

**Etablierung und funktionelle  
Charakterisierung eines transgenen,  
autochthonen Lebertumormodells**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Jasmin Teresa Ney**

aus Saarbrücken

Bonn, Mai 2008

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie an der Universitäts-Klinik Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. R. Büttner
2. Referent: Prof. Dr. D. Fürst

Tag der Promotionsprüfung: 17.09.2008

## **Erklärung zur Urheberschaft**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Jasmin Teresa Ney, im Mai 2008

*Meinen Eltern*





## Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen der Leber zählen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Herkömmliche Therapiestrategien, wie die radikale Resektion, die Bestrahlung und die chemotherapeutischen Ansätze bergen oftmals hohe Risiken für den Patienten. Basierend auf Befunden, daß entartete Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt werden können, sind neuartige Modellsysteme notwendig, um immuntherapeutische Ansätze bei der Behandlung von Lebertumoren einzusetzen.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges, autochthones Lebertumormodell unter Verwendung des Protoonkogens *c-myc* und des Modellantigens OVA (Ovalbumin) mit Hilfe des binären, induzierbaren Tet Systems von H. Bujard generiert. Es konnten zwei Mauslinien etabliert werden, die nach Verpaarung mit leberspezifischen Reportermäusen (LAP tTA; Kistner et al. 1996) und neonataler bzw. embryonaler Induktion eine ähnliche Hepatokarzinogenese wie die publizierten *c-myc* tg+ Mäuse aufwiesen (Beer et al. 2004). Im Unterschied zu dem normalen, angrenzenden Lebergewebe, konnte eine starke OVA Expression, beschränkt auf das maligne Lebertumorgewebe, immunhistochemisch nachgewiesen werden. Transferierte OVA spezifische CD8+ T-Zellen regulierten in den *c-myc/OVA* 75 tg+ Mäusen CD69 hoch, was auf eine Stimulierung dieser Zellen hindeutet. 24 h nach adoptivem T-Zelltransfer akkumulierten die OVA spezifischen T-Zellen vorwiegend im Lebertumorbereich. Nach 66 h bzw. 5 d waren sie neben der Leber auch in sekundär lymphatischen Organen, wie der Milz, dem ILK und LLK, nachweisbar. An der Antigenpräsentation waren tumorassoziierte und milzassoziierte Dendritische Zellen (DC) beteiligt, die in ihrer Anzahl im Lebertumorbereich vermehrt waren. Entgegen der frühen Stimulierung der OVA spezifischen T-Zellen und Akkumulation in dem Lebertumorbereich, blieb eine effektive Tumorregression und *in vivo* Zytotoxizität aus. Weiterhin waren die transferierten T-Zellen in den *c-myc/OVA* 75 tg+ Mäusen nicht in der Lage, nach *in vitro* Restimulation IFN- $\gamma$  zu produzieren. Diese Beobachtungen zeigen, daß die OVA spezifischen T-Zellen in den *c-myc/OVA* 75 tg+ Mäusen toleriert wurden. Selbst durch eine Vakzinierung mit CpG ODN und OVA konnte die Toleranz nicht aufgehoben werden. Die Toleranzinduktion hängt vermutlich mit der bereits 24 h nach zelladoptivem Transfer auftretenden und anhaltenden (5 d nach Transfer) partiellen Herunterregulation des T-Zellrezeptors (TZR) zusammen.

Es konnte somit ein neuartiges Tumormodell etabliert werden, welches der realen Situation einer Hepatokarzinogenese in Patienten ähnelt und für die Anwendung von gezielten, antigenspezifischen Tumorthérapien genutzt werden kann.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Zusammenfassung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	2
1.1.2.1 Antigenpräsentation.....	3
1.1.2.2 T-Zellaktivierung.....	4
1.1.2.3 Signaltransduktion der T-Zellaktivierung.....	7
1.1.2.4 Abschalten der Immunantwort und Gedächtnisbildung.....	8
1.1.3 Die T-Zelltoleranz.....	9
1.1.3.1 Zentrale Toleranzinduktion.....	9
1.1.3.2 Periphere Toleranzinduktion.....	10
1.2 Tumormimmunologie.....	13
1.2.1 Die „ <i>immune surveillance</i> “ und „ <i>immune editing</i> “ Hypothese.....	14
1.2.2 Tumorantigene.....	15
1.2.3 Effektormechanismen gegen Tumore.....	18
1.2.4 Tumorevasionsmechanismen.....	18
1.2.5 Immuntherapien gegen Tumore.....	21
1.3 Lebererkrankungen und Tumormodelle.....	23
1.3.1 Maligne Erkrankungen der Leber.....	23
1.3.2 Tumortransplantationsmodelle versus autochthone Tumormodelle: Vorteile und Nachteile.....	24
1.3.3 Autochthone Lebertumormodelle.....	25
1.4 Zielsetzung.....	28

2. Material und Methode.....	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.3 Allgemeine Chemikalien.....	35
2.1.4 Verwendete Enzyme.....	38
2.1.5 Chemikalien und Medien für die Zellkultur.....	39
2.1.6 Allgemeine Lösungen.....	39
2.1.7 Lösungen für die Bakterienkultur.....	41
2.1.8 Lösungen für Gordon Färbung.....	41
2.1.9 Lösungen für Western Blot Analyse.....	41
2.1.10 Lösungen für die Zellkultur.....	42
2.1.11 Verwendete Kits.....	42
2.1.12 Verwendete Primärantikörper.....	43
2.1.13 Verwendete Sekundärantikörper.....	44
2.1.14 Magnetische Kügelchen („ <i>MicroBeads</i> “.....)	44
2.1.15 Oligonukleotide.....	45
2.1.16 Verwendete Plasmide.....	46
2.1.17 Verwendete Mauslinien.....	47
2.1.18 Verwendete Bakterienstämme.....	49
2.1.19 Verwendete Zelllinien.....	49
2.2 Methoden.....	50
2.2.1 Tierhaltung und Applikation <i>in vivo</i> .....	50
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.2.1 DNA Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus.....	51
2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	52
2.2.2.4 Analytischer und präparativer Verdau.....	52
2.2.2.5 Präparation von Dialyseschläuchen.....	53
2.2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten.....	53
2.2.2.6.1 Elektroelution von DNA-Fragmenten für die Pronukleus- injektion.....	53
2.2.2.6.2 Elution von DNA Fragmenten für sonstige Analysen.....	54

2.2.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen.....	54
2.2.2.8 Ethanol-Präzipitation nukleinsäurehaltiger Lösungen.....	54
2.2.2.9 Ligation von DNA.....	55
2.2.2.10 Ligation von Oligonukleotiden.....	55
2.2.2.11 Alkalische Phosphatase Behandlung.....	55
2.2.2.12 Herstellung von Agarplatten.....	56
2.2.2.13 Zucht von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ).....	56
2.2.2.14 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	56
2.2.2.15 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien.....	56
2.2.2.16 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („ <i>Mini Präp</i> “).....	57
2.2.2.17 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („ <i>Maxi-Präp</i> “).....	57
2.2.2.18 Konzentrationsbestimmung nukleinsäurehaltiger Lösungen im Photometer.....	58
2.2.2.19 Sequenzierung von Nukleinsäuresequenzen.....	58
2.2.2.19.1 Sequenzierung.....	59
2.2.2.19.2 Ethanol-Präzipitation der Sequenzierungsreaktionen.....	60
2.2.2.19.3 Probenvorbereitung für Sequenzer-Analyse.....	60
2.2.2.20 RNA-Isolierung aus Geweben.....	60
2.2.2.21 cDNA Synthese.....	61
2.2.2.22 Expressionsnachweis mittels RT (Reverse Transkriptase)-PCR.....	61
2.2.3 Histologische Methoden.....	62
2.2.3.1 Fixierung von Frischgewebe.....	62
2.2.3.2 Einbetten von fixiertem Frischgewebe.....	62
2.2.3.3 Herstellung von Paraffinschnitten.....	63
2.2.3.4 Herstellung von Kryoschnitten.....	63
2.2.3.5 Hämatoxylin Eosin- (HE) Färbung.....	63
2.2.3.6 Immunhistochemie von Paraffinschnitten.....	64
2.2.3.7 Gordon Färbung.....	64
2.2.3.8 Immunhistochemie von Zellen.....	65
2.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten.....	66
2.2.3.10 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	66

2.2.3.11 TUNEL ( <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling</i> ) Methode.....	67
2.2.4. Zellkulturmethoden.....	68
2.2.4.1 Auftauen von Zellen.....	68
2.2.4.2 Zelllinien und ihre Kultivierung <i>in vitro</i> .....	68
2.2.4.3 Primäre Zellen und ihre Kultivierung <i>in vitro</i> .....	69
2.2.4.4 Ermittlung der Zellzahl.....	69
2.2.4.5 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....	70
2.2.4.6 Generierung primärer Fibroblasten aus Mausohrbiopsien.....	70
2.2.4.7 Transiente Transfektion primärer Fibroblasten.....	71
2.2.4.8 Transiente Transfektion von HeLa tTA und MEF tTA (Calcium-Phosphat-Präzipitation).....	71
2.2.5. Proteinchemische Methoden.....	72
2.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellen.....	72
2.2.5.2 Proteinextraktion aus Gewebe.....	72
2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	73
2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	73
2.2.5.5 Western Blot („ <i>wet blot</i> “.....)	74
2.2.5.6 Coomassie-Färbung.....	76
2.2.6. Gewinnung primärer Zellsuspensionen.....	76
2.2.6.1 Isolierung primärer Zellen aus der Milz und den Lymphknoten.....	76
2.2.6.1.1 Isolierung CD8 <sup>+</sup> Zellen aus der Milz und den Lymphknoten.....	76
2.2.6.1.2 Isolierung CD11c <sup>+</sup> Dendritischer Zellen aus der Milz.....	77
2.2.6.2 Isolierung primärer Zellen aus der Leber.....	78
2.2.6.2.1 Isolierung leberassoziiertes Lymphozyten.....	78
2.2.6.2.2 Isolierung leberassoziiertes CD11c <sup>+</sup> Dendritischer Zellen ....	78
2.2.6.3 Isolierung spezifischer Zellen durch magnetische Zellseparation (MACS).....	79
2.2.6.4 Isolierung primärer Zellen aus peripherem Blut.....	80
2.2.7. Immunfluorometrische Methoden.....	81
2.2.7.1 Immunfluoreszenzmessung am Durchflußzytometer.....	81
2.2.7.2 Markierung von Oberflächenantigenen und Fixierung.....	81

2.2.7.3 Markierung intrazellulärer Antigene.....	82
2.2.7.4 Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen.....	83
2.2.7.5 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest (nicht-radioaktiv).....	84
2.2.7.6 <i>Cytometric Bead Array</i> .....	85
2.2.9 Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion): Generierung von c-myc/OVA transgenen Mäusen.....	85
2.2.8 Statistische Analysen.....	87
3. Ergebnisse.....	88
3.1 Generierung c-myc/OVA transgener Mäuse.....	88
3.1.1 Das Tet System.....	88
3.1.2 Klonierung des pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> Plasmids.....	89
3.1.3 Expressionsnachweis von c-myc und OVA <i>in vitro</i> .....	94
3.1.4 Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion) und Analyse der Founder.....	97
3.2 Phänotypbeschreibung c-myc/OVA transgener Mäuse.....	101
3.2.1 Tumorinduktionsexperimente.....	101
3.2.2 Histologie.....	102
3.2.3 Expressionsnachweis von c-myc und OVA in c-myc/OVA tg+ Mäusen.....	104
3.3 Immunologische Analyse c-myc/OVA 75 transgener Mäuse.....	107
3.3.1 Endogene CD3+ CD8+ T-Zellverteilung.....	107
3.3.2 Akkumulation naiver OT I T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und Infiltration in den Tumorknoten.....	108
3.3.3 Akkumulation tumorassoziierter Dendritischer Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und Präsentation von OVA <i>in vitro</i> .....	113
3.3.4 Ausbleibende <i>in vivo</i> zytotoxische T-Zellaktivität transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	116
3.3.5 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc /OVA tg+ Mäusen.....	119
3.3.6 Fehlende IFN- $\gamma$ Produktion der transferierten OT I T-Zellen und fehlende <i>in vivo</i> Zytotoxizität nach zusätzlicher CpG ODN und OVA Immunisierung in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	125
3.3.7 Partielle Herunterregulation des T-Zellrezeptors, als möglicher Toleranzmechanismus.....	128

4. Diskussion.....	132
4.1 Phänotypvergleich.....	133
4.1.1 c-myc induzierte Hepatokarzinogenese.....	133
4.1.2 c-myc und OVA Expression.....	135
4.2 Immunologische Analyse.....	136
4.2.1 Frühe tumorspezifische Antigenerkennung in der Leber und verzögerte Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen.....	136
4.2.2 Fehlende Tumorregression nach adoptivem Transfer antigenspezifischer CD8+ T-Zellen.....	138
4.2.3 Toleranzinduktion in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	141
4.2.4 Partielle Herunterregulation des T-Zellrezeptors, ein möglicher Mechanismus in der Toleranzinduktion.....	144
4.2.5 Vakzinierung mit CpG ODN und OVA führt nicht zur Aufhebung der Toleranz.....	145
4.3 Ausblick.....	147
5. Literatur.....	149
6. Anhang.....	170
6.1 Lebenslauf.....	170
6.2 Publikationen.....	172
6.3 Posterpräsentationen.....	172
6.4 Vorträge.....	173

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Schematische Darstellung der Interaktion einer APC mit einer CD8+ T-Zelle..	5
Abb.1.2 Schematische Darstellung der Interaktion einer APC mit einer CD4+ T-Zelle und zusätzliche Stimulierung einer CD8+ T-Zelle.....	6
Abb.1.3 Schematische, vereinfachte Übersicht über den Signaltransduktionsweg einer T-Zellaktivierung.....	7
Abb.1.4 Tumorabhängige Evasionsmechanismen.....	19
Abb.1.5 Tumorevasionsmechanismen durch gezielte Inhibierung der Immunantwort.....	20
Abb.1.6 Funktionale Domänen von c-myc und Interaktion mit MAX.....	27
Abb.3.1 Schematische Darstellung des binären, induzierbaren Tet-off Systems und Verpaarungsschema.....	88
Abb.3.2 Schematische Übersicht der in pBluescript II KS(+) klonierten humanen <i>c-myc</i> cDNA.....	90
Abb.3.3 <i>NotI/SalI</i> Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBluescript II KS(+) <i>c-myc</i> Plasmids. ....	90
Abb.3.4 Asymmetrischer Restriktionsverdau von pBluescript II KS(+) <i>c-myc</i> .....	91
Abb.3.5 <i>NotI/SalI</i> Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBI-4 <i>c-myc</i> Plasmids.....	91
Abb.3.6 Einführen einer <i>MluI</i> Schnittstelle in pBluescript II KS(+) <i>OVA</i> .....	92
Abb.3.7 Einbringen einer <i>NheI</i> Schnittstelle in pBluescript II KS <i>OVA MluI</i> .....	93
Abb.3.8 <i>MluI/NheI</i> Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> Plasmids.....	93
Abb.3.9 Endkonstrukt pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> .....	94
Abb.3.10 Expressionsnachweis (Western Blot) von c-myc und OVA nach transienter Transfektion mit pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> in MEF tTA bzw. HeLa tTA Zelllinien.....	95
Abb.3.11 Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie transient transfizierter MEF tTA und HeLa tTA Zellen mit pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> .....	96
Abb.3.12 Übersicht über die Pronukleusinjektion.....	97
Abb.3.13 PCR-Analyse der geborenen Nachkommen aus der Pronukleusinjektion und anschließender Transfer der manipulierten Eizellen.....	99
Abb.3.14 Immunfluoreszenzfärbungen transient transfizierter Mausohrfibroblasten.....	100

Abb.3.15 Kaplan-Meier Kurven .....	101
Abb.3.16 Leber-Phänotyp neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 100 tg+ und c-myc tg+ Mäuse.....	103
Abb.3.17 Leber-Phänotyp embryonal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.....	104
Abb.3.18 RT PCR Analyse neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.....	105
Abb.3.19 Western Blot Analyse neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.....	105
Abb.3.20 Immunhistochemischer Ovalbumin Nachweis in der Leber von neonatal und embryonal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	106
Abb.3.21 Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	108
Abb.3.22 Akkumulation und Stimulierung naiver OT I T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse nach 24 h.....	110
Abb.3.23 Infiltration naiver OT I T-Zellen in den Lebertumorknoten c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse (nach 24 h).....	112
Abb.3.24 Akkumulation tumorassoziierter Dendritischer Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.....	114
Abb.3.25 <i>In vitro</i> Aktivierung von B3Z Zellen durch leber- und milzassoziierte Dendritische Zellen aus c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	115
Abb.3.26 Fehlende <i>in vivo</i> Zytotoxizität transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	116
Abb.3.27 Fehlende zusätzliche Tumorzellnekrosen / -apoptosen nach OT I T-Zellinjektion in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (TUNEL-Färbung).....	118
Abb.3.28 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	120
Abb.3.29 Akkumulation CD3+ CD8+ T-Zellen im Lebertumorgewebe von c-myc/OVA 75tg+ Mäusen, in die OT I T-Zellen injiziert wurden (Immunfluoreszenzfärbung nach 5 d).....	121
Abb.3.30 Akkumulation CD3+ CD8+ T-Zellen im Lebertumorgewebe c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse, transferiert mit OT I T-Zellen und CD3+ CD8- T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen ohne OT I T-Zellinjektion (nach 5 d).....	122
Abb.3.31 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen in der Leber nach 66 h und Verteilung auf sekundär lymphatische Organe nach 5 d.....	124
Abb.3.32 Fehlende IFN- $\gamma$ Produktion transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	126

---

Abb.3.33 Fehlende <i>in vivo</i> Zytotoxizität in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen auch nach zusätzlicher Vakzinierung mit CpG ODN und OVA.....	127
Abb.3.34 Partielle Herunterregulation des TZR der transferierten OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.....	129
Abb.3.35 Histogrammdarstellung der partiellen Herunterregulation des T-Zellrezeptors der transferierten OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen und Vergleich zu den endogenen CD8+ T-Zellen.....	130
Abb.3.36 Zusammenstellung der immunologischen Ergebnisse und Vergleich zwischen toleranten T-Zellen und Effektorzellen.....	131

**Tabellenverzeichnis**

Tab.2.1	Verwendete Antikörper gegen Oberflächenmarker und intrazelluläre Epitope...	43
Tab.2.2	Verwendete Plasmide, ihre Beschreibung und Referenzquelle.....	46
Tab.2.3	Verwendete Mauslinien, ihre Beschreibung und Referenzquelle.....	47
Tab.2.4	Verwendete Zelllinien, ihre Beschreibung und Referenzquelle.....	49
Tab.2.5	Übersicht über Pipettierschemata und Programme der Genotypisierungs-PCR.....	51
Tab.2.6	Pipettierschema der Sequenzierungsreaktion.....	59
Tab.2.7	Übersicht über verwendete Pipettierschemata und Programme für die RT-PCR Ansätze.....	61
Tab.2.8	Verwendete Antikörper und Vorbehandlungsbedingungen für die Immunhistochemie.....	64
Tab.2.9	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen für die Immunfluoreszenzfärbung von Geweben und Zellen.....	67
Tab.2.10	Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.....	74
Tab.2.11	Verwendete Primär- (links) und Sekundärantikörper (rechts) sowie die eingesetzten Verdünnungen bei der Western Blot Analyse.....	75
Tab.3.1	Übersicht über die Ergebnisse der Pronukleusinjektion.....	98

## Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
μg	mikro-Gramm
μl	mikro-Liter
μm	mikro-Meter

### A

A	Arginin
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AFP	α-Fetoprotein
AICD	„ <i>activation-induced cell death</i> “
AINR	„ <i>activation-induced-unresponsiveness</i> “
AIRE	„ <i>autoimmune regulator</i> “
Ak	Antikörper
Amp.	Ampicillin
AMV	„ <i>Avian Myeloblastosis Virus</i> “
AP-1	„ <i>activator protein-1</i> “
APC	Allophycocyanin; Antigen präsentierende Zelle („ <i>antigen presenting cell</i> “)
APS	Ammoniumpersulfat

### B

BAP	Alkalische Phosphatase („ <i>Bacterial Alkaline phosphatase</i> “)
BES	N, N, Bis [2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Bereich
bio	biotinyliert
<i>bla</i>	β-Laktamase
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin

B3Z	CD8+ T-Zellhybridom
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise

**C**

°C	Grad Celsius
C	Cytosin; Cystein
ca.	circa
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen („ <i>cluster of differentiation</i> “)
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA („ <i>copy DNA</i> “)
CFDA-SE	5-, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE	5-,6-Carboxyfluorescein Succinimidyl-Ester
cm	Zentimeter
CM	„ <i>central memory</i> “
CMV	Cytomegalovirus
cTEC	„ <i>cortical thymic epithelial cell</i> “
CTLA-4	„ <i>cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4</i> “

**D**

D	Dalton (1D = 1,6601 x 10 <sup>-27</sup> kg)
d	Tag
DABCO	1,4 Diazabicyclo (2.2.2) octan
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol, dilactat
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2,3`-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
D-MEM	Dulbecco's <i>Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EM	„effector memory“
engl.	englisch
et al.	und andere („et alteres“)
<b>F</b>	
FACS	Durchflußzytometer („fluorescence activated cell sorter“)
Fc	konstante Region
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<b>G</b>	
G	Guanin; Glycin
g	Gramm
G-418	Geneticin
β-Gal	β-Galaktosidase
GBSS	„Gey's Balanced Salt Solution“
GlyCAM-1	„glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1“
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony-stimulating factor“
griech.	griechisch
<b>H</b>	
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Viren
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCG	„human chorionic gonadotropin“
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie

---

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HEV	„ <i>high endothelial venules</i> “
HPF	„ <i>high power field</i> “
HPLC	„ <i>high performance liquid chromatography</i> “
HRP	Meerrettich Peroxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)

**I**

ICAM-1	„ <i>intercellular adhesion molecule-1</i> “
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	inguinaler Lymphknoten
IMMEI	Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie
ISCOM	„ <i>immuno stimulating complex</i> “
ITAM	„ <i>immune receptor tyrosine-based activation motif</i> “

**K**

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIR	„ <i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i> “
KLS	Kernlokalisationssignal

**L**

L	Liter; Ligand
LAP	„ <i>liver-enriched activator protein</i> “
lat.	lateinisch
LB	Luria Bertani
LFA	„ <i>lymphocyte function-associated antigen</i> “
LLK	leberdrainierender Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	lebersinusoidale Endothelzellen („ <i>liver sinusoidal endothelial cell</i> “)
LZ	Leuzin-Zipper

**M**

M	Molar
m	milli
MACS	Magnetische Zellsortierung („ <i>magnetic activated cell sorter</i> “)
MAP	„ <i>mitogen-activated protein</i> “
MB I / II	Myc Box I / II
MEF	Mausembryonale Fibroblastenzelllinie
Mio.	Millionen
mg	milli-Gramm
MHC	Haupthistkompatibilitätskomplex („ <i>major histocompatibility complex</i> “)
min	Minute
ml	milli-Liter
mM	milli-Molar
mm	milli-Meter
mTEC	„ <i>medullary thymic epithelial cell</i> “

**N**

n	nano; Anzahl
NFAT	„ <i>nuclear factor of activated T-cells</i> “
NF-κB	„ <i>nuclear factor-kappa B</i> “
ng	nano-Gramm
NIH-3T3	Maus-Fibroblasten-Zelllinie
NK	Natürliche Killer
NOD	„ <i>non-obese diabetic</i> “

**O**

OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
3`-OH	3`Hydroxylgruppen
OVA	Ovalbumin (Eiweiß)

**P**

p	piko
P	Prolin

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	„ <i>pathogen-associated molecular patterns</i> “
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS-Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	„ <i>programmed death-1</i> “
PD-L1	„ <i>programmed death ligand-1</i> “
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	„ <i>potenia hydrogenii</i> “
PKC	Proteinkinase C
PMS	„ <i>pregnant mares serum</i> “
PolyI:C	„ <i>polyinosinic:polycytidylic acid</i> “
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polivinyliden Difluorid

**R**

R	Rezeptor
RAG	„ <i>recombinase-activating gene</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
-RT	RT-PCR Ansatz ohne AMV-Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
rtTA	reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator

**S**

S	Serin
SCID	„ <i>severe combined immunodeficiency</i> “
SD	Standardabweichung („ <i>standard deviation</i> “)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40 Tag	T-Antigen des Simian Virus

**T**

TAA	tumorassoziierte Antigen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	„transforming growth factor-beta“
Th1	Typ 1 T-Helferzelle
Th3	Typ 3 T-Helferzelle
Thy1.1	„thymocyte differentiation antigene 1.1“
TIL	„tumor-infiltrating lymphocytes“
TLR	„toll-like receptors“
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tr1	Typ 1 regulatorische T-Zelle
Treg	CD4 <sup>+</sup> T-regulatorische Zellen
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
TUNEL	„Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling“
TZR	T-Zellrezeptor

**U**

U	unit (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
UTP	Uridin
UV	ultraviolettes Licht

**V**

V	Volt; Valin
---	-------------

**Z**

ZAP-70	ξ-assozierte Protein
z.B.	zum Beispiel
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes, biologisches Abwehrsystem, bestehend aus verschiedenen Organen, Zellen und Molekülen, die miteinander interagieren. Die Hauptaufgaben des Immunsystems bestehen in der effektiven Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten, sowie in der Kontrolle entarteter, körpereigener Zellen (Krebszellen).

Das Immunsystem läßt sich in die angeborene (innate) und erworbene (adaptive) Immunabwehr unterteilen, die in einem engen Kommunikationsverhältnis miteinander stehen. In beiden Systemen sorgen unterschiedliche Zellen dafür, eingedrungene Erreger zu erkennen und zu eliminieren.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die innate Immunabwehr stellt den phylogenetisch älteren Teil dar, dessen Zellen und Moleküle für eine schnelle Immunreaktion verantwortlich sind. Dazu zählen neben anatomischen und physiologischen Barrieren wie Epithelien, auch eine Abwehr durch zellvermittelte Phagozytose oder durch die Freisetzung bakterizider Substanzen. Die obersten Hautschichten stellen aufgrund des pH-Wertes einen wirkungsvollen Schutzmechanismus für eingedrungene Krankheitserreger dar. Schafft es ein pathogener Keim dennoch die natürlichen Epithelbarrieren zu überwinden, sind neben Makrophagen, Granulozyten, Dendritischen Zellen (DC<sup>1</sup>) auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an der ersten Abwehr beteiligt.

Ein wichtiger Bestandteil der innaten Immunabwehr stellt das Komplementsystem dar (Tomlinson 1993). Es besteht aus einer Anzahl verschiedener Plasmaproteine mit unterschiedlichen Funktionen. Zum einen sind sie in der Lage Bakterien durch Porenbildung in deren Membranen zu schädigen, zum anderen können sie phagozytierende Abwehrzellen an den Entzündungsort locken und deren Vernichtung beschleunigen. Weiterhin sind einige Komponenten in der Lage sich an extrazelluläre Krankheitserreger zu binden und somit das

---

<sup>1</sup> *engl.*: dendritic cell

Erkennen und die Aufnahme des Erregers durch Makrophagen, die Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, zu erleichtern. Dabei werden die Pathogene durch die Produktion von reaktiven Substanzen wie OH-Radikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zerstört (Takao et al. 1996).

Die Immunzellen der innate Immunabwehr exprimieren Rezeptoren (PRR<sup>2</sup>), die bestimmte hoch konservierte, weit verbreitete, mikrobielle oder virale Muster (PAMPs<sup>3</sup>) erkennen, wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan oder Lipoteichonsäuren (Wright et al. 1990; Medzhitov und Janeway 1997; Medzhitov 2001). Zu diesen Rezeptoren gehören zehn sogenannte TLRs<sup>4</sup>, die eine Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst ermöglichen. Eine Stimulation eines TLRs führt bei DCs zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD40), was zu einer Aktivierung der Zelle beiträgt (Banchereau und Steinman 1998). Diese stimulierten Antigen präsentierenden Zellen (APC<sup>5</sup>) des innate Immunsystems induzieren eine Aktivierung der antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort (Janeway 2001).

Neben den Makrophagen, Granulozyten und DCs spielen auch NK-Zellen bei dem angeborenen Immunsystem eine entscheidende Rolle. Sie sind in der Lage virusbefallene Zellen abzutöten (Di Santo et al. 1998) und werden durch die von Makrophagen produzierten Zytokine IL-12, IL-15 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aktiviert und zur Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Produktion angeregt.

Die schnelle Immunantwort des innate Immunsystems über Makrophagen, Granulozyten, DCs und NK-Zellen führt bei den meisten Infektionen zu einer Eliminierung des Krankheitserregers. Über das innate Immunsystem wird die Aktivierung des adaptiven Immunsystems, welches eine gezielte antigenspezifische Immunantwort beinhaltet, induziert.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Basierend auf der somatischen Rekombination und Modifikation verschiedener Gensegmente, ist das adaptive Immunsystem in der Lage eine enorme Variabilität an verschiedenen antigenspezifischen Rezeptoren zu bilden und somit spezifisch fremde Antigene zu erkennen, zu eliminieren und ein Gedächtnis auszubilden. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen T- und B-Zellen, die nach ihrem Reifungsort benannt sind. Während B-Zellen sich im Knochenmark (äquivalent zur Bursa Fabricii bei Vögeln) entwickeln und heranreifen,

---

<sup>2</sup> *engl.*: pattern recognition receptors

<sup>3</sup> *engl.*: pathogen-associated molecular patterns

<sup>4</sup> *engl.*: toll-like receptors (sind homolog zu dem Drosophila Protein Toll)

<sup>5</sup> *engl.*: antigen presenting cell

entwickeln sich die T-Vorläuferzellen zwar im Knochenmark, reifen jedoch im Thymus heran. Man unterscheidet eine durch die B-Zellen vermittelte humorale Abwehr von einer zellulären Abwehr, an der hauptsächlich die T-Zellen beteiligt sind. Die T-Zellpopulation gliedert sich in CD4+ T-Helferzellen und die zytotoxischen CD8+ T-Zellen. Sie erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) von APCs prozessierte Antigene, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC<sup>6</sup>) gebunden sind (Zinkernagel und Doherty 1974). MHC Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die Antigene binden und diese den T-Zellen präsentieren können.

B-Lymphozyten hingegen produzieren spezifische Antikörper, nachdem sie durch CD4+ T-Zellen oder bestimmte mikrobielle Antigene stimuliert wurden.

Im Unterschied zu dem innaten Immunsystem, persistieren Zellen des adaptiven Immunsystems als Gedächtniszellen und können bei einem zweiten Kontakt des selben Erregers für eine schnellere und effektivere Eliminierung sorgen. Das immunologische Gedächtnis ist langlebig und spezifisch.

### 1.1.2.1 Antigenpräsentation

Die beiden wichtigen Untergruppen der T-Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihren Effektorfunktionen und den Korezeptoren CD4+ und CD8+, die sie auf der Oberfläche exprimieren, sondern auch in dem MHC Typ, welchen sie erkennen. CD4+ T-Zellen erkennen Antigene im Kontext mit MHC II, während CD8+ T-Zellen prozessierte Antigene zusammen mit MHC I erkennen.

MHC Klasse I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und spielen bei der viralen Abwehr und damit verbundenen Präsentation zytosolischer Peptide eine Rolle. Die Beladung erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum. Die durch die Präsentation viraler Peptide aktivierten CD8+ T-Zellen sind in der Lage zu Effektorzellen zu differenzieren und die befallenen Körperzellen zu lysieren.

Bestimmte APCs wie CD8 $\alpha$ + DCs, Makrophagen und B-Zellen verfügen über einen gesonderten Mechanismus auch exogene Antigene zusammen mit MHC I Molekülen zu präsentieren (Carbone und Bevan 1990; Kurts et al. 1996) Dieser Mechanismus wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Bevan 1976; Moore et al. 1988; Rock et al. 1990; Shen et al.

---

<sup>6</sup> *engl.*: major histocompatibility complex

1997). Das exogen aufgenommene Antigen wird aus dem Phagosom in das Zytosol geschleust und durch das Proteasom, ähnlich wie zelleigene Proteine, prozessiert und in den MHC I Präsentationsweg eingeschleust (Kovacsovics-Bankowski und Rock 1995). Auf diesem Weg können auch Tumorantigene aufgenommen und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden (Sotomayor et al. 2001; van Mierlo et al. 2004).

Extrazelluläre Antigene werden im endosomatischen Abbauweg proteolytisch zu Peptiden zerkleinert und im Kontext mit MHC Klasse II Molekülen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. MHC II Moleküle werden ausschließlich von professionellen APCs wie DCs, Makrophagen und B-Zellen konstitutiv exprimiert. Nicht professionelle APCs hingegen exprimieren die MHC Moleküle erst nach Stimulierung durch Zytokine, wie z. B. IFN- $\gamma$ . Zu ihnen zählen unter anderem thymische bzw. vaskuläre Epithelzellen.

### 1.1.2.2 T-Zellaktivierung

Naive T-Zellen zirkulieren im Blutgefäß- und Lymphsystem um eingedrungene Krankheitserreger im Organismus aufzuspüren. Eine Aktivierung dieser Zellen erfolgt durch professionelle APCs (vorwiegend DCs), die hauptsächlich in den sekundär lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) lokalisiert sind. Naive T-Zellen müssen deswegen aus dem Blutgefäßsystem auswandern und in die sekundär lymphatischen Organe eindringen. An der Extravasation sind verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie L-Selektin (CD62L) beteiligt. Dieses bindet an vaskuläre Adressine, zu denen GlyCAM-1<sup>7</sup> und CD34 gehören, die auf sogenannten HEVs<sup>8</sup> im Lymphknoten vorkommen (Baumhüter et al. 1993).

Die Aktivierung einer T-Zelle durch eine professionelle APC erfolgt primär nach dem „2-Signal Modell“ (Janeway und Bottomly 1994; Abb.1.1). Die Erkennung des spezifischen MHC:Peptid Komplexes durch den TZR stellt das Signal 1 dar, während eine Aktivierung über kostimulatorische Moleküle wie z. B. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf den APCs zu dem Signal 2 zählen. B7.1 und B7.2 interagieren mit CD28 auf den T-Zellen (Linsley und Ledbetter 1993). Diese Interaktion löst eine Signalkaskade aus, was zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle und zur Produktion von IL-2 führt (Viola und Lanzavecchia 1996; Shaw und Dustin 1997). Weiterhin zählen eine Wechselwirkung von LFA-3<sup>9</sup> auf den

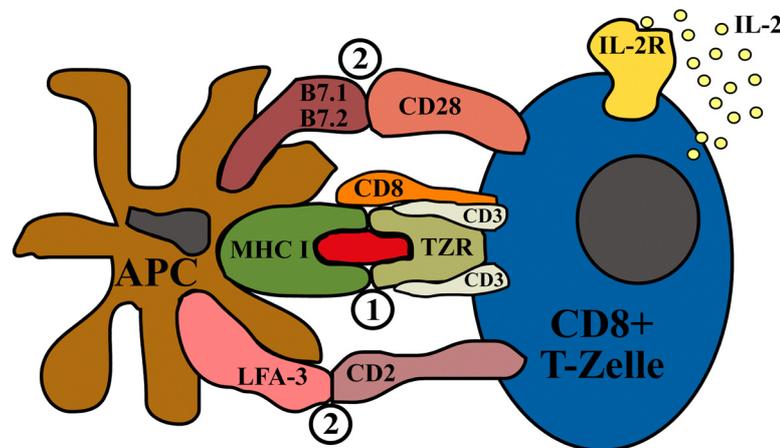
---

<sup>7</sup> engl.: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1

<sup>8</sup> engl.: high endothelial venules

<sup>9</sup> engl.: lymphocyte function-associated antigen 3

APCs mit CD2 auf den T-Zellen zu dem kostimulatorischen Signal 2 (Selvaraj et al. 1987). Bleibt das Signal 2 bei der T-Zellaktivierung aus, so werden diese anerg und somit inaktiv für weitere Signale (Schwartz 1996; Schwartz 1997).



**Abb.1.1 Schematische Darstellung der Interaktion einer APC mit einer CD8+ T-Zelle.** APCs nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie im Kontext mit MHC I den CD8+ T-Zellen (Signal 1; ①). Eine Interaktion der kostimulatorischen Moleküle B7.1, B7.2 mit CD28 sowie LFA-3 und CD2 liefert das 2. notwendige Signal (②) zur T-Zellstimulierung. Eine aktivierte CD8+ T-Zelle produziert unter anderem IL-2, welches an den hochaffinen IL-2 Rezeptor (IL-2R) binden kann.

Eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen benötigt neben der Antigenerkennung (Signal 1) und der Kostimulation (Signal 2) noch ein drittes Signal, was durch die Hilfe von CD4+ T-Zellen und deren Interaktion mit APCs erfolgt (Keene und Forman 1982; Cardin et al. 1996; Abb.1.2). Dabei spielen die Zytokine IL-2, IL-12 oder IFN $\alpha/\beta$  eine entscheidende Rolle.

Nach erfolgreicher Antigenstimulierung (Signal 1) und Kostimulation über B7.1, B7.2 und CD28 bzw. CD40 und CD40L produzieren CD4+ T-Zellen IL-2, welches autokrin als Wachstumsfaktor wirkt. IL-2 induziert die Expression von Zellzyklusproteinen, nachdem es an den hochaffinen IL-2 Rezeptor (IL-2R, CD25) gebunden hat (Moon et al. 2001). Während die T-Zellen durch Antigenkontakt in die G1-Phase des Zellzyklus eingetreten sind, können sie nach IL-2 Bindung den kompletten Zellzyklus durchlaufen, was zu deren klonaler Expansion führt. Ebenso kann IL-2 die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen verstärken (Gollob et al. 1999) und ist auch für die Differenzierung von IFN- $\gamma$  produzierenden Effektor T-Zellen (CD8+) und deren zytotoxischen Aktivität notwendig (Malek et al. 2001).

Nur reife DCs sind in der Lage naive T-Zellen durch die Bereitstellung der Kostimulation und der Sekretion verschiedener Zytokine zu stimulieren (Granucci et al. 2001; Granucci et al. 2003), wodurch sie ein Bindeglied zwischen innatem und adaptivem Immunsystem darstellen (Pasare und Medzhitov 2004; Pasare und Medzhitov 2005).

In nicht lymphoiden Geweben kommen DCs nur in einem unreifen Zustand vor. Erhalten sie ein „*Danger*“ Signal über die Bindung von TLR<sup>10</sup> beginnen sie zu reifen (Matzinger 1994) und ihre Migrationseigenschaften zu ändern. Sie sind dann bevorzugt in den lymphatischen Organen wie der Milz und den Lymphknoten lokalisiert, wo auch die Interaktion mit den T-Zellen stattfindet (Banchereau und Steinman 1998; Banchereau et al. 2000). Sie werden durch eine Bindung von CD40 und CD40L oder über eine Aktivierung der TLR zur Produktion von IL-12 und IFN $\alpha/\beta$  angeregt, was die CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert (Curtsinger et al. 2003; Curtsinger et al. 2005; Valenzuela et al. 2005).

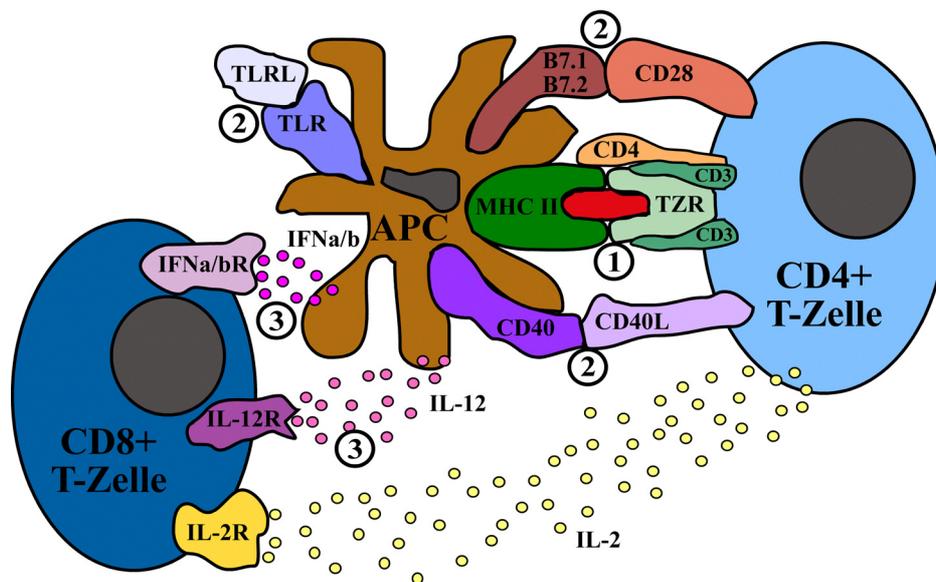


Abb.1.2 Schematische Darstellung der Interaktion einer APC mit einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle und zusätzliche Stimulierung einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle. APCs präsentieren exogene Antigene zusammen mit MHC II Molekülen, was von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird (1. Signal, ①). Zu den kostimulatorischen Molekülen zählen neben B7.1, B7.2 und CD28 auch CD40 und CD40L (2. Signal, ②). Für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie deren Aufrechterhaltung sind weiterhin noch Zytokine (IL-2, IL-12 und IFN $\alpha/\beta$ ) notwendig (3. Signal, ③). Eine Interaktion zwischen den CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der APC über Signal 1 und 2 ist ebenfalls notwendig (Abb.1.1), aber nicht eingezeichnet.

Neben den Zytokinen spielt bei der Aktivierung von naiven T-Zellen auch die Stärke des T-Zellrezeptorsignals eine entscheidende Rolle. Zum einen hängt dies mit der Konzentration des Antigens und der Kostimulation zusammen, zum anderen ist die Interaktionsdauer zwischen T-Zelle und APC entscheidend (Iezzi et al. 1998; Iezzi et al. 1999; Müller et al. 1999). Die Interaktion kann zwischen einigen Sekunden und mehreren Stunden dauern (Stoll et al. 2002).

<sup>10</sup> engl.: toll-like receptors ligand

### 1.1.2.3 Signaltransduktion der T-Zellaktivierung

Die Antigenerkennung über Peptid:MHC Komplexe (Signal 1) und eine Aktivierung über kostimulatorische Moleküle (Signal 2) bewirkt eine intrazelluläre Veränderungen des TZR und der CD3 Moleküle. Letztere sind mit dem TZR verbunden und ermöglichen die Signaltransduktion ins Zellinnere und somit die Aktivierung von Genen die für die Zellproliferation, Differenzierung und Ausbildung der Effektorfunktion notwendig sind (Abb.1.3).

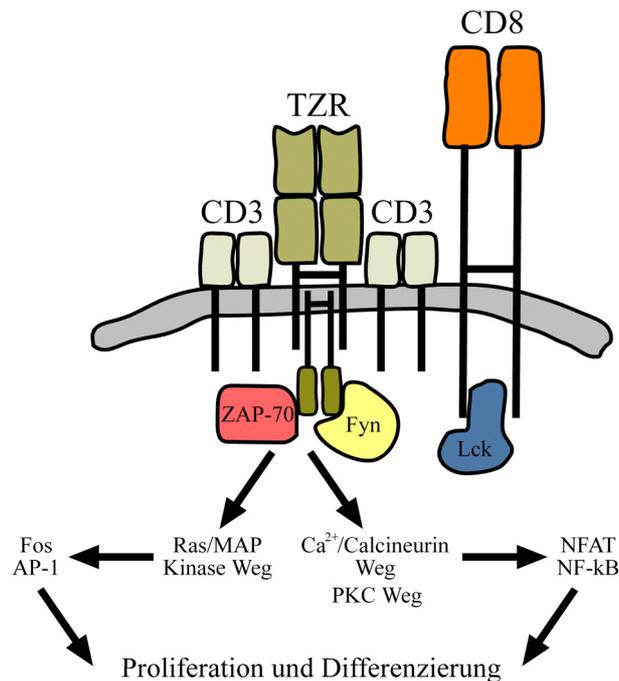


Abb.1.3 **Schematische, vereinfachte Übersicht über den Signaltransduktionsweg einer T-Zellaktivierung.** Dargestellt sind die drei Hauptwege der T-Zellaktivierung, der Ras/MAP Kinase Weg, Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin Weg und PKC Weg, die zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führen.

PKC Weg = Proteinkinase C Weg

Die ersten Schritte in der Aktivierung beruhen auf den beiden Tyrosinkinasen Lck und Fyn. Während Lck mit der zytoplasmatischen Domäne des Korezeptors CD8 oder CD4 verbunden ist, lagert sich Fyn nach Rezeptoraggregation an die zytoplasmatische CD3 ξ- und CD3 ε-Kette. Die beiden Tyrosinkinasen phosphorylieren bestimmte ITAM<sup>11</sup> Motive der CD3 ξ- und CD3 ε-Kette, so daß das ξ-assoziierte Protein (ZAP-70) binden kann. Anschließend folgt eine Phosphorylierung von ZAP-70, was zur Aktivierung von drei verschiedenen Signalwegen, dem Ras/MAP<sup>12</sup> Kinase Weg, dem Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin Weg und dem Proteinkinase C (PKC) Weg führt. Bei dem Ras/MAP Kinase Weg führt Ras zu einer

<sup>11</sup> engl.: immune receptor tyrosine-based activation motif

<sup>12</sup> engl.: mitogen-activated protein

Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren Fos und Jun, die sich zu dem Transkriptionsfaktor AP-1 zusammenlagern. Dieser kann an den Promotorbereich des IL-2 Gens binden und die IL-2 Expression ermöglichen, welche wiederum für die Differenzierung der T-Zelle in Effektor T-Zellen notwendig ist.

Weiterhin kommt es durch Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calcineurin Weg zur Aktivierung von NFAT<sup>13</sup>, welches in den Zellkern wandern kann und in Assoziation mit AP-1<sup>14</sup> aktiv wird. NFAT induziert über die Bindung an den IL-2 Promotor die Expression früher Gene der T-Zellaktivierung.

In dem dritten Signalweg, dem PKC Weg, führt die Proteinkinase C zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B<sup>15</sup>, welcher zusammen mit AP-1, NFAT zur Expression weiterer Gene führt, die eine Zellaktivierung und –proliferation ermöglichen.

#### 1.1.2.4 Abschalten der Immunantwort und Gedächtnisbildung

Nach erfolgreicher Eliminierung eines Erregers ist es unerlässlich, daß die Immunantwort herunterreguliert wird. Dies wird unter anderem durch die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen, wie TGF- $\beta$ <sup>16</sup>, IL-4 und IL-10 erreicht (Goletti et al. 1998; Moore et al. 2001). Um das zelluläre Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, werden überschüssige, aktivierte Lymphozyten vorwiegend über den Mechanismus der Apoptose eliminiert. Dazu nutzen die T-Zellen den selben Mechanismus wie zum Abtöten infizierter Zellen. Es kommt nach der Aktivierung einer T-Zelle, neben der Hochregulation von CD95 Ligand, auch zu einer Hochregulation von CD95, so daß eine aktivierte T-Zelle eine benachbarte T-Zelle abtöten kann (van Parijs und Abbas 1998).

Nach einer Immunantwort werden nicht alle Lymphozyten aus dem Körper eliminiert, sondern ein kleiner Teil spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen überlebt und bildet das für das adaptive Immunsystem charakteristische immunologische Gedächtnis. Dieses kennzeichnet sich durch seine Langlebigkeit aus und ermöglicht dem Organismus bei erneutem Kontakt mit dem selben Erreger, mit einer effizienteren und schnelleren, spezifischen Immunantwort zu reagieren (Tanchot et al. 1997; Duttan et al. 1998; Sprent und Surh 2001; Sprent und Surh 2002). Im Unterschied zu naiven T-Zellen benötigen Gedächtniszellen

---

<sup>13</sup> *engl.*: nuclear factor of activated T-cells

<sup>14</sup> *engl.*: activator protein-1

<sup>15</sup> *engl.*: nuclear factor-kappa B

<sup>16</sup> *engl.*: transforming growth factor-beta

geringere Antigenkonzentrationen zur Aktivierung (Zinkernagel et al. 1996) und sind weniger abhängig von kostimulatorischen Molekülen (Lanzavecchia et al. 2000).

Man unterscheidet zwei Subpopulationen von Gedächtniszellen, die „*central memory*“ (CM) und „*effector memory*“ (EM) T-Zellen. CM T-Zellen besitzen ein hohes proliferatives Potential und differenzieren erst nach Antigenkontakt. Sie befinden sich in den sekundär lymphatischen Organen. EM T-Zellen hingegen zirkulieren hauptsächlich durch nicht lymphatische Gewebe, reagieren auf einen primären Stimulus und sind in der Lage in kürzester Zeit Effektorfunktionen zu übernehmen (Sallusto et al. 1999; Sallusto et al. 2004).

Sezernierte Zytokine wie IL-15 und IL-7 können eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gedächtniszellen spielen (Zhang et al. 1998; Schluns et al. 2002).

### **1.1.3 Die T-Zelltoleranz**

Während der Reifung der T-Vorläuferzellen im Thymus entwickeln sich T-Zellen mit TZR unterschiedlichster Spezifität. Aufgrund der somatischen Rekombination und Hypermutation entsteht ein Repertoire von ca.  $10^{18}$  verschiedenen Spezifitäten, wodurch zum einen ein Schutz gegen fremde Pathogene sichergestellt werden kann, zum anderen sich aber auch T-Zellen entwickeln können, die körpereigene Selbstpeptide erkennen.

Im Rahmen der zentralen und peripheren Toleranzinduktion versucht der Körper sicherzustellen, daß solche potentiell autoreaktiven T-Zellen eliminiert bzw. durch unterschiedliche Mechanismen aktiv inhibiert werden.

#### **1.1.3.1 Zentrale Toleranzinduktion**

Die zentrale Toleranzinduktion, bei der ein großer Teil der potentiell autoreaktiven T-Zellen über den Mechanismus der klonalen Deletion eliminiert werden, erfolgt im Thymus. Dabei durchlaufen die T-Vorläuferzellen zunächst eine positive Selektion, bei der ein funktionaler TZR sichergestellt wird, der in der Lage ist mit den MHC Molekülen auf den Epithelzellen des Thymuscortex (cTEC<sup>17</sup>) zu interagieren. Anschließend werden die potentiell autoreaktiven T-Zellen eliminiert, was auf der Präsentation einer großen Anzahl

---

<sup>17</sup> *engl.*: cortical thymic epithelial cell

körpereigener Antigene durch medulläre Thymusepithelzellen (mTEC<sup>18</sup>) oder residenten DCs basiert (Palmer 2003). Die negative Selektion beruht auf einer Bindung potentieller autoreaktiver T-Zellen mit dem Peptid:MHC Komplex mit hoher Affinität, wodurch eine Apoptose eingeleitet wird (Starr et al. 2003). Die Expression der körpereigenen Proteine, die nur in bestimmten Geweben vorhanden sind oder nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert werden, erfolgt im Thymus mit Hilfe des Transkriptionsfaktors AIRE<sup>19</sup> (Anderson et al. 2002).

Trotz dieses effektiven Mechanismus der zentralen Toleranzinduktion, können in der Peripherie autoreaktive T-Zellen vorkommen, die der Selektion entgangen sind (Wucherpfennig et al. 1994). So werden beispielsweise autoreaktive T-Zellen, die eine niedrigere Affinität zwischen TZR und Peptid:MHC Komplex aufweisen, nicht im Zuge der zentralen Toleranz eliminiert. Dies kann zu Autoimmunerkrankungen führen (Liu et al. 1995; Bouneaud et al. 2000). Um eine Aktivierung dieser Zellen und damit das Aufkommen von Autoimmunerkrankungen zu minimieren, existieren Mechanismen, solche potentiell autoreaktiven T-Zellen zu eliminieren oder aktiv zu inhibieren. Diese Mechanismen zählen zur peripheren Toleranzinduktion.

### 1.1.3.2 Periphere Toleranzinduktion

Potentiell autoreaktive T-Zellen können, nachdem sie der zentralen Toleranz entkommen sind, in der Peripherie eliminiert bzw. in der Ausübung ihrer Effektorfunktion aktiv inhibiert werden. Zu den Mechanismen der peripheren Toleranz zählen Deletion, Anergie, adaptive Toleranz (*in vivo* Anergie), Ignoranz, Herunterregulation des TZRs oder/und Korezeptors und die Suppression der T-Zellantwort durch unreife oder tolerisierende DCs, sowie durch regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tregs).

Die Deletion autoreaktiver T-Zellen stellt eine effektive Methode der peripheren Toleranzinduktion dar. Es wurde beobachtet, daß bei diesem Mechanismus der Toleranzinduktion die Anzahl spezifischer T-Zellen zunächst zunahm, dann aber aufgrund des AICD<sup>20</sup> reduziert wurde (Webb et al. 1990; Kawabe und Ochi 1991). Dies stellt einen Prozess der Selbsttötung dar, bei dem durch wiederholte Aktivierung der T-Lymphozyten durch ihr

---

<sup>18</sup> *engl.*: medullary thymic epithelial cell

<sup>19</sup> *engl.*: autoimmune regulator

<sup>20</sup> *engl.*: activation induced cell death

spezifisches Antigen eine Fas abhängige Apoptose induziert wird (Klas et al. 1993; Nagata 1994; Dhein 1995). Da körpereigene Antigene permanent im System präsent sind, treffen potentiell autoreaktive T-Zellen repetitiv auf Selbst-Proteine, was ein möglicher Auslöser des AICD sein kann. Ebenso scheint der Wachstumsfaktor IL-2 eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion und somit der peripheren Toleranzinduktion zu spielen (Leonardo 1991). Das Fehlen von IL-2 oder der IL-2 Signalweiterleitung führt aufgrund unkontrollierter Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Autoimmunität (Sadlack et al 1995).

Eine Antigenerkennung durch Lymphozyten in Abwesenheit der kostimulatorischen Moleküle führt nicht zu einer klonalen Expansion mit anschließender Zytokinproduktion, sondern zur Anergie bzw. adaptiven Toleranz. Diese zählen ebenfalls zu den peripheren Toleranzmechanismen. T-Zell Anergie konnte zunächst *in vitro* (Feldmann 1983; Jenkins 1987), später auch *in vivo* experimentell gezeigt werden (Falb 1996).

T-Zell Anergie und adaptive Toleranz unterscheiden sich auf der Ebene der Signaltransduktion. Eine bevorzugt in aktivierten T-Zellen induzierte Anergie beruht auf der Blockade des Ras/MAP Kinase Weges, welcher durch Zugabe von exogenem IL-2 oder anti-Ox40 Signalen aufgehoben werden kann (Beverly et al. 1992; Appleman und Boussiotis 2003). Adaptive Toleranz wird hauptsächlich in naiven T-Zellen *in vivo* beobachtet und hängt mit einer frühen Blockade der Tyrosinkinase und somit mit einer Inhibition des Ca<sup>2+</sup> Signals zusammen. Die adaptive Toleranz kann durch die Zugabe von IL-2 nicht aufgehoben werden (Schwartz 2003; Chiodetti et al. 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß, neben einer unzureichenden Aktivierung durch kostimulatorische Moleküle, auch koinhibitorische Moleküle, wie z. B. CTLA-4<sup>21</sup> und PD-1<sup>22</sup> bei der Induktion der peripheren Toleranz durch DCs von Bedeutung sind (Probst et al. 2005). Eine besondere Form der Anergie konnte für CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben werden und wird als AINR<sup>23</sup> bezeichnet. Diese Zellen stellen nach 3-4 Tagen die Proliferation und IL-2 Produktion ein, produzieren allerdings noch IFN- $\gamma$  und zeigen zytotoxische T-Zellaktivität (Tham et al. 2002). Durch Zugabe von IL-2 oder CD4<sup>+</sup> T-Zellhilfe konnte die Anergie wieder aufgehoben werden (Schwartz 2003; Sun et al. 2004).

Es gibt autoreaktive T-Zellen, die zwar in der Peripherie vorhanden sind, ihr spezifisches Antigen allerdings ignorieren und somit funktionell die T-Zell Toleranz erhalten. Die Ignoranz von Antigenen tritt ein, wenn das Antigen durch physiologische Barrieren von den

---

<sup>21</sup> *engl.*: cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4

<sup>22</sup> *engl.*: programmed death-1

<sup>23</sup> *engl.*: activation-induced-nonresponsiveness

spezifischen T-Zellen getrennt wird (Zinkernagel 1996; Alferink et al. 1998) oder wenn das Antigen unterhalb einer Schwellendosis exprimiert wird, so daß es weder zur Aktivierung noch Deletion kommt (Kurts et al. 1998 a). Im Zuge einer Infektion kann es jedoch zu einer vermehrten Exposition dieser Antigene in einem proinflammatorischen und stimulatorischen Umfeld kommen, so daß der Zustand der Ignoranz gebrochen wird (Ohasi et al. 1991; Voehringer et al. 2000).

Die Herunterregulation des TZR und/oder Korezeptors stellt einen reversiblen Prozeß der peripheren Toleranzinduktion dar. Dies konnte in Mäusen gezeigt werden, die das MHC Klasse I Molekül K<sup>b</sup> auf Zellen des Neuroektoderms und den K<sup>b</sup>-spezifischen TZR exprimieren. Eine *in vitro* Stimulation dieser Zellen brachte den TZR wieder zum Vorschein (Schönrich et al. 1991). Auch eine alleinige Herunterregulation des Korezeptors CD8 ist beschrieben worden (Zhang et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine Herunterregulation des TZR auch von der Antigendosis abhängen kann. Eine niedrigere Antigendosis führt zu einer partiellen Herunterregulation des TZR, während eine höhere Antigendosis mit dem kompletten Verlust des TZR auf der Oberfläche korreliert (Ferber et al. 1994).

Die Präsentation von körpereigenen, apoptotischen Zellen durch unreife oder tolerisierende DCs stellt einen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranz dar. Kontinuierlich werden Selbst-Peptide von unreifen oder tolerisierenden DCs den autoreaktiven T-Zellen präsentiert (Kurts et al. 1996). Erkennen autoreaktive T-Zellen ihr Antigen, verlieren sie ihre Fähigkeit Effektorfunktionen auszuüben und werden anerg (Hawinger et al. 2001), deletiert (Albert et al. 2001) oder durch die Induktion regulatorischer T-Zellen aktiv inhibiert (Jonuleit et al. 2001; Walker und Abbas 2002). Weiterhin spielt auch eine niedrigere Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie die Expression koinhibitorischer Moleküle eine bedeutende Rolle, ebenso wie eine erhöhte IL-10 und eine fehlende Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-12 (Lutz und Schuler 2002; Goddard et al. 2004). Zudem führt eine Kreuzpräsentation von Selbst-Peptiden zu einer Toleranz, vermittelt durch die Deletion der autoreaktiven T-Zellen. Dieser Mechanismus wird als „*cross-tolerance*“ bezeichnet (Kurts et al. 1997; Heath et al. 1998).

Tregs können aktiv tolerogene DCs induzieren. In einem humanen *in vitro* System differenzierten DCs, die mit Tregs kokultiviert wurden zu tolerogenen DCs, die Anergie in alloreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auslösen (Chang et al. 2002). In der Maus hingegen können Tregs über CTLA-4 die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DCs erhöhen und einen tolerogenen Phänotyp erzeugen (Fallarino et al. 2003).

Zum anderen sind Tregs in der Lage, aktiv autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu supprimieren (Groux et al. 1997). Es werden zwei verschiedene Treg Populationen unterschieden. Die natürlichen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs werden im Thymus generiert und exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs werden antigenspezifisch aktiviert, das heißt sie müssen in der Peripherie Selbst-Antigene erkennen, um suppressiv aktiv zu werden. Einmal aktiviert sind sie in der Lage, unspezifisch durch Zell-Zell Kontakt andere T-Zellen in ihrer Proliferation zu supprimieren (Kuniyasu et al. 2000; Schwartz 2005). Induzierte Tregs (Th3, Tr1) entstammen der Begegnung mit natürlichen Tregs oder der Interaktion mit einer tolerogenen DC in der Peripherie. Im Gegensatz zu den natürlichen Tregs exprimieren sie nicht den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Sakaguchi 2000 a; Jonuleit 2001). Bei einer Aktivierung induzierter Tregs werden suppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  exprimiert, was zu einer antigenunspezifischen Suppression von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Takahashi und Sakaguchi 2003).

## 1.2 Tumormunologie

Maligne (bösartige) Tumore entstehen durch eine Veränderung von Körperzellen, die sich durch ein unkontrolliertes Wachstum auszeichnen, sich fortlaufend teilen und gesundes Gewebe verdrängen bzw. zerstören. Ein Kennzeichen der Karzinogenese ist die genetische Instabilität (Fearon und Vogelstein 1990). Dazu zählen Mutationen oder Deletionen der Kontrollelemente des Genoms, wie beispielsweise des Tumorsuppressorgens p53 (Lu und Lane 1993). Neben einem unkontrollierten Wachstum sind Tumorzellen in der Lage, über natürliche Gewebegrenzen hinweg, in das angrenzende, normale Gewebe einzudringen und so zu metastasieren.

Seit dem Fortschritt der Behandlungsmöglichkeiten gegen Infektionskrankheiten zählen benigne (gutartige) und maligne Tumorerkrankungen in der westlichen Welt nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zu den Haupttodesursachen. Jährlich erkranken ca. 395.000 Menschen in Deutschland an Krebs und ca. 20.000 Menschen erliegen täglich, weltweit diesem Leiden. Die klassischen Behandlungsmöglichkeiten sind Strahlentherapien mit radioaktiven Stoffen oder Röntgenstrahlen, Chemotherapien oder radikale, chirurgische Entfernungen. Je nach Tumorart und Fortschritt der Erkrankungen können mit diesen

Behandlungsmöglichkeiten mittelmäßige bis gute Ergebnisse erzielt werden. Chemotherapeutische Ansätze und der Einsatz der Strahlentherapie zur Tumorbekämpfung bergen das Risiko nicht nur malignes Gewebe, sondern auch noch angrenzendes, gesundes Gewebe zu zerstören. Eine weitere Folge der chemotherapeutischen Behandlung ist Übelkeit, Haarausfall und eine Immunsuppression mit resultierender Infektionsanfälligkeit. Eine chirurgische Entfernung birgt zusätzlich zu dem herkömmlichen Operationsrisiko, noch die Gefahr einer nicht kompletten Tumorsektion oder Metastasierung des Primärtumors aufgrund einer Verbreitung von Tumorzellen über die Blutbahn in den gesamten Körper. Weiterhin sind eine Vielzahl von Tumoren wegen ihrer Größe und Lokalisation inoperabel. Im Zuge der Erforschung des hoch spezifischen Immunsystems bei der Abwehr unterschiedlichster pathogener Erreger, stieg die Hoffnung das körpereigene Abwehrsystem für die Bekämpfung von Tumoren zu nutzen. Der Vorteil einer antigenspezifischen, gezielten Tumorthherapie liegt in der Minimierung unspezifischer Zerstörung von gesundem, angrenzendem Körpergewebe und folglich in der Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen, die bei den herkömmlichen Therapieansätzen vorkommen können.

### **1.2.1 Die „*immune surveillance*“ und „*immune editing*“ Hypothese**

Die ersten wissenschaftlichen Ansätze zur Tumorimmunologie wurden von Paul Ehrlich Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben. Er beobachtete, daß maligne Erkrankungen mit einer weniger häufigen Wahrscheinlichkeit auftraten, als man es erwarten würde, und schloss auf eine Beteiligung des Immunsystems in der Bekämpfung dieser entarteten Tumorzellen. Die sogenannte „*immune surveillance*“ oder Immunüberwachung Hypothese wurde erst 50 Jahre später von Thomas und später von Burnet beschrieben (Thomas 1959; Burnet 1970). Diese Hypothese besagt, daß Tumore mit einer ähnlichen Frequenz wie Infektionen, verursacht durch pathogene Erreger, auftreten und daß die zirkulierenden Lymphozyten des Immunsystems neoplastisch veränderte Zellen, aufgrund von unterschiedlichen tumorassoziierten Antigenen (TAA) erkennen und diese eliminieren. Diese Hypothese basiert auf Befunden, daß Menschen mit einer erblichen oder erworbenen Immundefizienz häufiger an Tumoren erkranken, als Menschen mit einem gesunden Immunsystem (Gatti und Good 1971; McClain 1997; Smyth et al. 2001). Neuere Studien zeigten jedoch, daß diese Hypothese nicht für das Auftreten aller Tumore Gültigkeit besaß, sondern nur virusinduzierte Tumore signifikant verstärkt auftraten (List et al. 1987; Gaidano und Dalla-Favera 1992). Weiterhin

konnte eine erhöhte Inzidenz an Tumoren in knock-out Tieren ( $RAG^{-/-}$ ,  $IFN-\gamma^{-/-}$ ) beobachtet werden, denen die T- und B-Zellen bzw.  $IFN-\gamma$  fehlten (Kaplan et al. 1998; Shankaran et al. 2001). Nach Transfer des Tumors in immunkompetente Tiere, konnte der Tumor hingegen abgestoßen werden, was die Hypothese unterstützt, daß die fehlende Tumorabstoßung auf einen Defekt in der „*immune surveillance*“ zurückzuführen ist (Pardoll 2003).

Die „*immune editing*“ Hypothese basiert auf Beobachtungen, daß es trotz einer erfolgreichen „*immune surveillance*“ zu einem Tumorwachstum kommen kann (Shankaran et al. 2001; Dunn et al. 2002). Dieser Hypothese liegen drei unterschiedliche Phasen zugrunde. In einer frühen Phase (Phase 1) können Tumorzellen aufgrund der Expression bestimmter Tumorantigene eliminiert werden („*elimination*“). In einer zweiten Phase können aufgrund einer nicht vollständigen Elimination, schwach immunogene Tumorvarianten selektioniert werden („*equilibrium*“). Diese Tumorvarianten können anschließend der Überwachung des Immunsystems entgehen („*tumor escape*“; Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004). Zusammenfassend umschreibt die „*immune editing*“ Hypothese einen Mechanismus, bei dem das Immunsystem zur Selektion schwach immunogener Tumore beiträgt, die sich anschließend der Überwachung entziehen können („*tumor escape*“).

### 1.2.2 Tumorantigene

Tumorantigene sind tumorzellabgeleitete Peptide, die entweder ausschließlich oder vorwiegend in Tumorzellen vorkommen. Sie können von APCs effektiv den T-Lymphozyten präsentiert werden. Eine Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene führt zur Zerstörung der Tumorzellen. Bereits 1943 konnte gezeigt werden, daß mit Methylcholanthren induzierte Sarkome spezifisch von  $CD8+$  T-Zellen abgestoßen werden können. Dazu wurde die Haut der Mäuse mit dem Karzinogen Methylcholanthren behandelt und die Tumore in syngene Empfängermause transplantiert. Lediglich die Empfängertiere, die zuvor mit den  $CD8+$  T-Zellen aus den Donormäusen immunisiert wurden, waren in der Lage den Tumor abzustoßen (Gross 1943; Prehn und Main 1957; Klein et al. 1960).

Zahlreiche Tumorantigene, die von T-Zellen erkannt werden, konnten identifiziert werden (Pardoll 1994; Boon et al. 1995; van den Eynde und van der Bruggen 1997; Rosenberg 2001). Hierbei wurden tumorspezifische T-Zellklone generiert, indem T-Zellen aus dem Blut, den Lymphknoten oder dem Tumor selbst isoliert und mit den Tumorzellen des Patienten

kokultiviert wurden. Die T-Zellepitope wurden anschließend über genetische oder biochemische Methoden identifiziert.

Bei der biochemischen Identifizierung (Cox et al. 1994) werden die Peptide durch eine Säurebehandlung von den MHC Molekülen der Tumorzellen eluiert und mit Hilfe der HPLC in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Anschließend werden die Peptidfraktionen auf Zielzellen mit passendem MHC Molekül beladen und bestimmt, ob die Zielzelle nach der Peptidbeladung von den tumorspezifischen T-Zellklonen lysiert werden kann. Ist dies der Fall, wird mit Hilfe der Massenspektroskopie die Aminosäuresequenz bestimmt.

Bei dem genetischen Ansatz (Boon et al. 1989; van der Bruggen et al. 1991) werden cDNA Bibliotheken von Tumorzelllinien hergestellt, die stabil in Zielzelllinien transfiziert werden, die die selben MHC Moleküle wie der Tumor exprimieren. Die stabil transfizierten Zelllinien werden mit tumorspezifischen T-Zellklonen kokultiviert und diejenigen bestimmt, die lysiert werden. Anschließend werden genau diejenigen subfraktioniert und die Prozedur wird so lange wiederholt bis einzelne cDNA Sequenzen identifiziert sind. Anhand der Sequenz werden dann die Peptide synthetisiert und auf die Aktivierung von T-Zellklonen, wie oben beschrieben, getestet.

Es gibt Tumorantigene, die ausschließlich auf den Tumor begrenzt sind und nicht auf dem normalen, angrenzenden Gewebe exprimiert werden. Bei diesen Tumorantigenen handelt es sich oftmals um mutierte Gene. Epitope von Onkogenen (ras, Her-2/neu) und Tumorsuppressorgenen (p53) können Zielstrukturen für eine T-Zellantwort sein (Slamon et al. 1989; Gjertsen et al. 1995; Abrams et al. 1996). Oftmals werden jedoch die mutierten Antigene in den Tumorpatienten nicht von den T-Zellen erkannt und sind deswegen für eine gezielte Immuntherapie nur eingeschränkt verwendbar. Weiterhin finden sich in den Patienten je nach Tumorart unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Bereichen der Moleküle, so daß eine breit anwendbare Therapie erschwert wird (Hollstein et al. 1991). Eine große Zahl von Tumoren ist mit einer viralen Infektion assoziiert und die Produkte von diesen onkogenen Viren stellen, ähnlich wie mutierte Gene, fremde Antigene dar. Beim hepatozellulären Karzinom (HCC) sind die Hepatitisviren der Gruppe B (HBV) und C zu nennen, während z.B. bei Zervixkarzinomen die Proteine E6 und E7 der Papillomaviren fremde Antigene darstellen können (Ressing et al. 1995). Virusassoziierte Tumorantigene spielen bei prophylaktischen Impfungen eine bedeutende Rolle. Seit der Einführung einer Impfung gegen HBV sinkt in Taiwan die Inzidenz des HCCs (Chang et al. 1997).

Die weitaus größere Gruppe der Tumorantigene sind die nicht mutierten Selbstantigene, die der zentralen oder peripheren Toleranz unterworfen sein können.

Dazu zählen Differenzierungsantigene, die sowohl von Tumorzellen, wie auch von gesunden Körperzellen exprimiert werden können. Gut charakterisierte Differenzierungsantigene sind das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und gp100 sowie MART, die in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert werden (Boon et al. 1995). In Melanozyten werden diese Differenzierungsantigene nur schwach exprimiert, so daß keine Toleranzinduktion stattfindet, während in Melanomzellen eine starke Überexpression dieser Antigene zu finden ist. Diese Tumorantigene stellen somit vielversprechende Zielstrukturen für eine spezifische Tumorthherapie dar.

Embryonale Antigene werden in der Regel nur in männlichen Keimzellen und in der Plazenta exprimiert. In Tumorzellen jedoch können diese Gene wieder aktiviert und exprimiert werden. So wird das gut charakterisierte Antigen MAGE in Melanomzellen überexprimiert und von Tumorzellen über MHC Moleküle präsentiert. Da in der Plazenta keine klassischen MHC I Moleküle vorkommen, werden dort auch keine Antigene präsentiert (Boon und van der Bruggen 1996), was zu spezifischen T-Zellen in der Peripherie führen kann, die eventuell für die Bekämpfung solcher Tumore hilfreich sind. Es konnten melanomspezifische CD8+ T-Zellen detektiert werden, die präsentierte MAGE-Genprodukte erkennen (Huang et al. 1999).

Onkofetale Antigene sind Proteine, die normalerweise während der fötalen Entwicklung eine Rolle spielen, von Tumorzellen aber erneut exprimiert werden. Einer der wichtigsten Vertreter ist das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), welches sowohl bei gutartigen aber auch malignen Erkrankungen der Leber vorkommt. AFP findet Verwendung bei Immunisierungsstrategien, die auf genetischer Basis beruhen. So konnten AFP exprimierende DCs eine spezifische T-Zellantwort auslösen (Vollmer et al. 1999). Ebenso führten DNA basierende Immunisierungsstrategien mit AFP und IL-12 sowie IL-18 zu einer *in vivo* T-Zellantwort und teilweise zu einer Tumorregression von AFP exprimierenden Tumorzellen (Grimm et al. 2000).

Zu der letzten Gruppe zählen Glykolipide und Glykoproteine. Diese tragen modifizierte Zuckerstrukturen oder exponieren Proteinbestandteile, welche als Antigen dienen können. Zu den Glykolipiden zählen die Ganglioside GM<sub>2</sub>, GD<sub>2</sub> und GD<sub>3</sub> von Melanomzellen, die allerdings weniger von T-Zellen erkannt werden, als vielmehr Zielstrukturen von Antikörpern darstellen (Bitton et al. 2002; Chapman 2003). Zu den Glykoproteinen zählen Mucine, z. B. MUC-1, welches bei Brusttumoren und Melanomen häufig modifiziert ist und als Tumorantigen fungieren kann (Hanisch und Ninkovic 2006).

### 1.2.3 Effektormechanismen gegen Tumore

An einer ersten Tumorantwort ist das innate Immunsystem mit den NK-Zellen beteiligt. Sie sind in der Lage nicht nur virusbefallene Zellen, sondern auch sehr effizient Tumorzellen abzutöten (Fernandez et al. 1999). Ihre Reaktivität gegen Tumorzellen wird durch stimulierende und hemmende Rezeptoren gesteuert (Lanier 2000; Biassoni et al. 2001). Zu den hemmenden Molekülen zählen sogenannte Killer-inhibierende Rezeptoren (KIR<sup>24</sup>), die MHC I Moleküle auf der Zelloberfläche erkennen und deren zytotoxische Funktion einschränken. NK-Zellen sind in der Lage *in vivo* an den Ort der Tumorentstehung zu migrieren, um dort MHC I defiziente Tumorzellen zu lysieren (Whiteside und Herberman 1995; Smyth und Godfrey 2000). Zu den stimulierenden Rezeptoren zählen NKG2D, welcher mit den NKG2D-Liganden, die von vielen Tumorzellen überexprimiert werden, interagieren kann (Cerwenka et al. 2001). Diese Interaktion führt zu einer verstärkten NK abhängigen Tumorzelllyse (Cerwanka et al. 2000).

DCs verbinden das innate mit dem adaptiven Immunsystem und spielen ebenfalls eine Rolle bei der Tumorbekämpfung (Fernandez et al. 1999). In einem Melanommodell konnte gezeigt werden, daß DCs der Haut, die sogenannten Langerhans Zellen, Tumorantigene aufnehmen und in die peripheren Lymphknoten wanderten, wo sie eine CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort induzierten (Rivoltini et al. 2002). Ebenso spielen weitere APCs, wie Makrophagen bei der Tumorbekämpfung eine Rolle, da sie ebenso wie DCs in der Lage sind Tumorantigene zu präsentieren und somit T-Zellen zu stimulieren (Bonnotte et al. 2001).

Eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung von entarteten Zellen spielen die T-Lymphozyten, die den Tumor infiltrieren können und als sogenannte TIL<sup>25</sup> bezeichnet werden. Wenngleich sie eine der wichtigsten Komponenten in der Überwachung von transformierten Zellen darstellen (Smyth et al. 2001), sind sie nicht immer in der Lage zu einer kompletten Tumorregression beizutragen (Phan et al. 2001).

### 1.2.4 Tumorevasionsmechanismen

Trotz Antigenpräsentation von entarteten Tumorzellen durch APCs und Aktivierung von NK- Zellen oder zytotoxischen T-Zellen, kommt es häufig zu einem unkontrollierten

---

<sup>24</sup> *engl.*: killer cell immunoglobulin-like receptors

<sup>25</sup> *engl.*: tumor-infiltrating lymphocytes

Tumorwachstum und nicht zu einer effektiven Abwehr durch das Immunsystem (Chen 1993). Tumore sind in der Lage tolerogene Umgebungen zu induzieren, um so der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Zu diesen Mechanismen zählen die Herunterregulation von Tumorantigenen, aber auch der MHC Klasse I Moleküle auf den Tumorzellen (Ferrone und Marincola 1995; Maeurer et al. 1996). Ebenso können immunsuppressive Zytokine, wie TGF- $\beta$  und IL-10, die Präsentation potentieller Tumorantigene durch direkten Kontakt mit den T-Zellen oder indirekten Kontakt über die APCs, minimieren (Elgert et al. 1998; Abb.1.4. A)

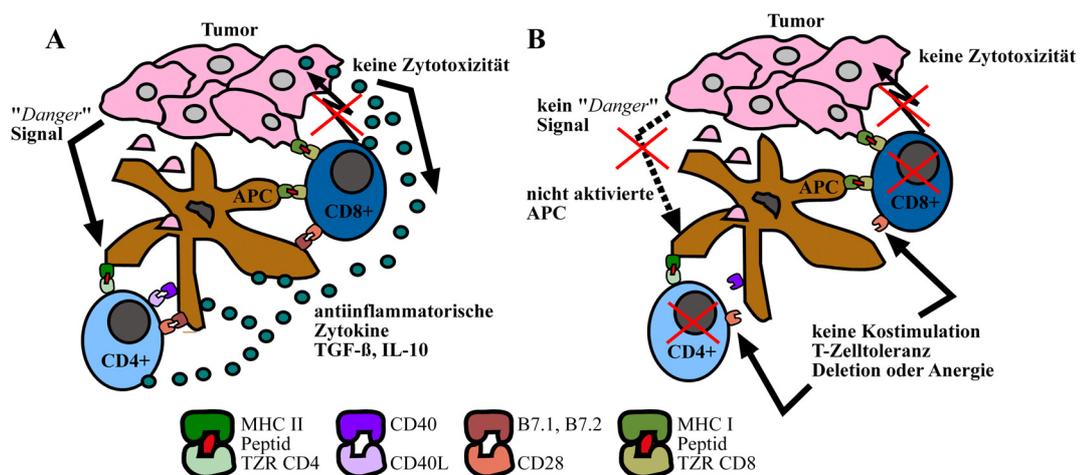


Abb.1.4 **Tumorabhängige Evasionsmechanismen.** (A) Tumorinduzierte Unterdrückung der Immunantwort durch Sezernierung immunsuppressiver Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-10). (B) Abwesenheit von „*Danger*“ Signalen führt zu einer unzureichenden Stimulierung der APCs und somit nicht zu einer Expression von kostimulatorischen Molekülen, was letztendlich in einer ineffektiven Immunantwort endet. Die T-Zellen werden tolerant (Deletion oder Anergie). (in Anlehnung an Smyth et al. 2001)

Umstritten sind die Ergebnisse, daß Tumore durch die Expression von CD95L, einem Apoptose induzierenden Faktor, die T-Zellen direkt zerstören können (Rivoltini et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Tumore inhibitorische Moleküle (PD-L1<sup>26</sup> und CTLA-4) exprimieren und somit aktivierte T-Zellen effektiv inhibieren (Dong et al. 2002).

Tumore wachsen zu Beginn ähnlich wie gesunde Zellen und senden sehr häufig auch kein „*Danger*“ Signal an die APCs (Fuchs und Matzinger 1996; Abb.1.4 B). Dies führt zu einer unzureichenden Expression kostimulatorischer Moleküle und resultiert in einer ineffektiven Tumorbekämpfung durch das Immunsystem. Die T-Zellen werden deletiert oder anerg.

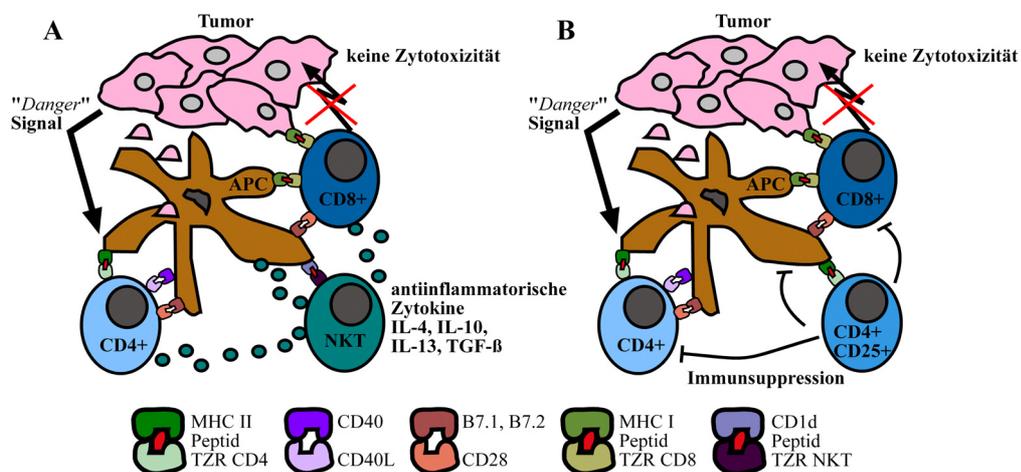
Ebenso spielt die anatomische Lage eines Tumors für seine Bekämpfung eine bedeutende Rolle. Eingebettet in Stroma gelangen nicht metastasierende Tumore nicht in die peripheren Immunorgane (Lymphknoten), um dort durch Antigenpräsentation eine Immunantwort

<sup>26</sup> engl.: programmed death ligand-1

auszulösen (Ochsenbein et al. 2001). APCs, wie DCs, müssen ins Tumorgewebe eindringen, Tumorantigene aufnehmen und in den drainierenden Lymphknoten wandern um eine Immunantwort einzuleiten. Weiterhin stellen immunprivilegierte Regionen, wie z. B. das Auge, Orte dar, an denen ein Tumor dem Immunsystem entkommen kann. In diesen Regionen fehlen oftmals APCs, so daß keine Antigenpräsentation und somit auch keine effektive Induktion einer spezifischen Tumorbekämpfung möglich ist (Rocha et al. 1998).

Regulatorische und suppressive T-Zellen, deren Aufgabe es ist eine Selbst-Toleranz aufrecht zu erhalten, stellen ebenfalls ein Hindernis für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung dar. So verhindern NKT-Zellen eine komplette Tumorregression durch Interaktion mit APCs über ein MHC Klasse I ähnliches Molekül CD1d und dem TZR (Abb.1.5 A). Dies Interaktion resultiert in der Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine, wie z. B. IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  (Terabe et al. 2000). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, daß NKT-Zellen hauptsächlich an der Eliminierung von entarteten Tumorzellen beteiligt sind. Die resultierende Immunantwort einer NKT-Zelle hängt von der Art der Signale, die vermittelt werden, ab (Smyth und Godfrey 2000).

Regulatorische CD4+ CD25+ Tregs können ebenfalls zusätzlich zu der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz an der ineffektiven Tumorbekämpfung beteiligt sein (Abb.1.5. B).



**Abb.1.5 Tumorevasionsmechanismen durch gezielte Inhibition der Immunantwort.** (A) Inhibition durch NKT-Zellen über eine Interaktion zwischen dem TZR und dem MHC Klasse I ähnlichen Molekül CD1d. Produktion antiinflammatorischer Moleküle, was zu einer Inhibition von CD4+ und CD8+ T-Zellantwort führt und somit eine Tumorregression verhindert. (B) Inhibition durch CD4+ CD25+ Tregs über eine Interaktion mit APCs oder direkt mit den T-Zellen. (in Anlehnung an Smyth et al. 2001)

Sie sind in der Lage, entweder durch eine Interaktion mit APCs oder durch einen direkten Kontakt mit den CD4+ und CD8+ T-Zellen, tumorspezifische T-Lymphozyten zu inhibieren

(Sakaguchi 2000 a und b). Eine Depletion dieser Tregs kann eine Immunantwort durch CD8+ T-Zellen und NK-Zellen gegen einen syngenen Tumor induzieren, der in unbehandelten Tieren nicht erkannt wird (Onizuka et al. 1999; Shimizu et al. 1999).

Zusammenfassend kann man festhalten, daß es eine Reihe von Möglichkeiten gibt, wie ein Tumor sich der Eliminierung durch das Immunsystem effektiv entziehen kann. Diese müssen bei der Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen berücksichtigt werden.

### 1.2.5 Immuntherapien gegen Tumore

Bei einer Immuntherapie gegen Tumore besteht das Ziel darin, die Evasionsmechanismen des Tumors zu umgehen und das Immunsystem spezifisch gegen die entarteten Zellen zu aktivieren. Dabei finden Therapieansätze, die das innate Immunsystem betreffen, ebenso Verwendung, wie eine Aktivierung der humoralen Immunantwort. Eine bedeutende Rolle wird der Aktivierung von T-Zellen und dem Einsatz von DCs in der Immuntherapie zugesprochen.

Ein Therapieansatz bestand in der Aktivierung von NK-Zellen des innaten Immunsystems durch hohe Gaben von IL-2, was bei einigen Patienten auch zu einer kompletten Remission des Tumors geführt hat (Rosenberg et al. 1993). Als problematisch erwiesen sich allerdings die Nebenwirkungen der hohen TNF Produktion durch die NK-Zellen, die sehr toxisch waren. Eine Möglichkeit, um eine verbesserte Interaktion zwischen dem innaten und adaptiven Immunsystem zu erreichen, besteht in der Verwendung von CpG Oligonukleotiden. CpG-ODN sind einzelsträngige DNA-Sequenzen, die ein oder mehrere unmethylierte CpG-Dinukleotide in konservierten Hexanukleotidstrukturen enthalten (Raz 2000; Wagner 2000) Solche Sequenzen sind in Vertebraten seltener anzutreffen als statistisch erwartet (Bird 1980) und außerdem zu 70% methyliert. In Bakterien hingegen findet man solche Sequenzen, die ähnlich wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder Lipoproteine, mikrobielle Strukturen darstellen, welche dem angeborenen Immunsystem als Signal für eine Infektion dienen können (Wagner 1999). CpG ODN binden direkt an APCs über TLR-9 und stimulieren diese zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12. Werden Antigene zusammen mit CpG ODN als Adjuvanz *in vivo* appliziert, wird sowohl eine starke Th1 Immunantwort ausgelöst (Malletto et al. 2002), als auch zytotoxische T-Zellen aktiviert (Wild et al. 1999, Sparwasser et al. 2000).

Die humorale Immuntherapie basiert auf dem Einsatz von Antikörpern. Diese können spezifisch ihr Antigen auf der Zelloberfläche erkennen und lösen durch deren Bindung eine komplementaktivierte Zellyse aus. Bei der Behandlung des Mammakarzinoms finden Antikörper gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor HER2/neu, der in sehr vielen Patientinnen mit Brustkrebs überexprimiert ist, Verwendung (Pegram et al. 1999).

Eine Verbesserung in der T-Zellaktivierung stellt eine weitere Möglichkeit dar, Tumore mit Hilfe des Immunsystems zu bekämpfen. Bei der T-Zellaktivierung spielt die Dichte der MHC:Peptid Komplexe auf der Zelloberfläche, ebenso wie die Affinität des TZR eine entscheidende Rolle. MHC Anker von Antigenen, die eine schwache Affinität für MHC Moleküle besitzen, können so verändert werden, daß die Antigenbindung verstärkt wird, ohne eine Erkennung des unveränderten Peptids zu beeinflussen (Parkhurst et al. 1996). Auf diese Weise kann eine verstärkte Immunantwort gegen das unveränderte Peptid induziert werden.

Weiterhin ist es möglich durch gezielte Blockade inhibierender Moleküle, eine T-Zellaktivität zu verstärken. CTLA-4 wird nach der Aktivierung einer T-Zelle exprimiert und besitzt eine höhere Affinität zu den kostimulatorischen Molekülen B7.1 und B7.2, wodurch eine hemmende Immunantwort ausgelöst wird. Eine Inhibierung des CTLA-4 führte *in vivo* zwar zu einer Abstoßung eines etablierten Tumors (van Elsas et al. 1999), hatte allerdings eine Autoimmunreaktion auf das Gewebe, gegen das die Tumorzelle gerichtet waren, zur Folge. Ein erfolgversprechender Ansatz in der Bekämpfung von Tumoren mit Unterstützung des Immunsystems stellt der Einsatz von DCs dar. DCs zählen zu den APCs und sind in der Lage sehr effektiv Tumorantigene aufzunehmen und den T-Zellen zu präsentieren, was auch zu einer Eliminierung des Tumorgewebes führen kann. Der Wachstumsfaktor GM-CSF<sup>27</sup> induziert die Differenzierung von DCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und lockt diese in den Bereich der Applikation. Die Transfektion von Tumorzellen mit GM-CSF stellt eine erfolgversprechende Immunisierungsstrategie in der Bekämpfung von Krebs dar (Dranoff et al. 1993). Eine zusätzliche Gabe des CD40 Liganden steigerte die Anzahl an reifen DCs und verstärkt die Immunantwort (Chiodoni et al. 1999). Weiterhin besteht die Möglichkeit in einer *ex vivo* Beladung von DCs mit Tumorfragmenten, was zu einer Immunantwort gegen den Tumor führt (Porgador und Gilboa 1995). Ebenso ist es möglich mit Hilfe von rekombinanten Viren, Tumorantigensequenzen in DCs einzuführen und eine Immunantwort gegen den Tumor auszulösen (Song et al. 1997). So konnten erste, erfolgversprechende

---

<sup>27</sup> *engl.*: granulocyte macrophage colony-stimulating factor

Vakzinierungsstudien mit idiotypbeladenden DCs, gerichtet gegen den Immunglobulinidiotyp des B-Zell Lymphoms, in der Bekämpfung humaner Tumore, erzielt werden (Hsu et al. 1996).

## 1.3 Lebererkrankungen und Tumormodelle

### 1.3.1 Maligne Erkrankungen der Leber

Zu den malignen Erkrankungen der Leber zählen bösartige Tumore, die entweder von den Leberzellen selbst oder den Gallengängen der Leber ausgehen. Demnach werden Leberzellkarzinome von Cholangiokarzinomen unterschieden.

Cholangiokarzinome sind wesentlich seltener als Leberzellkarzinome und treten häufig im 6. Lebensjahrzehnt auf. Männer sind etwas häufiger als Frauen betroffen. Zu den Risikofaktoren der Cholangiokarzinome zählen Infektionen der Gallenwege, die Aufnahme von Karzinogenen, wie z. B. Aflatoxine (Gift des Schimmelpilzes), aber auch anatomische Missbildungen der Gallengänge.

Hepatoblastome sind ebenfalls bösartige Lebertumore, die in der Regel bei kleinen Kindern vor dem 3. Lebensjahr auftreten. Auch hier findet sich eine Disposition für Knaben.

Weiterhin zählt das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zu den malignen Erkrankungen der Leber, welches regional mit einer unterschiedlichen Inzidenz auftritt. In Europa erkranken deutlich weniger Menschen an HCC, verglichen mit Teilregionen in Afrika und Südostasien. Diese regionalen Unterschiede beruhen auf einer unterschiedlichen Verteilung und Häufigkeit einer Hepatitis B und C Infektion, welche die Entstehung eines HCC begünstigt. Die Zeitspanne zwischen dem Auftreten einer Infektion und dem Ausbruch einer HCC Erkrankung beträgt in der Regel 30 bis 40 Jahre. Bei der Mehrzahl der Patienten, die an einem HCC erkranken, kommt gleichzeitig auch eine Leberzirrhose vor. Neben einer Hepatitis Infektion, Alkoholkonsum und Pilzgiften zählen auch chronische Lebererkrankungen und angeborene Stoffwechselerkrankungen zu den Risikofaktoren einer HCC Erkrankung.

Maligne Erkrankungen der Leber und des Gallenganges gehören mit ca. 1 Mio. Neuerkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Erkrankungen weltweit (Parker et al. 1996). In den USA erkranken jährlich 15.400 Patienten an Lebertumoren, von denen 50% die Gallenblase, 30% die Gallengänge und 20% die Hepatozyten betreffen (Simonetti et al. 1991).

Zu den Behandlungsmöglichkeiten maligner Lebererkrankungen zählen, neben der chirurgischen Resektion des Tumors mit einer anschließenden Lebertransplantation, die Bestrahlung und die Verwendung von Chemotherapeutika. Da die Behandlungsmöglichkeiten bei fortgeschrittenem Tumorstand eingeschränkt bleiben und eine Resektion mit einem hohen Risiko für den Patienten verbunden ist, bedarf es alternativer Behandlungsmöglichkeiten. Um eine gezielte Immuntherapie gegen maligne Lebererkrankungen in Erwägung zu ziehen, werden geeignete Tumormodelle benötigt.

### **1.3.2 Tumortransplantationsmodelle versus autochthone Tumormodelle: Vorteile und Nachteile**

Viele Studien in der Tumorimmunologie wurden mit Hilfe von transplantierbaren Tumorzelllinien durchgeführt, was zwar experimentell den Vorteil hat, daß die Tumore in den Empfängertieren relativ schnell anwachsen und die Tumorzelllinien sich gut manipulieren lassen, die Aussagekraft in Bezug auf eine erfolgreiche Tumorthherapie beim Menschen allerdings gering ist. Transplantationstumore unterscheiden sich durch mehrere Parameter deutlich von humanen Primärtumoren.

Humane Primärtumore wachsen allmählich im Verlauf von Monaten bzw. Jahren heran und entstehen aus der Veränderung einer Körperzelle (Barrett 1992). Sie bilden sich am Ort ihrer Entstehung, weswegen sie auch als autochthone<sup>28</sup> Tumore bezeichnet werden. Sie entwickeln sich im Umfeld von gesunden, nicht entarteten Zellen. Transplantationstumore hingegen entwickeln sich ektopisch am Injektionsort, ungeachtet welcher organischer Herkunft sie unterliegen.

Werden Tumorzellsuspensionen aus einem autochthonen Tumor isoliert und in das gleiche Empfängertier injiziert, kommt es häufig zur Bekämpfung des transplantierten Tumors, allerdings nicht zur Abstoßung des Primärtumors (Klein et al. 1960). Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen entstehen autochthone Tumore aus der Transformation einer Körperzelle unter der ständigen Beobachtung des Immunsystems, was zu einer Selektion immunogener Tumorvarianten führen kann (Bahler et al. 1987). Zum anderen sind transplantierte Tumorzellen vollständig transformiert und bei der Applikation dieser Tumorzellsuspension erhöht sich die Chance, daß einzelne Tumorzellen in die

---

<sup>28</sup> *lat.-griech.*: am Fundort entstanden

drainierenden Lymphknoten gelangen und dort eine effektive Immunantwort auslösen (Yang et al. 1997).

Eine weitere Rolle spielt auch der Applikationsort bei der Induktion einer effektiven Tumorantwort. Eine Injektion von Tumorzellen subkutan löst in der Regel eine sehr effiziente Immunantwort aus, während Tumorzellapplikationen in der Niere, im Auge oder der Leber eher nicht so effizient attackiert werden.

Ebenso kann das Tumormikromilieu eine entscheidende Rolle bei der Tumorregression durch das Immunsystem spielen. Bei autochthonen Tumoren kann das Tumormikromilieu eine Lymphozyteninfiltration verhindern und somit nicht zu einer effektiven Tumorregression beitragen (Ganss et al. 1998). Bei injizierten Tumorzellen hingegen kann eine artifizielle Immunantwort durch Verletzung des Gewebes hervorgerufen werden.

Beim Vergleich beider Tumormodelle miteinander wurde, im Hinblick auf biologische Relevanz, die Generierung eines autochthonen Tumormodells der Verwendung von Transplantationsmodellen vorgezogen.

### **1.3.3 Autochthone Lebertumormodelle**

Um den Einfluß von naiven, antigenspezifischen T-Zellen als immuntherapeutischen Ansatz bei der Tumorbehandlung zu untersuchen, sollte daher ein autochthones Lebertumormodell Verwendung finden. Im Folgenden werden die schon publizierten Modelle miteinander verglichen und die Notwendigkeit ein neues Modell zu generieren erläutert.

Spontane Leberkarzinogenese mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von 7 bis 53% konnte in Männchen des Mausstammes B6C3F1 beobachtet werden (Tarone et al. 1981). Sie benötigen für die Entwicklung des HCC allerdings über ein Jahr (Ward et al. 1979), was die Verwendung solcher Mäuse für die immunologische Fragestellung unbrauchbar macht.

Es besteht die Möglichkeit autochthone Lebertumore mit Hilfe von chemischen Karzinogenen zu induzieren (Williams 1997). Diese Substanzen versucht der Organismus üblicherweise zu inaktivieren und wieder auszuschleusen. Bei zu großen Mengen kann es zu einer Anhäufung solcher Substanzen in der Leber kommen, die im Genom interkalieren und Mutationen auslösen, die entweder Tumorsuppressorgene inaktivieren (Hooper 1998) oder Protoonkogene aktivieren können (Buzard 1996). Häufig sind mehrere Mutationen bzw. Faktoren, die zusammentreffen müssen, notwendig, um eine Karzinogenese einzuleiten. Ebenso bedarf es einer kontinuierlichen Applikation von mindestens 8 Monaten, um ein Leberkarzinom

entstehen zu lassen. Safrol führt nach 52 Wochen in 50% und erst nach 75 Wochen in 100% der Tiere zu einem HCC (Lipskey et al. 1981). Da die Applikation von Karzinogenen meist systemisch erfolgt, entwickeln die behandelten Tiere neben Lebertumoren häufig auch Tumore in anderen Organen. Ein weiterer entscheidender Nachteil dieser Methode der Tumorinduktion besteht in der toxischen Nebenwirkung der Karzinogene bei der Verwendung von höheren Dosen, die für eine schnellere Tumorgenese allerdings notwendig sind. Ebenso weisen bei der chemischen Induktion die entstehenden Tumore unterschiedliche Mutationen auf, was zu unterschiedlichen, tumorspezifischen Antigenen führen kann und somit kein geeignetes Modell für eine spezifische Immuntherapie darstellt.

Eine zuverlässige Methode der Tumorinduktion besteht in der transgenen Expression eines Onkogens. Transgene Tiere unterscheiden sich von Wildtyp Tieren durch die Insertion und Expression eines neuen Gens. Eine der herkömmlichen Methoden für die Generierung von transgenen Mäusen stellt die Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion) dar, bei der linearisierte DNA in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle (Oozyte) injiziert wird (Gordon et al. 1980). Durch die Wahl von bestimmten Promotoren kann die Expression des Transgens auf bestimmte Organe und Entwicklungsstadien beschränkt werden.

Es wurden bislang transgene Mäuse publiziert, die das T-Antigen des Simian Virus (SV40 Tag) exprimieren und bei einer geeigneten Promotorwahl auch Lebertumore induzieren. SV40 Tag findet auch als Antigen für immunologische Versuche Verwendung. Bei Verwendung des  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Promotors entwickeln die Tiere neben HCCs auch Hyperplasien in Pankreas, Niere und Magen (Sepulveda et al. 1989), während der Promotor des  $\alpha$ -Amylase-Gens nebenbei zu malignen Veränderungen im braunen Fettgewebe führt (Fox et al. 1989). Der humane Antithrombin III Promotor führt erst nach 5 Monaten zu einer Leberkarzinogenese (Romieu et al. 1998). Der Albumin-Promotor induziert eine Leberkarzinogenese innerhalb von 3 bis 7 Monaten, trägt allerdings in einem späten Tumorstadium auch zu Lungenmetastasen bei (Sandgren et al. 1989). Die Nachteile dieser Systeme bestehen in einer konstitutiven Expression des Transgens (Albumin Promotor), einer Tumorentstehung in anderen Organen und in einer doch relativ langen Zeitspanne der Tumorentwicklung.

Ein weiteres Protoonkogen, das in der Tumorentstehung eine bedeutende Rolle spielt, ist *c-myc*. Das *c-myc* Gen umfaßt drei Exone und kodiert für ein 64 kDa großes Protein (Battey et al. 1983). Es zählt zu den Transkriptionsfaktoren und besitzt charakteristische Motive, welche als „basische-Helix-Loop-Helix“-Domäne (bHLH) und als „Leuzin-Zipper“ (LZ) bezeichnet werden und im carboxyterminalen Bereich lokalisiert sind (Abb.1.6). Der mittlere Bereich des *c-myc* Proteins umfaßt die zentrale Domäne mit dem Kernlokalisierungssignal

(KLS). Aminoterminal befinden sich die für die Aktivierung von Zielgenen wichtigen Bereiche Myc Box I (MB I) und Myc Box II (MB II). Zusammen stellen sie die Transaktivierungsdomäne dar (Kato et al. 1990).

Der c-terminale Abschnitt mit seinen bHLH und LZ Bereichen vermittelt die Dimerisierung von *c-myc* mit seinem Partnerprotein MAX, ebenfalls ein bHLH-LZ Protein. Das Heterodimer *c-myc*/MAX bindet an spezifische Enhancer Boxen der DNA und reguliert somit verschiedene Gene, die für das Zellwachstum, die DNA Synthese, den Zellzyklus, die Proteinbiosynthese und Apoptose zuständig sind (Pelengaris et al. 2002 a; Schlosser et al. 2003).

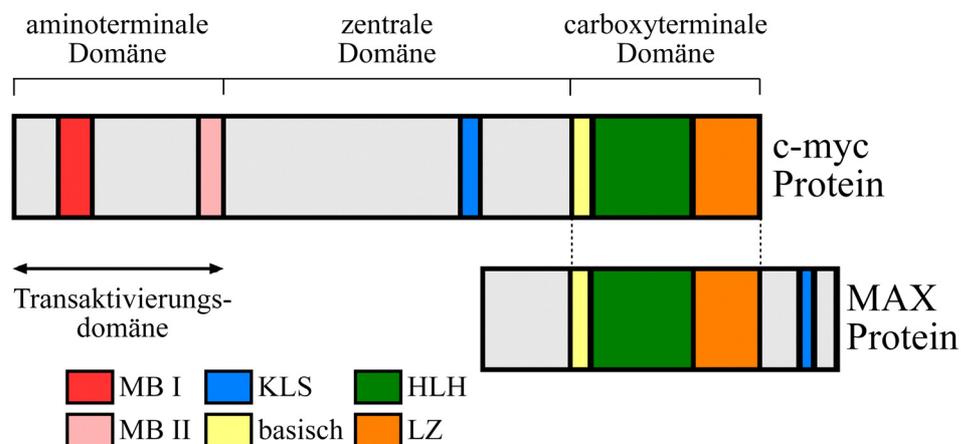


Abb.1.6 Funktionale Domänen von *c-myc* und Interaktion mit MAX. Dimerisierung von *c-myc* und MAX im Bereich der carboxyterminalen Domäne.

HLH = Helix-Loop-Helix; KLS = Kernlokalisierungssignal; LZ = Leuzin-Zipper; MB I = Myc Box I; MB II = Myc Box II

Weiterhin konnte eine fehlerhafte Regulation bzw. Lokalisation von *c-myc* in verschiedenen Tumoren festgestellt werden. In Burkitt-Lymphomen ist *c-myc* von Chromosom 8q24 transloziert und in die Nähe des Immunglobulinlokus verschoben (Dalla-Favera et al. 1982). Es finden sich in den unterschiedlichsten humanen Tumoren eine Amplifikation von *c-myc*, wie z. B. im Bronchialkarzinom (Little et al. 1983), Mammakarzinom (Berns et al. 1996), Ovarialkarzinom (Wang et al. 1999), Prostatakarzinom (Jenkins et al. 1997) und Zervixkarzinom (Pinion et al. 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, daß eine *c-myc* Überexpression in chronischen Lebererkrankungen eine bedeutende Rolle bei der Prädisposition für eine HCC Erkrankung darstellt (Chan et al. 2004).

In verschiedenen Mausmodellen konnte der Zusammenhang zwischen der *c-myc* Expression und Tumorentstehung näher untersucht werden. Eine konstitutive *c-myc* Expression unter der Kontrolle des Immunglobulin Enhancers führt zur Entstehung von B-Zelllymphomen

(Adams et al. 1985), während die Überexpression in den Brustdrüsen Mammakarzinome induziert (Schoenenberger et al. 1988).

Für unsere Fragestellung sehr viel bedeutender waren die Untersuchungen einer neonatal induzierten Überexpression von *c-myc*, die in murinen Hepatozyten zu einer schnellen Karzinogenese innerhalb von 8 Wochen führt (Beer et al. 2004). Die Generierung dieser Maus basiert auf der Verwendung des binären, Tetrazyklin induzierbaren Systems (Tet System) von H. Bujard und einer anschließenden Verpaarung mit leberspezifischen Reportermausen (LAP tTA transgene Mäuse; Kistner et al. 1996). Der Vorteil in der Verwendung des *c-myc* Protoonkogens besteht, kombiniert mit dem Tet System, in der relativ schnellen Tumorgenese und gewebsspezifischen Lebertumorinduktion durch Verwendung des LAP<sup>29</sup> Promotors. Eine tumorspezifische Immunantwort in diesem bereits etablierten System zu analysieren, wirft aufgrund der fehlenden Identifikation eines tumorspezifischen Antigens Probleme auf. Deswegen bestand die Aufgabe darin, ein neuartiges, transgenes Lebertumormodell unter der Verwendung eines Modellantigens zu generieren. Es wurde das in der Immunologie gut charakterisierte und häufig verwendete Hühnereiweiß (Ovalbumin) als Modellantigen gewählt.

## 1.4 Zielsetzung

Maligne Erkrankungen der Leber zählen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Herkömmliche Therapiestrategien, wie die radikale Resektion, die Bestrahlung und die chemotherapeutischen Ansätze bergen, zusätzlich zu den aufkommenden Nebenwirkungen oftmals hohe Risiken für den Patienten. Basierend auf Befunden, daß entartete Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt werden können, sind neuartige Modellsysteme notwendig, um immuntherapeutische Ansätze bei der Behandlung von Lebertumoren einzusetzen.

Da es bei Transplantationen von Tumorzellen zu einer lokalen Verteilung und damit zur Generierung einer artifiziellen inflammatorischen Umgebung kommen kann, bestand das erste Ziel der Arbeit in der Etablierung eines autochthonen, transgenen Lebertumormodells. Es sollte das bidirektionale, induzierbare Tet System von H. Bujard unter der Verwendung des Protoonkogens *c-myc* und einer leberspezifischen Reportermaus genutzt werden. Aufgrund

---

<sup>29</sup> *engl.*: liver-enriched activator protein

der Schwierigkeiten tumorspezifische Antigene zu identifizieren, diese aber für die Analyse einer tumorspezifischen Immunantwort unerlässlich sind, sollte zusätzlich zu dem Protoonkogen noch das Modellantigen OVA verwendet werden.

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der funktionellen Charakterisierung des neuartigen, autochthonen Lebertumormodells hinsichtlich des Phänotyps und der immunologischen Analyse. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die tumorspezifische Antigenerkennung von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* während der Tumorgenese gelegt. Im Hinblick auf vorhandene Evasionsmechanismen des Tumors sollte die resultierende Immunantwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich einer möglichen Tumorregression oder Toleranzinduktion charakterisiert werden. Im letzten Teil der Arbeit sollten, im Falle einer nicht vorhandenen effektiven Immunantwort gegen den Lebertumor, die Mechanismen der unzureichenden Abwehr aufgedeckt werden, und Immuntherapien in Form einer Vakzinierung und somit Stimulierung des adaptiven Immunsystems getestet werden.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

ABI Prism 310	Sequenzier (Applied Biosystems, Darmstadt)
Analysenwaage	PL3001-S2 (Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz); BP211S (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Tuttnauer 3870, Tuttnauer 5075 ELV (Biomedis, Gießen)
Bechergläser, Glas-	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L; ILMABOR (TGI, Ilmenau)
Bechergläser, Plastik-	500 ml, 1 L; VitLAB PlastiBrand (Brand, Wertheim)
Blotting Kammer	Mini Trans-Blot-Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München)
Brutschränke	Cytoperm 2; BBD 6220 (Heraeus, Hanau)
Bunsenbrenner	LABOGAZ 206 (Roth, Karlsruhe)
Durchflußzytometer	BDFACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einbettautomat	Tissue-Tek VIP (Sakura, Heppenheim)
Eismaschinen	ZBE 70-35 (Ziegra, Isernhagen)
Elektrophoresekammern, horizontal	OWL (VWR, Darmstadt)
Elektrophoresekammern, vertikal	Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, München)
ELISA-Lesegerät	EL <sub>X</sub> 800 (BioTek Instruments; Bad Friedrichshall)
Entwickler	X-Omat 1000 Processor (Kodak, Rochester, USA)
Erlenmeyerkolben	250 ml, 500 ml, 1 L, 2 L (Schott, Mainz)
Färbeautomat	DAKO Tech Mate 500 Plus (Dako, Hamburg)
Femto Jet	Eppendorf, Hamburg

Gewindeflaschen	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L (Schott, Mainz)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Homogenisator, Glas-	Sartorius, Göttingen
Injektionshalter	Eppendorf, Hamburg
Kamera	Mitsubishi P91 (Intas, Göttingen); Axio Cam MRC 5 (Zeiss, Oberkochen); Ky-F 70B (JVC, Friedberg)
Kryostat	Leica CM 1900 (Leica, Nussloch)
Kühlschränke (+4°C)	7081-312-04 (Liebherr, Biberach an der Riss)
Kühlschränke (-20°C)	7081-598-03 (Liebherr, Biberach an der Riss)
Kühlschränke (-80°C)	HERAfreeze (Hereaus, Hanau)
Küvette, Quarzglas	Suprasil, 10 mm 104.002-QS (Hellma, Müllheim)
MACS, Ständer & Magnet	MACS Multi Stand; quadroMACS; miniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	ARE Heating magnetic stirrer (VELP Scientifica, Usmate, Italien)
Messkolben	50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L (Brand, Wertheim)
Messzylinder, Plastik-	25 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 2 L (Brand, Wertheim)
Mikromanipulator	Narishige, New York, USA
Mikroskope	Axiovert 40C (Zeiss, Oberkochen); Olympus BX51 (Olympus, Hamburg); Leica DMLB, Leica DMIRB (Leica, Solms)
Mikrotom	Leitz, Wetzlar
Mikrowellenofen	Microwave 800 (Severin, Sundern)
Netzanschlußgerät	Power Pac Basic (Bio-Rad, München); Consort E143 (Sigma-Aldrich)
Ohrmarkenzange	klein 73855 (Hauptner & Herberholz, Solingen)
PCR-Gerät	PTC-200, Gradient Cycler (Biozym, Oldendorf)
pH-Meter	inoLab pH Level 1 WTW (VWR, Darmstadt)
Photometer, Spektral-	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg); NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Erlangen)

Pipetten	0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 30-200 µl, 200-1000 µl (Gilson, Middleton, USA) 8-Kanal-Pipette: 20-200 µl (Brand, Wertheim)
Pipettierhilfen	accu-jet und accu-jet pro (Brand, Wertheim)
Pumpen	Eco Vac (Schütt, Göttingen); Master Flex L/S (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA)
Reinstwasseranlage	Automatic Sanitization Module (Millipore, Schwalbach)
Röntgenkassette	mit MVE HC Folie (Rego, Augsburg)
Rotoren	FA 45-30-11 (Eppendorf, Hamburg); 75006445 (Heraeus, Hanau)
Schüttelinkubator	Unimax1010 (Heidolph, Schwabach); Inova 4000 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
Schüttler, horizontal	Shaker S-4 Sky Line (ELMI, Riga, Lettland)
Siebe, Metall-	100 µM (Abt. Feinmechanik, Uniklinikum Bonn)
Stickstofftank	K series cryostorage system (Tec-Lab, Lugano, Schweiz)
Tischschüttelgerät	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Trockentisch, Gel-	Slab Gel Dryer Model SE1160 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Ultra-Turrax	T8 (IKA Labortechnik, Staufen)
UV-Beleuchtungstisch	Intas, Göttingen
Wasserbad	WB/OB7-45 WBU45 (Memmert, Schwabach)
Wasserbad, Schüttel-	Köttermann Labortechnik, Uetze
Werkbank, Steril-	HERAsafe, HERAGuard (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer 0,0025 mm <sup>2</sup> (Brand, Wertheim)
Zentrifuge, Klein-	Galaxy Mini für 6 x Reaktionsgefäße (VWR, Darmstadt)
Zentrifugen, Kühl-	5417R (Eppendorf, Hamburg); Multifuge 3S-R (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge, Vakuum-	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Autoklavierband	Roth, Karlsruhe
Chamber Slide System	2 well Permanox Slide (Nalge Nunc International, New York, USA)
Dako Pen	Dako, Hamburg,
Deckgläser	24 x 60 mm (Engelbrecht, Edermünde)
Dialyseschläuche	Merck, Darmstadt
Dialyseunterlagen	20 x 40 cm, 6-lagig (Noba, Wetter/Ruhr)
Einmalröhrchen	15 ml, 50 ml (Greiner, Solingen; Corning, New York, USA)
	FACS 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einstreu	Ssniff, Soest
Filterpapier	Whatmann 3 MM (Schleicher & Schuell, Dassel)
Gaskartuschen	C206 (Roth, Karlsruhe)
Gaze	Maschenweite 41 µm, Faden-Ø 33 µm (Bückmann, Mönchengladbach)
Glaskapillaren, heparinisiert	Mikro-Hämatokrit (Brand, Wertheim)
Handschuhe, Einmal-	Derma clean, S, M, L (Ansell, Richmond, Australien)
Injektionsnadeln	Femtotips (Eppendorf, Hamburg)
Kanülen	20G x 1½-Nr.1; 21G x 1½-Nr.2; 23G x 1¼-Nr.4; 27G x ¾ -Nr.20 (Becton Dickinson; Heidelberg)
Kryomolds	15 x 15 mm (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA)
Kryoröhrchen	2 ml (Greiner, Solingen)
MACS-Säulen	MACS separation columns MS, LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Messpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Roth, Karlsruhe; Corning, New York, USA)
Mikrometerschrauben	Cell Tram Air, Cell Tram Vario (Eppendorf, Hamburg)
Mikrotiterplatten	96- (Rund- und Flachboden), 48-, 24-, 12-, 6- Loch (Greiner, Solingen)

---

Nylonwolle	Dunn Labortechnik, Asbach
Objektträger	ChemMate™ Capillary Gap Microscope Slide; 75 µm (Dako, Hamburg); Histo Bond 76 x 26 x 1 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Ohrmarken	Hauptner & Herberholz, Solingen
Paraffinkassetten	Tissue Tek uni cassette (Sakura, Heppenheim)
Paraplast	Mc Cormick Scientific, St. Louis, USA
Pasteurpipetten, Glas-	230 mm (Brand, Wertheim)
PCR-Reaktionsgefäße	Axygen (Nerbe Plus), Winsen/Luhe
Petrischalen	35 x 15 mm, 60 x 15 mm, 90 x 15 mm (Greiner, Solingen)
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl (Roth, Karlsruhe)
Präparationsbesteck	FST, Heidelberg
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg); 2 ml (Greiner, Solingen)
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Rotlichtlampe	150 W (Breker Tierbedarf, Rüthen)
Siebe, Nylon-	40 µM (Becton Dickinson, Heidelberg)
Skalpelle, Einweg-	Feather Disposable Scalpel, No.10, No.11, No.15 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Spritzen, Einweg-	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2 µM, 0,45 µM (Schleicher & Schuell, Dassel)
Sterilfilter, Flaschen-	250 ml, 500 ml, 1 L (Nalgene, Rochester, USA)
Thermo Clean	mit Methylenblau-Indikator (Bioanalytic, Umkirch/Freiburg)
Tierfutter	Ssniff, Soest
Tierkäfige und Zubehör	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Transfermembran	Roti-PVDF (Roth, Karlsruhe)
Vernichtungsbeutel	600 x 780 mm (Greiner, Solingen)
Verschlußkonus, universal	Combi-Stopper 100 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> , 225 cm <sup>2</sup> (Corning, New York, USA)

Zellkulturschalen 95 x 15 mm (Greiner Solingen, Corning, New York, USA)

### 2.1.3 Allgemeine Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung; 30%	Roth, Karlsruhe
AEC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Substrate Solution (Chrom)	Dako, Hamburg
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ammoniak (25%)	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Antibody diluent	Dako, Hamburg
Aquatex	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Biotin Blocking System	Dako, Hamburg
N, N, Bis [2-Hydroxyethyl]-2-amino-Ethansulfonsäure (BES)	Sigma-Aldrich, München
100 bp-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Brefeldin A (GolgiPlug)	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CaliBRITE APC Bead	Becton Dickinson, Heidelberg
5-, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (5(6)-CFDA-SE;CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Chemilumineszenz Substrat (SuperSignal West Pico)	Pierce, Rockford, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg

CpG-1668 (5`-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3`)	TIB Molbiol, Berlin
ddH <sub>2</sub> O (embryogetestet)	Sigma-Aldrich, München
DAPI II-Fertiglösung	Abbott, Wiesbaden
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
4', 6-Diamidino-2-phenylindol, dilactat (DAPI, dilactat)	Invitrogen, Karlsruhe
1,4 Diazabicyclo (2.2.2) octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Doxyzyklin Hyclate	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin; 0,5%; wässrig	Merck, Darmstadt
Ethanol; absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung; 1%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ferrialaun	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung; 4%; gepuffert; pH 6,9	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung; 10%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium-2500	Ratiopharm, Ulm
Hidi-Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
1 kb-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Kernechtrot	Merck, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid	Pfizer, Karlsruhe

---

Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Monensin (GolgiStop)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mowiol 4-88 Reagent	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Lösung; 3 M; pH 4,6	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Delta Select, Pfullingen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge; 1 M; 5 M	Merck, Darmstadt
Nukleotid-Stammlösung	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Nycodenz	Progen, Heidelberg
Oligo-d(T)-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonukleotide (Primer)	MWG, Ebersberg
Ovalbumin	Serva, Heidelberg
OVA <sub>257-264</sub> Peptid; 80% HPLC rein	Pineda Berlin
Oxalsäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Percoll	Amersham Biosciences, Freiburg
Pertex	Mediate, Burgdorf
Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail, Mini	Roche, Mannheim
Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1)	Roth, Karlsruhe
Protein Leiter, Prestained, 10-180 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure; 3%	Merck, Darmstadt

Silbernitrat-Lösung; 10%; wässrig	Merck, Darmstadt
Stickstoff; flüssig	Linde, Pullach
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Terminator Ready Reaction Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tetrachlorgold (III)-säure (gelb)	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura, Heppenheim
TO-PRO-3 Iodid	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypton	Merck, Darmstadt
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Delta Select, Pfullingen
Xylazinhydrochlorid	Serumwerk, Bernburg
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4 Verwendete Enzyme

Alkalische Phosphatase (BAP)	Invitrogen, Karlsruhe
AMV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Collagenase IA, D	Sigma-Aldrich, München
DNase I	Sigma-Aldrich, München
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Rnase-Free DNase Set	Qiagen, Hilgen
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe



DEPC-H <sub>2</sub> O	0,2% Diethylpyrocarbonat; autoklavieren
DNA-Lyse Puffer	50 mM Tris-HCL, pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCL; 1% SDS
Doxyzyklin-Trinklösung	0,1 g/L Doxyzyklin; 25 g/L Sucrose; in Leitungswasser
FACS-Puffer	1 g/L BSA; in PBS
Ladepuffer (10x)	40% Glycerol; 20% TAE (50x); 1 Spatelspitze Bromphenolblau; 1 Spatelspitze Xylencyanol
MACS-Puffer	2 mM EDTA; 1g/L BSA; in PBS
Mowiol/DABCO-Lösung	2,4 g Mowiol; 4,8 ml 100% Glycerol; 6 ml H <sub>2</sub> O; 12 ml Tris-HCl pH 8,5; 0,45 g DABCO
Nycodenz-Stammlösung; 30%	300 g/L Nycodenz
Nycodenz-Verdünnungspuffer	4,5 mM Tris; 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,3 mM EDTA; pH 7,5
Nycodenz-Arbeitslösung	Nycodenz Stammlösung 1:1,2 mit Nycodenz Verdünnungspuffer mischen
Paraformaldehyd	40 g/L bzw. 20 g/L; in PBS; pH 7,0
Percoll	80% bzw. 40%; in PBS
Perfusionspuffer <sup>30</sup>	0,4 mg/ml Collagenase D; in PBS
Perfusionspuffer <sup>31</sup>	0,4 mg/ml Collagenase D; 80 µg/ml DNase I in PBS
Permeabilisierungspuffer	0,1% Triton X-100; in PBS (Immunhistochemie und Immunfluoreszenz von Zellen)
Pronukleus-Injektionspuffer	10 mM Tris (extra rein) pH 7,4; 0,1 mM EDTA (extra rein); in H <sub>2</sub> O (embroygetestet)
Saponinpuffer	20 g/L BSA; 5 g/L Saponin; in PBS
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris; 5,7% Eisessig; 50 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0
Tris-Puffer (0,5 M; 1 M; 1,5 M)	in H <sub>2</sub> O; pH-Wert mit HCl einstellen
Tris-Waschpuffer	5 mM Tris-HCl pH 7,4-7,6; 16 mM NaCl
Verdauungspuffer	0,4 mg/ml Collagenase D; in GBSS

<sup>30</sup> für leberassoziierte Lymphozyten

<sup>31</sup> für leberassoziierte Dendritische Zellen (DC)

**2.1.7 Lösungen für die Bakterienkultur**

Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin
LB-Medium	10 g/L Trypton; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt
LB-Agar	15 g Agar; ad 1 L LB-Medium (eventuell 100 µg/ml Ampicillin)

**2.1.8 Lösungen für Gordon Färbung**

saures Kaliumpermanganat; 0,5%	250 ml/L Kaliumpermanganat (2%); 53 ml/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3%)
Silbernitrat-Lösung	100 ml/L wässrige Silbernitrat-Lösung (10%); tropfenweise 25% Ammoniak hinzu, bis sich der gebildetet Niederschlag gerade wieder löst; 100 ml/L wässrige Natriumhydroxidlösung (3%); tropfenweise 25% Ammoniak hinzu, bis sich der gebildetet Niederschlag gerade wieder löst; wässrige Silbernitrat-Lösung (5%) bis Lösung hellbraun-gelblich

**2.1.9 Lösungen für Western Blot Analyse**

SDS-Laufpuffer (10x)	30 g/L Tris; 144 g/L Glycin; 10 g/L SDS
SDS-Laufpuffer (1x)	Laufpuffer (10x) 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen
PBST-Waschpuffer	0,1% Tween 20; in PBS
Transferpuffer (10x)	200 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,1% SDS
Transferpuffer (1x)	10% Transferpuffer (10x); 20% Methanol; in H <sub>2</sub> O
Stripping-Puffer	100 mM β-Mercaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris pH 6,7
Blocking-Puffer	50 g/L Magermilchpulver; in PBST

RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% SDS; 1,0% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA; 1 mM Protease Inhibitor
Coomassie-Färbelösung	2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue R250; 50% Methanol; 10% Eisessig; in H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärbelösung	30% Methanol; 10% Eisessig; in H <sub>2</sub> O

### 2.1.10 Lösungen für die Zellkultur

Einfriermedium	10% DMSO; in FCS
Fibroblastenmedium (MEF tTA-) und HeLa tTA-Medium	D-MEM; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Glutamin; 50 µg/ml G-418
Mausohr-Fibroblastenmedium	RPMI 1640; 20% FCS; 1% Glutamin; 3% Penicillin/Streptomycin; 1% Natriumpyruvat
Mausohr-Verdauungsmedium	1 mg/ml Collagenase IA; 2,5 µg/ml Fungizone; in Mausohr-Fibroblastenmedium
T-Zellmedium	RPMI 1640 + HEPES; 10% FCS, 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 50µM β-Mercaptoethanol

### 2.1.11 Verwendete Kits

ApopTag Apoptosis Detection Kit	Chemicon, Hofheim
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
Cytometric Bead Array	Becton Dickinson, Heidelberg
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
DakoREAL Detection System und Peroxidase/AEC Kit	Dako, Hamburg

### 2.1.12 Verwendete Primärantikörper

Tab.2.1 **Verwendete Antikörper gegen Oberflächenmarker und intrazelluläre Epitope.** Sofern nicht anders angegeben wurden monoklonale Antikörper gegen murine Epitope verwendet, die mit einem Fluorochrom (Alexa Fluor 488, FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, APC, PE-Cy7, APC-Cy7), mit einem Biotin oder unkonjugiert waren.

Antigen	Isotyp	Klon	Bemerkung/Methode	Referenzquelle
CD3ε	IgG, Hamster	145-2C11	auch unkonjugiert zur Restimulierung <i>in vitro</i> eingesetzt; DZ	BD; PK
CD3ε	IgG, Hamster	500A2	DZ; IF	Invitrogen
CD4	Ig2b κ, Ratte	GK1.5	DZ; IF	BD
CD4	IgG2b, Ratte	YTS 191.1.2	DZ	ImmunoTools
CD8	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	= Ly-2; DZ; IF	BD
CD11c	IgG1 λ2, Hamster	HL3	= Integrin α <sub>x</sub> Kette; DZ; IF	BD
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	DaBe4	= anti-FcγR III/II unkonjugiert; DZ; IF	ImmunoTools
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	= anti-FcγR III/II unkonjugiert ; DZ; IF	BD
CD45R	IgG2a κ, Ratte	RA3-6B2	= B220; DZ; IF	BD
CD69	IgG1 λ3, Hamster	H1.2F3	DZ	BD
CD90.2	IgG2a κ, Ratte	53-2.1	= Thy1.2; DZ	eBiosciences
CD90.1	IgG2a κ, Maus	HIS51	= Thy1.1; DZ	eBiosciences
IFN-γ	IgG1, Ratte	XMG1.2	DZ	BD
NK1.1	IgG2a κ, Maus	PK136	= NKR-P1B und NKR-P1C; DZ	BD
Vα2 TZR	IgG2a λ, Ratte	B20.1	DZ	BD
Vβ5.1, 5.2 TZR	IgG1 κ, Maus	MR9-4	DZ	BD
c-myc	IgG1, Maus	9E10	gegen humanes c-myc Protein; unkonjugiert; IF	BD

OVA	Kaninchen	-	polyklonales Antiserum (56 mg/ml); unkon- jungiert; DZ; IF; IH; WB	CK
c-myc	Kaninchen	-	polyklonales Antiserum; unkonjungiert; WB	Santa Cruz
$\beta$ -Aktin	IgG1, Maus	AC-15	unkonjungiert; WB	Sigma-Aldrich
Ki67	IgG2a, Ratte	TEC-3	unkonjungiert; IH	Dako

Quellenabkürzung: BD = Becton Dickinson, Heidelberg; CK = mit freundlicher Genehmigung von Christian Kurts, IMMEI, Bonn; Dako = Dako, Hamburg; DZ = Durchflußzytometrie eingesetzt; eBiosciences = eBiosciences, San Diego, USA; IF = Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt; IH = Immunhistochemische eingesetzt; ImmunoTools = ImmunoTools, Friesoythe; Invitrogen = Invitrogen, Karlsruhe; PK = mit freundlicher Genehmigung von Percy Knolle, IMMEI, Bonn; Santa Cruz = Santa Cruz, Heidelberg; Sigma-Aldrich = Sigma-Aldrich, München; WB = Western Blot eingesetzt

### 2.1.13 Verwendete Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Hase IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Biotinylated Secondary Antibodies	Dako, Hamburg
polyklonaler Ziege anti-Hase Immunglobulin/HRP	Dako, Hamburg
polyklonaler Ziege anti-Maus Immunglobulin/HRP	Dako, Hamburg
Streptavidin Alexa Fluor 568	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin APC-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
Streptavidin Peroxidase (HRP)	Dako, Hamburg

### 2.1.14 Magnetische Kügelchen („*MicroBeads*“)

murine CD8a (Ly-2) <i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach
murine CD11c (N418) <i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach

### 2.1.15 Oligonukleotide

#### Genotypisierung und RT PCR

CamK2tTA-fwd	5'-CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG-3'
CamK2tTA-rev	5'-CAT GTC CAG ATC GAA ATC GTC-3'
Myc-f	5'-AGC TTG TAC CTG CAG GAT CTG AGC-3'
Myc-r	5'- ATC CAG ACT CTG ACC TTT TGC CAG-3'
OVA-f	5'-GAT GTT TAT TCG TTC AGC CTT GCC-3'
OVA-r	5'-CAA TCT GGT ACA TCA TCT GCA CAG G-3'
mb-Act-F	5'-GGT CAG AAG GAC TCC TAT GT-3'
mb-Act-R	5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG TC-3'

#### Sequenzierung

ova1	5'-CGA ATT CGA GCT CGG TAC-3'
ova2	5'-CAC TTA GAG ACA TCC TCA ACC-3'
ova3	5'-TGT CTT CAA AGG ACT GTG GG-3'
ova4	5'-CTT ACC TCG CAT GAA GAT GG-3'
ovaA	5'-CAC CCT GAA GTT CTC AGT C-3'
c-myc1	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
c-myc2	5'-GCT CTG CTC GCC CTC CTA C-3'
c-myc3	5'-GCT GGC CTC CTA CCA GGC TG-3'
c-myc4	5'-CTG GTG CTC CAT GAG GAG AC-3'
c-myc5	5'-AGT TGG ACA GTG TCA GAG TCC-3'
c-myc6	5'-CCA CAG CAT ACA TCC TGT C-3'
c-mycA	5'-GGT GAT TGC TCA GGA CAT TTC-3'
c-mycB	5'-GCT CCG TTT TAG CTC GTT CC-3'
c-mycC	5'-GGC TGT GAG GAG GTT TGC-3'
c-mycD	5'-TCT TGC GAG GCG CAG GAC-3'
c-mycE	5'-TGA AGG TCT CGT CGT CCG-3'
c-mycF	5'-GCT GCA GCT CGC TCT GCT G-3'
T3	5'-CGA AAT TAA CCC TCA TA AAG GG-3'
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3'

## Oligoligation

<i>Bam</i> HI- <i>Nhe</i> IA	5`-GAT CCC CTT AAG CTA GC-3`
<i>Not</i> I- <i>Nhe</i> I	5`-GGC CGC TAG CTT AAG GG-3`
<i>Hind</i> III- <i>Mlu</i> I	5`-AGC TAC GCG T-3`

## 2.1.16 Verwendete Plasmide

Tab.2.2 Verwendete Plasmide, ihre Beschreibung und Referenzquelle

Bezeichnung	Beschreibung	Referenzquelle
pBI-4	bidirektionales rTA/rtTA Response-Reporter-Plasmid und Klonierungsvektor	AK; HB; Baron et al. 1995
pBI-4 <i>c-myc</i>	Exon2 und Exon3 humaner <i>c-myc</i> cDNA über <i>Not</i> I und <i>Sal</i> I aus pBluescript II KS (+) <i>c-myc</i> Klon9 herausgeschnitten und in pBI-4 kloniert	diese Arbeit
pBI-4 <i>c-myc/OVA</i> Klon6	in pBI-4 <i>c-myc</i> wurde über <i>Mlu</i> I und <i>Nhe</i> I die Ovalbumin cDNA kloniert	diese Arbeit
pBluescript II KS (+)	Plasmid für DNA Klonierungen mit mehreren Klonierungsstellen	RJ
pBluescript II KS (+) <i>c-myc</i> Klon9	Exon2 und Exon3 humaner <i>c-myc</i> cDNA über <i>Eco</i> RI in pBluescript II KS (+) kloniert Orientierung: 5` in Richtung <i>Not</i> I	diese Arbeit
pBluescript II KS (+) <i>c-myc</i> Klon15	Exon2 und Exon3 humaner <i>c-myc</i> cDNA über <i>Eco</i> R I in pBluescript II KS (+) kloniert Orientierung: 5` in Richtung <i>Sal</i> I	diese Arbeit
pBluescript II KS (+) <i>OVA</i>	Hühnereiweiß (Ovalbumin) cDNA über <i>Eco</i> RI (5`) und <i>Bam</i> H I (3`) in pBluescript II KS (+) kloniert	FM

pBluescript II KS (+) <i>OVA MluI</i> Klon6	über <i>HindIII</i> wurde <i>MluI</i> Schnittstelle (Oligonukleotid: <i>HindIII-MluI</i> ) in pBluescript II KS (+) <i>OVA</i> kloniert	diese Arbeit
pBluescript II KS (+) <i>OVA MluI-NheI</i> Klon8	in pBluescript II KS (+) <i>OVA MluI</i> Klon6 wurde über <i>BamHI</i> und <i>NotI</i> eine <i>NheI</i> Schnittstelle kloniert (Oligonukleotid <i>BamHI-NheIA</i> und <i>NotI-NheI</i> )	diese Arbeit
pUHD10-3 <i>c-myc</i>	Exon2 und Exon3 humaner <i>c-myc</i> cDNA über <i>EcoRI</i> in pUHD10-3 kloniert	DF; Felsher und Bishop, 1999
pUHRt 62-1 („M2“)	reverser tetrazyklin kontrollierter Transaktivator (rtTA M2) unter der Kontrolle des CMV Promoters	KS; HB

Quellenabkürzung: AK = mit freundlicher Genehmigung von Andrea Kröger, Helmholtz-zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig; DF = mit freundlicher Genehmigung von Dean Felsher, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA; FM = mit freundlicher Genehmigung von Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg; HB = mit freundlicher Genehmigung von Hermann Bujard, ZMBH, Heidelberg; KS = mit freundlicher Genehmigung von Kai Schönig, Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim; RJ = mit freundlicher Genehmigung von Richard Jäger, Institut für Pathologie, Bonn

### 2.1.17 Verwendete Mauslinien

Tab.2.3 **Verwendete Mauslinien, ihre Beschreibung und Referenzquelle.** Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung der Pathologie und im HET (Haus für experimentelle Therapie) in Bonn gehalten.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenzquelle
CD-1	Auszuchtstamm; vasektomierte Männchen; Ammenmütter	Harlan; Charles River
C57BL/6J	Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2K <sup>b</sup>	Harlan; Charles River
FVB/N	Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotyp H2K <sup>q</sup>	Harlan; Charles River
B6D2F1	Hybridstamm aus Kreuzung C57BL/6J x DBA/2; mit dem MHC Haplotyp H2K <sup>b</sup> und H2K <sup>d</sup>	Harlan; Charles River

B6.Cg-Tg (tTALap)5Bjd/J	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator (tTA) wird in der Leber exprimiert (LAP = <i>liver-enriched activator protein</i> ) Rückkreuzung für mindestens 10 Generationen auf C57BL/6J	Charles River; Kistner et al. 1996
B6 c-myc/OVA 75	linearisierte <i>c-myc/OVA</i> cDNA in Pronuklei von Oozyten aus B6D2F1 x C57BL/6J injiziert; Rückkreuzung für mindestens 7 Generationen auf C57BL/6J	diese Arbeit
B6 c-myc/OVA 100	linearisierte <i>c-myc/OVA</i> cDNA in Pronuklei von Oozyten aus C57BL/6J x C57BL/6J injiziert	diese Arbeit
OT I /C57BL/6J	CD8+ T-Zelltransgene Mauslinie; CD8+ T-Zellen erkennen das OVA <sub>257-264</sub> Peptid, präsentiert auf H2K <sup>b</sup> und exprimieren den V $\alpha$ 2/V $\beta$ 5 T-Zellrezeptor	PK; Hoquist et al. 1994
OT I-RAG <sup>-/-</sup> /C57BL/6J	RAG2-Gen ( <i>recombinase-activating gene</i> 2) defiziente Mäuse, denen aufgrund der fehlenden Rekombination alle B- und T-Zellrezeptor-tragenden Zellen fehlen	CK
Tet-o-MYC	Exon2 und Exon3 der humanen <i>c-myc</i> cDNA in FVB/N	DF; Felsher und Bishop 1999
Thy1.1/C57BL/6J	<i>Thy1<sup>a</sup></i> (kodiert für Thy1.1 Leukozyten-Alloantigen) transgener Mausstamm; unterschiedlich zum herkömmlichen Thy1.2 Leukozyten-Alloantigen in Wildtyp C57BL/6J Mäusen	PK; Jackson

Quellenabkürzung: Charles River = Charles River, Sulzfeld; CK = mit freundlicher Genehmigung von Christian Kurts, IMMEI, Bonn; DF = mit freundlicher Genehmigung von Dean Felsher, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA; Harlan = Harlan, Borcheln; Jackson = The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA; PK = mit freundlicher Genehmigung von Percy Knolle, IMMEI, Bonn

### 2.1.18 Verwendete Bakterienstämme

TOP10F<sup>+</sup> (Invitrogen, Karlsruhe)

*E.coli* - Stamm: F<sup>+</sup> {*lacIq* Tn10(TetR)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMSmcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *rec A1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *end A1* *nupG*

### 2.1.19 Verwendete Zelllinien

Tab.2.4 Verwendete Zelllinien, ihre Beschreibung und Referenzquelle

Bezeichnung	Beschreibung	Referenzquelle
B3Z	CD8+ T-Zellhybridom, welches aus einem CD8+ T-Zellklon generiert wurde, dessen T-Zellrezeptor (TZR) spezifisch das OVA <sub>257-264</sub> Peptid, präsentiert auf H2K <sup>b</sup> , erkennt. Eine TZR vermittelte Aktivierung kann über ein <i>lacZ</i> -(bakterielle $\beta$ -Galaktosidasegen) Reporter gen, welches unter der Kontrolle des NF-AT Elements des IL-2 Enhancers steht, gemessen werden. Bei einer Aktivierung produzieren diese Zellen IL-2 und $\beta$ -Galaktosidase.	PK; Karttunen et al. 1991
HeLa S3 Tet off cell line (HeLa tTA)	humane Cervixkarzinomzelllinie (HeLa), die mit dem Tetrazyklin kontrollierten Transaktivator (tTA; Gossen und Bujard, 1992) stabil transfiziert wurde	JK; Clontech
MEF/3T3 Tet off cell line (MEF tTA)	mausembryonale Fibroblasten-Zelllinie die mit dem Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) stabil transfiziert wurde	JK; Clontech
NIH-3T3	Maus-Fibroblasten-Zelllinie	Pathologie

Quellenabkürzung: Clontech = Clontech, Heidelberg; JK = mit freundlicher Genehmigung von Jutta Kirfel, Institut für Pathologie, Bonn; Pathologie = Sammlungen Institut für Pathologie, Bonn; PK = mit freundlicher Genehmigung von Percy Knolle, IMMEI, Bonn

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung und Applikation *in vivo*

Die Mäuse wurden in Plastik Käfigen gehalten und erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Zur Identifizierung der Tiere wurde im Alter von drei Wochen eine Schwanzbiopsie zur DNA-Gewinnung durchgeführt und die Mäuse mit nummerierten Ohrmarken gekennzeichnet. Der Tag- und Nachtzyklus in den Versuchstierhaltungen betrug 12 h.

Um die Zusammenhänge des Immunsystems und deren Abläufe zu verstehen, wurden Versuche *in vivo* in transgenen Mäusen sowie Kontrollgruppen durchgeführt. Die Applikation von CpG-1668 ODN (0,5 µg, Krieg et al. 1995, Sato et al. 1996) und löslichem Antigen (Ovalbumin, 2 mg) erfolgte intravenös. Der adoptive Transfer von OT I T-Zellen ( $1-3 \times 10^6$ ) wurde ebenfalls durch einer intravenösen Applikation durchgeführt. Eine Stimulierung endogener T-Zellen erfolgte ca. 1,5 h vor Versuchsbeginn durch intravenöse Applikation von 2 µg anti CD3.

Die hormonelle Stimulierung der Eizellen-Spendermäuse mit den beiden verwendeten Hormonen PMS (*pregnant mares serum*) und HCG (*human chorionic gonadotropin*) erfolgte intraperitoneal. Dazu wurden 5 U PMS um 15:00 Uhr und 47 h später 5 U HCG verabreicht.

Für den Transfer manipulierter Eizellen wurde den Ammenmüttern eine Kombinationsnarkose, bestehend aus den beiden Wirkstoffen Xylazinhydrochlorid und Ketaminhydrochlorid (100 µg / 10 g Körpergewicht), intraperitoneal verabreicht.

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Im Rahmen der neonatalen Tumorinduktionsexperimente wurde den *c-myc* x LAP tTA, *c-myc/OVA* 75 x LAP tTA sowie den *c-myc/OVA* 100 x LAP tTA transgenen Tieren während der Verpaarung Doxyzyklin-Trinklösung (25 g/L Sucrose; 0,1 g/L Doxyzyklin) zur Unterdrückung der Genexpression von *c-myc* und *OVA* gegeben. Die Lösung wurde lichtgeschützt, in dunklen Trinkflaschen verabreicht und zweimal die Woche gewechselt. Bei Geburt wurde durch Austausch der Doxyzyklin-Trinklösung gegen gewöhnliches Trinkwasser die Genexpression von *c-myc* und *OVA* induziert. Im Alter von ca. 4-5 Wochen wurden die Tiere analysiert.

Im Rahmen der embryonalen Tumorinduktionsexperimente wurde den *c-myc/OVA* 75 x LAP tTA transgenen Tieren während der Verpaarung bereits gewöhnliches Trinkwasser ohne

Zusätze gegeben, um die Expression von *c-myc* und *OVA* schon vor der Geburt zu induzieren. Die Tiere wurden entweder am ersten oder fünften Tag nach der Geburt analysiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 DNA Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus

Die Schwanzbiopsien wurden in 710  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer und 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55°C lysiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 min gemischt. Anschließend wurde den Proben 300  $\mu\text{l}$  5 M NaCl zugegeben und diese erneut für 5 min bei Raumtemperatur gemischt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 10°C wurde 750  $\mu\text{l}$  Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol überführt. Die Fällung der DNA erfolgte bei einer Zentrifugation von 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und das so erhaltene DNA Pellet zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  80%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C für 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 3 h bei 37°C gelöst.

### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Identifizierung der Mäuse und Bestimmung der Genotypen wurde eine PCR durchgeführt.

Tab.2.5 Übersicht über Pipettierschemata und Programme der Genotypisierungs-PCR

	tTA	c-myc und OVA
DNA	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
PCR-Puffer (10x)	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$
dNTPs (10 mM)	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

Primer (10 pmol/ $\mu$ l; 15 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l CamK2tTA-fwd (10 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l CamK2tTA-rev (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l OVA-f (15 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l OVA-r (15 $\mu$ mol/ $\mu$ l)  1 $\mu$ l Myc-f (15 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l Myc-r (15 $\mu$ mol/ $\mu$ l)
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	35,2 $\mu$ l	35,2 $\mu$ l
<b>Programm</b>	94°C; 45 sec 58°C; 30 sec 72°C; 45 sec	94°C; 45 sec 60°C; 30 sec 72°C; 45 sec
<b>Zyklusanzahl</b>	35	35

### 2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich DNA-Gemische aufzutrennen und ihre Größe zu bestimmen. Es wurden 1%ige (für sonstige Analysen) und 2%ige (für PCR) horizontale Agarosegele verwendet. Dazu wurde die Agarose abgewogen, mit entsprechender Menge an TAE Puffer (1x) versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50-60°C wurde Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml) zugegeben, das Gel gegossen und die Probenkämme eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer (1x) befüllt. Den Proben wurde 1/10 des Volumens Ladepuffer zugefügt, entsprechende Mengen (15  $\mu$ l PCR Ansatz) in die Taschen gefüllt und je nach Gelstärke bei 70-130 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine 100 bp- oder 1 kb-Leiter mitgeführt. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz im UV-Licht (320 nm).

### 2.2.2.4 Analytischer und präparativer Verdau

Für einen analytischen Verdau wurden 1  $\mu$ l Plasmid-DNA (ca. 1  $\mu$ g) mit 2  $\mu$ l Restriktionsenzym-puffer (10x) und 1  $\mu$ l Restriktionsenzym (10-20 U/ $\mu$ l) versetzt. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20  $\mu$ l gebracht und für 1-2 h bei 37°C inkubiert.

Bei einem präparativen Ansatz wurden 20 µg DNA (ca. 5 µg Insert) in einem Gesamtvolumen von 70 µl verdaut. Entsprechend wurden 5 µl (10-20 U/µl) Restriktionsenzym und 7 µl Restriktionspuffer (10x) eingesetzt. Es erfolgte ein Verdau bei 37°C über Nacht.

Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei Restriktionsenzymen (Doppel-Verdau) wurde die eingesetzte Menge halbiert.

#### **2.2.2.5 Präparation von Dialyseschläuchen**

Dialyseschläuche von 25 mm Breite wurden in ca. 7 cm lange Stücke geschnitten und für 10 min in 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1 mM EDTA gekocht. Anschließend wurden die Schläuche zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in einer 1 mM EDTA Lösung autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

#### **2.2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten**

##### **2.2.2.6.1 Elektroelution von DNA-Fragmenten für die Pronukleusinjektion**

Die Bande von Interesse wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel (ohne Ethidiumbromid) herausgeschnitten und in einen, zweimal mit 5 ml H<sub>2</sub>O ausgespülten, Dialyseschlauch überführt. Der Schlauch wurde am unteren Ende mit einer Klammer verschlossen. Zu dem Gelstück wurden 350 µl TE-Puffer gegeben und der Schlauch wurde oben mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei abgedichtet. Der Schlauch wurde in eine mit TAE-Puffer (1x) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und eine Spannung von 90 V angelegt. Die Polungsrichtung wurde nach 2 h für 45 sec umgekehrt. Die DNA konnte somit elektrophoretisch aus dem Gel eluiert werden. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung aus dem Schlauch herauspipettiert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer Ethanol-Präzipitation durchgeführt.

#### 2.2.2.6.2 Elution von DNA Fragmenten für sonstige Analysen

Die Bande von Interesse wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ die DNA eluiert. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Das herausgeschnittene Gelstück wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, gewogen und das 3-fache Volumen an *Qiagen Puffer QG* zu einem Volumen Gelstück pipettiert (100 mg wurden 100 µl gleichgesetzt). Während der 10-minütigen Inkubation bei 50°C wurde die Probe alle 2-3 min gemischt. Anschließend wurde ein 1-faches Volumen Isopropanol zugesetzt, erneut gemischt und die Probe in eine *QIAquick Säule* überführt, die zuvor in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesetzt wurde. Nach einem 1-minütigem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm wurde der Durchlauf verworfen, die Säule mit 0,5 ml *Qiagen Puffer QG* gespült, erneut zentrifugiert und mit 0,75 ml *Qiagen Puffer PE* gewaschen. Es wurde zweimal bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säule danach in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Die DNA-Elution erfolgte mit 35 µl *Qiagen Puffer EB* oder H<sub>2</sub>O nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min.

#### 2.2.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen

Der Nukleinsäurelösung wurde ein gleiches Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, gemischt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gleiche Menge an Chloroform hinzugegeben und bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die DNA schließlich Ethanol-präzipitiert.

#### 2.2.2.8 Ethanol-Präzipitation nukleinsäurehaltiger Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit dem 2 bis 3-fachen Volumen 100% Ethanol und 1/10 des Volumens einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6) gemischt und 40 min bei -80°C inkubiert. Die Lösung wurde für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 2 min

wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O (oder Pronukleus-Injektionspuffer) aufgenommen.

#### **2.2.2.9 Ligation von DNA**

Für die Ligation von 3`-Hydroxyl und 5`-Phosphatenden zwischen Vektor-DNA und Insert über eine Phosphodiesterbindung wurde die T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben eingesetzt. 100 ng Vektor und ein 3-facher molarer Überschuß Insert wurden mit 4 µl Ligasepuffer (5x) und 2 µl T4-DNA-Ligase gemischt. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im PCR-Gerät.

#### **2.2.2.10 Ligation von Oligonukleotiden**

Die Oligonukleotide (100 pmol/µl) wurden 5 min bei 75°C im Heizblock inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei der Verwendung von zwei Oligonukleotiden wurden diese zu gleichen Verhältnissen gemischt.

100 ng Vektor wurde mit 4 µl Ligasepuffer (5x) und 2 µl T4-DNA-Ligase gemischt und mit Oligonukleotiden auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im PCR-Gerät.

#### **2.2.2.11 Alkalische Phosphatase Behandlung**

Bei einem nicht asymmetrischen Verdau wurde, um eine Religierung der Vektor-DNA zu minimieren, die 5`-Phosphatenden durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren. 35 µl linearisierte und Gel-eluierte Vektor-DNA wurde mit 4 µl Dephosphorylierungspuffer (10x) und 1 µl alkalischer Phosphatase (BAP = *Bacterial Alkaline Phosphatase*; 150 U/µl) gemischt bei 65°C im Heizblock inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurde die Vektor DNA Phenol/Chloroform-extrahiert und Ethanol-präzipitiert.

#### **2.2.2.12 Herstellung von Agarplatten**

Eine Flasche LB-Agar (400 ml) wurde nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf ca. 60°C heruntergekühlt und 100 µg/ml Ampicillin hinzugegeben. Es wurden unter sterilen Bedingungen an der Bunsenbrennerflamme ca. 20 Agar-Platten (9 cm Durchmesser) gegossen. Die Platten wurden gestapelt, abkühlen gelassen und bei 4°C über Kopf gelagert.

#### **2.2.2.13 Zucht von *Escherichia coli* (*E.coli*)**

*E. coli* wurde in LB-Medium unter sterilen Bedingungen gezüchtet. Die Vorkulturen (5 ml) wurden mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht (für sonstige Analysen) oder über Tag (Präparation großer Mengen Plasmid-DNA) gezüchtet. Je nach Bedarf wurde 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Hauptkulturen (200 ml) wurden mit 1% Inokulum beimpft und in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 260 rpm und 37°C geschüttelt.

#### **2.2.2.14 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien**

Die *E. coli* Hauptkultur (50 ml) wurde über Tag in LB-Medium bei 37°C im Bakterienschüttler bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,3 gezüchtet. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und bei 2.500 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung durch invertieren resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten 5-minütigem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2.500 rpm wurde das Bakterienpellet in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% Glycerol durch invertieren resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.2.15 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien**

Ca. 10 ng Plasmid-DNA wurde mit 100 µl, auf Eis aufgetauten, chemisch-kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 90 sec bei 42°C im Wasserbad. Die Bakterien wurden anschließend erneut für 2 min auf Eis inkubiert.

Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium wurden die Bakterien 35 min bei 37°C und 750 rpm geschüttelt. 100 µl wurden direkt auf eine LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert, der Rest wurde 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

#### 2.2.2.16 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini Pröp“)

Die Präparation kleiner Mengen an DNA erfolgte mit dem „*QIAprep Spin Miniprep Kit*“ der Firma Qiagen. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde bei 5.000 rpm 5 min zentrifugiert, das erhaltene Bakterienpellet in 250 µl *Qiagen Puffer P1* resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl *Qiagen Puffer P2* wurde die Lösung 4-6 mal invertiert, mit 350 µl *Qiagen Puffer N3* versetzt und erneut 4-6 mal invertiert. Die anschließende Zentrifugation wurde bei 13.000 rpm für 10 min durchgeführt und der Überstand auf eine *QIAprep Säule*, die zuvor in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gestellt wurde, überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30-60 sec. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule mit 0,5 ml *Qiagen Puffer PB* gespült, bei 13.000 rpm für 30-60 sec zentrifugiert und mit 0,75 ml *Qiagen Puffer PE* gewaschen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und die aufgereinigte Plasmid-DNA mit 50 µl *Qiagen Puffer EB* oder H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.2.2.17 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Pröp“)

Verwendet wurde das „*HiSpeed Plasmid Maxi Kit*“ der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Eine 200 ml Übernachtskultur wurde 15 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml *Qiagen Puffer P1* resuspendiert. Danach wurden 10 ml *Qiagen Puffer P2* zugegeben und die Zellen 5 min bei Raumtemperatur lysiert. In der Zwischenzeit wurde eine *QIA-Filter-Maxi-Cartridge* mit einer Kappe verschlossen und aufgestellt. Nach Zugabe von 20 ml kaltem *Qiagen Puffer P3* wurde die Bakteriensuspension invertiert und sofort auf die *Cartridge* gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation, wurde das Lysat auf eine, mit 10 ml *Qiagen Puffer QBT* äquilibrierte, *HiSpeed-Maxi-Säule* ausgepresst. Die Säule

wurde anschließend mit 60 ml *Qiagen Puffer QC* gewaschen. Danach wurde ein 50 ml-Einmalröhrchen unter die Säule gestellt und die DNA mit 15 ml *Qiagen Puffer QF* eluiert. Es wurden 10,5 ml Isopropanol zur DNA Lösung gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde in dem folgenden Schritt durch einen *QIA-Präzipitator* gedrückt. Die nun im Präzipitator befindliche DNA wurde mit 2 ml 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend zweimal ohne Flüssigkeitszugabe durchgespült. In einem letzten Schritt wurde die DNA mit zweimal 600 µl H<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert und die Konzentration am Photometer bestimmt.

### 2.2.2.18 Konzentrationsbestimmung nukleinsäurehaltiger Lösungen im Photometer

Mit Hilfe eines Spektralphotometers ist es möglich die Konzentration und im gewissen Maße auch die Reinheit von nukleinsäurehaltigen Lösungen zu bestimmen. Dazu mißt man die nukleinsäurehaltige Lösung gegen ihr Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die DNA-Konzentration läßt sich durch die Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmen, wobei die Absorption direkt proportional zum DNA-Gehalt ist. Bei einer optischen Dichte ( $OD_{260 \text{ nm}}$ ) von 1, ergibt sich für doppelsträngige DNA ein Gehalt von 50 µg/ml und für RNA eine Konzentration von 40 µg/ml. Unterschiedlich zu den Nukleinsäuren besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm stellt somit ein Maß für die Reinheit der Lösung dar. Er sollte bei DNA im Bereich von 1,8 und bei RNA im Bereich von 2,0 liegen.

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O angemessen verdünnt (in der Regel 1:100) und in Quarzküvetten gegen H<sub>2</sub>O gemessen.

### 2.2.2.19 Sequenzierung von Nukleinsäuresequenzen

Die Überprüfung der Nukleinsäuresequenzen von *c-myc* und *OVA* erfolgte nach der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977). Diese Methode wird auch als enzymatische DNA-Sequenzierung oder Kettenabbruchverfahren bezeichnet und beruht auf dem zufälligen Einbau von 2,3'-Dideoxynukleotiden (ddNTPs) während der Polymerasekettenreaktion, was zu einem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese führt. Diesen ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, so dass die DNA-Polymerase das nächste Nukleotid nicht mehr anfügen kann

und die Synthese beendet. Dem Sequenzieransatz werden neben den üblichen dNTPs (2'-Desoxynucleotid-triphosphat-Gemisch) auch verschiedene Fluoreszenz-markierte ddNTPs zugesetzt. Es kommt in einer statistischen Verteilung zu einem Einbau eines ddNTPs an unterschiedlichen Positionen während der PCR und somit zur Entstehung unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die anhand einer Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt werden können. Im Fluoreszenz-Detektor können die DNA-Fragmente bestimmt und anhand von farbigen Peakdiagrammen visualisiert werden.

### 2.2.2.19.1 Sequenzierung

Die Annealing-Temperatur, die für die einzelnen Sequenzierungen verwendet wurde, richtet sich nach der Anzahl der Guanin (G)- und Cytosin (C)-Nukleinbasen, die in der Primersequenz vorkommen. Bei einer Anzahl zwischen 10 und 12 G- bzw. C-Nukleinbasen wurde eine Annealingtemperatur von 55°C, bei einer Anzahl von weniger als 10 G- und C-Nukleinbasen hingegen 50°C gewählt. Gab es in einer Primersequenz mehr als 12 G- und C-Nukleinbasen, betrug die Annealingtemperatur 60°C.

Tab.2.6 Pipettierschema der Sequenzierungsreaktion

<b>Komponenten</b>	<b>Menge</b>
Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
PCR-Puffer (5x)	2 µl
DNA	(0,2-0,5µg)
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20µl
<b>Programm</b>	96°C; 5min
	96°C; 15 sec
	50-60°C; 30 sec
	60°C; 4 min
	4°C bis zur Ethanol-Präzipitation
<b>Zyklusanzahl</b>	35

### 2.2.2.19.2 Ethanol-Präzipitation der Sequenzierungsreaktionen

Der Sequenzieransatz wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl 100%igem Ethanol, 10 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 80 µl H<sub>2</sub>O (HPLC gereinigt) gemischt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 15.000 rpm für 5 min. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT für 5 min getrocknet. Die Proben wurden bis zur Vorbereitung für die Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.19.3 Probenvorbereitung für Sequenzier-Analyse

Den Proben wurde 25 µl Hidi-Formamid zugegeben und die DNA durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend wurde die gelöste DNA in 0,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und kurz anzentrifugiert. Die elektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgte in einem ABI Prism 310. Die Analyse der Daten erfolgte mit der *Sequencer Analysis Software* der Firma Applied Biosystems (ABI).

### 2.2.2.20 RNA-Isolierung aus Geweben

Die RNA-Isolierung aus Geweben erfolgte mit dem „*Qiagen RNeasy Kit*“ der Firma Qiagen. Es wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

Das Gewebestück (max. 30 mg) wurde in 600 µl *Qiagen Puffer RLT* mit 6 µl β-Mercaptoethanol in einem Ultra-Turrax T8 homogenisiert und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 600 µl 70%igem Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O) überführt und gemischt. Die Probe (2 x 600 µl) wurde anschließend auf eine *RNeasy-Mini-Säule* gegeben und dazwischen 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 350 µl *Qiagen Puffer RW1* auf die Säule pipettiert und wiederum 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nachdem 10 µl DNase I (3 U/µl) und 70 µl *Qiagen RDD* Puffer auf die Säule pipettiert wurden, erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 20-30°C. Erneut wurden 350 µl *Qiagen Puffer RW1* auf die Säule pipettiert, 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde in ein neues

1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl *Qiagen Puffer RPE* gewaschen und dabei 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die Säule erneut in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde zweimal durch die Säule laufen gelassen, bei einem Zentrifugationsschritt für 1 min und 10.000 rpm. Die Konzentration der RNA wurde im NanoDrop Spektralphotometer gemessen. Die Aufbewahrung erfolgte bei –80°C.

#### 2.2.2.21 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde 100 ng RNA eingesetzt, die mit 1 µl Oligo-d(T)-Primer, 2 µl dNTPs (10 mM) versetzt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt wurde. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 65°C. Anschließend wurden 4 µl PCR-Puffer (5x), 1µl DTT (0,1 M), 3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1 µl RNase OUT und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (15 U/µl) zugegeben. Zur Kontrolle wurde immer ein Ansatz ohne AMV-Reverse Transkriptase (-RT) durchgeführt, stattdessen wurde DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte bei 50°C für 45 min und schließlich 5 min bei 80°C. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert.

#### 2.2.2.22 Expressionsnachweis mittels RT (Reverse Transkriptase)-PCR

Zur Expressionsanalyse wurde 1 µl cDNA in einer PCR Reaktion eingesetzt. Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die verwendeten Pipettierschemata und gewählten PCR-Programme.

Tab.2.7 Übersicht über verwendete Pipettierschemata und Programme für die RT-PCR Ansätze

	c-myc und OVA	β-Aktin
cDNA	1 µl	1 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl

Primer	1 $\mu$ l Myc-f (15 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l mb-Act-F (10 pmol/ $\mu$ l)
(10 pmol/ $\mu$ l; 15 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l Myc-r (15 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l mb-Act-R (10 pmol/ $\mu$ l)
	1 $\mu$ l OVA-f (15 pmol/ $\mu$ l)	
	1 $\mu$ l OVA-r (15 pmol/ $\mu$ l)	
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	39,3 $\mu$ l	39,3 $\mu$ l
<b>Programm</b>	94°C; 2 min	94°C; 2 min
	94°C; 45 sec	94°C; 45 sec
	60°C; 30 sec	55°C; 30 sec
	72°C; 45 sec	72°C; 45 sec
<b>Zyklenanzahl</b>	30	30

### 2.2.3 Histologische Methoden

#### 2.2.3.1 Fixierung von Frischgewebe

Die Fixierung von Frischgewebe erfolgte (falls nicht anders beschrieben) in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung (pH 6,9) bei 4°C über Nacht.

#### 2.2.3.2 Einbetten von fixiertem Frischgewebe

Nach der Fixierung wurden die Präparate zugeschnitten, in Einbettkassetten überführt und erneut 1 h bei 4°C fixiert. Danach wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser gründlich gewässert und in den Einbettautomat gelegt. Dort durchliefen die Präparate zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h 35 min; 80%, 96%, 2 x 100%, jeweils 1 h), wurden anschließend in Xylol (1 h, 2 x 30 min) und letztlich in Paraffin (3 x 1 h) überführt und in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Präparate aus den Einbettkassetten genommen und in Paraffinblöcke gegossen, die bei Raumtemperatur gelagert wurden.

### **2.2.3.3 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die Paraffinblöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte von 2-3 µm angefertigt, die im Wasserbad bei 45°C geglättet worden sind, bevor sie auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden schließlich über Nacht bei 55°C getrocknet.

### **2.2.3.4 Herstellung von Kryoschnitten**

Das Frischgewebe zur Anfertigung von Kryoschnitten wurde in Kryomolds zusammen mit Tissue Tek O.C.T. Compound eingebettet und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Proben ca. ½ h vor Beginn aus dem -80°C Schrank genommen und im Kryostat auf -20°C gebracht. Anschließend wurden die Proben aus den Kryomolds entfernt, mit Tissue Tek O.C.T. Compound auf Metallhalterungen fixiert und im Kryostat eingespannt. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträger gezogen, ½-1 h getrocknet und 5 min bei 4°C in Aceton fixiert. Danach wurden die Schnitte über Nacht getrocknet und am nächsten Morgen entweder direkt für Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt oder in Aluminiumfolie eingepackt und bei -80°C gelagert.

### **2.2.3.5 Hämatoxylin Eosin- (HE) Färbung**

Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, jeweils 5 min) entparaffiniert, 5 min in H<sub>2</sub>O inkubiert, bevor sie 5 min mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt wurden. Kryoschnitte wurden direkt nach der Trocknung über Nacht zu den gleichen Bedingungen mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Die folgenden Schritte sind für Paraffin- und Kryoschnitte identisch. Die Schnitte wurden in lauwarmem Leitungswasser 5 min gebläut; dabei wurde das Wasser mehrfach gewechselt. In einem letzten Schritt wurde das Leitungswasser gegen deionisiertes H<sub>2</sub>O getauscht, 30-45 sec in Eosin gefärbt und erneut in H<sub>2</sub>O getaucht. Nach Abschluß der Färbung wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 2 x 100%; für jeweils 5 sec) in Xylol überführt und mit Pertex eingebettet. Alle angefertigten Paraffinschnitte wurden an einem Olympus BX51 Mikroskop ausgewertet und die Bilder wurden mit der

Kamera Axio Cam MRC 5 (Zeiss) unter Verwendung der Software *Axio Vision Rel. 4.5* aufgenommen.

### 2.2.3.6 Immunhistochemie von Paraffinschnitten

Die Schnitte wurden zunächst in Xylol (2 x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min), kurz in H<sub>2</sub>O überführt und anschließend in Tris-Waschpuffer (5 mM Tris-HCl pH 7,4-7,6; 16 mM NaCl) gespült. Nach der Rehydrierung schloß sich je nach verwendetem Antikörper eine Vorbehandlung in der Mikrowelle oder dem Dampfkochtopf an (siehe Tab.2.8). Nach 20 min Abkühlphase wurden die Schnitte erneut in Tris-Waschpuffer (5 mM Tris-HCl pH 7,4-7,6; 16 mM NaCl) überführt. Die Schnitte wurden im DAKO TechMate 500 Plus, unter Verwendung des „*DakoREAL Detection System und Peroxidase/AEC Kit*“ der Firma Dako, gefärbt.

Tab.2.8 **Verwendete Antikörper und Vorbehandlungsbedingungen für die Immunhistochemie**

	<b>OVA</b>	<b>Ki67</b>
Vorbehandlung	2 x 15 min in Citratpuffer (0,1 M; pH 6,0) (Mikrowelle; 600 W)	1 x 3 min in Citratpuffer (0,1 M; pH 6,0) (Dampfkochtopf; 125°C)
Inkubationstemperatur und -zeit	RT ½ h	4°C über Nacht
Primärantikörper- verdünnung	1:1000	1:25

### 2.2.3.7 Gordon Färbung

Die Schnitte wurden zunächst, wie unter 2.2.3.6 beschrieben, entparaffiniert, kurz in H<sub>2</sub>O getaucht und anschließend für 3 min in 0,5%igem saurem Kaliumpermanganat für 3 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte in Leitungswasser überführt, bis keine Farbwolken mehr zu sehen waren, 1 min in 1%iger Oxalsäure inkubiert (bis die Schnitte farblos wurden)

und erneut gründlich in Leitungswasser gewaschen, bevor sie 3 mal in H<sub>2</sub>O überführt wurden. Nach 15-minütiger Färbung in 2,5%igem Ferrialaun und 3-maligem Waschen in H<sub>2</sub>O folgte eine 10 sec-Färbung in Silberlösung. Anschließend wurden die Schnitte erneut 2 mal in H<sub>2</sub>O gewaschen und in 10%igem Formalin 20 sec inkubiert, bevor sie in Leitungswasser gewaschen wurden. Danach wurden die Schnitte 2 mal in H<sub>2</sub>O überführt, 1 min in 0,15%iger Goldchloridlösung inkubiert, erneut in H<sub>2</sub>O überführt und 3 min in 2,5%igem Natriumthiosulfat inkubiert, bis sie schließlich gründlich in Leitungswasser gewaschen wurden. Nach Waschen in H<sub>2</sub>O, erfolgte eine 5 bis 10-minütige Färbung in Kernechtrot und das Überführen der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 2 x 100%; für je jeweils 5 sec) in Xylol. Die Schnitte wurden mit Pertex eingedeckt.

### 2.2.3.8 Immunhistochemie von Zellen

Es wurde die Avidin-Biotin Methode angewendet. Alle verwendeten Lösungen der Firma Dako wurden ca. 30 min bei Raumtemperatur vorgewärmt. Die Zellen wurden in *Chamber Slides* (Doppelkammer) kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 4%iger Paraformaldehydlösung 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 1 ml PBS, erfolgte eine Permeabilisierung in 1 ml 0,1%igem Triton X-100 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Primärantikörper (OVA 1:1.000), verdünnt in *Antibody diluent*, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit den *Biotinylated Secondary Antibodies* überdeckt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und die endogenen Peroxidasen durch eine 5-minütige Inkubation in einer *Peroxidase-Blocking-Solution* abgeblockt. Anschließend wurden die Zellen 5 mal mit 1 ml PBS gewaschen, mit *Streptavidin Peroxidase (HRP)* bedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde die *AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate Solution* (AEC Substrat) auf die Zellen getropft, bis diese vollständig bedeckt waren. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion nach 5-10 min in H<sub>2</sub>O gestoppt. Es folgte eine 45-60 sec lange Kernfärbung in Hämatoxylin nach Mayer, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation in lauwarmem Leitungswasser, welches mehrfach zwischendurch gewechselt wurde. Die Schnitte wurden in einem letzten Schritt in abgestandenes H<sub>2</sub>O getaucht und mit Aquatex eingedeckt.

### 2.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Es wurden entweder direkt, nach der Acetonfixierung und dem Trocknen über Nacht, am nächsten Morgen die Kryoschnitte für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder einen Tag vor Beginn der Färbung Schnitte aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Schrank entnommen und über Nacht bei Raumtemperatur erwärmt bzw. getrocknet. Die Gewebe auf den Objektträgern wurden mit dem Dako Pen umrandet, 10 min in PBS rehydriert und bei der Verwendung von biotinylierten Antikörpern das Biotin Blocking System der Firma Dako verwendet. Dazu wurden die Schnitte 15 min mit der Avidin-Lösung und anschließend 15 min mit der Biotin-Lösung inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS, erfolgte ein CD16/32 Blockierungsschritt (1:100; 0,1% BSA in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 2%igen FCS Lösung in PBS erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und mit der Primärantikörperverdünnung (angesetzt in 0,1% BSA in PBS) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bei der Verwendung von zwei primären Antikörpern wurden beide in einer Verdünnungslösung angesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit der Sekundärantikörperverdünnung (angesetzt in 0,1% BSA in PBS) inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS und eine 8-minütige DAPI-Kernfärbung ( $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen, mit Mowiol/DABCO-Lösung eingedeckt. Alle angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen wurden im Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLB) unter Verwendung der Kamera Ky-F 70B (JVC) und Software *Diskus* ausgewertet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln.

### 2.2.3.10 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Zellen wurden in *Chamber Slides* (Doppelkammer) kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 4%iger Paraformaldehydlösung 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschrten in 1 ml PBS, erfolgte eine Permeabilisierung in 1 ml 0,1%igem Triton X-100 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Primärantikörper (OVA 1:800), verdünnt in *Antibody diluent*, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte in 1 ml PBS und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer Sekundärantikörperverdünnung, angesetzt in *Antibody diluent*. Nach zweimaligem Waschen

mit 1 ml PBS wurden die Zellen mit 10 µl DAPI II-Fertiglösung (125 ng/ml) eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

**Tab.2.9 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen für die Immunfluoreszenzfärbung von Geweben und Zellen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
CD3 Alexa 488	1:100	Alexa Fluor 488 Ziege anti-Hase IgG	1:200
CD8 bio	1:400	Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG	1:400
CD11c bio	1:200	Streptavidin Alexa Fluor 568	1:1000
B220 PE	1:500		
c-myc (Klon 9E10)	1:100		
OVA	1:800		

### **2.2.3.11 TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling*)-Methode**

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen auf Paraffinschnitten wurde das „*Apoptag Apoptosis Detection Kit*“ von Chemicon verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Während der Apoptose (programmierter Zelltod) kommt es durch Endonukleasen zu Brüchen in den DNA-Strängen und somit zu freiliegenden 3'-Hydroxylgruppen (3'-OH Gruppen). Die terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) ist nun in der Lage an diese entstehenden 3'-OH Gruppen mit Biotin konjugiertes UTP (Uridin) anzufügen. Nach Zugabe des anti-Digoxygenin Antikörpers, konjugiert mit einer Peroxidase, ist es möglich die Enzymaktivität zu nutzen um durch Zugabe von einem Substrat (AEC-Substrat) eine rot-braune Farbreaktion hervorzurufen und somit die apoptotischen Zellen auf einem indirekten Weg nachzuweisen.

Im Gegensatz zur Verwendung von direkt-konjugierten UTPs, stellt dieser beschriebene, indirekte Nachweis von apoptotischen Zellen eine deutlich sensitivere Methode dar.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol (2 x 7,5 min) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 5 min 100% Ethanol; 3 min 96% Ethanol; 3 min

70% Ethanol) entparaffiniert und 5 min in PBS inkubiert. Nach 30-minütiger Proteinase K (20 µg/ml; in H<sub>2</sub>O)-Behandlung und zweimaligem Waschen in H<sub>2</sub>O, wurden endogene Peroxidasen durch eine Inkubation in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) für 5 min abgeblockt. Es folgten zwei weitere Waschschritte für 5 min in PBS. Dann wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Dako-Pen umrandet, 10 sec bei Raumtemperatur mit 75 µl *Chemicon Equilibration Puffer* inkubiert, bevor sich eine einstündige Inkubation mit 55 µl *Chemicon Working Strength TdT Enzym* (*TdT Enzym* und *Chemicon Reaction Puffer* im Verhältnis 30:70) bei 37°C im Wasserbad, in einer feuchten Kammer anschloß. Die Reaktion wurde 10 min mit einem *Chemicon Stop/Wash Puffer* (verdünnt 1:35 in H<sub>2</sub>O) gestoppt, 3 x 1 min in PBS gewaschen und mit 65 µl *Chemicon Anti-Digoxigenin Conjugate Peroxidase* für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 4 x 2-minütigen Waschschritten in PBS wurden die Schnitte mit 75 µl AEC-Substrat bedeckt und unter Mikroskopkontrolle für 5-10 min gefärbt. Nach 4 weiteren Waschschritten in PBS für 1 min, wurden die Schnitte für 30 sec in Hämatoxylin nach Mayer inkubiert und 5 min in lauwarmem Leitungswasser 5 min gebläut. Das Leitungswasser wurde zwischendurch mehrfach gewechselt. Die Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckt.

#### **2.2.4. Zellkulturmethoden**

##### **2.2.4.1 Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, auf Eis gehalten und zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend sofort in Medium überführt, 7 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in entsprechender Menge frischem Medium aufgenommen, bevor sie auf Zellkulturflaschen oder -platten verteilt wurden.

##### **2.2.4.2 Zelllinien und ihre Kultivierung *in vitro***

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen oder -platten bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank. Je nach Zelllinie wurde das Medium alle 1 bis 2 Tage erneuert. Bei adhärennten und semiadhärennten Zellen wurde dazu das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Bei Suspensionszellen hingegen wurde die

Zellsuspension in 50 ml-Einmalröhrchen überführt, 8 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Je nach Wachstumseigenschaften wurden die Zellen 1:2-1:10 gesplittet. Dazu wurde bei adhärennten und semiadhärennten Zellen das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und 3-5 min in Trypsin/EDTA oder 2 mM EDTA in PBS (B3Z Zellen) bei 37°C inkubiert, um sie von den Zellkulturgefäßen zu lösen. Die Trypsinisierung wurde durch eine äquivalente Menge an Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml-Einmalröhrchen überführt, 8 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert und in gewünschter Zelldichte neu ausgesät. Bei Suspensionszellen entfällt das Ablösen der Zellen von den Zellkulturgefäßen.

#### **2.2.4.3 Primäre Zellen und ihre Kultivierung *in vitro***

T-Zellhybridomzellen und Dendritische Zellen wurden in T-Zellmedium in einer Zellzahl von 1 bzw.  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte in Triplikaten ausgesät und kultiviert. Für die Bestimmung von IL-2 wurde nach einem Tag Kokultivierung der Überstand genommen und entweder bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren oder direkt im Anschluß mit dem „*Cytometric Bead Array*“ der Firma Becton Dickinson analysiert.

Lymphozyten, isoliert aus der Leber, der Milz, den inguinalen und leberdrainierenden Lymphknoten wurden in einer Zellzahl von  $1-5 \times 10^6$  / Vertiefung einer 24-Loch-Flachbodenplatte zur Restimulierung ausgesät. Die Kultivierung primärer Zellen erfolgte bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Begasung im Brutschrank.

#### **2.2.4.4 Ermittlung der Zellzahl**

Die Zellsuspension wurde 1:10-1:100 mit Trypanblau-Lösung oder Türks-Lösung verdünnt und 10 µl in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen zweier Großquadrate, wonach sich die Anzahl wie folgt berechnen läßt.

Mittelwert der Zellzahl beider Großquadrate x Verdünnungsfaktor x  $10^4$  (Kammerfaktor) =  
Zellzahl/ml

Bei der Zählung wurden nur vitale Zellen berücksichtigt, die in der Lage sind Trypanblau aktiv aus dem Zytoplasma hinauszutransportieren, während tote Zellen dazu nicht mehr in der Lage sind und im Mikroskop dunkelblau erscheinen.

#### **2.2.4.5 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Die Zelllinien wurden zunächst von den Zellkulturplatten abgelöst (siehe Zelllinien und ihre Kultivierung) und ihre Zellzahl ermittelt (siehe Ermittlung der Zellzahl). Anschließend wurden zwischen  $1-10 \times 10^6$  Zellen in 0,5-1 ml Einfriermedium (10% DMSO; in FCS) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und in einer Styroporbox bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Styroporbox gewährleistet, daß die Zellen langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt werden. Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.4.6 Generierung primärer Fibroblasten aus Mausohrbiopsien**

Zur Generierung primärer Fibroblasten wurde eine ca. 4 x 4 mm große Mausohrbiopsie durchgeführt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 70%igem Ethanol zur Desinfizierung überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Ohrbiopsie in eine Petrischale, gefüllt mit Mausohr-Fibroblastenmedium (RPMI 1640, 20% FCS, 3% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 1% Natriumpyruvat) überführt und mit einem Skalpell zerkleinert. Die zerkleinerten Ohrstücke wurden dann in eine Vertiefung einer 6-Loch-Flachbodenplatte überführt, die mit 2 ml Mausohr-Verdauungsmedium (1 mg/ml Collagenase IA; 2,5 µg/ml Fungizone; in Mausohr-Fibroblastenmedium), überführt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%iger  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Zellsuspension vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt, durch ein 40 µm Nylonsieb gegeben, mit 10 ml Mausohr-Fibroblastenmedium durchgespült und 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml frischem Mausohr-Fibroblastenmedium resuspendiert und für 24-36 h wachsen gelassen, damit sich die Fibroblasten absetzen können. Nach spätestens 36 h wurde das Medium gewechselt und nach 3-5 Tagen wurden die Zellen 1:3 gesplittet. Sobald die Zellen eine ausreichende Zelldichte erreicht hatten, wurden sie

entweder kryokonserviert oder zur transienten Transfektion auf *Chamber Slides* (Doppelkammer) ausgesät.

#### **2.2.4.7 Transiente Transfektion primärer Fibroblasten**

Die primären Fibroblasten wurden mit *Lipofectamine 2000* transient transfiziert. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Zur transienten Transfektion wurden die primären Fibroblasten in *Chamber Slides* (Doppelkammer) mit Mausohr-Fibroblastenmedium ohne Penicillin/Streptomycin bis zu einer Dichte von ca. 80% wachsen gelassen. 1,6 µg Plasmid-DNA (pUHRt 62-1) und 10 µl *Lipofectamine 2000* wurden jeweils mit 100 µl Mausohr-Fibroblastenmedium ohne Penicillin/Streptomycin und FCS 5 min bei Raumtemperatur separat inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie zu den primären Fibroblasten (in 800 µl Mausohr-Fibroblastenmedium ohne Penicillin/Streptomycin) dazugegeben wurden. Die Transfektion erfolgte ohne und mit Doxyzyklin (1 µg/ml) im Medium. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, und nach zwei Tagen die Zellen hinsichtlich ihrer OVA Expression mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

#### **2.2.4.8 Transiente Transfektion von HeLa tTA und MEF tTA (Calcium-Phosphat-Präzipitation)**

Bei dieser Methode bindet sich die zu transfizierende DNA in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausfallendes Calciumphosphat, welches von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden kann.

HeLa tTA und MEF tTA Zellen wurden in 10 cm Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von ca. 60% kultiviert. Am Morgen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches Medium ohne Zusätze von Penicillin/Streptomycin und G-418 ersetzt. Vier Stunden später wurden 20 µg Plasmid-DNA (pBI-4 *c-myc/OVA*; pBI-4) mit 500 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde in 500 µl BBS (2x)-Lösung eine Minute lang Luft hineingeblasen. Anschließend werden beide Lösungen vereinigt, erneut für 1 min Luft hineingeblasen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch tropfenweise

auf der Zellkulturplatte verteilt wurde. Am nächsten Morgen waren schwarze Phosphatgranula zu sehen. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen für weitere Versuche (Western Blot Analysen) nach zwei Tagen verwendet.

Die transiente Transfektion von HeLa tTA und MEF tTA Zellen in *Chamber Slides* (Doppelkammer) wurde nach dem gleichen Protokoll mit 1/16 der angegebenen Volumina durchgeführt. Die Zellen wurden ebenfalls zwei Tage nach Transfektion für Immunhistochemie und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

## **2.2.5. Proteinchemische Methoden**

### **2.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vorsichtig von der Platte abgelöst und in einem Volumen von 1 ml in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 2.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% SDS; 1,0% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA; 1 mM Protease Inhibitor) resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Proteinlysate in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, gemischt und anschließend in mehreren Aliquots bei -20°C gelagert.

### **2.2.5.2 Proteinextraktion aus Gewebe**

Das Gewebestück wurde zusammen mit 1 ml RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% SDS; 1,0% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA; 1 mM Protease Inhibitor) in einem Glashomogenisator auf Eis gehalten und zerdrückt. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 30 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, gemischt und in mehreren Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „*BCA Protein Assay Reagent Kit*“ der Firma Pierce verwendet und nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

Zu Beginn wurde eine Albumin Standardverdünnungsreihe, in H<sub>2</sub>O die von 20-2000 µg/ml reicht, angesetzt und diese für mehrere Wochen bei 4°C gelagert. 10 µl der zu analysierenden Probe bzw. der einzelnen Standardverdünnungen (Standard A-I) wurden in Duplikaten auf Eis in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert und mit jeweils 200 µl Arbeitsreagenz (196 µl *Pierce Lösung A* + 4 µl *Pierce Lösung B*) gemischt und 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Es konnte ein Farbumschlag von grün nach blau-violett beobachtet werden.

Die zu analysierenden Proben wurden eventuell mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% SDS; 1,0% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA; 1 mM Protease Inhibitor) entsprechend verdünnt, so daß die gemessenen Extinktionen im Messbereich lagen. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen. Dabei ist die Proteinkonzentration direkt proportional zur gemessenen OD. Es wurde anhand der eingemessenen Standardverdünnungen, deren Konzentrationen bekannt waren, eine Eichgerade mit Hilfe der Software *Microsoft Excel* und der Anwendung der linearen Regression erstellt und die Konzentration berechnet. Gewöhnlich lag das Bestimmtheitsmaß bei 0,999.

### 2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den Nachweis von c-myc, OVA und β-Aktin in transient transfizierten HeLa tTA und MEF tTA Zellen mit pBI-4 *c-myc/OVA* sowie in frischen Lebertumor- und Lebernorgalgewebeproben aus c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> (c-myc/OVA transgen positiv) und c-myc/ova tg<sup>-</sup> (c-myc/OVA transgen negativen) Mäusen wurden 10%ige oder 12%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen.

Die SDS-Gel-Apparatur wurde nach Herstellerprotokoll (Biorad) aufgebaut, wobei die Glasplatten mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt wurden. Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels nach Pipettierschema Tab.2.10 der Reihe nach zusammenpipettiert und bis ca. 1 cm unter den Kammrand gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und gewartet bis es fest wurde. Danach wurden die entsprechenden Komponenten für das Sammelgel der Reihe nach zusammenpipettiert (Tab.2.10), gemischt

und über das Trenngel pipettiert, bei dem zuvor das Isopropanol abgeschüttet worden ist. Der Kamm wurde eingesetzt und es wurde erneut gewartet bis das Polyacrylamidgel fest wurde. In der Zwischenzeit wurden die zu analysierenden Proben auf Eis aufgetaut, äquivalente Mengen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, eventuell mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% SDS; 1,0% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA; 1 mM Protease Inhibitor) auf ein gleiches Volumen gebracht und  $\frac{1}{4}$  der Menge an Ladepuffer (4x) dazugegeben. Die Proben wurden für 8-10 min bei 95°C aufgekocht, anschließend 5 min auf Eis inkubiert.

Dann wurde die SDS-Gel-Laufapparatur nach Herstellerangaben aufgebaut und die Kammer mit Laufpuffer (1x) gefüllt. Die zu analysierenden Proben sowie 5 µl Proteinstandard (*Prestained* der Firma Fermentas) wurden in die Polyacrylamidtaschen gefüllt und das Gel bei 30 mA, bis die Proben das Trenngel erreichen, und anschließend bei 40-45 mA laufen gelassen.

Tab.2.10 **Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.** Die Komponenten und Mengenangaben für Trenngele links und für Sammelgele rechts (ausreichend für 2 Gele, Dicke 0,75 mm). Bei der Verwendung von 1,5 mm dicken Gelen wurde die doppelte Menge pipettiert.

<b>Komponenten</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>Komponenten</b>	<b>5 ml</b>
<b>Trenngel</b>			<b>Sammelgel</b>	
H <sub>2</sub> O	4,0 ml	3,3 ml	H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Acrylamid-Mix (30%)	3,3 ml	4,0 ml	Acrylamid-Mix (30%)	0,83 ml
Tris (1,5 M; pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	Tris (1,0 M; pH 6,8)	0,63 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml	SDS (10%)	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml	0,1 ml	Ammoniumpersulfat (10%)	0,05 ml
TEMED	4 µl	4 µl	TEMED	5 µl

#### 2.2.5.5 Western Blot („wet blot“)

Es wurde das „wet blot“ System der Firma Biorad verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Die PVDF-Membran wurde zunächst 2 min in Methanol, kurz in H<sub>2</sub>O und anschließend ebenso wie die Schaumstofflappen, das Filterpapier (Whatmann 3 MM) und das zu blottende SDS-Gel in kaltem Transferpuffer (1x) 15 min inkubiert. Der Blot wurde von Kathode (-Pol) nach Anode (+Pol) wie folgt aufgebaut: 1 x Schaumstofflappen; 2 x Filterpapier; SDS-Gel, seitenverkehrt; PVDF-Membran; 2 x Filterpapier; 1 x Schaumstofflappen. Die Kassette wurde geschlossen und zusammen mit einem Kühlakku in die vorgesehene Apparatur eingehängt und diese komplett mit Transferpuffer (1x) überschichtet. Es wurde entweder 1 h bei 100 V oder über Nacht bei 30 V und 4°C geblottet. Anschließend wurde die Membran 5 min in PBS gewaschen, 1 h in Blocking-Puffer (50 g/L Magermilchpulver; in PBST) bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Nach einmaligem Waschen in PBST (0,1% Tween 20; in PBS) wurde die Membran zusammen mit 5 ml Primärantikörperverdünnung (angesetzt in Blocking-Puffer; Tab.2.11) in einer Folie eingeschweißt und 1 h bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler inkubiert. Nach 3-5 weiteren Waschschritten in PBST, erfolgte die Inkubation in 5 ml Sekundärantikörperverdünnung (angesetzt in Blocking-Puffer; Tab.2.11). Nach 3-5 Waschschritten in PBST, wurde zur Detektion der Proteinbanden das *Chemilumineszenz Substrat (SuperSignal West Pico)* der Firma Pierce verwendet und dem Herstellerprotokoll gefolgt. *Pierce Lösung 1* und *Pierce Lösung 2* wurden zu gleichen Teilen gemischt und eine ausreichende Menge (1-2 ml pro Membran) auf die Proteinseite gegeben, 5 min inkubiert und die Lösung anschließend von der Membran abgestreift. Die Membran wurde in Folie eingepackt, in die Röntgenkassette gelegt und in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt. Die Expositionszeit richtete sich nach dem jeweilig eingesetzten Primärantikörper. Zuletzt wurden die Filme in einem X-Omat 1000 Processor entwickelt.

**Tab.2.11 Verwendete Primär- (links) und Sekundärantikörper (rechts) sowie die eingesetzten Verdünnungen bei der Western Blot Analyse**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
OVA	1:10.000	polyklonaler Ziege anti-Hase Immunglobulin/HRP	1:1.000
c-myc	1:500	polyklonaler Ziege anti-Maus Immunglobulin/HRP	1:1.000
β-Aktin	1:5.000		

### **2.2.5.6 Coomassie-Färbung**

Das SDS-Gel wurde 15 min in Coomassie-Färbelösung (2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue R250; 50% Methanol; 10% Eisessig; in H<sub>2</sub>O) gelegt und bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Coomassie-Färbelösung gegen die Coomassie-Entfärbelösung (30% Methanol; 10% Eisessig; in H<sub>2</sub>O) getauscht und so lange auf dem horizontalen Schüttelinkubator inkubiert bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Zwischendurch wurde die Coomassie-Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Schließlich wurde das Gel auf einem Filterpapier (Whatmann 3MM) Vakuum getrocknet.

### **2.2.6. Gewinnung primärer Zellsuspensionen**

Die Mäuse wurden, soweit nicht anders beschrieben, durch zervikale Dislokation getötet, die Felloberfläche mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Leibeshöhle bzw. der Brustkorb unter semisterilen Bedingungen geöffnet.

#### **2.2.6.1 Isolierung primärer Zellen aus der Milz und den Lymphknoten**

Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Milz von Blutgefäßen und Fettgewebe getrennt und in ein mit PBS gefülltes 15 ml-Einmalröhrchen überführt. Die Lymphknoten (inguinal, leberdrainierend, axillar oder mesenterisch) wurden vorsichtig aus dem Fettgewebe freipräpariert und ebenfalls in ein 15 ml-Einmalröhrchen, welches zuvor mit PBS gefüllt wurde, überführt. Anschließend wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit PBS gründlich nachgespült und bei 1.500 rpm für 10 min und 10°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen resuspendiert und durch ein 40 µm Sieb vereinzelt. Gegebenenfalls wurde die Zellzahl bestimmt.

##### **2.2.6.1.1 Isolierung CD8<sup>+</sup> Zellen aus der Milz und den Lymphknoten**

Vor Versuchsbeginn wurde das T-Zellmedium (RPMI 1640 + HEPES; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Glutamin; 50 µM β-Mercaptoethanol) 30 min im Wasserbad

bei 37°C erwärmt. Milz und Lymphknoten (inguinal, leberdrainierend, axillar oder mesenterisch) wurden aus den Mäusen herauspräpariert, vereinigt und nach dem unter 2.2.6.1 beschriebenen Protokoll aufbereitet. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und so eingestellt, daß max.  $5 \times 10^8$  Zellen / 2 ml T-Zellmedium pipettiert werden können. Es wurden ausreichend viele autoklavierte, mit 0,6 g Nylonwolle befüllte Spritzen in 50 ml-Einmalröhrchen aufgestellt, mit 10 ml T-Zellmedium äquilibriert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden die Spritzen mit Verschußkappen abgedichtet und max.  $5 \times 10^8$  Zellen in 2 ml T-Zellmedium auf die Spritzen pipettiert und im Brutschrank für 45 min inkubiert. Dann wurde die Verschußkappe entfernt, die Zellen mit 2 x 10 ml T-Zellmedium aus der Spritze gespült, bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert, mit MACS-Puffer gewaschen, erneut 10 min bei 1.500 rpm und 10°C zentrifugiert und die Zellzahl für die weitere CD8+ MACS-Aufreinigung bestimmt (siehe 2.2.6.3). Durch die Aufreinigung der Zellen mit Hilfe der Nylonwolle ist es möglich ein Großteil der adhärenenten Zellen (Dendritische Zellen und Makrophagen) sowie der B-Zellen zu eliminieren.

#### **2.2.6.1.2 Isolierung CD11c+ Dendritischer Zellen aus der Milz**

Vor Versuchsbeginn wurde die Perfusionslösung (0,4 mg/ml Collagenase D; 80 µg/ml DNase I; in PBS) und der Verdauungspuffer (0,4 mg/ml Collagenase D; in GBSS) 30 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Milz wurde aus der Maus herauspräpariert und in ein mit PBS gefülltes 15 ml-Einmalröhrchen überführt. Anschließend wurde die Milz in eine mit Verdauungspuffer gefüllte Petrischale überführt und mit einer Kanüle mehrfach Verdauungspuffer durchgespült. Die Milz wurde dann mit einer Pinzette und einem Skalpell in kleine Stücke zerlegt, 30 min im Brutschrank inkubiert und die Zellsuspension danach mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Einmalröhrchen überführt, mit MACS-Puffer gewaschen und bei 950 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen, die Zellen durch ein 40 µm Nylonsieb vereinzelt und mit MACS-Puffer gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 950 rpm und 10°C wurde das Zellpellet in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und eine CD11c+ MACS-Aufreinigung durchgeführt (siehe 2.2.6.3).

## **2.2.6.2 Isolierung primärer Zellen aus der Leber**

### **2.2.6.2.1 Isolierung leberassoziierter Lymphozyten**

Vor Versuchsbeginn wurde die Perfusionslösung (0,4 mg/ml Collagenase D; in PBS) 30 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Nach Eröffnen des Bauchraumes wurde die Kanüle in die Pfortader (Vena porta) eingeführt, die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt und die Leber mit der Perfusionslösung (5 ml/min) 10-30 sec perfundiert. Anschließend wurde die Leber herauspräpariert, die Gallenblase entfernt und in ein 50 ml-Einmalröhrchen, gefüllt mit 25 ml PBS, überführt. Die Leber wurde dann mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, mit 25 ml PBS gründlich nachgespült und bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet in 8 ml 40%igem Percoll resuspendiert, auf zwei 15 ml-Einmalröhrchen verteilt und mit je 4 ml 80%igem Percoll unterschichtet. Der Gradient wurde bei 2.000 rpm, 20 min und 16°C ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Hepatozytenschicht wurde abgesaugt und die in der Interphase enthaltenen Lymphozyten in ein neues 50ml-Einmalröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen resuspendiert und durch ein 40 µm Sieb vereinzelt. Gegebenenfalls wurde die Zellzahl bestimmt.

### **2.2.6.2.2 Isolierung leberassoziierter CD11c+ Dendritischer Zellen**

Vor Versuchsbeginn wurde die Perfusionslösung (0,4 mg/ml Collagenase D; 80 µg/ml DNase I; in PBS) und der Verdauungspuffer (0,4 mg/ml Collagenase D; in GBSS) 30 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die transgen negativen Kontrollmäuse wurden, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, über die Pfortader perfundiert, die Lebern herauspräpariert, von der Gallenblase getrennt und in ein 50 ml-Einmalröhrchen, gefüllt mit 15 ml PBS, überführt. Die transgen positiven Tumormäuse wurden mit Isofluran betäubt, die Leibeshöhle geöffnet, die untere Hohlvene (Vena cava inferior) durchtrennt und die Leber über die Aorta für 30 sec mit der Perfusionslösung (5 ml/min) perfundiert. Anschließend wurde die Leber ohne die Gallenblase herauspräpariert und in ein mit 15 ml PBS gefülltes 50 ml-Einmalröhrchen überführt.

Die Lebern wurden anschließend in Petrischalen überführt, mit Skalpell und Pinzette in kleine Stücke zerlegt und in Verdauungspuffer 20 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die

Zellen aus den Lebern der transgen negativen Kontrollmäuse wurden anschließend durch ein Metallsieb mit Hilfe eines Spritzenstempels gedrückt, mit 50 ml MACS-Puffer insgesamt zweimal gewaschen und dazwischen bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Die Zellen aus den Tumorlebern der transgen positiven Mäuse wurden ebenfalls durch ein Metallsieb mit Hilfe eines Spritzenstempels gedrückt, mit 50 ml MACS-Puffer aufgefüllt und zunächst für 40 rpm, 4 min und 10°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet enthielt einen großen Teil der Tumorzellen, die somit entfernt werden konnten. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet und wie bei den Lebern aus den Kontrolltieren zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und dazwischen bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Nycodenz-Arbeitslösung (30% Nycodenzstocklösung 1:1,2 mit Nycodenzverdünnungspuffer mischen) resuspendiert, mit 2 ml FACS-Puffer überschichtet und bei 2.700 rpm, 20 min bei Raumtemperatur, ohne Bremse zentrifugiert. In der oberen Schicht sammeln sich nach der Dichtegradientenzentrifugation die gewünschten DCs. Diese Phase wurde vorsichtig abgenommen, durch ein 40 µM Nylonsieb vereinzelt und in ein 50 ml-Einmalröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, bei 950 rpm, 10 min bei 10°C zentrifugiert. Dabei wurden die isolierten Zellen aus 7-10 Lebern transgen negativer Tiere für ein Experiment vereinigt, während die isolierten Zellen aus den Lebern der transgen positiven Tumormäuse getrennt in den jeweiligen Versuch eingesetzt wurden. Das Pellet wurde in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und eine CD11c<sup>+</sup> MACS-Aufreinigung durchgeführt (siehe 2.2.6.3).

### **2.2.6.3 Isolierung spezifischer Zellen durch magnetische Zellseparation (MACS)**

Es wurde der MACS Multi Stand und quadroMACS bzw. miniMACS der Firma Miltenyi verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren.

Bei den zu isolierenden DCs aus der Leber wurde das Zellpellet nach dem Dichtegradient und dem letzten Waschschrift in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 40 µl *CD11c Microbeads* gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Bei den zu isolierenden DCs aus der Milz wurde dem Ansatz zusätzlich noch 4 µl CD16/32 zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 950 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Bei den isolierten Zellen aus der Milz wurden die LS-Säulen und bei den isolierten Zellen aus der Leber die MS-Säulen verwendet. Die Säulen wurden in den entsprechenden Magneten befestigt und dieser

wiederum an der Halterung fixiert. Die LS-Säulen wurden mit 3 ml MACS-Puffer und die MS-Säulen mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf die Säule pipettiert, der Durchlauf verworfen, und die Säulen 3 mal (LS: 3 ml MACS-Puffer; MS: 500 µl MACS-Puffer) gewaschen. Dann wurden die Säulen von den Magneten entfernt, und die Zellen mit 5 ml (LS-Säule) bzw. 1 ml (MS-Säule) MACS-Puffer von den Säulen in ein 15 ml-Einmalröhrchen gespült und mit MACS-Puffer gewaschen. Die Milzzellen wurden erneut über eine MS-Säule gegeben und nach dem oben beschriebenen Protokoll verfahren. Die Zellen wurden gezählt, eine gewünschte Zelldichte eingestellt und die Reinheit im Durchflußzytometer bestimmt. Die Reinheit bei isolierten CD11c+ Zellen lag zwischen 81-97%.

Bei der Isolierung von CD8+ T-Zellen aus der Milz und den vereinigten Lymphknoten wurde vor der MACS-Aufreinigung die Zellzahl bestimmt und das Pellet in 90 µl MACS-Puffer mit 2,5 µl *CD8 MicroBeads* pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert, für 15 min bei 4°C inkubiert und in 2 ml MACS-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen gewaschen. Anschließend wurden so viele LS-Säulen, nach oben beschriebenem Verfahren mit MACS-Puffer äquilibriert, daß maximal  $1 \times 10^8$  Zellen in 500 µl auf die einzelnen Säulen geladen wurden. Die Waschschrte und die Elution der Zellen erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll. Es wurde die Zellzahl ermittelt und die Reinheit der isolierten CD8+ Zellen (> 95% Reinheit) durchflußzytometrisch bestimmt. Gegebenenfalls wurden die isolierten Zellen noch mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert (siehe 2.2.7.4).

#### **2.2.6.4 Isolierung primärer Zellen aus peripherem Blut**

Die Tiere wurden zunächst 3 min mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt und anschließend in einer Halterung fixiert. Um peripheres Blut zu gewinnen, wurde die Schwanzvene mit einem Skalpell angeritzt und das Blut mit einer heparinisierten Glaskapillare aufgesaugt. Anschließend wurde die Kapillare in ein mit 20 µl Heparin-befülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß entleert. Dem Blut wurde 300 µl ACK-Lysepuffer (170 mM NH<sub>4</sub>Cl; 11 mM KHCO<sub>3</sub>; 1 mM EDTA; pH 7,3) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml PBS dazupipettiert, bei 2.000 rpm, 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in einem geeigneten Volumen für die durchflußzytometrische Bestimmung aufgenommen.

## 2.2.7. Immunfluorometrische Methoden

### 2.2.7.1 Immunfluoreszenzmessung am Durchflußzytometer

Die Durchflußzytometrie (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen sowie molekularen Eigenschaften, also der Größe, Granularität und Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an monochromatischen Lichtquellen (Argon Laser  $\lambda = 488$  nm bzw. Helium Neon Laser  $\lambda = 635$  nm) vorbeigeführt, und das gestreute Licht von hochempfindlichen Photozellen (*Photomultiplier*) detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. Die Streuung unter einem Winkel von 2-10° des geradewegs durch die Zelle gehenden Strahles gibt einen Hinweis auf die Zellgröße (*forward scatter*), während Licht, welches in einem Winkel von 90° detektiert wird, eine Aussage über die Granularität (*sideward scatter*) der Zelle zuläßt. Zugleich ist es möglich mit dem gestreuten Licht noch Fluoreszenzfarbstoffe im Durchflußzytometer zu messen. Bei der Verwendung von Fluorochromen, die zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen dienen, werden beim Passieren des Laserlichtes kurzfristig die Elektronen in einen angeregten, höher energetischen Zustand überführt. Beim Übergang der Elektronen zurück in ihren Energiegrundzustand wird ein charakteristisches Licht einer bestimmten Wellenlänge freigesetzt, welches durch den Einsatz spezieller Filter von den Photozellen detektiert werden kann. Diese Analyse hinsichtlich der Granularität, Größe und Fluoreszenzintensität ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen in komplexen Zellsuspensionen. Die am Durchflußzytometer gemessenen Daten wurden mit der Software *Flow Jo* (Tree Star Inc., San Carlos, USA) ausgewertet.

### 2.2.7.2 Markierung von Oberflächenantigenen und Fixierung

Zum Nachweis von Oberflächenmolekülen mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurden entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundene oder biotinylierte Antikörper verwendet. Bei der Verwendung von biotinylierten Antikörpern erfolgte die Detektion nach einem zweiten Färbeschritt mit einem Fluoreszenz-markierten Streptavidin-Konjugat.

Bei einem Färbeansatz in FACS-Röhrchen wurde in einem Volumen von 100  $\mu$ l und in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in 40  $\mu$ l gefärbt. Dabei wurden zwischen  $0,5-5 \times 10^6$  Zellen gefärbt. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen durch Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche

bestimmter Zellen, wurde dem Färbegemisch neben den zuvor titrierten Antikörpern, stets 5  $\mu\text{l/ml}$  anti CD16/32 (DaBe4 bzw. 2.4.G2) zugegeben. Die Färbung der Oberflächenmoleküle erfolgte bei 4°C für 20 min. Anschließend wurden die Zellen mit einem geeigneten Volumen FACS-Puffer gewaschen, 8 min bei 1.500 rpm und 10°C zentrifugiert. Gegebenenfalls schloß sich eine Färbung mit den zuvor titrierten Sekundärantikörpern nach oben beschriebener Methode an. Wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung noch intrazellulär gefärbt, erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das PFA mit FACS-Puffer gewaschen und erneut 8 min bei 1.500 rpm und 10°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann intrazytoplasmatisch gefärbt (siehe 2.2.7.3).

Erfolgte keine intrazytoplasmatische Färbung, schloß sich nach der Oberflächenmarkierung noch eine Inkubation für 10 min bei 4°C mit 4  $\mu\text{l}$  7-AAD oder TO-PRO-3 pro Probe zum Ausschluß der toten Zellen, die sich unspezifisch mit verschiedenen Antikörpern anfärben können, an. Die Zellen wurden nach der Inkubation in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer gewaschen und kurz vor der Messung durch Gaze filtriert und somit von größeren Zellklumpen befreit. Das Volumen wurde so mit MACS-Puffer eingestellt, daß am Durchflußzytometer nicht mehr als 8.000 Zellen/sec bei einer mittleren Fließgeschwindigkeit eingemessen wurden.

### **2.2.7.3 Markierung intrazellulärer Antigene**

Bei der intrazytoplasmatischen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Messung wurde ein Tag vor Versuchsbeginn eine 24-Loch-Flachbodenplatte mit anti CD3 (10  $\mu\text{g/ml}$  PBS) beschichtet, über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und am nächsten Morgen mit PBS gewaschen. Die zu analysierenden Zellen wurden für 5 h zusammen mit Brefeldin A und Monensin (je 0,8  $\mu\text{l/ml}$  T-Zellmedium) in einer Zellzahl von  $1-5 \times 10^6$  pro Vertiefung einer 24-Loch-Flachbodenplatte zur Restimulierung ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und eine Oberflächenfärbung und Fixierung der Zellen, wie unter 2.2.7.2 beschrieben, durchgeführt. Nach der Fixierung mit PFA und dem Waschschrift in FACS-Puffer wurden die Zellen mit Saponinpuffer (20 g/L BSA; 5 g/L Saponin; in PBS) 20 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem 8-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1.500 rpm und 10°C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit anti IFN- $\gamma$  (inklusive CD16/32), angesetzt in Saponinpuffer, für weitere 20 min bei Raumtemperatur im

Dunkeln inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift in Saponin- und ein Waschschrift in FACS-Puffer mit einem dazwischengeschalteten Zentrifugationsschrift für 8 min bei 1.500 rpm und 10°C.

Kurz vor der Messung wurden die Zellen durch Gaze filtriert und somit von größeren Zellklumpen befreit. Das Volumen wurde so mit MACS-Puffer eingestellt, daß am Durchflußzytometer nicht mehr als 8.000 Zellen/sec bei einer mittleren Fließgeschwindigkeit eingemessen wurden.

#### **2.2.7.4 Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen**

Die Markierung lebender Zellen erfolgte mit dem farblosen Farbstoff CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat Succinimidylester), welches als hydrophobes Molekül in der Lage ist ins Zellinnere zu diffundieren. Intrazelluläre Esterasen spalten die beiden Acetatreste ab, wobei Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) entsteht. Dieses bindet unter der Abspaltung der Succinimidylgruppe kovalent an Arginin- und Lysinreste zytoplasmatischer Proteine und fluoresziert grün (488 nm). Bei einer Zellteilung werden die CFSE-markierten Proteine zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch man nicht teilende von sich teilenden Zellen deutlich an der Intensitätsreduktion des CFSE im Durchflußzytometer nachweisen kann. Die Fluoreszenzmarkierung von Zellen wurde zur Proliferationsanalyse, Zytotoxizitätstest (*in vivo*) und zur Analyse bzw. Lokalisation bestimmter Zellpopulationen *in vivo* eingesetzt.

Gegebenenfalls wurden die isolierten Zellen noch vor der CFSE-Markierung CD8<sup>+</sup> MACS aufgereinigt (siehe 2.2.6.3). Die Zellsuspension wurde mit einem Nylonsieb (40 µm) von größeren Zellklumpen befreit und die Zellen dadurch vereinzelt. Es wurden 3-10 x 10<sup>6</sup> / ml in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze (oder in PBS) und einer Konzentration von 0,25-2,5 µM CFSE je nach Versuchsansatz gewählt (naive OT I T-Zellen: 1 µM; niedrig markierte Kontrollzellen für den Zytotoxizitätstest: 0,25 µM; stark markierte Zielzellen für den Zytotoxizitätstest: 2,5 µM), für 15 min bei 37°C inkubiert und mehrfach zwischendurch die Zellen gemischt, um eine gleichmäßige CFSE-Markierung zu erzielen. Die Färbereaktion wurde entweder durch Zugabe von 10%igem FCS oder durch kaltes PBS gestoppt und die Zellen bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend erneut mit RPMI 1640 + 10%igem FCS oder kaltem PBS gewaschen, bei 1.500 rpm, 10 min und 10°C zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die CFSE-Markierung

wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft und die Zellen anschließend erneut durch ein Nylonsieb (40 µm) vereinzelt und in einem geeigneten Volumen PBS für den adoptiven Transfer zur intravenösen Applikation aufgenommen.

### 2.2.7.5 *In vivo* Zytotoxizitätstest (nicht-radioaktiv)

Um nachzuweisen, ob die in die c-myc/OVA75 tg+ Mäuse injizierten antigenspezifischen CD8+ OT I T-Zellen zytotoxische Aktivität aufweisen, wurde in diesen, wie auch in injizierten c-myc/OVA tg- Mäusen, ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Bei dem nicht-radioaktiven *in vivo* Zytotoxizitätstest werden die injizierten Zielzellen grün-fluoreszierend markiert (CFSE-Markierung). Es wurden aus Wildtyp C57BL/6J Mäusen Milzen isoliert und eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.2.6.1). Die Zellen wurden auf zwei Ansätze verteilt. Die eine Population der Zielzellen (T = *targets*) wurde mit einem spezifischen Antigen (1 µM SIINFEKL-Peptid) für 15 min bei 37°C beladen, bevor sich eine CFSE-Markierung (2,5 µM; siehe 2.2.7.4) anschloss. Die zweite Population diente als Kontrolle (C = *control*) und wurde nicht mit Peptid beladen, sondern lediglich mit einer niedrigen CFSE-Konzentration (0,25 µM siehe 2.2.7.4) markiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um freies Antigen zu entfernen und dazwischen jeweils für 10 min bei 1.500 rpm und 10°C zentrifugiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden beide Populationen im gleichen Verhältnis zueinander gemischt, und  $1 \times 10^7$  Zielzellen, nach Vereinzeln der Zellen über ein Nylonsieb (40 µm), den Mäusen intravenös appliziert. Nach 4 h wurden die Mäuse getötet, die Organe (Leber, Milz, inguinaler Lymphknoten und leberdrainierender Lymphknoten) entnommen, die primären Lymphozyten isoliert (siehe 2.2.6.2.1 und 2.2.6.1) und im Durchflußzytometer analysiert.

Es wurde zunächst das Verhältnis (R = *ratio*) der Zellzahl der Targetzellen (RT) zu dem Verhältnis der Kontrollzellen (RC) mit Hilfe der Software *Flow Jo* ermittelt. In den Target-Kontrolltieren (KT; nur Ziel- und Kontrollzellanjektion) wurde dieses Verhältnis gemittelt und mit diesem Wert die spezifische *in vivo* Zytotoxizität in den Versuchstieren (VT; c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg-) nach folgender Gleichung mit der Software *Microsoft Excel* berechnet:

$$\text{spezifische Zytotoxizität [\%]} = 100 - ( [(RT/RC)_{VT} / (RT/RC)_{KT}] * 100 )$$

### 2.2.7.6 Cytometric Bead Array

Die Messung der IL-2 Mengen nach *in vitro* Kultivierung von B3Z T-Zellen und DCs, isoliert aus der Leber und der Milz von c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> und c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen, erfolgte mit dem „Cytometric Bead Array“ der Firma Becton Dickinson. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Vor Versuchsbeginn wurden die Überstände gegebenenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend, falls notwendig, mit dem *Assay diluent* verdünnt (in der Regel zwischen 1:2 und 1:4). In der Zwischenzeit wurde der IL-2 Standard vorbereitet. Dazu wurde eine IL-2 Standardtablette in ein 15 ml-Einmalreaktionsgefäß gegeben, mit 4 ml *Assay diluent* durch Auf- und Abpipettieren gelöst und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) von 2.500 pg/ml bis 10 pg/ml in *Assay diluent* angesetzt. 50 µl der jeweiligen Proben sowie der Standardverdünnungen wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt und mit 50 µl *capture microbeads*-Verdünnung (49 µl *capture diluent* + 1 µl *capture microbeads*) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 50 µl *detection microbeads*-Verdünnung (49 µl *detection diluent* + 1 µl *detection microbeads*) zu den Proben pipettiert und erneut für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml *Washbuffer* gewaschen, bei 950 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Proben in 300 µl *Washbuffer* resuspendiert, um sie im Durchflußzytomter zu analysieren. Dazu wurde die *Voltage* am Durchflußzytometer mit *A9 Beads* (APC Cy7 und APC) sowie *F1 Beads* (APC Cy7 und APC) eingestellt, von denen jeweils 25 µl in 175 µl *Washbuffer* angesetzt wurden. Die *Voltage* wurde so eingestellt, daß bei A9 der *mean* bei 160.000 +/- 2.000 und bei F1 der *mean* bei 60 +/- 5 lag. Es wurden 300 *microbeads* eingemessen und die Daten mit der Software *FCAP Array* der Firma Becton Dickinson analysiert.

### 2.2.9 Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion): Generierung von c-myc/OVA transgenen Mäusen

Die zu injizierende pBI-4 *c-myc/OVA* DNA wurde linearisiert und für die Pronukleus-Injektion, wie unter 2.2.2.4-2.2.2.8 beschrieben, aufbereitet.

Die hormonelle Stimulierung der Eizellen-Spendermäuse (C57BL/6J und B6D2F1) mit den beiden verwendeten Hormonen PMS (*pregnant mares serum*) und HCG (*human chorionic*

*gonadotropin*) erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die Eizellenspendermäuse mit C57BL/6J Männchen verpaart. Ebenso wurden Ammenmütter (CD1) mit vasektomierten Männchen (CD1) verpaart.

Am nächsten Morgen wurden die, einen Vaginalpfropf enthaltenen Eizellenspender-Mäuse, durch zervikale Dislokation getötet, desinfiziert und der Bauchraum geöffnet. Zunächst wurde das Mesometrium möglichst nah am Uterus, Eileiter und Ovar durchtrennt. Der Eileiter wurde anschließend in M2-Medium mit 300 µg/ml Hyaluronidase (löst die Cumuluszellen von den Eizellen ab) überführt. Nach Aufbrechen der Ampulla wurden die Eizellen und Cumuluszellen in das Medium gespült. Die Eizellen wurden anschließend zweimal in M2-Medium gewaschen, in eine Tropfenkultur unter Mineralölschicht überführt und bis zur Injektion im Brutschrank (37°C; 7% CO<sub>2</sub>) kultiviert.

Zur Injektion der pBI-4 *c-myc/OVA* DNA wurden die Eizellen in M2-Medium in die Injektionskammer überführt. Mit der Haltekapillare wurde eine Eizelle angesaugt, und mit Hilfe der Injektionskapillare so positioniert, daß sich möglichst der männliche (größere) Vorkern seitlich befand. Anschließend wurde mit der Injektionskapillare die DNA in den männlichen Pronukleus bei einer 400-fachen Vergrößerung (inverses Lichtmikroskop Leica DMIRB) injiziert. Die injizierten Eizellen wurden zweimal in M16-Medium gewaschen und bis zum Transfer in die scheinchwangeren Ammenmütter (CD1) im Inkubator in M16-Medium kultiviert. Für den Transfer der Eizellen in die Ammenmütter wurden diese erneut in M2-Medium überführt.

In die, einen Vaginalpfropf enthaltenen Weibchen, wurden die manipulierten Eizellen (25-32 pro Maus) eingesetzt. Dazu wurde den Ammenmüttern eine Kombinationsnarkose (Xylazinhydrochlorid und Ketaminhydrochlorid; 100 µg / 10 g Körpergewicht; intra-peritoneal) verabreicht. Anschließend wurde die Oberhaut im Bereich der Wirbelsäule etwa 2 cm aufgeschnitten, die Unterhaut im Bereich des Ovar durchtrennt und dieses herausgezogen. Nach Aufreißen der Bursa, wurden die injizierten Eizellen mit einer Transferkapillare in das Infindibulum transferiert, und das Ovar zurück in die Leibeshöhle gelegt. Danach erfolgte der Transfer auf der anderen Seite. Nach der Operation wurde die Oberhaut mit Wundclipsen verschlossen.

### 2.2.8 Statistische Analysen

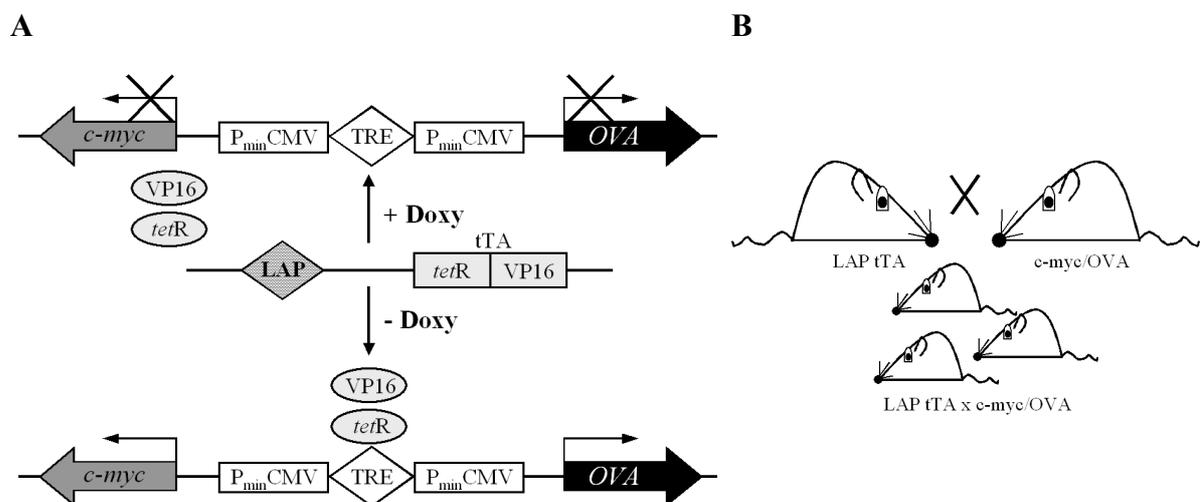
Fehlerabweichungen sind als Standardabweichungen, die aus den Einzelwerten mit Hilfe der Software *Microsoft Excel* berechnet wurden, dargestellt. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier Methode dargestellt. Unabhängige Student's T-Test wurden für  $k=2$  und eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit postHoc Tests (nach Bonferroni) für  $k>2$  mit Hilfe der Software *SPSS 14.0* berechnet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Generierung c-myc/OVA transgener Mäuse

##### 3.1.1 Das Tet System

Zur Generierung der c-myc/OVA transgenen Mäuse wurde das Tetrazyklin-abhängige Genexpressionssystem (Tet-off System, Abb.3.1 A) von H. Bujard und seinen Kollegen verwendet (Gossen und Bujard 1992; Gossen et al. 1993).



**Abb.3.1 Schematische Darstellung des binären, induzierbaren Tet-off Systems und Verpaarungsschema.** (A) In Anwesenheit von Doxyzyklin (+ Doxy) kann der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA) nicht an das Tetrazyklin Response Promotor Element (TRE) binden und die nachfolgenden Gene *c-myc* und *OVA* können nicht exprimiert werden. In Abwesenheit von Doxyzyklin (- Doxy) hingegen kann der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA) an das Promotor Element binden und die Genexpression ist gewährleistet. In diesem Fall wird der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA) leberspezifisch exprimiert (LAP = *liver-enriched activator protein*).

$P_{\min}CMV$  = minimaler Promotor des Cytomegalovirus; *tetR* = Tet Repressor, Tetrazyklinresistenzkassette aus *E.coli*; TRE = Tetrazyklin Response Promotor Element; VP16 = transaktivierende Domäne des *Herpes simplex* Virus. (B) LAP tTA transgene Mäuse werden mit c-myc/OVA transgenen Mäusen verpaart um doppelt transgene LAP tTA x c-myc/OVA Mäuse zu erhalten.

Es handelt sich um ein binäres, induzierbares System, bei dem die Regulation der Gene abhängig von Doxyzyklin, einem Tetrazyklin-Analogon, ist. Dabei wird Doxyzyklin, bei *in vivo* Verwendung des Systems, über das Trinkwasser verabreicht oder für *in vitro* Versuche dem Zellkulturmedium zugefügt. Weiterhin ist die Genexpression abhängig von einem Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA), welcher eine Fusion aus dem Tet-Repressor

(*tetR*) des Tet-Operons von *E.coli* sowie einem Teil der VP16-Aktivator-domäne (Triezenberg et al. 1988) des *Herpes simplex* Virus besteht.

Bei dem Tet-off System kommt es in Anwesenheit von geringsten, noch nicht antibiotisch wirkenden Mengen Doxyzyklin (Hillen und Berens 1994) zu einer Konformationsänderung des *tetR*-Anteils, was das Ausbleiben einer Bindung des Transaktivators an das Tetrazyklin Response Promotor Element (TRE) zur Folge hat. In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet der Transaktivator an das TRE und die nachgeschalteten Gene (*c-myc* und *OVA*) werden exprimiert. Das TRE besteht aus der Tet-Operatorsequenz (*tetO*) sowie einem minimalen CMV Promoter ( $P_{\min}CMV$ ) des Cytomegalovirus, bei dem die Enhancer Elemente fehlen, so daß es ohne Transaktivatorbindung nicht zu einer Expression der nachgeschalteten Gene kommt. Durch die Wahl eines spezifischen Promotors (LAP = *liver-enriched activator protein*) ist es möglich den Transaktivator gewebsspezifisch zu induzieren. Ein weiterer Vorteil des Tet Systems besteht zusätzlich in einer zeitspezifischen Genexpression, je nach Zugabe bzw. Entzug von Doxyzyklin.

Um die generierten *c-myc/OVA* transgenen Mäuse zu analysieren, sollten diese mit den LAP tTA Reporter-mäusen (Kistner et al. 1996) verpaart werden, um eine leberspezifische Genexpression von *c-myc* und *OVA* zu gewährleisten (Abb.3.1 B).

Bei dem Tet-on System ist die Genexpression von einem reversen Tetrazyklin-kontrolliertem Transaktivator (rtTA) abhängig, der nur in Anwesenheit von Doxyzyklin an das Response Promotor Element binden kann und somit die Expression der nachfolgenden Gene induziert. In Abwesenheit von Doxyzyklin hingegen findet keine Genexpression statt.

### 3.1.2 Klonierung des pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids

Zur Generierung eines neuartigen, transgenen Tumormodells muß zunächst ein geeignetes Onkogen gewählt werden. In unserem Fall fiel die Wahl auf das Protoonkogen *c-myc*, welches zum einen unterschiedliche Funktionen innerhalb des Zellzyklus einnimmt, zum anderen auch in der Lage ist, bei Überexpression in der Leber, zu HCC-ähnlichen Tumoren zu führen (Beer et al. 2004). Da es für tumorspezifische, immunologische Therapieansätze unerlässlich ist das Tumorantigen zu kennen, dies aber oftmals in der medizinischen Anwendung aufgrund der fehlenden Identifikation ein Problem darstellt, sollte in unserem transgenen Mausmodell, zusätzlich zu dem Protoonkogen, noch ein Modellantigen exprimiert

werden. Es wurde das gut charakterisierte und in der Immunologie häufig verwendete Hühnereiweiß (Ovalbumin, OVA) gewählt.

Zur Generierung *c-myc*/OVA transgener Mäuse wurde das bidirektionale Reporterplasmid pBI-4 gewählt. Exon 2 und Exon 3 der humanen *c-myc* cDNA wurde aus pUHD10-3 *c-myc* (mit freundlicher Genehmigung von Dean Felsher, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA; Felsher und Bishop 1999) über *EcoRI* herausgeschnitten und zunächst in pBluescript II KS(+) zwischenkloniert. In Abb.3.2 A und B sind beide Orientierungsmöglichkeiten der humanen *c-myc* cDNA in pBluescript II KS(+) schematisch dargestellt. Für die weiteren Klonierungsschritte war, die in Abb.3.2 A dargestellte Insertion bzw. Orientierung von *c-myc* notwendig.

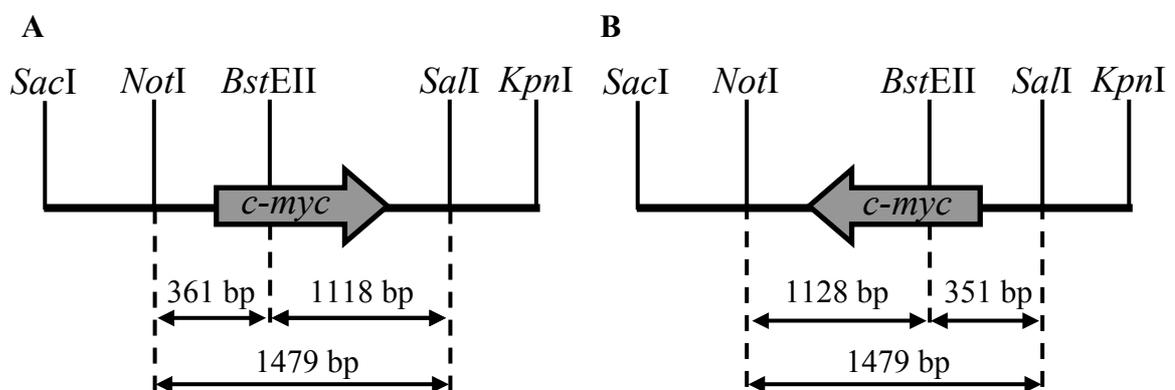


Abb.3.2 **Schematische Übersicht der in pBluescript II KS(+) klonierten humanen *c-myc* cDNA.** Exon 2 und Exon 3 der humanen *c-myc* cDNA wurde aus pUHD10-3 *c-myc* (Felsher und Bishop, 1999) über *EcoRI* herausgeschnitten und in pBluescript II KS(+) hineinkloniert. Dargestellt sind die beiden Orientierungsmöglichkeiten (A und B) bzw. Schnittstellen *NotI* und *SalI* nach Insertion der humanen *c-myc* c-DNA in pBluescript II KS(+).

Die erhaltenen Klone wurden zunächst durch einen *NotI/SalI* Doppel-Restriktionsverdau auf die Insertion der humanen *c-myc* cDNA in pBluescript untersucht (Abb.3.3). Klon 3, 5 und 9 zeigten eine erfolgreiche Insertion der humanen *c-myc* cDNA (Bande bei ca. 1,5 kb).

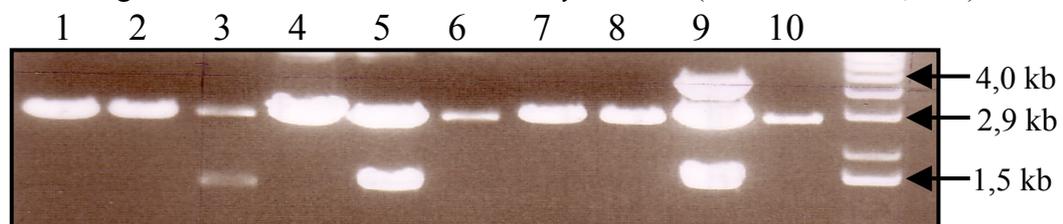


Abb.3.3 ***NotI/SalI* Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBluescript II KS(+) *c-myc* Plasmids.** Von den 10 transformierten und analysierten *E.coli* Stämmen konnte in drei Stämmen (Klon 3, 5 und 9) Plasmide isoliert werden, die die humane *c-myc* cDNA inseriert haben (Bande bei ca. 1,5 kb). Klon 9 zeigte zusätzlich zu der inserierten *c-myc* cDNA noch unverdaute Plasmid DNA (Bande bei ca. bei 4,0 kb).

Um die Orientierung der cDNA zu bestimmen, wurden anschließend von den *c-myc* inserierten Klonen asymmetrische Restriktionsverdau (*NotI/BstEII* und *SalI/BstEII*) durchgeführt (Abb.3.4). Klon 9 zeigte die für die weitere Klonierung gewünschte Orientierung, wie sie auch schematisch in Abb.3.2 A dargestellt ist.

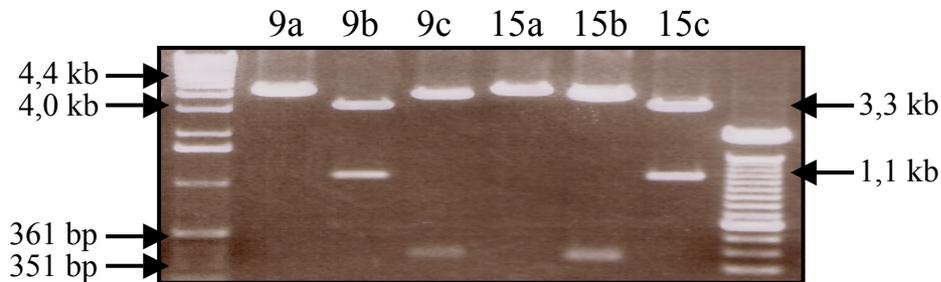


Abb.3.4 **Asymmetrischer Restriktionsverdau von pBluescript II KS(+) *c-myc***. Die beiden *c-myc* inserierten Plasmide (Klon 9 und 15) wurden mit *BstEII* (a) linearisiert sowie mit *SalI* und *BstEII* (b) und *NotI* und *BstEII* (c) asymmetrisch verdaut, um die Orientierung der integrierten *c-myc* cDNA zu bestimmen. Klon 9 zeigte die gewünschte Insertion der *c-myc* cDNA wie in Abb.3.2 A, während die Orientierung von Klon 15 der schematischen Abb.3.2 B entspricht.

Anschließend wurde die humane *c-myc* cDNA mit *NotI* und *SalI* aus pBluescript II KS(+) herausgeschnitten und in das bidirektionale Reporterplasmid pBI-4 hineinkloniert. Die Überprüfung der erhaltenen Klone erfolgte über einen *NotI/SalI* Doppel-Restriktionsverdau, wie in Abb.3.5 dargestellt (Bande bei ca. 1,5 kb).

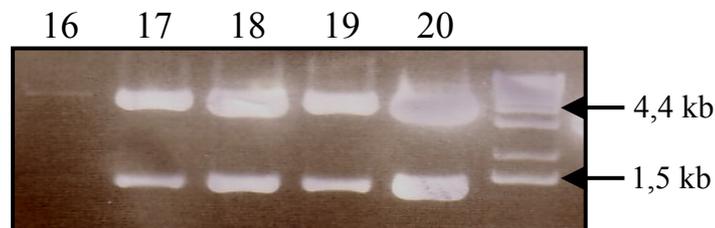


Abb.3.5 ***NotI/SalI* Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBI-4 *c-myc* Plasmids**. Aus Klon 16 konnte nur wenig DNA isoliert werden, während bei den übrigen hier gezeigten Klonen (16-20) die inserierte *c-myc* cDNA mit *NotI* und *SalI* wieder herausgeschnitten werden konnte (Bande bei ca. 1,5 kb).

Als Ausgangspunkt für die Ovalbumin (Hühnereiweiß) Klonierungsstrategien erhielten wir ein pBluescript II KS(+), in dem die *OVA* cDNA bereits hineinkloniert wurde (pBluescript II KS(+) *OVA*; mit freundlicher Genehmigung von Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg).

In den pBluescript II KS(+) *OVA* Vektor wurde zunächst eine, für die weiteren Klonierungsschritte notwendige *MluI* Schnittstelle eingefügt. Dazu wurde das Plasmid mit *HindIII* verdaut und ein Oligonukleotid mit einer *MluI* Schnittstelle eingebracht (Abb.3.6 A). Die erhaltenen Klone wurden mit *MluI* verdaut, um eine Insertion des Oligonukleotids

nachzuweisen. In die Klone 2-7 konnte eine *MluI* Schnittstelle erfolgreich hineinkloniert werden (Bande bei ca. 4,1 kb), während Klon 1 nicht linearisiert wurde (Abb.3.6 B).

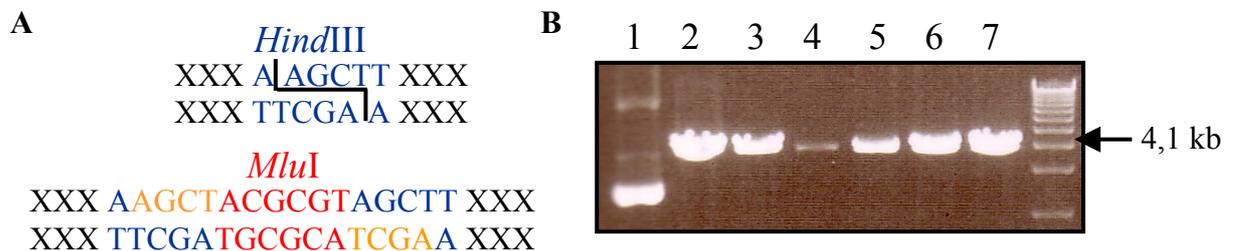


Abb.3.6 Einführen einer *MluI* Schnittstelle in pBluescript II KS(+) OVA. (A) Schematische Darstellung der Oligoligation über *HindIII* (blau) und Einbringen einer *MluI* Schnittstelle (rot). (B) Die analysierten Klone (1-7) wurden mit *MluI* verdaut, dabei konnten die Klone 2-7 linearisiert werden (Bande bei ca. 4,1 kb), während in Bahn 1 (Klon 1) das Bandenmuster unverdauter Plasmid DNA entspricht.

Nach erfolgreichem Einbringen einer *MluI* Schnittstelle wurde der 5`-Bereich der OVA cDNA zusätzlich ansequenziert. Es ergab sich, daß schon in dem erhaltenen Ausgangsplasmid die OVA cDNA über *BamHI* hineinkloniert wurde, allerdings fehlten im Vergleich zu der in der Datenbank (<http://www.ensembl.org>) gefundenen Sequenz, die letzten drei Aminosäuren sowie ein Stopcodon.

Damit es nach der Transkription zu einem funktionsfähigen, der Datenbank entsprechenden OVA Protein kommt, wurde in einem nächsten Klonierungsschritt der 3`-Bereich rekonstruiert. Dazu wurde ein *NotI/BamHI* Doppel-Restriktionsverdau durchgeführt und neben dem Einführen einer *NheI* Schnittstelle, die für die weiteren Klonierungsschritte benötigt wurde, noch die fehlenden Nukleotide, inklusive Stopcodon eingebracht.

Abb.3.7 A zeigt schematisch das Einbringen der Oligonukleotide, wobei sich im Vergleich zur Datenbankanalyse ein Aminosäureaustausch von Valin zu Glycin (V→G) ergibt. Die erhaltenen Klone wurden mit *NheI* verdaut, um das Einbringen der Oligonukleotide zu überprüfen. Klon 1-4 sowie 7 und 8 konnten mit *NheI* linearisiert werden (Bande bei ca. 4,1 kb, Abb.3.7 B).

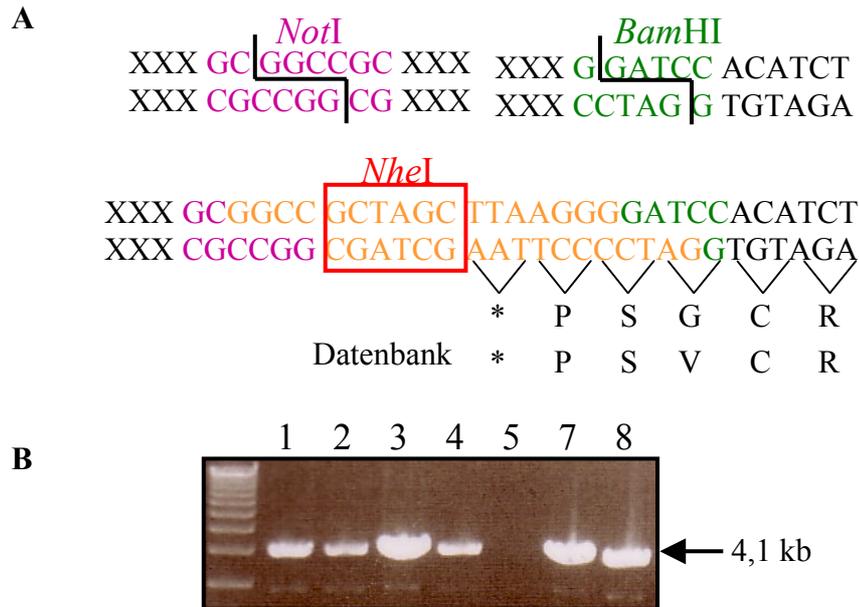


Abb.3.7 **Einbringen einer *NheI* Schnittstelle in pBluescript II KS *OVA MluI*.** (A) Schematische Darstellung der Oligoligation über einen asymmetrischen Verdau mit *NotI* (pink) und *BamHI* (grün) sowie das Einbringen einer *NheI* (rot umrandet) Schnittstelle zusammen mit einem Stopcodon (\*). Obere Reihe entspricht der Aminosäuresequenz der klonierten *OVA* c-DNA, während die untere Reihe die Aminosäuresequenz der *OVA* c-DNA aus der Datenbankanalyse (<http://www.ensembl.org>) darstellt. (B) Die analysierten Klone (1-4; 7-8) wurden mit *NheI* verdaut und linearisiert (Bande bei ca. 4,1 kb).

C = Cystein; G = Glycin; P = Prolin; R = Arginin; S = Serin; V = Valin

In einem letzten Klonierungsschritt wurde die *OVA* cDNA über *MluI* und *NheI* aus pBluescript II KS(+) herausgeschnitten und in pBI-4 *c-myc* eingebracht. Die Überprüfung der Klone erfolgte durch einen *MluI/NheI* Doppel-Restriktionsverdau. Aus allen analysierten Klonen (1-10) konnten die *OVA* cDNA (Bande bei ca. 1,2 kb) wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten werden (Abb.3.8).

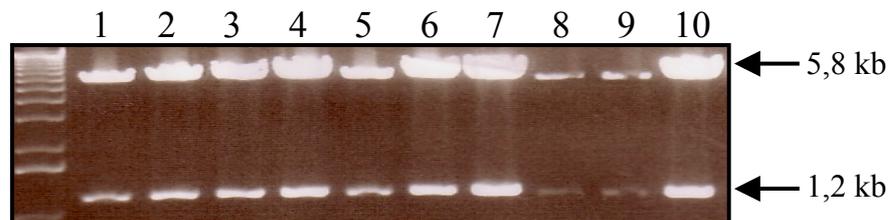


Abb.3.8 ***MluI/NheI* Doppel-Restriktionsverdau des klonierten pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids.** In allen 10 analysierten Klonen (1-10) konnten die inserierten *OVA* c-DNAs mit einem *MluI/NheI*-Doppelverdau nachgewiesen werden (Bande bei ca. 1,2 kb).

Das klonierte pBI-4 *c-myc/OVA* Endkonstrukt (ca. 7,0 kb) weist nun eine Insertion der humanen *c-myc* cDNA über *NotI* und *SalI* auf und besitzt eine über *MluI* und *NheI* eingebrachte *OVA* cDNA. Die beiden inserierten cDNA Sequenzen wurden auf Nukleotidveränderungen analysiert und mit den veröffentlichten Datenbanksequenzen

(<http://www.ensembl.org>) verglichen. Abb.3.9 zeigt neben der schematischen Darstellungen des pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids (A) eine Auswahl an Restriktionsanalysen zur Überprüfung des klonierten Endkonstruktes (B).

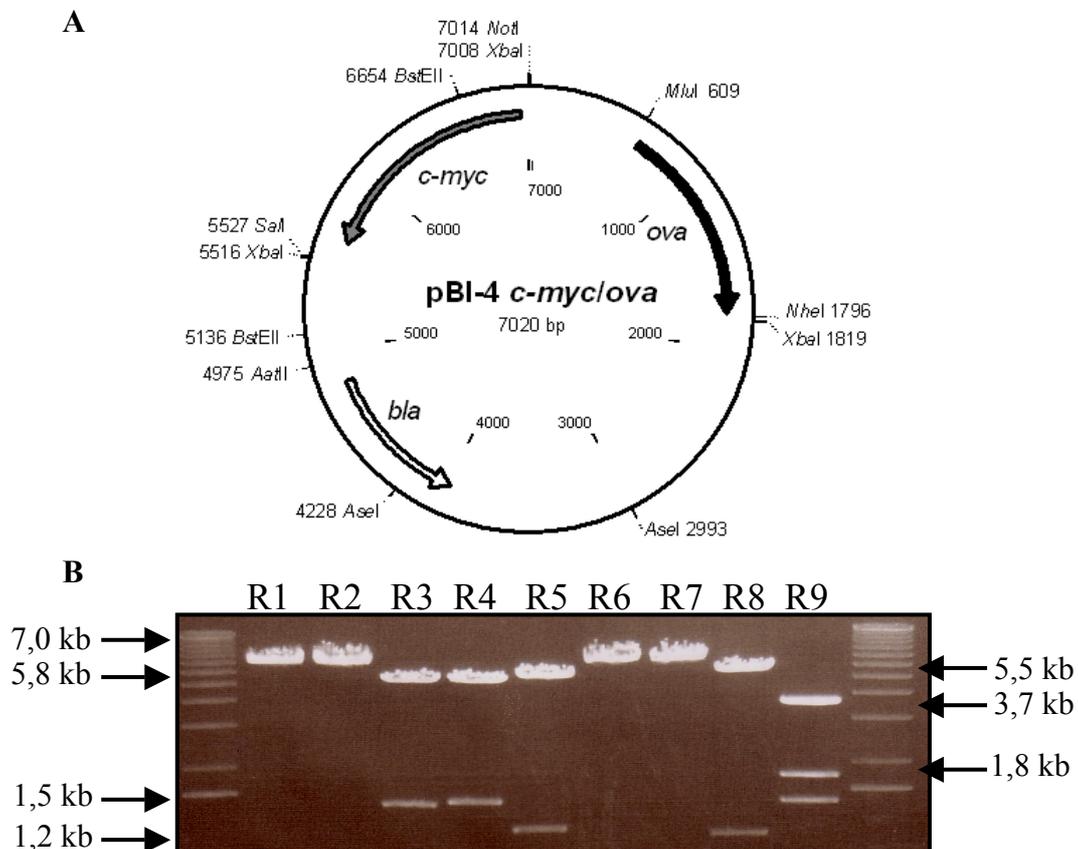
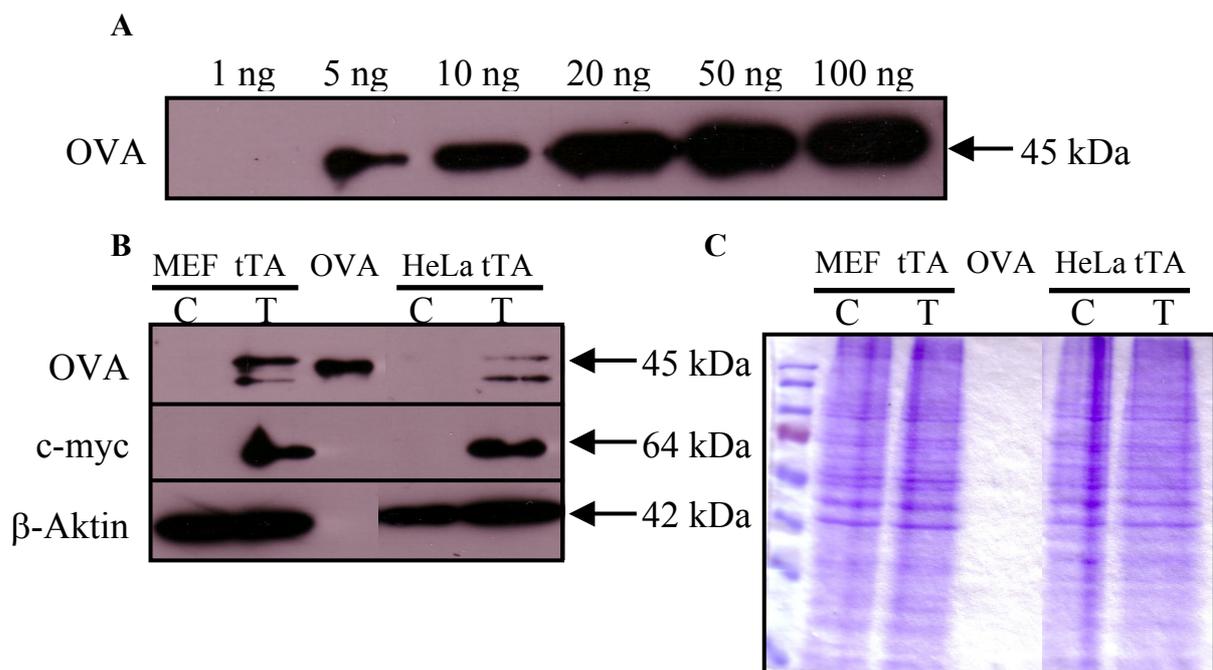


Abb.3.9 **Endkonstrukt pBI-4 *c-myc/OVA***. (A) Schematische Darstellung des klonierten pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids (*bla* =  $\beta$ -Laktamase; verantwortlich für die Ampicillinresistenz) mit einer Auswahl an eingezeichneten Restriktionsschnittstellen. (B) Restriktionsanalysen (R1: *NotI* 7,0 kb; R2: *SalI* 7,0 kb; R3: *NotI* + *SalI* 1,5 kb, 5,5 kb; R4: *BstEII* 1,5 kb, 5,5 kb; R5: *AseI* 1,2 kb, 5,8 kb; R6: *MluI* 7,0 kb; R7: *NheI* 7,0 kb; R8: *MluI* + *NheI* 1,2 kb, 5,8 kb; R9: *XbaI* 1,5 kb, 1,8 kb, 3,7 kb) des klonierten pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids.

### 3.1.3 Expressionsnachweis von *c-myc* und OVA *in vitro*

Das klonierte pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmid wurde hinsichtlich der *c-myc* und OVA Expression *in vitro* untersucht. Zur Etablierung und Bestimmung der Sensitivität eines OVA Nachweises, wurde aufgereinigtes Protein in unterschiedlichen Konzentrationen (1–100 ng) mit Hilfe des Western Blots analysiert. Die Detektierbarkeit von OVA mit Hilfe der Western Blot Analyse lag bei 5 ng Protein (Abb.3.10 A).

Anschließend wurden Zelllinien (MEF tTA und HeLa tTA), die den Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) konstitutiv exprimieren, transient mit dem pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmid transfiziert und zur Induktion beider Genexpressionen in Abwesenheit von Doxozyklin kultiviert. Nach zwei Tagen wurden Proteinlysate generiert und die pBI-4 *c-myc/OVA* transfizierten, ebenso wie die mock transfizierten Zellen mit Hilfe der Western Blot Analyse auf ihre OVA, c-myc und  $\beta$ -Aktin Expression untersucht. Als Positivkontrolle für den OVA Nachweis wurde 10 ng aufgereinigtes OVA Protein verwendet. Die mit dem pBI-4 *c-myc/OVA* transient transfizierten HeLa tTA sowie MEF tTA Zelllinien zeigten im Unterschied zu den mock transfizierten Zelllinien eine OVA Expression (Bande bei ca. 45 kDa). Im Unterschied zur Positivkontrolle konnte in den pBI-4 *c-myc/OVA* transfizierten Zelllinien zusätzlich zur detektierten 45 kDa schweren OVA Bande eine etwas leichtere Bande nachgewiesen werden, was eventuell mit einer Degradation des OVA Proteins zusammenhängt (Abb.3.10 B).

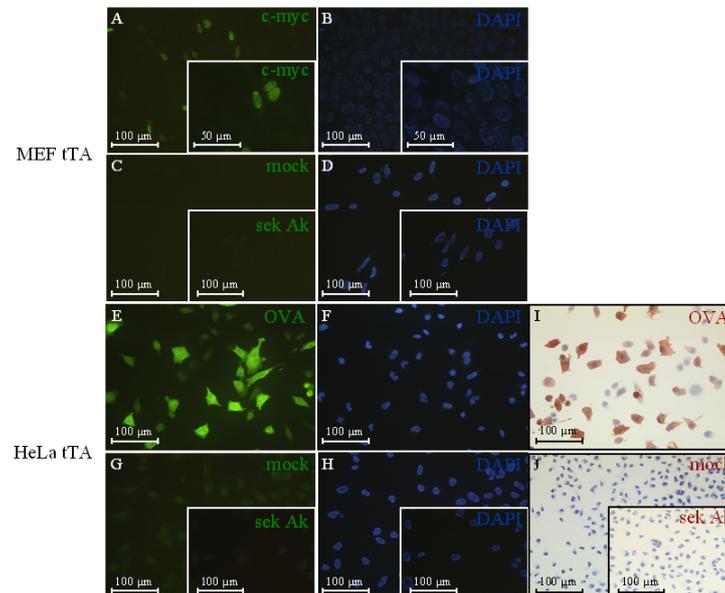


**Abb.3.10 Expressionsnachweis (Western Blot) von c-myc und OVA nach transienter Transfektion mit pBI-4 *c-myc/OVA* in MEF tTA bzw. HeLa tTA Zelllinien.** (A) Western Blot Analyse von 1-100 ng aufgereinigtem OVA Protein (anti-OVA Ak: 1:10.000; anti-Hase/HRP 1:1.000) zur Bestimmung der Sensitivität. (B) MEF tTA bzw. HeLa tTA Zelllinie, transient transfiziert mit pBI-4 *c-myc/OVA* (T) oder mock transfiziert (C) und anschließende Western Blot Analyse nach 2 d für OVA, c-myc (anti-c-myc Ak 1:500; anti-Hase/HRP 1:1.000) und  $\beta$ -Aktin (anti- $\beta$ -Aktin Ak 1:5.000; anti-Maus/HRP 1:1.000; 10  $\mu$ g Totalprotein). (C) Coomassie-Färbung eines mit äquivalenten Mengen beladenen SDS-Gels. OVA = gereinigtes Ovalbumin, 10 ng

Vergleichbar mit der OVA Expression in den pBI-4 *c-myc/OVA* transfizierten Zelllinien konnte auch eine *c-myc* Expression (Bande bei ca. 64 kDa) detektiert werden. Auffallend war, daß in den mock transfizierten HeLa tTA Zelllinien keine endogene *c-myc* Expression nachgewiesen werden konnte. Dies könnte eventuell mit der relativ kurzen Halbwertszeit von 20-30 min (Salghetti et al. 1999), der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse (Ciechanover et al. 1991, Salghetti et al. 1999) oder einem im Vergleich zur transienten Transfektion niedrigeren endogenen Gehalt von *c-myc* in HeLa tTA Zelllinien zusammenhängen (Abb.3.10 B).

Zur Kontrolle, daß von den pBI-4 *c-myc/OVA* bzw. mock transfizierten Zellen äquivalente Proteinmengen analysiert wurden, wurde zum einen die  $\beta$ -Aktin Expression (Bande bei ca. 42 kDa) im Western Blot bestimmt (Abb.3.10 B) und zum anderen eine Coomassie-Färbung eines mit äquivalenten Mengen beladenen SDS-Gels durchgeführt (Abb.3.10 C).

Zusätzlich zu dem Expressionsnachweis von *c-myc* und OVA mit Hilfe der Western Blot Analyse wurden beide Proteine mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung bzw. für OVA zusätzlich auf immunhistochemischer Ebene nachgewiesen. Dazu wurden die beiden Zelllinien MEF tTA und HeLa tTA mit dem pBI-4 *c-myc/OVA* bzw. mock transfiziert, zwei Tage in Abwesenheit von Doxyzyklin kultiviert, fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung für *c-myc* (Abb.3.11 A-D) bzw. OVA (Abb.3.11 E-H) durchgeführt.



**Abb.3.11 Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie transient transfizierter MEF tTA und HeLa tTA Zellen mit pBI-4 *c-myc/OVA*.** (A-D) MEF tTA Zellen transient transfiziert mit pBI-4 *c-myc/OVA* (A, B) bzw. mock transfiziert (pBI-4; C, D) und Immunfluoreszenzfärbung für *c-myc* 2 d nach Transfektion (anti-*c-myc* Ak 1:100; Alexa 488 anti-Maus 1:400). (E-J) HeLa tTA Zellen transient transfiziert mit pBI-4 *c-myc/OVA* (E, F, I) bzw. mock transfiziert (pBI-4; G, H, J) und Immunfluoreszenzfärbung für OVA 2 d nach Transfektion (anti-OVA Ak 1:800; Alexa 488 anti-Hase 1:200; E-H) bzw. Immunhistochemische Färbung (anti-OVA Ak 1:1.000; AEC; I, J).

Das Protoonkogen *c-myc*, ein Transkriptionsfaktor, ist kernlokalisiert, während die OVA Expression sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma detektierbar ist. Die OVA Expression und Lokalisation konnte ebenfalls auf immunhistochemischer Ebene bestätigt werden (Abb.3.11 I, J).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe unterschiedlicher Nachweisverfahren die Funktionalität des klonierten pBI-4 *c-myc/OVA* Plasmids bestätigt werden.

### 3.1.4 Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion) und Analyse der Founder

Zur Generierung der *c-myc/OVA* transgenen Mäuse wurde die Pronukleusinjektion gewählt. Dazu wurde die pBI-4 *c-myc/OVA* DNA mit einem *AatII/AseI* Doppel-Restriktionsverdau linearisiert, aufgereinigt und in embryogetestetem H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 6 ng/μl resuspendiert. Abb.3.12 A zeigt schematisch die linearisierte DNA, die mit Hilfe der Injektionskapillare bevorzugt in den größeren, männlichen Pronukleus injiziert wird, während die Oozyte (Eizelle) zeitgleich mit einer Haltekapillare fixiert wird. Anschließend wurden die injizierten Oozyten in scheinchwangere Ammenmütter (CD1) transferiert.

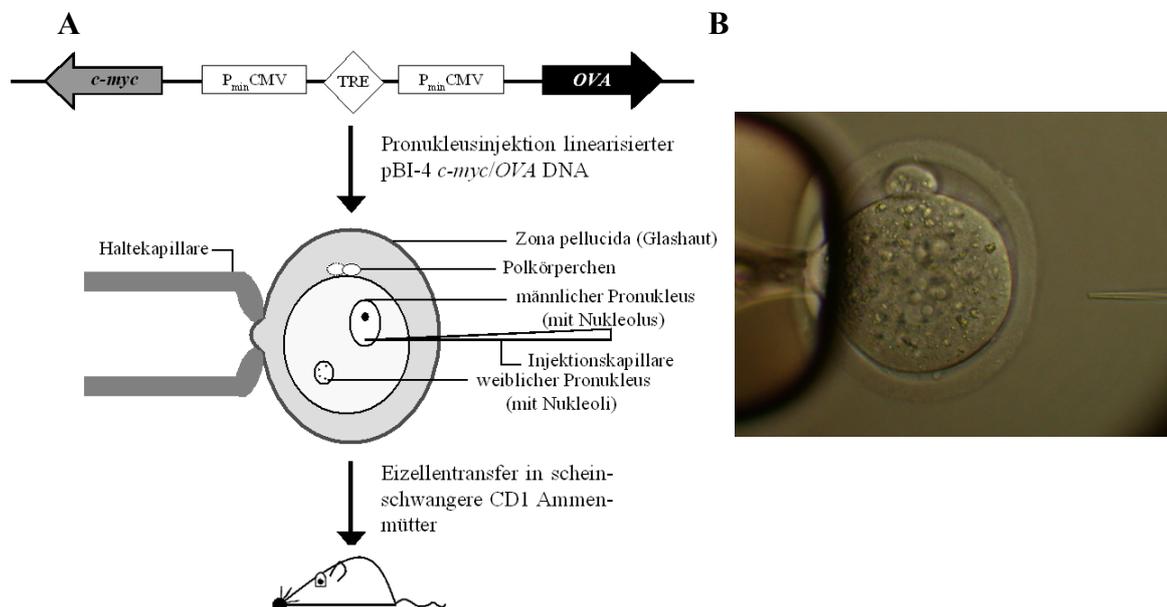


Abb.3.12 **Übersicht über die Pronukleusinjektion.** (A) Schematische Darstellung der linearisierten pBI-4 *c-myc/OVA* DNA und die Injektion in den männlichen Pronukleus einer Eizelle mit Hilfe einer Injektionskapillare und anschließendem Transfer in scheinchwangere CD1 Ammenmäuse. (B) Pronukleusinjektion (Angela Egert, Institut für Pathologie, Bonn) in Eizellen aus der Verpaarung B6D2F1 x C57BL/6J (400x).

Da es für die weiteren immunologischen Analysen notwendig ist Lymphozyten-Spendermäuse sowie Empfängertiere mit gleichem MHC Haplotyp zu verwenden, sollten die *c-myc/OVA* transgenen Mäuse im C57BL/6J Mausstamm generiert werden. Die Pronukleusinjektion in Oozyten aus reinen C57BL/6J Mäusen bereitet aufgrund des schlechter erkennbaren Pronukleus Probleme und resultiert oftmals in einer geringeren Ausbeute an injizierten Oozyten und folglich in einer niedrigeren Ausbeute an geborenen Mäusen. Aus diesem Grund wurde die Pronukleusinjektion sowohl in Oozyten aus der Verpaarung C57BL/6J x C57BL/6J, als auch zur Sicherheit in B6D2F1 x C57BL/6J (Abb.3.12 B) durchgeführt.

Aus dem C57BL/6J x C57BL/6J Ansatz konnten 119 Oozyten, aus B6D2F1 x C57BL/6J Ansatz 129 Oozyten injiziert und in scheinchwangere Ammenmütter transferiert werden. Insgesamt wurden 15 Mäuse geboren, von denen zwei Mäuse die pBI-4 *c-myc/OVA* DNA im Genom integriert hatten (je eine Maus aus einem der beiden Ansätze, Tab.3.1).

Tab.3.1 **Übersicht über die Ergebnisse der Pronukleusinjektion.** Anzahl der injizierten und transferierten Eizellen, deren Herkunft sowie die Anzahl der geborenen Mäuse.

Ezellenspender	Anzahl injizierter und transferierter Eizellen	Anzahl geborener Mäuse	Anzahl der Founder
B6D2F1 x C57BL/6J	129	10	1
C57BL/6J x C57BL/6J	119	5	1

Dabei erfolgte die Überprüfung über die Integration der pBI-4 *c-myc/OVA* DNA in die geborenen Mäuse mit Hilfe der PCR. Abb.3.13 A zeigt schematisch die Genstruktur von *c-myc* und *OVA* mit den dazugehörigen Positionen der Primerbindestellen, die für die Analyse der Nachkommen verwendet wurden.

Von den 10 Nachkommen (Mausnummer 2-12) aus dem B6D2F1 x C57BL/6J Ansatz zeigte die Maus 8 (im Folgenden B6 *c-myc/OVA* 75 genannt) sowohl für *c-myc* als auch für *OVA* einen positiven Nachweis (Abb.3.13 B). Die 5 Nachkommen aus dem C57BL/6J x C57BL/6J Ansatz wurden ebenfalls mit Hilfe der PCR auf die Integration von *c-myc* und *OVA* untersucht. Maus 16 (im Folgenden B6 *c-myc/OVA* 100 genannt) wies die Integration beider Gene im Genom auf (Abb.3.13 C).

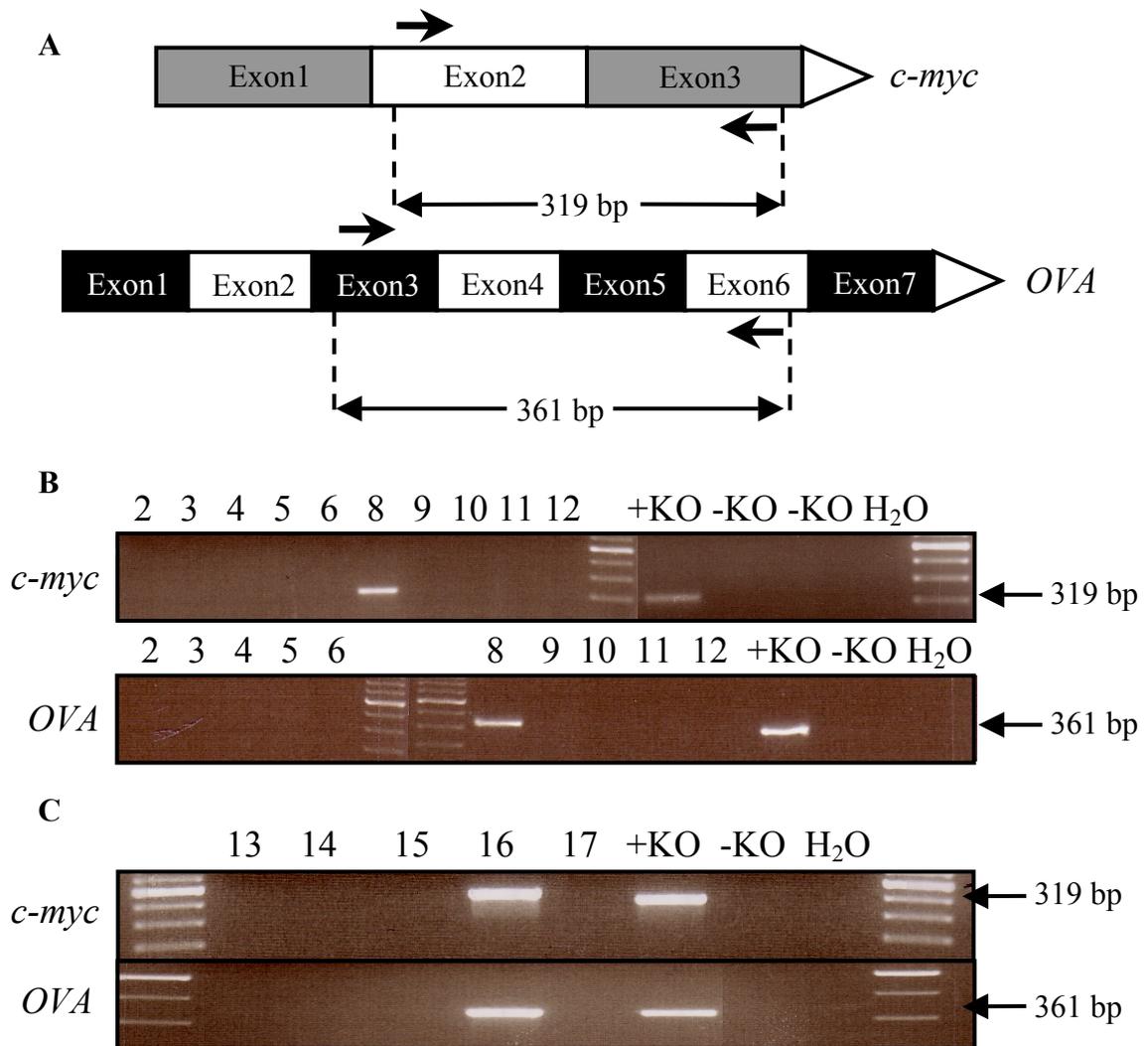


Abb.3.13 PCR-Analyse der geborenen Nachkommen aus der Pronukleusinjektion und anschließender Transfer der manipulierten Eizellen. (A) Schematische Übersicht über die Primerbindestellen für *c-myc* und *OVA*. (B) PCR-Analyse für *c-myc* bzw. *OVA* der Nachkommen aus der Pronukleusinjektion der Eizellenspendermäuse B6D2F1 x C57BL/6J. (C) PCR-Analyse für *c-myc* bzw. *OVA* der Nachkommen aus der Pronukleusinjektion der Eizellenspendermäuse C57BL/6J x C57BL/6J.

H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle; -KO = Negativkontrolle; +KO = Positivkontrolle

Zur Überprüfung der Funktionalität beider Founder Mäuse B6 *c-myc*/*OVA* 75 und B6 *c-myc*/*OVA* 100 wurde aus einem Ohrstück primäre Fibroblasten generiert und diese transient mit einem reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator exprimierenden Plasmid (pUHRt 62-1; mit freundlicher Genehmigung von Kai Schönig, Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim; Tet-On System) transfiziert. Das Ergebnis der Genexpression in den primären Mausohrfibroblasten läßt schnellere Rückschlüsse auf die Funktionalität der Founder Mäuse zu, als die nach Verpaarung mit den Reportermäusen (Schönig et al. 2003; Hasan et al 2004).

In Anwesenheit von Doxyzyklin kann der reverse Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator die Genexpression der nachfolgenden Gene induzieren, während in Abwesenheit von Doxyzyklin keine Induktion stattfindet.

Die mit dem reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator transient transfizierten primären Mausohrfibroblasten wurden nach zwei Tagen hinsichtlich ihrer OVA Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen überprüft. Abb.3.14 zeigt die transfizierten Mausohrfibroblasten der B6 c-myc/OVA 100 Founder, die in Anwesenheit von Doxyzyklin eine hauptsächlich zytoplasmatisch verteilte OVA Expression aufweisen, während in Abwesenheit von Doxyzyklin keine OVA Expression detektierbar war.

Dieses Ergebnis zeigte, daß die generierte B6 c-myc/OVA 100 transgene Mauslinie mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit beide Gene exprimierte.

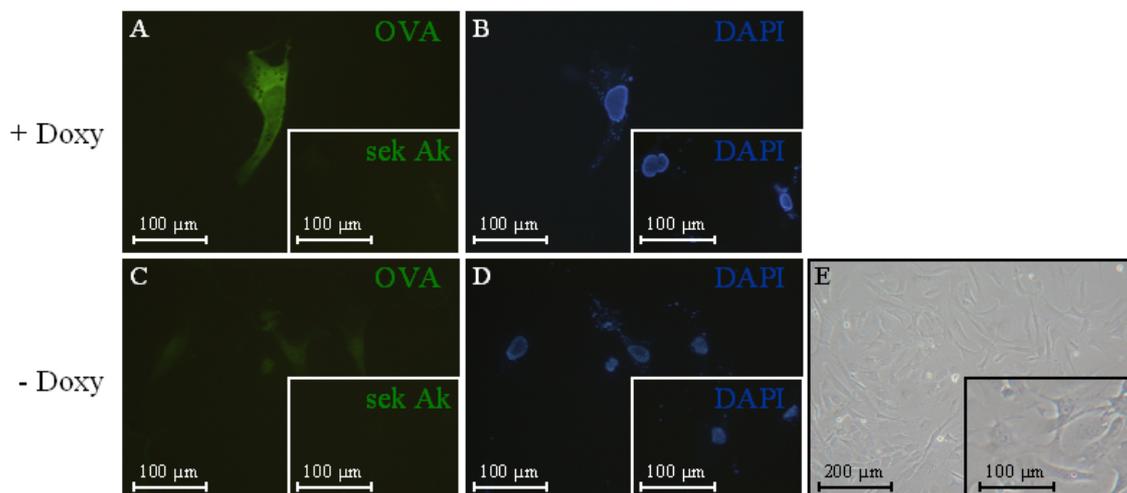


Abb.3.14 **Immunfluoreszenzfärbungen transient transfizierter Mausohrfibroblasten.** (A-D) Mausohrfibroblasten wurden aus Ohrstücken der B6 c-myc/OVA 100 Founder generiert und transient mit dem reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (pUHrt 62-1) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde in Anwesenheit von Doxyzyklin (A, B) und in Abwesenheit von Doxyzyklin (C, D) die OVA Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt (anti-OVA Ak 1:800; Alexa 488 anti-Hase 1:200). (E) Phasenkontrastaufnahme nicht transfizierter Mausohrfibroblasten.

Doxy = Doxyzyklin

## 3.2 Phänotypbeschreibung c-myc/OVA transgener Mäuse

### 3.2.1 Tumorinduktionsexperimente

Zur Induktion der Tumorgenese wurden die generierten B6 c-myc/OVA 100 und B6 c-myc/OVA 75 transgenen Mauslinien mit den leberspezifischen LAP tTA transgenen Mäusen verpaart und die Nachkommen entweder neonatal oder embryonal induziert (Tet-off System). Bei der neonatalen Induktion wurde während der Verpaarung zur Unterdrückung der Genexpression den Mäusen Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht und bei Geburt der Nachkommen das Doxyzyklin-behandelte Trinkwasser gegen gewöhnliches Trinkwasser ausgetauscht. Bei der embryonalen Induktion hingegen wurde den Mäusen bei der Verpaarung Trinkwasser ohne weitere Zusätze verabreicht, so daß die Genexpression schon während der Embryogenese induziert wurde.

Im Folgenden wurden Mäuse des Genotyps tTA+ myc/OVA+ als c-myc/OVA 75 bzw. 100 tg+ bezeichnet, je nachdem mit welcher der beiden Reportermauslinien (B6 c-myc/OVA 75 oder B6 c-myc/OVA 100) die LAP tTA Mäuse verpaart wurden. Einzeltransgene Wurfkontrollen wurden als c-myc/OVA 75 bzw. 100 tg- bezeichnet. Transgen positive Mäuse aus Verpaarungen von LAP tTA x c-myc Mäusen wurden als c-myc tg+ und die Wurfkontrollen als c-myc tg- bezeichnet.

Nach Verpaarung mit den LAP tTA transgenen Mäusen und neonataler Induktion von c-myc und OVA entwickelten die beiden generierten Mauslinien Lebertumore und verstarben zwischen 5-8 Wochen (c-myc/OVA 75 tg+) bzw. 8-20 Wochen (c-myc/OVA 100 tg+) nach Geburt (Abb.3.15 A).

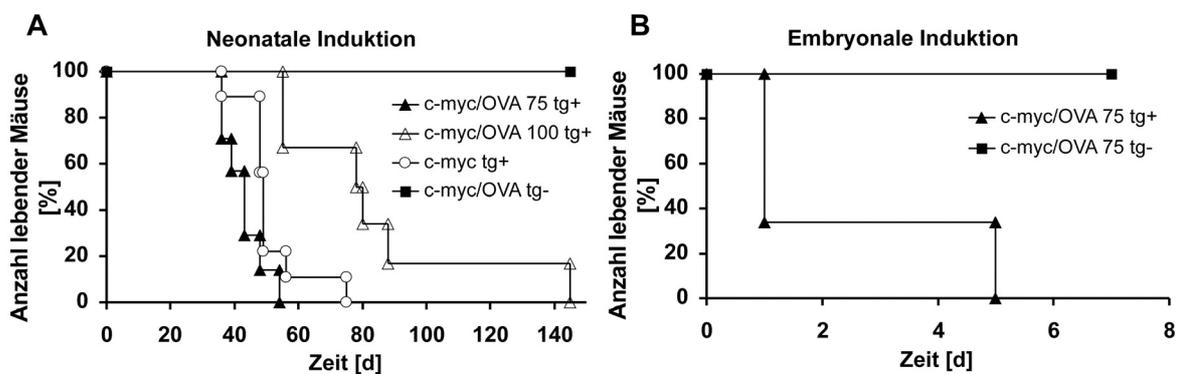


Abb.3.15 **Kaplan-Meier Kurven.** (A) Kaplan-Meier Kurve neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 100 tg+, c-myc tg+ und c-myc/OVA tg- Mäuse. (B) Kaplan-Meier Kurve embryonal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäuse.

Eine mögliche Erklärung für die spätere Tumorgenese der c-myc/OVA 100 tg+ Mäuse könnte entweder mit einer unterschiedlichen, bei der Pronukleusinjektion nicht kontrollierbaren Kopienzahl von c-myc/OVA DNA oder aber mit dem Integrationsort der inserierten DNA im Genom zusammenhängen. Die publizierten c-myc tg+ Mäuse (Felsher und Bishop 1999; Beer et al. 2004) hingegen zeigten bei neonataler Induktion eine ähnliche Überlebenskurve (5-10 Wochen) als die c-myc/OVA 75 tg+ Tiere (Abb.3.15 A). Die transgen negativen Wurfkontrollen hingegen haben die komplette Versuchslaufzeit überlebt.

Bei der embryonalen Induktion von c-myc und OVA hingegen starben die c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse zwischen 1 und 5 Tagen nach der Geburt, während die transgen negativen Wurfkontrollen die komplette Versuchszeit überlebten (Abb.3.15 B). Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen der embryonal induzierten c-myc transgenen Mäusen, die innerhalb von 10 Tagen nach der Geburt verstarben (Beer et. al 2004).

### 3.2.2 Histologie

Die makroskopischen sowie mikroskopischen Befunde neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 100 tg+ Mäuse (Abb.3.16 A-B, E-F) zeigten multifollikuläre Tumorknoten, mit invasiv wachsenden Tumorzellen, die in einem glandulären, soliden Muster das normale, angrenzende Lebergewebe infiltrierten. Ähnlich wie die publizierten c-myc tg+ Tiere (Abb.3.16 I, J) ähnelt der neonatale Leberphänotyp dem hepatozellulären Karzinom (HCC), verglichen mit den tumorfreien Lebern der transgen negativen Wurfkontrollen (Abb.3.16 M, N).

Eine Gordon Färbung, die die Faserstruktur der Leber hervorhebt, gab zusätzliche Informationen. In den neonatal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ (Abb.3.16 D) und c-myc/OVA 100 tg+ (Abb.3.16 H) Mäusen war innerhalb der Tumorknoten, die gewöhnliche Leberstruktur aufgehoben. Ähnliche Befunde lieferte auch die publizierte c-myc tg+ Maus (Abb.3.16 I).

Es wurde publiziert, daß die c-myc induzierte Tumorentstehung in den c-myc tg+ Tieren mit einem erhöhten Anteil an neonatalen Hepatozyten mit einem 2N-4N DNA Gehalt und somit mit einem Anstieg an Zellen in der S Phase des Zellzyklus in Zusammenhang steht. Nachgewiesen wurde die verstärkte Zellproliferation durch eine Ki67 Färbung (Beer et. al 2004, Abb.3.16 P). Die neu generierten c-myc/OVA75 tg+ (Abb.3.16 C) und c-myc/OVA 100

tg+ (Abb.3.16 G) Mäuse wiesen ebenfalls eine verstärkte Proliferation im Tumorgewebe auf, welches durch eine Ki67 immunhistochemische Färbung bestätigt wurde.

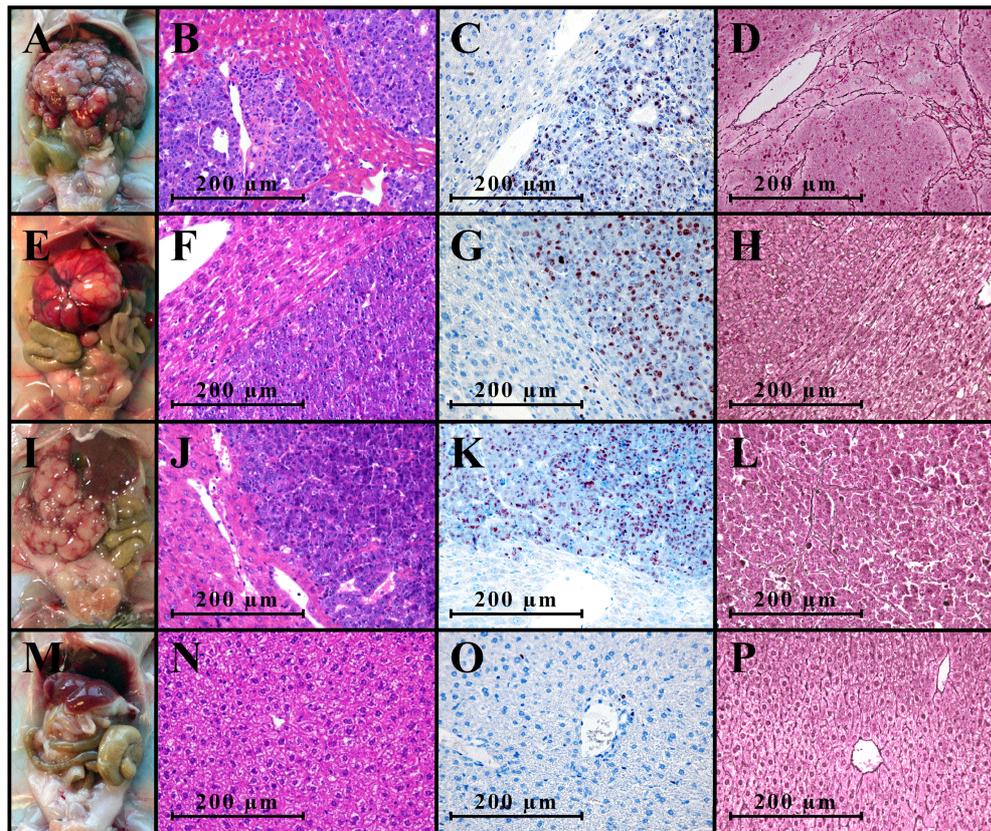


Abb.3.16 **Leber-Phänotyp neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 100 tg+ und c-myc tg+ Mäuse.** (A, E, I, M) Makroskopische Aufnahmen der Lebern, (B, F, J, N) HE Färbungen, (C, G, K, O) Ki67 Färbungen (anti-Ki67 Ak 1:25; AEC) und (D, H, L, P) Gordon Färbungen der Lebern von neonatal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ (A-D), c-myc/OVA 100 tg+ (E-H), c-myc tg+ (I-L) und c-myc/OVA 75 tg- (M-P) Mäusen.

Die mikroskopischen Befunde embryonal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse zeigten verglichen mit den neonatal induzierten transgen positiven Tieren ebenfalls eine neoplastische Veränderung der Leber (Abb.3.17. A), während die Lebern in den Kontrolltieren tumorfrei waren (Abb.3.17 D).

Die Disorganisation der Leberstruktur in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (Abb.3.17 C) konnte, wie in den neonatal induzierten Tieren, durch eine Gordon Färbung hervorgehoben werden. Auch zeichnete sich die c-myc/OVA 75 tg+ Tumormaus (Abb.3.17 B) durch eine verstärkte Proliferation in dem neoplastisch verändertem Lebergewebe aus, welche in den transgen negativen Wurfkontrollen (Abb.3.17 E) nicht zu finden war.

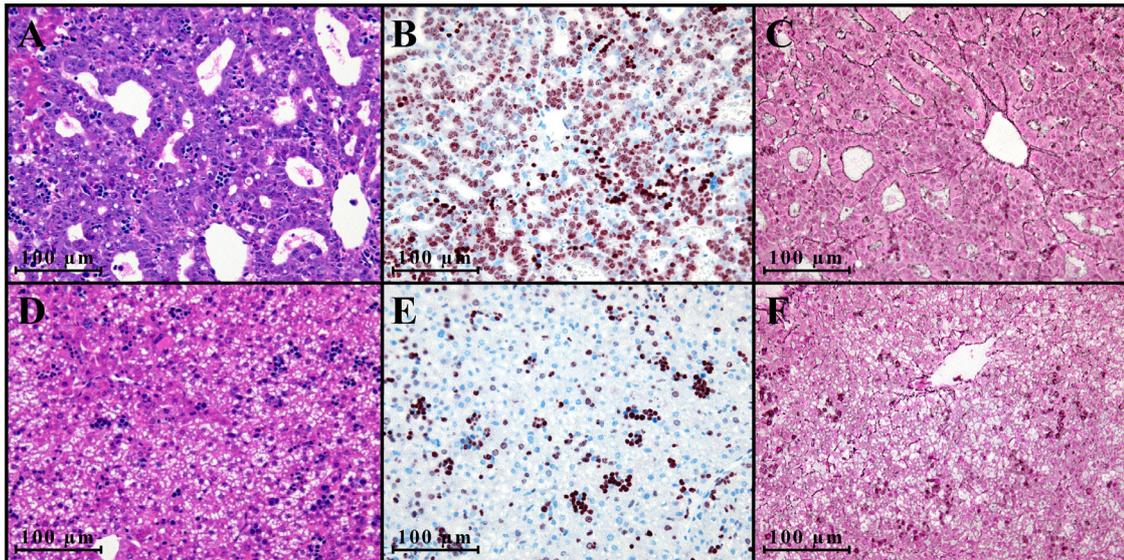


Abb.3.17 Leber-Phänotyp embryonal induzierter *c-myc/OVA 75 tg+* Mäuse. (A, D) HE Färbungen, (B, E) Ki67 Färbungen (anti-Ki67 Ak 1:25; AEC) und (C, F) Gordon Färbungen embryonal induzierter *c-myc/OVA 75 tg+* (A-C) und *c-myc/OVA 75 tg-* (D-F) Mäuse.

### 3.2.3 Expressionsnachweis von *c-myc* und OVA in *c-myc/OVA tg+* Mäusen

Aufgrund der schnelleren Tumorgenese wurden die weiteren immunologischen Versuche und ein Teil der Expressionsnachweise lediglich in der *c-myc/OVA 75* transgenen Mauslinie durchgeführt. Der *c-myc* und OVA Expressionsnachweis erfolgte unter anderem mit Hilfe von RT PCR Analysen (Abb.3.18).

Dazu wurde die Leber in den *c-myc/OVA 75 tg+* Tieren unterschieden in Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N). Da es für die weiteren immunologischen Versuche notwendig war eine mögliche Genexpression von OVA in den primär und sekundär lymphatischen Organen auszuschließen, wurden die Milz, die inguinalen Lymphknoten (ILK), die leberdrainierenden Lymphknoten (LLK) und der Thymus analysiert. Somit konnte eine Antigenpräsentation durch APCs aufgrund einer vorhandenen OVA Expression in den lymphatischen Organen, ebenso wie eine zentrale Toleranz im Thymus ausgeschlossen werden.

Es wurde publiziert, daß die LAP tTA transgene Mauslinie eine hauptsächlich leberspezifische Expression des Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivators aufweist, allerdings auch niedrige Expressionslevel in Niere und Lunge zu finden sind (Kistner et al. 1996). Aus diesem Grund wurde in den *c-myc/OVA 75 tg+* Tieren nach neonataler Induktion auch die *c-myc* und OVA Expression in diesen beiden Organen untersucht.

Abb.3.18 A zeigt, daß in der Leber der c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse sowohl im Tumorknoten, als auch im angrenzenden Normalgewebe c-myc und OVA auf RNA Ebene nachweisbar war, ebenso wie in der Niere und Lunge. Die primär und sekundär lymphatischen Organe hingegen zeigten keine Expression. Die transgen negative Wurfkontrolle exprimierte in allen analysierten Organen weder c-myc, noch OVA (Abb.3.18 B).

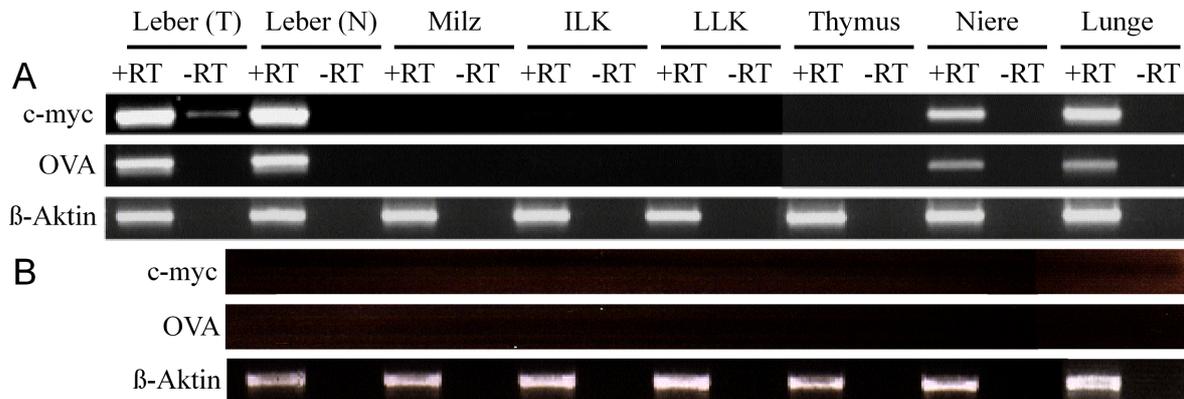


Abb.3.18 **RT PCR Analyse neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.** (A) C-myc, OVA und  $\beta$ -Aktin RT PCR Analyse von c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (Dawid Eckert, Institut für Pathologie, Bonn). (B) C-myc, OVA und  $\beta$ -Aktin RT PCR Analyse von c-myc/OVA 75 tg- Mäusen (Zhanli Luo, Institut für Pathologie, Bonn).

ILK = inguinaler Lymphknoten; LLK = leberdrainierender Lymphknoten; N = Normalgewebe; +RT = RT PCR Analyse; -RT = RT PCR Analyse ohne Zusatz von AMV-Reverser Transkriptase; T = Tumorgewebe

Da eine Expressionsbestimmung auf RNA Ebene nicht unbedingt mit einem Proteinnachweis gleichzusetzen ist, wurde von neonatal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen noch im Lebergewebe die OVA Proteinmenge mit Hilfe der Western Blot Analyse bestimmt (Abb.3.19). Beide analysierten c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse wiesen eine starke OVA Expression auf, während in beiden c-myc/OVA tg- Kontrollen keine OVA Expression detektierbar war.

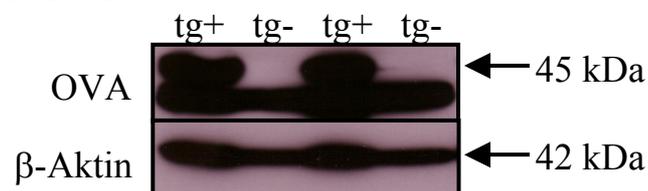
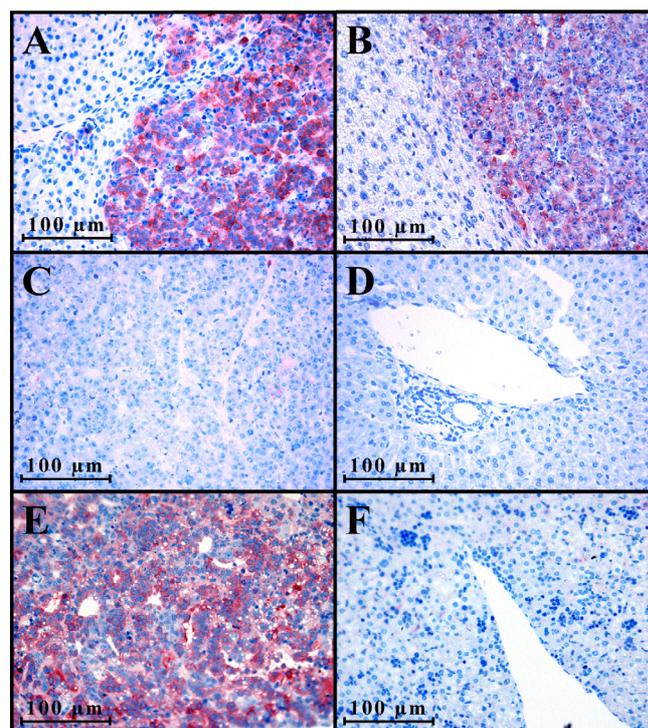


Abb.3.19 **Western Blot Analyse neonatal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.** Es wurden Leberproben von c-myc/OVA 75 tg+ (tg+) und c-myc/OVA 75 tg- (tg-) Mäusen hinsichtlich der OVA Expression (anti-OVA Ak: 1:10.000; anti-Hase/HRP 1:1.000) und beta-Aktin Expression (anti-beta-Aktin Ak 1:5.000; anti-Maus/HRP 1:1.000) untersucht.

Um die Verteilung der OVA Expression in der Leber zu untersuchen, wurden von neonatal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ (Abb.3.20 A) und c-myc/OVA 100 tg+ (Abb.3.20 B) Mäusen immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Im Unterschied zum angrenzenden Normalgewebe, wiesen die Tumorknoten in beiden transgenen Mauslinien starke OVA Expression auf. Um eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers auszuschließen, wurde neben den immunhistochemischen Analysen in c-myc/OVA 75 tg- (Abb.3.20 D) Mäusen, noch das Lebertumorgewebe von c-myc tg+ Mäusen hinsichtlich der OVA Expression untersucht (Abb.3.20 C). In beiden analysierten Geweben konnte keine OVA Expression nachgewiesen bzw. eine unspezifische Bindung des Antikörpers ausgeschlossen werden. Die, im Unterschied zur neonatalen Induktion, komplett neoplastisch veränderte Leber embryonal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ (Abb.3.20 E) Mäuse war ebenfalls durch eine starke OVA Expression gekennzeichnet, verglichen mit dem normalen Lebergewebe einer c-myc/OVA 75 tg- (Abb.3.20 F) Maus.



**Abb.3.20 Immunhistochemischer Ovalbumin Nachweis in der Leber von neonatal und embryonal induzierten c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.** (A-D) Neonatal induzierte c-myc/OVA 75 tg+ Maus (A), c-myc/OVA 100 tg+ Maus (B), c-myc tg+ Maus (C) und c-myc/OVA 75 tg- Maus (D). (E, F) Embryonal induzierte c-myc/OVA 75 tg+ Maus (E) und c-myc/OVA tg- Maus (F), analysiert am Tag 5 nach Geburt (anti-OVA Ak 1:1.000; AEC).

Setzt man die OVA Expression der c-myc Expression gleich, so deckten sich die Ergebnisse mit den publizierten Daten in den neonatal induzierten c-myc tg+ Mäusen, bei denen ebenfalls eine erhöhte c-myc Expression in den stark proliferierenden Tumorzellen nachweisbar war

(Beer et al. 2004). Auch in anderen beschriebenen Tumormodellen ist oftmals die Expression des Transgens im Tumor höher als im normalen, gesunden Gewebe (Weiss et al. 2003). Zusammenfassend lassen die makroskopischen und mikroskopischen Beobachtungen, sowie OVA Expressionsnachweise den Schluß zu, daß die zusätzlich zur myc Expression vorhandene OVA Expression in den c-myc/OVA transgenen Mäusen bzw. eine endogene Immunantwort gegen OVA vermutlich keine starke Beeinträchtigung des Tumorwachstums zur Folge hat.

### 3.3 Immunologische Analyse c-myc/OVA 75 transgener Mäuse

#### 3.3.1 Endogene CD3+ CD8+ T-Zellverteilung

Die folgenden immunologischen Versuche wurden aufgrund der schnelleren Tumorgenese in neonatal induzierten c-myc/OVA 75 transgen Mäusen durchgeführt. Die nicht verzögerte Tumorentstehung in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, verglichen mit den c-myc tg+ Tieren, spricht nicht für eine starke endogene Immunantwort gegen OVA. Dennoch wurde das Verhältnis von zytotoxischen T-Zellen (CD3+ CD8+) in der Leber und den sekundär lymphatischen Organen bestimmt. Diese spielen nicht nur bei der Abwehr von virusbefallenen Zellen, sondern auch bei der Eliminierung von Tumorzellen eine bedeutende Rolle.

Es wurde in den c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen die relative Anzahl an CD3+ CD8+ T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Vergleicht man die ermittelten Werte in den untersuchten Organen (Leber, Milz, ILK und LLK) fällt auf, daß zwischen den beiden Gruppen keine großen Unterschiede nachweisbar sind (Abb.3.21 A).

Bei den absoluten Anzahlen CD3+ CD8+ T-Zellen hingegen, konnten etwas mehr Zellen in der Leber, der Milz und in dem LLK der c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse im Vergleich zu den c-myc/OVA 75 tg- Mäusen nachgewiesen werden, die allerdings nicht statistisch signifikant waren. In dem ILK hingegen konnten verglichen mit der c-myc/OVA 75 tg- Kontrollgruppe etwas weniger CD3+ CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb.3.21 B).

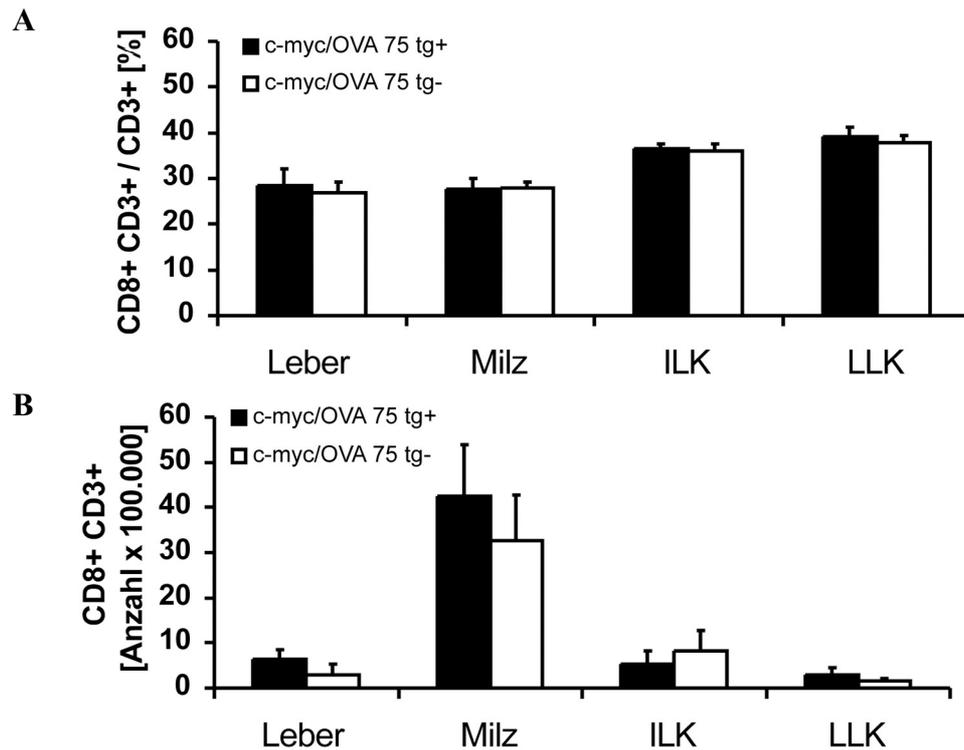


Abb.3.21 **Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.** Relative (A) und absolute (B) Anzahl CD3+ CD8+ T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ (n = 5 Mäuse pro Gruppe), verglichen mit c-myc/OVA 75 tg- (n = 6 Mäuse pro Gruppe) Mäusen in der Leber, der Milz, dem ILK und LLK.

Da es in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen anscheinend nicht zu einer starken Anhäufung von endogenen zytotoxischen T-Zellen kam und auch deren Funktionalität nicht bestimmbar war, wurden für die folgenden Versuche OVA spezifische naive CD8+ T-Zellen aus OT I Mäusen (OT I T-Zellen) isoliert und in die c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse sowie in die Kontrolltiere injiziert. Es stellte sich die Frage, ob zum einen OVA in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen von professionellen APCs präsentiert wird und ob naive OT I T-Zellen nach Injektion in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen OVA erkennen und aktiviert werden.

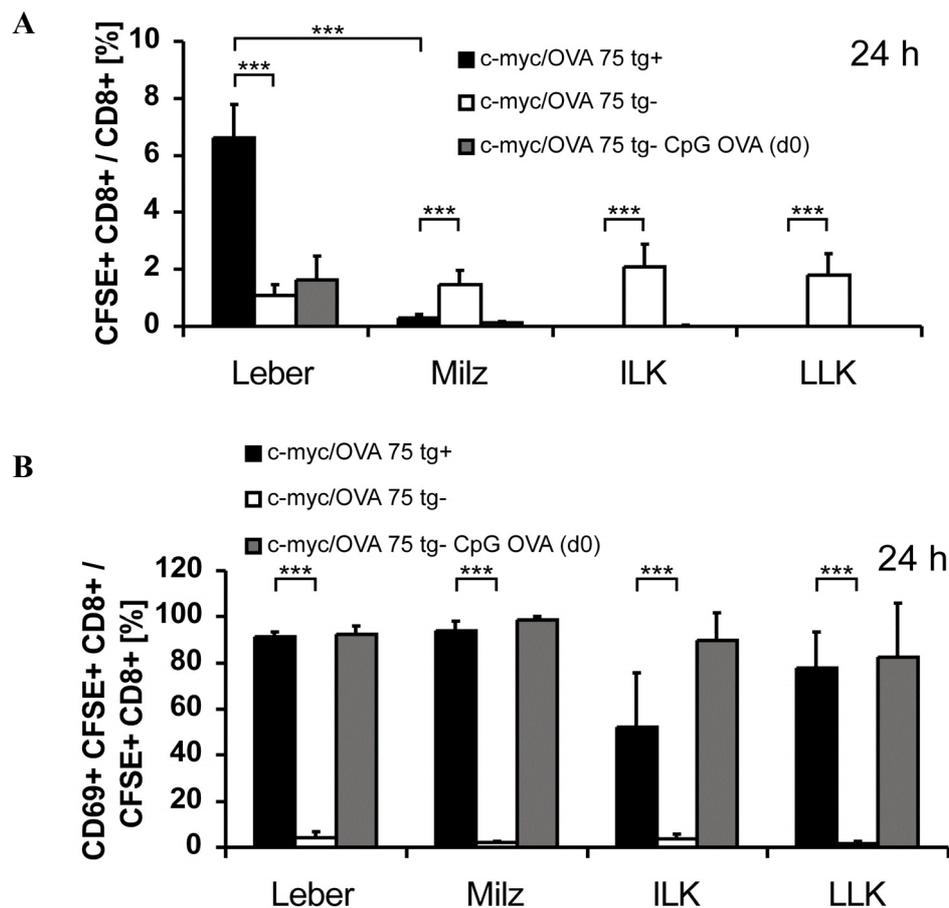
### 3.3.2 Akkumulation naiver OT I T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und Infiltration in den Tumorknoten

Zum Nachweis ob naive OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen aktiviert werden, wurden diese zur Unterscheidung von endogenen CD8+ T-Zellen vor dem adoptiven Transfer mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff CFSE markiert. Die Zellen wurden in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse sowie in c-myc/OVA tg- Wurfkontrollen injiziert. Als Positivkontrolle wurden den

c-myc/OVA 75 tg- Mäusen zusätzlich zu den OT I T-Zellen zur Stimulierung CpG ODN zusammen mit OVA intravenös verabreicht (c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA).

Injizierte, naive OT I T-Zellen akkumulierten 24 h nach adoptivem Transfer in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse (6,6% +/- 1,2% CFSE+ CD8+ / CD8+), verglichen mit c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltieren (1,1% +/- 0,1% CFSE+ CD8+ / CD8+; \*\*\*p ≤ 0,001). Innerhalb der c-myc/OVA 75 tg+ Tiere zeichnete sich ebenfalls ein starker signifikanter Unterschied in der Anzahl der injizierten OT I T-Zellen zwischen der Leber und der Milz ab (\*\*\*p ≤ 0,001). Vergleicht man die Anzahl an injizierten OT I T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen (Milz, ILK und LLK), so fanden sich signifikant höhere Mengen in den c-myc/OVA 75 tg- Tieren im Gegensatz zu den c-myc/OVA tg+ Mäusen (\*\*\*p ≤ 0,001). Diese Ergebnisse deuten zusammenfassend auf eine frühe Antigenerkennung in der Leber hin. Eine Vakzinierung der c-myc/OVA 75 tg- Mäuse mit CpG ODN und OVA führte ebenfalls zu einer Akkumulation der OVA spezifischen T-Zellen in der Leber. Vergleicht man die relativen Anzahlen der injizierten OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ mit den CpG ODN und OVA vakzinierten Mäusen, so liegen diese in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Tiere deutlich höher (Abb.3.22 A). Dies könnte mit einer schnelleren Proliferation der OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen oder mit einer stärkeren Attraktion dieser Zellen für das Lebertumorgewebe zusammenhängen.

Um nachzuweisen, ob die injizierten naiven OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen ihr Antigen erkennen, wurde 24 h nach adoptivem Transfer die OVA spezifischen T-Zellen hinsichtlich der CD69 Expression untersucht. CD69 zählt zu den Oberflächenmarkern, die auf naiven T-Zellen nicht exprimiert werden und erst nach *in vitro* oder *in vivo* Stimulierung von Lymphozyten sehr früh hochreguliert werden. In allen vier untersuchten Organen (Leber, Milz, ILK und LLK) wiesen 52-94% der injizierten OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren eine Hochregulation von CD69 auf, verglichen mit applizierten OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltieren (\*\*\*p ≤ 0,001). Das bedeutet, daß in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen OVA in prozessierter Form den OVA spezifischen T-Zellen präsentiert wurde, was zu deren Stimulierung führte.



**Abb.3.22 Akkumulation und Stimulierung naiver OT I T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse nach 24 h.** (A) Akkumulation naiver, CFSE markierter OT I T-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) in der Leber in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, verglichen mit c-myc/OVA 75 tg- und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen 24 h nach adoptivem Transfer. (B) Stimulierung (CD69 Hochregulation) naiver, CFSE markierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen, im Gegensatz zu c-myc/OVA 75 tg- Tieren 24 h nach T-Zellinjektion (n = 4-6 Mäuse pro Gruppe). Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test sowie dem postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Obwohl die Anzahl der OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Tieren im Gegensatz zu den c-myc/OVA tg+ Tieren geringer war (Abb.3.22 A), wurden diese jedoch ebenfalls stimuliert. Dies konnte durch eine Hochregulation des Stimulierungsmarker CD69 in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Wenngleich die injizierten OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren nach 24 h hauptsächlich in der Leber akkumulierten, zeigten doch auch die wenigen vorgefundenen T-Zellen in der Milz und, etwas reduzierter in der Anzahl, in den Lymphknoten eine Stimulierung in Form der CD69 Hochregulation (Abb.3.22 B). Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte die Antigenerkennung in der Leber sehr rasch erfolgen und sich die T-Zellen

nach 24 h bereits auf die sekundär lymphatischen Organe verteilt haben, zum anderen könnte eine eventuell etwas verzögerte systemische Antigenerkennung durch Freisetzung von OVA in diesen Kompartimenten direkt erfolgen.

In dem folgenden Versuch sollte die Lokalisation injizierter OVA spezifischer T-Zellen mit der Verteilung dieser Zellen in den Kontrolltieren verglichen werden, einerseits aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse, welche zeigten, daß die OVA Expression auf den Lebertumorbereich induzierter c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse beschränkt war (Abb.3.20). Andererseits weil das Mikromilieu eines Tumors oftmals eine Barriere für die Infiltration spezifischer T-Zellen darstellt und somit der Kontakt von T-Zelle mit Tumorgewebe erschwert sein sollte (Singh et al. 1992; Ganss et al. 1998; Ochsenbein et al. 2001; Garbi et al. 2004). Um die Lokalisation der injizierten OT I T-Zellen zu bestimmen, wurden diese zuvor mit CFSE markiert und in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> (Abb.3.23 A-H) und c-myc/OVA tg<sup>-</sup> Mäuse (Abb.3.23 I-P) injiziert. 24 h nach adoptivem Transfer wurde die Leber, die Milz, der ILK und LLK mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der Verteilung injizierter OVA spezifischer T-Zellen analysiert und mit c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen, die nicht injiziert wurden, verglichen (Abb.3.23 Q-X).

Vergleicht man nun die Lokalisation der transferierten OVA spezifischen T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Tieren, so ließen sich im gesunden Lebergewebe (Daten nicht gezeigt) aber auch im Tumorknoten OT I T-Zellen nachweisen (Abb.3.23 A, Pfeilspitzen). Die Größe der injizierten OT I T-Zellen sowie die Intensität des grünfluoreszierenden Farbstoffes lieferten einen ersten Hinweis auf eine T-Zellstimulierung und eventuell durchschrittene Zellteilungen. Aktivierte Lymphozyten nehmen in ihrer Größe zu, während proliferierende Zellen bei jeder durchschrittenen Zellteilung die Hälfte des grünfluoreszierenden Farbstoffes an die Tochterzellen weitergeben und somit an Intensität verlieren. Erste Hinweise auf eine eventuell beginnende T-Zellproliferation durch Reduktion der CFSE Intensität und Größenzunahme der Lymphozyten konnte bei den transferierten OT I T-Zellen in der Leber und Milz der c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse (Abb.3.23 A, B), verglichen mit den OT I T-Zellen in den Kontrollmäusen (Abb.3.23 I, L), beobachtet werden.

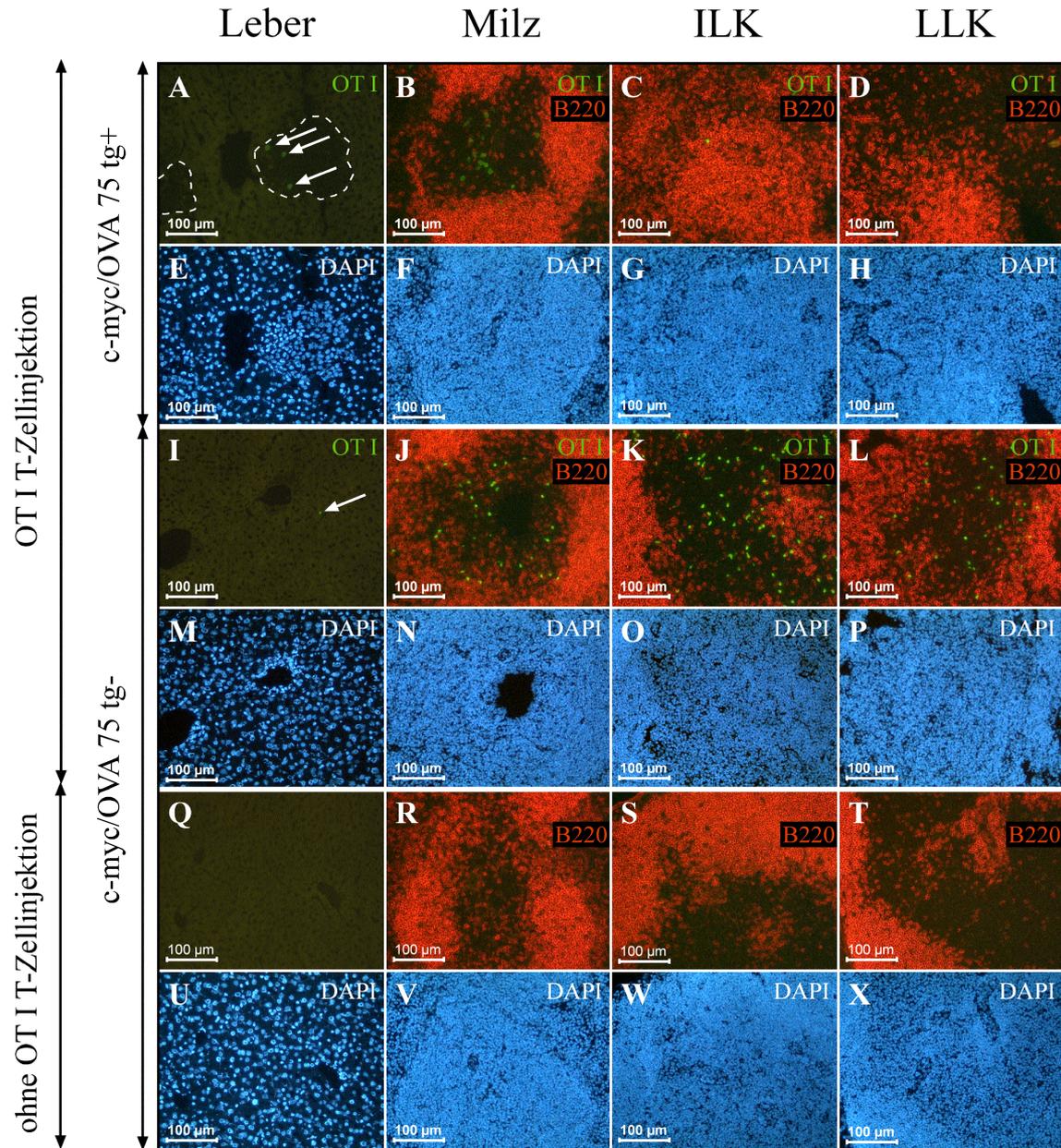


Abb.3.23 **Infiltration naiver OT I T-Zellen in den Lebertumorknoten c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse (nach 24 h).** Immunfluoreszenzfärbungen der Leber, der Milz, des ILKs und LLKs nach Injektion von  $3 \times 10^6$  naiven, CFSE markierten (grün) OT I T-Zellen in neonatal induzierte c-myc/OVA 75 tg+ (A-H) und c-myc/OVA 75 tg- Mäuse (I-P). Neonatal induzierte c-myc/OVA 75 tg- Maus ohne OT I T-Zellinjektion (Q-X). Die B-Zellen in den Milzen, den ILKs und LLKs wurden mit dem B-Zellmarker B220 (rot, anti-B220PE 1:500) gegengefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau).

Um die Lokalisation der injizierten T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen genauer zu bestimmen, wurde die B-Zellzone mit dem B-Zellmarker B220 angefärbt (rot). Es fanden sich weniger OVA spezifische OT I T-Zellen in der Milz, dem ILK und LLK in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (Abb.3.23 B-D), verglichen mit den transferierten T-Zellen in

den Kontrolltieren (Abb.3.23 J-L). Die OVA spezifischen T-Zellen waren in beiden Mäusen hauptsächlich in der T-Zellzone der sekundär lymphatischen Organe verteilt. In allen untersuchten Kompartimenten der c-myc/OVA tg- Tiere, denen keine OT I T-Zellen injiziert wurden, waren auch keine grünfluoreszierenden Zellen nachweisbar (Abb.3.23 Q-T).

### **3.3.3 Akkumulation tumorassoziierter Dendritischer Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und Präsentation von OVA *in vitro***

Naive injizierte OT I T-Zellen akkumulierten nach 24 h in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und regulierten CD69 hoch, ein Kennzeichen für eine Antigenstimulierung durch prozessiertes OVA Peptid. Eine geringere Anzahl an OVA spezifischen T-Zellen, die ebenfalls CD69 hochreguliert haben, konnte auch in den sekundär lymphatischen Organen nachgewiesen werden. Zur Klärung, ob und gegebenenfalls welche APCs in der Leber bzw. der Milz an der Aktivierung der OVA spezifischen T-Zellen beteiligt sind, wurde in den folgenden Versuchen der Fokus auf Dendritische Zellen (DCs) gelegt.

Neben den kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) exprimieren DCs unter anderem CD11c auf ihrer Oberfläche. Zunächst wurden die Lebern von induzierten c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen und c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltieren hinsichtlich der Verteilung der DCs (CD11c rot) zusammen mit T-Zellen (CD3 grün) mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht (Abb.3.24 A-D).

In dem c-myc/OVA 75 tg+ Lebertumorgewebe waren zum einen eine erhöhte Anzahl an CD3+ T-Zellen, zum anderen eine Vermehrung CD11+ DCs nachweisbar (Abb.3.24 A), verglichen mit dem gesunden Lebergewebe c-myc/OVA 75 tg- Kontrollmäuse (Abb.3.24 B, Pfeilspitzen).

Um die Anzahl der CD11c+ DCs zu quantifizieren, wurde aus dem Lebertumorgewebe c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse bzw. Lebernormalgewebe c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltiere der Mittelwert der absoluten Anzahl pro Maus bestimmt. Dazu wurden die CD11c+ DCs nach Leberperfusion über einen Dichtegradienten angereichert, CD11c+ MACS-gereinigt und die Anzahl per Durchflußzytometrie ermittelt. Während in der Milz kein Unterschied in der absoluten Anzahl CD11c+ DCs nachweisbar war, fanden sich in der Tumorleber signifikant größere Mengen an CD11c+ DCs, verglichen mit der Anzahl in dem gesunden Lebergewebe c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltiere (\* $p \leq 0,05$ ; Abb.3.24 E).

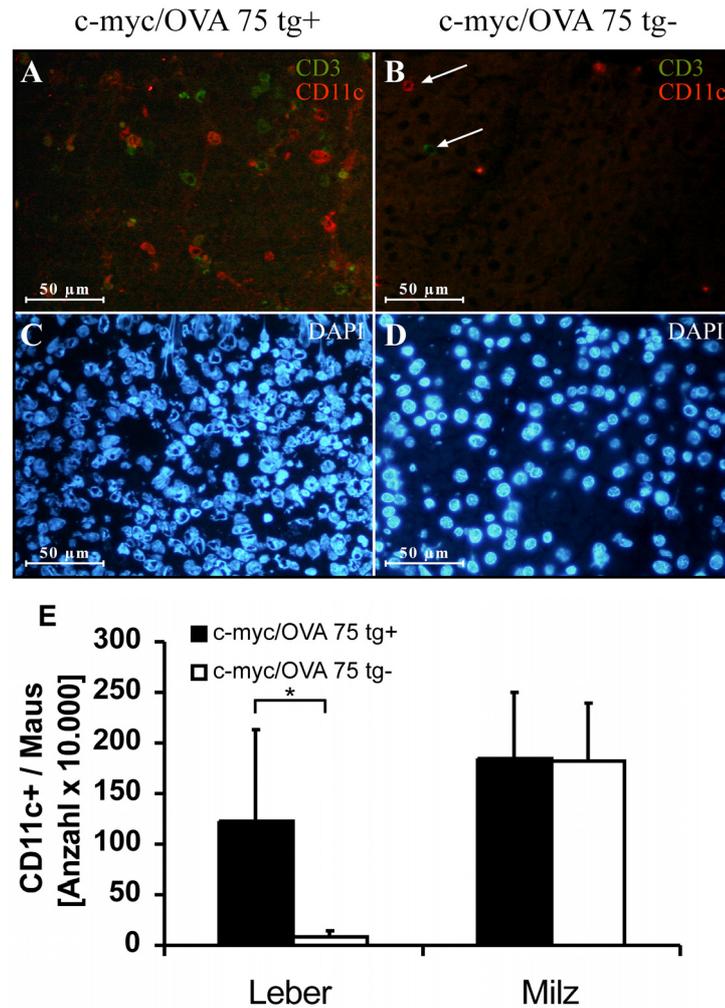


Abb.3.24 **Akkumulation tumorassoziierter Dendritischer Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse.** (A-D) Immunfluoreszenzfärbungen von CD3+ T-Zellen (grün, anti-CD3 Alexa 488 Ak 1:100) sowie CD11c+ DCs (rot, anti-CD11c bio 1:200, Streptavidin Alexa 568 1:1.000) in dem Lebertumorgewebe von c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (A, C) und dem Lebernorgewebe der c-myc/OVA 75 tg- Tiere (B, D). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). (E) Anzahl isolierter DCs nach der CD11c+ MACS Aufreinigung in c-myc/OVA 75 tg+ (n = 6 Mäuse pro Gruppe) und c-myc/OVA 75 tg- Mäuse (n = 25 Mäuse pro Gruppe) in der Leber (bzw. Tumorknoten bei c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen) und Milz (n = 6 Mäuse für beide Gruppen).

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p ≤ 0,05).

Es stellte sich die Frage, ob die in der Leber vorkommenden DCs in der Lage sind die injizierten OT I T-Zellen zu aktivieren. Dazu wurden die DCs aus dem Lebertumorgewebe c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse sowie aus den gesunden Lebern mehrerer c-myc/OVA 75 tg- Kontrolltiere über einen Dichtegradienten und MACS Aufreinigung (CD11c+) isoliert. Anschließend wurden die DCs zusammen mit einem T-Zellhybridom, welches spezifisch OVA erkennt (B3Z T-Zellhybridom) in Triplikaten kokultiviert und nach 24 h die Inter-

leukin-2 (IL-2) Produktion, als Zeichen der Aktivierung des T-Zellhybridoms mit Hilfe des *Cytometric Bead Array* bestimmt (Abb.3.25).

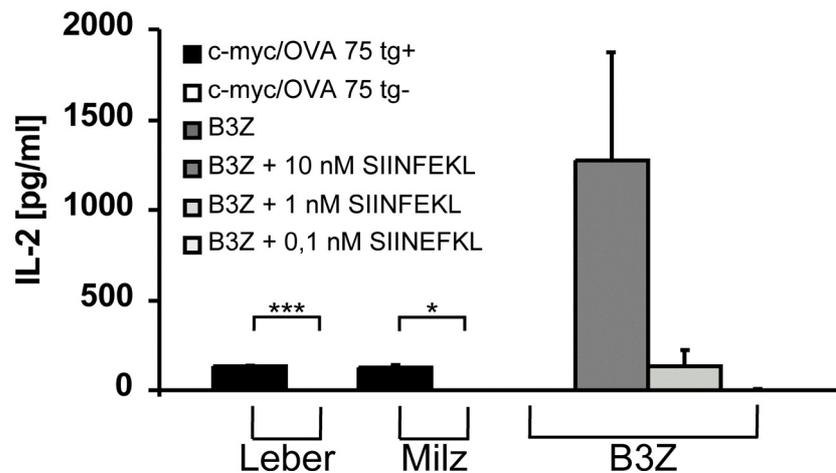


Abb.3.25 *In vitro* Aktivierung von B3Z Zellen durch leber- und milzassoziierte Dendritische Zellen aus c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen. Kokultivierung von leber- und milzassoziierten DCs ( $0,5 \times 10^5$ , Reinheit: 81-97%) mit B3Z T-Zellhybridomzellen ( $1 \times 10^5$ ) und Ermittlung der IL-2 Produktion im Überstand nach 24 h mit Hilfe des *Cytometric Bead Array*. Als Positivkontrolle wurden B3Z T-Zellen und milzassoziierte DCs aus c-myc/OVA 75 tg- Mäusen mit 10 nM, 1 nM und 0,1 nM SIINFEKL kokultiviert (n = 2-6 Mäuse pro Gruppe). Als Negativkontrolle wurden B3Z T-Zellen alleine kultiviert.

B3Z = CD8+ T-Zellhybridom

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (\*p ≤ 0,05; \*\*\*p ≤ 0,001).

DCs, isoliert aus dem Lebertumorgewebe und DCs, isoliert aus der Milz von c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, waren in der Lage B3Z T-Zellhybridomzellen *in vitro* zu aktivieren, was sich in einer sehr signifikanten, größeren Menge an produziertem IL-2 im Vergleich zu den Kontrollen widerspiegelte (Leber \*\*\*p ≤ 0,001; Milz \*p ≤ 0,05). Als Negativkontrollen wurden B3Z T-Zellhybridomzellen ohne DCs kultiviert. Als Positivkontrolle dienten B3Z T-Zellhybridomzellen, die zusammen mit milzassoziierten DCs, isoliert aus c-myc/OVA 75 tg- Mäusen, und SIINFEKL kokultiviert wurden. Das SIINFEKL Peptid stellt die Aminosäuresequenz dar, die von den OVA spezifischen CD8+ T-Zellen und somit auch von den B3Z T-Zellhybridomzellen im Kontext von MHC I erkannt wird. Das SIINFEKL Peptid muß im Unterschied zu dem OVA Protein nicht von APCs aufgenommen und prozessiert werden, sondern kann direkt an MHC Moleküle ( $K^b$ ) an der Oberfläche der DCs binden.

Während 1 nM SIINFEKL zusammen mit milzassoziierten DCs, isoliert aus c-myc/OVA 75 tg- Mäusen die B3Z T-Zellhybridomzellen *in vitro* noch aktivieren und somit zur IL-2 Produktion anregen konnten, war bei 0,1 nM SIINFEKL Kokultivierung keine IL-2 Produktion mehr detektierbar (Abb.3.25).

### 3.3.4 Ausbleibende *in vivo* zytotoxische T-Zellaktivität transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen

Transferierte OT I T-Zellen regulierten nach adoptivem Transfer in c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse CD69 hoch und akkumulierten in der Leber (Abb.3.22, Abb.3.23). Eine Hochregulation von CD69 muß nicht zwangsläufig zu einer starken fortlaufenden Aktivierung von CD8+ T-Zellen führen, sondern kann auch in einer T-Zelltoleranz enden (Limmer et al. 2000; Berg et al. 2006).

Aus diesem Grund wurde die *in vivo* Zytotoxizität OVA spezifischer T-Zellen untersucht. Dazu wurden OVA spezifische T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäuse injiziert. Als Positivkontrolle wurden c-myc/OVA 75 tg- Mäuse mit CpG ODN und OVA immunisiert. 5 Tage nach adoptivem Transfer wurde die spezifische *in vivo* Zytotoxizität in der Leber und Milz bestimmt (Abb.3.26).

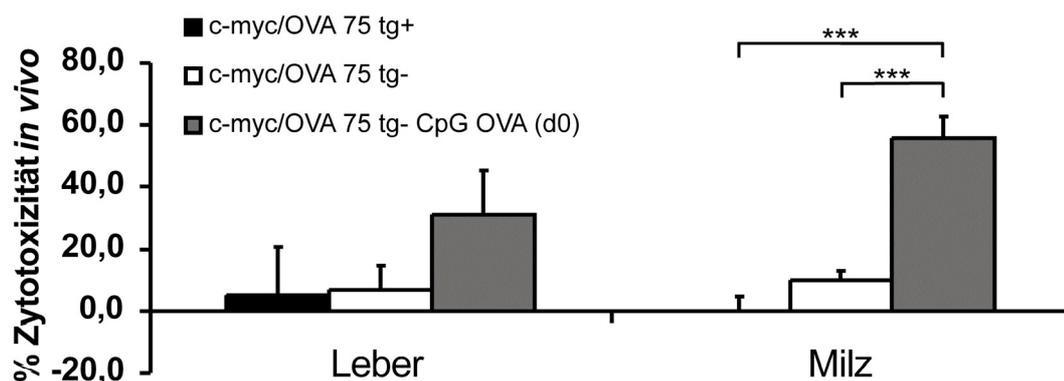


Abb.3.26 Fehlende *in vivo* Zytotoxizität transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen wurden in c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 75 tg- sowie zusammen mit CpG ODN und OVA in c-myc/OVA 75 tg- (c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA) Mäuse injiziert. Nach 5 Tagen wurde mit Hilfe von CFSE markierten SIINFEKL beladenen Zielzellen sowie unbeladenen Kontrollzellen die OVA spezifische *in vivo* Zytotoxizität (nach 4 h) in der Leber und Milz bestimmt (n = 3 Mäuse pro Gruppe).

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

In den c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen konnte weder in der Leber, noch in der Milz eine signifikante *in vivo* Zytotoxizität beobachtet werden (Leber:  $p = 1,0$ ; Milz:  $p = 0,174$ ). Während die Unterschiede in der Leber von c-myc/OVA 75 tg+ Tieren im Vergleich zu der Positivkontrolle einen Trend zeigten ( $p = 0,152$ ), waren die Werte in der Milz statistisch hoch signifikant (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Die fehlende *in vivo* Zytotoxizität deutet darauf hin, daß die Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren tolerisiert wurden und deshalb nicht das OVA exprimierende Lebergewebe *in vivo* attackierten. Wäre das Lebergewebe oder Tumorgewebe von zytotoxischen T-Zellen angegriffen worden, wären zum einen lymphozytäre Infiltrate nachweisbar gewesen und zum anderen hätte das Tumorgewebe einen erhöhten nekrotischen bzw. apoptotischen Anteil an zerstörtem Gewebe aufweisen müssen. Um dies näher zu untersuchen, wurde von OT I T-Zell-injizierten und nicht injizierten c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA tg- Mäusen apoptotische und nekrotische Zellen in der Leber mit Hilfe der TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling*)-Methode (Gavrieli et al. 1992) nachgewiesen (Abb.3.27 A-D).

Weder in den c-myc/OVA 75 tg+ (Abb.3.27 A, B) noch in den c-myc/OVA 75 tg- Tieren (Abb.3.27 C, D) zeigten sich Unterschiede mit und ohne OT I T-Zellinjektion. In den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen waren in der angrenzenden, normalen Leber wenig TUNEL positive Hepatozyten detektierbar, während im Tumorknoten eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen nachweisbar war.

Im Unterschied zu den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen waren in den c-myc/OVA tg- Tieren mit und ohne OT I T-Zellinjektion nur sehr wenige TUNEL positive Hepatozyten nachweisbar (Abb.3.27 C, D).

Eine Quantifizierung der TUNEL positiven Zellen im Lebertumorgewebe, verglichen mit dem gesunden Gewebe, lieferte hoch signifikante Unterschiede, unabhängig ob OT I T-Zellen injiziert worden waren ( $***p \leq 0,001$ ). Die Injektion von OT I T-Zellen hatte weder auf den Tumorbereich, noch auf das normale Lebergewebe in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen eine Auswirkung (Abb.3.27 E).

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der fehlenden Tumorabstoßung durch die OT I T-Zellen den Befund der OT I T-Zell-Tolerisierung in den c-myc/OVA tg+ Mäusen.

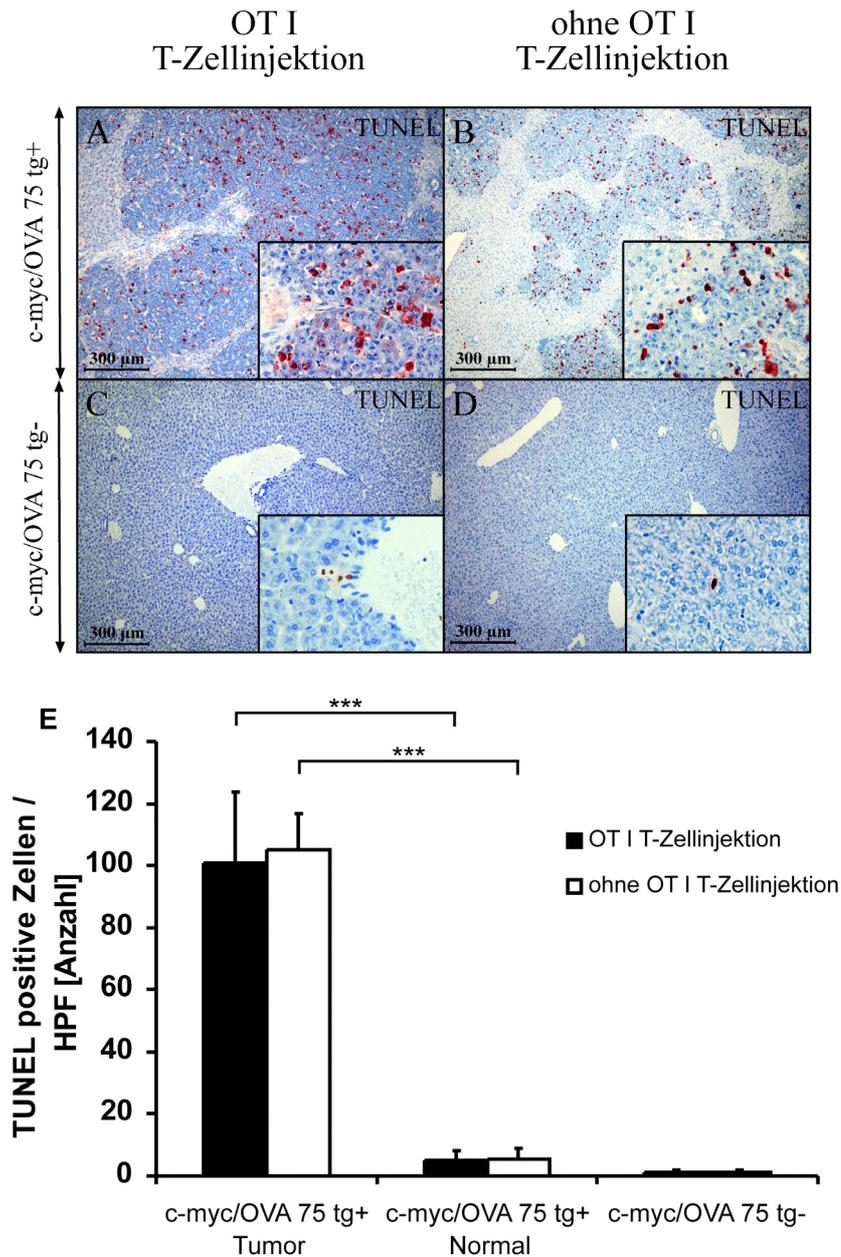


Abb.3.27 **Fehlende zusätzliche Tumorzellnekrosen / -apoptosen nach OT I T-Zellinjektion in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen (TUNEL-Färbung).** (A-D) Vergleich der Lebergewebe hinsichtlich Nekrosen / Apoptosen nach TUNEL-Färbung in c-myc/OVA 75 tg+ (A,B) und c-myc/OVA 75 tg- (C, D) Mäusen, injiziert mit  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen (A, C) und mock injiziert (B, D), 5 Tage nach adoptivem Transfer. (E) Quantifizierung der TUNEL positiven Zellen bezogen auf ein HPF (40x). Von jeder Maus wurden 10 HPFs ausgezählt und die Werte gemittelt (n = 4 Mäuse pro Gruppe).

HPF = *high power field*, 40-fach Mikroskopisches Sichtfeld

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test sowie dem postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

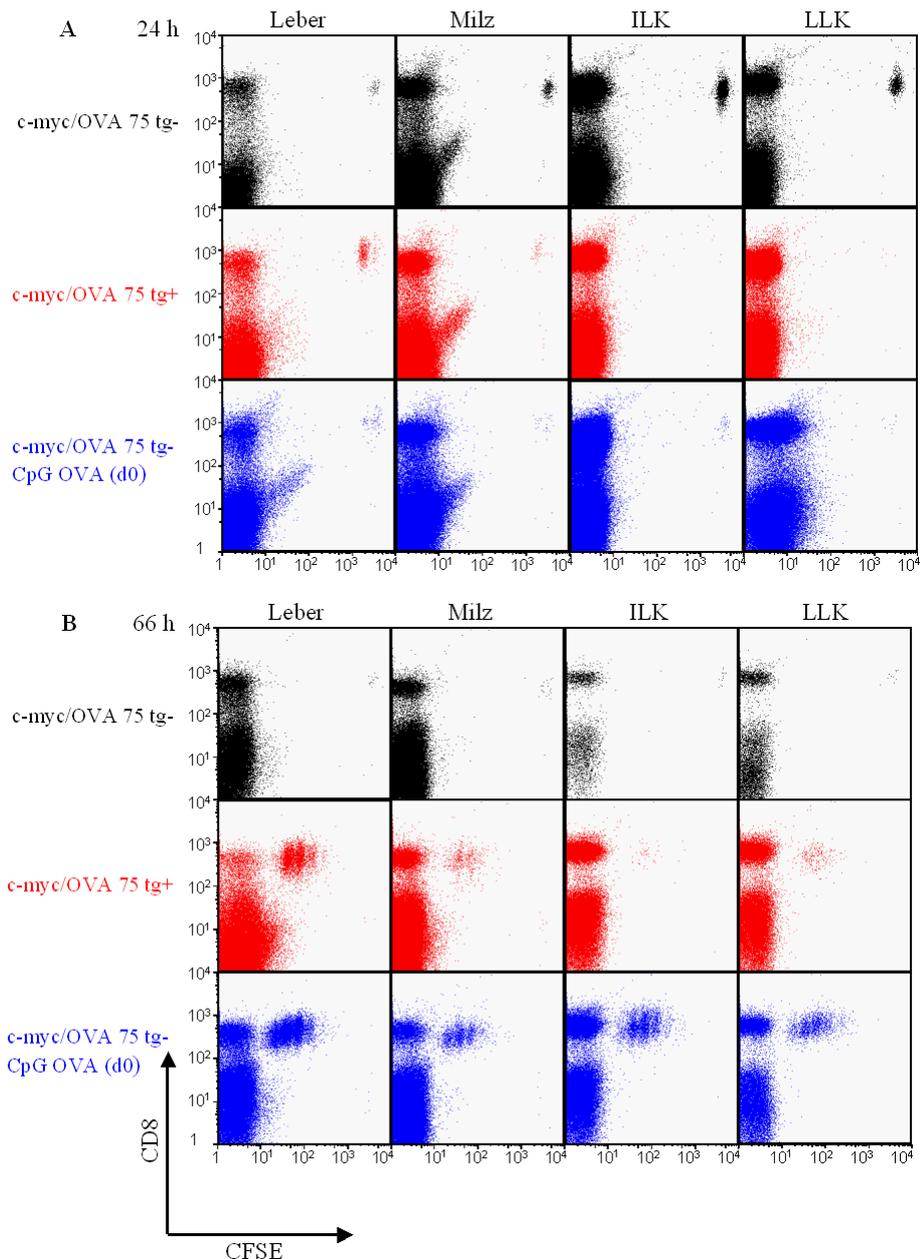
### 3.3.5 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc /OVA tg+ Mäusen

In den folgenden Versuchen wurde das Proliferationsverhalten der injizierten OT I T-Zellen verfolgt. Es soll damit nachgewiesen werden, daß bei Analyse der *in vivo* Zytotoxizität und der TUNEL-Färbung noch ausreichend injizierte OT I T-Zellen vorhanden waren. Es ist bekannt, daß der Mechanismus der Toleranzinduktion auf verschiedene Arten erfolgen kann, bei dem es neben Anergie auch zu einer Deletion toleranter T-Zellen kommen kann. So ist eine periphere Deletion durch Induktion von CD95 vermittelter Apoptose in verschiedenen Modellen beschrieben worden (Kawabe und Ochi 1991; Bertolini et al. 1995; Kurts et al. 1997; Kurts et al. 1998 b).

Naive OT I T-Zellen wurden mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff (CFSE) markiert und in c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 75 tg- und als Positivkontrolle zusammen mit CpG ODN und OVA in c-myc/OVA 75 tg- Mäuse (c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA) injiziert und deren Proliferationsverhalten nach 24 h und 66 h untersucht. 24 h nach zelladoptivem Transfer hatten ein Großteil der OVA spezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen in der Leber und Milz bereits eine Zellteilung durchschritten, was anhand der CFSE Verdünnung nachweisbar war. Bei den wenigen Zellen, die in dem Lymphknoten c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse vorkamen, ließ sich eine vollzogene Zellteilung aufgrund der niedrigen Zellzahl nur schwer nachweisen (Abb.3.28 A rot). Die in den c-myc/OVA 75 tg- Wurfkontrollen injizierten OT I T-Zellen zeigten in allen untersuchten Organen (Leber, Milz, ILK und LLK) keine Proliferation (Abb.3.28 A schwarz). Verglichen mit den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen durchliefen in den c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen weniger transferierte OVA spezifische T-Zellen 24 h nach adoptivem Transfer eine Zellteilung in der Leber (Abb.3.28 A blau).

Nach 66 h hingegen hatten die OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen in allen untersuchten Kompartimenten bereits mehrere Zellteilungen durchschritten, was anhand des stark verdünnten CFSE nachweisbar war (Abb.3.28 B rot). Ein ähnliches Proliferationsverhalten zeigten auch die c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäuse (Abb.3.28 B blau). Verglichen mit der Analyse nach 24 h hatten sich in den c-myc/OVA 75 tg- Mäusen die OT I T-Zellen in ihrer Anzahl reduziert und zeigten, wie erwartet, keine Proliferation (Abb.3.28 B schwarz).

Aufgrund der Proliferation der injizierten OT I T-Zellen bereits nach 66 h und der damit verbundenen starken CFSE Verdünnung war eine Analyse unter diesen Bedingungen nach 5 d nicht mehr möglich.



**Abb.3.28 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.** Injektion  $1 \times 10^6$  naiver, CFSE markierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ (rot), c-myc/OVA tg- (schwarz) und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen (blau) und Analyse nach 24 h (A) und 66 h (B) in der Leber, der Milz, dem ILK und LLK. Es wurde auf lebende Lymphozyten gegatet. Dargestellt ist der Dot Blot einer repräsentativen Maus pro Gruppe.

Um zu überprüfen, ob die injizierten OT I T-Zellen nach 5 d immer noch in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen nachweisbar waren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Leberschnitten durchgeführt und injizierte versus nicht injizierte Mäuse miteinander verglichen. Aufgrund der fehlenden CFSE Färbung nach 5 d, wurden die T-Zellen über CD3 und CD8 Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Da bei dieser Methode eine Unterscheidung zwischen endogenen und injizierten T-Zellen nicht eindeutig möglich war, wurden CD3+

CD8<sup>+</sup> T-Zellen quantifiziert und mit der Anzahl in nicht injizierten Mäusen verglichen. In c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen, in die OT I T-Zellen injiziert wurden, konnte 5 d nach Transfer mehr CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, als in nicht injizierten c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Kontrollgruppen. Die Zellen waren hauptsächlich im Tumorknoten lokalisiert (Abb.3.29 A-D), wie auch schon 24 h nach zelladaptivem Transfer beobachtet werden konnte (Abb.3.23 A). In den c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen fand man weniger CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit und ohne OT I T-Zellinjektion (Abb.3.29 E-H).

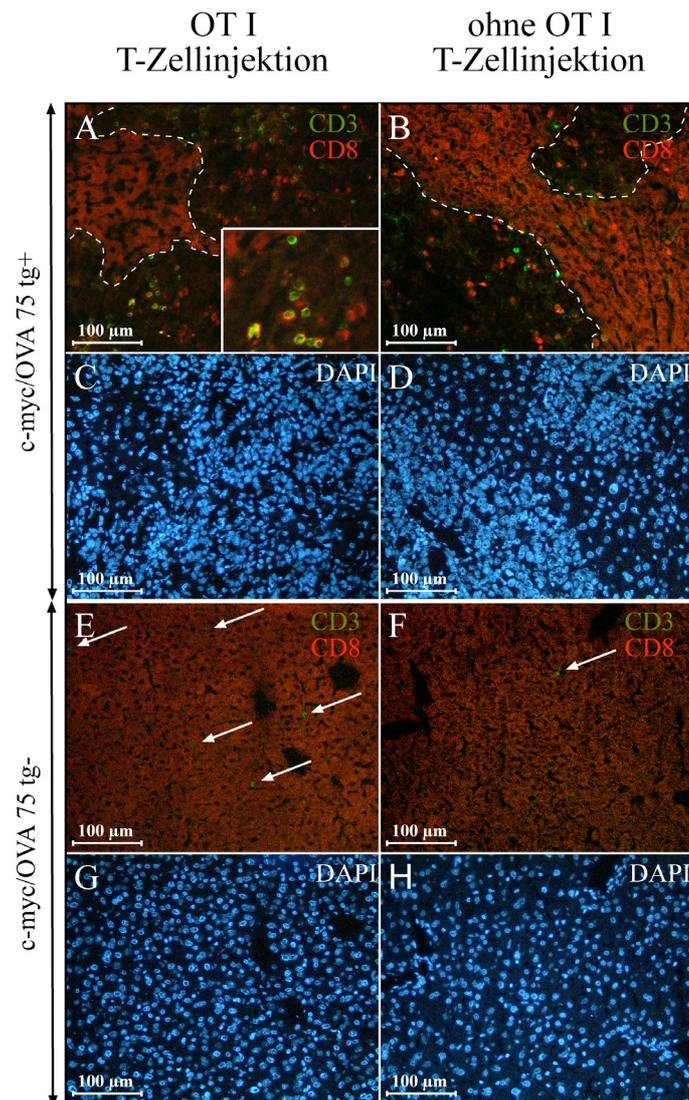


Abb.3.29 **Akkumulation CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Lebertumorgewebe von c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen, in die OT I T-Zellen injiziert wurden (Immunfluoreszenzfärbung nach 5 d).** Injektion von  $1 \times 10^6$  naiven OT I T-Zellen in neonatal induzierten c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> (A, C) und c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen (E, G). Neonatal induzierte c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> (B, D) und c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäuse (F, H) ohne OT I T-Zellinjektion. CD3<sup>+</sup> T-Zellen sind grün (anti-CD3 Alexa 488 1:100) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind rot (anti-CD8 bio 1:400, Streptavidin Alexa 568 1:1.000) dargestellt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Pfeilspitzen zeigen auf die CD3 positiven T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen.

Um genaue Anzahlen CD3+ CD8+ T-Zellen zu erhalten, wurden pro Maus 10 HPFs (*high power field*) ausgezählt und jeweils die Mittelwerte zwischen injizierten und nicht injizierten c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen verglichen. Nach OT I T-Zellinjektion waren in den Tumorknoten c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse signifikant mehr CD3+ CD8+ T-Zellen zu finden, als in den Tumorknoten nicht injizierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse (\*\*p ≤ 0,01; Abb.3.30 A). Dieser Unterschied war auch statistisch signifikant im Vergleich zu dem Normalgewebe injizierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse (\*p ≤ 0,05) und c-myc/OVA 75 tg- Tiere (\*\*p ≤ 0,01; Abb.3.30 A). Man kann mit diesem Nachweis allerdings lediglich aussagen, daß es sich sehr wahrscheinlich um die injizierten OT I T-Zellen handelte, die sich offensichtlich im Tumorbereich c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse ansammelten.

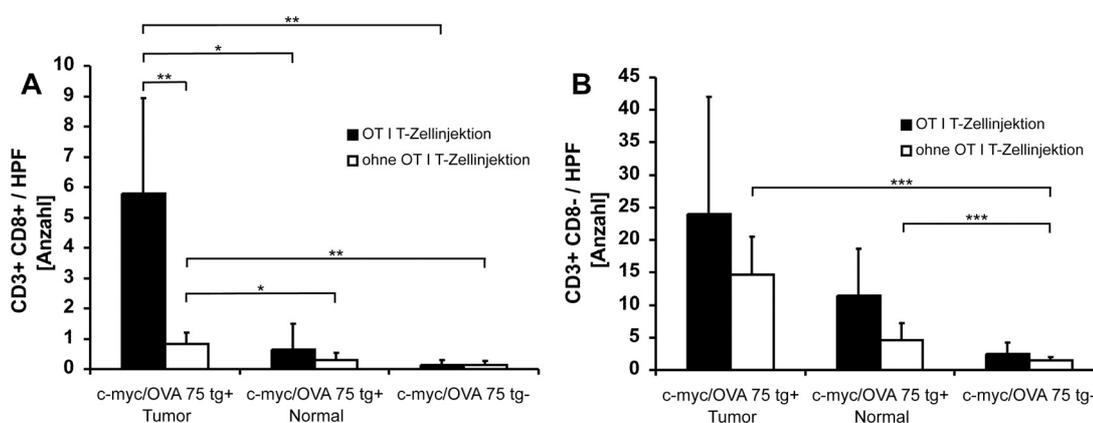


Abb.3.30 **Akkumulation CD3+ CD8+ T-Zellen im Lebertumorgewebe c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse, transferiert mit OT I T-Zellen und CD3+ CD8- T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen ohne OT I T-Zellinjektion (nach 5 d).** Quantifizierung CD3+ CD8+ T-Zellen (A) und CD3+ CD8- T-Zellen (B) im Lebertumor und angrenzendem Normalgewebe c-myc/OVA tg+ und im gesunden Lebergewebe c-myc/OVA tg- Mäusen mit und ohne OT I T-Zellinjektion. Die Quantifizierung erfolgte durch Auszählen und mitteln von 10 HPFs (40x) pro Maus (n = 4-6 Mäuse pro Gruppe).

HPF = *high power field*, 40-fach Mikroskopisches Sichtfeld

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test sowie dem postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).

Vergleicht man zusätzlich das Lebertumorgewebe mit dem Normalgewebe nicht injizierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse, so waren deutlich weniger CD3+ CD8+ T-Zellen nachweisbar, verglichen mit den Geweben injizierter Tieren. Dafür war die Anzahl der CD3+ CD8+ T-Zellen, die sich im Lebertumorgewebe befanden, deutlich erhöht, verglichen mit dem Normalgewebe (\*p ≤ 0,05; Abb.3.30 A). Ein signifikanter Unterschied bestand auch bei dem Vergleich zwischen dem Tumorgewebe c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse und dem Normalgewebe c-myc/OVA 75 tg- Tiere (\*\*p ≤ 0,01; Abb.3.30. A). Zusammenfassend kann man sagen, daß

auch endogen eine Anhäufung CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in dem Tumorbereich c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Tiere nachweisbar ist. Es bleibt allerdings unklar, ob diese T-Zellen eine OVA Spezifität aufweisen oder eventuell gegen ein weiteres Tumorantigen gerichtet sind.

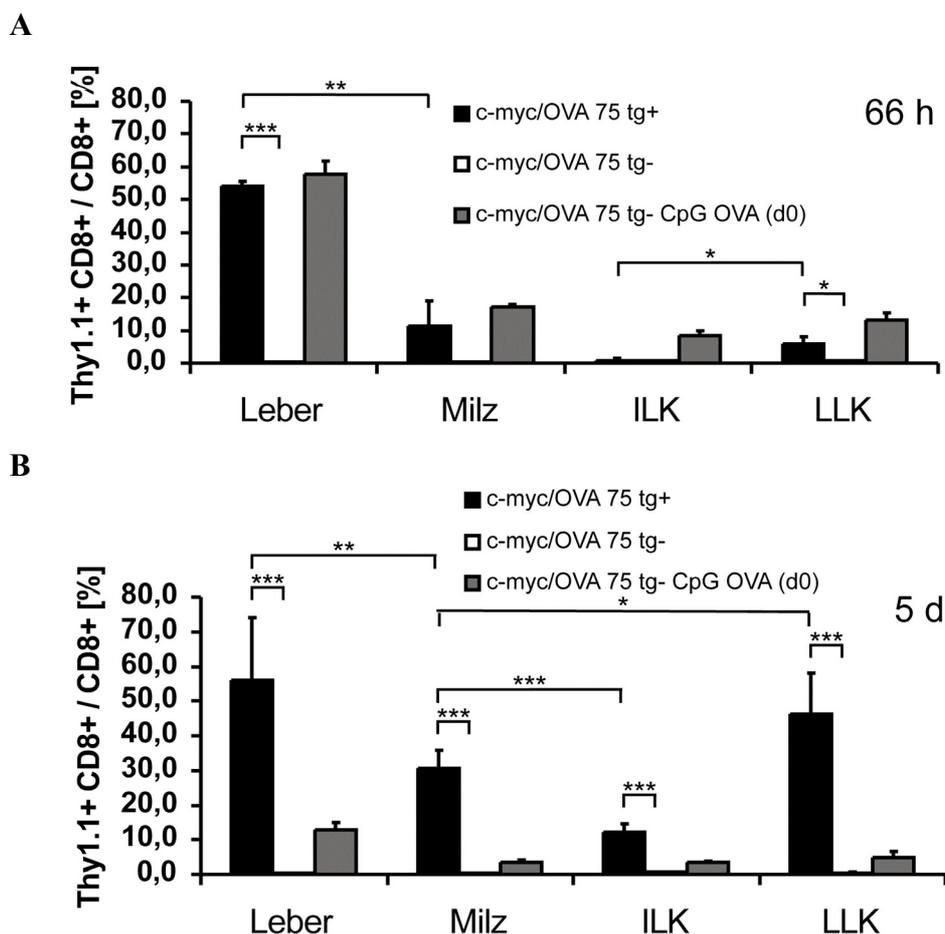
Vergleicht man die CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Zellen in dem Lebertumorgewebe injizierter c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse mit den nicht injizierten c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Tieren, so lassen sich lediglich Tendenzen in der Anzahl der Zellen feststellen, die statistisch nicht signifikant unterscheidbar waren ( $p = 0,264$ ; Abb.3.30 B). Daß die Injektion CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> OT I T-Zellen weitere nicht CD8<sup>+</sup> T-Zellen anlockt, ließ sich mit diesem Experiment nicht eindeutig belegen und stützt die Aussage, daß es sich bei den CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen um die injizierten OT I T-Zellen handelt.

Es fällt weiterhin auf, das schon endogen in dem Tumor- und Normalgewebe nicht injizierter c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse verglichen zu den c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Tieren ein statistisch hoch signifikanter Unterschied in der Anzahl CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Zellen vorhanden war ( $***p \leq 0,001$ ; Abb.3.30 B). Es fehlt eine genaue Klassifizierung der Zellen hinsichtlich weiterer Marker wie CD4 oder NK1.1, ebenso gegen welches Antigen sie gerichtet sind.

Da es mit der Immunfluoreszenzfärbung nicht eindeutig möglich war, endogene von injizierten T-Zellen zu unterscheiden, wurden für die folgenden Proliferationsanalysen OT I Thy1.1 (*thymocyte differentiation antigene 1.1*) Tiere als T-Zellspendermäuse verwendet. Während Thy1.2 auf den Thymozyten in den meisten murinen Mausstämmen, so auch in C57BL/6J exprimiert ist, findet man eine Thy1.1 Expression nur in wenigen Mausstämmen. Der Vorteil besteht darin, daß nach adoptivem Transfer von OT I Thy1.1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Empfängermäuse (C57BL/6J), eine Unterscheidung zwischen endogenen und transferierten T-Zellen über den Marker Thy1.1 möglich ist.

In den folgenden Versuchen wurde das Proliferationsverhalten von transferierten OVA spezifischen T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup>, c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> und c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> CpG OVA Mäusen nach 66 h (Abb.3.31 A) und 5 d (Abb.3.31 B) untersucht. Verglichen mit der Anzahl transferierter OT I T-Zellen nach 24 h (Abb.3.23 A), hatten die OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen nach 66 h in der Leber stark proliferiert und zeigten signifikante Unterschiede verglichen mit den c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen ( $***p \leq 0,001$ ) und den in der Milz proliferierten T-Zellen ( $**p \leq 0,01$ ; Abb.3.31 A). Im Unterschied zu der Proliferationsanalyse nach 24 h waren im LLK signifikant mehr transferierte T-Zellen im Vergleich zu den c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Tieren und auch im Vergleich zu der Anzahl im ILK nachweisbar ( $*p \leq 0,05$ ; Abb.3.31 A).

Nach 5 d fand, verglichen mit der 66 h Analyse, kein weiterer starker Proliferationsanstieg der transferierten OT I T-Zellen in der Leber statt. Die Anzahl OVA spezifischer T-Zellen in der Leber in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen war verglichen mit der Anzahl in den c-myc/OVA 75 tg- Tieren sehr stark signifikant ( $***p \leq 0,001$ ; Abb.3.31 B). Wenngleich in der Milz deutlich mehr OT I T-Zellen nachweisbar waren, blieb immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen Leber und Milz in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen festzustellen ( $**p \leq 0,01$ ; Abb.3.31 B). Im Gegensatz zum Proliferationsverhalten der OT I T-Zellen nach 24 h und 66 h waren signifikante Unterschiede im ILK und LLK c-myc/OVA 75 tg+ versus c-myc/OVA 75 tg- Mäuse nachweisbar ( $***p \leq 0,001$ ; Abb.3.31 B).



**Abb.3.31 Proliferation transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen in der Leber nach 66 h und Verteilung auf sekundär lymphatische Organe nach 5 d.** Injektion von  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 75 tg- und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäuse und Bestimmung der Verteilung in der Leber, der Milz, dem ILK und LLK 66 h (A, n = 3 Mäuse pro Gruppe) und 5 d nach adoptivem Transfer (B, n = 4-7 Mäuse pro Gruppe).

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test sowie dem postHoc Verfahren nach Bonferroni ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$ ).

In den Milzen c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse konnten bereits DCs identifiziert werden, die *in vitro* OVA präsentierten. Ob auch in den Lymphknoten APCs vorhanden waren, die zu einer verzögerten Proliferation der OT I T-Zellen in diesen Kompartimenten beitrugen, blieb unklar.

Vergleicht man zusätzlich die Anzahl an transferierten wiedergefundenen OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen zwischen LLK versus Milz sowie Milz versus ILK, so zeichnen sich signifikante Unterschiede ab (\*p ≤ 0,05; \*\*\*p ≤ 0,001; Abb.3.31 B). Die Proliferation der OT I T-Zellen in der Positivkontrolle (c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA) stieg in allen untersuchten Organen (Leber, Milz, ILK und LLK) bis 66 h nach adoptivem Transfer an (Abb.3.31 A) und fiel nach 5 d wieder ab (Abb.3.31 B).

Zusammenfassend kann man festhalten, daß zum Zeitpunkt des durchgeführten *in vivo* Zytotoxizitätsversuches und der TUNEL-Färbung nach 5 d noch genügend proliferierte OT I T-Zellen vorhanden waren. Weiterhin konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung, daß die CD8+ CD3+ T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen den transferierten OT I T-Zellen entsprechen bestätigt werden.

### **3.3.6 Fehlende IFN- $\gamma$ Produktion der transferierten OT I T-Zellen und fehlende *in vivo* Zytotoxizität nach zusätzlicher CpG ODN und OVA Immunisierung in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen**

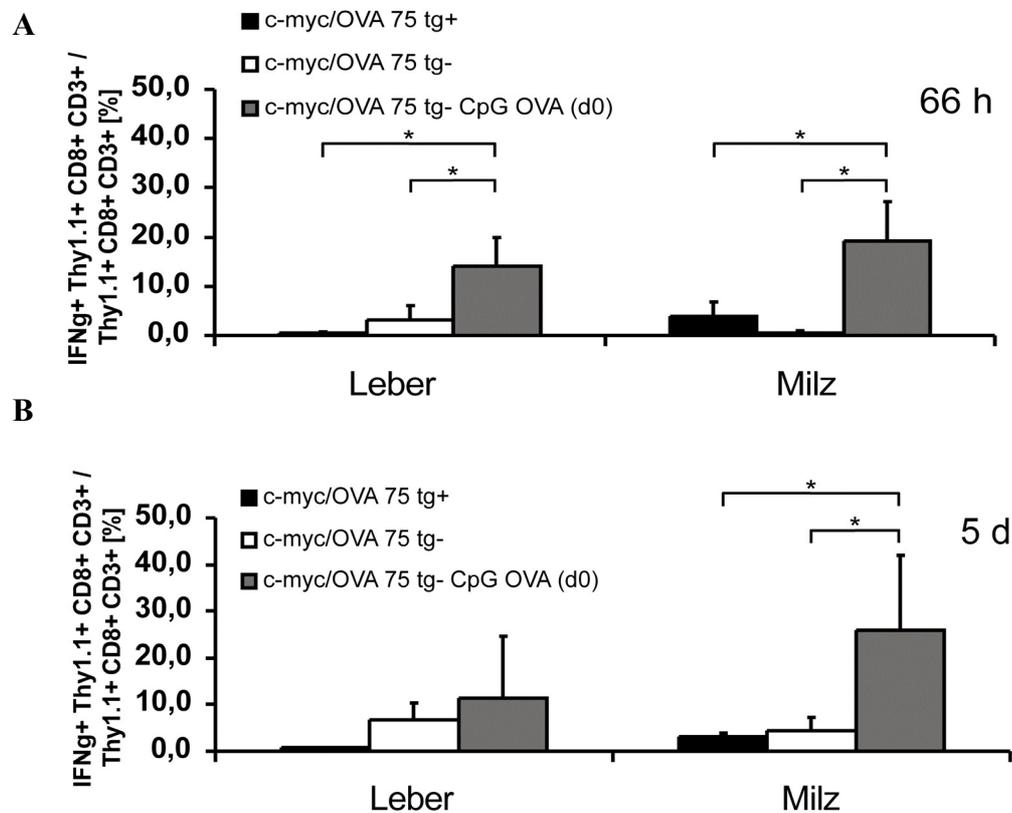
Proliferation transferierter OT I T-Zellen, fehlende Zytotoxizität und Tumorwachstum lassen auf Toleranzinduktion schließen. Um zu untersuchen, ob die transferierten OT I T-Zellen tolerisiert worden waren, wurde in den folgenden Versuchen IFN- $\gamma$  nach 66 h (Abb.3.32 A) und 5 d (Abb.3.32 B) gemessen.

Aktivierte T-Effektorzellen zeichnen sich zusätzlich zu einer effektiven zytotoxischen T-Zellantwort durch die Produktion von IFN- $\gamma$  aus.

Vergleicht man die IFN- $\gamma$  Produktion der OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ sowie c-myc/OVA 75 tg- Mäusen nach 66 h, so waren weder in der Leber, noch in der Milz, verglichen mit der Positivkontrolle (c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA), deutliche IFN- $\gamma$  Mengen nachweisbar (\*p ≤ 0,05; Abb.3.32 A).

Die fehlende IFN- $\gamma$  Produktion in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen konnte auch nach 5 d bestätigt werden. In der Leber war der Unterschied zwischen c-myc/OVA 75 tg+ Tieren im Vergleich zur Positivkontrolle nicht signifikant, sondern es war lediglich ein Trend sichtbar

( $p = 0,293$ ). In der Milz hingegen waren auch nach 5 d die fehlenden IFN- $\gamma$  Mengen signifikant unterschiedlich zwischen den c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen, verglichen mit der Positivkontrolle ( $*p \leq 0,05$ ; Abb.3.32 B).



**Abb.3.32 Fehlende IFN- $\gamma$  Produktion transferierter OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.** In c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 75 tg- und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen wurden  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen transferiert. 66 h (A,  $n = 3$  Mäuse pro Gruppe) und 5 d (B,  $n = 3-4$  Mäuse pro Gruppe) nach adoptivem Transfer und *in vitro* Restimulierung mit anti-CD3 wurde die IFN- $\gamma$  Menge mit Hilfe der intrazytoplasmatischen FACS Färbung in Leber und Milz bestimmt.

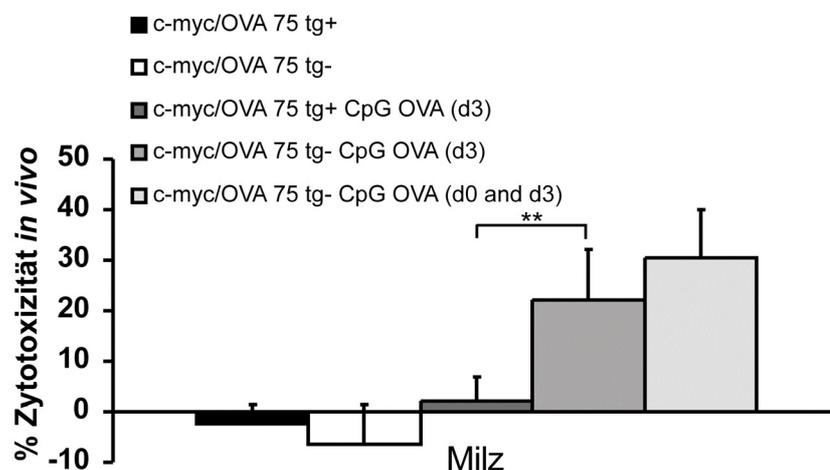
Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des postHoc Verfahren nach Bonferroni ( $*p \leq 0,05$ ).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der zwar anfänglichen Stimulierung der OT I T-Zellen, nachgewiesen durch eine CD69 Hochregulation, sowie die Ergebnisse der Proliferation, der fehlenden *in vivo* Zytotoxizität und der ausbleibenden IFN- $\gamma$  Produktion den Schluß zu, daß die in die c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse transferierten OT I T-Zellen tolerisiert worden waren.

Es stellte sich nun die Frage, ob es durch Vakzinierung mit CpG ODN und OVA möglich war, die Toleranz der OT I T-Zellen aufzuheben. Dazu wurden c-myc/OVA 75 tg+ und

c-myc/OVA 75 tg- Mäuse nach adoptivem OT I T-Zelltransfer mit CpG ODN und OVA immunisiert und weitere 5 d später auf ihre *in vivo* Zytotoxizität in der Milz untersucht (Abb.3.33).

Die Positivkontrolle wurde sowohl am Tag der OT I T-Zellinjektion, als auch am dritten Tag mit CpG ODN und OVA immunisiert. Verglichen wurden die *in vivo* Zytotoxizitätslevel mit c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäusen ohne Stimulierung. Selbst nach Vakzinierung mit CpG ODN und OVA konnte, im Gegensatz zu c-myc/OVA 75 tg- Mäusen in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren, keine *in vivo* Zytotoxizität der transferierten OT I T-Zellen nachgewiesen werden (\*\*p ≤ 0,01; Abb.3.33). Die c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA tg- Kontrollgruppen zeigten, ähnlich der Analyse nach 5 d (Abb.3.26), keine *in vivo* Zytotoxizität.



**Abb. 3.33 Fehlende *in vivo* Zytotoxizität in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen auch nach zusätzlicher Vakzinierung mit CpG ODN und OVA.** C-myc/OVA 75 tg+ und c-myc/OVA 75 tg- Mäuse wurden entweder nicht oder 3 d nach adoptivem T-Zelltransfer mit CpG ODN und OVA immunisiert und nach weiteren 5 d auf *in vivo* Zytotoxizität (4 h) hin untersucht. Die Positivkontrolle c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA wurde am Tag der OT I T-Zellinjektion (d0), als auch am dritten Tag mit CpG OVA (d3) stimuliert (n = 3–6 Mäuse pro Gruppe). Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*\*p ≤ 0,01).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß selbst nach einer Immunisierung mit CpG ODN und OVA es nicht möglich war OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen zu aktivieren und die spezifische T-Zell Toleranz aufzuheben.

### 3.3.7 Partielle Herunterregulation des T-Zellrezeptors, als möglicher Toleranzmechanismus

Einer der möglichen Toleranzmechanismen besteht, neben der Anergie, also der Unfähigkeit einer T-Zelle auf einen Antigenstimulus zu reagieren, in der Deletion der T-Zellen. Um eine Deletion der T-Zellen in unserem transgenen Mausmodell endgültig auszuschließen, müßten längere Verlaufskontrollen gewählt werden.

Ein Mechanismus der Toleranzentstehung besteht in der Herunterregulation des T-Zellrezeptors (TZR) und/oder Korezeptors, der ein reversibler Prozess der Tolerisierung ist. Dieses Phänomen der Toleranzentstehung wurde schon in anderen Modellsystemen beschrieben (Schönrich et al. 1991).

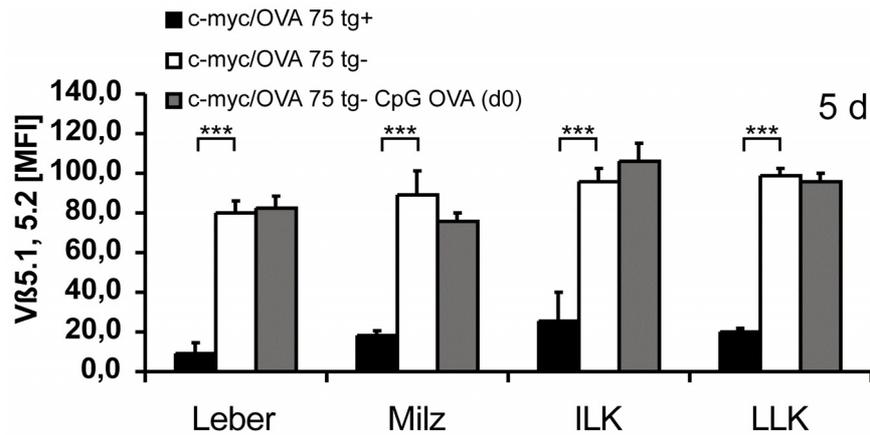
Eine Herunterregulation des Korezeptors CD8 konnte bei den transferierten OT I T-Zellen, isoliert aus c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> oder c-myc/OCA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen, nicht nachgewiesen werden (Abb.3.28).

Untersucht man jedoch genauer den TZR der OVA spezifischen T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie hinsichtlich der V $\alpha$ 2 (Daten nicht gezeigt) und V $\beta$ 5.1, 5.2 Expression, so waren Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> versus c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> Mäusen nach 5 d nachweisbar, die auch statistisch hoch signifikant waren ( $***p \leq 0,001$ ; Abb.3.34 A). Dieses Ergebnis konnte in der Leber, der Milz, dem ILK und LLK ermittelt werden. In c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> CpG OVA Mäusen, in denen die OT I T-Zellen OVA spezifisch aktiviert worden waren, zeigte sich hingegen keine Herunterregulation des T-Zellrezeptors nach 5 d (Abb.3.34 A).

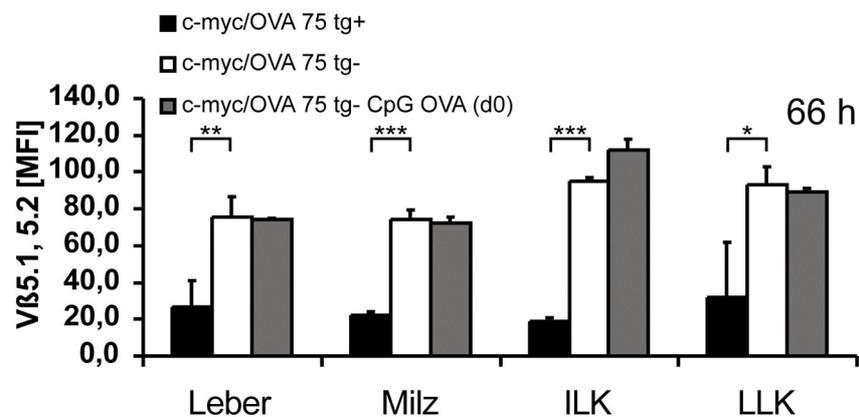
Ob die Herunterregulation des TZR auf Expressionsebene oder beispielsweise durch eine Internalisierung des Rezeptors zustande kam, wird zur Zeit untersucht.

Ein ähnliches Ergebnis, auch mit statistisch hoch signifikanten Unterschieden, konnte bereits nach 66 h ( $***p \leq 0,001$ ; Abb.3.34 B) und 24 h ( $***p \leq 0,001$  für die Leber, die Milz und den ILK;  $*p \leq 0,05$  für den LLK; Abb.3.34 C) ermittelt werden. Da schon nach 24 h in allen untersuchten Kompartimenten der TZR herunterreguliert wurde, müßte man, um den genauen Zeitpunkt der Antigenerkennung zu bestimmen, noch frühere Analysen durchführen, die aus Zeitgründen nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sein konnten. Im Unterschied zu den Zeitpunkten nach 5 d und 66 h konnte in c-myc/OVA 75 tg<sup>-</sup> CpG OVA Mäusen lediglich nach 24 h eine leichte Herunterregulation des TZR beobachtet werden (Abb.3.34 C).

A



B



C

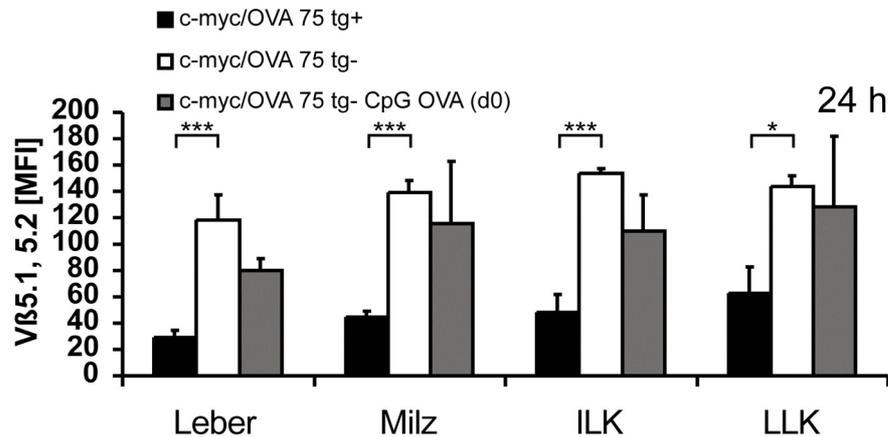
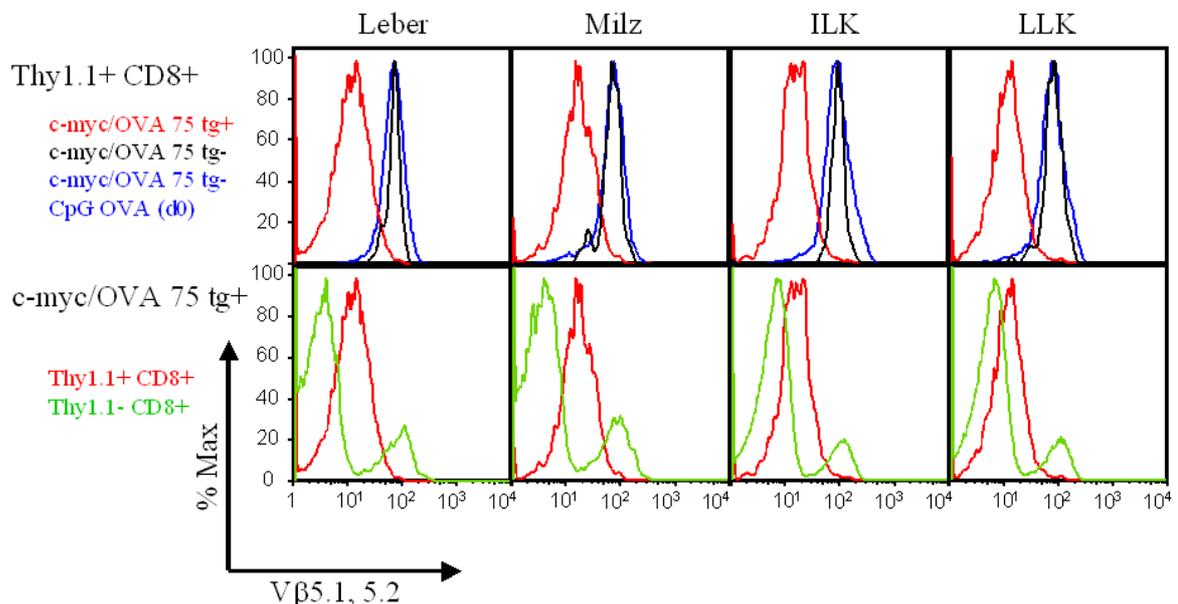


Abb.3.34 Partielle Herunterregulation des TZR der transferierten OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen.  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen wurden in c-myc/OVA 75 tg+, c-myc/OVA 75 tg- und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäuse transferiert und nach 5 d (A, n = 4-6 Mäuse pro Gruppe), 66 h (B, n = 3 Mäuse pro Gruppe) und 24 h (C, n = 4-5 Mäuse pro Gruppe) die mittlere Fluoreszenzintensität der T-Zellrezeptorkette V $\beta$ 5.1, 5.2 der OVA spezifischen T-Zellen in Leber, Milz, ILK und LLK bestimmt.

Die Werte sind +/- SD angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des postHoc Verfahren nach Bonferroni (\*p  $\leq$  0,05; \*\*\*p  $\leq$  0,001).

Abb.3.35 zeigt exemplarisch das zytometrische Ergebnis zum Zeitpunkt 66 h. Dazu wurde die Expression des T-Zellrezeptors ( $V\beta 5.1, 5.2$ ) der transferierten OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen mit den c-myc/OVA 75 tg- und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA Mäusen verglichen und in einem Histogramm dargestellt.

Zusätzlich wurde in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen die transferierten OT I T-Zellen mit den endogenen CD8+ T-Zellen verglichen. Es zeigte sich, daß der T-Zellrezeptor der injizierten OVA spezifischen T-Zellen in allen untersuchten Kompartimenten (Leber, Milz, ILK und LLK), verglichen mit den endogenen CD8+ T-Zellen sowie der ungefärbten Population, deutlich herunterreguliert war (Abb.3.35). Dieses Ergebnis konnte nach 5 d und 24 h ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb.3.35 Histogrammdarstellung der partiellen Herunterregulation des T-Zellrezeptors der transferierten OT I T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen und Vergleich zu den endogenen CD8+ T-Zellen.**  $1 \times 10^6$  OT I T-Zellen wurden in c-myc/OVA 75 tg+ (rot), c-myc/OVA 75 tg- (schwarz) und c-myc/OVA 75 tg- CpG OVA (blau) Mäuse transferiert und 66 h später hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität der  $V\beta 5.1, 5.2$  Expression untersucht (Gate: Thy1.1+ CD8+, oben). In den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen wurden transferierte OT I T-Zellen (rot) mit endogenen Thy1.1- CD8+ T-Zellen (grün) hinsichtlich der  $V\beta 5.1, 5.2$  Expression nach 66 h analysiert (Gate: Thy1.1- CD8+, unten).

Zusammenfassend kann man festhalten, daß mit Hilfe des Protoonkogens c-myc und des Modellantigens OVA ein neuartiges autochthones, transgenes Lebertumormodell generiert werden konnte, welches eine starke Antigenexpression im Tumorknoten, verglichen mit dem normalen, angrenzenden Lebergewebe, aufwies. Transferierte OVA spezifische T-Zellen erkannten ihr Antigen, akkumulierten in der Leber bzw. in den Tumorknoten c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse nach 24 h und verteilten sich auf die sekundär lymphatischen Organe (Milz, ILK und LLK) nach 5 d. An der Antigenpräsentation waren leber- und milzassoziierte DCs beteiligt. Das Schicksal der transferierten OT I T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen ist zusammenfassend in Abb.3.36 dargestellt.

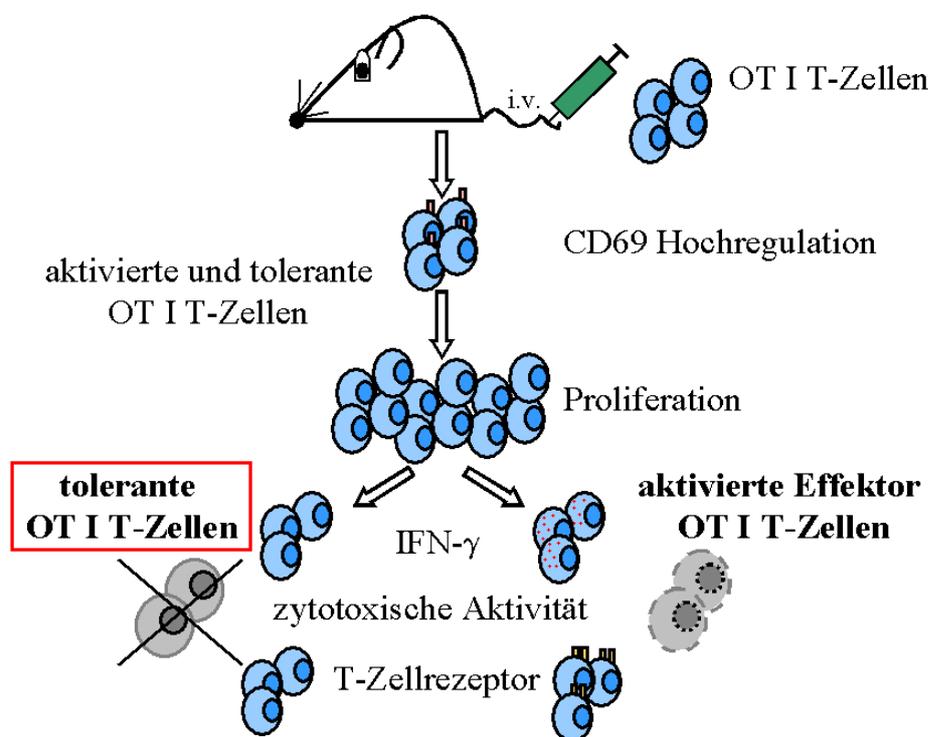


Abb.3.36 **Zusammenstellung der immunologischen Ergebnisse und Vergleich zwischen toleranten T-Zellen und Effektorzellen.** Injizierte OVA spezifische OT I T-Zellen regulieren 24 h nach adoptivem Transfer CD69 (früher Stimulierungsmarker hoch), proliferieren und werden schließlich toleriert in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen.

Zunächst exprimierten die transferierten OT I T-Zellen den frühen Stimulierungsmarker CD69 und fingen an zu proliferieren. Dies läßt noch keine Unterscheidung zwischen toleranten T-Zellen sowie Effektor T-Zellen zu. Erst die fehlende IFN- $\gamma$  Produktion und die fehlende zytotoxische T-Zellaktivität zeigte, daß die transferierten OT I T-Zellen toleriert wurden. Selbst nach Vakzinierung mit CpG ODN und OVA ließ sich die Toleranz nicht aufheben. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Toleranzinduktion mit der partiellen Herunterregulation des T-Zellrezeptors zusammenhängt.

## 4. Diskussion

Unter Verwendung des binären, Tetrazyklin induzierbaren Systems von H. Bujard konnte ein neuartiges, transgenes, autochthones Lebertumormodell zur Analyse immunologischer Fragestellungen generiert werden. Dabei wurde das Protoonkogen c-myc, welches bei einer Überexpression in murinen Hepatozyten zu einer starken Tumorgenese führt (Beer et al. 2004), verwendet. Um eine antigenspezifische Immunantwort während der Tumorgenese verfolgen zu können, wurde als Modellantigen das in der Immunologie häufig verwendete und gut charakterisierte OVA genutzt.

Nach Verpaarung von c-myc/OVA tg<sup>+</sup> Mäusen mit den leberspezifischen Reporterermäusen (LAP tTA; Kistner et al. 1996) zeigten die doppelt transgenen Nachkommen eine ähnliche Hepatokarzinogenese wie die publizierten c-myc tg<sup>+</sup> Tiere (Beer et al. 2004).

Nach neonataler Induktion von c-myc/OVA tg<sup>+</sup> Mäusen konnte eine starke OVA Expression im Lebertumorknoten nachgewiesen werden, während in dem normalen, angrenzenden gesunden Gewebe keine OVA Expression immunhistochemisch nachweisbar war. Transferierte OVA spezifische OT I T-Zellen akkumulierten 24 h nach adoptivem Transfer und verteilten sich erst nach 66 h bzw. 5 d auf die sekundär lymphatischen Organe, wie die Milz, den ILK und LLK. An der Antigenpräsentation waren leber- und milzassoziierte DCs beteiligt.

Trotz einer anfänglichen Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen, der Hochregulation von CD69 als frühen Stimulierungsmarker und einer Infiltration von antigenspezifischen T-Zellen in das Tumorgewebe, blieb eine Tumorregression aus. Die antigenspezifischen T-Zellen zeichneten sich durch eine fehlende IFN- $\gamma$  Produktion, sowie eine fehlende *in vivo* Zytotoxizität aus, was auf eine Tolerisierung dieser Zellen hindeutet.

Selbst eine Immunisierung mit CpG ODN und OVA führte nicht zum Aufheben der Toleranz und somit auch nicht zu einer Eliminierung von tumorös veränderten Hepatozyten. Ein möglicher Mechanismus bzw. eine Erklärung für die Toleranzinduktion könnte die partielle Herunterregulation des T-Zellrezeptors (TZR) sein. Dadurch wird die Aktivierung der T-Zellen aufgrund unzureichender Antigenerkennung verändert.

Es konnte ein neuartiges Tumormodell etabliert werden, welches der realen Situation einer Leberkarzinogenese im Patienten ähnelt und somit für das Austesten gezielter Tumorthérapien verwendet werden kann.

## 4.1 Phänotypvergleich

### 4.1.1 c-myc induzierte Hepatokarzinogenese

Mit Hilfe der Pronukleusinjektion konnten zwei transgene Mauslinien etabliert werden, die nach leberspezifischer Induktion des Protoonkogens c-myc und des Modellantigens OVA Lebertumore entwickelten. Neonatal induzierte c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse zeigten einen ähnlichen Verlauf der Hepatokarzinogenese verglichen mit c-myc tg+ Mäusen, während die c-myc/OVA 100 tg+ Tiere deutlich später an Lebertumoren erkrankten (3.2.1; Abb.3.15; Beer et al. 2004).

Die bei neonataler Induktion des Protoonkogens c-myc induzierte Hepatokarzinogenese verlief in c-myc tg+ (5-10 Wochen) und in c-myc/OVA 75 tg+ (5-8 Wochen) Mäusen deutlich schneller ab, als in bereits publizierten transgenen Mausmodellen, bei denen chemische Karzinogene zur Lebertumorinduktion verwendet wurden (Lipskey et al. 1981). Auch die Verwendung des SV40 Tag Transgens führte erst nach 5 Monaten (Romieu et al. 1998) bzw. 3-7 Monaten (Sandgren et al. 1989) zu Lebertumoren. Da zwischen der Hepatokarzinogenese der c-myc/OVA 75 tg+ und c-myc tg+ Mäuse kein großer zeitlicher Unterschied nachweisbar war, ist anzunehmen, daß gegen das Modellantigen OVA keine starke Immunantwort gerichtet ist, was sich sonst eventuell in einer verzögerten Tumorgenese oder idealerweise im Ausbleiben des Tumorwachstums äußern würde.

Die verzögerte Hepatokarzinogenese in c-myc/OVA 100 tg+ (8-20 Wochen) Mäusen nach neonataler Induktion kann auf mehrere Weisen erklärt werden.

C57BL/6J transgene Mäuse sind, verglichen mit anderen Mausstämmen, weniger anfällig für Tumore und somit wurde vermutet, daß eine Verzögerung in der Hepatokarzinogenese mit dem Mausstamm zusammenhängen könnte. Es konnte eine im Vergleich zur Hepatokarzinogenese in den c-myc/OVA 100 tg+ Mäusen schneller verlaufende Tumorentwicklung in den mittlerweile mehr als 10 mal zurückgekreuzten c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit beruht die verzögerte Hepatokarzinogenese in den c-myc/OVA 100 tg+ Mäusen nicht auf dem reinen C57BL/6J Hintergrund.

Eine weitere, naheliegende Möglichkeit der späteren Hepatokarzinogenese der c-myc/OVA 100 tg+ Mäuse könnte mit der Kopienzahl des c-myc Transgens zusammenhängen, welche im Genom integriert wurden. Bei der Pronukleusinjektion handelt es sich nicht um ein gezieltes

Einbringen einer definierten Kopienzahl der gewünschten Transgene. Die linearisierte DNA wird in den männlichen Vorkern injiziert, wobei die Anzahl der integrierten Kopien des Konstruktes, sowie der Integrationsort ungerichtet erfolgt. Somit könnte auch der Integrationsort der DNA in direktem Zusammenhang mit der verzögerten Hepatokarzinogenese in den c-myc/OVA 100 tg+ Mäusen stehen.

Die sehr rasche Hepatokarzinogenese embryonal induzierter c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen innerhalb weniger Tage nach Geburt fand sich auch bei den publizierten c-myc tg+ Tieren (3.2.1; Abb.3.15; Beer et al. 2004). Die Hepatokarzinogenese bei Mäusen, die im adulten Stadium induziert wurden, verläuft über eine Endoreduplikation des Genoms der Zellen mit einem zunächst andauernden mitotischen Arrest, gefolgt von einer Proliferation und Entartung der Hepatozyten (Beer et al. 2004).

Die embryonale und neonatale Hepatokarzinogenese in c-myc tg+ Mäusen, aber auch in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren zeichneten sich durch eine starke Proliferation der Tumorzellen aus, was durch eine hohe Anzahl von Ki67 positiven, tumorös veränderten Zellen nachgewiesen werden konnte (3.2.2; Abb.3.16; Beer et al. 2004). Obwohl die Zeitspanne der Tumorentstehung bei den c-myc/OVA 100 tg+ Mäusen deutlich länger ist als bei den publizierten c-myc tg+ Mäusen und den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren, zeigte sich kein Unterschied in dem proliferativen Verhalten der Tumorzellen (3.2.1; Abb.3.15; 3.2.2; Abb.3.16). Daß das proliferative Verhalten eine bedeutende Rolle bei der Hepatokarzinogenese spielt und für den zeitlichen Unterschied der Tumorentwicklung je nach c-myc Induktion mit verantwortlich ist, konnte Beer et al. zeigen (Beer et al. 2004). Eine partielle Hepatektomie führte in der Leber von c-myc tg+ Mäusen zu einem starken Anstieg an proliferativen Hepatozyten, um eine möglichst schnelle Leberregeneration zu erreichen. Wird nun den Mäusen, denen im adulten Stadium c-myc induziert wurde, ein Teil der Leber entfernt, resultiert diese Entfernung nicht nur in einem Anstieg an proliferativen Zellen, sondern auch in einer verfrühten, allerdings im Vergleich zur neonatalen Induktion dennoch verzögerten, Lebertumorentwicklung (Beer et al. 2004). Das proliferative Verhalten stellt folglich einen Grund für die unterschiedliche Hepatokarzinogenese dar, bestimmt aber nicht alleinig die Ursache. Mitverantwortlich für die Entwicklung der Hepatokarzinogenese ist auch der Zeitpunkt der c-myc Expression.

Es fiel auf, daß bei neonataler c-myc/OVA Induktion in c-myc/OVA tg+ Mäusen nicht alle Hepatozyten gleichzeitig entarteten, sondern daß multifokale Tumorknoten entstanden waren, die allmählich das gesunde Gewebe verdrängten (3.2.2; Abb.3.16). Auch variierte die Entstehung der Lebertumore innerhalb eines Mausstammes zwischen 5-8 Wochen

(c-myc/OVA 75 tg+) bzw. 8-20 Wochen (c-myc/OVA 100 tg+; 3.2.1; Abb.3.15). Verpaarungen der Reportermaus LAP tTA mit  $\beta$ -Gal<sup>32</sup> exprimierenden Mäusen hingegen zeigten, daß sich die Expression des Tetrazyklin abhängigen Transaktivators homogen auf die gesamten Hepatozyten verteilt (Kistner et al. 1996) und somit nicht unbedingt ein Grund für diese Variabilität darstellen muß. Eine mögliche Erklärung besteht in der c-myc induzierten Proliferation, die nicht unbedingt allein für die Tumorentstehung verantwortlich ist, wie auch schon die Experimente in den adulten induzierten c-myc tg+ Mäusen gezeigt haben (Beer et al. 2004). Neben des proliferativen Verhaltens der Hepatozyten wie es oben beschrieben wurde, spielte bei der c-myc induzierten Hepatokarzinogenese im adulten Tier auch noch der Verlust von p53, einem Tumorsuppressorgen, eine entscheidende Rolle (Beer et al. 2004). Befunde von Shachaf et al. zeigten, daß eine in adulten Mäusen durch c-myc induzierte Hepatokarzinogenese reversibel ist. Eine c-myc Inaktivierung führte zu einer Tumorregression, gekennzeichnet durch den Verlust der Expression des Tumormarkers AFP. Neben den Leberzellmarkern Zytokeratin 8 und CEA<sup>33</sup> konnte in einigen Zellen auch der Leber Stammzellmarker Zytokeratin 19 nachgewiesen werden. Diese Zellen waren in der Lage bei erneuter c-myc Induktion wieder zu entarten. Die Befunde deuteten darauf hin, daß c-myc zu einer Entartung von unreifen Leberzellen mit Stammzellcharakter beitrug (Shachaf et al. 2004), eine Beobachtung die sich mit Befunden, daß Lebertumore aus Stammzellen entstehen, deckte (Thorgeirsson 1996).

#### 4.1.2 c-myc und OVA Expression

Eine neonatale Induktion von c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse resultierte innerhalb weniger Wochen in einer starken Hepatokarzinogenese. Wenngleich mit Hilfe der RT PCR Analyse eine starke OVA und c-myc Expression sowohl im Lebertumorknoten, als auch in dem gesunden, angrenzenden Normalgewebe nachweisbar war (3.2.3; Abb.3.18), konnte eine OVA Expression auf immunhistochemischer Ebene lediglich in den Lebertumoren nachgewiesen werden (3.2.3; Abb.3.20). Dieses Ergebnis läßt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu. Zum einen muß die Expression eines Gens auf RNA Ebene nicht zwangsläufig mit einem Proteinnachweis korrelieren, da eine Proteinexpression bzw. deren Kontrolle auch posttranskriptionell möglich ist. Des weiteren könnte die Expression auf

---

<sup>32</sup>  $\beta$ -Galaktosidase

<sup>33</sup> *engl.*: carcino-embryonic antigen

Proteinebene im angrenzenden, normalen Gewebe niedriger ausfallen als im Lebertumorbereich und somit unter der Nachweisgrenze der Immunhistochemie liegen.

Setzt man die OVA Expression der c-myc Expression gleich, so deckten sich die Ergebnisse mit den publizierten Daten in den neonatal induzierten c-myc tg<sup>+</sup> Mäusen, bei denen ebenfalls eine erhöhte c-myc Expression in den stark proliferierenden Tumorzellen nachweisbar war (Beer et al. 2004). Auch in anderen beschriebenen Tumormodellen ist oftmals die Expression des Transgens im Tumor höher als im normalen, gesunden Gewebe (Weiss et al. 2003).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist durch eine Vielzahl von Funktionen gekennzeichnet, die nicht nur mit der Proliferation von Zellen oder der Tumorentwicklung zusammenhängen, sondern auch das Zellwachstum und die Apoptose betreffen (Pelengaris et al. 2002 a; Schlosser et al. 2003). Ebenso hat c-myc einen Einfluß auf die für die Initiation der Translation wichtigen Faktoren eIF-4E und die  $\alpha$  Untereinheit des eIF-2 Komplexes, was somit c-myc eine Funktion in der Proteinbiosynthese zuspricht (Rosenwald et al. 1993). Dies könnte somit auch mitverantwortlich für die verstärkte OVA Expression im Tumorbereich sein.

## 4.2 Immunologische Analyse

### **4.2.1 Frühe tumorspezifische Antigenerkennung in der Leber und verzögerte Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen**

Transferierte OVA spezifische T-Zellen akkumulierten 24 h nach adoptivem Transfer in der Leber von c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen und regulierten CD69 hoch, was auf eine antigenspezifische Stimulierung der T-Zellen hindeutet. Wenngleich in den sekundär lymphatischen Organen (Milz, ILK, LLK) nur wenige antigenspezifische T-Zellen nachweisbar waren, zeigten diese ebenfalls eine CD69 Hochregulation (3.3.2; Abb.3.22). Dafür kann es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten geben. Zum einen kann in den sekundär lymphatischen Organen ebenfalls OVA von antigenpräsentierenden T-Zellen präsentiert werden, zum anderen können sich die stimulierten OVA spezifischen T-Zellen nach Antigenerkennung auf die sekundär lymphatischen Organe verteilt haben. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl in der Leber, als auch in der Milz DCs an der Antigenpräsentation

beteiligt waren (3.3.3; Abb.3.25), was somit eher für eine direkte Stimulierung der T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen spricht. Ob in dem LLK und ILK ebenfalls Antigenpräsentation durch DCs erfolgt oder weitere APCs beteiligt sind, muß noch untersucht werden.

Mit Hilfe der RT PCR Analysen konnte keine OVA Expression in den sekundär lymphatischen Organen, wie der Milz, dem ILK und LLK und in dem primär lymphatischen Organ, dem Thymus, nachgewiesen werden (3.2.3; Abb.3.18). Auch immunhistologische Analysen zeigten keine Tumormetastasen in den lymphatischen Geweben (Daten nicht gezeigt). Dies läßt die Vermutungen zu, daß das Antigen von dem primären Bildungsort, der Leber, stammt. Ob nun durch den hohen apoptotischen und nekrotischen Anteil der Lebertumore (3.3.4; Abb.3.27; Beer et al. 2004) Antigen freigesetzt wurde und systemisch in der Milz und eventuell auch in den Lymphknoten von APCs aufgenommen wurde, oder ob DCs in der Leber OVA aufgenommen haben und in die sekundär lymphatischen Organe gewandert sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Tumorantigenfreisetzung durch Exosome und anschließende Aufnahme durch DCs konnte in einem humanen *in vitro* Modell gezeigt werden (Wolfers et al. 2001).

In Tumortransplantationsmodellen konnte präsentiertes Tumorantigen konstitutiv im drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden, während in der Milz und in den nicht drainierenden Lymphknoten, im Gegensatz zu unseren Daten, kein Hinweis auf präsentiertes Tumorantigen gefunden werden konnte (Marzo et al. 1999).

Wenngleich die Transplantation von Tumorzellen die Gefahr birgt, daß sich Tumorzellen ablösen und systemisch verteilen, konnten in diesem Modell vorhandene Tumorzellen durch *in vitro* Kultur der Lymphknoten und über PCR Analyse ausgeschlossen werden. Dies unterstützt die Vermutung, daß professionelle APCs an der Aufnahme von Tumorantigenen und einer anschließenden Wanderung in die drainierenden Lymphknoten beteiligt sind (Marzo et al. 1999).

Obwohl in der Milz und in der Leber von c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen OVA präsentierende DCs nachweisbar waren, akkumulierten 24 h nach adoptivem T-Zelltransfer antigenspezifische T-Zellen zunächst in der Leber (3.3.2; Abb.3.22). Erst 66 h bzw. 5 d nach adoptivem T-Zelltransfer konnten in der Milz und den Lymphknoten antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen werden (3.3.5; Abb.3.31). Eine mögliche Erklärung für die Präferenz der Akkumulation der transferierten, antigenspezifischen T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse, könnte eventuell mit Ergebnissen von von Oppen et al. erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, daß lösliches OVA Antigen von lebersinusoidalen Endothelzellen

(LSEC) präsentiert wird, zu einer antigenspezifischen Retention naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber führte (von Oppen et al., Manuskript eingereicht). Trotz der Präsenz professioneller APC in der Milz, der Lunge, dem Darm oder den Lymphknoten konnte diese antigenspezifische Adhäsion, als Folge der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen, in diesen Organen nicht beobachtet werden. Ob in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen in der Leber noch weitere APCs, wie beispielsweise LSEC, an der OVA Präsentation beteiligt sind, bleibt noch zu untersuchen.

Die RT PCR Analysen (3.2.3; Abb.3.18) und die publizierten Analysen der verwendeten Reportermaus (LAP tTA; Kistner et al. 1996) zeigten eine im Vergleich zur Leber niedrigere Expression des Transaktivators in der Niere und der Lunge. Ob sich, neben der Leber und den sekundär lymphatischen Organen, OVA spezifische T-Zellen auf andere Organe, wie z.B. die Lunge oder Niere verteilen, bleibt ebenfalls noch zu untersuchen. Eine Überexpression von c-myc in den renalen, tubulären Epithelien, unter Verwendung des  $\beta$ -Globin Promotors, führte zu einer abnormalen Proliferation und endete in einer polyzystischen Nierenerkrankung, an der die Mäuse innerhalb von 6-12 Wochen durch ein Nierenversagen verstarben (Trudel et al. 1991). Da die c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäuse nach Induktion von c-myc makroskopisch und mikroskopisch keine Veränderung der Nieren gezeigt haben (Daten nicht gezeigt), scheint die mit Hilfe der RT PCR Analyse ermittelte c-myc Expression in der Niere eine geringere Bedeutung zu spielen.

#### **4.2.2 Fehlende Tumorregression nach adoptivem Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Bereits 24 h nach adoptivem Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine Akkumulation dieser Zellen in der Leber von c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen beobachtet werden, die auch in der Lage waren, ins Tumorgewebe einzudringen (3.3.2; Abb.3.23). Eine stärkere Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen konnte 5 d nach adoptivem Transfer im Lebertumorgewebe von c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen nachgewiesen werden (3.3.5; Abb.3.29), wengleich eine effektive Tumorregression und ein damit verbundener zusätzlicher Anstieg an apoptotischen Tumorzellen ausblieb (3.3.4; Abb.3.27).

Eine gegen das Tumorgewebe gerichtete, fehlende zytotoxische Effektorfunktion scheidert oftmals an physiologischen Barrieren. RIP1-Tag5 transgene Mäuse, die ein rekombinantes Insulin/Simian 40 Onkogen unter der Kontrolle des Ratteninsulinpromotors exprimieren,

entwickelten ausgehend von den Langerhans'schen Inseln Insulinome (Hanahan 1985; Adams et al. 1987). Diese Insulinome zeichneten sich durch ein irreguläres Gefäßnetzwerk aus und waren durch fehlende Lymphozyteninfiltrate und eine damit verbundene fehlende Tumorrogression gekennzeichnet (Ganss et al. 2002). Erst eine Bestrahlung der Mäuse vor dem adoptivem T-Zelltransfer, was vermutlich zu einem proinflammatorischen Tumormikromilieu führte, resultierte in einer Lymphozyteninfiltration in das Gewebe und schließlich in einer kompletten Tumorrogression (Ganss et al. 2002).

Wenngleich in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen keine effektive Tumorrogression gegen den autochthonen Lebertumor beobachtet werden konnte, waren dennoch die transferierten T-Zellen in der Lage, in das Tumorgewebe einzuwandern, ein Befund, der nicht mit den Daten aus den RIP1-Tag5 Mäusen in Einklang steht. Möglicherweise gibt es organspezifische und /oder Tumormikromilieu-spezifische Faktoren, welche diese Unterschiede in den beiden Modellen erklären können. Ob eine zusätzliche Bestrahlung c-myc/OVA 75 tg+ Mäuse zu einer verstärkten Infiltration von antigenspezifischen T-Zellen und schließlich zu einer Tumorrogression führen würde, müßte noch untersucht werden.

Die fehlende Tumorrogression der antigenspezifischen T-Zellen, trotz Präsenz im Lebertumorgewebe, deutet darauf hin, daß die T-Zellen tolerant waren. Aktivierte T-Zellen unterscheiden sich von naiven T-Zellen nicht nur durch die Expression eines größeren Spektrums an Molekülen, die für die Interaktion mit Endothelien wichtig sind (Crispe et al. 2000), sondern zeigen auch Unterschiede im Migrationsverhalten. Während aktivierte T-Zellen üblicherweise in Gewebe vordringen, patrouillieren naive T-Zellen im allgemeinen über Blut und Lymphe durch den Körper, bis sie aktiviert werden.

Obwohl die transferierten, antigenspezifischen T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen nicht aktiviert waren und keine zytotoxische Aktivität aufwiesen, konnten sie im Lebertumorgewebe detektiert werden. Dies könnte man eventuell mit Befunden von Diehl et al. erklären. Die Tolerisierung naiver T-Zellen durch LSEC *in vitro* resultiert in einer hohen Expression von CD44 und CD62L, während CD25 herunterreguliert wird (Diehl et al. 2008). Naive und aktivierte T-Zellen unterscheiden sich in den Oberflächenmolekülen, die sie exprimieren. So zeichnen sich naive T-Zellen durch eine  $CD25^{\text{niedrig}} CD44^{\text{niedrig}} CD62L^{\text{hoch}}$  Expression aus, während aktivierte T-Zellen  $CD25^{\text{hoch}} CD44^{\text{hoch}} CD62L^{\text{niedrig}}$  exprimieren. Die durch LSEC tolerisierten CD8+ T-Zellen besitzen durch die Expression von CD62L, ähnlich wie naive T-Zellen, die Fähigkeit in den Lymphknoten zu wandern, während aktivierte T-Zellen dazu nicht mehr in der Lage sind. Ebenso unterstützt die Expression von CD44 die Extravasation ins Gewebe (DeGrendele et al. 1997). Somit scheinen durch LSEC tolerisierte

CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage zu sein, ähnlich wie naive T-Zellen, lymphatisches Gewebe zu durchwandern, aber auch, ins Gewebe einzudringen, wie aktivierte T-Zellen. Ob in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen ebenfalls eine Toleranzinduktion durch die LSEC stattfindet, ist bislang noch nicht geklärt. Die Eigenschaften der durch LSEC tolerisierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen allerdings könnten eine Erklärung liefern, weswegen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe nachweisbar sind, diese allerdings keine Effektorfunktionen zeigen und somit nicht zu einer Tumorregression führen. Die verstärkte Ansammlung der antigenspezifischen, transferierten T-Zellen 66 h bzw. 5 d nach adoptivem Transfer in den Lymphknoten müsste somit auch nicht unbedingt mit einer direkten Antigenerkennung in diesen sekundär lymphatischen Geweben zusammenhängen, sondern könnte mit der eventuell noch vorhandenen hohen CD62L Expression tolerisierter T-Zellen zusammenhängen. Um dieser Frage nachzugehen ist die Charakterisierung der tolerisierten T-Zellen bezüglich der Expression von CD44, CD62L und CD25 notwendig.

Daß die Leber einen präferenziellen Ort für die Retention von naiven, antigenspezifischen T-Zellen darstellt, zeigten Daten von Bertolino et al., die ebenfalls eine erhöhte Retention antigenspezifischer DesTCR CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber transgener Mäuse, die H-2K<sup>b</sup> unter dem MHC Klasse I Promotor exprimieren, beobachten (Bertolino et al. 2005). Durch die ubiquitäre Expression des Antigens konnte in diesen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden, welche Zellen für die Retention verantwortlich sind, allerdings konnte der Interaktion zwischen ICAM-1<sup>34</sup> und LFA-1 auf den Donor T-Zellen und den Leberzellen eine bedeutende Rolle zugesprochen werden (Bertolino et al. 2005).

Mit Hilfe der TUNEL-Methode konnte die fehlende Tumorregression durch die transferierten, antigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden (3.3.4; Abb.3.27). Es konnte kein signifikanter Anstieg an apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen in c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen, in die antigenspezifische T-Zellen injiziert wurden, nachgewiesen werden. Mittels der TUNEL-Methode werden in der Leber zusätzlich zu den apoptotischen Zellen auch nekrotische Zellen angefärbt (Grasl-Kraupp et al. 1995).

Eine c-myc induzierte Apoptose wurde als ein Mechanismus in der Verhinderung einer Tumorentstehung beschrieben (Evan et al. 1992; Pelengaris et al. 2000; 2002 b). Die Daten zeigten, daß eine c-myc induzierte Apoptose im Tumorknoten die Hepatokarzinogenese nicht verhindert, ähnlich zu den Befunden in c-myc tg<sup>+</sup> Mäusen (Beer et al. 2004).

---

<sup>34</sup> *engl.*: intercellular adhesion molecule-1

### 4.2.3 Toleranzinduktion in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen

Die fehlende *in vivo* Zytotoxizität (3.3.4; Abb.3.26) und die fehlende IFN- $\gamma$  Produktion 66 h und 5 d (3.3.6; Abb.3.32) nach adoptivem antigenspezifischen T-Zelltransfer in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen spricht für eine Toleranzinduktion der transferierten T-Zellen. Die Leber spielt bei der peripheren Toleranz eine entscheidende Rolle. Sowohl die Eliminierung aktivierter T-Zellen, als auch eine aktive Tolerisierung von naiven T-Zellen wurde in der Leber während unterschiedlicher Immunantworten beschrieben (Huang et al. 1994; Bertolino et al. 1998; Limmer et al. 2000; Thomson et al. 2002). Diese unterschiedlichen Ausgänge einer T-Zellaktivierung in der Leber können mit verschiedenen Zellpopulationen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, zusammenhängen.

In einem transgenen *ex vivo* Modell konnte gezeigt werden, daß H2k<sup>b</sup> exprimierende Hepatozyten in der Lage sind, Des-TZR CD8+ T-Zellen zunächst zu aktivieren. Die CD8+ T-Zellen exprimierten unterschiedliche Aktivierungsmarker, proliferierten und zeigten zunächst spezifische zytotoxische T-Zellaktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung unabhängig von kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) auf den Hepatozyten und einer CD4+ T-Zellhilfe induziert wurde. Im Gegensatz zu T-Zellen, die durch professionelle APCs aktiviert wurden, zeigte sich nach 3 Tagen Kokultivierung eine Apoptose der zunächst durch die Hepatozyten aktivierten T-Zellen, die durch IL-2 Zugabe verhindert werden konnte (Bertolino et al. 1998).

Ebenso konnte eine Toleranzinduktion bei Lebertransplantationen beobachtet werden. Hier wurden alloreaktive CD8 T-Zellen, welche für ihr Leberantigen spezifisch sind, apoptotisch. In diesen Modellen ist unklar, ob die Antigene primär in der Leber oder im Lymphknoten erkannt werden (Benseler et al. 2007).

In c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen konnte eine Stimulierung und damit verbundene CD69 Hochregulation transferierter CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (3.3.2; Abb.3.22). Nach anfänglicher Proliferation (3.3.5; Abb.3.31) der transferierten antigenspezifischen T-Zellen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen blieb eine effektive Tumorregression und *in vivo* Zytotoxizität aus (3.3.4; Abb.3.26; Abb.3.27). Die transferierten antigenspezifischen T-Zellen wurden tolerisiert. An der Antigenpräsentation waren sowohl milzassozierte, als auch tumorassozierte DCs in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen beteiligt (3.3.3; Abb.3.25). Interessanterweise konnte eine erhöhte Anzahl an tumorassozierten DCs in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen gefunden werden, was entweder für ein verstärktes, selektives Einwandern in das tumorös veränderte Gewebe spricht, oder zu einer Expansion von residenten DCs im

Lebertumorbereich geführt hat (3.3.3; Abb.3.24). DCs stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der innate und adaptiven Immunantwort dar.

Wenngleich die *c-myc/OVA 75 tg+* Mäuse trotz der hohen Anzahl an tumorinfiltrierenden DCs relativ schnell verstarben, konnte eine Studie bei Patienten kolorektaler Karzinome zeigen, daß eine erhöhte Anzahl von tumorinfiltrierenden DCs mit einer besseren Prognose und längeren Überlebensdauer der Patienten verbunden war (Nagorson et al. 2007).

Im Gegensatz zu milzassoziierten DCs, scheinen leberassoziierte DCs eher tolerogene Eigenschaften zu besitzen, was auf ein suppressives Milieu innerhalb der Leber durch die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10, zurückzuführen ist (Steinbrinck et al. 1997; Lau und Thomson 2003).

Ob die Kreuzpräsentation zu einer Aktivierung oder Toleranzinduktion führt, hängt wesentlich von den Signalen ab, die eine DC erhält. So kann die Invasion eines Tumors bei beginnender Metastasierung gesundes, angrenzendes Gewebe zerstören und ausreichende Signale liefern, die die DCs aktivieren und somit zu einer effektiven Tumorantwort führen können (Fuchs und Matzinger 1996). Die Abwesenheit inflammatorischer Signale hingegen kann zu einer Interaktion zwischen immaturren DCs und T-Zellen führen, was zu einer Toleranzinduktion führt (Fuchs und Matzinger 1996). Unter nicht inflammatorischen Umständen kommt es erschwert zu einer effektiven Immunantwort und dies könnte eine mögliche Erklärung für die Toleranzinduktion in den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen sein.

Ob die in den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen stark erhöhte Anzahl von DCs in der Tumorleber an der Toleranzinduktion beteiligt ist, bleibt zu klären. Eine Toleranzinduktion kann nicht nur durch das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86), sondern auch durch das Einwirken von inhibitorischen Signalen (PDL-1) hervorgerufen werden.

So spielt die Interaktion über PD-L1:PD-1 zwischen DCs und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine bedeutende Rolle bei der peripheren Toleranzinduktion (Probst et al. 2005). Tumorassoziierte DCs exprimieren vermehrt PD-L1 und eine Kokultivierung von T-Zellen und DCs, zusammen mit PD-L1 blockierenden Antikörpern, resultierte in einer besseren Fähigkeit, das Wachstum eines autologen humanen Ovarialkarzinoms in NOD<sup>35</sup>-SCID<sup>36</sup> Mäusen zu verhindern (Cruet et al. 2003).

Ebenso weisen verschiedene humane Tumore eine erhöhte Expression von PD-L1 auf, wie beispielsweise Melanome, Kolon-, Lungen- oder Ovarialkarzinome (Dong et al. 2002). Die Expression von PD-L1 auf Tumoren förderte deren Wachstum und induziert verstärkt eine

---

<sup>35</sup> *engl.*: non-obese diabetic

<sup>36</sup> *engl.*: severe combined immunodeficiency

Apoptose in tumorspezifischen T-Zellen (Dong et al. 2002). Diese Befunde geben Hinweise darauf, daß die inhibitorischen Signale von PD-L1:PD-1 Tumoren einen Selektionsvorteil ermöglichen, dem Immunsystem zu entgehen und daß eine Blockade von PD-L1:PD-1 eventuell eine mögliche Tumorthherapie darstellt.

Ob in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen eine erhöhte PD-L1 Expression auf den DCs oder dem Tumor, für die antigenspezifische T-Zelltoleranz verantwortlich ist, wird zur Zeit untersucht. Entgegen den Beobachtungen in c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, einer anfänglichen T-Zellstimulierung (CD69 Hochregulation) und Proliferation transferierter antigenspezifischer T-Zellen, beruht die Toleranzinduktion durch DCs über PD-L1:PD-1 Interaktion auf einer Deletion der T-Zellen (Probst et al. 2005).

Eine in der Leber induzierte Toleranz konnte ebenfalls für die LSEC beschrieben werden (Limmer et al. 2000). Diese war durch eine anfängliche Stimulierung der T-Zellen, ähnlich wie die Ergebnissen in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, gekennzeichnet. LSEC sind in der Lage, *in vitro* und *in vivo* eine periphere CD8+ T-Zelltoleranz über eine Interaktion mit PD-L1:PD-1 zu induzieren (Diehl et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, daß LSEC apoptotische Tumorzellfragmente kreuzpräsentieren und eine tumorspezifische CD8+ T-Zelltoleranz induzieren können (Berg et al. 2005). Die durch LSEC vermittelte tumorspezifische CD8+ T-Zelltoleranz verläuft ähnlich wie die in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen induzierte Toleranzinduktion über eine anfängliche T-Zellstimulierung und Proliferation.

In den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen konnte endogen eine Erhöhung an CD3+ CD8- T-Zellen im Lebertumorbereich nachgewiesen werden. Zur Zeit wird untersucht, ob es sich bei diesen Zellen um CD4+ T-Zellen oder Tregs (1.2.4; Abb.1.1. B) handelt.

Tregs sind in der Lage durch direkten Kontakt mit den CD4+ und CD8+ T-Zellen oder durch eine Interaktion mit APCs tumorspezifische T-Lymphozyten zu inhibieren (Sakaguchi 2000 a und b). Eine Depletion dieser Tregs kann zu einer Immunantwort durch CD8+ T-Zellen und NK-Zellen gegen einen syngenen Tumor führen, der in unbehandelten Tieren nicht erkannt wird (Shimizu et al. 1999; Onizuka et al. 1999).

In wieweit in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen die tumorassoziierten DCs, die LSECs, die Tregs bzw. NKT-Zellen (1.2.4; Abb.1.5 A) an der Toleranzinduktion beteiligt sind, ist Gegenstand der aktuellen Untersuchungen. Ebenso bleibt zu untersuchen, ob in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen die Tumorzellen selbst in der Lage sind, das Antigen zu präsentieren und eventuell aufgrund unzureichender Stimulierung der T-Zellen zur Toleranz beitragen.

In den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen konnte die Toleranzinduktion der transferierten OVA spezifischen T-Zellen nicht nur für die Leber, sondern auch für die Milz gezeigt werden. Arbeiten von Bowen et al. zeigten hingegen eine periphere Toleranzinduktion in der Leber und eine Immunität in den sekundär lymphatischen Organen (Bowen et al. 2004). Derzeit werden in den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen die Immunantwort in dem ILK und LLK hinsichtlich Toleranzinduktion und Immunität untersucht.

#### **4.2.4 Partielle Herunterregulation des T-Zellrezeptors, ein möglicher Mechanismus in der Toleranzinduktion**

Eine induzierte T-Zelltoleranz konnte in verschiedenen Tumormodellen, sowohl bei Prostatakarzinomen (Tseng-Rogenski et al. 2008), als auch bei Mammakarzinomen (Worschech et al. 2008) beobachtet werden.

Neben der Deletion, Anergie und Ignoranz, stellt die Herunterregulation des TZR einen weiteren peripheren, aber reversiblen Toleranzmechanismus dar. Die partielle Herunterregulation des TZR, bereits 24 h nach zelladaptivem Transfer in *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen (3.3.7; Abb.3.34), könnte eine Erklärung für die fehlende, effektive Tumorregression sein. Aufgrund der Herunterregulation des TZR ist ein effektives T-Zellrezeptorsignal, welches für eine optimale T-Zellaktivierung notwendig ist, nicht gewährleistet (van Stipdonk et al. 2003). Die Zellen werden tolerant.

Eine Herunterregulation des TZR und des CD8<sup>+</sup> Korezeptors konnte in Mäusen gezeigt werden, die das MHC Klasse I Molekül K<sup>b</sup> auf Zellen des Neuroektoderms und den K<sup>b</sup>-spezifischen TZR exprimieren. Eine *in vitro* Stimulation dieser Zellen mit Antigen brachte den TZR wieder zum Vorschein (Schönrich et al. 1991). Ob die Herunterregulation des TZR in den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen reversibel ist, wird zur Zeit analysiert. Dazu werden die toleranten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen isoliert, in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert und zu verschiedenen Zeiten überprüft, ob der TZR wieder hochreguliert wird. In den hier beschriebenen Experimenten konnte keine Herunterregulation des CD8 Korezeptors in den *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen beobachtet werden, im Unterschied zu den Daten von Zhang et al. (3.3.5; Abb.3.28; Zhang et al. 1995). Zhang et al. konnte zeigen, daß die intravenöse Applikation von männlichen Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen in C57BL/6 anti-HY TZR transgene Weibchen, nach 6 Wochen zu einer drastischen Reduktion an männlichen Antigen-reaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt.

Es konnte von Ferber et al. gezeigt werden, daß eine Herunterregulation des TZR von der Antigenendosis abhängt. Eine niedrigere Antigenendosis des K<sup>b</sup> Moleküles auf Hepatozyten führte zu einer partiellen Herunterregulation des TZR, während eine höhere Antigenendosis mit dem kompletten Verlust des TZR auf der Oberfläche assoziiert ist (Ferber et al. 1994). Trotz starker OVA Expression im Lebertumorbereich, konnte in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen auch 5 d nach adoptivem Transfer von antigenspezifischen T-Zellen keine komplette Herunterregulation des TZR nachgewiesen werden. Verglichen mit den injizierten T-Zellen in den Kontrolltieren, konnte eine 9-fache Herunterregulation des TZR der antigenspezifischen T-Zellen in der Leber c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen, 5 d nach Transfer, nachgewiesen werden. Unklar bleibt, ob sich zu einem späteren Zeitpunkt eine weitere Herunterregulation des TZR zeigt, oder die injizierten T-Zellen deletiert werden. Dies wird derzeit untersucht.

Die TZR Herunterregulation in den c-myc/OVA 75 tg+ Tieren und die daraus resultierende antigenspezifische Toleranz könnte von Bedeutung sein, um eine fehlende Immunantwort bei humanen Krebspatienten zu erklären (Lee et al. 1999). In einigen klinischen Studien ist es möglich gewesen nach Antigenentzug Effektorfunktionen wiederzuerlangen (Drake et al. 2006). Dies zeigt, daß die Antigenmenge eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Immunabwehr spielt. Es konnte in Patienten mit unterschiedlichsten Tumoren, wie z. B. malignen Melanomen, Nierenzellkarzinomen, Ovarialkarzinomen oder Kolorektalkarzinomen, eine Herunterregulation der TZR  $\xi$ -Kette beobachtet werden (Bukowski et al. 1998; Whiteside 2004; Kim et al. 2005; Pignataro et al. 2007).

Weiterhin konnte eine Herunterregulation des TZR in einem oral induzierten transgenen Mausmodell beobachtet werden. Dabei reduzierte sich nicht nur aufgrund anhaltenden Antigenkontakts, die Expression des TZR auf der Oberfläche, sondern dies hing auch mit einem internen Anstieg der TZR Level zusammen, gefolgt von der Deletion antigenspezifischer T-Zellen (Benson et al. 2000).

#### **4.2.5 Vakzinierung mit CpG ODN und OVA führt nicht zur Aufhebung der Toleranz**

Die zusätzliche Stimulierung mit CpG ODN und OVA führte in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen nicht zu einer Aufhebung der antigenspezifischen Toleranz (3.3.6; Ab.3.33). CpG ODN bindet an APCs über TLR-9 und stimulieren diese zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12. Appliziert man CpG ODN zusammen mit Antigenen als

Adjuvanz *in vivo*, wird eine starke Th1 Immunantwort ausgelöst (Malletto et al. 2002) und es werden zytotoxische T-Zellen aktiviert (Wild et al. 1999; Sparwasser et al. 2000).

Nicht nur die durch CpG ODN Induktion entstehende IL-12 Produktion kann zur Aktivierung von T-Zellen führen, sondern die intratumorale Injektion von IL-12 kann zu einer erfolgreichen Tumorregression in einem murinen Lungentumormodell führen. Zunächst führte die intratumorale Applikation von IL-12 zu einer kurzzeitigen Aktivierung und anschließenden Apoptose von tumorassoziierten Effektor/Gedächtnis CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zur Entfernung von Tregs im Tumorgewebe, die effektiv eine Proliferation verhindern können. Sieben Tage nach Therapie konnten nicht apoptotische, aktivierte CD8 Effektor T-Zellen im Lebertumorgewebe nachgewiesen werden, die zu einer erfolgreichen Tumorregression führten (Kilinc et al. 2006).

Transgene Mäuse, die das MHC Klasse I Molekül K<sup>b</sup> auf Hepatozyten exprimieren, zeigten eine antigenspezifische T-Zelltoleranz, die durch die Gabe von CpG ODN *in vivo* aufgehoben werden konnte (Sacher et al. 2002). Dies führte zur Aktivierung K<sup>b</sup>-spezifischer T-Zellen und resultierte in einer Autoimmunantwort gegen K<sup>b</sup>-positive Hepatozyten. In dieser Studie führte die Applikation von CpG ODN zu einer Infiltration der T-Zellen ins Leberparenchym. Zusätzlich wurden kostimulatorische Moleküle und Adhensionsmoleküle hochreguliert, die eine Infiltration der T-Zellen ermöglichten und zum Erkennen des Antigens auf Hepatozyten in immunogener Form beitrugen, was letztendlich zu einem Leberschaden führte (Sacher et al. 2002).

Verglichen mit den Beobachtungen von Sacher et al., bei der es zur Autoaggression in der Leber kommt, ist die in *c-myc/OVA 75 tg+* Mäusen entstehende T-Zelltoleranz entweder irreversibel oder benötigt einen stärkeren Stimulus als die CpG ODN und OVA Applikation, um die T-Zelltoleranz wieder aufzuheben.

Die Ergebnisse könnten erklären, warum oftmals Immuntherapien in transplantierten Tumormodellen effektiv sind, während in autochthonen Tumormodellen eine erfolgreiche Tumorregression ausbleibt. Eine effektive T-Zell basierte Immuntherapie gegen Lebertumore müsste die TZR Herunterregulation aufheben, um eine tumorspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zu gewährleisten. Vakzinierungen, adoptive T-Zelltransfers (Weinhold et al. 2007), Veränderungen des Tumorstromas zur Kreuzpräsentation der Tumorantigene (Zhang et al. 2007) und CD4<sup>+</sup> T-Zelltransfers (Wall et al. 2007; Kennedy und Celis et al. 2008) müssen eventuell kombiniert werden, um eine erfolgversprechende Tumortherapie zu entwickeln. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit vorklinische Immuntherapien an autochthonen Tumormodellen zu testen.

### 4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein autochthones Lebertumormodell etabliert werden. Mit diesem Modell ist es möglich, die Tumortoleranzmechanismen näher zu charakterisieren und neuartige Therapiestrategien zur Behandlung von Lebertumoren zu testen. Die Vorteile des Modells bestehen in der Möglichkeit, sowohl antigenspezifische, als auch antigenunspezifische Immuntherapien anzuwenden. Ebenso können Immuntherapien zu unterschiedlichen Zeitpunkten, je nach Induktion der Hepatokarzinogenese, untersucht werden. Weiterhin bieten autochthone Tumormodelle die Möglichkeit das Tumormikromilieu bei der Anwendung verschiedener Therapiestrategien miteinzubeziehen. Durch die Verwendung von Reporter-mäusen mit unterschiedlichen Promotoren ist es möglich, eine c-myc Expression in der Haut bzw. den B-Lymphozyten, was zu Melanomen bzw. B-Zelllymphomen führt, zu induzieren und somit weitere autochthone Tumormodelle zu generieren.

Es konnte gezeigt werden, daß der adoptive Transfer antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwar zur Infiltration der Zellen in das Lebertumorgewebe führte, allerdings nicht zu einer Tumorrogression beitrug. Die transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden toleriert und der TZR Rezeptor wurde herunterreguliert.

Unklar ist bislang noch, welche Zellen an der Toleranzentwicklung beteiligt sind, und ob die Toleranz in den Lebertumoren oder den sekundär lymphatischen Organen induziert wird. In weiteren Experimenten soll überprüft werden, ob die im Lebertumorgewebe infiltrierenden DCs zur Toleranz beitragen oder ob leberresidente APCs, wie z. B. die LSEC, einen Einfluß auf die Aktivierung der transferierten T-Zellen haben. Dazu sollen isolierte DCs, LSEC oder Lebertumorzellen aus den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen mit antigenspezifischen T-Zellen *in vitro* kokultiviert werden, und die T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion (IL-2, IFN- $\gamma$ ) sowie *in vitro* Zytotoxizität überprüft werden. Anschließend soll untersucht werden, ob das Fehlen von kostimulatorischen Signalen oder das Einwirken inhibitorischer Signale (PD-L1) eventuell an der Toleranzinduktion beteiligt sind. Ebenso soll untersucht werden, ob und gegebenenfalls welche APCs in den Lymphknoten an der Antigenpräsentation beteiligt sind und ob diese zur Toleranz der transferierten T-Zellen beitragen.

Darüber hinaus sollen die im Lebertumorbereich endogenen CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Zellen in den c-myc/OVA 75 tg<sup>+</sup> Mäusen näher charakterisiert werden, um deren Funktion und eventuell auch deren Einfluß auf die Toleranzinduktion zu klären. Es bleibt zu untersuchen, ob in

c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen endogene OVA spezifische CD8+ und/oder CD4+ T-Zellen nachweisbar sind und gegebenenfalls, deren Immunstatus hinsichtlich Toleranz oder Effektorfunktion zu bestimmen.

Die Toleranzinduktion erfolgte in den c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen über den Mechanismus der TZR Herunterregulation. Es bleibt zu überprüfen, ob diese TZR Herunterregulation einen reversiblen Prozeß darstellt oder ob die T-Zellen eventuell zu einem späteren Zeitpunkt deletiert werden. Dazu sollen *in vivo* tolerisierte, antigenspezifische CD8+ T-Zellen aus c-myc/OVA 75 tg+ Mäusen isoliert, in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert und zu einem späteren Zeitpunkt quantifiziert werden. Ebenso soll die TZR Expression überprüft werden.

Weiterhin sollen zusätzliche Therapiestrategien ausgetestet werden, die entweder die TZR Herunterregulation wieder rückgängig machen und somit zu einer Aufhebung der Toleranz beitragen oder erst gar keine Toleranzinduktion bei gleichzeitiger Gabe von antigenspezifischen T-Zellen hervorrufen. Dazu können TLR Liganden, wie z. B. PolyI:C<sup>37</sup> (Lang et al. 2006) oder immunstimulierende Vakzine, wie z. B. ISCOM<sup>38</sup> (Maraskovsky et al. 2004), zusammen mit OVA und antigenspezifischen T-Zellen, im Hinblick auf eine erfolgreiche Tumorregression getestet werden.

---

<sup>37</sup> *engl.*: polyinosinic:polycytidylic acid

<sup>38</sup> *engl.*: immuno stimulating complex

## 5. Literaturverzeichnis

- Abrams** SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J (1996) Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol* 23(1):118-134
- Adams** JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL (1985) The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318(6046):533-538
- Adams** TE, Alpert S, Hanahan D (1987) Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. *Nature* 325(6101):223-228
- Albert** ML, Jegathesen M, Darnell RB (2001) Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2(11):1010-1017
- Alferink** J, Tafuri A, Vestweber D, Hallmann R, Hämmerling GJ, Arnold B (1998) Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 282(5392):1338-1341
- Anderson** MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley, SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298(5597):1395-1401
- Appleman** LJ, Boussiotis VA (2003) T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192:161-180
- Bahler** DW, Frelinger JG, Harwell LW, Lord EM (1987) Reduced tumorigenicity of a spontaneous mouse lung carcinoma following H-2 gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(13):4562-4566
- Banchereau** J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811
- Banchereau** J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-252
- Barrett** JC (1992) Mechanisms of activation of known human carcinogens. *IARC Sci Publ* 116:115-134
- Batley** J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G, Leder P (1983) The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34(3):770-787
- Baumheler** S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262(5132):436-438

- Beer S, Zetterberg A, Ihrie RA, McTaggart RA, Yang Q, Bradon N, Arvanitis C, Attardi LD, Feng S, Ruebner B, Cardiff RD, Felsher DW (2004)** Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS Biol* 2(11):1785-1798
- Benseler V, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bishop GA, Bowen DG, Bertolino P (2007)** The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis* 27(2):194-213
- Benson JM, Campbell KA, Guan Z, Gienapp IE, Stuckman SS, Forsthuber T, Whitacre CC (2000)** T-cell activation and receptor downmodulation precede deletion induced by mucosally administered antigen. *J Clin Invest* 106(8):1031-1038
- Berg M, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G, Limmer A, Knolle P (2006)** Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *Eur J Immunol* 36(11):2960-2970
- Berns EM, Klijn JG, Smid M, van Staveren IL, Lokk MP, van Putten WL, Foekens JA (1996)** TP53 and MYC gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 16(3):170-179
- Bertolino P, Heath WR, Hardy CL, Morahan G, Miller JF (1995)** Peripheral deletion of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* 25(7):1932-1942
- Bertolino P, Schrage A, Bowen DG, Klugewitz K, Ghani S, Eulenburg K, Holz L, Hogg N, McCaughan GW, Hamann A (2005)** Early intrahepatic antigen-specific retention of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. *Hepatology* 42(5):1063-1071
- Bertolino P, Trescol-Biémont, Rabourdin-Combe C (1998)** Hepatocytes induce functional activation of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 28(1):221-236
- Bevan MJ (1976)** Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117(6):2233-2238
- Beverly B, Kang SM, Lenardo MJ, Schwartz RH (1992)** Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation 4(6):661-671
- Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A (2001)** Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 181:203-214
- Bird AP (1980)** DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research* 8(7):1499-1504

- Bitton** RJ, Guthmann MD, Garbi MR, Carnero AJ, Alonso DF, Fainboim L, Gomez DE (2002) Cancer vaccines: an update with special focus on ganglioside antigens. *Oncol Rep* 9(2):267-276
- Bonnotte** B, Larmonier N, Favre N, Fromentin A, Moutet M, Martin M, Gurbuxani S, Solary E, Chauffert B, Martin F (2001) Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killer of tumor cells after immunization in a rat model system. *J Immunol* 167(9):5077-5083
- Boon** T, van der Bruggen P (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183(3):725-729
- Boon** T, van Pel A, de Plaen E, Chomez P, Lurquin C, Szikora JP, Sibille C, Mariamé B, van den Eynde B, Lethé B, et al. (1989) Genes coding for T-cell-defined tum transplantation antigens: point mutations, antigenic peptides, and subgenic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54(1):587-596
- Boon** T, Gajewski TF, Coulie PG (1995) From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol Today* 16(7):334-336
- Bouneaud** C, Kourilsky P, Bousso P (2000) Impact of negative selection on th T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13(6):829-840
- Bowen** DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P (2004) The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 114(5):701-712
- Bukowski** R, Rayman P, Uzzo R, Bloom T, Sandstrom K, Peereboom D, Olencki T, Budd GT, McLain D, Elson P, Novick A, Finke JH (1998) Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin Cancer Res* 4(10):2337-2347
- Burnet** FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27
- Buzard** GS (1996) Studies of oncogene activation und tumor suppressor gene inactivation in normal and neoplastic rodent tissue. *Mutat Res* 365(1-3):43-58
- Carbone** FR, Bevan MJ (1990) Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 171(2):377-387
- Cardin** RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC (1996) Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* 184(3):863-871

- Cerwenka A**, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL (2000) Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12(6):721-727
- Cerwenka A**, Baron JL, Lanier LL (2001) Ectopic expression of retinoic acid inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11521-11526
- Chan KL**, Guan XY, Ng IO (2004) High-throughput tissue microarray analysis of c-myc activation in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 35(11):1324-1331
- Chang MH**, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau Wy, Chen DS (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 336(26):1855-1859
- Chang CC**, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciuc-Foca N (2002) Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3(3):237-243
- Chapman PB** (2003) Vaccinating against GD3 ganglioside using BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody. *Curr Opin Investig Drugs* 4(6):710-715
- Chen L**, Linsley PS, Hellström KE (1993) Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14(10):483-486
- Chiodetti L**, Choi S, Barber DL, Schwartz RH (2004) Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. *J Immunol* 176(4):2279-2291
- Chiodoni C**, Paglia P, Stoppacciaro A, Rodolfo M, Parenza M, Colombo MP (1999) Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 190(1):125-133
- Ciechanover A**, DiGiuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM (1991) Degradation of nuclear oncoproteins by ubiquitin system in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:139-143
- Cox AL**, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr (1994) Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264(5159):716-719

- Crispe IN**, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP (2000) The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 174:47-62
- Curiel TJ**, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, Davied O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminiki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W (2003) Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9(5) :562-567
- Curtsinger JM**, Johnson CM, Mescher MF (2003) CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* 171(10):5165-5171
- Curtsinger JM**, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF (2005) Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174(8):4465-4469
- Dalla-Favera R**, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982) Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(24):7824-7827
- DeGrendele HC**, Estess P, Siegelman MH (1997) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278(5338):672-675
- Dhein J**, Walczak H, Bäumlner C, Debatin KM, Krammer PH (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373(6513):438-441
- Diehl L**, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA (2008) Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8(+) T cell tolerance. *Hepatology* 47(1):296-305
- Di Santo JP**, Colucci F, Guy-Grand D (1998) Natural killer and T cells of innate and adaptive immunity: lymphoid compartments with different requirements for common gamma chain-dependent cytokines. *Immunol Rev* 165:29-38
- Dong H**, Strome SE, Salmao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8):793-800
- Drake CG**, Jaffee E, Pardoll DM (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90:51-81

- Dranoff G**, Jaffee E, Lazenby A, Golubek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (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 USA* 90(8):3539-3543
- Dunn GP**, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11):991-998
- Dutton RW**, Bradley LM, Swain SL (1998) T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-223
- Elgert K**, Alleva DG, Mullins DW (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 64(3):275-290
- Evan GI**, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1):119-128
- Fallarino F**, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(12):1206-1212
- Fearon ER**, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759-767
- Felsher DW**, Bishop JM (1999 a) Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3940-3944
- Felsher DW**, Bishop JM (1999 b) Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4(2):199-207
- Ferber I**, Schönrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hämmerling GJ, Arnold B (1994) Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263(5147):674-676
- Fernandez NC**, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L (1999) Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5(4):405-411
- Ferrone S**, Marincola FM (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16 (10):487-494.
- Fox N**, Crooke R, Hwang LH, Schibler U, Knowles BB, Solter D (1989) Metastatic hibernomas in transgenic mice expressing an alpha-amylase-SV40 T antigen hybrid gene. *Science* 244(4903):460-463

- Fuchs** EJ, Matzinger P (1996) Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 8(9):271-280
- Gaidano** G, Dalla-Favera R (1992) Biologic aspects of human immunodeficiency virus-related lymphoma. *Curr Opin Oncol* 4(5):900-906
- Ganss** R, Hanahan D (1998) Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res* 58:4673-4681
- Ganss** R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hämmerling GJ (2002) Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 62(5):1462-1470
- Garbi** N, **Arnold** B, **Gordon** S, **Hämmerling** GJ, **Ganss** R (2004) CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol* 172(10):5861-5869
- Gatti** R A, Good R A (1971) Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28(1):89-98
- Gavrieli** Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3):493-501
- Gjertsen** MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Solheim BG, Soreide O, Thorsby E, Gaudernack G (1995) Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. *Lancet* 346(8987):1399-1400
- Goddard** S, Youster J, Morgan E, Adams DH (2004) Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 164(2):511-519
- Goletti** D, Weissman D, Jackson RW, Collins FM, Kinter A, Fauci AS (1997) The in vitro induction of human immunodeficiency virus (HIV) replication in purified protein derivative-positive HIV-infected persons by recall antigen response to *Mycobacterium tuberculosis* is the result of a balance of the effects of endogenous interleukin-2 and proinflammatory and antiinflammatory cytokines. *J Infect Dis* 177(5):1332-1338
- Gollob** JA, Schnipper CP, Murphy EA, Ritz J, Frank DA (1999) The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation. *J Immunol* 162(8):4472-4481
- Gossen** M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551
- Gossen** M, Bonin AL, Bujard H (1993) Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem Sci* 18(12):471-475

- Granucci F**, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2(9):882-888
- Granucci F**, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P (2003) Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *Embo J* 22(11):2546-2551
- Grasl-Kraupp B**, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21(5):1465-1468
- Grimm CF**, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M (2000) Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 119(4):1104-1112
- Gross L** (1943) Intradermal immunisation of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 3:326-333
- Groux H**, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-742
- Hanahan D** (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315(6015):115-122
- Hanisch FG**, Nikovic T (2006) Immunology of O-glycosylated proteins : approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Curr Protein Pept Sci* 7(4):307-315
- Hasan MT**, Friedrich RW, Euler T, Larkum ME, Giese G, Both M, Duebel J, Waters J, Bujard H, Griesbeck O, Tsien RY, Nagai T, Miyawahi A, Denk W (2004) Functional fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PloS Biol* 2(6):763-775
- Hawiger D**, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC (2001) *J Exp Med* 194(6) :769-779
- Heath WR**, Kurts C, Miller JF, Carbone FR (1998) Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens. *J Exp Med* 187(10):1549-1553
- Hillen W**, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48:345-369

- Hollstein** M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015):49-53
- Hooper** ML (1998) Tumour suppressor gene mutations in humans and mice: parallels and contrasts. *Embo J* 17(23):6783-6789
- Hsu** FJ, Benike C, Fagoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engelman EG, Levy R (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2(1):52-58
- Huang** LQ, Brasseur F, Serrano A, de Plaen E, van der Bruggen P, Boon T, van Pel A (1999) Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J Immunol* 162(11):6849-6854
- Huang** L, Soldevila G, Leeker M, Flavell R, Crispe IN (1994) The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1(9):741-749
- Iezzi** G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8(1):89-95
- Iezzi** G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A (1999) The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29(12):4092-4101
- Janeway** CA Jr (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3(13):1167-1171
- Janeway** CA Jr, Bottomly K (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76(2):275-285
- Jenkins** RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG (1997) Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 57(3):524-531
- Jonuleit** H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH (2001) Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22(10):394-400
- Kaplan** DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13):7556-7561
- Karttunen** J, Sanderson S, Shatri N (1992) Detection of rare antigen-presenting cells by the *lacZ* T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6020-6024

- Kato** GJ, Barrett J, Villa-Gracia M, Dang CV (1990) An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 10(11):5914-5920
- Kawabe** Y, Ochi A (1991) Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* 349(6306):245-248
- Keene** JA, Forman J (1982) Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155(3):768-782
- Kilinc** MO, Aulakh KS, Nair RE, Jones SA, Alard P, Kosiewicz MM, Egilmez NK (2006) Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory cells, induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *J Immunol* 177(10):6962-6973
- Kim** JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL (2005) Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11(3):1010-1020
- Kistner** A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(20):10933-10938
- Klas** C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 5(6):625-630
- Klein** G, Sjögren HO, Klein E, Hellström KE (1960) Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20:1561-1572
- Kovacsovics-Bankowski** M, Rock KL (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267(5195):243-246
- Krieg** AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522):546-549
- Kuniyasu** Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S (2000) Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 12(8):1145-1155
- Kurts** C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184(3):923-930

- Kurts C**, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR (1997) Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186(2):239-245
- Kurts C**, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR (1998 a) Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 188(2):409-414
- Kurts C**, Heath WR, Kosaka H, Miller JF, Carbone FR (1998 b) The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* 188(2):415-420
- Lang KS**, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M, Harris NL, Junt T, Odermatt B, Clavien PA, Pircher H, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM (2006) Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 116(9):2456-2463
- Lanier LL** (2000) Turning on natural killer cells. *J Exp Med* 191(8):1259-1262
- Lanzavecchia A**, Sallusto F (2000) From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12(1):92-98
- Lau AH**, Thomson AW (2008) Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 52(2):307-314
- Lee PP**, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM (1999) Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5(6):677-685
- Lenardo MJ** (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353(6347):858-861
- Limmer A**, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6(12):1348-1354
- Linsley PS**, Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11:191-212
- Lipsky MM**, Hinton DE, Klaunig JE, Trump BF (1981) Biology of hepatocellular neoplasia in the mouse. I. Histogenesis of safrole-induced hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 67(2):365-376
- List AF**, Greco FA, Vogler LB (1987) Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. *J Clin Oncol* 5(10):1673-1689

- Little** CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306(5939):194-196
- Liu** GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC (1995) Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3(4):407-415
- Lu** X, Lane DP (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75(4):765-778
- Lutz** MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23(9):445-449
- Maeurer** MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT (1996) *J Clin Invest* 98(7):1633-1641
- Malek** TR, Yu A, Scibelli P, Lichtenheld MG, Codias EK (2001) Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol* 166(3):1675-1683
- Maletto** B, Rópolo A, Morón V, Pistoresi-Palencia MC (2002) CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J Leukoc Biol* 72(3):447-454
- Maraskovsky** E, Sjölander S, Drane DP, Schnurr M, Le TT, Mateo L, Luft T, Masterman KA, Tai TY, Chen Q, Green S, Sjölander A, Pearse MJ, Lemonnier FA, Chen W, Cebon J, Suhrbier A (2004) NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 10(8):2879-2890
- Marzo** AL, Lake RA, Lo D, Sherman L, McWilliam A, Nelson D, Robinson BW, Scott B (1999) Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *J Immunol* 162(10):5838-5845
- Matzinger** P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045
- McClain** KL (1997) Immunodeficiency states and related malignancies. *Cancer Treat Res* 92:39-61
- Medzhitov** R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2):135-145
- Medzhitov** R, Janeway CA Jr (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9(1):4-9

- Moon** JJ, Nelson BH (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase potentiates, but does not trigger, T cell proliferation mediated by the IL-2 receptor. *J Immunol* 167(5):2714-2723
- Moore** MW, Carbone FR, Bevan MJ (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54(6):777-785
- Moore** KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765
- Müller** S, Demotz S, Bulliard C, Valitutti S (1999) Kinetics and extent of protein tyrosine kinase activation in individual T cells upon antigenic stimulation. *Immunology* 97(2):287-93
- Nagata** S (1994) Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1313):287-287
- Nagorson** D, Voigt S, Berg E, Stein H, Thiel E, Loddenkemper C (2007) Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5:1-8
- Ochsenbein** AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM (2001) Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411(6841):1058-1064
- Ohashi** PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H (1991) Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65(2):305-317
- Onizuka** S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59(13):3128-3133
- Palmer** E (2003) Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3(5):383-391
- Pardoll** DM (1994) Tumour antigens. A new look for the 1990s [news; comment]. *Nature* 369(6479):357
- Parker** SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1996) Cancer statistics, 1996 [see comments]. *CA Cancer J Clin* 46(1):5-27
- Parkhurst** MR, Salgaller ML, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y (1996) Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *Immunology* 157(6):2539-2548
- Pasare** C, Medzhitov R (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6(15):1382-1387

- Pasare C**, Medzhitov R (2005) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560:11-18
- Pegram M**, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinavar F, Slamon D (1999) Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18(13):2241-2251
- Pelengaris S**, Khan M, Evan G (2002 a) C-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2(10):764-776
- Pelengaris S**, Khan M, Evan GI (2002 b) Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109(3):321-334
- Pelengaris S**, Rudolph B, Littlewood T (2000) Activation of Myc in vivo – proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 10(1):100-105
- Phan GQ**, Wang E, Marincola FM (2001) T-cell-directed cancer vaccines: mechanisms of immune escape and immune tolerance. *Expert Opin Biol Ther* 1(3):511-523
- Pignataro L**, Pagani D, Brando B, Sambataro G, Scarpati B, Corsi MM (2007) Down-regulation of zeta chain and zeta-associated protein 70 (Zap 70) expression in circulating T lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 29(1):57-62
- Pinion SB**, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB (1991) Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 337(8745):819-820
- Porgador A**, Gilboa E (1995) Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182(1):255-260
- Prehn RT**, Main JM (1957) Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18(6):769-778
- Probst HC**, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M (2005) Resting dendritic cells induce peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6(3):280-286
- Raz E** (2000) Immunostimulatory DNA-sequences (ISS). Springer Seminars in Immunopathology. Ausgabe 22 Nummer 1-2
- Ressing ME**, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey H M, Melief CJ, Kast WM (1995) Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol* 154(11):5934-43

- Rivoltini** L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G (2002) Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188:97-113
- Rocha** G, Deschênes J, Rowsey JJ (1998) The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol* 18(4):305-325
- Rock** KL, Gamble S, Rothstein L (1990) Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249(4971):918-921
- Romieu** R, Baratin M, Kayibanda M, Lacabanne V, Ziol M, Guillet JG, Viguier M (1998) Passive but not active CD8<sup>+</sup> T cell-based immunotherapy interferes with liver tumor progression in a transgenic mouse model. *J Immunol* 161(10):5133-5137
- Rosenberg** SA (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835):380-384
- Rosenberg** SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, Aebersold P, Leitman S, Linehan WM, Seipp CA, et al. (1993) Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85(8):622-632
- Rosenwald** IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ, Schmidt EV (1993) Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13):6175-6178
- Sacher** T, Knolle P, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling GJ, Limmer A (2002) CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur J Immunol* 32(12):3628-3637
- Sadlack** B, Löhler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I (1995) Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 25(11):3053-3059
- Sakaguchi** S (2000 a) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101(5):455-458
- Sakaguchi** S (2000 b) Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 12(6):684-690
- Salghetti** SE, Kim SY, Tansey WP (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* 18(3):717-726

- Sallusto** F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-712
- Sallusto** F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763
- Sandgren** EP, Quaife CJ, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1989) Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* 4(6):715-724
- Satomayor** E, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, Levitsky HI (2001) Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood* 98(4):1070-1077
- Schlosser** I, Hölzel M, Mürnseer M, Burtscher H, Weidle UH, Eick D (2003) A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31(21):6148-6156
- Schluns** KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L (2002) Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168(10):4827-4831
- Schoenenberger** CA, Andres AC, Groner B, van der Valk M, LeMeur M, Gerlinger P (1988) Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J* 7(1):169-175
- Schönig** K, Bujard H (2003) Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. *Methods Mol Biol* 209:69-104
- Schönrich** G, Kalinke U, Momburg F, Malissen M, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B, Hämmerling GJ, Arnold B (1991) Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65(2):293-304
- Schwartz** RH (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184(1):1-8
- Schwartz** RH (1997) T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9(3):351-357
- Schwartz** RH (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305-334
- Schwartz** RH (2005) Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6(4):327-330
- Selvaraj** P, Plunkett ML, Dustin M, Sanders ME, Shaw S, Springer TA (1987) The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326(6111):400-403

- Sepulveda** AR, Finegold MJ, Smith B, Slagle BL, DeMayo JL, Shen RF, Woo SL, Butel JS (1989) Development of a transgenic mouse system for the analysis of stages in liver carcinogenesis using tissue-specific expression of SV40 large T-antigen controlled by regulatory elements of the human alpha-1- antitrypsin gene. *Cancer Res* 49(21): 6108-6117
- Shachaf** CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop JM, Contag CH, Felsher DW (2004) MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 431(7012):1112-1117
- Shaw** AS, Dustin ML (1997) Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6(4):361-369
- Shen** Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL (1997) Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158(6):2723-2730
- Shimizu** J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10):5211-5218.
- Singh** S, Ross SR, Acena M, Rowley DA, Schreiber H (1992) Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells. *J Exp Med* 175(1):139-146
- Simonetti** RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L (1991) Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 36(7):962-72.
- Slamon** DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al (1989) Studies of the HER-2/neu proto-onkogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244(4905):707-712
- Smyth** MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrot RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193(6):661-670
- Smyth** MJ, Godfrey DI (2000) NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* 1(6):459-460
- Song** W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA, Crystal RG (1997) Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med* 186(8):1247-1256

- Sparwasser T**, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H (2000) Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 30(12):3591-3597
- Sprent J**, Surh CD (2001) Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* 13(2):248-254
- Sprent J**, Surh CD (2002) T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20:551-579
- Starr TK**, Jameson SC, Hogquist KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176
- Steinbrink K**, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159(10):4772-4780
- Stoll S**, Delon J, Brotz TM, Germain RN (2002) Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296(5574):1873-1876
- Sun JC**, Williams MA, Bevan MJ (2004) CD4<sup>+</sup> T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8<sup>+</sup> T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5(9):927-933
- Takahashi T**, Sakaguchi S (2003) Naturally arising CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Curr Mol Med* 3(8):693-706
- Takao S**, Smith EH, Wang D, Chan CK, Bulkley GB, Klein AS (1996) Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):C1278-1284
- Tanchot C**, Rocha B (1997) Peripheral selection of T cell repertoires: The role of continuous thymus output. *J Exp Med* 186(7):1099-1106
- Tarone RE**, Chu KC, Ward JM (1981) Variability in the rates of some common naturally occurring tumors in Fischer 344 rats and (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst* 66(6):1175-1181
- Terabe M**, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA (2000) NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1(6):515-520
- Tham EL**, Shrikant P, Mescher MF (2002) Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory checkpoint in the CTL response. *J Immunol* 168(3):1190-1197
- Thomas L** (1959) *Discussion of Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive States* (New York, ed. HS Lawrence, Hoeber-Harper)
- Thomson AW**, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Lu L (2002) Immunobiology of liver dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80(1):65-73

- Thorgeirsson** SS (1996) Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 10(11):1249-1256
- Tomlinson** S (1993) Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5(1):83-89
- Triezenberg** S, LaMARco KL, McKnight SL (1988) Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev* 2(6):730-742
- Trudel** M, D'Agati V, Constantini F (1991) C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int* 39(4):665-671
- Tseng-Rogenski** SS, Arredouani MS, Neeley YC, Lu B, Chinnaiyan AM, Sanda MG (2008) Fas-mediated T cell deletion potentiates tumor antigen-specific tolerance in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*
- Valenzuela** JO, Hammerbeck CD, Mescher MF (2005) Cutting edge: Bcl-3 upregulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* 174(2):600-604.
- van den Eynde** BJ, van der Bruggen P (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9(5):684-693
- van der Bruggen** P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, de Plaen E, van den Eynde, B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma *Science* 254(5038):1643-1647
- van Elsas** A, Hurwitz AA, Allison JP (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190(3):355-366
- van Mierlo** GJ, Boonmann ZF, Dumortier HM, den Boer AT, Fransen MF, Nouta J, van der Voort EI, Offringa R, Toes RE, Melief CJ (2004) Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8<sup>+</sup> CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* 173(11):6753-6759
- van Parijs** L, Abbas AK (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280(5361):243-248
- van Stipdonk** MJ, Hardenberg G, Bijker MS, Lemmens EE, Droin NM, Green DR, Schoenberger SP (2003) Dynamic programming of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses. *Nat Immunol* 4(4):361-365
- Viola** A, Lanzavecchia A (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273(5271):104-106

- Voehringer** D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H (2000) Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 165(5):2415-22
- Vollmer** CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS (1999) Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 59(13):3064-3067
- Wagner** H (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73:329-368
- Wagner** H (2000) Immunobiology of bacterial CpG-DNA. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Nummer 247. Springer Verlag Heidelberg
- Walker** LS, Abbas AK (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2(1):11-19
- Wall** EM, Milne K, Martin ML, Watson PH, Theiss P, Nelson BH (2007) Spontaneous mammary tumors differ widely in their inherent sensitivity to adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 67(13):6442-6450
- Wang** ZR, Liu W, Smith ST, Parrish RS, Young SR (1999) C-myc and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp Mol Pathol* 66(2):140-148
- Ward** JM, Goodman DG, Squire RA, Chu KC, Linhart MS (1979) Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst* 63(3):849-54
- Webb** S, Morris C, Sprent J (1990) Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 63(6):1249-1256
- Weinhold** M, Sommermeyer D, Uckert W, Blankenstein T (2007) Dual T cell receptor expressing CD8<sup>+</sup> T cells with tumor- and self-specificity can inhibit tumor growth without causing severe autoimmunity. *J Immunol* 179(8):5534-5542
- Weiss** WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA (2003) Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 63(7):1589-1595
- Whiteside** TL (2004) Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 53(10):865-878
- Whiteside** TL, Herberman RB (1995) The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7(5):704-710
- Wild** J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J (1999) Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4<sup>+</sup> T cell dependent. *J Immunol* 163(4):1880-1887

- Williams** GM (1997) Chemicals with carcinogenic activity in the rodent liver; mechanistic evaluation of human risk. *Cancer Lett* 117(2):175-188
- Wolfers** J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7(3):297-303
- Worschech** A, Kmiecik M, Knutson KL, Bear HD, Szalay AA, Wang E, Marincola FM, Manjili MH (2008) Signatures associated with rejection or recurrence in HER-2/neu-positive mammary tumors. *Cancer Res* 68(7):2436-2446
- Wright** SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249(4975):1431-1433
- Wucherpfennig** KW, Zhang J, Witek C, Matsui M, Modabber Y, Ota K, Hafler DA (1994) Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* 152(11):5581-5592
- Yang** G, Mizuno MT, Hellstrom KE, Chen L (1997) B7-negative versus B7-positive P815 tumor: differential requirements for priming of an antitumor immune response in lymph nodes. *J Immunol* 158(2):851-858
- Zhang** B, Bowerman NA, Salama JK, Schmidt H, Spiotto MT, Schietinger A, Yu P, Fu YX, Weichselbaum RR, Rowley DA, Kranz DM, Schreiber H (2007) Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 204(1):49-55
- Zhang** L, Fung-Leung W, Miller RG (1995) Down-regulation of CD8 on mature antigenreactive T cells as a mechanism of peripheral tolerance. *J Immunol* 155(7):3464-3471
- Zhang** X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8(5):591-599
- Zinkernagel** RM (1996) Immunology taught by viruses. *Science* 271(5246):173-178
- Zinkernagel** RM, Bachmann MF, Kündig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H (1996) On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14:333-367
- Zinkernagel** RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248(450):701-702

## **6. Anhang**

### 6.1 Lebenslauf



## 6.2 Publikationen

Human Pathology, 2007 Feb;38(2):359-64. Epub 2006 Nov 29

**Podocalyxin-like protein 1 expression is useful to differentiate pancreatic ductal adenocarcinomas from adenocarcinomas of the biliary and gastrointestinal tracts**

Jasmin Teresa Ney, Hui Zhou, Bence Sipos, Reinhard Büttner, Xin Chen, Günter Klöppel, Ines Gütgemann

**Autochthonous liver tumors induce T cell tolerance associated with T cell receptor downmodulation**

Jasmin Teresa Ney, Qi Zhou, Thomas Schmidt, Dawid Eckert, Dean W. Felsher, Hubert Schorle, Percy Knolle, Thomas Tüting, Christian Kurts, Reinhard Büttner, Andreas Limmer, Ines Gütgemann

Manuskript eingereicht

## 6.3 Posterpräsentationen

Semester-Meeting Bonner Forum für Biomedizin, Walberberg 12.-13. Februar 2005

**Development of an orthotopic tumor model to study the immune response to liver tumors**

Jasmin Ney, Hubert Schorle, Christian Kurts, Reinhard Büttner and Ines Gütgemann

Semester-Meeting Bonner Forum für Biomedizin, Bad Breisig 04.-05. März 2006

**Generation of conditional c-myc/ova transgenic mice to study antigen specific immune response in liver tumours**

Jasmin Ney, Angela Egert, Hubert Schorle, Christian Kurts, Reinhard Büttner and Ines Gütgemann

Immuno Rio 2007, 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brasilien  
21.-25. August 2007

**A novel model of antigen recognition in a hepatic tumor microenvironment: c-myc/OVA transgenic mice**

Jasmin Teresa Ney, Qi Zhou, Christian Kurts, Angela Egert, Hubert Schorle, Andreas Limmer, Reinhard Büttner and Ines Gütgemann

#### 6.4 Vorträge

Immuno Rio 2007, 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brasilien  
21.-25. August 2007

**A novel model of antigen recognition in a hepatic tumor microenvironment: c-myc/OVA transgenic mice**