

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Modulation der Immunogenität  
von humanen Nierenzellkarzinomzellen  
durch stabilen TAP1-Gentransfer

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich vorgelegt

von Michael Kallfelz

aus Bonn

Mainz, 2001

Dekan: Herr Universitätsprofessor Dr. Dr. NN

1. Gutachter: Frau Universitätsprofessorin Dr. NN

2. Gutachter: Herr Universitätsprofessor Dr. NN

Tag der Promotion: 11. Dezember 2001

Meinen Eltern



<b>1.</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>MHC Klasse I-vermittelte Zytotoxizität</b>	<b>1</b>
	1.1.1. MHC Klasse I-restringierte T-Zellantwort	1
	1.1.2. T-Zellantwort CD8 positiver zytotoxischer T-Zellen	5
	1.1.3. Antigenprozessierung und -präsentation	6
	Das Proteasom	6
	Der Peptidtransporter TAP	8
	Peptidbeladung	10
	1.1.4. Tumorantigene	11
<b>1.2.</b>	<b>“Immune escape” Mechanismen von humanen Tumoren</b>	<b>12</b>
	1.2.1. Defizienzen der Antigenprozessierungsmaschinerie in Tumoren	15
	1.2.2. Reaktion des Immunsystems auf Antigenprozessierungs-Defizienzen	16
	1.2.3. Modulation der Antigenprozessierungsmaschinerie durch Zytokine	16
<b>1.3.</b>	<b>Das Nierenzellkarzinom</b>	<b>17</b>
	1.3.1. Molekularbiologie, Morphologie und Klinik des Nierenzellkarzinoms	17
	1.3.2. Nierenzellkarzinom und Immunsystem	19
	1.3.3. Therapie des Nierenzellkarzinoms	19
<b>2.</b>	<b><i>Ziel der Arbeit</i></b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b><i>Material</i></b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	<b>Verwendete Bakterien</b>	<b>23</b>
<b>3.2.</b>	<b>Plasmide</b>	<b>23</b>
	3.2.1. Restriktionskarten der verwendeten Plasmide	23
<b>3.3.</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>25</b>
<b>3.4.</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>25</b>
	3.4.1. Primer für die PCR	25
	3.4.2. Sonden für Southern- und Northern-Blot	26
<b>3.5.</b>	<b>Chemikalien, Enzyme und Nukleinsäuren</b>	<b>26</b>
<b>3.6.</b>	<b>Allgemeine Stammlösungen und Puffer</b>	<b>28</b>
	3.6.1. Elektrophorese:	28
	3.6.2. Proteinchemie, Immunhistologie und Durchflußzytometrie:	29
	3.6.3. Hybridisierung:	29
	3.6.4. Enzymlösungen:	30
	3.6.5. Sonstige Lösungen:	30
<b>3.7.</b>	<b>Medien für die Bakterienvermehrung</b>	<b>32</b>
<b>3.8.</b>	<b>Puffer und Medien für die Kultivierung von Säugerzellen</b>	<b>33</b>
<b>3.9.</b>	<b>Besondere Geräte und Software:</b>	<b>33</b>

<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
<b>4.1.</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>35</b>
4.1.1.	Kultivierung eukaryotischer Zellen und Zytokinstimulation	35
4.1.2.	Selektion Neomycin resistenter Zellklone	35
4.1.3.	Antikörpergewinnung aus Hybridoma-Zellen	35
4.1.4.	Verwendete Gentransfermethoden	36
	Elektroporation	36
	Lipofektion	37
<b>4.2.</b>	<b>Molekularbiologie</b>	<b>37</b>
4.2.1.	Allgemeines	37
	Agarose-Gelelektrophorese	37
	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
4.2.2.	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	38
4.2.3.	Präparation der Transfektionsvektoren	38
	Mini-Plasmidisolierung	38
	Midi-Plasmid-Präparation	39
	Vorbereitung der Plasmide für die Transfektion	40
4.2.4.	<i>In-vitro</i> -Transkription und -Translation	41
	Transkription	41
	Translation	42
4.2.5.	Nachweis der Integration und Expression des Transgens	42
	Genomische Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Zelllysaten	42
	Isolierung zytoplasmatischer RNS aus Zellpellets nach der NP40-Methode	44
	DNase-Verdau	45
	RT-PCR	45
	Southern Blot-Analyse der Amplifikate	46
	Northern Blot	47
	Denaturierende RNS Agarose Gelelektrophorese	47
	RNS-Kapillar-Blot	48
	Radioaktive Markierung eines cDNS-Fragmentes	48
	Hybridisierung	49
<b>4.3.</b>	<b>Proteinchemie</b>	<b>49</b>
4.3.1.	Western-Blot-Analyse	49
	Proteinpräparation und Proteinkonzentrationsbestimmung	49
	Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Lämmli (1970) und Blot	50
	Immunhistochemische Detektion durch spezifische Antikörper	51
	Streptavidin-Peroxidase vermittelte Chemilumineszenz	51
<b>4.4.</b>	<b>Funktionelle Analysen</b>	<b>52</b>
4.4.1.	Durchflußzytometrie	52
	Probenvorbereitung und -messung	53
4.4.2.	Immunfluoreszenzmikroskopie	53

4.4.3. Peptid-Translokations-Versuche	54
4.4.4. T-Zell vermittelte Experimente	55
CTL-Assays	55
Zytokin-Detektion durch ELISA	55
T-Zell Proliferations-Experimente	56
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>5.1. Etablierung eines stabilen Gentransfers in Nierenzellkarzinom-Zelllinien</b>	<b>59</b>
5.1.1. Analyse der Transfektionseffizienz	59
5.1.2. Bestimmung der Stabilität des Vektorkonstrukts	60
5.1.3. Optimierung der Methode und des Transfervektors	63
Nachweis des Genproduktes nach <i>in-vitro</i> -Transkription und -Translation	64
Subklonierung der parentalen Zelllinie MZ1257RC	65
<b>5.2. Funktionsüberprüfung des Transgens</b>	<b>66</b>
5.2.1. Heterogenes Transkriptionsmuster des TAP1-Transgens auf RNS-Ebene	66
5.2.2. Heterogene TAP1-Proteinexpression in den Transfektanden	68
<b>5.3. Einfluß von TAP1-Überexpression auf die Membranexpression von MHC Klasse I</b>	<b>70</b>
5.3.1. Durchflußzytometrische Quantifizierung der MHC Klasse I Dichte mit und ohne IFN- $\gamma$ Stimulation	70
5.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von TAP1 und MHC Klasse I-Antigenen	72
5.3.3. Quantifizierung der Peptid-Translokation	74
<b>5.4. Analyse der T-Zell-vermittelten Immunantwort</b>	<b>75</b>
5.4.1. Zytotoxizitäts-Analysen	75
5.4.2. Aktivierung autologer zytotoxischer T-Lymphozyten durch die Transfektanden	76
<b>5.5. Induktion der Proliferation allogener Lymphozyten in der MLTC</b>	<b>77</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>6.1. Das Problem des “immune escape”</b>	<b>79</b>
<b>6.2. Veränderung der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie zur Aufhebung von “immune escape Mechanismen”</b>	<b>79</b>
6.2.1. Die Etablierung des stabilen TAP1 Gentransfers	80
<b>6.3. Auswirkungen einer TAP1-Überexpression auf die MHC Klasse I Oberflächenexpression und Immunogenität der Nierenzell-karzinomzellen</b>	<b>82</b>
6.3.1. TAP1-Überexpression kann den Effekt einer Behandlung mit IFN- $\gamma$ nicht verstärken	83
6.3.2. Die TAP1-Überexpression führt spezifisch zu einer verstärkten Immunantwort allogener und autologer T-Zellen	83
<b>6.4. Ausblick</b>	<b>84</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>8. Literatur</b>	<b>89</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>99</b>

## Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge	HLA	„human leukocyte antigen“ humanes Leukozyten Antigen
$\mu\text{g}$	Mikrogramm	IFN	Interferon
$\mu\text{l}$	Mikroliter	IRES	„internal ribosomal entry site“
$\mu\text{M}$	mikromolar	kDa	Kilodalton
$\mu\text{mol}$	Mikromol	kg	Kilogramm
$^3\text{H}$	Thymidin	l	Liter
$^{51}\text{Cr}$	Chrom-51	LMP	„low molecular weight protein“ Protein geringen Molekulgewichts
Abb.	Abbildung	mAb	„monoclonal antibody“ monoklonaler Antikörper
ABC	„ATP-binding cassette“/ ATP-bindende Kassette	Mg	Magnesium
AP	Alkalische Phosphatase	mg	Milligramm
APC	„antigen presenting cell“ antigenpräsentierende Zelle	MHC	„major histocompatibility complex“, Haupt- histokompatibilitäts-Komplex
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie	min	Minute(n)
ATP	Adenosintriphosphat	ml	Milliliter
bp	Basenpaare	mM	millimolar
bzw.	beziehungsweise	mmol	Millimol
c	Konzentration	MW	Molekulargewicht
Ca	Kalzium	n.b.	nicht bestimmt
ca.	circa	ng	Nanogramm
Cl	Chlor	nm	Nanometer
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	NZK	Nierenzellkarzinom
CTL	„cytotoxic T-lymphocyte“ zytotoxischer T-Lymphozyt	Tab.	Tabelle
DNS	Desoxyribonucleinsäure	TAP	„transporter associated with antigen processing“
E : T	„effector to target ratio“ Verhältnis Effektor- zu Zielzelle	TCR	„T-cell receptor“ T-Zellrezeptor
E	Extinktion	TGF	„transforming growth factor“ transformierender Wachstumsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ER	endoplasmatisches Retikulum		
FCS	„fetal calf serum“ fötale Kälberserum		
g	Gramm		
h	Stunde(n)		



## 1. Einleitung

Die maligne Transformation von Zellen eines Organismus, d.h. die Umwandlung normaler Zellen in bösartig wuchernde Tumorzellen erfolgt nach heutiger Vorstellung auf zwei Ebenen: Zum einen werden Kontrollmechanismen außer Kraft gesetzt, die verhindern sollen, daß sich Zellen, deren genetische Information fehlerhaft ist, weiter vermehren können, zum anderen wird die natürliche Teilungsbegrenzung der Zellen weitgehend aufgehoben. So fehlt häufig die Kontaktinhibition der Zellen untereinander sowie eine allgemeine Limitierung der Teilungshäufigkeit. Erreicht wird dies durch die Aktivierung von Regulatoren des Zellwachstums, deren Expression in ausgereiften Zellen weitgehend supprimiert ist, in omni- oder pluripotenten unreifen embryonalen Zellen aber wichtige Funktionen in der Entstehung des Organismus haben.

Die Entstehung maligner Zellen ist kein ausgesprochen seltenes Ereignis, aber nur in einer kleinen Zahl der Fälle kann sich tatsächlich ein Tumor aus diesem Vorgang etablieren. Somit muß der Organismus in der Lage sein, maligne bzw. transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Die Umstände, unter denen diese Abwehr nicht erfolgreich ist und sich ein Tumor im Organismus manifestieren kann, zeichnen sich durch bestimmte Besonderheiten aus, von denen einige im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen sollen.

### 1.1. MHC Klasse I-vermittelte Zytotoxizität

Erkenntnisse der letzten 20 Jahre weisen auf komplexe Interaktionen zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems hin, wobei T-Zellen dabei eine herausragende Rolle zukommt. Den Arbeiten von Zinkernagel und Doherty, die bereits 1974 zeigten, daß eine Zerstörung virusinfizierter Zellen durch CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten ("cytotoxic T-lymphocytes": CTL) über den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex der Klasse I ("major histocompatibility complex": MHC) vermittelt wurde, folgte die Erkenntnis, daß das Immunsystem über diesen Weg die Möglichkeit hat, kontinuierlich die Proteinprodukte aller Zellen zu überwachen. Dabei werden Fragmente dieser Proteine, Peptide, auf der Oberfläche der Zellen durch die MHC Klasse I Moleküle präsentiert. Virusinfizierte Zellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch die Produktion virusspezifischer Proteine, Tumorzellen verändern ihr Proteinexpressionsmuster gegenüber dem differenzierter Zellen, so daß in beiden Fällen Peptide an die Zelloberfläche gelangen, die dem Immunsystem unbekannt sind.

#### 1.1.1. MHC Klasse I-restringierte T-Zellantwort

MHC Moleküle wurden auch als Transplantationsantigene bekannt, da zytotoxische T-Zell Funktionen die eine Transplantatabstoßung verursachen, über sie vermittelt werden. Aus dieser Beobachtung resultiert auch die Bezeichnung Histokompatibilität. Es kann zwischen zwei verschiedenen Klassen von MHC Molekülen unterschieden werden, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen. MHC Klasse I Moleküle werden generell auf allen kerntragenden Zellen exprimiert und dienen der Präsentation von Peptiden endogen synthetisierter Proteine. MHC Klasse II Moleküle finden sich auf

professionellen Antigen-präsentierenden-Zellen ("antigen presenting cell": APC) des Immunsystems wie z.B. B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Monozyten, wo sie im wesentlichen exogene, endozytotisch aufgenommene und prozessierte Antigene präsentieren. Zu diesen Antigenen zählen in erster Linie Fragmente viraler oder bakterieller Proteine, die nach einer Immunantwort freigesetzt wurden, aber auch Proteinfragmente lysierter Tumorzellen. Die Sequenzen der schweren Ketten von MHC Klasse I und Klasse II sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert, allerdings in unterschiedlichen Loci (Beck *et al.*, 1996).

Klasse I Moleküle bestehen aus Heterotrimeren, die sich aus einer sogenannten schweren Kette, der  $\alpha$ -Domäne, einer nicht kovalent assoziierten leichten Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ), sowie dem zu präsentierenden Peptid zusammensetzen.

Die  $\alpha$ -Domäne besteht aus 3 Segmenten. Innerhalb der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Regionen befindet sich die Peptidbindungsstelle. Durch zwei parallele  $\alpha$ -Helices werden die Seitenwände und durch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur der Boden der Peptidbindungsgrube gebildet. Die  $\alpha 3$  Region enthält einen Immunglobulin-ähnlichen Anteil, an den die leichte Kette bindet und eine transmembrane Region sowie einen zytoplasmatischen Anteil, die der Verankerung in der Zellmembran dienen.

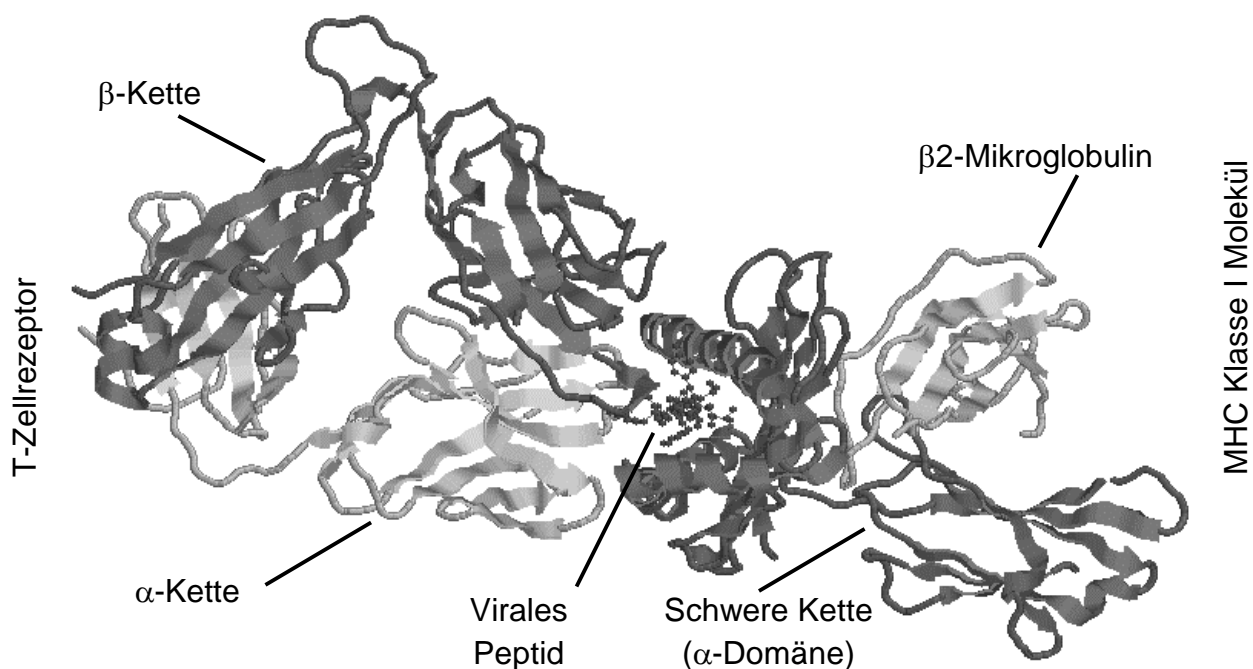


Abb. 1.1: Räumliche Darstellung eines MHC Klasse I-Moleküles.

Ein HLA-A2 Komplex (rechts) präsentiert ein virales Peptid einem T-Zellrezeptor (links). (RasMol-Darstellung HLA-A0201, Brookhaven Datenbank Code: 1BD2)

Die schweren Ketten des Klasse I Komplexes sind hochgradig polymorphe transmembranäre Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 44 kDa. Hochgradig polymorph bedeutet, daß im menschlichen Genom eine große Anzahl verschiedener Allele für diese Moleküle existieren und sich daher einzelne Individuen durch die Expression bestimmter Isotypen dieser MHC Klasse I Komplexe auf der Oberfläche ihrer Zellen unterscheiden. Im Gegensatz dazu ist das  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Gen

nicht polymorph, somit tragen fast alle Individuen das gleiche Gen.

Die Gesamtheit der MHC Klasse I Allele in einem Individuum bestimmt dessen sog. HLA-Phänotyp. HLA steht dabei für "human leukocyte antigen", da diese Moleküle früher mit Antiseren auf Patienten-Leukozyten nachgewiesen wurden. Es existieren dabei im Wesentlichen drei verschiedene Hauptgruppen: HLA-A, -B und -C, unter denen durch zusätzliche Ziffern und Buchstaben die verschiedenen Allele identifiziert werden. Eins der unter der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommenden Allele ist z.B. HLA-A2. T-Lymphozyten sind durch die Struktur ihres jeweiligen T-Zellrezeptors (TCR) auf die Erkennung eines bestimmten Peptides in Verbindung mit einem spezifischen HLA-Isotyp beschränkt. Man spricht in diesem Fall davon, daß die T-Zelle HLA-restringiert ist. Der T-Zellrezeptor auf der Mehrzahl der T-Lymphozyten ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die variable (V) und konstante (C) Regionen ähnlich der Organisation von Immunglobulin-(Ig)-Genen enthalten und eine ebenso große Diversität besitzen wie diese. Der T-Zellrezeptor gehört damit auch zu der Ig-Superfamilie von Molekülen, von denen die meisten an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind.

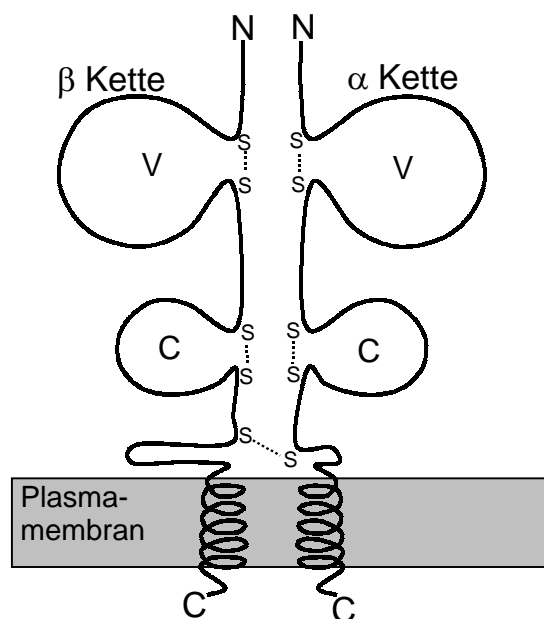


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptors  
Dargestellt sind beide T-Zellrezeptor-Untereinheiten (nach Abbas *et al.*, 1994). Zu einem kleinen Anteil sind diese Untereinheiten nicht vom  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typ sondern bestehen aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten. Die Spezifität des  $\gamma\delta$ -TCR ist bisher nicht endgültig geklärt, es weisen allerdings einige Untersuchungen daraufhin, dass sie nicht-polymorphe MHC-Moleküle erkennen. Die variablen Regionen (V) enthalten die Bereiche, die für die Antigenerkennung auf MHC Klasse I Molekülen verantwortlich sind.

Der zytosolische Anteil des TCR ist verhältnismäßig klein und es wird angenommen, daß durch diesen allein keine für die Funktion des TCR wichtige Signaltransduktion in das Innere der T-Zelle erfolgen kann. Vier oder fünf weitere Moleküle sind nötig für die Bildung eines funktionellen T-Zellrezeptorkomplex. Zu diesen gehören die weitgehend homologen CD3 Moleküle  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , die im Allgemeinen als Monomere vorliegen und die Proteine  $\zeta$  und  $\eta$ , die als  $\zeta\zeta$ -Homodimere und  $\zeta\eta$ -Heterodimere auftreten. Diese ergänzenden Moleküle enthalten in ihrem zytosolischen Anteil ein wiederkehrendes Motiv, das auch in anderen Immunrezeptoren gefunden wurde, das sog. "antigen recognition activation motif", das eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion zu spielen scheint, die wohl über eine Phosphorylierung dieser Sequenzen vermittelt wird. Der transmembrane Anteil der akzessorischen Moleküle enthält einige negativ geladene

Aminosäuren-Reste, die vermutlich mit positiv geladenen Aminosäuren-Resten des TCR assoziieren und dadurch die Bildung des Komplexes vermitteln (Abbas *et al.*, 1994). Während der TCR die spezifische Erkennung eines antigenen Peptids auf einem bestimmten MHC Molekül vermittelt, entscheiden weitere Moleküle auf der T-Zelle, an welche Art von MHC-Molekülen eine Bindung erfolgen kann: Trägt die T-Zelle den Oberflächenmarker CD4, bindet ihr Rezeptorkomplex an MHC Klasse II Moleküle. CD4 positive T-Lymphozyten werden auch als T-Helfer Zellen bezeichnet, da sie in erster Linie auf den Kontakt mit Antigenen durch die Produktion stimulierender Zytokine reagieren, die wiederum andere Teile des Immunsystems aktivieren bzw. eine immunologische Reaktion aufrecht erhalten. Im Rahmen des sogenannten “Crosspriming” erkennen sie auch Tumorantigene, die nach Aufnahme durch professionelle antigenpräsentierende Zellen auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden (Armstrong *et al.*, 1998). Eine effektive Immunantwort ist nur durch die Mitwirkung CD4 positiver T-Zellen möglich.

Das Molekül CD8 befähigt T-Lymphozyten, MHC Klasse I restringierte Antigene durch den T-Zellrezeptor zu erkennen. Diese T-Zellen, von denen die meisten zytotoxische Funktionen haben, zeigen Toleranz gegen Zellen, die Peptide normaler Proteinprodukte exprimieren. Sie werden jedoch aktiviert, wenn die präsentierten Peptide aus einem Virusprodukt oder z.B. dem Produkt eines Onkogens generiert wurden, was letztendlich zur Lyse der Zelle führt, in der das irreguläre Protein produziert wurde. CD8 positiven T-Zellen wird somit nach der derzeitigen Meinung ein maßgeblicher Anteil an der Eliminierung transformierter Zellen in einem immunkompetenten Wirt zugeschrieben. Das kritische, erste Signal wird durch die lokalisierte Bindung von mehreren T-Zellrezeptorkomplexen und den entsprechenden CD8 Molekülen an MHC Komplexe über einen durchgängigen Abschnitt der T-Zelloberfläche geliefert, ist aber allein nicht hinreichend für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle (Mescher, 1992). Nach der “Zwei-Signal-Hypothese” sind weitere sogenannte akzessorische Moleküle für eine Aktivierung der T-Zelle durch die antigenpräsentierende Zelle (APC) nötig. Zu entsprechenden Liganden auf Zielzellen konnten gemäß untenstehender Tabelle T-Zell-Moleküle identifiziert werden, die diese spezifisch binden.

T-Zell-Molekül	Akzessorisches Molekül	Funktion
CD28	B7-1, B7-2	Kostimulation
CTLA-4	B7-1, B7-2	Neg. Rückkopplung
LFA-1	ICAM-1, ICAM-2	Zell-Zell-Adhäsion
CD2	LFA-3	Zell-Zell-Adhäsion
CD40	CD40L	Zell-Zell-Adhäsion

Tab. 1.1: Eine Auswahl akzessorischer Moleküle und ihrer Liganden mit der jeweiligen Funktion

Diese gehören der Immunglobulin- oder Integrin-Superfamilie an und gelten als Adhäsionsmoleküle oder Kostimulatoren. Ihre Funktion ist zum einen die Aufrechterhaltung des Kontaktes zwischen den Zellen und damit des Signales, das durch die TCR – MHC-Interaktion geliefert wird und zum anderen die Stimulation der T-

Zellantwort durch Erzeugung zusätzlicher Aktivierungssignale. Ihre Expression auf der T-Zelloberfläche wird im Sinne einer positiven Rückkopplung nach Aktivierung der T-Zelle durch Antigenkontakt verstärkt. Ebenso werden aber auch nach Aktivierung auf der T-Zelloberfläche vermehrt Rezeptoren exprimiert, die eine negative Rückkopplung und damit eine Eindämmung der T-Zellreaktion erlauben. So exprimieren aktivierte T-Zellen zum Beispiel auch den Fas-Rezeptor, der, wie im Verlauf noch besprochen wird, nach Bindung an seinen Liganden den Zelltod einleitet. T-Zellen sind also nach Aktivierung eher suszeptibel für die Einleitung ihrer eigenen Apoptose.

### 1.1.2. T-Zellantwort CD8 positiver zytotoxischer T-Zellen

Nach Aktivierung reagieren die T-Zellen mit einer Umstellung ihres Transkriptionsmusters: Innerhalb kurzer Zeit beginnt die Produktion von Transkriptionsfaktoren und Proto-Onkogenen, die die Proliferation beeinflussen. Nur wenig später lassen sich vermehrt Zytokine wie Interleukin(IL)-2, Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$  oder Interferon(IFN)- $\gamma$  nachweisen, die sowohl die T-Zelle selbst und andere T-Zellen in unmittelbarer Nähe stimulieren als auch eine vermehrte MHC Klasse I Expression auf der Zielzelle induzieren können. Für die Einleitung der Zielzellyse ("lethal hit") galt noch bis Ende der achtziger Jahre ausschließlich die Theorie, daß von den CTL sezernierte Moleküle zu einer Porenbildung in der Membran der Zielzelle führen. CTL besitzen spezielle Granula, die das Molekül Perforin und sogenannte Granzyme, Proteasen, die Apoptose-Signalwege anstoßen können, enthalten. Nach Bindung an ein entsprechendes Antigen und Aktivierung der T-Zelle wird der Inhalt dieser Granula Kalziumionen-abhängig in den Spalt zwischen Zielzelle und CTL ausgeschüttet. Es wird davon ausgegangen, daß das Perforin in der Membran der Zielzelle Löcher erzeugt, durch die die Granzyme in die Zelle gelangen können, in der anschließend eine DNS-Fragmentation als Zeichen der Apoptose zu beobachten ist. Auf welche Weise diese Wirkung allein auf die Zielzelle beschränkt bleibt, ist noch nicht hinreichend geklärt. Man geht davon aus, daß T-Zellen eine relative Resistenz gegen die sezernierten Moleküle haben.

In den neunziger Jahren wurde die Theorie der sekretorisch vermittelten Zielzellyse um eine zweite nicht sekretorische Möglichkeit erweitert: In Perforin und Granzym „knockout“ T-Zellen ist eine direkte rezeptorvermittelte Lyse durch die Bindung des auf CTL exprimierten Fas-Liganden (CD95L) an den auf der Zielzelle befindlichen Fas-Rezeptor (CD95) möglich. Durch "crosslinking" des Fas-Rezeptors, also einer Lokalisierung von mindestens drei Rezeptoren, wird eine sogenannte Todesdomäne, („Death Domain“, DD) an seinem zytosolischen Anteil aktiviert, die mit dem intrazellulären Adapter FADD/MORT1 interagiert. Dies führt wiederum zur Entstehung des „Death inducing signalling complex“ (DISC), der durch eine Kaskade weiterer Signalmoleküle unter Beteiligung der Molekülfamilie der Caspasen, die Apoptose einleitet (Berke, 1995; Waring und Müllbacher, 1999; Krammer, 2000).

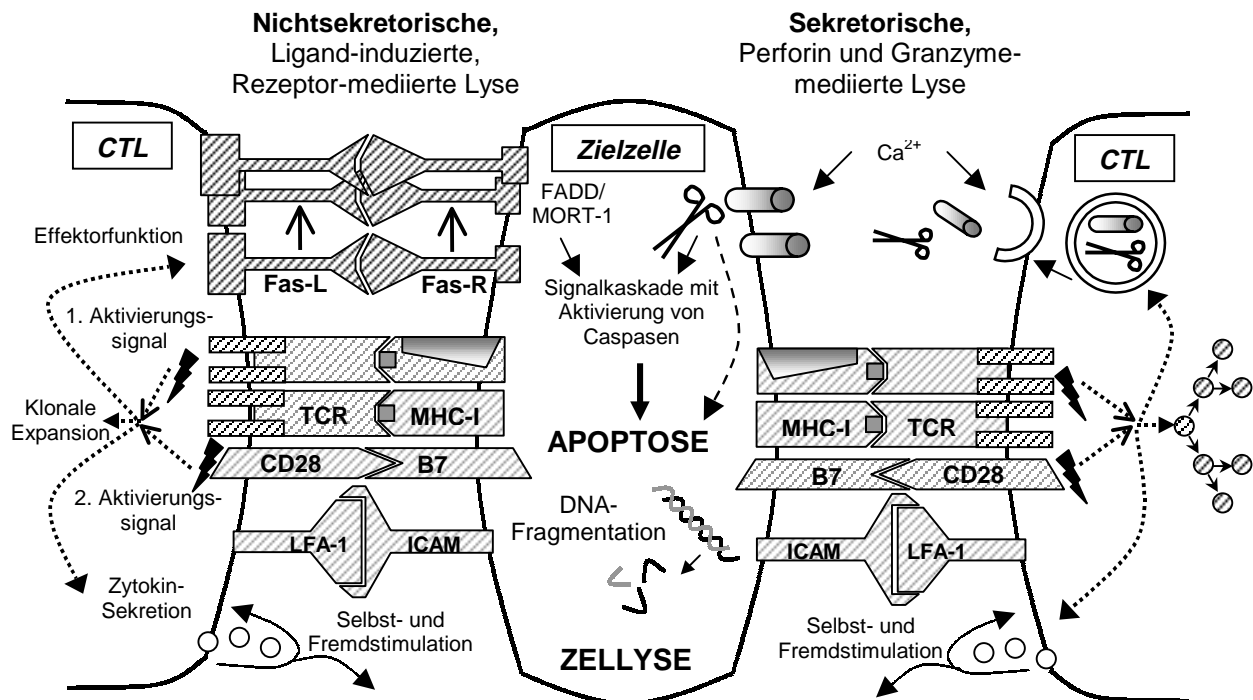


Abb. 1.3: T-Zell/APC-Interaktion und Zielzellyse (lethal hit).

Die zytotoxische T-Zelle wird durch Bindung mehrerer T-Zellrezeptoren (TCR) mit MHC/Peptid-Komplex auf der APC sowie durch weitere kostimulatorische Signale aktiviert. Dies führt zunächst zur Sekretion von Zytokinen, die die T-Zelle selbst und andere Zellen des Immunsystems stimuliert, sowie zur klonalen Expansion der T-Zelle. Darauf folgt die Ausführung der Effektorfunktion, also die Zielzellyse.

### 1.1.3. Antigenprozessierung und -präsentation

Damit antigene Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert werden können, werden diese durch kontinuierliche Degradation aus der Gesamtheit aller innerhalb der Zelle anfallenden Proteine generiert und durch ein spezialisiertes Transportsystem dem MHC Klasse I Weg zur Verfügung gestellt. Dieser komplexe Vorgang wird als Antigenprozessierung bezeichnet, der in mehrere Schritte unterteilt werden kann.

#### Das Proteasom

Im Zytosol vorliegende Proteine oder Polypeptide werden durch ein System von aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen an mehrere Moleküle des Polypeptids Ubiquitin gekoppelt, wodurch der Kontakt mit einem multikatalytischen Komplex, dem sogenannten Proteasom, vermittelt wird. Die Aufgabe des Proteasoms ist die Degradierung einer Vielzahl von Proteinen. Es ist ein essentielles Enzymsystem und spielt neben der Bereitstellung antigener Peptide unter anderem eine Rolle im Zellzyklus. Ein 20S- und ein 26S-Proteasom-Komplex werden aufgrund ihrer Größe unterschieden. Das 20S-Proteasom ist eine zylindrische Struktur mit einem Gewicht von ca. 700kDa, die aus 4 Ringen mit je sieben Untereinheiten gebildet wird, den "Proteinen geringen Molekulargewichts" ("low molecular weight protein", LMP). Die Sequenzen für diese LMP-Untereinheiten werden in einen  $\alpha$ - und einen  $\beta$ -Typus unterteilt und Ringe bestehen jeweils nur aus einem Typus. Der Zylinder setzt sich aus Ringen in der Abfolge  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  zusammen, wobei die inneren  $\beta$ -Einheiten die katalytisch aktiven Strukturen enthalten.

Das 26S-Proteasom besteht aus einem 20S-Proteasom als proteolytischem Zentrum und zusätzlich zwei 19S Cap-Strukturen, die an beiden Enden des Zylinders aufsitzen. Es wird angenommen, daß diese 19S-Untereinheiten die Bindung an das Ubiquitin vermitteln, die Proteine auffalten und unter ATP-Verbrauch in das Innere des Zylinders transportieren, da das 20S-Proteasom alleine nur einige denaturierte und nicht ubiquitinierte Proteine ohne Energieverbrauch spaltet (Hilt und Wolf, 1996).

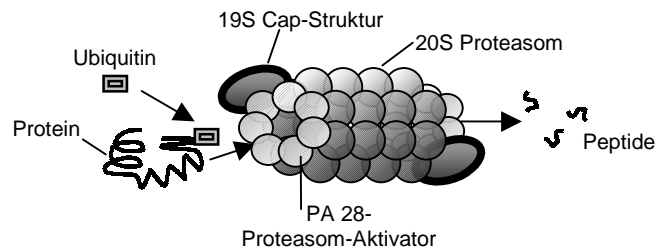


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Proteasoms.

Zytosolische Proteine werden nach Markierung mit Ubiquitin durch den multikatalytischen Komplex Proteasom in kleine Peptide degradiert. Diese können so dem MHC Klasse I Weg zur Verfügung gestellt werden.

Konstitutiv werden in humanen Zellen die proteosomalen  $\beta$ -Untereinheiten X, Y und Z exprimiert. Nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  werden diese durch die Moleküle LMP2, LMP7 und LMP10 (MECL-1) ausgetauscht. Das führt zur Entstehung von sogenannten Immunoproteasomen, die sich in ihrer Peptidase-Spezifität von herkömmlichen Proteasomen unterscheiden (Driscoll *et al.*, 1993) und so zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung des Peptidangebotes beitragen (Goldberg und Rock, 1992; Foss *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1998).

Durch IFN induzierbar sind auch die Proteasomenaktivatoren (PA) PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$ , die als ringförmige Hexa- und Heptamere in Interaktion mit dem Proteasom ebenso dessen proteolytische Aktivität und das Peptidrestriktionsmuster beeinflussen (Groettrup *et al.*, 1996). Es wird angenommen, daß sie eine Assoziation mit den 19S-Einheiten eingehen.

Vor einer weiteren Degradation der Peptide im Zytosol werden diese durch Bindung an Proteine der "heat-shock"-Familie geschützt. Zu diesen zytosolischen Chaperonen zählen hsp70, hsp73 und hsp90. Eine Bindung antigener Peptide an diese Moleküle konnte direkt nachgewiesen werden und auch Vakzinierungsversuche mit aus Tumorzellen isolierten und dadurch peptidtragenden "heat-shock"-Proteinen riefen spezifische CTL-Antworten hervor (Srivastava *et al.*, 1998; Dressel *et al.*, 1999).

Neben dem Proteasom sind auch noch zu einem geringeren Teil zytosolische sowie ER-residente Aminopeptidasen an der Degradation von Proteinen und damit der Bereitstellung antigener Epitope beteiligt (Rock und Goldberg, 1999).

## Der Peptidtransporter TAP

Um als antigene Epitope an den MHC Klasse I Komplex binden zu können, werden die durch das Proteasom im Zytosol generierten Peptide mittels eines energieabhängigen Transportsystems über die Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER) in dessen Lumen transloziert. 1990 beschrieben vier verschiedene Forschungsgruppen nahezu gleichzeitig zwei eng verwandte Gene in der MHC Klasse II Region, die für einen Peptidtransporterkomplex kodieren (Monaco *et al.*, 1990; Deverson *et al.*, 1990; Trowsdale *et al.*, 1990; Spies *et al.*, 1990), der vermutlich als Heterodimer vorliegt. Es folgte die Erkenntnis, daß es sich um einen Peptidtransporter handelte, der im wesentlichen die Transportfunktion für Peptide im MHC Klasse I Weg übernimmt und deshalb als Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung (TAP: "transporter associated with antigen processing") bezeichnet wurde.

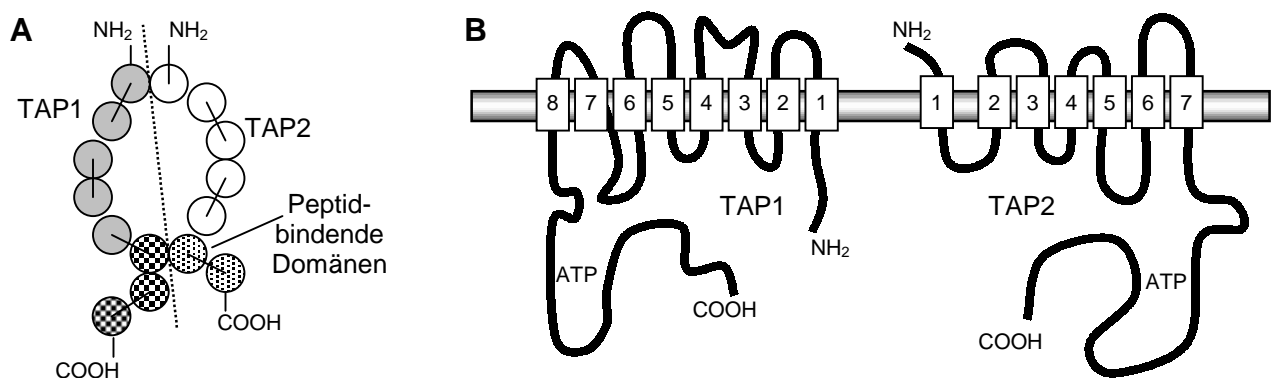


Abb. 1.5: Modell des TAP-Heterodimer mit den weitgehend homologen Molekülen TAP1 und TAP2. Diese formen mit ihren jeweils 7-8 hydrophoben transmembranären Domänen eine Pore in der Zellmembran, die Bereiche für die Peptidbindung und den -transport enthält. Im zytosolischen Anteil enthalten beide Moleküle je eine ATP-bindende Kasette. [A] zeigt eine Aufsicht auf die Pore, [B] eine Seitensicht in der Ebene der gestrichelten Linie, die auch die Kopf-an-Kopf-Lage der Moleküle verdeutlicht (modifiziert nach Vos *et al.*, 1999).

Die beiden etwa 70kD schweren Untereinheiten TAP1 und TAP2 ähneln sich in ihren funktionellen Anteilen, besitzen Amino-terminal bis zu zehn hydrophobe Domänen und sind mit mindestens sechs von diesen als transmembranären Anteilen in der ER-Membran verankert. Carboxy-terminal besitzen sie je einen großen hydrophilen zytosolischen Anteil, mit sogenannten Walker A und B Consensus-Sequenzen, die charakteristisch für ATP-bindende und hydrolysierende Domänen sind (Walker *et al.*, 1982).

TAP gehört damit zur Familie der ABC-("ATP-binding-cassette")Transporter (Trowsdale *et al.*, 1990; Spies *et al.*, 1990). Die Untereinheiten formen eine gemeinsame Peptidtransport-Pore mit ihren N-terminalen transmembranären Domänen (Vos *et al.*, 1999). Innerhalb dieser befinden sich Peptid-bindende Domänen, die bevorzugt Peptide von acht bis elf Aminosäuren binden und damit solche, die auch an die Bindungsstelle des MHC Klasse I Komplexes assoziieren können (Gubler *et al.*, 1998; Koopmann *et al.*, 1996). Mit einer geringeren Effizienz können kürzere und auch längere Peptide transportiert werden, die dann gegebenenfalls im ER durch dortige Aminopeptidasen



modifiziert werden, um den Anforderungen der Bindungsstelle des MHC Klasse I Komplexes zu entsprechen (Lobigs *et al.*, 2000).

Aber nicht nur die Länge, sondern auch das Carboxy-terminale und Amino-terminale Ende eines Peptids entscheiden über Transport durch TAP und Bindung an den MHC Komplex. So bevorzugen sowohl das humane TAP als auch die meisten humanen MHC Klasse I Allele eine positiv geladene Aminosäure am Carboxy-Terminus. Innerhalb einer jeweiligen Spezies scheinen sich die Anforderungen von TAP und dem MHC Komplex an die Peptide zu entsprechen, während zwischen den einzelnen Spezies deutliche Unterschiede bestehen (Momburg *et al.*, 1994c).

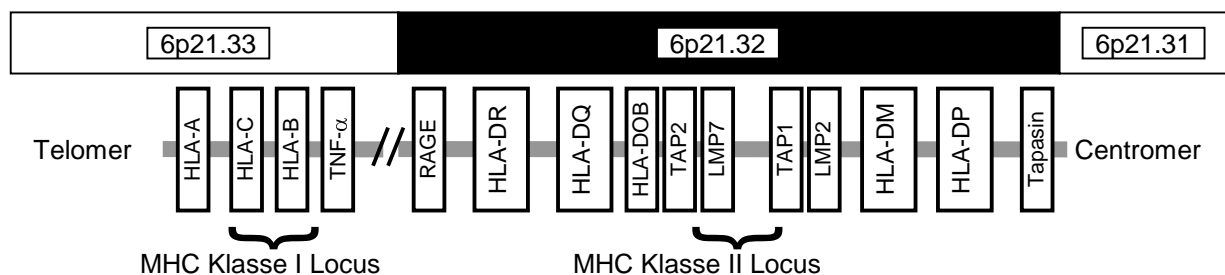


Abb. 1.6: Lokalisation einiger relevanter Gene und Gencluster des MHC-Locus auf Chromosom 6. Darstellung modifiziert nach Stephens *et al.*, 1999 und "Human MHC II-Gene list" (<http://www.sanger.ac.uk>).

Die Organisation der meisten Antigenprozessierungs-Gene in einem Locus auf Chromosom 6 weist auf die Möglichkeit einer koevolutionären Entwicklung der MHC Klasse I restringierten Antigenpräsentation hin.

TAP ist somit für eine Vorauswahl immunogener Peptide, die MHC Klasse I restringiert präsentiert werden können verantwortlich und kann damit eine Überflutung des ERs mit irrelevanten und nur schwach bindenden Peptiden verhindern (Momburg *et al.*, 1994a+b). Die Translokation der gebundenen Peptide über die ER-Membran findet unter ATP-Hydrolyse statt (Neefjes *et al.*, 1993).

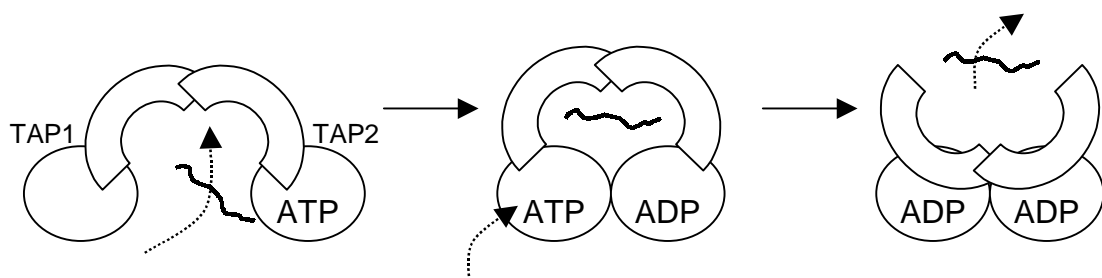


Abb. 1.7: Mehrschritt-Modell der Peptid-Translokation durch TAP.

Nach Bindung des Peptids durch TAP2 kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes, nach ATP-Hydrolyse. Daraufhin bindet auch TAP1 ein ATP und durch eine weitere energieabhängige Konformationsänderung wird das Peptid in das ER entlassen (modifiziert nach Karttunen *et al.*, 2001).

Versuche mit in verschiedenen Bereichen mutierten, bzw. deletierten TAP-Varianten zeigten, daß dezidierte Funktionen innerhalb des Transportvorganges von unterschiedlichen Domänen des Dimeres übernommen werden, wobei dieser Vorgang in mehreren Schritten verläuft (Ritz *et al.*, 2001; Karttunen *et al.*, 2001).

Dabei wird angenommen, daß die Peptidbindungsdomäne von TAP2 durch die Anlagerung von ATP aktiviert wird. Das Peptid „triggert“ durch seine Bindung die ATP-Hydrolyse an TAP2, was zu einer Konformationsänderung des Moleküls mit Translokation des Peptids in das Innere führt. Daraufhin erhöht sich die ATP-Affinität der TAP1-Nukleotid-Bindungsdomäne und nach Anlagerung eines ATP-Moleküls an die zytosolische Nukleotidbindungsdomäne von TAP1 wird es unter einer erneuten Konformationsänderung hydrolysiert. Dabei wird das Peptid in das ER freigegeben.

Neben dieser Möglichkeit des energieabhängigen Transportes können auch Proteine und Peptide über Signalsequenzen bzw. transmembrane Anteile Eintritt in das ER finden (Khanna *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996). Solche Transportwege spielen jedoch in quantitativer Hinsicht verglichen mit dem TAP-abhängigen Transport eine untergeordnete Rolle.

Eine Form des seltenen „bare lymphocyte syndrome“, bei dem es nach deutlicher Einschränkung der MHC Klasse I oder II Expression zu einer schweren Störung im Lymphozyten-Repertoire kommt, ist mit Mutationen in TAP1 oder TAP2 vergesellschaftet, die zu nicht funktionalen Molekülen führen. An diesem Syndrom leidende Patienten weisen gehäufte virale und bakterielle Infektionen sowie nekrotisierende granulomatöse Hautläsionen auf.

Ein Zusammenhang mit einigen Autoimmun-Erkrankungen, wie Typ I-Diabetes, rheumatoider Arthritis, M. Basedow sowie Multipler Sklerose und gewisser TAP-Allele (TAP-Polymorphismus) wurde von einigen Autoren vermutet, wird aber kontrovers diskutiert (Ritz und Seliger, 2001). Eine veränderte Peptid-Spezifität dieser Allele gilt dabei als möglicher Mechanismus.

### **Peptidbeladung**

Im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisierte schwere Ketten des MHC Klasse I Komplexes werden zunächst durch das in der ER-Membran verankerte Chaperon Calnexin gebunden. Nach Bildung eines Heterodimers aus schwerer Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin wird Calnexin im humanen System durch das Chaperon Calreticulin ausgetauscht. Um den MHC Klasse I Komplex mit Peptid zu beladen, geht dieser unter Beteiligung von Calreticulin, des Moleküls ERp57 (einer Thiolreduktase) und Tapasin eine physische Assoziation mit dem TAP-Heterodimer ein (Suh *et al.*, 1994+1996; Li *et al.*, 1999; Grandea und van Kaer, 2001). Das Molekül Tapasin (für TAP-assoziiertes Glykoprotein) spielt bei der Bildung dieses Peptidbeladungskomplexes eine herausragende Rolle. Es besitzt sowohl eine Bindungsstelle für die schwere Kette des MHC-Komplexes als auch für TAP. Lewis und Koautoren (1996) konnten an der  $\alpha 2$ -Domäne der schweren Kette des HLA-A2.1 Klasse I Komplexes Punktmutationen identifizieren, die die Bindung an das TAP-Heterodimer beeinflussen, so daß die Bindungsstelle in diesem Bereich vermutet wird.

Die Beladung selber erfolgt nach heutiger Vorstellung mit der Hilfe der peptidbindenden Proteine gp96 und Peptid-Disulfide Isomerase (PDI) (Spee und Neefjes, 1997).

Tapasin erhält die Bindung zwischen TAP und dem MHC Klasse I-Komplex aufrecht bis

zur Beladung mit einem Peptid hoher Affinität und hält somit nicht beladene Komplexe im ER zurück. Fehlt Tapasin, so gelangen auch leere Komplexe an die Zelloberfläche, die dort instabil sind und rasch wieder degradiert werden (Lewis und Elliot, 1998; Grandea und van Kaer, 2001).

Nach Bindung eines passenden Peptids löst sich der MHC-Komplex aus seiner Bindung und wird über den Golgi-Apparat zur Zellmembran weitergeleitet. (Hill und Ploegh, 1995). Die Trennung des MHC-Komplexes aus dem Peptidbeladungs-Komplex scheint nach einer enzymatischen Deglukosylierung zu erfolgen. (van-Leeuwen und Kears, 1996).

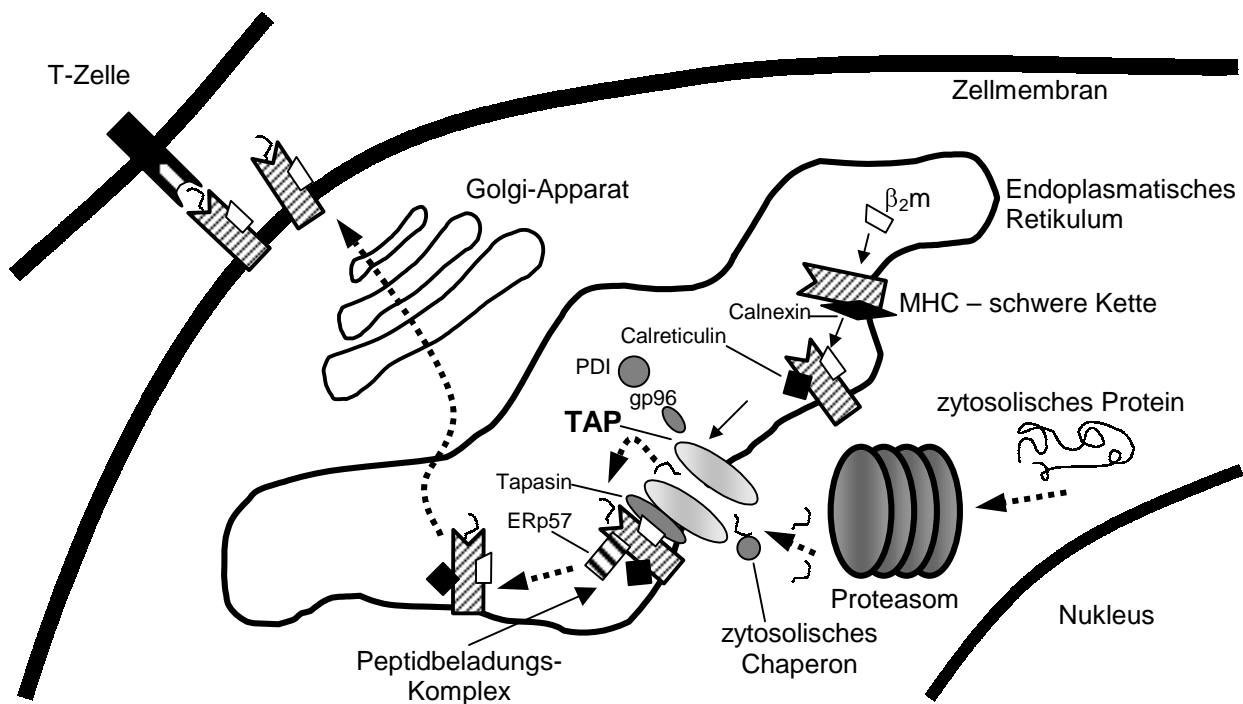


Abb. 1.8: Synopsis der MHC Klasse I Antigenprozessierung mit TAP in einer zentralen Rolle. Antigene Peptide werden aus zytosolischen Proteinen durch das Proteasom generiert und mittels zytosolischer Chaperone, die wohl der Familie der "heat-shock"-Proteine zugerechnet werden können, einem energieabhängigen Transport in das Innere des endoplasmatischen Retikulums zugeführt. Für den Transport ist das Heterodimer TAP maßgeblich, nur einzelne Peptide oder Proteine können über Signalsequenzen Eintritt in das ER finden. Der MHC-Komplex bildet mit der Hilfe einiger weiterer Chaperone wie Calreticulin, ERp57 und vor allem Tapasin mit dem TAP-Molekül einen Peptidbeladungs-Komplex. Bei der Beladung mit dem antigenen Peptid scheinen die Peptid-bindenden Chaperone gp96, Calreticulin und PDI eine Rolle zu spielen. Tapasin scheint dabei den Peptidbeladungs-Komplex zusammenzuhalten, bis auf dem MHC-Komplex ein Peptid mit hoher Affinität gebunden ist. Danach löst sich der Komplex wieder von TAP und kann durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche verbracht werden, an der das antigene Peptid präsentiert wird.

#### 1.1.4. Tumorantigene

Es erfolgte zuerst in Melanomzellen die Entdeckung sogenannter Tumor-assoziiertes-Antigene (TAA) (van-der-Bruggen *et al.*, 1991). Diese entsprechen auf dem MHC-Komplex präsentierten antigenen Peptiden, die aus Proteinen generiert wurden, deren Expression in Tumorzellen stark erhöht oder wie bei Punktmutationen auf diese

beschränkt ist. Diese Antigene sind prinzipiell geeignet, eine T-Zellantwort hervorzurufen und können in drei verschiedene Untergruppen unterteilt werden:

- a) Testis-spezifische Tumor-Antigene, die also sowohl in malignen Tumoren als auch im Hoden exprimiert werden, z.B. die Gene der MAGE-Familie. Außerdem fetale Genprodukte wie das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) oder das Carcinoembryonale Antigen (CEA). Diese Gruppe entspricht im Tumor überexprimierten, in Normalgeweben jedoch nur schwach oder überhaupt nicht exprimierten Proteinen.
- b) Differenzierungs-Antigene der jeweiligen Zellart, wie z.B. die Tyrosinase.
- c) mutierte Gene wie p53-Varianten, virale Genprodukte in Virus-assoziierten Malignomen sowie Onkogene wie p21<sup>ras</sup>.

Aus diesen Proteinen entstehen üblicherweise mehrere antigene Peptide. 1998 konnten Kirkin und Koautoren z. B. für das Melanom bereits über 30 bekannte Tumor-assoziierte Antigene veröffentlichen, deren Zahl seitdem ständig weiter gestiegen ist.

## 1.2. “Immune escape” Mechanismen von humanen Tumoren

Das wachsende Verständnis über molekulare Vorgänge, die zu Störungen der Präsentation einer Zelle führen können, bereitet Theorien den Weg, die erklären, auf welche Weise transformierte Zellen aus dem Wirt eliminiert werden bzw. welche Mechanismen Tumoren benutzen, um sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen (“immune escape”).

Es existieren eine Reihe von Mechanismen, durch die sich Tumorzellen der Erkennung durch zytotoxische Immunzellen ihres Wirts entziehen können. Generell können systemische Mechanismen und solche unterschieden werden, die sich spezifisch auf antigene Eigenschaften der Tumorzelle beziehen.

Als systemischer Mechanismus kann Tumorwachstum in teilweise immunprivilegierten Bereichen des Organismus oder die Sekretion immunsuppressiver Faktoren verstanden werden. Für Gliome ist z.B. die Sekretion von TGF- $\beta$  (“transforming growth factor-beta”) beschrieben worden. TGF- $\beta$  hat vielfältige Wirkungen auf die umgebenden Zellen, neben Angiogenese wird auch die Funktion von Immuneffektorzellen beeinträchtigt (Gilboa, 1999). Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen, auch solchen, die keine wesentliche Knochenmarksverdrängung zeigen, und Patienten mit intracraniellen malignen Tumoren weisen ebenso wie Patienten mit fortgeschrittenen Tumorleiden eine generalisierte Immundefizienz auf (Pawelec *et al.*, 1997), die nicht nur auf zytostatische Therapie oder allgemeinen Marasmus zurückgeführt werden kann (Kiessling *et al.*, 1999). Für myeloische maligne Erkrankungen konnte dabei eine reduzierte Expression der zum T-Zellrezeptorkomplex gehörenden  $\zeta$ -Ketten und zugehöriger Protein-Kinasen gefunden werden (Buggins *et al.*, 1998). Für Hirntumoren ist eine Störung der Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bekannt, eventuell verursacht durch die Unfähigkeit der Zellen ausreichend IL-2 Rezeptor zu produzieren (Elliott *et al.*, 1990). Weitere Beispiele sind die T-Zellen von Melanompatienten, deren Zytokinproduktion und  $\zeta$ -Ketten-Expression vermindert ist (Zea *et al.*, 1995), sowie tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL, “tumor infiltrating lymphocytes”) von Patienten mit Ovar- oder Nierenzellkarzinom, die eine verminderte

TNF- $\alpha$  Produktion in Korrelation mit schwacher  $\zeta$ -Ketten-Expression zeigen (Tartour *et al.*, 1995).

Auch die Expression des Fas-Liganden auf Tumorzellen, der die Apoptose aktivierter T-Zellen hervorrufen kann, fällt unter diese Kategorie (Walker *et al.*, 1998, Whiteside und Rabinowich, 1998). Es scheint dabei der Verlust an  $\zeta$ -Ketten mit dem Kontakt mit Fas-Liganden ursächlich zusammenhängen, quasi eine Vorstufe zur Apoptose zu bilden. Eine zentrale Rolle bei der Inaktivierung von T- und NK-Zellen scheinen weiterhin Monozyten zu spielen, insbesondere solche, die den Tumor infiltrieren. Sie sezernieren  $H_2O_2$ , wie es auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Fall ist, und induzieren damit ebenfalls  $\zeta$ -Ketten-Verlust bis hin zur Apoptose. Zudem wird durch sie Nitrat („nitric oxide“ = NO) sezerniert, das eine Hemmung der Signaltransduktion für die T-Zell-Aktivierung, durch Blockade des JAK3/STAT5 Signalweges bewirkt (Kiehl *et al.*, 1999).

Als sogenanntes „Durchschleichen“ („sneaking through“) wird ein Phänomen beschrieben, das im Tierversuch nach Injektion unterschiedlicher Mengen Tumormaterials beobachtet werden kann. Nach Verabreichung größerer Mengen von Tumorzellen kommt es zur Abstoßung, bei geringen Mengen können sich jedoch Tumoren etablieren. Eine Übertragbarkeit dieses Modells auf den Menschen ist bei zunächst langsam wachsenden Tumoren denkbar, die anfangs das Immunsystem nicht ausreichend stimulieren und nach ihrer Etablierung nicht mehr zu eliminieren sind.

Als weitere Mechanismen werden das sogenannte „antigen shedding“, bei dem Tumorzellen Antigene „abwerfen“ und das „antigen masking“, bei dem Antigene durch die Produktion von Polysacchariden maskiert werden, postuliert (aus Abbas *et al.*, 1994).

Zu den antigenspezifischen Mechanismen zählen zum Beispiel Antigen-Verlustvarianten, d.h. Tumorzellen, die ein vormals exprimiertes Tumorantigen nicht mehr exprimieren, am ehesten nach einem Selektionsprozess durch eine erfolgte Immunantwort. Eine verminderte Expression kostimulatorischer Signale, besonders der Verlust der B7-Expression auf Tumorzellen, der zu einer nicht ausreichenden Erkennung durch T-Zellen führt (Thompson, 1995), kann ebenfalls zu einem Mechanismus gezählt werden, der die antigenen Eigenschaften der Tumorzelle betrifft. Wenn T-Zellen mit einem Antigen ohne kostimulatorische Signale konfrontiert werden, führt dies zur Ausbildung von T-Zelltoleranz gegen die Tumorzellen. Dabei handelt es sich um einen Vorgang, der auch bei der regulären Entwicklung von Toleranz gegen Selbstantigene wirksam ist (Sotomayor *et al.*, 1996).

Die größte Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der Immunabwehr von Malignomen erhalten aber Mechanismen, die die regelrechte Präsentation des zelleigenen Peptidrepertoires und damit tumorspezifischer Peptide auf MHC Klasse I Molekülen verhindern. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen zu Störungen der internen Antigenprozessierung, die hauptsächlich für das Zustandekommen einer korrekten Darstellung aller in der Zelle vorhandenen Peptide verantwortlich ist.

Zu den betroffenen Anteilen dieses Apparates zur Antigenprozessierung gehören im besonderen der Peptidtransporter TAP und das Proteasom mit seinen Untereinheiten LMP2 und LMP7, die wie beschrieben für die Bildung des Immunoproteasoms erforderlich sind. LMP2 und LMP7 wurden zusammen mit den Genen von TAP1 und TAP2 in einem MHC Klasse II Locus lokalisiert und werden gleichzeitig mit diesen in bösartigen Tumoren häufig nur schwach exprimiert, bzw. unter IFN- $\gamma$  Einfluß gemeinsam hochreguliert (Seliger *et al.*, 1997b). TAP1 und LMP2 teilen sich einen bidirektionalen Promoter, der ein IFN- $\gamma$  und ein p53-Steuerelement sowie einen NF- $\kappa$ B Bindungsbereich enthält, die wohl unter anderen für die Regulation dieser antigenpräsentierenden Gene verantwortlich sind (Ritz und Seliger, 2001).

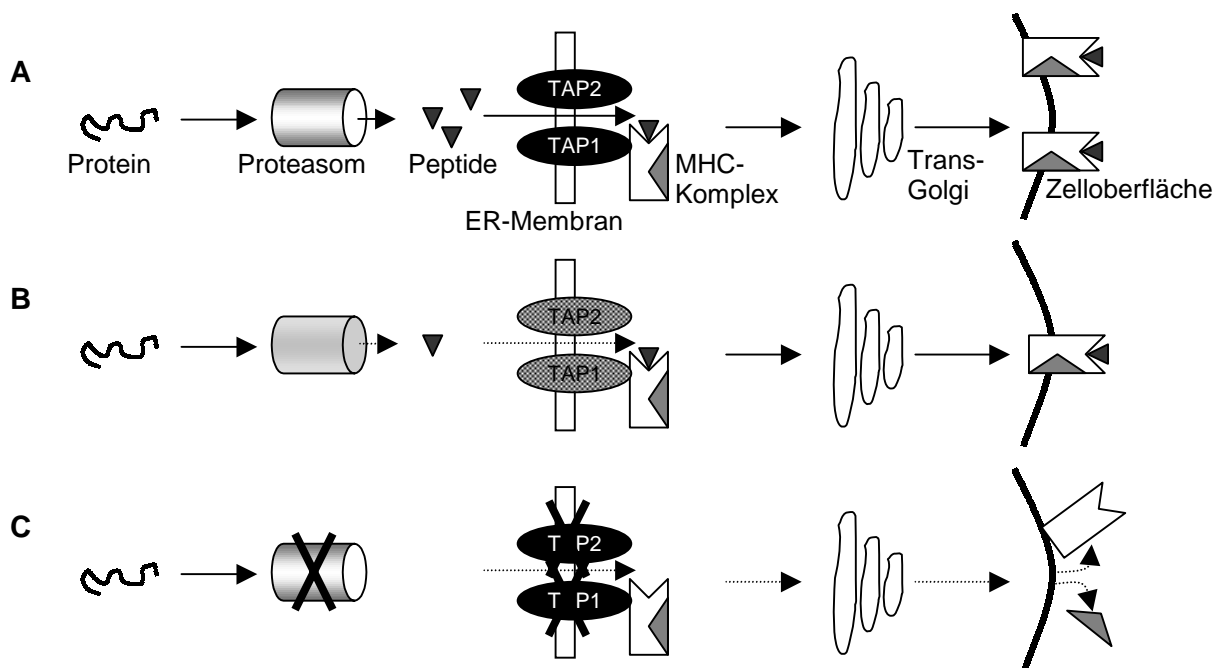


Abb. 1.9: Einfluß von Störungen der APM auf die Antigenpräsentation.

Bei ungestörter Antigenprozessierung [A] ist eine regelrechte Präsentation zytosolischer Antigene auf der Zelloberfläche möglich. Die Störung der Funktion oder verminderte Expression einzelner Anteile dieser Maschinerie [B] führt im allgemeinen zu einer reduzierten MHC Klasse I-Oberflächenexpression. Bei totalem Funktionsausfall oder fehlender Expression eines oder mehrerer Bestandteile [C] kann es zu einem vollkommenen Verlust der Antigenpräsentation unter anderem durch Instabilität nicht beladener MHC-Komplexe kommen.

Daneben kann natürlich auch der Verlust kompletter HLA-Gene oder des  $\beta_2$ -Mikroglobulin durch Chromosomenaberrationen bzw. die Mutation dieser Gene zur Beeinträchtigung oder völligen Unmöglichkeit der Antigenpräsentation führen, wie es unter anderem für Melanomzellen gezeigt werden konnte (Ferrone und Marincola, 1995). „Immune escape“-Mechanismen werden auch bei der Infektion durch zahlreiche Viren gefunden. Beispielhaft sollen hier einige virale Proteine genannt werden, die die Peptidtransport-Funktion behindern: Das Protein ICP47 aus dem Herpes simplex Virus Typ 1 lagert sich mit hoher Affinität an den Peptidbindungsbereich von TAP an und blockiert diesen. Das humane Cytomegalievirus ist in der Lage durch sein ER-residentes

Protein US6 eine TAP-Konformationsänderung herbeizuführen, die dessen Funktion ebenfalls einschränken (Miller und Sedmak, 1999).

### 1.2.1. Defizienzen der Antigenprozessierungsmaschinerie in Tumoren

In Tumoren unterschiedlicher Herkunft wurden Beeinträchtigungen der Bestandteile des Antigenprozessierungs-Apparates gefunden. Zu diesen gehören unter anderem kleinzellige Lungenkarzinome (Restifo *et al.*, 1993; Singal *et al.*, 1996b), das Cervix-Karzinom (Cromme *et al.*, 1994), das Prostata-Karzinom (Sanda *et al.*, 1995), Melanome (Wang *et al.*, 1996), das Burkitt-Lymphom (Rowe *et al.*, 1995), Kolorektale Karzinome (Kaklamanis *et al.*, 1994, Browning *et al.*, 1996), Mammakarzinome (Kaklamanis *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 1998), hepatozelluläre Karzinome, basophilic leukemia (Singal *et al.*, 1996a) und Nierenzellkarzinome (Seliger *et al.*, 1996a,b; Seliger *et al.*, 1997a). Unter diesen Beeinträchtigungen lassen sich strukturelle Alterationen, wie der zuvor beschriebene komplette HLA-Verlust und regulative Vorgänge unterscheiden, die sich meist in der verminderten Expression mehrerer Komponenten der Antigenprozessierung niederschlagen und so zu einer schwachen HLA-Oberflächenexpression führen. Eine solche koordinierte negative Regulation konnte auch für Nierenzellkarzinome gezeigt werden (Seliger *et al.*, 1996b).

Malignomart	Anzahl Proben	Prozentuale Expressionsverminderung bzw. -verlust				
		LMP2	LMP7	TAP1	TAP2	HLA I
M. Hodgkin / Burkitt-L.	8	100	0	100	88	100
Plasmozytom	13	./.	./.	13	13	13
Kleinzelliges Bronchial-Ca.	6	100	100	100	100	100
Cervix-Ca.	7	0	0	0	0	29
Nierenzellkarzinom	19	79	74	79	74	34
Melanom	9	57	78	33	57	./.

Tab. 1.2: Darstellung der Expressionsverminderung relevanter Gene der Antigenprozessierung in Malignomen verschiedenen Ursprungs (nach Seliger *et al.*, 2000).

Hierbei offenbarte sich auch ein Zusammenhang zwischen dem Grad der malignen Transformation, bzw. einer Progression der Erkrankung im Sinne von Metastasierung und der schwächeren Expression der Antigenprozessierungs-Maschinerie. So zeigte z.B. eine Zelllinie gewonnen aus einer Lymphknoten-Metastase eines Nierenzellkarzinoms gegenüber Zellen aus dem Primärtumor eine deutlich verringerte Expression relevanter Gene. Die Zelllinie aus dem Primärtumor wies, verglichen mit Nieren-Normalgewebe, ebenfalls reduzierte Synthesewerte für diese Gene auf (Seliger *et al.*, 1997c). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für Cervixkarzinome (Cromme *et al.*, 1994b) und Mammakarzinome (Kaklamanis *et al.*, 1995) gefunden werden.

### 1.2.2. Reaktion des Immunsystems auf Antigenprozessierungs-Defizienzen

Bei reduzierter MHC Klasse I-Oberflächenexpression ist die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen erschwert und die Lyse der Zielzellen vermindert. Es kann eine Anergie, bzw. eine Toleranz der T-Zellen gegenüber schwach exprimierten Tumor-Antigenen beobachtet werden. Das heisst, die T-Zellantwort ist unter anderem abhängig von der Quantität der MHC-vermittelten Präsentation.

Alternativ sind in diesem Fall natürliche Killer (NK)-Zellen, die MHC-unabhängig Tumorzellen mit einer gewissen Spezifität lysieren können eine wichtige Ergänzung der Immunabwehr. Die Grundlage für diese Spezifität ist nicht vollständig verstanden, jedoch scheint eine Verminderung der MHC-Dichte auf Zielzellen, wie es bei APM-Defekten vorkommt, eine NK-Zell-vermittelte Lyse zu triggern (Salcedo *et al.*, 1994).

NK-Zellen werden als phylogenetisch ältere aber nicht Peptidantigen-spezifische CTL angesehen. Sie teilen einige Eigenschaften mit CTL, wie z.B. deren Aktivierbarkeit durch Zytokine, besonders IL-2, tragen jedoch keinen T-Zellrezeptor.

Es konnten allerdings Rezeptoren der Ig-Superfamilie identifiziert werden, die Gruppen von, bzw. einzelne klassische und auch nicht klassische MHC-Komplexe erkennen können, die Moleküle KIR (“killer cell inhibitory Ig-like receptor”) und ILT2/LIR-1 (“Ig-like transcript 2/leukocyte inhibitory receptor 1”). Diese Rezeptoren vermitteln eine Hemmung der NK-Zelle und erklären somit die vorgenannte Spezifität der Zellyse. Als aktivierende Rezeptoren werden aus der Gruppe der NCRs (“natural cytotoxicity receptors”) die Moleküle NKp46, NKp44 und NKp30 propagiert, die genauso der Ig-Superfamilie angehören. Ein weiteres Molekül, ein Lektin namens NKG2D soll ebenfalls aktivierende Signale über die Bindung an GPI-verankerte Moleküle vermitteln (Colonna *et al.*, 2000).

Die nicht klassischen, wenig polymorphen MHC-Moleküle HLA-G und HLA-E sowie auch Moleküle die dem Isotyp HLA-C angehören, sind in der Lage, wenn sie auf ansonsten MHC-defizienten Zellen exprimiert werden, die NK-Zell-Funktion gegen diese Zellen zu inhibieren. Ihnen wird dabei eine Rolle in der feto-maternalen Toleranz und auch beim „immune escape“ von Tumoren zugesprochen, die allerdings kontrovers diskutiert wird (Bainbridge *et al.*, 2001).

Nach Aktivierung durch Zytokine verstärkt sich die Aktivität der NK-Zellen beträchtlich, sie verändern sich zu sogenannten Lymphokin-aktivierten-Killerzellen (LAK), so daß auch hier das “Crosspriming” von Bedeutung ist. Eine weitere Funktion von NK-Zellen ist die Antikörper abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität, für die ein Rezeptor für den Fc-Anteil von IgG (CD16) identifiziert werden konnte.

### 1.2.3. Modulation der Antigenprozessierungsmaschinerie durch Zytokine

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird heute versucht, ”immune escape” Mechanismen zu korrigieren, in der Hoffnung, eine solche Strategie in die Tumorthherapie umsetzen zu können.

Zytokine sind in der Lage, die Funktionen unterschiedlicher APM Komponenten zu beeinflussen. Dabei führt die Behandlung mit Interferonen (IFN) zu einer quantitativen,



bis zu 10-fachen Erhöhung der Expression verschiedener Komponenten. Für verschiedene Allele der schweren Ketten,  $\beta_2m$ , TAP-Moleküle und die Moleküle LMP2 und 7, aber auch Moleküle außerhalb des MHC-Locus wie MECL-1 oder PA28 konnte eine koordinierte verbesserte Expression mit anschließender Erhöhung der MHC-Oberflächenexpression nach IFN-Behandlung gezeigt werden (Fisk *et al.*, 1994; Seliger *et al.*, 1997b). Die Zytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) steigern die Expression der Bestandteile der APM, das Zytokin IL-10 dagegen ist in der Lage die Expression von TAP zu reduzieren, was möglicherweise klinische Relevanz als „tumor-escape“-Mechanismus hat (Zeidler *et al.*, 1997). In der Therapie z.B. des Melanoms haben einzelne Patienten nach Zytokin-Behandlung Remissionen gezeigt, was auch auf die Modulation der APM und einer daraufhin stattfindenden Erkennung der Tumorzellen durch CTL zurückgeführt wurde.

Weitere Versuche zielen darauf ab, die Immunogenität von Tumorzellen durch die stabile Transfektion und Expression von Zytokin-Genen oder einzelnen Genen der APM zu verbessern (Schendel *et al.*, 2000).

### 1.3. Das Nierenzellkarzinom

Das Hypernephrom oder Nierenzellkarzinom (NZK) wird als „maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms mit immunhistochemischen Merkmalen uropoetischer Tubulusepithelien“ definiert. Die Häufigkeit innerhalb aller bösartigen Tumoren beträgt bis zu 3% und es ist mit etwa 85% der am häufigsten auftretende Nierentumor. Man unterscheidet die sporadische, die seltenere hereditäre familiäre Form und ein Auftreten im Rahmen des „von-Hippel-Lindau-Syndroms“ (VHL) als eine Teilkomponente. Ein sicherer pathogenetischer Faktor für die sporadische Entstehung des Nierenzellkarzinoms konnte noch nicht identifiziert werden, chronische Dialyse und Exposition mit Zigarettenrauch bzw. Schwermetallen sind jedoch Risikofaktoren.

#### 1.3.1. Molekularbiologie, Morphologie und Klinik des Nierenzellkarzinoms

Zytogenetisch können zwei Formen unterschieden werden, die sich auch grob im histologischen Wachstumsmuster unterscheiden: Die selteneren papillär wachsenden Formen mit etwa 10% Anteil zeigen häufig einen Verlust des Y-Chromosoms und Trisomien der Chromosomen 7, 17, 16 und 12. In den wesentlich häufigeren nichtpapillären findet sich dagegen eine Deletion des Chromosoms 3p, auf dessen kurzen Arm sich neben dem VHL-Gen auch weitere Tumorsuppressorgene befinden, deren Funktionsverlust ursächlich mit der Entstehung eines Nierenzellkarzinoms zusammenhängen soll. Das VHL-Gen, das beim VHL-Syndrom in der Keimbahn verändert ist, hat regulatorische Funktionen, die den Zellzyklus und damit die Proliferation beeinflussen. Ausserdem wird die Produktion hypoxieinduzierter Gene verstärkt, was unter anderem eine Hypervaskulierung von VHL-defekten Tumoren zur Folge hat. Eine Inaktivierung des VHL-Gens scheint nicht ausreichend für Initiation oder Progression der Tumorerkrankung zu sein. Bei der Tumorphogenese scheinen

ausserdem die ebenfalls auf Chromosom 3p lokalisierten Gene FHIT und RASSF<sub>1</sub>A eine Rolle zu spielen (Seliger *et al.*, 2001).

Für eine Klassifizierung nach rein histologischen Typen, die sich in Häufigkeit und Prognose unterscheiden, hat sich außerdem die Einteilung nach Thoenes etabliert:

Der klarzellige Typ ist mit 80% Anteil der häufigste. Er zeigt immunhistochemisch Merkmale des proximalen Tubulus mit großen Zellen, die wegen eines hohen Glykogengehaltes ein helles Zytoplasma haben. Die Kerne der Zellen sind klein, chromatinreich, mäßig polymorph und weisen wenige Mitosen auf. Das Wachstumsmuster ist eher solide.

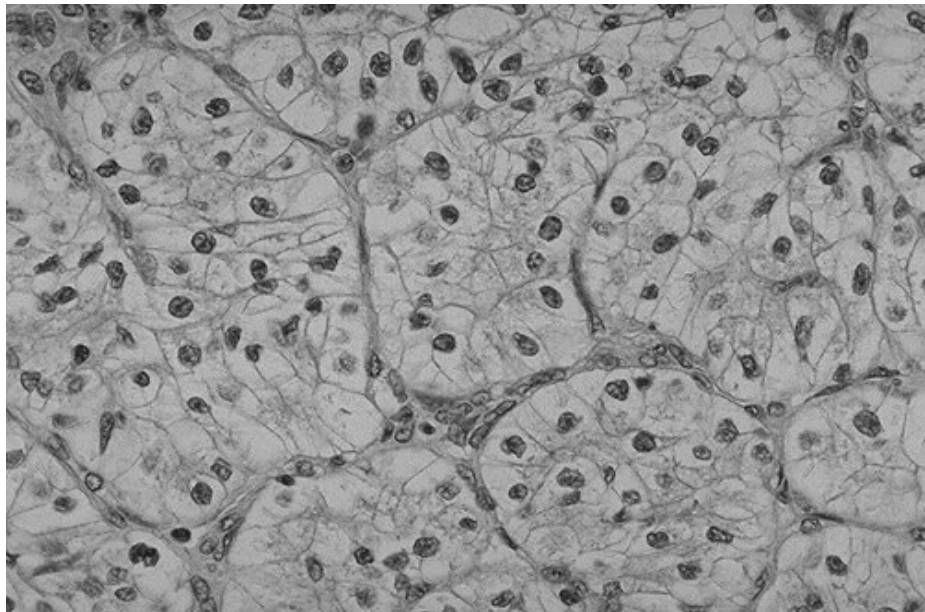


Abb. 1.9: Histologische Ansicht eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms.  
(Aus dem "Webpath"-Online-Pathologie Kursus (<http://medstat.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>)).

Der zweithäufigste Typ mit 10% Anteil ist der chromophile. Auch dieser Typ weist Merkmale des proximalen Tubulus auf, die Zellen haben jedoch ein basophiles oder eosinophiles Zytoplasma.

Der mit 5% Anteil seltenere chromophobe Typ gleicht den Zellen der Sammelrohr-Schaltstücke. Die Zellen, die ein transparentes, feinretikuläres Zytoplasma zeigen, bevorzugen ein solides Wachstumsmuster und haben eine günstigere Prognose.

Die Zellen des mit 1% Anteil eher seltenen Spindelzelltyp haben ein spindelförmiges Aussehen, sind proliferationsaktiv und wachsen aggressiv in die Umgebung ein. Ihre Prognose ist daher schlecht.

Das sehr seltene NZK vom Bellini-Gang-Typ imitiert Sammelrohrhauptzellen und zeichnet sich ebenfalls durch invasives Wachstum und eine schlechte Prognose aus.

Das Nierenzellkarzinom metastasiert bevorzugt hämatogen nach dem Kavatyp. In 50% der Fälle finden sich Metastasen in der Lunge, in 30% im Skelettsystem und in 30% in der Leber. Metastasen finden sich außerdem im Gehirn und in der anderen Niere. In 35% der Fälle metastasiert es lymphogen. (Riede und Schaefer, 1993)

Klinisch manifestiert sich das NZK in 50% der Fälle durch eine Hämaturie, in 15% durch Fieber und in 10% durch eine Polyglobulie infolge erhöhter Erythropoietinproduktion. Weitere klinische Zeichen sind ein Flankenschmerz, in einigen Fällen Paraneoplasien wie einem Hyperparathyreoidismus und als Spätzeichen ein tastbarer Flankentumor (aus Fauci *et al.*, 1998).

### 1.3.2. Nierenzellkarzinom und Immunsystem

Bei einer unvollständigen Tumorabwehr finden sich regelmäßig innerhalb und in der Umgebung eines Nierenzellkarzinoms tumorinfiltrierende Lymphozyten, die gelegentlich erfolgreich *in vitro* expandiert werden können und auch dann Reaktivität gegen Nierenzellkarzinomzellen zeigen können (Brouwenstijn *et al.*, 1996). Meist können allerdings keine tumorspezifischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden, oder solche besitzen nur marginales lytisches Potential und eine geringe Proliferationskapazität. Dabei konnten viele Faktoren, die zu einem „immune escape“ führen können, in dieser Tumorentität nachgewiesen werden. Zu diesen zählen verminderte MHC Klasse I und II Expression, defiziente Antigenprozessierung, konstitutive Expression nicht klassischer MHC-Moleküle, Expression des Fas-Liganden, fehlende Kostimulation und Sekretion immunsuppressiver Faktoren (Seliger *et al.*, 2001).

In Fällen, in denen eine Immunabwehr erfolgreich war und es spontan oder nach Immunochemotherapie zu einer Remission gekommen ist, konnten von solchen Patienten tumorreaktive T-Lymphozyten isoliert oder sogar stabile T-Zelllinien etabliert werden (Bernhard *et al.*, 1994 und 1996). Mit Hilfe solcher tumorreaktiver T-Lymphozyten gelang auch für Nierenzellkarzinome die Identifikation von Tumorantigenen (TAA). Hervorzuheben ist hierbei die Entdeckung des Gens RAGE durch einen HLA-B7-restringierten T-Zellklon (Gaugler *et al.*, 1996), das auch in zahlreichen anderen malignen Neoplasien, wie z.B. dem Harnblasenkarzinom, in gesundem Gewebe aber nur in Zellen der Retina nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnten mutierte Formen der Gene hsp70-2, mdm2, p53, HLA-A2 und überexprimierte Antigene wie HER-2/neu, MAGE-2 und PRAME nachgewiesen werden (Seliger *et al.*, 2001).

### 1.3.3. Therapie des Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des NZK gestaltet sich schwierig, da der Tumor relativ lange klinisch stumm bleibt und bei Diagnose häufig bereits metastasiert ist. Eine Heilung ist aber nur nach vollständiger chirurgischer Exstirpation ohne Fernmetastasierung zu erwarten. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten ohne Metastasierung allerdings 70%. Eine Zytostatika- oder Strahlentherapie beeinflusst die Tumorzellen nicht nennenswert (Heidbreder und Götz 'Classen', 1993), allein Vinca-Alkaloide und 5-Fluoruracil zeigen zytostatische Aktivität, verlängern aber nicht die Überlebenszeit. Bemerkenswert ist jedoch eine verhältnismäßig hohe Rate spontaner Remissionen von ca. 0,5% (Young, 1998), der Nachweis tumorinfiltrierender Lymphozyten und Therapieerfolge nach dem Einsatz von immunmodulatorisch wirkender Zytokine (Figlin *et al.*, 1991; Marincola *et al.*, 1995). Bisher wurde der Effekt von Zytokinen wie IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  sowie

Interleukin-2 in klinischen Studien untersucht. Eine solche Behandlung führte bei einigen ausgewählten Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium zu partiellen, in einzelnen Fällen sogar zur totalen Remission (Bukowski, 1997; Schmid und Szabo, 1997).

Dies legt die Vermutung nahe, daß NZK potentiell immunogen sind und damit ein interessantes Ziel für innovative immuntherapeutische Ansätze darstellen. Unter diesen werden im wesentlichen zwei verschiedene Richtungen unterschieden:

Zur Zeit wird noch eine Chemo-Immuntherapie im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien favorisiert, die die sequentielle Gabe von IFN- $\alpha$ -2a, IL-2 und 5-FU beinhaltet. Die Ansprechraten liegen hierbei zwischen 20 und 40 Prozent, die mittlere Überlebenszeit bei ca. 20 Monaten und die Rate langanhaltender Remissionen bei etwa fünf Prozent (Fischer *et al.*, 2000).

Als interessante Alternativen bieten sich inzwischen Therapiestudien, die das Prinzip der Tumorzellvaksinierung verfolgen. Dabei werden dem Patienten aufbereitete tumorspezifische Antigene appliziert, die eine Immunantwort gegen die im Körper verbliebenen Tumorzellen induzieren sollen. Es wird dabei unterschieden zwischen der allogenen und der autologen Vakzinierung. Bei der allogenen Vakzinierung wird inaktiviertes fremdes, aber HLA-adaptiertes Tumormaterial, meist als "Antigen-Cocktail" aus Tumoren verschiedener Patienten, verwendet. Bei der Herstellung einer autologen Vakzine wird Material patienteneigener Tumore verwendet. In beiden Fällen wird die Vakzine zusammen mit unspezifischen Immunmodulatoren wie Zytokinen oder BCG eingesetzt. Anstatt Zytokine zu den inaktivierten Zellen dazuzugeben, wurden auch bereits Tumorzellen *ex-vivo* mit Zytokin-Genen transfiziert und sorgten dadurch nach ihrer Verabreichung für eine anhaltende Produktion dieser Substanzen (Simons *et al.*, 1997)

Eine vielversprechende Modifikation des Vakzinierungsansatzes ist das Einschleusen von tumorspezifischen Peptiden in professionelle Antigen-präsentierende Zellen und eine anschließende Vakzinierung mit diesen (Nair *et al.*, 1997).

Eine interessante Erweiterung dieses Ansatzes zur autologen Vakzinierung liegt in der Fusionierung von Tumormaterial mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen. Die Prozessierung und Präsentation der Tumorantigene soll dadurch ungeachtet eventueller Defekte der Tumorzelle verbessert und um die MHC Klasse II restringierte Präsentation erweitert werden (Kugler *et al.*, 2000). Allerdings wird die Methodik dieses Ansatzes kontrovers diskutiert.

Eine noch nicht bis zum Einsatz gebrachte Alternative sind molekulare Vakzine, die nach *in vitro* Herstellung ohne den Einsatz von Tumorzellmaterial eine Expression bereits charakterisierter Tumorantigene erlauben.

## 2. Ziel der Arbeit

Nach der Beobachtung, daß Nierenzellkarzinomzellen häufig eine niedrige und instabile MHC Klasse I-Oberflächenexpression aufweisen, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob zu den zugrundeliegenden Mechanismen, die zu einer abnormalen MHC Klasse I-Expression führen, Defizienzen im Peptidtransport gehören. Diese werden für eine verminderte Funktion der Antigenprozessierungsmaschinerie und damit verbunden für eine verschlechterte Aktivierung tumorspezifischer CTL verantwortlich gemacht.

Voraussetzung für die Untersuchungen ist die Etablierung des stabilen Gentransfers in Nierenzellkarzinomzellen. Nach stabiler Transfektion von Nierenzellkarzinomzellen mit dem humanen TAP1A Allel wird untersucht, ob eine stabile, konstitutive Überexpression des TAP1-Moleküls in Nierenzellkarzinomzellen erreicht wird.

Zu diesem Zweck wird ein Plasmidvektor mit dem starken Promoter des Cytomegalievirus entwickelt, in dem das Transgen über eine IRES-Komponente mit dem Selektionsmarker gekoppelt ist sowie die Elektroporation als Transfektionsverfahren optimiert. Die Zellen werden mit einem leeren („mock“) und einem TAP1-tragenden Vektor transfiziert und die funktionellen Unterschiede der TAP1-negativen und -positiven Transfektanden dargestellt. Dabei wird primär die Integrität des TAP1-Transgens, sowie anschließend dessen Expression auf RNS- und Protein-Ebene untersucht.

Im weiteren werden die Auswirkungen der erhöhten TAP1-Proteinexpression auf die Funktion der Antigenprozessierung und -präsentation sowie auf die Erkennung durch T-Lymphozyten definiert.

Dafür wird die Peptidtransportfunktion mit Modellpeptiden überprüft und die Bedeutung der TAP1-Überexpression für die MHC Klasse I-Präsentation durch durchflußzytometrische Untersuchungen und deren Einfluß auf T-Zell-immunologische Parameter durch Lymphozytenproliferations- und Zytotoxizitäts-Analysen erfasst. Die Aktivierung von Lymphozyten wird ausserdem anhand von Zytokin-Sekretions-Analysen überprüft.

Denkbare klinische oder experimentelle Anwendungen für TAP1-modifizierte Tumorzellen sind zum einen die erleichterte Identifizierung Tumorzell-spezifischer Tumorantigene durch verstärkte Oberflächenexpression und zum anderen die Herstellung einer immunogeneren Tumor-Zellvakzine.



### 3. Material

#### 3.1. Verwendete Bakterien

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung	Quelle
DH5•	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , Δ( <i>argF-lacZYA</i> )169, Φ80d ( <i>lacZ</i> ΔM15)	Vermehrung von pUC-Plasmiden und ihrer Derivate. α-Komplementation fähig	[Hanahan; 1983 modifiziert durch BRL; 1986]

#### 3.2. Plasmide

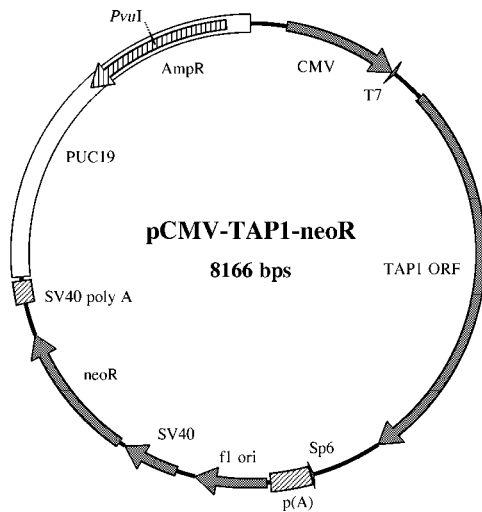
Name	Nr.	Insertion/Verwendung	Quelle
pcDNA3		Basisvektor, verwendet zur Klonierung der verschiedenen Plasmide.	Invitrogen, San Diego, CA, USA
pCMV-TAP1-neoR	P21	Expressionsvektor für das TAP1A-Gen mit der Neomycin-Phosphotransferase II (neo <sup>R</sup> ) in zweiter Expressionskassette.	D. Jung
pCMV-TAP2-neoR	P23	Expressionsvektor für das TAP2E-Gen mit neo <sup>R</sup> in zweiter Expressionskassette.	D. Jung
pCMV-IRES-neoR	P46	Klonierungsvektor mit CMV-Promoter und neo <sup>R</sup> als Selektionsmarker in einer Expressionskassette	D. Jung
pCMV-TAP1-IRES-neoR.2	P84	Expressionsvektor für das TAP1A Gen und neo <sup>R</sup> in einer bicistronischen Expressionskassette.	D. Jung, C. Harders, M. Kallfelz

Weitere verwendete Vektorkonstrukte waren die Plasmide p-hTAP1 und p-hTAP2 (Quelle für das TAP1A- und das TAP2E-Allel, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch F. Momburg, DKFZ Heidelberg), sowie die Plasmide P64 (CMV-TAP1-IRES-neoR.1) und P65 (PGK-TAP1-IRES-neoR), die beide fehlerhafte Startsequenzen enthielten. Beim Plasmid P65 wurde auf den Cytomegalievirus-Promoter zugunsten des Promoters der humanen Phosphoglycerat-Kinase verzichtet. Dieser ist dafür bekannt, weniger stark als der CMV-Promoter zu sein, aber eine stabilere Expression des darauffolgenden Transgens zu bieten (Nacken *et al.*, 1996).

##### 3.2.1. Restriktionskarten der verwendeten Plasmide

Im folgenden sind die Restriktionskarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide schematisch dargestellt, wobei nur die wesentlichen Elemente und die Restriktase-Erkennungsstellen des Polylinker vollständig aufgeführt wurden. Zusätzlich wurde die *PvuI*-Erkennungsstelle gekennzeichnet, die für eine zur stabilen Integration in das Zell-Genom notwendigen Linearisierung der Plasmide von Bedeutung ist.

Abb. 2.1: Plasmid pCMV-TAP1-neoR (P21) mit einer CMV kontrollierten TAP1- und einer zweiten SV40 kontrollierten neoR Expressionskassette



**AmpR:** Ampicillin-Resistenzgen ( $\beta$ -Lactamase).  
**CMV:** Promoter des Cytomegalievirus  
**T7:** Promoter des Phagen T7.  
**TAP1 ORF:** „open reading frame“ des TAP1A-Gens.  
**Sp6:** Promoter des Phagen Sp6.  
**p(A):** Poly-Adenylierungssequenz, (bovines Wachstumshormon)  
**f1 ori:** Replikationsursprung des f1 Phagen.  
**SV40:** Promoter des Simian Virus 40 (SV40).  
**neoR:** Neomycinresistenzgen.  
**SV 40 poly A:** Poly-Adenylierungssequenz des SV40  
**PUC19:** PUC19-DNS-Anteil

Abb. 2.2: Plasmid pCMV-TAP2-neoR (P23) analog zu P21 mit der TAP2E-cDNS anstelle des TAP1A-Transgens

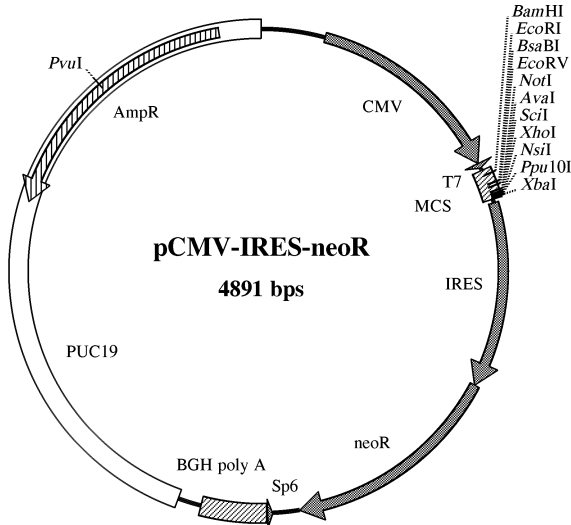
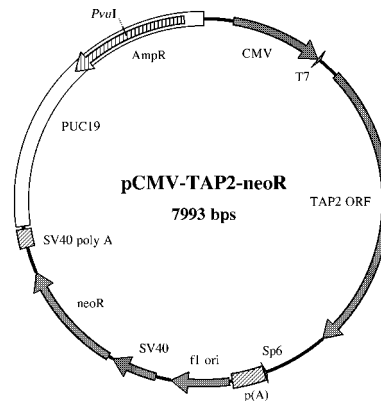


Abb. 2.3: Plasmid pCMV-IRES-neoR (P46) Basisvektor für die Konstruktion bicistronischer Expressionsvektoren mit dem neo<sup>R</sup>-Gen als Selektionsmarker

**MCS:** „multiple cloning site“, Polylinker zur Klonierung von Transgenen in diesen Vektor mit Angabe der Restriktionsstellen  
**IRES:** „internal ribosomal entry site“, Sequenz aus dem Human Choriomeningitis Virus, die einen Methyl-Cap unabhängigen Translationsstart ermöglicht (Gallardo *et al.*, 1997).  
**BGH poly A:** „bovine growth hormone“ Poly-Adenylierungssequenz



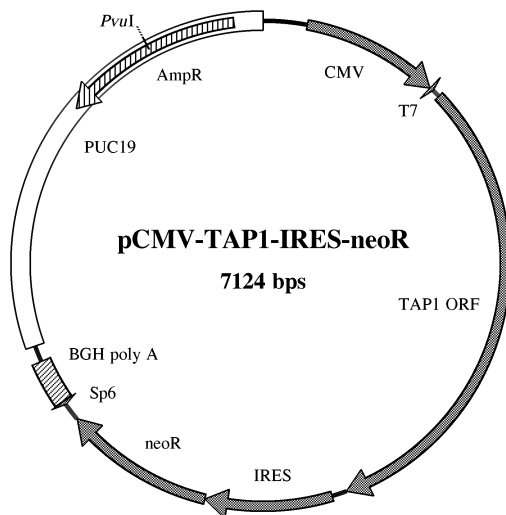


Abb. 2.4: Plasmid 84, Expressionsvektor zur stabilen Expression des TAP1A- und des neoR-Transgens durch Transkription nur einer bicistronischen mRNS, in der beide Gene durch eine IRES verbunden sind.

Bei erhöhter Instabilität des Vektoronstruktes mit einem CMV-Promoter (siehe auch: McLachlin *et al.*, 1993; Najjar *et al.*, 1999) wurde durch die Kombination mit einer IRES eine stabile und unter Selektion anhaltende Integration des Plasmids in die Wirts-DNS erreicht.

### 3.3. Zelllinien

Name	Eigenschaften/Verwendung	Quelle
MZ1257RC	NZK-Zelllinie, stabile Transfektion	Seliger <i>et al.</i> , 1997b
MZ1851RC	NZK-Zelllinie, stabile Transfektion	Seliger <i>et al.</i> , 1996a
MZ1851LN	Zelllinie einer Lymphknoten-Metastase, stabile Transfektion	Seliger <i>et al.</i> , 1996a
NIH3T3	Murine Fibroblasten-Zelllinie, transiente Transfektion	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (Braunschweig)
IVSB	T-Zelllinie eines NZK-Patienten	Wölfel <i>et al.</i> , 1993

### 3.4. Oligonukleotide

#### 3.4.1. Primer für die PCR

Name	Sequenz	Amplifikat	Modus	Verwendung
Neo-A	22-mer 5'-CACAAACAGACAATCGGCTGCTC-3'	518bp	G	Nachweis der Integration des neoR-Selektionsgens
Neo-B	22-mer 5'-CCATGATATTCGGCAAGCAGGC-3'			
pcDNA5'	21mer 5'-ACGACTCACTATAGGGAGACC-3'	707-863bp (je nach Vektor)	G/R	Nachweis des TAP1- und des TAP2-Transgens
T-1AEx2	21mer 5'-CCATCTTGTTAGAATCCAGTCA-3'			
T-2EcDNA	19mer 5'-GGAGAAGAGGCACATGAAG-3'			
$\beta$ -Aktin5'	21mer 5'-TCCTGTGGCATCCACCAAAC-3'	315bp	R	Nachweis des $\beta$ -Aktin Gens als Expressions-Kontrolle
$\beta$ -Aktin3'	21mer 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACCAT-3'			

Abk.: G: Genomische PCR, R: RT-PCR

Die verwendeten vektorspezifischen Oligonukleotide wurden durch die Firma Pharmacia Biotech (Roosendaal, Niederlande) oder MWG Biotech GmbH (Ebersberg, BRD) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in H<sub>2</sub>O (PCR-Primer) umgepuffert und bei -20°C gelagert.

### 3.4.2. Sonden für Southern- und Northern-Blot

Sonde	Sequenz
TAP1	Fragment von 1163bp aus Restriktionsverdau von Plasmid P84 mit <i>Hind</i> III
β-Aktin	30mer 5'-AGA TGT GGA TCA GCA AGC AGG AGT ATG ACG -3'

Die Sonden wurden für den Northern Blot mit dem Megaprime Kit (Amersham Buchler, Braunschweig, BRD) radioaktiv markiert und für den Southern Blot wie beschrieben Biotin-gelabelt.

### 3.5. Chemikalien, Enzyme und Nukleinsäuren

Alle verwendeten und nicht aufgeführten Chemikalien wurden als analysenreine Reagentien von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim, BRD), Fluka (Deisenhofen, BRD), Gibco/BRL (Eggenstein, BRD), Merck (Darmstadt, BRD), Serva (Heidelberg, BRD) oder Sigma (Deisenhofen, BRD) bezogen. Radioaktive Nukleosidtriphosphate stammten von Amersham Buchler (Braunschweig, BRD), Enzyme und Nukleinsäuren von Roche Diagnostics (Mannheim, BRD) und Gibco/BRL (Eggenstein, BRD).

Enzyme für die Molekularbiologie:

Name	Verwendung	Quelle
DNase	RNS-Präparation vor RT-PCR	Für alle:
<i>Pfu</i> - und <i>Taq</i> - DNS-Polymerase	PCR	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
Titan-Enzym-Mix	„one step“-RT-PCR	
Restriktionsendonukleasen:		
<i>Pvu</i> I	Plasmid-Linearisierung für die Transfektion	Für alle:
<i>Not</i> I	Plasmid-Linearisierung für <i>in-vitro</i> Transkription	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
<i>Hind</i> III	Sondenherstellung	

## Chemikalien für die Transfektion:

Name	Verwendung	Quelle
Lipofectamine	Lipofektion	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD

## Antikörper für die Proteinchemie, Immunhistologie und Durchflußzytometrie:

Name	Verwendung	Quelle
<i>Primärantikörper:</i>		
mAb 148.3 $\alpha$ -TAP1 (human)	Western-Blot Immunfluoreszenz	R. Tampé
mAb w6/32 $\alpha$ -MHCI (human)	Durchflußzytometrie Immunfluoreszenz	Th. Wölfel
mAb mA2.1 $\alpha$ -HLA-A2 (human)	Durchflußzytometrie	
<i>Sekundärantikörper:</i>		
Anti Maus IgG – AP gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Western-Blot	DAKO, Hamburg, BRD
Anti Maus IgG – GAM-FITC gekoppelt mit Fluorescein- Isothiocyanat	Durchflußzytometrie Immunfluoreszenz- mikroskopie	Beckmann-Coulter- Immunotech, Krefeld, BRD

## Oligopeptide für Translokationsexperimente:

Name	AS-Sequenz	Quelle
Peptidsequenz #56	RYWANATRSR	Für alle:
Peptidsequenz #65	RYWANATRSK	Frank Momburg,
Peptidsequenz #73	RYWANATRSV	DKFZ Heidelberg, BRD

## Molekulargewichts- und Längenstandards:

Name	Fragmentgröße	Quelle
DNS-Fragment Längenstandard $\lambda$ -BstEII	8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 112 (in bp)	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
DNS-Fragment Längenstandard VII	8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359 (in bp)	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
Proteingrößenstandard RPN 756 (Rainbow-Marker)	14.3, 21, 30, 46, 69, 97.4, 200 (in kDa)	Amersham Buchler, Braunschweig, BRD

### 3.6. Allgemeine Stammlösungen und Puffer

#### 3.6.1. Elektrophorese:

Nukleinsäuren:

---

TAE-Puffer (50x)	2M Tris-Eisessig (pH 8,5), 1M Na-Acetat, 50mM Na <sub>2</sub> EDTA.
TBE <sub>seq</sub> -Puffer (10x)	1M Tris-Base, 0,83M Borsäure, 10mM Na <sub>2</sub> EDTA.
DNS-Ladepuffer (6x)	10ml TAE-Puffer, 80ml Glycerin (87 %), je 0,2g Bromphenolblau und Xylen Cyanol.

Proteine:

---

Acrylamid-Lsg. (40%)	95g Acrylamid, 5g N,N'-Methylenbisacrylamid, ad 250ml H <sub>2</sub> O, bei 4°C dunkel lagern
Laufpuffer (5x)	150g Tris-Base 720g Glycin ad 5l H <sub>2</sub> O
Elektrophorese-Puffer	400ml Laufpuffer (5x) 10ml 20% SDS ad 2l H <sub>2</sub> O
Transfer-Puffer	300ml Laufpuffer (5x) 600ml 99,8% Ethanol 2100ml H <sub>2</sub> O.
10 % PAGE Trenngel entspricht 6 ml	1,5ml 40% Acrylamid 0,8ml 2% Bisacrylamid 1,2ml 1,88 M Tris/HCl pH 8,8 1,2ml 0,5% SDS 1,3ml H <sub>2</sub> O
5% PAGE Sammelgel entspricht 2 ml	0,25ml 40% Acrylamid 0,13ml 2% Bisacrylamid 0,4ml 0,625 M Tris/HCl pH 8,8 0,4ml 0,5% SDS 0,82ml H <sub>2</sub> O

---

**3.6.2. Proteinchemie, Immunhistologie und Durchflußzytometrie:**

TBS, pH 7,5	6.05g Tris Base (50mM), 8.76g Natriumchlorid (150mM) in 800ml H <sub>2</sub> O, pH mit HCl auf 7,5 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 1 l
TBS-Tween 20 (TBST)	1ml Tween 20 in 1l TBS lösen (0.1% v/v)
2 x SDS Puffer, ad 10ml:	1g Sucrose 5ml SDS 20% 1,2ml Tris 1M pH 6,8 3,8ml Aqua dest. 1 Körnchen Pyronin B
Proteaseinhibitoren- gemisch, ad 1ml:	5µl Aprotinin [2mg/ml] 10µl Trypsininhibitor [1mg/ml] 20µl PMSF [2,5mg/ml] 4µl Jodacetamid [100mg/ml] 25µl Pepstatin [0,68mg/ml] 25µl Leupeptin [0,38mg/ml] 911µl PBS
TBS-AP-Lösung pH 9,5	5,05g MgCl <sub>2</sub> 2,9g NaCl 6,05g Tris-Base ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Entwickler-Lösung pro ml TBS-AP	4,5µl NBT (Roche Diagnostics, Mannheim, BRD) 3,5µl BCIP/X-Phosphat (Roche Diagnostics, Mannheim, BRD)
Ponceau-S-Lösung	0,5% Ponceau-S 1% Essigsäure
Blockierungs-Lösung	1% Magermilch Pulver in TBS/Tween 20

**3.6.3. Hybridisierung:**

Depurinierungslösung	0,25M HCl
Denaturierungslösung	0,5N NaOH, 1,5M NaCl
Transferpuffer	0,25N NaOH, 1,5M NaCl
Formamid (deion.)	Formamid und 5% w/v Ionenaustauscherharz (AG 501-X8 (D), Bio-Rad) 30 Min. rühren, filtrieren und bei -20 °C lagern.

SSC (20x)	3M NaCl, 0,3M Trinatriumcitrat, pH 7,5.
Denhardts-Lösung (50x)	1% w/v Ficoll, 1% w/v Polyvinylpyrrolidon, 1% w/v BSA, Fraktion V.
DNS- Vorhybridisierungs- lösung	50% v/v Formamid (deion.), 6x SSC, 5x Denhardts Lösung, 0,5% w/v SDS, 50µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNS.
DNS- Hybridisierungs- lösung	50% v/v Formamid (deion.), 10% w/v Dextransulfat, 5,75x SSC, 0,5% w/v SDS, 50µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNS.
Schnell- hybridisierungs- lösung	3x SSC, 10x Denhardts Lösung 0,1% w/v SDS 250µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNS.

#### 3.6.4. Enzymlösungen:

Rnase 2000	100mg RNase A und 1ml RNase T1 ( $1 \times 10^5$ U) in 49ml 10mM Tris-Cl (pH 7,5)/15mM NaCl lösen und 15 Min. kochen. Nach langsamen Abkühlen bei $-20^\circ\text{C}$ lagern.
Restriktions-Mix Proteinase K	4µl RNase 2000, 20µl 10x Restriktase-Puffer, 76µl H <sub>2</sub> O 20mg/ml in H <sub>2</sub> O lösen (für die PCR). Für 30 Min. bei $50^\circ\text{C}$ aktivieren. Aliquotiert bei $-20^\circ\text{C}$ lagern.
DNase, RNase frei	20mM MgCl <sub>2</sub> , 2mM DTT, 500ng DNase I, 8U RNase Inhibitor in TE pH 7,5
DNase Stop Mix	50mM EDTA, 1,5M Natrium Acetat, 1% SDS

#### 3.6.5. Sonstige Lösungen:

##### Nukleinsäuren:

H <sub>2</sub> O, RNase-frei	mit 0,1% Diethylpyocarbonat (DEPC) ü/n bei $37^\circ\text{C}$ behandelt und anschließend autoklaviert
TE-Puffer	10mM Tris-Cl, 1mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0 für DNS, pH 7,5 für RNS

Phenol<sub>gesättigt</sub> Phenol (bei 70°C geschmolzen) und 0,1% v/v 8-Hydroxychinolin mit gleicher Menge 1 M Tris-Cl (pH 8) ausschütteln. Mit 0,1 M Tris-Cl (pH 8) ausschütteln bis die wäßrige Phase pH 7,6 erreicht hat. Bei 4 °C dunkel lagern.

Phenol/Chloroform Phenol<sub>gesättigt</sub>, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1).

LPA (Lineares Polyacrylamid) Acrylamid ad 5% w/v in H<sub>2</sub>O lösen. 50µl Ammoniumpersulfat (100 mg/ml) und 4µl TEMED/10ml Lösung zugeben. Eine Std. bei RT polymerisieren lassen. Bei 4°C lagern. Je 5µl einer 1:5 Verdünnung (10mg/ml) als Präzipitationshilfe bei Fällungen von gereinigter DNS/RNS mit bis zu 1,5 ml Endvolumen einsetzen.

#### Plasmidpräparation:

---

#### Mini-Plasmid-Präp (B. Seed)

Lösung I: 10mM EDTA pH 8  
 Lösung II: 0,2M NaOH; 1% SDS; (frisch ansetzen)  
 Lösung III: 2,5M KAc; 2,5M HAc (Eisessig) pH 4,7

#### Qiagen Midi-Plasmid- Präparations Kit

Puffer P1 50mM Tris/HCl pH 8,0, 10mM Na<sub>2</sub>EDTA  
 (Lagerung bei 4°C) 100µg/ml RNase A RNase T1

Puffer P2 (Lyse) 0,2M NaOH, 1% SDS

Puffer P3 (Neutralisation) 3M Kaliumacetat pH 5,5

Puffer QBT 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7,0 ,15% Ethanol,  
 (Äquibrierung) 0,15% Triton-X-100

Puffer QC (Waschpuffer) 1000mM NaCl, 50mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol

Puffer QF 1250mM NaCl  
 (Elutionspuffer) 50mM Tris/HCl pH 8,5, 15% Ethanol

<i>in-vitro</i> Transkription	0,2M EDTA pH 8,0 T7 abhängige RNA Polymerase (Roche Diagnostics) Cap Scribe 5x Puffer (Roche Diagnostics) Ribonukleosidtriphosphate, Cap-Nukleotid [P1-5'-(7-Methyl)- Guanosin-triphosphat]
<i>in-vitro</i> Translation	Biotin in vitro Translations-Kit (Roche Diagnostics) 1M Kalium-Acetat 10mM Magnesium-Acetat Translations Mix: Retikulozyten Lysat, 10pmol biotin konjugierte Lysin-tRNA, 42µM Aminosäuren ohne Lysin, Spermidin, Nukleosidtriphosphate, DTT (Dithiotreitol), 83mM Kalium-Acetat, 0,83mM Magnesium-Acetat

### 3.7. Medien für die Bakterienvermehrung

Alle Medien wurden durch Autoklavieren (20 Min. bei 120 °C) sterilisiert. Ampicillin wurde nach dem Abkühlen der Medien auf mindestens 55 °C mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Das Medium für Agarplatten enthielt 1,5 % w/v Agar-Agar (Sigma, Deisenhofen, BRD ).

LB-Medium (Luria Bertani)	10g Bacto-Tryptone (Sigma), 5g Bacto-Yeast Extract (Sigma), 5g NaCl ad 1l Aqua <sub>bidest</sub>
TB-Medium (Terrific broth)	<b>Lsg. 1:</b> 12g Bacto-Tryptone (Sigma), 24g Bacto-Yeast Extract (Sigma), 4ml Glyzerin ad 900 ml Aqua <sub>bidest</sub> <b>Lsg. 2:</b> 170mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 720mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . in 100ml Aqua <sub>bidest</sub> Beide Lösungen getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 9 Teile Lsg. 1 und 1 Teil Lsg. 2 mischen.



### 3.8. Puffer und Medien für die Kultivierung von Säugerzellen

Name	Beschreibung	Quelle
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung, ohne Kalzium	Eigenherstellung Apotheke Mainz
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum	PAA (Coelbe, BRD)
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	Seromed (Berlin, BRD)
D10	DMEM supplementiert mit 10% v/v hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.	
RPMI 1640	„Roswell Park Memorial Institute“ [Moore <i>et al.</i> , 1966]	Seromed (Berlin, BRD)
R10	RPMI supplementiert mit 10% v/v hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.	
Trypsin/EDTA	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA	Seromed (Berlin, BRD)
G418 (Neomycin)	Geneticin, 16 g/l in 200 mM Pipes (pH 7,3) lösen, entspricht 8 mg/ml wirksame Substanz. Aliquotiert bei -20 °C lagern.	Gibco/BRL (Eggenstein, BRD)
Elektroporations- medium	DMEM + 1% FCS	

### 3.9. Besondere Geräte und Software:

Geräte:

Rechteck-Impuls-Elektroporator    Fa. Fischer-Intergen, Heidelberg, BRD

Software:

Align Plus v2.0	Scientific & Educational Software
Clone Manager v4.0	Scientific & Educational Software
Plasmid Map Enhancer v2.0	Scientific & Educational Software
Quantiscan 2.0	Microbial Systems



## 4. Methoden

### 4.1. Zellkultur

#### 4.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen und Zytokinstimulation

Die in dieser Arbeit eingesetzten Nierenzellkarzinom- und Hybridomzellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank kultiviert. Eine Ablösung adhärenter Zellen wurde, wenn nicht anders vermerkt, durch eine kurzfristige Behandlung mit Trypsin/EDTA erreicht. Eine Sedimentierung dieser Zellen erfolgte bei 1400 U/Min. für 5 Min.. Die Zellen wurden zur Weiterkultivierung in einem Verhältnis von 1/6 bis 1/10 auf neue Kulturgefäße verteilt. Als Kultivierungsmedium diente für Nierenzellkarzinomzellen D10, für Hybridomzellen oder Lymphozyten R10. Die im Zusammenhang mit der Kultivierung von Zellen allgemein angewandten Techniken erfolgten in Anlehnung an Lindl & Bauer („Zellkultur“, 1994).

Für die Zytokinstimulation wurden die Nierenzellkarzinomzellen mit 20ng/ml IFN- $\gamma$  (200 IE/ml, Thomae, Biberach, BRD) für die angegebene Zeit behandelt. Wie in früheren Dosis-Wirkungsanalysen bereits gezeigt wurde, besitzt diese Konzentration für den eingesetzten Zeitraum auf die Nierenzellkarzinomzellen weder zytotoxische noch zytostatische Effekte (Seliger et al., 1997b).

#### 4.1.2. Selektion Neomycin resistenter Zellklone

Nach dem Gentransfer eines Vektors in Zellen, der das Neomycinphosphotransferase II-Gen als Selektionsmarker trägt, werden sie in Selektionsmedium mit 500 $\mu$ g/ml G418 (Neomycin/Geneticin, Gibco) kultiviert. Das Antibiotikum G418 wird in diesen Zellen durch Produktion der Neomycinphosphotransferase II (NPT) inaktiviert. Die Expression dieses Enzyms führt also zur Neomycin-Resistenz (neo<sup>R</sup>) der Zellen. Nach etwa 2 Wochen sind einzelne G418-resistente Zellhaufen als Klone abgrenzbar, die bei Erreichen einer entsprechenden Zellanzahl mit der Hilfe von Klonierungsringen nach einer Trypsinbehandlung von der Unterlage gelöst und in neue Kulturgefäße überführt werden. Die Zahl der Klone pro eingesetzter Zellen entspricht der Transfektionseffizienz. In Folge werden die Klone weiterhin in Selektionsmedium mit 350 $\mu$ g/ml G418 kultiviert, um den Selektionsdruck beizubehalten.

#### 4.1.3. Antikörpergewinnung aus Hybridoma-Zellen

Zur Gewinnung des Antikörpers w6/32 (Brodsky *et al.*, 1979), der den MHC Klasse I Komplex aus schwerer Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin erkennt, werden 1x10<sup>6</sup> Zellen der Hybridomalinie w6/32 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die Arbeitsgruppe Wölfel) in 500ml R10 ausgesät und für etwa eine Woche bis zum Erreichen ihrer stationären Wachstumsphase kultiviert. Anschließend werden die Zellen bei 1400 U/Min. für 5 Min. abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Gefäß erneut bei 7000 U/Min. zentrifugiert, um hochmolekulare Proteine zu sedimentieren. Der Überstand

dieser Zentrifugation, der Antikörper und kleinemolekulare Proteine enthält, wird in ein neues Gefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1M Tris pH 8 gepuffert. In dieser Form wird er ohne weitere Aufreinigung zur Detektion der MHC Klasse I Oberflächenexpression eingesetzt, wobei zuvor die optimale Endkonzentration gegen einen Antikörper bekannter Konzentration austitriert wird.

#### 4.1.4. Verwendete Gentransfermethoden

##### Elektroporation

Die Elektroporation wurde als effektive Methode des Gentransfers in Säugetierzellen, im folgenden Transfektion genannt, beschrieben (Chu *et al.*, 1987). Hierbei wird ein Zellsuspensions/Plasmid-Gemisch einem elektrischen Feld in Impulsform ausgesetzt, welches für einen kurzen Augenblick Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die die DNS in die Zelle gelangt. Die Bedingungen müssen für jedes System optimiert werden (Oellig & Seliger, 1990)

Die Elektroporation wurde als bevorzugte Methode für einen stabilen Gentransfer in Nierenzellkarzinomzellen gewählt, da die Transfektionseffizienz in diese Zellen mit anderen Methoden, unter anderem Calciumpräzipitation, nur sehr gering war (Seliger, persönl. Mitteilung). Der in dieser Arbeit eingesetzte Elektroporations-Impulsgenerator (EPI 2500, Fischer Intergen, Heidelberg, BRD) unterscheidet sich von vergleichbaren Geräten, wie z.B. den weitverbreiteten Bio-Rad-Impulsgeneratoren, durch die Erzeugung eines nahezu rechteckförmigen Impulses. Hierdurch verspricht man sich gegenüber dem sonst üblichen Sägezahnimpuls eine geringere Erwärmung der Zellsuspension durch eine kürzere Impulsdauer bei gleichzeitiger Verlängerung des Plateaus der, für den Transfer entscheidenden, Hochspannungsphase.

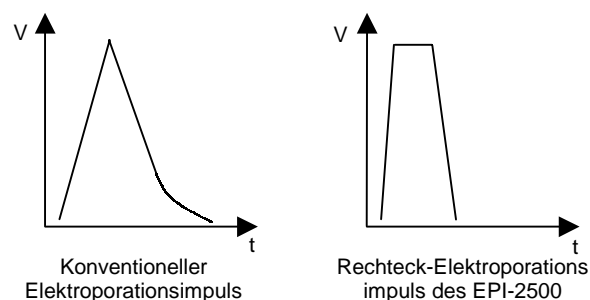


Abb.3.1: Rechteck-Impuls-Elektroporation.

Vergleich zwischen Impulsen erzeugt von herkömmlichen Generatoren und dem EPI-2500 der Firma Fischer Intergen.

In Vorversuchen wurden folgende Elektroporationsbedingungen als optimal ermittelt:

- $2,5 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l DMEM mit 1% FCS
- 10  $\mu$ g Plasmid-DNS
- 455V
- 2ms Impulsdauer
- 1200  $\mu$ F Kapazität

Die Zellen und das Plasmid werden in Elektroporations-Küvetten (Bio-Rad, München, BRD) gegeben und in dem Elektroporator einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Anschließend werden die Küvetten für 5 Min. auf Eis inkubiert, um der Erwärmung durch den Impuls entgegenzuwirken. Die so behandelten Zellen werden in D10 Medium überführt und zu gleichen Volumina in die Gefäße einer 6-Loch-Platte verteilt. Nach 24 Stunden wird das Medium entfernt und gegen ein Selektionsmedium ausgetauscht.

### **Lipofektion**

Neben der Elektroporation ist auch die Lipofektion ein anerkanntes Verfahren zum Gentransfer in Säugetierzellen (Felgner *et al.*, 1987). Hier wurde das Lipofectamine-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein, BRD) eingesetzt. Das Prinzip der Lipofektion besteht in der Bildung von Mizellen oder Liposomen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die die zu transfizierenden Plasmide enthalten. Durch Verschmelzung der Liposomen mit der Plasmamembran können die Plasmide in das Zellinnere gelangen.

Die zu transfizierenden Zellen werden einen Tag vor der Transfektion zu je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Gefäß einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. 24 Stunden später nach Erreichen einer etwa 60%igen Konfluenz des Zellmonolayers wird die Transfektion durchgeführt. Pro Ansatz werden 1-3µg Plasmid-DNS in einem Totalvolumen von 100µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Außerdem werden je 5µl des Lipofectamine-Reagenz mit H<sub>2</sub>O auf 100µl Volumen gebracht und beide Ansätze zusammengegeben, durch Invertieren gemischt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen, zu dem Transfektionsansatz je 800µl serumfreies Medium gegeben und diese Mischung dann auf die Zellen pipettiert. Die Komplexe aus Lipofectamine und DNS werden mit den Zellen für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, das Inkubationsmedium dann entfernt und gegen Normalmedium ausgetauscht. 24 Stunden später werden die Zellen in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Erste Neo<sup>R</sup> Kolonien sind ca. 14 Tage später sichtbar.

Die Effizienz des Gentransfers nach Lipofektion war der nach Elektroporation unterlegen, so daß im weiteren die Elektroporation als Gentransfermethode eingesetzt wurde.

## **4.2. Molekularbiologie**

### **4.2.1. Allgemeines**

#### **Agarose-Gelelektrophorese**

Um Nukleinsäurenfragmente aus enzymatischen Verdaus, aus PCR-Reaktionen oder nach Aufreinigung nachzuweisen, werden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dafür werden Nukleinsäure-Lösungen mit 20% v/v 5fach-Gelelektrophoresepuffer versetzt und je nach erwarteter Fragmentgröße in 0,8-1,5%igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Diese enthalten 0,5µg/ml Ethidiumbromid, wodurch die Nukleinsäure-Fragmente durch Fluoreszenz unter UV-Licht zu detektieren sind. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNS werden Gele und Laufpuffer auf TAE-Puffer Basis, von RNS auf TBE-Puffer Basis eingesetzt.

### Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Zur Extinktionsbestimmung werden 5µl Nukleinsäurenlösung pro Milliliter vorgegeben und nach Abzug des Leerwertes, die Ergebnisse für doppelsträngige DNS mit zehn, für einzelsträngige DNS und RNS mit acht und für Oligonukleotide mit vier multipliziert:

Die Reinheit der Probe wird nach dem Quotient der Optischen Dichte (OD) bei 260 und 280nm beurteilt, da Proteine vornehmlich bei einer Wellenlänge von 280nm absorbieren. Hinreichend reine Nukleinsäure-Lösungen weisen ein Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von grösser eins auf.

### 4.2.2. Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Kompetente *E.coli* Bakterien, also solche die eine erhöhte Bereitschaft zeigen, Plasmide aufzunehmen und zu amplifizieren, wurden freundlicherweise von Dr. D. Jung nach der Methode von Douglas Hanahan (Hanahan, 1983) präpariert und zur Verfügung gestellt. Zur Transformation werden die kompetenten *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut. 50µl der Zellsuspension werden mit 50-150ng Plasmid-DNS in 10µl in einem Mikrogefäß gemischt, für 10 Min. auf Eis und für weitere 2 Min. bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 450µl vorgewärmten (37°C) LB-Medium verbleibt der Ansatz 30 Min. in einem 37°C Bakterieninkubator. Anschließend werden 100µl der Suspension auf eine Schale mit LB-Selektionsagar aufgetragen und ü/n bei 37°C inkubiert.

### 4.2.3. Präparation der Transfektionsvektoren

#### Mini-Plasmidisolierung

Nach erfolgreicher Transformation können auf dem Selektionsagar einzelne Bakterienkolonien unterschieden werden. Aus diesen wird eine Anzahl Vorkulturen für sogenannte Mini-Plasmid-Präparationen nach B. Seed hergestellt, die zur Überprüfung der korrekten und vollständigen Übertragung des Plasmids dienen.

Unter sterilen Bedingungen werden einige Transformanten (6-12) in Inkubationsröhrchen mit 3ml LB-Selektionsmedium überimpft. Die Röhrchen werden in einem Bakterienrüttler bei 37°C und 225-250 U/Min. für etwa 6-8 Stunden oder über Nacht inkubiert, ohne die Phase des exponentiellen Wachstums der Bakterien zu überschreiten.

Die DNS-Präparation, nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wird mit 1,5ml der Vorkultur durchgeführt.

Nach Zentrifugation bei 10.000 U/Min. für 20 sec wird der Überstand verworfen und das Zellpellet auf einem Vortex-Mischer in 200µl Lösung I resuspendiert. Durch die aufeinanderfolgende Zugabe von 400µl Lösung II und 300µl Lösung III sowie Mischen durch sorgfältiges Invertieren werden erst Bakterienmembranen lysiert und anschließend Zelltrümmer und Proteine ausgefällt. Durch einen Zentrifugationsschritt von fünf Min. mit 13.000 U/Min. bei 4°C pelletiert man diese und überführt anschliessend den Überstand von ca. 900µl in ein frisches, mit 600µl Isopropanol gefülltes, Reaktionsgefäß.

Um eine möglichst weitgehende Präzipitation der DNS zu erreichen, wird die Lösung sorgfältig gemischt und erneut fünf Min. bei 13.000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNS-Pellet mit eiskaltem Ethanol (-20°C) gewaschen. Hieran schließt sich ein letzter fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/Min. und 4°C an. Nach dem Zentrifugieren wird der Ethanol quantitativ entfernt und das DNS-Pellet kurz getrocknet, da evtl. verbliebene Alkoholreste nachfolgende Enzymreaktionen beeinflussen können. Die DNS kann nun je nach Größe des Pellets in 80-100µl TE-Puffer (pH 8) in ca. zehn Min. bei 65°C auf einem Thermomixer gelöst werden.

Zur Überprüfung der Integrität des Plasmids, wird ein Testverdau mit einem, möglichst ein spezifisches Bandenmuster hervorrufenden Restriktionsenzym durchgeführt. Dazu werden aus der Mini-Plasmid-Präparation 4µl eingesetzt. Zu diesen werden in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 4µl eines vorbereiteten für das jeweilige Enzym spezifischen Restriktionsmixes pipettiert, welcher den entsprechenden Puffer in der richtigen Konzentration sowie RNase enthält. An den Rand des Reaktionsgefäßes werden 0,3µl des Restriktionsenzymes gegeben. Nach kurzem Anzentrifugieren und Mischen wird der Ansatz bei 37°C für 60-90 Min. inkubiert.

Der Testverdau wird mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft, wobei unverdautes Plasmid als Kontrolle dient.

Entspricht der Testverdau dem gewünschten Ergebnis werden 500µl der Bakterienkultur mit 500µl sterilem Glycerin zu einem sogenannten „Glycerin-stock“ vermischt, der bei -70°C gelagert wird und einer späteren Rekultivierung des Bakterienklons dient.

### **Midi-Plasmid-Präparation**

Zur Präparation der Plasmide wurde das Qiagen-Midi-Präparations-Kit mit Qiagen-Tip-100 Säulen verwendet. Es gelingt mit dieser Methode die Isolierung von bis zu 100µg Plasmid-DNS.

Ein Milliliter einer überprüften Bakterien-Vorkultur wird zu 24ml TB-Selektionsmedium (Tartof und Hobbs, 1987) in einen luftdurchlässig verschließbaren 250ml Erlenmeyerkolben gegeben. Dieser wird in einem Bakterienschüttler mit 250 U/Min. bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakterien werden in 50ml Röhrchen für 15 Min. mit 4.000 U/Min. bei 4°C sedimentiert und das Pellet anschließend in 4ml Puffer P1 auf einem Vortex-Mischer resuspendiert. Zu der Zellsuspension werden 4ml Puffer P2 gegeben, der die Zellwände lysiert (Alkalische Lyse, s.o.). Durch vorsichtiges Mischen erreicht man eine Homogenisierung der Lösung, die darauf 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wird. Zur Neutralisation pipettiert man 4ml Puffer P3 zu der Lösung, mischt erneut vorsichtig bis diese homogen erscheint und inkubiert dann 15 Min. auf Eis. Hieran schließt sich ein Zentrifugationsschritt von 45 Min. mit 4.000 U/Min. bei 4°C an. Die Schritte verlaufen bis zu diesem Zeitpunkt analog zu dem Verfahren der Schnellisolierung. Es folgt jedoch keine Fällung der kompletten DNS im Überstand, sondern die Plasmid-DNS wird mit der Hilfe von Qiagen-Tip 100 Säulen, welche Plasmid-DNS bis zu einer Größe von 150kB nach dem Affinitätsprinzip binden, isoliert.

Vor der Verwendung werden die Säulen mit 3ml des QBT-Puffers äquilibriert. Der Plasmid-enthaltende Überstand wird filtriert und der Durchlauf hieraus komplett auf die Säulen aufgetragen. Die Säulen werden anschließend zweimal mit 10ml Puffer QC gewaschen, bevor die Plasmid-DNS mit 5ml Puffer QF aus der Säule in ein frisches Röhrchen eluiert wird. Zur Fällung der DNS wird das Eluat mit 70% v/v eiskaltem Isopropanol (-20°C) versetzt und anschließend für 45 Min. mit 4.000 U/Min. bei 4°C zentrifugiert, das DNS-Pellet einmal mit eiskaltem Ethanol gewaschen und danach erneut für fünf Min. mit 4.000 U/Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Ethanol wird quantitativ entfernt, das DNS-Pellet bei Raumtemperatur kurz getrocknet und nach Aufnahme in mindestens 100µl TE-Puffer (pH8) in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Die DNS wird nun bei 37°C unter leichtem Schütteln für ein bis zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C gelöst, anschließend photometrisch deren Konzentration bestimmt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **Vorbereitung der Plasmide für die Transfektion**

Nur linearisierte, nicht aber ringförmige Plasmid-DNS ist in der Lage, sich stabil in das Genom einer eukaryotischen Zelle zu integrieren (Sambrook *et al.*, 1989). Von den durch Midi-Präparation gewonnenen Plasmiden werden deshalb je 50µg linearisiert und für die Transfektion aufgereinigt. Die für die Linearisierung verwendeten Enzyme sind im Kapitel Material (s. 2.5) angegeben.

In ein 1,5ml Reaktionsgefäß wird Folgendes vorgegeben:

- 50µg DNS-Lösung
- 20µl 10x Restriktionspuffer
- TE pH8.0 ad 200µl Reaktionsvolumen
- 1-3 U Enzym pro µg DNS abhängig von der Enzymaktivität

Der Ansatz wird gemischt, kurz zentrifugiert und für 1,5-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Linearisierung des Plasmids wird in einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Wegen seiner ringförmigen Struktur kann sich unverdautes Plasmid im gleichen Zeitraum weiter durch die Matrix des Agarose-Gels bewegen als das linearisierte Molekül. Bei unvollständiger Linearisierung wird durch die erneute Zugabe von Enzym und Inkubation bei 37°C ein vollständiger Restriktionsverdau erreicht.

Zur Aufreinigung der DNS wird eine Phenol/Chloroform Extraktion mit 200µl (einem Volumen) Phenol/Chloroform pH8.0 durchgeführt und ein weiterer Extraktionsschritt mit Chloroform/Isoamylalkohol angeschlossen. Hierbei wird jeweils nach gründlichem Mischen auf einem Vortex-Mischer und fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000U/Min. die obere Phase in ein frisches Gefäß überführt. Der Überstand des zweiten Extraktionsschrittes wird in ein steriles Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und durch die Zugabe von 22µl 5M NaCl und 450µl eiskaltem unvergälltem 100% Ethanol die Plasmid-DNS in einem 30 minütigen Inkubationsschritt bei -70°C präzipitiert. Alternativ kann dieser Schritt bei -20°C ü/n durchgeführt werden. Alle weiteren Schritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Die DNS wird mit 13.000 U/Min. bei 4°C für 30



Min. pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und der Rücklauf quantitativ entfernt. Das DNS-Pellet wird vorzugsweise in einer Speed-Vac getrocknet und dann in 50µl sterilem TE pH8.0 gelöst. In dieser Form wird das Plasmid zur Transfektion eingesetzt.

#### 4.2.4. *In-vitro* -Transkription und -Translation

Um die Expression eines Plasmid-Inserts vor einer Transfektion *in-vitro* qualitativ zu überprüfen, bietet sich die Methode der *in-vitro*-Transkription und -Translation an. Hier wurde eine Kombination aus der „T7-Cap Scribe RNS Polymerase“ und einem „Biotin *in-vitro*-Translations Kit“ (beides Roche Diagnostics, Mannheim, BRD) benutzt.

Eine für *in-vitro*-Transkription geeignete cDNS ist im entsprechenden Vektor hinter einen RNS-Polymerase Promoter der Bakteriophagen T3, SP6 oder in diesem Fall T7 kloniert, wobei das Translations-Startcodon AUG nicht weiter als 25-100 Basenpaare von der BakteriophagenPromoterregion entfernt sein sollte. Die RNS-Polymerase bindet an die entsprechende Promoterregion und beginnt dort unter Anwesenheit von Ribonukleosidtriphosphaten die RNS-Synthese. Durch den Zusatz des Cap-Nukleotids wird außerdem das 5' Ende durch eine Methyl-Cap modifiziert, die eine erhöhte Translationseffizienz ermöglicht (Angaben des Herstellers).

Die Polymerase bindet aber auch unspezifisch an überhängende 3'-Enden. Um die DNS entsprechend vorzubereiten, wird das Plasmid etwa 50-200 Basenpaare hinter dem Stopcodon linearisiert und, wenn das Enzym nicht „blunt“ geschnitten hat, einer abbauenden Klenow-Fragment Reaktion unterzogen. Bevor die DNS in die Reaktion eingesetzt wird, wird sie durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter RNase-freien Bedingungen.

#### Transkription

In einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß werden auf Eis vorgelegt:

- 4µl 5x Cap-Scribe Puffer
- 0,5µg linearisierte DNA
- H<sub>2</sub>O ad 19µl

Dieser Ansatz wird mit 1µl T7 RNS Polymerase versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Um eine höhere Ausbeute zu erreichen, kann nach Ablauf der zwei Stunden erneut 1µl T7 RNS Polymerase zu dem Reaktionsansatz gegeben und für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert werden.

Wird die RNS nach Ablauf der Transkription direkt in die *in-vitro*-Translation eingesetzt, wird der Ansatz bis zur Translation auf Eis gehalten. Ein 2µl Aliquot wird gelelektrophoretisch kontrolliert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Wird nur ein Teil der RNS in die Translationsreaktion eingesetzt und der Rest aufbewahrt, wird die Reaktion unter Zugabe von 2µl 0,2M EDTA (pH8) gestoppt. Es wird ein Aliquot von 2µl gelelektrophoretisch überprüft, die RNS dann durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und unter Zugabe von 14µl Ammoniumacetat und 100µl eiskaltem 100% Ethanol für 30 Min. bei Raumtemperatur präzipitiert.

Nach Zentrifugation mit 13.000 U/Min. bei 4°C für 30 Min. wird das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das RNS-Pellet wird kurz getrocknet, in 25µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die *in-vitro* transkribierte RNS wird bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

### Translation

Zur Translation der im vorhergehenden Schritt erzeugten RNS wurde das Biotin-*in-vitro*-Translations-Kit verwendet. Dieses enthält in einem gebrauchsfertigen Mix ein Retikulozyten-Lysat, welches die Ribosomen für die Translationsreaktion zur Verfügung stellt, einen Energiemix, an t-RNS gebundene Aminosäuren, wobei die Aminosäure Lysin zusätzlich mit Biotin markiert ist und die für die Reaktion optimalen Elektrolytkonzentrationen. Durch die Anwesenheit der Biotin-markierten Lysin-t-RNS bietet es die Möglichkeit, das Proteinprodukt im Western Blot nicht nur durch spezifische Antikörper zu detektieren, sondern jedes produzierte Protein durch eine Streptavidin-vermittelte Reaktion zu detektieren.

Um die Translationsreaktion zu starten, werden 1µg RNS in 20µl H<sub>2</sub>O zu dem gebrauchsfertigen Translationsmix (30µl) gegeben, vorsichtig gemischt, anzentrifugiert und der Ansatz eine Stunde bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz mit 20µl H<sub>2</sub>O ohne RNS, als Positivkontrolle ein Ansatz, zu dem 18µl H<sub>2</sub>O und 2µl einer mitgelieferten  $\gamma$ -Globulin RNS gegeben werden. Der Reaktionsansatz kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Die Detektion erfolgt im Western Blot Verfahren entweder durch spezifische Antikörper oder mit einer Streptavidin-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion (s. 3.3.1). Verwendet wurde hierzu der „Chemiluminescence Western Blotting Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim, BRD) mit einem Streptavidin-Peroxidase Konjugat und dem Substrat Luminol.

#### 4.2.5. Nachweis der Integration und Expression des Transgens

##### Genomische Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Zellysaten

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) ist eine hochsensitive und spezifische Methode zur Detektion von Nukleinsäuresequenzen. Sie basiert auf dem Prinzip einer enormen Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnittes durch eine hitzestabile DNS-Polymerase, so daß dieser bereits durch eine Gelelektrophorese dargestellt werden kann. Die Spezifität wird durch sog. Primer erreicht, DNS-Fragmente, an denen die DNS-Polymerase die DNS-Synthese beginnen kann. Es wird ein Primer-Paar spezifischer Sequenz im Überschuß zugesetzt, das nach Denaturierung der Doppelstrang-DNS an komplementäre Strukturen hybridisiert (Primer-Annealing). Nach dem ersten Synthese-Schritt wird die DNS erneut denaturiert, weiterhin vorhandene freie Primer binden erneut und so schließen sich bis zu 40 Zyklen an, in denen große Mengen des spezifischen Amplifikates gebildet werden ( $2^{40} \sim 1,09 \cdot 10^{12}$ ).

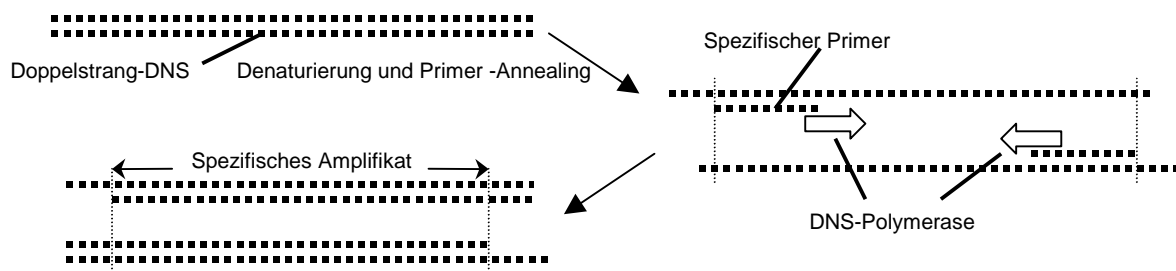


Abb. 3.2: Prinzip der PCR.

Durch den Einsatz spezifischer Primer wird in aufeinanderfolgenden Synthese-Zyklen nur ein definierter Abschnitt der DNS amplifiziert.

Die Integration des Transgens in das Genom der Zellen kann durch eine direkte genomische PCR mit einer geringen Zellzahl überprüft werden. Es wird in unabhängigen Versuchen jeweils das Vorhandensein des Inserts und des Resistenzgens mittels spezifischer Primer kontrolliert.

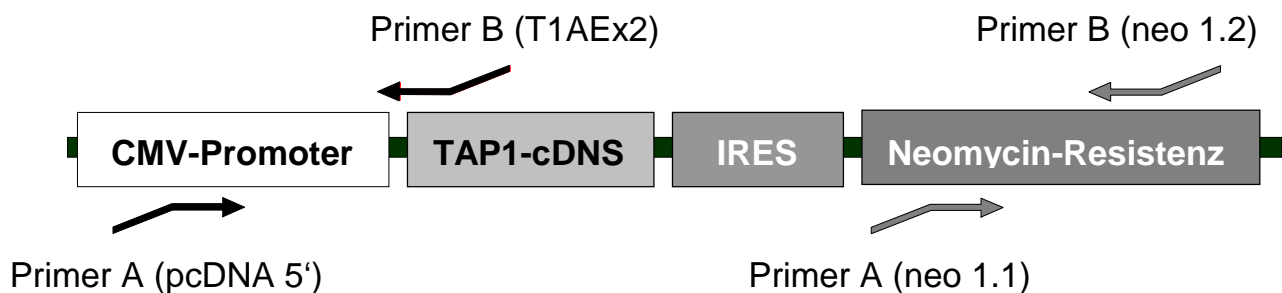


Abb. 3.3: Strategie für die genomische PCR zur Überprüfung der vollständigen Vektor-Integration nach Transfektion.

In unabhängigen Versuchen wird das Vorhandensein des Transgens und des Neo<sup>R</sup>-Selektionsgens überprüft.

Für die Reaktion werden  $5 \times 10^3$  -  $5 \times 10^4$  Zellen eingesetzt, diese mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl Volumen aufgefüllt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. In einem ersten Schritt werden die Zellen bei 95°C für 10 Min. lysiert, im zweiten Proteine durch die Zugabe von 5 µl Proteinase K (2mg/ml) und Inkubation bei 55°C für 60 Min. degradiert.

Nach Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 10 Min. schließt sich die Polymerasekettenreaktion nach Abkühlen des Ansatzes auf 80°C durch Zugabe eines entsprechenden PCR-Mix direkt an, der nach folgendem Schema hergestellt wird:

- 5 µl 10x PCR-Puffer
- x µl 50mM MgCl<sub>2</sub> (variabel: Endkonzentration 1-10mM)
- 1 µl 3'Primer (=500pmol)
- 1 µl 5'Primer (=500pmol)
- 5 µl 2mM dNTP
- 1,5 µl Taq-Polymerase (1U/µl, Roche Diagnostics, Mannheim, BRD)
- x µl H<sub>2</sub>O ad 25 µl

Der vorbereitete PCR-Mix wird für 30 Sekunden bei 80°C vorgewärmt und anschließend zu dem Ansatz gegeben. Der Start der PCR erfolgt dadurch unter Beibehaltung der 80°C, dem "Hot-start" Protokoll (Chou *et al.*, 1992) entsprechend, welches eine unspezifische

Primer-Bindung im ersten Amplifikations-Zyklus vermindert und somit die PCR-Spezifität erhöht. Die PCR läuft für 40 Zyklen analog zum Standard PCR-Protokoll mit den Schritten:

60 Sek.	95°C	Denaturierung
65 Sek.	50-60°C	Primer Bindung („Annealing“)
60-120 Sek.	72°C	Verlängerung des DNA-Stranges („Extension“)

Die Bedingungen entsprechen folgender Tabelle:

Zu detektierende cDNS	Annealing Temp.	Extension	MgCl <sub>2</sub> -Konz.
Neo <sup>R</sup>	58°C	50 sek.	1,5mM
CMV-TAP1A	55°C	60 sek.	1,5mM
CMV-TAP2E	55°C	60 sek.	1,5mM

Die Amplifikate werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

### Isolierung zytoplasmatischer RNS aus Zellpellets nach der NP40-Methode

Alle Arbeiten mit RNS werden unter RNS-sterilen Bedingungen durchgeführt, so daß eine Kontamination mit RNasen vermieden wird. Es werden grundsätzlich Einmal-Handschuhe getragen, alle Lösungen mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O und RNase-freien Chemikalien angesetzt, sowie die Ansätze auf Eis gehalten. Alle mit der RNS in Kontakt kommenden Geräte-Oberflächen werden durch eine 30minütige Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung von RNasen befreit.

Zur Isolierung zytoplasmatischer RNS wurde eine modifizierte NP40-Methode eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Es werden Zellpellets von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen gewonnen und pro Pellet 445µl „RNA Extraction Buffer“ (REB) Stocklösung mit 5µl 200mM DTT und 50µl 200mM „Vanadylribosynucleotide-complex“ (VRC), einem RNase Inhibitor, zum REB+ Puffer komplettiert. Das Pellet wird durch Vortexen in 500µl REB+ vollständig resuspendiert und anschließend die Suspension fünf Min. auf Eis inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes lysiert das NP40 die Plasmamembranen der Zellen, nicht aber die Kernmembran.

Das Lysat von etwa 700µl wird in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 90 Sekunden mit 13.000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 400µl „Proteinase Digestion Buffer“ (PDB) nach kurzem Mischen auf dem Vortex-Mischer für fünf Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt werden die gelösten Proteine degradiert, was deren anschließende Phenol/Chloroform Extraktion vereinfacht. Zu dem Ansatz werden 600µl Phenol/Chloroform (pH 7,5) gegeben, das Reaktionsgefäß invertiert, bis sich eine homogene Trübung eingestellt hat und anschließend das Gemisch für 5 Min. bei 13.000 U/Min. zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und, zur Entfernung des Phenols aus dem Ansatz, eine Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion nach dem gleichen Prinzip angeschlossen.

Anschließend wird die RNS mit 800µl eiskaltem Isopropanol versetzt und für mindestens

30 Min. oder ü/n bei  $-70^{\circ}\text{C}$  ausgefällt. Durch einen Zentrifugationsschritt von 30 Min. bei 13.000 U/Min. und  $4^{\circ}\text{C}$  wird die RNS pelletiert und das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 Min. bei 13.000 U/Min. wird das Ethanol quantitativ entfernt, das Pellet getrocknet, bevor es in 200 $\mu\text{l}$  TE (pH 7,5) bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 10 Min. gelöst wird. 5 $\mu\text{l}$  der RNS-Lösung werden für die photometrische Konzentrationsbestimmung eingesetzt, der Rest bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **DNase-Verdau**

Obwohl bei der NP-40 RNS-Extraktions-Methode DNS-Kontaminationen wegen des Intaktbleibens der Kernmembran selten sind, wird ein Teil der RNS zum späteren Einsatz in eine RT-PCR einem DNase Verdau unterzogen, um eventuell vorhandene DNS-Spuren, die die RT-PCR verfälschen könnten, zu beseitigen. Es wird dazu ein 2x DNase-Inkubationsmix angesetzt, der 1:1 mit 100 $\mu\text{l}$  des RNS-haltigen Ansatz vermischt und für 15 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert wird. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 25% v/v DNase-Stop-Mix abgebrochen. Die RNS wird dann nach obigem Protokoll erneut durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und ausgefällt.

#### **RT-PCR**

Die Expression der mRNS wurde unter anderem durch eine Ein-Schritt RT-PCR mit dem Titan<sup>TM</sup>-RT-PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, BRD) erfasst.

Das Prinzip der RT-PCR besteht in der Erstellung einer cDNS-Kopie der RNS mit Hilfe der retroviralen Reversen Transkriptase und einer anschließenden Amplifizierungsreaktion mit spezifischen Primern nach der vorbeschriebenen klassischen PCR-Methode. Bei der klassischen Zwei-Schritt-Methode wird eine cDNS-Kopie der gesamten RNS durch die Hybridisierung mit unspezifischen Hexanukleotiden erstellt, beschränkt allerdings auf eine limitierte Kopielänge. Bei der hier angewendeten Ein-Schritt-Methode wird ein Enzymmix eingesetzt, der sowohl eine reverse Transkriptase als auch DNS-abhängige Polymerasen enthält. Spezifische Primer übernehmen sowohl die Aufgabe der reversen Transkription als auch der direkt anschließenden Amplifikation. Neben den Primern für die zu detektierende Sequenz werden zur Expressionskontrolle ebenso Primer für das „house-keeping“ Gen  $\beta$ -Aktin eingesetzt. Die Vorteile dieser Methode liegen in einer Vereinfachung des Arbeitsablaufs, in der Möglichkeit geringere Mengen an RNS zu detektieren, sowie längere Amplifikate zu erhalten.

Die reverse Transkription wurde nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers für 30 Min. bei  $50^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die PCR schloß sich direkt mit folgenden Parametern an: Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 2 Min, 10 Zyklen mit Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 60 Sek., Annealing bei  $58^{\circ}\text{C}$  für 30 Sek., Verlängerung bei  $68^{\circ}\text{C}$  für 60 Sek.. 25 Zyklen entsprechend den vergangenen 10 Zyklen jedoch mit einer Erhöhung der Verlängerungszeit um je 5 Sek. je Zyklus. Die PCR wurde mit einer letzten

Verlängerungszeit von 7 Min. beendet und anschließend die Amplifikate in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### Southern Blot-Analyse der Amplifikate

Um die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen, wurde das Gel auf einen Nylonfilter geblottet und mit einer spezifischen, Biotin-markierten Sonde hybridisiert.

#### *Vakuum-Blot*

Das Gel wurde in einer Vakuum-Blot-Apparatur auf einen Nylon-Filter (Hybond-N, Amersham) geblottet. Für 8 Min. werden zur Denaturierung der DNS etwa 15ml Denaturierungspuffer auf das Gel einwirken gelassen, Reste dann entfernt, das Gel mit ca. 1l Transferpuffer überschichtet und für eine Stunde geblottet. Nach Markierung der Geltaschen auf dem Filter wird das Gel verworfen, der Filter in 2x SSC einmal gewaschen und auf einem Whatman-Papier getrocknet. Die DNS wird nach dem Trocknen in einer 3-minütigen UV-Exposition durch „Cross-Linking“ mit der Nylon-Membran kovalent vernetzt.

#### *Biotin-Markierung einer spezifischen Sonde*

Als Sonde dienen aufgereinigte 30mer Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg, BRD), die mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotid Transferase (TdT; Gibco BRL, Eggenstein, BRD) mit Biotin <sup>14</sup>d-CTP markiert werden. Alternativ wurden kommerziell erhältliche Oligonukleotide verwendet, die bereits biotinkonjugiert waren.

In die Reaktion werden 50pmol der Sonde, die in einer Konzentration von 100pmol vorliegt, in 2µl Volumen eingesetzt. Dazu werden gegeben:

- 5µl 5x TdT-Puffer
- 5µl 0,4mM Biotin <sup>14</sup>d-CTP
- 1µl TdT (15U/µl)

Dieser Ansatz wird für 15 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann die Reaktion durch die Zugabe von 0,5µl 0,2M EDTA (pH 7,5) abgestoppt. Die Sonde wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### *Hybridisierung*

Der Filter wird je nach Größe in 5-10ml Vorhybridisierungslösung für eine Stunde bei 56°C vorhybridisiert, anschließend die Flüssigkeit gegen das entsprechende Volumen Hybridisierungslösung mit dem markierten Oligonukleotid ausgetauscht und der Filter ü/n bei 54°C hybridisiert.

Nach einem Abspülen überschüssiger Hybridisierungslösung in 2xSSC, schliessen sich folgende Waschschrte an:

- 15 Min. 2x SSC bei Raumtemperatur
- 15 Min. 2x SSC bei 57°C
- 15 Min. 1x SSC bei 57°C
- 15 Min. 1x SSC bei Raumtemperatur

Der Filter wird kurz in Blockierungspuffer 2 abgespült und dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen 30 Min. bei Raumtemperatur in diesem abgesättigt.

#### *Detektion*

Der Filter wird mit 5-10ml Puffer 2 und 0,1µl/ml (1:10.000) Streptavidin-alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat 15 Min. auf dem Taumelroller bei Raumtemperatur inkubiert. Es schliessen sich je 3 Waschschritte zu 5 Min. in Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 sowie 5 minütiges Absättigen in Puffer 3 an. Eine Lumineszenz-Reaktion, d.h. die Emission von Licht durch eine enzym-katalysierte chemische Reaktion, wird erreicht durch Inkubation des Filters mit 5-10ml Puffer 3 und 10µl/ml AP-Substrat CDP-Star. Nach 5 Min. wird das Substrat wieder entfernt, der Filter einmal in Puffer 3 gewaschen und nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit feucht in eine Kunststofftüte eingeschweißt. Durch eine 5minütige Inkubation bei 37°C wird die Reaktion verstärkt und es kann der Lumineszenz-Nachweis durch Auflegen eines Röntgenfilms durchgeführt werden.

#### **Northern Blot**

Zur Darstellung der endogenen und exogenen TAP1-Transkripte in den Transfektanden wurde die gesamte zytoplasmatische RNS gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran gebロットet und anschließend TAP1- sowie β-Aktin-Transkripte mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden markiert.

#### Denaturierende RNS Agarose Gelelektrophorese

Es wurde eine modifizierte Methode nach Lehrach und Koautoren (1977) benutzt.

20µg der RNS werden mit 10% v/v 3M Natrium-Acetat-Lösung vermischt und mit dem dreifachen Volumen eiskaltem 100% Ethanol versetzt. Nach gründlichem Invertieren wird die RNS bei -70°C für mindestens 30 Min. gefällt. Wenige Stunden vor der Gelelektrophorese wird die RNS durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 4°C pelletiert, zweimal mit 500µl eiskaltem 80% Ethanol gewaschen und der Rücklauf quantitativ entfernt. Das Pellet wird kurz getrocknet und dann in 4µl H<sub>2</sub>O auf Eis gelöst.

Es wird ein 1% Agarose Gel auf H<sub>2</sub>O Basis hergestellt, welches nach dem Aufkochen mit 10% v/v 10x Morpholinosulfat (MOPS) vermischt und nach Abkühlen auf 60°C in einem Wasserbad mit 0,025% v/v 37%igem Formaldehyd versetzt wird. Vor dem Probenauftrag, wird das fertige Gel schon etwa 30 Min. im Laufpuffer 1xMOPS äquilibriert.

Zur Auflösung von RNS-Sekundärstrukturen wird die RNS unter Zugabe stabilisierender Substanzen denaturiert. Dafür wird zu den 4µl RNS (20µg/Ansatz) dazugegeben:

- 3µl 10x MOPS
- 4µl Formaldehyd 37%
- 10µl Formamid (deionisiert)
- 2,5µl Ethidiumbromid (400µg/ml)
- 1,5µl H<sub>2</sub>O

Anschließend wird der Ansatz für 15 Min. bei 65°C denaturiert, danach 5 Min. auf Eis inkubiert, mit 5µl RNS-Ladepuffer versetzt und nach kurzem Zentrifugieren das Endvolumen von 30µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 120V gestartet, bis die Farbstoffe des Ladepuffers in das Gel eingewandert sind und dann für 2-2,5 Stunden mit 100V fortgeführt. Das Gel wird anschließend auf dem UV-Transilluminator fotografiert.

#### RNS-Kapillar-Blot

Das RNS-Gel wird nach dem Fotografieren zusammen mit dem Filter so auf einer Blotvorrichtung plziert, daß die RNS mit einem durch Kapillarkräfte getriebenen Flüssigkeitsstrom von 10xSSC durch das Gel auf den Filter transferiert wird. (Sambrook et al., 1989). Der Kapillarsog wird durch mehrere Lagen Whatman-Papier und Zellstoff erzeugt.

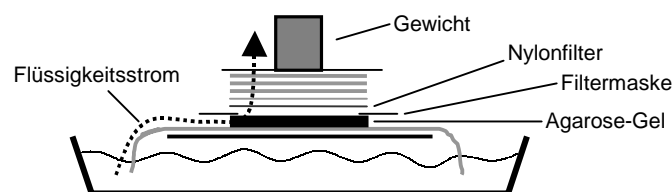


Abb. 3.4: Schematische Darstellung einer Blotvorrichtung für den Kapillar-Blot. Ein Flüssigkeitsstrom von 10xSSC transferiert Nukleinsäuren vom Gel auf den darüberliegenden Nylon-Filter

Der Blot wird über Nacht durchgeführt. Danach wird der Nylon-Filter zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und die RNS für zwei Stunden bei 80°C auf dem Filter fixiert.

#### Radioaktive Markierung eines cDNS-Fragmentes

Zur radioaktiven Markierung einer DNS-Sonde, mit welcher RNS auf einer Nylonmembran durch Hybridisierung detektiert wird, wurde das „Megaprime-Kit“ (Amersham, Braunschweig, BRD) eingesetzt.

Es werden 25-50ng der Ausgangs-DNS, gelöst in einem Volumen von 31µl H<sub>2</sub>O, in ein Schraubdeckel-Reaktionsgefäß vorgegeben. Dazu werden 5µl des mitgelieferten Primers pipettiert, der Ansatz für 5 Min. bei 95°C denaturiert und für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Primerbindung zuzulassen. Nach der Zugabe von 10µl 5x-Labeling-Puffer, der die desoxy-Nukleosid-Triphosphate Adenin, Thymin und Guanin enthält, 2µl des radioaktiven <sup>32</sup>P-desoxy-Cytidin-Triphosphat und 2µl des Klenow-Fragmentes (1U/µl) wird nach Mischen die Synthese radioaktiv markierter cDNS für etwa 30 Min. bei 37°C durchgeführt.

Die Aufreinigung des Produktes erfolgt über eine Sephadex-G50 Säule. Hierzu wird eine 1ml Standardinsulinspritze mit silikonisierter Glaswolle abgedichtet und soweit mit Sephadex-G50 (gequollen und autoklaviert in TE) aufgefüllt, daß nach einem Zentrifugationsschritt von 5 Min. bei 1500U/Min. ungefähr 600µl der Spritze mit abgesetzten G50-Kügelchen gefüllt sind. Die Säule wird mit 200µl TE äquilibriert und zentrifugiert. Die markierte Probe wird mit 150µl TE auf 200µl Volumen gebracht und



auf die Säule aufgetragen, der Durchlauf während eines weiteren Zentrifugationsschrittes in einem Schraubdeckelröhrchen aufgefangen. Von der jetzt aufgereinigten cDNS wird 1µl zur Bestimmung der Aktivität in einem Flüssigkeits-Szintillations-Counter (Canberra Ind., Canberra, Australien) entnommen, der Rest in die Hybridisierung eingesetzt.

#### Hybridisierung

Hybridisierungen wurden bei 42°C in einem Rotations-Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen, BRD) durchgeführt. Der Filter wird in ein Glas-Hybridisierungsröhrchen, mit der RNS-Seite zum Lumen gerichtet, eingelegt und in 15ml einer auf 42°C vorgewärmten Prähybridisierungslösung für mindestens zwei Stunden im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Anschließend wird die radioaktive cDNS-Sonde für 3 Min. bei 95°C denaturiert und dann zügig zum Filter in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht.

Zur Entfernung nicht gebundener radioaktiv markierter DNS wird der Filter mehrfach gewaschen:

- zweimal je 15 Min. mit 15ml 2x SSC bei 42°C in dem Hybridisierungsröhrchen
- einmal 30 Min. mit 15ml 2x SSC bei 65°C in einem Wasserbad
- einmal 30 Min. mit 15ml 1x SSC bei 65°C in einem Wasserbad

Die noch verbliebene Radioaktivität auf dem Filter wird mit der Hilfe eines Geiger-Zählers gemessen und protokolliert. Der Filter wird feucht in Plastikfolie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit Verstärkungsfolie einem Autoradiographie-Film mindestens 12h bei -70°C exponiert. Der Film wird in einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine (Kodak, Stuttgart, BRD) entwickelt.

### 4.3. Proteinchemie

#### 4.3.1. Western-Blot-Analyse

##### Proteinpräparation und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Zellen werden zur Proteinisolierung auf Petrischalen für die Zellkultur mit 15 cm Durchmesser ausgesät und im subkonfluenten Stadium geerntet. Dafür wird kaltes PBS, SDS-Puffer (angesetzt aus je einem Teil H<sub>2</sub>O und 2xSDS-Puffer) und ein Proteaseinhibitorengemisch verwendet.

Die Zellkulturschalen werden auf Eis gestellt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen nach der Zugabe von 1ml Proteaseinhibitorengemisch mit einem „Rubber-Policeman“ abgeschabt, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sofort für 2 Min. bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet, je nach Größe, in 100-400µl SDS Puffer aufgenommen und in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine gleichmäßig in dem SDS-Puffer zu lösen, wird der Ansatz für mindestens fünf Min. bei 95°C inkubiert. Die Proteine werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Um die Proteine in gleichen Mengen in den Western-Blot einsetzen zu können, wird eine Konzentrationsbestimmung (Bradford, 1976) durchgeführt werden. Dazu werden die Proteine aus der SDS-Lösung durch eine Methanol-Chloroform-Fällung extrahiert.

3µl der SDS-Proteinlösung werden mit 97µl H<sub>2</sub>O vermischt. Durch die Zugabe von 100µl Chloroform, 400µl Methanol, 300µl H<sub>2</sub>O und Mischen auf dem Vortex-Mixer nach jedem Schritt werden die Proteine ausgefällt. In einem Zentrifugationsschritt von 5 Min. bei 13.000 U/min werden die Phasen getrennt und die Proteine werden als weiße Interphase sichtbar. Die obere Phase wird verworfen, durch die erneute Zugabe von 300µl Methanol die Phasenunterschiede aufgehoben und die Proteine in einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min pelletiert. Der Überstand wird quantitativ entfernt, das Pellet für etwa 10 Min. getrocknet und anschließend in 10µl 0,1 N NaOH für 5 bis 10 Min. gelöst. Der Ansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf 800µl aufgefüllt.

Damit eine photometrische Konzentrationsbestimmung möglich ist, werden von bovinem Serumalbumin (BSA) Proteinstandards mit bekannten Konzentrationen hergestellt. Dafür wird eine Stocklösung von 10mg/ml BSA mit 0,1 N NaOH 1:100 verdünnt, eine Konzentrationsreihe von 2 bis 16 µg/ml angesetzt und die Proben mit H<sub>2</sub>O auf 800µl Gesamtvolumen gebracht. Zur Anfärbung der Proteine werden alle Ansätze sowie ein Leeransatz mit 800µl H<sub>2</sub>O mit 200µl Bradford Reagenz (Bio-Rad, München, BRD) versetzt, auf dem Vortex-Mixer vermischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Proben werden direkt gegen den Leeransatz photometrisch vermessen. Anschließend wird eine Eichgerade erstellt und die Konzentrationen der Proteine aus dieser abgelesen. Die tatsächlichen Konzentrationen der extrahierten Proteine werden nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{abgelesener Wert} \times \text{Bradford-Faktor (2)}}{\text{entnommenes Volumen}} = \text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

### **Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Lämmli (1970) und Blot**

Zur weiteren Analyse der Proteine dient die elektrophoretische Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (PAGE) und der anschließende Transfer der Proteine auf einen Nitrozellulose-Filter (Western-Blot), auf dem sie immunohistochemisch oder mit einer Biotin-Streptavidin Reaktion detektiert werden können.

Ein 10% Trenngel und ein 5% Sammelgel sowie ein Gelträger werden vorbereitet. Vom Trenngel werden 500µl entnommen und durch die Zugabe von 5µl Ammoniumpersulfat [APS] (Bio-Rad, München, BRD) und 2µl Tetramethylethyldiamin [TEMED] (Bio-Rad, München, BRD) die Polymerisierung des Acryls gestartet. Dieser Ansatz wird direkt in den Gelträger gegeben, um dessen Boden vollständig abzudichten. Nach erfolgter Polymerisierung wird auch der Rest des Trenngel-Ansatzes mit 25µl APS und 3µl TEMED versetzt, in den Gelträger gefüllt und anschließend vorsichtig mit 200µl Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt, Reste mit Filterpapier abgesaugt, der Sammelgel-Ansatz mit 10µl APS und 2µl TEMED versetzt und über das Trenngel geschichtet. Vor dem Polymerisieren wird ein Spacer-Kamm eingesetzt, der Taschen für das Auftragen der Proteine formt.

40 oder 50µg Protein werden entnommen, mit 1x SDS-Puffer auf 15µl Auftragsvolumen

gebracht und kurz auf 95°C erhitzt.

Nach Vorbereitung der Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München, BRD), werden die Proteinlösungen sowie ein Größenstandard mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei 10mA für ca. 20 Min. (Sammelgel) und bei 20mA für eine weitere Stunde (Trenngel) durchgeführt.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf einen Nitrozellulose-Filter erfolgt anschließend in einer Transferkammer (Bio-Rad, München, BRD). Dazu wird das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel abgetrennt und verworfen, ein Nitrozellulose-Filter entsprechender Größe im Transferpuffer angefeuchtet und auf das Gel aufgelegt. Dann werden Gel und Filter von innen nach außen jeweils mit drei angefeuchteten Whatman 3M-Papieren und einem Schwamm versehen und so in eine Transferhalterung eingespannt.

Der Transfer wird ü/n bei Raumtemperatur mit 100mA durchgeführt.

Der Nitrozellulose-Filter kann danach sofort weiterverarbeitet oder eingeschweißt bei -20°C aufbewahrt werden.

Um zu überprüfen, ob die Proteine in gleicher Menge aufgetragen wurden, wird eine Proteinfärbung der Filter mit Ponceau-S-Lösung für 15 Min. durchgeführt.

#### **Immunhistochemische Detektion durch spezifische Antikörper**

Der Filter wird durch mehrfaches Spülen in TBS/Tween 20 (TBST) entfärbt, unspezifische Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation in „Blocking“-Lösung abgedeckt und der Filter erneut dreimal für 5 Min. in TBST gewaschen. Anschließend wird der Filter mit dem, für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper in TBST in Folie eingeschweißt und entweder ü/n bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumelroller inkubiert.

Anschließend kann die Detektion mit dem, gegen den ersten Antikörper gerichteten, Zweit-Antikörper erfolgen. Dazu wird der Filter dreimal für 5 Min. in TBST gewaschen und danach mit dem, mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten, Zweitantikörper in TBST in eine Folie eingeschweißt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Die Farbreaktion durch die alkalische Phosphatase wird durch eine Vorinkubation mit der TBS-AP-Lösung eingeleitet, die nach 5 Min. gegen die Entwickler-Lösung ausgetauscht wird. Der Filter soll bis zu einer deutlich erkennbaren Färbung, die nach ca. 4 Min. beginnt, im Dunklen inkubiert werden. Wenn die Färbung ausreichende Intensität angenommen hat, wird die Reaktion durch mehrfaches Spülen des Filters in H<sub>2</sub>O abgestoppt. Der Filter wird ü/n in einer 0,01% Natriumazid-Lösung im Dunklen fixiert, anschließend zwischen 2 Whatman 3M-Papieren getrocknet und kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

#### **Streptavidin-Peroxidase vermittelte Chemilumineszenz**

Produkte aus der Biotin-*in-vitro*-Translation werden durch direkte Markierung mit einem Streptavidin-Peroxidase(POD)-Konjugat detektiert. Nach Transfer auf Nitrozellulose, wie

oben beschrieben, wird der Filter zweimal gewaschen und 1 Stunde in 1% „Blocking“-Lösung unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Waschschritten in TBST und zwei weiteren in 0,5% Blockierungs-Lösung für je 10 Min. wird der Filter in eine Folientasche eingeschweißt, die mit 5ml 0,5% Blockierungs-Lösung mit 100 mU Streptavidin-POD-Konjugat aufgefüllt wird. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. wird der Filter mit TBST viermal für je 15 Min. gewaschen und dann mit 5ml der frisch angesetzten Detektionslösung in Folie eingeschweißt. Nach 1 Min. Inkubation kann in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Intensität der Chemilumineszenzreaktion nach 1-60 Sek. wieder entfernt und entwickelt werden.

## 4.4. Funktionelle Analysen

### 4.4.1. Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden mit einem EPICS XL, Software Version 2.1 (Beckmann & Coulter Electronics, Krefeld, BRD) durchgeführt.

Der Epics XL arbeitet mit einem luftgekühlten Laser mit der Wellenlänge 488nm (blautürkis), drei Fluoreszenzdetektoren und Detektoren für Vorwärts- und Seitwärtstreulicht. Das Prinzip der Messung soll hier kurz erläutert werden (nach R. Eckhardt, Grundlagen der Durchflußzytometrie, Coulter Electronics):

In einem Durchflußzytometer werden einzelne Zellen in hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare geleitet und dort durch eine Lichtquelle, in diesem Fall einen Argon-Laser angeregt.

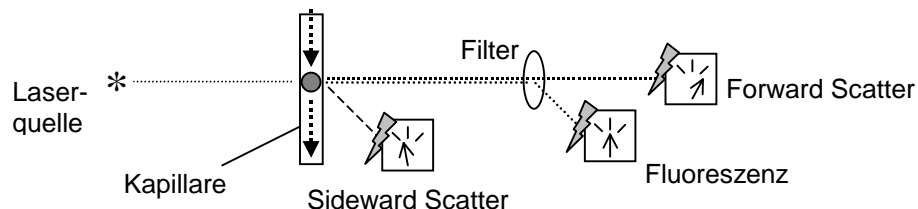


Abb. 3.5: Schema der Durchflußzytometrie.

Einzelne Zellen werden beim Durchfluß durch eine Kapillare vom Licht des Lasers erfaßt und das entstehende Streulicht von einer Reihe von Detektoren aufgefangen.

Das emittierte Licht wird daraufhin durch eine Reihe von Sensoren in elektrische Signale umgesetzt. An erster Stelle stehen hier das Vorwärts- und Seitwärtstreulicht (Forward- und Sideward-Scatter), die sich nach Zellgröße bzw. Zellgranularität ändern und somit eine grobe Unterteilung von z.B. Leukozytenpopulationen erlauben. Diese Werte ergeben ein sogenanntes „Scattergramm“, in dem durch das Legen eines Fensters, des sogenannten „Gate“, einzelne Bereiche abgegrenzt werden können. Dadurch ist die weitere Analyse einzelner Zellpopulationen möglich, da nur die in einem solchen „Gate“ empfangenen Impulse weiter verarbeitet werden. Zudem können störende Impulse durch Zelltrümmer, also kleine Partikel, ausgegrenzt werden.

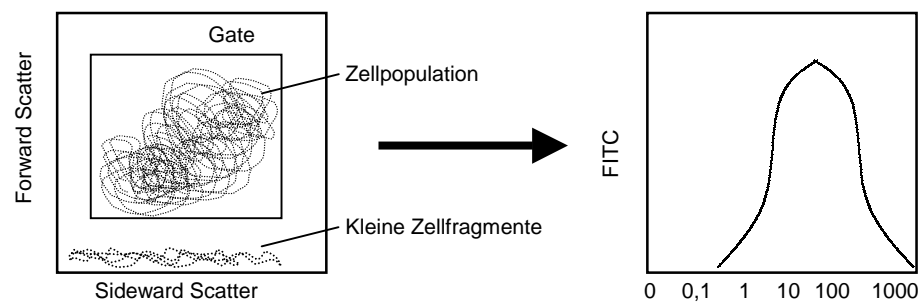


Abb. 3.6: Wiedergabe einer typischen durchflußzytometrischen Analyse. Abgrenzung einer Zellpopulation und Darstellung der Fluoreszenzintensität dieses Bereiches.

Weitere Sensoren können durch Filter bestimmter Wellenlänge bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden und auch je nach Leuchtintensität die Quantität der Signale bestimmen. Mit solchen Farbstoffen konjugierte Antikörper sind also hervorragende Hilfsmittel zur quantitativen Bestimmung der Expression eines Zelloberflächenmoleküls. Die auf der Zelloberfläche lokalisierten Moleküle werden mit einem spezifischen Maus-Primärantikörper detektiert, der wiederum durch einen Ziegen-Anti-Maus-IgG („goat-anti-mouse“, GAM) Sekundärantikörper markiert wird. Dieser Sekundärantikörper ist kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt, der, angeregt, bei einer Wellenlänge von 525nm grünlich fluoresziert. Um eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung von Antikörpern zu erfassen, wird parallel ein Kontrollansatz mit Maus-IgG1 als Primärantikörper durchgeführt, da die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper dem IgG1 Isotyp entsprechen.

### Probenvorbereitung und -messung

Pro Messung werden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Sie werden zweimal in PBS gewaschen und in 200µl PBS mit dem Erstantikörper nach kurzem Mischen auf dem Vortex-Mischer für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1ml PBS zur Entfernung nicht gebundener Antikörper werden die Zellen in gleicher Weise mit dem FITC-konjugierten Zweitantikörper im Dunkeln inkubiert. Nachdem durch Waschen in PBS auch hier überschüssige Antikörper entfernt wurden, wird der Ansatz mit 750µl PBS aufgefüllt und anschließend in die Messung eingesetzt.

Die Messröhrchen werden dem Gerät entweder manuell oder über ein Karussell zugeführt, wobei der Kontrollansatz zuerst gemessen und die Kompensation des Gerätes so eingestellt wird, daß die mittlere spezifische Fluoreszenzintensität bei etwa 1 liegt. Alle Proben werden nach den gleichen Kriterien gemessen und die Ergebnisse sind somit vergleichbar.

#### 4.4.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation der in der Durchflußzytometrie quantitativ erfassten Expression der verschiedenen Proteine darzustellen, wurde eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt.

Dazu werden adhärenente Zellen auf sterilen, runden Deckgläschen des Durchmessers 12mm in 24-Loch-Kulturplatten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Ein Anwachsen von Zellen wird durch vorherige Beschichtung der Deckgläschen mit 1% steriler Gelatine für 20 Min. bei Raumtemperatur begünstigt.

Nicht adhärenente Zellen werden kurz vor der Markierung durch Antikörper auf den Deckgläschen mit der Hilfe von 50µM Poly-L-Lysin fixiert. 100µl Poly-L-Lysin werden dazu für 10 Min. auf dem Deckgläschen inkubiert, anschließend verbleibende Flüssigkeit abgenommen und 100µl einer Zellsuspension für 10 Min. auf das Deckgläschen gegeben. Nach Entfernung der überschüssigen Zellsuspension werden diese Ansätze wie die adhärenent gewachsenen Zellen behandelt.

Die Zellen werden einmal mit 500µl PBS gewaschen und dann in 500µl Paraformaldehyd (PFA)-Puffer für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dies hat sowohl eine Fixierung der Zellen als auch eine Permeabilisierung der Zellmembran zur Folge und eignet sich also für membranständige wie auch für zytosolische Antigene gleichermaßen.

Es schließen sich zwei Waschschrte mit 500µl PBS und ein Waschschrte mit 500µl Bovines Serum-Albumin (BSA)-Puffer an, durch den unspezifische Bindungen abgedeckt werden sollen. Die Zellen werden dann fünf Min. in 500µl Saponin (SAPO)-Puffer inkubiert, der Überstand entfernt und 150µl des Primärantikörpers in SAPO-Puffer für 20 Min. bei 4°C inkubiert.

Je ein Waschschrte mit 500µl SAPO-Puffer, mit 500µl PBS und ein weiterer mit 500µl SAPO-Puffer sind vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper GAM-FITC notwendig. Dieser wird in 150µl SAPO-Puffer auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 20 Min. bei 4°C mit ihnen inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, werden die Zellen dreimal mit SAPO-Puffer, zweimal mit BSA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. In die Mitte eines Objektträgers werden 3µl PBS/Glycerin gegeben, das Deckgläschen mit einer spitzen Pinzette entnommen und mit der zellbehafteten Seite auf den Objektträger gelegt. Der Rand des Deckgläschens wird nach Antrocknen ausgetretener Flüssigkeit mit Nagellack versiegelt.

#### 4.4.3. Peptid-Translokations-Versuche

Die Peptid-Translokations-Versuche wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation durch die Arbeitsgruppe von Dr. Frank Momburg am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Das Prinzip dieser Experimente beruht auf den Tatsachen, daß

- I.) antigene Peptide fast ausschließlich vom Zytosol unter ATP-Verbrauch in das ER transloziert werden,
- II.) eine Glykosylierung fast ausschließlich im ER stattfindet und
- III.) glykosylierte Peptide mit ConA-Sepharose isoliert werden können.

Modellpeptide werden dafür mit radioaktivem <sup>125</sup>Iod markiert, die Plasmamembranen von  $2,5 \times 10^6$  zu untersuchenden Zellen mit 2IU/ml Streptolysin O für 15 Min. permeabilisiert und anschließend in An- bzw. Abwesenheit von 10mM ATP für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Abschließend werden die Zellen mit NP40 lysiert, Zellkerne und -trümmer beseitigt und die glykosylierten Peptide mit ConA-Sepharose extrahiert. Als Maß für die

Menge transportierter und damit glykosylierter Peptide wird in einem  $\gamma$ -Counter die emittierte Radioaktivität gemessen.

Die Versuche wurden zweimal mit drei verschiedenen Modellpeptiden durchgeführt.

#### 4.4.4. T-Zell vermittelte Experimente

##### CTL-Assays

Zytotoxizitäts-Analysen mit autologen CTL, in Form von  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Versuchen, wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation durch die Arbeitsgruppe von Prof. A. Knuth am Nordwest-Krankenhaus Frankfurt/M. ausgeführt. Alle Versuchsansätze wurden dreifach parallel vorbereitet. Es wurden dazu  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$  Zielzellen mit  $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$  (als Natrium-Chromat) für 1 Stunde inkubiert.

Nach 3 Waschgängen mit RPMI plus 3% FCS wurden  $1 \times 10^3 / \mu\text{l}$  Zielzellen in  $100 \mu\text{l}$  RPMI in 96-Lochplatten überführt. Zu diesen wurden zu einem Gesamtvolumen von  $200 \mu\text{l}$  Effektorzellen der T-Zelllinie IVSB (Bernhard *et al.*, 1994) in verschiedenen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen („effector to target ratio“, E:T) gegeben. NK-Zell-Aktivität wurde durch die Zugabe von nicht markierten K562 Zellen, einem primären Ziel von NK-Zellen, in einem Verhältnis von 80:1 zu IVSB Zellen blockiert. Die Zellen wurden für 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  miteinander inkubiert, danach bei  $1400 \text{U}/\text{min}$  abzentrifugiert und der Anteil der Zielzell-Lyse durch Messen von  $100 \mu\text{l}$  des Überstandes in einem  $\gamma$ -Counter bestimmt. Eine maximale Lyse als Positivkontrolle wurde durch die Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  NP40 erreicht. Die spontane Lyse überstieg nicht 5-10%. Die spezifische Zytotoxizität wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Prozentuale spezifische } ^{51}\text{Cr}\text{-Freisetzung} = 100 \times \frac{\text{cpm der Probe} - \text{cpm spontan}}{\text{cpm maximal} - \text{cpm spontan}}$$

##### Zytokin-Detektion durch ELISA

Die verbliebenen Überstände aus dem CTL-Assay wurden erneut zum Abtrennen von Zelltrümmern bei  $1400 \text{U}/\text{min}$  zentrifugiert und bis zum Abklingen der Radioaktivität für ca. 4 Wochen bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Konzentration von  $\text{TNF-}\alpha$  (Tumornekrose-Faktor-alpha, Cachectin) wurde mittels ELISA („Enzyme linked immunosorbent assay“) bestimmt. Das Prinzip des ELISA beruht darauf, daß für das  $\text{TNF-}\alpha$  Molekül spezifische Antikörper auf einer festen Basis gebunden werden. Die zu messende Flüssigkeit wird dazugegeben so daß sich die darin befindlichen Moleküle an die Antikörper binden. Nach einem Waschschrift, in dem ungebundene Moleküle entfernt werden, wird die Menge gebundener Moleküle durch die Zugabe eines, mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugierten, spezifischen Antikörpers detektiert. Nach einem weiteren Waschschrift, wird der Ansatz mit einer Substratlösung versetzt, durch die es zu einer meßbaren Farbreaktion kommt. Zur Berechnung der Konzentration wird parallel eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des zu detektierenden Moleküls angefertigt, mit der eine Eichkurve erstellt werden kann. Es wurde für dieses Experiment ein Kit verwendet, das alle notwendigen Lösungen und Materialien enthält (R&D

Systems, Wiesbaden, BRD). Die Versuche wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **T-Zell Proliferations-Experimente**

„Mixed lymphocyte tumor cell culture“ (MLTC)-Experimente dienen der Ermittlung der Proliferation von T-Zellen als Maß für ihre Aktivierung in Kokultur mit Tumorzellen. Es werden hierzu T-Zellen HLA-kompatibler Spender in Anwesenheit von  $^3\text{H}$ -Thymidin zusammen mit letal bestrahlten und damit nicht mehr proliferationsfähigen Tumorzellen kultiviert. Bei der Proliferation der T-Zellen wird das radioaktive Thymidin in die DNS der Zellen inkorporiert, so daß die Akkumulation des Isotops mit der Aktivierung der Zellen korreliert.

Periphere mononukleäre Zellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) werden aus 100ml Blut gesunder Spender durch einen Ficoll-Gradienten (Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) isoliert. Hierzu wird pro 10ml Heparin-Vollblut das gleiche Volumen PBS pipettiert und dieses Gemisch über 20ml Ficoll geschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt von 25 Min. bei 1400 U/Min. kann die, die PBMC enthaltende, Interphase abpipettiert werden. Durch dreimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup> wird kontaminierendes Ficoll entfernt und anschließend die Zellen in 100ml R10 resuspendiert. 10µl der Zellsuspension werden entnommen und nach Trypanblaufärbung gezählt. Eine Gesamtzahl von ca.  $14 \times 10^7$  Zellen pro 100ml Vollblut werden gewöhnlich erreicht.

Um die in den PBMC enthaltene Monozytenpopulation weitgehend zu eliminieren, wird eine Adhärenzreinigung durchgeführt. Diese basiert auf dem Prinzip, daß Monozyten eine höhere Affinität zu den Oberflächen der Zellkulturgefäße zeigen als Lymphozyten. Die Zellen werden hierzu auf eine Konzentration von  $20\text{-}30 \times 10^6/10\text{ml}$  Medium eingestellt und je 10ml in einer Petrischale von 90mm Durchmesser 60-90 Min. bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird danach abgenommen und die Schalen zweimal mit 5ml R10 gewaschen, die Spülflüssigkeit mit dem Überstand vereinigt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen werden in 5ml Medium aufgenommen und wie oben gezählt.

Zur Erhöhung des Anteils von T-Lymphozyten innerhalb der PBMC nutzt man die Eigenschaft von Schafserythrozyten den T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD2 zu binden und somit Komplexe aus Erythrozyten und T-Zellen zu bilden (E-Rosettierung), die durch einen Ficoll-Gradienten von den nicht komplexierten B-Zellen und verbliebenen Monozyten getrennt werden. Pro 100ml Vollblut werden 2ml Schafserythrozyten („sheep red blood cells“, SRBC, Virion, Rüschnikon, CH) einen Tag zuvor vorbereitet. Die SRBC werden mit PBS<sup>-</sup> 2-3mal gewaschen und anschließend in 1ml PBS<sup>-</sup>/5ml Ausgangsvolumen aufgenommen, mit 1IE Neuraminidase/ml (Sigma, Deisenhofen, BRD) versetzt und nach Mischen 30-60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS werden die SRBC in 25ml R10/5ml Ausgangsvolumen resuspendiert und sind in dieser Form für etwa 5 Tage bei 4°C haltbar.

Die PBMC werden zur Separation mit R10 auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und pro 10ml



mit je 5ml präparierter SRBC und 5ml FCS versetzt, für 15 Min. auf einem Taumelroller bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 800 U/Min. sedimentiert. Nach Inkubation für 30-60 Min. auf Eis und Wiedererwärmen bei 37°C sowie vorsichtigem Resuspendieren wird die Suspension mit 10ml Ficoll unterschichtet. Nach Zentrifugation für 20 Min. bei 1400 U/Min. zeigt sich eine Interphase, die B-Lymphozyten und Monozyten enthält. Im Sediment sind die komplexierten T-Zellen enthalten. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zur Erythrozytenlyse in 5ml ACK-Lösung aufgenommen. Nach gründlicher Durchmischung und dreimaligem Waschen in PBS werden die T-Zellen in 20ml R10-Medium pro 100ml Ausgangsvolumen aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung, aber höchstens ü/n bei 37°C inkubiert.

Pro MLTC-Ansatz und 96-Loch-Mikrotiterplatten, werden  $1 \times 10^4$  mit 200Gy bestrahlte Tumorzellen und  $1 \times 10^5$  T-Zellen in 200µl Endvolumen benötigt. Zusätzlich zu einer einfachen Kokultur werden in einzelne Ansätze folgende Substanzen gegeben:

- $\alpha$ -CD28 (Janssen Biochemica, Neuss, BRD) 0,1µg/Ansatz: blockierender anti-CD28 Antikörper, der eine Kostimulation durch B7-Moleküle verhindert.
- Rekombinantes Interleukin-2 (IL-2) (Pharmingen, San Diego, USA) 2IE/Ansatz: stimuliert die T-Zellproliferation, dient der Ermittlung der allgemeinen Stimulierbarkeit der verwendeten T-Zellen und der Steigerung unter Kokultur mit Tumorzellen.
- Phytohämagglutinin (PHA) (Wellcome, Burgwedel, BRD) 20ng/Ansatz: stark T-Lymphozyten stimulierendes Lektin, dient als Positivkontrolle.

Alle Ansätze werden zur Mittelung der Werte dreifach parallel angefertigt. Als Negativkontrolle, bzw. um Hintergrundwerte des Thymidineinbaus zu ermitteln, werden je drei Ansätze ohne Zellen, nur mit T-Zellen und nur mit Tumorzellen vorbereitet.

Die Tumorzellen werden für sechs Tage mit den T-Zellen kokultiviert. Am fünften Tag wird zu jedem Ansatz 1µCi  $^3\text{H}$ -Thymidin gegeben und nach 24 Stunden die Zellen mit einem „Filter Mate Cell Harvester“ (Bio-Rad, Freiburg, BRD) geerntet und lysiert. Die DNS wird über einen Vakuumtransfer auf einen 96-Loch-Unifilter GF/C übertragen, der danach bei 50°C getrocknet wird. Die Messung der Radioaktivität wird nach Verstärkung durch je 30µl Microscint-20 Lösung (Sigma, Deisenhofen, BRD) in einem Top-Count-Zähler (Canberra Ind., Canberra, Australien) durchgeführt.

Hintergrundwerte werden von den Proben subtrahiert und die Ergebnisse der Transfektanden relativ zu den Ausgangszellen dargestellt.



## 5. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, das humane TAP1-Gen stabil in Nierenzellkarzinomzellen zu transfizieren und exprimieren. Analysen zeigten, daß die Transfektanden leicht erhöhte Werte für die MHC Klasse I-Oberflächenexpression aufwiesen und in der Lage waren, T-Zellen stärker zu aktivieren als nicht transfizierte Ausgangszellen.

### 5.1. Etablierung eines stabilen Gentransfers in Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Eine wesentliche Voraussetzung für funktionelle Untersuchungen zur TAP1-Überexpression verschiedener Konstrukte in Nierenzellkarzinom-Zellen ist ein effizienter Gentransfer. Somit wurde zunächst die Effizienz verschiedener Gentransfer-Methoden ermittelt, wobei Promoter- und Vektortyp, DNS-Menge und Zelllinie variiert wurden.

#### 5.1.1. Analyse der Transfektionseffizienz

Humane Zellen generell und NZK-Zellen im besonderen erwiesen sich als schwierig zu transfizieren. Die Gen-Transfereffizienz wurde durch einfaches Auszählen Neomycin-resistenter Einzelklone nach mindestens zweiwöchiger Kultur ermittelt. In den untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien ergaben sich dabei erhebliche Unterschiede:

Zelllinie	Verwendeter Vektor	Promoter	Eingesetzte DNA-Menge	Verwendete Methode	Anzahl der Klone	Effizienz
MZ 1851 RC	TAP1neo (P21)	CMV	10µg	Elektroporation	23	$9,2 \cdot 10^{-6}$
MZ 1851 RC	TAP2neo (P23)	CMV	10µg	Elektroporation	0	-
MZ 1851 LN	TAP1neo (P21)	CMV	10µg	Elektroporation	0	-
MZ 1851 LN	TAP2neo (P23)	CMV	10µg	Elektroporation	2	$8 \cdot 10^{-7}$
MZ 1257 RC	hTAP1 (P12)	β-Aktin	3µg	Lipofektion	37	$9,25 \cdot 10^{-5}$
MZ 1257 RC	hTAP2 (P13)	β-Aktin	3µg	Lipofektion	7	$1,75 \cdot 10^{-5}$
MZ 1851 RC	hTAP1 (P12)	β-Aktin	3µg	Lipofektion	0	-
MZ 1851 RC	hTAP2 (P13)	β-Aktin	3µg	Lipofektion	0	-
MZ 1257 RC S6	pCT1irNeo (P64)	CMV	10µg	Elektroporation	>500	$>2 \cdot 10^{-4}$
MZ 1257 RC S6	pPT1irNeo (P65)	PGK	10µg	Elektroporation	>500	$>2 \cdot 10^{-4}$
MZ 1257 RC S6	pCirNeo (P46)	CMV	10µg	Elektroporation	>500	$>2 \cdot 10^{-4}$
MZ 1257 RC S6	pCT1irNeo.2 (P84)	CMV	10µg	Elektroporation	>500	$>2 \cdot 10^{-4}$

Tab. 4.1: Transfektionseffizienz bei Anwendung verschiedener Transfektionstechniken und unterschiedlicher Zelllinien. Der Gentransfer wurde durchgeführt wie in „Methoden“ beschrieben. Die Elektroporation mit IRES-Vektorkonstrukten in die Zelllinie MZ1257RC erwies sich als hocheffizient und damit als geeignet, ein Transfektionsmodell aufzustellen.

Die primären Zellversuche zur Transfektion der TAP-Transgene wurden mit den Plasmidvektoren TAP1-neo (P21) und TAP2-neo (P23) begonnen. Die hier eingesetzte Methode der Elektroporation mit einem Rechteck-Impuls zeigte in dieser Versuchsreihe noch keine optimale Transfektionseffizienz, war jedoch den, in vorherigen Experimenten erzielten, Transduktionserfolgen in einem retroviralen System mit den Zelllinien MZ 1851 RC und MZ 1852 LN mindestens gleichwertig (Jung, pers. Mitteilung).

Alternativ dazu wurde die Methode der Lipofektion mit einem Vektorkonstrukt, das einen  $\beta$ -Aktin-Promoter enthält, angewandt. Die Zelllinien MZ 1851 RC und MZ 1851 LN, isoliert aus einem Primärtumor und einer Lymphknoten-Metastase, erwiesen sich dabei als schwieriger zu transfizieren als die Zelllinie MZ 1257 RC. Es fiel zudem eine verminderte Transfektionseffizienz für die Zellen der Metastase im Vergleich zu denen des Primärtumors auf. Da keine weiteren Versuche zur Verbesserung der Transfektionseffizienz bei den Linien MZ 1851 RC und LN durchgeführt wurden, konnte dies nicht erneut bestätigt werden. Die Ergebnisse entsprechen jedoch den Resultaten, die mit den gleichen Zelllinien auch in anderen Gentransfer-Systemen erzielt werden konnten (D. Jung, pers. Mitteilung).

Die Zelllinie MZ 1257 RC zeigte in den verschiedenen Transfektions-Experimenten unabhängig vom Promoter hohe Raten einer stabilen Integration der Plasmide. Es fiel außerdem eine erhebliche Heterogenität in dieser Zelllinie auf, so daß sich klonale Unterschiede nur schwer von den durch Transgen-Überexpression verursachten differenzieren ließen und also zusätzlich eine Subklonierung dieser Zelllinie notwendig wurde.

Die im Vergleich zur Elektroporation durchgeführten Lipofektionen ergaben eine deutlich reduzierte Anzahl resistenter Klone, so daß diese Methode zugunsten ausschließlicher Elektroporations-Versuche fallengelassen wurde. Nach Optimierung des Elektroporationsprotokolles (s. 3.1.4.1), wurde dieses für alle nachfolgenden Gentransfer-Experimente eingesetzt.

Die Zelllinie MZ1257RC besaß unter allen getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien die höchste Transfektionsrate und war daher für den Aufbau eines „proof of principle“-Modells besonders geeignet.

### 5.1.2. Bestimmung der Stabilität des Vektorkonstrukts

Die Integration des Transgens in die transfizierten Zellen wurde durch eine genomische PCR direkt aus neo<sup>R</sup> Zellen überprüft. Die Konstrukte TAP1neo (P21) und TAP2neo (P23), die einen CMV-Promotor für das Transgen und einen unabhängigen sv40-Promotor für das Selektionsgen tragen, erwiesen sich als instabil, da sich nach wenigen Passagen bereits die TAP-Transgene nicht mehr in der PCR nachweisen ließen. Dies bedeutet, daß es zu einer Segregation der Vektoranteile kommt: Die transfizierten Zellen behalten unter dem Selektionsdruck durch Neomycin das neo<sup>R</sup>-Gen, das nicht essentielle TAP-Transgen wird jedoch eliminiert.

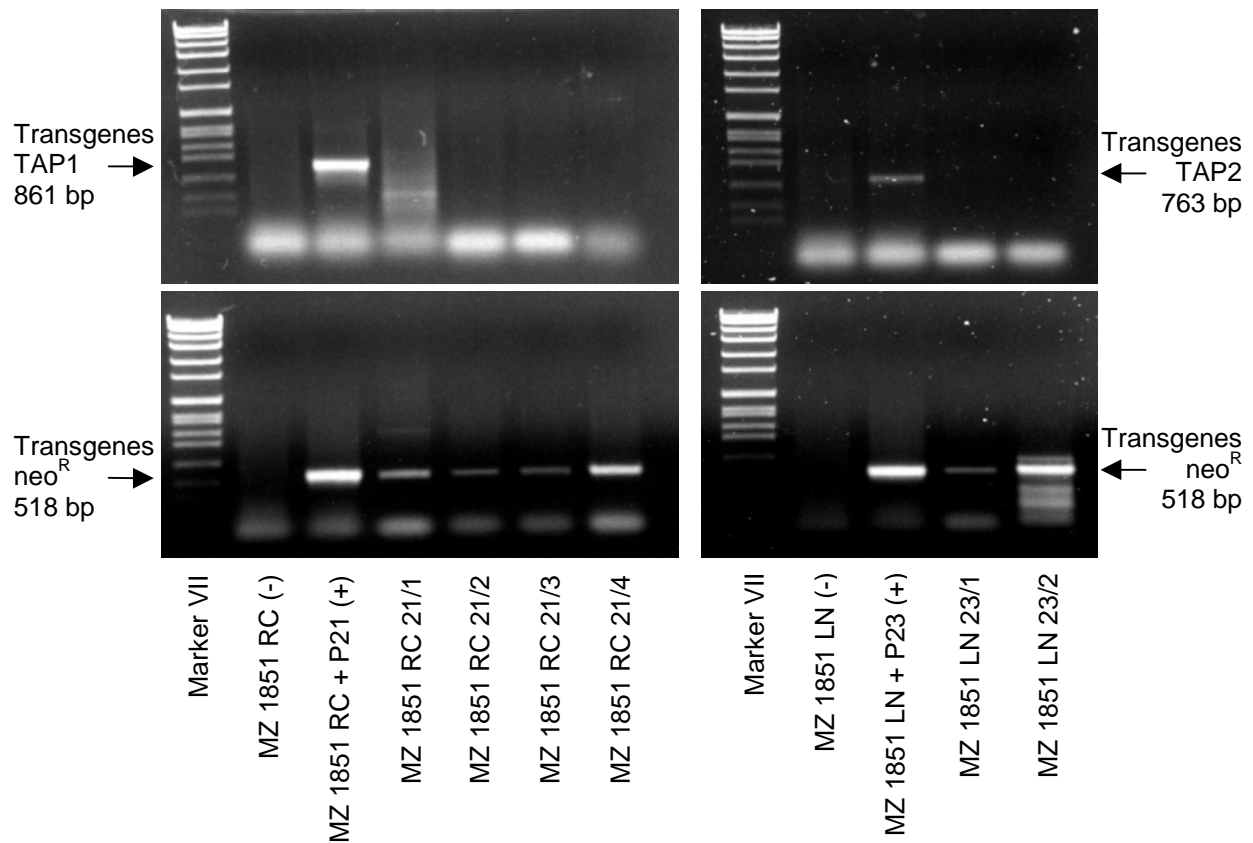


Abb. 4.1: genomische PCR zur Evaluation einer instabilen TAP1-Transfektion. Pro Ansatz wurden  $1,5-2,5 \times 10^4$  Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte Parental-Zellen, als Positivkontrolle ebenfalls Parental-Zellen mit Zugabe von 10ng nicht linearisiertem Plasmid P21, bzw. P23. In den resistenten Klonen aus beiden Transfektionsansätzen war kein Nachweis von transgenem TAP möglich, während jedoch in allen Ansätzen das Neomycin-Selektionsgen vorhanden war.

Eine transiente Kontrolltransfektion von NIH-Zellen mit dem Vektor CMV-TAP1-neo (P21) zeigte eine weitgehende Segregation der Gene innerhalb kurzer Zeit. Während in der genomischen PCR nach 3 Tagen in 17 von 24 (70,8%) Transfektionsansätzen das neo<sup>R</sup>-Gen nachweisbar war, konnte lediglich noch in einem Ansatz (4,2%) ein intaktes TAP1-Transgen identifiziert werden (Abb. 4.2).

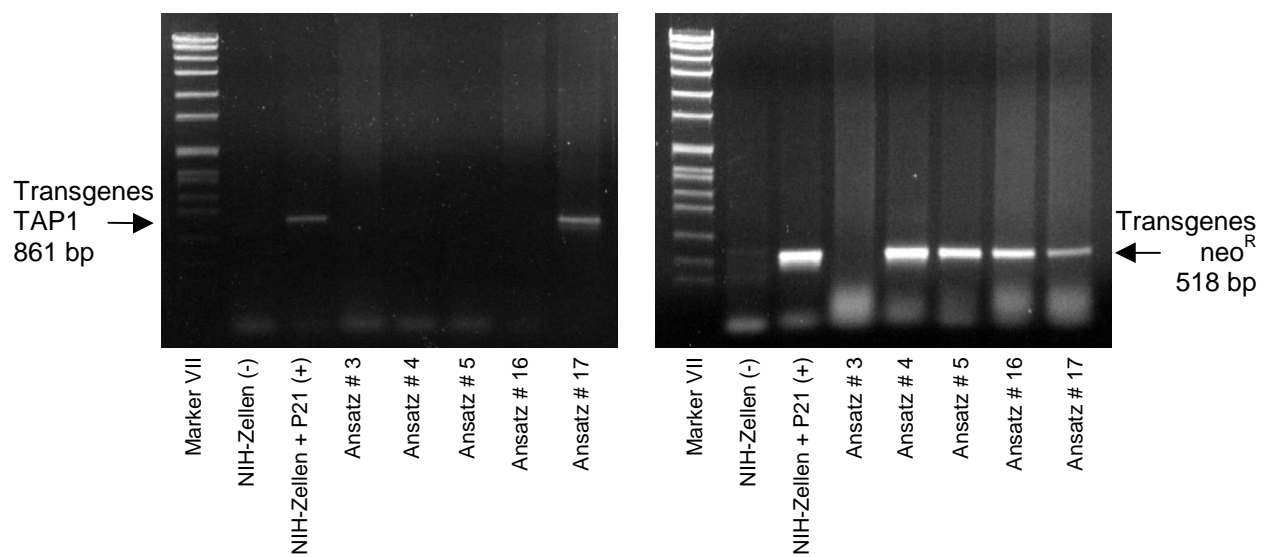


Abb. 4.2: Repräsentative Auswahl aus 24 Ansätzen einer transienten Transfektion von NIH-Zellen mit dem Plasmid CMV-TAP1-neo (P21).

17 Ansätze zeigten ein positives Signal für das neo<sup>R</sup>-Gen, nur einer von diesen war noch positiv für das TAP1-Transgen. Negativkontrolle und Positivkontrolle entsprechen dem Prinzip der vorhergehenden Abbildung.

Um das Problem der Segregation anzugehen, wurde die Struktur des Plasmidvektors verändert. Dafür wurden die Plasmide CMV-TAP1-IRES-neo (P64) und PGK-TAP1-IRES-neo (P65) konstruiert, die sich in ihrem Promoter unterscheiden. Während der Promoter des Cytomegalievirus (CMV) als besonders stark gilt, soll der Promoter des humanen Phosphoglycerat-Kinase-Gens (PGK) eine stabilere Expression des nachfolgend klonierten Transgens garantieren.

Durch die Koppelung beider Transgene mit einer IRES-Sequenz (Gallardo *et al.*, 1997) wird gewährleistet, daß die Transkription des Resistenzgens nur zusammen mit dem Transgen auf einer bicistronischen mRNA erfolgt. Alle Neo-resistenten Klone hatten, wie in der genomischen PCR nachgewiesen, nach Transfektion stabil das TAP1 Transgen integriert (Daten nicht gezeigt). Allerdings war bei der Konstruktion dieser Plasmide ein nicht dokumentiertes ATG-Transkriptionsstartcodon in einem Klonierungsbereich des Ausgangsvektors übersehen worden, das bei einer Kontrollsequenzierung entdeckt wurde. Das Startcodon liegt nur einige Basen vor dem eigentlichen TAP1-Startcodon und stimmt nicht mit dem Leseraster des TAP1-Gens überein, so daß durch diese Vektoren vermehrt Nonsense-Proteine produziert werden. Um eine optimale Expression der beiden Transgene zu erreichen, wurde das Konstrukt zu dem endgültigen Vektor CMV-TAP1-IRES-neo (P84) modifiziert. Zur Verbesserung des Transkriptionsstarts wurde nicht nur das falsche Startcodon entfernt, sondern auch eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1990) vor dem TAP1-Startcodon eingefügt.

Die Stabilität der Transgen-Integration wurde mittels einer genomischen PCR und die Integrität des Vektors durch Kontroll-Sequenzierung geprüft. Wie zu erwarten, wurde das Problem der Segregation der Gene durch die Einführung einer IRES-Sequenz in den Vektor eliminiert.

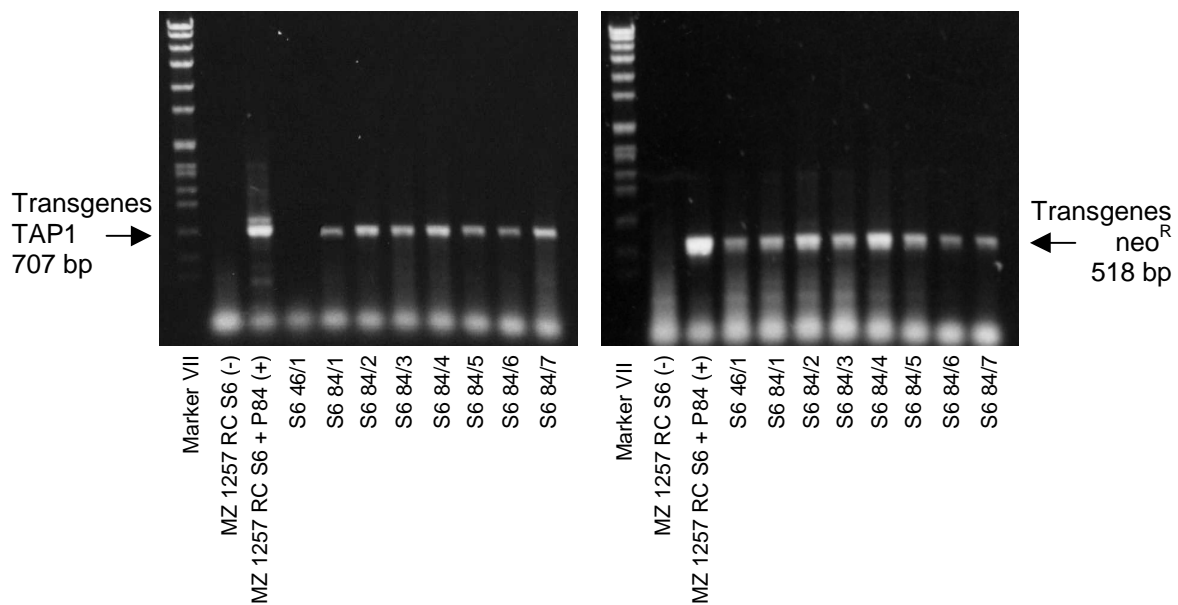


Abb. 4.3: Nachweis der stabilen Integration des TAP1-Transgens und neo<sup>R</sup>-Selektionsmarkers durch genomische PCR.

Repräsentativ werden hier nur die Resultate der genomischen PCR von Transfektanten, die mit dem Plasmid P84 transfiziert wurden, dargestellt. Die Versuche mit den Plasmiden P64 und P65 lieferten vergleichbare Ergebnisse. Negativkontrolle und Positivkontrolle entsprechen dem Prinzip der vorhergehenden Abbildungen.

Für die Konstrukte P12 und P13 erwies es sich als nicht möglich, die entsprechende PCR für eine Transgendetektion zu etablieren, vermutlich weil ein Priming im hier eingesetzten humanen  $\beta$ -Aktin-Promoter im Gegensatz zum viralen CMV-Promoter nicht exklusiv erfolgte. Das Resistenzgen neo<sup>R</sup> blieb bei jedem unter Selektionsdruck gewachsenen Klon in der genomischen PCR nachweisbar.

### 5.1.3. Optimierung der Methode und des Transfervektors

Die Vektorentwicklung wurde durch die Vorversuche (4.1.1 und 4.1.2) beeinflusst. So wurde durch Kombination des effizienten, aber zur Instabilität neigenden CMV-Promoter mit einer IRES-Sequenz in jedem resistenten Klon eine stabile Transgen-Transkription erzielt. Auf den weniger starken Promoter PGK wurde deshalb im Vektordesign verzichtet. Die Transfektion des humanen TAP2-Transgens wurde zunächst nicht weiter verfolgt, weil zum einen einer TAP1-Überexpression in Nierenzellkarzinom-Zellen eine höhere Bedeutung zugemessen wurde und auch durch das Vorhandensein valider monoklonaler Antikörper im Gegensatz zu TAP2 der Nachweis der Expression des TAP1-Transgens möglich ist.

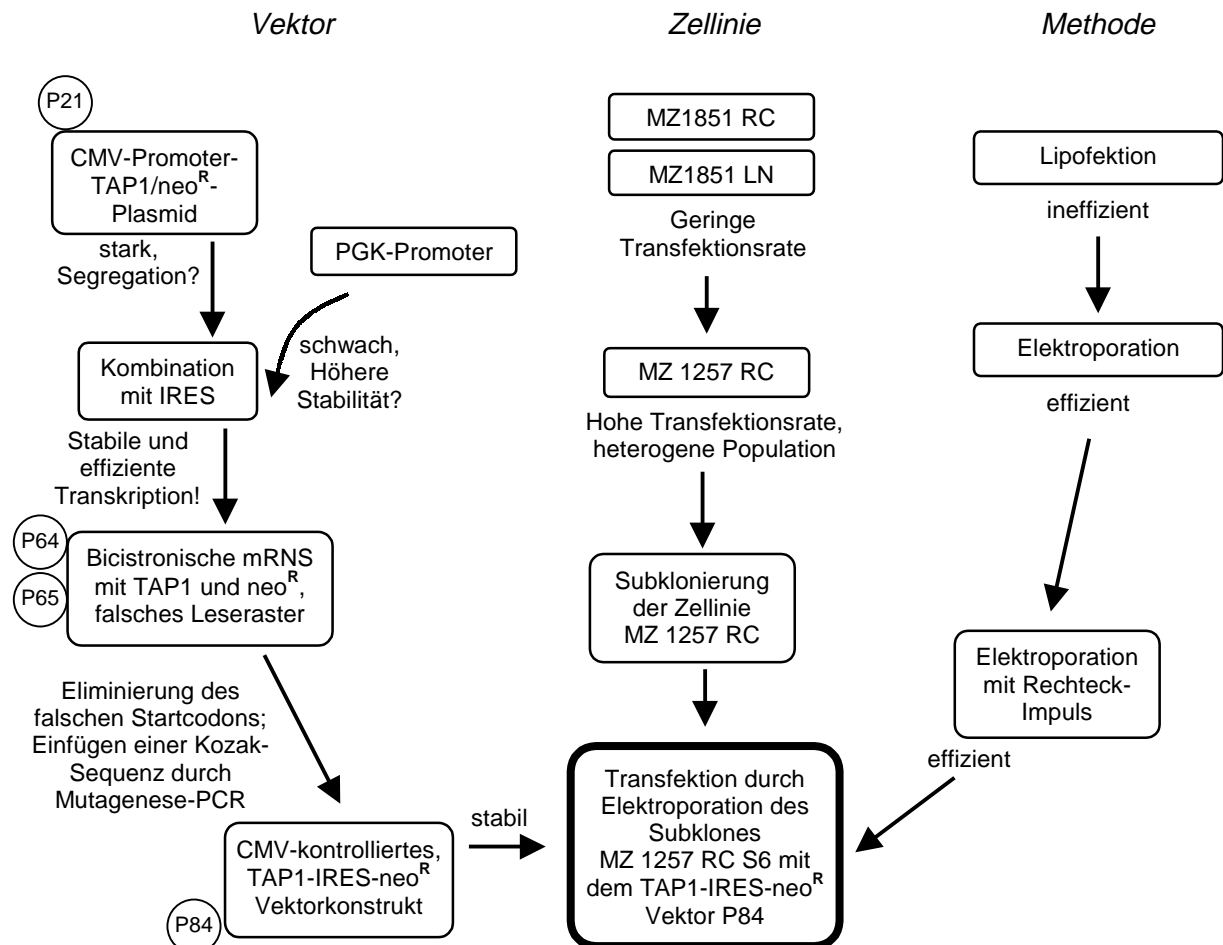


Abb. 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse von Vorversuchen und Entscheidungen, die zur Auswahl von Zelllinie, Vektor und Transfektionsmethode führten.

### Nachweis des Genproduktes nach *in-vitro*-Transkription und -Translation

Um vor dem Einsatz des entsprechenden TAP1 / neo<sup>R</sup> Expressionsvektors zu testen, ob das Transgen richtig transkribiert und translatiert wird, wurde in einer aufeinanderfolgenden *in-vitro* Transkriptions- und Translationsreaktion Protein synthetisiert (s. 3.2.4). Durch einen nachfolgenden Immunoblot mit einem anti-TAP1 spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) wurde ermittelt, daß das Plasmid P64 sowie auch das für die weiterführenden Untersuchungen verwendete Plasmid P84 das TAP1-Protein translatieren.

Das TAP1-Protein besitzt ein MW von ca. 70 kDa. Im Zellextrakt ist neben einer deutlichen Bande in Höhe dieses MW aber auch eine schwächere mit geringerem MW detekierbar. Sie findet sich auf gleicher Höhe wie die Bande aus dem Translationsprodukt.

Da in einer *in-vitro*-Translation keine Glykosylierung stattfindet, handelt es sich dabei um die nicht-glykosylierte Form von TAP1, die ebenfalls durch den TAP1-spezifischen monoklonalen Antikörper 148.3 markiert wird und also auch in geringerem Umfang im Zellextrakt vorkommt.



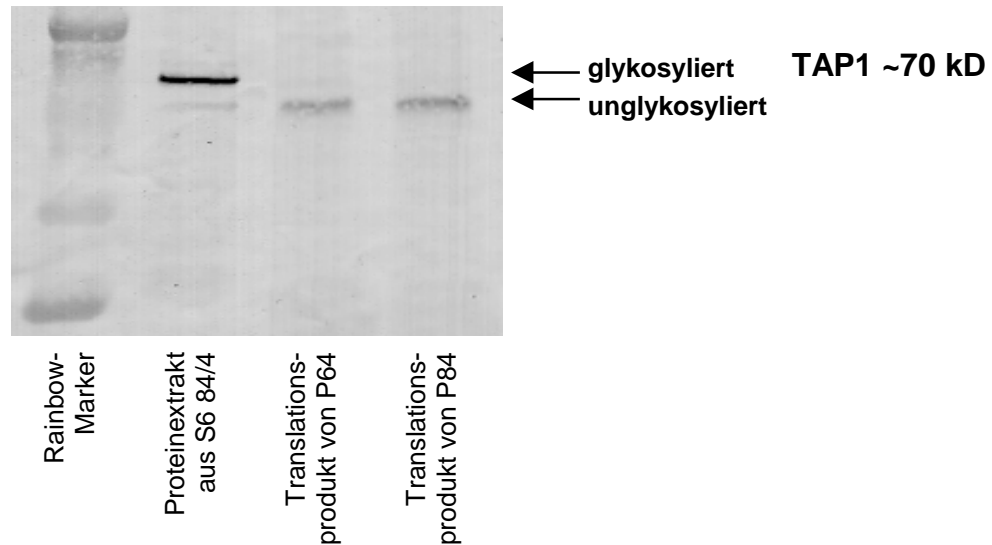


Abb. 4.5: Immunoblot der *in vitro* Translationsprodukte.

Nach der *in vitro*-Translation wurde ein Vergleich zwischen den Proteinprodukten aus der *in vitro*-Translation der Plasmide P64 und P84 gegenüber Proteinextrakt aus einem TAP1-Transfektanten mit TAP1-spezifischem Antikörper (mAb 148.3) durchgeführt. Die nicht glykosylierte Form von TAP1 stellt sich in einer Bande mit geringerer Molekülgröße als zelluläres TAP1 dar. Eine entsprechende schwache Bande kann auch im Zellextrakt detektiert werden.

### Subklonierung der parentalen Zelllinie MZ1257RC

Die für die Vorversuche unter anderen eingesetzte NZK-Zelllinie MZ 1257 RC, wies nach Vereinzelung der Klone eine heterogene Morphologie auf.

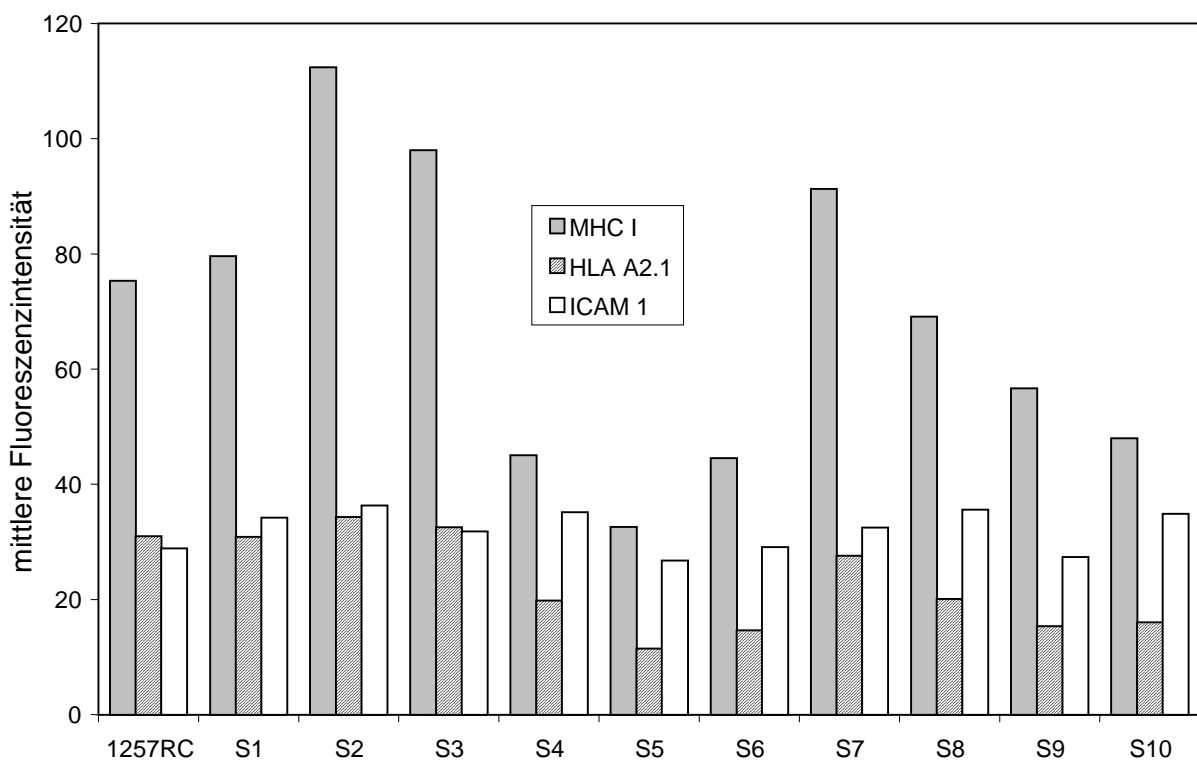


Abb. 4.6: Darstellung der unterschiedlichen Oberflächenexpression relevanter Moleküle auf der parentalen Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257RC und deren Subklone in der Durchflußzytometrie (Einzelmessung).

Aus diesem Grunde wurde die parentale Zelllinie vor erneuten Transfektions-Versuchen subkloniert, was die interzelluläre Heterogenität vermindert. Dafür wurden Zellen auf rechnerisch eine Zelle pro Milliliter verdünnt und auf Mikrotiterplatten verteilt. Nach ca. einer Woche können einzelne Klone identifiziert und expandiert werden.

Insgesamt wurden 10 Klone isoliert und auf ihre MHC Klasse I, ICAM-1 und HLA-A2 Oberflächenexpression analysiert. Wie in Abb. 4.5 gezeigt, wurde eine heterogene Expression der genannten Moleküle gefunden.

Für die abschließenden Transfektions-Versuche wurde der Subklon S6 ausgewählt, weil er zu den Klonen mit einer vergleichsweise niedrigen MHC Klasse I-Expression und relativ hoher Expression anderer relevanter Moleküle gehört. Dabei wird postuliert, daß nach Transfektion eine deutlichere Veränderung in der Klasse I Oberflächenexpression zwischen parentalen Zellen und TAP1-Transfektanden festzustellen wäre.

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden Zytotoxizitätsanalysen der Subklone durchgeführt, die ebenfalls deutliche Unterschiede im Verhalten der T-Zelllinie IVSB gegenüber den Subklonen ergab.

Grund für diese Untersuchung war die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Ausprägung der Oberflächenexpression eines Moleküls und dem Lyseverhalten einzelner Klone nachweisbar ist, was allerdings nicht gezeigt werden konnte.

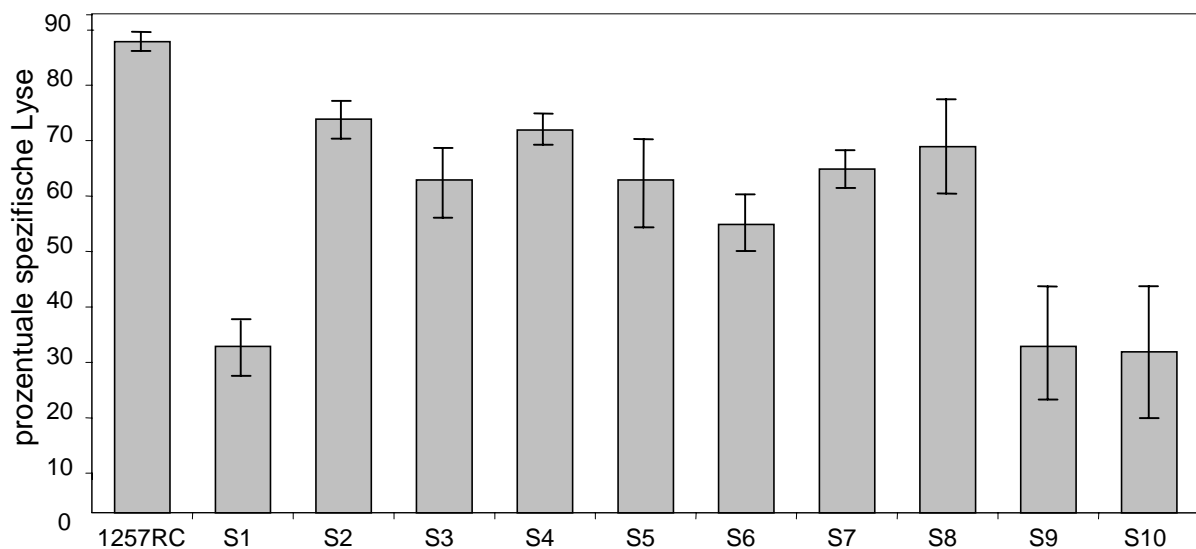


Abb. 4.7: Zytotoxizitätsanalyse parallel durchgeführt zu vorstehender Durchflußzytometrie.

Es wurden Zellen der gleichen Passagezahl verwendet. Dargestellt sind aus 3 Ansätzen gemittelte Werte bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 10:1.

## 5.2. Funktionsüberprüfung des Transgens

### 5.2.1. Heterogenes Transkriptionsmuster des TAP1-Transgens auf RNS-Ebene

Um die Transkriptionsrate des TAP1-Transgens semiquantitativ zu erfassen, wurden RT-PCR-Analysen von parentalen Zellen und der TAP1-transfizierten Klone durchgeführt. Zur Bestimmung der Transkriptionsrate und RNS-Integrität wurden im gleichen Ansatz Primer für  $\beta$ -Aktin mitgeführt.

Die PCR-Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Gele geblottet und zum Nachweis der Spezifität des TAP1-PCR-Produktes wurde dieses mittels eines Southern-blot mit einer TAP1-Sonde hybridisiert.

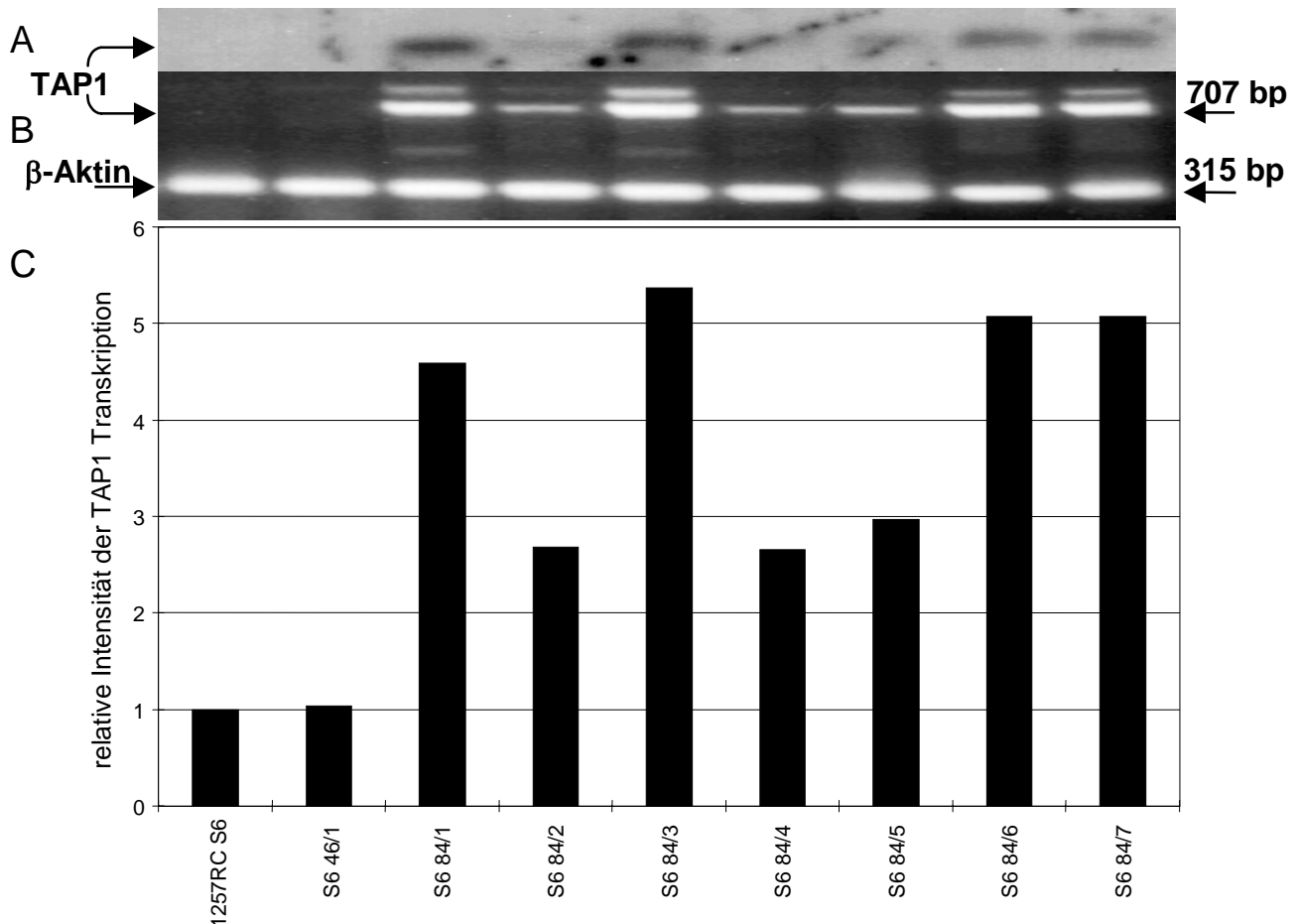


Abb. 4.8: Nachweis des transgenen TAP1 und seine Quantifizierung in einer Ein-Schritt-PCR. Die PCR-Produkte von Transfektanten und Ausgangszellen wurden durch eine Gelelektrophorese dargestellt (B). Die Spezifität der TAP1-Amplifikate wurde in einem Southern-Blot verifiziert (A). Zum Zwecke der Quantifizierung wurde die Intensität der TAP1- und der  $\beta$ -Aktin-Banden densitometrisch erfasst, normalisiert und die Intensität der TAP1-Transgen-Bande zum Hintergrund (in diesem Fall MZ1257RC S6) in Relation gesetzt (C).

Wie Abbildung 4.8 zeigt, wurde ein heterogenes Expressionsmuster des TAP1-Transgens in den einzelnen Klonen nachgewiesen. In den parentalen und mock-transfizierten Kontrollzellen war, wie erwartet, kein Signal nachzuweisen. Um eine Quantifizierung der Signale zu erreichen, wurden Transgen- und  $\beta$ -Aktin-Banden densitometrisch erfasst, die Werte für TAP1 gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert und zum Hintergrund der Kontrolle mit parentalen Zellen in Relation gesetzt. Die Klone können in zwei Gruppen unterteilt werden: Klone mit niedriger TAP1-Transgen-Transkriptionsrate, zu denen die drei Klone S6 84/2, 84/4 und 84/5 zählen und Klone mit höherer TAP1-Transkriptionsrate wie S6 84/1, 84/3, 84/6 und 84/7.

Dies heterogene Transkriptionsmuster bestätigte sich in einer Northern Blot Untersuchung, die zusätzlich zu der RT-PCR Analyse durchgeführt wurde. Der Filter wurde konsekutiv mit radioaktiv markierten TAP1- und  $\beta$ -Aktin-spezifischen Sonden hybridisiert. Mit Hilfe dieser Methode kann auch exogenes von endogenem TAP1-Plasmidtranskript aufgrund der Größe unterschieden werden. Die transgene TAP1-mRNS besitzt wegen der Koppelung des neo<sup>R</sup> Gens über die IRES-Sequenz eine größere Länge als das endogene TAP1.

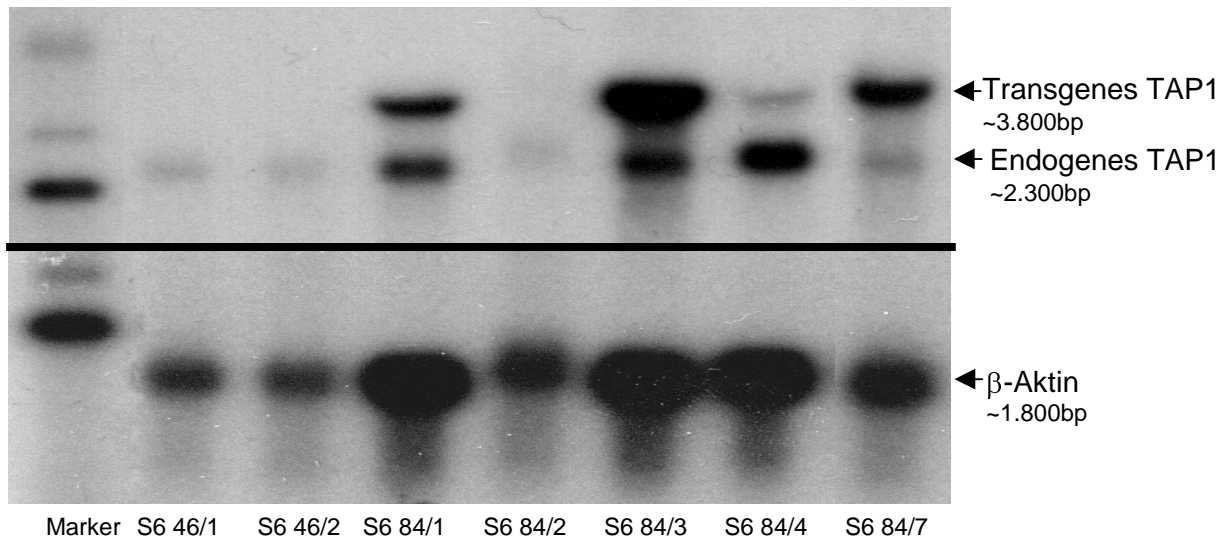


Abb. 4.9: Differentielle Expression von endogener und transgener TAP1-mRNS ausgewählter TAP1-Transfektanden im Northern-Blot.

In eine Northern-Blot Analyse wurde zur Bestimmung der TAP1-Transgen und endogenen TAP1-mRNS-Transkription RNS von mock- und TAP1-Transfektanden eingesetzt. Eine simultane Detektion der Transkripte ist durch unterschiedliche Transkriptlängen möglich. Die Bestimmung der Transkription des „housekeeping“-Gen  $\beta$ -Aktin dient der Kontrolle der RNS-Integrität und dem Vergleich der eingesetzten RNS-Mengen.

Wie an der Stärke der  $\beta$ -Aktin-Signale abzulesen ist, sind zum Teil ungleiche RNS-Mengen eingesetzt worden, was zu dem heterogenen Bild führt. Nach Normalisierung zum entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Signal, zeigen jedoch die Klone auch das schon in der RT-PCR beobachtete heterogene Transkriptionsmuster. Auffällig ist ein besonders starkes Transgen-Signal durch den Klon S6 84/3 sowie die relativ starke Transkription der endogenen TAP1-mRNS bei schwachem Transgen-Signal durch den Klon S6 84/4.

Klon S6 84/2 wiederum zeigt nahezu gar kein Transgensignal bei mit den Ausgangszellen vergleichbarer Transkription der endogenen TAP1-mRNS.

### 5.2.2. Heterogene TAP1-Proteinexpression in den Transfektanden

Das in der RT-PCR- und Northern-Blot-Analyse bereits beobachtete heterogene TAP1-Transkriptionsmuster der Transfektanden ging mit einem vergleichbaren TAP1-Proteinexpressionsprofil einher, was anhand eines Western-Blot dargestellt ist. Auch hier

wurde die Bandenintensität analog zur RT-PCR densitometrisch ausgewertet. Dabei korreliert der RNS-Gehalt direkt mit der Protein-Expressionsstärke. Jedoch muß dabei berücksichtigt werden, daß keine Unterscheidung zwischen endogener und exogener Expression möglich ist. So zeigt sich z.B. eine mit den Kontrollzellen vergleichbare TAP1-Expression durch den Klon S6 84/2, der auch nur eine sehr geringe Transgen-Transkriptionsrate bei normaler Rate der endogenen TAP1-Transkription aufwies. S6 84/4 weist ebenfalls eine geringe Transgen-Transkriptionsrate auf, jedoch im Northern-Blot eine gegenüber den Kontrollzellen höhere Transkriptionsrate der endogenen TAP1-mRNS, die sich auch in höherer TAP1-Proteinexpression niederschlägt.

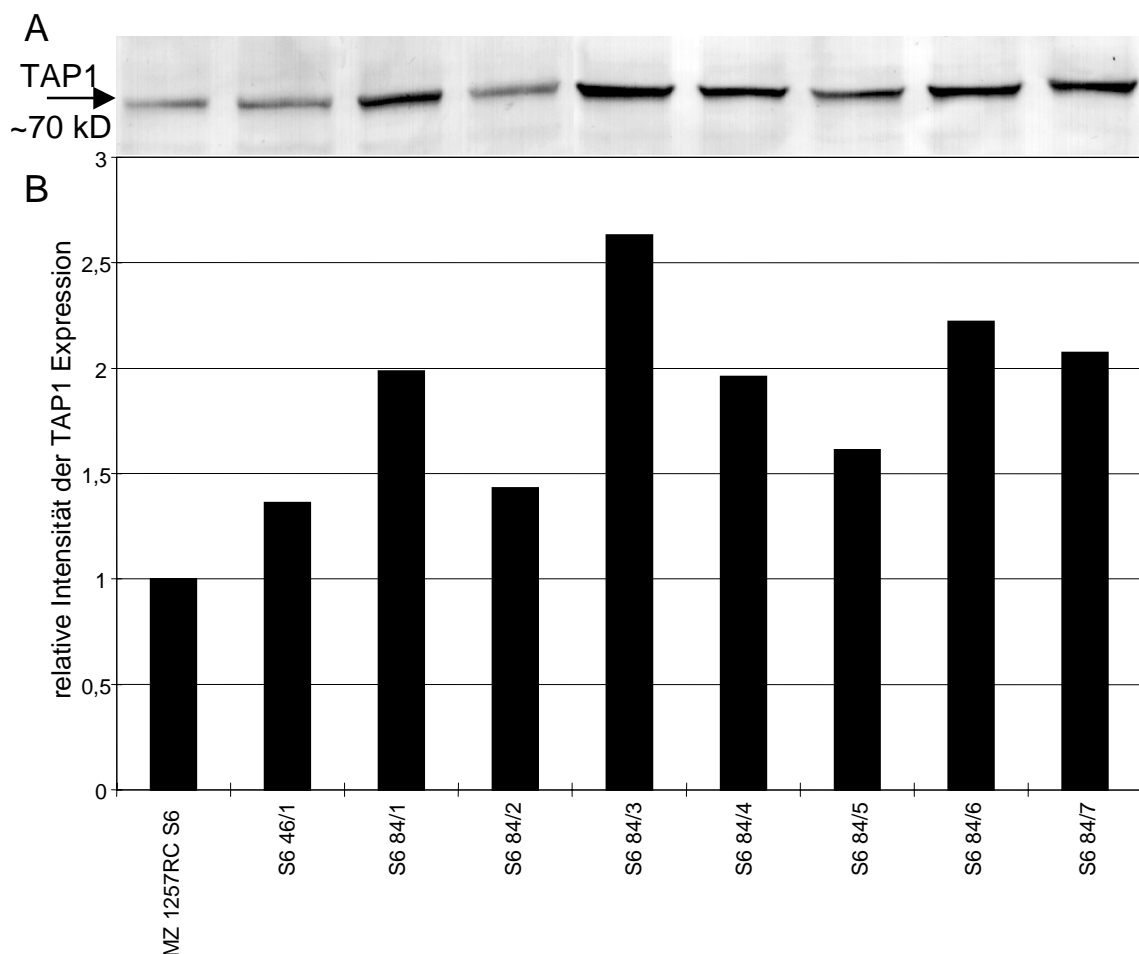


Abb. 4.10: Unterschiedliche TAP1-Proteinexpression in TAP1-Transfektanden.

Ein Western-Blot von Proteinextrakten aus Transfektanden wurde mit dem mAb 148.3  $\alpha$ -TAP1 wie in Methoden beschrieben durchgeführt (A). Zum Zwecke der Quantifizierung wurde die Intensität der TAP1-Banden densitometrisch erfasst und zur Ausgangszelllinie MZ1257RC S6 in Relation gesetzt (B). Das Expressionsmuster zeigt Ähnlichkeit mit dem Muster der mRNS-Transkriptionsrate.

Wie auch in den RNS-Analysen sind für die Klone S6 84/1, 84/6, 84/7 und besonders 84/3 in der Proteinexpression die höchsten Expressionsraten nachzuweisen. Zumindest für die TAP1-Expression durch dieses Vektorsystem muß also von einer transkriptionellen Expressionsregulation ausgegangen werden.

### 5.3. Einfluß von TAP1-Überexpression auf die Membranexpression von MHC Klasse I

#### 5.3.1. Durchflußzytometrische Quantifizierung der MHC Klasse I Dichte mit und ohne IFN- $\gamma$ Stimulation

Um die Frage zu klären, ob eine TAP1-Überexpression in den Transfektanden eine Stabilisierung und damit Erhöhung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression zur Folge hat, wurde durchflußzytometrisch die konstitutive MHC Klasse I-Expression und HLA-A2.1 Expression bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden der Antikörper w6/32, der den vollständig trimerisierten MHC Klasse I-Komplex erkennt und der Antikörper mA2.1, der für den HLA-Isotyp A2.1 spezifisch ist, eingesetzt.

Von den nach Transfektion mit den Plasmiden TAP1 neo (P21) und TAP2 neo (P23) unter Neomycin-Selektion entstandenen Klonen wies nur einer von sechs analysierten in der ersten durchflußzytometrischen Messung leicht erhöhte MHC Klasse I-Werte auf der Zelloberfläche auf (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse waren zudem in weiteren Versuchen nicht reproduzierbar und die Überprüfung der Integration des Transgens in einer genomischen PCR ergab wie beschrieben eine Segregation der TAP1- und TAP2-Gene vom neo<sup>R</sup>-Gen.

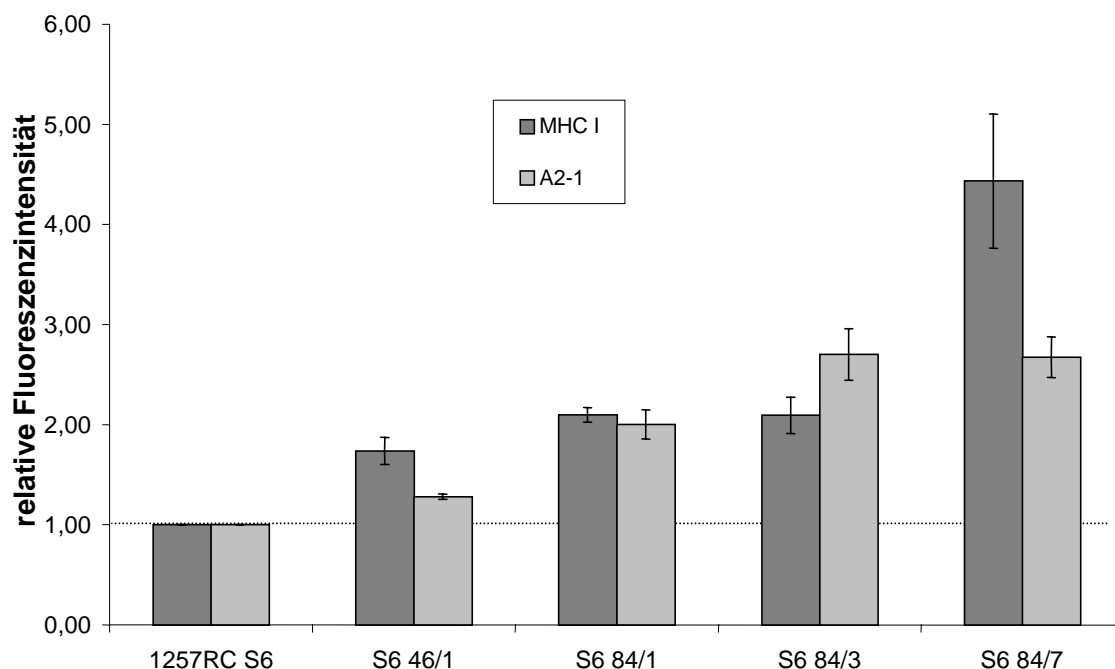


Abb. 4.11: TAP1-vermittelte Rekonstitution der MHC Klasse I-Oberflächenexpression.

Die Mittelwerte der spezifischen Fluoreszenzintensität aus 3 unabhängigen Messungen des mock-transfizierten Kontroll-Klons S6 46/1 und der Subklone S6 84/1, 84/3 und 84/7. Die Ergebnisse sind dargestellt relativ zur HLA-Oberflächen-Expression der Ausgangszelllinie MZ1257RC S6, wobei sich eine Erhöhung der Expression besonders des A2-Allels zeigt.

Nach Weiterentwicklung des Vektorsystems mit Stabilisierung der TAP1-Transgen-Expression, wurden erneut durchflußzytometrische Untersuchungen an den Transfektanden durchgeführt. Zwei von sieben getesteten P84-Klonen, S6 84/1 und 84/3, zeigten eine um das 2-3-fach konstant erhöhte MHC Klasse I-Oberflächenexpression im

Vergleich zu Ausgangszellen bzw. mock-transfizierten Transfektanten. Ein Klon, S6 84/7 wies deutlich höhere Werte bis zu einer 5-fachen Hochregulation gegenüber dem Kontrollansatz für MHC Klasse I und HLA-A2.1 auf.

Dabei wird eine allelspezifische Erhöhung der HLA-A2 Expression angenommen, die jeweils deutlich über der von Ausgangszellen bzw. mock-transfizierten Zellen lag. Die Expression anderer Allele wie A3, B7, B44 oder C war nicht erhöht (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  über 24h, die eine verstärkte Expression der meisten Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie und damit bereits eine maximale Erhöhung der MHC-Oberflächenexpression zur Folge hat, konnte kein additiver Effekt der TAP1-Überexpression festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, daß ein eventueller Synergismus zwischen TAP1-Überexpression und Zytokin-Stimulation durch die IFN- $\gamma$  Wirkung überlagert wird.

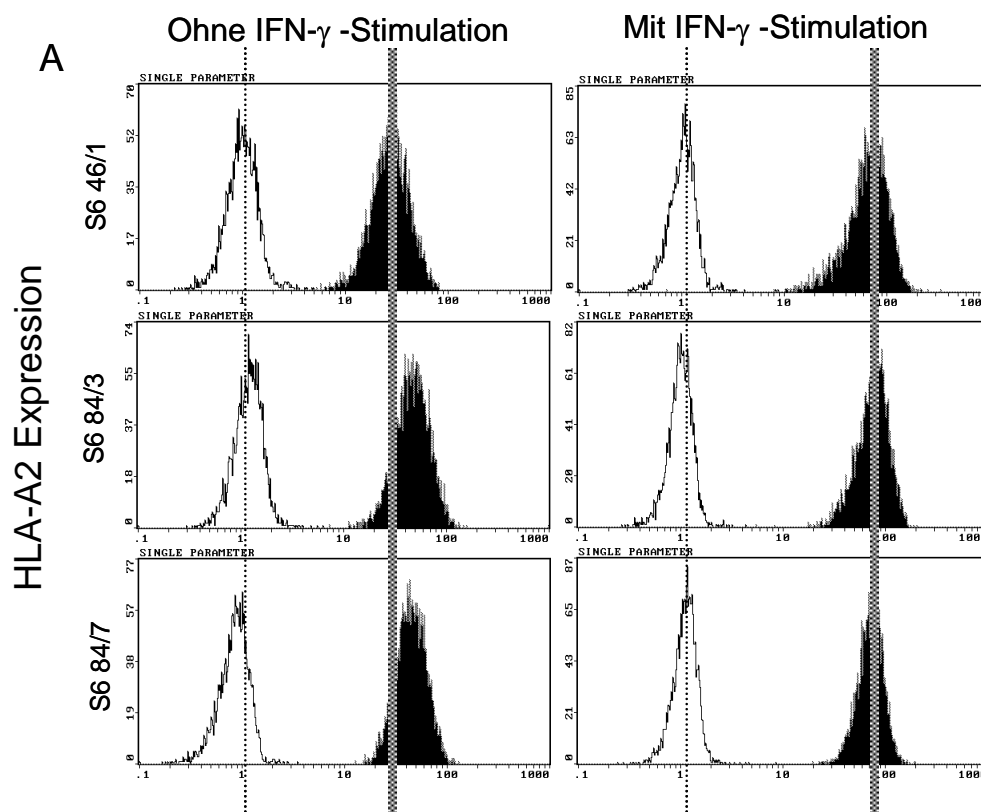


Abb. 4.12 (A): Beispiele einer durchflußzytometrischen Untersuchung der HLA-A2 Oberflächenexpression in Kontrolltransfektanten und TAP1-überexprimierenden Klonen.

Die Untersuchung erfolgt mit und ohne Stimulation durch Interferon-gamma. Ohne Stimulation ist in beiden P84-Transfektanten eine leichte, aber deutliche Erhöhung sowohl des HLA-A2 Allels als auch der Gesamt-MHC Klasse I Expression zu verzeichnen. Nach IFN- $\gamma$ -Stimulation ist ein additiver Effekt nicht mehr festzustellen.

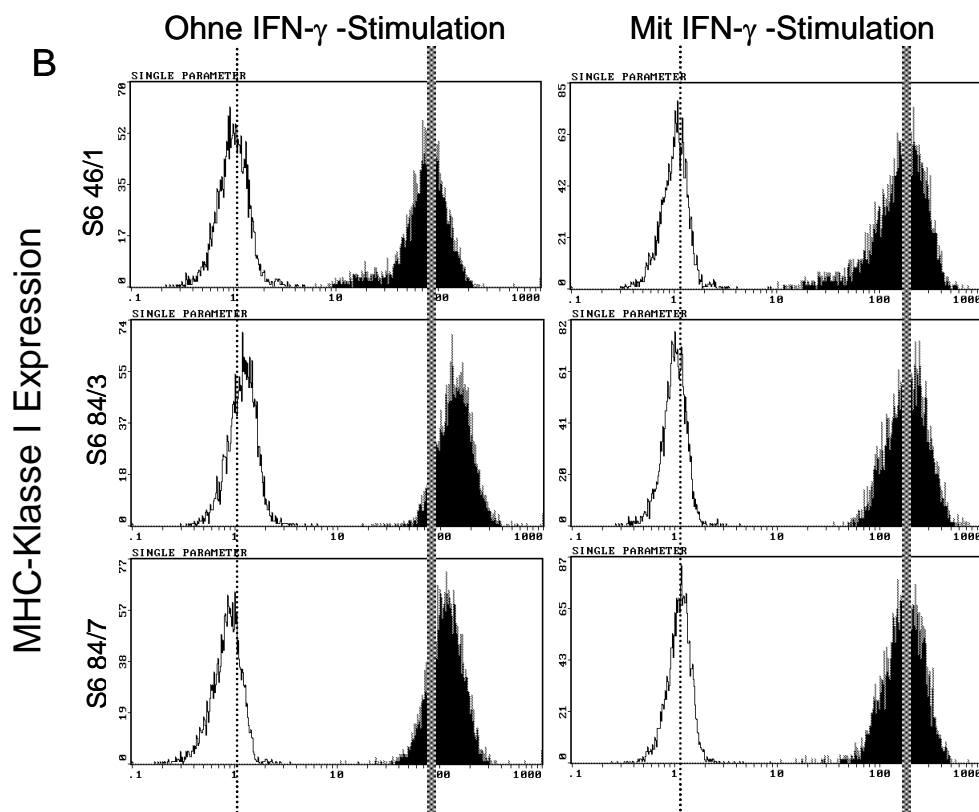


Abb. 4.12 (B): Beispiele einer durchflußzytometrischen Untersuchung der MHC Klasse I Oberflächenexpression in Kontrolltransfektanten und TAP1-überexprimierenden Klonen. Auch für die MHC Klasse I Expression ist ohne Stimulation in beiden P84-Transfektanten eine leichte, aber deutliche Erhöhung der mittleren spezifischen Fluoreszenzintensität zu verzeichnen.

### 5.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von TAP1 und MHC Klasse I-Antigenen

Zusätzlich zu quantitativen durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen lebender Zellen durchgeführt, wodurch eine Visualisierung der TAP1- und MHC-Moleküle in den Zellen und auf der Zelloberfläche möglich ist.

Eine Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität ist mit dieser Untersuchungs-Technik nur bei extremen Unterschieden möglich. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Darstellung der Lokalisation der Moleküle.

Es zeigt sich sowohl in den Kontrollzellen als auch in den TAP1-Transfektanten eine TAP1-Proteinexpression der TAP1-Moleküle am endoplasmatischen Retikulum, das sich als feines Netzwerk vom Nukleus in die Peripherie erstreckt. Eine leichte, wenn auch nicht quantifizierbare Erhöhung der Fluoreszenzintensität ist bei den TAP1-Transfektanten festzustellen.

Ebenso ist eine Oberflächenexpression der MHC Klasse I Moleküle bei beiden Klonen nachzuweisen. Ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität ist in diesem Fall allerdings nur marginal. Zu jeder Fluoreszenz-Abbildung ist die zugehörige Aufnahme im Phasenkontrast abgebildet, damit eine Zuordnung der Zellstrukturen möglich ist.



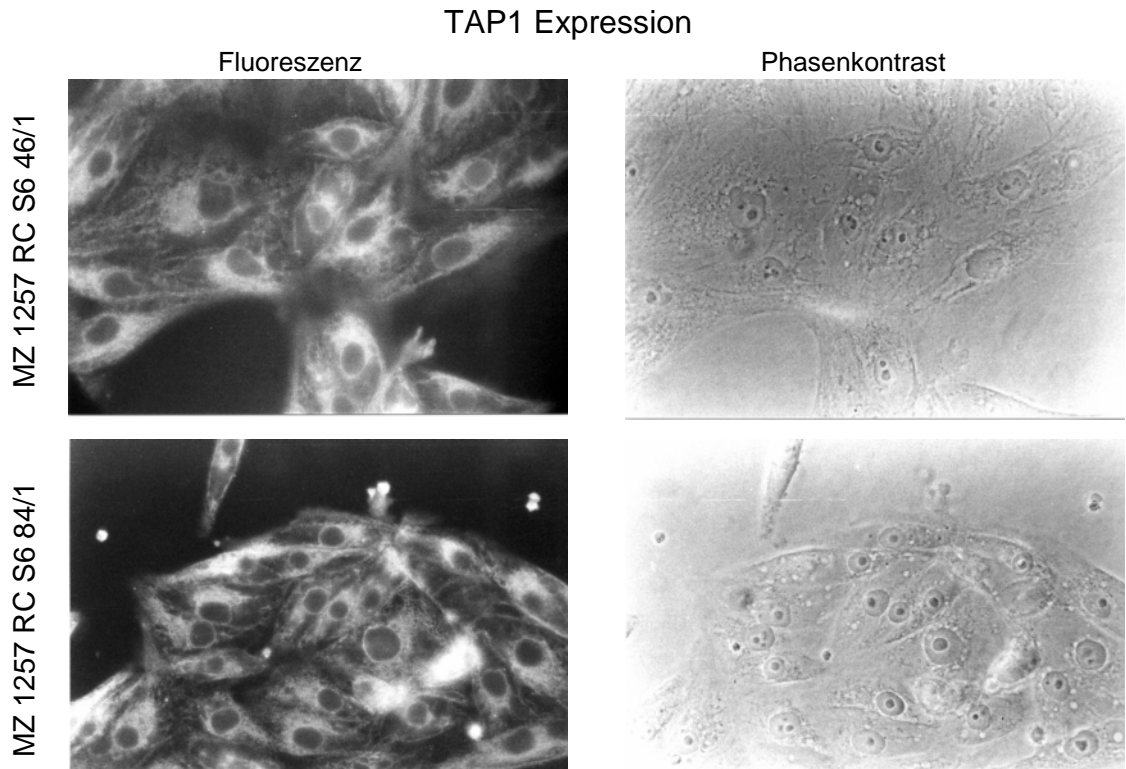


Abb. 4.13 (A): Darstellung der TAP1-Expression in einem Kontroll- und einem ausgewählten TAP1-Transfektand durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Analog zu jedem Ausschnitt unter Immun-Fluoreszenz wurde derselbe auch im Phasenkontrast abgebildet. Alle Aufnahmen wurden mit 85-facher Vergrößerung durchgeführt.

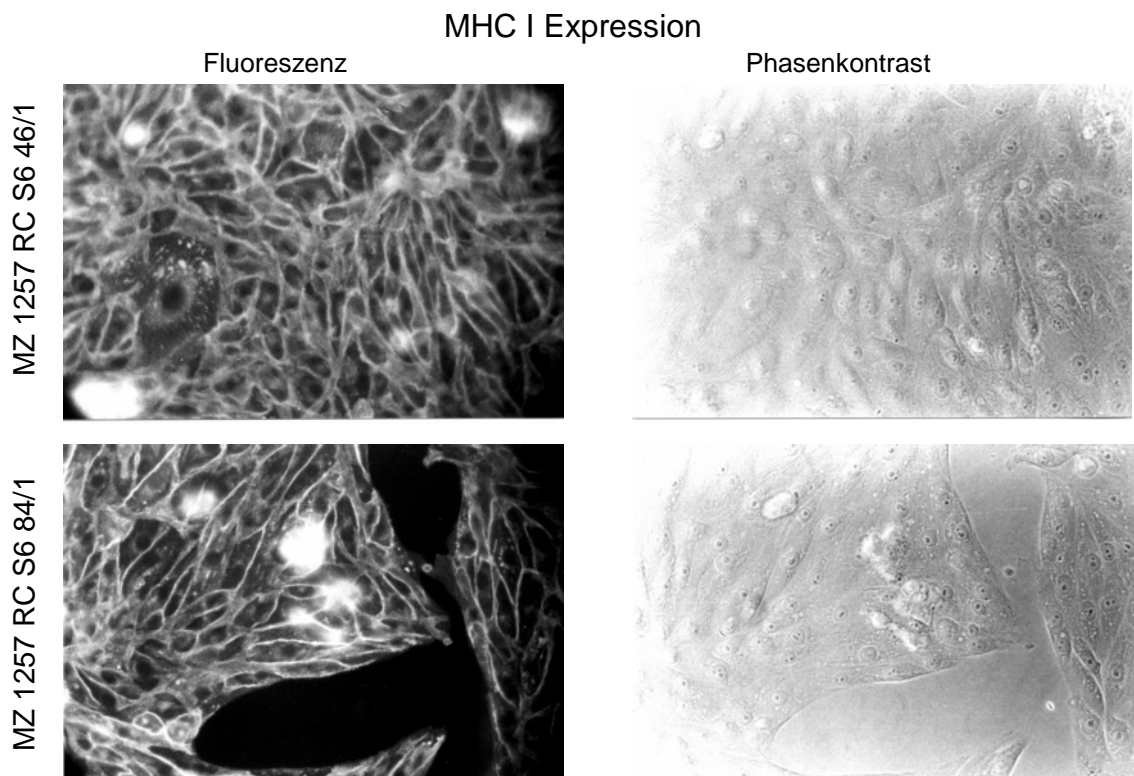


Abb. 4.13 (B): Darstellung der MHC Klasse I-Expression in einem Kontroll- und einem ausgewählten TAP1-Transfektand durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

### 5.3.3. Quantifizierung der Peptid-Translokation

Neben der TAP1-Expression wurden auch funktionelle Analysen zur Veränderung der Peptidtransport-Kapazität durchgeführt. Diese Versuche wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Momburg in Heidelberg als Peptidtransport-Assays an repräsentativen Transfektanten durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob es durch die TAP1-Überexpression zu quantitativen Unterschieden zwischen Transfektanten und Kontrollzellen in der Peptid-Translokation über die ER-Membran kommt.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Modell-Peptide mit Glykosylierungs-Sequenz in die Experimente mit Ausgangszellen, Kontroll-Transfektanten und den TAP1-Transfektanten S6 84/1, 83/3 und 84/7 eingesetzt. Die Daten von zwei Untersuchungen sind exemplarisch dargestellt.

Ein Charakteristikum von TAP-vermitteltem Peptidtransport ist die ATP-Abhängigkeit. Um Transportmechanismen ohne ATP-Verbrauch, also nicht klassischen TAP-Transport, abzugrenzen, wurden Ansätze mit und ohne ATP-Zugabe vorbereitet.

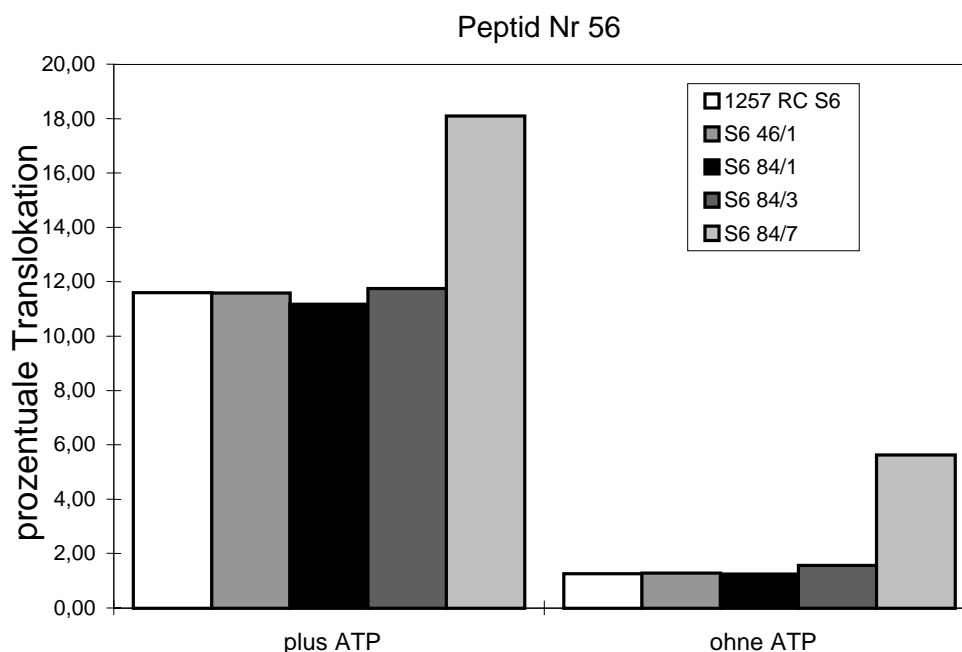


Abb. 4.14 (A): Peptid-Translokationsrate für das Peptid Nr. 56 (RYWANATRSR) mit ausgewählten Klonen und der parental Zelle.

Die Experimente wurden in An- und Abwesenheit von ATP durchgeführt. Die bei Klon S6 84/7 festzustellende hohe Translokationsrate auch ohne ATP-Zugabe ließ sich in Kontrollversuchen nicht bestätigen.

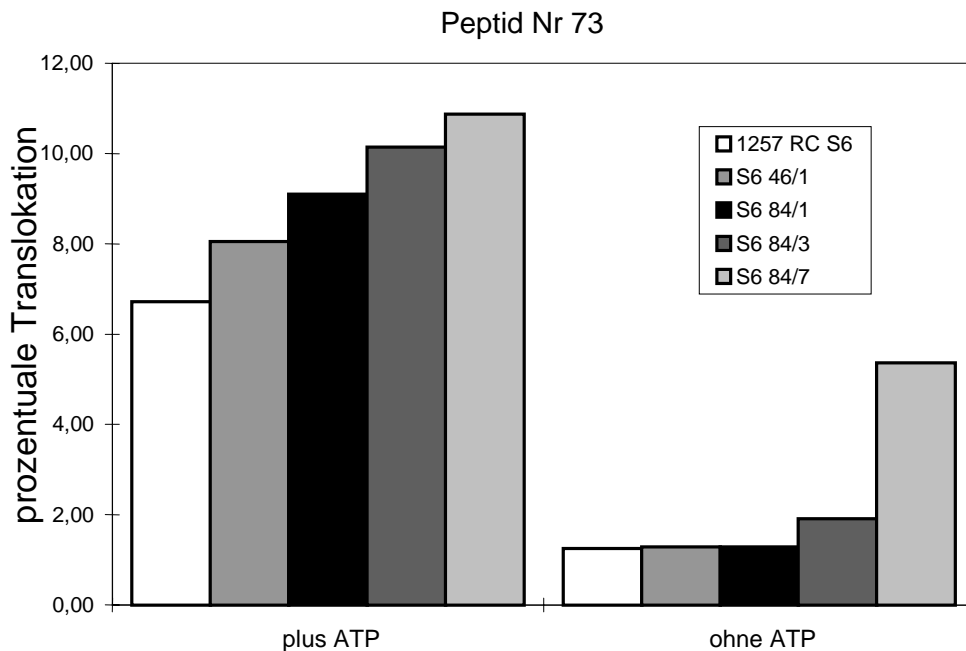


Abb. 4.14 (B): Peptid-Translokationsrate für das Peptid Nr. 73 (RYWANATRSV).

Bei insgesamt ausgesprochen hohen Transportraten zeigen sich unter den Transfektanten für die benutzten Peptide im Vergleich zu den Ausgangszellen eine leichte Erhöhung in der Transportkapazität, in diesem Versuch auch eine deutliche Erhöhung der Translokation bei Klon S6 84/7. Diese starke Erhöhung, insbesondere im ATP-freien Ansatz, ließ sich in einem Kontrollversuch nicht bestätigen (Momburg, pers. Mitteilung).

## 5.4. Analyse der T-Zell-vermittelten Immunantwort

### 5.4.1. Zytotoxizitäts-Analysen

<sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuche wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Knuth in Frankfurt/M. durchgeführt, um die Frage zu klären, ob durch TAP1-Überexpression und konsekutiv erhöhte Allel-spezifische MHC Klasse I Expression auch eine verbesserte Erkennung und Lyse durch eine autologe tumorzellspezifische T-Zelllinie erreicht werden kann. In den Versuchen zeigte sich allerdings keine verbesserte Lyse der TAP1-Transfektanten gegenüber den Ausgangszellen bzw. mock-transfizierten Klone. Es war vielmehr sogar noch eine verminderte Lyse sowohl der mock- als auch TAP1-transfizierten Zellen zu erkennen. Jedoch wurde die vor dem Versuch notwendige Stimulation der Lymphozyten mit der in Frankfurt kultivierten Ausgangszelllinie MZ1257RC und nicht mit dem Subklon S6 durchgeführt. Die Versuche wurden mit verschiedenen Effektor zu Zielzell-Verhältnis (E:T-Ratio) zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

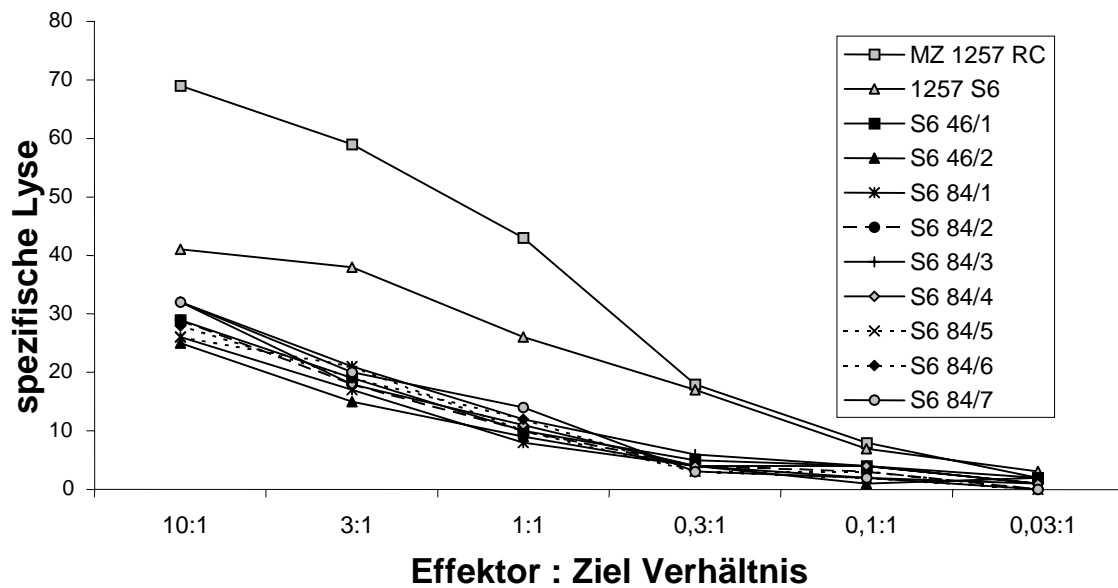


Abb. 4.15: <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assay zur Ermittlung der lytischen Aktivität einer autologen T-Zelllinie gegen Transfektanden und Ausgangszellen.

Bei allen Transfektanden zeigen sich eher verminderte Lyse-Raten. Repräsentative Darstellung einer Messung.

#### 5.4.2. Aktivierung autologer zytotoxischer T-Lymphozyten durch die Transfektanden

Ein Maß für die Aktivierung von T-Zellen durch die TAP-Transfektanden ist die Sekretion von Zytokinen, unter anderem IFN- $\gamma$ , GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor) und TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ )

Deshalb wurden die Überstände aus den Zytotoxizitäts-Versuchen gesammelt und die Konzentrationen der Zytokine GM-CSF und TNF- $\alpha$  über einen ELISA bestimmt, um damit eine T-Zell-Stimulation evaluieren zu können.

Während die Lyseraten der Transfektanden eher niedrig waren, wurde in den Reaktionsansätzen der Transfektanden S6 84/3 bis S6 84/7 gegenüber den mock-transfizierten Zellen ein deutlicher Anstieg der TNF- $\alpha$  Sekretion nachgewiesen. Dieses Zytokin wird von neutrophilen Granulozyten, Lymphokin-aktivierten-Killerzellen, NK-Zellen, Astrozyten, Endothel-Zellen, glatten Muskelzellen, einigen transformierten Zellen und aber auch aktivierten B- oder T-Lymphozyten sezerniert (Ruddle, 1992).

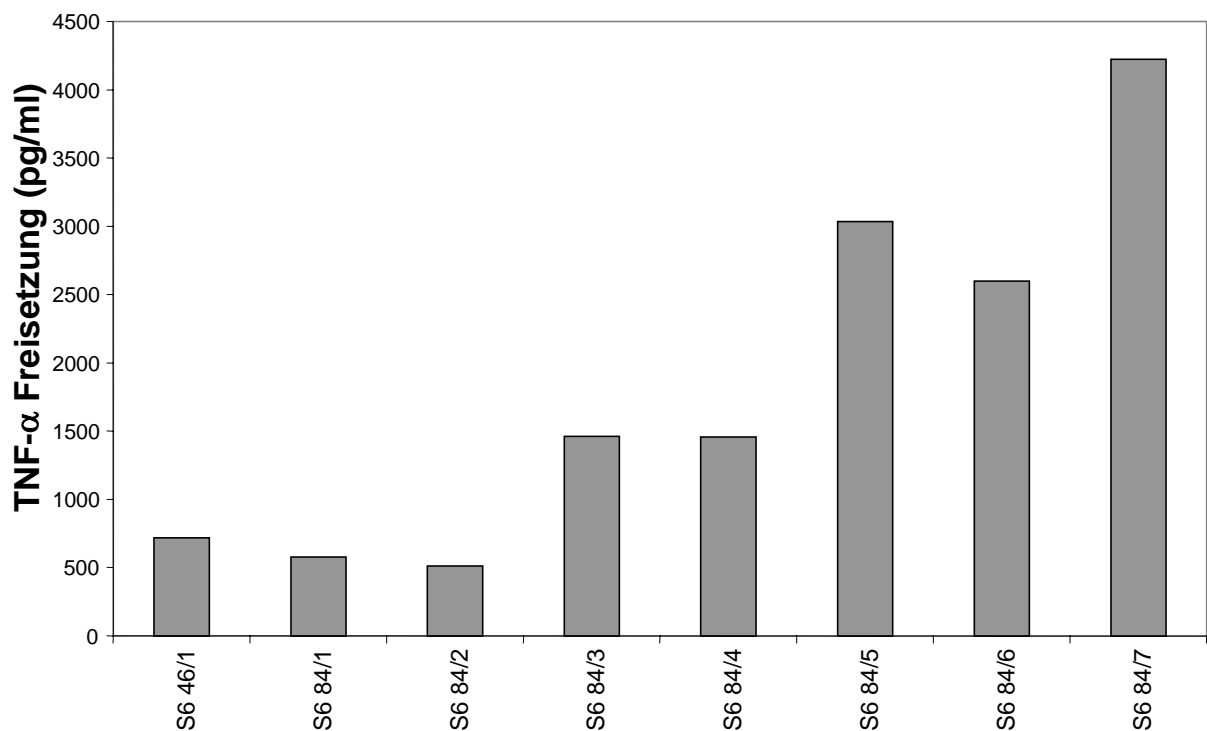


Abb. 4.16: Unterschiedliche TNF- $\alpha$  Freisetzung in verschiedenen Zytotoxizitäts-Ansätzen. Zur Konzentrationsbestimmung des Zytokins TNF- $\alpha$  in den Überständen aus einem  $^{51}\text{Cr}$ -Zytotoxizitäts-Assay wurde ein ELISA eingesetzt. Dabei wurde ein erhöhter Zytokin-Spiegel in einigen TAP1-Transfektanden gegenüber den mock-transfizierten Zellen als Zeichen einer vermehrten T-Zell-Aktivierung nachgewiesen.

In den Zellkultur-Überständen der Zytotoxizitäts-Analysen ausgewählter Klone zeigte sich eine bis zu 8-fache Induktion der TNF- $\alpha$  Sekretion. Dies weist daraufhin, daß die TAP1-Transfektanden zwar nicht besser durch die autologe T-Zelllinie lysiert wurden, aber diese T-Zellen stärker aktivierten. Die Resultate für GM-CSF zeigten keine Unterschiede zwischen TAP1- und mock-Transfektanden (Daten nicht gezeigt).

### 5.5. Induktion der Proliferation allogener Lymphozyten in der MLTC

Zur weiteren Klärung einer verbesserten T-Zell-Aktivierung durch die TAP1-Transfektanden wurde ein T-Zellproliferations-Experiment mit allogenen Lymphozyten durchgeführt.

Dazu wurde in einer mixed-lymphocyte-tissue-culture (MLTC) der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau in proliferierende Lymphozyten nach 5 Tagen gemessen. Die Menge des inkorporierten Thymidin gilt als Maß für die Aktivierung dieser Lymphozyten durch die kokultivierten Tumorzellen. Die Ergebnisse aus zwei Versuchen mit je 3 Ansätzen pro Zelllinie wurden zusammengefaßt und in Relation zur Ausgangszelllinie gesetzt. Wie auch schon die Zytokinsekretion in der Zytotoxizitätsanalyse zeigte, beeinflussten verschiedene Transfektanden die T-Zellproliferation unterschiedlich. So wurden in den Ansätzen mit S6 84/3 und S6 84/7 deutlich erhöhte Proliferationsraten von einer bis zu 5-fachen Steigerung gefunden. Die mittleren Absolutwerte variierten für die verschiedenen

Experimentalansätze ohne T-Zellen zwischen 40 und 85 cpm, für Ansätze mit T-Zellen zwischen 250 und 1260 cpm, für die Ansätze unter Zusatz von  $\alpha$ -CD28 zwischen 85 und 415 cpm und für die Ansätze unter Zugabe von IL2 zwischen 3.000 und 17.000 cpm.

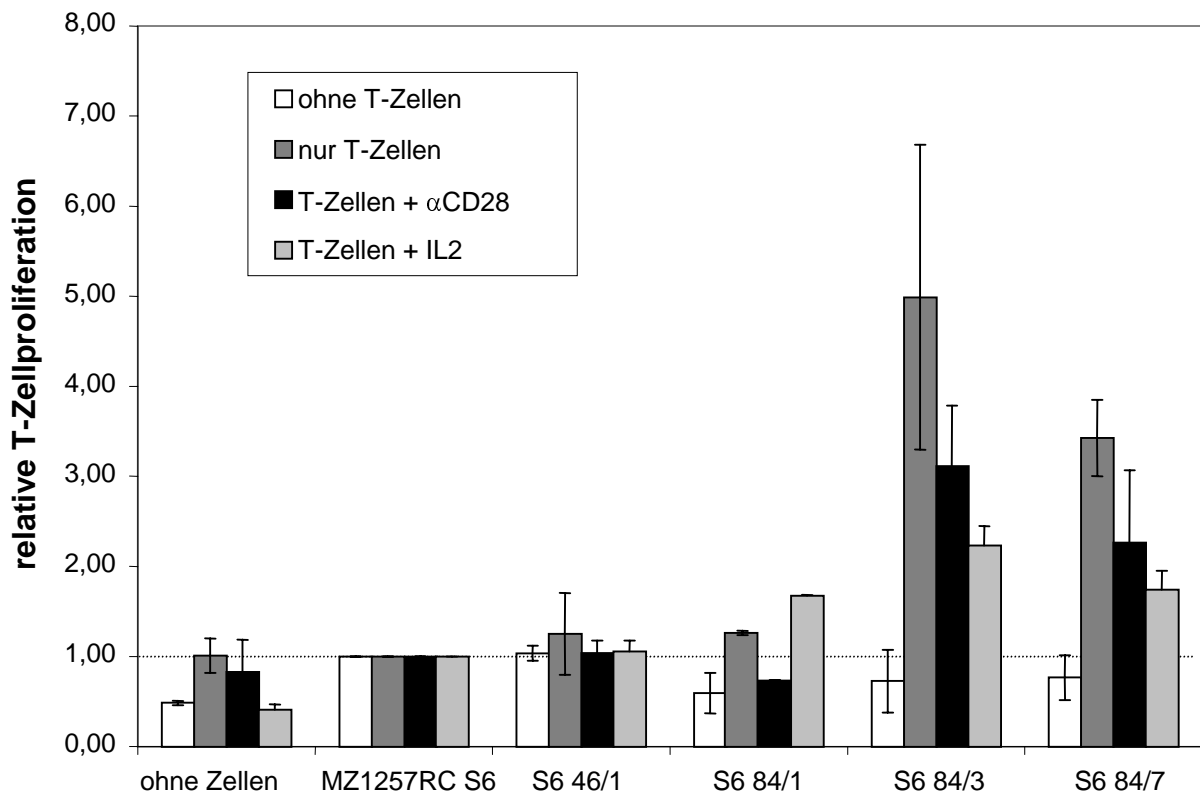


Abb. 4.17: Heterogene Induktion der T-Zellproliferation durch unterschiedliche Tumorzellen. Es wurde eine MLTC mit allogenen T-Zellen und unterschiedlichen Tumorzellen (-TAP, +TAP, mock) durchgeführt. Die Ergebnisse aus drei Versuchen mit je drei Parallelansätzen wurden gemittelt und zusammengefasst. Die Resultate sind relativ zu den Werten für die T-Zellproliferation nach Stimulation mit der parentalen Zelllinie MZ1257RC S6 dargestellt. Besonders durch die hier untersuchten Transfektanden S6 84/3 und S6 84/7 konnte eine deutliche Steigerung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen gezeigt werden.

Die Induktion der T-Zellproliferation erscheint spezifisch für eine TAP1-Überexpression durch die Transfektanden, da für die parentale Zelllinie und einen mock-Transfektanden vergleichbar niedrige Werte erzielt wurden. Die Werte für den TAP1-Transfektand MZ1257RCS6 P84/1 überraschen durch eine im Vergleich zu den Transfektanden S6 P84/3 und S6 P84/7 schwache Proliferationsinduktion, die nicht direkt mit anderen erzielten Ergebnissen bis auf die Zytokin-Freisetzung korreliert werden kann.

## 6. Diskussion

### 6.1. Das Problem des „immune escape“

Die Entwicklung einer spezifischen tumorgerichteten Immunreaktion, die eine Tumoreradikation zur Folge hat, ist das Ziel der Immuntherapie maligner Erkrankungen. Dabei gilt es, die im Tumorpatienten vorliegende, relative Immuntoleranz gegen die Erkrankung zu durchbrechen. Eine solche Immuntoleranz in einem immunkompetenten Wirt lässt sich durch einen Selektionsdruck auf die sich häufig teilenden Tumorzellen erklären. T-Zellen sind in der Lage, über den TZR Tumorantigene auf Zellen mit normaler Antigenprozessierung, die über den Klasse I Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC Klasse I) präsentiert werden, zu erkennen. NK-Zellen wiederum greifen Zellen an, die keine oder nur sehr wenige MHC Klasse I-Komplexe auf ihrer Oberfläche aufweisen. Tumorzellen können also der Immunüberwachung entgehen, indem sie eine reduzierte MHC Klasse I-Antigenpräsentation erlauben und damit eine Balance erreicht wird, in der weder T-Zellen noch NK-Zellen durch die Tumorzelle aktiviert werden (Johnsen *et al.*, 1998). Eine unzureichende Präsentation von Antigenen auf MHC Klasse I-Komplexen ist deshalb neben anderen sogenannten „immune escape“ Mechanismen, wie der Sekretion von Zytokinen, der fehlenden Kostimulation, einer defizienten MHC Klasse II Expression, der Expression von atypischen HLA-Molekülen, wie dem HLA-G oder der Expression des Fas-Liganden ein bei Tumorzellen häufig beobachtetes Phänomen (Garrido *et al.*, 1995). Ursachen, die für eine Kompromittierung der MHC Klasse I-Antigenpräsentation verantwortlich sind, konnten bisher auf allen Ebenen der Antigenprozessierung identifiziert werden. Dazu zählen Defizienzen in der Generierung antigenener Peptide aus dem Protein-Pool des Zytosols und in dem Transport dieser Peptide über die ER-Membran oder Anomalien im Zusammenbau und dem Transport der trimeren MHC Klasse I-/Peptid-Komplexe zur Zellmembran. In der Tat konnte für nahezu jede Teilkomponente der APM in präsentationsdefizienten Zellen auch ein entsprechender Defekt, der entweder auf struktureller Alteration oder Dysregulation beruht, gezeigt werden (Ehrlich, 1997).

Für eine effiziente Immunantwort zytotoxischer T-Zellen ist die endogene Prozessierung antigenener Proteine mit Bereitstellung entsprechender Peptide und die Präsentation dieser Peptide durch den MHC Klasse I auf der Zelloberfläche notwendig. Die „immune escape“ Mechanismen, durch die sich unter anderem eine solche Toleranz etablieren kann, sind deshalb hauptsächliche Ansatzpunkte für die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten.

### 6.2. Veränderung der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie zur Aufhebung von „immune escape Mechanismen“

Um das Verständnis der „immune escape“ Mechanismen von Tumorzellen zu vertiefen und mögliche Ausgangspunkte für eine rationale Immuntherapie zu entwickeln, verspricht die Aufhebung einzelner Defekte in nicht immunogenen Zellen ein sinnvoller Ansatz zu sein.

Der Peptidtransporter TAP spielt eine entscheidende Rolle bei der Antigenprozessierung und in vielen Tumoren und Tumorzelllinien mit Präsentationsdefekten kann auch eine gestörte oder fehlende TAP-Expression gefunden werden (Restifo *et al.*, 1993; Seliger *et al.*, 1997a). Nachdem eine Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression nach TAP-Gentransfer bereits in verschiedenen experimentellen Systemen (Wang *et al.*, 1995; Attaya *et al.*, 1992) und in unterschiedlichen Tumorentitäten (Singal *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998) gelungen war, sollte in dieser Arbeit die Auswirkung einer TAP1-Überexpression nach stabiler Transfektion auf die antigenen Eigenschaften einer Nierenzellkarzinomzelllinie untersucht werden. Die vorbeschriebenen Erkenntnisse sollten somit auf Nierenzellkarzinomzellen erweitert werden. Dabei sollten Aussagen über eine Veränderung der Immunogenität durch den Gentransfer gemacht werden. Da sich Nierenzellkarzinomzellen bisher einem stabilen retroviralen Gentransfer schwer zugänglich zeigten, sollte die Methode des stabilen Gentransfers in diese Tumorzellentität durch den Einsatz verschiedener Technologien verbessert werden. Dies nicht zuletzt aufgrund der Überlegung, solche gentechnisch modifizierte Tumorzellen evtl. zu einem späteren Zeitpunkt therapeutisch einzusetzen und dabei die Verwendung retroviraler DNS-Elemente zu umgehen.

### 6.2.1. Die Etablierung des stabilen TAP1 Gentransfers

Für die Versuche wurde die Zelllinie MZ1257RC gewählt, die sich durch eine reduzierte TAP-Expression und dabei auch durch eine reduzierte, aber noch vorhandene MHC Klasse I-Oberflächenexpression auszeichnete. Zudem wurde bei der Auswahl der besondere Umstand berücksichtigt, daß die Patientin, aus deren Nierenzellkarzinom die Zelllinie etabliert werden konnte, trotz Metastasierung nach Tumoresektion und anschließender Chemo-Immunotherapie als geheilt betrachtet werden kann und bereit ist, periphere-Blut-Lymphozyten zu spenden. Zudem konnte die Tumorzell-reaktive, stabile T-Zelllinie IVSB von dieser Patientin etabliert werden (Bernhard *et al.*, 1994), deren Klone ein hohes zytotoxisches Potential gegenüber der Zelllinie MZ1257RC zeigten. Diese Voraussetzungen erlauben subtile T-Zell-Untersuchungen in einem autologen System.

Die Nierenzellkarzinom-Zelllinien MZ1851RC und MZ1851LN, die ebenfalls anfangs in Transfektionsexperimenten eingesetzt worden waren, aber eine zu geringe Transfektionsrate aufwiesen, wurden für weiterführende Untersuchungen nicht verwendet. Diese Zelllinien waren aus einem Primärtumor und einer korrespondierenden Lymphknotenmetastase desselben Tumors, deren Antigenpräsentation noch weit stärker reduziert war, als die des Ausgangstumors, etabliert worden (Seliger *et al.*, 1996b). Im Gegensatz zu retroviralen Transfektionsversuchen, die ohne Erfolg verliefen, resultierten allerdings Transfektionen mittels Elektroporation über einen Rechteck-Impuls-Generator zumindest in einigen Transfektanden.

Die Zelllinie MZ1257RC eignete sich im Vergleich besonders gut für Transfektionsexperimente, da sie unter den etablierten Nierenzellkarzinomzelllinien eine verhältnismäßig hohe Transfektionsrate besaß und außerdem eine hohe Teilungsfrequenz



aufwies. Nach den ersten stabilen Transfektionen wurde lediglich nach Vereinzelung der Klone eine gewisse Heterogenität in der Zelllinie offenbar, die vergleichende Untersuchungen erschwerte. Daher wurde diese Zelllinie vor weiteren Transfektionen subkloniert, um eine Vergleichbarkeit der Ausgangszellen und der TAP-transfizierten Klone untereinander gewährleisten zu können. Der aus dieser Subklonierung unter anderen resultierende Klon MZ1257RC S6 wurde im weiteren Verlauf aufgrund einer in der Durchflußzytometrie ermittelten, etwas schwächeren MHC Klasse I-Oberflächenexpression gegenüber anderen Subklonen weiter verwendet.

Zur stabilen Transfektion durch Elektroporation wurden zunächst linearisierte Plasmidvektoren verwendet, die neben einem CMV-Promoter-kontrolliertem Transgen auch ein zusätzliches SV40-Promoter-reguliertes Resistenzgen trugen, mit dessen Hilfe transfizierte Zellen von nicht transfizierten selektiert werden konnten. Bei der Verwendung herkömmlicher kommerzieller Vektoren, in die das TAP-Transgen transfiziert worden war, ergaben sich Probleme mit der Stabilität der Konstrukte. Unter Selektion mit dem Antibiotikum Neomycin war lediglich noch das Resistenzgen, nicht mehr jedoch das TAP-Transgen nachweisbar. Das heißt, es kam zu einer Segregation von TAP1 und dem Selektionsmarker. In Zusammenhang mit Vektoren mit dem starken CMV-Promoter wurde auch in der Literatur über instabile Expression berichtet. (McLachlin *et al.*, 1993; Najjar & Lewis, 1999) Eine Instabilität dieser Konstrukte war auch ohne Selektionsdruck in transienten Kurzzeittransfektionen nachweisbar, so daß die Vektorkonstruktion verändert wurde: Zwischen Transgen und Resistenzgen wurde eine IRES-Sequenz eingefügt, die die Transkription beider Gene in einer bicistronischen mRNA ermöglicht. Das Resistenzgen kann somit nur abgelesen werden, wenn zuvor auch das Transgen kopiert wurde. Eine Stabilität konnte mit diesem Konstrukt, dem Plasmid P84, in jedem unter Selektion etablierten Zellklon dauerhaft mittels PCR nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde auch ein spezifisches Proteinprodukt in einer *in vitro* Translation generiert.

In den verschiedenen Transfektanden wurden sowohl TAP1-mRNA als auch –Protein heterogen exprimiert. Dafür verantwortlich könnten multiple Vektorinsertionen bei einzelnen Klonen oder die Insertion der Vektor-DNS im Bereich von Enhancer-Strukturen bzw. in stillen Bereichen der Wirts-DNS sein. Eine Integration in die zelluläre DNS erfolgte mit den verwendeten Vektoren ungerichtet, d.h. nicht durch homologe Rekombination, sondern randomisiert, d.h. an zufälligen Stellen des Genoms. Typischerweise integrieren sich DNS-Plasmide im Bereich von natürlich auftretenden Doppelstrang-Brüchen. Eventuell dabei entstehende Nukleotid-Lücken werden durch Reparaturenzyme aufgefüllt (Murnane *et al.*, 1990). Bei zufälliger aber auch bei gerichteter Integration können mehrfache Vektorinsertionen beobachtet werden (Ng und Baker, 1999). Inwiefern es dadurch zu Unterschieden in der Expression kommt, wurde bisher in keinem vergleichbaren System untersucht.

### 6.3. Auswirkungen einer TAP1-Überexpression auf die MHC Klasse I Oberflächenexpression und Immunogenität der Nierenzellkarzinomzellen

In Abhängigkeit von der TAP1-Expressionsstärke fand sich eine Korrelation der MHC Klasse I-Antigen Expressionsstärke in der Durchflußzytometrie. Fünf der sieben TAP1-Transfektanden zeigten eine erhöhte TAP1-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen. Bei drei von diesen konnte eine leicht erhöhte MHC Klasse I Oberflächenexpression mit spezifischer Erhöhung des HLA-A2-Locus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die das transgene TAP1 nur schwach exprimierenden Klone keine nennenswerte Erhöhung der MHC Klasse I Expression. Der Klon S6 84/6, der eine relativ hohe TAP1 Expression aufwies, entsprach in der MHC Klasse I Expression allerdings nicht den beiden anderen höher exprimierenden Klonen S6 84/3 und 84/7. Die Induktion der MHC Klasse I Expression ist daher nicht allein auf die TAP1-Überexpression zurückzuführen. Eine Erklärung wäre die Beteiligung anderer Faktoren bzw. einer unterschiedlichen Expression anderer Bestandteile der APM. Für die zweite TAP-Untereinheit TAP2 und den MHC Klasse I-Komplex konnte allerdings im Western-Blot nachgewiesen werden, daß die Klone vergleichbare Mengen exprimieren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung stützt weiterhin nicht die Hypothese, daß beide TAP-Untereinheiten die gleiche Wertigkeit besitzen, da ein TAP1/2 Heterodimer notwendig sei, um einen effizienten Peptid-Transport zu gewährleisten (Androlewicz *et al.*, 1993). Dies wurde bereits kürzlich auch von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung von TAP-Deletionsmutanten postuliert (Karttunen *et al.*, 2001).

Bereits die Überexpression der TAP1-Untereinheit führte zu meßbaren Unterschieden in der MHC Klasse I Oberflächenexpression. In der TAP-defizienten Zelllinie CMT.64 eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms, konnte durch TAP1-Transfektion allein bereits eine T-Zell Erkennung induziert werden (Gabathuler *et al.*, 1994). Die Autoren gehen nach ihren Untersuchungen davon aus, daß auch ein TAP1-Homodimer bereits eine Transportfunktion erfüllen kann. Diese These wurde durch Meyer und Koautoren (1994) nicht bestätigt, die TAP1 und TAP2 in Insektenzellen transfizierten und nur bei koordinierter Expression beider Untereinheiten einen Transport nachweisen konnten. Allerdings wurde für diese Versuche nur ein einziges Modellpeptid eingesetzt.

Die tatsächliche Steigerung der Transportrate der TAP1-Transfektanden gegenüber den Ausgangszellen zeigte sich nur leicht erhöht. Dies läßt vermuten, daß bereits eine geringfügige Erhöhung des Peptidtransportes zu einer wesentlichen Verbesserung der Stabilisierung des MHC Klasse I-Komplexes führt. Außerdem ist es möglich, daß sich durch Überexpression von TAP1 die Selektivität des Peptidtransportes verändert und somit verstärkt Peptide zur Präsentation gelangen, die bessere antigene Eigenschaften aufweisen. Es ist zudem möglich, daß ein besserer Transport antigener Peptide durch die, im *in vitro*-Experiment angebotenen Peptide nicht erfasst wurde. Es scheint auch nicht nur der Peptidtransport, sondern ebenso die sterische Assoziation zwischen TAP, Tapasin und den MHC Klasse I Komplexen, die die Peptidbindung erleichtert, eine Schlüsselrolle zu spielen (Ortmann *et al.*, 1994, Grandea und van Kaer, 2001). Dabei konnte gezeigt

werden, daß die Interaktion zwischen TAP1 und der schweren Kette des MHC Klasse I allelspezifisch variiert (Neisig *et al.*, 1996), was sich in der bevorzugten Erhöhung der Oberflächenexpression des HLA-A2 Allels manifestiert haben könnte.

### **6.3.1. TAP1-Überexpression kann den Effekt einer Behandlung mit IFN- $\gamma$ nicht verstärken**

IFN- $\gamma$  ist in der Lage, die Expression der meisten essentiellen Bestandteile der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) transkriptionell zu induzieren, was unter anderem am Beispiel von RCC-Zelllinien gezeigt worden ist (Seliger *et al.*, 1997b). Wie in der durchflußzytometrischen Untersuchung deutlich wurde, führte eine 24-stündige Behandlung der Nierenzellkarzinomzellen mit IFN- $\gamma$  zu einer deutlichen Erhöhung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression als Reaktion auf die weitreichende Aktivierung der APM, wobei in TAP1-Transfektanden, die unstimuliert eine leichte Erhöhung der MHC Klasse I Expression zeigten, kein additiver Effekt nachzuweisen war. Dies ist am ehesten als Zeichen einer maximalen Induktion der APM durch IFN- $\gamma$  zu werten, zu der die TAP1-Überexpression keinen synergistischen Beitrag mehr leisten konnte.

Schendel und Koautoren (2000) untersuchten die Wirksamkeit einer konstitutiven IFN- $\gamma$  Expression in einer Nierenzellkarzinomzelllinie im Rahmen der Entwicklung einer Tumorstoffimpfung und konnten eine Verbesserung der Erkennung durch tumorspezifische MHC Klasse I-restringierte zytotoxische T-Zellen zeigen. Die Erkennung durch nicht MHC-restringierte zytotoxische Zellen (NK-Zellen) war allerdings vermindert, was mit der Theorie zur NK-Zellaktivierung durch fehlende MHC Klasse I-Expression übereinstimmt.

Die koordiniert niedrige Expression der APM weist auf einen Regulationsdefekt in einem Regelkreis, der mit dem des IFN- $\gamma$  ähnlich oder mit diesem identisch ist. Die Wirkung des IFN- $\gamma$  wird durch die Bindung der Faktoren IRF-1 („interferon regulatory factor-1“) und Stat1 („signal transducer and activator of transcription 1“) an entsprechende Bereiche der DNS, meist Promoter, vermittelt. Die Nierenzellkarzinomzelllinie Caki-2 zeigte z.B. Defekte in der Phosphorylierung von Molekülen der IFN- $\gamma$ -Signalkette. Während alle notwendigen Gene für eine normale Signaltransduktion vorhanden sind, kann durch IFN- $\gamma$ -Gabe dennoch keine Verbesserung der Antigenprozessierungsmaschinerie erreicht werden. Eine Überexpression der Janus-Kinase Jak1, die durch Phosphorylierung Stat1 aktiviert, kann allerdings eine isolierte Expressionserhöhung von TAP1 und LMP2 ohne IFN- $\gamma$ -Einfluß induzieren (Dovhey *et al.*, 2000).

### **6.3.2. Die TAP1-Überexpression führt spezifisch zu einer verstärkten Immunantwort allogener und autologer T-Zellen**

T-Zell-Experimente zur Evaluierung der Immunogenität der TAP1-Transfektanden ergaben differierende Ergebnisse. So wurden wider Erwarten in T-Zell Zytotoxizitäts-Experimenten die TAP1-Transfektanden und der Subklon S6 im Vergleich zur parentalen Zelllinie MZ1257RC schwächer lysiert. Es ist jedoch bei Betrachtung dieser Experimenten zu berücksichtigen, daß die autologe (HLA-A2 restringierte) T-Zelllinie

IVSB ausschließlich mit einer nicht subklonierten heterogenen Population von MZ1257RC-Zellen und nicht mit Zellen des Subklons S6 stimuliert wurde. Die subklonierten Zellen und die daraus entstandenen Transfektanden könnten sich in ihrem Peptidmuster von der Gesamtheit der parentalen Zellen unterscheiden und die unerwarteten Unterschiede wären dadurch zu erklären.

Die nach Abschluß der Experimente entnommenen Kulturüberstände zeigten jedoch bei den stark TAP1-exprimierenden Transfektanden eine deutlich erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$  im Medium, was bei einer T-Zell-Aktivierung beobachtet werden kann. In den Zytotoxizitätsexperimenten stand also eine Aktivierung der T-Zellen gegenüber der Lyse der Zielzellen im Vordergrund. Diese Aktivierung scheint spezifisch durch die TAP1-Transfektion hervorgerufen worden zu sein, da "mock"-Transfektanden dazu nicht in der Lage waren.

Weitere Hinweise auf eine veränderte, bzw. erhöhte Immunogenität der Transfektanden ließen sich in T-Zell-Proliferationsexperimenten finden. Sowohl allogene Lymphozyten HLA-A2-positiver Spender als auch autologe Lymphozyten zeigten in Kokultur mit ausgewählten Transfektanden, wenn mit Ausgangszellen oder "mock"-Transfektanden verglichen, eine bis zu fünffache Steigerung der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation als Zeichen einer verstärkten T-Zell-Aktivierung. Die verstärkte Aktivierung erscheint auch dabei spezifisch auf die TAP1-Überexpression zurückzuführen sein, da Transfektanden mit dem TAP1-negativen Leervektor P46 gegenüber Ausgangszellen vergleichbar niedrige Werte ergaben. Auch hier konnte eine Abhängigkeit von der Stärke der Erhöhung der MHC Klasse I Oberflächenexpression innerhalb der Transfektanden nachgewiesen werden. Rivoltini und Koautoren (1995) konnten in ähnlicher Weise in einem Melanommodell die MHC Klasse I Oberflächenexpression mit der Stärke einer T-Zell-Antwort korrelieren.

#### 6.4. Ausblick

Alimonti und Koautoren (2000) konnten für die Bronchialkarzinom-Zelllinie CMT.64 nach TAP1-Transfer eine Wiederherstellung der Antigen-Presentation und der Immun-Erkennung sowie auch einen Einfluß auf die Malignität dieser Zelllinie im Tierversuch feststellen. Die Autoren entwickelten zudem ein Maus-Modell einer antineoplastischen Therapie mit einem TAP1-exprimierenden Vaccinia-Virus, das ungezielt verabreicht, zu einer Reduktion von Tumoren in diesen Tieren führte.

Eine Immun-Therapie beim Menschen ist durch die Gabe von Zytokinen, die direkte Verabreichung von Peptiden, bzw. nackter DNS von Tumor-Antigenen oder aber auch durch die Konfrontation des Patienten-eigenen Immunsystems mit einer letal bestrahlten Tumorzell-Vakzine denkbar. Da durch eine solche Vakzine die realen Verhältnisse der Mikro-Umgebung einer immunologischen Auseinandersetzung am ehesten erreicht werden können, gehen Bestrebungen dahin, diesen Weg auch in der klinischen Anwendung möglichst bald zu beschreiten.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben unter anderem am Modell des Nierenzellkarzinom bereits Versuche unternommen, Zellvakzine herzustellen und zu erproben, entweder mit

Tumorzellen oder professionellen Tumorantigen-präsentierenden Zellen (Nair *et al.*, 1997; Traversari *et al.*, 1997; Mulders *et al.*, 1999; Weidmann *et al.*, 1993 ). In vielen Fällen gelang dabei die Induktion einer Immunantwort.

Für die Herstellung einer individuellen Vakzine durch den *in vitro*-Transfer von Genen der Antigenprozessierung in Tumorzellen eines Patienten oder auch die Erstellung einer globalen Vakzine durch das Zusammenführen mehrerer solcher veränderter Zellen in ein Vakzinierungs-Panel, konnten in dieser Arbeit Erfahrungen gesammelt werden.

Der theoretische Ansatz ist dabei, da die Antigenprozessierung der primären Tumorzellen nicht durch Vakzinierung nicht beeinflusst werden kann, eine T-Zell-Anergie, die durch verminderte Präsentation eines Tumorantigens verursacht wurde, zu durchbrechen und die klonale Expansion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen zu fördern. Diese wären dann in der Lage auch Zellen des Primärtumors zu lysieren.



## 7. Zusammenfassung

Eine reduzierte Expression der Klasse I Haupthistokompatibilitäts-Komplexe (MHC Klasse I) konnte bei Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden und ist assoziiert mit der gestörten Expression oder Funktion von Komponenten der Antigenprozessierung. Eine verminderte Erkennung solcher Tumore durch zytotoxische T-Lymphozyten und ein Zusammenhang mit einem Fortschreiten der Erkrankung führte zu der Annahme, daß es sich bei diesen Störungen um „immune escape“-Mechanismen handelt.

Um die Bedeutung des heterodimeren Peptidtransporters TAP („transporter associated with antigen processing“) für die Immunogenität von Nierenzellkarzinomen zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals der stabile Gentransfer des humanen TAP1A-Gens in Nierenzellkarzinom-Zellen erfolgreich durchgeführt. Dies wurde durch die Optimierung der Transfektionsmethode und des verwendeten Plasmid-Vektors erzielt. Die Transfektionen wurden mit Hilfe der Rechteck-Impuls-Elektroporation unter spezifischen, in der Arbeit etablierten Bedingungen durchgeführt. Der CMV-regulierte TAP-Expressions-Vektor wurde dahingehend verbessert, daß durch die Einführung der IRES Sequenz eine bicistronische m-RNS transkribiert wird, die sowohl das TAP1-Transgen als auch den Neomycin-Selektionsmarker enthält.

Es konnte nach klonaler Selektion eine stabile, aber unter den sieben getesteten Klonen heterogene Transkription der transgenen TAP1-mRNS nachgewiesen werden. In der Protein-Expression zeigten 5/7 der TAP1A<sup>+</sup>-Klone eine mindestens zweifache Induktion der TAP1-Expression. In 2/7 dieser TAP1A<sup>+</sup>-Klone war die TAP1-Überexpression mit einer Erhöhung der MHC Klasse I-Expression und selektiver Induktion des HLA-A2-Moleküls in der Durchflußzytometrie verbunden.

Eine Quantifizierung des Peptidtransportes ergab je nach verwendetem Modellpeptid eine geringe oder gar keine Erhöhung der Transportrate in den TAP1-Transfektanden gegenüber Kontrollzellen. Ebenfalls konnte in Zytotoxizitäts-Analysen mit einer autologen T-Zelllinie eine Erhöhung der spezifischen Lyse nicht gezeigt werden. Jedoch wurden im Zellkultur-Überstand dieser Zytotoxizitäts-Analysen bei einigen TAP1A<sup>+</sup>-Transfektanden gegenüber TAP1A<sup>-</sup>-Kontrollzellen deutlich erhöhte Werte des Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gemessen, was als Maß einer T-Zell-Aktivierung gilt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer ebenfalls deutlich gesteigerten T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von TAP1A<sup>+</sup>-Transfektanden.

Die alleinige Überexpression von TAP1 in Nierenzellkarzinomzellen führt somit zu einer Modulation der MHC Klasse I-Expression und der T-Zell-Reaktivität. Das weist darauf hin, daß eine starke, konstitutive TAP1-Expression eine grundlegende Voraussetzung für eine effiziente Antigenprozessierung und Immunantwort darstellt und die Immuntoleranz gegenüber Nierenzellkarzinomen durch stabilen TAP1-Gentransfer beeinflussbar ist.

Eine denkbare klinische Anwendung dieser Technik ist die Herstellung einer Tumorantigen-präsentierenden Zellvakzine, die eine T-Zell-Anergie gegenüber Nierenzellkarzinomen durchbrechen könnte.





## 8. Literatur

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1994) Cellular and molecular immunology - 2nd ed. W.B. Saunders Company, USA
2. Alimonti, J., Zhang, Q.J., Gabathuler, R., Reid, G., Chen, S.S., Jefferies, W.A. (2000) TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells in vivo. *Nat-Biotechnol.* **18**: 515-20
3. Armstrong, T.D., Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S. (1998) Tumor antigen presentation: changing the rules. *Cancer-Immunol-Immunother.* **46**: 70-4
4. Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C.K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Lindahl, K.F., Bevan, M.J., Monaco, J.J. (1992) Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Nature.* **355**: 647-9
5. Bainbridge, D., Ellis, S., Le Bouteiller, P., Sargent, I. (2001) HLA-G remains a mystery. *Trends-Immunol.* **22**: 548-52
6. Beck, S., Belich, M., Gruneberg, U., Jackson, A., Kelly, A., Sanseau, P., Sanderson, F., Trowsdale, J., van-Ham, M. (1996) Organisation and functions of class II genes and molecules. *DNA-Seq.* 1996 **7**: 21-3
7. Berke, G. (1995) Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol-Today.* **16**: 343-346
8. Bernhard, H., Karbach, J., Wölfel, T., Busch, P., Störkel, S., Huber, C., Wölfel, C., Seliger, B., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Knuth, A. (1994) Cellular immune response to human renal cell carcinomas: definition of a common antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) clones. *Int-J-Cancer.* **59**: 837-842
9. Bernhard, H., Maeurer, M.J., Jäger, E., Wölfel, Schneider, J., Karbach, J., Seliger, B., Huber, C., Storkus, W.S., Lotze, M.T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Knuth, A. (1996) Recognition of human renal cell carcinoma and melanoma by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes is mediated by shared epitopes and up-regulated by Interferon-gamma. *Scand-J-Immunol.* **44**: 285-92
10. Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.-Acids-Res.* **7**: 1513-22
11. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal-Biochem.* **72**: 248-54
12. Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., Bodmer, W.F. (1979) Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. *Immunol-Rev.* **47**: 3-61
13. Brouwenstijn, N., Gaugler, B., Kruse, K.M., van-der-Spek, C.W., Mulder, A., Osanto, S., van-den-Eynde, B.J., Schrier, P.I. (1996) Renal-cell carcinoma-specific lysis by cytotoxic T-lymphocyte clones isolated from peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int-J-Cancer.* **68**: 177-82
14. Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J., Bodmer, W. (1996) Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue-Antigens.* **47**: 364-71

15. Buggins, A.G., Hirst, W.J., Pagliuca, A., Mufti, G.J. (1998) Variable expression of CD3-zeta and associated protein tyrosine kinases in lymphocytes from patients with myeloid malignancies. *Br-J-Haematol.* **100**: 784-92
16. Bukowski, R.M., Novick, A.C. (1997) Clinical practice guidelines: renal cell carcinoma. *Clevel-Clinic-J-Medicine.* **64**: S11-44
17. Chou, Q., Russel, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic-Acids-Res.* **20**: 1717-23
18. Chu, G., Hayakawa, H., Berg, P. (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl-Acids-Res.* **15**: 1311-29
19. Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. (Hrsg.) (1993) *Innere Medizin. - 2., überarb. Auflage* Urban & Schwarzenberg, München
20. Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E. (2000) A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol-Today* **21**: 428-31
21. Cromme, F. V., Airey, J., Heemels, M. T., Ploegh, H. L., Keating, P. J., Stern, P. L., Meijer, C. J., Walboomers, J. M. (1994a) Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J-Exp-Med.* **179**: 335-40
22. Cromme, F. V., van-Bommel, P. F., Walboomers, J. M., Gallee, M. P., Stern, P. L., Kenemans, P., Helmerhorst, T. J., Stukart, M. J., Meijer, C. J. (1994b) Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br-J-Cancer.* **69**: 1176-81
23. Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W., Howard, J.C. (1990) MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters *Nature.* **348**: 738-41
24. Dovhey, S.E., Ghosh, N.S., Wright, K.L. (2000) Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res.* **60**:5789-96
25. Dressel, R., Lubbers, M., Walter, L., Herr, W., Gunther, E. (1999) Enhanced susceptibility to cytotoxic T lymphocytes without increase of MHC class I antigen expression after conditional overexpression of heat shock protein 70 in target cells. *Eur-J-Immunol.* **29**: 3925-35
26. Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D., Monaco, J. J. (1993) MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activity of the proteasome. *Nature.* **365**: 262-4
27. Ehrlich, R. (1997) Modulation of antigen processing and presentation by persistent virus infections and in tumors. *Hum-Immunol.* **54**: 104-16
28. Elliott, L.H., Brooks, W.H., Roszman, T.L. (1990) Inability of mitogen-activated lymphocytes obtained from patients with malignant primary intracranial tumors to express high affinity interleukin 2 receptors. *J-Clin-Invest.* **86**: 80
29. Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. (editors) (1998) *Harrison's principles of internal medicine. - 14th ed.* McGraw-Hill Companies, Inc., USA

30. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* **84**: 7413-7
31. Ferrone, S., Marincola, F.M. (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol-Today.* **16**: 487-94
32. Figlin, R.A., Abi-Aad, A.S., Belledegrun, A., deKernion, J.B. (1991) The role of interferon and interleukin-2 in the immunotherapeutic approach to renal cell carcinoma. *Semin-Oncol.* **18**: 102-7
33. Fischer, C.G., Oberneder, R., Altwein, J., Wirth, M., Miller, K. (2000) Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms. *Dt-Ärzteblatt.* **97**: A2781-4
34. Fisk, B., Ioannides, C. G., Aggarwal, S., Wharton, J. T., O'Brian, C. A., Restifo, N., Glisson, B. S. (1994) Enhanced expression of HLA-A,B,C and inducibility of TAP-1, TAP-2, and HLA-A,B,C by interferon-gamma in a multidrug-resistant small cell lung cancer line. *Lymphokine-Cytokine-Res.* **13**: 125-31
35. Foss, G. S., Larsen, F., Solheim, J., Prydz, H. (1998) Constitutive and interferon-gamma-induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *Biochim-Biophys-acta.* **1402**: 17-28
36. Gabathuler, R., Reid, G., Kolaitis, G., Driscoll, J., Jefferies, W. A. (1994) Comparison of cell lines deficient in antigen presentation reveals a functional role for TAP-1 alone in antigen processing. *J-Exp-Med.* **180**: 1415-25
37. Gallardo, H.F., Tan, C., Sadelain, M. (1997) The internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus enables reliable coexpression of two transgenes in human primary T lymphocytes. *Gene-Therapy.* **4**: 1115-19
38. Garrido, F., Cabrera, T., Lopez-Nevot, M.A., Ruiz-Cabello, F. (1995) HLA class I antigens in human tumors. *Adv-Cancer-Res.* **67**: 155-95
39. Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J.P., Van-der-Spek, C.W., Patard, J.J., Boon, T., Schrier, P., Van-den-Eynde, B.J. (1996) A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics.* **44**: 323-30
40. Gilboa, E. (1999) How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Canc-Imm-Immunoth.* **48**: 382-5
41. Goldberg, A. L., Rock, K. L. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* **357**: 375-8
42. Grandea, A.G., Van Kaer, L. (2001) Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends-Immunol.* **22**: 194-9
43. Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J. (1998) Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J-Exp-Med.* **187**: 97-104

44. Groettrup., M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., Kloetzel, P.M. (1996) A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*. **381**: 166-8
45. Gubler, B., Daniel, S., Armandola, E.A., Hammer, J., Caillat-Zucman, S., van-Endert, P.M. (1998) Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs during peptide binding to TAP. *Mol-Immunol*. **35**: 427-33
46. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J-Mol-Biol*. **166**: 557-80
47. Hill, A., Ploegh, H. (1995) Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. **92**: 341-3
48. Hilt, W., Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *TIBS* **21**:96-102
49. Johnsen, A., France, J., Sy, M.-S., Harding, C.V. (1998) Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Canc-Res*. **58**: 3660-7
50. Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., Gatter, K.C., Harris, A.L. (1995) Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer-Res*. **55**: 5191-4
51. Kaklamanis, L., Townsend, A., Doussis-Anagnostopoulou, I. A., Mortensen, N., Harris, A. L., Gatter, K. C. (1994) Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am-J-Pathol*. **145**: 505-9
52. Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W., Cresswell, P. (2001) Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. **98**: 7431-6
53. Khanna, R., Burrows, S.R., Arguet, V., Moss, D.J. (1994) Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumour cell line. *Int-Immunol*. **6**: 639-45
54. Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjöberg, J., Pisa, P., Petersson, M. (1999) Tumor-induced immune dysfunction. *Canc-Imm-Immunoth*. **48**: 353-62
55. Kirkin, A. F., Dzhandzhugazyan, K., Zeuthen, J. (1998) Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS*. **106**: 665
56. Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hammerling, G.J., Momburg, F. (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur-J-Immunol*. **26**: 1720-8
57. Kozak-M (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. **87**: 8301-5
58. Krammer, P.H. (2000) Apoptose. *Dt-Ärztebl*. **97**: A-1752-59
59. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zöller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U.,

- Ullrich, S., Müller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., Ringert, R.H. (2000) Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature-Med.* **6**: 332-6
60. Lee, S. P., Thomas, W. A., Blake, N. W., Rickinson, A. B. (1996) Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *Eur-J-Immunol.* **26**: 1875-83
61. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* **16**: 4743-51
62. Lewis, J.W., Elliott, T. (1998) Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly *Curr-Biol.* **8**: 717-720
63. Lewis, J.W., Neisig, A., Neefjes, J., Elliott, T. (1996) Point mutations in the alpha2 domain of HLA-A2.1 define a functionally relevant interaction with TAP. *Curr-Biol.* **6**: 873-83
64. Li, S., Paulsson, K.M., Sjögren, H.O., Wang, P. (1999) Peptide-bound major histocompatibility complex class I molecules associate with Tapasin before dissociation from transporter associated with antigen processing. *J-Biol-Chem.* **274**: 8649-54
65. Lindl, T., Bauer, J. (1994) *Zell- und Gewebekultur 3. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
66. Lobigs, M., Chelvanayagam, G., Müllbacher, A. (2000) Proteolytic processing of peptides in the lumen of the endoplasmic reticulum for antigen presentation by major histocompatibility class I. *Eur-J-Immunol.* **30**: 1496–1506
67. Marincola, F.M., Shamamian, P., Rivoltini, L., Salgaller, M., Cormier, J., Restifo, N.P., Simonis, T.B., Venzon, D., White, D.E., Parkinson, D.R. (1995b) HLA associations in the antitumor response against malignant melanoma. *J-Immunother-Emphasis-Tumor-Immunol.* **18**: 242-52
68. Marincola, F.M., White, D.E., Wise, A.P., Rosenberg, S.A. (1995a) Combination therapy with interferon alfa-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. *J-Clin-Oncol.* **13**: 1110-22
69. McLachlin, J.R., Mittereder, N., Daucher, M.B., Kadan, M., Eglitis, M.A. (1993) Factors affecting retroviral vector function and structural integrity. *Virology.* **195**:1-5
70. Mescher, M.F. (1992) Surface contact requirements for activation of cytotoxic T lymphocytes. *J-Immunol.* **149**: 2402-5
71. Meyer, T. H., van-Endert, P. M., Uebel, S., Ehring, B., Tampé, R. (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells *FEBS-Lett.* **351**: 443-447
72. Miller, D.M., Sedmak, D.D. (1999) Viral effects on antigen processing. *Curr-Opin-Immunol.* **11**: 94-9
73. Momburg, F., Neefjes, J. J., Hammerling, G. J. (1994a) Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr-Opin-Immunol.* **6**: 32-7

74. Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J., Neefjes, J. J. (1994b) Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J-Exp-Med.* **179**: 1613-23
75. Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hammerling, G. J., Neefjes, J. J. (1994c) Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature.* **367**: 648-51
76. Monaco, J.J., Cho, S., Attaya, M. (1990) Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science.* **250**: 1723-26
77. Moore, G.E., Grace, J.T. Jr., Citron, P., Gerner, R., Burns, A. (1966) Leukocyte cultures of patients with leukemia and lymphomas. *NY-State-J-Med* **66**: 2757-64
78. Mulders, P., Tso, C.L., Gitlitz, B., Kaboo, R., Hinkel, A., Frand, S., Kiertscher, S., Roth, M.D., deKernion, J., Figlin, R., Beldegrun, A. (1999) Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin-Canc-Res.* **5**: 445-54
79. Mullis, K.B., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth-Enzymol.* **55**: 335-50
80. Murnane, J.P., Yezzi, M.J., Young, B.R. (1990) Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic-Acids-Res.* **18**: 2733-8
81. Nair, S. K., Boczkowski, D., Snyder, D., Gilboa, E. (1997) Antigen-presenting cells pulsed with unfractionated tumor-derived peptides are potent tumor vaccines. *Eur-J-Immunol.* **27**: 589-97
82. Najjar, S.M., Lewis, R.E. (1999) Persistent expression of foreign genes in cultured hepatocytes: expression vectors. *Gene.* **230**:41-5
83. Neefjes, J. J., Momburg, F., Hämmerling, G. J. (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science:* **261**: 769-71
84. Neisig, A., Wubbolts, R., Zang, X., Melief, C., Neefjes, J. (1996) Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J-Immunol.* **156**: 3196-206
85. Ng, P., Baker, M.D. (1999) The molecular basis of multiple vector insertion by gene targeting in mammalian cells. *Genetics.* **151**: 1143-55
86. Oellig, C., Seliger, B. (1990) Gene transfer into brain tumor cell lines: reporter gene expression using various cellular and viral promoters. *J-Neurosci-Res.* **26**: 390-6
87. Ortmann, B., Androlewicz, M.J., Cresswell, P., (1994) MHC class I/beta2-microglobulin complexes associated with TAP transporters before peptide binding. *Nature.* **368**: 864-867
88. Pawelec, G., Zeuthen, J., Kiessling, R. (1997) Escape from host-antitumor immunity *Crit-Rev-Oncog.* **8**: 111
89. Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mule, J. J., Rosenberg, S. A., Bennink, J. R. (1993) Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J-Exp-Med.* **177**: 265-72

90. Riede, U.N., Schaefer, H.E. (Hrsg.) (1993) Allgemeine und spezielle Pathologie. - 3., neu bearb. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York
91. Ritz, U., Momburg, F., Pircher, H.P., Strand, D., Huber, C., Seliger, B. (2001) Identification of sequences in the human peptide transporter subunit TAP1 required for transporter associated with antigen processing (TAP) function. *Int-Immunol.* **13**: 31-41
92. Ritz, U., Seliger, B. (2001) The transporter associated with antigen processing (TAP): Structural integrity, expression, function and its clinical relevance. *Mol-Medicine.* **7**: 149-58
93. Rivoltini, L., Barracchini, D.C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N.P., Topalian, S.L., Simonis, T.B., Rosenberg, S.A. (1995) Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer-Res.* **55**: 3149-3157
94. Rock, K.L., Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu-Rev-Immunol.* **17**: 739-79
95. Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C.A., Argaeet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S.R., et al. (1995) Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur-J-Immunol.* **25**: 1374-84
96. Ruddle, N.H. (1992) Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr-Opin-Immunol.* **4**: 327-32
97. Salcedo, M., Momburg, F., Hämmerling, G. J., Ljunggren, H. G. (1994) Resistance to natural killer cell lysis conferred by TAP1/2 genes in human antigen-processing mutant cells. *J-Immunol.* **152**: 1702-8
98. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N. Y.
99. Sanda, M. G., Restifo, N. P., Walsh, J. C., Kawakami, Y., Nelson, W. G., Pardoll, D. M., Simons, J. W. (1995) Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J-Natl-Cancer-Inst.* **87**: 280-5
100. Schendel, D.J., Falk, C.S., Nossner, E., Maget, B., Kressenstein, S., Urlinger, S., Tampe, R., Gansbacher, B. (2000) Gene transfer of human interferon gamma complementary DNA into a renal cell carcinoma line enhances MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition but suppresses non-MHC-restricted effector cell activity. *Gene-Ther.* **7**: 950-9
101. Schmid, H.P., Szabo, J. (1997) Renal cell carcinoma--a current review. *Schweiz-Rundsch-Med-Praxis.* **86**: 837-43
102. Seliger, B., Beck, J., Huber, C. (2001) Molekularbiologie und Immunologie des Nierenzellkarzinoms. *Onkologe.* **7**: 722-9
103. Seliger, B., Hammers, S., Höhne, A., Zeidler, R., Knuth, A., Gerharz, C.-D., Huber, C., (1997b) IFN-gamma-mediated coordinated transcriptional regulation of the human TAP1 and LMP2 genes in human renal cell carcinoma. *Clin-Cancer-Res.* **3**: 573-578

104. Seliger, B., Höhne, A., Jung, D., Kallfelz, M., Knuth, A., Jaeger, E., Bernhard, H., Momburg, F., Tampe, R., Huber, C. (1997c) Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp-Hematol.* **25**: 608-14
105. Seliger, B., Höhne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Ehring, B., Tampé, R., Huber, C., (1996a) Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin-Cancer-Res.* **2**: 1427-1433
106. Seliger, B., Höhne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Meyer, T., Tampe, R., Momburg, F., Huber, C (1996b) Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer-Res.* **56**: 1756-60
107. Seliger, B., Maeurer, M.J., Ferrone, S. (1997a) TAP off--tumors on. *Immunol-Today.* **18**: 292-9
108. Seliger, B., Maeurer, M.J., Ferrone, S. (2000) Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol-Today* **21**: 455-64
109. Simons, J.W., Jaffee, E.M., Weber, C.E., Levitsky, H.I., Nelson, W.G., Carducci, M.A., Lazenby, A.J., Cohen, L.K., Finn, C.C., Clift, S.M., Hauda, K.M., Beck, L.A., Leiferman, K.M., Owens, A.H., Piantadosi, S., Dranoff, G., Mulligan, R.C., Pardoll, D.M., (1997) Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer-Res.* **57**: 1537-46
110. Singal, D. P., Ye, M., Bienzle, D. (1998) Transfection of TAP 1 gene restores HLA class I expression in human small-cell lung carcinoma. *Int-J-Cancer.* **75**: 112-6
111. Singal, D. P., Ye, M., Ni, J., Snider, D. P. (1996a) Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines. *Immunol-Lett.* **50**: 149-54
112. Singal, D. P., Ye, M., Qiu, X. (1996b) Molecular basis for lack of expression of HLA class I antigens in human small-cell lung carcinoma cell lines. *Int-J-Cancer.* **68**: 629-36
113. Sotomayor, E.M., Borrello, I., Levitsky, H.I. (1996) Tolerance and cancer:a critical issue in tumor immunology. *Crit-Rev-Oncog.* **7**: 433-6
114. Spee, P., Neefjes, J. (1997) TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur-J-Immunol.* **27**: 2441-9
115. Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D., de Mars, R.T. (1990) A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature.* **348**: 744-747
116. Srivastava, P.K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R.J., McQuade, K.L. (1998) Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity.* **8**: 657-665
117. Suh, W.K., Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, P.A., Williams, D.B. (1994) Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science.* **264**: 1322-6



118. Suh, W.K., Mitchell, E.K., Yang, Y., Peterson, P.A., Waneck, G.L., Williams, D.B. (1996) MHC class I molecules form ternary complexes with Calnexin and TAP and undergo peptide-regulated interaction with TAP via their extracellular domains. *J-Exp-Med.* **184**: 337-48
119. Tartof, K.D., Hobbs, C.A. (1988) New cloning vectors and techniques for easy and rapid restriction mapping. *Gene.* **67**: 169-82
120. Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C.D., Lee, R., Debre, B., Fridman, W.H. (1995) Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int-J-Cancer.* **63**: 205
121. Thompson, C.B. (1995) Distinct Roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T Helper cell differentiation? *Cell.* **81**: 979-82
122. Traversari, C., Meazza, R., Coppolecchia, M., Basso, S., Verrecchia, A., van-der-Bruggen, P., Ardizzoni, A., Gaggero, A., Ferrini, S. (1997) IFN-gamma gene transfer restores HLA-class I expression and MAGE-3 antigen presentation to CTL in HLA-deficient small cell lung cancer. *Gene-Ther.* **4**: 1029-35
123. Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., Kelly, A. (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* **348**: 741-3
124. van-der-Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma *Science.* **254**: 1643
125. van-Leeuwen, J. E., Kearse, K. P. (1996) Deglycosylation of N-linked glycans is an important step in the dissociation of calreticulin-class I-TAP complexes. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* **93**: 13997-4001
126. Vitale, M., Rezzani, R., Rodella, L., Zauli, G., Grigolato, P., Cadei, M., Hicklin, D.J., Ferrone, S. (1998) HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer-Res.* **58**: 737-42
127. Vos, J.C., Reits, E.A.J., Wojcik-Jacobs, E., Neefjes, J. (1999) Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr-Biol.* **10**: 1-7
128. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.Y. (1982) Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO-J.* **1**: 945-51
129. Walker, P.R., Saas, P., Dietrich, P.Y. (1998) Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr-Opin-Immunol.* **10**: 564-72
130. Wang, Z., Margulies, L., Hicklin, D.J., Ferrone, S. (1996) Molecular and functional phenotypes of melanoma cells with abnormalities in HLA class I antigen expression. *Tissue-Antigens.* **47**: 382-90
131. Waring, P. Müllbacher, A. (1999) Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Imm-Cell-Biology.* **77**: 312-17

132. Weidmann, E., Logan, T.F., Yasumura, S., Kirkwood, J.M., Trucco, M., Whiteside, T.L. (1993) Evidence for oligoclonal T-cell response in a metastasis of renal cell carcinoma responding to vaccination with autologous tumor cells and transfer of in vitro-sensitized vaccine-draining lymph node lymphocytes. *Cancer-Res.* **53**: 4745-9
133. White, C.A., Thomson, S.A., Cooper, L., van-Endert, P.M., Tampe, R., Coupar, B., Qiu, L., Parsons, P.G., Moss, D.J., Khanna, R. (1998) Constitutive transduction of peptide transporter and HLA genes restores antigen processing function and cytotoxic T cell-mediated immune recognition of human melanoma cells. *Int-J-Cancer.* **75**: 590-5
134. Whiteside, T.L., Rabinowich, H. (1998) The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Canc-Immunol-Immunoth.* **46**: 175-84
135. Wölfel, T., Herr, W., Coulie, P., Schmit, U., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Knuth, A. (1993) Lysis of human pancreatic adenocarcinoma cells by autologous HLA-class I-restricted cytolytic T-lymphocyte (CTL) clones. *Int-J-Cancer.* **54**: 636-44
136. Young, R.C. (1998) Metastatic renal cell carcinoma: What induces occasional dramatic regressions? *N-Engl-J-Med.* **338**: 1305-06
137. Zea, A.H., Curti, B.D., Londo, D.L., Alvord, W.G., Strobi, S.L., Mizoguchi, H., Creekmore, S.P., O'Shea, J.J., Powers, C.G., Urba, W.J., Ochoa, A.C. (1995) Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin-Cancer-Res.* **1**: 1327
138. Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampé, R., Lazis, S., Hammerschmidt, W. (1997) Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood.* **90**: 2390-7
139. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1974) Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature.* **251**: 547-8

## 9. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: Räumliche Darstellung eines MHC Klasse I-Moleküles.</i>	2
<i>Abb. 1.2: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptors</i>	3
<i>Abb. 1.3: T-Zell/APC-Interaktion und Zielzellyse (lethal hit).</i>	6
<i>Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Proteasoms.</i>	7
<i>Abb. 1.5: Modell des TAP-Heterodimer mit den weitgehend homologen Molekülen TAP1 und TAP2.</i>	8
<i>Abb. 1.6: Lokalisation einiger relevanter Gene und Gencluster des MHC-Locus auf Chromosom 6</i>	9
<i>Abb. 1.7: Mehrschritt-Modell der Peptid-Translokation durch TAP.</i>	9
<i>Abb. 1.8: Synopsis der MHC Klasse I Antigenprozessierung mit TAP in einer zentralen Rolle.</i>	11
<i>Abb. 1.9: Einfluß von Störungen der APM auf die Antigenpräsentation.</i>	14
<i>Abb. 1.9: Histologische Ansicht eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms.</i>	18
<i>Abb. 2.1: Plasmid pCMV-TAP1-neoR (P21) mit einer CMV kontrollierten TAP1- und einer zweiten SV40 kontrollierten neoR Expressionskassette</i>	24
<i>Abb. 2.2: Plasmid pCMV-TAP2-neoR (P23)</i>	24
<i>Abb. 2.3: Plasmid pCMV-IRES-neoR (P46)</i>	24
<i>Abb. 2.4: Plasmid 84, Expressionsvektor zur stabilen Expression des TAPIA- und des neoR-Transgens durch Transkription nur einer bicistronischen mRNS, in der beide Gene durch eine IRES verbunden sind.</i>	25
<i>Abb.3.1: Rechteck-Impuls-Elektroporation.</i>	36
<i>Abb. 3.2: Prinzip der PCR.</i>	43
<i>Abb. 3.3: Strategie für die genomische PCR zur Überprüfung der vollständigen Vektor-Integration nach Transfektion.</i>	43
<i>Abb. 3.4: Schematische Darstellung einer Blotvorrichtung für den Kapillar-Blot.</i>	48
<i>Abb. 3.5: Schema der Durchflußzytometrie.</i>	52
<i>Abb. 3.6: Wiedergabe einer typischen durchflußzytometrischen Analyse.</i>	53
<i>Abb. 4.1: genomische PCR zur Evaluation einer instabilen TAP1-Transfektion.</i>	61
<i>Abb. 4.2: Repräsentative Auswahl aus 24 Ansätzen einer transienten Transfektion von NIH-Zellen mit dem Plasmid CMV-TAP1-neo (P21).</i>	62
<i>Abb. 4.3: Nachweis der stabilen Integration des TAP1-Transgens und neo<sup>R</sup>-Selektionsmarkers durch genomische PCR.</i>	63
<i>Abb. 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse von Vorversuchen und Entscheidungen, die zur Auswahl von Zelllinie, Vektor und Transfektionsmethode führten.</i>	64
<i>Abb. 4.5: Immunoblot der in vitro Translationsprodukte.</i>	65
<i>Abb. 4.6: Darstellung der unterschiedlichen Oberflächenexpression relevanter Moleküle auf der parentalen Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257RC und deren Subklone in der Durchflußzytometrie (Einzelmessung).</i>	65
<i>Abb. 4.7: Zytotoxizitätsanalyse parallel durchgeführt zu vorstehender Durchflußzytometrie.</i>	66
<i>Abb. 4.8: Nachweis des transgenen TAP1 und seine Quantifizierung in einer Ein-Schritt-PCR.</i>	67
<i>Abb. 4.9: Differentielle Expression von endogener und transgener TAP1-mRNS ausgewählter TAP1-Transfektanden im Northern-Blot.</i>	68
<i>Abb. 4.10: Unterschiedliche TAP1-Proteinexpression in TAP1-Transfektanden.</i>	69
<i>Abb. 4.11: TAP1-vermittelte Rekonstitution der MHC Klasse I-Oberflächenexpression.</i>	70

<i>Abb. 4.12 (A): Beispiele einer durchflußzytometrischen Untersuchung der HLA-A2 Oberflächenexpression in Kontrolltransfektanden und TAP1-überexprimierenden Klonen.</i>	71
<i>Abb. 4.12 (B): Beispiele einer durchflußzytometrischen Untersuchung der MHC Klasse I Oberflächenexpression in Kontrolltransfektanden und TAP1-überexprimierenden Klonen.</i>	72
<i>Abb. 4.13 (A): Darstellung der TAP1-Expression in einem Kontroll- und einem ausgewählten TAP1-Transfektand durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.</i>	73
<i>Abb. 4.13 (B): Darstellung der MHC Klasse I-Expression in einem Kontroll- und einem ausgewählten TAP1-Transfektand durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.</i>	73
<i>Abb. 4.14 (A): Peptid-Translokationsrate für das Peptid Nr. 56 (RYWANATRSR) mit ausgewählten Klonen und der parentalen Zelllinie.</i>	74
<i>Abb. 4.14 (B): Peptid-Translokationsrate für das Peptid Nr. 73 (RYWANATRSV).</i>	75
<i>Abb. 4.15: <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assay zur Ermittlung der lytischen Aktivität einer autologen T-Zelllinie gegen Transfektanden und Ausgangszellen.</i>	76
<i>Abb. 4.16: Unterschiedliche TNF-<math>\alpha</math> Freisetzung in verschiedenen Zytotoxizitäts-Ansätzen.</i>	77
<i>Abb. 4.17: Heterogene Induktion der T-Zellproliferation durch unterschiedliche Tumorzellen.</i>	78

---

## Danksagung

Mein Dank gebührt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. NNNNNNNNNN für die Möglichkeit, diese Promotion an seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. NNNNNNNNNN danke ich sehr für die Überlassung des Themas und ihre ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Herrn Dr. rer. nat. NNNNNN danke ich für die exzellente Betreuung während der Durchführung der Experimente.

Dem Labor-Team der Arbeitsgruppe NNNN danke ich für die zahlreichen Tips, die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die freundliche Aufnahme.

Der Arbeitsgruppe um Prof. NNNN danke ich für die Durchführung der <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assays, der Arbeitsgruppe um Prof. NNNNN für die Durchführung der Peptid-Transport-Assays und Frau NNNNN für die Hilfe bei den ELISAs.

---

---

---

---

## Curriculum vitae

### Michael Kallfelz

geboren am 11.04.1970 in Bonn

wohnhaft in:

Zentnerstr. 46, 80796 München,

Telefon: 089 / 27273149

Familienstand: ledig, keine Kinder

### Schulbildung

1976 – 1980

1980 – 1982

1982 – 1989

Grundschule in Altwarmbüchen im Landkreis Hannover

Orientierungsstufe Luerstrasse in Hannover

Altsprachliches Kaiser-Wilhelms-Gymnasium in Hannover bis zum Schulabschluß mit der Hochschulreife

### Zivildienst

1989 - 1991

Johanniter Unfallhilfe Kreisverband Hannover-Stadt

- während dieser Zeit Ausbildung zum Rettungssanitäter/Rettungsassistenten

### Studium

SS 91 - WS 93/94

SS 94 - WS 96/97

SS 97 - WS 97/98

Humanmedizin an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Wechsel im Fach Humanmedizin an die J. Gutenberg-Universität Mainz

Erneuter Wechsel an die J.W.G. Universität FFM zum Praktischen Jahr:

- Anästhesie an den Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Bad Soden

- Innere Medizin am New York Medical College, Valhalla, USA

- Chirurgie am St. Luke's Hospital, Guardamangia, Malta

12. Mai 1998

Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

### Beruf

12/1998 – 05/2000

„Arzt im Praktikum“

in der III. Medizinischen Klinik des Klinikums der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Abteilung Hämatologie und Onkologie.

07/2000 – 07/2001

Weiterbildungsmaßnahme „Medizinische Informatik“

am Systemhaus München, von der Bayerischen Landesärztekammer anerkannt als Ausbildungsabschnitt zur Erlangung der ärztlichen Zusatzbezeichnung „Medizinische Informatik“

03/2001 – 11/2001

Medizinische Software-Modellierung bei der Firma „ClinicNet AG“

Teilzeitbeschäftigung während der Weiterbildungsmaßnahme und als freier Mitarbeiter im Anschluß.



München, 11. Dezember 2001

---