

**Aus den Hautkliniken der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. J. Knop)
und der
Rheinischen Friedrichs-Wilhelm Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. ès sci. T. Bieber)**

**Aufhebung der peripheren Immuntoleranz
durch Kopplung eines
Melanomantigens mit immunogenen Fremdproteinen**

von Jürgen Brück

Als Dissertationsschrift vorgelegt dem Fachbereich

**Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt**

2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Dezember 2001 in der Hautklinik am Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (Leiter: Prof Dr. J. Knop) und in der Zeit von Januar 2002 bis Dezember 2002 in der Hautklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (Leiter: Prof. Dr. Dr. ès sci. T. Bieber) angefertigt. Die Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 432 „Mechanismen der Tumorabwehr und ihre therapeutische Beeinflussung“ (Sprecher Prof. Dr. Ch. Huber), Teilprojekt A12 (Prof. Dr. T. Tüting), gefördert.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Fasold

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Tüting

Datum der Disputation: 17.10.2003

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Fasold danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen und ein Gutachten zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Tüting für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung eines sehr interessanten Promotionsthemas. Darüber hinaus möchte ich mich für die hervorragende Betreuung sowie für die hilfreichen Ratschläge und anregende Diskussionen bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Dr. Julia Steitz möchte ich für die Hilfe bei den tierexperimentellen Arbeiten, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit danken.

Bei Frau Dipl. Ing. Julia Lenz bedanke ich mich für die kompetente Hilfe bei der Durchführung der ELISPOT Analysen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Hautklinik in Bonn und Mainz, im besonderen bei Frau Ruth Alt, Frau Stefanie Büchs, Herrn Yingjie Qian und Frau Annekatriin Meinel möchte ich mich für die vielfältige Unterstützung bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Karsten Mahnke danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Labor fertig stellen zu können und für die konstruktive Durchsicht meines Manuskriptes.

Meinen Eltern gewidmet.

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	8
1.1	VERLAUF UND THERAPIE DES MALIGNEN MELANOMS	8
1.2	WARUM DAS IMMUNSYSTEM MELANOMZELLEN NICHT ABWEHREN KANN.....	8
1.3	STRATEGIEN FÜR DIE ENTWICKLUNG EINER MELANOMIMPfung.....	10
1.4	TUMORVAKZINIERUNG IN EXPERIMENTELLEN TUMORMODELLEN DER MAUS.....	11
1.5	FRAGESTELLUNGEN	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	VERSUCHSTIERE.....	14
2.2	ZELLKULTUR.....	14
2.2.1	<i>Plastikwaren.....</i>	<i>14</i>
2.2.2	<i>Zelllinien.....</i>	<i>14</i>
2.2.3	<i>Nährmedien, Puffer und Reagenzien.....</i>	<i>15</i>
2.2.4	<i>Kryokonservierung von Zellen.....</i>	<i>16</i>
2.3	PLASMIDE.....	16
2.3.1	<i>Vermehrung</i>	<i>16</i>
2.3.2	<i>Verwendete Bakterien.....</i>	<i>17</i>
2.3.3	<i>Herstellung chemisch transformationskompetenter E. Coli (nach Hanahan)</i>	<i>17</i>
2.3.4	<i>Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....</i>	<i>18</i>
2.3.5	<i>Plasmid-Aufreinigung (Mini- und Maxi-Prep).....</i>	<i>19</i>
2.3.6	<i>Bestimmung der Plasmidmenge</i>	<i>19</i>
2.3.7	<i>Restriktionsverdau.....</i>	<i>20</i>
2.3.8	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....</i>	<i>20</i>
2.3.9	<i>Herstellung eines 1% Agarosegels.....</i>	<i>20</i>
2.3.10	<i>Konstruktion neuer Plasmide</i>	<i>21</i>
2.3.11	<i>PCR-vermittelte Konstruktion neuer Plasmide</i>	<i>22</i>
2.4	REKOMBINANTE ADENOVIRALE VEKTOREN	22
2.4.1	<i>Struktur der Adenoviren</i>	<i>22</i>
2.4.2	<i>Der adenovirale Lebenszyklus.....</i>	<i>23</i>
2.4.3	<i>Adenovirale Gentransfersysteme.....</i>	<i>24</i>
2.4.4	<i>Neukonstruktion replikationsdefekter rekombinanter Adenoviren.....</i>	<i>25</i>
2.4.5	<i>Isolation von Virus- DNA aus Ψ5 Virus.....</i>	<i>26</i>
2.4.6	<i>Linearisierung des Shuttle-Plasmids für eine effiziente CaPO₄-Transfektion ...</i>	<i>27</i>

2.4.7	<i>Phenol-Chloroform Extraktion</i>	28
2.4.8	<i>Kalzium-Phosphat-Transfektion von Cre8 Zellen</i>	28
2.4.9	<i>Gewinnung von Virus-Zell-Lysat</i>	29
2.4.10	<i>Aufreinigung von Adenoviren</i>	29
2.4.11	<i>Photometrische Quantifizierung von Adenoviren</i>	30
2.5	ÜBERPRÜFUNG DER GENEXPRESSION.....	30
2.5.1	<i>Durchführung der Gene Gun Immunisierung</i>	30
2.5.2	<i>Genetische Immunisierung mit rekombinanten Adenoviren</i>	32
2.5.3	<i>Grün fluoreszierendes Protein EGFP</i>	32
2.5.4	<i>β-Galaktosidase</i>	32
2.5.5	<i>Tyrosinase-related-protein 2</i>	32
2.6	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION DER FUSIONSKONSTRUKTE	35
2.6.1	<i>Herstellung stabiler Transfektanten zur Lokalisation der Antigenexpression</i>	35
2.6.2	<i>Analyse der intrazellulären Lokalisation der Fusionskonstrukte</i>	35
2.7	ANALYSE DER IMMUNANTWORT	36
2.7.1	<i>Antigene, Peptide und Proteine</i>	36
2.7.2	<i>ELISPOT Test</i>	36
2.7.3	<i>Antikörpertest</i>	37
2.8	IN VIVO ANTIKÖRPERDEPLETION VON LYMPHOZYTEN	39
2.9	ANALYSE DER TUMORIMMUNABWEHR.....	39
2.9.1	<i>Experimentelle Induktion von B16 Lungenmetastasen</i>	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	DIE KOPPLUNG DES MELANOZYTÄREN ENZYMS TRP2 MIT EINEM IMMUNOGENEN FREMDPROTEIN BRICHT DIE PERIPHERE ZELLULÄRE IMMUNTOLERANZ	40
3.1.1	<i>Konstruktion der cDNA EGFPmTRP2 aa30-519</i>	41
3.1.2	<i>Nachweis der Expression des Fusionsproteins EGFPmTRP2 aa30-519 im Western-Blot</i>	43
3.1.3	<i>Nachweis der Immunantwort nach Immunisierung mit EGFPmTRP2 aa30-519</i> 44	
3.1.4	<i>Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen</i>	45
3.1.5	<i>Nachweis von TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten</i>	46
3.1.6	<i>Induktion von EGFP- und TRP2 -spezifischen Antikörpern</i>	47
3.1.7	<i>Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen</i>	51
3.2	ANALYSE DER IMMUNOLOGISCH RELEVANTEN FRAGMENTE VON TRP2	53

3.2.1	<i>Konstruktion von EGFPmTRP2-Vektoren zur Analyse der immunologisch relevanten Fragmente von TRP2</i>	54
3.2.2	<i>Nachweis der Genexpression im Western-Blot</i>	57
3.2.3	<i>Aufklärung der Mechanismen zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nach Gene-Gun Immunisierung</i>	58
3.2.4	<i>Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen</i>	58
3.2.5	<i>Nachweis EGFP-spezifischer Antikörper</i>	59
3.2.6	<i>Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort</i>	59
3.2.7	<i>Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen nach Immunisierung mit rek. Adenoviren</i>	60
3.2.8	<i>Rolle von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei der Induktion einer Immunantwort</i> ...	61
3.2.9	<i>EGFPmTRP2 Fusionskonstrukte mit unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation zur Bestimmung der Immuntoleranz</i>	65
3.2.10	<i>mTRP2aa1-198 EGFP, mTRP2aa30-198 EGFP</i>	65
3.2.11	<i>limTRP2 aa30-198 EGFP</i>	67
3.2.12	<i>Es EGFPmTRP2 aa30-519</i>	69
3.2.13	<i>Nachweis der Genexpression im Western-Blot</i>	71
3.2.14	<i>Expression der Fusionskonstrukte in DCEK-Zellen</i>	72
3.2.15	<i>Gene Gun Immunisierung mit mTRP2 EGFP Fusionskonstrukten</i>	75
3.2.16	<i>Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen</i>	75
3.2.17	<i>Nachweis EGFP-spezifischer Antikörper</i>	76
3.2.18	<i>Nachweis von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten</i>	76
3.2.19	<i>Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen</i>	77
3.3	EIGENSCHAFTEN IMMUNOGENER FUSIONSPARTNER	78
3.3.1	<i>β-gal mTRP2aa30-188</i>	79
3.3.2	<i>pp65 mTRP2</i>	81
3.3.3	<i>Nachweis von β-Galaktosidase mTRP2 180-188 in der X-gal Färbung</i>	83
3.3.4	<i>Nachweis von pp65mTRP2</i>	84
3.3.5	<i>Analyse des Einflusses der Fusionspartner auf die Gene-Gun Immunisierung</i> ...	84
3.3.6	<i>Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen</i>	85
3.3.7	<i>Nachweis von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten</i>	86

4	DISKUSSION.....	87
4.1	KOPPLUNG VON TUMORANTIGENEN MIT IMMUNOGENEN FREMDPROTEINEN	87
4.2	MÖGLICHKEITEN DER GENETISCHEN IMMUNISIERUNG ZUR INDUKTION EINER TUMORIMMUNANTWORT GEGEN SELBSTANTIGENE DURCH FUSION MIT IMMUNSTIMULIERENDEN MOLEKÜLEN	88
4.3	EINFLUSS UND FUNKTION VON CD4 ⁺ T-ZELLEN AUF DIE INDUKTION EINER IMMUNANTWORT	90
4.4	BEDEUTUNG VON CD8 ⁺ T-ZELLEN FÜR DIE IMMUNABWEHR VON MELANOMZELLEN .	91
4.5	EINFLUSS VON KOMPETITIVEN MHC-KLASSE-I BINDENDEN PEPTIDEPITOPEN AUF DIE INDUKTION EINER IMMUNANTWORT	92
4.6	EINFLUSS DER KOPPLUNG AUF DIE INTRAZELLULÄRE LOKALISATION	94
4.7	ANWENDUNG DER KOPPLUNG VON SELBSTANTIGENEN UND IMMUNOGENEN FREMDPROTEINEN IN DER KLINIK.....	96
5	LISTE DER VERWENDETEN PLASMIDE	97
6	LISTE DER VERWENDETEN PRIMER	102
7	ZUSAMMENFASSUNG	105
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
9	ABKÜRZUNGEN.....	115

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Verlauf und Therapie des malignen Melanoms

Die Behandlung des malignen Melanoms stellt eine große Herausforderung in der Dermatologie dar. In frühen Stadien kann die Erkrankung durch Exzision des Primärtumors dauerhaft geheilt werden. Mit zunehmendem Wachstum in die Tiefe steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung in die regionalen Lymphknoten und in andere innere Organe. Im sogenannten Stadium der Fernmetastasierung ist das Melanom bis heute nur in Ausnahmefällen heilbar¹. Wie bei vielen anderen Tumoren wäre es wünschenswert, durch eine frühzeitige Behandlung von Risikopatienten die Metastasierung zu verhindern. Neben den herkömmlichen Therapieformen (entfernen der regionalen Lymphknoten, Bestrahlung, Chemotherapie), hat vor allem die Immuntherapie zu einer Verbesserung der Heilungschancen geführt². Die spezifische Stimulation der Immunabwehr gegen Melanomzellen durch eine Impfbehandlung steht gegenwärtig im Zentrum des klinischen Interesses.

1.2 Warum das Immunsystem Melanomzellen nicht abwehren kann

Obwohl das Immunsystem Melanomzellen *in vitro* erkennen und lysieren kann, sterben viele Patienten an einer dissemierten Metastasierung. Offenbar ist in der Mehrzahl der Patienten die Immunantwort nicht effektiv. Das zelluläre Immunsystem entstand im Zuge der Evolution, um intrazelluläre Pathogene, insbesondere Viren zu bekämpfen. Das natürliche Immunsystem wird durch eine evolutionär stark konservierte, Rezeptor-vermittelte Erkennung fremdartiger Strukturen auf eindringenden Pathogene aufmerksam³. Als „Wachposten“ in Haut und Schleimhäuten werden spezialisierte Zellen des Immunsystems, die dendritischen Zellen, dabei aktiviert und tragen die Erreger in den regionalen Lymphknoten, um spezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen auszulösen⁴.

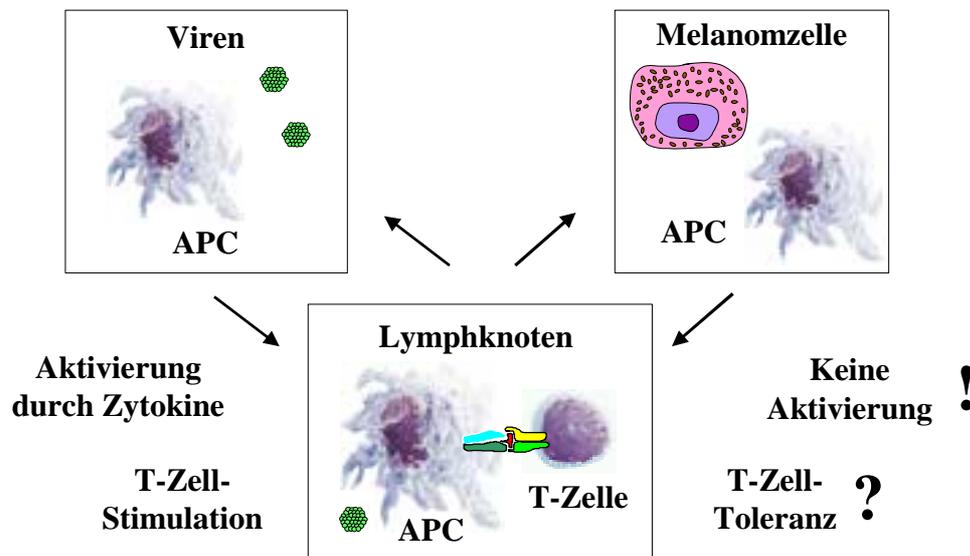


Abbildung 1

Warum das Immunsystem Melanomzellen nicht abwehren kann

Das natürliche Immunsystem erkennt fremdartige Strukturen auf eindringenden Pathogenen (wie z.B. Viren). Die in der Haut und den Schleimhäuten befindlichen, für die Antigenaufnahme und Präsentation spezialisierte Zellen des Immunsystems, die dendritischen Zellen, werden dabei durch Zytokine aktiviert und tragen die Erreger in den regionalen Lymphknoten, um spezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen auszulösen. Im Gegensatz dazu entwickeln sich Melanomzellen schrittweise durch genetische Schäden aus körpereigenen Melanozyten. Es besteht in der Regel ein Zustand der immunologischen Toleranz gegen körpereigene Zellen. Eine Aktivierung des Immunsystems findet nicht statt.

Bei der Immunantwort gegen Pathogene muss körpereigenes Gewebe von aktivierten T-Zellen ignoriert und eine Autoreaktivität verhindert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese immunologische Toleranz gegenüber normalen zellulären Proteinen besteht⁵. Sie ist jedoch nicht absolut, was das Auftreten von Autoimmunerkrankungen eindrucksvoll beweist. Da sich Melanomzellen schrittweise durch genetische Schäden aus körpereigenen Melanozyten entwickeln, besteht ebenfalls in der Regel ein Zustand der immunologischen Toleranz gegen Melanomzellen und deren Antigene. Eine mit viralen Infektionen vergleichbare Aktivierung des Immunsystems findet während der Entstehung primärer Melanome nicht statt. Erst wenn sich Melanomzellen im Körper ausbreiten, entwickelt sich bei einigen Patienten eine systemisch messbare, spezifische Immunantwort⁶. Die gelegentliche Ausbildung von Regressionszonen in Primärtumoren wird ebenfalls als ein klinisches Zeichen für eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor gewertet. Melanomzellen sind genetisch instabil und können einer solchen Immunantwort durch Veränderungen des Phänotyps entkommen. Hierauf deutet unter anderem der häufig beobachtete Verlust von MHC Klasse I Molekülen sowie der Verlust von spezifischen

Antigenen in Metastasen hin⁷. Durch den Verlust der Oberflächenmarker können T-Zellen den Tumor nicht mehr wirksam erkennen.

1.3 Strategien für die Entwicklung einer Melanomimpfung

Eine spezifische Impfung gegen Melanomzellen hat das Ziel, frühzeitig eine starke Immunabwehr gegen metastasierende Melanomzellen zu stimulieren. Um dieses zu erreichen, muss nach heutigem Verständnis die periphere Toleranz gegen körpereigene Zellen partiell aufgehoben und eine limitierte Autoreaktivität gegen körpereigenes Gewebe induziert werden. Insbesondere im Stadium der Mikrometastasierung besteht die Hoffnung, den weiteren Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen, dabei stehen folgende Fragen im Mittelpunkt des Interesses:

- Welche Strategien der Tumorstimmung sind geeignet, eine protektive und gewebezerstörende Immunantwort auszulösen?
- Welche Antigenkategorien sind hierbei relevant?

Man glaubte ursprünglich, dass vor allem mutierte, für den Körper fremde Antigene aus Melanomzellen vom Immunsystem erkannt werden.

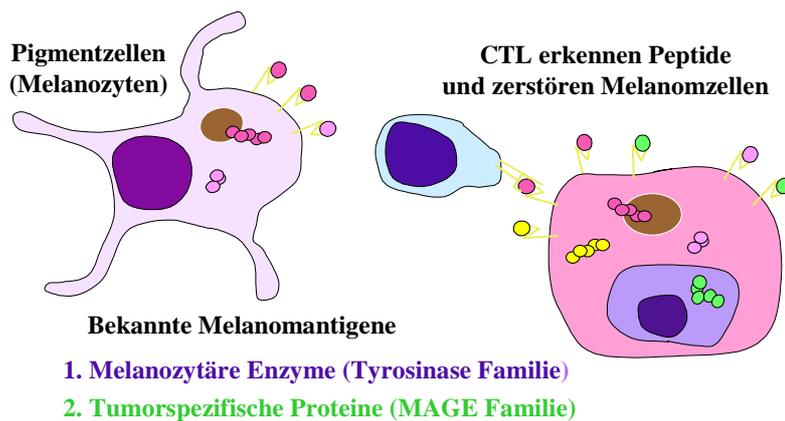


Abbildung 2

Wie das Immunsystem Melanomzellen erkennt

Die Mehrzahl der von CTL erkannten Antigene sind körpereigene melanozytäre Proteine (z. B. Tyrosinase oder TRP2), die sowohl in Melanomzellen als auch in Melanozyten vorkommen, oder tumorspezifische, aber strukturell normale Proteine (z. B. MAGE). Auch mutierte Proteine, die an der malignen Entartung beteiligt sind, wurden als Zielantigene identifiziert. Rezeptoren auf T-Zellen erkennen das Antigen in Form kurzer Peptide in der Bindungsgrube von MHC Klasse I Molekülen und können somit Melanomzellen zerstören.

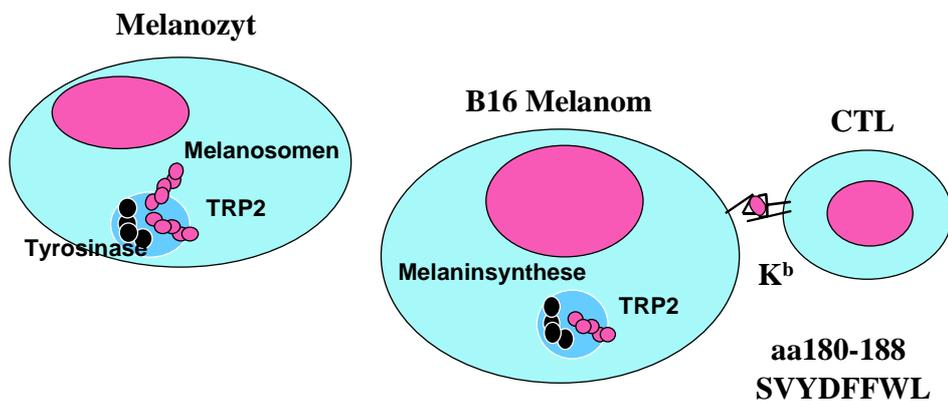
Die Analyse der von CTL erkannten Antigene erbrachte jedoch in der Mehrzahl körpereigene melanozytäre Proteine (z. B. Tyrosinase oder TRP2), die sowohl in Melanomzellen als auch in Melanozyten vorkommen, oder tumorspezifische, aber strukturell normale Proteine (z. B. MAGE), die außer in verschiedenen Tumoren nur noch im Hodengewebe exprimiert werden. Nur in einigen wenigen Fällen konnten auch mutierte Proteine, die an der malignen Entartung beteiligt sind, als Zielantigene identifiziert werden⁸. Diese Tumor-assoziierten Antigene sind zelluläre Proteine der Tyrosinasefamilie, welche endogen exprimiert an der Melaninsynthese in Melanozyten und Melanomzellen beteiligt sind.

1.4 Tumorstimmulierung in experimentellen Tumormodellen der Maus

Die Möglichkeiten einer Melanomimpfung, die mit Erfolg in die Klinik übertragen werden kann, sollte zuerst im tierexperimentellen Modell überprüft werden. Ein wesentliches Problem war jedoch lange Zeit, dass klinisch relevante Kategorien von Melanomantigenen im murinen System nicht bekannt waren. Mit Hilfe von CTL konnte das für B16 Melanomzellen spezifische H-2K^b-bindende Peptid SVYDEFVWL, entsprechend den Aminosäuren 180-188 von murinem Tyrosinase related protein 2 (mTRP2), als von T-Zellen erkanntes Zielantigen identifiziert werden. Die B16 Melanomzellen entstammen aus einem spontan entstandenen Melanom einer C57BL/6 Maus⁹. Das melanosomale Protein TRP2, auch Dopachrom Tautomerase genannt, gehört zusammen mit TRP1 und Tyrosinase zur strukturell und funktionell eng verwandten Enzymfamilie der Tyrosinase ähnlichen Proteine, die an der Melaninsynthese in pigmentbildenden Zellen beteiligt ist. Mutationen der Tyrosinase-Genfamilie führen zu Fellverfärbung in Mäusen (Tyrosinase = albino locus, TRP1 = brown locus, TRP2 = slaty locus). Tyrosinase, TRP1 und TRP2 werden natürlicherweise von Melanozyten und Melanomzellen exprimiert. Die humane und murine Sequenz von TRP2 sind zu 80 % homolog und besitzen das identische CD8-spezifische Peptidepitop aa180-188.

Vorangegangene Arbeiten im B16 Melanommodell der Maus haben gezeigt, dass die genetische Immunisierung in C57BL/6 Mäusen mit der cDNA von mTRP2 als Modellantigen nicht ausreicht um einen signifikanten protektiven Schutz gegen das B16 Melanom zu induzieren. Dieses wird als Ausdruck peripherer Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen interpretiert. Die Vermutung liegt nahe, dass die Möglichkeit der Induktion starker Immunreaktionen gegen melanozytäre Autoantigene wie TRP2 durch Mechanismen zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz begrenzt werden. Gegenwärtige Immunisierungsverfahren müssen dahingehend verbessert werden, dass die Toleranz

gegenüber peripheren Antigenen aufgehoben wird. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die genetische Immunisierung von Mäusen mit dem xenogenen homologen humanem TRP2 zu einem wirksamen Schutz gegen das Wachstum von B16 Melanomzellen führt. Die Tatsache, dass die genetische Immunisierung mit hTRP2 eine humorale Immunantwort sowohl gegen humanes als auch gegen murines TRP2 bewirkt, weist auf die Induktion von TRP2-spezifischen $CD4^+$ T-Lymphozyten hin. Denkbar wäre, dass die humanen Proteine in nicht-homologe Aminosäuresequenzen stimulierende MHC Klasse II-bindende Peptide enthalten, die effektiv $CD4^+$ T-Zellen aktivieren und so zu einer Bildung von autoreaktiven TRP2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen und Antikörper beitragen. Ausgehend von dieser Hypothese versuchten wir in dieser Arbeit durch Fusion der autologen TRP2 cDNA mit artifiziellen immunogenen Proteinen einen ähnlichen Effekt zu erreichen.



Murines TRP2: QIANC **SVYDFFVWL** HYYSV
 80% homologes humanes TRP2: QFANC **SVYDFFVWL** HYYSV

Abbildung 3

Tyrosinase-related-Protein 2 (TRP2) als Modellantigen

TRP2 gehört zur Tyrosinase-Enzymfamilie und ist in Melanosomen an der Melaninsynthese beteiligt. TRP2 wird sowohl in C57BL/6 Mäusen als auch bei Melanompatienten von CTL erkannt

1.5 Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden die folgenden Fragen bearbeitet

1. Kann durch die genetische Immunisierung mit einem Fusionsprotein bestehend aus mTRP2 und EGFP die periphere Toleranz aufgehoben und eine antigenspezifische Immunantwort induziert werden, die das Wachstum von transplantierten B16 Melanomzellen in C57BL/6 Mäusen unterbindet?
2. Welche Rolle spielen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bei der Induktion einer Tumorummunantwort in diesem Modell?
3. Welche immunologisch relevanten Fragmente von TRP2 sind für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort notwendig?
4. Welche Voraussetzungen müssen Fusionspartner besitzen um die Immunantwort gegen TRP2 zu verstärken und welchen Einfluss haben potentiell kompetitive MHC-Klasse I bindende Peptidepitope?
5. Wie verändert die Fusion von mTRP2 mit einem immunstimulierenden Protein die intrazelluläre Lokalisation und wie wirkt sich dies auf die Immunantwort aus?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Inzuchtmäuse des Stammes C57BL/6 (H-2^b) wurden von der Tierversuchsanstalt der Universitätsklinik Mainz bezogen und im Alter von 6-12 Wochen für die Versuche verwendet. C57BL/6 CD4^{-/-} wurden von Charles Rivers (Wilmington) bezogen, C57BL/6 CD8^{-/-} wurden uns freundlicherweise von Dr. Hengartner (Zürich) zur Verfügung gestellt^{10,11}.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Plastikwaren

Alle für die Zellkultur eingesetzten Plastikwaren wurden steril von den Firmen bezogen. Zur Kultivierung der Zellen wurden sowohl Zellkulturplatten (6-Loch-, 24- Loch- oder 96- Loch-Platten), als auch Zellkulturflaschen (75cm²) von Fischer Scientific (Frankfurt) verwendet. Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml) und Kryoröhrchen wurden von der Firma Greiner (Solingen) bezogen. FACS-Röhrchen wurden ebenfalls von FischerScientific bezogen. Zur Sterilfiltration von Medium wurden Vacu-Top Filter von membraPure (Bodenheim) benutzt. Andere Reagenzien wurden mit Filtern (0,2µm) der Firma Schleicher&Schuell (Dassel) sterilfiltriert.

2.2.2 Zelllinien

Die Melanomzelllinie B16 (H-2^b) wurde von Dr. S. A. Rosenberg (NIH, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt. Sie entstammt einem spontan entstandenen Melanom einer C57BL/6 Inzuchtmaus⁹. Die Kultivierung erfolgte in DMEM bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂. B16 Melanomzelle sind adhärente Zellen. Sie wurden mit Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin (Amersham Pharmacia Biotech), 0,02% EDTA) von der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und 2-3 Mal in der Woche (je nach Dichte der Zellen) geteilt.

293 Zellen (Microbix Biosystem Inc.) sind humane embryonale Nierenzellen und werden wie B16 Zellen kultiviert¹². Die Zellen sind mit der E1 Region der Adenovirus Typ5-DNA (von Dr. Frank Graham) stabil transfiziert und ermöglichen so die Vermehrung von E1 replikationsdefekten Adenoviren.

Cre8-Zellen wurden durch stabile Transfektion der 293 Zellen mit dem 38kd großen Rekombinase Protein aus dem Bakteriophagen P1 erzeugt. Diese Zellen wurden uns von der Gesellschaft für Gentherapie Berlin zur Verfügung gestellt. Cre8 Zellen unterstützen die Replikation E1-deletierter Adenoviren und vermitteln die Rekombination zwischen den lox-P Seiten des Shuttle Vektors pAdlox und der ψ 5 Virus DNA. Cre8 Zellen werden wie 293 Zellen kultiviert.

Die Antigen präsentierende Zelllinie DCEK von Suzy Swain wurde uns von Dr. Karsten Mahnke zur Verfügung gestellt. Sie stammt von Makrophagen ab, welche stabil durch retroviralen Vektoren mit MHC II (IE^k) und ICAM-1 transfiziert wurden. Die Zellen werden in RPMI 1640 mit 5% FKS wie B16 kultiviert.

2.2.3 Nährmedien, Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Zusätze und Konzentration	Firmen
RPMI 1640	RPMI 1640 Trockenpulver für 5l 2g/l Natriumhydrogencarbonat 0,1 mM HEPES 50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME) Vor Gebrauch: 100 IU/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 2mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (45min 56 °C) 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren	Gibco Merck Roth Pharmacia Biotech Gibco Gibco Gibco Gibco PAA Gibco
DMEM	DMEM Trockenpulver für 5l 2g/l Natriumhydrogencarbonat 0,1 mM HEPES 50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME) Vor Gebrauch: 100 IU/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 2mM L-Glutamin (Gibco) 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (45min 56 °C)	Gibco Merck Roth Pharmacia Biotech Gibco Gibco Gibco PAA

10x PBS	1,375 M NaCl 113 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O in Aqua bidest gelöst pH 6,6 autoklaviert (20min, 121 °C) eingesetzt als 1 x PBS	Merck Merck
LB Medium	20g/l LB-Broth Base in Aqua bidest gelöst autoklaviert (20min,121°C)	Roth Gibco
Ampicillin- Agarplatten	20g/l LB-Broth Base 15g/l Agar in Aqua bidest gelöst autoklaviert (20min,121°C) nach abkühlen auf ca.50°C Zugabe von 150µg/ml Ampicillin	Gibco Gibco Roth

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Um im Verlauf der Arbeit bei Bedarf auf eine konstante Zellpopulation zurückgreifen zu können, wurden die verwendeten Zellen in flüssigem Stickstoff bzw. bei -70 °C aufbewahrt. Hierzu wurden sie in einem Einfrier-Medium (RPMI 1640 mit 20% FKS und 10% DMSO von Roth) für zunächst 24h bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

2.3 Plasmide

2.3.1 Vermehrung

Die in den hier beschriebenen Experimenten verwendeten Plasmide wurden mit etablierten molekularbiologischen Verfahren unter Verwendung üblicher E. coli Bakterienstämme (u.a. DH5 α , TOP 10F) vermehrt. Alle notwendigen Reagenzien für die prokaryontische Zellkultur wurden von der Firma Gibco Life Science bezogen. Plasmid DNA wurde mit Hilfe von Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) biochemisch isoliert und aufgereinigt und

anschließend mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs) überprüft. Zusätzlich verwendete Chemikalien wurden bei der Firma Sigma und bei der Firma Roth erworben.

2.3.2 Verwendete Bakterien

Für die Vermehrung von Plasmiden werden in der Molekularbiologie spezielle E. coli Bakterien verwendet, die sich von dem Stamm K12 ableiten. Zur fehlerfreien Replikation wurden die E. coli Stämme weiter genetisch verändert, z. B. durch Entfernung bzw. Mutation verschiedener Gene wie beispielsweise der Rekombinase (recA) oder der Endonuclease (endA1). Durch ein mutiertes recA erreicht man beispielsweise eine höhere Stabilität der aufgenommenen Plasmide. Eine Mutation im endA1 Gen bewirkt eine hohe Plasmid Qualität. Im Rahmen der Arbeiten wurden die Stämme DH5 α und Top10F¹³ verwendet.

2.3.3 Herstellung chemisch transformationskompetenter E. Coli (nach Hanahan)

Lösungen:

Puffer RF1

RbCl	12,1g	100	mM
MnCl ₂ *4H ₂ O	9,9g	50	mM
CH ₃ COONa	2,9g	30	mM
CaCl ₂	1,1g	10	mM
Glycerol	150g	15%	

Die Komponenten werden in Aqua bidest. gelöst und der pH mit 0,2M Essigsäure auf 5,8 \pm 0,2 eingestellt. Danach wird das Volumen mit dH₂O auf 1 Liter aufgefüllt und durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert. Die sterile Lösung wird dann bei -20°C gelagert.

Puffer RF2

MOPS	2,1g	10	mM
RbCl	1,2g	10	mM
CaCl ₂	8,3g	75	mM
Glycerol	150g	15%	

Die Komponenten werden in Aqua bidest. gelöst und der pH mit KOH auf 6,8 eingestellt. Danach wird das Volumen mit dH₂O auf 1Liter aufgefüllt und durch einen 0,22µm Filter sterilfiltriert. Danach kann RF2 bei -20°C gelagert werden.

Um chemisch kompetente E. Coli DH5α zu generieren werden die Bakterien mit 100 ml LB-Medium auf einem Bakterienschüttler bis zu einer optischen Dichte von A₅₆₀ von 0,35-0,4 bei 37°C inkubiert. Dann wird die Bakterienkultur in eine 500ml Contron-Zentrifugenflasche überführt und für 15 Min in einem Eisbad inkubiert.

Danach werden die Bakterien 15Min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Bakterienpellet wird nun in 30ml kalter RF1-Lösung resuspendiert und erneut 15 min in einem Eisbad inkubiert.

Die Bakterien werden erneut für 15min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert und danach der Überstand im Anschluss vollständig entfernt.

Die Bakterien werden nun in 4-8ml kalter RF2 resuspendiert und wiederum für 15 min in einem Eisbad inkubiert.

Die so erhaltenen kompetenten Zellen können nun zu je 200 µl in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

2.3.4 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Zur Transformation der Plasmide in Bakterien werden die kompetenten E. Coli auf Eis aufgetaut. Für eine Transformation verwendet man ca. 50 µl kompetente eiskalte Bakteriensuspension.

Für die Transformation gibt man zu 50 µl Bakterien ca.1-2 µl Plasmid DNA und inkubiert den Ansatz 30min auf Eis .

Nach Ablauf der 30 min wird der Transformationsansatz für 90 sec. im Wasserbad auf 42°C erhitzt (Hitzeschock).

Danach wird der Transformationsansatz für weitere 2 min. auf Eis gestellt und danach 800µl angewärmtes LB-Medium zugegeben. Der Ansatz wird für 1h bei 37°C auf dem Schüttelinkubator geschüttelt und danach in mehreren Verdünnungsstufen auf antibiobiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und 24h Brutschrank bei 37° inkubiert.

2.3.5 Plasmid-Aufreinigung (Mini- und Maxi-Prep)

150 ml LB-Medium mit Ampicillin (150 µg/ml) werden in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 0,5ml von einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Zur Plasmid Aufreinigung werden Qia-Filter-Tip 500 (Qiagen) verwendet und die Aufreinigung nach Anleitung durchgeführt. Die Plasmidaufreinigung beruht auf einer alkalischen Bakterienlyse durch NaOH und SDS in Gegenwart von RNase A. SDS denaturiert zelluläre Proteine, während die alkalischen Bedingungen die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA denaturiert. Danach wird das Lysat mit saurer Kaliumacetatsalzlösung neutralisiert. Der hohe Salzgehalt sorgt dafür, dass die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA, Zellfragmente und SDS präzipitieren, während sich die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und im Überstand bleibt. Der niedrige pH-Wert und die Salzkonzentration im Lysat sorgen dafür, dass die Plasmid-DNA selektiv an der Säule bindet, während zerschnittene RNA, zelluläre Proteine und andere Metabolite nicht binden und durch die Säule laufen.

Danach wird die DNA mit einem speziellen salzhaltigen Bindungspuffer gewaschen. Hierdurch werden Kontaminationen wie Reste von RNA oder Nukleinsäure-bindende Proteine ohne Phenol/Chloroform Extraktion entfernt ohne die Bindungsaffinität der DNA zu beeinflussen. Die DNA wird bei einem pH von 8,5 und einem Salzgehalt von 1,25M NaCl von der Säule eluiert und anschließend entsalzt und durch eine Isopropanol-Präzipitation aufkonzentriert. Durch waschen mit 70% Ethanol werden restliche Salzurückstände und Isopropanol entfernt. Zum Schluss wird die DNA getrocknet und in Wasser zur weiteren Verwendung resuspendiert.

2.3.6 Bestimmung der Plasmidmenge

Für die weiteren Arbeitsschritte (Ligation, Restriktionsverdau, Kalzium-Phosphat-Transfektion) ist es entscheidend, dass man genau weiß, wie viel DNA die Lösung nach der Plasmidpräparation enthält. Wir bestimmen die Konzentrationen von DNA in einer wässrigen Lösung mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie. Die Menge der UV-Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt proportional. Es wird die Absorption bei $\lambda=260$ nm (A_{260}) bestimmt; bei dieser Wellenlänge entspricht der Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Anhand der UV-Absorption kann man auch die Reinheit einer DNA-Präparation überprüfen. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm

(A₂₆₀/A₂₈₀) bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

2.3.7 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle und zur Isolation einzelner DNA Fragmente wird ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu werden ca. 1-2 µg DNA in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wird mit sterilen Wasser und Enzympuffer (10x), der von dem verwendeten Enzym abhängig ist auf ein Volumen von 20-40 µl verdünnt und die entsprechende Menge Restriktionsenzym dazugegeben. Der Ansatz wird mindestens eine Stunde, gegebenenfalls über Nacht bei der optimalen Temperatur nach Angabe des Enzymherstellers (meist 37°C) inkubiert. Anschließend werden die DNA-Fragmente in einem 1% Agarosegel je nach Größe des Fragments aufgetrennt.

2.3.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Ladepuffer	KB Marker
25µl Bromphenolblau	20µl Ladepuffer
300µl Glycerol	10µl One-Phor-All-Puffer Pharmacia
675µl dH ₂ O	10µl KB-Marker Pharmacia
	60µl dH ₂ O

Mittels Agarosegelelektrophorese werden die DNA Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zur Anode, mit der Geschwindigkeit, die dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes umgekehrt proportional ist. Der Trennbereich eines 1% Agarosegels liegt bei 0,5-7 kb. Andere Fragmente, die größer oder kleiner sind, werden mit anderen Gelkonzentrationen aufgetrennt. Die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wird mittels entsprechender molekularer Marker (z. B. der Kilo-Basen-Marker der Firma Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.3.9 Herstellung eines 1% Agarosegels

Herstellen von TAE Puffer(50x)

242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure und 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 werden in 1 Liter dH₂O gelöst. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem 1% Agarosegel werden TAE-Puffer(1x) und Agarose verwendet. 1x TAE-Puffer wird aus der Stammlösung (50x TAE) 1:50 verdünnt. In ein Erlenmeyerkolben werden je nach Größe des Gels 50-150 ml TAE (1x) und 0,5-1,5 g Agarose erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wird zu der Agaroselösung 1-2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wird die Agarose in die Gelkammer eingefüllt. Nach dem Erstarren des Gels wird die Gelkammer mit TAE-Puffer(1x) befüllt, bis das zu analysierende Gel mit dem Laufpuffer bedeckt ist. Die zu analysierenden Proben werden mit 10µl Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen einpipettiert. Die DNA-Fragmente werden bei einer Feldstärke von 1-5 V/cm² aufgetrennt. Nach erfolgter Trennung wird das Gel aus der Gelkammer entnommen und unter UV-Licht zur weiteren Auswertung photographiert. Da Ethidiumbromid ein Fluoreszenzfarbstoff ist, der in die DNA interkoaliert, fluoreszieren die aufgetrennten DNA-Fragmente bei Bestrahlung mit UV-Licht.

2.3.10 Konstruktion neuer Plasmide

Um Gene in neue Plasmide einzufügen, muss man die gewünschten DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen schneiden, gelelektrophoretisch auftrennen und aus dem Agarosegel isolieren. Hierzu werden die Fragmente unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Die Aufreinigung der DNA von der Agarose und dem Ethidiumbromid erfolgt mit dem Qiaex II Kit der Firma Qiagen. DNA Moleküle mit der Größe zwischen 40bp und 50kb binden bei hoher Salzkonzentration selektiv an die Qiagen-Silica-Partikel. Sämtliche Verunreinigungen wie Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid binden nicht und werden während eines Waschschrattes von der DNA entfernt. Danach wird die DNA mit Wasser von den Silica-Partikeln eluiert und kann weiter verarbeitet werden.

Für die Ligationsreaktion werden 1 µl Puffer, 1 µl T4-Ligase, 5 µl des Gens und 2 µl des Vektors in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrollansatz werden 1 µl Puffer, 1 µl T4-Ligase, 5 µl dest. Wasser und 2 µl des Vektors in ein Eppendorfgefäß pipettiert und ebenfalls 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden jeweils 2µl des Kontroll- und Ligationsansatzes in Bakterien transformiert, anschließend auf ampicillinhaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden von den gewachsenen Kolonien auf der Platte mit dem Ligationsansatz mehrere Kolonien separiert, in LB-Medium mit Ampicillin

überführt und über Nacht kultiviert. Nach Aufreinigung des Plasmids mit Hilfe des Mini-Prep-Kits von Qiagen, wurde die Integration des klonierten Fragments durch einen entsprechenden Restriktionsverdau kontrolliert.

2.3.11 PCR-vermittelte Konstruktion neuer Plasmide

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Vermehrung von gewünschten Nukleinsäuresequenzen in einem Gemisch mit Hilfe von spezifischen Primern und der DNA-Polymerase. Hierzu wird im ersten Schritt die DNA denaturiert und es entstehen zwei Einzelstränge. Im zweiten Schritt binden die im Überschuss vorhandenen Primer an die zu amplifizierende Sequenz, wobei "forward" und "reverse"-Primer strangspezifisch sind. Diesen Abschnitt nennt man das "Annealing". Es entstehen doppelsträngige Bereiche, die im dritten Schritt den Startpunkt für die DNA-Polymerase darstellen, mit deren Hilfe der fehlende Einzelstrang zum Doppelstrang aufsynthetisiert wird (Elongation). Diese drei Schritte erfolgen bei unterschiedlichen Temperaturen und so die spezifische Sequenz amplifiziert. Man benötigt passende Primer, Oligonukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), DNA-Polymerase und einen geeigneten Puffer (enthält unter anderem $MgCl_2$), in dem die Polymerase arbeiten kann. Die PCR-Bedingungen (Temperaturen und Dauer der einzelnen Zyklen) sind abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes, der Länge der verwendeten Primer und der Homologie der verwendeten Primer zur „template“ DNA.

2.4 Rekombinante Adenovirale Vektoren

2.4.1 Struktur der Adenoviren

Adenoviren sind doppelsträngiger DNA Viren und können Erkrankungen der oberen Atemwege verursachen¹⁴. Auf Grund verschiedener Oberflächenrezeptoren lassen sich zahlreiche Serotypen unterscheiden. Adenoviren besitzen einen ikosaedrischen Aufbau. Das Viruscapsid ist aus zwei verschiedenen Capsomeren aufgebaut. Es besteht aus 240 Hexonen, die 20 dreieckige Flächen bilden und zwölf Pentonen. Letztere bilden die Basis für die Fiberproteine, die an den 12 Ecken des ikosaedrischen Viruspartikels hervorragen. Der Durchmesser der Viruspartikel beträgt 60-100nm. Die Virusmasse setzt sich zu 13% aus DNA und zu 87% aus Proteinen zusammen. Adenoviren besitzen keine Membran oder Lipidschicht. Die DNA im Inneren liegt in einer linearen Form vor und ist von Core-

Proteinen umgeben, die die Verbindung zwischen der Virus-DNA und der Virushülle darstellen.

An beiden Enden des adenoviralen Genoms befinden sich die inverted terminal repeats (ITR). Ein Verpackungssignal initiiert den Zusammenbau der Virionen. In der E1 Region sind Gene für die Transkriptionsregulation kodiert (E1A und E1B). In der E2 Region liegen Gene für die Virusreplikation. Gene der E3 Region sind an der Suppression von Immunantworten beteiligt. Genprodukte der E4 Region sind für den Infektionszyklus, die Genomreplikation und für die Aktivierung der späten Gene L1-L5 verantwortlich. Letztere kodieren für die viralen Strukturproteine.

2.4.2 Der adenovirale Lebenszyklus

Adenoviren benötigen für einen Replikationszyklus 32-48 Stunden. Der Replikationszyklus beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Zielzelle durch Wechselwirkungen zwischen dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor auf der Zelloberfläche und den Fiberproteinen des Virus. Nach erfolgreicher Anlagerung kommt es zu einer weiteren Wechselwirkung zwischen Integrinen auf der Zelle und den Pentonbasisproteinen. Danach wird der Virus über clathrinbedeckte Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt. Durch Ansäuern der Virushülle in den Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer Freisetzung des Virus-Kerns in das Cytoplasma. Die Core-Proteine sorgen für den Transport des viralen Genoms in den Zellkern, in dem dann die virale DNA als Episom bestehen bleibt. Zu Beginn erfolgt die Expression der Gene der E1 und E2 Region. Diese Proteine, initiieren etwa sechs bis acht Stunden nach der Infektion die Replikation des viralen Genoms mit einem Maximum nach 18-20 Stunden. An die 5'-Enden der ITRs sind kovalent von E2 kodierte Proteine gebunden, die als Primer zur Initiation der DNA Synthese dienen. Die DNA-Replikation erfolgt kontinuierlich in 5'→3' Richtung und wird durch die E2 viruskodierte DNA-Polymerase mittels Strang-Displacement katalysiert.

Die neuen Adenoviren werden im Zellkern zusammengebaut. Es entstehen ca. 10^4 - 10^5 Viren pro Zelle. Während dieser Prozesse blockieren virale Faktoren, welche in der E1 und E4 Region kodiert sind, die Synthese zellulärer Proteine, die die Virusproduktion unterdrücken. Infolgedessen ist die Zelle durch die Expression der viralen Gene unterversorgt. Die infizierte Zelle verkümmert innerhalb von 30-40h nach der Infektion und setzt dann die neusynthetisierten Viren frei (lytischer Infektionszyklus).

2.4.3 Adenovirale Gentransfersysteme

Adenoviren sind in der Lage viele verschiedene Zelltypen zu infizieren und ihr Genom in diese Zellen einzubringen. Folglich führt der Einbau von Fremdgenen in das virale Genom zu einer vergleichbar effizienten Einschleusung dieser heterologen genetischen Information in infizierten Zellen. Vektoren für die Gentherapie wurden auf der Basis von Adenoviren der Serotypen 2 und 5 entwickelt¹⁴. Da der normale adenovirale Lebenszyklus für die Zelle lytisch verläuft, muss bei der Einbringung heterologer Gene in bestimmte Zielzellen mit adenoviralen Vektoren der replikative Zyklus des Virus derart unterbrochen werden, dass die normalerweise erfolgende Lyse der infizierten Zelle nicht stattfinden kann. Dies wurde durch die Entfernung der zentralen E1 Region des Adenovirusgenoms erreicht¹⁴⁻¹⁶. Diese Region kodiert für bedeutsame Transaktivationsfaktoren, die für die Induktion des replikativen Lebenszyklus des Adenovirus in der Zielzelle erforderlich sind. In Abwesenheit der E1 Region findet nur die Infektion und die Einschleusung des viralen Genoms statt. Für den Gentransfer mit Adenoviren wurde deshalb die E1 Region entfernt. Solche E1-deletierte adenoviralen Vektoren sind replikationsdefekt und deshalb wesentlich sicherer in der Anwendung. An Stelle der E1 Region wurden heterologe Gensequenzen eingefügt. Um die effiziente Verpackung der adenoviralen DNA nicht zu behindern, können jedoch nur Gene bis zu einer Größe von ca. 7,5 kb in die E1 Region eingebaut werden. Das gewünschte Gen wird meist unter der Kontrolle eines heterologen starken Promotors gebracht. Dies ermöglicht eine Expression von heterologen Genen in der adenoviral infizierten Zelle. Hierzu werden bevorzugt virale Promotoren benutzt. Ein häufig verwendeter Promotor stammt aus dem Genom des Zytomegalie Virus und treibt dort die Transkription der immediate-early Gene. Der sogenannte CMV-*ie* Promoter gewährleistet eine starke Expression heterologer Gene in verschiedenen Zelltypen. Eine weitere Voraussetzung für eine starke Expression ist ein starkes Polyadenylierungssignal, z.B. aus dem SV40 Virus. In den virusproduzierenden Zellen müssen die E1-Funktionen jedoch unbedingt vorhanden sein. Dies erreicht man, indem man rekombinante replikationsdefekte Viren in Zelllinien vermehrt, die Gene der E1 Region stabil exprimieren. Somit ist das E1 Genprodukt zwar in den virusproduzierenden Zellen vorhanden, die genetische Information für E1 wird aber normalerweise nicht in den rekombinanten Viruspartikeln verpackt und kann daher auch nicht in die zu infizierenden Zielzellen gelangen. Die erste derartige Zelllinie für die Kultur replikationsdefekter rekombinanter Adenoviren war eine mit adenoviralen DNA-Fragmenten transfizierte humane embryonale Nierenzelllinie, die sogenannten 293 Zellen¹².

2.4.4 Neukonstruktion replikationsdefekter rekombinanter Adenoviren

Neue rekombinante Adenoviren wurden durch homologe Rekombination zwischen adenoviraler DNA und der gewünschten heterologen DNA nach simultaner Transfektion geeigneter Fragmente in Cre8 Zellen erzeugt¹⁷. Als sogenannter Shuttle-Vektor für die Fremd-DNA wird ein Plasmid verwendet, das zur Vermittlung der Rekombination zusätzlich ein subgenomisches, lineares Adenovirus DNA-Fragment (typischerweise die 3' Region mit ITR und Verpackungssignal bis in die Nähe der E1 Region) enthält. Nach Rekombination der homologen Sequenzbereiche zwischen dem Plasmid und der linearen DNA entsteht ein adenovirales Genom, welches das heterologe Gen in der E1 Region trägt und von Cre8 Zellen in Viruspartikeln verpackt wird. In den Bereichen eines Zellmonolayers, in denen eine Rekombination stattfindet, bilden sich auf Grund des zytopathischen Effekts des Virus Plaques aus. Allerdings kann auch die Adenovirus-Wildtyp DNA alleine zu einem Virus verpackt werden, ohne das gewünschte Gen einzubauen. Um einen rekombinanten Virus zu isolieren, mussten herkömmlicherweise die transfizierten Zellkulturplatten mit Agar überschichtet und einzelne Plaques isoliert werden. Diese wurden vermehrt und die Rekombination mit Hilfe von Restriktionsenzymen oder durch Nachweis der Genexpression überprüft. Die Konstruktion eines einzelnen rekombinanten Adenovirus dauerte früher oft mehrere Monate. Dieser Arbeitsaufwand war lange Zeit ein entscheidender Nachteil, der die Verbreitung adenoviraler Vektoren für den Gentransfer limitierte. Zahlreiche Arbeitsgruppen bemühten sich, die Konstruktion rekombinanter Adenoviren zu erleichtern. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System von Steven Hardy und Mitarbeitern verschafft dem erfolgreich rekombinierten Virus mit der heterologen Gensequenz gegenüber dem Wildtyp-Virus einen Wachstumsvorteil in der Kultur. Es nutzt die Fähigkeit des Rekombinaseproteins Cre aus dem Bakteriophagen P1, das selektiv DNA zwischen zwei 34bp langen loxP Sequenzen entfernt und die Enden neu rekombiniert. Die adenovirale Wildtyp-DNA wurde derart verändert, dass das Verpackungssignal von zwei loxP Sequenzen flankiert ist. Das resultierende, in der vorliegenden Arbeit verwendete Virus nennt sich $\Psi 5$. Weiterhin wurde das Cre-Rekombinase Gen stabil in 293 Zellen eingebracht. In diesen Cre8 genannten Zellen wird die Replikation des $\Psi 5$ Virus konstitutiv behindert, da das Rekombinaseprotein Cre aus der neu synthetisierten Virus DNA das von loxP Sequenzen flankierte Verpackungssignal durch Exzision und Rekombination entfernt und das Virus somit nicht zusammgebaut werden kann. Für die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Adenoviren wurden die entsprechenden cDNA Fragmente aus den Expressionsplasmiden in den speziellen Shuttle-Vektor pAdlox eingesetzt. pAdlox enthält ein Verpackungssignal und eine

flankierende loxP Sequenz sowie einen CMV Promoter, einen Polylinker mit geeigneten Schnittstellen und ein SV40-Polyadenylierungssignal. In Cre8 Zellen katalysiert Cre die Rekombination zwischen dem Shuttle-Vektor und der adenoviralen DNA. Die resultierenden rekombinanten Adenoviren enthalten im Gegensatz zu zum Wildtyp-Virus $\Psi 5$ nur eine loxP Sequenz und können sich deshalb ungehindert in Cre8 Zellen vermehren. Auf diese Weise erhalten die neu rekombinierten Adenoviren den gewünschten Wachstumsvorteil. Mit Hilfe dieses Systems gelang die Neukonstruktion der gewünschten Adenoviren ohne größere Probleme. Das System ist in Abb. 4 für das Adenovirus Ad-EGFPmTRP2 graphisch dargestellt.

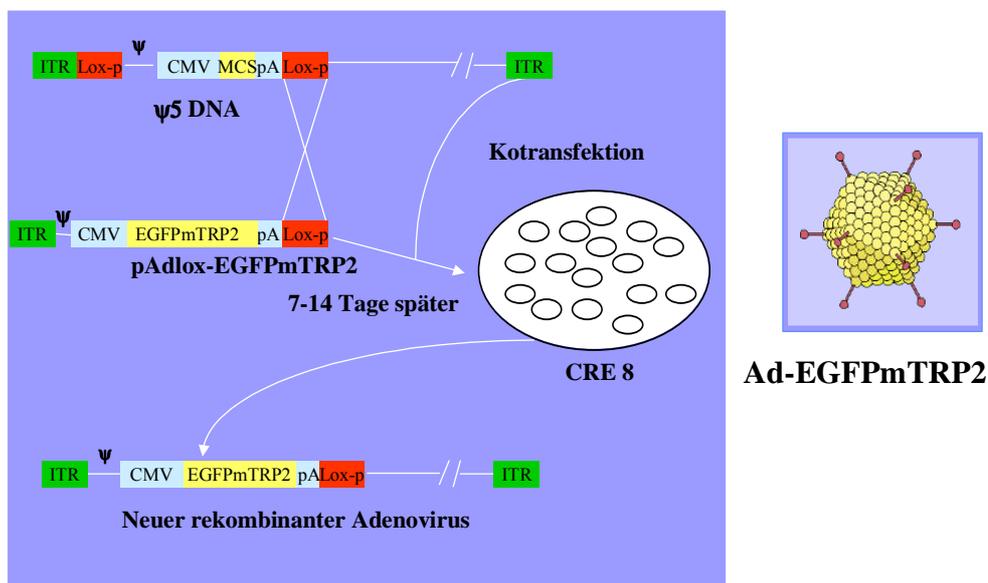


Abbildung 4

Cre-loxP-vermittelte Rekombination neuer replikationsdefekter Adenoviren

Aufgereinigte $\Psi 5$ Virus DNA wird zusammen mit linearisiertem Shuttle-Plasmid pAdlox-EGFPmTRP2 unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitation in Cre8 Zellen kotransfiziert. In Cre8 Zellen katalysiert Cre die Rekombination zwischen dem Shuttle-Vektor und der adenoviralen DNA über loxP Sequenzen.

2.4.5 Isolation von Virus- DNA aus $\Psi 5$ Virus

Die für die Rekombination neuer Viren benötigte $\Psi 5$ DNA wird aus aufgereinigtem $\Psi 5$ Virus gewonnen. Dazu wird die Virus DNA nach folgendem Protokoll aus ca. 100 μ l Virus Lsg. aufgereinigt.

1. 100µl Ψ5 Virus mit 4 µl Proteinase K, 4µl SDS(10%) und 5µl EDTA(0,5M) für 3h bei 65°C inkubieren
2. Mit Tris-HCl (10mM) wird das Volumen auf 400µl aufgefüllt.
3. 400µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugeben und 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren.
4. Wässrige Phase, die die Virus-DNA enthält in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
5. Erneut Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugeben und 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren.
6. Die Virus-DNA haltige wässrige Phase wird in ein Eppendorfgefäß überführt und zum präzipitieren mit 1/10 des Volumens an 3M Natriumacetat und dem doppelten Volumen an Ethanol (100%) vermischt. Das Gemisch wird 30 Minuten bei -20°C gelagert.
7. Das Virus-DNA Gemisch 15 Minuten bei 4°C zentrifugieren und das Pellet 2x mit je 600µl Ethanol(70%) waschen und im Speed-Vac trocknen.
8. Virus-DNA in 100 µl Wasser resuspendieren.
9. Zur Kontrolle der DNA werden 5µl der gewonnenen Virus-DNA für 1h mit BSAB I bei 60°C verdaut und anschließend die entstandenden Fragmente in einem 1% Agarosegel gegen einen Standard quantifiziert.
10. Die Virus-DNA bei -20°C lagern.

2.4.6 Linearisierung des Shuttle-Plasmids für eine effiziente CaPO₄-Transfektion

Um eine hohe Transfektionseffizienz bei der Co-Transfektion zu erreichen werden die pAdlox Shuttle Vektoren nach Standardprotokollen linearisiert.

1. pAdlox DNA (ca. 50 µg) mit Sfi 1 und Puffer 2 (NEB) für 1h schneiden.
2. DNA mit Tris pH 8 auf ein Volumen von 300 µl verdünnen.
3. 300 µl Phenol-Chloroform zugeben, 1 Min zentrifugieren.
4. Wässrige Phase (obere) in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
5. Zum Präzipitieren der DNA, 1/10 des DNA-Volumens an 3 M Natriumacetat und das doppelte Volumen an Ethanol (100%) zugeben und 30 Min bei -20°C inkubieren
6. DNA 15 Min bei 15000 rpm zentrifugieren (4°C).
7. DNA-Pellet 2x mit 500µl Ethanol (70%) waschen, zentrifugieren und im Speed-Vac trocknen.

8. DNA in 25µl Wasser resuspendieren.
9. DNA geschnitten mit SfiI vor und nach Phenol- Chloroform zur Kontrolle auf Agarosegel laufen lassen (ca. 2 µl).

2.4.7 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenolisierung ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Phenol ist ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner und kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden. So dissoziieren unter dem Einfluss von Phenol Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Phenolphase an. Chloroform stabilisiert die Grenzfläche zwischen der wässrigen und der organischen Phase. Isoamylalkohol vermindert die Schaumbildung und trägt ebenfalls zu einer sauberen Interphase bei. Die DNA in der wässrigen Phase wird mit Ethanol gefällt und gewaschen.

2.4.8 Kalzium-Phosphat-Transfektion von Cre8 Zellen

Am Tag vor der Transfektion wird eine nahezu konfluente 10cm Kulturschale mit Cre8 Zellen in eine 6-well Platte geteilt und bei 37°C inkubiert.

Pro well werden für die Transfektion 10µg aufgereinigte Ψ5 DNA und 10µg Sfi 1 linearisierte Plasmid-DNA verwendet.

Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen wurde teilweise das MBS Mammalian Transfection Kit der Firma Stratagene verwendet.

Nach 7-10 Tagen bilden sich an den Stellen, an denen das Virus sich rekombiniert, Plaques aus (kometenartige Figuren mit randständigen abgerundeten und abgelösten Zellen)

Idealerweise werden die Zellen bei voller Lyse geerntet, spätestens jedoch wenn sie sich spontan ablösen. Danach wird das Zelllysat 3x eingefroren und 0,5ml Lysat auf eine neue 6cm Kulturschale pipettiert. Spätestens nach 3 Passagen sollte in den Zellen innerhalb von 3 Tagen ein kompletter zytopathischer Effekt auftreten. In einem Kontrollansatz mit pAdlox-EGFP lässt sich die Rekombination eines neuen Virus leicht fluoreszenzmikroskopisch überprüfen.

2.4.9 Gewinnung von Virus-Zell-Lysat

1. Zehn 15 cm konfluente Kulturschalen mit 293 oder Cre8 Zellen mit je 1ml Virusvorkultur infizieren und bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
2. Nach Eintreten des zytopathischen Effekts (36-48 h) runden und lösen sich die Zellen ab.
3. Zellen und Überstand in 50ml Falcon-Röhrchen überführen. 5 Min bei 1300 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen, Zellpellet in ca. 10 ml Adeno- Resuspensions-Puffer aufnehmen und in ein 50ml Röhrchen zusammenführen. 3x in einem Trockeneis-Alkohol Gemisch einfrieren und bei 37°C im Wasserbad auftauen.
4. Das Viruslysat wird 5min bei 4°C und 2300 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält dann das freigesetzten Virus.

2.4.10 Aufreinigung von Adenoviren

Alle rekombinanten Adenoviren werden auf 293 Zellen vermehrt und in der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation aus Zell-Lysaten aufgereinigt. Das CsCl (Roth) wird durch Dialyse mit Hilfe von semipermeablen Membranen entfernt. Gereinigte Adenoviren werden in 3% Saccharose-haltigem Puffer bei -80°C gelagert. Der Titer des aufgereinigten Virus wird spektrophotometrisch durch Messung der Menge an Virus-DNA bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine OD_{260nm} etwa $1,1 \times 10^{12}$ Viruspartikeln bzw. $1,1 \times 10^{10}$ infektiöse Viren (=pfu) entspricht. Anschließend wird die spektrophotometrisch ermittelte Virusmenge mit der Transduktionseffizienz einer seriell verdünnten Viruspräparation verglichen. Dies ermöglichte eine Korrelation zwischen der spektrophotometrisch ermittelten DNA Menge und der biologischen Aktivität der rekombinanten Adenoviren¹⁷.

1. Zur Aufreinigung der Viren werden in einem Ultrazentrifugenröhrchen 3,0 ml schwere CsCl-Lösung ($\delta \approx 1,4$ g/ml) mit 3,0 ml leichter CsCl-Lösung ($\delta \approx 1,2$ g/ml) überschichtet .
2. Der CsCl-Gradient wird mit ca. 5ml Virus-Lysat überschichtet und 1h bei 4°C und 30.000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.
3. Nach der Zentrifugation erscheint der aufgereinigte Virus als hellblaue Bande im CsCl-Gradienten.

4. Zur Virusentnahme wird das Zentrifugenröhrchen in ein Laborstativ eingespannt und das Röhrchen mit einer 2ml Spritze unterhalb der Virusbande angestochen um den Virus abzusaugen.
5. Zur Aufreinigung des Virus von CsCl Rückständen wird das Virus in ein Stück gewaschenen Dialyseschlauch überführt, der Dialyseschlauch wird mit Klammern verschlossen und 2 x in 500 ml Saccharoselösung dialysiert (1.Dialyseschritt 5h 2.Dialyseschritt 12h).
6. Zur Entnahme des aufgereinigten Virus nach dem 2. Dialyseschritt wird der Inhalt des Dialyseschlauchs in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Anschließend kann der Virus aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

2.4.11 Photometrische Quantifizierung von Adenoviren

1. 2µl des Viruspreps mit dH₂O zu einem Volumen von 100µl (1:50) in einem 1,5 ml Gefäß verdünnen.
2. Am Photometer Nullwert messen (dH₂O)
3. Absorption der Probe bei 260 nm messen

$$OD_{260} * 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)} * 1,1 * 10^{12} = \text{Partikel/ml}$$
 100 Partikel entsprechen 1pfu (Plaque Forming Unit = infektiöses Virus)¹⁸

2.5 Überprüfung der Genexpression

2.5.1 Durchführung der Gene Gun Immunisierung

Die Gene Gun ermöglicht die direkte Transfektion der Haut *in vivo* mit einfachen Expressionsplasmiden¹⁹. Im Gegensatz zur Verwendung von viralen Vektoren, beruht der Gentransfer mit der Gene Gun auf einfachen physikalischen Prinzipien. Aufgereinigte Plasmid DNA wird auf Goldpartikel mit einer Größe von etwa 1-3 µm aufgebracht. Für die Transfektion der Haut ist ein Gemisch verschieden großer Partikel am wirksamsten, da aufgrund der inhomogenen Massenverteilung gleichzeitig Zellen in den oberflächlichen und in den tieferen Zellschichten erreicht werden können. Wir haben Partikel mit einem Durchmesser von 1,6 und 2,1 µm mit ähnlichem Erfolg verwendet. Mit Hilfe der Gene Gun werden die Plasmid DNA-beladenen Goldpartikel durch einen kurzen, explosionsartigen

Gasdruck von 400 psi beschleunigt. Hierbei findet das inerte Edelgas Helium Verwendung. Bei optimalen Gasdruck dringen die kleinen, aber verhältnismäßig schweren Goldpartikel ohne allzu großen Schaden in die beschossenen Zellen oder Gewebe ein. Auf diese Weise gelangt Plasmid DNA direkt in die Zellkerne der beschossenen Zellen, wo die gewünschten Gensequenzen mit Hilfe des CMV-Promotors transkribiert werden.

Das Aufbringen der Plasmid DNA auf die Goldpartikel erfolgt durch eine Kalziumchloridpräzipitation in Gegenwart von Spermidin. Hierzu wurden routinemäßig für 25mg Goldstaub 50µg DNA verwendet. Zunächst wurde die DNA in 100 µl einer wässrigen 0.05 M Spermidin-Lösung aufgenommen. Die Präzipitation erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 100 µl einer 1M CaCl₂-Lösung bei ständiger Durchmischung auf einem Vortex. Nach 10 Minuten wurden die Goldpartikel 3-4 mal mit 100% Ethanol gewaschen, um sämtliches Wasser zu entfernen. Anschließend wurden die DNA-beladenen Goldpartikel in 3,2 ml Ethanol mit 0.075 mg/ml PVP resuspendiert, kurz auf dem Vortex durchmischt und mit Hilfe eines sogenannten „Tube loaders“ horizontal in einen Tefzelschlauch geladen.

Nach 5 Minuten setzten sich die schweren Goldpartikel ab. Der Alkohol wurde abgezogen, die Goldpartikel durch Rotation auf der Innenseite des Plastikschauches verteilt und mit Stickstoffgas getrocknet. Abschließend wurde der mit Goldstaub geladene Tefzelschlauch in 1,25 cm lange Stücke geschnitten, die jeweils 1µg DNA auf 0,5 mg Gold für einen Gene Gun Schuss enthielten. Ihre Lagerung erfolgte bei 4°C unter Luftabschluss mit Trockenkapseln, um das Eindringen von Feuchtigkeit zu vermeiden.

Die Gene Gun wurde von der Firma Biorad als Helios Gene Gun System hergestellt. Die Goldpartikel wurden entweder von der Firma Biorad (München) oder von der Firma Strem Chemicals (Wiesbaden) bezogen. Der Tefzelschlauch ist ebenfalls bei der Firma Biorad erhältlich. Die verwendeten Chemikalien wurden bei der Firma Sigma und bei der Firma Roth erworben.

Die genetische Immunisierung erfolgte durch direkten Beschuss der Epidermis mit Expressionsplasmiden. Hierzu wurde die Bauchhaut der Mäuse zunächst rasiert. Die mit DNA-beladenen Goldpartikeln überzogenen Tefzel-Schlauchstücke wurden in den Zylinder der Gene Gun eingelegt und an die Heliumgasflasche angeschlossen. Am Druckregler wurde ein Gasdruck von 400 psi gewählt und jede Maus zweimal beschossen, so dass jeweils 2µg DNA auf 1mg Gold eingesetzt wurden. Die Immunisierung wurde 5 Mal im wöchentlichen Abstand durchgeführt.

2.5.2 Genetische Immunisierung mit rekombinanten Adenoviren

Die genetische Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Adenoviren erfolgte durch direkte Injektion von 5×10^8 pfu rekombinantes Adenovirus in 250 μ l PBS intraperitoneal¹⁷.

2.5.3 Grün fluoreszierendes Protein EGFP

Das grün fluoreszierendes Protein GFP wurde aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert. Dieses Protein fluoresziert aufgrund seiner charakteristischen Proteinstruktur und kann fluoreszenzmikroskopisch ohne weitere Antikörper oder Substrate nachgewiesen werden. Die entsprechende cDNA wird zum Nachweis der Genexpression mit verschiedenen Gentransfersystemen herangezogen. EGFP stellt eine Weiterentwicklung dieses neuen Reportergensystems dar und wurde durch gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins konstruiert. EGFP wird in Eukaryontenzellen besser exprimiert und weist eine wesentlich stärkere Eigenfluoreszenz auf. Außerdem lässt es sich aufgrund des in den roten Bereich verschobenen Anregungsspektrums effizient mit dem Argon-Laser bei 488nm anregen und so durchflußzytometrisch leicht detektieren²⁰. Mit Hilfe von EGFP wurde die Lokalisation der EGFP- Fusionskonstrukte auf Einzelzellebene direkt in Kulturschalen fluoreszenzmikroskopisch mit Standard FITC-Fluoreszenzfiltern analysiert. Der Nachweis von EGFP spezifischen Antikörper erfolgte im ELISA und im Westernblot.

2.5.4 β -Galaktosidase

Der Nachweis des Enzyms β -Galaktosidase in transfizierten Zellen erfolgte durch eine Färbung mit X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma). Zellen wurden für die Analyse auf Objektträger aufgeschleudert, luftgetrocknet, in 0.5% Glutaraldehyd fixiert und gefärbt.

2.5.5 Tyrosinase-related-protein 2

Die Expression des melanosomalen Proteins TRP2 in transfizierten Zielzellen erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des TRP2-spezifischen Kaninchenantiserums anti-PEP8. Als Kontrolle wurde das EGFP-spezifische Kaninchenantiserum eingesetzt. anti-PEP8 und wurden von Dr. Vincent Hearing (NIH, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt²¹. Für die Western-Blot Analyse wurden transduzierte Zellen in TNEN-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Die Zellextrakte wurden in einem 10% SDS-PAGE Gel

elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Anlegung eines elektrischen Feldes auf PVDF Membranen (Millipore) transferiert. Freie Proteinbindungsstellen auf den Membranen wurden mit Blotto für 2 Stunden (siehe unten) blockiert. Die Immundetektion von TRP2 erfolgte mit dem Kaninchenantiserum anti-PEP8 in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS + 2% Magermilchpulver + 0,1% Tween 20 für 1 Stunde gefolgt von dem Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Kaninchen IgG (Jackson Immunoresearch) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS + 2% Magermilchpulver + 0,1% Tween 20 für 1 Stunde. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe der Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (Amersham) sichtbar gemacht.

Puffer und Lösungen für Western Blot:

Bezeichnung	Zusätze und Konzentrationen	Firmen
10x Laufpuffer	247mM Tris 1,9 M Glycine 34 mM SDS gelöst in Aqua bidest eingesetzt als 1x Puffer	eurobio eurobio Merck
Transfer-Puffer	20 mMTris 150 mM Glycine 20% (v/v) Methanol gelöst in Aqua bidest	eurobio eurobio Merck
Laemmli Sample Puffer	125 mM Tris pH 6,8 30% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 0,3 µM Bromphenol blue gelöst in Aqua bidest Vor Gebrauch: 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol	Merck Merck Merck PharmaciaBiotech PharmaciaBiotech
TNEN-Lysepuffer	10mM TNEN 150mM NaCl 1% (w/v) NP 40 5mM EDTA gelöst in Aqua bidest.	PharmaciaBiotech Roth PharmaciaBiotech Merck

	Vor Gebrauch: 1:25 Complete (Protease Inhibitor)	Boehringer Mannheim
Blotto	5% (w/v) Magermilchpulver 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS gelöst	Fema, Reformhaus PharmaciaBiotech

Herstellung eines SDS-Gels:

Trenngel:

9,75 ml Aqua bidest

6,0 ml einer 1,5 mM Tris pH 8,8

220 µl einer 10% SDS-Lösung

7,92 ml einer 30% Acrylamidlösung (Rotiphorese 30 von Roth)

105 µl einer 10% APS-Lösung (PharmaciaBiotech)

10,5 µl Temed (PharmaciaBiotech)

Sammelgel:

3,95 ml Aqua bidest

1,65 ml einer 0,5 mM Tris pH 6,8

66 µl einer 10% SDS-Lösung

1,7 ml einer 30% Acrylamidlösung

66 µl einer 10% APS-Lösung

7,5 µl Temed

Zuerst wird das Trenngel gegossen. Nach Polymerisierung wird das Sammelgel darüber geschichtet.

2.6 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionskonstrukte

2.6.1 Herstellung stabiler Transfektanten zur Lokalisation der Antigenexpression

Um die intrazelluläre Expression der Fusionskonstrukte zu analysieren wurden DCEK-Zellen mit den Fusionskonstrukten stabil transfiziert. Zur Transfektion der Zellen wurde das METAFECTENE™ Transfektionsreagenz der Firma Biontex verwendet. Metafectene ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Struktur vorliegt. Die zu transfizierende DNA wird durch das Reagenz in sehr kompakte Strukturen komplexiert. Eine optimale Transkription der DNA in der Zelle wird dann durch die von Biontex entwickelte RMA- Technologie erreicht (Repulsive Membrane Acidolysis). Am Tag vor der Transfektion werden 2×10^5 DCEK Zellen /well in eine 6-well Platte plattiert und über Nacht inkubiert, so dass die Wachstumsfläche am Tag der Transfektion zu 70% bewachsen ist.

Danach werden die Transfektionslösungen A und B hergestellt.

Lösung A:

1,5µg Plasmid- DNA + 0,5µg DNA für Purumycin-Antibiotikaresistenz werden in 50µl Optimem vermischt.

Lösung B:

6µl Metafectene werden mit 50µl Optimem vermischt.

Die Lösungen A und B werden vereinigt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wird die Lösung auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und nach 24 Stunden das Medium gegen frisches Purumycinhaltiges Medium ausgetauscht.

Nach etwa 2 Wochen sind einzelne fluoreszente antibiotikaresistente Zellkolonien zu sehen, die nach Standartprotokollen weiter kultiviert werden.

2.6.2 Analyse der intrazellulären Lokalisation der Fusionskonstrukte

Um die intrazelluläre Lokalisation der Fusionskonstrukte nachzuweisen wurden stabile Transfektanten von DCEK Zellen mit den Fusionskonstrukten EGFPmTRP2aa30-519,

EsEGFPmTRP2aa30-519, EGFP, mTRP2aa1-198 EGFP, mTRP2aa30-198 EGFP und li mTRP2aa30-519 EGFP hergestellt. Die Transfektanten wurden in Nunc Tissue-chamber-slides plattiert um die Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch zu bestimmen.

Um die Lokalisation der Expression näher zu charakterisieren wurden die Zellen für 1 Stunde mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und danach mit einem Gemisch aus 1% FKS und 0,1% Saponin in PBS permeabilisiert.

Die Zellen wurden danach für eine Stunde mit einem anti-LAMP Antikörper, in einer Verdünnung 1:10 als Primärantikörper inkubiert. Gebundener Primärantikörper wurde dann mit Texas Red sulfonyl chloride konjugiertem Ziege anti-Ratte IgG in einer Verdünnung von 1:100 mit Fluoreszenzfiltern detektiert.

2.7 Analyse der Immunantwort

2.7.1 Antigene, Peptide und Proteine

Die folgenden Peptide wurden von der Abteilung für Biochemie der Universität Mainz im Fmoc-Verfahren synthetisch hergestellt und mit HPLC aufgereinigt:

ICPMYARV (H-2K^b) entsprechend aa495-504 von E. coli β -Galaktosidase²²

SVYDFVWL (H-2K^b) entsprechend aa180-188 von TRP2^{23;24}

Die Peptide wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml in PBS mit 10% DMSO (Roth) gelöst und bei -20°C gelagert.

Rekombinantes EGFP wurde in unserem Labor in Bakterien exprimiert und über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 1mg/ml in PBS eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.7.2 ELISPOT Test

Die Induktion antigenspezifischer MHC-Klasse I- restringierte CD8⁺ T Zellen wurde mit dem ELISPOT-Verfahren direkt *ex vivo* überprüft²⁵. Hierzu wurden Milzzellen von immunisierten Mäusen bzw. von naiven Kontrolltieren geerntet, Einzelzellsuspensionen hergestellt und kontaminierende Erythrozyten mit hypotoner NH₄Cl Lösung lysiert. Dazu wurden 96-Loch Millipore HA Platten für 16 Stunden mit dem monoklonalen anti-Maus IFN γ Antikörper (Klon R4-6A2, Pharmingen) in einer Konzentration von 10 μ g/ml in PBS (50 μ l/Loch) beschichtet. Nach Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen mit RPMI 1640 + 10%

FKS für 1 Stunde bei 37°C wurden 10^6 Milzzellen je Loch mit 1µg/ml synthetischem Peptid und 25 IU/ml humanem IL-2 in 0,2ml RPMI 1640 Medium restimuliert. Nach 22 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurden gebundene Zytokine mit dem biotinylierten monoklonalen Ratten anti-Maus IFN γ Antikörpers (Klon XMG1.2, 1µg/ml) in ELISA-Test-Puffer für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und nachfolgend mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:1500 in Test-Puffer für ½ Stunde detektiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit vorgefertigtem DAB-Peroxidase Substrat (Vector Laboratories, Heidelberg). Die Anzahl der Spots wurde unter einem Operationsmikroskop ausgezählt und als Mittelwert von Zwei- bzw. Dreifachmessungen angegeben. Die ELISPOT Tests wurden für jeden Versuch mindestens dreimal durchgeführt. In Vorversuchen mit aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die nachgewiesenen Spots der Anzahl IFN γ produzierender antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen entspricht. Aus Kosten- und Zeitgründen wurden dann in den ELISPOT- Tests die komplette Milzzellpopulation eingesetzt.

2.7.3 Antikörpertest

Die Induktion antigenspezifischer Antikörper wurde mit Hilfe von ELISA- bzw. Western-Blot-Techniken überprüft. Serum wurde immunisierten Mäusen oder naiven Kontrolltieren entnommen. Zum Nachweis von EGFP-spezifischen Antikörpern wurden 96-Loch-ELISA-Platten mit 10µg/ml des jeweiligen rekombinanten Proteins in Beschichtungs-Puffer für 16h bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten mit Blockierlösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurden Verdünnungsreihen der zu bestimmenden Serumproben in Test-Puffer für 2h bei 37°C inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem Peroxidase-konjugierten Esel anti-Maus IgG Antikörper (Jackson Immunoresearch) in einer Verdünnung von 1:5000 in Test-Puffer für 1 Stunde detektiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit 100µl ABTS-Substrat-Lösung. Die ELISA-Platten wurden bei 405 nm mit einem ELISA-Reader (z. B. Dynatech MR500) analysiert.

Der Nachweis TRP2-spezifischer Antikörper erfolgte wie durch Einsatz der Seren aus immunisierten Mäusen als Primärantikörper ([2.8.3.](#)) im Western Blot.

Diese Methode ist in Kapitel 2.5.5 beschrieben.

Puffer und Lösungen für ELISA

Bezeichnung	Zusätze und Konzentrationen	Firmen
Beschichtungs-Puffer	30mM Na ₂ CO ₃ 70mM NaHCO ₃ gelöst in Aqua bidest pH 9,6	Merck Merck
Blockierlösung	2% BSA 0,01% Thimerosal 0,05% Tween 20 gelöst in PBS	Sigma Merck PharmaciaBiotech
Test-Puffer:	0,5% (w/v) BSA 0,01% (w/v) Thimerosal 0,05% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS	Sigma Merck PharmaciaBiotech
Wasch-Puffer	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS	PharmaciaBiotech
ABTS-Substrat Lösung	54 mM 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazoline-6-sulfonic-acid)) 0,1M Zitronensäure vor Gebrauch: 0,03% (v/v) H ₂ O ₂	Sigma Merck

2.8 In vivo Antikörperdepletion von Lymphozyten

Hybridomzelllinien, für monoklonale Ratte anti-Maus CD4 (Klon L3T4, TIB207), Ratte anti-Maus CD8 (Klon GK1.5, TIB210), und Ratte anti-Maus Ia (Klasse II MHC; Klon M5/114, TIB120) Antikörper wurden von Dr. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie der Universität Mainz) bezogen. Diese Zelllinien wurden in RPMI mit 5% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 0.1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 0.1 mM HEPES, 50 µM 2-mercaptoethanol (2-ME), 100 IU/ml Penicillin, und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die monoklonalen Antikörper wurden aus dem Zellkulturüberstand der Hybridome über eine Protein-G-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt und im Anschluss daran gegen PBS dialysiert. Die Firma Eurogentec (Belgien) wurde beauftragt von dem Klon L3T4 ein Ratte anti-Maus CD4 Aszites zu produzieren.

Für die *in vivo* Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Induktionsphase einer Immunantwort wurden pro Maus am Tag -2 und -1 vor der Vakzinierung jeweils 250µl anti-CD4 Aszites oder 250µg anti-CD8 und zur Kontrolle 500µg anti-Ratten-IgG Antikörper i.p. injiziert.

2.9 Analyse der Tumorumabwehr

2.9.1 Experimentelle Induktion von B16 Lungenmetastasen

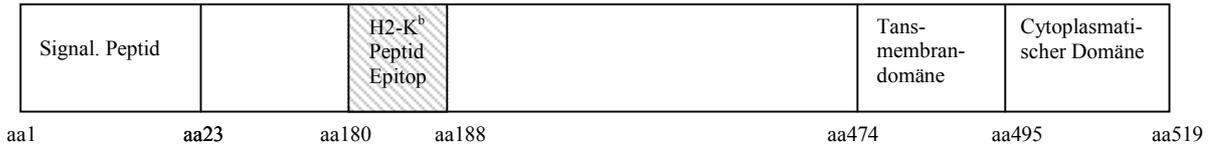
Um den Einfluss einer Immunisierung auf das Wachstum von Lungenmetastasen zu bestimmen, wurden 4×10^5 pigmentierte B16 Melanomzellen intravenös injiziert. Hierdurch werden in naiven Tieren innerhalb von 14 Tagen stark pigmentierte Lungenmetastasen induziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Lungen entnommen und die Anzahl der Melanommetastasen auf der Lungenoberfläche unter einem Operationsmikroskop gezählt. Die Resultate wurden als mittlere Anzahl Lungenmetastasen \pm Mittelwertabweichung wiedergegeben. Die experimentellen Gruppen bestanden aus jeweils 5 Mäusen und wurden 3-5 Mal durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Kopplung des melanozytären Enzyms TRP2 mit einem immunogenen Fremdprotein bricht die periphere zelluläre Immuntoleranz

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die „Gene Gun“ Immunisierung mit humaner TRP2 cDNA regelmäßig zu einer vitiligoartigen Felldepigmentierung im Bereich der beschossenen Bauchhaut führt. Dieses wurde nach Immunisierung mit murinem TRP2 nie beobachtet²⁴. Die Immunisierung mit humaner TRP2 cDNA bewirkte eine verbesserte protektive Immunabwehr von B16 Melanomzellen im direkten Vergleich mit der murinen TRP2 cDNA. Sowohl die „Gene Gun“ Immunisierung mit dem hTRP2 als auch die Injektion von rekombinanten Adenoviren für humanes TRP2 (Ad-hTRP2) führte zu einer eindeutigen Induktion TRP2-Peptid-reaktiver T-Zellen im ELISPOT-Test²⁶. Dies wurde mit murinem TRP2 nie beobachtet. Gleichzeitig war nur nach Immunisierung mit humanem, aber nicht mit murinem TRP2 die Induktion einer humoralen Immunantwort gegen humanes TRP2 mit Kreuzreaktivität für murines TRP2 im Westernblot nachweisbar. Die Aminosäuresequenz von humanem TRP2 ist zu etwa 80 % homolog der Sequenz von murinem TRP2. Identisch ist ebenfalls das H2-K^b bindende TRP2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid SVYDFFVWL.

Wir gehen davon aus, dass die Wirksamkeit der humanen TRP2 cDNA durch ein starkes CD4-Helferepitope vermittelt wird, welches in den nicht homologen Sequenzen kodiert ist. Offenbar vermag die „fremde“ hTRP2 cDNA die periphere Immuntoleranz der CD8⁺ T-Zellen aufzuheben. Wenn diese Hypothese stimmt, müsste die Kopplung der murinen TRP2 cDNA an ein immunogenes Fremdprotein den gleichen Effekt haben^{27;28}. Um den Einfluss dieser „Verfremdung“ auf die Induktion einer Immunantwort näher zu charakterisieren, verwendeten wir das immunogene Markergen EGFP²⁰. Dieses Protein fluoresziert aufgrund seiner charakteristischen Proteinstruktur, dadurch lassen sich transfizierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch direkt nachweisen. Gleichzeitig ist es immunogen und stimuliert sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten.



Das Protein der Tyrosinase Enzymfamilie Tyrosinase-related Protein 2 (TRP2)²⁹ ist ein Typ II Transmembranglykoprotein, welches mit seinem Signalpeptid (aa1-24) N-Terminal im endoplasmatischen Retikulum inseriert wird. Die Aminosäuren 474-495 sind stark hydrophob und kodieren die Transmembrandomäne. Das C-Terminale cytoplasmatische Ende aa496-519 kodiert eine endosomale Targetingsequenz. In dem Bereich aa180-188 befindet sich das H2-K^b bindende CD8⁺ spezifische Peptidepitop.

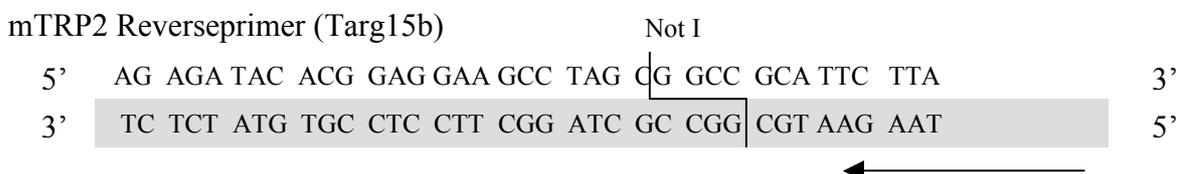
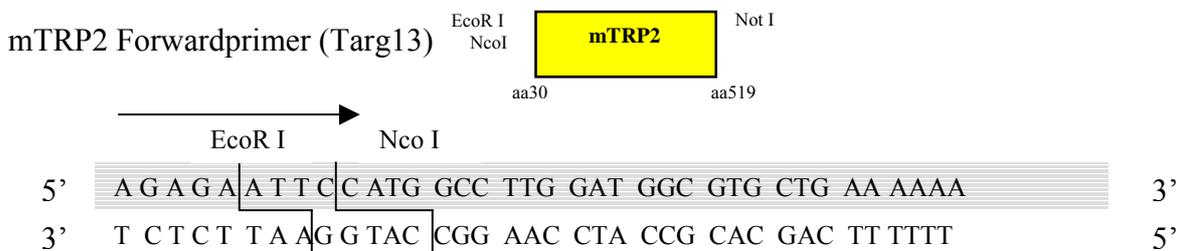
3.1.1 Konstruktion der cDNA EGFPmTRP2 aa30-519

Zur Generierung des EGFPmTRP2 aa30-519 Fusionskonstruktes wurden Primer synthetisiert, um die jeweiligen EGFP und TRP2 Fragmente mittels PCR amplifizieren zu können. ([siehe 2.3.11.](#))

Das mTRP2 Fragment wurde mit einem Forwardprimer, der an aa 30 bindet und einem Reverseprimer, der an aa 519 bindet mit den flankierenden Schnittstellen EcoR I / Nco I / Not I amplifiziert (siehe Kap. [2.3.11.](#)).

Das entsprechende EGFP Fragment wurde mit einem Primer, der an das EGFP Startkodon bindet zusammen mit einem Reverseprimer, welcher an dem Ende von EGFP bindet amplifiziert. Die Primer enthalten die für die weitere Klonierung notwendigen Sal I / Nco I / Not I Schnittstellen. Das EGFP Stopkodon ist in diesem Primer deletiert.

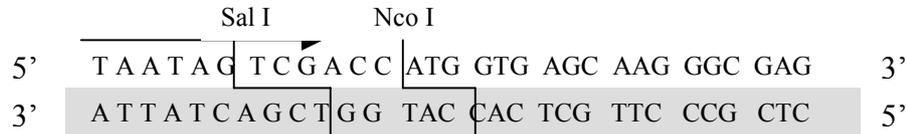
mTRP2 Fragment aa30-519:



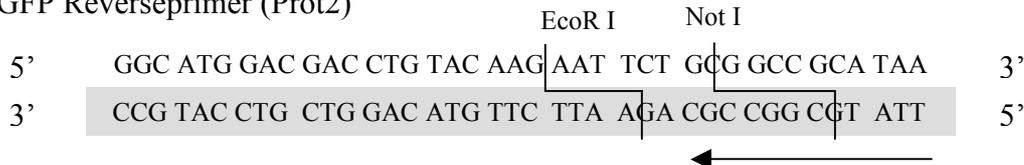
EGFP Fragment



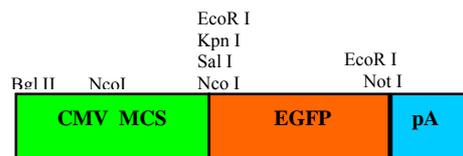
EGFP Forwardprimer (Targ9)



EGFP Reverseprimer (Prot2)

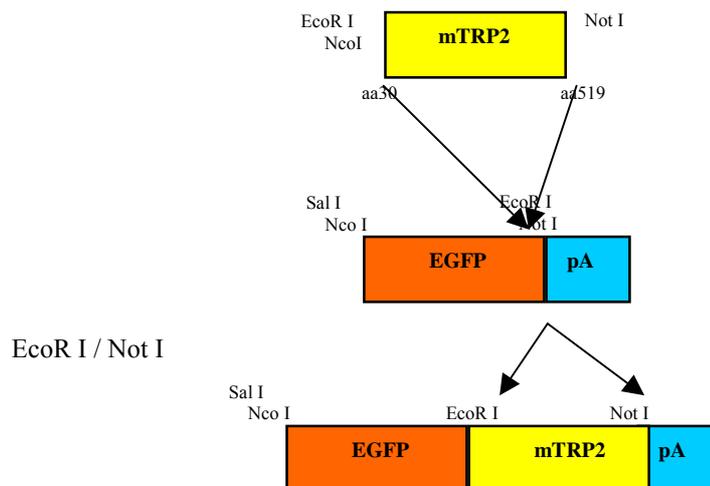


Das EGFP Fragment wurde in den Stratagene pCI Expressionsvektor ligiert.



Um nun TRP2 Fragmente in einen Klonierungsvektor ligieren zu können, in dem die flankierenden Schnittstellen nur einmal vorkommen, wurde der CMV Promoter mit Kpn I und Bgl II deletiert, mit Hilfe der Klenowpolymerase die freien Enden aufgefüllt und danach das Plasmid geschlossen. (siehe Kap. [2.3.10.](#))

Danach wurde das TRP2 Fragment EcoRI / NotI in den Klonierungsvektor ligiert .



Das so entstandene Fragment EGFPmTRP2 aa30-519 wurde Sal I / Not I im Anschluss in den vollständigen Expressionsvektor pAdlox kloniert



3.1.2 Nachweis der Expression des Fusionsproteins EGFPmTRP2 aa30-519 im Western-Blot

Um die Expression des Fusionskonstruktes nachzuweisen, wurden 293-Zellen durch Kalzium-Phosphat-Transfektion mit den Expressionsplasmiden für pAdlox-EGFPmTRP2 aa30-519 und als Kontrolle mit pAdlox-TRP2 transient transfiziert, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen (siehe Kap. 2.5.5)

Die Membranen wurden anschließend mit dem Kaninchen-Antiserum Pep8, das spezifisch an ein im C-Terminus lokalisiertes Peptid des TRP2 bindet inkubiert und mit einem anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt als Kontrolle die entsprechenden Banden von pAdlox-mTRP2. Die 55 kDa und der 75 kDa Bande entsprechen der unglykosylierten und der voll glykosylierten Form von TRP2. Die 30 kDa Bande entspricht der Größe von EGFP. Das Fusionsprotein EGFPmTRP2 aa30-519 ließ sich bei 130 kDa detektieren

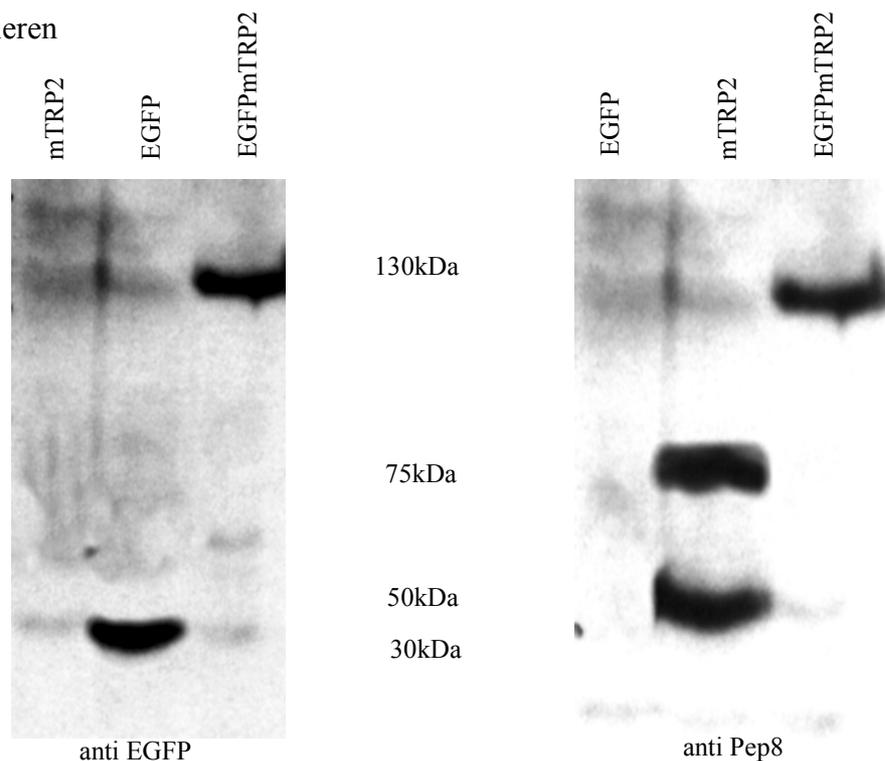


Abbildung 5 Nachweis von EGFPmTRP2 aa30-519 im Western-Blot

EGFPmTRP2 aa30-519 wurde in transfizierten 293-Zellen mittels Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden Lysate aus 293-Zellen eingesetzt. Zur Detektion wurden ein Kaninchenantiserum (anti Pep8), welches an den C-Terminus von TRP2 bindet und ein gegen EGFP gerichtetes polyklonales Kaninchenantiserum (anti EGFP) verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Sekundärantikörpern gegen Kaninchen IgG gerichtet detektiert.

3.1.3 Nachweis der Immunantwort nach Immunisierung mit EGFPmTRP2 aa30-519

Um die Frage zu beantworten, ob sich mit EGFPmTRP2aa30-519 eine Immunantwort induzieren lässt, wurden C57BL/6 Mäuse bioballistisch mit der EGFPmTRP2aa30-519 cDNA und als Kontrolle mit der cDNA von mTRP2, hTRP2, EGFP und EGFP+mTRP2 immunisiert. (siehe Kap. 2.5.1.) In der EGFP+mTRP2 Gruppe wurden beide Plasmide zusammen auf Gold präzipitiert, so dass nach der Immunisierung beide Proteine in der gleichen Zelle exprimiert werden.

In Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte nur nach Immunisierung mit huTRP2 eine eindeutige Immunantwort erzielt werden

Der Ablauf der genetischen Immunisierung ist in Abb.6 dargestellt. Die Wirksamkeit der Immunisierung wurde ab Tag 35 überprüft. Getestet wurde die Induktion von TRP2 spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Antikörper sowie das Entstehen einer vitiligoartigen Felldepigmentierung.

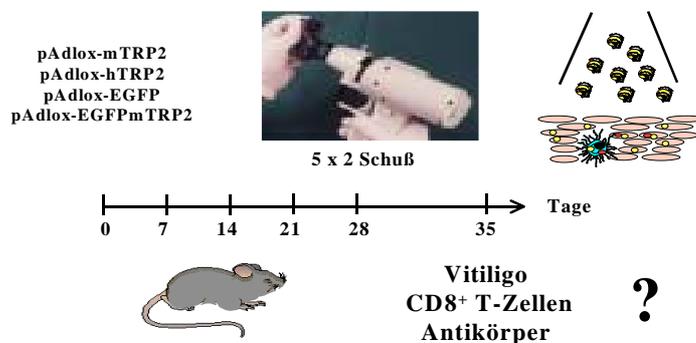


Abbildung 6

Schema der Gene-Gun Immunisierung mit Plasmid DNA

Die Plasmid DNA wird an Goldpartikel gekoppelt und mit der Gene Gun in die Epidermis geschossen. Bei der Immunisierung werden 2µg Plasmid-DNA (1µg pro Schuss) appliziert. Die Mäuse werden in wöchentlichem Rhythmus insgesamt 5x entweder mit pAdlox-mTRP2, pAdlox-hTRP2, pAdlox-EGFP und pAdlox-EGFPmTRP2 aa30-519 immunisiert. Ab Tag 35 werden die Mäuse bezüglich der Entstehung einer vitiligoartigen Depigmentierung, sowie der Induktion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und Antikörpern untersucht.

3.1.4 Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen

2-3 Wochen nach Ende der Immunisierung fiel in der EGFPmTRP2 aa30-519 immunisierten Gruppe ein Verlust der Pigmentierung im nachwachsenden Fell im Bereich der rasierten Bauchhaut auf. Wie von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, führt eine Immunisierung mit hTRP2 zu einer vitiligoartigen Felldepigmentierung. Das humane TRP2 bewirkt offensichtlich eine kreuzreaktive Immunantwort gegen das murine TRP2 in den Melanozyten der Maus. Dieses führt zur Zerstörung der Melanozyten und führt zum Verlust des Pigmentes in den Haaren. Durch die "Verfremdung" des murinen TRP2 mit EGFP ist man ebenfalls in der Lage die periphere Toleranz gegen Selbstantigene zu durchbrechen und induziert so eine autoimmune Zerstörung der Melanozyten.

Einige Mäuse wurden daraufhin am Rücken rasiert, um die Hautareale die nicht direkt mit Plasmid-DNA beschossen wurden auf eine mögliche Felldepigmentierung zu untersuchen. Hier wuchs das Fell ebenfalls weiß nach. Im Gegensatz dazu entwickelten keine der C57BL/6 Mäuse die mit mTRP2 ,EGFP oder EGFP+mTRP2 eine Felldepigmentierung.

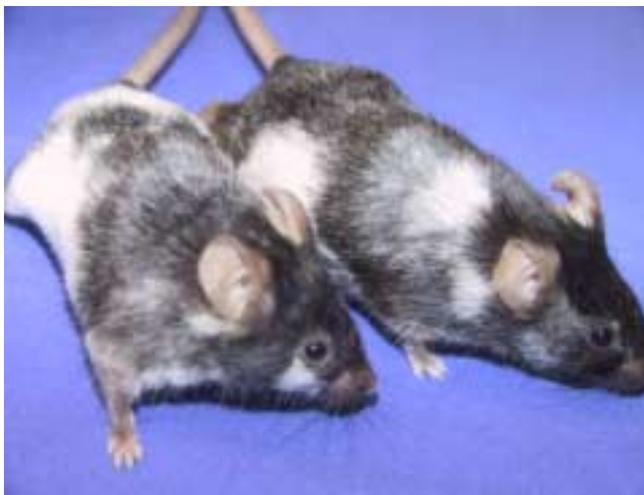


Abbildung 7

Autoimmune Vitiligo nach genetischer Immunisierung mit EGFPmTRP2 cDNA

C57Bl/6 Mäuse wurden in wöchentlichem Rhythmus insgesamt 5x mit EGFPmTRP2aa30-519 Gene Gun-
immunisiert. 2-3 Wochen nach Abschluß der Immunisierung stellte sich im Bereich des beschossenen Hautareals
am Bauch eine Depigmentierung des nachwachsenden Fells ein.

3.1.5 Nachweis von TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten

Wir vermuten, dass die Stimulation von EGFP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen Hilfe für die Induktion von autoreaktiver TRP2 spezifischen CD8⁺ T-Zellen bieten. Um TRP2 spezifische CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen, wurden Milzzellen von immunisierten Mäusen isoliert und im ELISPOT-Test getestet. Diese Methode der T-Zell Analyse beruht auf dem Nachweis der IFN- γ Produktion nach Antigen-Restimulation *in vitro* mit einem modifizierten ELISA-Verfahren. Das von einzelnen T-Zellen gebildete IFN- γ wird durch einen auf die Platte geschichteten Antikörper gebunden und mit einem zweiten Antikörper und entsprechenden Sekundärreagenzien als 'Spot' sichtbar gemacht (siehe Kapitel [2.7.2](#)) EGFP spezifische CD8⁺ T-Zellen können im ELISPOT-Assay nicht nachgewiesen werden, da bis zum heutigen Tag kein H2-K^b bindendes EGFP Peptid bekannt ist. Wie in Abbildung 8 gezeigt, konnte in der pAdlox-EGFPmTRP2 aa30-519 immunisierten Gruppe eindeutig eine Induktion von TRP2-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl der Spots entsprach der Anzahl aus der pAdlox-hTRP2 immunisierten Gruppe. In den Mäusen, die mit pAdlox-EGFP, pAdlox-mTRP2 und pAdlox-mTRP2 + pAdlox-EGFP immunisiert wurden, konnten keine TRP2-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden und keine der Lymphozyten reagierte auf das als Kontrollpeptid eingesetzte H2-K^b bindende Peptid β gal₄₉₅₋₅₀₄. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, dass durch die Fusion von mTRP2 mit EGFP die periphere Toleranz aufgehoben werden kann und man so in der Lage ist, TRP2 spezifische T-Zellen zu induzieren. Nach der Gene-Gun Immunisierung mit beiden Plasmiden EGFP und mTRP2 konnten keine TRP2-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, obwohl beide Proteine in der gleichen Zelle exprimiert werden. Antigen-spezifische T-Zellen konnten nur bei direkter Fusion von TRP2 mit dem immunogenen Fusionspartner EGFP nachgewiesen werden.

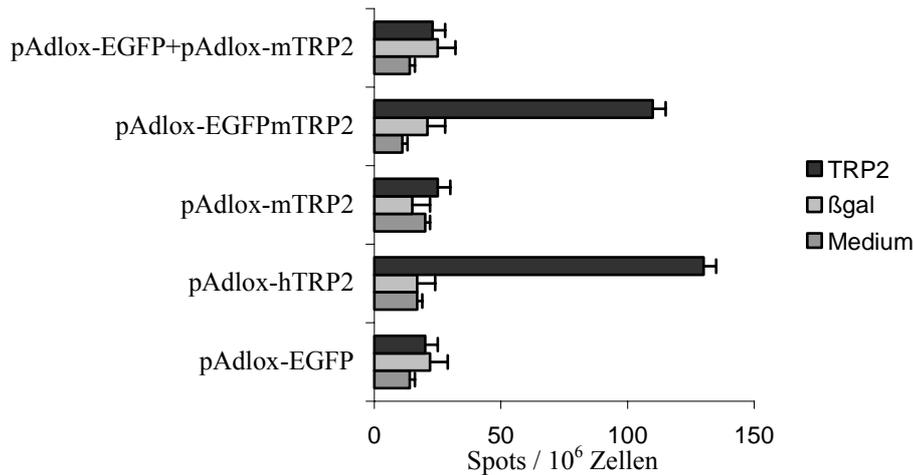


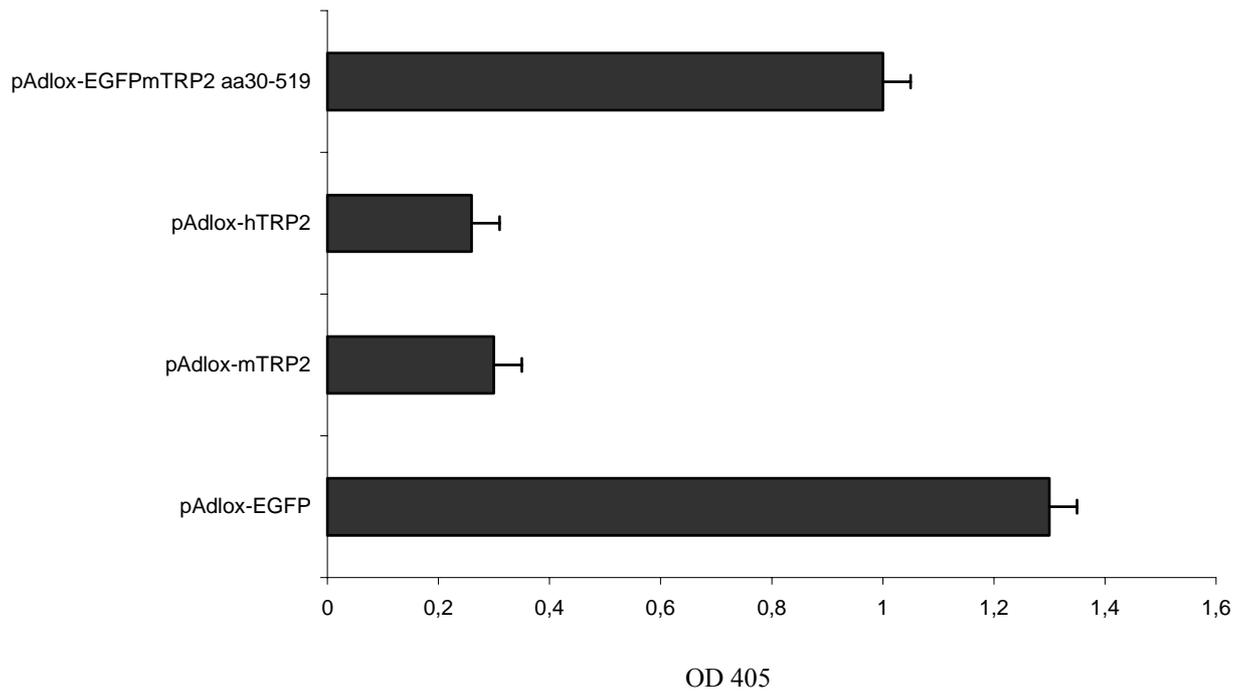
Abbildung 8

Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen

C57BL/6 Mäuse wurden wie angegeben mit der Gene Gun immunisiert. Milzzellen aus immunisierten Mäusen wurden in IFN γ ELISPOT Assay mit dem TRP2₁₈₀₋₁₈₈ restimuliert. Nach 22 Stunden wurde die Antigen-spezifische IFN γ -Freisetzung einzelner Lymphozyten sichtbar gemacht. Dargestellt ist die Anzahl Spots pro 10⁶ Milzzellen aus Dreifachmessungen \pm Mittelwertabweichung.

3.1.6 Induktion von EGFP- und TRP2 -spezifischen Antikörpern

Allen immunisierten Mäusen wurden Serumproben entnommen und auf spezifische Antikörper für EGFP und murines TRP2 untersucht. (siehe Kapitel [2.7.3](#)) EGFP-spezifische Antikörper wurden in einem EGFP Sandwich-ELISA bestimmt. Dabei wurden ELISA-Platten mit rekombinantem EGFP beschichtet. Im Serum enthaltene EGFP-spezifische Antikörper binden an das Protein und können mit sekundärem anti-Maus IgG Antikörpern und einer Farbreaktion spektrophotometrisch bestimmt werden. Wie Abb. 9 zeigt wird eine hohe Konzentration von EGFP spezifischen Antikörpern in den Seren von pAdlox-EGFP und pAdlox-EGFPmTRP2aa30-519 immunisierten Mäusen bestimmt. Die Bildung von EGFP-spezifischen Antikörpern scheint ein Indiz für eine “CD4⁺ T-Zell Hilfe“ zu sein.

**Abbildung 9****Induktion von EGFP-spezifischen Antikörpern nach Gene-Gun Immunisierung mit EGFPmTRP2 aa30-519**

C57BL/6 Mäuse wurden mit der Gene-Gun 5x immunisiert. 2-3 Wochen später wurden Seren entnommen und auf Antikörper gegen EGFP mittels ELISA untersucht. Aufgetragen sind die OD-Werte gemessen bei 405nm und einer Serumverdünnung von 1:250.

Um zu untersuchen, ob durch den Einfluss der “CD4 Hilfe“ TRP2-spezifische Antikörper induziert werden können, wurden diese versucht im Western-Blot Verfahren nachzuweisen (siehe Kap. [2.5.5](#)).

Da aufgereinigtes oder rekombinantes TRP2 nicht zur Verfügung stand, wurde zum Nachweis von Antikörpern gegen TRP2 ein Western-Blot Verfahren unter Verwendung von Lysaten aus B16 Melanomzellen und Adenovirus transduzierten 293 Zellen durchgeführt. Um Lysate für den Western-Blot zu erhalten, wurden 293 Zellen mit Adenoviren für mTRP2 und EGFP transduziert, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF Membranen übertragen.

Die Membranen wurden anschließend mit den Seren der Mäuse als Primärantikörper inkubiert und mit anti-Maus IgG Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Wie in Abb.10 zu sehen ist, reagiert das Serum von pAdlox-EGFPmTRP2aa30-519 immunisierten Mäusen nicht mit Lysaten aus B16 oder mTRP2 transduzierten 293 Zellen. Das Serum von pAdlox-hTRP2 immunisierten Mäusen reagiert mit der 55kDa und 75kDa Bande von TRP2.

Das Fehlen von Antikörpern gegen TRP2 in den Seren von pAdlox-EGFPmTRP2aa30-519 immunisierten Mäusen ist möglicherweise auf die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation und intrazelluläre Prozessierung zurückzuführen.

Dem Fusionsprotein EGFPmTRP2aa30-519 fehlt die N-Terminale Insertionssequenz aa1-24 und es wird deshalb im Cytosol synthetisiert. Daher ist das Protein nicht glykosyliert.

Das native TRP2, welches die Insertionssequenz enthält, ist als Transmembranprotein im endoplasmatischen Retikulum inseriert, in welchem es zum Teil glykosyliert wird und zu den Melanosomen wandert. Die beiden Proteine besitzen somit zwei völlig verschiedene Tertiärstrukturen und können somit eine unterschiedliche humorale Immunantwort in Form einer Antikörperbildung induzieren.

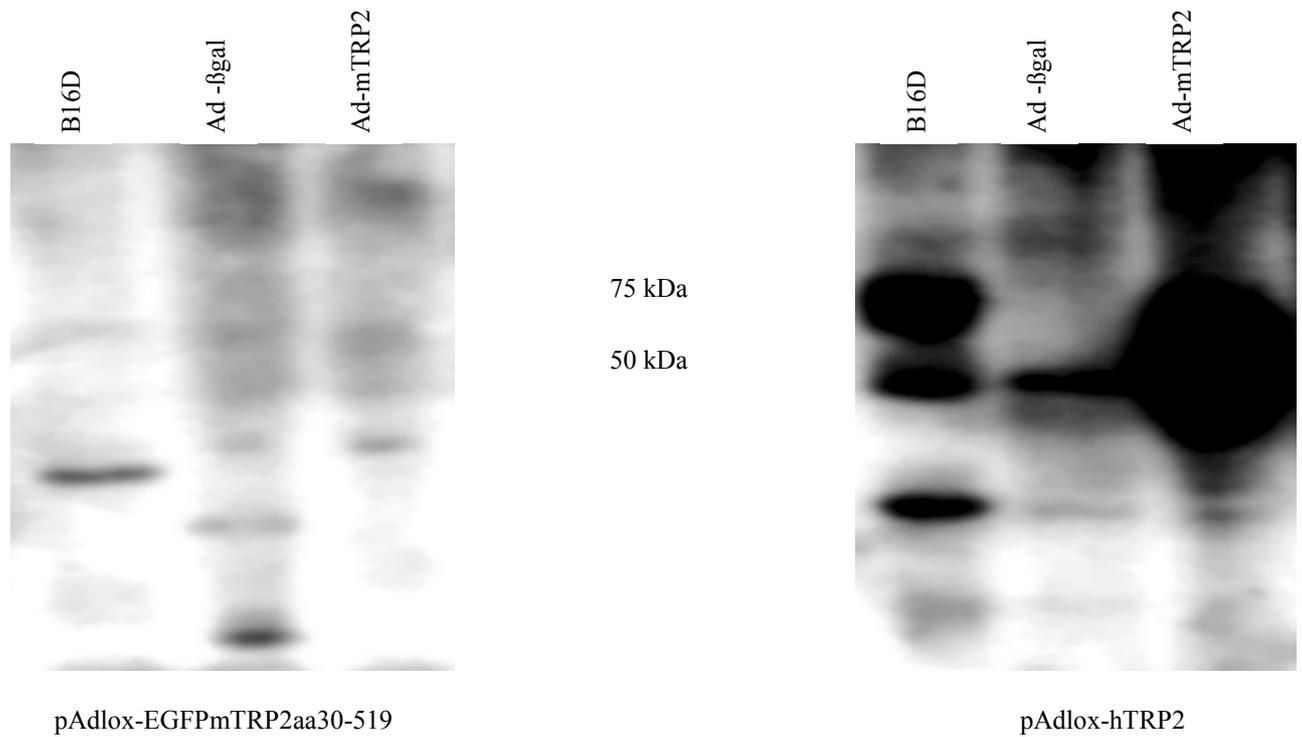


Abbildung 10

Nachweis TRP2-spezifischer Antikörper nach Gene Gun Immunisierung

Mäuse wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden Gene Gun immunisiert. TRP-2 spezifische Autoantikörper in den Seren der immunisierten Tieren wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden Lysate aus B16 Melanomzellen sowie Adenovirus-transduzierten 293 Zellen (Ad-βgal bzw. Ad-hTRP2) eingesetzt. Antikörper im Serum immunisierter Mäuse binden an humanes TRP2 aus transduzierten 293 Zellen bzw. an murines TRP2 aus B16 Melanomzellen und können mit Sekundärantikörpern gegen Maus IgG detektiert werden. Das Lysat aus Ad-βgal-transduzierten 293 Zellen diente als Kontrolle.

3.1.7 Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen

Aufgrund der geringen Effektivität der Gene-Gun Immunisierung im Hinblick auf eine Tumorabwehr wurden alternativ zu den Expressionsplasmiden rekombinante Adenoviren für die genetische Immunisierung erprobt. Frühere Arbeiten im experimentellen B16 Melanommodell der Maus zeigen, dass die Injektion von rekombinantem Adenovirus für hTRP2 eine sehr wirksame Immunabwehr induzieren kann^{30,31} (siehe Kap. [2.5.2](#))

Dieses virale Gentransfersystem eignet sich für die genetische Immunisierung und ist vergleichsweise ungefährlich. Rekombinante Adenoviren sind in der Lage in vielen verschiedenen Zelltypen eine starke transiente Genexpression zu bewirken. Anders als bei retroviralen Vektoren ist dabei keine Zellproliferation erforderlich. Der Adenovirus für EGFPmTRP2aa30-519 wurde durch Cre-lox Rekombination nach Dr. Steven Hardy rekombiniert und nach Standardprotokollen vermehrt und aufgereinigt.

Die Immunisierung erfolgte durch eine einmalige intraperitoneale Gabe von 5×10^8 pfu des jeweiligen Adenovirus. Nach 14 Tagen wurde die Abwehr von Tumorzellen im Lungenmetastasenmodell getestet (siehe Kap. [2.8.1](#))

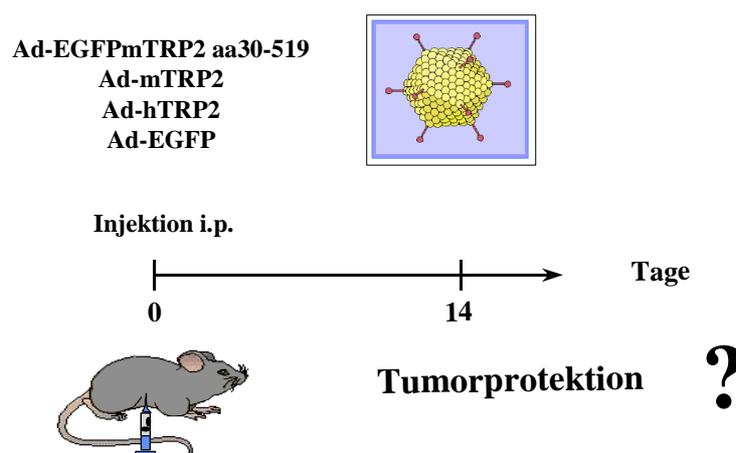


Abbildung 11

Schema der Immunisierung mit rekombinanten Adenoviren

5×10^8 pfu rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren wurden intraperitoneal in die Mäuse injiziert. An Tag 14 wurde die Induktion einer Tumorprotektion untersucht.

Gruppen von Mäusen wurden mit Adenoviren für EGFP, EGFPmTRP2 aa30-519, mTRP2, hTRP2 und EGFP+mTRP2 immunisiert. Anschließend wurde die Induktion einer Tumorabwehr überprüft. Abb. 12 zeigt, dass die Immunisierung mit EGFPmTRP2 und hTRP2 zu einer vollständigen Tumorprotektion führte.

Die Injektion von mTRP2, EGFP oder die Kombination von EGFP und mTRP2 bietet keinen Schutz vor dem Wachstum von B16 Lungenmetastasen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Fusion mit einem immunogenen Protein notwendig ist, um eine Tumorprotektion zu induzieren.

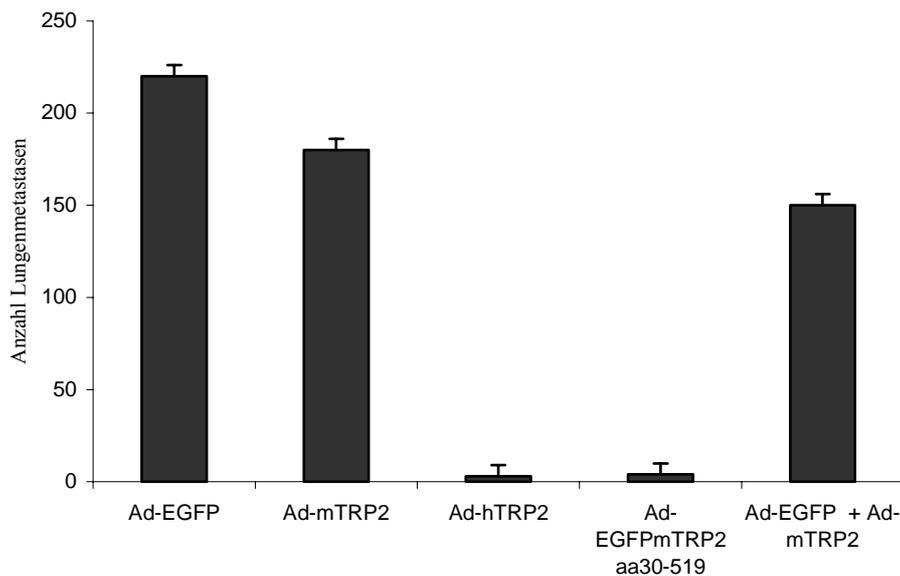


Abbildung 12

Protektion gegen das Wachstum von B16 Lungenmetastasen nach Immunisierung mit Adenoviren

C57Bl/6 Mäuse wurden durch Injektion mit den angegebenen Adenoviren immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungenmetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und das Tumorwachstum analysiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl Melanometastasen auf den Lungenoberflächen \pm Mittelwertabweichung. Die Immunisierung mit hTRP2 und EGFPmTRP2aa30-519 Adenoviren verhindern die Metastasierung von Melanomzellen.

3.2 Analyse der immunologisch relevanten Fragmente von TRP2

Mit dem Fusionskonstrukt EGFPmTRP2aa30-519 konnte gezeigt werden, dass durch die Fusion mit dem starken Fremdartigen EGFP die periphere Toleranz aufgehoben werden kann. Es kommt zur Induktion von potentiell autoreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten, die Melanozyten und Melanomzellen zerstören können (Pigmentverlust).

Um den Einfluss der Verfremdung näher zu charakterisieren und die für eine starke Immunantwort notwendigen immunogenen Bereiche von murinem TRP2 näher zu lokalisieren wurden weitere EGFPmTRP2aa30-519 Fusionskonstrukte generiert. Das TRP2 Fragment aa30-519 wurde durch die beiden TRP2 Fragmente mTRP2 aa30-188, welches das H2-K^b bindende CD8 Epitop noch enthält und durch das mTRP2 Fragment aa30-179, welches das Epitop nicht mehr enthält ersetzt. Mit diesen beiden Konstrukten sollte die Frage beantwortet werden, ob das CD8 Epitop für einen Schutz vor der Metastasierung des B16 Melanoms notwendig ist. Weiterhin wurden die Mäuse mit einem Konstrukt immunisiert, welches EGFP fusioniert mit dem CD8 Epitop mTRP2 aa180-188 enthält. Mit diesem Konstrukt sollte die Frage geklärt werden ob, alleine die Fusion des Peptidepitops mit einem immunogenen Antigen ausreicht, die periphere Toleranz aufzuheben und eine wirkungsvolle Tumorphotektion zu induzieren (siehe Kap. [2.8.1](#)).

3.2.1 Konstruktion von EGFPmTRP2-Vektoren zur Analyse der immunologisch relevanten Fragmente von TRP2

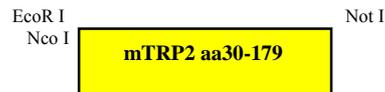
Die beiden TRP2 Fragmente mTRP2 aa30-188 und mTRP2 aa 30-179 wurden mittels PCR amplifiziert. (Kap. [2.3.11.](#)).

Die Forwardprimer besitzen wiederum eine Nco I und EcoR I Schnittstelle, die Reverseprimer enthalten eine Not I Schnittstelle.

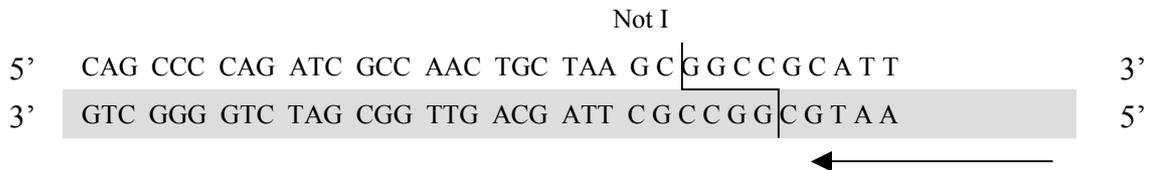
Forwardprimer für mTRP2 aa30-188 und mTRP2 aa30-179 (Targ13)



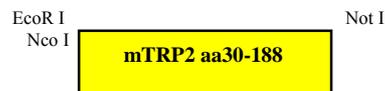
muTRP2 aa30-179



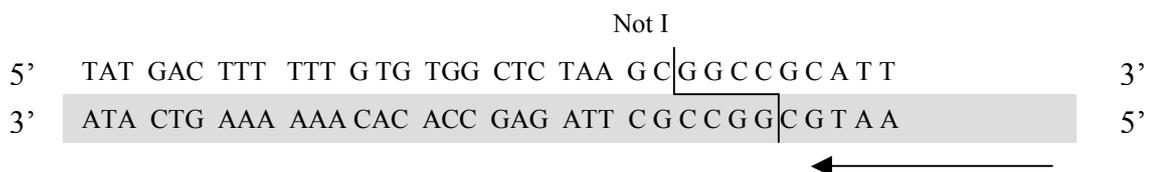
Reverseprimer für mTRP2 aa30-179 (Targ24)



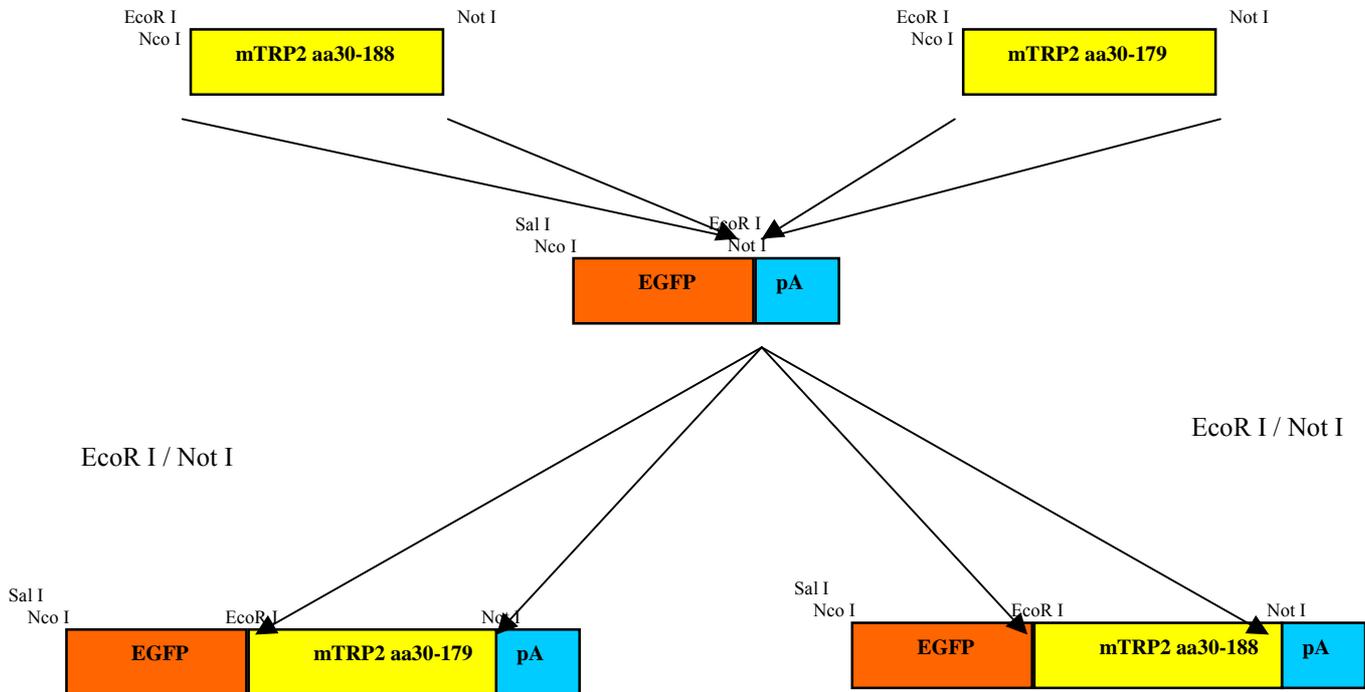
muTRP2 aa30-188



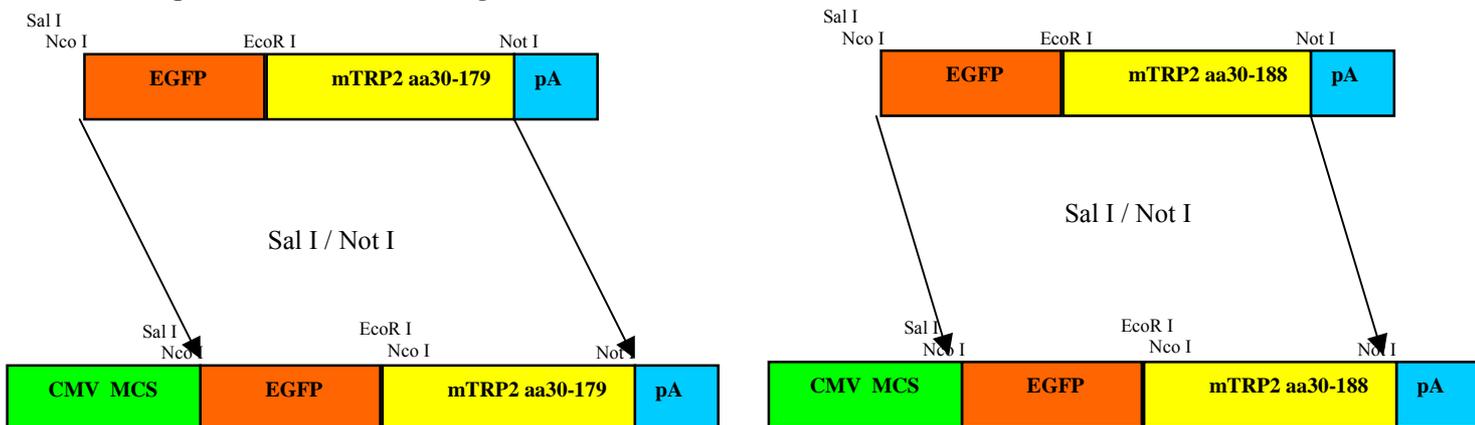
Reverseprimer für mTRP2 aa30-188 (Targ25)



Die beiden mTRP2 Fragmente aa30-179 und aa 30-188 wurden als EcoR I / Not I Fragmente in den deletierten EGFP-Klonierungsvektor ligiert. (siehe Kapitel [2.3.10.](#))

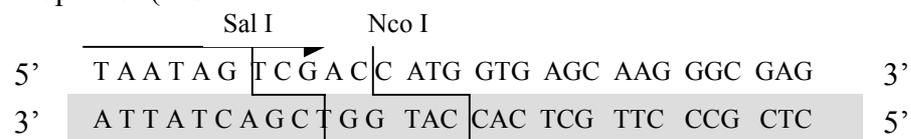


Danach wurden die EGFPmTRP2 Konstrukte als Sal I / Not I Fragmente in den pAdlox Expressionsvektor übertragen.

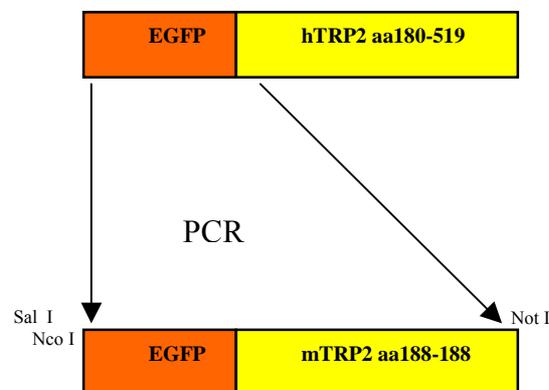
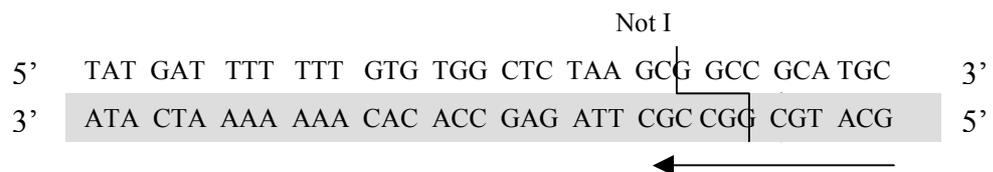


Um das Fragment EGFPmTRP2 aa180-188 mit der PCR generieren zu können, wurde in dem Vektor Δ EGFPmTRP2aa30-519 das TRP2 Fragment durch das aus früheren Arbeiten stammende hTRP2aa180-519 ausgetauscht. Das Konstrukt EGFPPhTRP2aa180-519 diente dann als Template für die PCR-Reaktion. Diese wurde mit einem Forwardprimer, der an EGFP bindet zusammen mit einem Reverseprimer, der an dem TRP2 CD8 Peptidepitop bindet verwendet. Der Forwardprimer besitzt eine Sal I und eine Nco I Schnittstelle, der Reverseprimer eine Not I Schnittstelle.

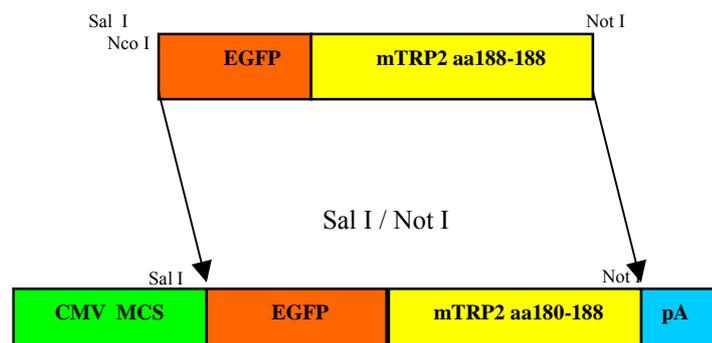
EGFP Forwardprimer (Prot9)



EGFP Reverseprimer mTRP2 aa180-188 (Targ19)



Danach wurde das Fusionsprotein EGFPmTRP2 aa180-188 mit den Schnittstellen Sal I und Not I in den pAdlox Expressionsvektor ligiert.



3.2.2 Nachweis der Genexpression im Western-Blot

Um die Expression der verkürzten Fusionskonstrukte nachzuweisen, wurden wiederum 293-Zellen durch Kalzium-Phosphat-Transfektion mit den Expressionsplasmiden für EGFPmTRP2 aa30-179, EGFPmTRP2 aa30-188, EGFPmTRP2 aa180-188 und als Kontrolle mit EGFP transient transfiziert, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membranen wurden anschließend mit einem polyklonalen anti-EGFP-Kaninchenantiserum als Primärantikörper inkubiert und mit einem anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper detektiert. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, entspricht die Bande von 30kDa EGFP und EGFPmTRP2 aa180-188. Die deutlich größeren Banden von 60 kDa entsprechen EGFPmuTRP2 30-179 und EGFPmuTRP2 30-188 .

(siehe Kapitel [2.6.3.](#))

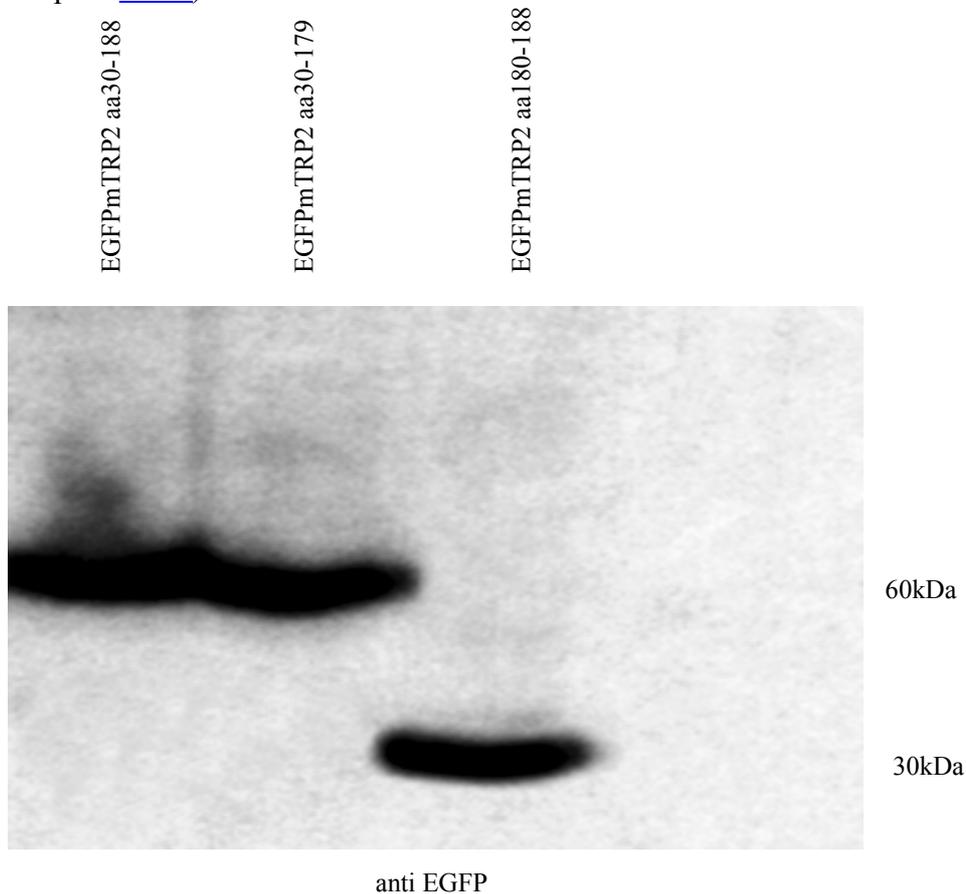


Abbildung 13

Nachweis der EGFPmTRP2 Konstrukte im Western-Blot

EGFPmTRP2 aa30-179, EGFPmTRP2 aa30-188 und EGFPmTRP2 aa180-188 wurden in transfizierten 293-Zellen mittels Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden Lysate aus 293-Zellen eingesetzt. Zur Detektion wurden ein gegen EGFP gerichtetes polyklonales Kaninchenantiserum (anti EGFP) verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Sekundärantikörpern gegen Kaninchen IgG detektiert.

3.2.3 Aufklärung der Mechanismen zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nach Gene-Gun Immunisierung

Wie in den vorigen Experimenten erfolgte die genetische Immunisierung zur Induktion einer Immunantwort durch direkten Beschuss der Bauchhaut von C57BL/6 Mäusen mit den Expressionsplasmiden für EGFPmTRP2 aa30-188, EGFPmTRP2 aa30-179, EGFPmTRP2 aa180-188 und als Kontrolle EGFPmTRP2 aa30-519 (siehe Kapitel [2.5.1](#))

Nach Abschluss der Immunisierung wurden die Mäuse auf die Induktion von Antikörpern, TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie das Entstehen einer vitiligoartigen Felldepigmentierung untersucht.

3.2.4 Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen

In den Gruppen welche mit EGFPmTRP2 aa180-188, EGFPmTRP2 30-188 und als Kontrolle mit EGFPmTRP2 aa30-519 zeigte sich ein Verlust der Pigmentierung im nachwachsenden Fell. Keine Depigmentierung zeigte sich in der Gruppe, welche mit EGFPmTRP2 aa30-179 immunisiert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Verlust der Pigmentierung und damit die Zerstörung der Melanozyten von CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für das TRP2 Peptid aa180-188 abhängig sind. Die Depigmentierung in der EGFPmTRP2 aa180-188 immunisierten Gruppe weist darauf hin, dass das Peptid alleine mit CD4 spezifischer Hilfe durch das immunogene Antigen EGFP ausreicht um die Melanozyten zu zerstören.



pAdlox-EGFPmTRP2 aa 30-188

pAdlox-EGFPmTRP2 aa 30-179

pAdlox-EGFPmTRP2 aa 180-188

Abbildung 14

Autoimmune Vitiligo nach genetischer Immunisierung mit EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten

C57Bl/6 Mäuse wurden in wöchentlichem Rhythmus insgesamt 5x mit EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten Gene Gun-immunisiert. 2-3 Wochen nach Abschluss der Immunisierung stellte sich im Bereich des beschossenen Hautareals in den mit EGFPmTRP2 aa30-188 und EGFPmTRP2 180-188 immunisierten Mäusen am Bauch ein Verlust der Pigmentierung ein.

3.2.5 Nachweis EGFP-spezifischer Antikörper

Der Nachweis der Antikörper erfolgte für EGFP im ELISA. (siehe Kap. [2.7.3.](#)).

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, reagierte das Serum der mit EGFP-Fusionskonstrukten immunisierten Mäuse mit dem EGFP Protein der beschichteten ELISA-Platte. Kontrollserum von mTRP2 immunisierten Mäusen zeigten keine spezifischen Antikörper.

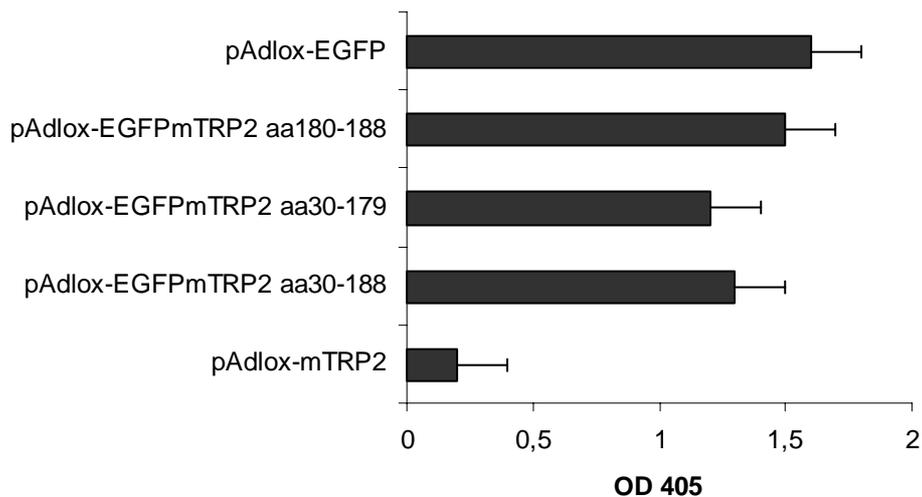


Abbildung 15

Induktion von EGFP- spezifischen Antikörpern nach Gene-Gun Immunisierung mit EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten

C57BL/6 Mäuse wurden mit der Gene-Gun immunisiert. 2-3 Wochen später wurden Seren entnommen und auf Antikörper gegen EGFP mittels ELISA untersucht. Aufgetragen sind die OD-Werte gemessen bei 405nm und einer Serumverdünnung von 1:250.

3.2.6 Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort

Zum Nachweis von TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden 10-14 Tage nach Abschluss der Gene-Gun Immunisierung die Milzzellen isoliert und die Induktion von Peptid spezifischen T-Zellen in ELISPOT Analysen überprüft.

Dabei wurde wiederum die spezifische IFN γ -Freisetzung von Lymphozyten nach Stimulation mit dem H2-K^b bindenden TRP2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid getestet (siehe Kap. [2.7.2.](#)).

Wie zu erwarten wiesen EGFPmTRP2aa30-179 immunisierten Mäuse nach Restimulation keine TRP2 spezifischen T-Zellen auf. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in dem verwendeten Konstrukt das CD8 spezifische Peptidepitop nicht mehr vorhanden ist.

Die Restimulation mit TRP2-Peptid zeigt in den Lymphozyten von EGFPmTRP2 aa30-188 und EGFPmTRP2 aa180-188 immunisierten Tieren eine starke Stimulation von TRP2-spezifischen T-Zellen .

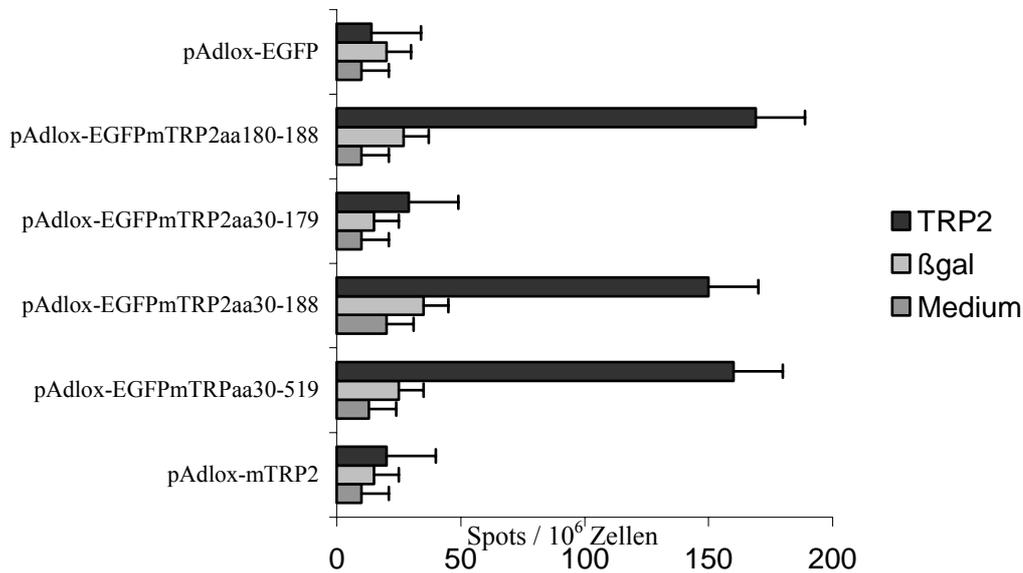


Abbildung 16

Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen

Milzzellen aus immunisierten Mäusen wurden in IFN γ ELISPOT Assay mit dem TRP2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid restimuliert. Nach 22 Stunden wurde die Antigen-spezifische IFN γ -Freisetzung einzelner Lymphozyten sichtbar gemacht. Dargestellt ist die Anzahl Spots pro 10⁶ Milzzellen aus Dreifachmessungen \pm Mittelwertabweichung.

3.2.7 Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen nach Immunisierung mit rek. Adenoviren

Aufgrund der geringen Effektivität der Gene-Gun Immunisierung im Hinblick auf eine Tumorabwehr wurden rekombinante Adenoviren für die Fusionskonstrukte generiert. Wie in den vorherigen Experimenten beschrieben, wurden Mäuse mit Adenoviren immunisiert und im Anschluss die Induktion einer Tumorimmunabwehr überprüft (siehe Kapitel [2.8.1](#))

In Abb. 17 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt. Gezeigt ist die mittlere Anzahl von Lungenmetastasen in den jeweiligen Gruppen.

Während Ad-EGFP Kontroll-immunisierte durchschnittlich 220 Metastasen aufwiesen, war die Anzahl Lungenmetastasen in Ad-EGFPmTRP2 aa180-179 immunisierten Tieren mit 80 Metastasen signifikant geringer. Mäuse, die mit Ad-EGFPmTRP2aa180-188 oder Ad-EGFPmTRP2aa30-188 immunisiert wurden zeigten einen kompletten Schutz gegen das Wachstum von Metastasen in den Lungen.

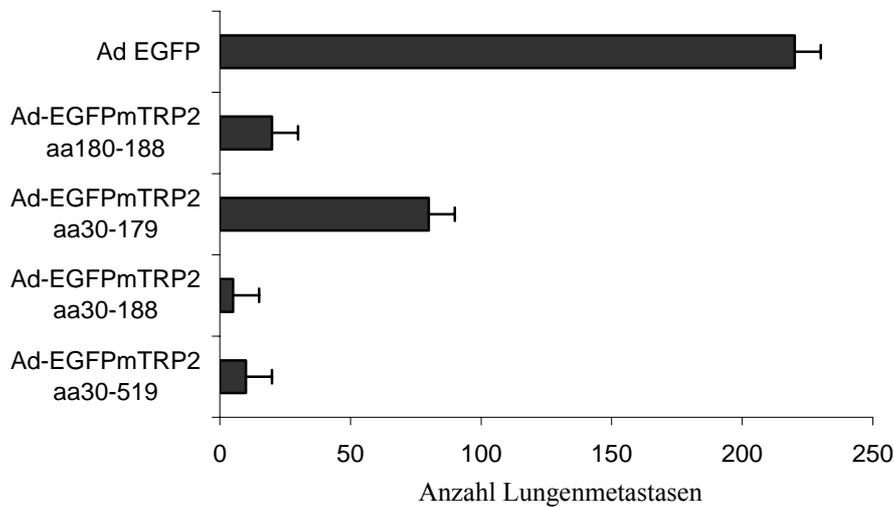


Abbildung 17

Protektion gegen das Wachstum von B16 Lungenmetastasen nach Immunisierung mit Adenoviren

C57Bl/6 Mäuse wurden durch Injektion mit den angegebenen Adenoviren immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungenmetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und das Tumorwachstum analysiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl Melanommetastasen auf den Lungenoberflächen \pm Mittelwertabweichung. Die Immunisierung mit EGFPmTRP2 aa30-188 und EGFPmTRP2 aa180-188 Adenovirus verhindern die Metastasierung von Melanomzellen. EGFPmTRP2 aa30-179 zeigt ein verzögertes Wachstum der Melanomzellen.

3.2.8 Rolle von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bei der Induktion einer Immunantwort

In den weiteren Experimenten versuchten wir die Rolle von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bei der Tumorummunantwort näher zu charakterisieren. Da $CD4^+$ T-Helfer-Zellen eine wesentliche Rolle für die Induktion von $CD8^+$ T-Effektor-Zellen und Antikörper spielen, erprobten wir die Wirksamkeit der Vakzine mit Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa 30-188 und Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 in $CD4^{-/-}$ Mäusen.

$CD4^{-/-}$ und Wildtyp C57/Bl6 Mäuse wurden durch direkte Injektion von 5×10^8 pfu Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188, Ad EGFPmTRP2 aa180-188 und als Kontrolle Ad-EGFP immunisiert. Anschließend wurden 4×10^5 B16 Melanomzellen intravenös inokuliert und das Wachstum der Lungenmetastasen bestimmt. Nach Immunisierung mit Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188 und Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 waren Wildtyp Mäuse wie in den vorausgegangenen Experimenten gegen das Wachstum von B16 Lungenmetastasen geschützt. $CD4^{-/-}$ hingegen entwickelten

nach gleicher Immunisierung eine hohe Anzahl von Metastasen (Abb. 18). Der Verlust der protektiven Wirkung in $CD4^{-/-}$ Mäusen ging einher mit einem Verlust der spezifischen Reaktivität von Milzzellen für das H2-K^b- bindenden TRP2 Peptid in IFN γ -ELISPOT-Tests. Die Ergebnisse zeigen, dass für die Protektion nach genetischer Immunisierung mit Ad-EGFPmTRP2aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188 oder Ad-EGFPmTRP2aa180-188 $CD4^{+}$ -T-Helfer Zellen benötigt werden.

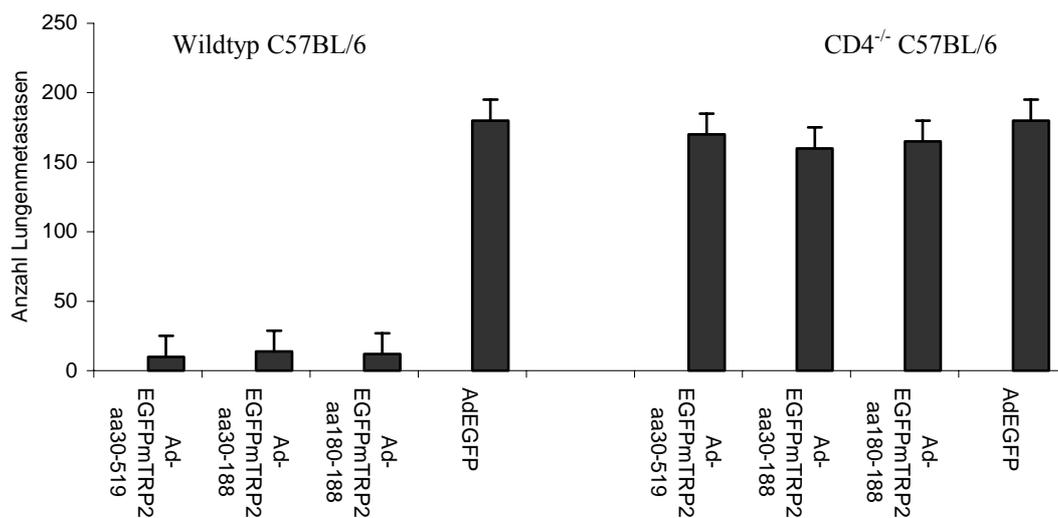


Abbildung 18

Vergleich der genetischen Immunisierung mit Adenoviren in $CD4^{-/-}$ und C57Bl/6 Mäusen

C57Bl/6 (A) und $CD4^{-/-}$ (B) Mäuse wurden durch direkte Injektion von 5×10^8 Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188, Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 bzw. Ad-EGFP immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungemetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und analysiert. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Melanommetastasen auf den Lungenoberflächen. Die Immunisierung mit Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188, Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 ist in C57Bl/6 Mäusen wirksam, es sind keine Lungenmetastasen zu detektieren, im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollgruppen mit EGFP. In C57Bl/6 $CD4^{-/-}$ Mäusen ist keine Tumorprotektion zu sehen. Alle Gruppen zeigen eine hohe Anzahl von Lungenmetastasen.

Um die Rolle der Antigen-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen bei der Tumorabwehr von Melanomzellen zu charakterisieren, wurden $CD8^{-/-}$ und Wildtyp Mäuse durch direkte Injektion von 5×10^8 pfu Ad-EGFPmTRP2aa30-519, Ad-EGFPmTRP2aa30-188, Ad-EGFPmTRP2aa180-188 und als Kontrolle Ad-EGFP immunisiert. Anschließend wurden 4×10^5 B16 Melanomzellen intravenös inokuliert und das Wachstum der Lungenmetastasen bestimmt. Nach Immunisierung mit Ad-EGFPmTRP2aa30-519, Ad-EGFPmTRP2aa30-188 und Ad-EGFPmTRP2aa180-188 waren Wildtyp Mäuse wie in den vorausgegangenen Experimenten gegen das Wachstum von B16 Lungenmetastasen geschützt. $CD8^{-/-}$ Mäusen entwickelten hingegen nach Immunisierung eine hohe Anzahl von Metastasen (Abb. 19). Diese Daten deuten darauf hin, dass Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen für eine wirksame Tumorprotektion erforderlich sind.

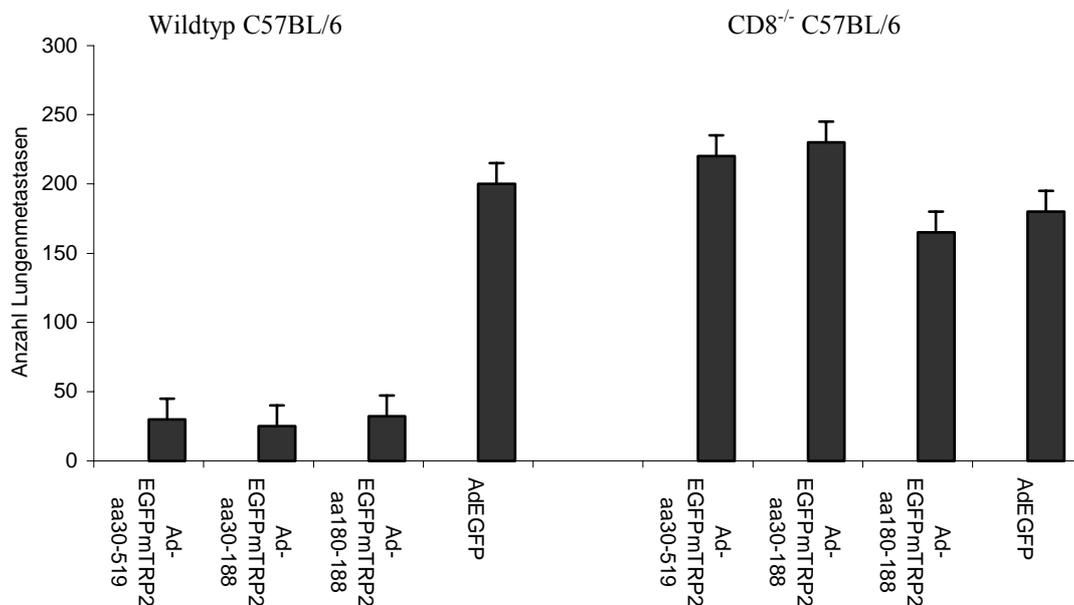


Abbildung 19

Vergleich der genetischen Immunisierung mit Adenoviren in $CD8^{-/-}$ und C57Bl/6 Mäusen

C57Bl/6 (A) und $CD8^{-/-}$ (B) Mäuse wurden durch direkte Injektion von 5×10^8 Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188, Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 bzw. Ad-EGFP immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungemetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und analysiert. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Melanommetastasen auf den Lungenoberflächen. Die Immunisierung mit Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188, Ad-EGFPmTRP2 aa180-188 ist in C57Bl/6 Mäusen wirksam, es sind keine Lungenmetastasen zu detektieren, im Gegensatz zu der entsprechenden Kontrollgruppen mit EGFP. In C57Bl/6 $CD8^{-/-}$ Mäusen ist keine Tumorprotektion zu sehen. Alle Gruppen zeigen eine hohe Anzahl von Lungenmetastasen.

Zusätzlich zu den Experimenten in $CD4^{-/-}$ und $CD8^{-/-}$ Mäusen wurden $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen depletiert, um den Einfluss von $CD4^{+}$ T-Zellen in der Primingphase von $CD8^{+}$ T-Zellen näher zu charakterisieren. Zur Depletion wurden anti-CD4, anti-CD8 und zur Kontrolle Ratten-IgG Antikörper vor und nach der Vakzinierung mit rekombinanten Adenoviren injiziert und 14 Tage später B16 Melanomzellen intravenös inokuliert. Wie in den vorausgegangenen Experimenten wurden dann nach weiteren 14 Tagen die Lungen entnommen und die Anzahl der Lungenmetastasen bestimmt.

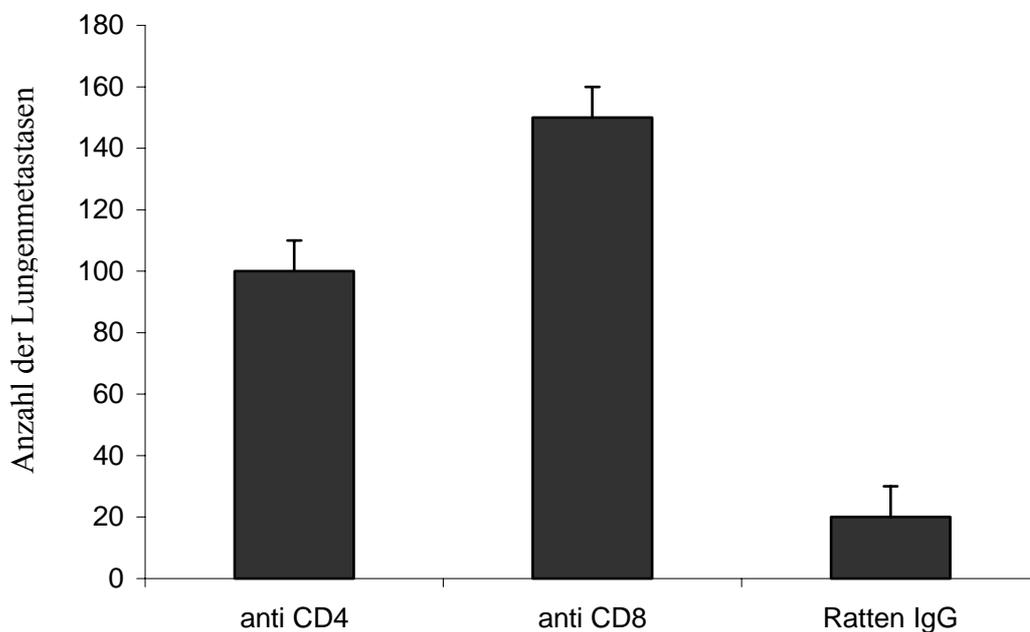


Abbildung 20

Depletion von $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen in C57BL6 Mäusen

$CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen wurden durch Injektion von anti-CD4 und anti-CD8 Antikörper depletiert. Zum Zeitpunkt der Depletion wurden die Mäuse mit 5×10^8 Ad-EGFPmTRP2aa30-519 immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungemetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und analysiert. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Melanommetastasen auf den Lungenoberflächen. Nach Depletion der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen ist die Tumorphotektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ratten IgG) komplett aufgehoben.

Das Ergebnis der Depletionsexperimente zeigt, dass in unserem Tumormodell $CD4^{+}$ T-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion von antigenspezifischen $CD8^{+}$ T-Zellen besitzen. Die Depletion von $CD8^{+}$ T-Zellen zeigt erneut, dass antigenspezifische $CD8^{+}$ T-Zellen für eine erfolgreiche Tumorphotektion entscheidend sind.

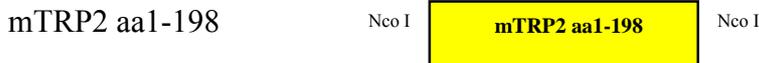
3.2.9 EGFPmTRP2 Fusionskonstrukte mit unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation zur Bestimmung der Immuntoleranz

Um den Einfluss der Fusion auf die intrazellulären Lokalisation der Antigene und die Induktion einer Immunantwort näher zu charakterisieren wurden zunächst mit PCR Technologie weitere EGFPmTRP2 Fusionskonstrukte generiert.

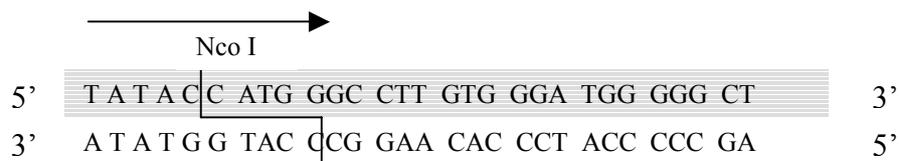
Um die Frage zu beantworten, ob die "Verfremdung" für die Induktion einer Immunantwort N- oder C- Terminal lokalisiert sein muss und ob Insertionssequenzen einen Einfluss auf die Entstehung von Immunantworten haben, wurden die Fusionskonstrukte mTRP2aa1-198 EGFP und mTRP2aa30-198 EGFP hergestellt (siehe Kap. [2.3.11.](#)).

3.2.10 mTRP2aa1-198 EGFP, mTRP2aa30-198 EGFP

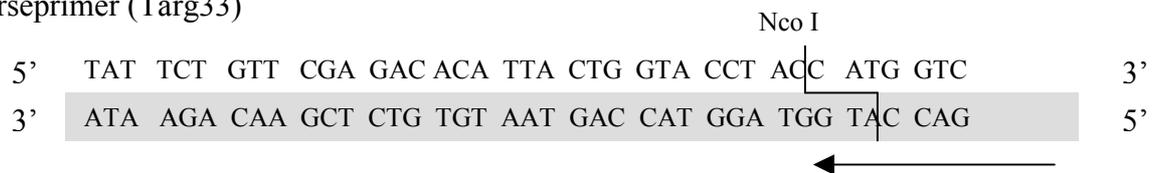
Die TRP2 Fragmente aa1-198 und aa30-198 wurden mit den folgenden Primern amplifiziert.



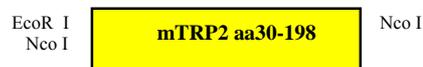
Forwardprimer (Targ31)



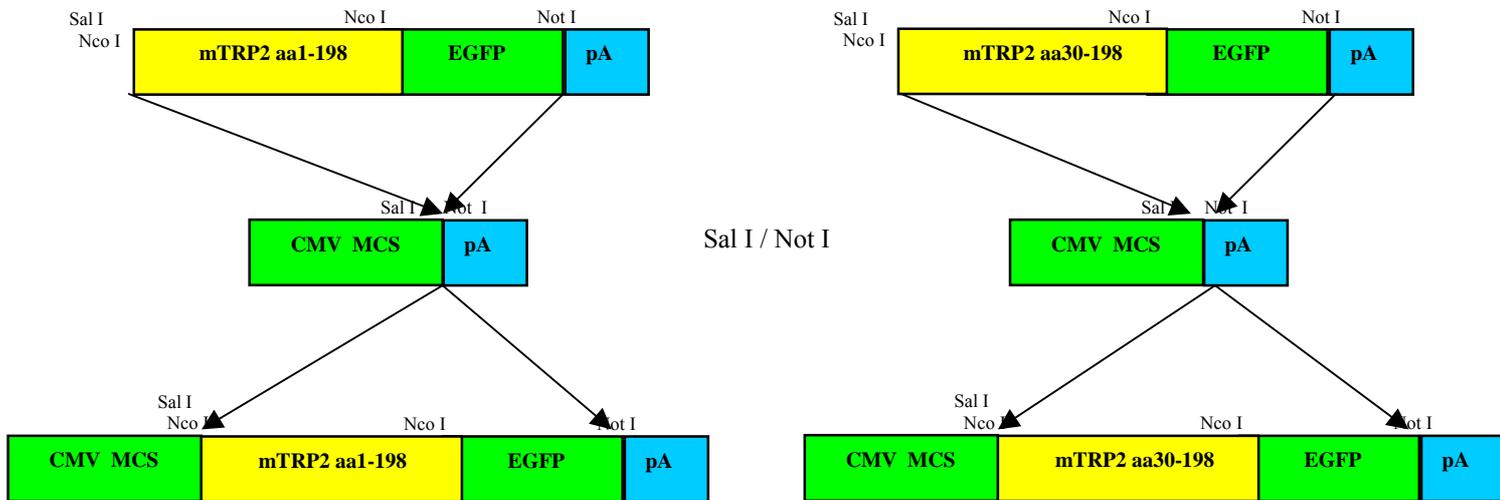
Reverseprimer (Targ33)



mTRP2 aa 30-198



Im letzten Klonierungsschritt wurden die Fusionsproteine Sal I / Not I in den pAdlox Expressionsvektor übertragen.



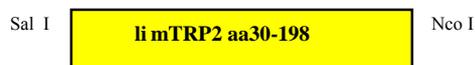
3.2.11 limTRP2 aa30-198 EGFP

Die MHC-II assoziierte invariante Kette (Ii) heftet sich im endoplasmatischen Retikulum an neu synthetisierte MHC-II Moleküle. Sie verhindert so die Bindung von intrazellulären Peptiden und leitet die MHC-II Moleküle zu den Endosomen. Durch die Fusion von Ii und TRP2 wird TRP2 zusammen mit MHC-II Molekülen zu den Endosomen transportiert. Dort wird in mehreren Schritten die invariante Kette durch die saure Protease Cathepsin L gespalten und das TRP2- Peptid kann in der MHC-II Bindungsgrube binden.

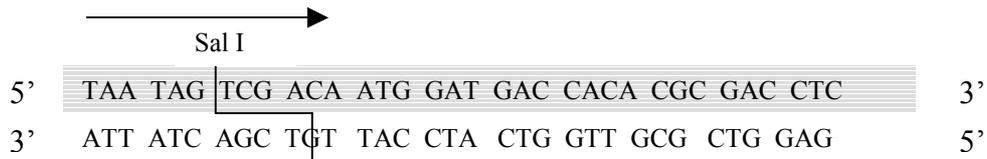
Mit den Ii-Konstrukten soll der Einfluss der TRP2-spezifischen CD4⁺ T-Zellen näher charakterisiert werden. Fusionskonstrukte mit der invarianten Kette müssten dann in den Endosomen der Zelle lokalisiert sein.

Um das Konstrukt limTRP2 aa30-198 EGFP zu generieren, wurde von dem Plasmid Ii mTRP2, das uns freundlicherweise von Herrn Dr. Thielemann zur Verfügung gestellt wurde, ein Sal I / Nco I Fragment generiert.

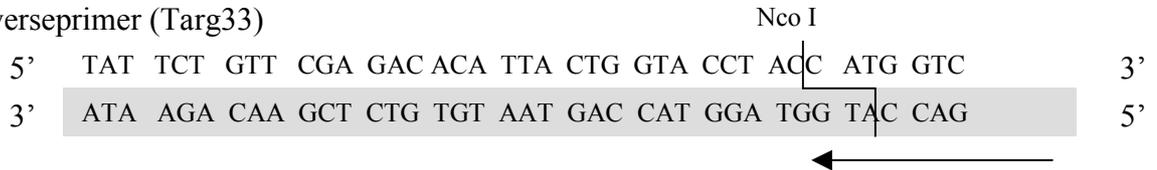
limTRP2aa30-198



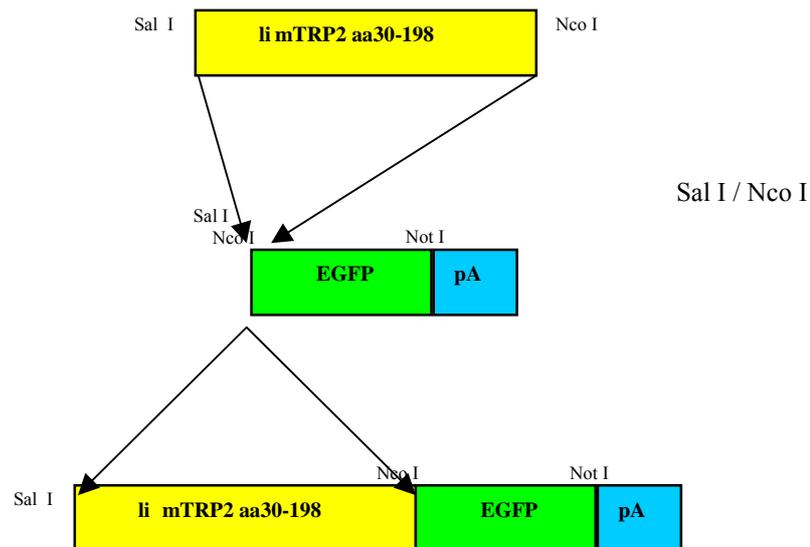
Forwardprimer (Targ28)



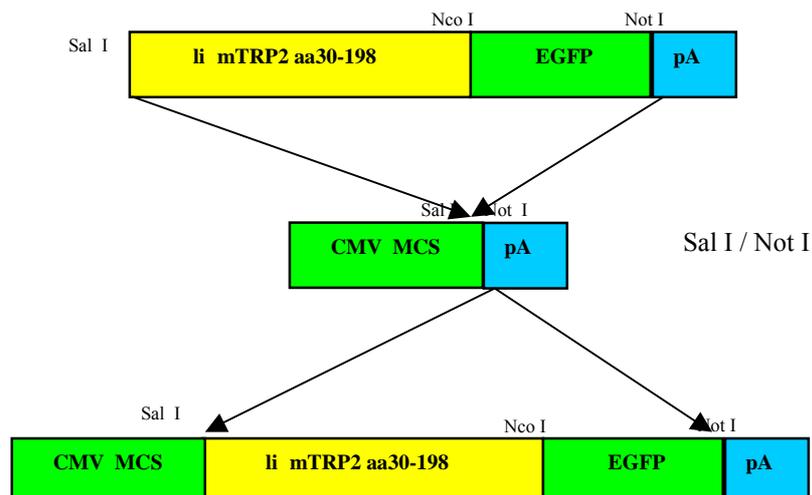
Reverseprimer (Targ33)



limTRP2aa30-198 wurde wie die anderen TRP2 Stücke aa1-198 und aa30-198 als Sal I / Nco I Fragment vor EGFP ligiert.



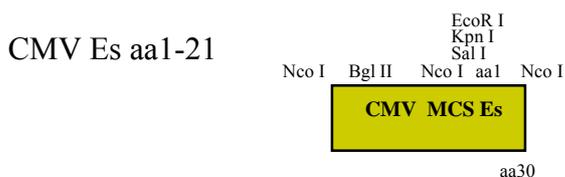
Im Anschluss wurde das komplette limTRP2 aa30-198 EGFP Sal I / Not I in den pAdlox Expressionsvektor übertragen.



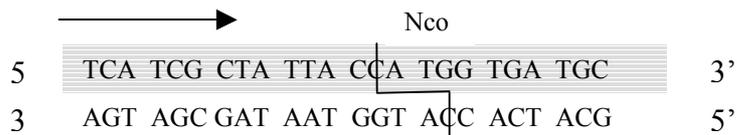
3.2.12 Es EGFPmTRP2 aa30-519

Um den Einfluss der endosomalen Insertionssequenz von TRP2 zu untersuchen wurde ein weiteres Fusionskonstrukt EsEGFPmTRP2aa30-519 generiert. Die Endosomale Insertionssequenz sorgt bei dem nativen TRP2 dafür, dass es in das Endoplasmatische Retikulum translatiert wird. Dort wird es glykosyliert und danach in die Melanosomen transportiert. Im Gegensatz dazu wird EGFPmTRP2aa30-519 in das Cytosol translatiert, da die N-Terminale Signal Sequenz aa1-21 fehlt.

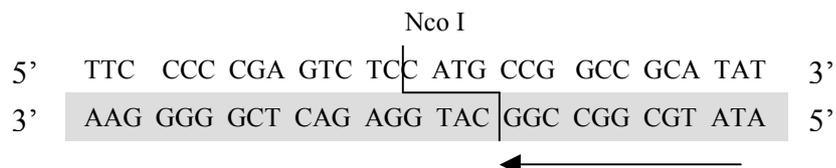
Um Es EGFPmTRP2aa30-519 zu erhalten wurde die Es Sequenz zusammen mit einem Stück des CMV- Promotors von dem Plasmid pCI mTRP2 mit Hilfe der PCR amplifiziert.



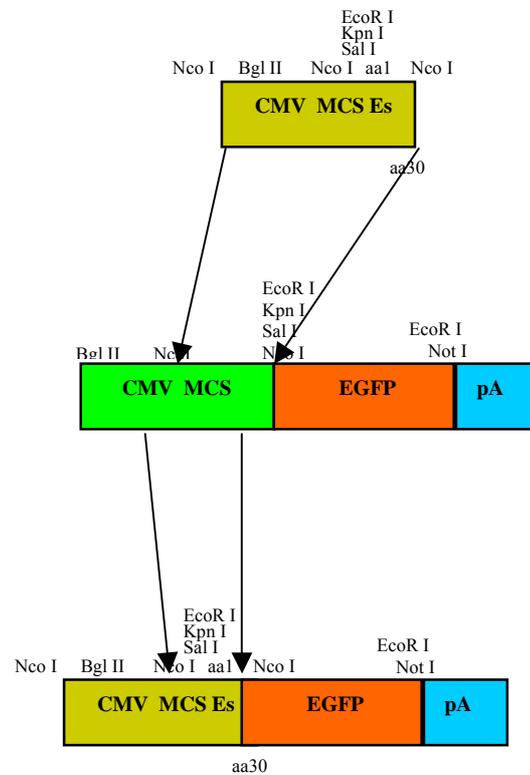
Forwardprimer (Targ6)



Reverseprimer (Targ16)

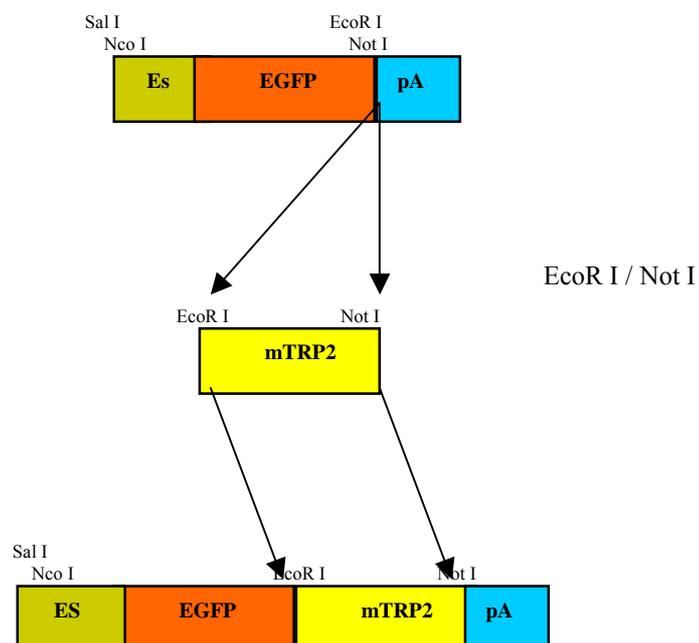


Zur Konstruktion von EsEGFPmTRP2aa30-519 wurde die Es Sequenz als Nco I / Nco I Fragment vor EGFP kloniert.

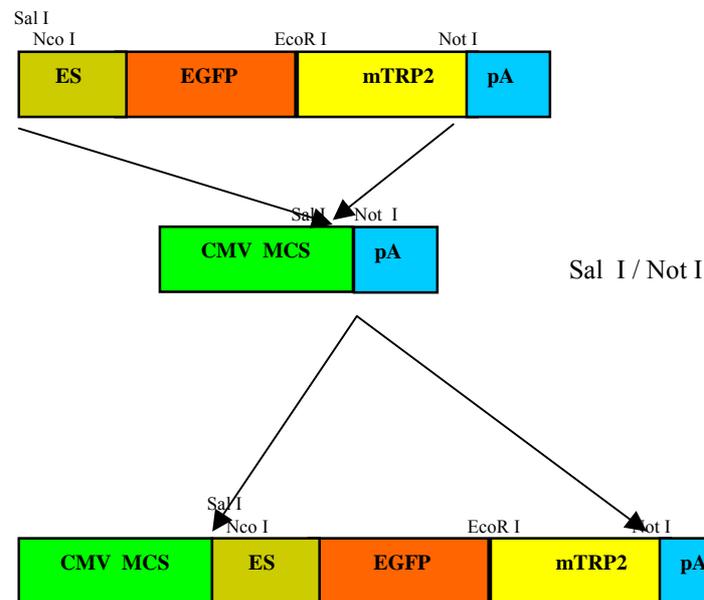


Um nun TRP2 Fragmente in den Klonierungsvektor ligieren zu können, in dem die flankierenden Schnittstellen nur einmal vorkommen, wurde der CMV Promoter mit Kpn I und Bgl II deletiert und mit Klenowpolymerase geschlossen.

Das mTRP2 aa30-519 wurde als EcoRI / Not I Fragment eingefügt



Im Anschluss daran wurde das Konstrukt als Sal I / Not I Fragment in den pAdlox Expressionsvektor übertragen.



3.2.13 Nachweis der Genexpression im Western-Blot

Um die Expression der Proteine zur Analyse der intrazellulären Lokalisation nachzuweisen wurden wiederum 293-Zellen transfiziert. Die Lysate von mTRP2 aa1-198 EGFP, mTRP2 aa30-198 EGFP, limTRP2 aa30-198 und EsEGFPmTRP2 aa30-519 wurden im Westernblot in Lysaten von transient transfizierten 293-Zellen nachgewiesen. (siehe Kap. 2.5.3)

Die Membranen wurden mit einem polyklonalen anti-EGFP-Kaninchenantiserum inkubiert und mit einem POD markierten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper detektiert. Wie in Abb. 21 zu sehen entspricht die Bande von 60 kDa der Größe von mTRP2 aa1-198 EGFP, mTRP2 aa30-198 EGFP und limTRP2aa30-198 EGFP. Die deutlich größere Bande von 130 kDa entspricht Es EGFPmuTRP2 30-519.

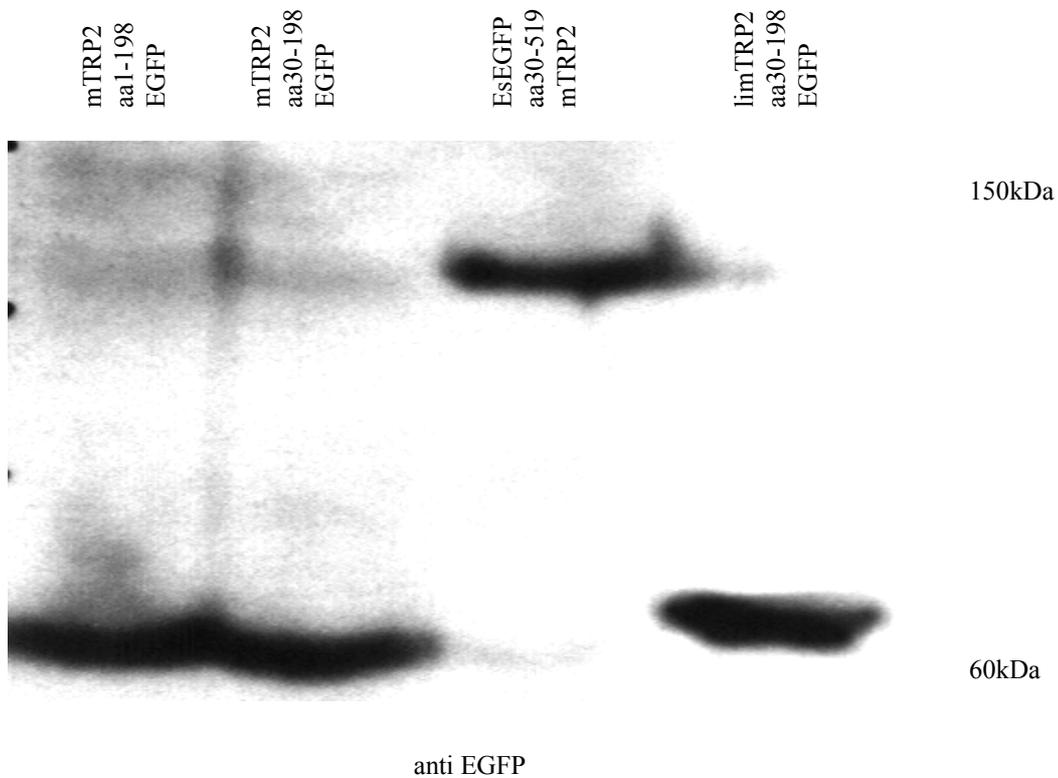


Abbildung 21

Nachweis der Antigenfusionskonstrukte im Western-Blot

Die Antigenfusionskonstrukte wurden in transfizierten 293-Zellen mittels Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden Lysate aus 293-Zellen eingesetzt. Zur Detektion wurden ein gegen EGFP gerichtetes polyklonales Kaninchenantiserum (anti EGFP) verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Sekundärantikörpern gegen Kaninchen IgG gerichtet detektiert.

3.2.14 Expression der Fusionskonstrukte in DCEK-Zellen

Durch die Fusion der TRP2 Fragmente mit dem grün fluoreszierenden Protein EGFP lässt sich die Expression in der Zelle und damit die intrazelluläre Antigenlokalisation leicht bestimmen. Zum Nachweis der intrazellulären Expression wurden DCEK Zellen stabil transfiziert. Zur Transfektion wurde das METAFECTENETM Transfektionsreagenz der Firma Biontex verwendet (siehe Kap.2.6.1) Es wurden stabile Transfektanten mit den Konstrukten EGFPmTRP2aa30-519, EsEGFPmTRP2aa30-519, mTRP2aa1-198 EGFP, mTRP2aa30-198

EGFP, limTRP2aa30-198 EGFP. Als Kontrolle wurden Zellen mit EGFP alleine transfiziert. Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation wurden die Transfektanten auf Nunc Tissue-chamber-slides fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit einem anti-LAMP Antiserum inkubiert und der gebundene Antikörper mit Texas Red konjugiertem Ziege anti-Ratte IgG sichtbar gemacht. Mit dem Antikörper anti-LAMP lassen sich die endosomalen Kompartimente der Zelle spezifisch anfärben (siehe Abschnitt [2.6.2](#)). Die intrazelluläre Expression der Fusionsproteine zur Bestimmung der Lokalisation wurde mit einem Zeiss M100 konfokalen Laser-Scan Mikroskop bestimmt. Die Fotos zur Bestimmung der Lokalisation sind in Abbildung 22 zusammengefasst. In der Fluoreszenzaufnahme von mit EGFP transfizierten Zellen zeigt sich eine starke EGFP-Expression sowohl im Cytosol als auch in der Kernregion der Zelle. Nach Färbung des endosomalen Kompartiments der Zelle mit anti-LAMP und dem Überlagern der beiden Aufnahmen konnte eine EGFP-Expression in den Endosomen der Zelle festgestellt werden. Nach Transfektion von Fusionskonstrukten ohne N-Terminale Insertionssequenz EGFPmTRP2aa30-519 und mTRP2aa30-198 EGFP zeigt sich wie zu erwarten ebenfalls eine cytosolische Expression des Fusionsproteins. Nach Färbung der Transfektanten mit anti-LAMP zeigt sich keine Kolo-kalisation der Fusionsproteine in dem endosomalen Kompartiment der Zelle. Die beiden Konstrukte EsEGFPmTRP2aa30-519 und mTRP2aa1-198EGFP besitzen die N-Terminale Insertionssequenz aa1-21 und nach Transfektion von DCEK-Zellen zeigt sich eine Expression in abgegrenzten Zellvesikeln. Diese scheinen nach Gegenfärbung mit anti-LAMP zum endosomalen Kompartiment der Zelle zu gehören. In dem verwendeten Konstrukt limTRP2aa30-198 sorgt die invariante Kette dafür, dass das Fusionsprotein zusammen mit MHC II Molekülen in die Endosomen transportiert wird. Sowohl in der Fluoreszenzaufnahme als auch in der Überlagerung zeigt sich die Expression von limTRP2 30-198 EGFP in den Endosomen der Zelle.

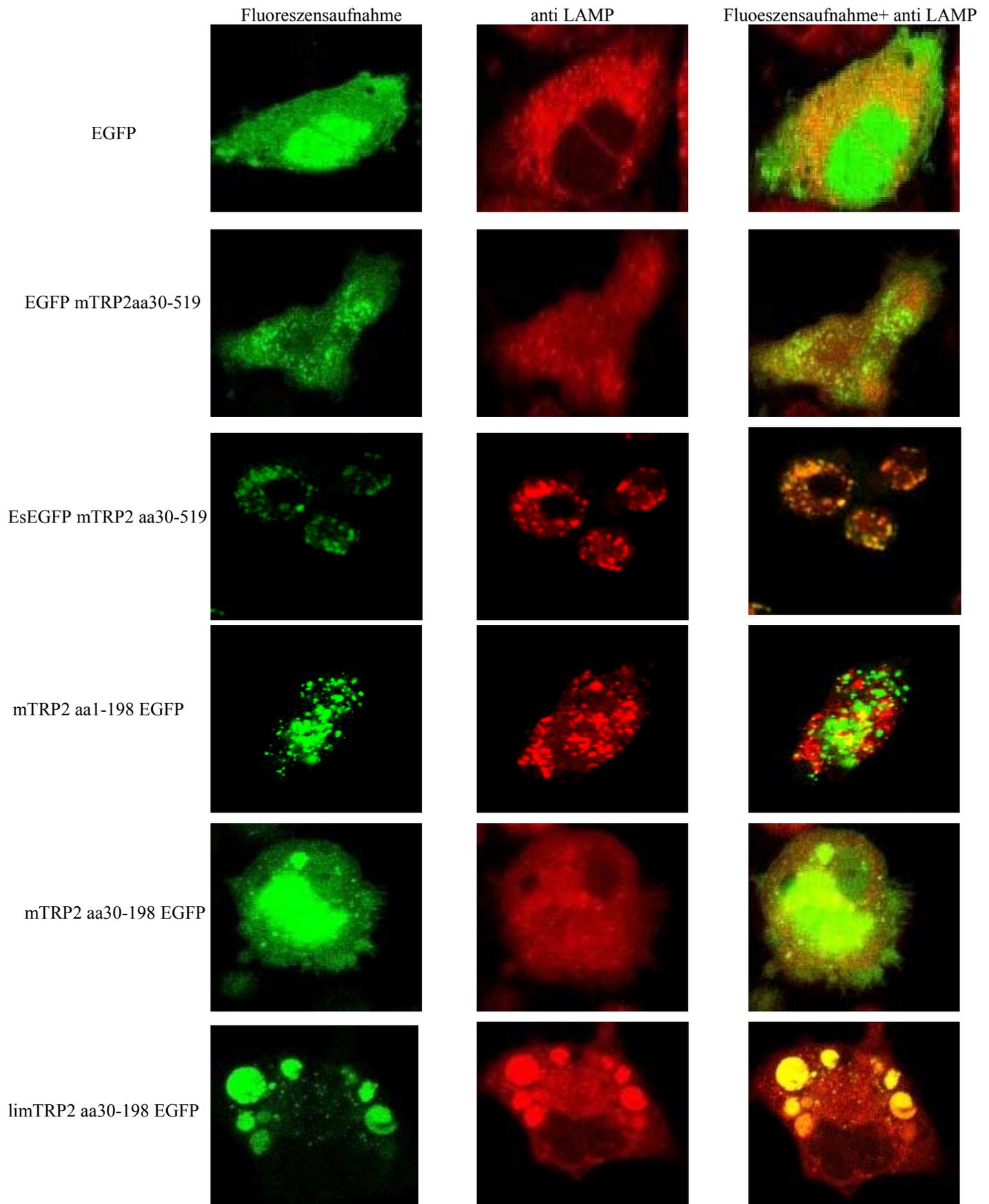


Abbildung 22

DCEK-Zellen wurden mit den verschiedenen Fusionskonstrukten stabil transformiert und danach mit anti-LAMP Antikörper gefärbt, um die Lokalisation der Expression zu bestimmen wurden beide Aufnahmen überlagert.

3.2.15 Gene Gun Immunisierung mit mTRP2 EGFP Fusionskonstrukten

Nach der Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurden Mäuse immunisiert, um die Induktion einer Immunantwort in Abhängigkeit zu der Antigenlokalisation näher zu untersuchen. Dazu wurden Mäuse mit den Konstrukten pAdlox-mTRP2aa1-198EGFP, pAdlox-mTRP2aa30-198EGFP, pAdlox-limTRP2 aa30-198 EGFP mit Hilfe der Gene-Gun immunisiert. Als Kontrollplasmide wurden pAdlox-EGFP und pAdlox-limTRP2 verwendet. (siehe Abschnitt [2.5.1.](#))

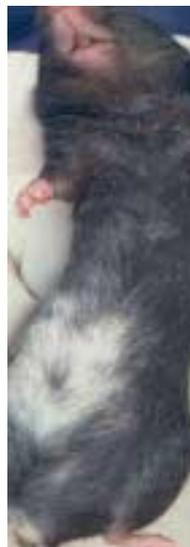
3.2.16 Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen

Nach Ende der Immunisierung zeigte sich in den mit pAdlox-mTRP2aa1-198 EGFP, pAdlox-mTRP2aa30-198 EGFP, pAdlox-limTRP2aa30-198 EGFP immunisierten Mäusen ein Verlust der Pigmentierung im nachwachsenden Fell. Mäuse, welche mit pAdlox-limTRP2 immunisiert wurden, zeigten keinen Pigmentverlust.

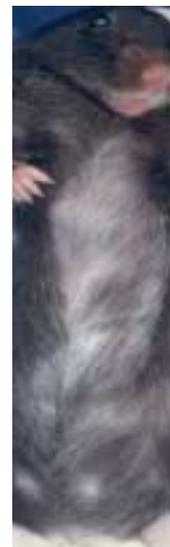
Dieses Ergebnis zeigt, dass die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins kein Einfluss auf die Entstehung einer Immunantwort in diesem System hat.



mTRP2aa1-198 EGFP



mTRP2aa30-198 EGFP



limTRP2aa30-198 EGFP

Abbildung 23

Autoimmune Vitiligo nach Gene-Gun Immunisierung

C57Bl/6 Mäuse wurden in wöchentlichem Rhythmus mit den angegebenen Fusionskonstrukten Gene-Gun immunisiert. 2-3 Wochen nach Abschluss der Immunisierung stellte sich im Bereich des beschossenen Hautareals in den mit mTRP2aa 1-198 EGFP, mTRP2aa30-198 EGFP, limTRP2aa30-198 EGFP immunisierten Mäusen am Bauch ein Verlust der Pigmentierung ein.

3.2.17 Nachweis EGFP-spezifischer Antikörper

2-3 Wochen nach Abschluss der Immunisierung wurden Seren auf EGFP-spezifische Antikörper hin untersucht. Der Nachweis erfolgte für EGFP im ELISA (siehe Kap. [2.7.3.](#)) Wie Abb. 24 zeigt reagierte das Serum von mTRP2 EGFP Fusionskonstrukten immunisierten Mäusen mit dem rek. EGFP der beschichteten ELISA Platten.

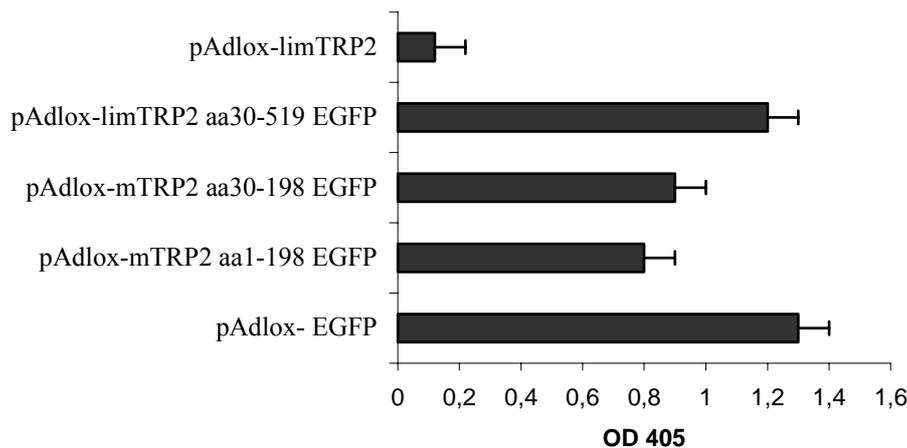


Abbildung 24

Induktion von EGFP- spezifischen Antikörpern nach Immunisierung Gene-Gun Immunisierung mit mTRP2 EGFP Fusionskonstrukten

C57BL/6 Mäuse wurden mit der Gene-Gun immunisiert. 2-3 Wochen später wurden Seren entnommen und auf Antikörper gegen EGFP mittels ELISA untersucht. Aufgetragen sind die OD-Werte gemessen bei 405nm und einer Serumverdünnung von 1:250.

3.2.18 Nachweis von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten

Der Nachweis von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten aus Gene-Gun immunisierten Mäusen erfolgte durch ELISPOT-Analyse. In allen mit EGFP-Fusionskonstrukten immunisierten Mäuse konnten TRP2-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. In der mit limTRP2 immunisierten Gruppe konnten keine T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt die Verfremdung mit EGFP in dieser Gruppe zu Induktion von TRP2-spezifische T-Zellen (siehe Abschnitt [2.7.2.](#)).

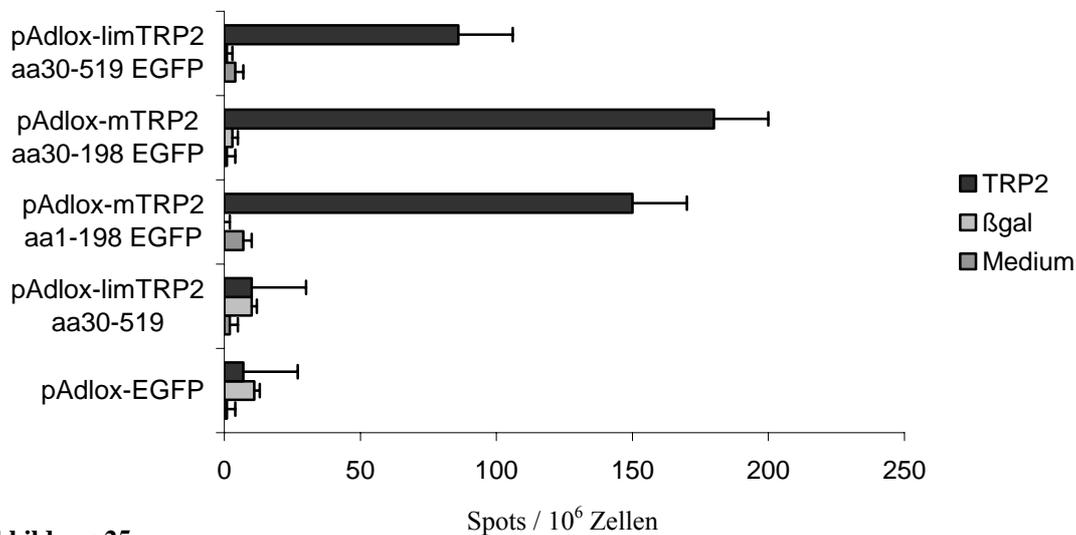


Abbildung 25

Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen

Milzzellen aus immunisierten Mäusen wurden in IFN γ ELISPOT Test mit dem TRP2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid restimuliert. Nach 22 Stunden wurde die Antigen-spezifische IFN γ -Freisetzung einzelner Lymphozyten sichtbar gemacht. Dargestellt ist die Anzahl Spots pro 10⁶ Milzzellen aus Dreifachmessungen \pm Mittelwertabweichung.

3.2.19 Protektion gegen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen

Um den Einfluss der Antigenlokalisierung auf den Schutz vor dem Wachstum von Lungenmetastasen zu untersuchen wurden von den Fusionskonstrukten mTRP2aa1-198 EGFP, mTRP2aa30-198EGFP und limTRP2aa30-198 EGFP rekombinante Adenoviren generiert (siehe Kap. 2.4.4) Die Viren wurden wiederum in Cre8 Zellen rekombiniert und nach Standardprotokollen vermehrt und aufgereinigt.

Gruppen von Mäusen wurden mit Adenoviren für EGFP, limTRP2, limTRP2aa30-198 EGFP, mTRP2aa30-198EGFP und mTRP2aa1-198EGFP immunisiert. Anschließend wurde die Induktion einer Tumorimmunabwehr überprüft (2.8.1). Abb. 26 zeigt, dass die Immunisierung mit mTRP2aa30-198EGFP und mTRP2aa1-198EGFP zu einer vollständigen Tumorprotektion führte Dieses Ergebnis zeigt, dass die intrazelluläre Lokalisation auch auf die Tumorprotektion keinen Einfluss hat. Die Injektion von rek. Adenovirus für limTRP2 aa30-198 EGFP zeigt eine vollständige Tumorprotektion, hingegen bewirkte die Injektion von Ad-limTRP2 keinen Schutz vor Metastasierung des B16 Melanoms in den Lungen.

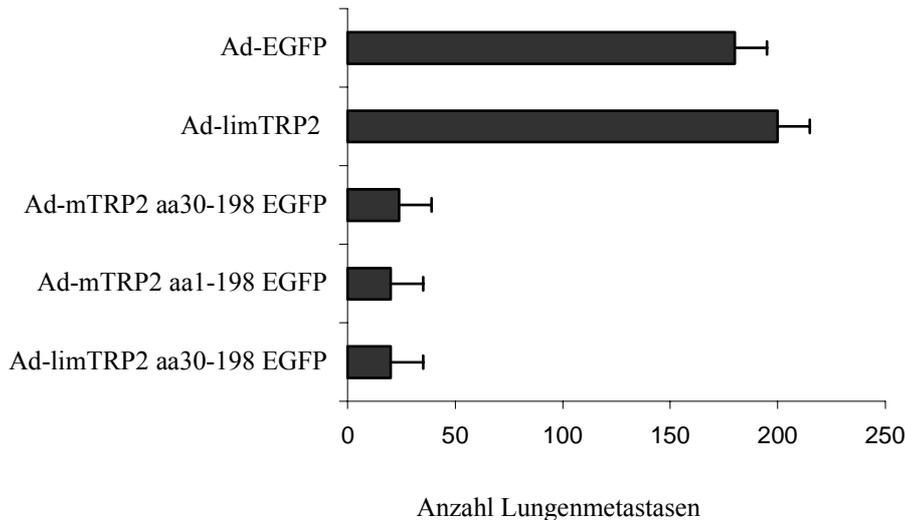


Abbildung 26

Protektion gegen das Wachstum von B16 Lungenmetastasen nach Immunisierung mit Adenoviren

C57Bl/6 Mäuse wurden durch Injektion mit den angegebenen Adenoviren immunisiert. 2-3 Wochen später wurden experimentelle Lungenmetastasen durch intravenöse Injektion von 4×10^5 B16 Tumorzellen induziert. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und das Tumorstadium analysiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl Melanometastasen auf den Lungenoberflächen \pm Mittelwertabweichung.

3.3 Eigenschaften immunogener Fusionspartner

Durch die Fusion des schwach immunogenen mTRP2 mit dem Fremdantigen EGFP kann die periphere Toleranz durchbrochen werden. Es kommt zur Induktion von potentiell autoreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten, welche sich indirekt in einer vitiligoartigen Felldepigmentierung und direkt im ELISPOT auf Einzelzellebene nachweisen lassen. Nach Injektion von B16 Melanomzellen kann durch Vakzinierung mit EGFPmTRP2 Adenovirus eine Metastasierung in den Lungen verhindert werden.

Durch Verkürzung der TRP2 cDNA kann gezeigt werden welche TRP2 Anteile für die Induktion einer starken Antigen-spezifischen Immunantwort notwendig sind.

Durch Verwendung von unterschiedlichen Lokalisationssequenzen kann gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation keinen Einfluss auf die Entstehung einer Immunantwort hat.

In den folgenden Untersuchungen soll durch Verwendung eines β -Galaktosidase mTRP2aa180-188 Fusionskonstruktes charakterisiert werden welchen Einfluss der Fusionspartner EGFP nach einer genetischen Immunisierung auf die Immunantwort hat.

3.3.1 β -gal mTRP2aa30-188

β -Galaktosidase ist wie EGFP ein starkes Antigen. Es ist zu erwarten, dass die Immunantwort gegen TRP2 nach Vakzinierung mit dem Fusionskonstrukt ähnlich stark ist, wie nach Vakzinierung mit den EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten.

β -gal spezifische T-Lymphozyten lassen sich im ELISPOT mit dem H-2K^b bindenden Peptid entsprechend aa495-504 von E. coli β -Galaktosidase nachweisen. Gleichzeitig müssen sich nach einer erfolgreichen Vakzinierung TRP2-spezifische T-Zellen mit dem H-2K^b bindenden Peptid entsprechend aa180-188 von TRP2 nachweisen lassen.

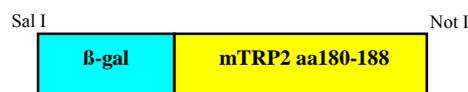
Der Nachweis des Enzyms β -Galaktosidase in transfizierten Zellen erfolgte auf Einzelzellebene durch eine Färbung mit X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma) (siehe Abschnitt [2.5.4](#)).

Das Fusionskonstrukt β -Galaktosidase mTRP2 aa180-188 wurde von dem β -Galaktosidase Expressionsplasmid der Firma Promega mit der PCR amplifiziert.

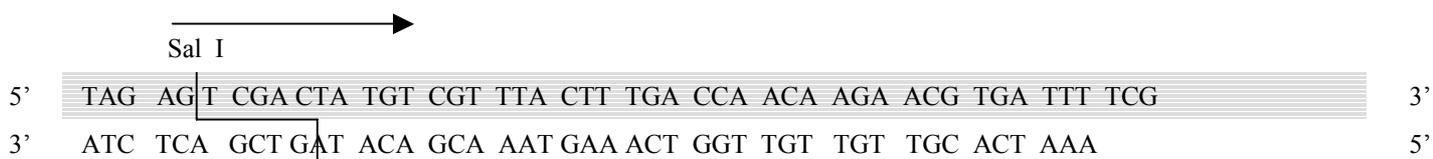
Dazu wurde eine PCR Reaktion mit einem Forwardprimer der an den ersten 14 aa von β -gal bindet und einem Reverseprimer, der das TRP2 Peptid Epitop aa180-188 enthält durchgeführt.

Das gewonnene PCR Produkt wurde danach als Sal I / Not I Fragment in den pAdlox Expressionsvektor kloniert.

β -Galaktosidase mTRP2 aa180-188 Fragment

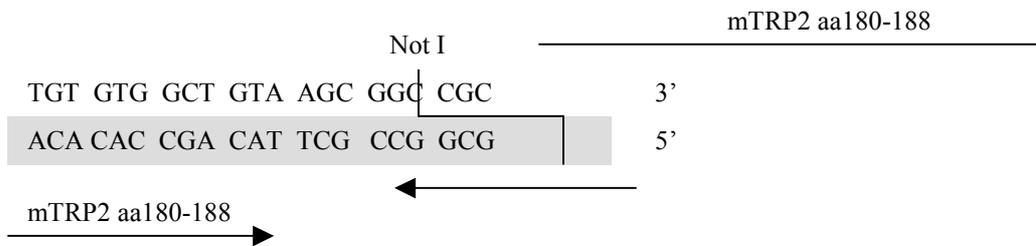


β -gal Forwardprimer (Targ42)

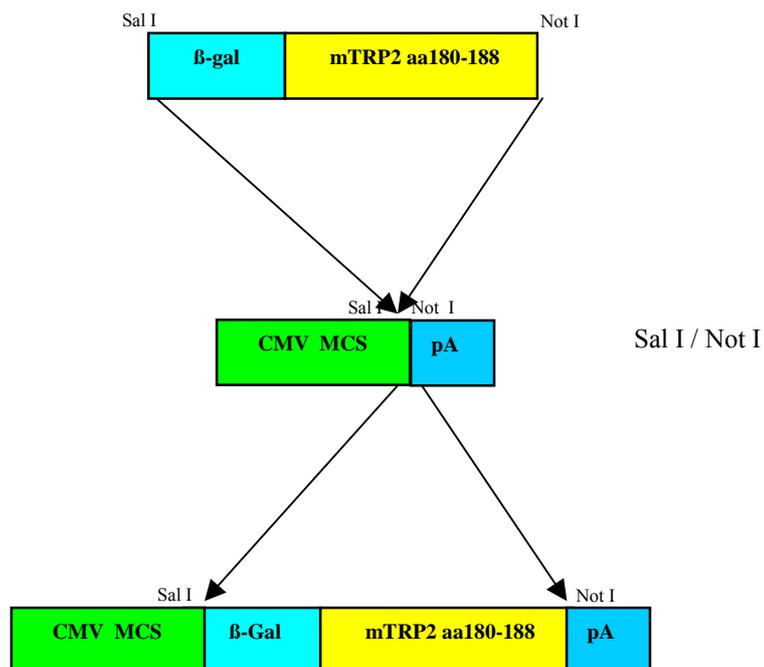


β -gal Reverseprimer mit mTRP2 aa 180-188 Peptidepitop (Targ43)

5' GTT GGT CTG GTG TCA AAA AAG CGT GTA TGA TTT TTT
 3' CAA CCA GAC CAC AGT TTT TTC GCA CAT ACT AAA AAA



Das PCR Produkt wurde Sal I / Not I in den pAdlox Expressionsvektor kloniert.

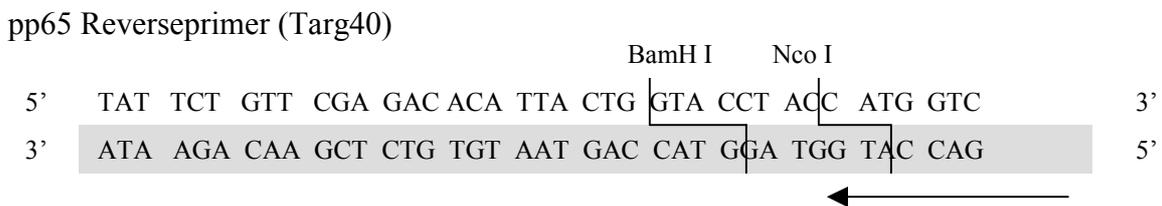
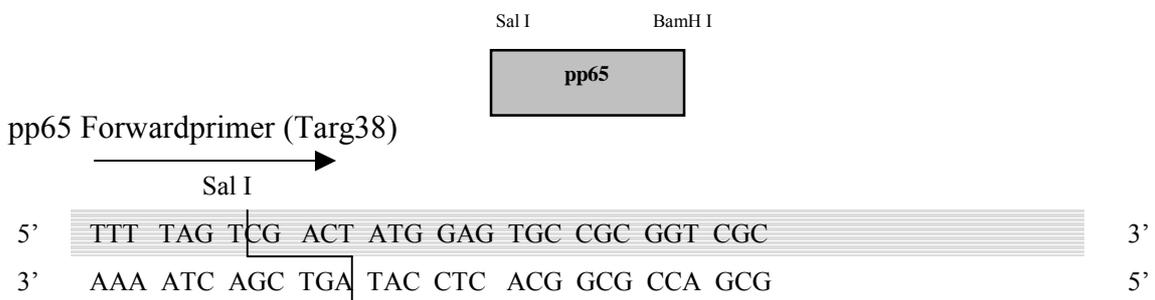


3.3.2 pp65 mTRP2

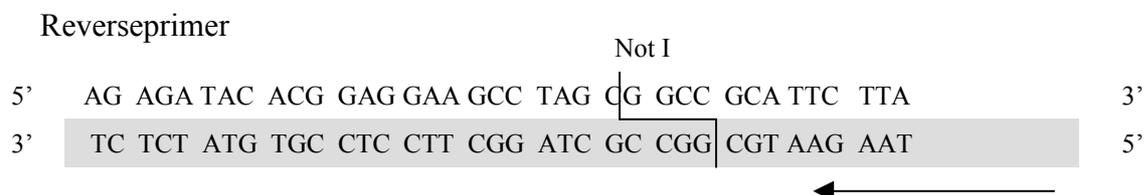
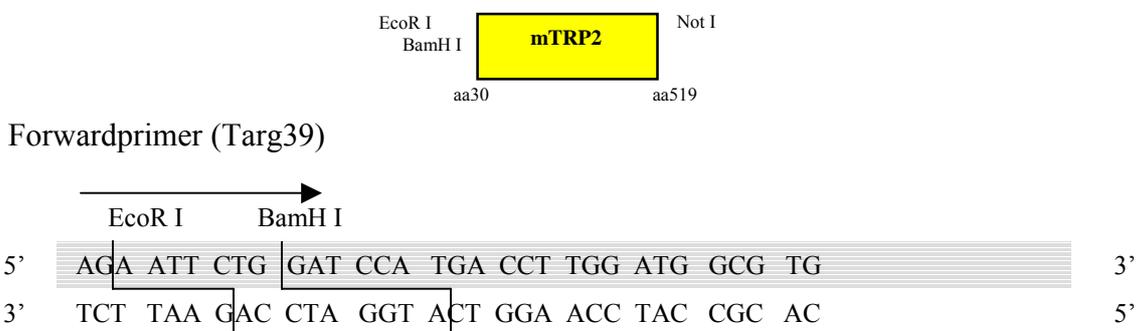
Um den Einfluss der Verfremdung mit einem gut charakterisiertem, klinisch relevanten Antigen zu untersuchen verwendeten wir pp65^{32;33}.

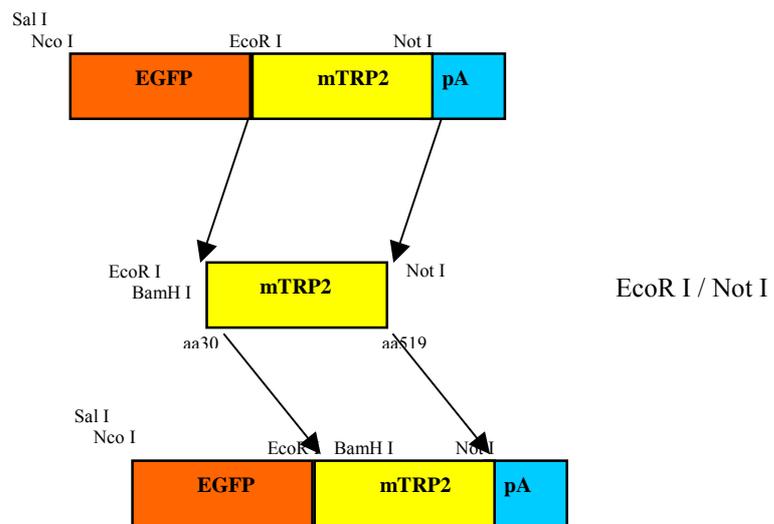
pp65 ist ein Matrix Phosphorprotein des humanen Cytomegalovirus (HCMV). Dieses Protein kann aus CMV infizierten Fibroblastenkulturen leicht aufgereinigt werden und besitzt ein Molekulargewicht von 65 kDa. Gegen dieses Protein sind zahlreiche Antikörper beschrieben.

Um das Fusionkonstrukt pp65mTRP2 zu gewinnen wurde ein pp65 Fragment mit den flankierenden Schnittstellen Sal I / BamH I generiert.

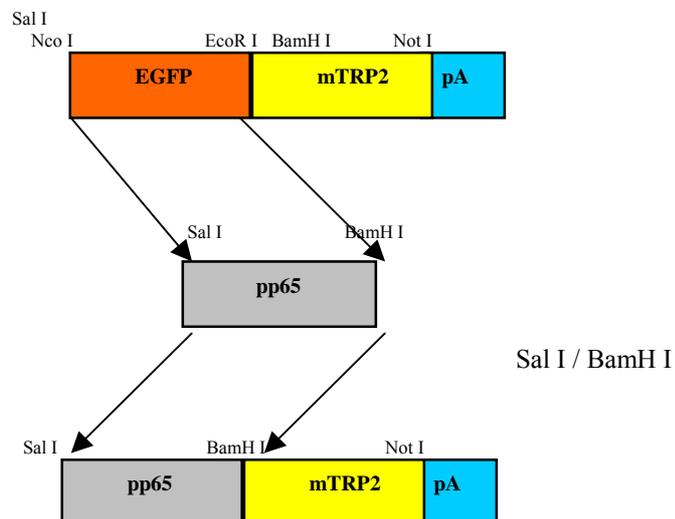


Um eine BamH I Schnittstelle in das EGFPmTRP2 Konstrukt einzufügen wurde mit Hilfe der PCR mTRP2 Fragment mit BamH I Schnittstelle amplifiziert.

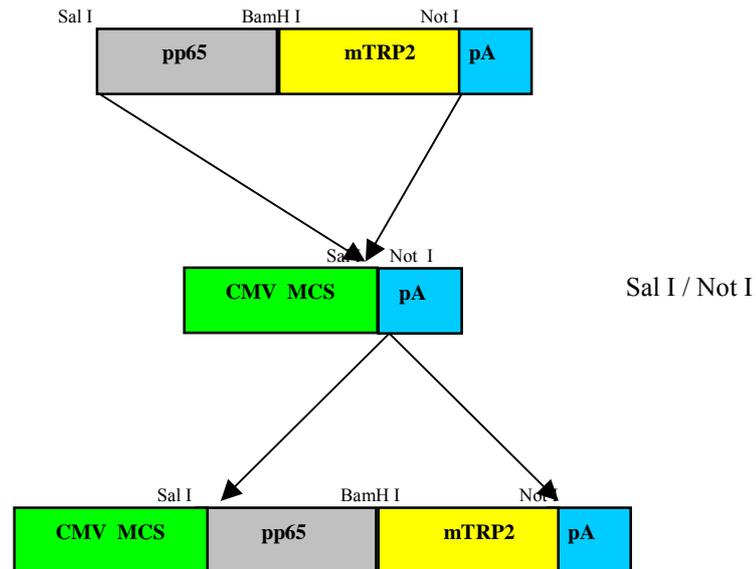




Nach einbringen der BamH I Schnittstelle in EGFPmTRP2 wurde EGFP durch pp65 als Sal I / BamH I Fragment ersetzt.



Im letzten Klonierungsschritt wurde pp65mTRP2 Sal I / Not I in den pAdlox-Expressionsvektor ligiert.



3.3.3 Nachweis von β -Galaktosidase mTRP2 180-188 in der X-gal Färbung

Zum Nachweis der Genexpression wurden 293-Zellen transient durch CaPO_4 - Transfektion mit dem Plasmid β -gal mTRP2 180-188 transfiziert, nach 48 Stunden wurde die Expression der β -Galaktosidase durch Färbung mit x-gal nachgewiesen.

Wie in Abb. 27A zu sehen ist, sind β -gal positive Zellen blau angefärbt (siehe Kap. [2.5.4.](#)).

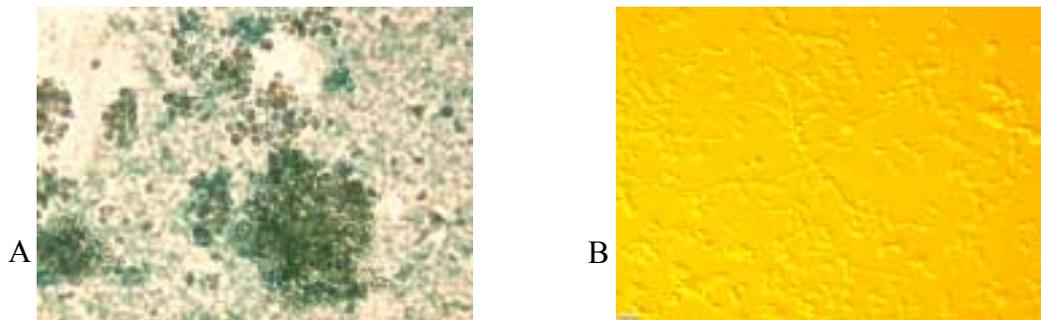


Abbildung 27

Nachweis von β gal mTRP2 in 293 Zellen

Zum Nachweis von β -gal mTRP2aa180-188 wurden 293 transient transfiziert und die β -Galaktosidase Expression durch Färbung der Zellen mit X-Gal nachgewiesen (A). Untransfizierte 293-Zellen sind in (B) dargestellt.

3.3.4 Nachweis von pp65mTRP2

pp65mTRP2 wurde nach transienter Transfektion von 293-Zellen im Western-Blot nachgewiesen. Zum Nachweis von mTRP2 wurde wie in den vorausgegangenen Experimenten anti-Pep8 verwendet. Wie in Abb. 28 zu sehen ist lässt sich die Expression des Fusionsproteins pp65mTRP 2 bei ca. 110 kDa im Western-Blot nachweisen

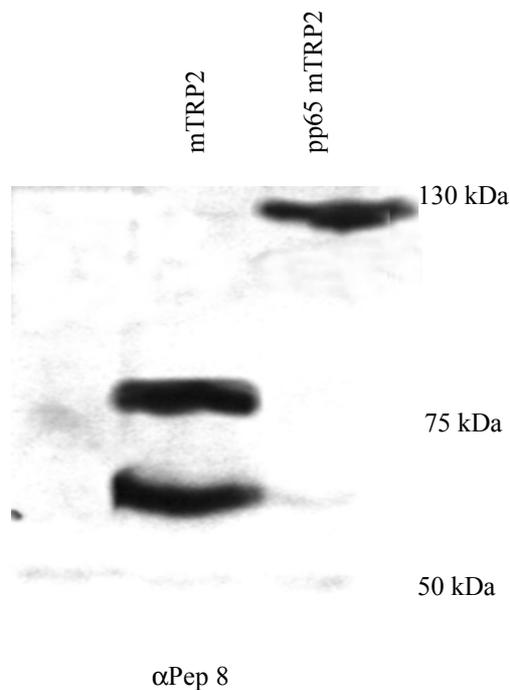


Abbildung 28

Nachweis von pp65mTRP2 in transfizierten 293 Zellen

pp65 mTRP2 wurde in transfizierten 293-Zellen mittels Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Zur Detektion wurden ein gegen TRP2 gerichtetes polyklonales Kaninchenantiserum (anti-Pep8) verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Sekundärantikörpern gegen Kaninchen IgG detektiert.

3.3.5 Analyse des Einflusses der Fusionspartner auf die Gene-Gun Immunisierung

Wie in den vorausgegangenen Experimenten erfolgte die genetische Immunisierung von C57BL/6 Mäuse durch Gene-Gun Beschuss der rasierten Bauchhaut. (siehe Kap. [2.5.1.](#))

Nach Ende der Immunisierung wurden die Mäuse auf die Induktion von TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und das entstehen einer vitiligoartigen Felldepigmentierung untersucht.

3.3.6 Induktion von vitiligoartigen Felldepigmentierungen

Nach Ende der Gene-Gun Immunisierung zeigte sich in den Gruppen, die pp65mTRP2 und mit β -gal mTRP2aa180-188 immunisiert wurden eine Depigmentierung im nachwachsenden Fell der Bauchhaut. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der Pigmentierung und somit die Zerstörung der Melanozyten durch $CD8^+$ TRP2-spezifische T-Zellen nicht ausschließlich von EGFP als Fusionspartner abhängig ist. Vielmehr sind auch andere Proteine in der Lage eine Verfremdung und somit eine Immunität herbeizuführen.



β -gal mTRP2aa180-188



pp65mTRP2

Abbildung 29

Autoimmune Vitiligo nach genetischer Immunisierung mit β -gal mTRP2 und pp65mTRP2

C57Bl/6 Mäuse wurden in wöchentlichem Rhythmus insgesamt 5x Gene Gun-immunisiert. 2-3 Wochen nach Abschluss der Immunisierung stellte sich im Bereich des beschossenen Hautareals in den mit pp65mTRP2 und β -gal mTRP2aa180-188 immunisierten Mäusen am Bauch ein Verlust der Pigmentierung ein.

3.3.7 Nachweis von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten

Der Nachweis des Einflusses der Fusionspartner auf die Induktion von TRP2-spezifischen T-Lymphozyten nach der Gene-Gun Immunisierung erfolgte in der ELISPOT-Analyse (siehe Abschnitt [2.7.2.](#)).

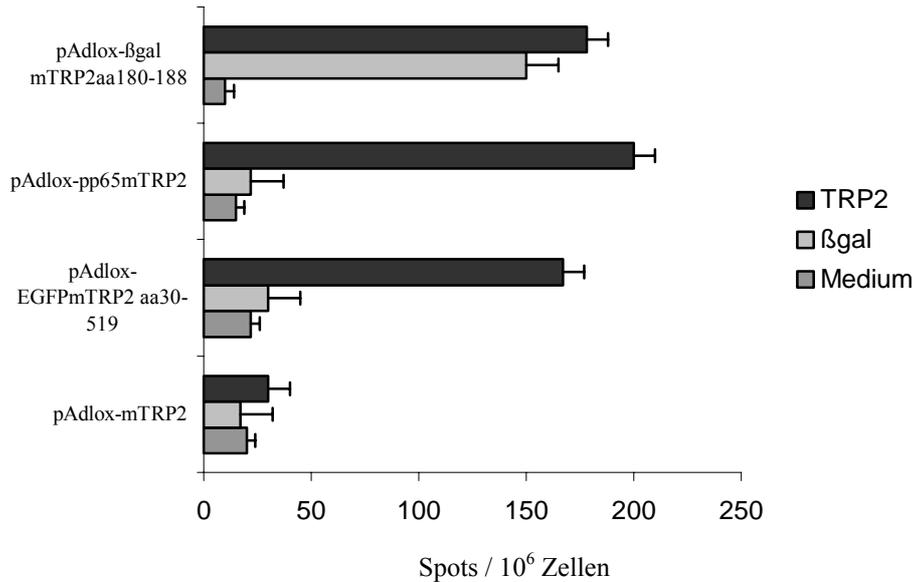


Abbildung 30

Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen

Milzzellen aus immunisierten Mäusen wurden in IFN γ ELISPOT Test mit dem TRP2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid restimuliert. Nach 22 Stunden wurde die Antigen-spezifische IFN γ -Freisetzung einzelner Lymphozyten sichtbar gemacht. Dargestellt ist die Anzahl Spots pro 10⁶ Milzzellen aus Dreifachmessungen \pm Mittelwertabweichung.

In den mit pp65mTRP2 und β -galmTRP2aa180-188 immunisierten Mäusen konnten TRP2-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt [2.7.2.](#)), zusätzlich konnten nach Restimulation mit dem H2-K^b CD8-spezifischen β gal-Peptid aa495-504 β -gal spezifische T-Zellen in den mit β -galmTRP2aa180-188 immunisierten Mäusen nachgewiesen werden. Die Fusion des wenig immunogenen TRP2 Fragmentes mTRP2 aa30-519 mit den immunogenen Fusionspartnern pp65 oder β -Galaktosidase scheint ausreichen um eine TRP2-spezifische Immunantwort zu induzieren.

4 Diskussion

4.1 Kopplung von Tumorantigenen mit immunogenen Fremdproteinen

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung einer effektiven Melanomvakzine im tierexperimentellen Modell im Hinblick auf die spätere klinische Anwendung beim Patienten. Durch die Fusion des wenig immunogenen Selbstantigens mTRP2 mit dem immunogenen Fusionspartner EGFP gelang es bei C57BL/6 Mäusen, die körpereigene Toleranz gegen Selbstantigene zu umgehen und so eine antigenspezifische Immunantwort zu induzieren³⁴. Die Idee der Verstärkung einer Immunantwort durch Kopplung an immunogene Proteine lehnt sich an die Generation von Kaninchenantisera gegen Peptidantigene durch Kopplung an keyhole limpet hemocyanin (KLH). Anstelle von KLH wurde für die Kopplung auf der Ebene der cDNA das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) verwendet³⁵. In dieser Arbeit wurde zuerst die Immunisierung mit der cDNA von EGFPmTRP2 aa30-519 durch Gene-Gun Beschuss durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.4 zu sehen zeigte sich in den mit der cDNA von EGFPmTRP2 aa30-519 immunisierten Mäusen eine vitiligoartige Felldepigmentierung, die nach Immunisierung mit der cDNA für das mTRP2 nicht beobachtet wurde³⁵. In diesen Mäusen ließen sich auch im Elispot-Test TRP2-spezifische T-Zellen nachweisen. Wie in Kapitel 3.1.8 gezeigt waren Tiere, die mit Ad-EGFPmTRP2 immunisiert wurden, gegen das Wachstum von transplantierten B16 Melanomzellen geschützt. Die Fusion verstärkt die Immunantwort. Eine Immunantwort und ein Tumorschutz konnte jedoch nur induziert werden, wenn eine direkte Fusion zwischen dem Selbstantigen TRP2 und dem immunogenen Fusionspartner EGFP besteht. Dies konnte mit den Experimenten belegt werden in denen Mäuse gleichzeitig mit der cDNA für EGFP und mTRP2 oder den Viren für EGFP und mTRP2 vakziniert wurden. In den transfizierten Zellen werden dann beide Proteine gleichzeitig exprimiert sind aber im Gegensatz zu EGFPmTRP2 aa30-519 nicht miteinander fusioniert. Hier konnten keine antigenspezifischen T-Zellen und Felldepigmentierungen nachgewiesen werden.

In der Literatur findet sich ein vergleichbarer Ansatz in einem Lymphommodell von der Arbeitsgruppe von Freda Stevenson^{36,37}. Als Tumorantigen dient das idiotypische Protein von Immunglobulinen, welches bei B-Zell Lymphomen exprimiert wird. Häufig sind diese Proteine nur wenig immunogen und reichen deshalb für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nicht aus. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Fusion des Fragments C des Tetanustoxins (FrC) mit der idiotypischen cDNA auf die Entstehung

einer Immunantwort untersucht. Im Gegensatz zur Vakzinierung mit der cDNA für das Tumorummoglobulin alleine, konnten nach Immunisierung mit dem Fusionskonstrukt tumorspezifische Antikörper und CTL nachgewiesen werden. Nach Injektion von A31 Lymphomzellen schützt die Vakzinierung mit dem Fusionskonstrukt vor dem Wachstum des Lymphoms im Mausmodell.

4.2 Möglichkeiten der genetischen Immunisierung zur Induktion einer Tumorummunantwort gegen Selbstantigene durch Fusion mit immunstimulierenden Molekülen

Die Verwendung antigenkodierender DNA für die Beeinflussung der erworbenen Immunantwort hat sich als „genetische Immunisierung“ in den letzten Jahren zu einer neuen, vielversprechende Methode für die Vorbeugung und Behandlung malignen Tumoren entwickelt. Neben der Möglichkeit der Fusion eines schwach immunogenen Antigens mit einem starken Fremdprotein zur Induktion und Verstärkung einer antigenspezifischen Immunantwort gibt es auch alternative Ansätze.

Mit Erfolg angewendet wurde die Kopplung von Antigenen an CTLA4. Die Arbeitsgruppe von Mi-Hua Tao konnte wieder in einem B-Zell Lymphommodell zeigen, dass die wenig immunogene idiotypische Determinante eines B-Zell Lymphoms nach Fusion mit CTLA-4 als erfolgreich Vakzine eingesetzt werden kann^{38;39}. Nach Immunisierung mit dem Fusionskonstrukt konnte ein hoher Titer von idiotypischen Antikörpern und die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Im Mausmodell schützt die Vakzinierung mit dem Fusionskonstrukt vor dem Wachstum des 38C13 Lymphoms. CTLA-4 befindet sich auf aktivierten T-Zellen und besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu B7-1 und B7-2, welche auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Es wird postuliert, dass die Wechselwirkung zwischen CTLA-4 und B7 die Antigene in antigenpräsentierende Zellen einbringt und damit effizient antigenspezifische T-Zellen stimuliert werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Fusion von Antigenen mit Wachstumsfaktoren. Der Fms-like tyrosinase kinase 3 ligand (Flt3) ist ein für die Generierung von dendritischen Zellen entscheidendes Zytokin. Er gehört zur Familie der Typ III Rezeptor Kinase Familie. Die Arbeitsgruppe von T.-C. Fu konnte mit dem E7 Protein des humanen Papillomvirus-16 als Tumormodellantigen zeigen, dass nach Gene-Gun Immunisierung mit einem Fusionskonstrukt bestehend aus HPV16-E7 und Flt3, im Gegensatz zur Vakzinierung mit der cDNA von HPV16-E7 alleine, tumorspezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden können⁴⁰.

Die Vakzinierung von C57BL/6 Mäusen mit dem Fusionskonstrukt schützt vor dem Wachstum von TC-1 Tumorzellen. Die Tumorprotektion in diesem Modell ist von CD4⁺ T-Zellen unabhängig. In *in vitro* Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Fusion eines Antigenes mit Flt3 zu einer verbesserten Prozessierung im MHC I Antigen-Prozessierungsweg führt. Diese Fusion führt vermutlich zum Targeting von Antigenen zu antigenpräsentierenden Zellen und deren Aktivierung.

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion einer T-Zell abhängigen Antitumor-Immunität ist die Fusion eines Selbstantigenes mit einem Chemokin. Die Arbeitsgruppe von Larry W. Kwak verwendete dazu zwei Chemokine, das Interferon inducible protein 10 und das monocyte chemotactic protein 3^{41;42}. Chemokine sind eine Gruppe von kleinen sezernierten Proteinen, die an Rezeptoren auf der Oberfläche von DC binden und diese aktivieren können. Man weiß, dass das Interferon inducible protein 10 durch Anlocken von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten in der Lage ist, eine T-Zell abhängige Tumorprotektion zu induzieren. Das monocyte chemotactic protein 3 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und DC, T-Lymphozyten, Basophile und Eosinophile. In dieser Arbeit konnte in einem Lymphommodell gezeigt werden, dass nach Fusion der variablen Region eines Lymphom-Immunglobulins mit einem Chemokin eine wirksame Tumorprotektion gegen das Wachstum von Lymphomzellen im Mausmodell induziert werden kann.

Die Arbeitsgruppe von Herman N. Eisen erprobte die Kopplung von Antigenen an Hitzeschockproteine. Diese löslichen Proteine sind als Stimulatoren von CD8⁺ T-Zellen bekannt. Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Ansätzen erfolgte in dieser Arbeit die Vakzinierung auf Proteinebene und nicht durch die Gabe von cDNA. Herman N. Eisen konnte in seinen Arbeiten zeigen, dass die Fusion eines Antigenes mit dem Hitzeschockprotein hsp70 eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen das fusionierte Antigen stimuliert. In seiner Arbeit zeigt er, dass nach Immunisierung von C57BL/6 mit einem rek. Fusionsprotein bestehend aus Ovalbumin und hsp 70 Ovalbumin spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden können^{43;44}. Weiterhin schützt die Immunisierung vor dem Wachstum von Ovalbumin-transfizierten Tumorzellen. In Versuchen mit CD4^{-/-} Mäusen konnte er zeigen, dass die Induktion von antigenspezifischen T-Zellen und die Tumorprotektion in diesem Modell von CD4⁺ T-Zellen unabhängig ist.

Die Arbeitsgruppe von I. Dalum konnte in seinen Arbeiten zeigen, dass nach Vakzinierung mit rekombinanten Selbstproteinen, die ein T-Helferepitop enthalten die B-Zell Toleranz durchbrochen werden kann und kreuzreagierende Antikörper gegen Selbstproteine induziert werden können^{45;46}. In seinen Arbeiten verwendete er das Selbstprotein Ubiquitin, in das er T-

Helferepitope von Ovalbumin und Hühner-Ei-Lysozym inserierte. Die Induktion von Antikörper ist in dieser Arbeit von der Lokalisation der T-Helferepitope abhängig.

Weiterhin lässt sich durch die Veränderung von Signalsequenzen die intrazelluläre Lokalisation und die Abbaugeschwindigkeit von Antigenen verändern und damit die Antigenprozessierung und –präsentation beeinflussen⁴⁷. So konnte gezeigt werden, dass die Kopplung eines Antigens mit einer N-terminalen Ubiquitindomäne zu einer verstärkten proteasomalen Proteindegradation und damit vermutlich über eine vermehrte Produktion von MHC-Klasse I-bindenden Peptiden zu einer verbesserten Antigen-Präsentation und einer effektiveren T-Zell-Stimulation führt⁴⁸. Durch N-terminale Addition der ersten 80 Aminosäuren der „Invarianten Kette“ gelang eine intrazelluläre Ansammlung in endosomalen, MHC Klasse II-positiven Kompartimenten und damit eine verbesserte Antigenpräsentation für CD4⁺ T-Helferzellen^{49;49-51}.

4.3 Einfluss und Funktion von CD4⁺ T-Zellen auf die Induktion einer Immunantwort

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Induktion von CD8⁺ antigenspezifischen T-Zellen nach Immunisierung mit EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten von CD4⁺ T-Zellen abhängig ist. Die Bedeutung von CD4⁺ T-Helferzellen in unserem Modell wurde durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen in Wildtyp Mäusen und durch Verwendung von CD4 knockout Mäusen gezeigt. CD4 knockout Mäuse besitzen keine CD4⁺ T-Zellen, so dass MHC Klasse II-restringierte Immunantworten deutlich reduziert sind. Die genetische Immunisierung mit EGFPmTRP2 war nicht in der Lage, eine Protektion gegen das metastatische Wachstum von B16 Melanomzellen in den Lungen von CD4^{-/-} Mäusen zu induzieren. In den Depletionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Primingphase von CD8⁺ T-Zellen spielen.

In den Arbeiten von P. Matzinger und J.M. Melief wurde der Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf die Induktion von Immunantworten näher charakterisiert⁵². Sie konnten zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen Hilfe in der Primingphase von CD4⁺ T-Zellen durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen erhalten⁵³⁻⁵⁵. Professionelle antigenpräsentierende dendritische Zellen präsentieren gleichzeitig Antigen-beladene MHC-I und MHC-II Moleküle. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt zur Sekretion von IL2, das die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen unterstützt. Weiterhin führt die Interaktion zwischen T-Helferzellen und DC zur Aktivierung und Ausreifung der APC. Nur „reife“ dendritische Zellen besitzen einen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. Dabei spielt die

Wechselwirkung zwischen den Molekülen CD40 und CD40 Ligand eine wichtige Rolle. CD40 wird auf aktivierten T-Helferzellen exprimiert^{56;57}. Die Wechselwirkung mit CD40 Ligand, der auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, führt zur Aktivierung und Ausreifung der Zellen. Arbeitsgruppen konnten *in vitro* zeigen, dass bei fehlender Aktivierung der DC über CD40 CD40 Ligand Interaktionen keine antigenspezifischen CTL induziert werden können.

Ein weiteres wichtiges Molekül für die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen ist das von der Arbeitsgruppe von E. G. Engleman beschriebene OX40^{58;59}. OX40 ist wie CD40 ein Mitglied der TNFR Superfamilie und wird auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Die Kostimulation von T-Helferzellen durch die Wechselwirkung zwischen OX40 und OX40 Ligand, welcher auf dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert wird, führt zur Proliferation von T-Zellen und zur Produktion von Zytokinen.

4.4 Bedeutung von CD8⁺ T-Zellen für die Immunabwehr von Melanomzellen

Um die Bedeutung der direkten Wirkung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen für die Immunabwehr von B16 Melanomzellen zu erfassen, wurden CD8 knockout Mäuse mit den verschiedenen EGFP-Fusionskonstrukten immunisiert. Diese Mäuse können keine CD8⁺ T-Zellen bilden, so dass MHC Klasse I-restringierte Immunantworten deutlich reduziert sind. Wie in Abschnitt 3.2.8 gezeigt, war die genetische Immunisierung mit den verschiedenen Konstrukten nicht in der Lage, eine Protektion gegen das Wachstum von B16 Melanomzellen in den Lungen von CD8^{-/-} Mäusen zu induzieren. Dieses Ergebnis zeigte eindeutig, dass CD8⁺ T-Zellen vorhanden sein müssen, um eine wirksame Tumorsektion zu generieren. Diese Ergebnisse wurden auch in den Experimenten bestätigt, in denen CD8⁺ T-Zellen in der Effektorphase mit blockierenden Antikörpern depletiert wurden. In diesen Tieren war die Tumorsektion nach Immunisierung im Gegensatz zu den Wildtypmäusen komplett aufgehoben.

In den bisherigen Experimenten konnten wir zeigen, dass durch die Fusion von mTRP2 EGFP eine spezifische Immunantwort gegen das bekannte H2-K^b bindende mTRP2 aa180-188 Peptid epitop induziert werden kann. CD8⁺ T-Zellen, spezifisch für dieses Epitop könnten eine wesentliche Rolle in der Protektion gegen das Wachstum von transplantierten B16 Melanomzellen besitzen. Um diese Hypothese zu bestätigen deletierten wir wesentliche Anteile der mTRP2 cDNA. Wie in Kapitel 3.2.4 zu sehen ist, zeigte sich eine vitiligoartige Felldepigmentierung, in den Mäusen welche mit dem Konstrukt EGFPmTRP2 aa30-188 immunisiert wurden. In Mäusen die mit EGFPmTRP2 30-179 immunisiert wurden, war keine

autoimmune Felldepigmentierung zu sehen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Peptidepitop mTRP2 aa180-188 für die Induktion einer Felldepigmentierung vorhanden sein muss. Diese Hypothese wurde in Mäusen bestätigt, welche mit dem Fusionskonstrukt EGFPmTRP2 aa180-188 immunisiert wurden, das nur das TRP2 Peptid fusioniert mit EGFP enthält. Diese Mäuse zeigten ebenfalls eine autoimmune Vitiligo. Folglich reicht das Peptidepitop mTRP2 180-188 in einem immunogenen Fusionskonstrukt völlig aus, um eine autoimmune Zerstörung der Melanozyten nach Gene Gun Immunisierung zu induzieren. Wie zu erwarten war, konnten im Elispot-Test TRP2 spezifische T-Zellen nur in den Gruppen nachgewiesen werden, welche mit einem Fusionskonstrukt immunisiert wurden das auch das Peptidepitop enthält. Da die Gene-Gun Immunisierung alleine keine ausreichende Tumorprotektion gegen Lungenmetastasen bewirkt, wurden rekombinante Adenoviren generiert und im Hinblick auf die Induktion einer Immunantwort im B16 Melanommodell getestet. Die Immunisierung mit Adenoviren, die das H2-K^b bindende TRP2 Peptid enthalten, schützte gegen das Wachstum von Lungenmetastasen. Selbst nach Immunisierung mit einem Adenovirus, das nur das Peptid fusioniert mit EGFP enthält, konnten keine Metastasen ausgezählt werden. Diese Ergebnisse unterstützten unsere Hypothese, dass das CD8 spezifische TRP2 Peptid ausreicht, um eine starke CD8 Immunantwort mittels CD4 Hilfe zu induzieren. Interessanterweise führt die Immunisierung mit dem Adenovirus EGFPmTRP2 30-179 nur zu einer teilweisen Protektion im Vergleich zu Ad EGFP immunisierten Kontrollgruppen. Wir erklären uns diese Reduktion der Lungenmetastasen (im Vergleich zur Kontrollgruppe), damit, dass sich in den Aminosäuren 30-179 möglicherweise weitere Peptidepitope befinden, die einen Einfluss auf die Induktion einer Tumorimmunantwort haben. Dies muss in weiteren Experimenten charakterisiert werden.

4.5 Einfluss von kompetitiven MHC-Klasse-I bindenden Peptidepitopen auf die Induktion einer Immunantwort

In den vorausgegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass durch Immunisierung mit EGFPmTRP2 Fusionskonstrukten eine TRP2-spezifische Immunantwort induziert werden kann. Für eine wirkungsvolle Tumorprotektion reicht das H2-K^b bindende Peptid mTRP2 180-188 fusioniert mit einem starken Antigen aus. Um den Einfluss des immunogenen Fusionspartners näher zu charakterisieren, immunisierten wir Mäuse mit einem β -Galaktosidase mTRP2 Fusionskonstrukt. Das für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort notwendige Peptid ist in diesem Vektor mit der cDNA von β -gal fusioniert (siehe 3.4.1). Das so erhaltene Fusionsprotein enthält wie EGFPmTRP2 aa180-188 das TRP2

Peptid. β -Galaktosidase ist analog EGFP ein starkes und gut charakterisiertes Antigen. Da von β -gal ein H2-K^b bindendes Peptid bekannt ist, können im Elispot-Test gleichzeitig TRP2 und β -gal spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis von β -gal spezifischen T-Zellen kann als Kontrolle für eine erfolgreiche Vakzinierung verwendet werden. Der Vektor enthält somit zwei starke H2-K^b bindende Peptidepitope. Nach Gene-Gun Immunisierung mit β -gal mTRP2aa 180-188 zeigte sich ebenfalls wie in den EGFPmTRP2 aa180-188 immunisierten Mäuse im Bereich der beschossenen Bauchhaut eine vitiligoartige Felldepigmentierung. Im Elispot-Test ließen sich nach der Immunisierung sowohl TRP2-spezifische als auch β -gal-spezifische T-Zellen nachweisen. Die autoimmune Zerstörung der Melanozyten und die Induktion von TRP2 spezifischen T-Zellen scheint also nicht auf den Fusionspartner EGFP beschränkt zu sein und wird nicht durch andere starke MHC-I Peptidepitope gemindert.

Die Arbeitsgruppe von Freda Stevenson hingegen konnte am Beispiel eines H2-L^d restringierten Peptidepitopes in einem Colon-Karzinom Modell einen kompetitiven Einfluss auf die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort und die Wirksamkeit der Vakzine in einem Tumormodell nachweisen⁶⁰. Als Tumorantigen wurde das Hitzeschockprotein gp70 verwendet, welches mit dem Fragment C des Tetanustoxins fusioniert wurde. gp70 enthält das H2-L^d bindende Peptidepitop AH1. Da das Fragment C ebenfalls ein H2-L^d Peptidepitop enthält, besitzt so das Fusionskonstrukt FrCgp70 zwei starke MHC-I restringierte Peptidepitope. Nach Vakzinierung mit diesem Konstrukt konnten zwar antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen gegen das FrC und AH1 Epitop induziert werden, jedoch konnte keine Tumorprotektion gegen injizierte CT26 Tumorzellen nachgewiesen werden. Nach Vakzinierung mit dem FrCgp70 Konstrukt kommt es zur Induktion von CTL gegen beide Peptidepitope. Die Anzahl der AH1 spezifischen CTL ist jedoch viel geringer als die Anzahl der FrC spezifischen CTL und reicht daher für eine Tumorprotektion nicht aus. Nach Vakzinierung mit einem Fusionskonstrukt bestehend aus dem AH1 Peptidepitop und einem FrC Fragment, in dem das MHC-I bindende Peptidepitop deletiert wurde konnten antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen und eine Tumorprotektion gegen injizierte CT26 Zellen induziert werden.

Peptide, die in Gegenwart von MHC I präsentiert werden stammen von Proteinen, die im Cytosol von Proteasomen abgebaut werden. Danach werden die entstandenen Peptide mit dem TAP-Transporter in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transportiert. Dort bindet das Peptid mit einem partiell gefaltetem MHC-I Molekül und wird aus dem ER an die Zelloberfläche befördert. Das in unseren Arbeiten verwendete Fusionsprotein β -Galaktosidase

mTRP2aa180-188 besitzt ebenfalls zwei H2-K^b bindende Peptidepitope. Das Protein wird im Proteasom gespalten, die entstandenen Peptide werden dann mit dem TAP-Transporter in das Lumen des ER transportiert, indem die Peptide mit neusynthetisierten MHC I Moleküle binden und an der Zelloberfläche präsentiert werden. Es stellt sich die Frage welches der beiden Peptide eine höhere Bindungsaffinität zu MHC-I Molekül besitzt. Das Peptid mit der höheren Bindungsaffinität wird dann in höherer Anzahl in Gegenwart von MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert. Im Gegensatz zu der Arbeit von Freda Stevenson scheint das TRP2-Peptid prozessiert und präsentiert zu werden, da nach Gene-Gun Immunisierung eine vitiligoartige Felldepigmentierung im Bereich der beschossenen Bauchhaut auftritt. Weitere funktionelle Analysen müssen noch nach Generierung von einem rekombinanten Adenovirus für β -galmTRP2aa180-188 im B16 Tumormodell untersucht werden.

4.6 Einfluss der Kopplung auf die intrazelluläre Lokalisation

Das mTRP2 ist ein Typ II Transmembranglykoprotein, das in seiner nativen Form mit seiner N-Terminalen Lokalisationssequenz in das Endoplasmatische Retikulum inseriert wird. In seiner nativen Form wird TRP2 posttranslational modifiziert. Die Insertion des Fusionspartners EGFP in die unterschiedlichen Domänen von mTRP2 hat einen Einfluss auf die posttranslationale Modifikationen und damit auf die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine. Den Einfluss der Fusion auf die intrazelluläre Lokalisation in unserem System konnte durch stabile Transfektanten der EGFP-Fusionskonstrukte mit unterschiedlichen Lokalisationssequenzen in DCEK Zellen und konfokaler Mikroskopie gezeigt werden. Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurden Fusionskonstrukte verwendet, bei denen das TRP2 Fragment N-Terminal inseriert ist. Dies hat den Vorteil, dass sich die Expression des TRP2 Fragmentes indirekt durch die Expression des fusionierten EGFP nachweisen lässt. Diese verkürzten TRP2 Fragmente lassen sich mit dem uns zur Verfügung stehenden gegen TRP2 gerichteten Antikörper nicht nachweisen, da dieser nur den C-Terminus von TRP2 erkennt. Die Konstrukte, bei denen mTRP2 N-Terminal inseriert ist, müssten glykosyliert und posttranslational modifiziert werden. Fusionsproteine, bei denen EGFP N-Terminal inseriert ist, werden nicht glykosyliert. Bei dem Fusionsprotein mTRP2 30-198 EGFP fehlt die N-Terminale Insertionssequenz in das ER. Die konfokale Fluoreszenzaufnahme zeigt, dass das Protein im Cytosol der Zelle exprimiert wird. Bei dem Konstrukt EGFPmTRP2aa30-519, dem ebenfalls die endosomale Insertionssequenz fehlt, das aber die Transmembranregion und die melanosomale Insertionssequenz besitzt, zeigt sich

ebenfalls eine cytosolische Expression. Da dieses Konstrukt bei der Expression die gleiche intrazelluläre Lokalisation wie mTRP2 30-198 EGFP aufweist lässt sich aus diesem Ergebnis schließen, dass das Protein posttranslational nicht mehr modifiziert wird. Die C- oder N-Terminale Anordnung des Fusionspartners EGFP selbst scheint keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation haben.

Da mTRP2aa1-198EGFP die endosomale Insertionssequenz besitzt, zeigt sich in der konfokalen Mikroskopie die Expression des Proteins im endoplasmatischen Retikulum. Bei dem Fusionsprotein limTRP2aa30-198 EGFP, das die ersten 80 Aminosäuren der invarianten Kette zur Insertion in das endosomale Kompartiment besitzt, zeigt sich nach Färbung der Zellen mit anti-LAMP ebenfalls eine Kolo-kalisation in dem endosomalem Kompartiment der Zelle. Auch die melanosomale Insertionssequenz von EGFP in dem Fusionsprotein EsEGFPmTRP2 aa30-519 führt zur Expression im endoplasmatischen Retikulum. Es kommt zur teilweisen Kolo-kalisation mit anti-LAMP angefärbten endosomalen Zellkompartimenten. Nach Abschluss der Analyse zur intrazellulären Lokalisation wurden Mäuse mit den unterschiedlichen Lokalisationssequenzen Gene-Gun immunisiert. Alle Mäuse zeigten nach Abschluss der Immunisierung eine vitiligoartigen Felldepigmentierung und im Elispot-Test ließen sich TRP2 spezifische T- Zellen nachweisen.

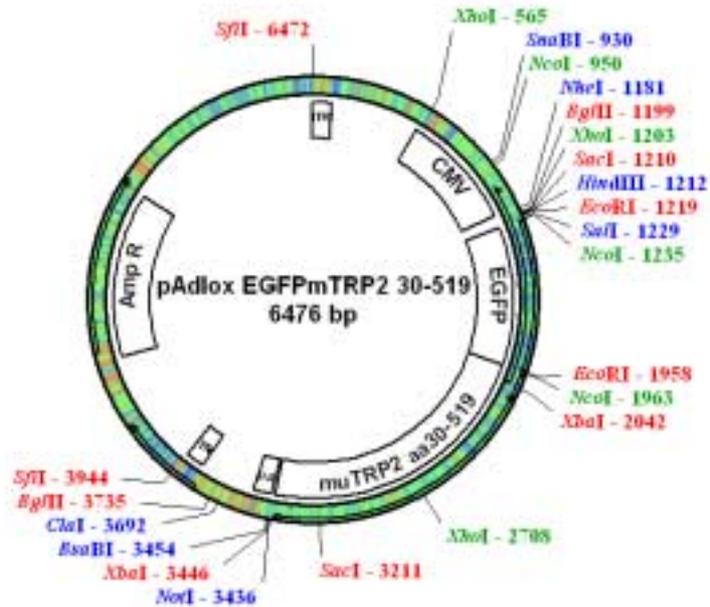
Unsere Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation unserer Fusionsproteine zumindest in diesem Modell keinen Einfluss auf die Entstehung einer Immunantwort hat. Die Arbeitsgruppe von Victor H. Engelhard konnte zeigen, dass die posttranslationale Modifikation von einem Tyrosinase-spezifischen-Peptid einen Einfluss auf die Induktion von antigenspezifischen T-Zellen hat^{61,62}. Durch eine enzymatische posttranslationale Modifikation wird in dem Tyrosinase-spezifischen Peptid aus der Aminosäure Asparagin Asparaginsäure. Beide Peptide besitzen die gleiche Bindungsaffinitäten zu HLA-2.1 Molekülen. Antigen-spezifische CTL werden jedoch nur durch das modifizierte Peptid induziert.

4.7 Anwendung der Kopplung von Selbstantigenen und immunogenen Fremdproteinen in der Klinik

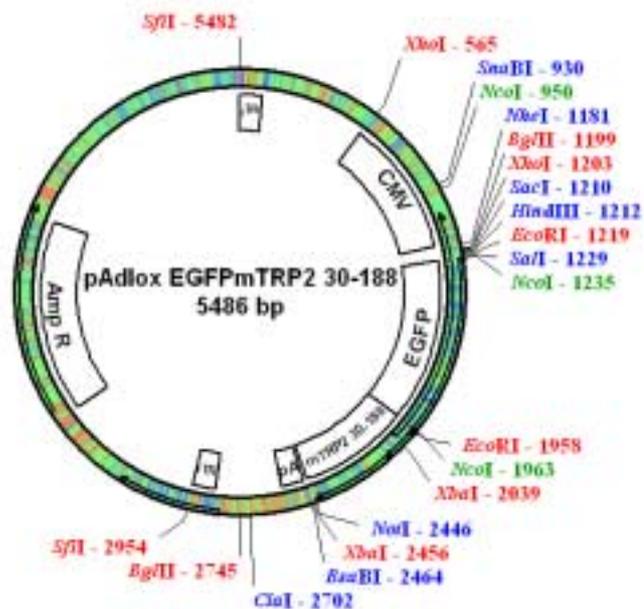
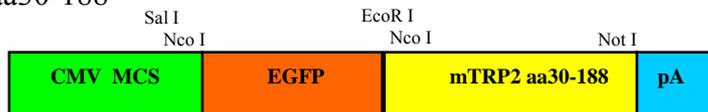
Langfristiges Ziel dieser Arbeit ist es, das Prinzip der Kopplung von Selbstantigenen mit immunstimulierenden Proteinen zur Behandlung von Melanompatienten in der Klinik einsetzbar zu machen. Für die Verwendung in klinischen Studien sollte der Fusionspartner ein gut charakterisiertes Antigen sein, das spezifische Antikörper und T-Zellen stimulieren kann. Der Fusionspartner β -gal eignet sich für klinische Anwendungen daher nicht. Wir haben uns stattdessen für das gut charakterisierte Antigen pp65 des humanen Cytomegalovirus³² entschieden³³. pp65 ist ein Matrix Phosphorprotein des humanen Cytomegalovirus (HCMV). Sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten gegen pp65 sind gut charakterisiert und mehrere MHC-I bindende T-Zellepitope sind bekannt^{63;64}. Um den Einfluss von pp65 als Fusionspartner auf die Induktion einer Immunantwort zunächst im Mausmodell zu untersuchen, wurde ein Plasmid generiert, in dem pp65 mit dem TRP2 Fragment aa30-519 fusioniert wurde. Dieses Konstrukt entspricht EGFP mTRP2 aa30-519. Nach der Gene-Gun Vakzinierung von C57BL/6 Mäusen mit pp65mTRP2 zeigte sich ähnlich wie bei EGFPmTRP2 eine vitiligoartige Feldepigmentierung im Bereich der beschossenen Bauchhaut. Auch im Elispot-Test ließen sich TRP2 spezifische T-Zellen nachweisen. Das Ergebnis dieses Versuchs bestätigt unsere Annahme, dass auch pp65 zur Verstärkung einer antigenspezifischen Immunantwort gegen ein wenig immunogenes Selbstantigen in der Lage ist. Diese Art der Kopplung wird in künftigen Experimenten mit humaner Tyrosinase im menschlichen System *in vitro* und nachfolgend *in vivo* getestet werden.

5 Liste der verwendeten Plasmide

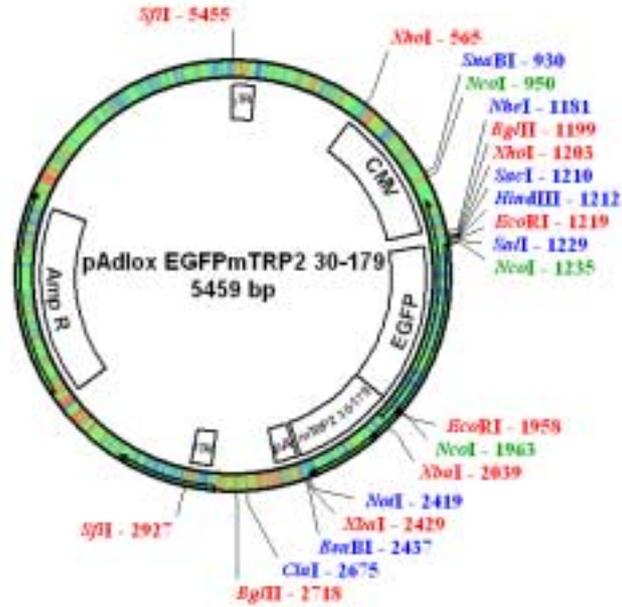
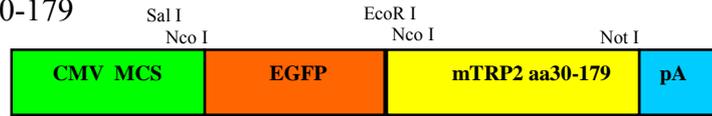
EGFPmTRP2 aa30-519



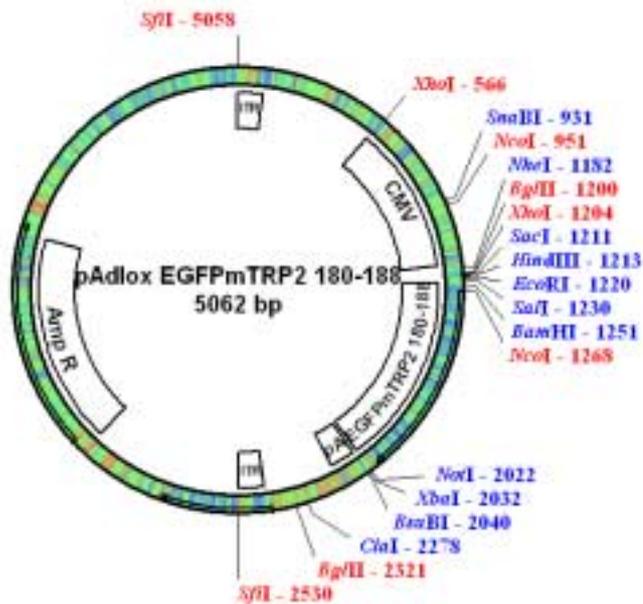
EGFPmTRP2 aa30-188



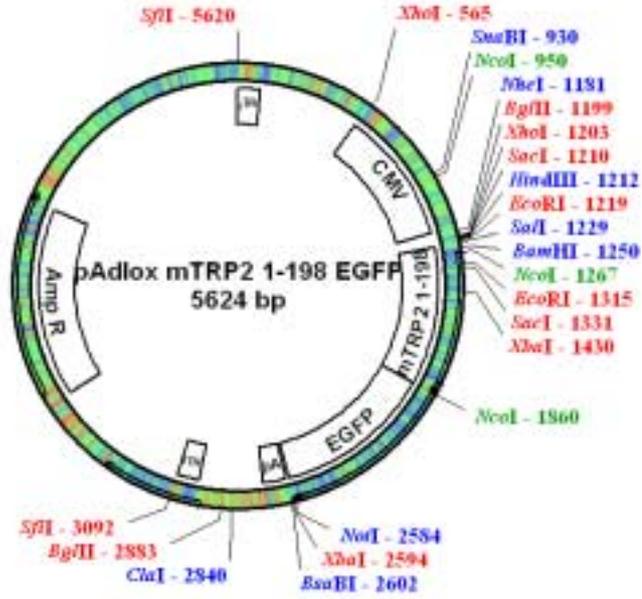
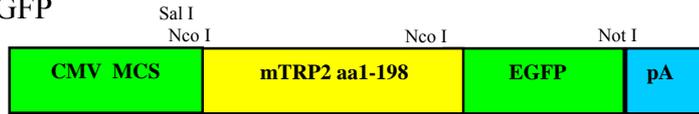
EGFPmTRP2 aa30-179



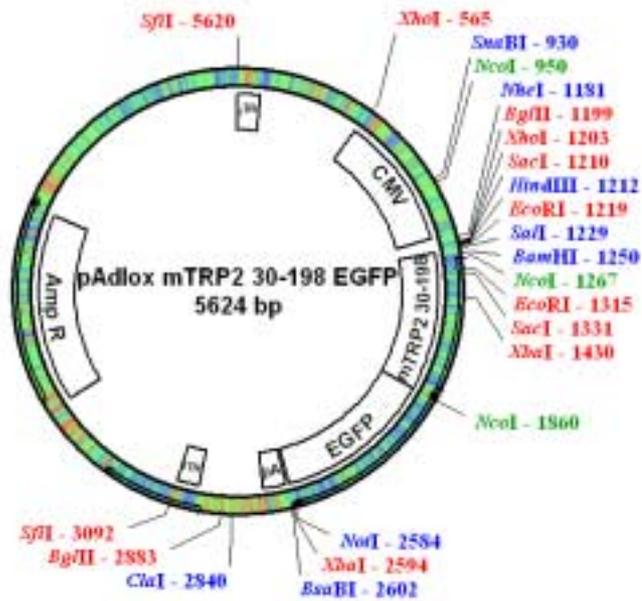
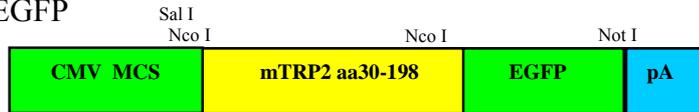
EGFPmTRP2 aa180-188



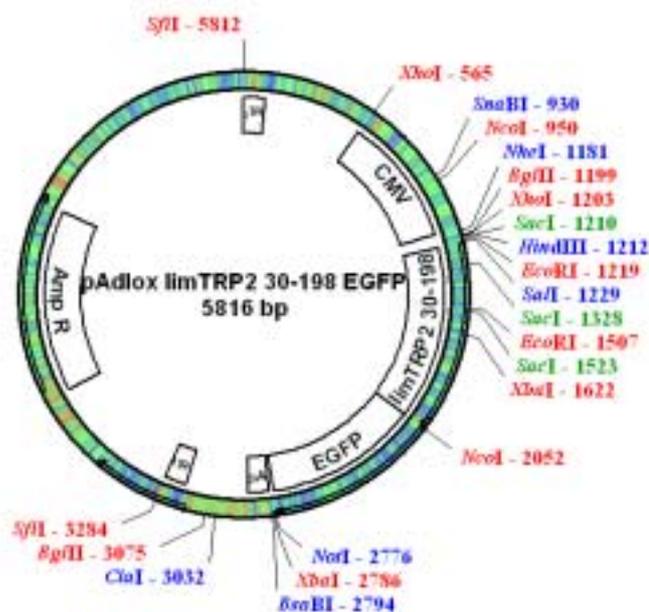
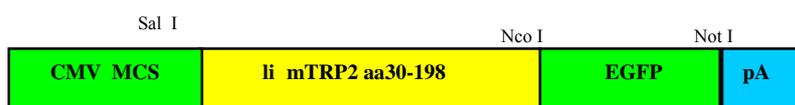
mTRP2 aa1-198 EGFP



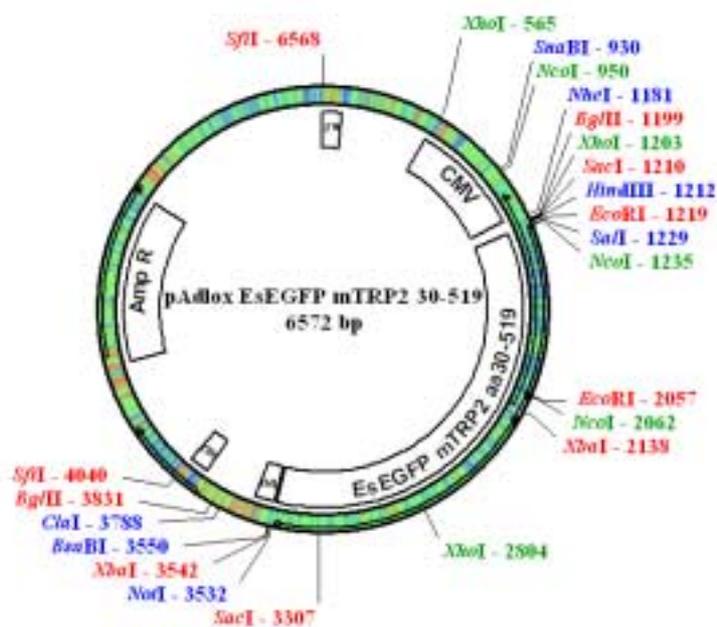
mTRP2 aa30-198 EGFP

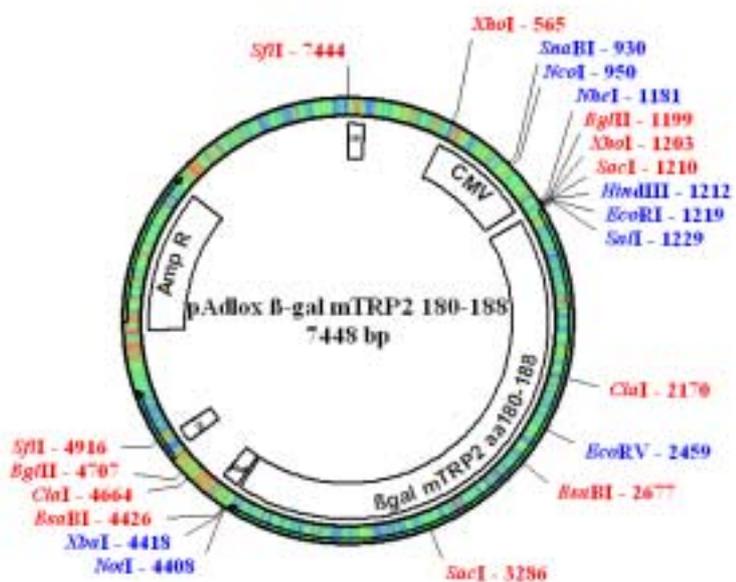


limTRP2 aa30-198 EGFP

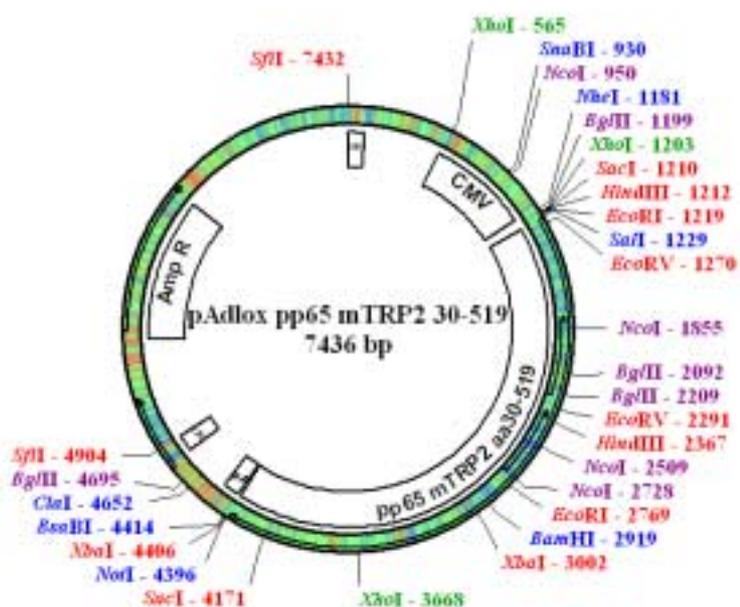


EsEGFPmTRP2 aa30-519

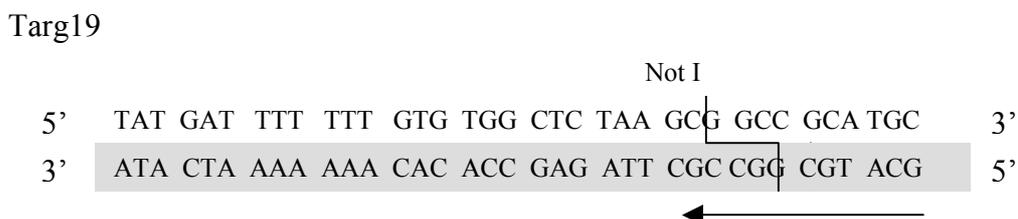
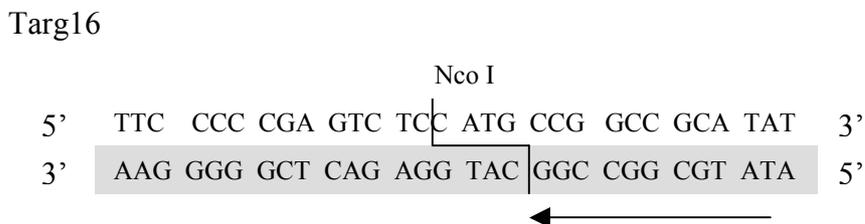
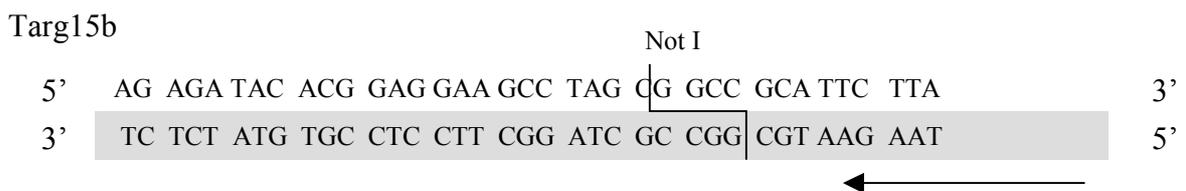
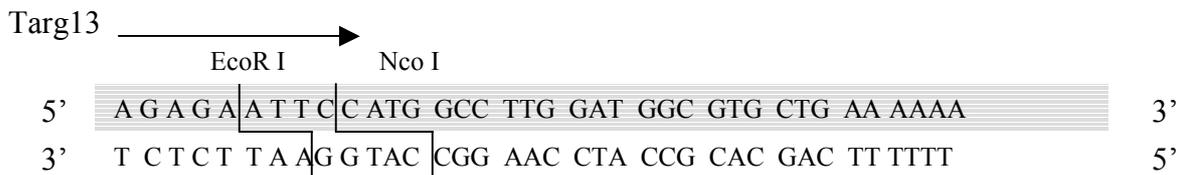
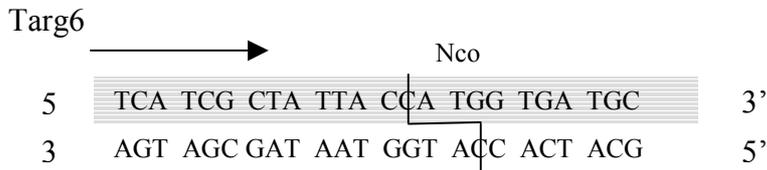
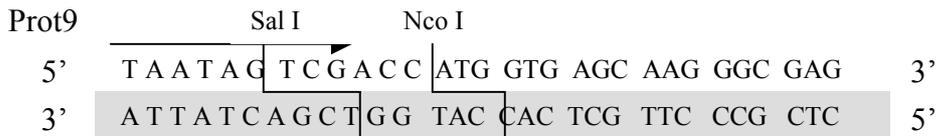
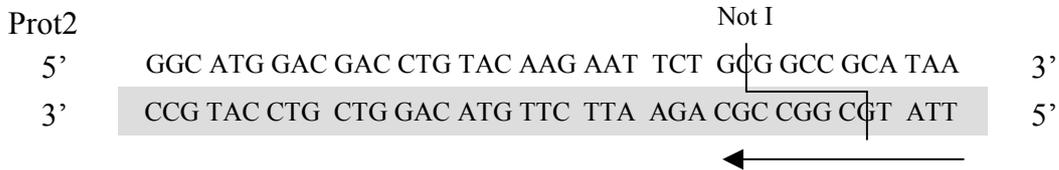


β -gal mTRP2aa180-188

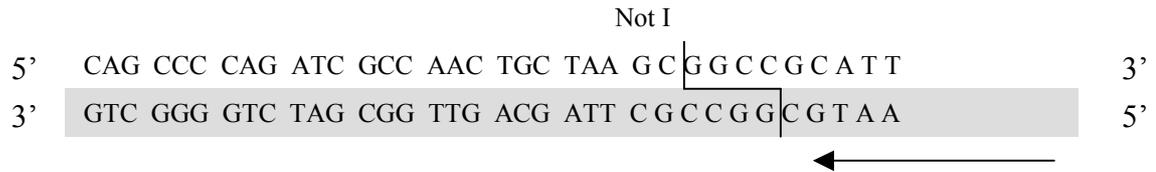
pp65 mTRP2 aa30-519



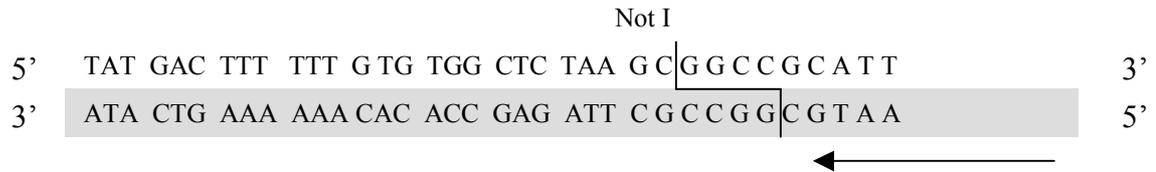
6 Liste der verwendeten Primer



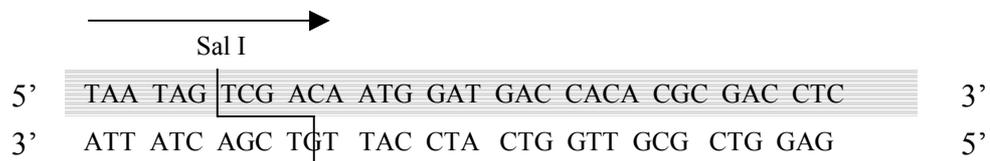
Targ24



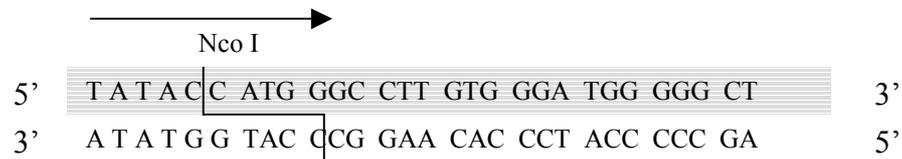
Targ25



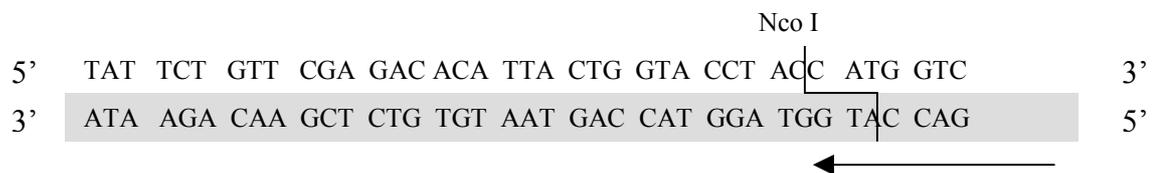
Targ28



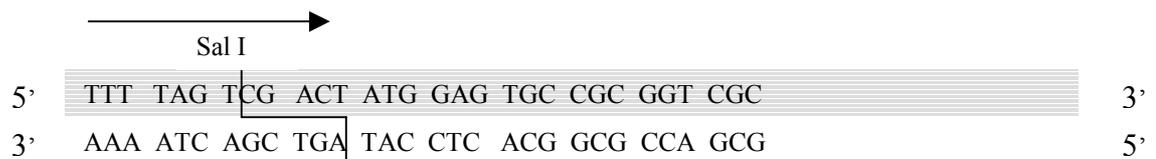
Targ31



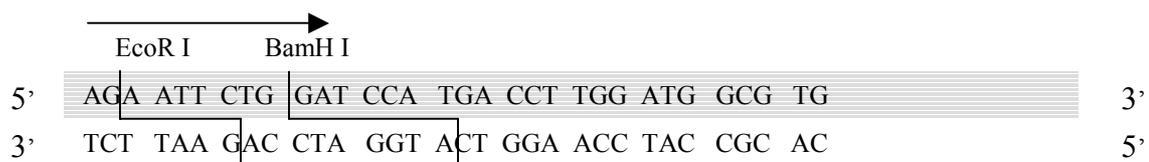
Targ33



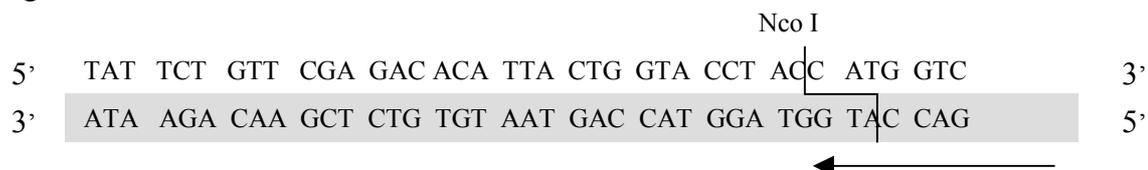
Targ38



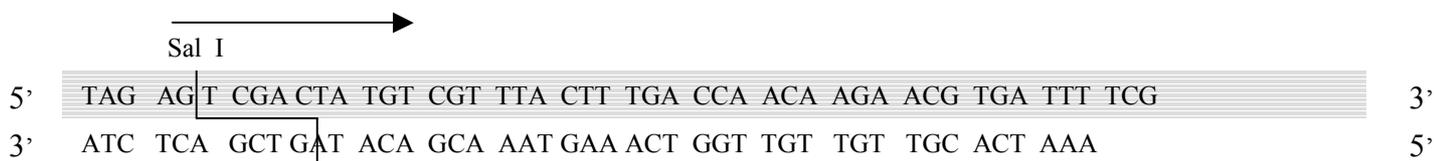
Targ39



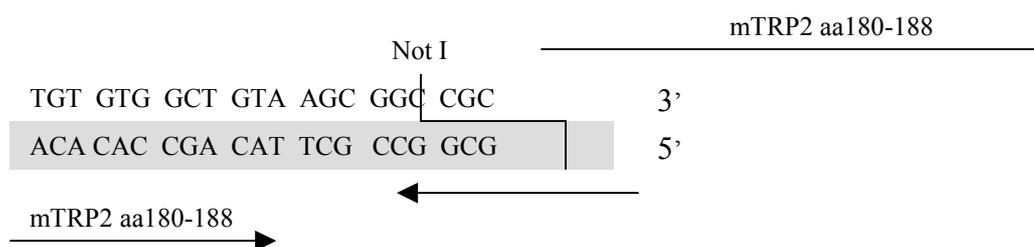
Targ40



Targ42



Targ43



7 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit konnten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Kann durch die genetische Immunisierung mit einem Fusionsprotein bestehend aus mTRP2 und EGFP die periphere Toleranz aufgehoben und eine antigenspezifische Immunantwort induziert werden, die das Wachstum von transplantierten B16 Melanomzellen in C57BL/6 Mäusen unterbindet?**

Die genetische Immunisierung mit der cDNA des Fusionsproteins EGFPmTRP2aa30-519 führt zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort gegen TRP2. In diesen Mäusen kommt es zur Ausbildung einer vitiligoartigen Feldepigmentierung. Die Verwendung des rekombinanten Adenovirus für EGFPmTRP2 aa30-519 führt zu einem vollständigem Schutz vor dem Wachstum von B16 Lungenmetastasen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Immunisierung mit einem Fusionskonstrukt bestehend aus dem wenig immunogenen mTRP2 aa30-519 und einem starken Antigen die periphere Toleranz aufheben und eine effektive Tumorummunabwehr stimulieren kann.

- 2. Welche Rolle spielen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei der Induktion einer Tumorummunantwort in diesem Modell?**

Um den Einfluss von CD4⁺ und CD8⁺-Zellen bei der Induktion einer Tumorummunantwort zu untersuchen, wurden CD4^{-/-} und CD8^{-/-} Mäuse mit Ad-EGFPmTRP2 aa30-519, Ad-EGFPmTRP2 aa30-188 und Ad-EGFPmTRP2 180-188 immunisiert und das Wachstum von transplantierten B16 Zellen im Lungenmetastasenmodell untersucht. Im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen zeigte sich in den CD4^{-/-} und CD8^{-/-} Mäusen keine Tumorprotektion. Es scheint, dass das EGFP Protein CD4⁺ T-Zellen stimuliert, die dann eine entscheidende Rolle in der Primingphase einer Immunantwort spielen. Wir vermuten, dass es durch die Wechselwirkung zwischen antigenpräsentierenden Zellen und aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu einer Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und nachfolgend zur Induktion von TRP2 spezifischen CD8⁺ T-Zellen kommt. Durch Depletion von CD4⁺ T-Zellen konnten wir zeigen, dass diese eine entscheidende Rolle in der Primingphase

von CD8⁺ T-Zellen spielen. Nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen war die Protektion gegen das Wachstum der transplantierten B16 Melanomzellen komplett aufgehoben. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen sind für eine Tumorprotektion erforderlich.

3. Welche immunologisch relevanten Fragmente von TRP2 sind für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort notwendig?

Nach Immunisierung mit den beiden TRP2 Fragmenten mTRP2 aa30-188 und mTRP2 aa180-188 fusioniert mit EGFP zeigt sich im Bereich der beschossenen Bauchhaut eine vitiligoartige Felldepigmentierung. In Elispot-Tests konnten in diesen Gruppen TRP2 spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Die Immunisierung mit der cDNA für mTRP2 aa30-179EGFP führt zu keiner Verfärbung des Fells und keiner Induktion von TRP2 spezifischen T-Zellen. Die Vakzinierung mit den Adenoviren Ad-EGFPmTRP2aa30-188 und Ad-EGFPmTRP2aa180-188 führt zu einem vollständigen Schutz vor dem Wachstum der Tumorzellen im B16 Lungenmetastasenmodell der Maus. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die alleinige Fusion des Peptides aa180-188 mit einem immunogenen Protein eine Zerstörung von Melanozyten bewirkt werden kann.

4. Welche Voraussetzungen müssen Fusionspartner besitzen um die Immunantwort gegen TRP2 zu verstärken und welchen Einfluss haben potentiell kompetitive MHC-Klasse I bindende Peptidepitope?

Um den Einfluss des Fusionspartners auf die Entstehung einer Immunantwort zu untersuchen wurden Mäuse mit pp65mTRP2aa30-519 und β -Galaktosidase mTRP2 180-188 immunisiert. In den mit pp65mTRP2 und β -gal mTRP2aa180-188 immunisierten Mäusen konnten TRP2-spezifische T-Zellen und vitiligoartige Felldepigmentierungen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in den β -gal mTRP2aa180-188 immunisierten Mäusen β -gal spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten hat das in dem Fusionskonstrukt zusätzlich enthaltene starke bindende β -gal H2-K^b Peptidepitop keinen negativen Einfluss auf die Induktion von TRP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

5. Wie verändert die Fusion von mTRP2 mit einem immunstimulierenden Protein die intrazelluläre Lokalisation und wie wirkt sich dies auf die Immunantwort aus?

Um den Einfluss der intrazellulären Lokalisation auf die Entstehung einer antigenspezifischen Immunantwort zu untersuchen wurden Fusionskonstrukte bestehend aus EGFP und mTRP2 mit unterschiedlichen Lokalisationssequenzen generiert. Fusionskonstrukte ohne N-Terminale Insertionssequenz werden im Cytosol der Zelle exprimiert. In diesen Konstrukten hat die unterschiedliche Insertion des EGFP-Fusionspartners (EGFPmTRP2aa30-519 und mTRP2aa30-198EGFP) keinen Einfluss auf die Lokalisation. Dagegen sind die Fusionskonstrukte, welche eine N-Terminale Insertionssequenz besitzen (EsEGFPmTRP2aa30-519 und mTRP2aa1-198EGFP) im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die ersten 80 Aminosäuren der invarianten Kette von limTRP2aa1-198EGFP sorgen dafür, dass dieses Protein in dem endosomalen Kompartiment der Zelle lokalisiert ist. Die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der verwendeten Fusionskonstrukte hat in unserem Modell keinen Einfluss auf die Induktion einer Immunantwort.

8 Literaturverzeichnis

1. Balch,C.M. 2002. Cutaneous melanoma 3rd. ed. *J.B.Lippincott Company, Philadelphia*.
2. Kirkwood,J.M. 1998. Adjuvant IFN alpha2 therapy of melanoma. *Lancet* 351:1901-1903.
3. Medzhitov,R. and C.Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *N.Engl.J.Med.* 343:338-344.
4. Banchereau,J. and R.M.Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 19;392:245-252.
5. Kamradt,T. and N.A.Mitchison. 2001. Tolerance and autoimmunity. *N.Engl.J.Med.* 344:655-664.
6. Marchand,M., N.van Baren, P.Weynants, V.Brichard, B.Dreno, M.H.Tessier, E.Rankin, G.Parmiani, F.Arienti, Y.Humblet, A.Bourlond, R.Vanwijck, D.Lienard, M.Beauduin, P.Y.Dietrich, V.Russo, J.Kerger, G.Masucci, E.Jager, J.De Greve, J.Atzpodien, F.Brasseur, P.G.Coulie, B.P.van der, and T.Boon. 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int.J.Cancer* 80:219-230.
7. Seliger,B., M.J.Maeurer, and S.Ferrone. 1997. TAP off--tumors on. *Immunol.Today* 18:292-299.
8. Rosenberg,S.A. 1997. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol.Today* 18:175-182.
9. Raz,A., C.Bucana, W.McLellan, and I.J.Fidler. 1980. Distribution of membrane anionic sites on B16 melanoma variants with differing lung colonising potential. *Nature* 284:363-364.
10. Rahemtulla,A., W.P.Fung-Leung, M.W.Schilham, T.M.Kundig, S.R.Sambhara, A.Narendran, A.Arabian, A.Wakeham, C.J.Paige, R.M.Zinkernagel, and . 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180-184.
11. Mak,T.W., A.Rahemtulla, M.Schilham, D.R.Koh, and W.P.Fung-Leung. 1992. Generation of mutant mice lacking surface expression of CD4 or CD8 gene targeting. *Adv.Exp.Med.Biol.* 323:73-77:73-77.

12. Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
14. Adenoviridae, S.T. 1996. The Viruses and Their Replication. *Fields Virology Lippincott-Raven, Philadelphia* 2111-2137.
15. Trapnell, B.C. and B. Gorzigla. 1994. Gene therapy using adenoviral vectors. *Biotechnology* 5:617-625.
16. Hitt, M., A.J. Bett, L. Prevec, and F.L. Graham. 1994. Construction and Propagation of Human Adenovirus Vectors. *Cell Biology: A Laboratory Handbook* 474-490.
17. Hardy, S., M. Kitamura, T. Harris-Stansil, Y. Dai, and M.L. Phipps. 1997. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* 71:1842-1849.
18. Mittereder, N., K.L. March, and B.C. Trapnell. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* 70:7498-7509.
19. Klein, R.M., E.D. Wolf, R. Wu, and J.C. Sanford. 1992. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* 24:384-6.:384-386.
20. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
21. Tsukamoto, K., I.J. Jackson, K. Urabe, P.M. Montague, and V.J. Hearing. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* 11:519-526.
22. Brossart, P., A.W. Goldrath, E.A. Butz, S. Martin, and M.J. Bevan. 1997. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J. Immunol.* 158:3270-3276.
23. Bloom, M.B., D. Perry-Lalley, P.F. Robbins, Y. Li, M. el Gamil, S.A. Rosenberg, and J.C. Yang. 1997. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J. Exp. Med.* 185:453-459.

24. Tuting,T., A.Gambotto, A.DeLeo, M.T.Lotze, P.D.Robbins, and W.J.Storkus. 1999. Induction of tumor antigen-specific immunity using plasmid DNA immunization in mice. *Cancer Gene Ther.* 6:73-80.
25. Schneider,J., S.C.Gilbert, T.J.Blanchard, T.Hanke, K.J.Robson, C.M.Hannan, M.Becker, R.Sinden, G.L.Smith, and A.V.Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat.Med.* 4:397-402.
26. Steitz,J., J.Bruck, K.Steinbrink, A.Enk, J.Knop, and T.Tuting. 2000. Genetic immunization of mice with human tyrosinase-related protein 2: implications for the immunotherapy of melanoma. *Int.J.Cancer* 86:89-94.
27. Mamula,M.J., R.H.Lin, C.A.Janeway, Jr., and J.A.Hardin. 1992. Breaking T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J.Immunol.* 149:789-795.
28. Naftzger,C., Y.Takechi, H.Kohda, I.Hara, S.Vijayasaradhi, and A.N.Houghton. 1996. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:14809-14814.
29. Yokoyama,K., K.Yasumoto, H.Suzuki, and S.Shibahara. 1994. Cloning of the human DOPAchrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression. *J.Biol.Chem.* 269:27080-27087.
30. Steitz,J., J.Bruck, J.Knop, and T.Tuting. 2001. Adenovirus-transduced dendritic cells stimulate cellular immunity to melanoma via a CD4(+) T cell-dependent mechanism. *Gene Ther.* 8:1255-1263.
31. Chen,P.W., M.Wang, V.Bronte, Y.Zhai, S.A.Rosenberg, and N.P.Restifo. 1996. Therapeutic antitumor response after immunization with a recombinant adenovirus encoding a model tumor-associated antigen. *J.Immunol.* 156:224-231.
32. Jahn,G., B.C.Scholl, B.Traupe, and B.Fleckenstein. 1987. The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J.Gen.Virol.* 68:1327-1337.

33. Ruger,B., S.Klages, B.Walla, J.Albrecht, B.Fleckenstein, P.Tomlinson, and B.Barrell. 1987. Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 61:446-453.
34. Colella,T.A., T.N.Bullock, L.B.Russell, D.W.Mullins, W.W.Overwijk, C.J.Luckey, R.A.Pierce, N.P.Restifo, and V.H.Engelhard. 2000. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J.Exp.Med.* 191:1221-1232.
35. Steitz,J., J.Bruck, A.Gambotto, J.Knop, and T.Tuting. 2002. Genetic immunization with a melanocytic self-antigen linked to foreign helper sequences breaks tolerance and induces autoimmunity and tumor immunity. *Gene Ther.* 9:208-213.
36. King,C.A., M.B.Spellerberg, D.Zhu, J.Rice, S.S.Sahota, A.R.Thompsett, T.J.Hamblin, J.Radl, and F.K.Stevenson. 1998. DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nat.Med.* 4:1281-1286.
37. Thirdborough,S.M., J.N.Radcliffe, P.S.Friedmann, and F.K.Stevenson. 2002. Vaccination with DNA encoding a single-chain TCR fusion protein induces anticolonotypic immunity and protects against T-cell lymphoma. *Cancer Res.* 62:1757-1760.
38. Huang,T.H., P.Y.Wu, C.N.Lee, H.I.Huang, S.L.Hsieh, J.Kung, and M.H.Tao. 2000. Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA-4 to a self tumor antigen. *Blood* 96:3663-3670.
39. Boyle,J.S., J.L.Brady, and A.M.Lew. 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* 392:408-411.
40. Hung,C.F., K.F.Hsu, W.F.Cheng, C.Y.Chai, L.He, M.Ling, and T.C.Wu. 2001. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand.PG. *Cancer Res.* 61:1080-1088.
41. Biragyn,A., K.Tani, M.C.Grimm, S.Weeks, and L.W.Kwak. 1999. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat.Biotechnol.* 17:253-258.
42. Biragyn,A., M.Surenhu, D.Yang, P.A.Ruffini, B.A.Haines, E.Klyushnenkova, J.J.Oppenheim, and L.W.Kwak. 2001. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells

- induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J.Immunol.* 167:6644-6653.
43. Huang,Q., J.F.Richmond, K.Suzue, H.N.Eisen, and R.A.Young. 2000. In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain and is CD4(+) T cell independent. *J.Exp.Med.* 191:403-408.
 44. Suzue,K., X.Zhou, H.N.Eisen, and R.A.Young. 1997. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:13146-13151.
 45. Dalum,I., M.R.Jensen, P.Hindersson, H.I.Elsner, and S.Mouritsen. 1996. Breaking of B cell tolerance toward a highly conserved self protein. *J.Immunol.* 157:4796-4804.
 46. Dalum,I., M.R.Jensen, K.Gregorius, C.M.Thomasen, H.I.Elsner, and S.Mouritsen. 1997. Induction of cross-reactive antibodies against a self protein by immunization with a modified self protein containing a foreign T helper epitope. *Molecular Immunology* 34:1113-1120.
 47. Sherritt,M., L.Cooper, D.J.Moss, N.Kienzle, J.Altman, and R.Khanna. 2001. Immunization with tumor-associated epitopes fused to an endoplasmic reticulum translocation signal sequence affords protection against tumors with down-regulated expression of MHC and peptide transporters. *Int.Immunol.* 13:265-271.
 48. Wu,Y. and T.J.Kipps. 1997. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J.Immunol.* 159:6037-6043.
 49. Sanderson,S., K.Frauwirth, and N.Shastri. 1995. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins.PG -. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:7217-7221.
 50. Sponaas,A., C.Carstens, and N.Koch. 1999. C-terminal extension of the MHC class II-associated invariant chain by an antigenic sequence triggers activation of naive T cells. *Gene Ther.* 6:1826-1834.

51. Bischof,F., W.Wienhold, C.Wirblich, G.Malcherek, O.Zevering, A.M.Kruisbeek, and A.Melms. 2001. Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:12168-12173.
52. Ridge,J.P., F.Di Rosa, and P.Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
53. Ossendorp,F., E.Mengede, M.Camps, R.Filius, and C.J.Melief. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J.Exp.Med.* 187:693-702.
54. Lanzavecchia,A. 1998. Immunology. Licence to kill. *Nature* 393:413-414.
55. Toes,R.E., F.Ossendorp, R.Offringa, and C.J.Melief. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J.Exp.Med.* 189:753-756.
56. Bennett,S.R., F.R.Carbone, F.Karamalis, R.A.Flavell, J.F.Miller, and W.R.Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480.
57. Schoenberger,S.P., R.E.Toes, E.I.van der Voort, R.Offringa, and C.J.Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.
58. Godfrey,W.R., F.F.Fagnoni, M.A.Harara, D.Buck, and E.G.Engleman. 1994. Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 180:757-762.
59. Weinberg,A.D., M.M.Rivera, R.Prell, A.Morris, T.Ramstad, J.T.Vetto, W.J.Urba, G.Alvord, C.Bunce, and J.Shields. 2000. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J.Immunol.* 164:2160-2169.
60. Rice,J., S.Buchan, and F.K.Stevenson. 2002. Critical components of a DNA fusion vaccine able to induce protective cytotoxic T cells against a single epitope of a tumor antigen. *J.Immunol.* 169:3908-3913.
61. Skipper,J.C., R.C.Hendrickson, P.H.Gulden, V.Brichard, A.Van Pel, Y.Chen, J.Shabanowitz, T.Wolfel, C.L.Slingluff, Jr., T.Boon, D.F.Hunt, and V.H.Engelhard. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen

on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J.Exp.Med.* 183:527-534.

62. Doyle,H.A. and M.J.Mamula. 2001. Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *TRENDS in Immunology*.
63. Grefte,J.M., B.T.van der Gun, S.Schmolke, G.M.van der, W.J.van Son, B.Plachter, G.Jahn, and T.H.The. 1992. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J.Gen.Virol.* 73:2923-2932.
64. Morello,C.S., L.D.Cranmer, and D.H.Speiser. 2000. Suppression of murine Cytomegalovirus (MCMV) Replication with a DNA vaccine encoding MCMV M84 (a homolog of HCMV pp65). *J.Virol.* 74:3696-3708.

9 Abkürzungen

Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulphat
βgal	β-Galaktosidase
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
CD4 ^{-/-}	CD4 ⁺ T-Zell knockout
CD8 ^{-/-}	CD8 ⁺ T-Zell knockout
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalie Virus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyt
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kda	Kilo Dalton
kb	Kilo Basen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of infection
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pfu	plaque forming unit
Th	T-Helfer
TRP1	Tyrosinase-related-Protein 1
TRP2	Tyrosinase-related-Protein 2

mTRP2	murines Tyrosinase-related-Protein 2
hTRPP2	humanes Tyrosinase-related-Protein 2
SDS	Sodium dodecyl sulphat
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent

Lebenslauf

Name: Brück
Vorname: Jürgen
Geburtsdatum: 8. August 1971
Geburtsort: Bad Kreuznach
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

2000-2003 Promotion an den Universitätskliniken Mainz und Bonn
Exp. Dermatologie AG Prof. Dr. Tüting.

1999-2000 Diplomarbeit am Universitätsklinikum Mainz
Hautklinik AG Dr. Tüting.

1994-1999 Studium an der Fachhochschule Bingen im
Studiengang Biotechnologie.

1993-1994.1 Fachoberschule Bad Kreuznach mit Abschluss
der Fachhochschulreife.

1991-1993 H. Treffert Polymere Bingen-Sponsheim. Beschäftigung in der Entwicklung/
Qualitätssicherung.

1989-1991 Chemische Fabrik Budenheim.
Ausbildung zum Chemielaboranten.

1981-1989	Realschule Bingen mit Abschluss der Sekundarstufe I.
1978-1981	Grundschule Münster-Sarmsheim