

**Identifikation und molekulare Charakterisierung von Resistenzmechanismen
gegenüber zellulären Immuneffektoren zur Optimierung von
Krebsimmuntherapien**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Corinna Göbel
aus Oberhausen
Oktober 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Schuler

2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2015

Abkürzungsverzeichnis:

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CDK1	Cyclin-dependent Kinase 1
cDNA	komplementäre DNA
CK2	Casein Kinase 2
CO ₂	Kohlendioxid
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DC	Dendritische Zelle
DFF40/CAD	DNA fragmentation factor 40/caspase-activated deoxynuclease
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1A	Adenovirus early region 1A
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green-fluorescent Protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eEF1B	eukaryotischer Elongationsfaktor B
Erk1/2	Extracellular-signal related kinase (=MAPK)
E:T	Effektor zu Target
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
γ	Gamma
g	Gramm
GEF	Guanin nucleotide exchange factor
GSK3 β	Glykogen synthase kinase 3 beta
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HeLa	Henriette Lacks (Zervixkarzinomzelllinie)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin-2
i.m.	intramuskulär
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
i.v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
LTR	Long Terminal Repeats
μ	Mikro-
M	Molar
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
NOD/SCID	Non-obese diabetic / severe combined immunodeficiency
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs (nicht-steroidale Antiphlogistika)
OD	optische Dichte
pAkt	phosphoryliertes Akt
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasenkettenreaktion)
PD-1	Programmed cell death 1
pg	Picogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
RPS9	Ribosomales Protein S9
RAG	Recombination Activation Genes
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
s.c.	subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Error of Mean
siRNA	small interfering RNA
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAP	Transporter associated with antigen processing
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
UV	ultraviolettes Licht
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
ZTL	Zytotoxische T-Zelle

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1. Tumorummunologie	10
1.1.1. Immunologische Tumorthapien	13
1.1.2. Murines Immuntherapiemodell	14
1.1.3. Expression einer cDNA-Bank in E1A-MEF zur Identifizierung von Resistenzfaktoren gegenüber St42Rag2 ^{-/-} -T-Zellen	16
1.2. Cyclooxygenase-2	17
1.2.1. Prostaglandin E ₂	19
1.2.2. COX-2 bei malignen Tumoren	21
1.2.3. Die Rolle von PGE ₂ im Immunsystem	23
1.2.4. COX-Inhibitoren in der Krebstherapie	24
2. Ziel der Arbeit	26
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27
3.1.1. Laborgeräte	27
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	27
3.1.3. Chemikalien	28
3.1.4. Puffer und Lösungen	29
3.1.5. Verwendete Plasmide	31
3.1.6. Zelllinien	32
3.1.7. Oligonukleotide	32
3.1.8. Antikörper	33
3.1.9. Fertigsysteme	34
3.1.10. Software	34
3.1.11. Datenbanken	34
3.1.12. Auftragsarbeiten	35
3.2. Methoden	36
3.2.1. Zellbiologische Methoden	36
3.2.1.1. Kultivierung von Zellen	36
3.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.2.1.3. Ermittlung der Lebendzellzahl	36
3.2.1.4. Immunomagnetische Zellseparation	37
3.2.1.5. Ko-Kultur von Splenozyten mit murinen Fibroblasten	37

3.2.1.6. Kolonie-Kokulturassay	38
3.2.1.7. Behandlung von Zellen mit zytotoxischen Substanzen	38
3.2.1.8. Bestrahlung von Zellen mit Ultraviolettstrahlung	38
3.2.1.9. Kalzium-Phosphat Transfektion	39
3.2.2. Durchflusszytometrie	41
3.2.2.1. Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumjodid ...	42
3.2.2.2. Bestimmung der Zellviabilität mittels Propidiumjodid.....	43
3.2.2.3. Messung der GFP-Expression	43
3.2.2.4. Detektion von Oberflächenproteinen	44
3.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	44
3.2.3.1. Gewinnung von genomischer DNA aus Mausgewebe	44
3.2.3.2. Gewinnung von genomischer DNA aus Zellkulturzellen.....	45
3.2.3.3. RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellkulturen	45
3.2.3.4. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	45
3.2.3.5. Reverse Transkription	46
3.2.3.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46
3.2.3.6.1. Genotypisierungs-PCR	47
3.2.3.6.2. PCR zur ortsspezifischen Mutagenese	49
3.2.3.6.3. Herstellung von PCR-Produkten für die Klonierung	50
3.2.3.6.4. qPCR	50
3.2.3.7. Agarosegelelektrophorese	51
3.2.3.8. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	52
3.2.3.9. Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	52
3.2.3.10. Klonierung von PCR-Produkten in den pJet-Vektor	53
3.2.3.11. Transformation von kompetenten Bakterien.....	54
3.2.3.12. Isolierung von Plasmid-DNA mit alkalischer Lyse (Minipräparation)	54
3.2.3.13. Plasmid-Maxipräparation	54
3.2.4. Biochemische Methoden	55
3.2.4.1. Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten	55
3.2.4.2. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	55
3.2.4.3. Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56

3.2.4.4. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blotting)	57
3.2.4.5. Immundetektion von Proteinen	57
3.2.4.6. Dehybridisierung von Nitrozellulosemembranen	58
3.2.4.7. Nachweis von Prostaglandin E ₂ im Zellkulturüberstand	58
3.2.4.8. Nachweis von IFN-gamma im Zellkulturüberstand	59
3.2.5 Mausmodelle	59
3.2.5.1. Mausstämme	59
3.2.5.2. Zucht von homozygoten St42Rag2 ^{-/-} Mäusen.....	61
3.2.5.3. Isolierung muriner Splenozyten für die Ko-Kultur	62
3.2.5.4. Transplantation von Tumorzellen.....	62
3.2.5.5. Adoptiver T-Zell-Transfer	62
3.2.5.6. Aufnahme des Tumorwachstums	63
4. Ergebnisse	64
4.1. Charakterisierung der Cyclooxygenase-2 als potentiellen Resistenzfaktor gegenüber zytotoxischen T-Zellen.....	64
4.1.1. Stabile Expression von COX-2 in E1A-MEF und Verifizierung der Resistenz gegenüber St42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten <i>in vitro</i>	64
4.1.2. Funktionelle Untersuchung der durch die Cyclooxygenase-2 vermittelten Resistenz <i>in vivo</i>	66
4.1.3. Funktionelle Analyse der Cyclooxygenase-2	69
4.1.3.1. Funktionelle Untersuchung katalytisch inaktiver COX-2-Mutanten. 72	
4.1.4 Untersuchung der COX-2 vermittelten Resistenz gegenüber pharmakologisch induzierter Apoptose	76
4.1.5. Untersuchung einer COX-2 vermittelten Resistenz gegenüber UV- Bestrahlung.....	78
4.1.6. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die E1A- Peptidpräsentation.....	79
4.1.7. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die Aktivierung von CD8 ⁺ , TCR-transgenen T-Zellen.....	82
4.1.8. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die IFN-gamma-Sekretion von ST42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten	84
4.1.9. Die Zugabe von exogenen IFN-gamma überwindet die Immunresistenz von COX-2-exprimierenden Tumorzellen.....	87
4.2. Identifikation und Validierung weiterer tumorzellintrinsic Mediatoren von Immunresistenz.....	89
4.2.1. Stabile Expression von RPS9 und eEF1Bδ in E1A-MEF.....	90

4.2.2. Einfluss der transgenen Expression von RPS9 oder eEF1B δ durch Tumorzellen auf deren klonogenes Überleben nach Ko-Kultur mit antigenspezifischen, TCR-transgenen ZTL.....	91
4.2.3. Untersuchung der Resistenz von E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-RPS9 gegenüber zytotoxischen Substanzen	92
4.2.4. Untersuchung des Einflusses der Expression von eEF1B δ oder RPS9 auf die Sensitivität von E1A-MEF gegenüber UV-Strahlung.....	94
4.2.5. Einfluss der Expression von eEF1B δ oder RPS9 auf die MAPK- und PI3K-Signalwege	95
4.2.6. Untersuchung der IFN-gamma Sekretion von ST42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-RPS9	96
5. Diskussion	98
5.1. COX-2	98
5.2. Ribosomales Protein S9 und eukaryotischer Elongationsfaktor 1B δ	102
6. Zusammenfassung und Ausblick	107
Literaturverzeichnis	108
Danksagung.....	128
Anhang.....	129
Abbildungsverzeichnis	129
Tabellenverzeichnis	131
Lebenslauf.....	132
Erklärungen.....	133

1. Einleitung

1.1. Tumormunologie

Das menschliche Immunsystem schützt den Organismus vor dem Eindringen und der Vermehrung fremder Spezies. Dies können Pathogene, wie beispielsweise Bakterien, Pilze und Viren sein, aber auch allogene menschliche Zellen. Darüber hinaus wird eine immunologische Überwachung der Entstehung maligner Tumore postuliert („Immune surveillance“) (Burnet, 1957), welche mit Hilfe des angeborenen und adaptiven Immunsystems gewährleistet wird. Mehrere Zelltypen des Immunsystems sind an der Zerstörung maligner Gewebe beteiligt. Diese umfassen zytotoxische T-Zellen (ZTLs), die im Knochenmark gebildet werden und im Thymus heranreifen (Schwarz and Bhandoola, 2006). Dort erfolgt die Aktivierung der „*Recombination Activation Genes*“ (RAG), welche eine Enzymgruppe kodieren, die während der Entwicklung die VDJ-Rekombination (*V-variable; D-diversity; J-joining*) ermöglicht. Durch die Neuordnung dieser variablen Gene wird die immense Vielfalt der T-Zellrezeptoren erreicht (Jones and Gellert, 2004). Als reife, aber naive Zellen verlassen die ZTLs den Thymus und können nach Aktivierung durch Antigenkontakt expandieren und Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen zerstören. Der T-Zellrezeptor erkennt dabei zytosolisch prozessierte Peptide, welche durch MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*) präsentiert werden (Zinkernagel and Doherty, 1979). Ein wesentlicher Mechanismus der ZTL-vermittelten Zytotoxizität ist die Induktion von Apoptose, welche durch verschiedene Effektormechanismen erfolgen kann. Eine Möglichkeit besteht in der Bindung von Todesliganden der ZTL mit Todesrezeptoren auf der Zielzelle (Krammer, 2000). Dies induziert die Bildung des DISC (*death-inducing signaling complex*) in der Zielzelle, welcher Caspase-8 aktiviert. Aktive Caspase-8 kann entweder direkt Effektorcaspasen, wie Caspase-3, aktivieren, oder sie führt zur Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid. Dies triggert den sogenannten mitochondrialen Signalweg der Caspasenaktivierung, der durch die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma initiiert wird (Scaffidi et al., 1998). Ferner können ZTL durch die Exozytose von Granula in die immunologische Synapse Perforine und Granzyme im extrazellulären Raum freisetzen. Granzyme induzieren Apoptose, indem sie durch Poren in die Zellen eindringen, die durch Perforine gebildet werden oder an Granzym-Rezeptoren binden (Motyka et al., 2000; Stinchcombe et al., 2001). Den Zelltod vermitteln Granzyme ebenfalls über die

Aktivierung von Caspasen bzw. über die mitochondriale Cytochrom-c-Freisetzung (Atkinson et al., 1998; Alimonti et al., 2001). Sind Effektorcaspasen aktiv, aktivieren diese wiederum die Endonuklease DFF40/CAD (*DNA fragmentation factor 40/caspase-activated deoxynuclease*), die mittels internucleosomaler Spaltung von DNA ein wesentliches Merkmal des apoptotischen Zelltodes vermittelt (Sharif-Askari et al., 2001). Neben diesen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Todesmechanismen sezernieren T-Zellen Zytokine, die zur Elimination der Zielzellen beitragen. Zu dieser Gruppe der Zytokine gehört die Familie der Interferone (IFN). Typ I Interferone, wie z.B. IFN-alpha und IFN-beta, inhibieren die Zellproliferation, verursachen einen Zellzyklusarrest und induzieren Apoptose (Chawla-Sarkar et al., 2003). IFN-gamma gehört zum Typ II Interferon und wirkt auf transformierte Zellen ebenfalls anti-proliferativ und pro-apoptotisch (Ikeda et al., 2002). Außerdem verursacht IFN-gamma die Hochregulation der Antigenprozessierung sowie der MHC-I Moleküle in der Zielzelle und verbessert damit die Erkennung durch den T-Zellrezeptor (Rosa et al., 1986; Epperson et al., 1992a).

Können nicht alle Tumorzellen vollständig eliminiert werden, so begünstigt der Selektionsdruck des Immunsystems die Proliferation von Zellen, die auf Grund von genetischen Veränderungen Resistenzen gegenüber Immuneffektormechanismen erworben haben. Eine extrinsische Tumorsuppression durch das Immunsystem ist nun erschwert; stattdessen wird eine immunsuppressive Umgebung durch den Tumor geschaffen, die weiteres Wachstum begünstigt, ein Prozess, der „*Cancer immunoediting*“ genannt wird (Schreiber et al., 2011).

Tumorzellen weisen eine Vielzahl von Mechanismen auf, um einer Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen. Diese umfassen eine verminderte Expression der MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche, so dass eine Erkennung durch ZTL verhindert wird (Chang and Ferrone, 2007). Eine reduzierte Präsentation der Tumorantigene im MHC-Komplex unterbindet ebenfalls eine Erkennung durch ZTLs. Störungen in der Antigen-Prozessierung werden z.B. durch eine verminderte Expression der Antigenpeptid-Transporter (TAP = *Transporter associated with antigen processing*) oder des Immunoproteasoms verursacht. Auf Grund des Fehlens von ko-stimulatorischen Molekülen auf der Tumorzelloberfläche kann eine Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen unterbunden werden (Stewart and Abrams, 2008). Stattdessen werden häufig inhibitorische Moleküle sezerniert, die die Reifung

und Aktivierung der T-Lymphozyten beeinträchtigen. Dazu gehört TGF- β (*Transforming Growth Factor*), ein Zytokin, welches die Produktion von Interleukin (IL)-12 verhindert und damit die Aktivierung und die zytotoxischen Effektorfunktionen von T-Zellen (Li et al., 2006). Die Sekretion von inhibitorischen Enzymen, wie z.B. Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), verhindern ebenfalls die vollständige Aktivierung von T-Zellen (Katz et al., 2008). Eine konstitutive STAT3-Aktivierung (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) in Tumorzellen induziert u.a. die Sezernierung von IL-10 und VEGF, wodurch die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen, professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, verhindert wird. Dadurch entfällt die unterstützende Rolle dieser Antigen-präsentierenden Zellen bei der Tumorelimination (Yu et al., 2007).

Tumorzellen exprimieren häufig inhibitorische Liganden auf ihrer Zelloberfläche. Dazu gehören die Liganden der B7-Familie, B7-H1 und B7-H4, welche eine Erschöpfung der Effektorfunktion (*Exhaustion*), sowie Apoptose und Anergie der T-Zellen zu Folge haben (Zou and Chen, 2008). Ebenfalls ist die Expression der Apoptose induzierenden Liganden FasL und TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) möglich, mit deren Hilfe Tumorzellen in Lymphozyten durch direkten Kontakt oder durch Sekretion von FasL-gefüllten Vesikeln den Zelltod induzieren (Andreola et al., 2002; Bron et al., 2004).

Die Migration von Immunzellen zum Ort von inflammatorischen Prozessen wird durch Chemokine ausgelöst. Die Chemotaxis von Effektor-T-Zellen wird vom Tumor jedoch unterdrückt, stattdessen werden selektiv immunsuppressive Zellpopulation rekrutiert (Ngo et al., 2011). Dazu gehören regulatorische T-Zellen (T_{Reg}), welche das Tumormilieu infiltrieren und durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch Sekretion solubler Faktoren einen starken inhibitorischen Einfluss auf die antitumorale Immunantwort haben (Bluestone and Abbas, 2003). Myeloide Suppressorzellen (MDSC = *Myeloid-derived suppressor cells*) hemmen durch Sekretion von TGF- β (Terabe et al., 2003) und inhibitorischen Enzymen (Ochoa et al., 2007) die T-Zellfunktion. TGF- β kann sowohl die Proliferation von Tumorzellen fördern, als auch auf das Tumorstroma und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) einwirken. Tumorstroma und TAMs begünstigen ihrerseits durch die Sekretion von angiogenetischen Faktoren wie VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und pro-inflammatorischen Molekülen wie PGE₂ weiteres Tumorwachstum (Kim et al., 2004; Reckamp et al., 2006).

1.1.1. Immunologische Tumortherapien

Immunbasierte Krebstherapien verfolgen verschiedene Ansätze, die Resistenz von Tumorzellen zu durchbrechen. Monoklonale Antikörper können an tumor- oder organspezifischen Oberflächenproteinen binden und so die Funktion der Antigene, wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, hemmen. Ein weiterer Effekt ist die mittels Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität und Komplement-vermittelter Zytolyse geförderte immunologische Tumorzerstörung. Beispiele sind Antikörper gegen das B-Zell-Antigen CD20, die bei malignen B-Zell-Lymphomen Wirksamkeit zeigen, oder Antikörper gegen die Wachstumsfaktoren EGFR oder HER2, die bei kolorektalen Karzinomen, Kopf-Hals-Tumoren sowie HER2-positiven Mamma- und Magenkarzinomen zur Behandlung zugelassen sind (Dougan and Dranoff, 2009). Eine weitere Gruppe stellen die immunmodulatorischen Antikörper dar, welche an die Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 oder den Liganden PD-L1 binden und die Wirkung von inhibitorischen Liganden-Rezeptorinteraktionen blockieren (O'Day et al., 2007; Wong et al., 2007).

Die Gabe von Zytokinen wie IL-2 und IFN-alpha hat eine systemische Reaktion des Immunsystems zur Folge, welche in der Therapie von Melanomen und Nierenzellkarzinomen angewendet wird (Atkins et al., 1999; Coppin et al., 2005). Adjuvantien, wie das Bacillus Calmette-Guérin (BCG), können in Kombination die Effektivität von Therapien verbessern (Sylvester et al., 2005). Ferner wird die lokale Gabe von BCG in die Blase zur Senkung des Rückfallrisikos oberflächlicher Blasentumore eingesetzt.

Der adoptive Transfer autologer, aktivierter Immunzellen, wie z.B. dendritische Zellen (DC), stellt eine weitere Möglichkeit der Krebsimmuntherapie dar. Solche DC-Vakzine können vor der Verabreichung *ex vivo* mit Tumor-spezifischen Antigenen „beladen“ werden, um im Patienten naive zytotoxische T-Zellen zu aktivieren und eine Tumorantwort auszulösen (Palucka and Banchereau, 2012). Der adoptive Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen, welche *ex vivo* aktiviert und expandiert wurden, zeigt gute Therapieerfolge bei Viruserkrankungen nach Stammzelltransplantation und Virus-assoziierten Tumorerkrankungen (Walter et al., 1995; Rooney et al., 1995). Eine genetische Modifikation immunologischer Effektorzellen erlaubt den Abwehrmechanismen von Tumorzellen auf verschiedenste Weise zu begegnen. Mittels Gentransfer können autologe ZTL *ex vivo* mit

tumorantigenspezifischen T-Zellrezeptoren ausgestattet werden, welche eine erhöhte Affinität und damit Aktivität aufweisen. „Proof of principle“ für einen solchen Ansatz wurde unter anderem bei Patienten mit malignen Melanomen demonstriert (Morgan et al., 2006; Mackensen et al., 2006). Da diese TCR-transgenen ZTL weiterhin eine MHC-Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation erfordern, wurden chimäre Antigenrezeptoren (CAR) entwickelt, die sowohl Peptide als auch Oberflächenproteine auf Tumorzellen erkennen können. Diese synthetischen Rezeptoren besitzen meist ein aus einer Einzelkette bestehendes variables Fragment (scFv : *single-chain variable fragment*), welches von einem murinen oder humanen Antikörper stammt (Sadelain et al., 2009). Die mittlerweile dritte „Generation“ der CARs besitzen zwei ko-stimulatorische Domänen im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors, welche die Aktivität der T-Zellen verbessern (Maus et al., 2014). Diese chimären, mit CAR ausgestatteten T-Zellen, wurden bereits in der Therapie von Patienten mit refraktären akuten und chronischen Leukämien eingesetzt (Porter et al., 2011; Grupp et al., 2013). Zusätzliche Rezeptoren können die Tumordinfiltration (Moon et al., 2011) oder die Überlebensdauer der Zellen verlängern (Scholler et al., 2012), so dass sich in einigen Patienten Gedächtnis-T-Zellen ausbilden, die einen dauerhaften Therapieerfolg ermöglichen (Kalos et al., 2011). Die transgene Expression eines dominant-negativen TGF β -Rezeptors bzw. der „Knockdown“ von inhibitorischen Liganden wie Fas erhöht die Widerstandsfähigkeit der T-Zellen gegenüber Inhibition (Dotti et al., 2005; Foster et al., 2008).

1.1.2. Murines Immuntherapiemodell

Wir haben ein murines Modell entwickelt, in welchem eine antigenspezifische, T-Zell-vermittelte Abstoßung von Tumorzellen *in vivo*- und *in vitro* untersucht werden kann. Zur Generierung antigenexprimierender Tumorzellen transformierten wir murine embryonale Fibroblasten (MEF) von C57BL/6-Mäusen mit den Onkogenen H-Ras und dem „Early Region 1“ Gen des humanen Adenovirus Typ 5 (E1A). H-RAS und E1A sind „kooperierende“ Onkogene, die murine Fibroblasten transformieren können (Mulcahy et al., 1985). Ferner kodiert E1A-Gen ein T-Zell-Antigen mit der Aminosäuresequenz E1A_234-245 (SGPSNTPPEI), welches durch murine Zellen

des Stammes C57BL/6 im MHC I Kontext H2-D^b präsentiert wird (Kast et al., 1989a). Diese mit E1A und H-RAS transformierten Fibrosarkomzellen (E1A-MEF) verwendeten wir als Tumormodell. Als korrespondierende Immuneffektoren nutzten wir Splenozyten und T-Zellen aus T-Zell-Rezeptor transgenen St42-Mäusen, die ebenfalls auf einem C57BL/6-Hintergrund generiert worden waren. Unter der Kontrolle des humanen CD2 Promotors exprimieren die Tiere einen transgenen T-Zellrezeptor mit den Segmenten V α 16 und V β 1 (Greaves et al., 1989; Kast et al., 1989b; Toes et al., 1996). Dieser Rezeptor erkennt spezifisch das Peptid Ad5E1A₂₃₄₋₂₄₃ im H2-D^b Kontext. Um einen Mausstamm mit einer reinen, transgenen T-Zell-Rezeptorpopulation zu erhalten, wurden die St42-Mäuse in einen Rag2-defizienten Hintergrund gekreuzt. Rag2-defiziente Mäuse können keine reifen B- und T-Zellen produzieren, was zu einer schweren Immundefizienz führt (Shinkai et al., 1992). Durch die Kreuzung der T-Zellrezeptor transgenen Mäuse mit Rag2^{-/-}-Mäusen konnte ein Stamm generiert werden (St42Rag2^{-/-}), der ausschließlich transgene T-Zellen produziert, die spezifisch das AdE1A₂₃₄₋₂₄₃-Epitop im H2-D^b Kontext erkennen (Hofmann et al., 2004). Mit diesem Modell bestehend aus E1A-exprimierenden Fibrosarkomzellen und den spezifischen St42Rag2^{-/-}-T-Zellen wurden Screeninguntersuchungen, zell- und molekularbiologische sowie tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt um neue Resistenzgene zu identifizieren und molekular zu charakterisieren.

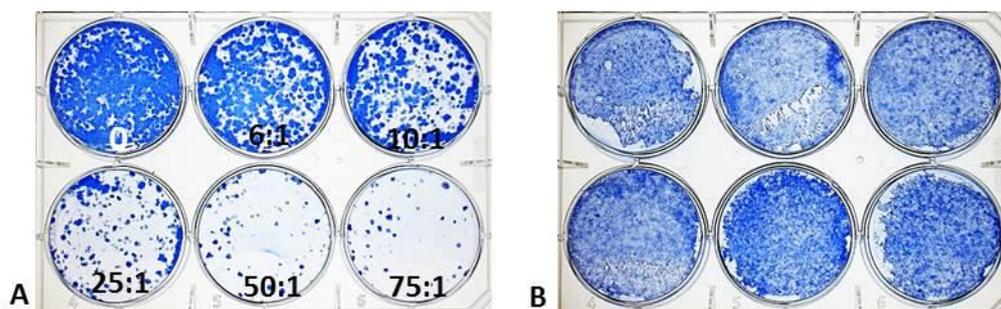


Abb. 1: Klonogenes Überleben von E1A-MEF und Myc-MEF nach Ko-Kultur mit E1A-spezifischen St42Rag2^{-/-}-Splenozyten.

(A) Ko-Kultur von E1A-MEF mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten für 24 Stunden. Das Wachstum der E1A-exprimierenden Fibrosarkomzellen wird in Antigen spezifischer Weise in Abhängigkeit der Effektorzellkonzentration supprimiert (B) Ko-Kultur mit MEF, welche durch die Onkogene Myc und H-Ras transformiert wurden. Da Myc-MEF das E1A-Antigen nicht präsentieren, erfolgt keine Lyse durch St42Rag2^{-/-}-Splenozyten.

1.1.3. Expression einer cDNA-Bank in E1A-MEF zur Identifizierung von Resistenzfaktoren gegenüber St42Rag2^{-/-}-T-Zellen

Zur Identifikation von neuen Resistenzfaktoren gegenüber antigenspezifischer, ZTL-vermittelter Zytotoxizität wurde eine cDNA-Bank aus dem Leukapharese-Produkt eines Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) generiert (Marques et al., 2008b). Diese cDNA-Bank wurde von Frau S. Hoffarth in einen bicistronischen Expressionsvektor kloniert, welcher die jeweiligen cDNA-Sequenzen und über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) das Markergen Enhanced Green-fluorescent Protein (EGFP) verbunden exprimiert. Dadurch wird in erfolgreich transduzierten Zellen die simultane Expression der cDNA-Bank und des Reportergens ermöglicht (Mountford and Smith, 1995; Martinez-Salas, 1999). Der retrovirale Expressionsvektor verfügt über "Long terminal Repeat" (LTR) –Elemente, die für die stabile Insertion der Vektorsequenz in das Genom von Zielzellen notwendig sind (Majors, 1990). Die cDNA-Bank wurde mittels retroviraler Transduktion stabil in E1A-MEF eingebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur eine Vektorkopie und damit nur ein cDNA-Fragment pro Zielzelle inseriert wird. Dies wurde aufgrund statistischer Erwägungen bei einer Transduktionseffizienz von unter 20% erreicht, was mit Hilfe des ko-exprimierten Reportergens EGFP im Durchflusszytometer überprüft werden konnte. Nach erfolgreicher Transduktion wurden die E1A-MEF mit Splenozyten von St42Rag2^{-/-}-Mäusen ko-kultiviert und überlebende, EGFP-positive Zellen isoliert. Diese wurden expandiert und ein zweites Mal mit den antigenspezifischen ZTLs inkubiert, um die Resistenz dieser Klone zu verifizieren. Überlebende Populationen wurden in Einzelsuspension bei geringer Zelldichte ausplattiert, Einzelklone selektiert und expandiert (Abb. 2). Zur Identifizierung der inserierten cDNA der Einzelklone wurde deren genomische DNA extrahiert, mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung Vektor-spezifischer Primer amplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „Basic Local Alignment Search Tools“ (BLAST) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) mit dem in GenBank hinterlegten humanen Genom abgeglichen. Der in diesem „Screen“ identifizierte Klon 9 hatte 1000bp des Gens Prostaglandin-endoperoxid Synthase 2 (PTGS-2), auch bekannt unter dem Namen Cyclooxygenase-2 (Reference Sequence: NM_000963.3), inseriert.

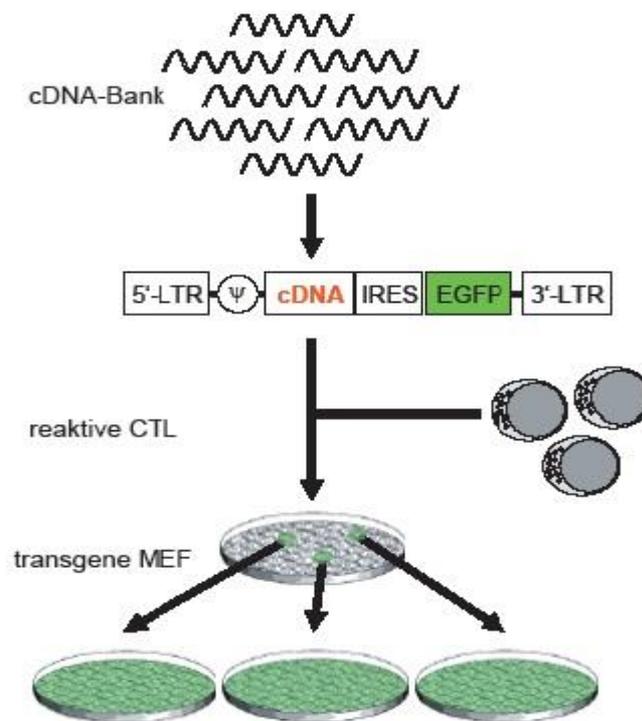


Abb. 2: Funktionelle Expression der cDNA-Bank in E1A-MEF und „Screening“-Strategie zur Identifizierung von Resistenz vermittelnden Targets gegenüber zytotoxischen T-Zellen.

Eine retrovirale cDNA-Bank wurde stabil in E1A-MEF exprimiert, welche anschließend mit E1A-spezifischen zytotoxischen T-Zellen inkubiert wurden. Überlebende, EGFP-positive Klone wurden isoliert und expandiert. Zur Verifizierung der Resistenz erfolgte eine zweite Ko-Kultivierung der Klone mit den Effektorzellen. (Abbildung modifiziert nach Marques et al., 2008a).

1.2. Cyclooxygenase-2

Die Prostaglandin-Endoperoxid Synthase, auch Cyclooxygenase (COX) genannt, existiert in zwei evolutionär konservierten Isozymen: COX-1 und COX-2. COX-1 wird konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert und sorgt mit basalen Prostaglandin-Konzentrationen für die Gewebs-Homöostase (Greenhough et al., 2009b). Die Expression von COX-2 hingegen wird durch Entzündung (Anderson et al., 1996), Schmerz (Seibert et al., 1994) und Fieber (Cao et al., 1998a), aber auch durch zahlreiche Tumorentitäten (Kutchera et al., 1996; Thompson et al., 1997; Gupta and Dubois, 2001) induziert. Das COX-2 Enzym ist ein Homodimer (Xiao et al., 1998) und verfügt über mehrere funktionelle Domänen: die Dimerisierungsdomäne, die Membran-Bindungsdomäne und die beiden katalytischen Domänen mit der Cyclooxygenase- bzw. Peroxidase-Aktivität (Simmons et al., 2004b). COX-2 ist an

der Innenseite des Endoplasmatischen Retikulums sowie an der Kernmembran lokalisiert (Spencer et al., 1998) und katalysiert die Synthese von Prostaglandin H₂ aus Arachidonsäure in zwei Schritten. Zunächst gelangt die aus der Zellmembran herausgelöste Arachidonsäure in die Cyclooxygenase-Domäne (Smith et al., 2000), eine schmale hydrophobe Tasche, die tief in das Enzym hereinragt (Picot et al., 1994). Dort wird das Zwischenprodukt Prostaglandin G₂ gebildet, welches anschließend von der Peroxidase-Domäne zu Prostaglandin H₂ reduziert wird (Landino et al., 1997c). Spezifische Prostaglandin-Synthasen nutzen diesen Ausgangsstoff für die Produktion von Prostaglandin E₂, Prostaglandin D₂, Prostaglandin F_{2α}, Prostaglandin I₂ und Thromboxan A₂ (Abb. 3).

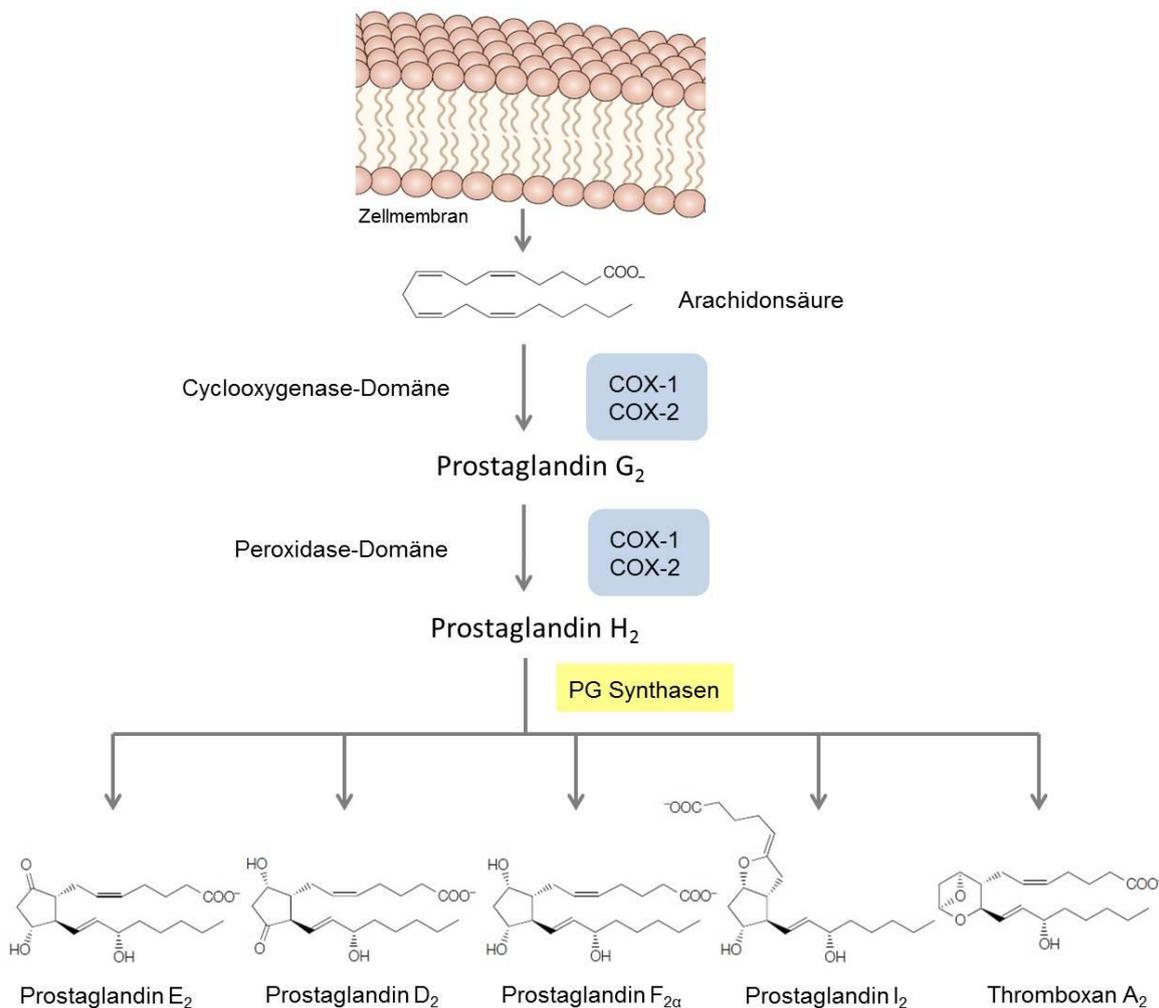


Abb. 3: Der Prostaglandin Syntheseweg.

Prostaglandine werden aus Arachidonsäure gebildet, welche zunächst mit Hilfe von Phospholipasen aus der Zellmembran herausgelöst wird. Cyclooxygenasen katalysieren dann in zwei Schritten die Bildung von Prostaglandin H₂: Die Arachidonsäure wird zu dem Zwischenprodukt Prostaglandin G₂ oxidiert und anschließend zu Prostaglandin H₂ reduziert. Die biologisch wirksamen Endprodukte

der Prostaglandinsynthese werden von verschiedenen Prostaglandin-Synthasen aus Prostaglandin H_2 gebildet. COX: Cyclooxygenase; PG: Prostaglandin (Abbildung modifiziert nach Gupta and Dubois, 2001a).

1.2.1. Prostaglandin E_2

Prostaglandine sind Gewebshormone, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden und dort sowohl endokrin als auch parakrin auf die umliegenden Zellen wirken (DuBois et al., 1998). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von Prostaglandin E_2 (PGE_2) die Hauptursache von Entzündungssymptomen ist (Zhang et al., 1997), wie z.B. das charakteristische Erythem (Solomon et al., 1968). PGE_2 vermindert die Reizschwelle der Natrium-Kanäle von Neuronen und wirkt damit hyperalgetisch (England et al., 1996). Des Weiteren löst PGE_2 Fieber aus, wenn es von Endothelzellen im Hypothalamus sezerniert wird (Cao et al., 1998b). Im Gastrointestinaltrakt bewirkt PGE_2 sowohl die Kontraktion der glatten Muskulatur (Simmons et al., 2004a), als auch eine Reduktion der Magensäuresekretion und fördert die Schutzfunktion der Magenschleimhaut (Konturek et al., 1980). Eine hohe COX-2-Expression im Uterus führt zu Kontraktionen und leitet die Geburtswehen ein (Gibb and Sun, 1996; Allport et al., 2001); nach der Geburt ist PGE_2 an der Schließung des Ductus arteriosus bei Neugeborenen beteiligt (Loftin et al., 2001). Eine Beteiligung von PGE_2 an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus wird ebenfalls vermutet (Hayaishi et al., 1991).

Es existieren vier spezifische PGE_2 Rezeptoren (EP1 – EP4), die in der Zellmembran lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit verschiedenen α -Untereinheiten assoziiert sind und durch die Bindung von PGE_2 nachgeschaltete Signalwege aktivieren (Rundhaug et al., 2011). PGE_2 -Rezeptoren werden in unterschiedlicher Ausprägung in fast allen Geweben exprimiert. EP1 ist mit der Untereinheit $G\alpha_q$ verbunden und hauptsächlich in Niere und Magen vertreten, EP3 ist mit der Untereinheit $G\alpha_i$ assoziiert und wird in Niere, Uterus und Magen exprimiert, EP2 und EP4 sind mit der Untereinheit $G\alpha_s$ gekoppelt und weit verbreitet in Thymus, Lunge, Ileum und Uterus (Sugimoto and Narumiya, 2007). Die Überexpression der EP-Rezeptoren, besonders EP2 und EP4, wird mit einigen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Eine EP-Expression konnte in Biopsien

von Mamma- (Chang et al., 2005), Kolon- (Sonoshita et al., 2001), Prostata- (Kasbohm et al., 2005), Lungen- (Hida et al., 1998) sowie in Kopf-Hals-Tumoren (Lin et al., 2002) nachgewiesen werden.

Durch die Rezeptorbindung von PGE₂ kommt es zu einer Konformationsänderung, welche zur Ablösung der α -Untereinheit vom Rezeptor führt und die Aktivierung von Effektormolekülen zur Folge hat. Zum einen werden Adenylcyclasen aktiviert und so der cAMP-Spiegel erhöht (Hull et al., 2004). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche u.a. den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) phosphoryliert. Phosphoryliertes CREB transloziert in den Nukleus, bindet an die „*cAMP response element*“-Sequenz und verstärkt die Transkription verschiedener Gene. Die PI3 (*Phosphoinositide 3*)-Kinase wird durch die $\gamma\beta$ -Untereinheit der EP aktiviert, was zur Phosphorylierung von Akt und GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3) führt. Eine Stabilisierung von β -Catenin ist die Folge, dessen Translokation in den Nukleus zur Genexpression führt (Shao et al., 2005). Die Bindung von PGE₂ an den EP2 Rezeptor kann auch zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor*) führen (Pai et al., 2002). Durch die Dimerisierung und Autophosphorylierung von EGFR wird der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg aktiviert, der wiederum in der Aktivierung verschiedener Proliferationsgenen mündet (Hill and Treisman, 1995) (siehe Abb. 4).

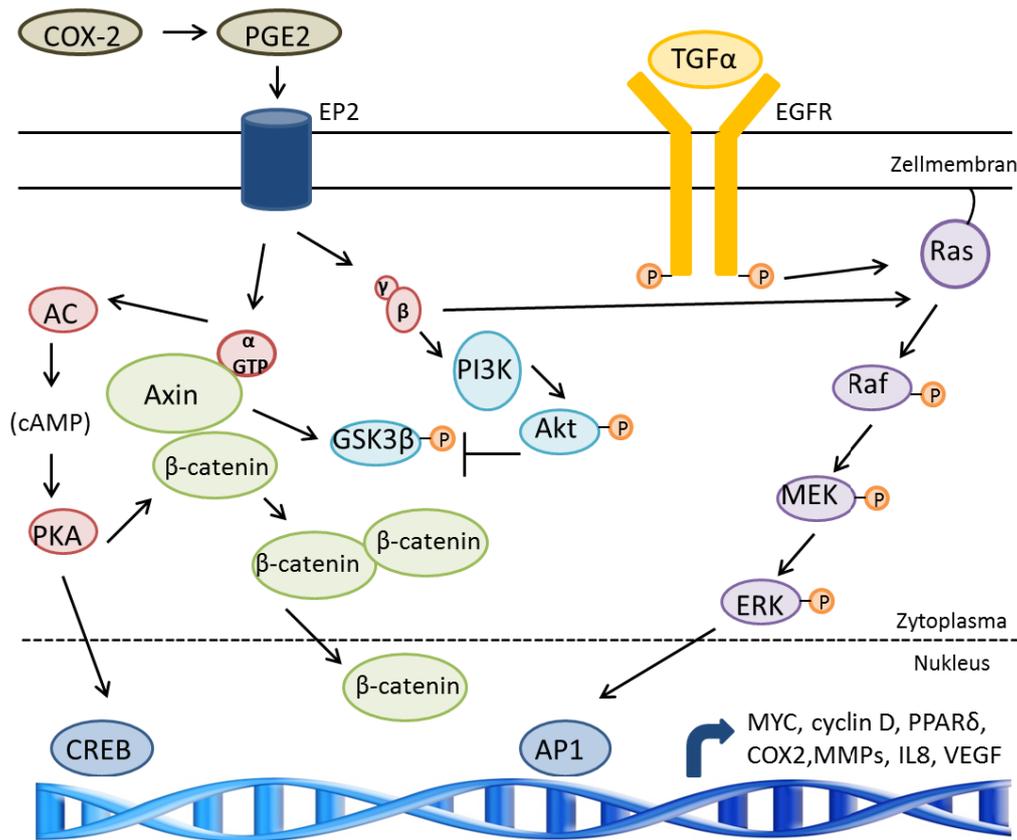


Abb. 4: Die PGE₂ Signalkaskade.

Die Bindung von Prostaglandin E₂ an den EP-Rezeptor bewirkt die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die zur Hochregulation von Genen führen, die an der Proliferation, Apoptoseresistenz, Immunresistenz sowie Angiogenese und Metastasierung der Zelle beteiligt sind.
(Abbildung modifiziert nach Dorsam and Gutkind, 2007)

1.2.2. COX-2 bei malignen Tumoren

Es wurde beobachtet, dass in COX-2-exprimierenden Tumorzellen selektiv PGE₂ überproduziert wird und zur Transformation beiträgt (Liu et al., 2001; Brown and Dubois, 2005). Daher wird vermutet, dass eine Ko-Regulation der Expression der Cyclooxygenase-2 und der Prostaglandin E₂ –Synthase besteht (Jakobsson et al., 1999).

Durch die Aktivierung der oben beschriebenen Signalkaskaden kann die Überexpression von COX-2 eine Tumorgenese begünstigen und zu den „Hallmarks of Cancer“ beitragen (Greenhough et al., 2009a). Ein entscheidendes Merkmal von malignen Zellen ist der Verlust einer zellintrinsic Regulation, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch PGE₂ bewirkt die vermehrte Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2

(*B-cell lymphoma 2*) (Sheng et al., 1998a). Des Weiteren wird durch die Aktivierung von Akt eine Translokation des pro-apoptischen Proteins Bax in die Mitochondrien unterbunden und somit ebenfalls der Zelltod verhindert (Tessner et al., 2004). Eine durch PGE₂ vermittelte Zellproliferation wird durch die PI3K/Akt-abhängige Induzierung des nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors δ (PPAR δ) erreicht (Wang et al., 2004). Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors PPAR δ wird mit einer Aktivierung von Genen, deren Produkte in den Zellstoffwechsel und die Proliferation involviert sind, in Verbindung gebracht. Diese Phänomene wurden bei kolorektalen Karzinomen, Mamma- und Prostatakarzinomen beschrieben (Gupta et al., 2000) (Stephen et al., 2004). Die Aktivierung von PPAR δ bewirkt wiederum die Expression von COX-2 und des EP2-Rezeptors, so dass ein positiver „*Feed-Back Loop*“ entsteht (Xu et al., 2006).

Eine weitere Eigenschaft von Tumorzellen ist autonomes Wachstum. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch PGE₂ führt seinerseits zur erhöhten COX-2 Expression, wodurch es ebenfalls zu einem „*Feed-back*“-Mechanismus kommt (Sheng et al., 1998b). PGE₂ wird vermehrt sezerniert, welches durch die Bindung an die EP-Rezeptoren wiederum MAPK aktiviert.

Hat ein Tumor eine bestimmte Größe erreicht, wird die Bildung von Blutgefäßen unerlässlich, um die Zellen weiterhin mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen zu können. Unter hypoxischen Bedingungen wird die COX-2 Expression durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor) aufreguliert und vermehrt PGE₂ gebildet (Kaidi et al., 2006). Die PGE₂ vermittelte MAPK-Aktivierung bewirkt die Expression von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), einem Signalmolekül, welches die Angiogenese vorantreibt (Pai et al., 2001).

Ein besonderes Kennzeichen von Tumorzellen ist die Fähigkeit, den Zellverbund des Tumors zu verlassen und in andere Gewebe einzuwandern, um dort Metastasen zu bilden. Auch an diesem Prozess ist COX-2 beteiligt. PGE₂ verursacht die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP2 und MMP9), die die extrazelluläre Matrix degenerieren und somit die Migration von Tumorzellen begünstigen (Tsuji et al., 1997). Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor Rezeptor c-MET wird ebenfalls durch PGE₂ aktiviert, was einen mesenchymalen Phänotyp zur Folge haben kann und der zum Verlust des Zell-Zell-Kontakts und erleichterter Migration führt (Birchmeier et al., 2003; Pai et al., 2003). Die oben beschriebene VEGF-Expression sorgt nicht nur für die Bildung neuer Blutgefäße, sondern erhöht auch die Durchlässigkeit des

Endothels, was die Paravasation der im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen und damit die Besiedelung anderer Organe fördert (Valcarcel et al., 2011). Auch die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapien auf Grund der Hochregulation von Efflux-Pumpen wird mit einer Überexpression von COX-2 durch Tumorzellen assoziiert (Liu et al., 2010).

1.2.3. Die Rolle von PGE₂ im Immunsystem

Das Vermögen der Zellen des Immunsystems, maligne entartetes Gewebe zu erkennen und zu eliminieren ist ein wesentlicher tumorsuppressiver Mechanismus. Entsprechend treten bei Patienten mit schwerer Immunsuppression, wie z.B. AIDS oder nach Organtransplantation, vermehrt Krebserkrankungen auf (Vajdic and van Leeuwen, 2009). Eine erhöhte COX-2 Expression und die damit verbundene PGE₂-Sekretion beeinflusst auch die Mediatoren des Immunsystems und schafft damit ein tumorpermissives Milieu.

PGE₂ wirkt auf eine Vielzahl von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), zytotoxische Leukozyten des angeborenen Immunsystems, werden durch PGE₂ inaktiviert, indem ihre Empfindlichkeit gegenüber aktivierenden Zytokinen, wie IL-12 und -15, herabsetzt wird. Dies resultiert in einer geringeren Zytotoxizität der NK Zellen (Goto et al., 1983; Joshi et al., 2001; Walker and Rotondo, 2004). Mastzellen werden häufig in Bereichen von Neovaskularisation und in den Randgebieten von Tumoren gefunden (Yano et al., 1999). PGE₂ bewirkt die Ausschüttung von VEGF durch Mastzellen und treibt damit die Bildung von neuen Blutgefäßen voran (Abdel-Majid and Marshall, 2004). Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bilden in Anwesenheit von PGE₂ ihren immunsuppressiven MΦ2 – Typ aus (Heusinkveld et al., 2011), wodurch weiteres Tumorwachstum begünstigt wird (Bingle et al., 2002). Sogenannte Myeloide Suppressorzellen produzieren durch die PGE₂-induzierte COX-2-Expression ebenfalls große Mengen an Prostaglandinen und inhibieren dadurch die Funktion von ZTL (Obermajer et al., 2011).

PGE₂ wirkt auf vielfältige Weise auf T-Zellen ein und moduliert die antigenspezifische Immunantwort. Die PGE₂-induzierte cAMP-Erhöhung hat einen anti-proliferativen Effekt auf Lymphozyten, indem es die IL-2-Produktion inhibiert (Walker et al., 1983); auch die Empfindlichkeit gegenüber IL-2 wird durch eine verminderte IL-2

Rezeptorexpression herabgesetzt (Anastassiou et al., 1992). Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen wird durch PGE₂ negativ beeinflusst, was eine eingeschränkte oder aufgehobene T-Zell-Aktivierung nach sich ziehen kann (Wiemer et al., 2011).

Naive T-Helferzellen können in Abhängigkeit von den sie umgebenden Zytokinen zu verschiedenen Untergruppen heranreifen. Wirken IFN-gamma und IL-12 auf die Zellen ein, differenzieren sie zur T_H1-Population; umgeben sie jedoch hohe Konzentrationen von IL-2 und IL-4, so differenzieren sie zu T_H2-Population (Zhu et al., 2010b). Die T_H1-Gruppe produziert hauptsächlich IL-2, IFN-gamma, sowie TNF- α/β und vermittelt die zelluläre Immunität durch die Reifung von ZTL und Aktivierung von Makrophagen. Die T_H2-Population aktiviert hingegen die humorale Immunantwort und bewirkt mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Zellen (Zhu et al., 2010a). PGE₂ begünstigt die Bildung der T_H2-Subpopulation und verhindert dadurch eine T_H1-Differenzierung mit Aktivierung von zytotoxischen Mediatoren (Betz and Fox, 1991). In Kombination mit IL-1 β und IL-23 löst PGE₂ die Ausbildung von T_H17- Helferzellen aus (Boniface et al., 2009), deren pro-inflammatorische Eigenschaften auch das Tumorstadium fördern kann (Chang et al., 2014). Eine weitere Wirkweise von PGE₂ ist die Induzierung des Transkriptionsfaktors *Forkhead Box p3* (FOXP3) in T_H-Zellen, dessen Expression für die Ausbildung von T_{Reg} verantwortlich ist (Baratelli et al., 2005). T_{Reg} supprimieren autoreaktive T-Zellen, um Autoimmunität zu verhindern oder entzündliche Prozesse einzudämmen (Bach, 2003). Im Tumormilieu können T_{Reg} die tumorspezifischen Effektorfunktionen von CD8 und CD4 T-Zellen inhibieren (Chen et al., 2005; Nishikawa et al., 2005). Dies geschieht entweder durch Zell-Zell-Kontakt oder durch die Produktion von IL-10 oder TGF- β (Wang, 2006). Schließlich kann PGE₂ Anergie von T_H-Zellen induzieren, ein dauerhafter Zustand, in dem die Zellen auf keine Stimulation durch Antigene reagieren (Mannie et al., 1995).

1.2.4. COX-Inhibitoren in der Krebstherapie

Eine Rolle der Cyclooxygenase-2 in der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen ist besonders am Beispiel des Darmkrebses beschrieben worden. Bereits Anfang der 1980er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen der

Gabe von nicht-steroiden Antiphlogistika (NSAID) und einer Reduktion der Entstehung von Darmpolypen – einer Vorstufe von Darmkrebs – erkannt (Waddell and Loughry, 1983). Dies konnte durch Studien mit Patienten mit familiärer adenomatösen Polyposis (FAP) bestätigt werden. Hier wurde gezeigt, dass die Einnahme des NSAID Sulindac und des COX-2-Inhibitors Celecoxib die Anzahl der Darmpolypen und damit das Krebsrisiko vermindern (Giardiello et al., 1993; Steinbach et al., 2000). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde die Inhibition des COX-2-Enzyms zur Prävention und Therapie von Krebserkrankungen diskutiert. Neben Darmkrebs wurde auch ein vermindertes Risiko für Brust-, Lungen- und Prostatakrebs mit einer dauerhaften Medikation mit NSAIDs (hauptsächlich Aspirin®) assoziiert (Harris et al., 2005). Ebenso ist bei Patienten mit PIK3CA-mutiertem Kolonkarzinom die regelmäßige Einnahme von Aspirin® mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert (Liao et al., 2012). Durch die Kombination von Chemotherapie mit COX-2-Inhibitoren kann in Tumormodellen eine Sensitivierung von Tumorzellen erreicht werden. So konnte gezeigt werden, dass die simultane Gabe von COX-2 die Sensitivität gegenüber Cisplatin in Osteosarkom- und Magenkarzinomlinien steigert (Chan et al., 2007; Liu et al., 2008), ebenso wie die Gemcitabin-Sensitivität von Lungenkarzinomzelllinien (Chen et al., 2008). Der Effekt einer Kombination von COX-2-Inhibition mit Strahlentherapie scheint zellabhängig zu sein. In Melanom-, Prostata- und Cervixkarzinomzelllinien wurde in Anwesenheit des spezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 durch Bestrahlung vermehrt Apoptose ausgelöst (Palayoor et al., 2005; Johnson et al., 2008). In Zelllinien von Kopf-Halstumoren wurde hingegen ein nachteiliger Effekt beschrieben (Czembirek et al., 2009). Die Wirkung von einigen Immuntherapien wird ebenfalls durch die Gabe von COX-2-Inhibitoren verbessert. In Rattenmodellen konnte gezeigt werden, dass die Effektivität einer DC-basierten Immuntherapie durch Celecoxib verbessert wird (Zhang et al., 2013). Im Mausmodell wurde beschrieben, dass die COX-2-Inhibition die Effektivität einer Immuntherapie mit dem Zytokin GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) verbessert (Eberstal et al., 2014).

2. Ziel der Arbeit

Die Effektivität zellulärer Immuntherapien gegenüber Krebserkrankungen ist zum einen bestimmt durch eine effiziente Erkennung tumorspezifischer Antigene durch Immunzellen, deren Expansion und Aktivität sowie zum anderen durch die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber den verschiedenen Effektormechanismen der tumorspezifischen Immunzellen. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Modells, mit dem neue Resistenzmechanismen gegenüber immunologischer Zytotoxizität identifiziert werden können. Dies sollte mittels funktioneller Expressionsklonierung und einer aus einem humanen Malignom gewonnenen, individuellen cDNA-Bibliothek realisiert werden. In Vorarbeiten wurde ein erstes Kandidatengen, die Cyclooxygenase (COX-2), identifiziert. Dieses Enzym, welches für die Produktion des Gewebshormons Prostaglandin E₂ verantwortlich ist, wurde bereits im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und der Resistenzbildung in der Literatur beschrieben. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob COX-2 auch eine Resistenz gegenüber Zytotoxischen T-Zellen vermittelt. Des Weiteren sollten diese Ergebnisse in unserem murinen Immuntherapiemodell *in vivo* validiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten mit der beschriebenen cDNA-Bibliothek weitere Resistenz vermittelnde Kandidatengene identifiziert werden. Die dabei priorisierten Kandidatengene sollten *in vitro* und *in vivo* validiert und bezüglich deren molekularen Wirkmechanismen charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Tabelle 1: Auflistung der im Labor verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Chemiluminometer ChemiSmart	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
ELISA-Reader Model 680	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop CK X41	Olympus, Hamburg
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Inkubator HeraCell 1500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Kreisschüttler IKA KS260	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Magnetrührer MR2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
PCR-Maschine C1000	BioRad, München
pH Elektrode InoLab pH720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Photometer Gene Quant Nanodrop-1000	Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg Peqlab, Erlangen
UV-Transluminator TL312A	Spectroline, USA
Vortexer BioVortex V1	Biosan, Riga (Lettland)
Wasserbad GFL®	Oehmen Labortechnik, Essen
Zellzählgerät Countess™ automated cell counter	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Zentrifugen: Heraeus® Multifuge® 3SR Heraeus® Megafuge 40 Sorvall RC 6 Plus Centrifuge 5417R	VWR International GmbH, Darmstadt Thermo Scientific, Waltham, USA Eppendorf, Hamburg

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der benutzten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterpipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Kryo-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
MACS Separationssäulen MS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Parafilm	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Polypropylen-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen

Serologische Pipetten	greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzenfilter, 0,2µm	Sartorius, Göttingen
Whatman-Papier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Zellkulturschalen	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Zellsieb, 40µm	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Zellzählkammern	Invitrogen, Carlsbad (USA)
6-Well Platten	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
24-Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well Platten	Costar Corning, Amsterdam, Niederlande

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid Bis-acrylamid 27:1	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ammoniumperoxidsulfat	Merck, Darmstadt
1,2-Bis(2-Dicarboxymethylaminoethoxy) Ethan (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Brilliant Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Celecoxib	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
cOmplete Proteasen Inhibitor	Roche, Basel (Schweiz)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Etoposid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Formaldehyd 37%	VWR International GmbH, Darmstadt
Freund's Adjuvant, Incomplete	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin 200nM (100x)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Glycerin	Merck, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Interferon-gamma (Maus)	Chemikon (Millipore), Billerica, USA
Interleukin 2 (Maus)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MACS Separationspuffer	Miltenyi, Bergisch Gladbach
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Paclitaxel	Apotheke des Uniklinikums Essen
Phosphatase Inhibitor Cocktail I/II	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ponceau	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Prostaglandin E ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Proteinase K	Roche, Basel (Schweiz)
Puromycin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
SuperSignal West Pico Chemilumineszenzsubstrat	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Ultrareines Wasser	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)

3.1.4. Puffer und Lösungen

TBS-T	10 ml 1M Tris/HCL (pH 8) 30 ml 5M NaCl 0,5 ml Tween20 ad 1 l aqua dest.
NP-40-Lysepuffer	0,5 % NP40 150 mM NaCl 50 mM HEPES, pH 7,4 1 mM EDTA 2 mM EGTA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
6x SDS-Probenpuffer	20 % SDS 3 ml Mercaptoethanol 4 ml Glycerol ein paar Partikel Bromophenolblau
50x TAE Puffer	242 g Tris 57,1 ml Glacial Acetic Acid 100 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung ad 1 l aqua dest.
Ethidiumbromid Stammlösung (1%)	Fluka Analytical, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
LB-Agar-Medium	8 Kapseln LB-Agar ad 1 l aqua dest.
Brilliantblau-Färbelösung	2,5 g Brilliantblau 100 ml Essigsäure 400 ml Methanol Aqua dest. ad 1 l

Circlegrow Medium	32 Circelgrow Kapseln ad 1 l aqua dest.
2x HBS- (<i>HEPES buffered saline</i>) Puffer	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Dextrose 50 mM HEPES auf pH 7,0 einstellen
Dehybridisierungslösung für Western Blot	62,5 ml 1M Tris-HCL (pH 6,8) 20g SDS Aqua dest. ad 1 l
Dehybridisierung-Gebrauchslösung	100 ml Dehybridisierungslösung 700 µl β-Mercaptoethanol
10xSDS-PAGE Laufpuffer	30,2 g Tris 144 g Glycin 10g SDS Aqua dest. ad 1 l
10xSDS-PAGE Transferpuffer	29 g Glycin 58 g Tris 3,7 g SDS Aqua dest, ad 1 l, pH 9 einstellen
HFS (<i>hypotonic fluorochrome solution</i>) – Puffer	5 mg Propidiumiodid 100 mg Natriumcitrat 100 µl Triton X-100 Aqua dest. ad 100ml
Lysepuffer für Mausgewebe	100 mM Tris/HCl (pH 8.5) 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0.2 % SDS 1 mg/ml Proteinase K frisch dazugeben
Lysepuffer für Erythrozyten	0.15 M NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0.1 mM EDTA Aqua dest. ad 1 l
Propidiumjodidlösung	1 g Propidiumjodid 100 ml PBS
Puffer für die alkalische Lyse: Puffer 1	50 mM Glukose 25 mM Tris-Cl (pH 8) 10 mM EDTA (pH 8)

Puffer 2	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer 3	60 ml einer 5 M Kaliumacetat-Lösung 11,5 ml Essigsäure Aqua dest. ad 100 ml
TAE Puffer (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml

3.1.5. Verwendete Plasmide

Tabelle 4: Auflistung der retroviralen Expressionsvektoren

Interne Nummer	Name	Insert
32	pCMV.VSV-G	Virales Verpackungsprotein
33	Hit60 (MLV gag-pol)	Virale Strukturproteine, Reverse Transkriptase, Integrase
85	pLPC_E1A 12S	Vektorrückgrad wurde für die Expressionsvektoren COX-2, eEF1B δ und RPS9 verwendet
149	pMxIRES-GFP	Leervektor der cDNA Bibliothek
244	pLPC_EGFP	eGFP
268	cDNA Library M. Wilbert in MS 149	cDNA library
703	pLPC_mmCOX-2	murine COX-2 cDNA
704	pLPC_hsCOX-2	humane COX-2 cDNA
705	pLPC_mmCOX-2 Y371F	murine COX-2 cDNA mit Aminosäuresubstitution von Tyrosin nach Phenylalanin an Position 371
706	pLPC_mmCOX-2 H374F	murine COX-2 cDNA mit Aminosäuresubstitution von Histidin nach Phenylalanin an Position 374
707	pLPC_mmCOX-2 H374E	murine COX-2 cDNA mit Aminosäuresubstitution von Histidin nach Glutamat an Position 374
708	pLPC_eEF1B δ	cDNA des eukaryotischen Elongationsfaktors 1B δ

709	pLPC_RPS9	cDNA des Ribosomalen Proteins S9
-----	-----------	----------------------------------

3.1.6. Zelllinien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Eigenschaft	Bezugsquelle
E1A-MEF	murin	E1A-Epitop präsentiert durch das murine H2-D ^b Molekül	AG Schuler
E1A-MEF mmCOX-2	murin	exprimiert die murine Cox-2 cDNA	AG Schuler
E1A-MEF hsCOX-2	murin	Exprimiert die humane COX-2 cDNA	AG Schuler
E1A-MEF mmCOX-2 Y371F	murin	murine Cox-2 Variante mit Y371F Substitution	AG Schuler
E1A-MEF mmCOX-2 H374E	murin	murine Cox-2 Variante mit H374E Substitution	in der vorliegenden Arbeit generiert
E1A-MEF mmCOX-2 H374F	murin	murine Cox-2 Variante mit H374F Substitution	in der vorliegenden Arbeit generiert
E1A-MEF RPS9	murin	exprimiert das humane ribosomale Protein S9	in der vorliegenden Arbeit generiert
E1A-MEF eEF1B δ	murin	exprimiert die humane Elongationsfaktor-Untereinheit 1B δ	in der vorliegenden Arbeit generiert
Phoenix	human	auf 293T-Zellen basierende Verpackungszelllinie zur Herstellung von Retroviren	AG Schuler

3.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligoprimer

Primer	Sequenz	Verwendung
ST42#1_S	TCCACCATGAGCTGCAGGCTTCTCCTCTA T	Genotypisierung der ST42Rag2 ^{-/-} - Mäuse
ST42#2_AS	CGGCTTCTCAGCGCTCTGTTTATACCAGT AC	
ST42#3_S	TGTAATGAGAGGCACGTGGTTAAGCTCTC GG	
Babe#S_BamHI	CAGGGATCCCCTTATCCAGCCCTCAC	Klonierungsprimer für pBabe puro-Vektor
Babe#AS_BamHI	ATAGGATCCCCACACCCTAACTGACACA	
mmCOX-2 H374F_S	CACTCTATCACTGGTTCCCCCTGCTGCCC G	Mutageneseprimer mmCox-2
mmCOX-2	CGGGCAGCAGGGGGAACCAGTGATAGAG	

H374F_A	TG	H374F
mmCOX-2 H374E_S	ACTCTATCACTGGGAGCCCCTGCTGCCC G	Mutagenese- primer mmCox-2 H374E
mmCOX-2 H374E_A	CGGGCAGCAGGGGCTCCCAGTGATAGAG T	
RPS9_S BamHI	TATGGATCCATGCCAGTGGCCCGGAG	Klonierungs- primer für RPS9
RPS9_AS BamHI	CGCGGATCCTTAATCCTCCTCCTCGTCGT CT	
eEF1B_S+BamHI	GAG GGA TCC ATG GCT ACA AAC TTC CTA GCA C	Klonierungs- primer für eEF1B
eEF1B_AS+BamHI	GAG GGA TCC GAG CAG GAA ATG ACC AGG AC	
MS85 Sense	ACT ATA GGG AGA CCC AAG CT	Sequenzier- ungsprimer für MS85
MS85 Antisense	GGC CGT TAC TAG TGG ATC	

3.1.8. Antikörper

Tabelle 7: Liste der verwendeten primären Antikörper zur Western-Blot Analyse

Name	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
COX-2	Kaninchen	1:300	Abcam
Aktin	Maus	1:1000	MP Biomedical
AKT	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Phospho-AKT (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
ERK	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	Maus	1:2000	Cell Signaling
eEF1B δ	Maus	1:300	Abcam

Tabelle 8: Liste der verwendeten sekundären Antikörper zur Western-Blot Analyse

Name	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Maus	Ziege	1:1000	Thermo Scientific
Anti-Ratte	Ziege	1:1000	Thermo Scientific
Anti-Kaninchen	Ziege	1:1000	Thermo Scientific

Tabelle 9: Liste der verwendeten fluorophor-gekoppelten Antikörper zur Verwendung in der Durchflusszytometrie

Name	Herkunft	Fluorophor	Verdünnung	Bezugsquelle
CD8a	Maus	FITC	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience
CD69	Maus	PE	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience
CD107a	Maus	PE	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience
H2-D ^b	Maus	PE	0,5 μ g/100 μ l	Abcam
CD8 IgG	Ratte IgG2a κ	FITC	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience
CD69 IgG	Hamster IgG1 λ 1	PE	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience
CD107a IgG	Ratte IgG2a κ	PE	0,5 μ g/100 μ l	BD Bioscience

3.1.9. Fertigungssysteme

- CD8a⁺ T Cell Isolation Kit, mouse, Miltenyi, Bergisch Gladbach
- CloneJet™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
- High Pure RNA isolation kit, Roche, Basel (Schweiz)
- Mouse IFN-gamma Platinum ELISA, eBioscience, San Diego (USA)
- Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden
- Prostaglandin E₂ EIA Kit (monoclonal), Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)
- PureLink Quick Gel extraction Kit, Invitrogen, Carlsbad (USA)
- Rapid Ligation™ Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche, Basel, Schweiz

3.1.10. Software

Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurde das Programmpaket der Firma DNASTAR (Madison, Wisconsin, USA) verwendet. ELISAs wurden mit Hilfe des Online-Programms „MyAssays“ der Firma Cayman Chemicals (Haywards Heath, West Sussex, Großbritannien) ausgewertet. Die graphische Auswertung von Daten erfolgte durch das Software-Paket „Office“ der Firma Microsoft (Redmont, Washington, USA) und dem Graphik-Programm „Photoshop“ der Firma Adobe (San Jose, Kalifornien, USA). Bei Daten, die mittels Geräten erfasst und ausgewertet wurden, wurde die vom Gerätebetreiber mitgelieferte Software genutzt.

3.1.11. Datenbanken

Folgende Datenbanken wurden für die DNA-Sequenzanalyse und die Generierung von Oligonukleotiden verwendet:

Tabelle 10: Liste der verwendeten Datenbanken

Datenbank	Adresse
National Center of Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/
QuikChange Primer Design	http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=1238069

3.1.12. Auftragsarbeiten

DNA Sequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Eukaryotische Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) der Firma Invitrogen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von ca. 80%. Dazu wurde das verbrauchte Medium aus den Kultivierungsschalen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde 1ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1400 U/min pelletiert und in frischem Medium aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt in einer neuen Schale ausplattiert.

3.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden zum Einfrieren im gleichen Verhältnis von Zelllösung und Einfriermedium gemischt, in Kryoröhrchen gefüllt und bei -80°C weggefroren. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert dabei die Eiskristallbindung in den Zellen. Für die Langzeitlagerung konnten die Zellen dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 37°C vorgewärmten Medium resuspendiert, bei 1400 U/min für 5 Minuten pelletiert und anschließend in frischem Medium ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel um eventuell verbliebene DMSO-Reste herauszuwaschen.

3.2.1.3. Ermittlung der Lebendzellzahl

Der zu untersuchenden Zellsuspension wurden 20µl entnommen und in einer 96-Well Platte mit 20µl Trypanblau gemischt. Davon wurden 10µl entnommen und auf die Invitrogen-Zählkammer (Countess™ Cell Counting Chamber Slide) gegeben. Der Farbstoff Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt diese blau, lebende Zellen

werden auf Grund ihrer intakten Zellmembran hingegen nicht gefärbt. In der automatischen Zellzählkammer von Invitrogen (Countess™ Automated Cell Counter) können mit Hilfe eines optischen Systems die Zellen erfasst und mittels einer Analysesoftware die Zellen gezählt, sowie tote von lebenden Zellen unterschieden werden.

3.2.1.4. Immunomagnetische Zellseparation

Mit Hilfe der immunmagnetischen Zellseparation kann eine bestimmte Zellpopulation aus einem Zellgemisch isoliert werden. Das System beruht auf 50 nm kleinen magnetischen Partikeln, den „*Microbeads*“, welche an Primärantikörper binden, die gegen spezifische Oberflächenepitope gerichtet sind. Anschließend kann eine Separation in einem magnetischen Feld erfolgen.

Um CD8 positive T-Zellen aus einer murinen Milzsuspension zu isolieren, wurde das „*Mouse CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II*“ der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dabei handelt es sich um eine Negativselektion, bei der die nicht relevanten Zellen aus der Suspension depletiert werden. Dazu wurde die Zellsuspension mit einem Biotin-konjugierten Antikörpercocktail inkubiert, der sich u.a. gegen T-Helferzellen, B-Zellen, NK Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und endotheliale Zellen richtet. Die CD8⁺ T-Zellfraktion war von der Antikörperbindung ausgenommen. Die magnetische Markierung erfolgte durch Zugabe von anti-Biotin *MicroBeads* mit der anschließenden Separation an der MACS®- Säule. Nachdem die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde, konnte die CD8⁺ T-Zellfraktion den Filter passieren, während die magnetisch markierten Nicht-Zielzellen durch das magnetische Feld zurückgehalten wurden. Die Säule wurde noch dreimal mit MACS-Puffer gespült, der Durchfluss aufgefangen und mit dem T-Zell-Eluat vereinigt. Anschließend wurde die Zellzahl der so angereicherten CD8⁺ T-Zellen bestimmt.

3.2.1.5. Ko-Kultur von Splenozyten mit murinen Fibroblasten

Für die Ko-Kultivierung von Fibroblasten und Splenozyten wurden die E1A-MEF Targetzellen am Vortag mit einer Konzentration von 5 000 Zellen pro 96-Well mit flachem Boden ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe der isolierten

Splenozyten in der gewünschten Effektor-zu-Target Ratio zu den E1A-MEFs. Zur Stimulation der T-Zellen wurde IL- 2 in einer Konzentration von 120 U/ml zugegeben und die Ko-Kultur für 24 Stunden im Brutschrank bei 37° inkubiert.

3.2.1.6. Kolonie-Kokulturassay

Das Langzeitüberleben von Targetzellen nach Behandlung mit verschiedenen Dosen von Effektorzellen wurde im Kolonie-Kokulturassay überprüft. Nach 24-stündiger Inkubation der Ko-Kultur wurden die Splenozyten abgenommen und die E1A-MEFs zweimal mit PBS gewaschen. Die verbliebenen Targetzellen wurden mit Trypsin vom Boden des 96-Wells abgelöst und in ein 6-Well mit vorgelegtem Medium überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vollzogen und die Zellen für weitere 5 bis 7 Tage inkubiert. Nachdem die unbehandelte Kontrolle eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht hatte, wurde das Medium abgenommen und die gewachsenen Kolonien in 70%-igem Alkohol für 20 Minuten bei -20°C fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der fixierten Kolonien mit Brillant-Blau.

3.2.1.7. Behandlung von Zellen mit zytotoxischen Substanzen

Um das Resistenz vermittelnde Potenzial von überexprimierten Genen in den E1A-MEF zu testen, wurden die Zelllinien mit verschiedenen Dosen von Zytostatika behandelt. Dazu wurden 20 000 Zellen in einer 24-Well Platte ausgesät und am Folgetag die zytotoxischen Agenzien in verschiedenen Konzentrationen zur Zellkultur gegeben. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen samt Zellkulturüberstand geerntet und der Anteil der apoptotischen Fraktion mittels Propidiumjodid im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.1.8. Bestrahlung von Zellen mit Ultraviolettstrahlung

Ultraviolettes Licht gehört zum nicht sichtbaren Spektrum und umfasst die Wellenlängen von 100 bis 380 nm. Die kurzwellige Strahlung ist sehr energiereich und kann in Zellen DNA-Schäden hervorrufen, welche zu Mutationen und schließlich auch zu Apoptose führen können. Die Reaktion der verschiedenen Zelllinien auf die

Bestrahlung mit UV-Licht wurde mit Hilfe des Stratalinkers, einem Gerät, welches Zellen mit einer definierten UV-c Menge bestrahlt, getestet. Am Vortag wurden zunächst 50 000 Zellen in einer 6-Well Platte ausplattiert. Für die Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, um die Bildung von toxischen Phenolen zu verhindern. Die Zellen wurden mit Energiedosen von 1-5 mJ/cm³ bestrahlt, frisches Medium hinzugefügt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine Bestimmung der apoptotischen Zellfraktion mittels Propidiumjodid im Durchflusszytometer.

3.2.1.9. Kalzium-Phosphat Transfektion

Um Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, bedient man sich der Kalzium-Phosphat Transfektion (Graham and van der Eb, 1973). Dazu werden die DNA und Calciumchlorid tropfenweise mit einem Phosphatpuffer gemischt, aus dem sich ein Präzipitat bildet. Der DNA-Phosphat-Komplex legt sich auf die Zellmembran und wird anschließend über Endocytose in die Zelle aufgenommen. Diese Methode wurde verwendet, um retrovirale Vektoren in die Verpackungszelllinie Phoenix einzubringen. Diese Zellen basieren auf der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 295T, welche die Konstrukte „gag-pol“ und „envelope“ für die Produktion von Viren besitzen.

Phoenix-Zellen wurden mit einer Konfluenz von ca. 50% ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 4 Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Um später eine Transfektionseffizienz bestimmen zu können, wurde für jedes Experiment ein Kontrollansatz mit dem Plasmid für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) mitgeführt. Für die Transfektion wurden 10 µg der gewünschten Plasmid-DNA und je 1,5 µg der Verpackungsplasmide pCMV.VSV-G und Hit60 (MLV gag-pol) verwendet. Die Transfektionsansätze wurden mit Aqua dest. auf 200 µl gebracht und tropfenweise 50 µl Kalziumchlorid hinzugegeben. Anschließend wurden unter Zuhilfenahme des Vortexers 250 µl HBS-Puffer zu den Ansätzen pipettiert. Während der anschließenden Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur bildete sich das Präzipitat, welches anschließend auf die Zellen gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation von 16 bis 20 Stunden bei 37°C, bevor am

nächsten Morgen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Transfektionseffizienz konnte mikroskopisch oder durchflusszytometrisch bestimmt werden.

3.2.1.10. Herstellung retroviraler Virusüberstände für die Transduktion eukaryotischer Zelllinien

Retroviren sind RNA-Viren, deren Genom aus einzelsträngigen RNA-Molekülen besteht. Sie replizieren sich über ein DNA-Intermediat, das Provirus genannt wird, und integrieren stabil in das Genom ihrer Wirtszellen. Um stabil transduzierte Zelllinien herzustellen, werden retrovirale Vektoren benutzt, die das einzubringende Gen enthalten. Flankiert wird die Gensequenz von 5'- und 3'-LTRs (*long terminal repeats*), die für die Insertion des Gens in das Wirtsgenom wichtig sind. Zusätzlich verfügt der Vektor über das Verpackungssignal Ψ sowie einen Selektionsmarker zur späteren Selektion erfolgreich transduzierter Zellen. Der zweite Baustein für die retrovirale Transduktion ist die Verpackungszelllinie. In dieser Arbeit wurden Phoenix-Zellen verwandt, die mit der oben beschriebenen Methode mit einem retroviralen Vektor und den Verpackungsplasmiden transfiziert wurden. Diese Helferplasmide codieren für die viralen Proteine Reverse Transkriptase, Integrase und Hüllproteine und werden für eine erhöhte Transduktionseffizienz zusätzlich zugegeben (Danos and Mulligan, 1988). Die Phoenix-Zellen generieren retrovirale Proteine, welche die Vektor-RNA verpacken und stellen damit die Virus-Partikel her. Diese werden in das Zellkulturmedium abgegeben, welches geerntet und auf die Zielzellen gegeben werden kann.

Das Virus wurde frühestens nach 48 Stunden nach der Transfektion gewonnen, da erst nach dieser Zeit ein geeigneter Virustiter erreicht ist. Dafür wurde das Zellkulturmedium der Phoenixzellen abgenommen und mit Hilfe einer Spritze durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 μm gepresst, um den Überstand von Zellen und Zelltrümmern zu befreien. Anschließend wurde das Virus tropfenweise zu den am Vortag ausplattierten Zielzellen E1A-MEF gegeben. Während der 24- stündigen Inkubation konnte das Provirus in die Zielzellen gelangen und während der Mitose stabil in das Genom integriert werden. Das gewünschte Gen und eine Antibiotikaresistenz wurden nun in den E1A-MEFs exprimiert, was nach 48 Stunden durch Zugabe eines Selektionsmediums überprüft wurde. Da die in dieser Arbeit

verwendeten Plasmide über ein resistenzvermittelndes Gen gegenüber Puromycin verfügen, wurden die Zielzellen mit 4 µg/ml Puromycin im Kulturmedium selektiert und unter Dauerselektion kultiviert.

3.2.1.11. Expression einer cDNA-Bank in E1A-MEF mit anschließendem Selektionsprozess überlebender Klone

Für die Identifikation von Resistenz vermittelnden Kandidatengenen wurde die soeben dargestellte Methode dazu verwendet, Viruspartikel herzustellen, welche die oben beschriebene (s. Einleitung) cDNA-Bank enthalten. Generiert wurden zwei virale Überstände. Der Erste enthielt das retrovirale Plasmid MS 268, welches die cDNA-Bank kodierte. Ein zweiter Virusüberstand wurde hingegen mit einem leeren Kontroll-Plasmid (MS 149) generiert. Das Virus wurde verdünnt auf die E1A-MEF gegeben, um eine maximale Transfektionseffizienz von 20% zu erhalten. Damit sollte sichergestellt werden, dass möglichst nur eine Plasmid-Kopie pro Zelle exprimiert wird. Da die Plasmide über das GFP-Gen verfügten, konnte die Transfektionseffizienz anschließend im Durchflusszytometer bestimmt werden. Die transduzierten Zielzellen wurden ausplattiert und wie oben beschrieben mit Splenozyten mit einem Effektor-zu-Target Verhältnis von 25:1 für 24 h ko-kultiviert. Überlebende Zellen wurden in 6-Well-Platten überführt. Nach 2-3 Tagen wurden Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze isoliert, in 96-Well-Platten überführt und expandiert. Zur Identifizierung des inserierten cDNA-Abschnittes wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert, der betreffende Abschnitt mittels PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetragen. Deutlich erscheinende Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *BLAST* analysiert.

3.2.2. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren, bei dem die Größe und Beschaffenheit einzelner Zellen analysiert werden kann. Dabei kommen sowohl fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die Strukturen in und auf der Zelle

markieren, als auch Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die zuvor in die Zellen eingebracht wurden bzw. die von der Zelle selbst produziert werden (z.B. GFP).

Die zu analysierenden Zellen werden in einem laminaren Strom perlchnurartig aufgereiht und an dem gebündelten Strahl eines Lasers vorbeigeführt. Wird der Fluoreszenzfarbstoff durch den Laser angeregt, emittiert dieser Licht einer spezifischen Wellenlänge. Das emittierte Licht wird mit verschiedenen Filtern aufgetrennt und mit Photodetektoren gemessen. Die Signalstärke ist dabei proportional zur Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes. Zusätzliche Informationen bekommt man durch die Messung des Streulichts. Im Vorwärtsstreulicht (forward scatter) wird durch die Beugung des Lichts die Zellgröße ermittelt, das Seitwärtsstreulicht (side scatter), bei dem die Lichtbrechung im 90° Winkel gemessen wird, gibt Auskunft über die Granularität einer Zelle. Die unterschiedlichen Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Eigenschaften.

3.2.2.1. Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumjodid

Um das Zellzyklusprofil einer Zellpopulation zu messen, wird die DNA mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Der DNA-Gehalt von Zellen variiert je nach Phase des Zellzyklus: Zellen in der G₀/G₁-Phase besitzen einen diploiden Chromosomensatz ($2n$); tritt die Zelle in den Zellzyklus, und damit in die S-Phase ein, wird die DNA verdoppelt ($2n-4n$), so dass die Zelle kurz vor der Zellteilung in der G₂/M-Phase den vierfachen Chromosomensatz ($4n$) besitzt. Stirbt eine Zelle, so wird die DNA durch spezielle DNAsen abgebaut und es wird ein DNA-Gehalt in der Zelle gemessen, der geringer als der diploide Chromosomensatz ist ($<2n$). Für die Messung des DNA-Gehalts werden die Proben mit einem Puffer versetzt, welcher das Detergens Triton-X enthält, das die Zellmembran aufschließt. Auf diese Weise gelangt das Propidiumjodid, einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, in den Zellkern, der bei 488 nm ein Absorptionsmaximum und bei 617 nm ein Emissionsmaximum hat.

Für die Untersuchung des Zellzyklusprofils wurde zunächst der Zellkulturüberstand in ein FACS-Röhrchen überführt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wurde

abgenommen und zu dem Überstand gegeben. Durch Trypsinbehandlung abgelöste Zellen wurden ebenfalls in das FACS-Röhrchen pipettiert und die Zellsuspension bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 300 µl HFS-Puffer resuspendiert und für mind. 30 min auf Eis abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer bezüglich ihres DNA-Gehalts analysiert.

3.2.2.2. Bestimmung der Zellviabilität mittels Propidiumjodid

Bei der Messung der Zellviabilität bedient man sich des gleichen Farbstoffes wie bei der Zellzyklusanalyse. Hierbei wird allerdings auf die Zugabe eines Detergens verzichtet, so dass nur tote Zellen, deren Membran ihre Integrität verloren hat, angefärbt werden.

Die zu analysierenden Zellen wurden geerntet und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 1400 U/min für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl PBS aufgenommen. Die Probe wurde mit 3 µl der Propidiumjodidlösung versetzt, für 10 min auf Eis abgedunkelt inkubiert und direkt gemessen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse im FL2 Kanal.

3.2.2.3. Messung der GFP-Expression

Das Durchflusszytometer eignet sich auch für die Detektion von fluoreszierenden Proteinen, die zuvor durch eine transiente oder stabile Transfektion eingebracht wurden. Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) wird häufig genutzt, um die Effizienz einer solchen Transfektion ermitteln zu können. GFP besitzt ein Absorptionsmaximum bei 395 nm und ein Emissionsmaximum bei 509 nm; die Messung erfolgt im Kanal FL1.

Die zu analysierenden Zellen wurden geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und bei 1400 U/min für 5 min pelletiert. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen in 300-500 µl PBS resuspendiert und anschließend analysiert.

3.2.2.4. Detektion von Oberflächenproteinen

Zur Untersuchung der Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, die bereits mit einem Fluorophor gekoppelt waren. Die Antikörper binden an die spezifischen Oberflächenantigene auf den Zellen, welche anschließend im Laser des Durchflusszytometers detektiert werden können. Wichtig ist die Unterbindung von unspezifischen Antikörperbindungen, was durch die Inkubation mit bovinem Serumalbumin (BSA) erreicht wird. Für die Analyse wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. FITC besitzt ein Absorptions- bzw. Emissionsmaximum bei 485 bzw. 514 nm und wird im Kanal FL1 gemessen. PE, welches im Kanal FL2 gemessen wird, wird mit einer Wellenlänge von 565 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 573 nm.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und bei 1400 U/min für 5min pelletiert. Das Pellet wurde mit PBS + 0,5% BSA einmal gewaschen und wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100µl PBS + 0,5% BSA resuspendiert und die laut Herstellerangaben verdünnten Antikörper zugegeben. Die Färbung erfolgte abgedunkelt bei 4°C für 40 min. Anschließend wurden die Zellen abermals mit PBS + 0,5% BSA gewaschen und in einer 1%-igen Formaldehydlösung über Nacht fixiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb von 24 h nach der Färbung.

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1. Gewinnung von genomischer DNA aus Mausgewebe

Zur Bestimmung des Genotyps wurde den Mäusen eine 1-2 mm lange Schwanzbiopsie entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zu jeder Biopsie wurden 90 µl Lysepuffer für Mausgewebe und 10 µl Proteinase K hinzugegeben und bei 56°C für 3 h inkubiert. Dabei wurde das Gewebe aufgebrochen und die Proteine lysiert, um die DNA freizusetzen. Nach einer 10 minütigen Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95°C wurde die Probe für 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene genomische DNA konnte nun in eine PCR eingesetzt werden.

3.2.3.2. Gewinnung von genomischer DNA aus Zellkulturzellen

Für die Gewinnung von genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurde das „Pure Link® Genomic DNA Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Dabei werden die Zellen ebenfalls zunächst mit einem Lysepuffer und Proteinase K inkubiert um die Zellmembran aufzuschließen und die DNA freizusetzen. Durch die Zugabe von RNase wird die vorhandene RNA zerstört, um die Reinheit der genomischen DNA zu erhöhen. Dem Lysat werden anschließend Ethanol und ein Puffer mit leicht saurem pH-Wert zugegeben, was eine Zerstörung der Hydrathülle der DNA bewirkt. Wird die Lösung nun auf eine Säule pipettiert, kann die DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen reversibel an die Silica-Membran binden. Die DNA-Moleküle werden mit verschiedenen Puffern von Verunreinigungen befreit und schließlich in ein frisches Gefäß eluiert.

3.2.3.3. RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellkulturen

Bei Arbeiten mit RNA sind RNase-freie Bedingungen sowie eine konstante Temperatur von 4°C wichtig. Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde das „RNeasy® Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Die aus der Zellkultur gewonnenen Zellen wurden zunächst mit einem Puffer aufgeschlossen und homogenisiert. Das in dem Puffer enthaltene Guanidinthiocyanat bewirkt dabei die Inaktivierung von RNAsen. Das Zelllysat wird auf eine Silicamembran gegeben, welche die Gesamt-RNA in Anwesenheit von Ethanol bindet. Mittels verschiedener Zentrifugationsschritte werden Verunreinigungen entfernt und schließlich die gereinigte RNA mittels eines Puffers von der Säule eluiert.

3.2.3.4. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Um die Konzentration bzw. Reinheit von Nukleinsäuren zu bestimmen wird die Absorption von ultraviolettem Licht gemessen. Doppelsträngige DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine hingegen absorbieren UV-Licht bei 280 nm. Aus diesem Quotienten lässt sich die Reinheit der Probe berechnen, der optimaler Weise zwischen 1,7 und 2 liegt.

Die Messung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte am Spektrophotometer mittels einer Quarzküvette. Zunächst wurden 98 µl Lösungsmittel in die Küvette vorgelegt und der Leerwert gemessen, um das Gerät auf den Hintergrund des Lösungsmittels zu normalisieren. Anschließend wurden 2 µl der Nukleinsäureprobe hinzugefügt und die Konzentration gemessen

3.2.3.5. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die einzelsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Da nur die Boten-RNA (mRNA) als Information dienen soll, wird die mRNA zunächst mit einem Oligo-dT-Primer inkubiert. Dieser lagert sich komplementär an die poly-adenylierten Enden der mRNA an und dient der reversen Transkriptase als Matrize. Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in der Lage ist, mRNA in cDNA umzuschreiben.

Hierzu wurde das „High Pure RNA isolation Kit“ der Firma Roche laut Protokoll benutzt. Zunächst wurden 5 µg RNA mit dem Oligo dT-Primer für 10 min bei 65°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren und das Anlagern des Primers an die RNA zu ermöglichen. Anschließend wurden weitere Komponenten der Reaktion, wie dNTPs, RNase Inhibitor, reverse Transkriptase sowie ein Puffer hinzugegeben. Danach wurden die Proben in den Thermocycler übergeben, wo die Synthese der cDNA für 30 min bei 50°C erfolgte. Abschließend wurden die Proben auf 85°C erhitzt, um das Enzym zu deaktivieren. Bis zur Probenentnahme kühlte das Gerät die Proben auf 4°C herunter.

Die cDNA kann anschließend bei -20°C gelagert werden.

3.2.3.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erlaubt die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten *in vitro* (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Für die Reaktion benötigt man kurze Oligonukleotide (Primer), die sich komplementär an die DNA anlagern und die zu duplizierende Sequenz flankieren. Dabei bindet ein Primer an den kodierenden DNA-Strang, der zweite an den nicht-kodierenden Strang. Der DNA-

Polymerase dienen diese Primer als Startpunkt für die Synthese des neuen DNA-Strangs.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus drei Phasen, die zyklisch wiederholt werden. In der Denaturierungsphase wird die DNA auf 95°C erhitzt, was zum Aufschmelzen des Doppelstrangs führt. In der anschließenden Anneling-Phase wird die Temperatur erniedrigt, so dass die Primer an die DNA-Einzelstränge binden können. Die Annealing-Temperatur wird durch die Länge und Beschaffenheit der Primer bestimmt. In der dritten Phase, der Extension, bindet die Polymerase an die Primer und synthetisiert einen komplementären Strang. Danach beginnt wieder eine Denaturierungsphase, in der die neu synthetisierten Doppelstränge wieder aufgeschmolzen werden und ein neuer Zyklus beginnt. Auf diese Weise wird die DNA-Menge nach jedem Zyklus exponentiell vermehrt.

3.2.3.6.1. Genotypisierung-PCR

Reaktionsansatz:

steriles Wasser	ad 50 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP Mix (je 0,2mM)	1 µl
Primer 1_S	0,5 µl
Primer 2_S	0,5 µl
Primer 3_AS	1 µl
5x Q-Solution	10 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
DNA Template	3 µl

PCR-Konditionen:

96°C	5 min	} 32 Zyklen
96°C	30 sec	
62°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

Zur Genotypisierung der $St42Rag2^{-/-}$ -Mäuse wurde ein Protokoll mit 3 Primern verwendet. Zwei Primer banden im Bereich der genomischen DNA im V β Gen des T-Zellrezeptors. Sie generierten ein Produkt mit der Größe von 280 bp, welches als interne Kontrolle der PCR diente. Ein dritter Primer band in der Promotorsequenz des humanen CD2 Gens, welcher als Promotor für das Transgen verwendet wurde. Wenn das Transgen in der $St42Rag2^{-/-}$ Maus vorlag, wurde in der PCR ein zweites Produkt mit einer Größe von 190 bp gebildet (Abb. 5). Zur Analyse wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel geladen, in dem sich der transgene Genotyp durch eine charakteristische Doppelbande bei 280 bp und 190 bp auszeichnete.

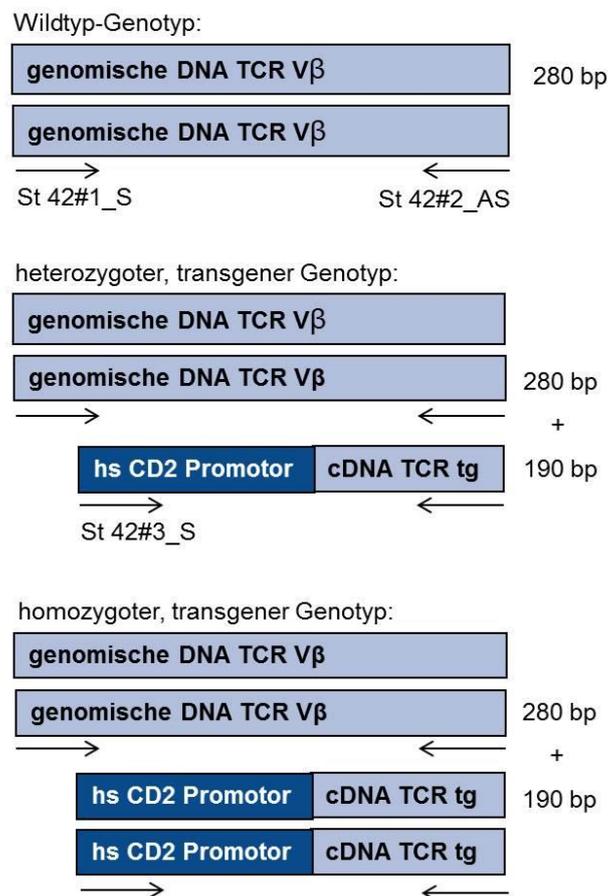


Abb. 5: Genotypisierungsstrategie zur Identifizierung von T-Zellrezeptor transgenen $St42Rag2^{-/-}$ Mäusen unter Verwendung einer 3-Primer-PCR.

Die Primer St 42#1_S und St 42#2_AS binden im genomischen DNA-Abschnitt des T-Zellrezeptors V β und erzeugen ein PCR-Produkt mit der Größe von 280 bp. Bei $St42Rag2^{-/-}$ Mäusen, die das Transgen tragen, bindet der dritte Primer (St 42#3_S) in der humanen CD2-Promoterregion, die zu dem Konstrukt gehört. Der dritte Primer bildet zusammen mit dem Antisense-Primer (St42#2_AS) ein zusätzliches PCR-Produkt mit der Größe von 190 bp. Pfeile markieren die Primer-Bindungsstellen.

3.2.3.6.2. PCR zur ortsspezifischen Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese wird eine Punktmutation in ein Gen, welches sich in einem Expressionsvektor befinden kann, eingefügt. Die Substitution der Base wird so gewählt, dass es bei der späteren Translation zu einem Aminosäureaustausch kommt. Findet dieser Austausch an einer enzymatisch aktiven Stelle des Proteins statt, so kann die Funktion des Proteins vermindert oder sogar ganz aufgehoben werden. Die Primer für die zielgerichtete Mutagenese wurden mit dem Programm QuikChange® Primer Design der Firma Agilent Technologies generiert. Für die PCR wurde die Phusion Polymerase verwendet, da dieses Enzym eine geringere Fehlerquote als die Taq-Polymerase besitzt.

Reaktionsansatz:

steriles Wasser	ad 50 µl
Phusion HS Puffer (5x)	10 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
Primer_Sense	1 µl
Primer_Antisense	1 µl
DMSO	4 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl

PCR Konditionen:

98°C	30 sec	
98°C	10 sec	
50°C	30 sec	} 15 Zyklen
72°C	3 min 40 sec	
98°C	10 sec	} 15 Zyklen
72°C	4 min	
4°C	∞	

3.2.3.6.3. Herstellung von PCR-Produkten für die Klonierung

PCR Konditionen:

98°C	30 sec	} 12 Zyklen
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	
72°C	20 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

3.2.3.6.4. qPCR

Diese PCR bietet die Möglichkeit, den cDNA-Gehalt einer Probe zu quantifizieren, um somit die Expression eines bestimmten Gens abzuschätzen. Dazu wurde das „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“ – System der Firma Roche verwendet.

Das System beruht auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Nach jedem Zyklus kann am Ende der Extension die Fluoreszenz mittels eines Detektors gemessen werden. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert Licht bei 494 nm und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Je höher die gemessene Fluoreszenzintensität ist, desto mehr PCR-Produkte liegen vor. Bei dieser Messung handelt es sich um relative Mengenangaben, da alle Werte auf die interne Kontrolle Aktin bezogen werden. Aktin ist ein Baustein des Zytoskeletts wird in nahezu allen Zellen exprimiert. Die Auswertung der Analyse erfolgte über den so genannten CT-Wert (*threshold cycle*). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, die benötigt wird, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, das deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens wird nun auf die Expression des Kontrollgens (Aktin) bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Werts:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

Nach der Normierung auf die endogene Kontrolle kann mit Hilfe des $\Delta\Delta CT$ -Werts der relative Unterschied in der Expressionsstärke zwischen zwei Zelllinien beschrieben werden:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ überexprimierende Zelllinie} - \Delta CT \text{ parentale Zelllinie}$$

Reaktionsansatz:

SybrGreen Mastermix	10 μ l
Primer Sense	1 μ l
Primer Antisense	1 μ l
steriles Wasser	3 μ l
cDNA	5 μ l

PCR Konditionen:

95°C	5 min	
95°C	10 sec	} 45 Zyklen
57°C	10 sec	
72°C	10 sec	
95°C	5 sec	
65°C	1 min	
97°C	kontinuierliche Erhöhung der Gradzahl	

Im Anschluss an die Amplifikation führt das LightCycler-Gerät noch eine Schmelzkurvenanalyse durch. Dabei werden durch eine Temperaturerhöhung die doppelsträngigen PCR-Produkte in Einzelstränge aufgeschmolzen und die Freisetzung des Sybr[®] Greens detektiert. Dies erlaubt die Unterscheidung der spezifischen Produkte von Primer-Dimeren, da die spezifischen Produkte bei einer höheren Temperatur als die Dimere aufschmelzen.

3.2.3.7. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese erlaubt die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten (Aaij and Borst, 1972). Dabei bewegt sich die negativ geladene DNA durch ein elektrisches Feld, welches an einem Agarosegel angeschlossen wird. Je

kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller bewegt es sich durch die Poren des Gels zur Anode. Größere DNA-Moleküle werden zurückgehalten und legen nur eine kurze Strecke im Gel zurück. Zur Visualisierung der DNA wird dem Agarosegel der Farbstoff Ethidiumbromid zugefügt, welcher zwischen die Basen von doppelsträngiger DNA interkaliert. Mittels einer UV-Lampe kann der Farbstoff bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht werden. Um die Größe des DNA-Fragments abschätzen zu können, wird ein Größenstandard mitgeführt.

Die Konzentration des Agarosegels richtet sich nach den aufzutrennenden DNA-Fragmenten. Bei großen DNA-Fragmenten wird ein 1%-iges Gel gewählt, für Fragmente zwischen 200 und 1000 bp werden 2%-ige Gele verwendet. Die gewünschte Menge an Agarose wurde abgewogen und mit der entsprechenden Menge an TAE Puffer gemischt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose keine Schlieren mehr bildete. Das noch flüssige Gel wurde mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Anschließend wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und in die polymerisierten Geltaschen pipettiert. Der Puffer enthält zum einen Bromphenolblau, welches zur Visualisierung der Wanderungsstrecke der DNA dient, und zum anderen Glycerin, das die Probe erschwert und das Absinken in die Probentasche erleichtert. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 60-120 V.

3.2.3.8. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach einer Agarosegelelektrophorese in weiteren Experimenten verwenden zu können, mussten diese aus dem Agarosegel isoliert werden. Dazu wurden die DNA-Banden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten. Für die Isolation der DNA aus der Agarose wurde das „PureLink™ Quick Gel Extraction Kit“ der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3.9. Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die fremde, in die Zelle eingedrungene DNA erkennen und diese spalten können. Die charakteristische

Methylierung des Bakteriengenoms schützt dabei vor dem Abbau der eigenen DNA. Für die Analyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die bestimmte Sequenzen innerhalb der DNA erkennen und diese schneiden. Bei der Erkennungssequenz handelt es sich häufig um ein Palindrom von vier bis acht Basenpaaren. Die Durchtrennung der DNA kann entweder glatt (*blunt-end*) oder versetzt mit einem Überhang von mehreren Basen (*sticky-end*) erfolgen.

Reaktionsansatz:

Restriktionsenzym	1 μ l
Puffer	2 μ l
DNA	1 μ g
Wasser	ad 20 μ l

Der Restriktionsansatz wird für 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die weitere Analyse wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.3.10. Klonierung von PCR-Produkten in den pJet-Vektor

Für das Klonieren von PCR-Produkten in einen Expressionsvektor wurde das CloneJET™ PCR Cloning Kit der Firma Fermentas nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit enthält einen linearisierten Vektor, in den PCR-Produkte eingefügt werden können, die mit Hilfe einer „proofreading“-Taq generiert wurden. Diese Produkte verfügen über „blunt ends“ und können mit Hilfe der Phosphatgruppen an den 5'-Enden des Vektors und dem Enzym Ligase direkt eingebaut werden. Der Vorteil dieses Systems ist das letale Gen, welches durch die Insertion des PCR-Produkts zerstört wird. Kommt es zu einer Religation des Vektors ohne Insert, so wird dieses Gen in den transformierten Bakterien exprimiert und tötet diese ab. Auf diese Weise werden Zellen selektiert, die den rekombinanten Vektor aufgenommen haben.

3.2.3.11. Transformation von kompetenten Bakterien

Bei kompetenten Zellen handelt es sich um *E. coli* Bakterien, die Fremd-DNA aufnehmen können. Zur Vervielfältigung von Vektor-DNA wurde diese in die *MAX Efficiency Stbl2 Competent Cells*, die sich besonders für die Transformation mit retroviralen Vektoren eignen, eingebracht. Das Kit der Firma Invitrogen wurde nach Herstellerangaben mit der Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Agarplatten ausgebracht und über Nacht in einem Brutschrank bei 32°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige Bakterienkolonien gepickt und in eine Starter-Kultur mit LB-Medium überführt. Diese wurde über Nacht bei 32°C geschüttelt. Die niedrigere Inkubationstemperatur verhinderte dabei die Rekombination bei retroviralen Plasmiden. Zum Schluss wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse aus den Bakterien gewonnen.

3.2.3.12. Isolierung von Plasmid-DNA mit alkalischer Lyse (Minipräparation)

Um die von Bakterien vermehrte Plasmid-DNA zu isolieren und zu analysieren, wurde bei kleinen Volumina die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim and Doly, 1979).

Dabei wird die Zellmembran der Bakterien zunächst mit einem Puffer aus Tris-Cl und EDTA perforiert, um sie mittels eines zweiten alkalischen Puffers komplett aufzuschließen. Die in dem zweiten Puffer enthaltene NaOH/SDS-Lösung bewirkt außerdem eine Denaturierung der DNA und Proteine. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die Lösung neutralisiert, wobei die genomische DNA zusammen mit Protein-SDS-Komplexen präzipitiert. Nach einer Zentrifugation kann die Plasmid-DNA aus dem Überstand gewonnen und mit Alkohol gefällt werden.

3.2.3.13. Plasmid-Maxipräparation

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus größeren Bakterienmengen wurde das QIAfilter™ *Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet. Das Prinzip dieses Fertigsystems beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse der Bakterien. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von Filtern, die mit einer Anion-Austausch-Matrix beschichtet sind, isoliert. Dabei binden die positiv geladenen Diethylaminoethanol-

Gruppen der Matrix das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA. Die DNA wird im Filter zurückgehalten, während Verunreinigungen von RNA und Proteinen mit Puffern entfernt werden. Schließlich wird die DNA mit einem hochkonzentrierten NaCl-Puffer von der Matrix eluiert.

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten

Zur Isolation von Proteinen aus der Zellkultur wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend von der Zellkulturplatte geschabt. Die Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1500U/min pelletiert. Die anschließende Prozedur wurde auf Eis bzw. bei 4°C vollzogen.

Die geernteten Zellpellets wurden in 1 Volumen NP-40 – Lysispuffer resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Um später eine Phosphorylierung der Proteine nachweisen zu können, wurden dem Puffer Phosphatase-Inhibitoren zugefügt. Die Proben wurden nun für 20min auf Eis inkubiert und zwischendurch gemischt, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 U/min für 5 min. Die Zelltrümmer sammelten sich dabei am Boden des Gefäßes. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.4.2. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Dabei bindet der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 unspezifisch an Proteine, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximum von 469 nm zu 595 nm führt. Nach Erstellen einer Eichkurve mit definierten Konzentrationen von bovinem Serumalbumin kann die Konzentration von Proteinproben bestimmt werden.

Zum Anfärben der Proteinproben wurde die Roti-Nanoquant-Lösung verwendet, die 1:5 in Wasser verdünnt wurde. Ein ml dieser Lösung wurde in eine Küvette vorgelegt, 2 µl der Proteinprobe hinzugegeben und die Proteinkonzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

3.2.4.3. Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die Proteinproben werden zunächst mit einem Probenpuffer versetzt und bei 95°C denaturiert. Das in dem Puffer enthaltene SDS (sodium dodecyl sulfate) zerstört Wasserstoffbrücken und damit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Disulfidbrückenbindungen werden hingegen durch das vorhandene β -Mercaptoethanol gespalten. Die Anlagerung des SDS an die denaturierten Proben bewirkt eine negative Ladung und überdeckt damit die Eigenladung der Proteine. Somit ist nach Anlegung einer Spannung die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld gemäß ihrer molaren Masse möglich. Zunächst durchlaufen die Proteine ein Sammelgel, welches dafür sorgt, dass die Proben gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Die maschenartige Struktur des Trenngels bewirkt die Auftrennung der negativ geladenen Proben. Kleinere Proteine können das Gel schneller passieren als größere, so dass die Proteinproben in absteigender Größenordnung aufgetrennt werden.

Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer-Puffer versehen und für 5 min bei 97°C denaturiert. Das Gel wurde mit 20 μ l je Probe und 10 μ l Proteingrößenstandard beladen und lief bei 95 V für ca. 2 Stunden.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Substanz	Sammelgel (5%)	Trenngel (8%)
Aqua dest.	2,7 ml	4,6 ml
Acrylamid, Bis-acrylamid 27:1	0,67 ml	2,7 ml
1M Tris (pH 6,8)	0,5 ml	-
1,5M Tris (pH 8,8)	-	2,5 ml
10% SDS	40 μ l	0,1 ml
10% Amoniumpersulfat	40 μ l	0,1 ml
TEMED	4 μ l	6 μ l

3.2.4.4. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blotting)

Nach der Auftrennung der Proteinproben wurden diese mit Hilfe eines Elektrotransfers auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979; Bittner et al., 1980). Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel wandern die Proteine aus dem Polyacrylamid und werden auf der Membran fixiert.

Dazu wurde das Trenngel auf die Membran gelegt, von beiden Seiten mit drei Lagen Whatman™-Papier umgeben und gegen das Austrocknen mit zwei Schwämmen abgeschlossen. Das Western Blotting erfolgte in der mit Blotting-Puffer gefüllten BioRad-Kammer für eine Stunde bei 300 mA. Als Nachweis des erfolgreichen Transfers konnte die Membran anschließend mit Ponceau-S-Lösung gefärbt werden. Der rote Azofarbstoff bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen und macht die Proteinbanden auf der Membran sichtbar.

3.2.4.5. Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion dient als Nachweis spezifischer Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. Dazu wird ein Primärantikörper verwendet, der an das Antigen des gesuchten Proteins bindet. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit dem Reporterenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper und dient zur Visualisierung der Proteinbande. Das Enzym oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol. Die durch die chemische Reaktion verursachte Lichtemission kann mit Hilfe eines Chemilumineszenzgeräts detektiert werden.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran in einer 4%igen Milchpulver-Lösung für 1 h inkubiert, um spätere unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in 4%-iger Milchpulverlösung bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Zweitantikörper wurde in 4%-iger Milchpulverlösung für zwei Stunden inkubiert. Anschließend folgten nochmal drei Waschstschritte für 10 min in TBS.

Die Antikörper wurden laut Angaben des Herstellers verdünnt.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die SuperSignal[®]-Reagenzien der Firma Thermo Scientific laut Protokoll verwendet und mit einem Chemilumineszenz-Imager der Firma Vilber analysiert.

3.2.4.6. Dehybridisierung von Nitrozellulosemembranen

Um Nitrozellulosemembranen ein weiteres Mal zu verwenden, müssen die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wird die Membran in 100 ml Dehybridisierungspuffer eingelegt und für 30 min bei 50°C geschüttelt. Anschließend wird die Membran dreimal für 10 min gewaschen, bevor sie für mindestens 1 Stunde zur Abblockung unspezifischer Antikörperbindungen in 4%-iger Milchlösung inkubiert wird. Danach kann die Membran erneut zur Detektion von Proteinbanden verwendet werden.

3.2.4.7. Nachweis von Prostaglandin E₂ im Zellkulturüberstand

Zur Detektion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Zellkulturüberstand wurde das *Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal* der Firma Cayman Chemikal verwendet. Dabei handelt es sich um ein kompetitives enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (EIA). Eine unbekannte Menge an PGE₂ aus einer Zellkulturprobe konkurriert mit einer bekannten Menge an PGE₂, welches mit Acetylcholinesterase gekoppelt ist, um die Bindung an einen limitierten, spezifischen Antikörper. Der Antikörper-PGE₂-Komplex bindet in einer mit Sekundärantikörper vorbeschichteten 96-Well Platte. Für die enzymatische Reaktion wird Acetylcholin hinzugefügt, welches von der Acetylcholinesterase gespalten wird. Dabei erfolgt ein gelber Farbumschlag, der in einem Plattenlesegerät bei 405 bis 420 nm gemessen werden kann. Die Farbintensität der Proben ist dabei umgekehrt proportional zu ihrer PGE₂-Konzentration; je mehr Acetylcholinesterase-PGE₂ an den Antikörper gebunden hat, desto weniger freies PGE₂ war in der Probe vorhanden und desto intensiver die gemessene Farbintensität.

3.2.4.8. Nachweis von IFN-gamma im Zellkulturüberstand

IFN-gamma wurde nach 24-stündiger Ko-Kultur im Zellkulturüberstand gemessen. Die Überstände wurden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend mit dem *Mouse IFN-gamma Platinum* ELISA der Firma ebioscience analysiert. Dabei wird die zu analysierende Probe in eine mit Primärantikörpern beschichtete Well-Platte gegeben. Nachdem das IFN-gamma an den primären Antikörper gebunden hat, wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, welcher ebenfalls an das Interferon-gamma bindet. Anschließend bindet ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat an das Biotin. Zum Nachweis der IFN-gamma Konzentration wird ein Substrat hinzugefügt. Das in dem Substrat enthaltene Tetramethylbenzidin führt in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und einem Phosphat-Citrat-Puffer zu einem blauen Farbumschlag der Lösung, die in einem Plattenlesegerät quantifiziert werden kann.

3.2.5 Mausmodelle

3.2.5.1. Mausstämme

ST42Rag2^{-/-}

Die zytotoxischen T-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen aus ST42Rag2^{-/-} Mäusen mit einem C57BL/6-Hintergrund. Die Tiere besitzen einen transgenen T-Zellrezeptor, der sich aus den Segmenten V α 16 und V β 1 zusammensetzt. Das eingebrachte Konstrukt befindet sich unter der Kontrolle des humanen CD2 Promotors, der dafür sorgt, dass das Transgen spezifisch in T-Zellen exprimiert wird (Graeves et al. 1989). Der transgene T-Zellrezeptor erkennt spezifisch das adenovirale Epitop Ad5E1A₂₃₄₋₂₄₃ Klon 5 auf dem murinen H2-D^b MHC-Klasse-I Molekül. Durch eine Kreuzung dieser transgenen Mäuse in den Rag2^{-/-}-Hintergrund, bei dem durch einen „Knock Out“ in dem entsprechendem Gen eine VDJ-Rekombination verhindert wird, reifen nur E1A-spezifische T-Zellen heran. Die Reifung von anderen B- und T-Zellen wird verhindert (Kast et al. 1989; Toes et al. 1996; Hofmann et al. 2004).

NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCrI)

Bei NOD/SCID Mäusen handelt es sich um Tiere, bei denen eine autosomal rezessive Mutation im *Prkdc*^{scid} (SCID = severe combined immunodeficiency) Gen vorliegt. Diese Mutation wurde durch Kreuzung mit dem NOD- (non-obese diabetic) Hintergrund kombiniert. Durch die Mutation, die eine VDJ-Rekombination verhindert, fehlen den Tieren reife B- und T-Lymphozyten. Des Weiteren ist die Funktion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vermindert. Durch das defekte humorale und zelluläre Immunsystem eignen sich diese Mäuse besonders für die Transplantation von nicht murinen/humanen Zellen, da diese nicht abgestoßen werden können.

Die NOD/SCID Mäuse stammen aus der Zucht des Zentralen Tierlabors.

C57BL/6J.B6D2F2-TgN(H2K^b-TCRV β 8.1)

Dieser auf einem C57BL/6-Hintergrund basierenden Mausstamm verfügt über einen transgenen T-Zellrezeptor, der das Lymphozytäre Choriomenigitis Virus- (LCMV) spezifische Peptid des Glycoproteins gp₃₃₋₄₁ erkennt. In diesen Tieren reifen nur p14 spezifischen T-Zellen heran.

C57BL/6-Prfltm1Sdz/J

Dieser Mausstamm verfügt ebenfalls über T-Zellen, die einen transgenen p14 T-Zellrezeptor besitzen. Zusätzlich tragen die Tiere einen *Knock out* im *Prf1*-Gen, wodurch die Produktion von Perforin in den T-Zellen unterbunden wird. Perforin wird benötigt, um Poren in der Zellmembran der Zielzellen zu bilden, durch welche Granzyme eindringen können. Die Perforin/Granzym- vermittelte Apoptose ist somit in diesen T-Zellen nicht möglich.

Die p14 und p14 Perforin^{-/-} Mäuse wurden freundlicher Weise vom Institut für Immunologie zur Verfügung gestellt.

Alle Tierversuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt.

3.2.5.2. Zucht von homozygoten St42Rag2^{-/-} Mäusen

Auf Grund der Tatsache, dass der transgene T-Zellrezeptor in der Mauspopulation zunächst nur heterozygot vorlag, besaßen bei Kreuzungen dieser Tiere ca. 25% der Nachkommen nicht das gewünschte Transgen. Die T-Zellen dieser Mäuse sind im E1A-System nicht reaktiv und daher für die Ko-Kultur nicht verwendbar. Daher wurde die homozygote Züchtung der transgenen St42Rag2^{-/-}-Mäuse angestrebt. Die Bestimmung eines hetero- oder homozygoten Genotyps erfolgte mit Hilfe einer Verpaarungsstrategie, bei der der Genotyp der Nachkommen (F1-Generation) Aufschluss über den Genotyp der Parentalgeneration gibt. Wird eine für den transgenen T-Zellrezeptor heterozygote Maus mit einer Wildtyp-Maus gekreuzt, so trägt die Hälfte der Nachkommen das Transgen, die andere Hälfte ist wildtypisch. Wird hingegen eine für den transgenen T-Zellrezeptor homozygote Maus mit einer Wildtyp-Maus verpaart, so tragen alle Nachkommen das Transgen (Abb. 6A). Der mittels PCR untersuchte Genotyp der F1-Generation zeigte die erwartete Verteilung (Abb. 6B). Um eine homozygote Linie zu erhalten, wurden die Nachkommen der homozygoten St42Rag2^{-/-}-Mäuse untereinander verpaart.

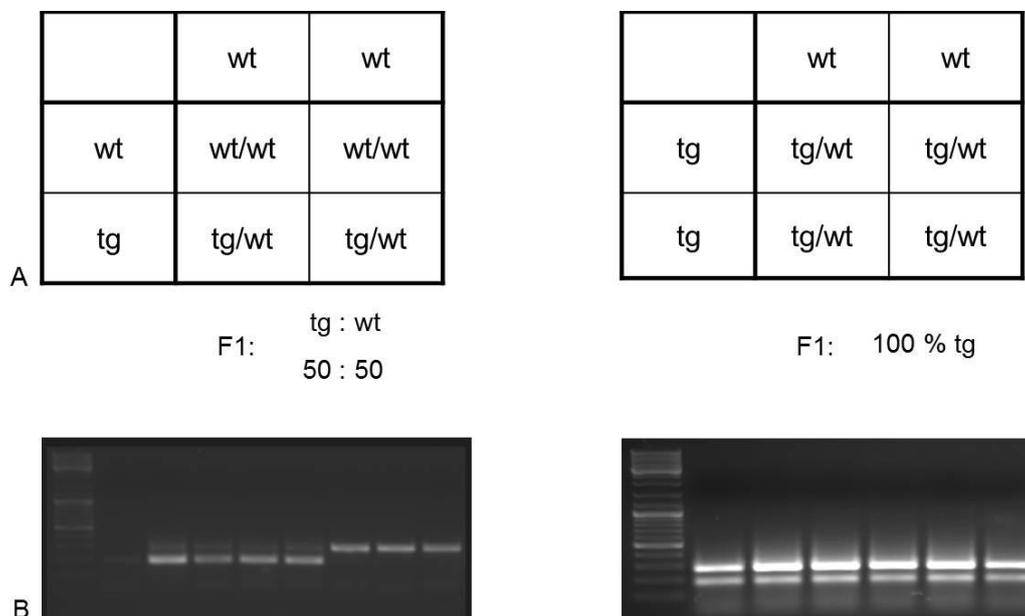


Abb. 6: Identifizierung des Genotyps durch Rückkreuzung mit dem Wildtyp.

(A) Kreuzungsschemata der zu identifizierenden St42Rag2^{-/-} Mäuse mit dem Wildtyp. Durch den Genotyp der F1-Generation kann auf den Genotyp der Parentalgeneration geschlossen werden.

(B) Gelelektrophorese-Bild nach einer Genotypisierungs-PCR der F1-Generation. Das Wildtypgen ist 280 bp groß, das Transgen hat die Größe von 190 bp.

3.2.5.3. Isolierung muriner Splenozyten für die Ko-Kultur

Zur Isolation muriner Splenozyten wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und großzügig mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde durch einen Schnitt an der linken Seite des Tieres von der Hüfte bis zum Rippenbogen eröffnet. Nach erneuter Desinfektion wurde durch einen kurzen Schnitt der Bauchraum eröffnet und die Milz steril entnommen. In einer 3 cm Petrischale wurde die Milz mit Hilfe des Stempels einer 20ml Spritze durch ein engmaschiges Sieb passiert. Das Sieb wurde mit 3ml warmen Medium gespült und die Milzsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Suspension wurde mit Medium auf ein Volumen von 8 ml eingestellt. Anschließend wurden 8 ml Ammoniumchloridlösung zur Lyse der Erythrozyten zugegeben, die Suspension durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert und nochmals durch ein Zellsieb (40 μm) filtriert. Die Splenozyten wurden durch Zentrifugation bei 1400U/min für 5 min pelletiert, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.5.4. Transplantation von Tumorzellen

Um Mäusen E1A-Fibroblasten subkutan zu transplantieren, wurden diese zunächst aus der Zellkulturschale geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die Suspension auf 10×10^6 Zellen pro ml PBS eingestellt. Davon wurden den Tieren 200 μl (2×10^6 Zellen) s.c. in die linke Flanke injiziert. Zur besseren Überprüfung des Anwachsens der Tumorzellen und der Messung der Tumorgroße im Verlauf des Experiments wurde die Haut an der zu injizierenden Stelle rasiert.

3.2.5.5. Adoptiver T-Zell-Transfer

Die E1A-Splenozyten wurden wie oben beschrieben gewonnen, allerdings wurde auf die Lyse der Erythrozyten verzichtet. Nach Auszählung der Zellen wurden die Splenozyten mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Von der Splenozytensuspension wurden 150 μl pro Tier i.v. in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Zur Aktivierung der Splenozyten wurde den Mäusen *Incomplete Freund's Adjuvant* und Interleukin-2 i.m. in die Schwanzwurzel gespritzt.

3.2.5.6. Aufnahme des Tumorwachstums

Nach der Transplantation von Tumorzellen wurde die Größe der Tumoren alle zwei Tage mit Hilfe einer Schieblehre zweidimensional gemessen. Die vorzeitige Tötung von Tumor tragenden Tieren erfolgte nach den Richtlinien der GV-SOLAS.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Cyclooxygenase-2 als potentiellen Resistenzfaktor gegenüber zytotoxischen T-Zellen

4.1.1. Stabile Expression von COX-2 in E1A-MEF und Verifizierung der Resistenz gegenüber *St42Rag2^{-/-}*-Splenozyten *in vitro*

Mittels funktioneller Expressionsklonierung unter Verwendung einer cDNA-Bank wurde die Cyclooxygenase-2 als möglicher Resistenzfaktor gegenüber T-Zell-vermittelter Tumorsuppression identifiziert (vgl. Einleitung). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die cDNA des humanen *hsCOX-2* und murinen *mmCOX-2* mit einem retroviralen Vektorsystem stabil in E1A-MEF integriert und exprimiert. Erfolgreich transduzierte Klone konnten über die Zugabe von Puromycin im Kulturmedium selektiert werden. Anschließend wurde die Transgenexpression mittels Immunoblotting überprüft (Abb. 7). Mit dem entsprechenden Vektor transduzierte E1A-MEF zeigten eine Expression des humanen oder murinen COX-2 Proteins, die deutlich höher war als die endogene COX-2-Expression der murinen Fibroblasten. Als Kontrolle dienten parentale E1A-MEF sowie E1A-MEF, die mit einem Kontrollvektor transduziert wurden, der das Grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert (E1A-MEF-GFP).

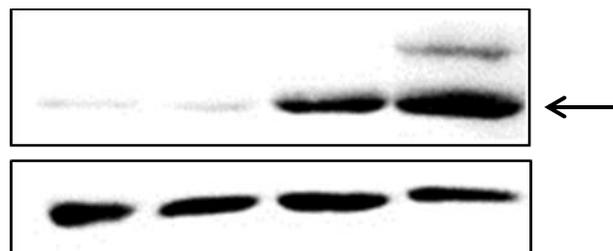


Abb. 7: Überprüfung der COX-2 Überexpression in E1A-MEF mittels Immunoblotting.
Mit den COX-2 Expressionsvektoren transduzierte E1A-MEF zeigten eine deutlich erhöhte Expression des COX-2 Proteins im Vergleich zu den

parentalen E1A-MEF und den E1A-MEF-GFP. Als Beladungskontrolle erfolgte der Nachweis von β -Aktin.

Als nächster wichtiger Schritt wurde die Resistenz der E1A-MEF-Cox-2 gegenüber dem zytotoxischen Effekt von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten in der Ko-Kultur verifiziert. Dazu wurden Effektor- und Targetzellen in verschiedenen Verhältnissen von 6:1 bis 75:1 inkubiert, außerdem wurde bei jeder Zelllinie eine unbehandelte Kontrolle (0) ohne St42Rag2^{-/-}-Splenozyten mitgeführt. Nach 24-stündiger Ko-Inkubation von E1A-MEF und E1A-MEF-Cox-2 als Zielzellen und St42Rag2^{-/-}-Splenozyten als Effektoren, wurden die letzteren entfernt und die Zielzellen in 6-Well-Platten kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Brillantblau gefärbt, um die Koloniebildung der Zielzellen zu untersuchen. Die Ko-Kultur von St42Rag2^{-/-}-Effektorzellen mit E1A-MEF verursachte ab einem Verhältnis von 10:1 eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduzierte Kolonienbildung. Bei hohem Überschuss der Effektorzellen von 50:1 und 75:1 waren kaum noch Kolonien zu erkennen (Abb. 8). Im Vergleich dazu zeigten die E1A-MEF-Cox-2 eine Resistenz gegenüber den St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Auch bei einem Effektor zu Target- (E:T) Verhältnis von 75:1 war eine deutliche Kolonienbildung noch erkennbar.

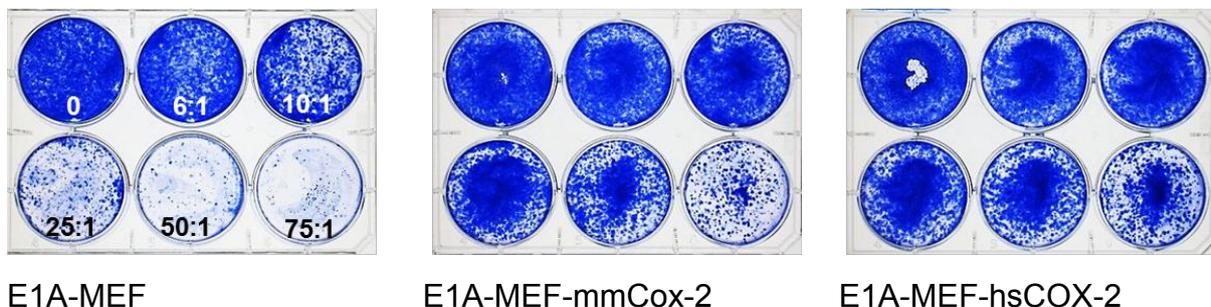


Abb. 8: Klonogenes Überleben von E1A-MEF nach Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten.

Überlebende E1A-MEF 5 Tage nach Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Parentale E1A-MEF konnten deutlich weniger Kolonien bilden (links) als COX-2 exprimierende E1A-MEF. Zahlen zeigen die Effektor zu Target Ratio an, wobei 0 die Kultivierung ohne St42Rag2^{-/-}-Splenozyten und somit die unbehandelte Kontrolle darstellt.

4.1.2. Funktionelle Untersuchung der durch die Cyclooxygenase-2 vermittelten Resistenz *in vivo*

Zur Bestätigung der Aktivität von COX-2 als immunologischem Resistenzfaktor wurden Untersuchungen in einem murinen Tumormodell angeschlossen. In diesem Modell untersuchten wir den Einfluss einer adoptiven, antigenspezifischen zellulären Immuntherapie auf das Tumorstadium *in vivo*. Dazu wurden 1×10^6 E1A-MEF bzw. E1A-MEF-mmCox-2 s.c. in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen injiziert. NOD/SCID-Mäuse haben aufgrund einer homozygoten Mutation im *Prkdc* Gen einen Defekt der spezifischen humoralen und zellulären Immunität. Entsprechend kann bereits zwei Tage nach Injektion das Anwachsen palpabler Fibrosarkome beobachtet werden. Nach Entwicklung palpabler Tumore erhielten die Mäuse eine einmalige intravenöse Injektion von Splenozyten der St42Rag2^{-/-}-Mäuse. Hierfür wurden der Hälfte jeder Mausgruppe 38×10^6 St42Rag2^{-/-}-Splenozyten in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Zur *in vivo* Aktivierung der T-Zellen wurden zusätzlich murines IL-2 und Freund's Adjuvant (incomplete) *i.m.* in die Schwanzwurzel injiziert. Die andere Hälfte der Gruppe diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Die Tumorgöße wurde alle 2 Tage mittels einer Schieblehre gemessen. Die Tiere wurden gemäß den Vorgaben der GV-SOLAS getötet, sobald sich der Gesundheitszustand des Tieres deutlich verschlechterte, der Tumor exulzerierte oder eine Größe von 1,5 cm erreicht hatte. In Abb.9 ist die Überlebenszeitanalyse der vier Experimentalgruppen dargestellt. Hier zeigte sich, dass die unbehandelten Kontrollgruppen, die E1A-MEF oder E1A-MEF-mmCox-2-Tumoren trugen, ein ähnliches medianes Überleben von 22 Tagen (± 2 Tage SEM) respektive 20 Tagen (± 3 Tage SEM) aufwiesen. Das mediane Überleben der Tiere mit E1A-MEF-mmCox-2-Tumoren verlängerte sich auf 27 Tage (± 4 Tage SEM) wenn mit einem adoptiven Splenozytentransfer behandelt wurde. Den günstigsten Verlauf zeigten die Tiere mit E1A-MEF-Tumoren, die einen adoptiven Splenozytentransfer erhielten und wiesen ein durchschnittliches Überleben von 29 Tagen (± 2 Tage SEM) auf. Die Überlebensspanne dieser Tiere war signifikant verlängert verglichen mit behandelten Tieren mit E1A-MEF-mmCox-2-Tumoren ($p = 0,0347$; Log-rank Test) bzw. mit der unbehandelten Kontrollgruppe mit E1A-MEF-Tumoren ($p = 0,0027$; Log-rank Test). Zudem traten bedrohliches Tumorstadium und Ulzerationen deutlich später auf. Dieser Versuch zeigt zum einen, dass der adoptive Transfer von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten einen

therapeutischen Effekt auf etablierte E1A-MEF-Tumore *in vivo* hat, und zum anderen, dass die Expression von mmCox-2 diese T-Zell-vermittelte Tumorsuppression neutralisiert.

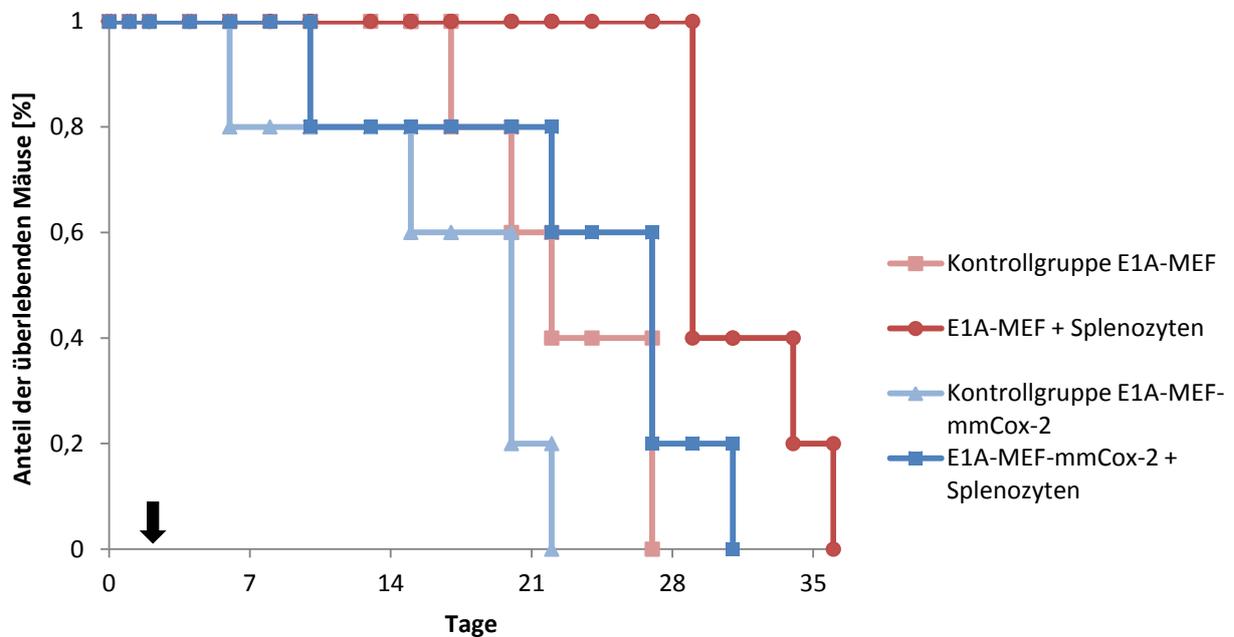
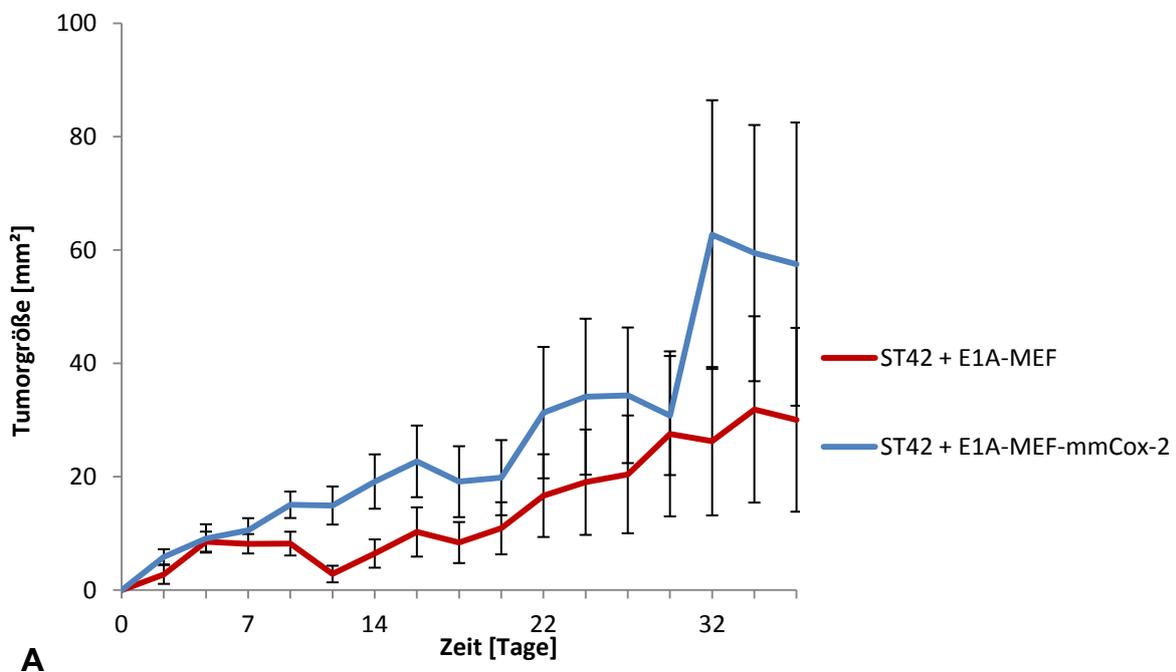


Abb. 9: Überlebenskurve von NOD/SCID-Mäusen nach Implantation von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCOX-2 Tumorzellen mit und ohne adoptivem T-Zelltransfer.

Den Mäusen wurde in eine Flanke 1×10^6 E1A-MEF (rote Linien), respektive E1A-MEF-mmCox-2 (blaue Linien) injiziert. Nach 2 Tagen erhielt eine Gruppe $St42Rag2^{-/-}$ -Splenozyten intravenös über die Schwanzvene (helle Linien), die Kontrollgruppe erhielt keine Injektion (dunkle Linien). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des T-Zelltransfers.

In einem zweiten Versuchsansatz untersuchten wir die Effektivität von $St42Rag2^{-/-}$ -Mäusen, die Tumorentwicklung von E1A-MEF-Fibrosarkomen in antigenspezifischer Weise zu supprimieren. In diesem Experiment erhielt eine Gruppe von $St42Rag2^{-/-}$ -Mäusen subkutane Flankeninjektionen von jeweils je 1×10^6 E1A-MEF oder E1A-MEF-mmCox2. Die Tumorentstehung wurde alle 2 Tage begutachtet. Als weitere Kontrolle erhielten isogene C57Bl/6 Mäuse Injektionen von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 (Abb. 10B). Die immunkompetenten C57Bl/6-Mäuse zeigten zunächst ein Anwachsen von E1A-MEF- und E1A-MEF-mmCox2-Tumoren mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer Abstoßung der Tumore, die nach 14 Tagen nicht mehr palpabel waren. Im Gegensatz hierzu

konnte in den $St42Rag2^{-/-}$ -Mäusen, die abgesehen von den $E1A_{234-243}$ T-Zellen keine antigenspezifische Immunität aufbauen können, das Tumorstadium über 34 Tage verfolgt werden (Abb. 10A). Tumore mit einer Cox-2 Überexpression zeigten auch in diesem Versuch ein deutlich aggressiveres Wachstum als die Kontrolltumore, was durch eine Resistenz gegenüber den $Ad5E1A_{234-243}$ -spezifischen T-Zellen der $St42Rag2^{-/-}$ -Mäuse bedingt ist. Ab Tag 29 fand sich ein exponentielles Tumorstadium der $E1A$ -MEF-mmCox-2-Tumoren, so dass diese an Tag 36 im Mittel die zweifache Größe der $E1A$ -MEF-Tumore aufwiesen. Die $E1A$ -spezifischen T-Zellen der $St42Rag2^{-/-}$ -Mäuse konnten jedoch die Entwicklung von $E1A$ -MEF-Tumoren nicht verhindern, aber deren Wachstum deutlich verlangsamen.



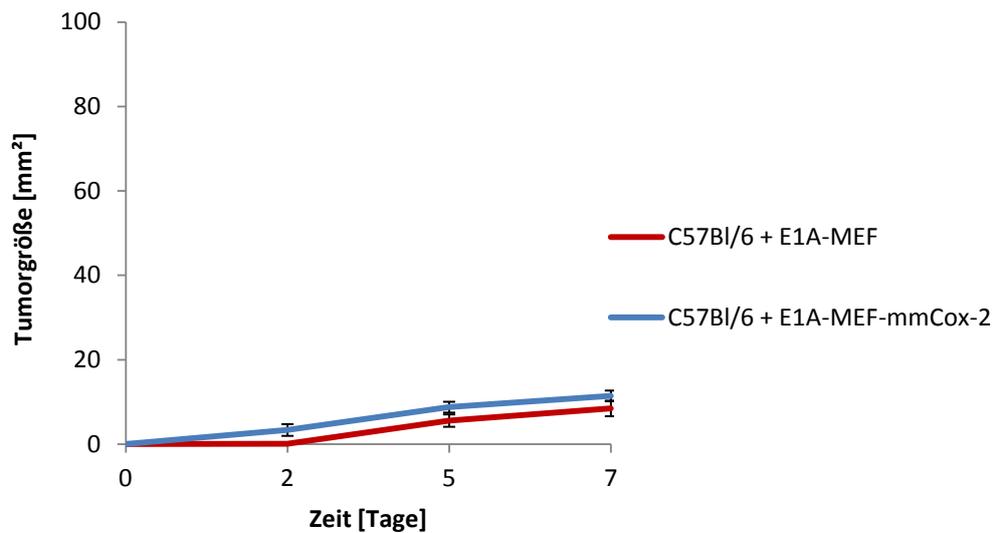


Abb. 10: Wachstum von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 in $St42Rag2^{-/-}$ und C57Bl/6 Mäusen.

(A) Tumorwachstum der E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 in $St42Rag2^{-/-}$ -Mäusen. Nach 30 Tagen nimmt die Größe der COX-2 Tumoren im Vergleich zu den parentalen Tumoren deutlich zu. Gezeigt werden die Mittelwerte, Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler (SEM) an.

(B) Das gleichmäßige Anwachsen der E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 wurde im C57Bl/6 Stamm verfolgt. Alle Tumore wurden durch das Immunsystem der Mäuse nach 2 Wochen eliminiert.

4.1.3. Funktionelle Analyse der Cyclooxygenase-2

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von hsCOX-2 und von mmCox-2 das klonogene Überleben von E1A-MEF nach Inkubation mit $ST42Rag2^{-/-}$ -Splenozyten *in vitro* verbessert und die Entstehung sowie das Wachstum von E1A-MEF-Tumoren *in vivo* fördert. COX-2 vermittelt in diesem Modell somit eine Resistenz gegenüber dem zytotoxischen Effekt antigenspezifischer T-Zellen. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob diese Immunresistenz an die katalytische Aktivität von COX-2 gekoppelt ist. COX-2 ist ein Enzym der Prostaglandinsynthese, das Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 oxidiert, welches wiederum durch die Prostaglandin-E-Synthase zu Prostaglandin E_2 (PGE_2) synthetisiert wird. Mit Hilfe eines Enzym-Immuno-Assays bestimmten wir die PGE_2 -Konzentration in Kulturüberständen von E1A-MEF und E1A-MEF, die hsCOX-2 oder mmCox-2 stabil exprimierten (Abb. 11A). Hierbei fand sich eine bis zu dreifach erhöhte PGE_2 -Konzentration in den Kulturüberständen von E1A-MEF mit heterologer COX-2-Expression. Die Freisetzung von PGE_2 in den Kulturüberstand konnte durch

Zugabe von Celecoxib, einem selektiven COX-2 Inhibitor (Penning et al. 1997), effektiv gehemmt werden (Abb. 11B).

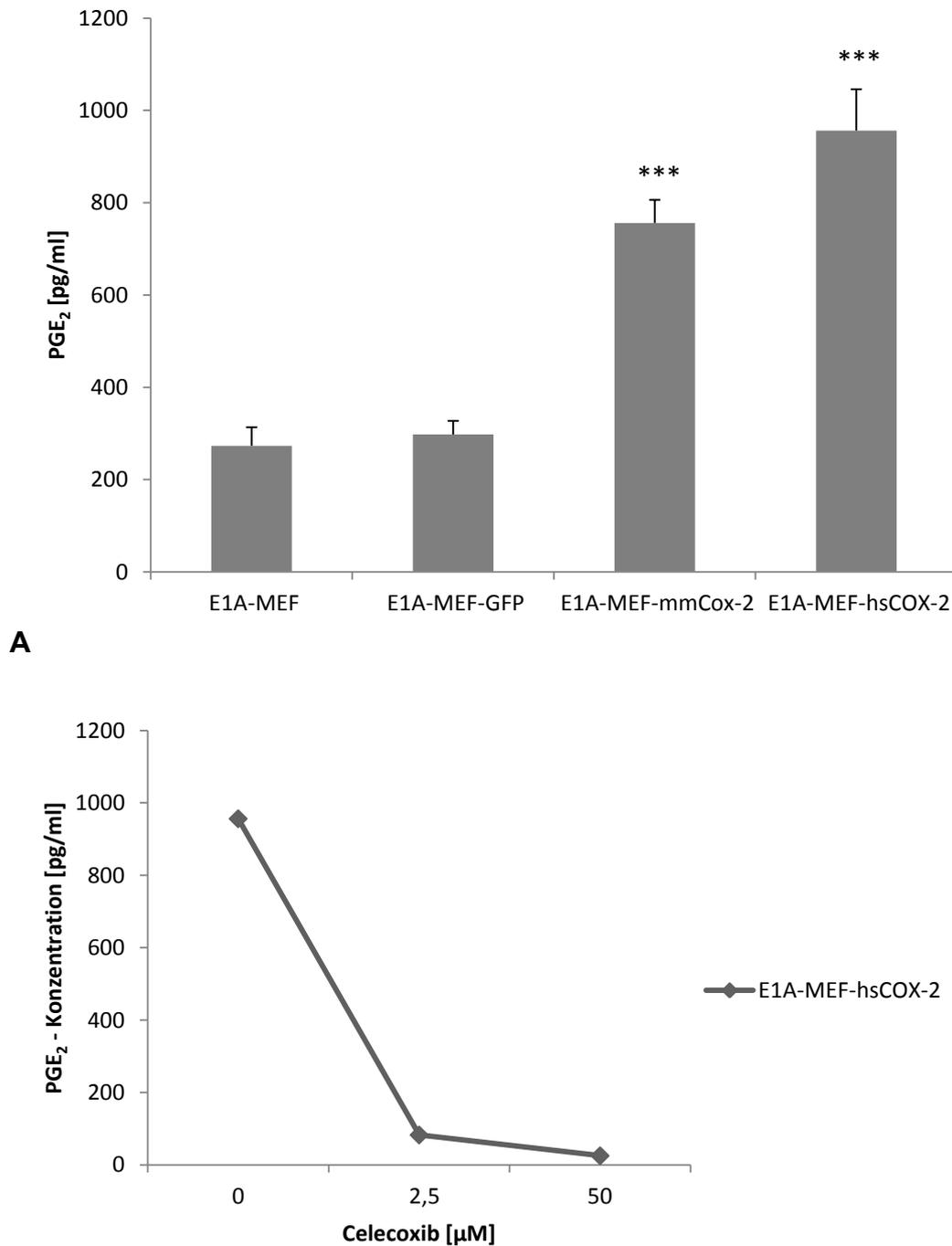


Abb. 11: Messung der PGE₂-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels Enzym-Immuno-Assay.

(A) Die Überexpression des murinen und humanen COX-2 Proteins führt zur 2,5 bis 3-fach erhöhten PGE₂ – Menge im Zellkulturmedium von E1A-MEF. Die in der Literatur beschriebene Cox-2 Mutante (Y371F) zeigte vergleichbare Mengen PGE₂ wie die COX-2 exprimierenden E1A-MEF. Gezeigt werden die Mittelwerte

von Triplikaten, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (**= $p < 0,01$).

(B) E1A-MEF-hsCOX-2 wurden für 24 Stunden mit dem spezifischen COX-2 Inhibitor Celecoxib in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und die PGE₂-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels EI-Assay gemessen. Bereits niedrig dosiert, konnte der Inhibitor das Enzym hemmen und die Produktion von PGE₂ deutlich reduzieren.

Im Folgenden untersuchten wir, ob die durch COX-2 vermittelte Immunresistenz gegenüber St42Rag2^{-/-}-Splenozyten durch Celecoxib aufgehoben werden kann. Dazu wurden E1A-MEF-mmCOX-2 und E1A-MEF-hsCOX-2 in der Anwesenheit von 2,5 μ M Celecoxib mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten ko-kultiviert. Trotz erfolgreicher Hemmung der PGE₂-Freisetzung (vgl. Abb. 11B) konnte keine Reduktion des klonogenen Überlebens von E1A-mmCox-2-MEF erreicht werden (Daten werden nicht gezeigt). In einem zweiten Versuch wurden die COX-2 exprimierenden E1A-MEF für 16 Stunden mit Celecoxib vorbehandelt und dann mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten ko-kultiviert. Die Celecoxib-Behandlung wurde während der Ko-Kultur fortgesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte zumindest ein leichter Rückgang der Kolonienzahl durch 2,5 μ M Celecoxib beobachtet werden (Abb. 12 untere Reihe). Auch dieser Versuch konnte die Frage, ob die durch COX-2 vermittelte Immunresistenz an die enzymatische Aktivität gekoppelt ist, nicht eindeutig beantworten. Aus diesem Grund wählten wir einen genetischen Ansatz.

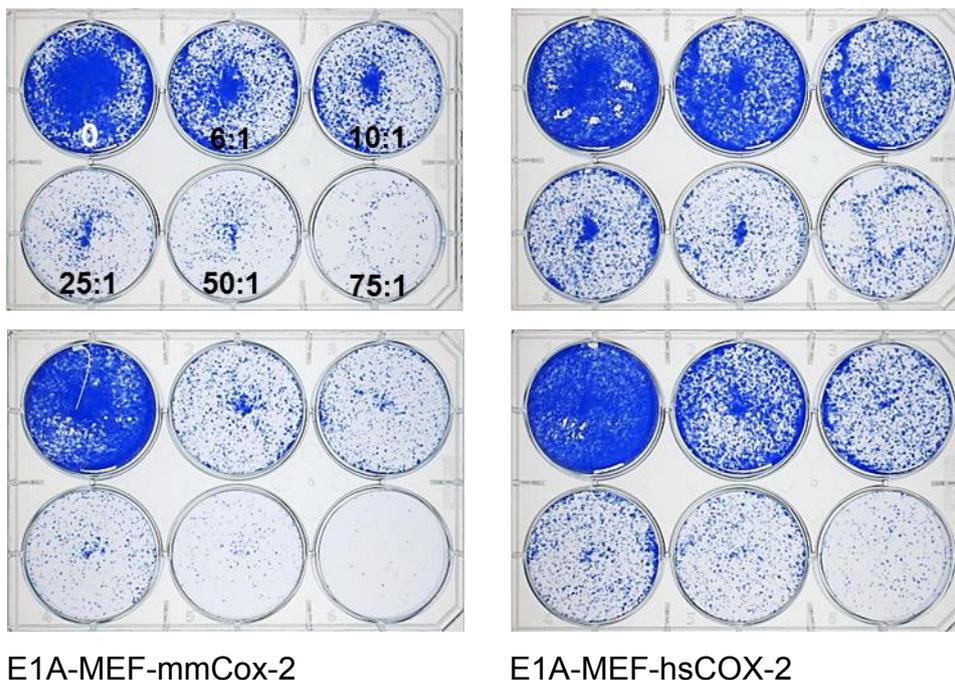
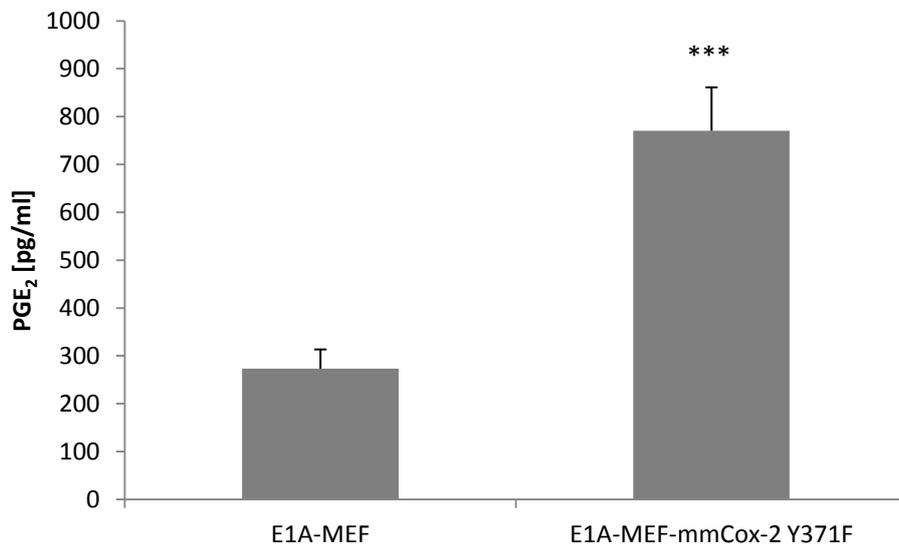


Abb. 12: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-mmCox-2 und E1A-MEF-hsCOX-2 mit und ohne Zugabe von Celecoxib.

Durch die Vorinkubation von COX-2 exprimierenden E1A-MEF mit 2,5 μ M Celecoxib für 16 Stunden und anschließender Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten, ebenfalls mit 2,5 μ M des COX-2 Inhibitors, konnte die Anzahl der überlebenden Kolonien gemindert werden (untere Reihe). Als Vergleich diente die Ko-Kultur ohne Celecoxib Zugabe (obere Reihe). Zahlen zeigen die E:T Ratio an.

4.1.3.1. Funktionelle Untersuchung katalytisch inaktiver COX-2-Mutanten.

Um zu prüfen, ob die durch COX-2 vermittelte T-Zell-Resistenz an die katalytische Aktivität gekoppelt ist, generierten wir eine Mutante der mmCox-2, bei der im ersten katalytischen Zentrum an Position 371 die Aminosäure Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt wurde (mmCox-2^{Y371F}) und exprimierten diese ebenfalls in E1A-MEF. Diese Mutante wurde als funktionell inaktiv beschrieben (Shimokawa et al., 1990; Tsai et al., 1998). Überraschenderweise zeigten Zellen mit heterologer Expression dieser Mutante eine deutlich erhöhte PGE₂-Konzentration im Vergleich zu den E1A-MEF (Abb. 13A). Des Weiteren zeigten E1A-MEF-mmCox-2^{Y371F} ein vermehrtes Kolonienwachstum und damit eine Resistenz gegenüber St42Rag2^{-/-}-Splenozyten (Abb. 13B).

**A**

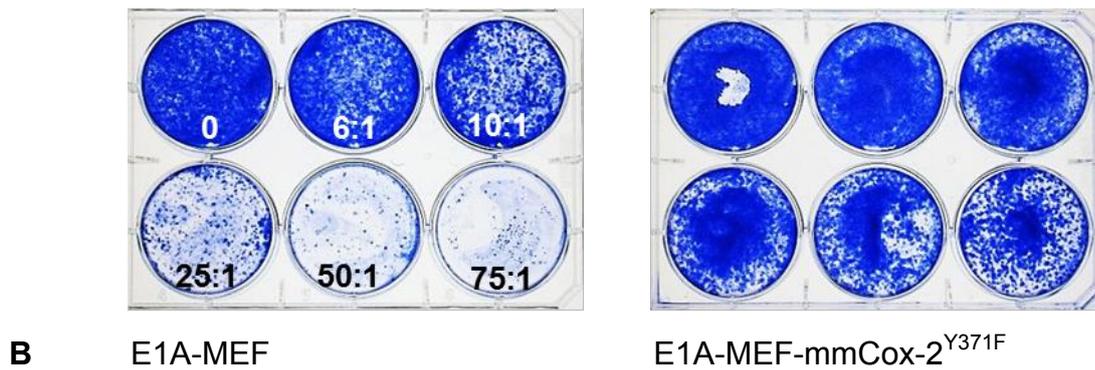


Abb. 13: Analyse der Mutante E1A-MEF-mmCox-2^{Y371F}.

(A) Prostaglandin E₂-Konzentration im Kulturüberstand von E1A-MEFmmCox-2^{Y371F} im Vergleich zu parentalen E1A-MEF.

(B) Klonogenes Überleben der COX-2 Mutante E1A-MEF-mmCox-2^{Y371F} nach Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Zahlen zeigen die E:T Ratio.

Das COX-2 Enzym verfügt über zwei enzymatische Zentren – die Cyclooxygenase und die Peroxidase. Wir generierten daher mittels zielgerichteter Mutagenese eine zweite mmCox-Mutante mit einem Aminosäureaustausch in der Peroxidasedomäne. Durch Austausch der Aminosäure Histidin an Position 374 gegen Glutamat änderten wir die Ladung der Seitenkette von basisch nach sauer. Wir generierten eine weitere Mutante, bei der Histidin an Position 374 durch Phenylalanin ersetzt wurde. Hierbei wird der polare aromatische Ring durch einen apolaren ersetzt. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 14A) und die mutante cDNA mittels retroviraler Vektoren in E1A-MEF stabil exprimiert und Populationen selektiert. Die resultierenden Zellpopulationen zeigten eine ebenso hohe Proteinexpression dieser Cox-2-Mutanten wie der wildtypischen mmCox-2 (Abb. 14B).

Reference Coordinates		1120	1130	1140	1150
▶ Translate	▶ Consensus	CTCTATCACTGGKNSCCCTGCTGCCCGACACCTTCAACATT			
NM_011198	mmCox-2 cds.SEQ(1>1815)	ctctatcactgg	cacc	ccctgctgccc	gacaccttcaacatt
▶ H374E	mmCOX-2 Mutation_R_3.seq(1>1068)	CTCTATCACTGG	GAGC	CCCTGCTGCCCG	ACACCTTCAACATT
▶ H374E	mmCOX-2 Mutation_L_3.seq(1>1095)	CTCTATCACTGG	GAGC	CCCTGCTGCCCG	ACACCTTCAACATT
▶ H374F	mmCOX-2 Mutation_R_3.seq(1>1080)	CTCTATCACTGG	ITCC	CCCTGCTGCCCG	ACACCTTCAACATT
▶ H374F	mmCOX-2 Mutation_L_3.seq(1>1097)	CTCTATCACTGG	ITCC	CCCTGCTGCCCG	ACACCTTCAACATT

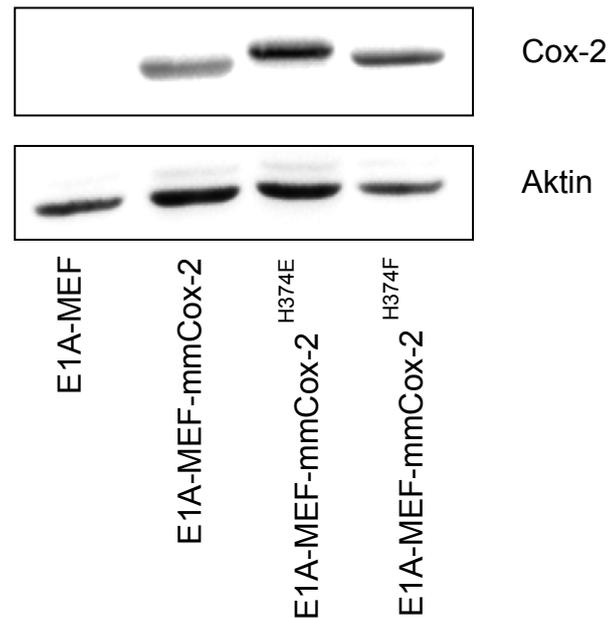


Abb. 14: Expression wildtypischer und mutanter mmCox-2 Proteine.

(A) Sequenzierungsergebnis nach zielgerichteter Mutagenese der murinen COX-2 cDNA. Die oberste Zeile zeigt die kodierende Sequenz der murinen COX-2 cDNA (accession number: NM_011198). Darunter die Sequenzierungsergebnisse der COX-2 cDNA mit den Mutationen H374E und H374F in sense- (grüne Pfeile) und antisense-Orientierung (rote Pfeile). In Rot eingrahmt ist der Bereich der Basensubstitutionen.

(B) Überprüfung der Proteinexpression von COX-2 in den generierten Mutanten mittels Immunoblotting. Die Aminosäuresubstitutionen H374E und H374F führten nicht zu einer Verminderung der COX-2 Expression verglichen mit den E1A-MEF mmCox-2. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin.

Als nächstes wurde überprüft, ob die oben beschriebenen Mutationen in der zweiten katalytischen Domäne der COX-2 zu einem Funktionsverlust mit reduzierter Freisetzung von PGE_2 führten. E1A-MEF mit Expression mutanter mmCox-2^{H374E} zeigten eine ähnliche hohe PGE_2 -Freisetzung wie E1A-MEF mit wildtypischer mmCox-2. Im Gegensatz hierzu war die PGE_2 -Freisetzung von E1A-MEF mit Expression mutanter mmCox-2^{H374F} deutlich reduziert (Abb. 15A). Die Enzymaktivität konnte somit durch den Austausch von Histidin 374 in Phenylalanin nahezu vollständig aufgehoben werden. Somit war nun ein Modell verfügbar, mit dessen Hilfe die Bedeutung der enzymatischen Aktivität von COX-2 für die Resistenz gegenüber antigenspezifischen T-Zellen untersucht werden konnte. In der Tat zeigten E1A- mmCox-2^{H374F}-MEF im Vergleich zu E1A-MEF-mmCox-2 ein deutlich reduziertes klonogenes Überleben nach Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten (Abb. 15B)

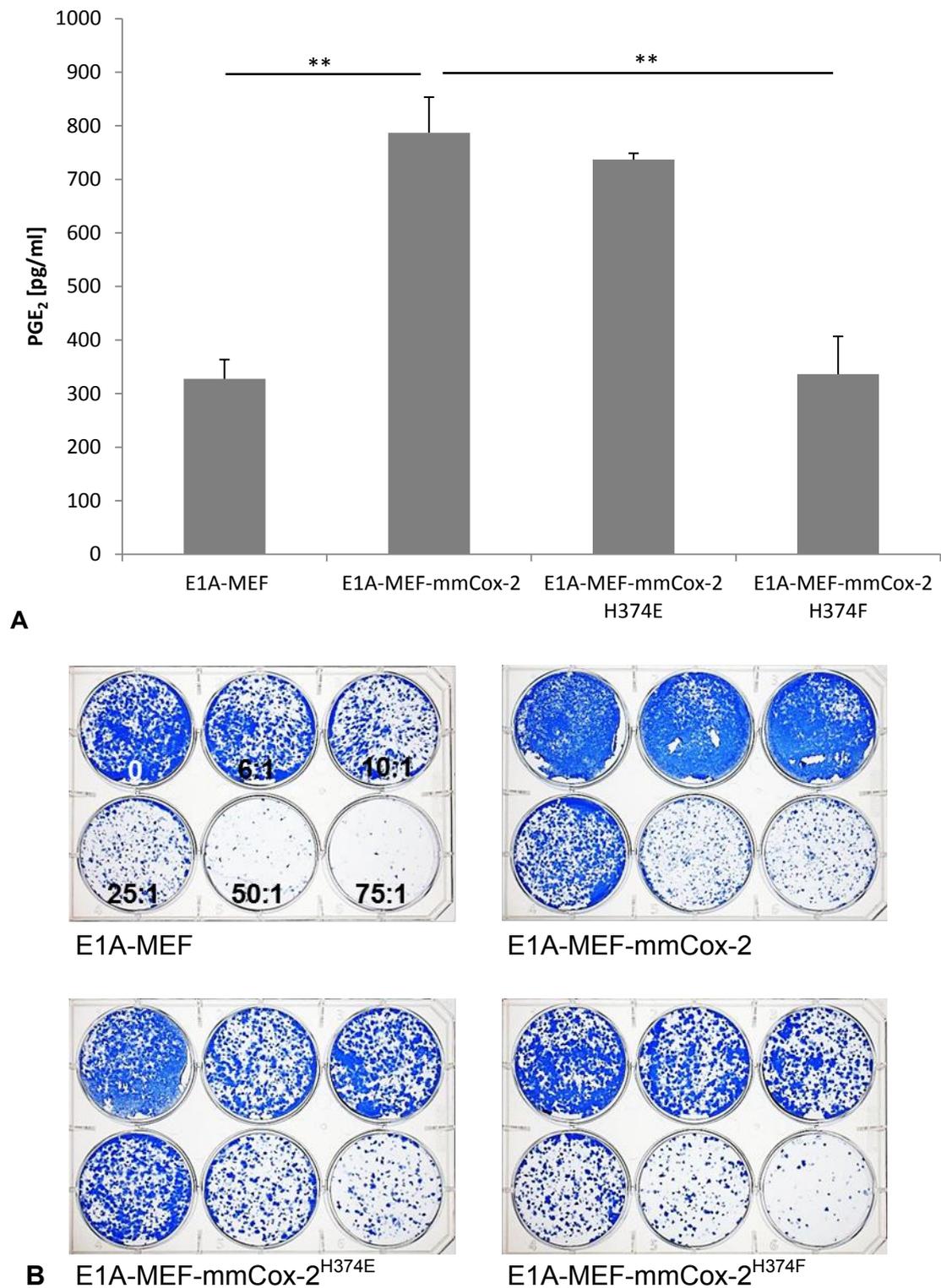


Abb. 15: Analyse der PGE₂-Sekretion und deren Einfluss auf das Überleben der Cox-2 Mutanten in der Ko-Kultur.

(A) PGE₂ Konzentrationen im Zellkulturüberstand der generierten Cox-2 Mutanten. Die gemessene PGE₂-Sekretion der E1A-MEF betrug 340 pg/ml, die der E1A-MEF-mmCox-2 790 pg/ml. E1A-MEF mit der H374E Mutation produzierten mit 740 pg/ml ähnlich hohe PGE₂-Mengen, wo hingegen die H374F Mutation mit 340 pg/ml

zu einer deutlich verminderten Sekretion führte. Gezeigt werden die Mittelwerte aus Triplikaten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken gekennzeichnet (** = $p < 0,05$).

(B) Klonogenes Überleben der Cox-2 Mutanten E1A-MEF-mmCox-2^{H374E} und E1A-MEF-mmCox-2^{H374F} im Vergleich zu parentalen und E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Die Cox-2 Mutante mit der H374F Substitution zeigt deutlich weniger überlebende Kolonien als E1A-MEF-mmCox-2.

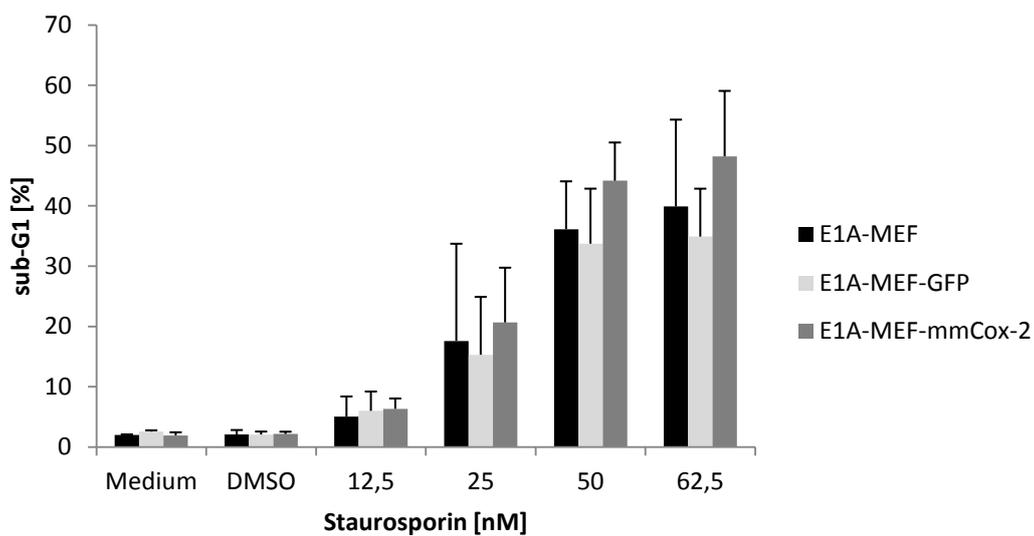
4.1.4 Untersuchung der COX-2 vermittelten Resistenz gegenüber pharmakologisch induzierter Apoptose

Um zu überprüfen, ob die Resistenz der COX-2 exprimierenden E1A-MEF gegenüber zytotoxischen T-Zellen mit einer generellen Resistenz gegenüber weiteren apoptotischen Stimuli einhergeht, wurden E1A-MEF mit verschiedenen Pharmaka inkubiert.

Zunächst wurde der Einfluss von Staurosporin auf E1A-MEF untersucht. Staurosporin ist ein Proteinkinaseinhibitor, der kompetitiv an die ATP-Bindestelle von Kinasen bindet und vermutlich durch die Aktivierung von Caspase-3 Apoptose induziert (Chae et al., 2000). In Abb. 16A wurden parentale E1A-MEF, E1A-MEF-GFP und E1A-MEF-mmCox-2 für 24 h mit verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen (12,5 – 62,5 nM) inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Medium und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte einen dosis abhängigen Anstieg der subgenomischen DNA-Zellfraktion. Es konnte jedoch kein signifikanten Unterschied zwischen den E1A-MEF und den COX-2 überexprimierenden E1A-MEF festgestellt werden.

Als weiterer apoptotischer Stimulus wurde Etoposid verwendet. Etoposidphosphat hemmt die Topoisomerase II, wodurch es während des Zellzyklus zu Doppelstrangbrüchen kommt, die letztendlich zum Zelltod führen (Pommier et al., 2010). Die mmCOX-2 exprimierenden E1A-MEF sowie Kontroll-E1A-MEF wurden mit verschiedenen Konzentrationen Etoposid (1,25 - 6,25 μ M) inkubiert. Nach 48 h wurde der Anteil der subgenomischen DNA-Zellfraktion mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der Anteil apoptotischer Zellen von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 war vergleichbar (Abb. 16B).

Das Spindelgift Paclitaxel wurde als dritter apoptotischer Stimulus verwendet. Paclitaxel stabilisiert die Mikrotubuli während der Zellteilung und verhindert die Trennung der beiden Tochterzellen. Als Konsequenz der unvollständigen Mitose wird in den Zellen Apoptose ausgelöst (Jordan and Wilson, 2004). Die Inkubation mit dem Spindelgift Paclitaxel erfolgte für 72 Stunden mit Konzentrationen zwischen 62,6 nM und 500 nM (Abb. 16C). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Die Werte für die apoptotische Zellfraktion lagen sowohl für die E1A-MEF als auch für die E1A-MEF-mmCox-2 konzentrationsabhängig zwischen 30% und 50%, es zeigte sich jedoch auch hier kein Unterschied zwischen den Zelllinien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von COX-2 in E1A-MEF nicht zu einer Resistenz gegenüber den hier untersuchten zytotoxischen Agenzien führt.

**A**

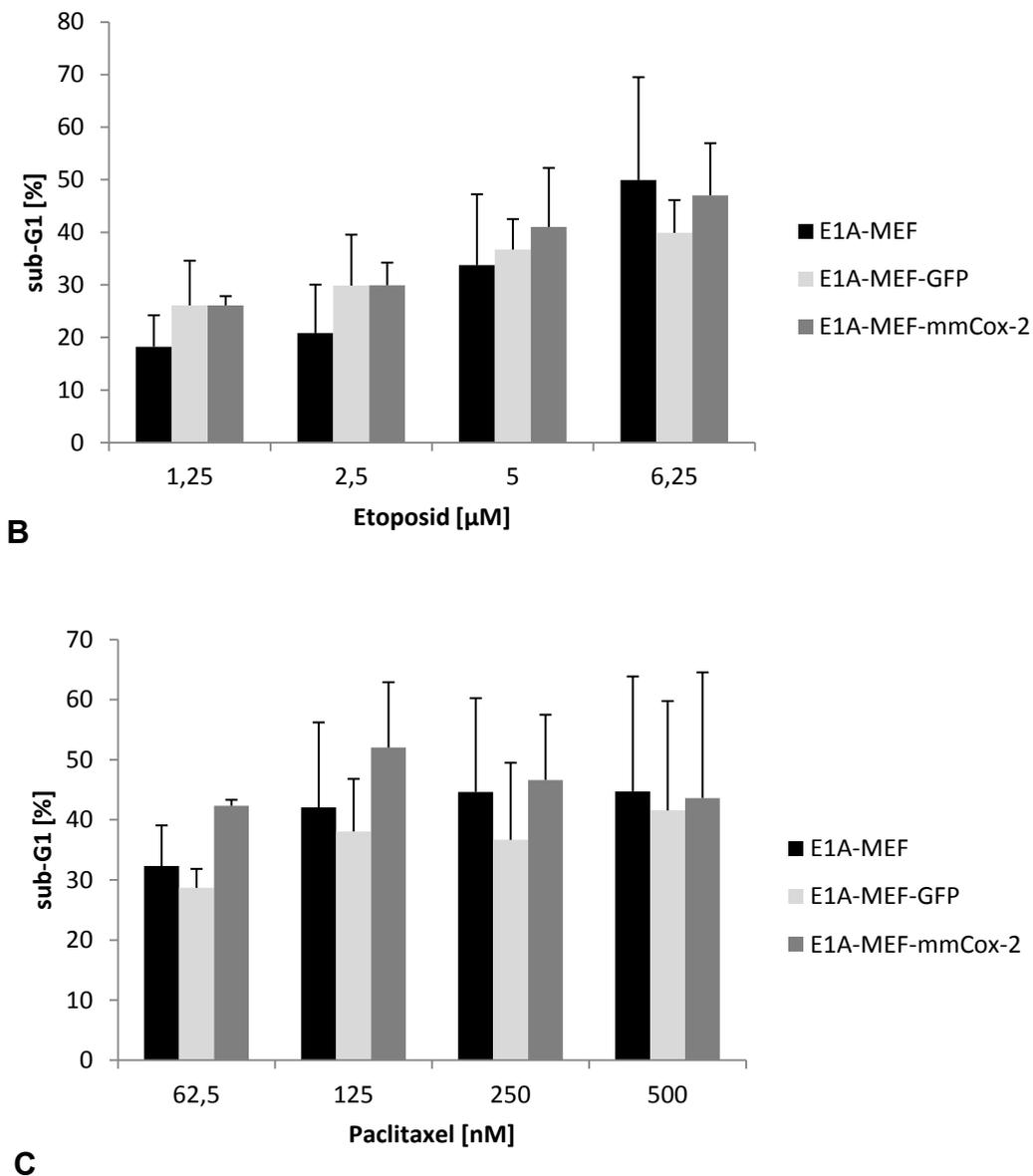


Abb. 16: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellfraktion mit subgenomischer DNA nach Induktion von Apoptose in E1A-MEF.

(A) Inkubation für 24h mit Staurosporin, (B) 48h mit Etoposid und (C) 72h mit Paclitaxel. Dargestellt sind Mittelwerte, Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

4.1.5. Untersuchung einer COX-2 vermittelten Resistenz gegenüber UV- Bestrahlung

Neben zytotoxischen Substanzen können auch ultraviolette (UV-) Strahlen Zelltod induzieren. Die energiereiche Strahlung mit Wellenlängen zwischen 100 und 400 nm verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA sowie die Formation von Thymidin-Dimeren, wodurch Apoptose in den Zellen induziert wird (Doniger et al.,

1981). Daher überprüften wir in einem weiteren Experiment, ob die COX-2 Überexpression in E1A-MEF zu einem verminderten Zelltod nach UV-Bestrahlung führt. E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 wurden mit UV-c-Dosen zwischen 1 und 5 mJ bestrahlt und der Anteil apoptotischer Zellen mittels Propidiumjodid-Färbung im Durchflusszytometer ermittelt (Abb. 17). Dabei zeigte sich eine Dosis-abhängige Korrelation zwischen dem Anteil toter, PI-positiver Zellen und der Energie der Bestrahlung. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 festgestellt werden. Die E1A-MEF-mmCox-2 schienen sogar etwas sensibler gegenüber UV-c-Strahlung und zeigten eine leicht erhöhte Anzahl von positiv gefärbten Zellen. Abschließend kann festgestellt werden, dass die vermehrte Expression von COX-2 in E1A-MEF weder zu einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Agenzien noch gegenüber UV-Strahlung führt.

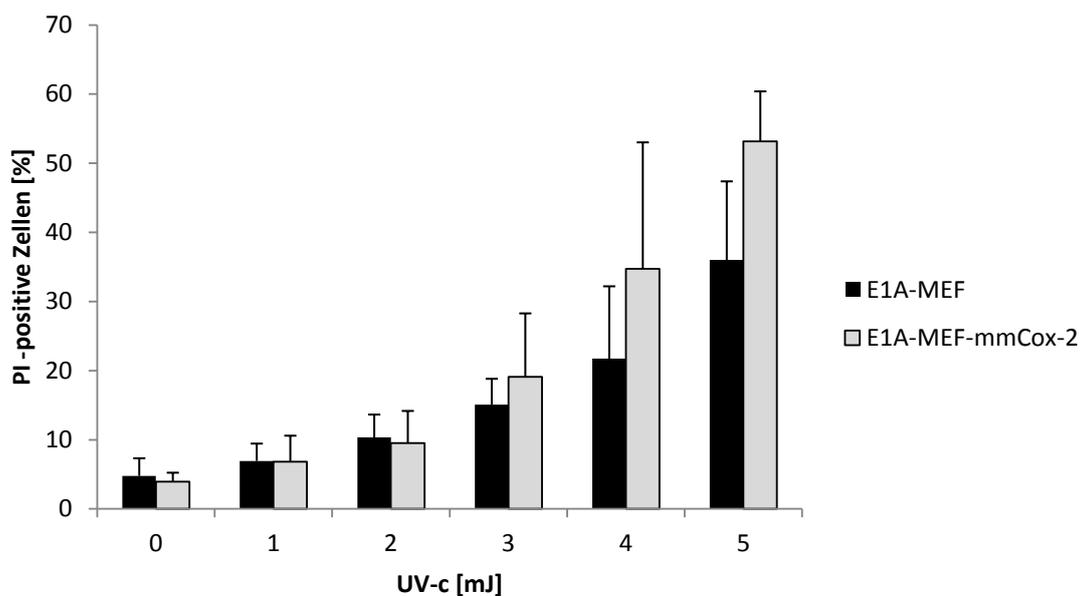


Abb. 17: Induktion von Apoptose in E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in verschiedenen Dosen.

Ausplattierte Zellen wurden mit UV-Dosen von 1-5 mJ bestrahlt und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt. Der Anteil der positiv gefärbten Zellfraktion wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte, Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

4.1.6. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die E1A-Peptidpräsentation

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die erhöhte COX-2 Expression zwar einen klonogenen Überlebensvorteil gegenüber der Zytotoxizität

von ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten bietet, jedoch keine Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Agenzien oder UV-Bestrahlung vermittelt. Daher gehen wir davon aus, dass COX-2 in unserem System keinen Einfluss auf zellintrinsische, anti-apoptotische Signalwege hat und nur eine spezifische Resistenz gegenüber zytotoxischen T-Zellen vermittelt. Dieser Mechanismus sollte mit Untersuchungen zu der Interaktion zwischen E1A-MEF und St42Rag2^{-/-}-Splenozyten näher charakterisiert werden.

Zunächst untersuchten wir ob eine Überexpression des COX-2 Proteins sich negativ auf die Oberflächendistribution des MHC-Klasse I Moleküls (*Major Histocompatibility Complex*) I Moleküls H2-D^b – in dessen Kontext das E1A-Peptid präsentiert wird – auswirkt. Eine verminderte MHC-Klasse I Expression verringert auch eine E1A-Peptidpräsentation und damit die Erkennungsmöglichkeit durch St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Um dies zu klären, wurde die Expression des Antigens H2-D^b auf der Zelloberfläche von E1A-MEF, E1A-MEF-mmCox-2 sowie die beiden COX-2 Mutanten mit einem spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper im Durchflusszytometer quantifiziert. Es wurde der Anteil an H2-D^b positiven Zellen in den COX-2 exprimierenden Zelllinien bestimmt und ins Verhältnis zu parentalen E1A-MEF gesetzt. Abb. 18 zeigt, dass die Anzahl H2-D^b – positiver Zellen in den COX-2 Zelllinien im Vergleich zu den parentalen Zellen mit ca. 80% zwar etwas niedriger, aber nicht signifikant vermindert ist. Die vermehrte COX-2 Expression hat damit nur einen geringen Einfluss auf Prozessierung und Oberflächendistribution des MHC-Klasse I Moleküls.

In einem weiteren Experiment beluden wir E1A-MEF-mmCox-2 vor der Ko-Kultur mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten mit exogenem E1A-Peptid (Abb. 19). Hiermit wollten wir eine gegebenenfalls durch COX-2-Expression verminderte Antigenprozessierung und –präsentation ausgleichen. Es fand sich jedoch keine Änderung der Resistenz Peptid-beladener E1A-MEF-mmCox-2. Daraus lässt sich schließen, dass eine fehlende Peptidpräsentation nicht die Ursache für die Resistenz der E1A-MEF-mmCox-2 ist.

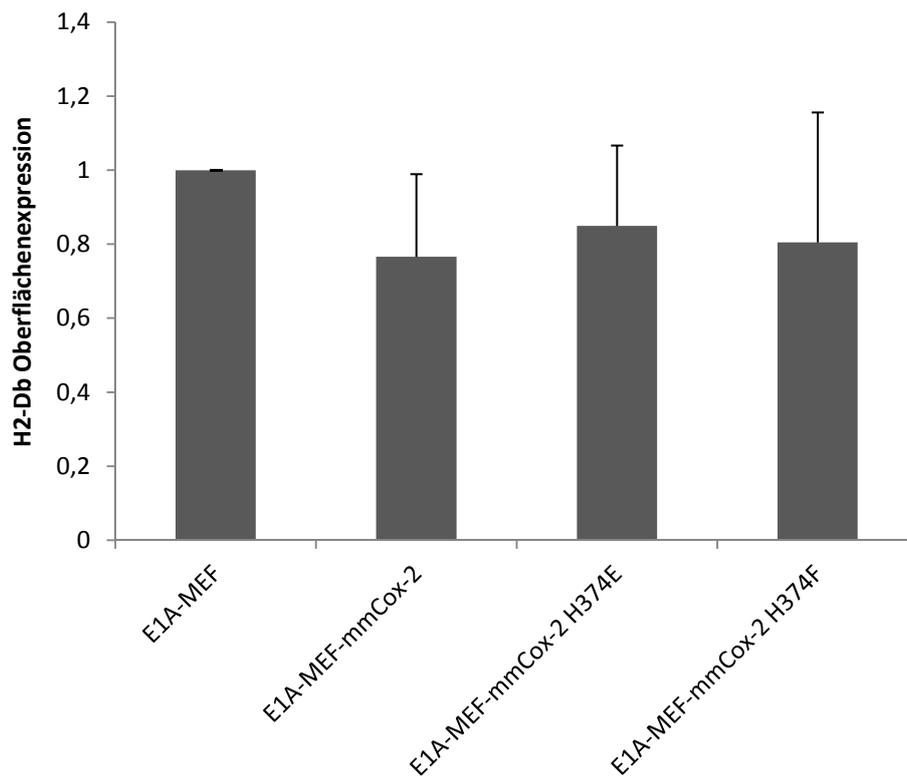


Abb. 18: Oberflächenexpression des MHC Klasse I Moleküls H2-D^b auf E1A-MEF.

Gemessen wurde der Anteil der H2-D^b exprimierenden Zellen am Durchflusszytometer. Die Oberflächenexpression des H2-D^b – Moleküls auf den verschiedenen Cox-2 E1A-MEF wurde ins Verhältnis zu der Expression der parentalen E1A-MEF gesetzt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung.

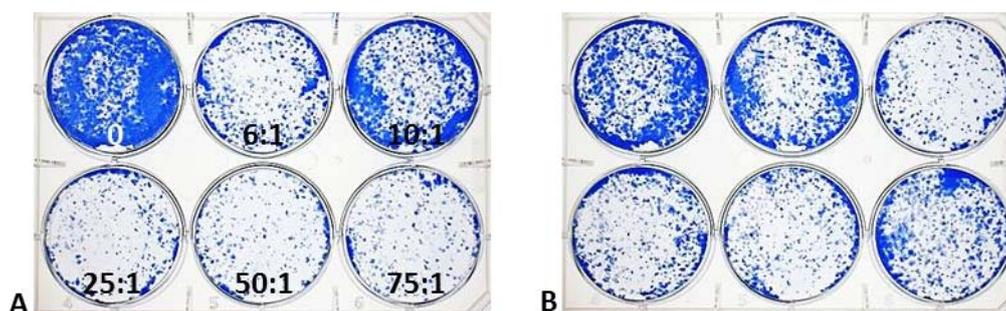


Abb. 19: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit E1A-Splenozyten mit und ohne vorherige Peptidbeladung.

(A) E1A-MEF-mmCox-2 wurden für 24 Stunden mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten inkubiert, überlebende Zellen in 6-Well Platten überführt und nach 5 Tagen fixiert und gefärbt. (B) E1A-MEF-mmCox-2 wurden vor der Ko-Inkubation für 1,5 Stunden mit dem E1A-Peptidantigen (Sequenz: SGPSNTPPEI) (500 µg/ml) beladen. Die Anzahl der überlebenden Kolonien ließ sich dadurch nicht verringern, was darauf schließen lässt, dass die COX-2 Überexpression nicht die Peptidpräsentation im H2-D^b-Kontext beeinflusst. Zahlen zeigen die E:T-Ratio an.

4.1.7. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die Aktivierung von CD8⁺, TCR-transgenen T-Zellen

Eine weitere mögliche mechanistische Erklärung für die COX-2-vermittelte Resistenz könnte sein, dass die erhöhte PGE₂-Sekretion einen Einfluss auf die Interaktion von Tumor- und T-Zelle hat. Um dies zu prüfen, isolierten wir CD8-positive T-Zellen aus der Splenozytenpopulation von St42Rag2^{-/-}-Mäusen mittels Negativselektion unter Verwendung des CD8a⁺ T Cell Isolation Kits und dem MACS-System. Die CD8-positiven, TCR-transgenen T-Zellen wurden für 1, 2 und 3 Stunden mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 ko-kultiviert und die Oberflächenexpression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 und CD107a durchflusszytometrisch bestimmt. CD69 ist ein Oberflächenantigen, welches in der Frühphase nach Antigenkontakt durch T-Zellen exprimiert wird und als ko-stimulatorisches Molekül wirkt. Es kann bereits innerhalb einer Stunde, nachdem der T-Zellrezeptor-Komplex gebildet wurde, detektiert werden (Ziegler et al., 1994). TCR-transgene T-Zellen wurden im Verhältnis von 25:1 mit E1A-MEF bzw. E1A-MEF-mmCox-2 inkubiert und nach 1, 2 und 3 Stunden durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 20). Im Vergleich zur CD69-Expression von TCR-transgenen CD8⁺ ZTL nach Inkubation mit E1A-MEF (Werte normalisiert auf 100%) fand sich keine systematische Verminderung der CD69-Expression nach Ko-Kultur mit E1A-MEF-mmCox-2. Zwar fanden sich zu den einzelnen Zeitpunkten diskrete Unterschiede in der CD69-Expression, die jedoch nicht statistisch signifikant waren.

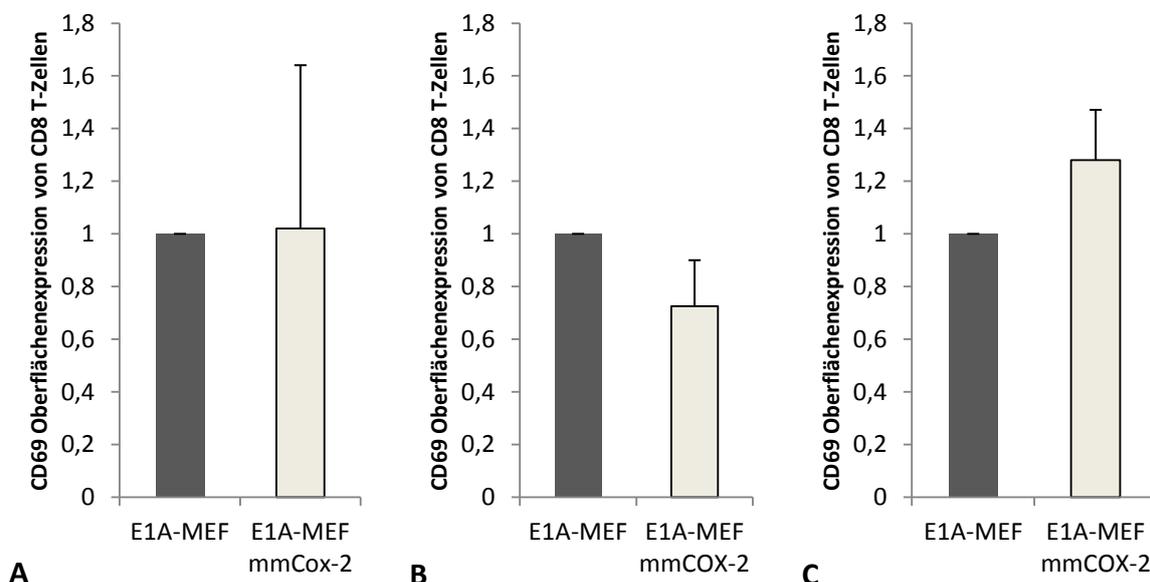


Abb. 20: Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD69 auf CD8⁺, TCR-transgenen T-Zellen nach Ko-Inkubation mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2.

(A) Inkubation für 1 Stunde, (B) 2 Stunden und (C) 3 Stunden. Anschließend wurde die CD69 Expression der TCR-transgenen T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Als zweiten T-Zellaktivierungsmarker untersuchen wird die Expression von CD107a. Dabei handelt es sich um ein lysosomales Glycoprotein, auch LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) genannt, welches sich auf der Innenseite von Vesikeln befindet, die mit Perforin und Granzymen gefüllt sind. Nach Aktivierung zytotoxischer T-Zellen verschmelzen die Granzym/Perforin-haltigen Vesikel mit der Zellmembran der T-Zelle und werden freigesetzt. Dadurch treten auch die membranständigen Proteine von der Innenseite der Vesikel an die Zelloberfläche und können im „*Degranulation Assay*“ detektiert werden (Betts et al., 2003). In Abb. 21 ist die durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD107a auf TCR-transgene CD8⁺ T-Zellen nach 1-3 stündiger Ko-Kultur mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 gezeigt. Über diesen Zeitraum war keine veränderte CD107a-Expression nach Inkubation mit COX-2 überexprimierenden MEF festzustellen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass COX-2-exprimierende Tumorzellen in gleicher Weise wie COX-2-negative Tumorzellen antigenspezifische zytotoxische T-Zellen aktivieren können. Die COX-2-vermittelte Immunresistenz ist somit nicht durch eine Störung der Aktivierung CD8-positiver T-Zellen bedingt.

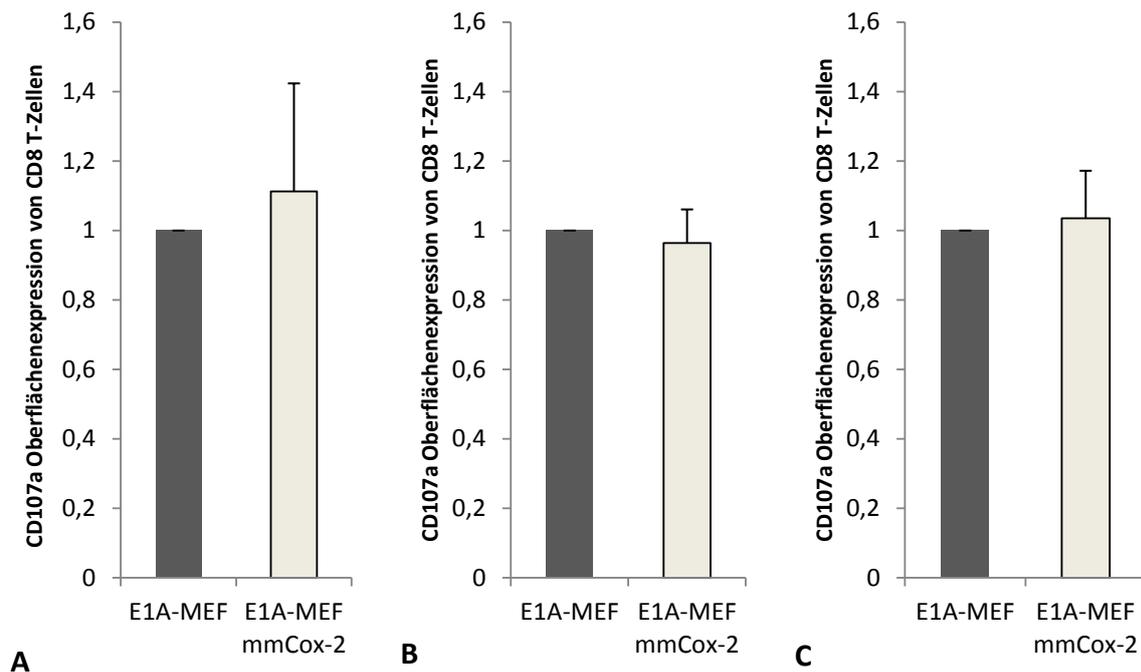


Abb. 21: Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD107a auf CD8⁺, TCR-transgenen T-Zellen nach Ko-Inkubation mit E1A-MEF und E1A-MEF mmCox-2.

(A) Inkubation der Targetzellen mit E1A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 1 Stunde, (B) 2 Stunden und (C) 3 Stunden. Nach der Inkubation wurden die TCR-transgenen T-Zellen mit einem CD107a-spezifischen Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung.

4.1.8. Untersuchung der COX-2 Überexpression auf die IFN-gamma-Sekretion von ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten

Die lokale Sekretion von Interferonen (IFN) ist ein weiterer Effektormechanismus antigenspezifischer T-Zellen. Man unterscheidet zwischen Typ I-Interferonen, wie IFN-alpha und -beta, und Typ II-Interferonen, wie IFN-gamma. Insbesondere IFN-gamma wird eine Rolle bei der T-Zell-vermittelten Tumorabstoßung zugesprochen (Kaplan et al., 1998; Xu et al., 1998). Vor diesem Hintergrund untersucht wird, ob die Expression von COX-2 und/oder die Freisetzung von PGE₂ von Tumorzellen einen Einfluss auf die Sekretion von IFN-gamma durch ko-kultivierte, TCR-transgene zytotoxische T-Zellen hat.

Wir ko-kultivierten E1A-MEF bzw. E1A-MEF-mmCox-2 mit St42Rag2^{-/-}-Splenozyten und gewannen nach 24 Stunden Zellkulturüberstände, in denen wir die Konzentration von IFN-gamma mittels ELISA bestimmten. Die Konzentration von IFN-gamma stand

in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der im Experiment eingesetzten TCR-transgenen Splenozyten. Es fand sich eine Reduktion der Freisetzung von IFN-gamma durch TCR-transgene Splenozyten um ca. 700 pg bei einem E:T Verhältnis von 75:1 nach Ko-Kultur mit Cox-2 exprimierenden E1A-MEF. Die IFN-gamma-Konzentration war damit um bis zu 50% reduziert im Vergleich zur Ko-Kultur mit E1A-MEF (Abb. 22).

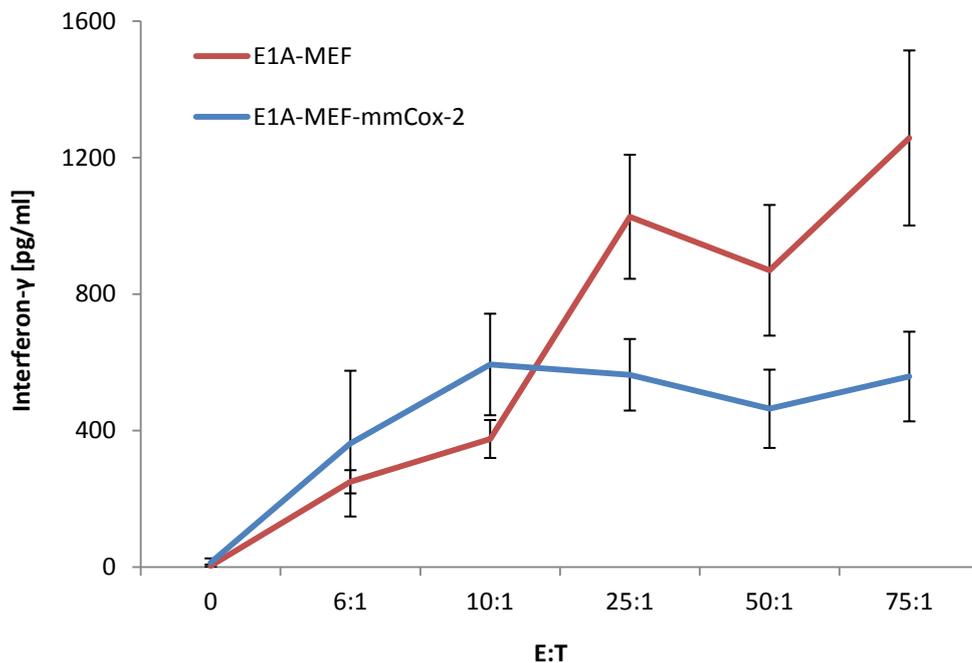


Abb. 22: IFN-gamma-Sekretion von TCR-transgenen ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2.

Die IFN-gamma-Konzentration wurde nach 24-stündiger Ko-Inkubation bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM).

Somit konnten wir zeigen, dass die Expression von COX-2 durch Tumorzellen eine Verminderung der IFN-gamma-Sekretion durch Antigen-aktivierte T-Zellen nach sich zieht. Um zu prüfen, ob dieser Mechanismus der COX-2-vermittelten Immunresistenz antigenunabhängig ist, untersuchten wir ein weiteres Antigen-T-Zell-Rezeptorsystem. Als Effektoren verwendeten wir transgene p14 T-Zellen, die einen TCR mit Spezifität für das Glykoprotein-Peptid gp₃₃₋₄₁ des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) im H-2D^b Kontext exprimieren (Ohashi et al., 1991). Als Zielzellen

verwendeten wir wiederum E1A-MEF und E1A-COX-2-MEF, die wir vor der Ko-Kultur mit p14 ZTL mit dem gp₃₃₋₄₁ Antigenpeptid beluden. Es zeigte sich wiederum eine deutliche Reduktion des tumorsuppressiven Effekts der antigenspezifischen CTL gegenüber COX-2-exprimierende Tumorzellen (Abb. 23A).

Anschließend wurde die IFN-gamma-Sekretion der p14 Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 betrachtet. Dazu wurde die IFN-Konzentration in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden Ko-Kultur gemessen. Wie in Abb. 23B dargestellt, sekretieren die p14 Splenozyten ebenfalls weniger IFN-gamma, wenn sie mit COX-2 exprimierenden Zellen ko-inkubiert werden, wobei die Reduktion um ca. 200 pg/ml bei einem Verhältnis von 75:1 deutlich geringer ist als in den ST42Rag2^{-/-} Splenozyten.

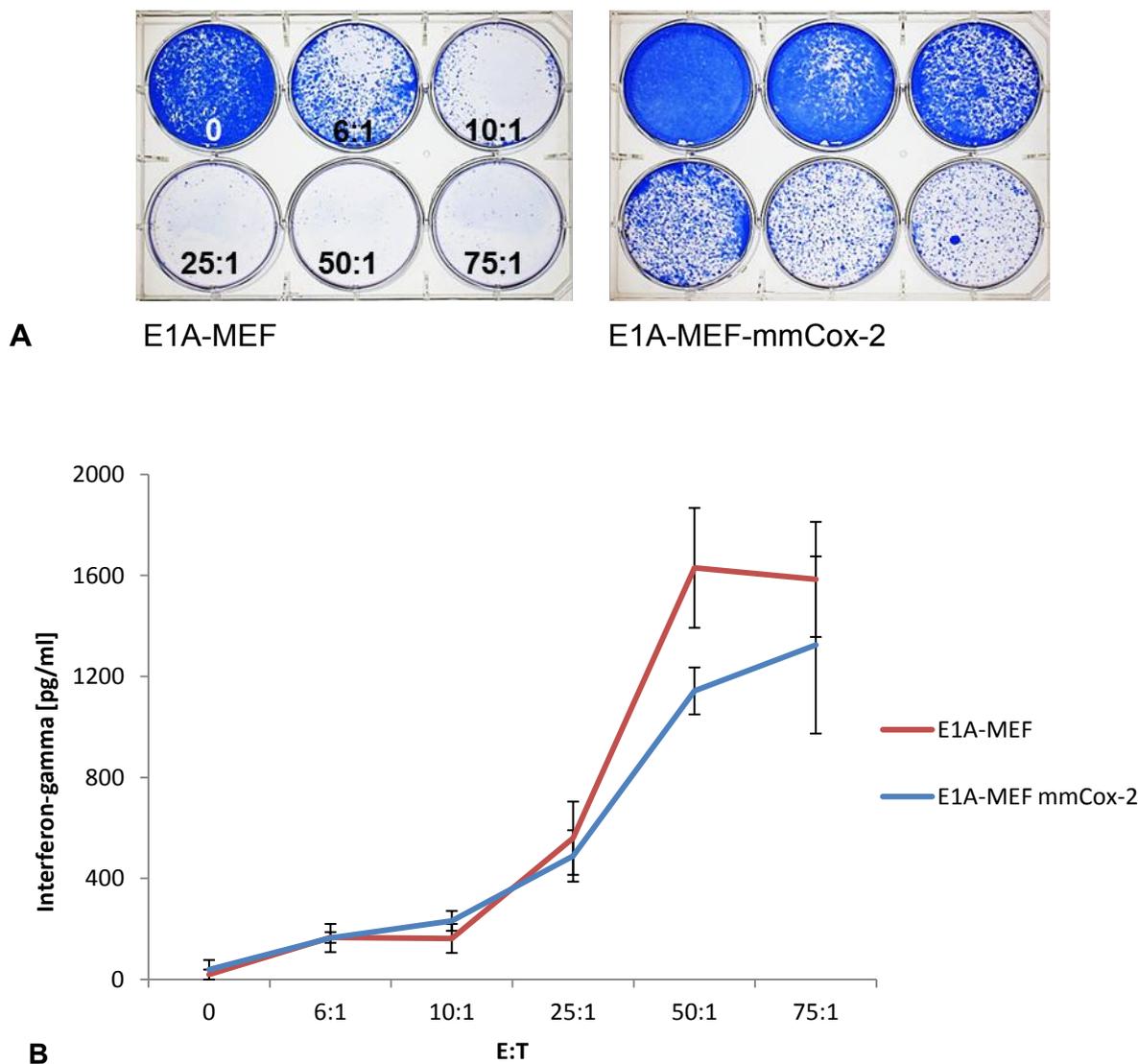


Abb. 23: Einfluss der COX-2 Expression von E1A-MEF auf p14 Splenozyten

(A) Klonogenes Überleben von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit p14 Splenozyten. Die Zielzellen wurden mit dem Antigenpeptid gp33-41 beladen und für 24 Stunden mit p14 Splenozyten kokultiviert. Zahlen zeigen die E:T Ratio.

(B) IFN-gamma Sekretion von p14 Splenozyten nach 24-stündiger Ko-Kultur mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM).

4.1.9. Die Zugabe von exogenen IFN-gamma überwindet die Immunresistenz von COX-2-exprimierenden Tumorzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte COX-2 Expression in E1A-MEF zu einer verminderten IFN-gamma-Sekretion von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten führt, sollte geklärt werden, ob diese Einflussnahme auf den IFN-gamma vermittelten Apoptoseweg der Grund für die Resistenz dieser Zellen ist. Entsprechend untersuchten wir, ob durch die Zugabe von exogenem IFN-gamma die Immunresistenz von E1A-MEF-mmCox-2 aufgehoben werden und das klonogene Überleben nach Ko-Kultur mit TCR-transgenen ZTL vermindert werden kann. Dazu ko-kultivierten wir E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten und IFN-gamma (2 - 200 ng/ml). Anschließend wurden die überlebenden Kolonien gezählt und auf die Anzahl an Kolonien in Abwesenheit von IFN-gamma normalisiert. Die steigenden Konzentrationen von exogenem IFN-gamma korrelierten mit der verminderten Anzahl an überlebenden Kolonien (Abb. 24). Dadurch konnte gezeigt werden, dass zum einen IFN-gamma ein wichtiger Faktor in der durch St42Rag2^{-/-}-Splenozyten vermittelten Apoptose ist und zum anderen, dass mit Hilfe der exogenen Zugabe von IFN-gamma die Resistenz von COX-2 exprimierenden Tumorzellen gegenüber TCR-transgenen ZTL gemindert werden kann.

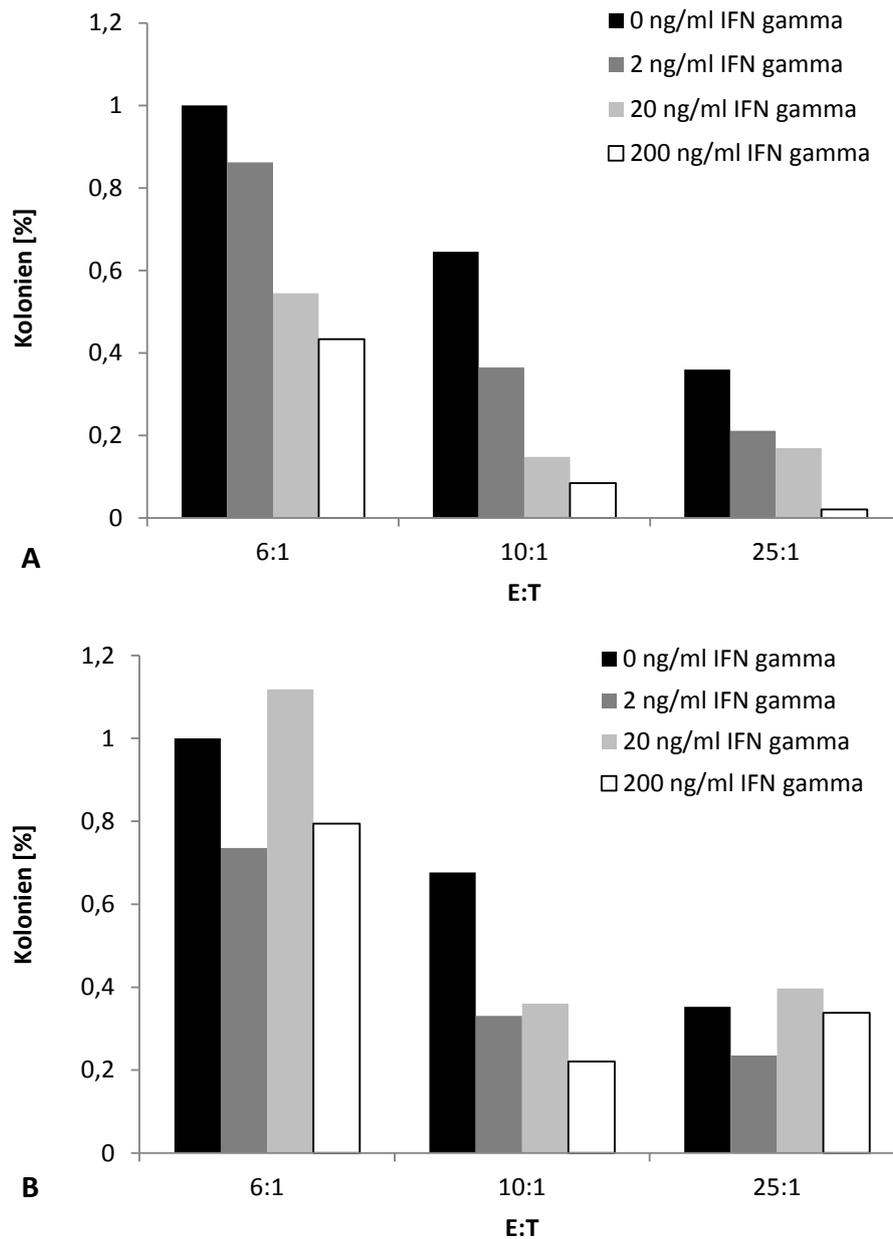
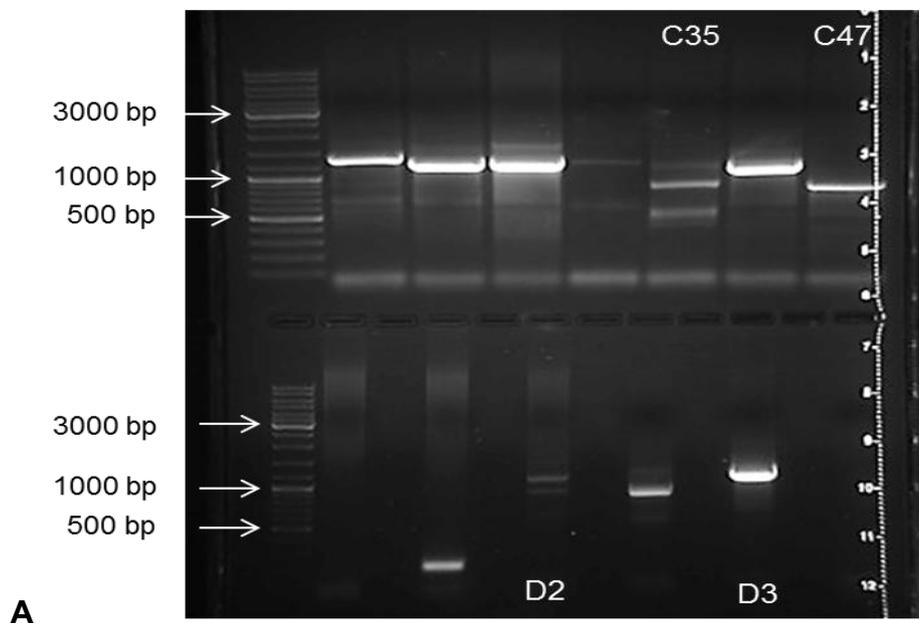


Abb. 24: Klonogenes Überleben von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten und Zugabe von exogenem IFN-gamma.

Kolonieanzahl von E1A-MEF(A) und E1A-MEF-mmCox-2 (B) nach Ko-Kultur mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten und exogenem IFN-gamma. Die Anzahl der Kolonien wurde auf die Koloniezahl in Abwesenheit von IFN-gamma normalisiert. x-Achse zeigt die E:T Ratio.

4.2. Identifikation und Validierung weiterer tumorzellintrinsischer Mediatoren von Immunresistenz

Der zweite Teil dieser Arbeit hatte zur Aufgabe weitere Resistenzfaktoren gegenüber T-Zell-vermittelter Tumorsuppression zu identifizieren. Hierfür wurde die oben beschriebene (vergl. Einleitung) retrovirale cDNA-Bank verwendet und stabil in E1A-MEF exprimiert. Anschließend wurden diese E1A-MEF in einem Verhältnis von 25:1 mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten ko-kultiviert. Überlebende, GFP-positive Klone wurden isoliert und expandiert. Um die Klone hinsichtlich ihrer Resistenz zu überprüfen, wurden sie ein zweites Mal mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten ko-kultiviert. Aus diesen validierten, immunresistenten Klonen wurde die genomische DNA isoliert, um die Vektor-kodierte cDNA-Sequenz zu bestimmen. Dies erfolgte mittels PCR und Sanger-Sequenzierung der Amplikons unter Verwendung vektorspezifischer Primer (vergl. Methoden) (Abb. 25). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des „*Basic local alignment tools*“ (BLAST) analysiert. Von den so identifizierten Kandidatengen priorisierten wir eEF1B δ und RPS9 und führten sie einer weiteren zellbiologischen Validierung zu.



Klonname	Resistenz	PCR Fragment	inserierte cDNA
A6	++	1300bp	chromosome 16 contig
A7	+		
A9	++	1200bp	

B5	+	1200bp	kein Sequenzierungsergebnis
C5	+	1000bp, 1200bp	
C22	+	(+)	
C35	+	900bp, 500bp	Ribosomal Protein S9, chromosome 19 contig
C47	(+)	900bp	Ribosomal Protein S9
D2	+	1200bp	Eukaryotic Elongation Faktor 1 delta
D3	++	1200bp	Eukaryotic Elongation Faktor 1 delta
D4	+	900bp	chromosome 12 contig

Abb. 25: Identifizierung neuer, Resistenz vermittelnder Kandidatengene.

(A) Agarosegelelektrophorese der mittels PCR isolierten cDNA-Fragmente aus resistenten E1A-Klonen. Die PCR-Produkte der identifizierten Resistenzgene wurden markiert.

(B) Auflistung der sequenzierten PCR-Produkte.

4.2.1. Stabile Expression von RPS9 und eEF1B δ in E1A-MEF

Zunächst wurden die cDNA Sequenzen der beiden Kandidatengene mit Hilfe des oben beschriebenen retroviralen Vektorsystems stabil in E1A-MEF exprimiert. Die Transgenexpression prüften wir mittels Immunoblotting. Abb. 26A zeigt eine deutliche Überexpression des Elongationsfaktors in E1A-MEF-EF1B δ im Gegensatz zu der endogenen Expression der parentalen Fibroblasten. Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers diente die humane Lungenkarzinomzelllinie A549.

Eine Überexpression des Ribosomalen Proteins S9 konnte mittels Immunoblot nicht dargestellt werden, da kein geeigneter Antikörper für die Unterscheidung zwischen muriner und humaner Variante kommerziell erhältlich war. Als Nachweis der Expression des Transgens wurde die Anzahl der transkribierten mRNA mittels qPCR gemessen. Wie in Abb. 26B zu erkennen, ist in der revers transkribierten mRNA von E1A-MEF-RPS9 eine hohe Anzahl von humanen RPS9-Transkripten nachweisbar, die sich in der Kontrollzellpopulation nicht finden.

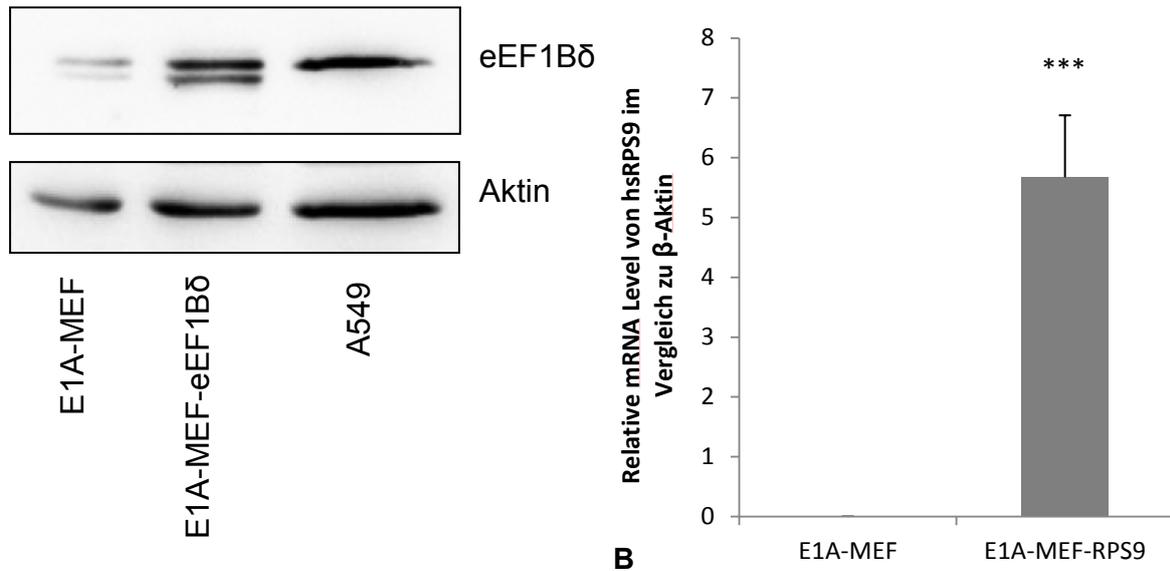


Abb. 26: Stabile Expression des eukaryotischen Elongationsfaktors 1Bδ und des humanen ribosomalen Proteins S9 in E1A-MEF.

(A) Immunoblot zur Überprüfung der Expression von eEF1Bδ in E1A-MEF. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von β-Aktin.

(B) Relative mRNA-Expression von humanen RPS9-Transkripten in E1A-MEF und E1A-MEF-RPS9 im Vergleich zu β-Aktin. Dargestellt sind Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (***) = $p < 0,01$).

4.2.2. Einfluss der transgenen Expression von RPS9 oder eEF1Bδ durch Tumorzellen auf deren klonogenes Überleben nach Ko-Kultur mit antigenspezifischen, TCR-transgenen ZTL

Im Anschluss an die stabile Expression untersuchten wir den Einfluss von RPS9 und EF1Bδ auf die Immunresistenz gegenüber antigenspezifischen TCR-transgenen T-Zellen. Dazu ko-kultivierten wir E1A-MEF-EF1Bδ bzw. E1A-MEF-RPS9 mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Es zeigte sich eine deutliche Resistenz und eine höhere Koloniezahln der E1A-MEF-EF1Bδ und E1A-MEF-RPS9 im Vergleich zu parentalen E1A-MEF (Abb. 27).

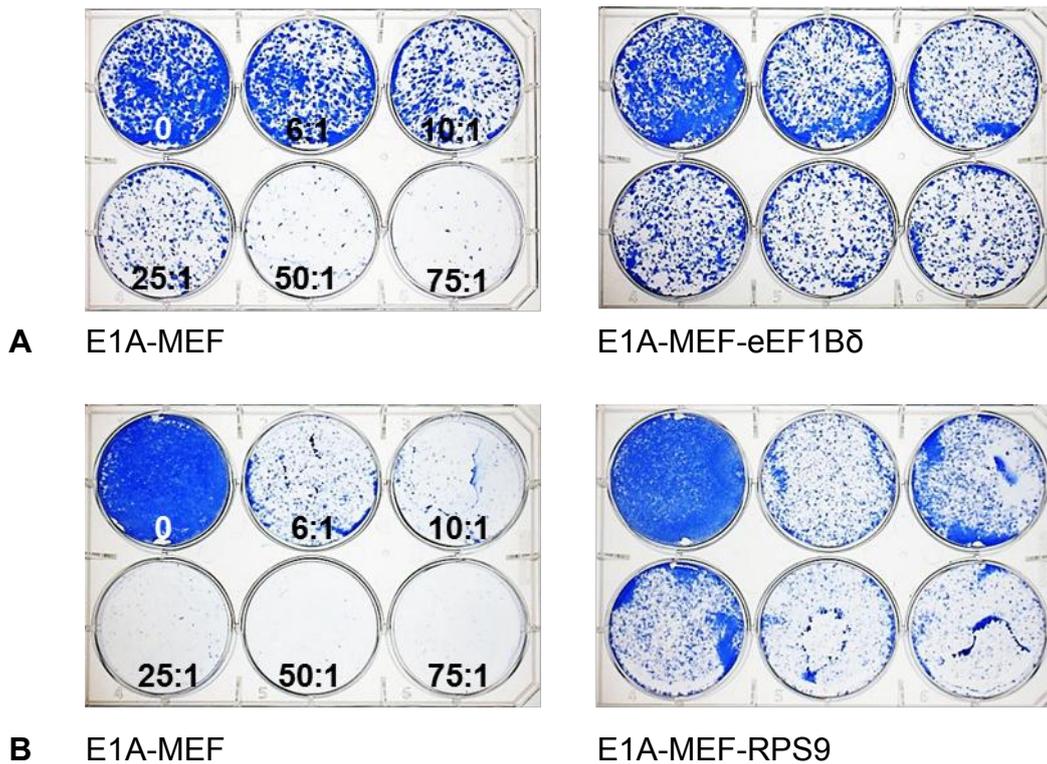


Abb. 27: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-RPS9 nach Ko-Kultur mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten.

Kolonien von E1A-MEF-EF1B δ (A) und E1A-MEF-RPS9 (B) im Vergleich zu parentalen E1A-MEF. Zahlen zeigen die E:T-Ratio an.

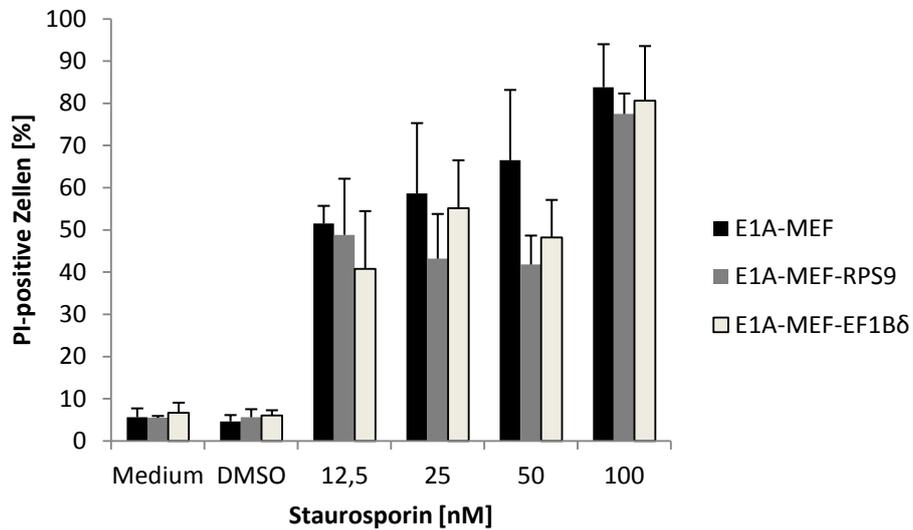
4.2.3. Untersuchung der Resistenz von E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-RPS9 gegenüber zytotoxischen Substanzen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von EF1B δ oder RPS9 zu einer Resistenz gegenüber zytotoxischen T-Zellen führt, untersuchten wir im Folgenden, ob diese Faktoren auch Resistenz gegenüber weiteren apoptotischen Stimuli vermitteln.

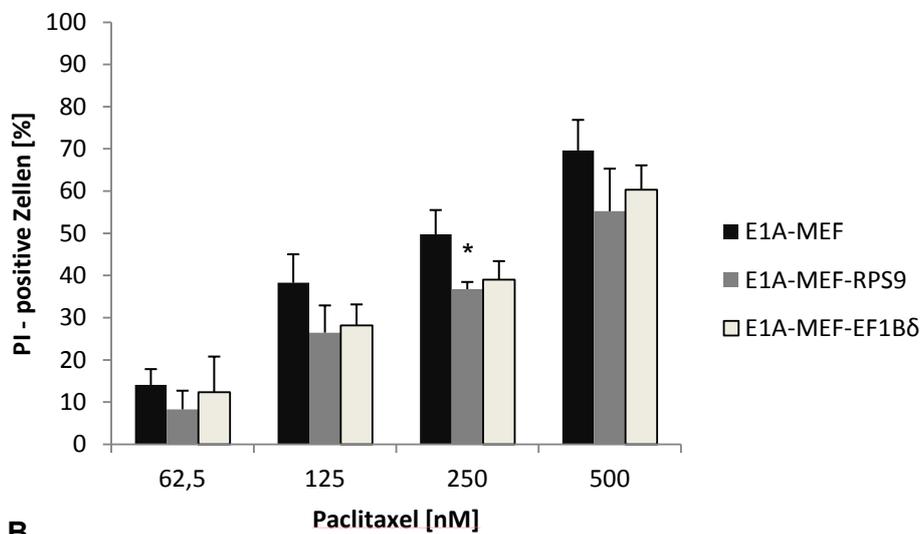
Zunächst wurden die parentalen E1A-MEF sowie die E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B δ für 24 Stunden mit verschiedenen Staurosporin-Konzentrationen (12,5 - 100 nM) inkubiert (Abb. 28A). Als Kontrolle diente die Inkubation mit Medium und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte einen leicht verminderten Anteil der subgenomischen DNA-Zellfraktion in den E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B δ , der jedoch nicht signifikant war.

In einem weiteren Experiment inkubierten wir E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B δ für 48 bzw. 72 Stunden mit Paclitaxel (Abb. 28B und 28C). Die Werte

für die apoptotischen Zellfraktionen von E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B δ waren signifikant vermindert, so dass zusammenfassend festgestellt werden kann, dass die Expression dieser Faktoren zu einer Resistenz gegenüber Paclitaxel führt.



A



B

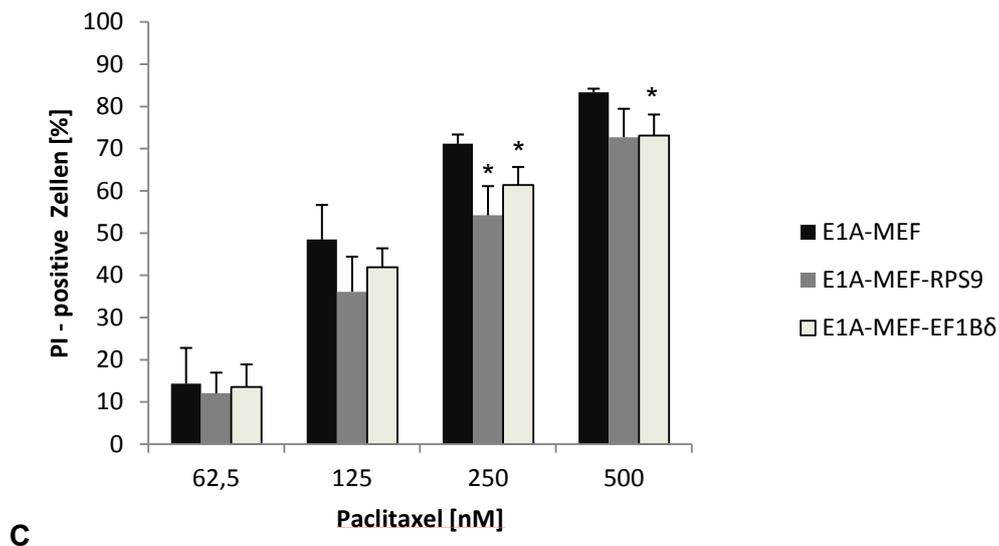


Abb. 28: Induktion von Apoptose in E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ.

(A) Inkubation für 24 Stunden mit Staurosporin, (B) Inkubation für 48 Stunden mit Paclitaxel und (C) Inkubation für 72 Stunden mit Paclitaxel. Der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation wurde am Durchflusszytometer bestimmt. Die Apoptosewerte der korrespondierenden Mediumkontrollen wurden in Abb. (B) und (C) bereits von den Werten subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwerte, Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an (* = $p < 0,1$).

4.2.4. Untersuchung des Einflusses der Expression von eEF1Bδ oder RPS9 auf die Sensitivität von E1A-MEF gegenüber UV-Strahlung

In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob die Expression von RPS9 und EF1Bδ auch Resistenz gegenüber ultravioletter Strahlung vermittelt. Dazu wurden E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ mit UV-c-Dosen zwischen 1 und 5 mJ bestrahlt, nach 24 Stunden mit Propidiumjodid inkubiert und der Anteil an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abb. 29 zu sehen ist, sind die Apoptoseraten von E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ vergleichbar mit denen der parentalen E1A-MEF. Bei höheren UV-Dosen von 4 und 5 mJ lag die Anzahl der apoptotischen Zellen sogar leicht über denen der E1A-MEF. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vermehrte Expression des ribosomalen Proteins und des Elongationsfaktors 1Bδ nicht zu einer Resistenz gegenüber der Bestrahlung mit UV führt.

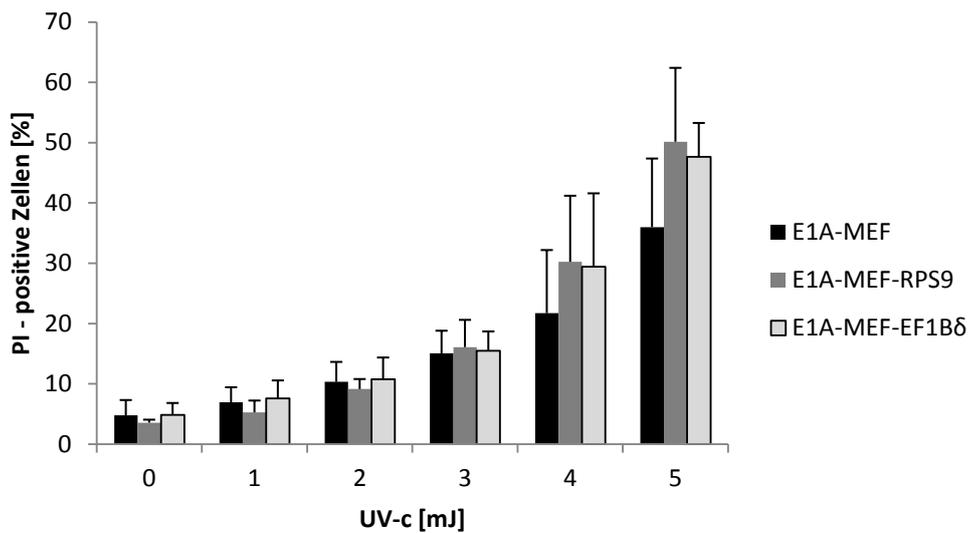


Abb. 29: Induktion von Apoptose in E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B5 durch Bestrahlung mit UV in verschiedenen Dosen.

Gezeigt ist der Anteil an apoptotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation nach Bestrahlung mit UV-c. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.2.5. Einfluss der Expression von eEF1B5 oder RPS9 auf die MAPK- und PI3K-Signalwege

Für Brustkrebszelllinien wurde bereits beschrieben, dass die Alpha-Untereinheit des eukaryotischen Elongationsfaktors mit der phosphorylierten Form von Akt interagiert. Die Depletion von EF1 α mittels RNA-Interferenz führte zu einer verminderten Expression von pAkt (Pecorari 2009). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs unter anderem zu einer vermehrten Expression von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren führt (Ruggero, 2003). Daher haben wir untersucht, welchen Einfluss eine Überexpression des ribosomalen Proteins S9 und des Elongationsfaktors 1B5 auf den PI3K-Signalweg bzw. auf die Phosphorylierung von Akt hat.

Zunächst untersuchten wir die Expression und Phosphorylierung von Akt in E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1B5 (Abb. 30). Es fand sich jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen kein Unterschied im Nachweis von Aktivierungsmarkern des PI3K-Signalwegs. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss auf den MAPK-Signalweg. Zellen mit heterologer Expression von eEF1B5 und RPS9 zeigten eine erhöhte Expression der Phosphoepitope Thyrosin 202 und Thyrosin 204 von ERK. Dies kann

auf eine gesteigerte konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch Expression von EF1B δ oder RPS9 hinweisen.

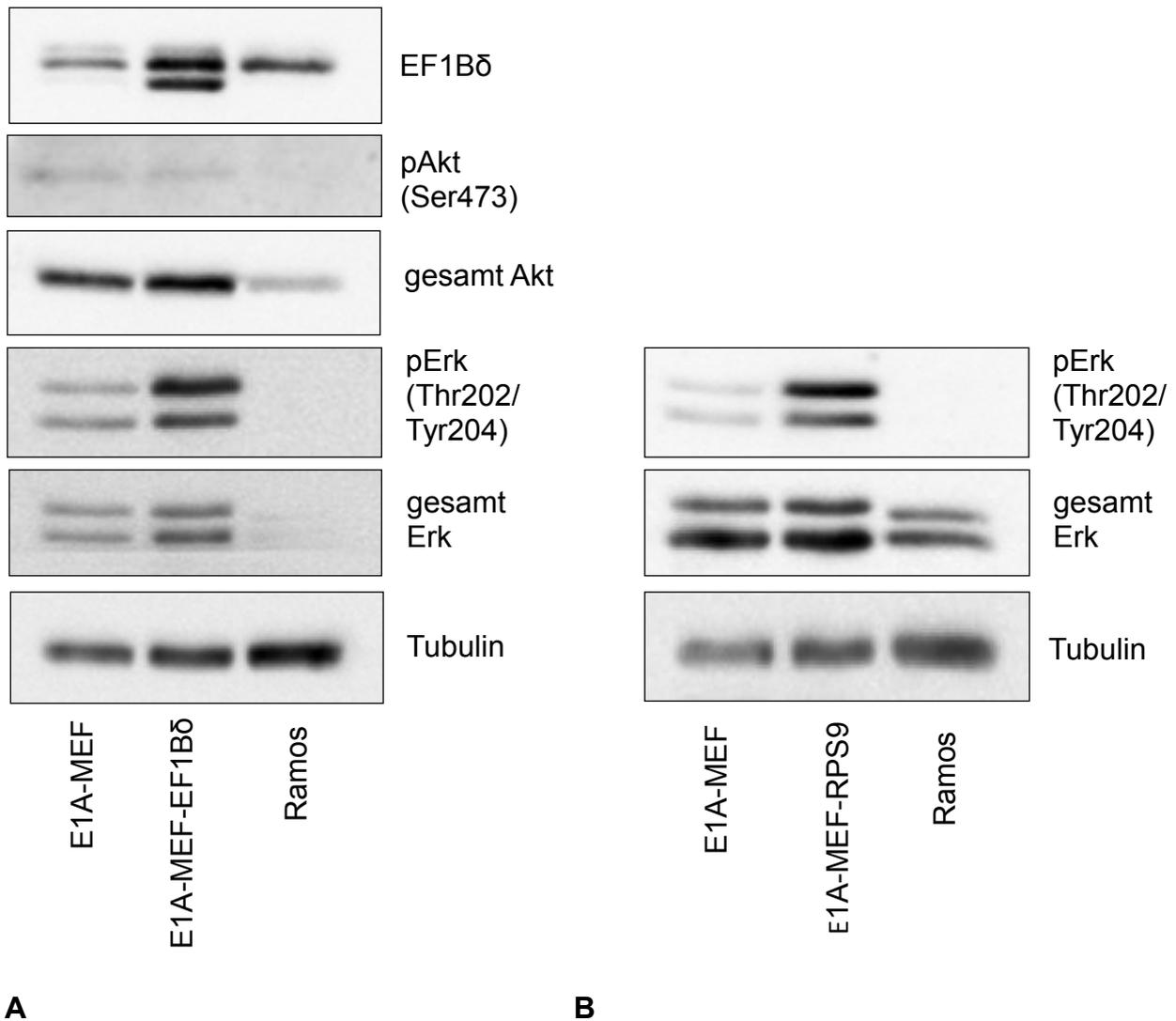


Abb. 30: Überprüfung der Aktivierung der MAPK- und PI3K-Signalwege mittels Immunoblotting.

Die Expression von eEF1B δ (A) und RPS9 (B) führt zur Phosphorylierung der Thyrosine 202 und 204 des Erk-Proteins. Eine Phosphorylierung von Akt (Ser473) konnte nicht festgestellt werden. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

4.2.6. Untersuchung der IFN-gamma Sekretion von ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-RPS9

Als nächstes prüften wir, ob die Expression des ribosomalen Proteins S9 oder des Elongationsfaktors 1B δ in Tumorzellen einen Einfluss auf die IFN-gamma Sekretion von ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten hat. Dazu wurden die E1A-MEF-EF1B δ und E1A-MEF-

RPS9 für 24 Stunden zusammen mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten inkubiert und anschließend die Konzentration von IFN-gamma im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Dabei zeigte sich, dass die E1A-MEF-RPS9 die Sekretion von IFN-gamma leicht, aber nicht signifikant verminderten (Abb. 31). Die Expression von EF1Bδ in E1A-MEF hatte keine Auswirkung auf die IFN-gamma Sekretion der St42Rag2^{-/-}-Splenozyten.

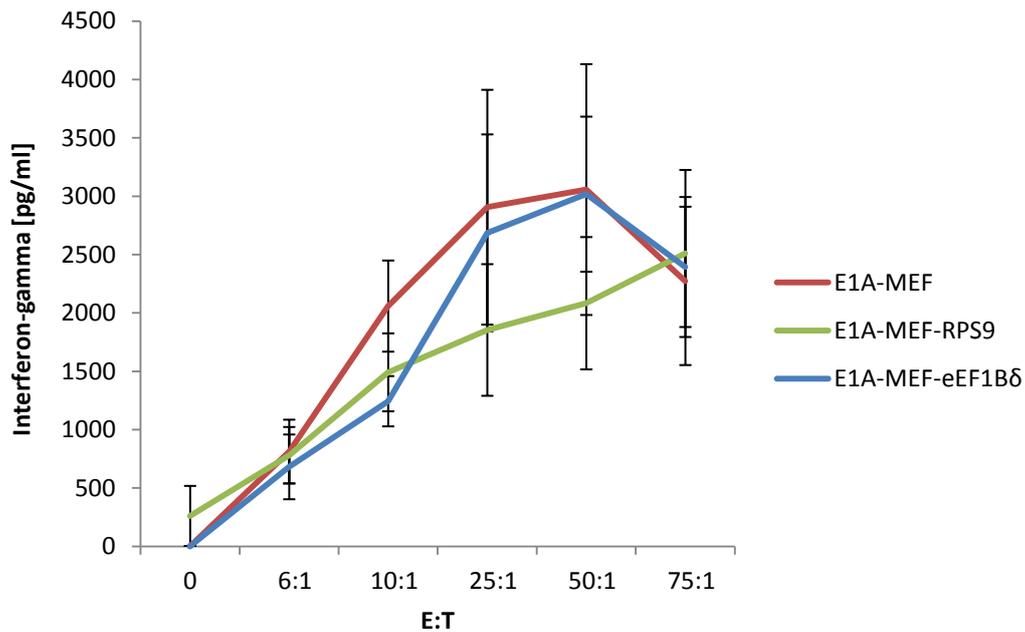


Abb. 31: IFN-gamma Sekretion von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ. Messung der IFN-gamma Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Ko-Inkubation von E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ mit ST42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Gezeigt sind Mittelwerte (± SEM).

5. Diskussion

5.1. COX-2

Die unterschiedlichen Strategien von Krebsimmuntherapien bieten zahlreiche Möglichkeiten, Patienten mit Tumorerkrankungen zu behandeln. Die allogene Blutstammzelltransplantation und die Infusion von Spenderlymphozyten bietet eine effektive Therapie für Patienten mit bestimmten Formen von Leukämien und Lymphomen, für die ein geeigneter, HLA-kompatibler Spender zur Verfügung steht (Kolb et al., 1995; Aggarwal and Pittenger, 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anwendung von monoklonalen Antikörpern, welche gegen spezifische Zielstrukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen gerichtet sind. Antikörper gegen Wachstumsfaktorrezeptoren können die Rezeptor-vermittelte Signalübertragung hemmen und somit das Wachstum von Tumorzellen einschränken oder Zelltod auslösen. Beispiele sind Antikörper gegen den EGFR oder Her2, die bei kolorektalen Karzinomen, Kopf-Hals-Tumoren sowie HER2-positiven Mamma- und Magenkarzinomen wirksam sind (Lynch, 2004; Hudis, 2007). Antikörper gegen negative immunregulatorische Rezeptoren und Liganden auf T-Zellen und Tumorzellen aktivieren die körpereigene Tumorantwort, was in klinischen Studien insbesondere bei Patienten mit malignen Melanomen, Lungen- und Nierenzellkarzinomen Wirksamkeit zeigte (Hodi et al., 2010; Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012).

Um den Erfolg von Krebsimmuntherapien sicherzustellen und zu verbessern, ist es wichtig, Resistenzmechanismen zu identifizieren, welche die Aktivität von T-Zellen beeinträchtigen. Der Nachweis von Resistenzfaktoren im Tumorgewebe kann als negativ prädiktiver Biomarker dienen und somit die Wirkungsaussicht einer Immuntherapie durch Selektion geeigneter Patienten erhöhen. Insbesondere kann das molekulare Verständnis von Mechanismen der Immunresistenz von Tumoren Ansatzpunkte für Therapiestrategien aufzeigen, die in Verbindung mit Immuninterventionen die Behandlungsergebnisse verbessern. Häufig führen zellintrinsische Veränderungen, wie z.B. die Expression von anti-apoptotischen Molekülen, zu einer verminderten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Immuneffektoren (Sutton et al., 2000; Heibein et al., 2000; Huber et al., 2005; Pardoll, 2012). Wie in einem anderen, von uns zuvor etablierten HLA-A0201 transgenen Tumormodell mit alloreaktiven T-Zellen gezeigt werden konnte, sind die

Aktivierung des Akt-Signalwegs sowie die vermehrte Expression der GTPase CDC42 (*cell division cycle 42*) verantwortlich für die Resistenz gegenüber antigenspezifischen T-Zellen (Hahnel et al., 2008; Marques et al., 2008c). In dem hier etablierten, neuen Modell einer syngenen/autologen, antigenspezifischen antitumoralen T-Zellantwort identifizierten wir die Cyclooxygenase-2 als einen möglichen zellautonomen Resistenz-mechanismus, der spezifisch immunvermittelte Tumorzellabtötung hemmt, jedoch keine Kreuzresistenz gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika oder Strahlen vermittelt. Obwohl in der Literatur eine COX-2 abhängige Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agenzien sowie gegenüber UV-Bestrahlung beschrieben wurde (Chun et al., 2007; Hasegawa et al., 2013), konnten wir diese Effekte in unserem Tumormodell nicht nachvollziehen. Eventuell führt die Ko-Expression von E1A und H-Ras in unserem Zellsystem über die Aktivierung insbesondere des MAPK-Signalweges zu einer konstitutiven Resistenz, die durch die zusätzliche Expression von COX-2 nicht weiter gesteigert werden kann. Eine deutliche Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in den parental MEF stützt diese These (Daten nicht gezeigt). Dem widerspricht jedoch die Apoptosesensitivität der E1A-MEF gegenüber bereits geringen Konzentrationen zytotoxischer Substanzen. Letztlich muss diese Diskrepanz durch die unterschiedlichen Zellmodelle der verschiedenen Studien erklärt werden.

In unserem murinen Immuntherapiemodell führt die COX-2-Überexpression zu einer Resistenz gegenüber ZTLs *in vitro*, die sich in einer deutlichen Steigerung des klonogenen Überlebens der Tumorzellen nach Ko-Kultur mit antigenspezifischen ZTL darstellte. Durch Injektion COX-2-exprimierender E1A-MEF und Kontrollzellen etablierten wir Tumore in NOD/SCID-Mäusen. Die Überlebenszeit von Mäusen mit COX-2-exprimierenden Tumoren nach adoptivem Transfer E1A-spezifischer, TCR-transgener Splenozyten war deutlich kürzer als die von Mäusen mit Kontrolltumoren. Ebenfalls verminderte die COX-2-Expression die *Immunsurveillance* von E1A-MEF in St42Rag2^{-/-}-Mäusen. COX-2-Tumoren wuchsen im Vergleich zu Kontrolltumoren mit einer erhöhten Geschwindigkeitsrate an. Es konnte somit gezeigt werden, dass COX-2 auch zu einer spezifischen Immunresistenz *in vivo* führt. Die pharmakologische Inhibierung von COX-2 mit Celecoxib zeigte in zellbiologischen Experimenten nur einen marginalen Effekt. Möglicherweise war die Wirkweise des COX-2-Inhibitors Celecoxib durch den Versuchsaufbau vermindert oder es besteht

auch ein inhibitorischer Effekt auf die Funktion der St42Rag2^{-/-}-Splenozyten. Daher generierten wir verschiedenen COX-2-Mutanten, um die Bedeutung der enzymatischen Aktivität für die Immunresistenz zu untersuchen. In der Tat war die Immunresistenz von E1A-MEF, die die mmCox-2^{H374E} oder mmCox-2^{H374F} Mutanten exprimierten, deutlich reduziert. Im Gegensatz zur Mutante mmCox-2^{Y371F} führte die Expression dieser Mutanten zu einer reduzierten Sekretion von PGE₂ in Zellkulturüberständen. Auf Grund der Tatsache, dass die zweite katalytische Domäne des Enzyms unabhängig von der ersten Domäne arbeitet (Mizuno et al., 1982), könnte in Zellen mit Expression von mmCox-2^{Y371F} das endogene COX-2-Enzym mit seiner aktiven Cyclooxygenase das Zwischenprodukt für die PGE₂-Synthese geliefert haben. Im Gegensatz dazu ist die Cyclooxygenase abhängig von der Peroxidase, da es die Oxidation der Häm-Gruppe zur vollständigen Funktion benötigt (Smith and Lands, 1972; Landino et al., 1997b). Entsprechend verursachte die zielgerichtete Mutagenese im zweiten katalytischen Zentrum in den Mutanten E1A-MEF-mmCox-2^{H374E} und E1A-MEF-mmCox-2^{H374F} eine deutliche Reduktion der PGE₂-Freisetzung.

In weiterführenden Experimenten wurde der Einfluss der COX-2-abhängigen PGE₂-Sekretion untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass das PGE₂ in der Zellkultur zu einer verminderten IFN-gamma Produktion in den St42Rag2^{-/-}-Splenozyten führte. Interferone werden von aktivierten T-Zellen sezerniert und spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Virus-infizierten Zellen (Whitmire et al., 2005). IFN-gamma ist an der immunologischen Tumorelimination und der *Immune surveillance* von Tumoren beteiligt (Dighe et al., 1993; Kaplan et al., 1998; Street et al., 2001; Shankaran et al., 2001; Detjen et al., 2001). IFN-gamma bewirkt eine vermehrte Expression sowohl von MHC-I als auch MHC-II-Molekülen (Rosa et al., 1986). β_2 -Mikroglobulin, dessen Ko-expression für die Ausbildung eines funktionellen MHC-Komplexes essentiell ist, wird ebenfalls durch IFN-gamma aufreguliert (Johnson and Pober, 1990). Zusammen mit einer erhöhten Aktivität der Antigenpeptid-Transporter (Epperson et al., 1992b) werden so vermehrt Antigene im MHC-Kontext präsentiert, wodurch die Erkennung durch T-Zellen verbessert wird.

IFN-gamma scheint auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die lytische Aktivität von ZTL und die Tumorelimination zu nehmen (Becker et al., 2001; Anders et al., 2011; Hess et al., 2013). So konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass IFN-gamma

eine wichtige Rolle in der Bekämpfung sowohl von transplantierten als auch von spontanen Tumoren spielt (Dighe et al., 1993; Kaplan et al., 1998). Dies könnte eine Erklärung für die Wirkweise von COX-2 in unserem Modell sein. Auf Grund der erhöhten COX-2-Expression wird von den Tumorzellen das Stoffwechselprodukt Prostaglandin E₂ vermehrt lokal sezerniert und hemmt somit die IFN-gamma-Produktion und/oder – Freisetzung von Antigen-exponierten ZTL, die einen wesentlichen Effektormechanismus der St42Rag2^{-/-}-Splenozyten darstellt. Durch die Verwendung von p14-spezifischen ZTL konnten wir zeigen, dass dieser Effekt sich nicht nur auf E1A-spezifische T-Zellen beschränkt, sondern ein generelles Phänomen darstellen kann. Eine PGE₂-abhängige Inhibition der IFN-gamma-Produktion und eine damit verbundene reduzierte Tumorelimination durch ZTLs wurde auch in einem murinen B-Zell-Lymphommodell beschrieben (Specht et al., 2001). Eine vermehrte Tumordinfiltration durch T-Zellen mit erhöhter IFN-gamma-Genexpression konnte mit einem längeren Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom assoziiert werden (Zhang et al., 2003). Weitere beschriebene Wirkweisen von PGE₂ sind die Unterbindung der direkten Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen durch Tumorzellen (Landino et al., 1997a; Ahmadi et al., 2008), sowie eine durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen verursachte Störung des Zytoskeletumbaus in den T-Zellen, wodurch die Formierung der immunologischen Synapse verhindert wird (Valitutti et al., 1993).

Eine Möglichkeit zur Überwindung der COX-2-vermittelten Immunresistenz ist die Gabe von IFN-gamma. Tatsächlich konnte durch die exogene Zugabe von IFN-gamma die Zytotoxizität von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten gegenüber ko-kultivierten COX-2-exprimierende E1A-MEF gesteigert werden. IFN-gamma-basierte Immuntherapien zeigten in klinischen Studien bisher nur in wenigen Fällen therapeutische Effekte und werden daher aktuell nicht mehr klinisch angewandt. Dies mag in erster Linie daran liegen, dass systemisch verabreichtes IFN-gamma durch eine kurze Halbwertszeit und Toxizitäten nicht in ausreichender Konzentration und Dauer in der Tumorumgebung wirken kann. Eine verlängerte progressionsfreie Überlebensdauer konnte jedoch in Ovarialkarzinompatienten mit IFN-gamma Behandlung beobachtet werden und verhinderte das Auftreten von Rezidiven beim Blasenkarzinom (Windbichler et al., 2000; Giannopoulos et al., 2003). Das Ansprechen auf einen adoptiven T-Zelltransfer beim Melanom konnte durch Zugabe

von IFN-gamma verbessert werden (Donia et al., 2013). Des Weiteren scheint die IFN-gamma-Konzentration im Blut ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Immuntherapien beim Pankreaskarzinom zu sein (Ishikawa et al., 2013). Es werden noch weitere Studien nötig sein, um die immunmodulatorischen Eigenschaften von Interferon-gamma besser zu verstehen um Krebstherapien zu verbessern zu können.

5.2. Ribosomales Protein S9 und eukaryotischer Elongationsfaktor 1B δ

Als weitere Kandidaten für Immunresistenzfaktoren wurden in dieser Arbeit das ribosomale Protein S9 und den eukaryotischen Elongationsfaktor 1B δ identifiziert. Ribosomen sind Enzyme, die für die Proteinbiosynthese verantwortlich sind und sich aus 2 Untereinheiten zusammensetzen: der großen 60S und der kleinen 40S Untereinheit. Zusammen bilden sie einen Komplex, der aus vier ribosomalen RNA-Molekülen und aus 80 Proteinen besteht (Wool, 1979). Die rRNAs bilden dabei das Grundgerüst des Ribosoms, wo hingegen die ribosomalen Proteine an der Oberfläche zu finden sind (Ben-Shem et al., 2011a). Die kleine ribosomale Untereinheit ist für die korrekte Paarung des mRNA Codons mit dem entsprechenden Anticodon einer tRNA verantwortlich (Rabl et al., 2011). Sie setzt sich aus einem rRNA-Molekül und 33 Proteinen zusammen, zu denen auch das ribosomale Protein S9 gehört, welches im Bereich des „Kopfes“ lokalisiert ist (s. Abb. 32).

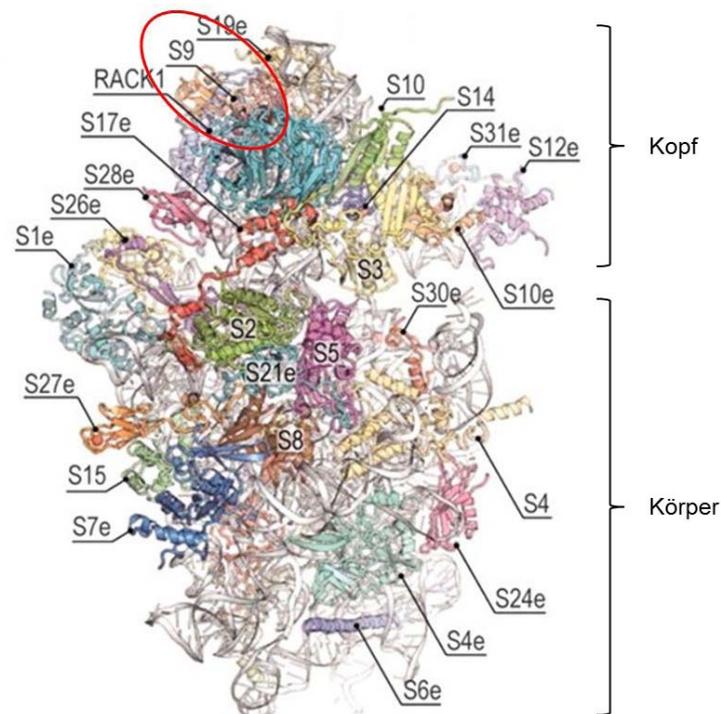


Abb. 32: Struktureller Aufbau der kleinen ribosomalen Untereinheit 40S.

Die kleine ribosomale Untereinheit S40 teilt sich in 2 Bereiche auf, dem „Kopf“ und dem „Körper“, zwischen denen die mRNA für die Transkription eingefädelt wird. Sie ist verantwortlich für den Abgleich zwischen der mRNA-Sequenz und der korrekten Aminoacyl-tRNA und besteht, wie auch die große Untereinheit, aus ribosomaler RNA und ribosomalen Proteinen. Die Abbildung zeigt die Rückansicht der 40S Untereinheit, die ribosomalen Proteine wurden bunt eingefärbt, die ribosomale RNA ist in grau dargestellt. Rot markiert ist die Lokalisation des ribosomalen Proteins S9. (Ben-Shem et al., 2011b).

Der mit Hilfe der cDNA-Bank identifizierte eukaryotische Elongationsfaktor 1B δ gehört ebenfalls zu den Proteinen, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. eEF1A bindet an die Aminoacyl-tRNA und transportiert diese zur A-Bindungsstelle des Ribosoms (Iwasaki et al., 1973). Unter Abspaltung einer Phosphatgruppe wird die tRNA bei korrekter Codon-Anticodon-Paarung freigesetzt und der Elongationsfaktor verlässt das Ribosom. Der eEF1B-Komplex, der in vielzelligen Lebewesen (Metazoa) aus den drei Untereinheiten eEF1B γ , eEF1B β und eEF1B δ besteht, dient anschließend als Nukleotid-Austauschfaktor und führt EF1A durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) in seinen Ausgangszustand zurück, wodurch die erneute Bindung eines tRNA-Moleküls möglich wird (Dever and Green, 2012) (Abb. 33).

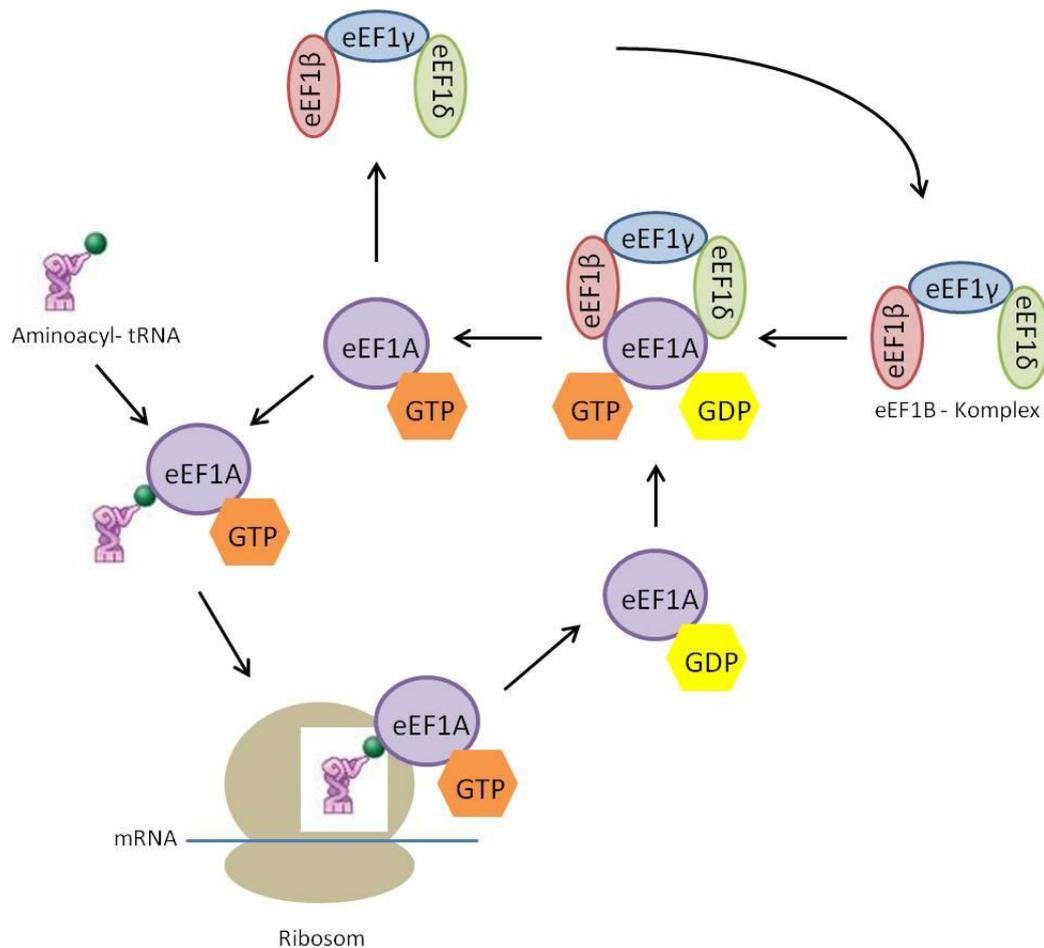


Abb. 33: Elongationsphase der Translation.

eEF1A-GTP bindet an eine Aminoacyl-tRNA und transportiert diese zum Ribosom. Nach erfolgreicher Codon-Anticodon Erkennung wird das GTP-Molekül hydrolysiert und eEF1A-GDP verlässt das Ribosom. Der GTP-Austauschfaktor eEF1B-Komplex reaktiviert eEF1A durch den Austausch von GDP zu GTP. (Abbildung modifiziert nach Li et al., 2013).

Die Expression des ribosomalen Proteins S9 oder des Elongationsfaktors 1Bδ in E1A-MEF resultierte in einer ausgeprägten Resistenz gegenüber der zytotoxischen Aktivität von St42Rag2^{-/-}-Splenozyten und damit in einem vermehrten klonogenen Überleben der Tumorzellen. Des Weiteren konnte eine verminderte Apoptose nach Inkubation mit den Zytostatika Staurosporin und Paclitaxel festgestellt werden. Auf Grund der Tatsache, dass die Expression der beiden Proteine sowohl vor zellulären Immunmodulatoren als auch gegenüber Chemotherapeutika Schutz bietet, vermuteten wir die Aktivierung eines generellen anti-apoptotischen Signalwegs. Im Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass die vermehrte Expression von eEF1Bδ und RPS9 zu einer Phosphorylierung von ERK als Zeichen für eine

Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt. Wie bereits beschrieben wurde, gehören zu den Zielgenen des Onkogens *MYC* auch ribosomale Proteine und Translationsfaktoren, unter anderem RPS9 und EF1B δ (Boon et al., 2001; Menssen and Hermeking, 2002). Da das *MYC*-Protein seinerseits durch den MAPK-Signalweg aktiviert wird (Gupta and Davis, 1994), besteht möglicherweise ein Rückkopplungsmechanismus, der eine *MYC*-Aktivierung durch RPS9 und eEF1B δ verursacht. Eine Untersuchung hinsichtlich der Auswirkung auf die St42Rag2^{-/-}-Splenozyten zeigte eine geringe Hemmung IFN-gamma Sekretion in der Ko-Kultur mit E1A-MEF-RPS9, wo hingegen die eEF1B δ -Überexpression hierauf keinen Einfluss hatte.

Es ist bekannt, dass Krebszellen einen veränderten Translationsprozess aufweisen, der auch in morphologischen Veränderungen des Nukleolus, der Ort der Ribosomen-Synthese, sichtbar wird (Gani, 1976). Die veränderte Expression von einigen ribosomalen Proteinen konnte sowohl für Zelllinien als auch für verschiedene Tumorentitäten beschrieben werden (Ferrari et al., 1990; Loging and Reisman, 1999; Kondoh et al., 2001). Das ribosomale Protein S9 wird in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa nach Einwirkung von Benzo[a]pyren-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxid (BPDE), einem Kanzerogen welches auch in Zigarettenrauch vorkommt, hochreguliert (Yu et al., 2000). Auf Grund der Tatsache, dass eine PRS9-Hochregulation in unserem Zellmodell zu Resistenzen führt, könnte diese Beobachtung im Kontext von Lungenkarzinomen von Interesse sein. RPS9 ist ein Bindungspartner von Nucleophosmin, einem Protein, welches RPS9 in den Nukleolus transportiert (Lindstrom and Zhang, 2008). RPS9 wird für eine normale Zellproliferation benötigt und die Depletion von RPS9 mittels siRNA (*small interfering RNA*) führte in einer Arbeit zur Apoptose von HeLa-Zellen (Lindstrom and Nister, 2010).

Es wird vermutet, dass ribosomale Proteine neben ihrer Funktion im Ribosom und der Proteinsynthese weitere Aufgaben in der Zelle besitzen (Wool, 1996; Warner and McIntosh, 2009; Bhavsar et al., 2010). In dieser Arbeit beschreiben wir erstmalig einen durch die Überexpression eines ribosomalen Proteins hervorgerufenen Resistenzmechanismus, der sowohl vor antigenspezifischen T-Zellen als auch durch Zytostatika induzierter Apoptose schützt. Weitere Studien sind erforderlich, um die Beteiligung von ribosomalen Proteinen an Resistenzmechanismen von Tumoren zu klären und dies in verbesserte Therapien von Tumorerkrankungen umzusetzen.

Der eukaryotische Elongationsfaktor 1A ist neben seiner zentralen Rolle in der Translation in einer Vielzahl von zellulären Funktionen involviert (Negrutskii and El'skaya, 1998). Er formt Komplexe mit Aktin und Tubulin und ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Bektas et al., 1994; Condeelis, 1995; Gross and Kinzy, 2007); weitere beschriebene Prozesse sind die Proteindegradation, Apoptose sowie die onkogene Transformation (Tatsuka et al., 1992; Gonen et al., 1994; Duttaroy et al., 1998; Chen et al., 2000). Die mutierte und trunkierte Form des Elongationsfaktors 1A wurde als das Onkogen PTI-1 identifiziert, welches im Prostatakarzinom hochreguliert ist (Shen et al., 1995; Gopalkrishnan et al., 1999). Aber auch die Untereinheiten des EF1B-Komplexes scheinen neben der GEF-Funktion weitere, translations-unabhängige Aufgaben zu haben (Le et al., 2006). Es wurde beobachtet, dass EF1B an DNA bindet, die durch Chrom oder Transplatin geschädigt wurde. Des Weiteren wird die Expression der Delta-Untereinheit des EF1B-Komplexes durch ionisierende Strahlung induziert (Wang et al., 1997). In einer neueren Studie wurde herausgefunden, dass EF1B δ eine längere Isoform besitzt, welche durch alternatives *Splicing* entsteht. Diese längere Variante lokalisiert neben dem Zytoplasma auch im Nukleus und dient als Transkriptionsfaktor für Gene, die in Folge einer *Heat-Shock*-Antwort der Zelle reguliert werden (Wang et al., 1997; Kaitsuka et al., 2011). Möglicherweise ist EF1B δ an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, da es von den Zellzyklusproteinen CDK1 und CK2 phosphoryliert wird (Minella et al., 1998; Sheu and Traugh, 1999). Eine Assoziation mit der Karzinogenese konnte durch die Überexpression von EF1B δ sowohl in verschiedenen Lungenkrebszelllinien als auch in Ösophaguskarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Ogawa et al., 2004; Liu et al., 2004). In murinen Fibroblasten ist die Expression von EF1B δ ausreichend, um diese zu transformieren und Tumore in Nacktmäusen zu erzeugen (Joseph et al., 2002). Hier beschreiben wir eine EF1B δ -vermittelte Resistenz von Tumorzellen gegenüber zytotoxischen Substanzen und Antigen-spezifischen T-Zellen. Diese ist mit Markern der Aktivierung des MAPK-Signalwegs assoziiert. Obwohl die Expression des Elongationsfaktors EF1B δ in Chemotherapie resistenten Melanomzelllinien bereits beschrieben wurde (Sinha et al., 2000), ist der molekulare Mechanismus dieser Resistenz bisher noch nicht bekannt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Rolle von EF1B δ in der Ausbildung von Tumoren und deren Resistenzmechanismen besser zu verstehen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Es existieren zahlreiche Immuntherapien um malignen Erkrankungen zu begegnen. Ihnen gemein ist, dass der Erfolg einer solchen Therapie von der Sensitivität gegenüber den eingesetzten Immuneffektoren und deren zytotoxischen Mechanismen abhängt. Deswegen haben wir ein Modell entwickelt, mit dem molekulare Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber antigenspezifischen Zytotoxischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden können. Mit Hilfe dieses Modells haben wir drei Kandidatengene identifiziert, die wir zell- und molekularbiologisch analysierten, sowie z.T. tierexperimentelle Untersuchungen durchführten. Die Expression von COX-2 führte in unserem Krebsmodell zu einer Zell-autonomen Resistenz auf Grund einer verminderten Sensitivität der Zellen gegenüber antigenspezifischen ZTL. Die Sekretion von IFN-gamma durch aktivierte ZTL wurde durch die COX-2 Expression vermindert und ermöglichte E1A-MEF weiteres Zellwachstum. Dieser von uns beschriebene Mechanismus kann zum Verständnis der Rolle von COX-2 in der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen beitragen. COX-2 könnte durch die lokale Suppression der IFN-gamma Ausschüttung durch antigenspezifische ZTL ein immunsuppressives Milieu begünstigen. In unserem Modell wurde gezeigt, dass die exogene Gabe von IFN-gamma die COX-2 vermittelte Resistenz überwindet, die pharmakologische Inhibition von COX-2 jedoch nicht zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen führte. Dies könnte für die zielgerichteten Therapien von COX-2 exprimierenden Tumoren von Bedeutung sein. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die Auswirkung von COX-2 Inhibitoren auf ZTL näher zu untersuchen und um Möglichkeiten zu erarbeiten, IFN-gamma-basierte Immuntherapien zu verbessern.

Zwei weitere, von uns identifizierte Resistenzfaktoren waren das Ribosomale Protein S9 und der Elongationsfaktor 1Bδ. Die Expression von RPS9 und EF1Bδ führte in unserem Zellmodell sowohl zu einer Resistenz gegenüber pharmakologisch induzierter Apoptose als auch gegenüber antigenspezifischen ZTL. Dies wurde vermutlich durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs begünstigt. Der Einfluss von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren auf eine zell-intrinsische Resistenz benötigen weitere Untersuchungen, um den Mechanismus besser zu verstehen um ihm evtl. pharmakologisch zu begegnen können.

Literaturverzeichnis

- Aaij C and Borst P (1972) The Gel Electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**:192-200.
- Aggarwal S and Pittenger MF (2005) Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses. *Blood* **105**:1815-1822.
- Ahmadi M, Emery DC and Morgan DJ (2008) Prevention of Both Direct and Cross-Priming of Antitumor CD8+ T-Cell Responses Following Overproduction of Prostaglandin E2 by Tumor Cells in Vivo. *Cancer Res* **68**:7520-7529.
- Alimonti JB, Shi L, Baijal PK and Greenberg AH (2001) Granzyme B Induces BID-Mediated Cytochrome c Release and Mitochondrial Permeability Transition. *J Biol Chem* **276**:6974-6982.
- Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO and Bennett PR (2001) Human Labour Is Associated With Nuclear Factor-KappaB Activity Which Mediates Cyclo-Oxygenase-2 Expression and Is Involved With the 'Functional Progesterone Withdrawal'. *Mol Hum Reprod* **7**:581-586.
- Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yamada H and Boumpas DT (1992) Prostaglandin E2 and Other Cyclic AMP-Elevating Agents Modulate IL-2 and IL-2R Alpha Gene Expression at Multiple Levels. *J Immunol* **148**:2845-2852.
- Anders K, Buschow C, Herrmann A, Milojkovic A, Loddenkemper C, Kammertoens T, Daniel P, Yu H, Charo J and Blankenstein T (2011) Oncogene-Targeting T Cells Reject Large Tumors While Oncogene Inactivation Selects Escape Variants in Mouse Models of Cancer. *Cancer Cell* **20**:755-767.
- Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC and Gregory SA (1996) Selective Inhibition of Cyclooxygenase (COX)-2 Reverses Inflammation and Expression of COX-2 and Interleukin 6 in Rat Adjuvant Arthritis. *J Clin Invest* **97**:2672-2679.
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G and Fais S (2002) Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-Bearing Microvesicles. *J Exp Med* **195**:1303-1316.
- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L and Rosenberg SA (1999) High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* **17**:2105-2116.
- Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW and Bleackley RC (1998) Cytotoxic T Lymphocyte-Assisted Suicide. Caspase 3 Activation Is

- Primarily the Result of the Direct Action of Granzyme B. *J Biol Chem* **273**:21261-21266.
- Bach JF (2003) Regulatory T Cells Under Scrutiny. *Nat Rev Immunol* **3**:189-198.
- Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuze-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S and Dubinett SM (2005) Prostaglandin E2 Induces FOXP3 Gene Expression and T Regulatory Cell Function in Human CD4+ T Cells. *J Immunol* **175**:1483-1490.
- bdel-Majid RM and Marshall JS (2004) Prostaglandin E2 Induces Degranulation-Independent Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Mast Cells. *J Immunol* **172**:1227-1236.
- Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schuler T, Assenmacher M, Schendel DJ and Blankenstein T (2001) Adoptive Tumor Therapy With T Lymphocytes Enriched Through an IFN-Gamma Capture Assay. *Nat Med* **7**:1159-1162.
- Bektas M, Nurten R, Gurel Z, Sayers Z and Bermek E (1994) Interactions of Eukaryotic Elongation Factor 2 With Actin: a Possible Link Between Protein Synthetic Machinery and Cytoskeleton. *FEBS Lett* **356**:89-93.
- Ben-Shem A, Garreau de LN, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G and Yusupov M (2011a) The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 A Resolution. *Science* **334**:1524-1529.
- Ben-Shem A, Garreau de LN, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G and Yusupov M (2011b) The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 A Resolution. *Science* **334**:1524-1529.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M and Koup RA (2003) Sensitive and Viable Identification of Antigen-Specific CD8+ T Cells by a Flow Cytometric Assay for Degranulation. *J Immunol Methods* **281**:65-78.
- Betz M and Fox BS (1991) Prostaglandin E2 Inhibits Production of Th1 Lymphokines but Not of Th2 Lymphokines. *J Immunol* **146**:108-113.
- Bhavsar RB, Makley LN and Tsonis PA (2010) The Other Lives of Ribosomal Proteins. *Hum Genomics* **4**:327-344.
- Bingle L, Brown NJ and Lewis CE (2002) The Role of Tumour-Associated Macrophages in Tumour Progression: Implications for New Anticancer Therapies. *J Pathol* **196**:254-265.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E and Vande Woude GF (2003) Met, Metastasis, Motility and More. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:915-925.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.

- Bittner M, Kupferer P and Morris CF (1980) Electrophoretic Transfer of Proteins and Nucleic Acids From Slab Gels to Diazobenzoyloxymethyl Cellulose or Nitrocellulose Sheets. *Anal Biochem* **102**:459-471.
- Bluestone JA and Abbas AK (2003) Natural Versus Adaptive Regulatory T Cells. *Nat Rev Immunol* **3**:253-257.
- Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ and de Waal MR (2009) Prostaglandin E2 Regulates Th17 Cell Differentiation and Function Through Cyclic AMP and EP2/EP4 Receptor Signaling. *J Exp Med* **206**:535-548.
- Boon K, Caron HN, van AR, Valentijn L, Hermus MC, van SP, Roobeek I, Weis I, Voute PA, Schwab M and Versteeg R (2001) N-Myc Enhances the Expression of a Large Set of Genes Functioning in Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis. *EMBO J* **20**:1383-1393.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A and Wigginton JM (2012) Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients With Advanced Cancer. *N Engl J Med* **366**:2455-2465.
- Bron LP, Scolyer RA, Thompson JF and Hersey P (2004) Histological Expression of Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Human Primary Melanoma. *Pathology* **36**:561-565.
- Brown JR and Dubois RN (2005) COX-2: a Molecular Target for Colorectal Cancer Prevention. *J Clin Oncol* **23**:2840-2855.
- Burnet M (1957) Cancer; a Biological Approach. I. The Processes of Control. *Br Med J* **1**:779-786.
- Cao C, Matsumura K, Yamagata K and Watanabe Y (1998a) Cyclooxygenase-2 Is Induced in Brain Blood Vessels During Fever Evoked by Peripheral or Central Administration of Tumor Necrosis Factor. *Brain Res Mol Brain Res* **56**:45-56.
- Cao C, Matsumura K, Yamagata K and Watanabe Y (1998b) Cyclooxygenase-2 Is Induced in Brain Blood Vessels During Fever Evoked by Peripheral or Central Administration of Tumor Necrosis Factor. *Brain Res Mol Brain Res* **56**:45-56.
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW and Kim HR (2000) Molecular Mechanism of Staurosporine-Induced Apoptosis in Osteoblasts. *Pharmacol Res* **42**:373-381.
- Chan MW, Wong CY, Cheng AS, Chan VY, Chan KK, To KF, Chan FK, Sung JJ and Leung WK (2007) Targeted Inhibition of COX-2 Expression by RNA Interference Suppresses Tumor Growth and Potentiates Chemosensitivity to Cisplatin in Human Gastric Cancer Cells. *Oncol Rep* **18**:1557-1562.

- Chang CC and Ferrone S (2007) Immune Selective Pressure and HLA Class I Antigen Defects in Malignant Lesions. *Cancer Immunol Immunother* **56**:227-236.
- Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF and Hla T (2005) The Prostaglandin E2 Receptor EP2 Is Required for Cyclooxygenase 2-Mediated Mammary Hyperplasia. *Cancer Res* **65**:4496-4499.
- Chang SH, Mirabolfofathinejad SG, Katta H, Cumpian AM, Gong L, Caetano MS, Moghaddam SJ and Dong C (2014) T Helper 17 Cells Play a Critical Pathogenic Role in Lung Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH and Borden EC (2003) Apoptosis and Interferons: Role of Interferon-Stimulated Genes As Mediators of Apoptosis. *Apoptosis* **8**:237-249.
- Chen E, Proestou G, Bourbeau D and Wang E (2000) Rapid Up-Regulation of Peptide Elongation Factor EF-1alpha Protein Levels Is an Immediate Early Event During Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Exp Cell Res* **259**:140-148.
- Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von BH and Khazaie K (2005) Regulatory T Cells Suppress Tumor-Specific CD8 T Cell Cytotoxicity Through TGF-Beta Signals in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:419-424.
- Chen XJ, Xiao W, Qu X and Zhou SY (2008) NS-398 Enhances the Efficacy of Gemcitabine Against Lung Adenocarcinoma Through Up-Regulation of P21WAF1 and P27KIP1 Protein. *Neoplasma* **55**:200-204.
- Chun KS, Akunda JK and Langenbach R (2007) Cyclooxygenase-2 Inhibits UVB-Induced Apoptosis in Mouse Skin by Activating the Prostaglandin E2 Receptors, EP2 and EP4. *Cancer Res* **67**:2015-2021.
- Condeelis J (1995) Elongation Factor 1 Alpha, Translation and the Cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **20**:169-170.
- Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A and Wilt T (2005) Immunotherapy for Advanced Renal Cell Cancer. *Cochrane Database Syst Rev*CD001425.
- Czembirek C, Eder-Czembirek C, Erovic BM, Turhani D, Spittler A, Selzer E, Potter R and Thurnher D (2009) The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Nimesulide, a Nonsteroidal Analgesic, Decreases the Effect of Radiation Therapy in Head-and-Neck Cancer Cells. *Strahlenther Onkol* **185**:310-317.
- Danos O and Mulligan RC (1988) Safe and Efficient Generation of Recombinant Retroviruses With Amphotropic and Ecotropic Host Ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6460-6464.
- Detjen KM, Farwig K, Welzel M, Wiedenmann B and Rosewicz S (2001) Interferon Gamma Inhibits Growth of Human Pancreatic Carcinoma Cells Via Caspase-1 Dependent Induction of Apoptosis. *Gut* **49**:251-262.

- Dever TE and Green R (2012) The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**:a013706.
- Dighe AS, Farrar MA and Schreiber RD (1993) Inhibition of Cellular Responsiveness to Interferon-Gamma (IFN Gamma) Induced by Overexpression of Inactive Forms of the IFN Gamma Receptor. *J Biol Chem* **268**:10645-10653.
- Donia M, Hansen M, Sendrup SL, Iversen TZ, Ellebaek E, Andersen MH, Straten P and Svane IM (2013) Methods to Improve Adoptive T-Cell Therapy for Melanoma: IFN-Gamma Enhances Anticancer Responses of Cell Products for Infusion. *J Invest Dermatol* **133**:545-552.
- Doniger J, Jacobson ED, Krell K and DiPaolo JA (1981) Ultraviolet Light Action Spectra for Neoplastic Transformation and Lethality of Syrian Hamster Embryo Cells Correlate With Spectrum for Pyrimidine Dimer Formation in Cellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:2378-2382.
- Dorsam RT and Gutkind JS (2007) G-Protein-Coupled Receptors and Cancer. *Nat Rev Cancer* **7**:79-94.
- Dotti G, Savoldo B, Pule M, Straathof KC, Biagi E, Yvon E, Vigouroux S, Brenner MK and Rooney CM (2005) Human Cytotoxic T Lymphocytes With Reduced Sensitivity to Fas-Induced Apoptosis. *Blood* **105**:4677-4684.
- Dougan M and Dranoff G (2009) Immune Therapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* **27**:83-117.
- DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB and Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in Biology and Disease. *FASEB J* **12**:1063-1073.
- Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL and Wang E (1998) Apoptosis Rate Can Be Accelerated or Decelerated by Overexpression or Reduction of the Level of Elongation Factor-1 Alpha. *Exp Cell Res* **238**:168-176.
- Eberstal S, Sanden E, Fritzell S, Darabi A, Visse E and Siesjo P (2014) Intratumoral COX-2 Inhibition Enhances GM-CSF Immunotherapy Against Established Mouse GL261 Brain Tumors. *Int J Cancer* **134**:2748-2753.
- England S, Bevan S and Docherty RJ (1996) PGE2 Modulates the Tetrodotoxin-Resistant Sodium Current in Neonatal Rat Dorsal Root Ganglion Neurones Via the Cyclic AMP-Protein Kinase A Cascade. *J Physiol* **495 (Pt 2)**:429-440.
- Epperson DE, Arnold D, Spies T, Cresswell P, Pober JS and Johnson DR (1992a) Cytokines Increase Transporter in Antigen Processing-1 Expression More Rapidly Than HLA Class I Expression in Endothelial Cells. *J Immunol* **149**:3297-3301.
- Epperson DE, Arnold D, Spies T, Cresswell P, Pober JS and Johnson DR (1992b) Cytokines Increase Transporter in Antigen Processing-1 Expression More Rapidly Than HLA Class I Expression in Endothelial Cells. *J Immunol* **149**:3297-3301.

- Ferrari S, Manfredini R, Tagliafico E, Rossi E, Donelli A, Torelli G and Torelli U (1990) Noncoordinated Expression of S6, S11, and S14 Ribosomal Protein Genes in Leukemic Blast Cells. *Cancer Res* **50**:5825-5828.
- Foster AE, Dotti G, Lu A, Khalil M, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM and Bollard CM (2008) Antitumor Activity of EBV-Specific T Lymphocytes Transduced With a Dominant Negative TGF-Beta Receptor. *J Immunother* **31**:500-505.
- Gani R (1976) The Nucleoli of Cultured Human Lymphocytes. I. Nucleolar Morphology in Relation to Transformation and the DNA Cycle. *Exp Cell Res* **97**:249-258.
- Giannopoulos A, Constantinides C, Fokaeas E, Stravodimos C, Giannopoulou M, Kyroudi A and Gounaris A (2003) The Immunomodulating Effect of Interferon-Gamma Intravesical Instillations in Preventing Bladder Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res* **9**:5550-5558.
- Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR and Offerhaus GJ (1993) Treatment of Colonic and Rectal Adenomas With Sulindac in Familial Adenomatous Polyposis. *N Engl J Med* **328**:1313-1316.
- Gibb W and Sun M (1996) Localization of Prostaglandin H Synthase Type 2 Protein and mRNA in Term Human Fetal Membranes and Decidua. *J Endocrinol* **150**:497-503.
- Gonen H, Smith CE, Siegel NR, Kahana C, Merrick WC, Chakraborty K, Schwartz AL and Ciechanover A (1994) Protein Synthesis Elongation Factor EF-1 Alpha Is Essential for Ubiquitin-Dependent Degradation of Certain N Alpha-Acetylated Proteins and May Be Substituted for by the Bacterial Elongation Factor EF-Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7648-7652.
- Gopalkrishnan RV, Su ZZ, Goldstein NI and Fisher PB (1999) Translational Infidelity and Human Cancer: Role of the PTI-1 Oncogene. *Int J Biochem Cell Biol* **31**:151-162.
- Goto T, Herberman RB, Maluish A and Strong DM (1983) Cyclic AMP As a Mediator of Prostaglandin E-Induced Suppression of Human Natural Killer Cell Activity. *J Immunol* **130**:1350-1355.
- Graham FL and van der Eb AJ (1973) Transformation of Rat Cells by DNA of Human Adenovirus 5. *Virology* **54**:536-539.
- Greaves DR, Wilson FD, Lang G and Kioussis D (1989) Human CD2 3'-Flanking Sequences Confer High-Level, T Cell-Specific, Position-Independent Gene Expression in Transgenic Mice. *Cell* **56**:979-986.
- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C and Kaidi A (2009a) The COX-2/PGE2 Pathway: Key Roles in the Hallmarks of Cancer and Adaptation to the Tumour Microenvironment. *Carcinogenesis* **30**:377-386.

- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C and Kaidi A (2009b) The COX-2/PGE2 Pathway: Key Roles in the Hallmarks of Cancer and Adaptation to the Tumour Microenvironment. *Carcinogenesis* **30**:377-386.
- Gross SR and Kinzy TG (2007) Improper Organization of the Actin Cytoskeleton Affects Protein Synthesis at Initiation. *Mol Cell Biol* **27**:1974-1989.
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL and June CH (2013) Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* **368**:1509-1518.
- Gupta RA and Dubois RN (2001) Colorectal Cancer Prevention and Treatment by Inhibition of Cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1**:11-21.
- Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK and DuBois RN (2000) Prostacyclin-Mediated Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta in Colorectal Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13275-13280.
- Gupta S and Davis RJ (1994) MAP Kinase Binds to the NH₂-Terminal Activation Domain of C-Myc. *FEBS Lett* **353**:281-285.
- Hahnel PS, Thaler S, Antunes E, Huber C, Theobald M and Schuler M (2008) Targeting AKT Signaling Sensitizes Cancer to Cellular Immunotherapy. *Cancer Res* **68**:3899-3906.
- Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H and Burr DD (2005) Aspirin, Ibuprofen, and Other Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Prevention: a Critical Review of Non-Selective COX-2 Blockade (Review). *Oncol Rep* **13**:559-583.
- Hasegawa K, Ishikawa K, Kawai S, Torii Y, Kawamura K, Kato R, Tsukada K and Udagawa Y (2013) Overcoming Paclitaxel Resistance in Uterine Endometrial Cancer Using a COX-2 Inhibitor. *Oncol Rep* **30**:2937-2944.
- Hayaishi O, Matsumura H, Onoe H, Koyama Y and Watanabe Y (1991) Sleep-Wake Regulation by PGD₂ and E₂. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **21B**:723-726.
- Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR and Bleackley RC (2000) Granzyme B-Mediated Cytochrome c Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax. *J Exp Med* **192**:1391-1402.
- Hess MR, Manzo T, Sturmheit T, Basso V, Rocchi M, Freschi M, Listopad J, Blankenstein T, Bellone M and Mondino A (2013) Vaccine-Instructed Intratumoral IFN-Gamma Enables Regression of Autochthonous Mouse Prostate Cancer in Allogeneic T-Cell Transplantation. *Cancer Res* **73**:4641-4652.
- Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, van HT and van der Burg SH (2011) M2 Macrophages

- Induced by Prostaglandin E2 and IL-6 From Cervical Carcinoma Are Switched to Activated M1 Macrophages by CD4+ Th1 Cells. *J Immunol* **187**:1157-1165.
- Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T and Takahashi T (1998) Increased Expression of Cyclooxygenase 2 Occurs Frequently in Human Lung Cancers, Specifically in Adenocarcinomas. *Cancer Res* **58**:3761-3764.
- Hill CS and Treisman R (1995) Transcriptional Regulation by Extracellular Signals: Mechanisms and Specificity. *Cell* **80**:199-211.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A and Urba WJ (2010) Improved Survival With Ipilimumab in Patients With Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **363**:711-723.
- Hofmann M, Radsak M, Rechtsteiner G, Wiemann K, Gunder M, Bien-Grater U, Offringa R, Toes RE, Rammensee HG and Schild H (2004) T Cell Avidity Determines the Level of CTL Activation. *Eur J Immunol* **34**:1798-1806.
- Huber C, Bobek N, Kuball J, Thaler S, Hoffarth S, Huber C, Theobald M and Schuler M (2005) Inhibitors of Apoptosis Confer Resistance to Tumour Suppression by Adoptively Transplanted Cytotoxic T-Lymphocytes in Vitro and in Vivo. *Cell Death Differ* **12**:317-325.
- Hudis CA (2007) Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med* **357**:39-51.
- Hull MA, Ko SC and Hawcroft G (2004) Prostaglandin EP Receptors: Targets for Treatment and Prevention of Colorectal Cancer? *Mol Cancer Ther* **3**:1031-1039.
- Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD (2002) The Roles of IFN Gamma in Protection Against Tumor Development and Cancer Immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:95-109.
- Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, Okayama T, Endo M, Tsuchiya R, Okajima M, Matsuyama T, Adachi S, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Ando T, Uno K, Naito Y and Yoshikawa T (2013) Whole Blood Interferon-Gamma Levels Predict the Therapeutic Effects of Adoptive T-Cell Therapy in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *Int J Cancer* **133**:1119-1125.
- Iwasaki K, Mizumoto K, Tanaka M and Kaziro Y (1973) A New Protein Factor Required for Polypeptide Elongation in Mammalian Tissues. *J Biochem* **74**:849-852.
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R and Samuelsson B (1999) Identification of Human Prostaglandin E Synthase: a Microsomal, Glutathione-Dependent,

- Inducible Enzyme, Constituting a Potential Novel Drug Target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7220-7225.
- Johnson DR and Pober JS (1990) Tumor Necrosis Factor and Immune Interferon Synergistically Increase Transcription of HLA Class I Heavy- and Light-Chain Genes in Vascular Endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5183-5187.
- Johnson GE, Ivanov VN and Hei TK (2008) Radiosensitization of Melanoma Cells Through Combined Inhibition of Protein Regulators of Cell Survival. *Apoptosis* **13**:790-802.
- Jones JM and Gellert M (2004) The Taming of a Transposon: V(D)J Recombination and the Immune System. *Immunol Rev* **200**:233-248.
- Jordan MA and Wilson L (2004) Microtubules As a Target for Anticancer Drugs. *Nat Rev Cancer* **4**:253-265.
- Joseph P, Lei YX, Whong WZ and Ong TM (2002) Oncogenic Potential of Mouse Translation Elongation Factor-1 Delta, a Novel Cadmium-Responsive Proto-Oncogene. *J Biol Chem* **277**:6131-6136.
- Joshi PC, Zhou X, Cuchens M and Jones Q (2001) Prostaglandin E2 Suppressed IL-15-Mediated Human NK Cell Function Through Down-Regulation of Common Gamma-Chain. *J Immunol* **166**:885-891.
- Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC and Paraskeva C (2006) Direct Transcriptional Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Promotes Colorectal Tumor Cell Survival and Enhances HIF-1 Transcriptional Activity During Hypoxia. *Cancer Res* **66**:6683-6691.
- Kaitsuka T, Tomizawa K and Matsushita M (2011) Transformation of EEF1Bdelta into Heat-Shock Response Transcription Factor by Alternative Splicing. *EMBO Rep* **12**:673-681.
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A and June CH (2011) T Cells With Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients With Advanced Leukemia. *Sci Transl Med* **3**:95ra73.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD (1998) Demonstration of an Interferon Gamma-Dependent Tumor Surveillance System in Immunocompetent Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7556-7561.
- Kasbohm EA, Guo R, Yowell CW, Bagchi G, Kelly P, Arora P, Casey PJ and Daaka Y (2005) Androgen Receptor Activation by G(s) Signaling in Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem* **280**:11583-11589.
- Kast WM, Offringa R, Peters PJ, Voordouw AC, Meloen RH, van der Eb AJ and Melief CJ (1989b) Eradication of Adenovirus E1-Induced Tumors by E1A-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Cell* **59**:603-614.

- Kast WM, Offringa R, Peters PJ, Voordouw AC, Meloen RH, van der Eb AJ and Melief CJ (1989a) Eradication of Adenovirus E1-Induced Tumors by E1A-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Cell* **59**:603-614.
- Katz JB, Muller AJ and Prendergast GC (2008) Indoleamine 2,3-Dioxygenase in T-Cell Tolerance and Tumoral Immune Escape. *Immunol Rev* **222**:206-221.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y and Toge T (2004) The Role of Fas Ligand and Transforming Growth Factor Beta in Tumor Progression: Molecular Mechanisms of Immune Privilege Via Fas-Mediated Apoptosis and Potential Targets for Cancer Therapy. *Cancer* **100**:2281-2291.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van RF, Mittermueller J, de WT, Holler E and Ansari H (1995) Graft-Versus-Leukemia Effect of Donor Lymphocyte Transfusions in Marrow Grafted Patients. *Blood* **86**:2041-2050.
- Kondoh N, Shuda M, Tanaka K, Wakatsuki T, Hada A and Yamamoto M (2001) Enhanced Expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 Ribosomal Protein MRNAs in Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* **21**:2429-2433.
- Konturek SJ, Robert A, Hanchar AJ and Nezamis JE (1980) Comparison of Prostacyclin and Prostaglandin E2 on Gastric Secretion, Gastrin Release, and Mucosal Blood Flow in Dogs. *Dig Dis Sci* **25**:673-679.
- Krammer PH (2000) CD95's Deadly Mission in the Immune System. *Nature* **407**:789-795.
- Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL and Prescott SM (1996) Prostaglandin H Synthase 2 Is Expressed Abnormally in Human Colon Cancer: Evidence for a Transcriptional Effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4816-4820.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Landino LM, Crews BC, Gierse JK, Hauser SD and Marnett LJ (1997c) Mutational Analysis of the Role of the Distal Histidine and Glutamine Residues of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2 in Peroxidase Catalysis, Hydroperoxide Reduction, and Cyclooxygenase Activation. *J Biol Chem* **272**:21565-21574.
- Landino LM, Crews BC, Gierse JK, Hauser SD and Marnett LJ (1997a) Mutational Analysis of the Role of the Distal Histidine and Glutamine Residues of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2 in Peroxidase Catalysis, Hydroperoxide Reduction, and Cyclooxygenase Activation. *J Biol Chem* **272**:21565-21574.
- Landino LM, Crews BC, Gierse JK, Hauser SD and Marnett LJ (1997b) Mutational Analysis of the Role of the Distal Histidine and Glutamine Residues of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2 in Peroxidase Catalysis,

- Hydroperoxide Reduction, and Cyclooxygenase Activation. *J Biol Chem* **272**:21565-21574.
- Le SF, Boulben S, Le BR, Cormier P, Morales J, Belle R and Mulner-Lorillon O (2006) EEF1B: At the Dawn of the 21st Century. *Biochim Biophys Acta* **1759**:13-31.
- Li D, Wei T, Abbott CM and Harrich D (2013) The Unexpected Roles of Eukaryotic Translation Elongation Factors in RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**:253-266.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK and Flavell RA (2006) Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* **24**:99-146.
- Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT and Ogino S (2012) Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival. *N Engl J Med* **367**:1596-1606.
- Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ and Boyle JO (2002) Cyclooxygenase-2: a Novel Molecular Target for the Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer. *Head Neck* **24**:792-799.
- Lindstrom MS and Nister M (2010) Silencing of Ribosomal Protein S9 Elicits a Multitude of Cellular Responses Inhibiting the Growth of Cancer Cells Subsequent to P53 Activation. *PLoS One* **5**:e9578.
- Lindstrom MS and Zhang Y (2008) Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-Binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *J Biol Chem* **283**:15568-15576.
- Liu B, Qu L and Tao H (2010) Cyclo-Oxygenase 2 Up-Regulates the Effect of Multidrug Resistance. *Cell Biol Int* **34**:21-25.
- Liu B, Shi ZL, Feng J and Tao HM (2008) Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis in Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 Via Down-Regulation of PI3K/Akt. *Cell Biol Int* **32**:494-501.
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF and Hla T (2001) Overexpression of Cyclooxygenase-2 Is Sufficient to Induce Tumorigenesis in Transgenic Mice. *J Biol Chem* **276**:18563-18569.
- Liu Y, Chen Q and Zhang JT (2004) Tumor Suppressor Gene 14-3-3sigma Is Down-Regulated Whereas the Proto-Oncogene Translation Elongation Factor 1delta Is Up-Regulated in Non-Small Cell Lung Cancers As Identified by Proteomic Profiling. *J Proteome Res* **3**:728-735.
- Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, Clark JA, Lee CA, Epstein JA, Morham SG, Breyer MD, Nguyen M, Hawkins BM, Goulet JL, Smithies O, Koller BH and Langenbach R (2001) Failure of Ductus Arteriosus Closure and Remodeling in

- Neonatal Mice Deficient in Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1059-1064.
- Loging WT and Reisman D (1999) Elevated Expression of Ribosomal Protein Genes L37, RPP-1, and S2 in the Presence of Mutant P53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**:1011-1016.
- Lynch TJ (2004) The Evolving Story of the Epidermal Growth Factor Receptor As a Target for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* **2**:786-787.
- Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J and Andreesen R (2006) Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen-Specific CD8+ T Cells for the Treatment of Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* **24**:5060-5069.
- Majors J (1990) The Structure and Function of Retroviral Long Terminal Repeats. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**:49-92.
- Mannie MD, Prevost KD and Marinakis CA (1995) Prostaglandin E2 Promotes the Induction of Anergy During T Helper Cell Recognition of Myelin Basic Protein. *Cell Immunol* **160**:132-138.
- Marques CA, Hahnel PS, Wolfel C, Thaler S, Huber C, Theobald M and Schuler M (2008a) An Immune Escape Screen Reveals Cdc42 As Regulator of Cancer Susceptibility to Lymphocyte-Mediated Tumor Suppression. *Blood* **111**:1413-1419.
- Marques CA, Hahnel PS, Wolfel C, Thaler S, Huber C, Theobald M and Schuler M (2008b) An Immune Escape Screen Reveals Cdc42 As Regulator of Cancer Susceptibility to Lymphocyte-Mediated Tumor Suppression. *Blood* **111**:1413-1419.
- Marques CA, Hahnel PS, Wolfel C, Thaler S, Huber C, Theobald M and Schuler M (2008c) An Immune Escape Screen Reveals Cdc42 As Regulator of Cancer Susceptibility to Lymphocyte-Mediated Tumor Suppression. *Blood* **111**:1413-1419.
- Martinez-Salas E (1999) Internal Ribosome Entry Site Biology and Its Use in Expression Vectors. *Curr Opin Biotechnol* **10**:458-464.
- Maus MV, Grupp SA, Porter DL and June CH (2014) Antibody-Modified T Cells: CARs Take the Front Seat for Hematologic Malignancies. *Blood* **123**:2625-2635.
- Menssen A and Hermeking H (2002) Characterization of the C-MYC-Regulated Transcriptome by SAGE: Identification and Analysis of C-MYC Target Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6274-6279.
- Minella O, Mulner-Lorillon O, Bec G, Cormier P and Belle R (1998) Multiple Phosphorylation Sites and Quaternary Organization of Guanine-Nucleotide Exchange Complex of Elongation Factor-1 (EF-1betagammadelta/ValRS) Control the Various Functions of EF-1alpha. *Biosci Rep* **18**:119-127.

- Mizuno K, Yamamoto S and Lands WE (1982) Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Fatty Acid Cyclooxygenase and Prostaglandin Hydroperoxidase Activities. *Prostaglandins* **23**:743-757.
- Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, Powell DJ, Jr., Riley JL, June CH and Albelda SM (2011) Expression of a Functional CCR2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T Cells Expressing a Mesothelin-Specific Chimeric Antibody Receptor. *Clin Cancer Res* **17**:4719-4730.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA and Rosenberg SA (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* **314**:126-129.
- Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gaudie J and Bleackley RC (2000) Mannose 6-Phosphate/Insulin-Like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B During Cytotoxic T Cell-Induced Apoptosis. *Cell* **103**:491-500.
- Mountford PS and Smith AG (1995) Internal Ribosome Entry Sites and Dicistronic RNAs in Mammalian Transgenesis. *Trends Genet* **11**:179-184.
- Mulcahy LS, Smith MR and Stacey DW (1985) Requirement for Ras Proto-Oncogene Function During Serum-Stimulated Growth of NIH 3T3 Cells. *Nature* **313**:241-243.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-273.
- Negrutskii BS and El'skaya AV (1998) Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha: Structure, Expression, Functions, and Possible Role in Aminoacyl-TRNA Channeling. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **60**:47-78.
- Ngo MC, Rooney CM, Howard JM and Heslop HE (2011) Ex Vivo Gene Transfer for Improved Adoptive Immunotherapy of Cancer. *Hum Mol Genet* **20**:R93-R99.
- Nishikawa H, Jager E, Ritter G, Old LJ and Gnjatic S (2005) CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Control the Induction of Antigen-Specific CD4+ Helper T Cell Responses in Cancer Patients. *Blood* **106**:1008-1011.
- O'Day SJ, Hamid O and Urba WJ (2007) Targeting Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4): a Novel Strategy for the Treatment of Melanoma and Other Malignancies. *Cancer* **110**:2614-2627.
- Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP and Kalinski P (2011) Positive Feedback Between PGE2 and COX2 Redirects the Differentiation of

- Human Dendritic Cells Toward Stable Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Blood* **118**:5498-5505.
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C and Rodriguez PC (2007) Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**:721s-726s.
- Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, Murayama S and Mori M (2004) Clinical Significance of Elongation Factor-1 Delta MRNA Expression in Oesophageal Carcinoma. *Br J Cancer* **91**:282-286.
- Pai R, Nakamura T, Moon WS and Tarnawski AS (2003) Prostaglandins Promote Colon Cancer Cell Invasion; Signaling by Cross-Talk Between Two Distinct Growth Factor Receptors. *FASEB J* **17**:1640-1647.
- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D and Tarnawski AS (2002) Prostaglandin E2 Transactivates EGF Receptor: a Novel Mechanism for Promoting Colon Cancer Growth and Gastrointestinal Hypertrophy. *Nat Med* **8**:289-293.
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H and Tarnawski AS (2001) PGE(2) Stimulates VEGF Expression in Endothelial Cells Via ERK2/JNK1 Signaling Pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **286**:923-928.
- Palayoor ST, Arayankalayil MJ, Shoaibi A and Coleman CN (2005) Radiation Sensitivity of Human Carcinoma Cells Transfected With Small Interfering RNA Targeted Against Cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res* **11**:6980-6986.
- Palucka K and Banchereau J (2012) Cancer Immunotherapy Via Dendritic Cells. *Nat Rev Cancer* **12**:265-277.
- Pardoll DM (2012) The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**:252-264.
- Picot D, Loll PJ and Garavito RM (1994) The X-Ray Crystal Structure of the Membrane Protein Prostaglandin H2 Synthase-1. *Nature* **367**:243-249.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H and Marchand C (2010) DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem Biol* **17**:421-433.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A and June CH (2011) Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* **365**:725-733.
- Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A and Ban N (2011) Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex With Initiation Factor 1. *Science* **331**:730-736.
- Reckamp KL, Krysan K, Morrow JD, Milne GL, Newman RA, Tucker C, Elashoff RM, Dubinett SM and Figlin RA (2006) A Phase I Trial to Determine the Optimal Biological Dose of Celecoxib When Combined With Erlotinib in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **12**:3381-3388.

- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK and Heslop HE (1995) Use of Gene-Modified Virus-Specific T Lymphocytes to Control Epstein-Barr-Virus-Related Lymphoproliferation. *Lancet* **345**:9-13.
- Rosa FM, Cochet MM and Fellous M (1986) Interferon and Major Histocompatibility Complex Genes: a Model to Analyse Eukaryotic Gene Regulation? *Interferon* **7**:47-87.
- Rundhaug JE, Simper MS, Surh I and Fischer SM (2011) The Role of the EP Receptors for Prostaglandin E2 in Skin and Skin Cancer. *Cancer Metastasis Rev* **30**:465-480.
- Sadelain M, Brentjens R and Riviere I (2009) The Promise and Potential Pitfalls of Chimeric Antigen Receptors. *Curr Opin Immunol* **21**:215-223.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) Signaling Pathways. *EMBO J* **17**:1675-1687.
- Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang WT, Plesa G, Hege KM, Vogel AN, Kalos M, Riley JL, Deeks SG, Mitsuyasu RT, Bernstein WB, Aronson NE, Levine BL, Bushman FD and June CH (2012) Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Sci Transl Med* **4**:132ra53.
- Schreiber RD, Old LJ and Smyth MJ (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**:1565-1570.
- Schwarz BA and Bhandoola A (2006) Trafficking From the Bone Marrow to the Thymus: a Prerequisite for Thymopoiesis. *Immunol Rev* **209**:47-57.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson P (1994) Pharmacological and Biochemical Demonstration of the Role of Cyclooxygenase 2 in Inflammation and Pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12013-12017.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD (2001) IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. *Nature* **410**:1107-1111.
- Shao J, Jung C, Liu C and Sheng H (2005) Prostaglandin E2 Stimulates the Beta-Catenin/T Cell Factor-Dependent Transcription in Colon Cancer. *J Biol Chem* **280**:26565-26572.
- Sharif-Askari E, Alam A, Rheaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J and Sekaly RP (2001) Direct Cleavage of

- the Human DNA Fragmentation Factor-45 by Granzyme B Induces Caspase-Activated DNase Release and DNA Fragmentation. *EMBO J* **20**:3101-3113.
- Shen R, Su ZZ, Olsson CA and Fisher PB (1995) Identification of the Human Prostatic Carcinoma Oncogene PTI-1 by Rapid Expression Cloning and Differential RNA Display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6778-6782.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and Dubois RN (1998a) Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res* **58**:362-366.
- Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN and Beauchamp RD (1998b) Induction of Cyclooxygenase-2 by Activated Ha-Ras Oncogene in Rat-1 Fibroblasts and the Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J Biol Chem* **273**:22120-22127.
- Sheu GT and Traugh JA (1999) A Structural Model for Elongation Factor 1 (EF-1) and Phosphorylation by Protein Kinase CKII. *Mol Cell Biochem* **191**:181-186.
- Shimokawa T, Kulmacz RJ, DeWitt DL and Smith WL (1990) Tyrosine 385 of Prostaglandin Endoperoxide Synthase Is Required for Cyclooxygenase Catalysis. *J Biol Chem* **265**:20073-20076.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM and . (1992) RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement. *Cell* **68**:855-867.
- Simmons DL, Botting RM and Hla T (2004b) Cyclooxygenase Isozymes: the Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* **56**:387-437.
- Simmons DL, Botting RM and Hla T (2004a) Cyclooxygenase Isozymes: the Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* **56**:387-437.
- Sinha P, Kohl S, Fischer J, Hutter G, Kern M, Kottgen E, Dietel M, Lage H, Schnolzer M and Schadendorf D (2000) Identification of Novel Proteins Associated With the Development of Chemoresistance in Malignant Melanoma Using Two-Dimensional Electrophoresis. *Electrophoresis* **21**:3048-3057.
- Smith WL, DeWitt DL and Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem* **69**:145-182.
- Smith WL and Lands WE (1972) Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids During Prostaglandin Biosynthesis by Sheep Vesicular Gland. *Biochemistry* **11**:3276-3285.
- Solomon LM, Juhlin L and Kirschenbaum MB (1968) Prostaglandin on Cutaneous Vasculature. *J Invest Dermatol* **51**:280-282.
- Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M and Taketo MM (2001) Acceleration of Intestinal Polyposis Through

- Prostaglandin Receptor EP2 in Apc(Delta 716) Knockout Mice. *Nat Med* **7**:1048-1051.
- Specht C, Bexten S, Kolsch E and Pauels HG (2001) Prostaglandins, but Not Tumor-Derived IL-10, Shut Down Concomitant Tumor-Specific CTL Responses During Murine Plasmacytoma Progression. *Int J Cancer* **91**:705-712.
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II and Smith WL (1998) Subcellular Localization of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2 by Immunoelectron Microscopy. *J Biol Chem* **273**:9886-9893.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B, Godio L, Patterson S, Rodriguez-Bigas MA, Jester SL, King KL, Schumacher M, Abbruzzese J, Dubois RN, Hittelman WN, Zimmerman S, Sherman JW and Kelloff G (2000) The Effect of Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis. *N Engl J Med* **342**:1946-1952.
- Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR and Palmer CN (2004) Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta Stimulates the Proliferation of Human Breast and Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **64**:3162-3170.
- Stewart TJ and Abrams SI (2008) How Tumours Escape Mass Destruction. *Oncogene* **27**:5894-5903.
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S and Griffiths GM (2001) The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* **15**:751-761.
- Street SE, Cretney E and Smyth MJ (2001) Perforin and Interferon-Gamma Activities Independently Control Tumor Initiation, Growth, and Metastasis. *Blood* **97**:192-197.
- Sugimoto Y and Narumiya S (2007) Prostaglandin E Receptors. *J Biol Chem* **282**:11613-11617.
- Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA and Trapani JA (2000) Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B-Mediated Caspase Activation. *J Exp Med* **192**:1403-1414.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA and Kurth K (2005) Bacillus Calmette-Guerin Versus Chemotherapy for the Intravesical Treatment of Patients With Carcinoma in Situ of the Bladder: a Meta-Analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *J Urol* **174**:86-91.
- Tatsuka M, Mitsui H, Wada M, Nagata A, Nojima H and Okayama H (1992) Elongation Factor-1 Alpha Gene Determines Susceptibility to Transformation. *Nature* **359**:333-336.

- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE and Berzofsky JA (2003) Transforming Growth Factor-Beta Production and Myeloid Cells Are an Effector Mechanism Through Which CD1d-Restricted T Cells Block Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Tumor Immunosurveillance: Abrogation Prevents Tumor Recurrence. *J Exp Med* **198**:1741-1752.
- Tessner TG, Muhale F, Riehl TE, Anant S and Stenson WF (2004) Prostaglandin E2 Reduces Radiation-Induced Epithelial Apoptosis Through a Mechanism Involving AKT Activation and Bax Translocation. *J Clin Invest* **114**:1676-1685.
- Thompson HJ, Jiang C, Lu J, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R and Ahnen DJ (1997) Sulfone Metabolite of Sulindac Inhibits Mammary Carcinogenesis. *Cancer Res* **57**:267-271.
- Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ and Kast WM (1996) Peptide Vaccination Can Lead to Enhanced Tumor Growth Through Specific T-Cell Tolerance Induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7855-7860.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM and Sznol M (2012) Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* **366**:2443-2454.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.
- Tsai A, Palmer G, Xiao G, Swinney DC and Kulmacz RJ (1998) Structural Characterization of Arachidonyl Radicals Formed by Prostaglandin H Synthase-2 and Prostaglandin H Synthase-1 Reconstituted With Manganese Protoporphyrin IX. *J Biol Chem* **273**:3888-3894.
- Tsujii M, Kawano S and DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 Expression in Human Colon Cancer Cells Increases Metastatic Potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3336-3340.
- Vajdic CM and van Leeuwen MT (2009) Cancer Incidence and Risk Factors After Solid Organ Transplantation. *Int J Cancer* **125**:1747-1754.
- Valcarcel M, Mendoza L, Hernandez JJ, Carrascal T, Salado C, Crende O and Vidal-Vanaclocha F (2011) Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Melanoma Cell Adhesion and Growth in the Bone Marrow Microenvironment Via Tumor Cyclooxygenase-2. *J Transl Med* **9**:142.
- Valitutti S, Dessing M and Lanzavecchia A (1993) Role of CAMP in Regulating Cytotoxic T Lymphocyte Adhesion and Motility. *Eur J Immunol* **23**:790-795.

- Waddell WR and Loughry RW (1983) Sulindac for Polyposis of the Colon. *J Surg Oncol* **24**:83-87.
- Walker C, Kristensen F, Bettens F and deWeck AL (1983) Lymphokine Regulation of Activated (G1) Lymphocytes. I. Prostaglandin E2-Induced Inhibition of Interleukin 2 Production. *J Immunol* **130**:1770-1773.
- Walker W and Rotondo D (2004) Prostaglandin E2 Is a Potent Regulator of Interleukin-12- and Interleukin-18-Induced Natural Killer Cell Interferon-Gamma Synthesis. *Immunology* **111**:298-305.
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED and Riddell SR (1995) Reconstitution of Cellular Immunity Against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones From the Donor. *N Engl J Med* **333**:1038-1044.
- Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK and DuBois RN (2004) Prostaglandin E(2) Promotes Colorectal Adenoma Growth Via Transactivation of the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta. *Cancer Cell* **6**:285-295.
- Wang JF, Engelsberg BN, Johnson SW, Witmer C, Merrick WC, Rozmiarek H and Billings PC (1997) DNA Binding Activity of the Mammalian Translation Elongation Complex: Recognition of Chromium- and Transplatin-Damaged DNA. *Arch Toxicol* **71**:450-454.
- Wang RF (2006) Immune Suppression by Tumor-Specific CD4+ Regulatory T-Cells in Cancer. *Semin Cancer Biol* **16**:73-79.
- Warner JR and McIntosh KB (2009) How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol Cell* **34**:3-11.
- Whitmire JK, Tan JT and Whitton JL (2005) Interferon-Gamma Acts Directly on CD8+ T Cells to Increase Their Abundance During Virus Infection. *J Exp Med* **201**:1053-1059.
- Wiemer AJ, Hegde S, Gumperz JE and Huttenlocher A (2011) A Live Imaging Cell Motility Screen Identifies Prostaglandin E2 As a T Cell Stop Signal Antagonist. *J Immunol* **187**:3663-3670.
- Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, Denison U, Muller-Holzner E and Marth C (2000) Interferon-Gamma in the First-Line Therapy of Ovarian Cancer: a Randomized Phase III Trial. *Br J Cancer* **82**:1138-1144.
- Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM and Weber JS (2007) Programmed Death-1 Blockade Enhances Expansion and Functional Capacity of Human Melanoma Antigen-Specific CTLs. *Int Immunol* **19**:1223-1234.
- Wool IG (1979) The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes. *Annu Rev Biochem* **48**:719-754.

- Wool IG (1996) Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins. *Trends Biochem Sci* **21**:164-165.
- Xiao G, Chen W and Kulmacz RJ (1998) Comparison of Structural Stabilities of Prostaglandin H Synthase-1 and -2. *J Biol Chem* **273**:6801-6811.
- Xu L, Han C and Wu T (2006) A Novel Positive Feedback Loop Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Delta and Prostaglandin E2 Signaling Pathways for Human Cholangiocarcinoma Cell Growth. *J Biol Chem* **281**:33982-33996.
- Yano H, Kinuta M, Tateishi H, Nakano Y, Matsui S, Monden T, Okamura J, Sakai M and Okamoto S (1999) Mast Cell Infiltration Around Gastric Cancer Cells Correlates With Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Gastric Cancer* **2**:26-32.
- Yu H, Kortylewski M and Pardoll D (2007) Crosstalk Between Cancer and Immune Cells: Role of STAT3 in the Tumour Microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**:41-51.
- Yu Z, Ford BN and Glickman BW (2000) Identification of Genes Responsive to BPDE Treatment in HeLa Cells Using CDNA Expression Assays. *Environ Mol Mutagen* **36**:201-205.
- Zhang H, Tian M, Xiu C, Wang Y and Tang G (2013) Enhancement of Antitumor Activity by Combination of Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells and Celecoxib in a Rat Glioma Model. *Oncol Res* **20**:447-455.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC and Coukos G (2003) Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **348**:203-213.
- Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K and Isakson PC (1997) Inhibition of Cyclooxygenase-2 Rapidly Reverses Inflammatory Hyperalgesia and Prostaglandin E2 Production. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1069-1075.
- Zhu J, Yamane H and Paul WE (2010b) Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (*). *Annu Rev Immunol* **28**:445-489.
- Zhu J, Yamane H and Paul WE (2010a) Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (*). *Annu Rev Immunol* **28**:445-489.
- Ziegler SF, Ramsdell F and Alderson MR (1994) The Activation Antigen CD69. *Stem Cells* **12**:456-465.
- Zinkernagel RM and Doherty PC (1979) MHC-Restricted Cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T-Cell Restriction-Specificity, Function, and Responsiveness. *Adv Immunol* **27**:51-177.
- Zou W and Chen L (2008) Inhibitory B7-Family Molecules in the Tumour Microenvironment. *Nat Rev Immunol* **8**:467-477.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Schuler für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung während meiner Promotion. Vor allem für den regelmäßigen und konstruktiven Austausch möchte ich mich bedanken.

Dr. Frank Breitenbücher möchte ich für die ausgezeichnete Unterstützung und die gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe danken.

Prof. Dr. Lang danke ich für die Bereitstellung der p14 Mäuse und die wissenschaftlichen Anregungen für meine Arbeit. Vielen Dank auch an Halime und Katja für die Hilfe bei den Interferon-ELISAs.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft danken, besonders den „Lab Girls“ (und natürlich Malte) für die lustige Zeit. Ein besonderer Dank gilt Dr. Boyka Markowa für die vielen praktischen Tipps und Kniffe im Laboralltag.

Danken möchte ich auch meinen Freunden für die Geduld, besonders Caro für das „Survival Kit“.

Florian danke ich für seine fortwährende Unterstützung.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klonogenes Überleben von E1A-MEF und Myc-MEF nach Ko-Kultur mit E1A-spezifischen <i>St42Rag2</i> ^{-/-} -Splenozyten.	15
Abb. 2: Funktionelle Expression der cDNA-Bank in E1A-MEF und „Screening“-Strategie zur Identifizierung von Resistenz vermittelnden Targets gegenüber zytotoxischen T-Zellen.....	17
Abb. 3: Der Prostaglandin Syntheseweg.....	18
Abb. 4: Die PGE ₂ Signalkaskade.....	21
Abb. 5: Genotypisierungsstrategie zur Identifizierung von T-Zellrezeptor transgenen <i>St42Rag2</i> ^{-/-} Mäusen unter Verwendung einer 3-Primer-PCR.	48
Abb. 6: Identifizierung des Genotypes durch Rückkreuzung mit dem Wildtyp.	61
Abb. 7: Überprüfung der COX-2 Überexpression in E1A-MEF mittels Immunoblotting.	64
Abb. 8: Klonogenes Überleben von E1A-MEF nach Ko-Kultur mit <i>St42Rag2</i> ^{-/-} -Splenozyten.	65
Abb. 9: Überlebenskurve von NOD/SCID-Mäusen nach Implantation von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCOX-2 Tumorzellen mit und ohne adoptivem T-Zelltransfer.	67
Abb. 10: Wachstum von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 in <i>St42Rag2</i> ^{-/-} und C57Bl/6 Mäusen.	69
Abb. 11: Messung der PGE ₂ -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels Enzym-Immuno-Assay.....	70
Abb. 12: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-mmCox-2 und E1A-MEF-hsCOX-2 mit und ohne Zugabe von Celecoxib.....	72
Abb. 13: Analyse der Mutante E1A-MEF-mmCox-2 ^{Y371F}	73
Abb. 14: Expression wildtypischer und mutanter mmCox-2 Proteine.....	74
Abb. 15: Analyse der PGE ₂ -Sekretion und deren Einfluss auf das Überleben der Cox-2 Mutanten in der Ko-Kultur.....	75
Abb. 16: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellfraktion mit subgenomischer DNA nach Induktion von Apoptose in E1A-MEF.....	78
Abb. 17: Induktion von Apoptose in E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in verschiedenen Dosen.	79
Abb. 18: Oberflächenexpression des MHC Klasse I Moleküls H2-D ^b auf E1A-MEF.	81

Abb. 19: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit E1A-Splenozyten mit und ohne vorherige Peptidbeladung.....	81
Abb. 20: Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD69 auf CD8 ⁺ , TCR-transgenen T-Zellen nach Ko-Inkubation mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2.	83
Abb. 21: Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD107a auf CD8 ⁺ , TCR-transgenen T-Zellen nach Ko-Inkubation mit E1A-MEF und E1A-MEF mmCox-2.	84
Abb. 22: IFN-gamma-Sekretion von TCR-transgenen ST42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2.	85
Abb. 23: Einfluss der COX-2 Expression von E1A-MEF auf p14 Splenozyten.....	86
Abb. 24: Klonogenes Überleben von E1A-MEF und E1A-MEF-mmCox-2 nach Ko-Kultur mit ST42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten und Zugabe von exogenem IFN-gamma.	88
Abb. 25: Identifizierung neuer, Resistenz vermittelnder Kandidatengene.	90
Abb. 26: Stabile Expression des eukaryotischen Elongationsfaktors 1Bδ und des humanen ribosomalen Proteins S9 in E1A-MEF.....	91
Abb. 27: Klonogenes Überleben von E1A-MEF-EF1Bδ und E1A-MEF-RPS9 nach Ko-Kultur mit ST42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten.	92
Abb. 28: Induktion von Apoptose in E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ.....	94
Abb. 29: Induktion von Apoptose in E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ durch Bestrahlung mit UV in verschiedenen Dosen.	95
Abb. 30: Überprüfung der Aktivierung der MAPK- und PI3K-Signalwege mittels Immunoblotting.	96
Abb. 31: IFN-gamma Sekretion von St42Rag2 ^{-/-} -Splenozyten nach Ko-Kultur mit E1A-MEF, E1A-MEF-RPS9 und E1A-MEF-EF1Bδ.....	97
Abb. 32: Struktureller Aufbau der kleinen ribosomalen Untereinheit 40S.....	103
Abb. 33: Elongationsphase der Translation.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der im Labor verwendeten Geräte.....	27
Tabelle 2: Auflistung der benutzten Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien	28
Tabelle 4: Auflistung der retroviralen Expressionsvektoren	31
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zelllinien.....	32
Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligoprimer	32
Tabelle 7: Liste der verwendeten primären Antikörper zur Western-Blot Analyse	33
Tabelle 8: Liste der verwendeten sekundären Antikörper zur Western-Blot Analyse	33
Tabelle 9: Liste der verwendeten fluorophor-gekoppelten Antikörper zur Verwendung in der Durchflusszytometrie	33
Tabelle 10: Liste der verwendeten Datenbanken.....	34
Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels	56

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema *„Identifikation und molekulare Charakterisierung von Resistenzmechanismen gegenüber zellulären Immuneffektoren zur Optimierung von Krebsimmuntherapien“* zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Corinna Göbel befürworte.

Essen, den _____

Name des wissenschaftl.
Betreuers/Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen

Unterschrift d. wissenschaftl.
Betreuers/Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in