

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

**„Untersuchung zu ubiquitär und nicht ubiquitär
exprimierten Antigenen bei Alloantigen-vermittelter
T-zellulärer Reaktion nach allogener
Stammzelltransplantation“**

**Stella Ramanantenasoa Robert
aus Antananarivo/Madagaskar**

2014



Westfälische Wilhelms-Universität Münster

„Untersuchung zu ubiquitär und nicht ubiquitär exprimierten Antigenen bei Alloantigen-vermittelter T-zellulärer Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Stella Ramanantenasoa Robert
aus Antananarivo/Madagaskar

2014

Als Dissertation genehmigt von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Prof. Dr. W.-M. Weber
Erster Gutachter:	Prof. Dr. B. Moerschbacher
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. M. Stelljes
Tag der Disputation:	--- 27. Januar 2015 -----
Tag der Promotion:	--- 06. Februar 2015 -----

„Wenn du ein Schiff bauen willst, dann trommle nicht Männer zusammen, um Holz zu beschaffen, Aufgaben zu vergeben und die Arbeit einzuteilen, sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem weiten, endlosen Meer.“

Antoine de Saint Exupéry (1900-1944)

Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist heutzutage eine der effektivsten Formen der zellulären Immuntherapie gegen maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems. Nach vorangegangener Konditionierung des Patienten durch Chemotherapie und/oder Bestrahlung werden das hämatopoetische System sowie das zelluläre Immunsystem des Empfängers durch hämatopoetische Stammzellen eines gesunden, histokompatiblen Spenders ersetzt.

In der klinischen Forschung zur allogenen Immunzelltherapie von Leukämien, ist u.a. die Charakterisierung von minor Histokompatibilitätsantigenen (mHags) und Tumorantigenen als Zielstruktur der Spender-gegen-Tumor (Graft-versus-tumor, GvT)-Reaktion und deren Nutzen für den therapeutischen Einsatz nach einer SZT von zentralem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel des vom Y-Chromosom kodierten männlichen mHags HY, den Einfluss auf die GvHD- und GvT-Reaktion nach einer SZT zu evaluieren. Diese Effekte wurden in Abhängigkeit der Expression im Empfänger-Organismus untersucht. Dabei wurde zwischen einer ubiquitären oder nur selektiven, tumorassoziierten Expression unterschieden. Darüber hinaus sollten die an der GvT-Reaktion beteiligten Effektorzellen charakterisiert werden.

Die weibliche, murine Leukämie-Zelllinie C1498 (Ursprung: C57BL/6) wurde mit dem UTY-Gen, dem mHag HY codierenden Gen, stabil transduziert. Der neu etablierte Tumor C1498-GFP-UTY wurde im haploidenten Transplantationsmodell, in dem C57BL/6-Tiere als Spender und (C57BL/6 x BALB/c)F1-Tiere als Empfänger dienen, eingesetzt und optimiert. Eine Alloreaktion gegen den weiblichen Wildtyp-Tumor C1498 war, aufgrund der MHC- [H-2K^b] und mHag-Parität zwischen Spenderzellen und Tumor, ausgeschlossen. So sollte, wenn eine alloreaktive Reaktion auf den transgenen Tumor C1498-GFP-UTY zu verzeichnen war, die T-zelluläre Erkennung nur über das Alloantigen HY vermittelt werden. Sowohl die GvHD- als auch die GvT-Reaktion wurden in regelmäßigen Intervallen mit Hilfe einer festgelegten GvHD-Skala ermittelt bzw. durch das Tumorstadium quantifiziert.

Nach Versuchsende wurden die CD3⁺-T-Zellen aus den transplantierten Versuchstieren isoliert und für die *in vitro*-Nachweisversuche, wie den spezifischen T-Zell-Aktivitäts-Nachweis (IFN- γ -ELISpot) oder die Bestimmung des T-Zell-Repertoires, verwendet. Histologische und immunhistochemische Analysen wurden sowohl aus den Geweben als auch aus den extrahierten Tumoren der Versuchstiere durchgeführt.

In männlichen C57BL/6N-Mäusen [H-2K^b] zeigten sowohl der C1498-Wildtyp- als auch der C1498-GFP-UTY-transgene Tumor die gleiche Wachstumskinetik. In weiblichen C57BL/6N-Mäusen [H-2K^b], die vorher mit männlichen Milzzellen immunisiert wurden, wurde hingegen ein signifikant verlangsamtes Wachstum des transgenen Tumors festgestellt, das auf die Immunogenität des Alloantigens HY deutete. In unserem Transplantationsmodell wuchs das Transplantat an Tag 12 bis 14 nach Transplantation an. Aufgrund der haploidenten Spender-Empfänger-Konstellation entwickelten die F1-Empfänger eine GvHD. Dabei entwickelten die männlichen Empfänger eine signifikant stärkere GvHD als die weiblichen Empfänger. Bestand über einen gewissen Zeitraum eine starke GvHD, führte dies zum Tod der Versuchstiere, was die hohe Letalitätsrate der männlichen Empfänger erklärt.

Darüber hinaus zeigten der Wildtyp- und der transgene Tumor in den männlichen F1-Empfängern die gleiche Wachstumskinetik, unabhängig davon, ob die Transplantate vorab gegen HY oder HX (das weibliche Pendant zu HY) immunisiert wurden. Bei den weiblichen F1-Empfängern konnte jedoch eine Regression des Wachstums des transgenen Tumors in der Gruppe festgestellt werden, deren Transplantat mit männlichen Milzzellen immunisiert war. In der immunhistochemischen Analyse zeigte diese Gruppe eine signifikant höhere Infiltration von CD8⁺-T-Zellen in den Tumor, sowie eine dominante T-Zell-Rezeptor-Familie (TBV21/22) in ihren T-Zell-Rezeptor-Profilen, die auf spezifische anti-HY T-Zell-Rezeptor-Klone deutete.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ubiquitär exprimierte mHags, wie das männliche mHag HY, relevante Zielstrukturen der GvHD sind, jedoch mit einem geringeren Einfluss auf den erwünschten Anti-Tumor-Effekt wirken.

Abstract

Allogeneic stem cell transplantation (SCT) is nowadays one of the most effective forms of cellular immunotherapy against malignant diseases of the hematopoietic system. After prior conditioning therapy by chemotherapy and/or radiation, the hematopoietic system as well as the cellular immune system of the recipient is replaced by transferred hematopoietic stem cells from a healthy histocompatible donor.

In clinical research for adoptive immunotherapy of leukemia characterization of minor histocompatibility antigens (mHag) and tumor associated antigens (TAA) as a target of antitumor response (GvT) and their utility as therapeutic uses after stem cell transplantation (SCT) move more in focus.

In this study, we wanted to clarify how far the male mHag HY encoded by the Y chromosome can affect the GvHD and GvT reactions after SCT, when it is expressed ubiquitously on healthy tissues or selective on tumor only in recipients. In addition, the effector cells involved in the GvT reaction were characterized.

We generated a murine female leukemia cell line C1498-GFP-UTY (Origin: C57BL/6) which stably expressed the mHag HY. To evaluate the impact of the alloantigen HY as a target for GvT reaction, C1498-GFP-UTY was applied in the haploidentical "Parent-into-F1-generation" transplantation model. Due to the MHC [H-2K^b] and mHag parity between donor and tumor, an alloreactivity against the female wild type tumor C1498 was not expected. In case of any relevant antitumor effect, the GvT reaction should be directed against HY. Both GvHD and the antitumor effect (tumor growth) were determined at regular intervals.

CD3⁺ T cells were isolated from transplanted recipients which were then used for specific T-cell activity assays (IFN- γ -*ELISpot*) or for determination of T cell repertoire. Moreover, histological and immunohistochemical analysis were performed both from tissues and tumors from transplanted recipients.

Both the C1498 wild type and the C1498-GFP-UTY transgenic tumor showed the same growth kinetics in male C57BL/6N mice [H-2K^b]. In female C57BL/6N mice [H-2K^b], which were previously immunised with male spleen cells, a significantly slower growth of the transgenic tumor was observed, which indicated the immunogenicity of the alloantigen HY. In our transplantation model, the engraftment of allogeneic haematopoietic cells was achieved on day 12 till 14 after transplantation. Due to the additional haplotype H-2K^d in F1 recipients [H-2K^{bxd}], which is allogeneic for donor cells [H-2K^b], they develop GvHD after SCT. The male recipients developed a significantly more severe GVHD than the female. Did the acute GvHD reach a scale of 7-8 of GvHD and remained these for some time, this led to the death of animals, which explains the high mortality rate of male recipients.

Furthermore, the male recipients showed similar growth pattern of the wild type and the transgenic tumor C1498-GFP-UTY, regardless of whether the grafts were immunised with male (HY) or female (HX) spleen. In contrast, immunisation of female donors against HY resulted in a significantly reduced tumor growth of the transgenic tumor C1498-GFP-UTY in female recipients. Moreover, immunohistochemical analysis showed a significantly higher infiltration of CD8⁺ T cells into the tumor in this group of female recipients, as well as the T cell receptor profiles showed a dominant T-cell receptor family (TBV21/22) probably indicated for specific anti-HY T cell receptor clones.

Our experimental data indicate that minor Histocompatibility Antigens like the male mHag HY are relevant targets for T cells mediated GvH reaction but less important for the desired GvT effect.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abstract	VI
1. Einleitung.....	1
Das Immunsystem und das blutbildende System.....	1
Maligne Erkrankungen	4
Entwicklung einer Immuntoleranz	5
Stammzelltransplantation	6
Zelluläre Immunreaktionen nach allogener SZT.....	7
i. Host-versus-Graft-Disease (HvGD)	8
ii. <i>Graft-versus-Host-Disease</i> (GvHD)	8
iii. <i>Graft-versus-Leukemia/Tumor</i> (GvL/GvT).....	12
Molekulare Grundlagen des Immunsystems	13
i. <i>Major Histocompatibility Complex</i> (MHC).....	13
ii. <i>Minor Histocompatibility Antigen</i> (mHag)	15
iii. Das männliche minor Histokompatibilitätsantigen „HY“	15
iv. Tumorantigene (engl. <i>Tumor Antibody Generating</i>).....	16
Das murine <i>Parent-into-F1-Generation</i> -Transplantationsmodell	18
Ziel der vorliegenden Arbeit	20
2. Ergebnisse	21
2.1 Etablierung einer Leukämiezelllinie mit einer stabilen HY-Expression	22
2.1.1 Retrovirale Transduktion mit Hilfe des <i>Gateway Cloning Systems</i> ..	22
2.1.2 Nachweis des UTY-Gens	29
2.1.3 HY-Expression	29
2.1.4 <i>In vivo</i> -Passagierung der Tumorzelllinien.....	31
2.2 C1498-GFP-UTY <i>in vivo</i>	33
2.2.1 Immunogenität des exprimierten Alloantigens HY.....	33
2.2.2 Tumorwachstumskinetik in Abhängigkeit der Zellzahl	33
2.2.3 Tumorwachstumskinetik in Abhängigkeit der Inokulationszeit.....	34
2.3 Allogene Stammzelltransplantation	37
2.3.1 Konditionierungstherapie.....	37
2.3.2 GvHD-Entwicklung in Abhängigkeit der Lymphozyten-Zellzahl und des Spenders	38

2.3.3	Modulation der GvHD- und der GvT-Reaktion in Abhängigkeit der transferierten Lymphozyten-Zellzahl.....	40
2.3.4	Chimärismus-Analyse	41
2.3.5	Das männliche mHag HY ist ein GvHD-Target	42
2.3.6	Höhere Mortalitätsrate bei einer HY mHags-Disparität.....	43
2.4	Einfluss des mHags HY auf den GvT-Effekt nach SZT	44
2.4.1	C1498-GFP-UTY-Wachstumskinetik in Abhängigkeit des HY-Expressions-musters (in ♀ vs. ♂ CB6F1-Empfängern)	44
2.4.2	HY wird tumorspezifisch exprimiert (TAA) in ♀ CB6F1-Empfängern.....	46
2.4.3	HY wird ubiquitär exprimiert in ♂ CB6F1-Empfängern	49
2.4.4	Kontrolltransplantation mit männlichem Transplantat (HY-kompatibel)	51
2.5	Differenzierte Zytokin-Sekretion der allogenen transplantierten Gruppen... ..	52
2.5.1	IFN- γ -Expression als anti-HY-spezifische T-Zellaktivität	52
2.5.2	Zytokin-Sekretion der allogenen transplantierten Empfängertiere.....	54
2.6	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der Effektorzellen	57
2.6.1	Identifizierung spezifischer anti-HY-CD8 ⁺ -T-Zellen	57
2.6.2	<i>In vivo-Imaging</i> und Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors	58
2.6.3	Etablierung von T-Zell-Rezeptor(TCR)-Profilen (<i>Spectratyping</i>)	61
3	Diskussion	67
4	Fazit und Ausblick	80
5	Material und Methoden.....	82
5.1	Zellkultur.....	82
5.1.1	Kultivierung muriner Tumorzelllinien	82
5.1.2	Murine Tumorzelllinien	82
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer	83
5.2	Molekularbiologische Methoden	84
5.2.1	RNA-Isolierung.....	84
5.2.2	cDNA-Synthese: Reverse Transkription.....	84
5.2.3	DNA-Isolierung.....	85
5.2.4	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	85
5.2.5	Geschlechtsbestimmung mit der Standard-PCR	85
5.2.6	Nachweis des Ziel-Gens UTY	86
5.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	87

5.2.8	Oligonukleotidprimer	88
5.2.9	Primer für die Standard-PCR	89
5.2.10	Primer für die Sequenzierung.....	89
5.2.11	Primer für die Real-time-quantitative PCR (qPCR).....	89
5.2.12	Primer für die <i>Spectratyping-/Immunoscope</i> -Analyse	90
5.2.13	<i>Real-time-quantitative</i> PCR (qPCR).....	91
5.2.14	Stabile Transfektion/Gateway Cloning System	93
5.3	Proteinbiochemie.....	99
5.3.1	Protein-Isolierung	99
5.3.2	SDS-PAGE.....	99
5.3.3	Immunoblotting (<i>Western Blotting</i>).....	100
5.4	<i>In vitro</i> -Generierung von T-Zellklonen gegen das HY-Antigen	101
5.4.1	Bestrahlung der Targetzellen	101
5.4.2	<i>Primäre mixed tumor lymphocyte culture (MTLC)</i>	102
5.4.3	<i>Sekundäre mixed tumor lymphocyte culture (MTLC)</i>	102
5.4.4	Subklonieren der HY-spezifischen T-Zellen	102
5.4.5	<i>Screening</i> der positiven T-Zellen.....	103
5.4.6	Kultivierung der positiven T-Zellklone.....	103
5.5	T-Zell-Rezeptor(TCR)-Profil (<i>Spectratyping</i>)	103
5.6	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i> (IFN- γ -ELISpot).....	109
5.7	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS</i>)	110
5.7.1	Antikörper-Färbung	111
5.7.2	Pentamer-Färbung	112
5.7.3	Sorten.....	113
5.8	<i>Cytometric Bead Array</i> -Analyse (CBA).....	113
5.9	Histologie.....	116
5.9.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	116
5.9.2	Immunhistochemische Analyse.....	117
5.10	Tierexperimentelle Methoden	118
5.10.1	Murines Transplantationsmodell	119
5.10.2	Narkotisieren der Mäuse	119
5.10.3	Stammzellgewinnung	120
5.10.4	Isolierung von Splenozyten (Milzzellen)	120
5.10.5	Gewinnung von Knochenmarkzellen.....	121

5.10.6	Separation von Zellpopulationen	121
5.10.7	Immunisierung der Spendertiere	122
5.10.8	Konditionierung/Bestrahlung der Empfängertiere.....	123
5.10.9	Stammzelltransplantation	123
5.10.10	Tumorapplikation	123
5.10.11	GvHD-Monitoring	123
5.10.12	Tumorkinetik	124
5.10.13	<i>Fluorescence reflectance imaging</i> (FRI)	124
5.11	Statistisches Auswertungsverfahren	125
5.11.1	Bestimmung der Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SEM)	125
5.11.2	Bestimmung der Signifikanz.....	126
6	Anhang	127
6.1	UTY-Gensequenz.....	127
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	128
6.3	Literaturverzeichnis	129
	Danksagung	1435

1. Einleitung

Das Immunsystem und das blutbildende System

Das Immunsystem ist ein komplexer Abwehrmechanismus, der sich im Laufe der Evolution entwickelt hat und hochdifferenziert ist. Für die heutige hochspezialisierte Form unseres Immunsystems hat die Evolution über 400 Millionen Jahre benötigt¹. Die zentralen Funktionen dieses Systems sind, den Organismus vor verschiedenen Krankheitserregern (Viren, Bakterien, pathogene Pilze, eukaryotische Parasiten) und anderen schädlichen Umwelteinflüssen (UV-Strahlen, Toxine), aber auch gegen eigene veränderte oder falsch funktionierende Zellen zu schützen.

Alle zellulären Komponenten des Blutsystems bzw. des Immunsystems stammen von pluripotenten, hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks (*Medulla ossium*) ab.

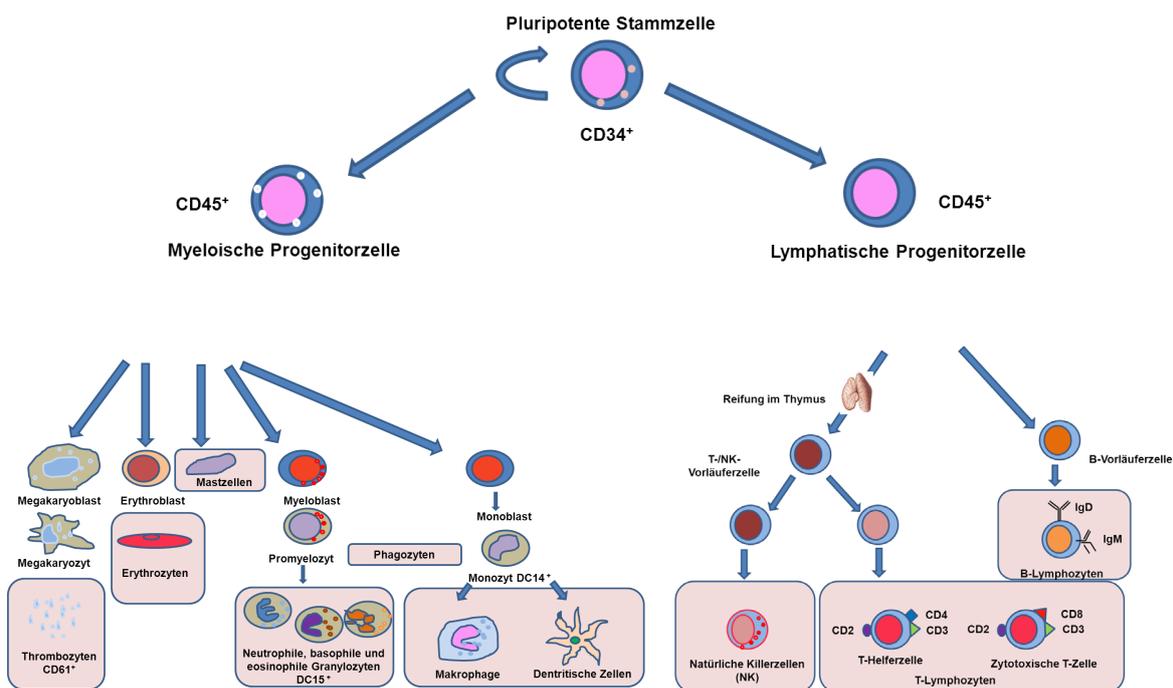


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Differenzierungsstufen der Hämatopoese. Die Entwicklung der unterschiedlichen Zelltypen des Immunsystems aus der pluripotenten Stammzelle, die während der Embryogenese zunächst die fötale Leber besiedeln. Ab der neonatalen Phase verliert die Leber ihre Funktion als lymphatisches Organ und die Stammzellen wandern ins Knochenmark ein (Dexter & Spooncer, 1987).

¹ Taschenatlas der Immunologie: Antonio Pezzutto, Timo Ulrichs, Gerd-Rüdiger Burmester vom Thieme Verlag

Pro Tag werden 18×10^{10} Erythrozyten und 7×10^{10} Leukozyten generiert und bei Bedarf kann ein Vielfaches mehr produziert werden. Die pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich lebenslang zu erneuern, sie sind jedoch weniger teilungsaktiv.

Eine funktionierende und effektive Immunantwort lässt sich in 4 Stufen gliedern²:

- I. Die immunologische Erkennung: Eine Gefährdung durch potenzielle Krankheitserreger muss möglichst frühzeitig erkannt werden. Die Immunzellen müssen körpereigene (selbst) und fremde molekulare Strukturen, die als gefährlich eingestuft werden, unterscheiden (Geenen, Brilot, Hansenne, Renard, & Martens, 2003). Der erste Kontakt mit dem Pathogen kann sowohl durch die Leukozyten des angeborenen Immunsystems als auch durch die Lymphozyten vermittelt werden.
- II. Die Immuneffektorfunktion beschreibt die Funktion der T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems als Effektorzellen im inflammatorischen Milieu. Dieses wird durch die verschiedenen freigesetzten Zytokine, das Komplementsystem, die Akute-Phase-Proteine und die Antikörper erzeugt. Die T- und B-Lymphozyten sind verantwortlich für die zelluläre bzw. humorale Immunantwort.
- III. Die Immunregulation: Eine Immunantwort sollte nur bei Bedarf eingeschaltet werden bzw. es muss gewährleistet sein, dass das Immunsystem nach einer effizienten Immunreaktion zurückgefahren wird. Dies geschieht durch verschiedene Zytokine sowie die regulatorischen T-Lymphozyten (Treg). Bei Störung dieses Mechanismus treten Autoimmunerkrankungen bzw. Allergien auf.
- IV. Das immunologische Gedächtnis: Die T- und B-Effektorzellen können sich durch klonale Selektion in T- und B-Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Kommt der Organismus mit dem gleichen Erreger erneut in Kontakt, kann durch diese Gedächtniszellen eine schnellere und gezielte Abwehrreaktion hervorgerufen werden. Somit kann ein erneuter Ausbruch der Krankheit verhindert werden. Der Organismus ist nun immun gegen dieses bestimmte Pathogen.

² Janeway Immunologie: K. Murphy, P. Travers, M Walport vom Spektrum Verlag

Bei dem unspezifischen Schutz gegen Erreger und Umwelteinflüsse steht das angeborene Immunsystem als Erstes zur Verfügung. Die angeborene Immunität wird als nicht-klonaler Abwehrmechanismus bezeichnet, da kein spezifischer Zellklon benötigt wird, um es zu aktivieren. Sie zeichnet sich durch eine schnelle und lokale, in Form einer akuten Entzündung, wirkungsvolle Abwehrreaktion aus und bleibt in ihrem Wirkmechanismus immer gleich. Zu den Mediatoren der angeborenen Immunität gehören phagozytierende Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), antigenpräsentierende Zellen (Dendritische Zellen), Mastzellen sowie lösliche Effektormoleküle des Komplementsystems. Bei der Freisetzung der Effektormoleküle werden die Blutgefäße erweitert und dadurch eine höhere Durchlässigkeit der Kapillarwände erreicht, die die Migration der Zellen der Immunabwehr in das befallene Gewebe begünstigt. Mit ihren Rezeptoren (PRRs, engl. *Pattern Recognition Receptors*) erkennen die Mediatorzellen konservierte, molekulare Strukturen (PAMPs, engl. *Pathogen-associated Molecular Patterns*) auf den Pathogenen bzw. Mikroorganismen. Mit solchen beschriebenen Rezeptoren erkennen Natürliche Killerzellen (NK, engl. *Natural Killer Cells*) durch Viren befallene und veränderte, körpereigene Zellen und vernichten sie. Bei einer Herunterregulierung der MHC-Expression bzw. einem MHC-Verlust (*missing self*), welcher bei veränderten Tumorzellen öfter auftritt, wird ein inhibitorisches Signal der NK-Zellen ausgeschaltet und sie werden stimuliert. Als Folge erkennen sie die Zelle als verändert an und lösen den programmierten Zelltod aus (Ljunggren & Kärre, 1990). Darüber hinaus produzieren die aktivierten Makrophagen Interferone (TNF- α , engl. *Tumor Necrose Factor α*) und Zytokine (IL-2, engl. *Interleukin 2*), die auch zur Aktivierung der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beitragen.

Bei der Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf aktivierten B-Zellen bzw. antigenpräsentierenden Zellen (APC) wird die angeborene und anschließend die adaptive Immunität aktiviert (Janeway, 2001). Sie interagieren mit ihrem auf den T-Zellen präsentierten CD28-Rezeptor und können dadurch die tumorspezifische Immunantwort initiieren bzw. verstärken (Linsley, Clark, Ledbetter, & Alerts, 2014) (Zheng, Wu, Guo, Lee, & Liu, 1998).

Das adaptive, also erworbene, Immunsystem, das durch die T- und B-Lymphozyten präsentiert wird, ist eng mit der angeborenen Immunabwehr verbunden und interagiert ständig mit dieser. Die adaptive Immunität ist nicht nur hoch spezialisiert, sondern auch in der Lage, antigenspezifische Gedächtniszellen (immunologisches

Gedächtnis) zu generieren und zu speichern, die später gegen weiteren Befall des gleichen Pathogens schützen. Im Menschen können die Effektor-Lymphozyten mehr als 100 Millionen Antigene erkennen.

Die Effektor-T-Lymphozyten können mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR, engl. *T Cell Receptor*) Antigene nur in Verbindung mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*, beim Menschen das HLA-system, engl. *Human Leukocyte Antigen*) erkennen. Einige wenige T-Lymphozyten sind aber auch in der Lage auf CD1-Molekülen präsentierte Lipide bzw. Phospholipide zu erkennen. Die Rezeptoren der B-Lymphozyten (BCR, engl. *B Cell Receptor*) können sowohl MHC-prozessierte Antigene als auch einzelne Antigene erkennen. Diese einzelnen Antigene können löslich oder membrangebunden sein oder als Bruchstücke (z.B LPS, engl. *Lipopolysaccharide*) im Blutsystem zirkulieren, wichtig ist nur die Möglichkeit des Antigen-B-Zell-Rezeptor-Kontaktes.

Die T- und B-Lymphozyten können nach dem Kontakt mit ihrem jeweiligen spezifischen Antigen aktiviert werden, klonal expandieren und eine effektive Immunantwort initiieren.

Maligne Erkrankungen

Unter malignen Erkrankungen fasst man alle bösartigen Erkrankungen zusammen, die durch unkontrolliertes und invasives Wachstum von Zellen oder Körpergewebe entstehen. Zellen unterliegen einem Fließgleichgewicht (engl. *steady state*), das gewährleistet, dass ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelltod aufrechterhalten wird.

Bei Krebs- bzw. Tumorzellen liegt eine Störung dieses Fließgleichgewichtes vor, so dass die Zellen sich ungehemmt vermehren. Bei den malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, wie der Leukämie, manifestiert sich die Störung dieses Fließgleichgewichtes während der Hämatopoese. Die Zellen verharren in einem bestimmten Reifungsstadium, ohne sich weiter zu einer Funktionszelle zu differenzieren und vermehren sich unkontrolliert. In der Regel werden solche veränderten Zellen früh erkannt. 1970 beschrieb Burnet die sogenannte „*Immune surveillance*“, eine Überwachungsfunktion des Immunsystems. Sie erkennt früh das Mutieren von Zellen und kann so eine Tumorentstehung vorbeugen (Burnet, 1970). Für das Immunsystem ist dieser Vorgang eine Herausforderung, da bei den

Tumorzellen weder ein Unterschied zwischen Selbst und Nicht-Selbst vorliegt, noch pathogene Strukturen auf den Zellen ausgebildet werden. Dazu sind viele Tumorzellen nicht nur in der Lage, sich durch verschiedene Mechanismen der Immunüberwachung zu entziehen (engl. *escape*), sie können dieses sogar supprimieren (Katz, Muller, & Prendergast, 2008; Smyth, Godfrey, & Trapani, 2001). Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Aus der aktuellsten 9. Ausgabe "Krebs in Deutschland", eine gemeinsame Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert-Koch-Institut, geht hervor, dass im Jahre 2010, 477.300 Menschen in Deutschland neu an Krebs erkrankten ("Krebs - Krebs in Deutschland," n.d.) (Bundes, 2013)³. Davon hatten etwa 11.560 Menschen die Diagnose Leukämie. 94 Prozent der Leukämie-Patienten erkrankten im Erwachsenenalter, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 60 Jahren für Männer und bei 65 Jahren für Frauen liegt. Nur ca. 6 Prozent der Patienten sind Kinder unter 15 Jahren. Sie leiden überwiegend an akuter lymphatischer (ALL, 80%) oder akuter myeloischer Leukämie (AML, 20%). Die chronische Form der Leukämie liegt bei Kindern selten vor. Dafür erkrankten etwas über 33% der Erwachsenen an chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (1,4 zu 1). Ca. 25% leiden an akuter myeloischer Leukämie (AML), 10% an ALL, 10% an CML und der restliche Prozentsatz der erwachsenen Patienten verteilt sich auf weitere seltene Leukämieformen.

Statistisch steigt mit dem Alter die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken an.

Entwicklung einer Immuntoleranz

Der anergische Zustand, also eine immunologische Toleranz, tritt ein, wenn ein aktives Immunsystem ein bestimmtes Antigen toleriert, weil es dieses nicht als fremd erkennt und darauf nicht reagiert (Krensky, 2001). Bei der Entwicklung einer Immuntoleranz und deren Erhalt gegenüber definierten Antigenen, sind drei Mechanismen verantwortlich: Die klonale Deletion im Thymus, die Anergie-Induktion und die aktive Suppression. Die zentrale Toleranzinduktion basiert als Erstes auf der positiven und negativen Selektion im Thymus (Boehmer, 1994; Nossal, 1994).

³ <http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php>

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?blob=publicationFile

Hierbei werden die autoreaktiven Lymphozyten während der Entwicklung im Thymus eliminiert. In der Peripherie werden die autoreaktiven T-Zellen durch andere Mechanismen inaktiviert. Die Aktivierung der Lymphozyten durch den T-/B-Zell-Rezeptor allein, ohne kostimulatorische Signale und ein geeignetes Zytokin-Milieu (IL-2), führt meist zur Apoptose (AICD, engl. *Activation-induced Cell Death*). Die fehlende IL-2-Sekretion charakterisiert die T-Zellanergie, die durch eine IL-2-Gabe rückgängig gemacht werden kann (Tomita, Khan, & Sykes, 1994). Die Apoptose kann aber auch gezielt durch die Fas-Ligand-Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen (APC) induziert werden. Die regulatorischen T-Zellen (Treg, CD25⁺/CD4⁺) spielen eine zentrale Rolle in der aktiven Suppression, indem sie inhibitorische Zytokine (IL-10, TGF- β) produzieren und die T-Zellaktivität blockieren.

Die Entwicklung einer Immuntoleranz gegenüber den Empfänger-Antigenen findet z.B. nach einer erfolgreichen, allogenen Stammzelltransplantation statt.

Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation (SZT) ist heutzutage eine etablierte, zelluläre Immuntherapieform zur Behandlung hämatologischer und nicht-hämatologischer, maligner Erkrankungen. Hintergrund ist die Rekonstitution, also die Wiederherstellung, des zellulären Immunsystems sowie des blutbildenden Systems eines Empfänger-Organismus durch Transferieren gesunder hämatopoetischer Stammzellen nach Konditionierung mit Hochdosis-Chemo- bzw. Bestrahlungstherapie. Bei einer autologen Stammzelltransplantation findet eine Retransfusion der eigenen gesunden Stammzellen statt, die vor der Konditionierung gewonnen und kryokonserviert wurden. Das Hauptziel einer autologen Stammzelltransplantation ist die Rekonstitution des Immunsystems des Patienten. Die Hauptindikation der autologen SZT sind Lymphome und das multiple Myelom, selten auch schwerwiegende Autoimmunerkrankungen wie die systemische Sklerose. Sie findet aber auch Anwendung bei der Behandlung solider Tumoren, wie den Keimzelltumoren, auch germinale Tumoren genannt. Aufgrund des Fehlens der Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD, engl. *Graft-versus-Host-Disease*) bei der autologen Stammzelltransplantation, besteht ein erhöhtes Rezidivrisiko, da der erwünschte therapeutische Effekt durch die Transplantat-gegen-Tumor-Reaktion (GvT/GvL, engl. *Graft-versus-Tumor/Leukaemie*) ausbleibt (H. J. Kolb et al., 1995; Porter & Antin, 1999).

Bei einer allogenen Stammzelltransplantation stammen die hämatologischen Stammzellen hingegen aus dem Knochenmark, peripheren Blut oder Nabelschnurblut eines geeigneten gesunden, HLA-identischen oder -kompatiblen Spenders. Die Übereinstimmung der Hauptgewebemerkmale bzw. der Major Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC, engl. *Major Histocompatibility Antigene* entsprechen dem *Human Leucocyte Antigen*, HLA) spielt hier eine zentrale Rolle für den Erfolg der Therapie. Die allogene Stammzelltransplantation hat ein breites Indikationsfeld. Sie kann sowohl zur Behandlung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, insbesondere von Leukämien (akute lymphatische Leukämie (ALL) und akute myeloische Leukämie (AML)), des myelodysplastischen Syndroms, verschiedener Lymphome, der chronischen myeloischen Leukämie (CML), als auch bei Störungen des Immunsystems (schwere aplastische Anämie, Thalassämie, schwere angeborene Immundefekte (SCID, engl. *Severe Combined Immunodeficiency*)) eingesetzt werden.

Ein großer Vorteil der allogenen Stammzelltransplantation ist die langfristige Tumorkontrolle durch den erwünschten therapeutischen GvT-Effekt.

Zelluläre Immunreaktionen nach allogener SZT

Anders als bei der klassischen Organ-Transplantation werden bei der Knochenmark- oder Stammzelltransplantation immunreaktive Zellen transplantiert. Die neu transferierten Stammzellen ersetzen die maligne veränderten Zellen des hämatopoetischen Systems des Empfängers und bilden anschließend das neue Immunsystem.

Bei einem HLA-inkompatiblen Spender erkennen seine Lymphozyten bestimmte Antigene des Empfängers als fremd und initiieren eine Immunreaktion. Diese Immunantwort gegen den Empfänger wird als Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD, engl. *Graf-versus-Host-Disease*) bezeichnet. Angriffspunkt der immunreaktiven T-Zellen sind u.a. die schnell proliferierenden Zellen der Haut, des Gastrointestinaltraktes und der Leber (F R Appelbaum, 2001; Frederick R Appelbaum, 2003).

Eine weitere mögliche Immunreaktion ist die Abstoßungsreaktion des fremden Transplantates (HvGD, engl. *Host-versus-Graft-Disease*) durch die verbliebenen immunreaktiven T-Zellen des Empfängers. Diese Reaktion führt dazu, dass das neue Transplantat nicht anwachsen kann.

Eine dritte mögliche Immunantwort, die Transplantat-gegen-Tumor-Reaktion (GvL/GvT, engl. *Graft-versus-Leukemia/Tumor*), wurde bei Patienten beobachtet, die nach einer allogenen Stammzelltransplantation an akuter oder insbesondere chronischer GvHD litten. Sie wird durch die transplantierten T-Zellen des Spenders vermittelt und richtet sich gegen die residualen Tumorzellen des Empfängers.

Das Rezidivrisiko bei Patienten mit GvHD ist signifikant geringer als bei Patienten ohne oder nur mit schwacher GvHD (Brunet et al., 2001). Die GvT-Reaktion manifestiert sich parallel zu der GvHD-Reaktion. Unklar ist, ob die Effektorzellen der beiden Reaktionen dieselben sind. Ziel vieler Forschungen ist es, sie zu trennen oder die GvHD-Reaktion so niedrig wie möglich zu halten, ohne den Nutzen des GvT-Effektes zu verlieren.

i. Host-versus-Graft-Disease (HvGD)

Eine Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion (HvGD) bzw. eine Abstoßung des Transplantats tritt nach allogener Stammzelltransplantation relativ selten auf (bei weniger als 5% der Fälle). Möglicher Grund für eine Abstoßungsreaktion ist eine HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger. Verantwortlich für diese unerwünschte Immunantwort sind in der Regel die residuellen T- und NK-Zellen des Empfängers, die die vorhergehende konditionierende Chemo- und Strahlentherapie überlebt haben. Das kann zu einem Transplantatversagen führen, das heißt, dass das neue Transplantat nicht anwachsen kann und eine lebensbedrohliche Situation bei persistierender Zytopenie auftritt. Als therapeutische Maßnahme steht, neben immunsuppressiven Arzneimitteln oder Wachstumsfaktoren, die die transferierten Stammzellen stimulieren sollen, eine zweite Stammzelltransplantation vom selben bzw. einem zweiten Spender, zur Verfügung (Wolff, 2002). Eine weitere Option wäre eine Immunrestitution durch eine autologe Stammzelltransplantation, sofern ein autologes Stammzellpräparat vorhanden ist (Mehta, Powles, Singhal, Horton, & Treleaven, 1996; M Stelljes et al., 2008)

ii. Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Trotz einer hohen Übereinstimmung der Hauptgewebemerkmale zwischen einem allogenen Knochenmarkspender und seinem Empfänger, ist die Wahrscheinlichkeit einer GvHD-Entwicklung hoch. Bei HLA-identischen Geschwistern liegt diese bei ca. 30-40% für leichte bis mittelschwere und bei 10% für schwere GvHD (Kanda et al., 2003). Nach einer allogenen Stammzelltransplantation ist sie die Hauptkomplikation

und stellt, neben den Rezidiven der Grunderkrankung, die Hauptursache für Morbidität und Letalität der Patienten dar (Margolis, Borrello, & Flinn, 2000). Die neu transferierten, immunreaktiven Zellen richten sich gegen die Antigene des Empfängers. Sowohl die Inzidenz als auch die Schwere der GvHD steigt unter anderem mit zunehmender HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger. Bei HLA-identen Transplantationen führt aber auch die Erkennung von minor Histokompatibilitätsantigenen (mHag) zu einer GvHD (Molldrem, Komanduri, & Wieder, 2002).

Es gibt zwei klinische Formen der GvHD, die akute und die chronische. Beide Formen sind pathophysiologisch und nach dem zeitlichen Auftreten gut unterscheidbar. Die akute GvHD tritt früh (häufig innerhalb der ersten 100 Tage) nach allogener Stammzelltransplantation auf und manifestiert sich vor allem in Zielorganen wie der Haut, dem Gastrointestinaltrakt, der Leber und allen sekundären lymphatischen Geweben (Goker, Haznedaroglu, & Chao, 2001). Die chronische GvHD entwickelt sich dagegen zu einem späteren Zeitpunkt, als Folge einer akuten GvHD oder als ganz eigenständiges Krankheitsbild. Neben den, von der akuten GvHD befallenen, Organen, können bei der chronischen GvHD zusätzlich die Lunge, die Mundschleimhaut, die Augen sowie der neuromuskuläre Apparat betroffen sein. Für die pathophysiologische Entstehung und den Verlauf einer GvHD, ist der alleinige Transfer von immunkompetenten Zellen nicht ausreichend. In einem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren wird ein inflammatorisches Milieu gebildet, welches den immunreaktiven Zellen, die benötigten, aktivierenden Modulatoren bietet. Die erste Phase der akuten GvHD wird bereits vor der Transplantation, durch die Gewebeschädigung bei der vorangehenden Konditionierungstherapie, initiiert. In den zwei weiteren, differenzierten Phasen der GvHD, interagieren sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem miteinander (J. L. M. Ferrara, Cooke, & Teshima, 2003; J. L. M. Ferrara & Reddy, 2006) (Abbildung 1.2).

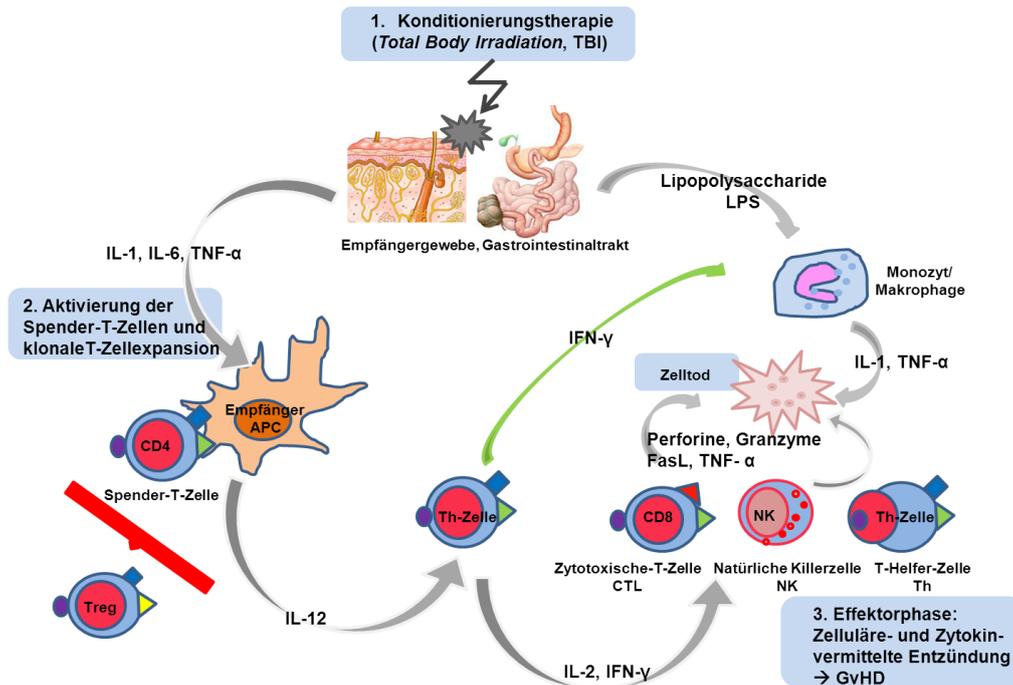


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Pathophysiologie der akuten GvHD nach Ferrara (J. L. M. Ferrara & Reddy, 2006). Die Pathophysiologie der akuten GvHD lässt sich in drei Phasen differenzieren: 1. Direkte Gewebeschädigung durch Ganzkörperbestrahlung (TBI) und Hochdosis-Chemotherapie. 2. Aktivierung und klonale Expansion der alloreaktiven Spender-T-Zellen. 3. die Effektorphase, die sich vor allem mit der Zerstörung der Zielorgane der GvHD durch die Effektorzellen (CD4⁺, CD8⁺-T-Zellen) auszeichnet.

Die Konditionierung mit Hochdosis-Chemotherapie in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung (TBI, engl. *Total Body Irradiation*), führt nicht nur zur direkten Gewebeschädigung, vor allem der Darmepithelien und der Haut, sondern auch zur Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Empfängers. Die mikrobiologische Besiedlung des Empfängers spielt zusätzlich eine zentrale Rolle, da die, durch die Konditionierung geschädigten, Darmepithelien die zerstörten Bakterien als immunstimulatorische, mikrobielle Lipopolysaccharide (LPS) ins Lumen abgeben. Diese zirkulieren dann in der Blutbahn und stimulieren die Makrophagen zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) oder IL-1 (Interleukin-1). Durch die Freisetzung der Zytokine, auch „*cytokine storm*“ genannt, wird die Expression von kostimulatorischen Rezeptoren (CD80, CD86), Adhäsionsmolekülen und Molekülen der Antigen-Prozessierung (MHC-Molekülen) auf den Empfängerzellen erhöht, die zur Optimierung der Antigen-Erkennung durch die Spender-T-Zellen führt. Die zweite Phase zeichnet sich durch die Aktivierung und klonale Expansion der alloreaktiven Spender-T-Zellen aus, die anschließend in die Zielorgane der GvHD migrieren, andere Effektor-Lymphozyten

rekrutieren und zur lokalen Gewebeschädigung führen (Vogelsang, Lee, & Bensen-Kennedy, 2003). Die dritte und letzte, differenzierte Phase ist die Effektorphase, die sich vor allem mit der Zerstörung der Zielorgane der GvHD manifestiert. Vielmehr ist diese Phase ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen aus zellulären und inflammatorischen Faktoren. Die zytotoxischen CD8⁺-Spender-T-Zellen, die durch Perforin-Granzym-Produktion eine Zelllyse direkt initiieren können, fungieren als eine der Haupteffektorzellen. Dagegen sind die aktivierten CD4⁺-Spender-T-Zellen für den Fas-Fas-*ligand*-vermittelten Zelltod (Fas/FasL) verantwortlich. Durch die Zytokin-Produktion des geschädigten Empfänger-Gewebes und der alloreaktiven Effektor-T-Zellen, wird ein inflammatorisches Milieu geschaffen. Dieses führt sowohl zur Stimulierung als auch zur Rekrutierung weiterer immunaktiver Zellen, wie der NK-Zellen oder Monozyten, woraus weitere Gewebeschäden, eine größere Immunantwort und zum Schluss in eine stärkere GvHD resultiert.

Die akute GvHD ist durch eine immunologische Reaktion auf Th1-Basis gekennzeichnet. In der chronischen GvHD spielen die Th2-T-Zellen eine primäre Rolle und sie manifestiert sich wie eine autoimmune Erkrankung (Nishimori, Maeda, & Tanimoto, 2013). Aktivierte CD4⁺-T-Zellen differenzieren sich, je nach aktivierenden Dendritischen Zellen und Zytokinmilieu, in Th1- oder Th2-Helferzellen (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 2014). Die Th1-Zellen initiieren durch Produktion von IFN- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-2 und IL-3 die Stimulation und Proliferation von zytotoxischen CD8⁺-Zellen (ZTLs). Dadurch sind sie direkt in eine T-Zell-vermittelte Immunantwort involviert. Die Th2-Zellen produzieren hingegen, nach Antigen-Stimulation, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und induzieren dadurch eine humorale, B-Zell-vermittelte Immunantwort. Bei der Th1-basierten akuten GvHD blockieren die Th1-Effektorzellen die Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen in Th2-Effektorzellen. Sie zirkulieren somit in Überzahl in der Blutbahn und aktivieren die zytotoxischen CD8⁺-Zellen, die anschließend die GvHD induzieren. Wiederum können die Th2-Zellen die Differenzierung der Th1-Zellen blockieren und die Immunreaktion in eine humorale Antwort lenken.

Treten keine Toleranz-Mechanismen gegenüber den Alloantigenen des Empfängers ein, geht eine akute GvHD in eine chronische GvHD über. Dies geschieht bei ca. 50% der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Im Idealfall klingt eine akute GvHD ab, sobald sich Suppressionsmechanismen entwickeln, wie z.B. die aktive Suppression alloreaktiver T-Lymphozyten durch regulatorische T-Zellen (Treg)

(Johnson, Becker, LaBelle, & Truitt, 1999) (Perreault, Bélanger, Gyger, Allard, & Brochu, 1989).

iii. **Graft-versus-Leukemia/Tumor (GvL/GvT)**

Die *Graft-versus-Leukemia-* (GvL) oder *Graft-versus-Tumor-* (GvT) Reaktion ist eine häufig beobachtete, immunologische Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation oder einer Behandlung mit Spenderlymphozyten (DLI, engl. *Donor Lymphocyte Infusion*). Sie wird durch Ausrichtung der transferierten T-Zellen des allogenen Transplantats gegen residuale Tumorzellen des Rezipienten hervorgerufen. Ein GvT-Effekt konnte bei vielen malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (akute und chronische Leukämien, Lymphome, multiple Myelome) und einigen soliden Tumoren nachgewiesen werden (Galo-Hooker, Ruiz-Delgado, Zamora-Ortiz, Velazquez-Sanchez-de-Cima, & Ruiz-Arguelles, 2013; H.-J. Kolb, Schmid, Barrett, & Schendel, 2004; Mandigers et al., 2003; Porter & Antin, 1999; Tricot et al., 1996).

Die GvT-Reaktion kann sich direkt und parallel, mit der laufenden GvHD, oder indirekt, durch das geschaffene inflammatorische Milieu einer GvHD-Reaktion, zu einer spezifischen Antwort gegen bestimmte Alloantigene oder tumorassoziierten Antigene entwickeln (Matthias Stelljes et al., 2004, 2007). Es wurde, sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch bei klinischen und experimentellen Ergebnissen anderer Gruppen, gezeigt, dass die GvT- eng mit der GvHD-Reaktion einhergeht und sogar mit deren Stärke korreliert (Alyea, 2008). Sie zeichnet sich als Interaktion verschiedener immunreaktiver Zellen, wie den NK-, NKT-, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen, mit den antigenpräsentierenden DC-Zellen, aus. Durch den GvT-Effekt wird eine langfristige Tumorkontrolle bzw. Eradikation der malignen Zellen gewährleistet. Die alloreaktiven Immunzellen richten sich gegen eine Vielzahl von Zielstrukturen und Zielantigenen, wie den minor Histokompatibilitätsantigenen (Els Goulmy, 2006), oder den tumorassoziierten Antigenen (TAA) bzw. tumorspezifischen Transplantationsantigenen (TSA) (Mutis et al., 1999).

Molekulare Grundlagen des Immunsystems

Um ein besseres Verständnis der Mechanismen der verschiedenen Immunantworten zu erlangen, muss hier erklärt werden, welche Moleküle für die Funktion des Immunsystems eine zentrale Rolle spielen.

i. *Major Histocompatibility Complex (MHC)*

Der *Major Histocompatibility Complex (MHC)* fasst eine Genregion zusammen, die im Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) lokalisiert ist und das *Human Leukocyte Antigen-System (HLA)* kodiert. Hier umfasst der MHC 224 Gene. Die MHC-Moleküle sind die Genprodukte und werden als Glykoproteine auf der Zelloberfläche exprimiert. Sie haben unter anderem die Funktion, Antigene in Form von kurzen Peptidfragmenten zu präsentieren und sind für die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen bzw. für die immunologische Individualität verantwortlich.

Sie wurden bei Transplantationsversuchen mit Mäusen in den 50-er Jahren entdeckt und als Haupttransplantationsantigene bezeichnet.

MHC-I-Moleküle werden ubiquitär auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wobei eine starke Expression auf hämatopoetischen Zellen zu beobachten ist. Zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort, prozessieren Zellen fragmentierte endogene Peptide bzw. intrazelluläre Proteine. Der MHC-I-Antigen-Komplex wird von den zytotoxischen CD8-T-Zellen erkannt. Die so aktivierten CD8-Effektorzellen vernichten daraufhin ihre Zielzellen, indem sie ihre Zellmembran durch Sekretion von Enzymen, wie Perforin, durchlässig machen. Die Serinprotease Granzyme B wird in die Zielzelle eingeschleust und löst den Zelltod aus.

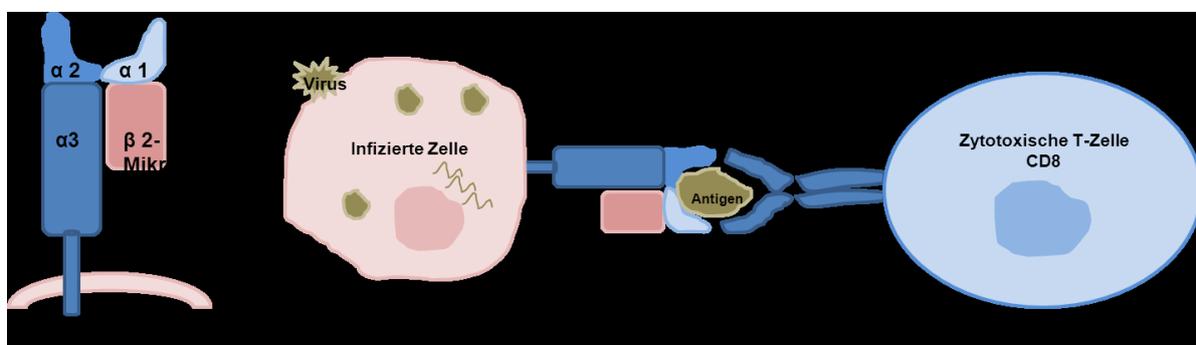


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I-Moleküls und der Antigen-Prozessierung an einer zytotoxischen CD8-T-Zelle. Das MHC-I-Molekül ist ein Heterodimer aus einem β 2-Mikroglobulin (12 kDa) und einer α -Kette (43 kDa), die sich in drei Domänen (α_1 , α_2 , α_3) faltet. Die α_1 - und α_2 -Domänen bilden eine Grube und stellen die Bindungsstelle der Peptidantigene dar.

MHC-II-Moleküle werden überwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl. *Antigen Presenting Cells*), wie Makrophagen oder Dendritischen Zellen, sowie auf B-, Endothelial- und, im Menschen, auf aktivierten T-Zellen, exprimiert. Sie präsentieren den CD4-T-Helfer-Zellen fragmentierte, exogene Peptide zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort.

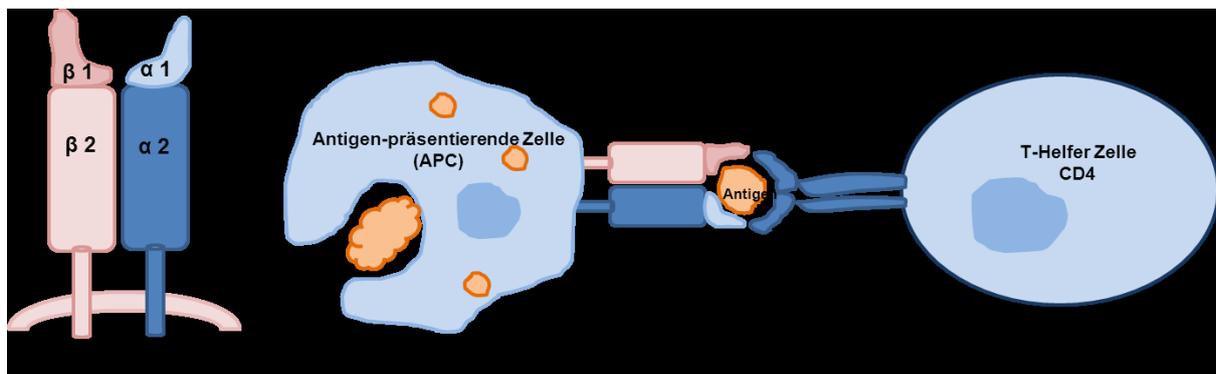


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-II-Moleküls und der Antigen-Präsentierung an einer CD4-Helfer-T-Zelle. Das MHC-II-Molekül besteht aus zwei Transmembranglykoproteinketten, α (34 kDa) und β (29 kDa), die durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Jede Kette besitzt zwei Domänen, wobei die Peptidbindungsstelle aus α_1 und β_1 an beiden Enden offen steht.

Die Gene der MHC-Klasse-III-Moleküle liegen zwischen den MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Genen und kodieren das Komplementsystem (C2, C4, Faktor B), einige Hitzeschock-Proteine (Stressproteine) und Zytokine (TNF- α , TNF- β).

Zelltyp	MHC-Klasse-I	MHC-Klasse-II
T-Zelle	+	+/-
B-Zelle	+	+
Antigenpräsentierende Zellen (APC)	+	+
Makrophagen	+	+
Granulozyten	+	-
Thrombozyten	+	-
Erythrozyten	-	-

Tabelle 1.1: Verteilung der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle auf den hämatopoetischen Zellen.

Bei der Maus wird der Haupthistokompatibilitätskomplex H-2 genannt und ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert.

Die MHC-I- und MHC-II-Genloci weisen einen sehr hohen Polymorphismus auf, was die Variabilität der MHC-Moleküle und die komplexe Funktion der Antigen-Präsentation erklärt.

Je höher die Übereinstimmung der Gewebemerkmale (MHC-Kompatibilität) zwischen Spender und Empfänger ist, desto größer ist der Therapieerfolg durch eine allogene Stammzelltransplantation.

ii. **Minor Histocompatibility Antigen (mHag)**

Die Existenz anderer Histokompatibilitätsantigene, neben dem MHC, wurde bei Transplantationsversuchen mit Mäusen nachgewiesen, die trotz eines H-2-identischen Hintergrundes, applizierte Tumorzellen bzw. ein Hauttransplantat abgestoßen haben (SNELL, 1948).

Die Erkennung von minor Histokompatibilitätsantigenen (mHag) bei einem HLA-kompatiblen Spender, kann zur GvHD führen (E Goulmy et al., 1996). Eine reine MHC-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger reicht also nicht aus, um eine erfolgreiche, allogene Stammzelltransplantation, ohne Gabe von Immunsuppressiva, zu erreichen (Simpson et al., 2001).

Die mHag stammen von genetisch polymorphen Proteinen und können sowohl über MHC-I- als auch über MHC-II-Moleküle prozessiert werden.

Die große Variabilität der mHag kann über ihren Entstehungsweg erklärt werden:

- Bei Substitution von Aminosäuren in der Peptidsequenz, wie es beim männlichen mHag HY der Fall ist (E Goulmy, 1997; Scott et al., 1995; Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).
- Die unterschiedliche Antigen-Prozessierung, die zu einem großen Polymorphismus in der Zelle bzw. zwischen Spender und Empfänger führt. Das humane mHag HA-2, das zu Proteinen der Myosin-Familie gehört und nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, ist ein Beispiel hierfür (Pierce et al., 2001). Solche mHag, die hauptsächlich bzw. ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, sind geeignete Zielantigene für den GvT-Effekt.

iii. **Das männliche minor Histokompatibilitätsantigen „HY“**

Das männliche minor Histokompatibilitätsantigen HY (mHag, engl. *minor Histocompatibility antigen*) wurde Mitte der 50-er Jahren durch Transplantationsversuche mit Mäusen durch die Arbeitsgruppe von Eichwald und

Silmser, als das männliche Transplantationsantigen entdeckt (EICHWALD, SILMSER, & WEISSMAN, 1958; Eichwald & Silmser, 1955). Das Vorliegen des HY-Antigens in männlichen Tieren, ist der Grund für die Abstoßung männlicher Transplantate durch genetisch identischen bzw. MHC-identen, weiblichen Empfänger. HY wird von einem Gen-Komplex auf dem Y-Chromosom codiert. Die physiologische Funktion des Gen-Komplexes ist leider noch ungeklärt, aber anhand dessen Sequenz wird eine Funktion in der transkriptionalen Regulation vermutet (Simpson, Scott, & Chandler, 1997). Das UTY-Gen (engl. *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on the Y chromosome*), ein Teil des Gen-Komplexes, das das Epitop (H-2Db/WMHHNMDLI) codiert, fungiert im Zellkern als Histon-Demethylase und gehört zu der *tetratricopeptid repeat protein*-Familie (Greenfield et al., 1996). Das UTY-Gen codiert ein HLA-Klasse-I-restringiertes Epitop (Simpson et al., 2001). Unter den 6, für HY klinisch relevant codierenden Genen (RPS4Y, DDX3Y, UPS9Y, TMSB4Y, SMCY und UTY), zeigte das H-2Db/WMHHNMDLI-Epitop die stärkste Stimulationseigenschaft (Laurin et al., 2006; Spierings et al., 2003).

In dieser Arbeit diene das mHag HY als Modell für ein ubiquitär exprimiertes minor Antigen bei den männlichen, bzw. als tumorspezifisch exprimiertes Antigen bei den weiblichen Empfängern.

Der Effekt dieser exprimierten Antigene auf die GvHD- und GvT-Reaktionen wird nach haploidenter allogener Stammzelltransplantation untersucht.

iv. Tumorantigene (engl. *Tumor Antibody Generating*)

Tumorantigene werden von malignen Zellen exprimiert und über den MHC-I-Komplex präsentiert (Dalglish & Pandha, 2007). Sie entstehen durch genetische Alterationen wie Mutationen, reziproke Translokation oder chromosomale Deletion.

- Tumorspezifische Antigene (TSA, engl. *Tumor Specific Antigen*) oder Neoantigene werden ausschließlich von transformierten und nie von normal funktionierenden Zellen exprimiert. Sie entstehen durch Mutationen und sind spezifisch für den jeweiligen Tumor. Sie eignen sich ideal als Zielantigene für die zelluläre Immuntherapie. Viele maligne transformierte Zellen weisen eine Mutation im TP53-Tumorsuppressor-Gen auf, dessen Genprodukt, das Protein p53, eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Das modifizierte p53-Produkt fungiert somit als TSA. Als bestuntersuchtes TSA gilt das BCR/ABL-Fusionsprotein (engl. *breakpoint cluster region/ Abelson murine*

leukemia viral oncogene homolog), das bei fast allen CML-Patienten (95%), selten bei Patienten mit akuter Leukämie, nachgewiesen worden ist (Barnes & Melo, 2002; Shtivelman et al., 2014). Das verkürzte Chromosom 22, bekannt als *Philadelphia*-Chromosom (NOWELL & HUNGERFORD, 1960), entsteht durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 im Bereich der ABL- (9q34) und BCR-Gene (22q11). Die Fusion mit dem BCR-Gen stört die Tyrosinkinase-Aktivität des ABL-Gens. Dieses reguliert normalerweise durch die Phosphorylierung von Tyrosingruppen das Zellwachstum. Kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung, kann die Zelle unkontrolliert wachsen.

- Tumorspezifische Transplantationsantigene (TSTA, engl. *Tumor Specific Transplantation Antigen*) wurden ursprünglich auf strahlen- oder chemisch-induzierten Neoplasmen bzw. Sarkomen bei Nagern beschrieben⁴.
- Tumorassoziierte Antigene (TAA, engl. *Tumor Associated Antigen*) können sowohl von malignen als auch von normalen Zellen exprimiert werden. Sie sind normale zelluläre Antigene, die jedoch, durch Fehlregulation bzw. Mutation in der Tumorzelle, in ihrem Expressionsmuster verändert sind. In den meisten Fällen werden sie hochreguliert. Sie werden als normale, ubiquitäre Proteine über den MHC-Komplex prozessiert und lösen im Regelfall keine Immunreaktion aus, da sie nicht als fremd bzw. eine Bedrohung erkannt werden. Außer die Antigendichte ist so hoch, dass eine spezifische T-Zell-Antwort nicht ausbleibt (Rosenberg, 1999). Ein bekanntes Beispiel für TAA ist das Produkt des Tyrosinase-Gens, das von normalen Melanozyten exprimiert wird. Das Gen ist nicht nur in allen untersuchten Melanom-Zellen überreguliert, es konnten auch spezifische, zytotoxische T-Zellen gegen Tyrosinase in Melanom-Patienten isoliert werden (Brichard et al., 1993).

Tumorantigene fungieren sowohl als Tumormarker in der Diagnostik, als auch als Targetantigene für die zelluläre Immuntherapie (Schieteringer, Philip, & Schreiber, 2008).

Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. WB Saunders, 2004; Abbas AK, Lichtman AH.

Das murine *Parent-into-F1-Generation*- Transplantationsmodell

In unserer Arbeitsgruppe wurde das murine „*Parent-into-F1-Generation*“-Transplantationsmodell etabliert und für die *in vivo*-Transplantationsversuche eingesetzt. Hier werden Stammzellen aus einem Elternteil [H-2K^b oder H-2K^d] in die F1-Generation [H-2K^{bxd}] transplantiert, wobei sich die Knochenmark-Spender und Empfänger im Haplotyp unterscheiden. Durch diese MHC-I-Disparität und die zusätzliche Gabe von allogenen Lymphozyten, kann gezielt eine GvHD- und GvT-Reaktion hervorgerufen werden. Die Stärke der GvHD lässt sich durch die transferierte Lymphozyten-Zahl variieren und kontrollieren.

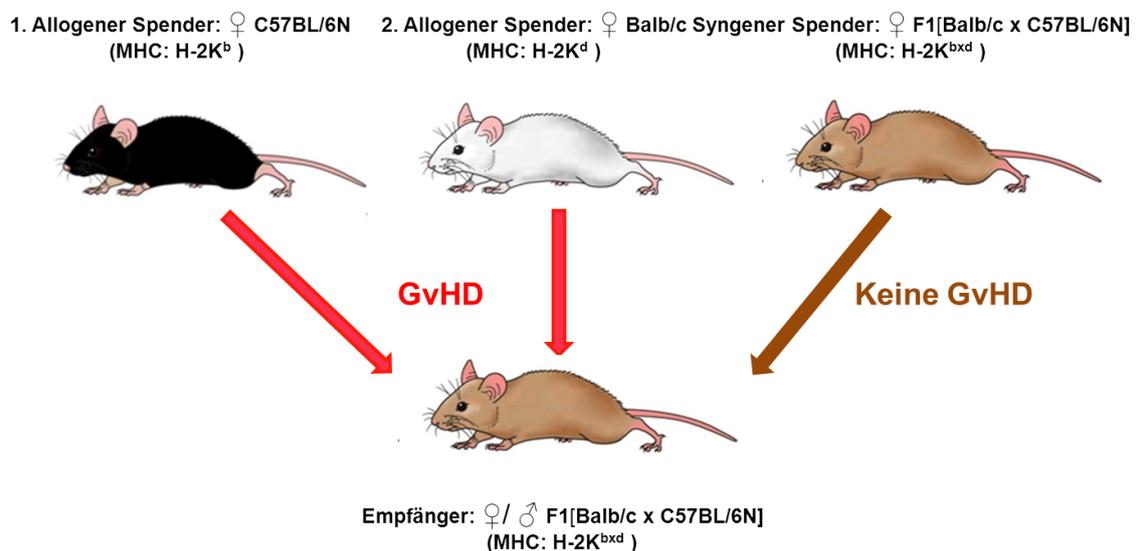


Abb. 1.5: Das murine „*Parent-into-F1-Generation*“-Transplantationsmodell ist ein haploidentisches Transplantationsmodell. Bei der syngenigen Transplantation wird syngenes F1-Knochenmark in F1-Empfängertiere transferiert, wobei sich aufgrund der MHC-Kompatibilität keine GvHD entwickelt. Wenn eines der Elternteile aber als Knochenmarkspender fungiert, manifestiert sich, aufgrund des MHC-Unterschiedes auf einem Locus, eine GvHD.

Aus eigener Erfahrung in unserer Arbeitsgruppe ist durch die C57BL/6N-Spender eine höhere GvHD zu erwarten als durch die BALB/c-Spender. So entschieden wir uns, für alle folgenden Transplantationsversuche, den C57BL/6N-Elternteil als Spender zu nehmen sowie einen syngenigen Tumor mit dem gleichen genetischen Hintergrund [H-2K^b].

Nicht nur durch die Konditionierung der F1-Empfängertiere mit einer myeloablativen Ganzkörperbestrahlung (TBI, engl. *Total Body Irradiation*), sondern auch durch die MHC-I-haploidente Spender/Empfänger-Konstellation, wird eine HvGD

ausgeschlossen, da die Empfängertiere gegenüber dem parentalen Spender-Transplantat tolerant sind.

Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist aber auch die Möglichkeit zur differentiellen Untersuchung der GvHD- und GvT-Reaktionen, je nach Wahl des eingesetzten Tumors. Wird eine Tumorzelllinie eingesetzt, die syngen zum Spender-Transplantat ist, kann diese zelluläre GvT-Reaktion nur über die Erkennung von tumorassoziierten Antigenen erfolgen.

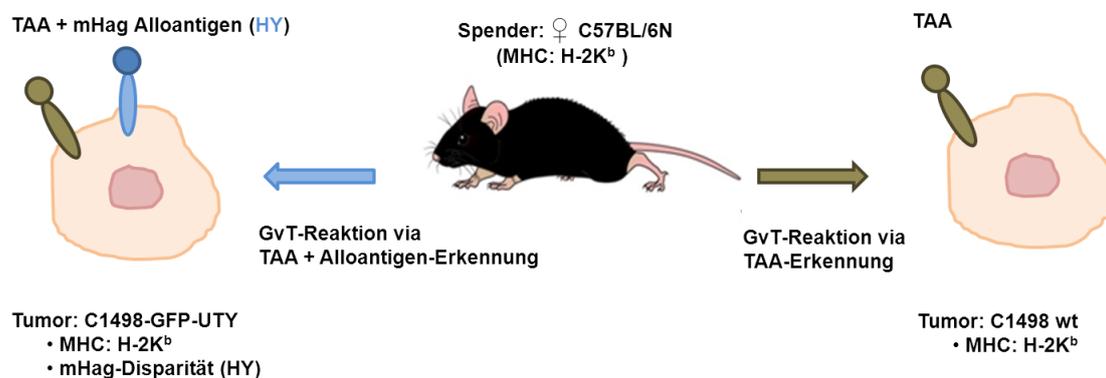


Abb. 1.6: Schematische Übersicht über die Spezifität des GvT-Effekts in Abhängigkeit von der Alloantigen-Expression am Beispiel des mHags HY. 24 Stunden nach der allogenen Stammzelltransplantation mit Knochenmark aus naivem bzw. immunisiertem Elternteil C57BL/6N, erfolgte die subkutane Applikation der Tumorzellen. Hier werden die möglichen Zielstrukturen der GvT-Reaktion schematisch dargestellt. Die Leukämie-Zelllinie C1498 hat einen C57BL/6N genetischen Hintergrund und ist somit syngen zum Transplantat. Wird ein zusätzlicher Effekt beim transgenen Tumor C1498-GFP-UTY beobachtet, ist dieser durch die zelluläre T-Zell-Erkennung des HY-Alloantigens zu erklären.

In dieser Arbeit wurde das männliche mHag HY als tumorspezifisches Antigen eingesetzt. Es wurde untersucht, welche mögliche Immunantwort das mHag HY bei einer selektiven Expression auf den Tumor, wie es bei den weiblichen Empfängertieren, bzw. bei einer Expression im ganzen Organismus, wie es bei den männlichen Empfängertieren der Fall ist, hervorrufen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Einsatz von minor Histokompatibilitätsantigen(mHag)-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen für die adoptive Immuntherapie von Leukämie ist vielversprechend. Deshalb liegt der Fokus der klinischen Forschung derzeit zunehmend auf der Charakterisierung von mHags und Tumorantigenen und deren Nutzen als therapeutische Zielstrukturen nach einer allogenen Stammzelltransplantation.

In dieser Arbeit wurde am Beispiel des männlichen mHags HY untersucht, welche immunologische Reaktion ein ubiquitär exprimiertes mHag bzw. ein tumorassoziertes Antigen (TAA) nach einer SZT initiieren kann und inwiefern sein Expressionsmuster im Empfängergewebe die *Graft-versus-Host Disease* (GvHD)-Reaktion bzw. den erwünschten *Graft-versus-Tumor*-Effekt (GvT) beeinflusst.

Alle kommerziell verfügbaren murinen, hämatopoetischen Tumorzelllinien sind weiblichen Ursprungs. So war der erste Schritt der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines Tumormodells, das das männliche mHag HY stabil exprimiert. Dafür wurde die weibliche Leukämie-Zelllinie C1498 (Ursprung: C57BL/6) mit dem HY kodierenden UTY-Gen stabil transfiziert (UTY, engl. *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on the Y chromosome*) und die Immunogenität der generierten C1498-GFP-UTY-Tumorzelllinie verifiziert. Anschließend wurde der Tumor im murinen „*Parent-into-F1-Generation*“-Transplantationsmodell eingesetzt.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen T-zellulären Immunantwort gegenüber dem exprimierten Alloantigen bzw. mHag HY nach einer allogenen Stammzelltransplantation unter Berücksichtigung seines Expressionsmusters *in vivo*:

- i. HY ist ubiquitär im Empfänger-Organismus exprimiert (bei ♂ CB6F1-Empfängern)
- ii. HY ist selektiv als TAA nur auf dem Tumor exprimiert (bei ♀ CB6F1-Empfängern)

Es wurden Spendertiere gegen das HY-Antigen vakziniert, um zu klären, ob die Generierung HY-spezifischer Spender-T-Zellklone durch die Vakzinierung, einen signifikant stärkeren GvT-Effekt in den CB6F1-Empfängertieren hervorruft. Weiterhin wurden die möglichen T-zellulär vermittelten Immunantworten analysiert und die beteiligten Effektorzellen charakterisiert und identifiziert.

2. Ergebnisse

Um den Einfluss eines männlichen Antigens (HY) auf die GvHD-Reaktion bzw. den GvT-Effekt nach einer allogenen SZT untersuchen zu können, benötigten wir eine geeignete männliche Tumorzelllinie, die das männliche mHag HY exprimiert. Die Suche nach einer männlichen Tumorzelllinie, die aus dem hämatopoetischen System stammt, erwies sich als problematisch, da nahezu alle kommerziell verfügbaren Tumorzelllinien weiblichen Ursprungs sind. Freundlicherweise wurden uns von Prof. Dr. Gerbitz, Universitätsklinikum Erlangen, mehrere Klone der Lymphom-Zelllinie Bl6xmyc (Kovalchuk et al., 2000a), zur Verfügung gestellt. Der Tumorzellklone Bl6xmyc #85 stammte aus einer männlichen Maus und exprimiert das durch das Y-Chromosom kodierte mHag HY.

Um einen möglichen Anti-Tumor-Effekt nach einer allogener SZT auf das endogen exprimierte HY-Antigen zu analysieren, wurden Bl6xmyc #85-Tumorzellen subkutan in weibliche und männliche transplantierte CB6F1-Empfängertiere appliziert. Der Bl6xmyc #85-Tumor zeigte sowohl im ubiquitären Modell, also in männlichen Empfänger, als auch im tumorspezifischen Modell, in weiblichen Empfänger die gleiche Wachstumskinetik (Gegenstand einer medizinischen Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe, Frau C. Dahrenmöller). Unsere anfängliche Hypothese, dass bei dem tumorspezifischen Modell, also in weiblichen Empfängern, ein T-zellulärer Effekt zu erwarten ist, konnte nicht bestätigt werden. Wir gingen davon aus, dass der männliche Tumor in den mit männlichen Milzzellen vorimmunisierten, weiblichen Empfängern, aufgrund des immunologischen Gedächtnisses gegen das HY, ein geringeres Wachstum zeigt, als der Tumor in den männlichen und weiblichen Kontrolltieren. Dies war nicht der Fall. Mittels Zytogenetik-Analyse zeigte die Bl6xmyc #85-Tumorzellen ein Mosaik aus Zellen mit nur einem X-Chromosom (X0) und Zellen mit einem X- und einem Y-Chromosom (XY). Etwa zwei Drittel der männlichen Zelllinie Bl6xmyc #85 zeigten einen Verlust des Y-Chromosoms. Aufgrund dieser genetischen Instabilität eignete sich das endogene HY-Tumormodell Bl6xmyc #85 nicht zur Klärung der Fragestellung dieser Dissertation. Daraus folgend wurde eine stabile Zelllinie generiert, die das zu untersuchende mHag HY permanent und stabil exprimieren wird.

2.1 Etablierung einer Leukämiezelllinie mit einer stabilen HY-Expression

Das UTY-Gen, engl. „*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome*“, codiert unter anderem das minor Histokompatibilitätsantigen (mHag) HY, ein klinisch relevantes HLA-Klasse-I-restringiertes Epitop (Simpson et al., 2001).

Für diese Arbeit wurde ein synthetisch hergestelltes Konstrukt des murinen UTY-Gens (BC140403) verwendet, das das komplette Protein des mHags HY codiert.

Die weiblichen Wildtyp-Zelllinien, C1498 (myeloische Zelllinie), Bl6xmyc #67 (Lymphom) und MPC-11 (Myelom) wurden mit Hilfe von Lipofectamin 2000 und durch Elektroporation mit dem pcDNA3-GFP-UTY-Vektor transfiziert. Ein geringer Prozentsatz (<3%) der transfizierten Zellen überlebte im Selektionsmedium (G418) und exprimierte initial das Reporter-gen GFP. Jedoch nach ca. 1 Woche Kultivierungszeit hörten die Zellen auf, zu proliferieren und starben. Die transfizierten Zellen hatten höchstwahrscheinlich die Transkription bzw. Translation der Gene des fremden pcDNA3-GFP-UTY-Vektors ausgeschaltet und anschließend das Plasmid aus der Zelle ausgeschieden.

Um die Expressionsstabilität des UTY-Gens sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Experimenten zu gewährleisten, wurde nun die Transfektion der Tumorzellen durch retrovirale Vektoren als Alternativmethode durchgeführt.

2.1.1 Retrovirale Transduktion mit Hilfe des *Gateway Cloning Systems*

Die Transduktion durch retrovirale Vektoren ist eine effiziente Transfektionsmethode (Transfektionsrate >99%), um eine stabile Integration der zu untersuchenden Gene in die Zelllinien zu erzielen.

Als *Donor Vector* für die erste LR-Rekombinationsreaktion fungierte der pENTR223.1-Vektor mit dem UTY-Konstrukt (OMM5896-99621102; Accession BC140403). Er wurde aus dem *Entry Clone DH10B TonA E. coli* isoliert.

Als *Destination Vector* wurde der GFP-tragende Vektor PINCO-GFP-RFB verwendet. Die folgenden Abbildungen zeigen das Prinzip des *Gateway Cloning Systems* und den Versuchsablauf mit dem ausgewählten UTY-Gen.

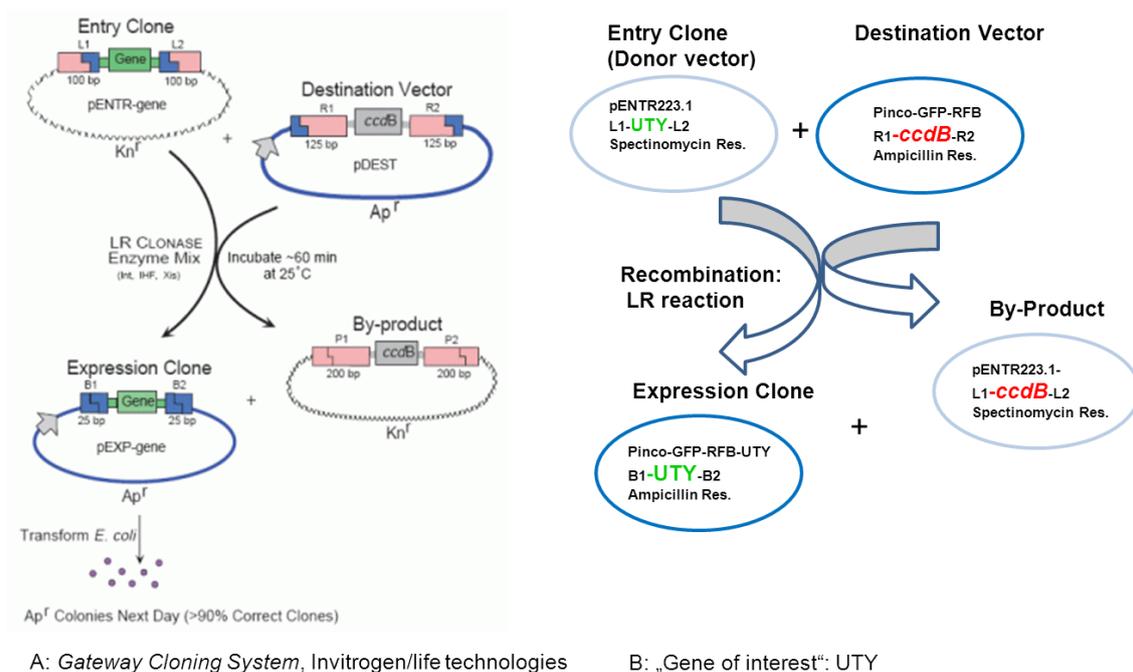


Abb. 2.1: (A) Prinzip des Gateway Cloning Systems. (B) Versuchsschemata mit dem ausgewählten UTY-Gen (OMM5896-99621102; Accesion BC140403).

- Isolierung des Donor Vectors aus dem Entry Clone DH10B *TonA E.coli*

Die Bakterien mit dem *Entry Clone* wurden auf Spectinomycin-Platten ausplattiert und einzelne Kolonien in größerem Maßstab kultiviert. Das Plasmid wurde isoliert und anschließend für die Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen EcoRV und XbaI verdaut.

Die Restriktionsanalyse des isolierten *Donor Vectors* pENTR223.1-UTY aus dem *Entry Clone* mit dem Enzym EcoRV, das sowohl eine Restriktionsstelle auf dem pENTR223.1-Vektor als auch auf dem UTY-Gen besitzt, zeigte, zwei Fragmente mit erwarteter Größe. Mit dem Enzym XbaI wurde das Plasmid linearisiert und zeigte eine Bande von 6485 bp, da XbaI nur eine Restriktionsstelle in dem Vektor hat.

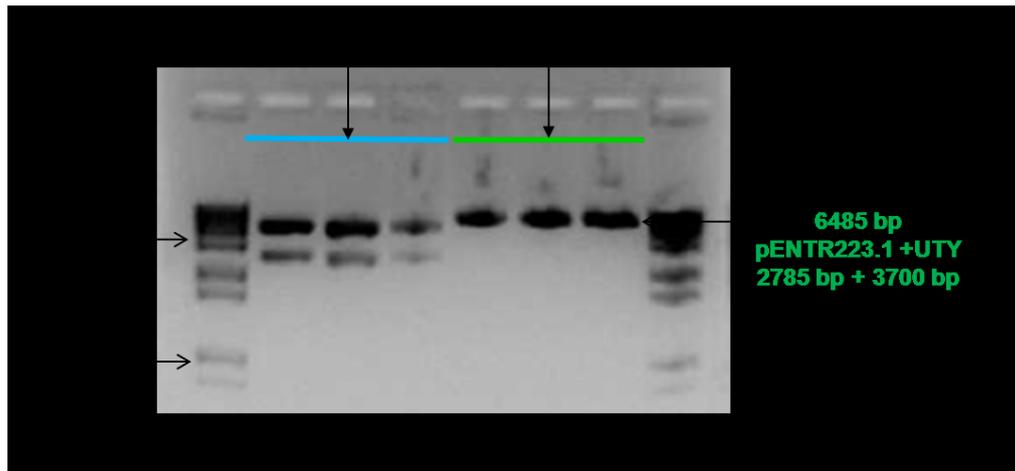


Abb. 2.2: Restriktionsanalyse des isolierten *Donor Vectors* pENTR223.1-UTY aus der *DH10B TonA E. coli*-Kultur mit EcoRV und XbaI. Die Spuren 1, 2 und 3 zeigen drei verschiedene Klone, die mit EcoRV verdaut wurden (blau). Die Spuren 4, 5 und 6 zeigen dieselben Klone, die mit XbaI behandelt wurden (grün).

- **Isolierung des *Expressions Vectors***

Die LR-Rekombinationsreaktion ist die erste Reaktion des *Gateway Cloning Systems*. Hier wird das UTY-Gen im *Donor Vector* pENTR223.1 gegen das *ccdB*-Gen im PINCO-GFP-RFB *Destination Vector* ausgetauscht. Die Reaktion wird durch das Enzym *LR-Clonase* katalysiert. Ein normaler *E. coli*-Stamm wurde nun mit dem neu rekombinierten Plasmid aus der LR-Reaktion transformiert. Da das *ccdB*-Gen für normale *E. coli*-Stämme toxisch ist (Bernard & Couturier, 1992), wachsen auf den Ampicillin-Selektionsplatten nur Klone mit dem gewünschten, neu kombinierten *Expressions Vector* PINCO-GFP-RFB-UTY. Zusätzlich schließt die fehlende Ampicillin-Resistenz des pENTR223.1-*ccdB*-Vektors als Nebenprodukt (*By-Product*) ein Wachstum aus. Somit erlaubt das *ccdB*-Gen und die fehlende Ampicillin-Resistenz eine doppelt negative Selektion des unerwünschten Nebenprodukts. Die von den Selektionsplatten isolierten Klone wurden in größerem Maßstab kultiviert. Ihre Plasmide wurden aus den Zellen isoliert und anschließend durch Restriktionsverdau analysiert.

Das isolierte Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII, BamHI und EcoRV behandelt. HindIII besitzt 4 Schnittstellen auf dem neu rekombinierten *Expressions Vector* PINCO-GFP-RFB-UTY, wodurch man 4 definierte Banden (13205, 10600, 2059 und 546 bp) erwarten würde, sollte das Plasmid das gewünschte UTY-Gen beinhalten. Das Gleiche gilt für das Enzym BamHI (14810, 13881, 703 und 226 bp). Bei dem EcoRV-Enzym wären theoretisch 5 Banden zu erwarten, jedoch entstehen bei 2 Schnittstellen Banden mit gleicher Produktgröße (75 bp), deren Unterscheidung

auf dem Gel aufgrund der Größe nicht möglich ist. Die Analyse beschränkt sich also auf drei Banden bei 7239, 5050 und 3095 bp.

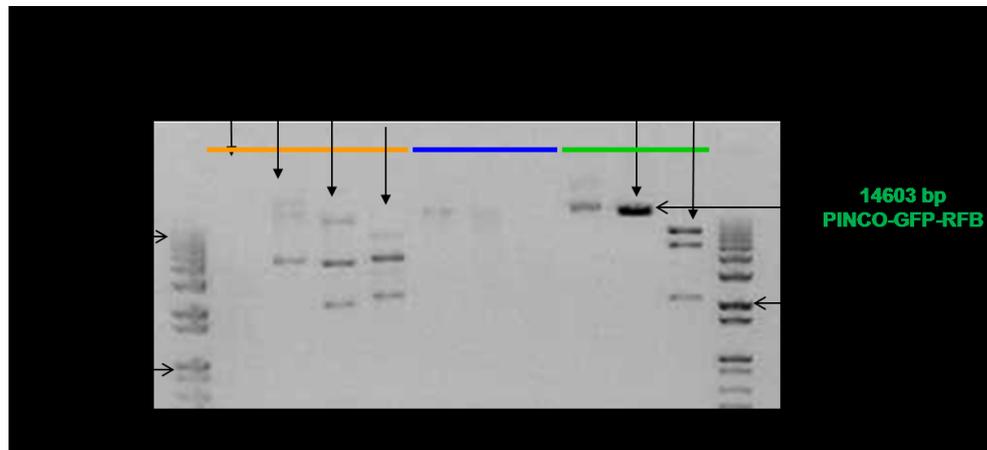
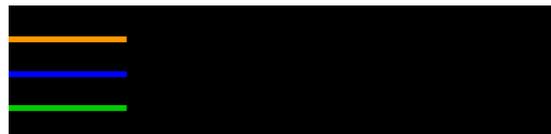


Abb. 2.3: Restriktionsanalyse des isolierten *Expressions Vectors* PINCO-GFP-RFB-UTY aus der *E. coli*-Kultur mit BamBI, HindIII und EcoRV. Die farbigen Balken zeigen jeweils einen Klon oder den Leervektor PINCO-GFP-RFB (ohne UTY-Gen).



Die Sequenz der bei der Restriktionsanalyse als positiv klassifizierten Klone wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- **Sequenzierung des *Expressions Vectors***

Mehrere Klone, die das erwartete Restriktionsmuster aufwiesen, wurden jeweils sowohl mit spezifischen Primern für den Vektor PINCO-GFP-RFB, als auch für das UTY-Gen, sequenziert. Um ein fehlerfreies Ablesen des langen UTY-Gens zu ermöglichen, wurden für die Sequenzierung mehrere Primer (UTY-1; UTY-14; UTY-15; UTY-16; UTY-17, UTY-18, UTY-19) entlang des UTY-Gens verwendet.

Sequencing

Sequencing Summary

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
pinco-GFP-RFB-I	pinco-GFP forw.	PASSED	17 - 967	950	
pinco-GFP-RFB-I	pinco-GFP rev.	PASSED	15 - 892	877	
pinco-GFP-RFB-II	pinco-GFP forw.	PASSED	14 - 926	912	
pinco-GFP-RFB-II	pinco-GFP rev.	PASSED	18 - 970	952	
pinco-GFP-RFB-III	pinco-GFP forw.	PASSED	13 - 980	967	
pinco-GFP-RFB-III	pinco-GFP rev.	PASSED	16 - 921	905	
pinco-GFP-RFB-IR	pinco-GFP forw.	FAILED	-	274	
pinco-GFP-RFB-IR	pinco-GFP rev.	FAILED	-	234	
pinco-GFP-RFB-UTY-1	UTY-1 forw.	FAILED	518 - 550	32	
pinco-GFP-RFB-UTY-1	UTY-1 rev.	PASSED	435 - 536	101	
pinco-GFP-RFB-UTY-1	pinco-GFP forw.	FAILED	423 - 446	23	
pinco-GFP-RFB-UTY-1	pinco-GFP rev.	FAILED	448 - 465	17	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	pinco-GFP forw.	PASSED	40 - 1020	980	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	pinco-GFP rev.	PASSED	102 - 378	276	
pinco-GFP-RFB-UTY-19	pinco-GFP forw.	FAILED	-	5	
pinco-GFP-RFB-UTY-19	pinco-GFP rev.	FAILED	-	5	
pinco-GFP-RFB-UTY-2	pinco-GFP forw.	FAILED	-	667	
pinco-GFP-RFB-UTY-2	pinco-GFP rev.	FAILED	173 - 188	15	
pinco-GFP-RFB-UTY-23	pinco-GFP forw.	FAILED	-	194	
pinco-GFP-RFB-UTY-23	pinco-GFP rev.	FAILED	-	233	

Sequencing Summary

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-1 forw.	PASSED	23 - 1006	983	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-16	PASSED	20 - 1023	1003	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-17	PASSED	18 - 994	976	

Sequencing Summary

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
LR Product	UTY-14	FAILED	-	5	
LR Product	UTY-16	FAILED	-	240	
pinco-GFP-RFB Steckl	UTY-14	FAILED	-	5	
pinco-GFP-RFB Steckl	UTY-16	FAILED	163 - 177	14	

Sequencing Summary

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
pinco-GFP-RFB-UTY-12	UTY-14	PASSED	24 - 1002	978	
pinco-GFP-RFB-UTY-12	UTY-16	PASSED	19 - 1018	999	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-14	PASSED	28 - 871	843	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-18	PASSED	18 - 893	875	
pinco-GFP-RFB-UTY-13	UTY-19	PASSED	40 - 945	905	
pinco-GFP-RFB-UTY-16	UTY-14	PASSED	31 - 935	904	
pinco-GFP-RFB-UTY-16	UTY-16	PASSED	19 - 985	966	
pinco-GFP-RFB-UTY-20	UTY-14	PASSED	24 - 932	908	
pinco-GFP-RFB-UTY-20	UTY-16	PASSED	21 - 995	974	
pinco-GFP-RFB-UTY-22	UTY-14	PASSED	33 - 919	886	
pinco-GFP-RFB-UTY-22	UTY-16	PASSED	35 - 933	898	

Abb. 2.4: Sequenzierungsanalyse. Der Leervektor PINCO-GFP-RFB diene als Negativkontrolle für das UTY-Gen. Der Klon C1498-GFP-UTY-13 wurde mit allen generierten Primern für das UTY-Gen sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen analysiert und verifiziert.

Alle zur Sequenzierung geschickten Klone, erwiesen sich als positiv für das UTY-Gen. Somit wurde eine 100%-ge Transfektionsrate erzielt. Ein Vorteil des *Gateway Cloning Systems*, neben der hohen Transfektionsrate, ist die spezifische Erkennung der *attL*-, *attR*-, *attB*- und *attP*-Rekombinationsschnittstellen durch die *Clonase Mix* Enzyme, die dafür sorgt, dass der richtige Leserahmen des Gens beibehalten wird. Für alle weiteren Versuche wurde der Klon PINCO-GFRP-RFB-UTY-13 ausgewählt. Als Negativkontrolle diene der Leervektor PINCO-GFP-RFB.

- **Transduktion der *Platinum-E Packaging cells***

Für die Viruspartikelproduktion diene die *Platinum-E Retroviral Packaging* Zelllinie (RV-101). Die aus 293T generierten Zellen wurden unter optimalen Bedingungen jeweils mit dem Leervektor oder dem UTY-Klon #13 transfiziert. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde prophylaktisch ein Antibiotikum-Cocktail aus Ciprofloxacin, Puromycin und Blastidicin zu den Zellen gegeben.

Ca. 24 Stunden nach der Transduktion exprimierten ca. 50-60% der Zellen das Reportergen GFP (Abb. 2.5). Die grün fluoreszierenden Zellen wurden erfolgreich transduziert und sollten die Viruspartikel produzieren. Der Überstand der Zellen, der die produzierten Viruspartikel beinhaltet, wurde zur Transduktion der Zielzellen verwendet.

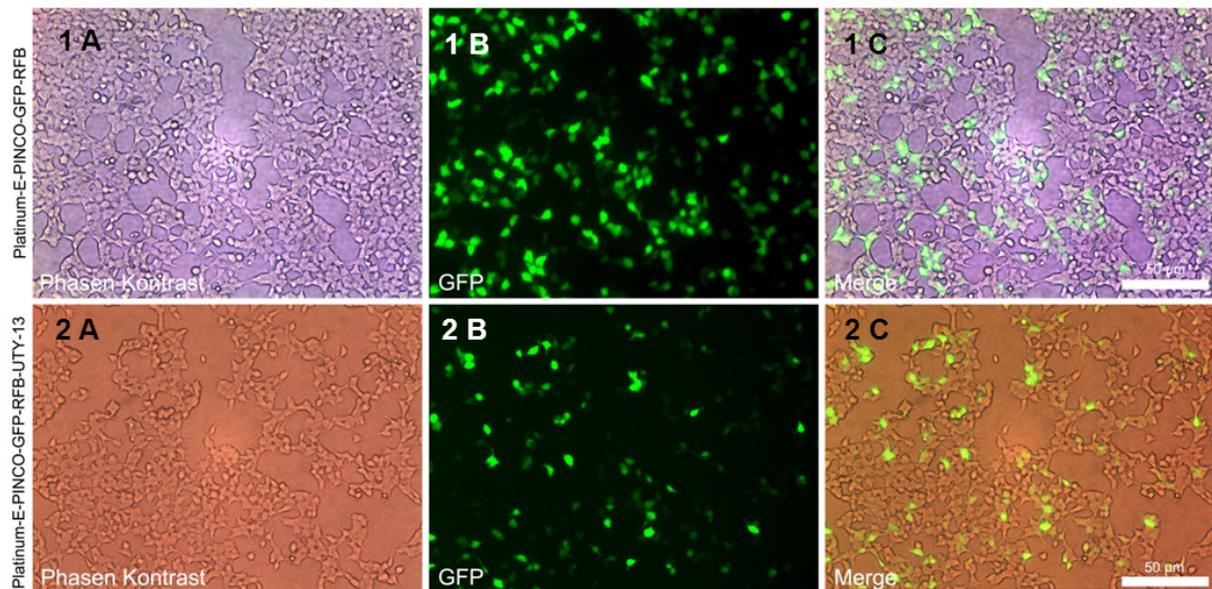


Abb. 2.5: Transduzierte *Platinum-E Retroviral Packaging* Zellen 24 Stunden nach der Transduktion mit dem Leervektor PINCO-GFP-RFB (1) und dem PINCO-GFP-RFB-UTY-13-Klon (2). A: Aufnahme im Phasenkontrast, B: Aufnahme mit Aufsicht-Fluoreszenz, C: Überlagerung von Bild A und B

- **Transduktion der Ziellzellen C1498, Bl6xmyc #67 und LLC**

Als Zielzellen wurden zwei hämatopoetische Zelllinien (C1498, Bl6xmyc #67) und ein solider Tumor (*Lewis Lung Carcinoma*, LLC) auf dem C57Bl/6N-Hintergrund (H-2-K^b) verwendet. Die Zellen wurden mit den gesammelten Viruspartikeln mit Hilfe von RetroNectin transduziert. An drei aufeinander folgenden Tagen, wurden die Zellen mit frischen Viruspartikeln inkubiert.

Ca. 24 Stunden nach der Transduktion konnten bei der C1498-Zelllinie vereinzelt GFP-positive Zellen beobachtet werden (Abb. 2.6). Die Bl6xmyc #67- und LLC-Zelllinien blieben GFP-frei.

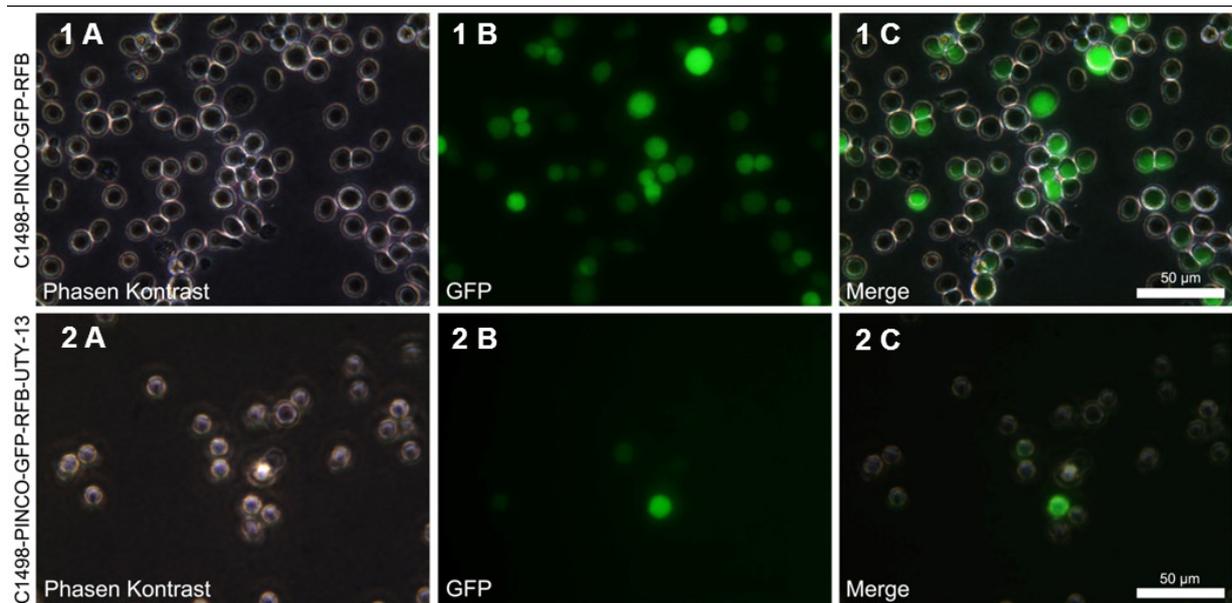


Abb. 2.6: Transduzierte C1498-Zellen 24 Stunden nach der Transduktion mit den Viruspartikeln des Leervektors PINCO-GFP-RFB (1) und des PINCO-GFP-RFB-UTY-13-Klones (2).

A: Aufnahme im Phasenkontrast, B: Aufnahme mit Aufsicht-Fluoreszenz, C: Überlagerung von Bild A und B

Nach der dritten Transduktion wurden die GFP-positiven C1498-Zellen mit Hilfe eines Zellsorters von den übrigen, nicht transduzierten Zellen getrennt und isoliert.

- **Sortieren der Tumorzellen nach GFP-Positivität**

Die transduzierten C1498-Zellen wurden gewaschen und am Zellsorter (FACS ARIA II) nach ihrer GFP-Positivität sortiert (Abb. 2.7).

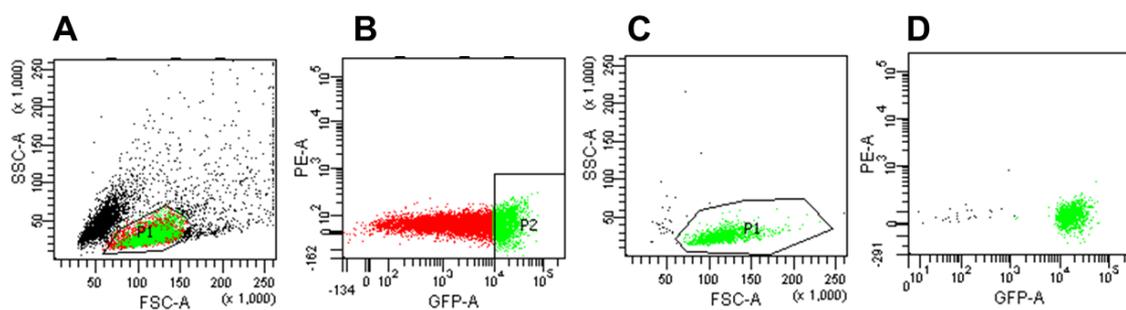


Abb. 2.7: Isolierung der GFP-hochpositiven C1498-Zellen ($>10^4$, B) nach der Transduktion. C und D zeigen die Reinheit der aussortierten Zellen.

Die GFP-positiven, aussortierten Zellen wurden mit Zugabe von frischem Medium in Kultur genommen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin), um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

2.1.2 Nachweis des UTY-Gens

Um die stabile Integration des UTY-Gens in die C1498-Zellen nachzuweisen, wurde die genomische DNA der Zellen isoliert und für die PCR-Analyse verwendet. Mit den Primern UTY-fw bzw. UTY-rev wurde für die transduzierten C1498-Zellen ein Produkt mit der erwarteten Größe von 3700 bp, wie bei der Positivkontrolle pENTR223.1-UTY, amplifiziert und nachgewiesen (Abb. 2.8).

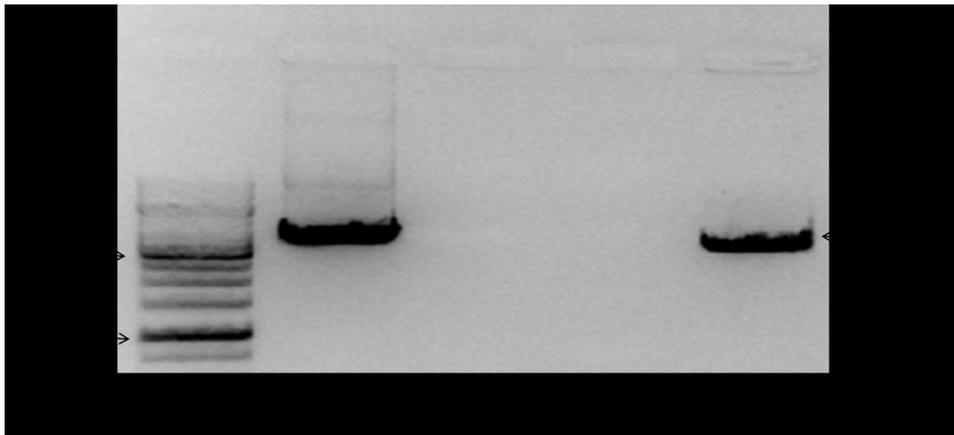


Abb. 2.8: UTY-PCR. Der *Donor Vector* pENTR223.1-UTY diente als Positivkontrolle, der Wildtyp C1498 und der Leervektor C1498-GFP-PINCO als Negativkontrolle für das UTY-Gen. Die neue Zelllinie C1498-GFP-UTY wies das erwartete 3700bp-große Produkt auf. Es wurden 20 ng DNA pro Probe aufgetragen.

2.1.3 HY-Expression

Das UTY-Gen war nun stabil im Genom der C1498-GFP-UTY-Zelllinie integriert. Ob das Gen translatiert und somit das mHag HY exprimiert wird, ließ sich auf Proteinebene mit einer Western Blot-Analyse nachweisen.

• Western Blot

Hierfür wurde ein polyklonale Antikörper, der den C-Terminus des HY-Proteins erkennt, verwendet. Die Sequenz des C-Terminus des UTY-Proteins weist eine sehr hohe Homologie (> 80%) mit der Sequenz des C-Terminus des UTX-Proteins auf (Shpargel, Sengoku, Yokoyama, & Magnuson, 2012). Das UTX-Gen ist das Äquivalent-Gen des UTY-Gens auf dem X-Chromosom. So zeigten alle Proben mit gleicher Proteinmenge (0,2 µg), ob weiblichen oder männlichen Ursprungs, ähnliche Banden mit der erwarteten Proteingröße (140 KDa) (Abb. 2.9).

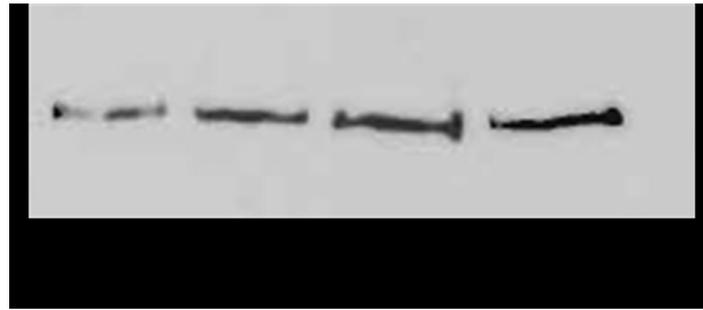


Abb. 2.9: Western Blot-Analyse der Wildtyp bzw. der transgenen Tumorzelllinien. Männliche und weibliche Milzzellen dienten als Kontrollen. Der polyklonale anti-UTY-Antikörper (ab95113) erkannte aufgrund der hohen Homologie der Sequenzen (>80%) sowohl den Carboxy-Terminus des UTY-Proteins als auch den des UTX-Proteins.

Um eine Aussage über die Expression des integrierten UTY-Gens machen zu können, wurde eine *Real-time-quantitative PCR-Analyse* (qPCR) der Tumorzellen durchzuführen.

• Relative Expression des UTY-Gens

Die gesamte RNA aus den transduzierten C1498-GFP-PINCO bzw. C1498-GFP-UTY sowie den C1498-Wildtyp-Zellen wurde isoliert. Anschließend wurde die relative Expression des UTY-Gens im Vergleich zu dem *Housekeeping*-Gen β -Aktin quantifiziert. Die transduzierten C1498-GFP-UTY-Zellen wiesen eine hohe Expression des UTY-Gens (16-fach \pm 2,6; $p < 0,0001$) im Vergleich zu dem Wildtyp-Tumor und dem Tumor mit dem Leervektor (Abb. 2.10) auf.

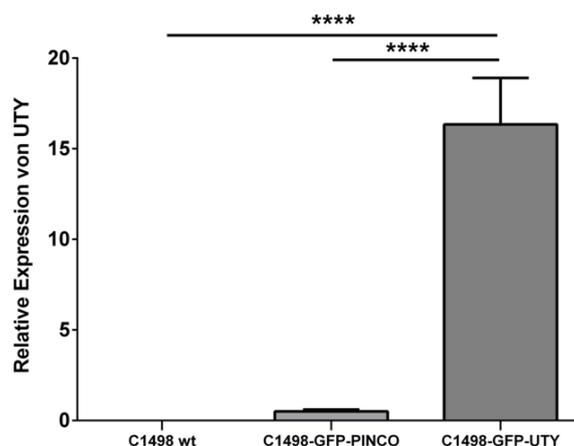


Abb. 2.10: Relative Expression von UTY in den Wildtyp und transduzierten Tumorzelllinien. RNA aus der jeweiligen Tumorzelllinie wurde isoliert und die relative Expression von UTY mittels *Real-time quantitative PCR* quantifiziert. Alle Proben wurden über die Expression des *Housekeeping*-Gens β -Aktin und in Bezug auf den Kalibrator ($\Delta\Delta C_T$) abgeglichen und mit einem dreifachen Ansatz (Triplett) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der dreifachen Bestimmung mit Standardabweichung, **** $p < 0,0001$

Darüber hinaus wurde sowohl in den C57BL/6N-Spender- als auch in den CB6F1-Empfängertieren die Expression des UTY-Gens quantifiziert (Abb. 2.11).

Alle männlichen Versuchstiere zeigten eine Expression des UTY-Gens (C57BL/6N, 151-fach \pm 0,02; $p < 0,001$ und CB6F1, 147-fach \pm 44,8; $p = 0,0081$), die weiblichen nicht (± 0).

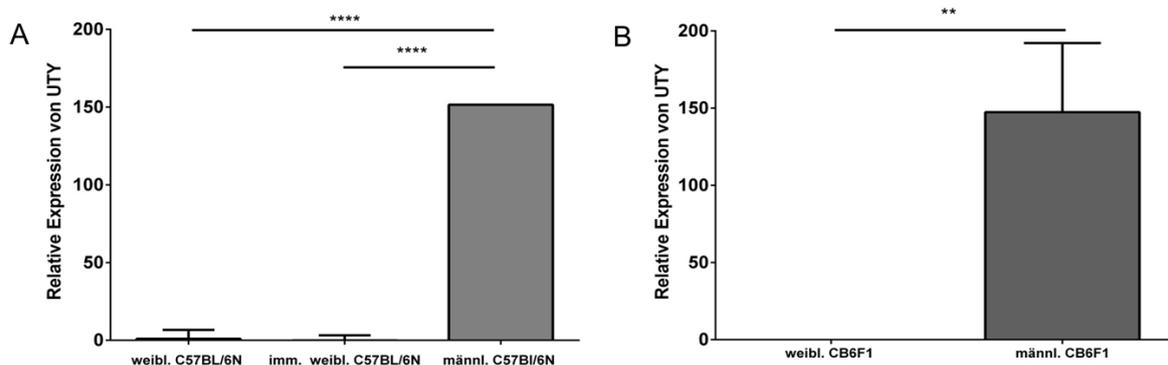


Abb. 2.11: Relative Expression von UTY in den C57BL/6N-Spendern bzw. in den CB6F1-Empfängern. Nach einer Splenektomie bei den Spender- (A) und Empfängertieren (B), wurde RNA aus den isolierten Milzzellen extrahiert und anschließend wurde die relative Expression von UTY in den verschiedenen Versuchsgruppen mittels *Real-time quantitative* PCR quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der dreifachen Bestimmung mit Standardabweichung, **** $p < 0,001$; ** $p = 0,0081$

Mit der Gewissheit, dass die transduzierten C1498-GFP-UTY-Tumorzellen die gewünschte Messenger-RNA exprimieren, wurden die Zellen, unter anderem für ihre Stabilität, in männliche C57BL/6N-Mäuse [H-2-K^b] passagiert.

2.1.4 *In vivo*-Passagierung der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien C1498-GFP-PINCO bzw. C1498-GFP-UTY wurden mehrmals in männlichen C57BL/6N-Mäusen [H-2-K^b] *in vivo* passagiert, um ihre Stabilität zu erhöhen und mögliche Störfaktoren z.B. durch Mediumzusätze (FCS) zu minimieren. Das Tumorgewebe wurde bei einer Maximalgröße von ca. 5 mm x 5 mm unter sterilen Bedingungen entnommen und präpariert. Die GFP-tragenden Tumorzellen wurden am Zellsorter von den übrigen Zellen getrennt und isoliert. Es wurden nur GFP-hochpositive Zellen ($>10^3$, Abb. 2.12-B) in Kultur genommen.

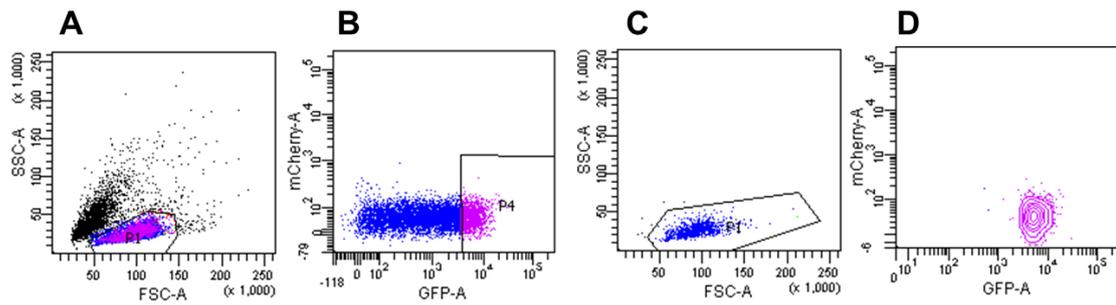


Abb. 2.12: Isolierung der GFP-hochpositiven C1498-Zellen ($>10^3$, B) aus dem extrahierten C1498-GFP-UTY-Tumor aus männlichen C57BL/6N nach der *in vivo*-Passagerung. C und D zeigen die Reinheit der aussortierten Zellen.

Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin), um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

2.2 C1498-GFP-UTY *in vivo*

2.2.1 Immunogenität des exprimierten Alloantigens HY

Um zu beantworten, ob das exprimierte mHag HY auch immunogen ist, wurden der Wildtyp-Tumor C1498 und der transgene Tumor C1498-GFP-UTY in weibliche C57BL/6N-Mäuse, die zuvor gegen HY immunisiert wurden, appliziert. Die Immunisierung der Versuchsmäuse mit bestrahlten, männlichen Milzzellen erfolgte zwei Mal innerhalb von vier Wochen vor der Tumorgabe.

Der Wildtyp-Tumor zeigte ein signifikant progredienteres Wachstum im Gegensatz zu dem transgenen Tumor, der zwar wie der Wildtyp an Tag 8 anwuchs aber eine langsamere Wachstumskinetik aufwies (Abb. 2.13).

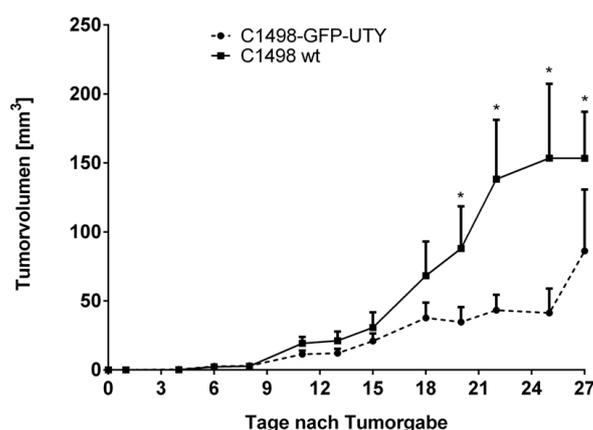


Abb. 2.13: Wachstumskinetik des Wildtyp-Tumors C1498 und des transgenen Tumors C1498-GFP-UTY in immunisierten, weiblichen C57BL/6N-Mäusen. Je 1×10^5 vitale Tumorzellen wurden den Versuchstieren in die hintere, rasierte Flanke appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je $n=6$ pro Gruppe, * $p < 0,05$.

2.2.2 Tumorwachstumskinetik in Abhängigkeit der Zellzahl

Um die geeignete Tumor-Zellzahl für die Transplantationsversuche zu bestimmen, wurde eine *in vivo*-Titration des C1498-GFP-UTY-Tumors und des Tumors mit dem Leervektor PINCO-GFP-RFB durchgeführt. Es wurden drei Gruppen mit drei weiblichen C57BL/6N-Mäusen gebildet. Den jeweiligen Gruppen wurden 1×10^4 , 1×10^5 bzw. 1×10^6 vitale Tumorzellen appliziert.

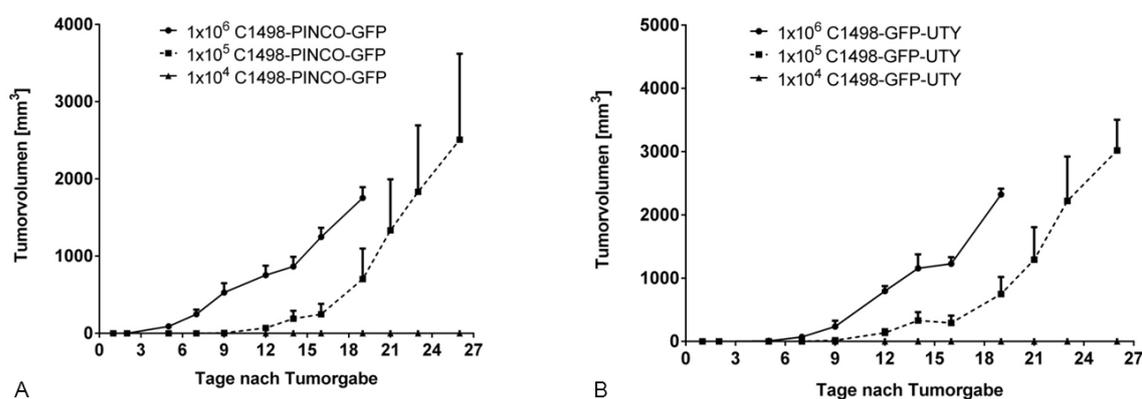


Abb. 2.14: Wachstumskurve des Tumors mit dem Leervektor C1498-PINCO-GFP (A) und des C1498-GFP-UTY-Tumors (B) in weiblichen C57BL/6N-Mäusen. Je 1×10^4 , 1×10^5 bzw. 1×10^6 vitale Tumorzellen wurden den Versuchstieren in die hintere, rasierte Flanke appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je $n=3$ pro Gruppe.

Bei der Gruppe mit der niedrigsten Zellzahl (1×10^4) wuchs kein Tumor an (Abb. 2.14). Bei der Gruppe mit der höchsten Tumorzellzahl (1×10^6) wuchs der Tumor an Tag 4 nach Tumorgabe an und konnte bis Tag 19 gemessen werden. Die Tiere dieser Gruppe verstarben an Tag 19 aufgrund einer leukämisch generalisierten Tumormanifestation. Bei der Gruppe mit 1×10^5 Zellen hingegen, fing das Tumorstadium erst zwischen dem 9. und 12. Tag nach der Tumoralplikation an. Nach einer Knochenmarkstransplantation findet das Anwachsen der Stammzellen mit hämatologischer Rekonstitution ca. 10 bis 12 Tage nach Transplantation statt. Somit ist der Zeitpunkt des Anwachsens des Tumors relevant, denn ab diesem Zeitpunkt ist sichergestellt, dass das zelluläre Immunsystem zumindest teilweise wieder vorhanden ist. Darüber hinaus konnte das Tumorstadium bei dieser Zellzahl bis zu vier Wochen (26 Tage) nach dem Versuchsstart verfolgt werden. So entschieden wir uns, für alle weiteren *in vivo*-Versuche mit der Tumorzellzahl 1×10^5 zu arbeiten.

2.2.3 Tumorstadiumskinetik in Abhängigkeit der Inokulationszeit

Um klinisch ähnliche Bedingungen zu imitieren, wurde der Tumor in allen Hauptversuchen 24 Stunden nach allogener Transplantation appliziert. Bei zwei unabhängigen Transplantationsversuchen wurde jedoch eine Applikationszeit von 14 Tagen nach Transplantation in Erwägung gezogen. Anschließend wurde die Tumorkinetik dieser Gruppe mit der parallel transplantierten Gruppe, die aber an Tag 1 den Tumor bekam, verglichen.

Die Applikationszeit von 14 Tagen nach Transplantation erlaubte eine längere Beobachtung der Versuchstiere. Dafür verstarben die Versuchstiere, die an Tag 1 nach Transplantation den C1498-GFP-UTY-Tumor appliziert bekamen, spätestens nach ca. 17 Tagen an einer leukämisch generalisierten Manifestation des Tumors (Abb. 2.15-B). Der am 14. Tag applizierte Tumor war aber kaum messbar, so dass keine Untersuchung eines möglichen Effekts möglich war (A).

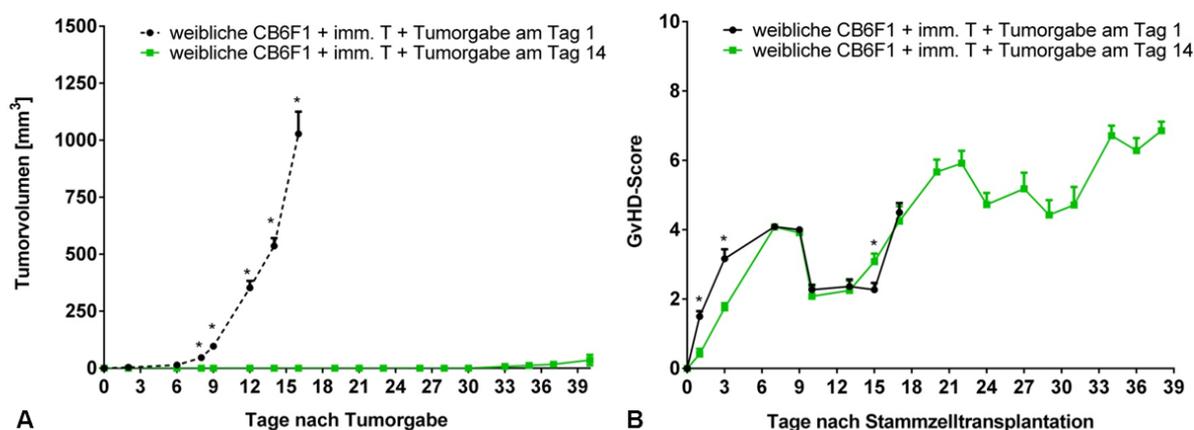


Abb. 2.15: Messbares aber invasives Tumorwachstum bei einer Applikationszeit von 24 Stunden im Vergleich zu minimalem Tumolvolumen bei Tumorgabe am 14. Tag nach allogener Transplantation. Die Applikationszeit von 14 Tagen nach Transplantation (■) erlaubte ein GvHD-/GvT-Monitoring bis über 3 Wochen, gleichzeitig jedoch nur ein minimales Tumolvolumen. Tumorgabe 24 Stunden nach Transplantation (●). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=6 pro Gruppe, $p < 0,0001$.

Die leukämische Manifestation des aggressiven C1498-GFP-UTY-Tumors war aufgrund seiner GFP-Positivität einfach durch Fluoreszenz-Analyse nachzuweisen. Die betroffenen Organe wurden nach dem Tod der Versuchstiere präpariert und Gewebeschnitte von diesen angefertigt. Die Gewebeschnitte mussten nicht immunhistochemisch angefärbt werden, da der Tumor durch GFP bereits grün leuchtete. Eine Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) war ausreichend, um die einzelne Zelle als solche zu definieren. Die C1498-GFP-UTY-Tumorzellen wurden sowohl in der Lunge als auch im Dickdarm nachgewiesen (Abb. 2.16). Bei dem Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI) besteht auch die Möglichkeit die Verteilung des C1498-GFP-UTY-Tumors im ganzen Empfängerorganismus festzustellen (siehe Abschnitt *in vivo-Imaging*).

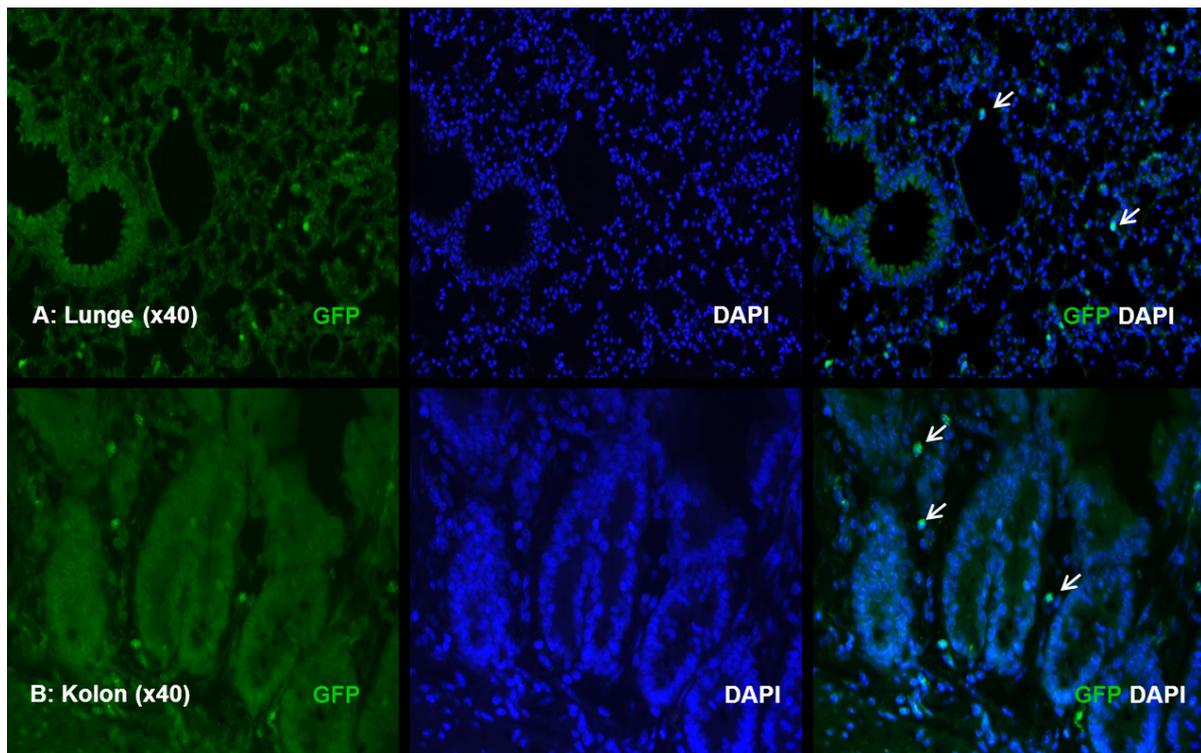


Abb. 2.16: Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors ins Gewebe, ca. 17 Tage nach Transplantation und Tumorinokulation. Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors in die Lunge (A) und den Dickdarm (B). Blaufärbung der Zellkerne durch DAPI. Einige Tumorzellen sind durch Pfeile markiert. 10 μ m Kryoschnitte.

2.3 Allogene Stammzelltransplantation

Für alle Transplantationsversuche wurde das „Parent-into-F1-Generation“-Transplantationsmodell verwendet (Abb. 2.17).

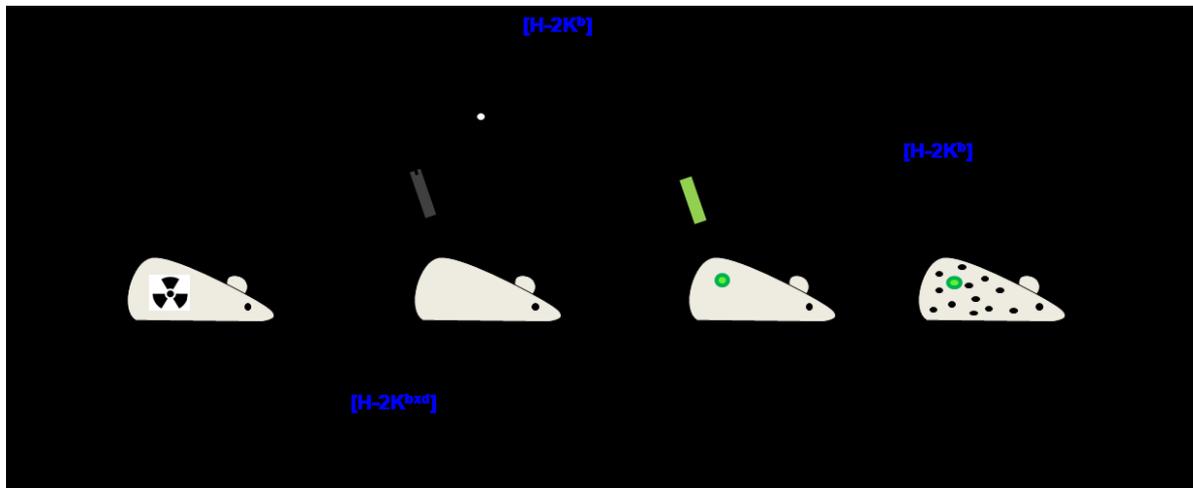


Abb. 2.17: Schematische Darstellung des *in vivo*-Versuchsablaufs

Es wurden parentale Stammzellen, bestehend aus 2×10^7 Knochenmark- und 1×10^7 Milzzellen, aus C57BL/6N [H-2K^b] in die weibliche bzw. männliche F1-Generation (♀ BALB/c x ♂ C57BL/6N → CB6F1 [H-2K^{bxd}]) transplantiert. Die Empfängertiere wurden 24 Stunden vor der Stammzelltransplantation durch eine Ganzkörperbestrahlung (TBI, 9 Gy, X-Ray) konditioniert. Die Tumorzellinokulation wurde an Tag 1 nach der Stammzelltransplantation durchgeführt. Jedem transplantierten Versuchstier wurden 1×10^5 vitale C1498-GFP-UTY-Tumorzellen subkutan in die hintere, rasierte Flanke verabreicht. Vor jeder Tumorzellapplikation wurden die Vitalität und die Reinheit der Tumorzellen (GFP-positive C1498-UTY-Zellen) am Durchflusszytometer (FACS) verifiziert.

2.3.1 Konditionierungstherapie

Versuchstiere, die eine myeloablative Ganzkörperbestrahlung (TBI, 9 Gy) und kein neues Transplantat bekamen, verstarben spätestens 8 Tage nach der Konditionierung (Abb. 2.18-B). Eine TBI-Dosis von 4,5 Gy rief bei den Tieren eine geringe Strahlentoxizität hervor, die sich in anfänglichem Gewichtsverlust und einer Störung der Fellbeschaffenheit zeigte (A). Nur bei den transplantierten Gruppen wurde eine GvHD induziert und diese konnte kontinuierlich bis über 80 Tage nach

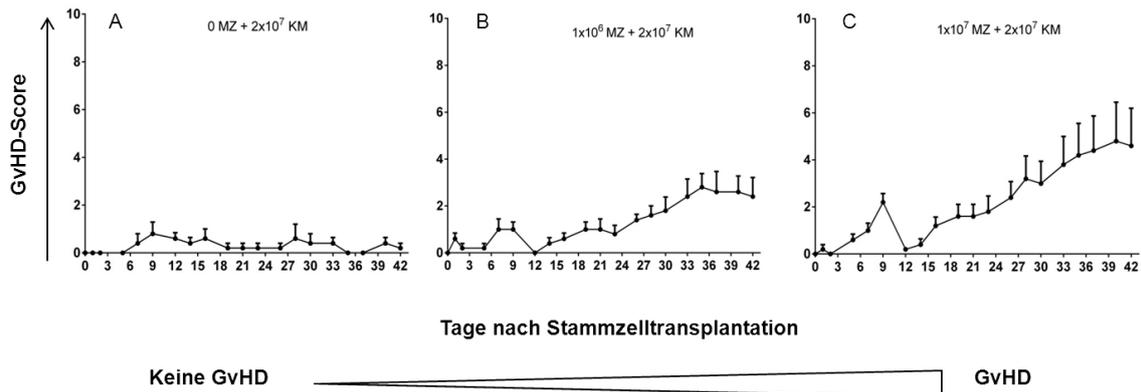


Abb. 2.19: GvHD-Verlauf allogener transplantierte CB6F1-Mäuse mit Transplantat bestehend aus gleicher Anzahl an Knochenmarkszellen und jeweils unterschiedlicher Milzzellzahl. Für das *Parent-into-F1-Generation*-Modell fungierte der eine parentale C57BL/6N-Teil als Stammzellspender. Ohne MZ (A). Zugabe von MZ ins Transplantat (B und C). Dargestellt sind die GvHD-Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=5 pro Gruppe.

ii. Parentale BALB/c-Mäuse als Spender

Beim Modell mit dem BALB/c-Elternteil als Spender, zeigte sich das gleiche Muster, wie mit dem C57BL/6N-Elternteil, allerdings wurde mit der gleichen Milzzellzahl (2x10⁷ MZ) ein geringerer GvHD-Grad (2,5 statt 4,8) in den CB6F1-Empfängern erzielt (Abb. 2.20-C). Mit 1x10⁶ BALB/c-MZ zeigten die transplantierten Versuchstiere eine minimale GvHD (1,5).

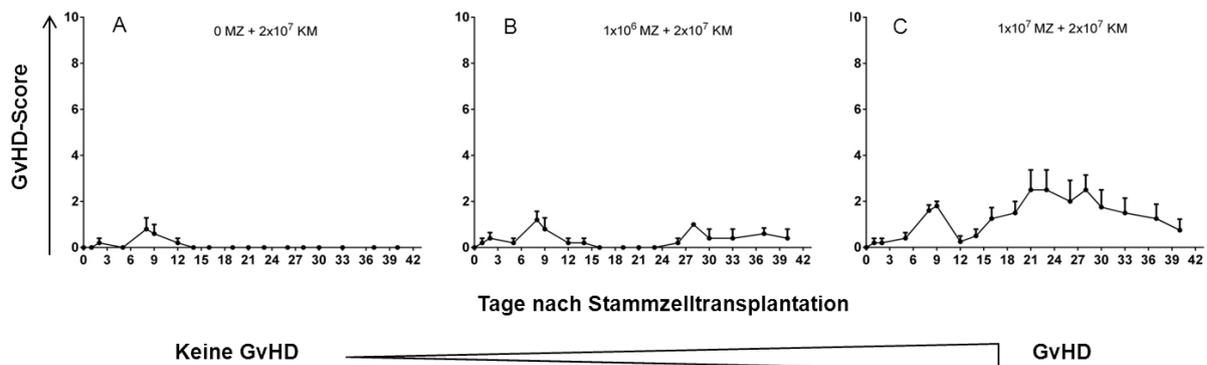


Abb. 2.20: GvHD-Verlauf allogener transplantierte CB6F1-Mäuse mit Transplantat bestehend aus gleicher Anzahl an Knochenmarkszellen und jeweils unterschiedlicher Milzzellzahl. Für das *Parent-into-F1-Generation*-Modell fungierte der andere parentale BALB/c-Teil als Stammzellspender. Ohne MZ (A). Zugabe von MZ ins Transplantat (B und C). Dargestellt sind die GvHD-Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=5 pro Gruppe.

Durch die Stammzelltransplantation mit dem C57BL/6N-Elternteil als Spender wurde eine stabil progrediente und höhere GvHD erzeugt als mit den BALB/c-Spendern.

Abb. 2.21 zeigt die Fellbeschaffenheit eines CB6F1-Empfängertieres ohne GvHD bzw. mit steigender GvHD nach der Methode von Cooke (Cooke et al., 1996).

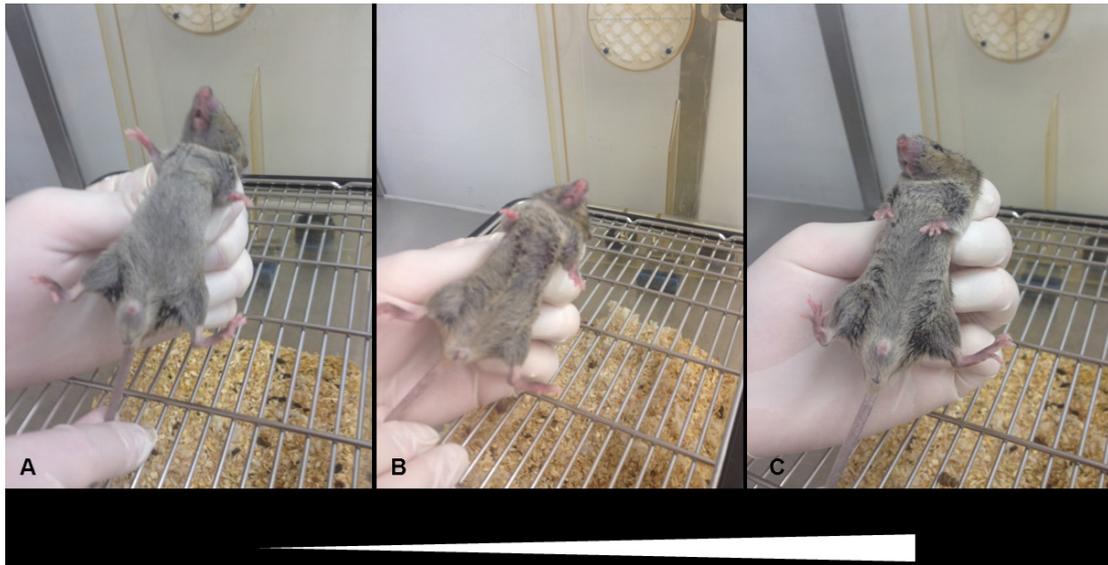


Abb. 2.21: Die Fellbeschaffenheit als ein Parameter der GvHD nach Cooke

Nach der Punktskala liegt das Tier im Bild A bei 0, im Bild B bei 1 und das Tier im Bild C bei 2.

2.3.3 Modulation der GvHD- und der GvT-Reaktion in Abhängigkeit der transferierten Lymphozyten-Zellzahl

Der C1498-GFP-UTY-Tumor wuchs in beiden Gruppen ab Tag 10 an. In der nicht-GvHD-Gruppe zeigte sich ein signifikant stärkeres Tumorstadium (1014 mm³, Tag 25), während der Tumor in der GvHD-Gruppe kaum angewachsen war (129 mm³, Tag 25) (Abb. 2.22-A). Der GvHD-Score erreichte 7,3 in der Gruppe mit Milzzellen und 3,5 in der Gruppe ohne (B).

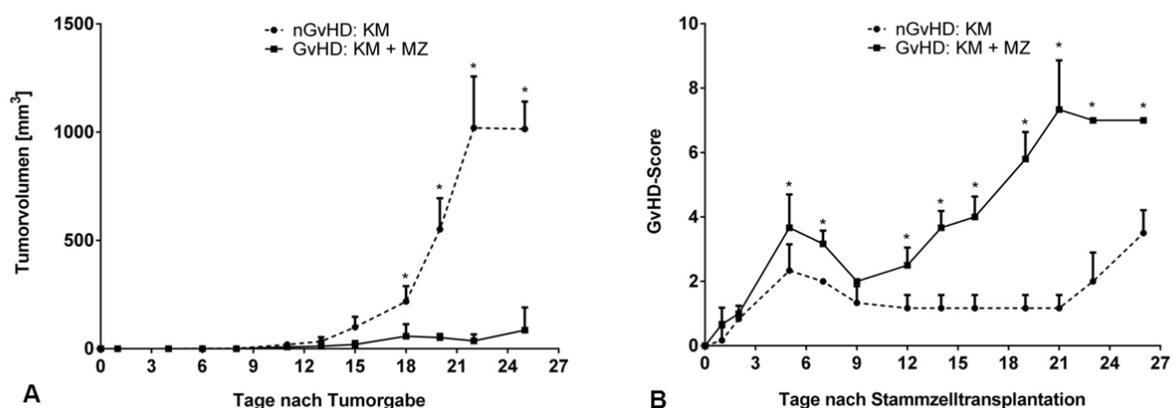


Abb. 2.22: Die Graft-versus-Tumor-Reaktion (GvT) ist mit der Entwicklung der Graft-versus-Host-Disease assoziiert, deren Grad zusätzlich mit der Tumorstadium (GvT) korreliert. Die GvHD-Gruppe (■) erhielt ein Transplantat, bestehend aus 2×10^7 Knochenmark- und 1×10^7 Milzzellen (B). Nicht-GvHD-Gruppe ohne Milzzellzugabe im Transplantat (●) (A). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je $n=6$ pro Gruppe, * $p < 0,05$.

Durch die Färbung des Zellkerns mit dem natürlichen Farbstoff Hämatoxylin (Hämalaun) bzw. des Zytoplasmas mit dem synthetischen, sauren Farbstoff Eosin, können feine Gewebestrukturen im Schnittpräparat unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. So konnten, die durch die GvHD betroffenen, Organe analysiert werden. Zielorgane der GvHD sind unter anderem die Haut (Abb. 2.23-A2/B2), Lunge (A3/B3) und der Dickdarm (A4/B4). Die erhöhte Immunaktivität in der GvHD-Gruppe führte zur Tumorsuppression und schließlich zur Gewebeschädigung innerhalb des Tumors (B1).

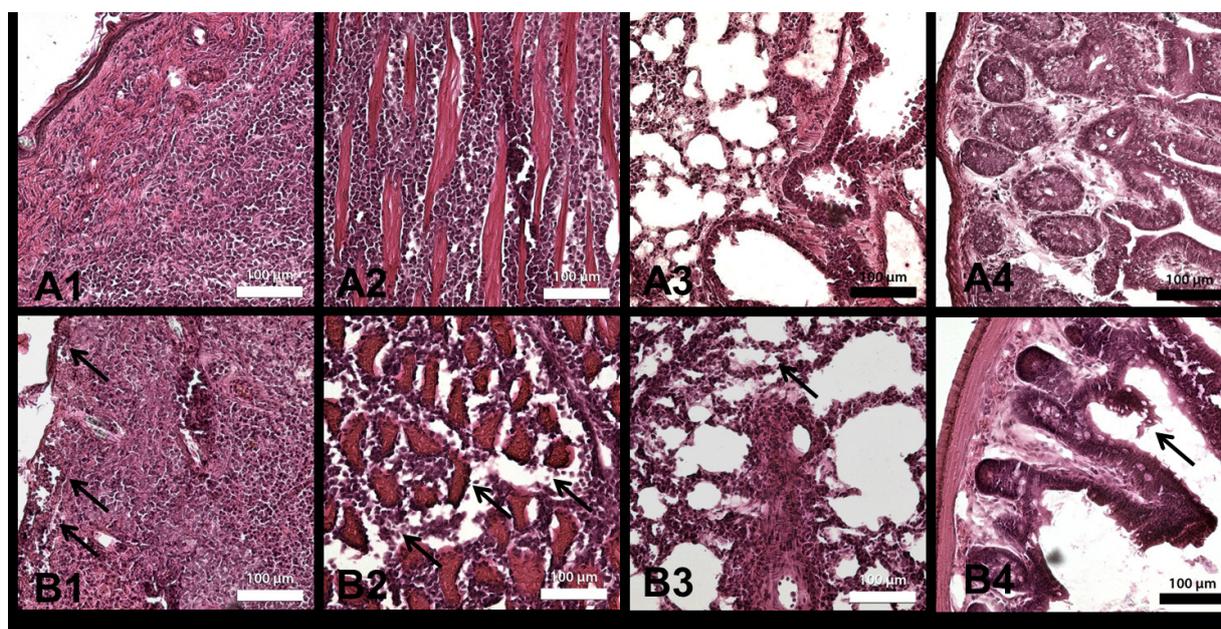


Abb. 2.23: Histopathologische Untersuchung von repräsentativen Organen. Die Färbung erfolgte mit HE auf 10 µm Gefrierschnitte. (A) repräsentieren die Gewebe der Versuchsgruppe ohne GvHD und (B) die GvHD-Versuchsgruppe. Die GvHD führte zu einer erhöhten Effektorzell-Aktivität/Infiltration im Tumorgewebe (B1), im Dickdarm (B4) und zur Gewebeschädigung (Pfeil).

2.3.4 Chimärismus-Analyse

Die Milzzellen der Empfängertiere wurden an verschiedenen Tagen nach allogener Transplantation präpariert und anschließend durch die Färbung mit Farbstoff gekoppelten H-2K^b- und H-2K^d-Antikörpern an einem Durchflusszytometer analysiert. Die Chimärismusanalyse zeigt, wie weit sich die transplantierten Stammzellen [H-2K^b] im Empfänger-Organismus [H-2K^{bxd}] etabliert haben und zeigt die Verhältnisse der Spender- und Empfänger-Populationen.

An Tag 12 nach allogener Transplantation waren 91% der detektierten T-Zellpopulation H-2K^b-FITC positiv (Abb. 2.24-B) bzw. 97,6% an Tag 14 (C). Das hämatopoetische System der Empfänger bestand somit nach *Engraftment* aus H-

2K^b-Zellen der Spender. Die Konditionierung mit 9 Gy und die Gabe von 2×10^7 Knochenmarkszellen erwiesen sich somit als ausreichend zur Etablierung bzw. Konstitution eines nahezu vollständigen Spenderzellchimärismus nach ca. 12 Tagen.

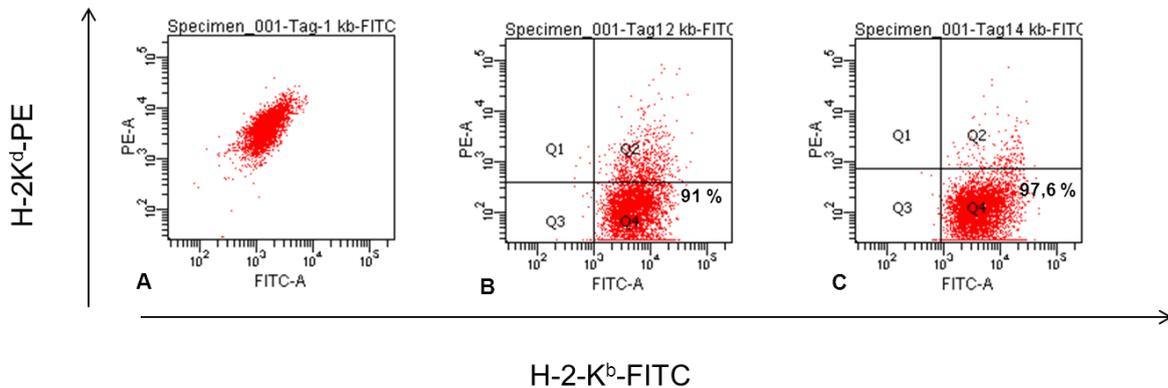


Abb. 2.24: Chimärismus-Analyse der CB6F1-Empfängertiere nach allogener Transplantation. An Tag 12 bzw. 14 nach allogener Stammzelltransplantation erfolgte eine Splenektomie bei den CB6F1-Empfängertieren. Die CD3⁺-T-Lymphozyten wurden mittels *Pan T Cell Isolation Kit II* von den übrigen Milzzellen isoliert und mit H-2K^b-FITC- und H-2K^d-PE-Antikörpern doppelgefärbt. A zeigt eine naive CB6F1-Maus ohne Transplantation mit ausschließlich doppelpositiven H-2K^{bxd}-Zellen. Spenderzellchimärismus 12 (B) bzw. 14 Tage nach Transplantation.

2.3.5 Das männliche mHag HY ist ein GvHD-Target

Die männlichen CB6F1-Empfänger entwickelten im Vergleich zu den weiblichen CB6F1-Empfängern, die dasselbe Transplantat erhielten, eine signifikant stärkere GvHD (4,0 vs. 1,9) (Abb. 2.25).

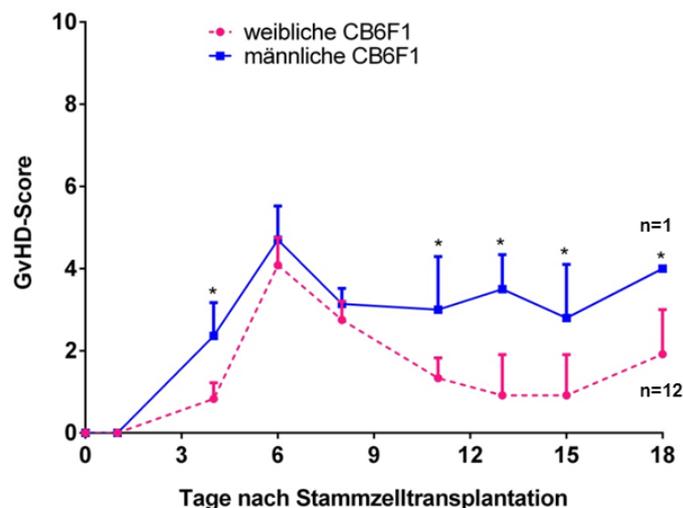


Abb. 2.25: Das mHag HY ist ein Zielantigen der GvHD-Reaktion. GvHD-Verlauf der weiblichen (●) und männlichen (■) allogenen transplantierten CB6F1-Empfängertiere. 24 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung (9 Gy) wurden weibliche und männliche CB6F1-Empfänger mit 2×10^7 Knochenmarkszellen (KM) und 1×10^7 Milzzellen (MZ) transplantiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=12 pro Gruppe, * p < 0,0001.

2.3.6 Höhere Mortalitätsrate bei einer HY mHags-Disparität

Die allogene Transplantation bei einer HY-Disparität führte in den männlichen Empfängern signifikant schneller zu einem letalen Ausgang (Abb. 2.26). Während die männlichen Versuchstiere bereits ab Tag 4 eine stufenweise Letalität aufwiesen, verstarben alle weiblichen Versuchstiere erst 18 Tage nach Transplantation und nur aufgrund einer leukämisch generalisierten Manifestation des invasiven C1498-GFP-UTY-Tumors.

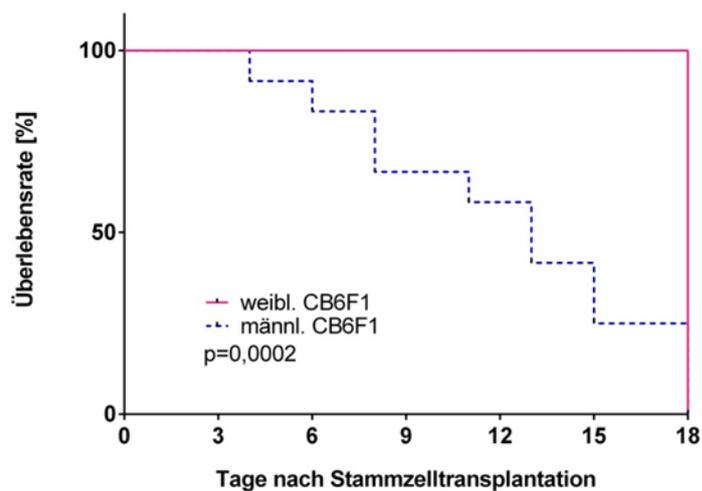


Abb. 2.26: Überlebenskurve der weiblichen (●) und männlichen (■) CB6F1-Empfänger aus Abb. 2.25 nach Kaplan-Meier. Je n=12 pro Gruppe, * p=0,0002.

Durch das *Fluorescence reflectance imaging* (FRI) konnte die Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors ins Empfängergewebe, unter anderem in die Milz, untersucht werden. Die gemessene Signalintensität des GFPs in den weiblichen Milzen war signifikant um 25% geringer als die in den männlichen Milzen (Abb. 2.27-C). Drei von sieben männlichen Milzen waren fast vollständig durch den C1498-GFP-UTY-Tumor infiltriert. Sie zeigten eine sehr hohe Signalintensität (max. 358 AU) im Vergleich zu den weiblichen Milzen (max. 184 AU), die eine ähnliche Verteilung des Tumors in allen acht Milzen aufwiesen (A).

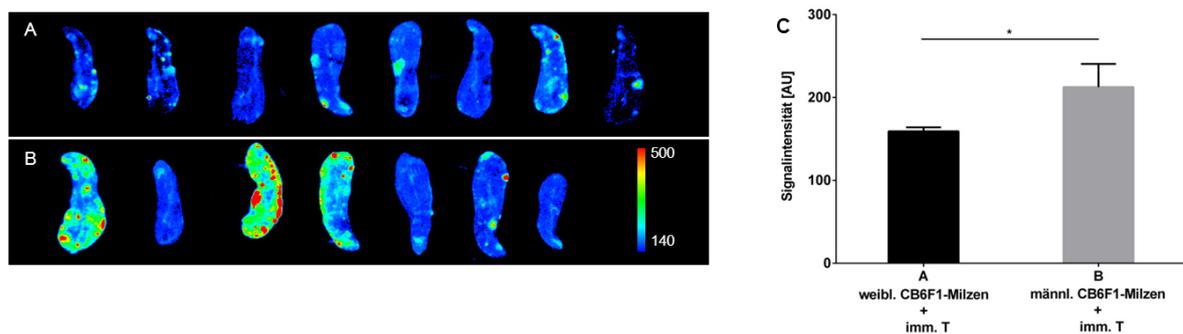


Abb. 2.27: Ex-vivo-Fluoreszenzbildgebung der Empfänger-Milzen mit *Fluorescence reflectance imaging* (FRI) zur Visualisierung der C1498-GFP-UTY-Tumorinfiltration. Die Milzen der Empfängertiere wurden an Tag 19 isoliert und die Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors mittels FRI gemessen. Die männlichen Milzen (n=7; B) wiesen eine um 25% signifikant stärkere GFP-Signalintensität (max. 358 AU) auf als die weiblichen Milzen (max. 184 AU; n=8) (A). Dargestellt sind die Mittelwerte der GFP-Signalintensität mit Standardabweichung, * p<0,0001

2.4 Einfluss des mHags HY auf den GvT-Effekt nach SZT

2.4.1 C1498-GFP-UTY-Wachstumskinetik in Abhängigkeit des HY-Expressions-musters (in ♀ vs. ♂ CB6F1-Empfängern)

Während in den weiblichen Empfängertieren HY selektiv nur auf dem C1498-GFP-UTY-Tumor exprimiert wird, exprimieren fast alle Zellen des männlichen Empfängerorganismus das mHag HY. Um die Alloreaktion gegen das mHag HY, in Abhängigkeit seines Expressionsmusters im Empfängerorganismus, besser zu untersuchen, wurde bei allen Transplantationsversuchen dieses Abschnittes dasselbe Transplantat, natives oder gegen HY immunisiertes Transplantat, und nur der C1498-GFP-UTY-Tumor verwendet. Die zwei Versuchsgruppen unterschieden sich lediglich durch das Geschlecht der Empfängertiere.

Bei vergleichbarer GvHD-Stärke beider Gruppen konnte gegen des selektiv exprimierte HY in den weiblichen Empfängertieren eine verstärkte Tumorsuppression gemessen werden, die durch das verminderte Tumorstadium messbar wurde, (Abb. 2.28). Der signifikante Unterschied begann an Tag 15 (A). Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die männlichen Empfängertiere von ihrer GvHD erholt und wiesen den gleichen GvHD-Score auf, wie die weibliche Empfänger-Gruppe (B).

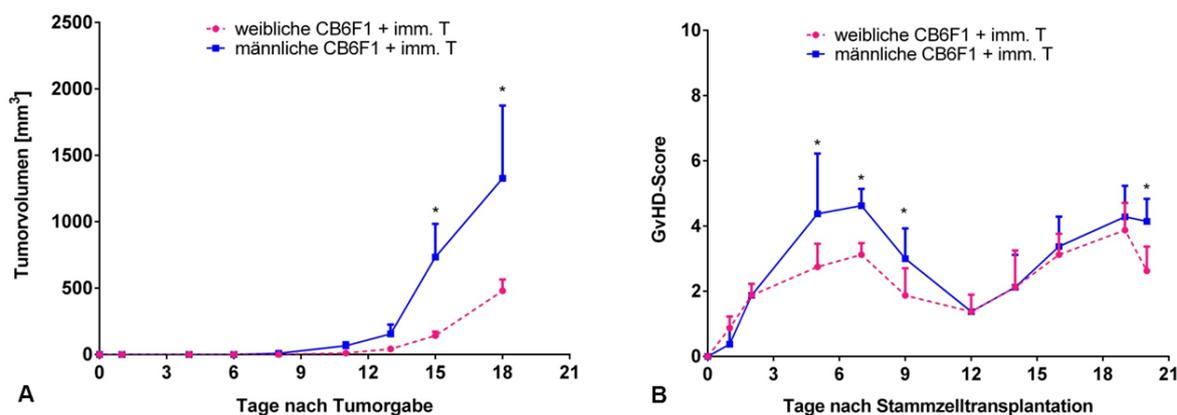


Abb. 2.28: Wachstumskinetik des C1498-GFP-UTY-Tumors in weibliche vs. männliche, allogene transplantierte CB6F1-Empfängertiere bei vergleichbarer GvHD-Stärke. Der Tumor wuchs in den männlichen Empfängertieren (■) schneller und zeigte ab Tag 15 ein signifikant progredienteres Wachstum als in den weiblichen Empfängertieren (●) (A), bei mehr oder weniger gleich verlaufender GvHD (B). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=8 pro Gruppe, * p<0,0001.

Da HY ein Zielantigen der GvHD-Reaktion ist, entwickelten die männlichen Empfängertiere eine signifikant stärkere GvHD als die weiblichen Tiere. Bei einer schweren GvHD der männlichen Empfängertiere, wirkten die erhöhte T-zelluläre Aktivität und das dadurch entstandene inflammatorische Zytokinmilieu supprimierend auf das Tumorstadium. So zeigte der C1498-GFP-UTY-Tumor aufgrund der schweren GvHD dieser Gruppe, eine generell signifikant langsamere Wachstumskinetik als bei der weiblichen Gruppe (Abb. 2.29).

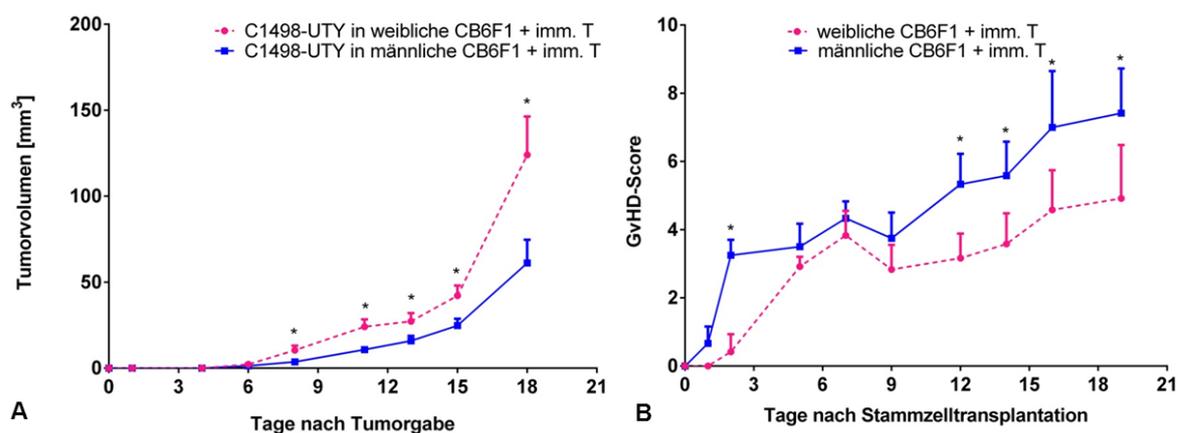


Abb. 2.29: Wachstumskinetik des C1498-GFP-UTY-Tumors in weiblichen vs. männlichen, allogene transplantierten CB6F1-Empfängertieren bei signifikant unterschiedlicher GvHD-Stärke. Die männlichen Empfänger litten an einer signifikant stärkeren GvHD (■) (B), die supprimierend auf das Tumorstadium wirkte (A). Das Tumorstadium stieg in den männlichen Empfängertieren langsamer und signifikant geringer an. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=12 pro Gruppe, * p<0,05.

Dies waren keine optimalen Bedingungen für die Vergleichbarkeit der Alloreaktivität gegenüber des HY-Alloantigens in Abhängigkeit des Expressionsmusters. Da bei gleich verlaufender GvHD ein signifikanter, messbarer Anti-Tumor-Effekt gegen das selektiv exprimierte Alloantigen HY gemessen wurde, sollte diese spezifische Erkennungsreaktion unter gleichbleibenden bzw. konstanten Bedingungen (GvHD) weiter untersucht werden. Durch gezielte Immunisierung kann eine T-zelluläre Immunreaktion induziert oder eine bereits vorhandene Immunantwort verstärkt werden. So sollte die T-zelluläre Reaktivität gegen das Alloantigen HY, erst gleichgeschlechtlich untereinander, in weiblichen oder männlichen Empfängern, verglichen werden, um dann den zusätzlichen GvT-Effekt, durch die Vorimmunisierung der Spendertiere genauer zu untersuchen.

2.4.2 HY wird tumorspezifisch exprimiert (TAA) in ♀ CB6F1-Empfängern

Hier dienten weibliche CB6F1-Versuchstiere als Empfänger. Eine verstärkte Anti-Tumor-Reaktion kann durch Vorimmunisierung der Spender, auch Antigen *priming* genannt, erreicht werden. Um diesen Anti-Tumor-Effekt untersuchen zu können, wurden zwei Transplantate bei gleichgeschlechtlichen Empfängern, also bei gleicher Verteilung des mHags HY im Empfänger-Gewebe, verglichen. Naives oder gegen HX immunisiertes Transplantat wurde mit gegen HY immunisiertem Transplantat verglichen. HX ist das Produkt des Äquivalent-Gens des UTY-Gens auf dem X-Chromosom (Shpargel et al., 2012).

- **Einfluss des gegen HY immunisierten versus des naiven Transplantats auf den GvT-Effekt**

Das mHag HY wurde in den weiblichen CB6F1-Empfängern selektiv auf dem Tumor exprimiert. Die Empfängertiere wurden entweder mit naive Transplantat oder mit einem zuvor gegen HY immunisierten Transplantat transplantiert. Beide Gruppen wiesen, außer an zwei Messtagen, den gleichen GvHD-Verlauf auf (Abb. 2.30-B). Der C1498-GFP-UTY-Tumor, der an Tag 1 nach Transplantation appliziert wurde, wuchs ab Tag 8 an und zeigte in der naiven Gruppe eine invasive und exponentielle Tumorkinetik ($870,9 \text{ mm}^3$, Tag 22). Die Gruppe, die mit dem gegen HY immunisierten Transplantat transplantiert wurde, zeigte dagegen ein supprimiertes Tumorwachstum ($347,8 \text{ mm}^3$, Tag 22). Der Tumorwachstumsunterschied war, wie

erwartet, ab Tag 13 nach Transplantation bzw. nach dem *Engraftment* des Transplantats, signifikant. Da die zwei Transplantate sich nur durch die Immunisierung gegen HY unterschieden, war die Tumorsuppression oder der beobachtete GvT-Effekt auf den C1498-GFP-UTY-Tumor, auf das Vorhandensein von anti-HY-spezifischen T-Zellklonen im immunisierten Transplantat zurückzuführen. Der GvT-Effekt gegen HY wurde in sechs Transplantationsversuchen mit gleichem Aufbau reproduziert.

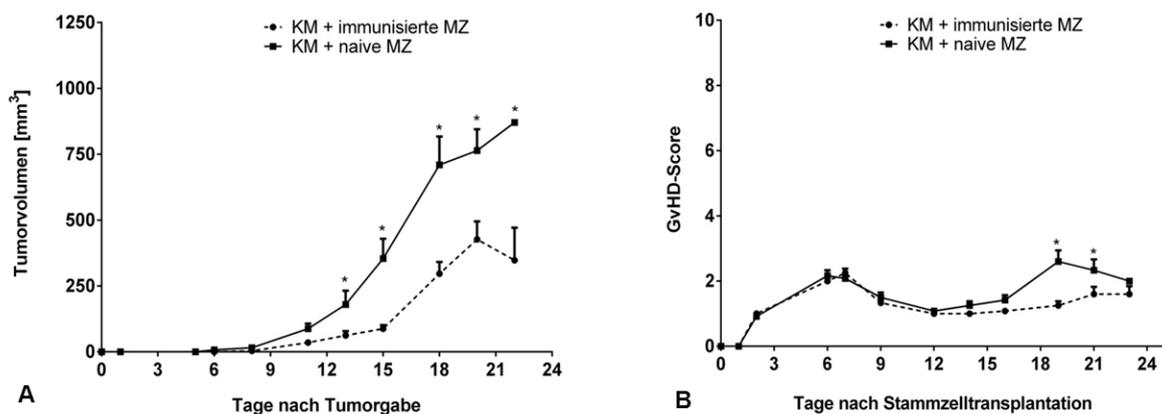


Abb. 2.30: GvT-Effekt gegen das tumorspezifisch exprimierte mHag HY durch das zuvor gegen HY immunisierte Transplantat (♀ CB6F1-Empfänger). Ab Tag 13 nach Transplantation zeigte der C1498-GFP-Tumor in der naiven Gruppe (■) ein signifikant progredienteres Wachstum als in der gegen HY immunisierten Gruppe (●) (A), bei gleichem GvHD-Verlauf (B). Repräsentativ für 8 Transplantationsversuche. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=12 pro Gruppe, * p<0,0001.

- **Einfluss des gegen HY immunisierten versus des gegen HX immunisierten Transplantats auf den GvT-Effekt**

Hier wurde das gleiche Transplantationsmodell wie im vorherigen Abschnitt verwendet. Stammzellen weiblicher Spender wurden in weibliche CB6F1-Empfänger transplantiert und der C1498-GFP-UTY-Tumor appliziert. Der einzige Unterschied war, dass die Kontrollgruppe nicht mit einem naiven Transplantat sondern mit einem Transplantat, das zuvor mit weiblichen Milzen immunisiert wurde, transplantiert wurde.

Ebenfalls wurde eine Tumorsuppression oder ein GvT-Effekt gegen das selektiv exprimierte Alloantigen mHag HY in der gegen HY immunisierten Gruppe festgestellt. Die Immunreaktion gegen das tumorspezifisch exprimierte mHag HY wurde in vier Transplantationsversuchen reproduziert. Die GvT-Reaktion gegen den

C1498-GFP-UTY-Tumor in der gegen HY immunisierten Gruppe, ging bereits ab Tag acht mit einem signifikant verminderten Tumorwachstum einher (Abb. 2.31).

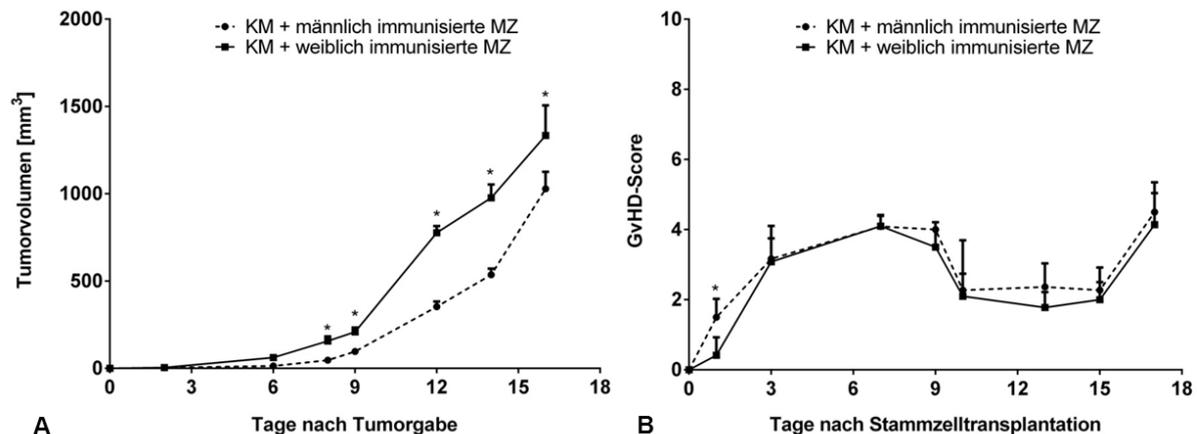


Abb. 2.31: GvT-Effekt gegen das tumorspezifisch exprimierte Alloantigen/mHag HY durch das zuvor gegen HY immunisierte Transplantat (♀ CB6F1-Empfänger). Die Kontrollgruppe wurde mit bestrahlten, weiblichen Milzzellen immunisiert. Die gegen HY immunisierte Gruppe (●) zeigte bereits ab Tag 8 ein signifikant vermindertes Tumorwachstum im Vergleich zu der gegen HX immunisierten Kontrollgruppe (■). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=12 pro Gruppe, * p<0,0001.

Die Tumorsuppression in der gegen HY immunisierten Versuchsgruppe ist durch spezifische T-zelluläre Aktivität im Transplantat zu erklären. Die Effektorzellen konnten durch eine immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden (Abb. 2.32).

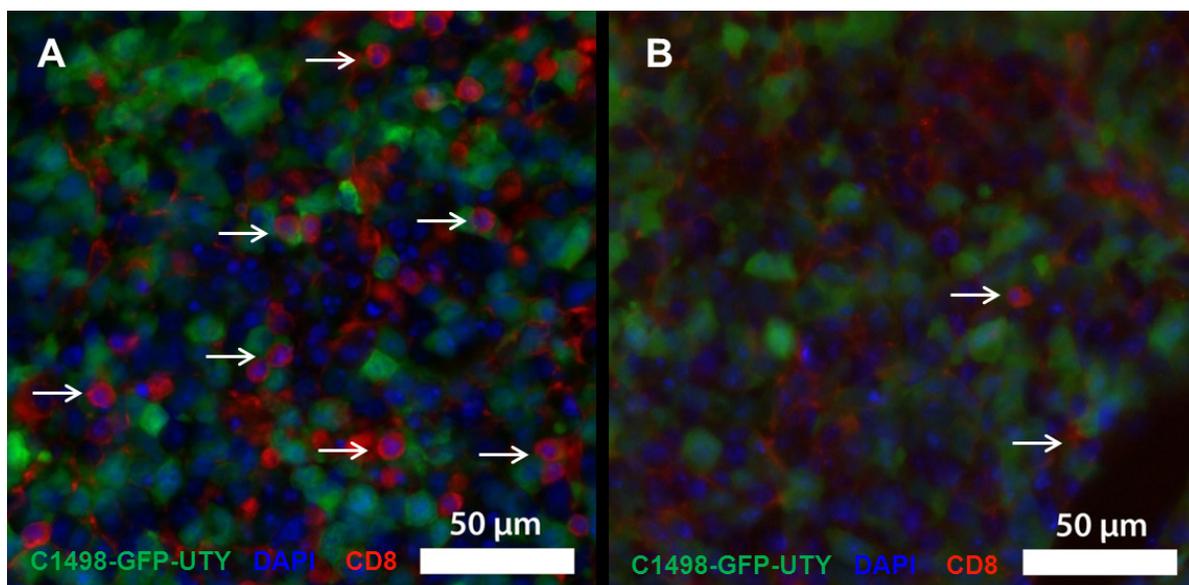


Abb. 2.32: Immunhistochemische Färbung der infiltrierten CD8⁺-Effektorzellen auf C1498-GFP-UTY-Tumor-Gefrierschnitten der Versuchsgruppen. Aus den extrahierten Tumoren der allogenen transplantierten Versuchsgruppen wurden Kryoschnitte (10 µm) angefertigt und mit CD8⁺-Antikörper gefärbt. Das Tumor-Gewebe (grün) der gegen HY immunisierten Gruppe (A) zeigte mehr infiltrierte CD8⁺-Effektorzellen als das der naiven Gruppe (B). Blaufärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CD8⁺-Effektorzellen sind rot (CD8⁺-AlexaFluor594-Antikörper) und mit Pfeilen markiert.

2.4.3 HY wird ubiquitär exprimiert in ♂ CB6F1-Empfängern

- **Einfluss des gegen HY immunisierten versus des naiven Transplantats**

Hier fungierten männliche CB6F1-Tiere als Empfänger, in dessen Organismus das mHag HY ubiquitär exprimiert wird. Die weiblichen Spendertiere waren, wie in vorherigen Abschnitten, parentale, (1) naive, (2) gegen HY oder (3) gegen HX immunisierte C57BL/6N. Eingesetzt wurde, wie bei allen Transplantationsversuchen, der C1498-GFP-UTY-Tumor.

In beiden Gruppen verliefen die Wachstumskurven des C1498-GFP-UTY-Tumors parallel und zeigten eine ähnliche Progredienz (Abb. 2.33-A). Weder das gegen HY immunisierte Transplantat noch das naive, zeigte in den männlichen Empfängern eine erhöhte immunologische Reaktivität auf den Tumor. In drei gleich aufgebauten Transplantationsversuchen wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

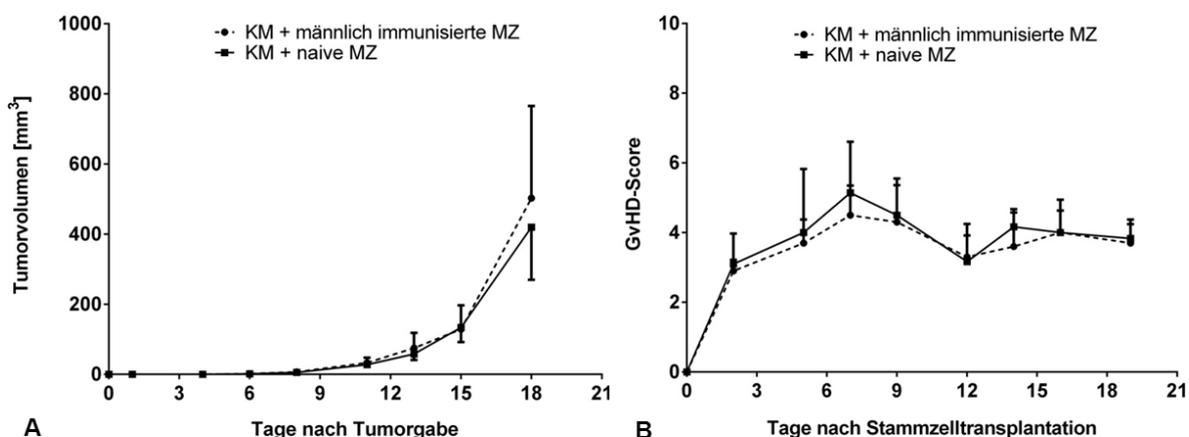


Abb. 2.33: Kein zusätzlicher GvT-Effekt gegen ubiquitär exprimiertes HY nach allogener Transplantation (♂ CB6F1-Empfänger). HY wurde ubiquitär im Empfänger-Organismus exprimiert. Naives (■) versus gegen HY immunisiertes Transplantat (●). Paralleler Verlauf des C1498-GFP-UTY-Tumorwachstums in beiden Gruppen (A) bei gleichem GvHD-Verlauf (B). Repräsentativ für 3 Transplantationsversuche. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=10 pro Gruppe.

An Tag 19 nach Transplantation wurden die angewachsenen Tumoren isoliert und anschließend die GFP-Signalintensität des C1498-GFP-UTY-Tumors mittels Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI) ermittelt (Abb. 2.34-A). Die gemessene GFP-Intensität beider Gruppen zeigte in Übereinstimmung mit den Tumorzellwachstumskurve keinerlei Unterschiede (2438,4 AU vs. 2442,1 AU) (Abb. 2.34-D/E).

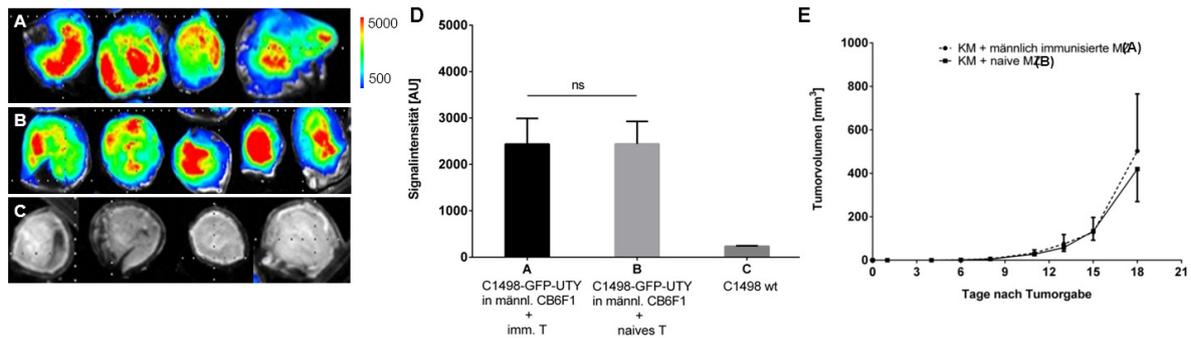


Abb. 2.34: Fluoreszenzbildgebung des C1498-GFP-UTY-Tumors mit *Fluorescence reflectance imaging* (FRI). Die GFP-Intensität des C1498-GFP-UTY-Tumors wurde an Tag 19 mittels FRI gemessen (A-B). (C) Die C1498-Wildtyp-Tumoren dienten als GFP-Negativkontrolle. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der GFP-Signalintensität der naiv transplantierten Kontrollgruppe (2442,1 AU) und der gegen HY immunisierten Gruppe (2438,4 AU) (D). (E) gibt die Tumorwachstumskurve beider Gruppen wieder (Abb. 2.33) Dargestellt sind die GFP-Signalintensitäts-Mittelwerte mit Standardabweichung (D).

• Einfluss des gegen HY immunisierten versus des gegen HX immunisierten Transplantats

Hier wiederholte sich das Setting bzw. das Transplantationsmodell des vorherigen Abschnitts, wobei die Spender der Kontrollgruppe nicht naiv waren sondern vorab mit weiblichen Milzzellen immunisiert wurden.

Es wurde wie im vorherigen Transplantationsversuch keinerlei Unterschied im Tumorwachstumsverhalten des C1498-GFP-UTY-Tumors zwischen den beiden Gruppen beobachtet. Die Wachstumskurven liefen nahezu parallel bei fast gleich verlaufender GvHD (Abb.2.35-B).

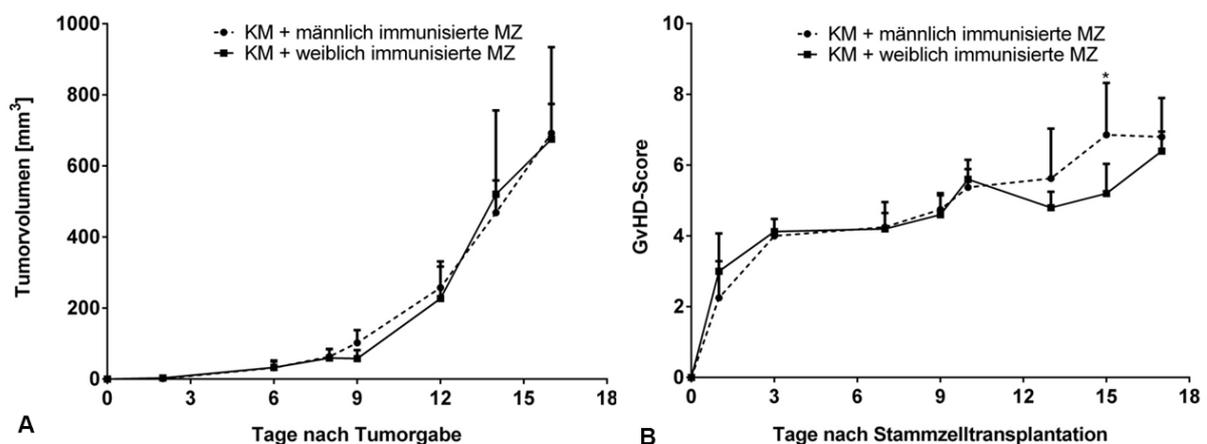


Abb. 2.35: Kein zusätzlicher GvT-Effekt gegen ubiquitär exprimiertes HY nach allogener Transplantation (♂ CB6F1-Empfänger). HY wurde ubiquitär im Empfänger-Organismus exprimiert. Gegen HY (●) versus gegen HX immunisiertes Transplantat (■). Nahezu paralleler Verlauf der C1498-GFP-UTY-Tumorwachstumskurven beider Gruppen (A) bei fast gleichem GvHD-Verlauf (B). Repräsentativ für 2 Transplantationsversuche mit insgesamt 20 Tieren pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, hier je n=8 pro Gruppe.

2.4.4 Kontrolltransplantation mit männlichem Transplantat (HY-kompatibel)

Mit der Kontrolltransplantation mit männlichen Spendern in männliche CB6F1-Empfänger, sollte geklärt werden, ob der nicht existierende GvHD-Effekt gegenüber HY bei einer ubiquitären Expression, nur zwischen den unterschiedlichen weiblichen Transplantaten bestand oder ob grundsätzlich keine zusätzliche Immunantwort auf ein ubiquitär exprimiertes mHag nach allogener Transplantation zu erwarten war.

Ein männliches, haploidentes Transplantat induzierte in den männlichen CB6F1-Empfängern eine ähnlich starke GvHD (6,6 vs. 6,8 am Tag 17) wie das gegen HY immunisierte Transplantat, obwohl das mHag für das immunisierte Transplantat ein GvHD-Zielantigen ist (Abb. 2.36-B). Bei ähnlich verlaufender GvHD entwickelte sich der C1498-GFP-UTY-Tumor beider Versuchsgruppen mit der gleichen Progredienz.

Eine Alloreaktion gegen das mHag HY auf dem C1498-GFP-UTY-Tumor war weder in der gegen HY immunisierten Gruppe noch in der Kontrollgruppe mit männlichem Transplantat zu beobachten.

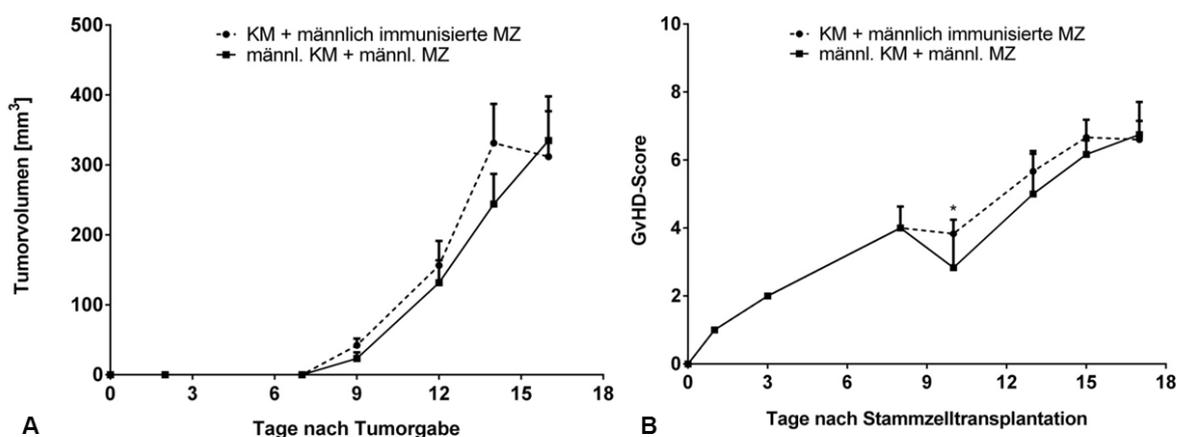


Abb. 2.36: Kein zusätzlicher GvT-Effekt gegen ubiquitär exprimiertes HY nach allogener Transplantation (♂ CB6F1-Empfänger). HY wurde ubiquitär im Empfänger-Organismus exprimiert. Männliches (■) versus gegen HY immunisiertes Transplantat (●). Der transgene Tumor C1498-GFP-UTY zeigte die gleiche Wachstumskinetik in beiden Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, je n=6 pro Gruppe.

2.5 Differenzierte Zytokin-Sekretion der allogenen transplantierten Gruppen

2.5.1 IFN- γ -Expression als anti-HY-spezifische T-Zellaktivität

Bei dieser Arbeit diente der *ELISpot*-Assay dem Nachweis des sekretierten Zytokins Interferon gamma (IFN- γ), das als spezifische T-zelluläre Immunantwort durch die isolierten CD3⁺-T-Lymphozyten freigesetzt wird. Der *ELISpot*-Assay wurde mit dem mouse-IFN- γ *ELISpot*^{PLUS} Kit [3321-4HPT-4] der Firma MABTECH durchgeführt.

An Tag 19 nach der Transplantation wurden die CD3⁺-T-Lymphozyten aus den Milzen der CB6F1-Empfängertiere isoliert und dienten als Effektorzellen für den IFN- γ -*ELISpot*-Assay. Sie wurden für 48 Stunden mit den bestrahlten C1498-GFP-UTY (120 Gy) bzw. den bestrahlten männlichen Milzzellen (30 Gy, Positivkontrolle für HY), auf einer, mit IFN- γ -Antikörper beschichteten, *ELISpot*-Platte kokultiviert. Zusätzlich wurde die Reaktivität der Effektorzellen in einer weiteren Positivkontrolle sichergestellt, indem diese mit CD3- und CD28-Antikörpern stimuliert wurden (Trickett & Kwan, 2003). Die Negativkontrollen wurden hingegen nur mit Medium in gleichem Volumen, ohne Zusatz von Stimulantien, kultiviert.

Die CD3⁺-Effektorzellen aus dem gegen HY immunisierten Transplantat produzierten signifikant mehr IFN- γ -Spots (22,7 Spots mit C1498-GFP-UTY- bzw. 23 Spots mit den männlichen Milzzellen) als die naiven CD3⁺-Effektorzellen (7,7 Spots mit C1498-GFP-UTY- bzw. 6 Spots mit den männlichen Milzzellen) (Abb. 2.37). Sie wurden durch die C1498-GFP-UTY-Tumor-Targetzellen stimuliert und sezernierten IFN- γ als spezifische T-zelluläre Immunantwort. Sie zeigten im Vergleich zu den naiven Effektorzellen eine hohe T-zelluläre Aktivität gegen das Alloantigen HY. Die Spezifität der Immunantwort erklärt sich durch die proportionale Zu- bzw. Abnahme der IFN- γ -Spots mit der Zu-/Abnahme der Targetzell-Zahl. Die naiven CD3⁺-Effektorzellen sezernierten, bei fast allen Effektor-Targetzell-Verhältnissen, die gleiche Anzahl an IFN- γ -Spots. Die Reaktivität der immunisierten Effektorzellen gegen die männlichen Milzzellen, diente als Kontrolle und zeigte die typische, proportionale Zunahme der IFN- γ -Spots in Abhängigkeit von der Anzahl der Stimulationen (Abb. 2.37-B) Die jeweilige angegebene Spotzahl war der Durchschnittswert aus der Triplett-Messung.

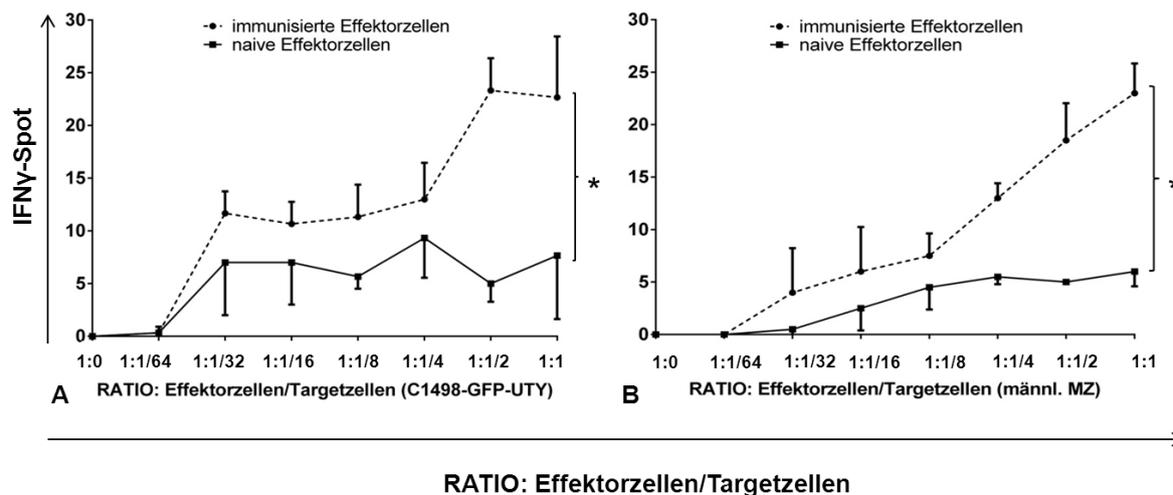


Abb. 2.37: Nachweis spezifischer T-Zell-Aktivität gegen das HY-Antigen mittels IFN- γ -ELISpot-Assay. Weibliche CB6F1 [H-2K^{bxd}]-Mäuse wurden mit naiven bzw. mit gegen HY immunisierten C57BL/6N-Stammzellen [H-2K^b] transplantiert. An Tag 18 nach der Tumorkonokulation erfolgte eine Splenektomie. Anschließend wurden die CD3⁺-T-Lymphozyten mittels *Pan T Cell Isolation Kit II* isoliert. Die CD3⁺-Effektorzellen wurden entweder durch C1498-GFP-UTY-Tumor- (A) bzw. männliche Milzzellen (B) stimuliert. Diese Ergebnisse waren repräsentativ für drei Transplantationsversuche. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, * p<0,05.

Die CD3⁺-Effektorzellen aus den vorab gegen HY immunisierten Versuchstieren, zeigten somit, im Gegensatz zu den naiven Effektorzellen, eine spezifische Immunantwort gegen den mHag HY exprimierenden C1498-GFP-UTY-Tumor (Abb. 2.37-A). Die Spezifität dieser T-zellulären Immunantwort ist einerseits durch den signifikanten Unterschied der produzierten IFN- γ -Menge zwischen den Effektorzellen, andererseits durch die proportionale Abnahme der IFN- γ -Spots zur Anzahl der stimulierenden Targetzellen, belegt.

Die relative IFN- γ -Expression aus dem extrahierten C1498-GFP-UTY-Tumor der beiden Versuchsgruppen, wurde parallel zum IFN- γ -ELISpot-Assay ermittelt. Darüber hinaus wurden die isolierten CD3⁺-Effektorzellen der gegen HY immunisierten Gruppe, mit den C1498-GFP-UTY- und C1498-GFP-PINCO-Tumorzellen kokultiviert und deren Überstand für die Bestimmung der IFN- γ -Konzentration, mit Hilfe des CBA-Assays, verwendet. Aus dem extrahierten Tumor der gegen HY immunisierten Gruppe wurde signifikant mehr IFN- γ quantifiziert, was auf eine erhöhte IFN- γ -Produktion bzw. eine erhöhte, spezifische T-Zell-Aktivität hindeutete (Abb. 2.38-D).

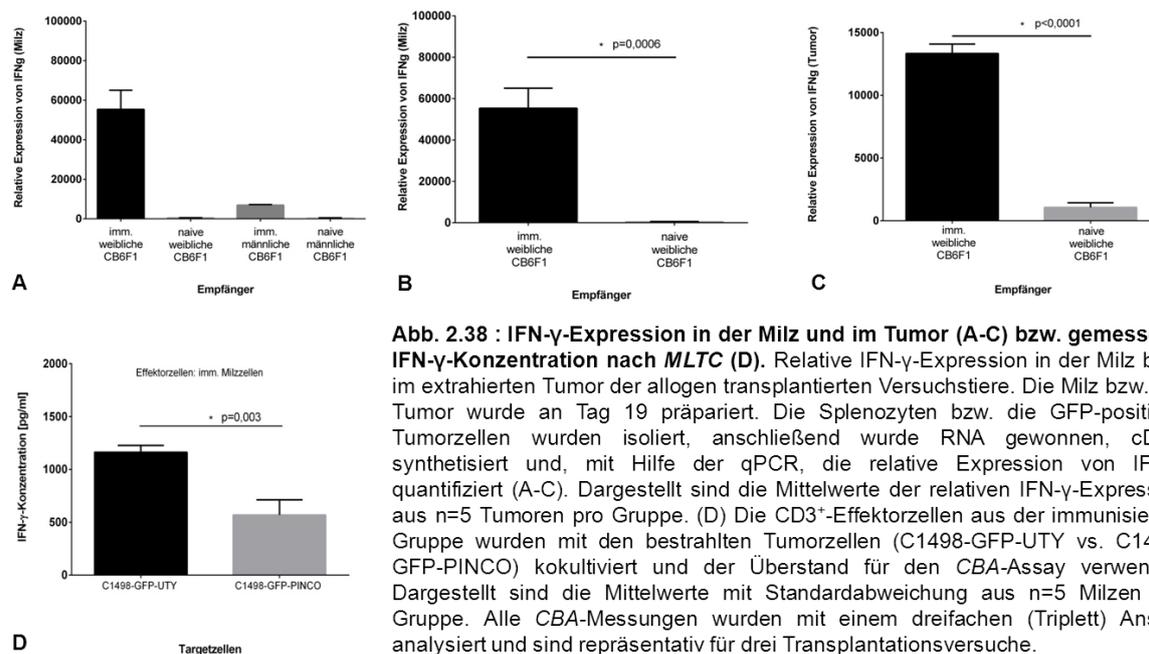


Abb. 2.38 : IFN- γ -Expression in der Milz und im Tumor (A-C) bzw. gemessene IFN- γ -Konzentration nach MLTC (D). Relative IFN- γ -Expression in der Milz bzw. im extrahierten Tumor der allogenen transplantierten Versuchstiere. Die Milz bzw. der Tumor wurde an Tag 19 präpariert. Die Splenozyten bzw. die GFP-positiven Tumorzellen wurden isoliert, anschließend wurde RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und, mit Hilfe der qPCR, die relative Expression von IFN- γ quantifiziert (A-C). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen IFN- γ -Expression aus n=5 Tumoren pro Gruppe. (D) Die CD3⁺-Effektorzellen aus der immunisierten Gruppe wurden mit den bestrahlten Tumorzellen (C1498-GFP-UTY vs. C1498-GFP-PINCO) kokultiviert und der Überstand für den CBA-Assay verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n=5 Milzen pro Gruppe. Alle CBA-Messungen wurden mit einem dreifachen (Triplett) Ansatz analysiert und sind repräsentativ für drei Transplantationsversuche.

Mit allen Nachweisverfahren in dieser Arbeit (*ELISpot*, *qPCR* und *CBA-Assay*) wurde gezeigt, dass die Expression des immunstimulierenden und antitumoralen Interferons IFN- γ in der gegen HY immunisierten, weiblichen, transplantierten Versuchsgruppe mit Anti-Tumor-Effekt signifikant höher ist als in den restlichen Versuchs- bzw. Kontrollgruppen.

Nachgewiesen wurde somit eine spezifische T-zelluläre Aktivität der gegen HY immunisierten Effektorzellen gegen den transgenen Tumor C1498-GFP-UTY sowohl *in vivo* im extrahierten Tumor als auch *in vitro* nach einer Restimulation mit dem Alloantigen HY.

2.5.2 Zytokin-Sekretion der allogenen transplantierten Empfängertiere

Nach einer SZT wird eine Zytokin-Sekretions-Kaskade, auch „*cytokine storm*“ genannt, induziert und bildet ein inflammatorisches Milieu, das wiederum die klonale Expansion der alloreaktiven Spender-T-Zellen initiiert bzw. zur Rekrutierung weiterer Effektor-Lymphozyten, wie NK-Zellen und Monozyten, führt (Vogelsang et al., 2003). Die Expression einiger produzierter Zytokine in den allogenen transplantierten Versuchstieren wurde mittels *Real-time-quantitativer PCR* (qPCR) oder nach einer *in vitro*-Restimulation der Effektorzellen (*MTLC*) mittels *CBA-Analyse* quantifiziert.

Die weibliche Empfängergruppe mit dem gegen HY immunisierten Transplantat und dem supprimierten Tumorwachstum (GvT) zeigte im Gegenstaz zu der weiblichen

Kontrollgruppe mit naivem Transplantat eine signifikant erhöhte Expression an pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-17A (Abb. 2.39). Darüber hinaus ist die Expression von der mit Perforinen an der Apoptose beteiligten Serinproteinase Granzyme B in dieser Versuchsgruppe signifikant höher (Abb. 2.39-C). Außerdem wurde die höchste Expression des essentiellen Transkriptionsfaktors für regulatorische T-Zellen FoxP3 in den Tumoren der weiblichen Empfängertiere mit dem Anti-Tumor-Effekt gemessen (Abb. 2.39-D).

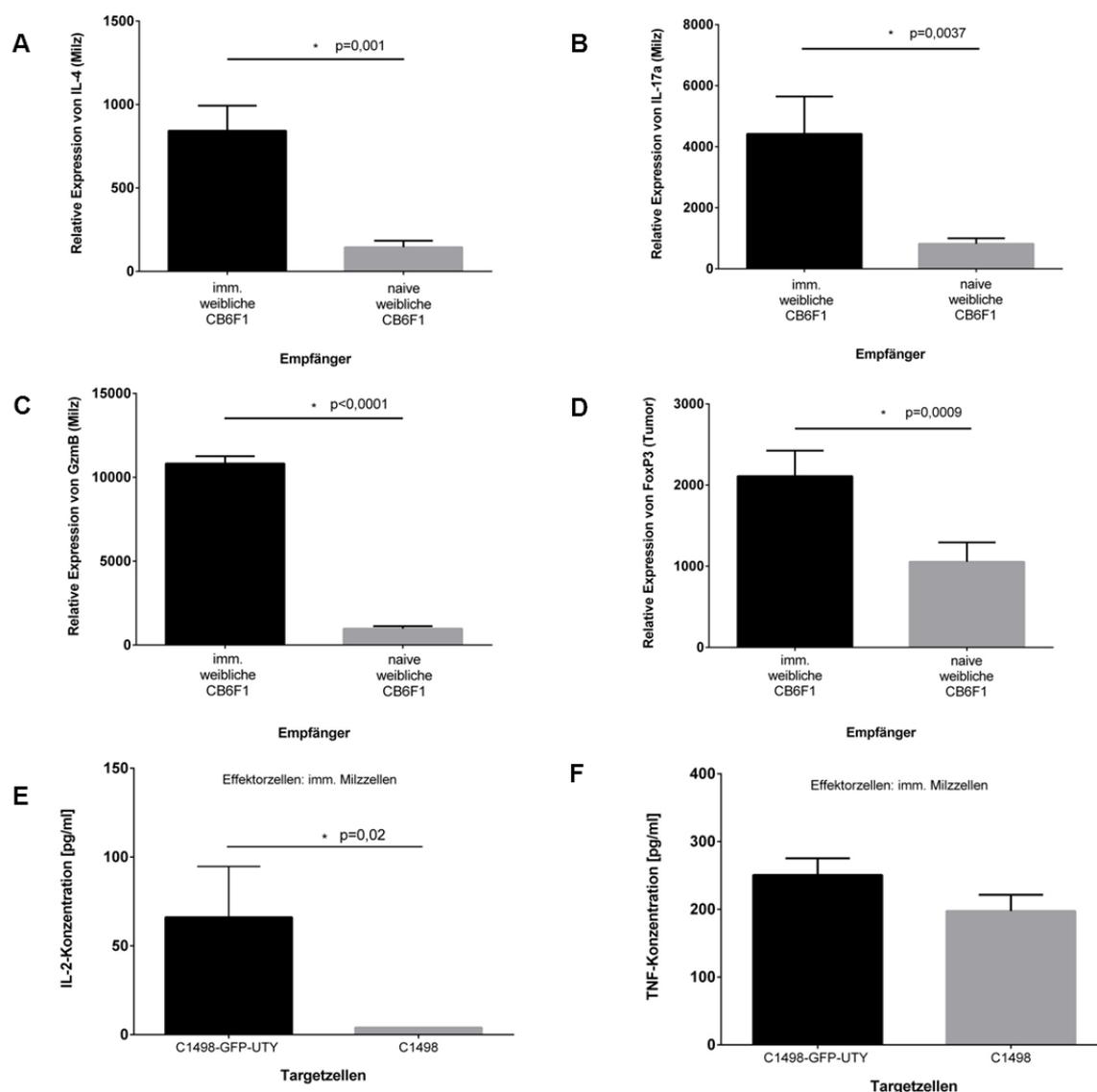


Abb. 2.39: Zytokin-Expression in der Milz bzw. im extrahierten Tumor der allogenen transplantierten, weiblichen Empfängertiere. (A-D) Quantifizierung der relativen Zytokin-Expression mittels qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin-Expression aus n=5 Milzen pro Gruppe. (E) IL-2- bzw. (F) TNF-Konzentration nach *in vitro*-Stimulation (*MLTC*) der gegen HY immunisierten CD3⁺-Effektorzellen durch den C1498 Wildtyp-Tumor und den C1498-GFP-UTY-Tumor. Die Zytokin-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe des *CBA*-Assays ermittelt. Alle *CBA*-Messungen wurden mit einem dreifachen Ansatz (Triplett) analysiert und sind repräsentativ für 3 Transplantationsversuche. Jede Gruppe repräsentiert einen Effektorzell-Pool aus n=5 Milzen.

Für den Tumornekrosefaktor (TNF) zeigte sich lediglich eine Tendenz ($p=0,055$), dass die $CD3^+$ -Effektorzellen mehr TNF in Anwesenheit des C1498-GFP-Tumors produzierten als in der des Wildtyp-Tumors C1498 (Abb. 2.39-F).

Im Gegensatz zu der erhöhten Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen in den gegen HY immunisierten, weiblichen Empfängertieren wurde sowohl in der naiven Kontrollgruppe als auch in den männlichen Empfängertieren signifikant mehr von dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 exprimiert. IL-10 wirkt immunsupprimierend, indem die IL-10-produzierenden Zellen, wie Monozyten und $CD4^+$ -Th2-T-Zellen, den CD28-Transduktionsweg und die Produktion einiger T-Zell-stimulierender Zytokine (IL-2, TNF) inhibieren (J. L. M. Ferrara, 2000). Die höchste IL-10-Expression wurde in der männlichen, transplantierten Versuchsgruppe mit dem gegen HY immunisierten Transplantat nachgewiesen. Außerdem ist die IL-10-Expression sowohl in dieser männlichen Empfänger-Gruppe als auch in der naiv transplantierten, weiblichen Kontrollgruppe im Vergleich zu der relevanten weiblichen Gruppe signifikant erhöht ($p=,0029$ bzw. $p=0,00025$) (Abb. 2.40). In diesen beiden Gruppen war das Tumolvolumen signifikant progredient, was auf eine reduzierte T-zelluläre Aktivität bzw. eine immunsupprimierende Wirkung durch IL-10 hindeutete.

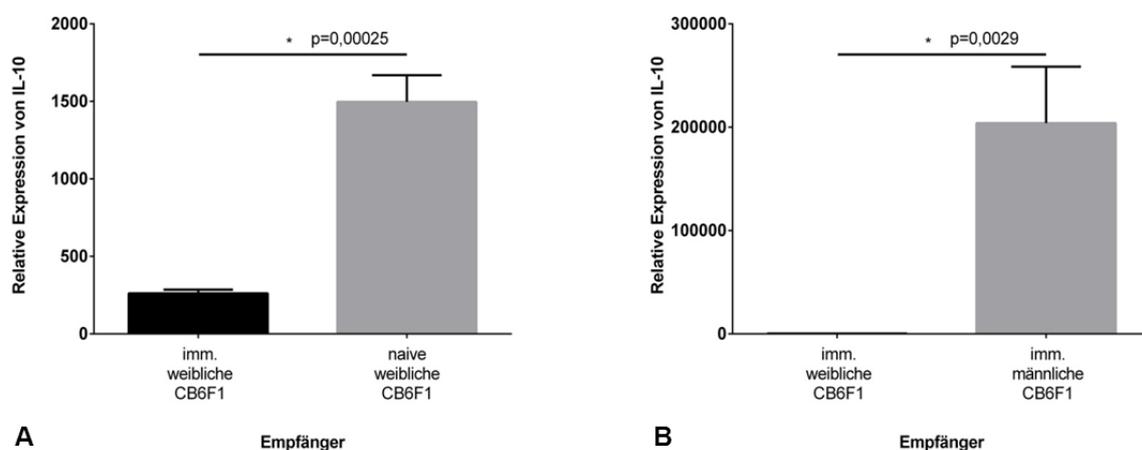


Abb. 2.40: IL-10-Expression in den Milzen der allogene transplantierten Empfängertiere. Die gegen HY immunisierte, weibliche Versuchsgruppe produzierte signifikant weniger IL-10 als alle anderen Versuchsgruppen (A und B). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen IL-10-Expression aus $n=5$ Milzen pro Gruppe. * $p=0,00025$ (A)/ $p=0,0029$ (B).

2.6 *In vitro*-Charakterisierung der Effektorzellen

2.6.1 Identifizierung spezifischer anti-HY-CD8⁺-T-Zellen

Der Nachweis einer *in vivo*-Tumorsuppression in der gegen HY immunisierten Gruppe legt die Existenz einer anti-HY-spezifischen T-Zell-Population nahe. Mit Hilfe eines antigenspezifischen Pentamer-Antikörpers sollte diese T-Zell-Population nachgewiesen werden. Milzzellen wurden aus naiven und gegen HY immunisierten Spendern sowie allogenen transplantierten Empfängern isoliert. Um die unspezifische Bindung des Pentamer-Antikörpers zu eliminieren bzw. zu reduzieren, wurden die Zellen zusätzlich mit CD19-PE-Cy5 gefärbt.

In der gegen HY immunisierten Gruppe wurden 5% der Zellen als doppelpositive CD8⁺-FITC und H-2D^b-APC Zellen markiert (Abb. 2.41-D). Diese Versuchsgruppe verzeichnete die meisten CD8⁺-FITC/H-2Db-APC doppelpositiven Zellen. Die weibliche Gruppe mit dem naiven Transplantat zeigte immerhin 33 doppelpositive Zellen. Beide männlichen Versuchsgruppen zeigten fast gleich viele CD8⁺-Zellen (13 und 18), die auch das Epitop H-2Db/WMHHNMDLI für das mHag HY erkennen (doppelpositiv) (B und C).

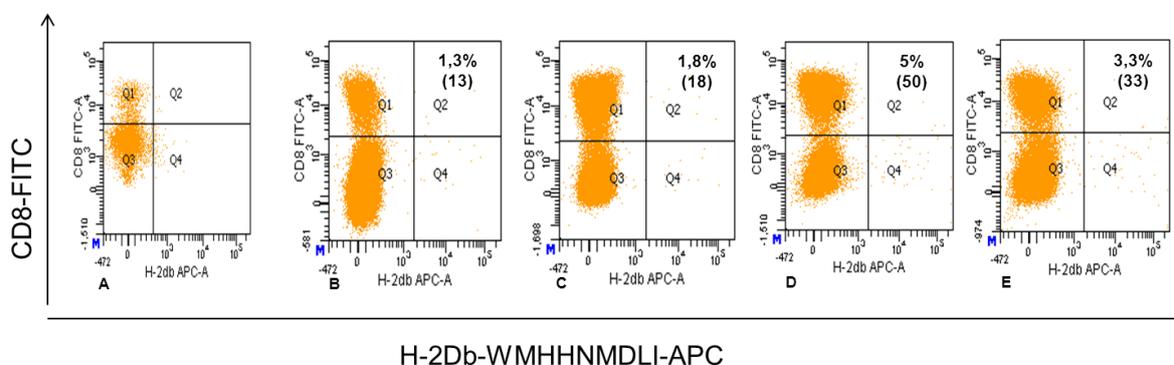


Abb. 2.41: Nachweis einer anti-HY-spezifischen T-Zellpopulation durch antigenspezifischen Pentamer-Antikörper. (A) zeigt ein naives, weibliches CB6F1-Versuchstier. (B und C) sind die männlichen und (D und E) die weiblichen, allogenen transplantierten Empfängertiere.

Aufgrund der geringen Zellfrequenz und fehlender Positiv-Kontrolle, eignet sich die anti-HY-Pentamer-Färbung nicht, um die relevante anti-HY T-Zellpopulation nachzuweisen. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz, dass in der gegen HY immunisierten Gruppe mehr von der anti-HY CD8⁺-T-Zellpopulation zu finden war.

2.6.2 *In vivo-Imaging* und Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors

Dank des GFP-Reportergens bestand die Möglichkeit, das Wachstum des C1498-GFP-UTY-Tumors, parallel zu den mechanischen und makroskopischen Messungen, auch *in vivo* mittels Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI, engl. *Fluorescence reflectance imaging*) zu verfolgen.

Das emittierte Fluoreszenz-Signal durch das GFP wurde detektiert und quantifiziert. Ein applizierter C1498 Wildtyp-Tumor bei einem allogenen transplantierten Versuchstier diente als GFP-Negativkontrolle (Abb. 2.42-A1). An Tag 18 nach Tumorapplikation (Tag 19 nach Transplantation) emittierte die weibliche Gruppe mit dem gegen HX immunisierten Transplantat das höchste GFP-Signal, wobei sie als einzige aller Gruppen (Abb. 2.42-C2) zu diesem Zeitpunkt keine nekrotischen Veränderungen der Tumoroberfläche aufwies (A2/B2/D2/E2).

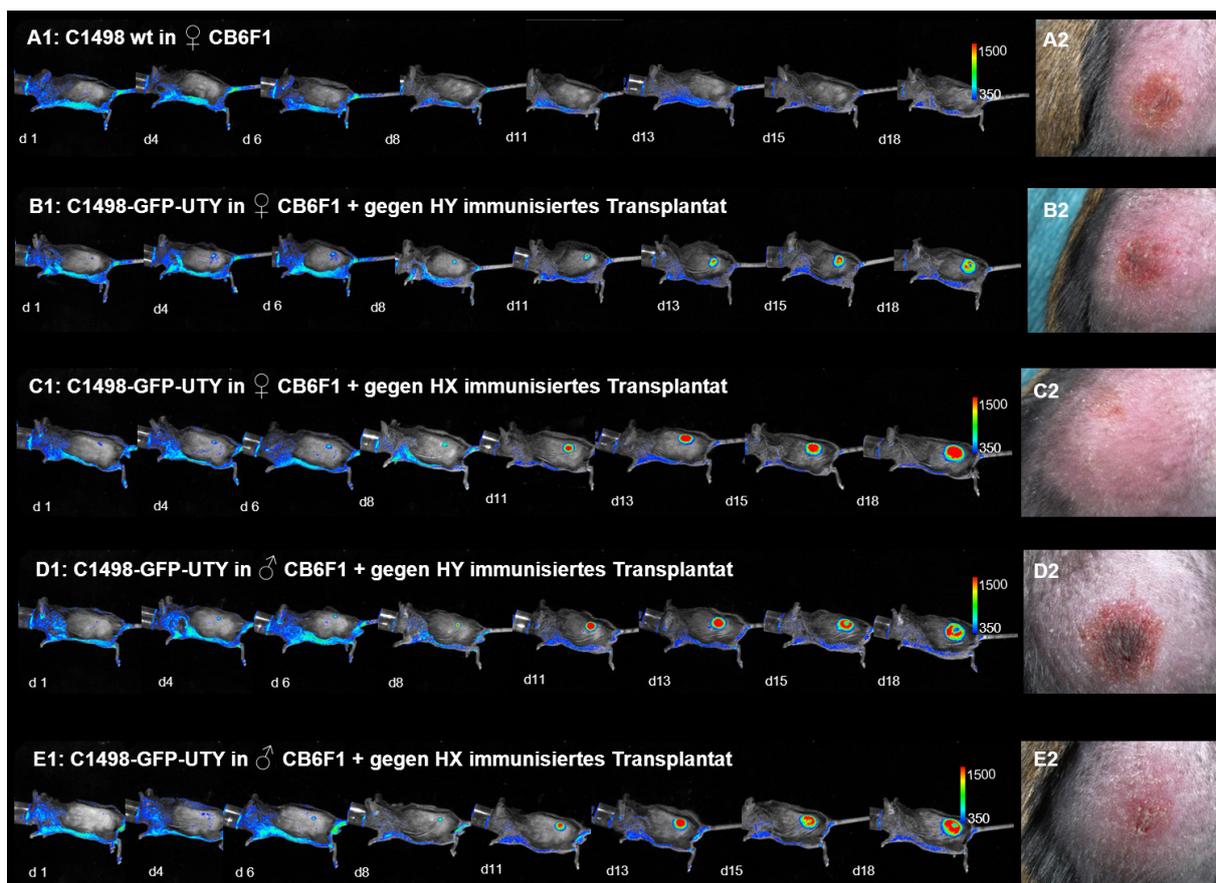


Abb. 2.42: *In vivo-Imaging* des Tumorwachstums durch Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI), ab Tumorapplikations-Tag bis Tag 19 nach Transplantation. Der C1498 Wildtyp-Tumor diente als GFP-Negativkontrolle. Die GFP-Fluoreszenzintensität nahm mit der Zeit und dem Tumolvolumen zu. Höchste Signalintensität bei den weiblichen Empfängern mit gegen HX immunisiertem Transplantat (C1). Nekrotische Veränderungen des Tumors in allen Gruppen außer bei der gegen HX immunisierten, weiblichen Gruppe (C2).

An Tag 19 nach Transplantation wurden die Versuchstiere präpariert und die Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors ins Empfängergewebe untersucht. Die aggressive C1498-Leukämie-Zelllinie tendiert schnell zu einer generalisierten Manifestation im ganzen Empfängerorganismus. So waren 18 Tage nach Tumorinokulation die Lunge, die Leber, die Milz, die Nieren, das Pankreas und teilweise die Muskeln von dem Tumor befallen. Bei der weiblichen Gruppe mit gegen HY immunisiertem Transplantat, beschränkte sich der Tumor lokal auf die Applikationsstelle (Abb. 2.43-C). Dafür generalisierte sich der Tumor sowohl in der mit naivem Transplantat transplantierten, weiblichen Gruppe als auch bei beiden männlichen Versuchsgruppen und infiltrierte in beinahe alle untersuchten Organe (Abb. 2.43-D/E/F).

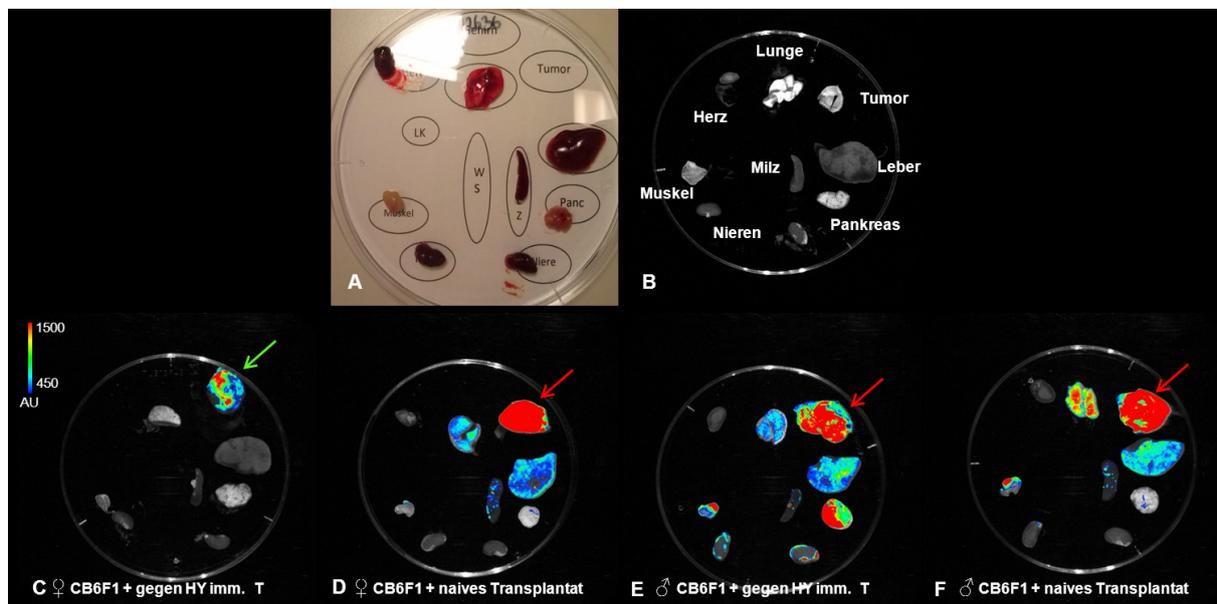


Abb. 2.43: Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI) zur Visualisierung der C1498-GFP-UTY-Tumorinfiltration ins Empfängergewebe an Tag 18 nach Tumorapplikation. (A) zeigt ein Beispiel einer Weißlichtaufnahme und (B) die Position der untersuchten Organe. Der Tumor der weiblichen Gruppe mit gegen HY immunisiertem Transplantat wurde nur an der Applikationsstelle lokalisiert (grüner Pfeil) (C). Alle anderen Versuchsgruppen verzeichneten eine C1498-GFP-UTY-Tumorinfiltration in beinahe alle untersuchten Organe (D/E/F).

Bei einem Transplantationsversuch mit starker GvHD, konnten die Versuchstiere bis 25 Tage nach der Transplantation beobachtet und das Tumorstadium dementsprechend verfolgt werden. Die schwere GvHD wirkte supprimierend bzw. inhibierend auf die Tumorpherese, so dass dieser nicht so rasch im Empfängerorganismus generalisieren konnte. In diesen Versuchstieren wurde ebenfalls die Infiltration des C1498-GFP-UTY-Tumors untersucht. Als Negativkontrolle diente eine naive, weibliche CB6F1-Maus ohne Tumor, deren gesunder

Magen-Darm-Trakt eine sehr hohe Eigen-Fluoreszenz aufwies (Abb. 2.44-A1). Ein weibliches Empfängertier mit naivem Transplantat wies ein sehr hohes GFP-Fluoreszenzsignal des Tumors auf, das mit der gemessenen Tumorgröße (7,3 mm x 7,7 mm) korrelierte. Der C1498-GFP-UTY-Tumor infiltrierte die Lunge, Leber, Milz, Nieren und teilweise den Darm (n=3) (Abb. 2.44-B2). Dagegen zeigte ein weibliches Empfängertier mit gegen HY immunisiertem Transplantat im Vergleich zu der naiven, transplantierten Gruppe ein minimales Tumorwachstum. Der Tumor zeigte keine Manifestation in den untersuchten Organen und wurde nur an der Applikationsstelle detektiert (Abb. 2.44-C2).

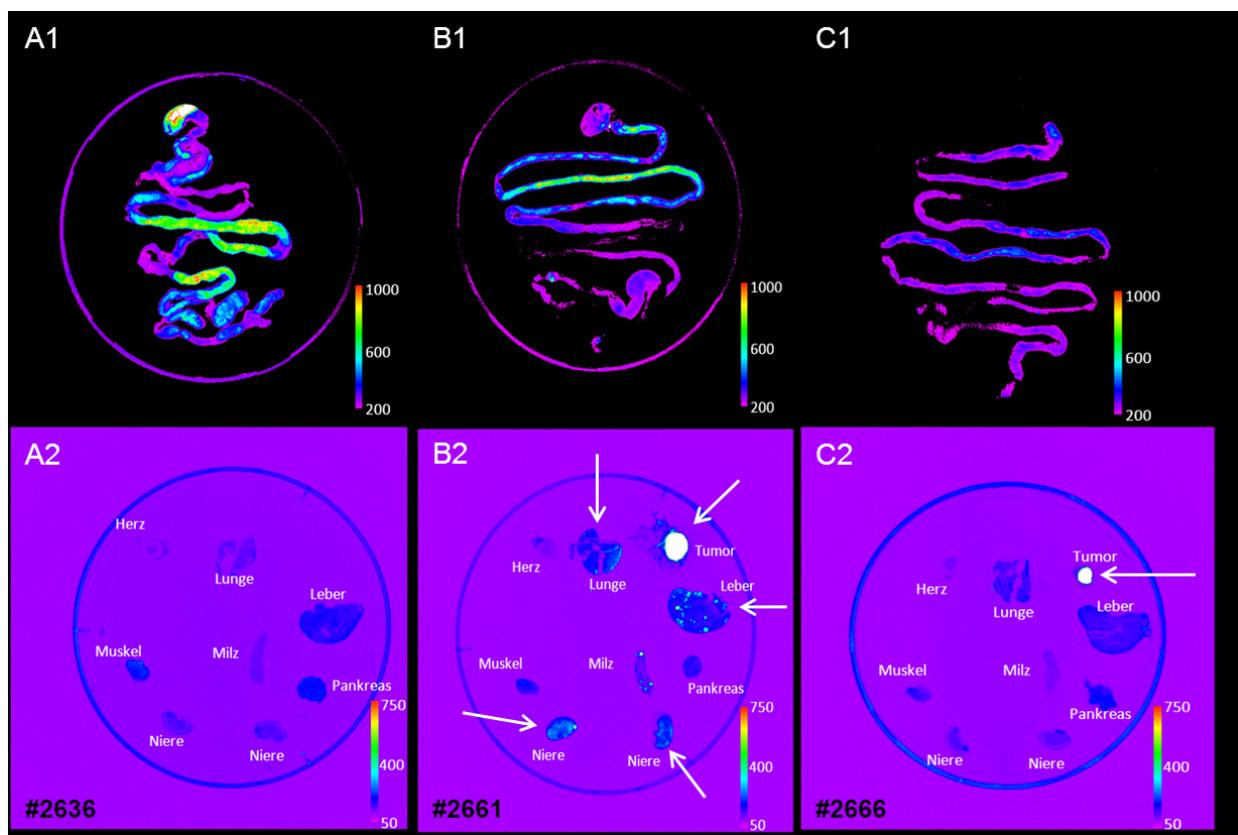


Abb. 2.44: Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI) zur Visualisierung der C1498-GFP-UTY-Tumorinfiltration in die Empfängergewebe an Tag 25 nach Tumorapplikation. (A) Naive, weibliche CB6F1-Maus ohne Tumor diente als Kontrolle und zeigte eine sehr hohe Eigen-Fluoreszenz des Magen-Darm-Trakts. (B) Weibliches Empfänger-Tier mit naivem Transplantat. C1498-GFP-UTY-Infiltration in Lunge, Leber, Milz, Nieren und teilweise in den Darm (n=3) (Pfeil). (C) Weibliches Empfänger-Tier mit gegen HY immunisiertem Transplantat mit minimalem Tumorwachstum (Pfeil). Keinerlei Tumor-Metastasen, nur Lokalisation des Tumors an der Applikationsstelle. (repräsentativ für n=5).

2.6.3 Etablierung von T-Zell-Rezeptor(TCR)-Profilen (*Spectratyping*)

Das *Spectratyping* ermöglicht das Herstellen eines genetischen T-Zell-Rezeptor-Profiles (TCR-Profil) aller vorhandenen T-Zell-Populationen eines Individuums. Hierbei wird die variable, komplementär bestimmende Region (CDR3, engl. *complementarity determining region 3*) mittels PCR amplifiziert. Die CDR3 stellt die Antigenbindungsstelle dar und weist die höchste Diversität im TCR auf.

Es wurde für die Spender-, Versuchs- und Kontrolltiere ein TCR-Profil aus der cDNA der CD3⁺-Zellen angefertigt. Dafür wurden die Milzen aus den Tieren präpariert und die CD3⁺-T-Zell-Population isoliert. Darüber hinaus wurde aus den isolierten CD3⁺-Zellen der extrahierten Tumoren ein TCR-Repertoire angefertigt. Die immunisierten Spendertiere wiesen, unabhängig davon ob sie gegen HY oder gegen HX vakziniert wurden, das gleiche T-Zell-Rezeptor-Profil auf (Abb. 2.45-A/B). Die männlichen Spender-Tiere wiesen in 4 TCR-Familien abweichende V β -Segmente im Vergleich zu den weiblichen Spendern auf (Abb. 2.45-C). Sie besaßen keine Population für die TBV23/24-TCR-Familie, dafür jedoch im TCR-Repertoire eine zusätzliche TCR-Population für die TBV11/12-Familie. In der TBV1/5- und TBV2/6-Familie der männlichen Spender-Tiere fehlte jeweils eine T-Zell-Population.

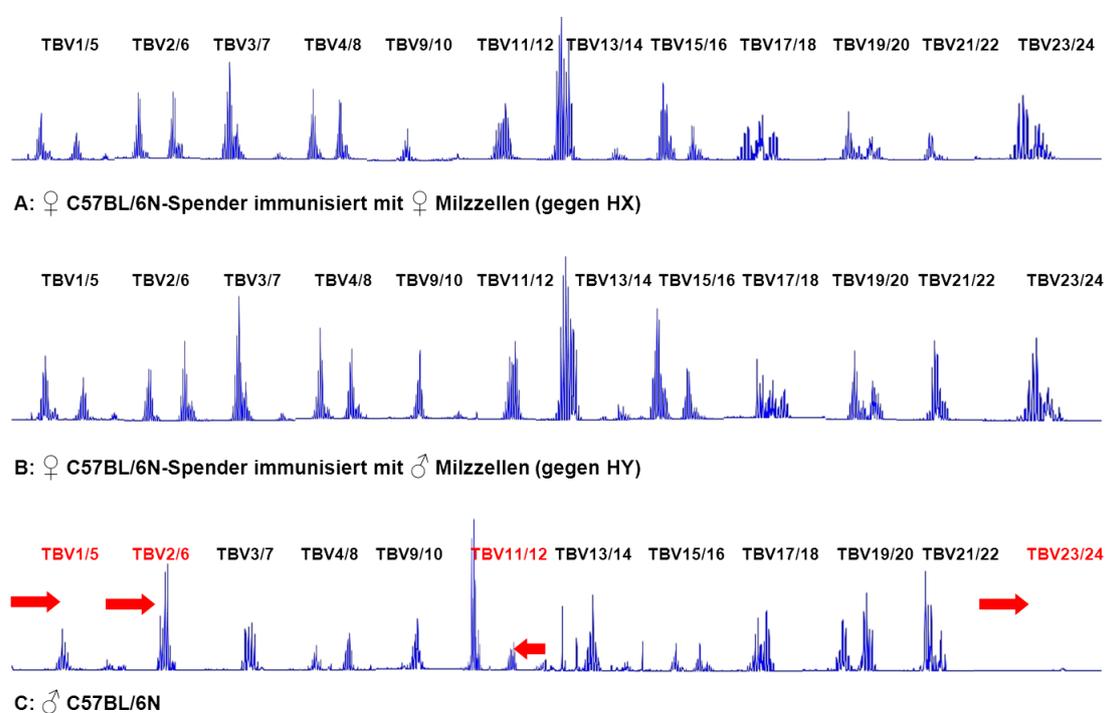


Abb. 2.45: TCR-Profil der Stammzell-Spender-Tiere für die allogene Transplantation. Spectratyping aus der isolierten CD3⁺-Zell-Population aus der Milz. Die immunisierten, weiblichen C57BL/6N-Spender-Tiere zeigten das gleiche TCR-Profil (A und B) dafür wiesen die männlichen Spender-Tiere in 4 V β -TCR-Familien (TBV1/5, TBV2/6, TBV11/12 und TBV 23/24) ein abweichendes Profil auf (rote Pfeile) (C).

Die T-Zell-Profile der weiblichen und männlichen, naiven CB6F1-Tiere unterschieden sich in allen V β -TCR-Familien, außer bei der TBV11/12-Familie, wo sich ähnliche V β -Segmente zeigten (Abb. 2.46).

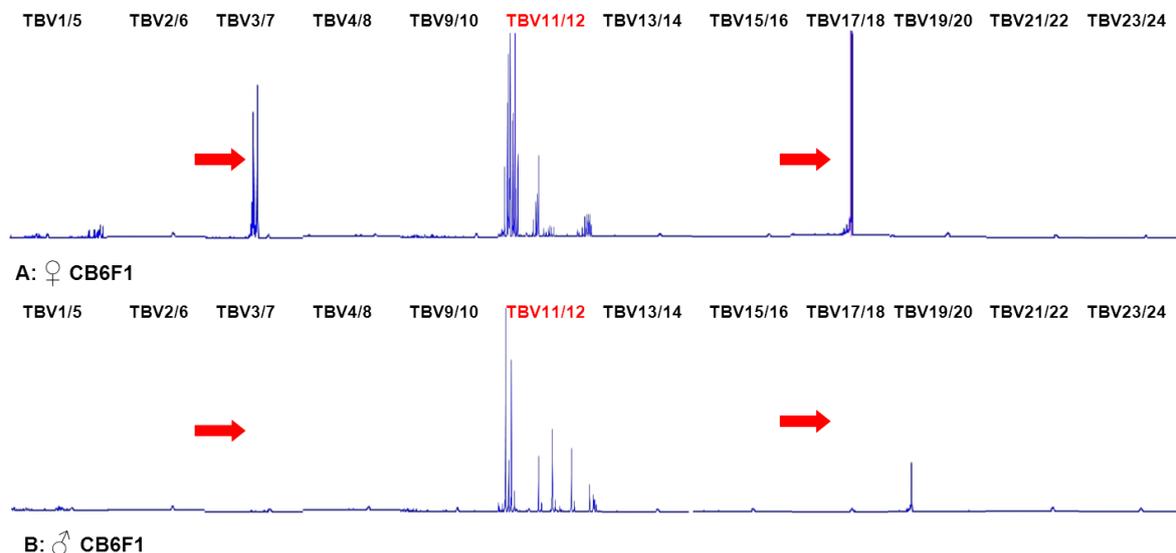


Abb. 2.46: TCR-Profil der Empfängertiere. Spectratyping aus der isolierten CD3⁺-Zell-Population aus der Milz. Die zwei Versuchsgruppen wiesen ein unterschiedliches TCR-Repertoire auf (A und B).

Die CD3⁺-Zellen aus den Milzen bzw. dem Tumor der allogenen transplantierten CB6F1-Empfängertiere, wurden an Tag 19 nach Transplantation isoliert. Im Vergleich zu den naiven CB6F1-Tieren (Abb. 2.46) wiesen die allogenen transplantierten Tiere ein neues, umfangreicheres und spenderähnliches TCR-Repertoire auf (Abb. 2.47).

• TCR-Profil der isolierten CD3⁺-Zellen aus den Milzen

In der naiv transplantierten Gruppe fehlten mehrere V β -TCR-Familien (rote Pfeile), die in der gegen HY immunisierten Gruppe nachgewiesen wurden (Abb. 2.47). Bei der TBV21/22-familie war auffällig, dass sie bei den Versuchstieren, die allogenen mit naivem Transplantat transplantiert wurden und den C1498-GFP-UTY appliziert bekamen selten und bei den allogenen transplantierten Versuchstiere, die den C1498 Wildtyp-Tumor appliziert bekamen, nie nachzuweisen war (Abb. 2.48).

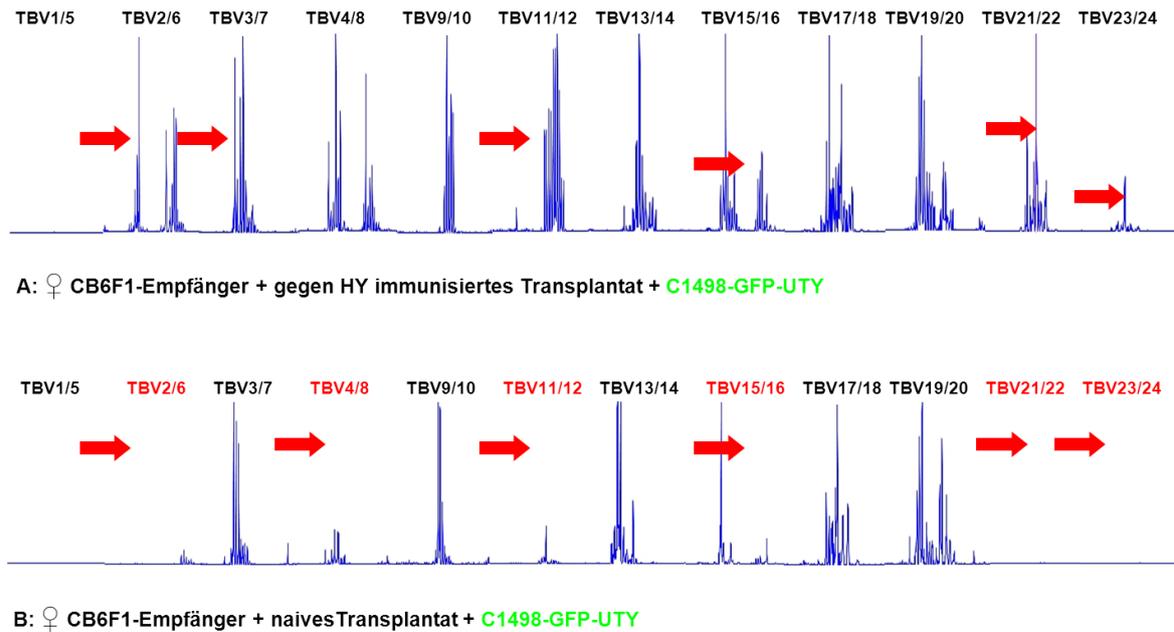


Abb. 2.47: TCR-Profil der allogenen transplantierten CB6F1-Empfängertiere. Spectratyping aus der isolierten CD3⁺-Zell-Population aus der Milz. Die gegen HY immunisierte Versuchsgruppe (A) wies ein umfangreicheres TCR-Repertoire auf als die naiv transplantierte, bei der 8 V β -Segment-Familien (TBV2/6, TBV4/8, TBV11/12, TBV15/16, TBV21/22 und TBV23/24) fehlten (B).

• TCR-Profil der isolierten CD3⁺-Zellen aus dem extrahierten Tumor

Das TCR-Repertoire der CD3⁺-Zellen aus dem extrahierten Tumor wies fast das gleiche Profil auf wie die CD3⁺-Zellen aus den Milzen. Die Unterschiede zeigten sich lediglich im Fehlen der TBV3/7-Familie in der gegen HX transplantierten Versuchsgruppe und dem Vorhandensein von 2 T-Zell-Populationen in der TBV4/8 und einer Population in der TBV11/12 auf (Abb. 2.48-B). Die vermutlich für die Erkennung des mHags HY relevante TBV21/22 TCR-Familie fehlte sowohl im Tumor der gegen HX transplantierten Gruppe als auch in der Versuchsgruppe mit dem C1498 Wildtyp-Tumor (Abb. 2.48-B/C).

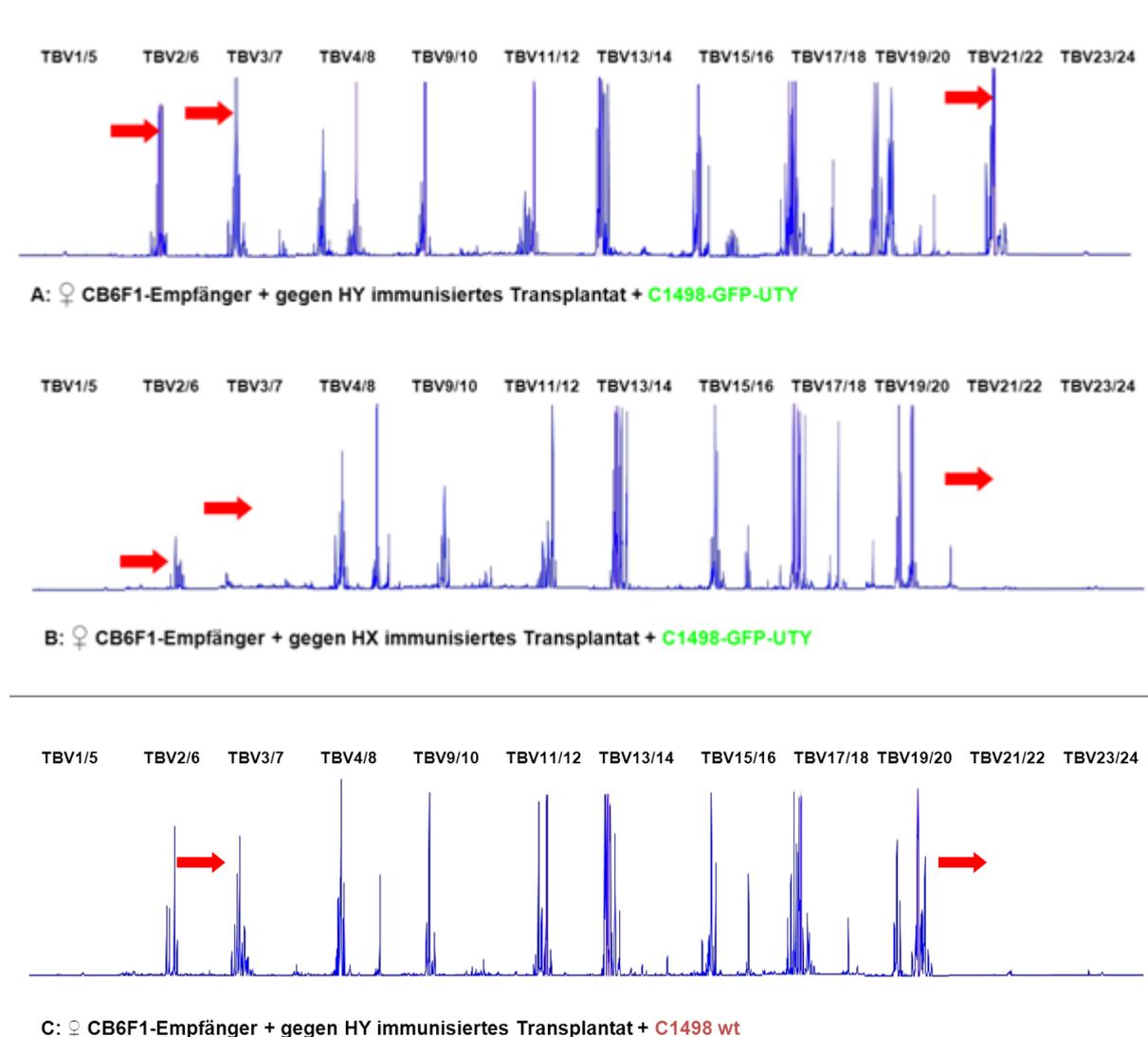
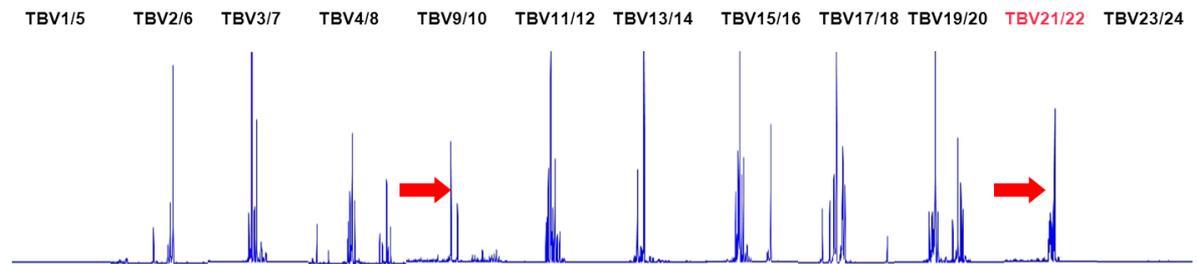


Abb. 2.48: TCR-Profil der allogenen transplantierten CB6F1-Empfängertiere. Spectratyping aus der isolierten CD3⁺-Zell-Population aus dem Tumor. Die vermutlich für die Erkennung des mHags HY relevante TBV21/22 TCR-Familie fehlte sowohl im Tumor der naiv transplantierten Gruppe als auch in der Versuchsgruppe mit dem C1498 Wildtyp-Tumor (B und C).

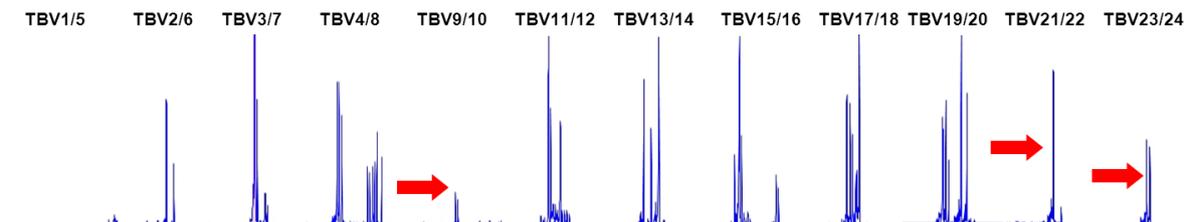
- **TCR-Profil der *in vitro*-restimulierten CD3⁺-Zellen durch die Tumorzellen**

Die isolierten CD3⁺-Zellen aus der Milz der Versuchstiere wurden mindestens für 48 Stunden mit bestrahlten C1498 Wildtyp- oder C1498-GFP-UTY-Tumorzellen kokultiviert und stimuliert. Parallel wurde die Kokultur der gleichen CD3⁺-Effektorzellen mit bestrahlten, männlichen Milzzellen angesetzt und diente als Positiv-Kontrolle für die HY-Erkennung. Die stimulierten CD3⁺-Zellen der immunisierten Versuchsgruppe wiesen das gleiche umfangreiche TCR-Repertoire auf wie die Zellen vor der Restimulation, jedoch zeigten die Histogramme der verschiedenen TCR-Familien nicht mehr die typische Gaußverteilung sondern lange,

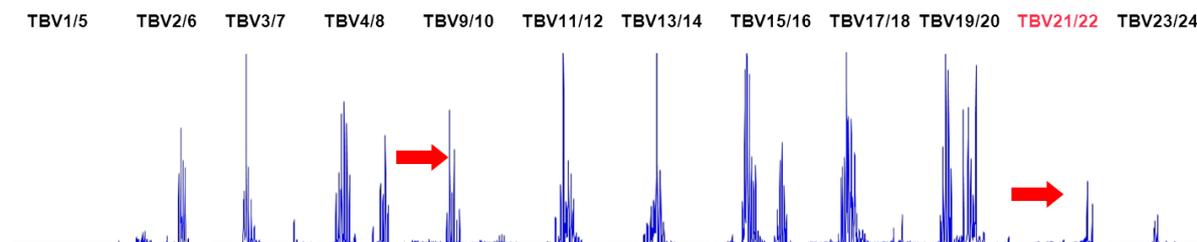
schmale Peaks, die auf die Anwesenheit spezifischer TCR-Familien hindeutete (Abb. 2.49-B). Der Peak der TBV21/22-Familie zeichnete die Positiv-Kontrolle für die anti-HY spezifische T-Zell-Population als solche aus. Genauso zeigten die stimulierten CD3⁺-Zellen der immunisierten Gruppe diesen bestimmten, spezifischen Peak. Weder die Stimulation durch den C1498 Wildtyp-Tumor noch durch die männlichen Milzzellen der naiv transplantierten Gruppe, führte in dieser Gruppe zur Generierung der TBV21/22 TCR-Familie (Abb. 2.49-C/D).



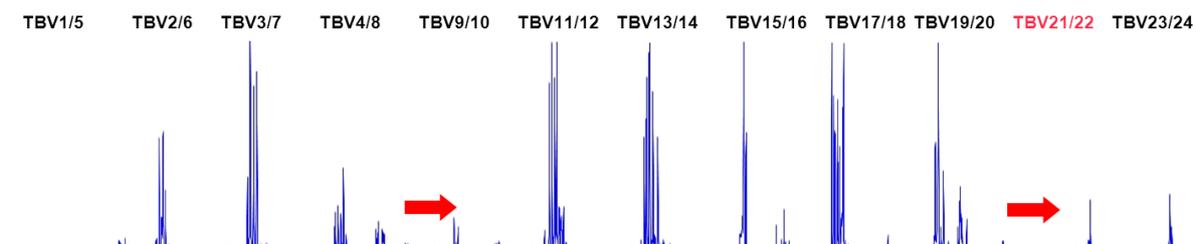
A: gegen HY immunisierte CD3⁺-Zellen + C1498-GFP-UTY



B: gegen HY immunisierte CD3⁺-Zellen + ♂ Milzzellen (HY-Kontrolle)



C: naive CD3⁺-Zellen + C1498 wt



D: naive CD3⁺-Zellen + ♂ Milzzellen (HY-Kontrolle)

Abb. 2.49: TCR-Profil der restimulierten CD3⁺-Zellen durch die Tumorzellen. Spectratyping aus der isolierten CD3⁺-Zell-Population aus der Milz, die für 48 Stunden durch die Tumorzellen bzw. männlichen Milzzellen *in vitro* restimuliert wurden. Die Histogramme zeigten weniger die typische Gaußverteilung, dafür eher einen eindeutigen, für eine Population bestimmten Peak. Die gegen HY immunisierte Versuchsgruppe wies, wie die für die anti-HY generierende Positiv-Stimulation mit den männlichen Milzzellen, einen Peak für die TBV21/22-Familie auf (A und B). Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Transplantationsversuche und *MLTC* mit mindestens n=6 pro Gruppe.

3 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung des Einflusses ubiquitär exprimierter Antigene am Beispiel des männlichen minor Histokompatibilitätsantigens (mHags) HY auf den erwünschten Anti-Tumor-Effekt (GvT) nach einer allogenen, haploidenten Stammzelltransplantation.

Dafür standen zwei Tumorzelllinien zur Verfügung, die das mHag HY exprimieren:

1. Ein Lymphom aus einer männlichen Maus (Ursprung: C57BL/6, H-2K^b), das HY endogen exprimiert (Kovalchuk et al., 2000a).
2. Eine Leukämiezelllinie (Ursprung: C57BL/6, H-2K^b), die stabil mit dem HY-codierenden UTY-Gen transfiziert wurde.

Für die experimentellen Untersuchungen wurde ein murines „parent-into-F1-generation“-Transplantationsmodell (C57BL/6N→F1[BALB/cxC57BL/6N]) verwendet, das aufgrund eines Haplotyp-Unterschieds (H-2K^b→H-2K^{bxd}) zur GvHD-Entwicklung in den transplantierten F1-Empfängertieren führte. Das Transplantat (Knochenmark und Milzzellen) und die beiden Tumormodelle [H-2K^b] waren syngen, so dass eine Alloreaktion gegen den Tumor nur über das Alloantigen bzw. mHag HY vermittelt werden konnte.

Es wurde in den Vorarbeiten experimentell gezeigt, dass die HY endogen exprimierende Tumorzelllinie, das Lymphom Bl6xmyc #85, unabhängig vom HY-Expressionsmuster, sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Empfängertieren, die gleiche Wachstumskinetik zeigte. Die Vorimmunisierung der Spenderinnen gegen HY blieb ohne zusätzliche Immunreaktion. In anderen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits eine alleinige Schwangerschaft mit männlichem Fötus die Bildung spezifischer HY-Antikörper in Menschen und Mäusen induziert (James et al., 2003; Verdijk et al., 2004). Entgegen der Annahme, dass gegen HY eine zusätzliche, allospezifische Reaktion vermittelt wird, gab es keinerlei Effekt, weder aufgrund der Vorimmunisierung noch aufgrund der Expressionsverteilung von HY im Empfängerorganismus. Eine Zytogenetik-Analyse der männlichen Bl6xmyc #85-Tumorzellen wies ein Mosaik von Zellen mit nur einem X-Chromosom (X0) und Zellen mit einem X- und einem Y-Chromosom (XY) auf. Der Verlust eines Bruchstückes oder des ganzen Y-Chromosoms ist eine der häufigsten sekundären Chromosomenaberrationen in hämatologischen Tumoren (Berger & Bernheim, 1979; Forsberg et al., 2014; Wu, Xue, & Pan, 2005). Durch das teilweise

Fehlen des Y-Chromosoms verhielt sich der Bl6xmyc #85-Tumor somit auf genetischer Ebene wie eine weibliche Zelllinie. Aufgrund der MHC- und mHag-Parität (X0) zwischen Spenderzellen und Tumor [H-2K^b] konnte keine Alloreaktion gegen den Tumor stattfinden. Es ist fraglich, ob überhaupt ein Effekt gegen diesen geringen Anteil Y-positiver Tumorzellen stattfinden kann und ob dieser messbar wäre (Gegenstand einer medizinischen Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe, Frau C. Dahrenmöller). Das endogene HY-Tumormodell Bl6xmyc #85 eignete sich aufgrund der genetischen Instabilität daher nicht zur Klärung der Fragestellung. Daraus folgend wurde eine stabile Zelllinie generiert, die das zu untersuchende mHag HY permanent und stabil exprimiert.

Um den Einfluss der HY-Expression in *in vivo*-Experimenten langfristig untersuchen zu können, musste eine stabile Expression des Alloantigens gewährleistet werden. Als Modellzelllinie wurde die weibliche Leukämiezelllinie C1498 ausgewählt. Durch die Transfektion des C1498 Wildtyp-Tumors mit dem pcDNA3-GFP-UTY-Vektor mit Hilfe von Lipofectamin und durch Elektroporation konnte nur eine geringe Transfektionsrate (<3%) erzielt werden. Da die hier verwendete Tumorzelllinie erfahrungsgemäß gut zu transfizieren ist, erklärt sich das hier vorliegende Problem der transienten Transfektion, durch die Größe des pcDNA3-GFP-Vektors (5428 bp+GFP 921 bp) und des zu untersuchenden UTY-Gens (3700 bp) (Ribeiro et al., 2012). Eine stabile Integration des UTY-Gens in das Genom der Tumorzellen konnte jedoch durch ein retrovirales Verfahren erreicht werden. Mit Hilfe des *Gateway Cloning Systems* wurde eine 100%-ige Transfektionsrate der virusproduzierenden *Platinum-E Retroviral Packaging* Zielzellen erreicht. Ein Vorteil dieses Systems ist, neben der hohen Transfektionsrate, die spezifische Erkennung der *attL*-, *attR*-, *attB*- und *attP*-Rekombinationsschnittstellen durch die Clonase Mix Enzyme, die dafür sorgen, dass der richtige Leserahmen des Gens beibehalten wird (Gasperi et al., 1999; Grignani et al., 1998). Nach erfolgreicher Transduktion des C1498 Wildtyp-Tumors, konnte die Reinheit der neu generierten C1498-GFP-UTY-Zelllinie durch regelmäßiges Sortieren der Zellen auf GFP-Positivität gewährleistet werden. Mit Hilfe eines polyklonalen anti-UTY-Antikörpers, der den C-Terminus des HY-Proteins erkennt, konnte ein Expressionssignal eines Proteins nachgewiesen werden, das mit der Größe des UTY-Gens übereinstimmt. Da die Sequenz des UTY-C-Terminus jedoch eine sehr hohe Homologie (>80%) mit der Sequenz des UTX-C-Terminus,

dem Äquivalent-Gen des UTY-Gens auf dem X-Chromosom, aufweist (Shpargel et al., 2012; Xu, Deng, Watkins, & Disteché, 2008), kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Expressionssignale UTY-spezifisch sind oder nicht. Die Fusion eines Protein-Affinitäts-Tags (z.B. His, Hat oder myc) direkt hinter das HY-Protein, wäre eine alternative Möglichkeit, die Proteinexpression von UTY zu quantifizieren. Die rekombinanten Proteine können über eine Affinitätschromatographie nachgewiesen werden (Terpe, 2007). Die Intergration einer zusätzlichen Sequenz zum UTY-Gen (3700 bp), auch wenn es sich nur um ein wenige Basenpaare gehandelt hätte, hätte die Größe des Vektors jedoch unnötig erhöht und die Transfektionsbedingungen erschwert (De La Vega, Braak, Azzoni, Monteiro, & Prazeres, 2013; Ribeiro et al., 2012). Somit erfolgte eine Quantifizierung der HY-Expression durch die transkribierte mRNA des UTY-Gens (Guo et al., 2008). Im Gegensatz zum C1498 Wildtyp- und dem C1498-GFP-PINCO-Kontrolltumor exprimierte der C1498-GFP-UTY-transgene Tumor das UTY-Gen. Sowohl die männlichen C57BL/6N-Spender als auch die männlichen F1-Empfänger zeigten eine UTY-Expression auf mRNA-Ebene.

Das generierte C1498-GFP-UTY-Tumormodell wurde im Hinblick auf seine Immunogenität untersucht. Dafür wurden der C1498 Wildtyp-Tumor und der C1498-GFP-UTY transgene Tumor in die rechte bzw. linke Flanke weiblicher C57BL/6N-Tiere appliziert, die zuvor mit bestrahlten, männlichen Milzzellen immunisiert worden waren. Der C1498-GFP-UTY transgene Tumor zeigte in den zuvor gegen HY immunisierten, weiblichen C57BL/6N-Tieren im Gegensatz zu dem C1498 Wildtyp-Tumor eine signifikant langsamere Wachstumskinetik. Da beide Tumore sich nur in der Expression von HY unterschieden, war die Tumorregression des C1498-GFP-UTY transgenen Tumors auf eine zusätzliche HY-vermittelte Alloreaktivität, also auf die Immunogenität des exprimierten Alloantigens HY, zurückzuführen. Somit wurde die Immunogenität des mHags HY in unserem generierten Modell bewiesen.

Die akute myeloische C1498-Leukämie-Zelllinie ist ein letaler und invasiver Tumor (Goldie, Butler, Anderson, Maxwell, & Hahn, 1953; Jin, Chen, Blazar, Ramakrishnan, & Valleria, 2002). Zur Etablierung des Tumormodells wurden sowohl verschiedene Zellzahlen als auch Zeitpunkte der Tumorgabe variiert. Eine Tumorzellzahl von 1×10^6 führte innerhalb von etwa zwei Wochen zu einer generalisierten Manifestation des

Tumors in den Versuchstieren und hierdurch zu einem letalen Ausgang. Die Applikation von 1×10^5 Tumorzellen erlaubte die Untersuchung einer vergleichbaren, konstanten Wachstumskinetik bis über drei Wochen nach Tumoringokulation. Die generalisierte Manifestation des Tumors konnte mit einer späteren Tumoringokulationszeit, an Tag 14 statt Tag 1 nach Transplantation, hinausgezögert werden. Jedoch war das Tumorstadium mit der späteren Tumoringabezeit aufgrund des bereits funktionierenden Immunsystems minimal bzw. beeinträchtigt, was die Untersuchung zusätzlicher Anti-Tumor-Effekte unmöglich machte. Zudem war es auch ein Ziel klinisch nahe Bedingungen zu imitieren, bei denen in der Regel die malignen Zellen während der laufenden Behandlung bzw. Therapie bereits im System vorhanden sind. Daher wurde eine Tumoringabe an Tag 1 nach Transplantation festgelegt.

1956 konnten Barnes und Kollegen zeigen, dass sich Mäuse, die eine letale Dosis von Röntgenstrahlen erhielten, regenerieren konnten, wenn ihnen homologe Knochenmarkszellen transferiert wurden (On & Block, 1956). In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass eine Ganzkörperbestrahlung von 9 Gy ohne anschließende Transplantation für die F1-Empfängertiere letal ist. Die Versuchstiere verstarben spätestens acht Tage nach der Konditionierung. Eine nicht myeloablative TBI-Dosis von 4,5 Gy rief in den Versuchstieren hingegen nur eine kurze Strahlentoxizität (Gewichtsverlust) hervor, der eine vollständige Regenerierung folgte. Durch Infusion von Spenderlymphozyten kann eine GvHD induziert werden (Alyea, 2008). Es wurde, sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch bei klinischen und experimentellen Ergebnissen anderer Gruppen, gezeigt, dass die GvT-Reaktion eng mit der GvHD einhergeht und mit deren Stärke korreliert (Alyea, 2008; H.-J. Kolb et al., 2004; Xia, Truitt, & Johnson, 2006). Die GvHD-Gruppe in unserem Modell erhielt, zusätzlich zu den Knochenmarkszellen, eine konstante Anzahl an Spenderlymphozyten (Milzzellen). Unsere experimentellen Daten zeigen, dass in der GvHD-Gruppe eine signifikante Tumorsuppression zu verzeichnen war. Darüber hinaus war die Schwere der GvHD durch die Lymphozytenzahl regulierbar (Collins, Juliano, & Dupont, 1986). Ein nahezu vollständiger Spenderchimärismus wurde bei unseren Versuchstieren ca. 12 Tage nach Stammzelltransplantation erreicht. Die H-2K^b-Spender-Lymphozyten haben die H-2K^{bxd}-Immunzellen der Empfänger ersetzt. Unsere Daten stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein, nach denen die

Rekonstitution des hämatopoetischen Systems von der Anzahl der transplantierten Stammzellen abhängt und ca. 14 bis 18 Tage nach Transplantation erfolgt (Hoepfl et al., 2002). Ab diesem Zeitpunkt des Transplantat-*Engraftments* war, im Gegensatz zur Nicht-GvHD-Gruppe, eine kontinuierliche und messbar signifikante GvHD zu verzeichnen.

Die Lokalisation des UTY-Gens auf dem Y-Chromosom bedingt die Allogenität aller Proteinprodukte des Gens für weibliche Spender bzw. Empfänger (James et al., 2003; Keith & Patrie, 2011; Simpson et al., 1997). In unseren experimentellen Versuchen entwickelten die männlichen Empfängertiere nach allogener Transplantation mit weiblichem Transplantat, eine signifikant stärkere GvHD als die weiblichen Empfänger. Sowohl unsere experimentellen Daten als auch klinische Studien zeigten, dass das Vorliegen von mindestens einer mHag-Disparität, hier das des HY, das Risiko einer schweren GvHD-Entwicklung erhöht (Nash et al., 1992). Darüber hinaus führte die HY-Disparität in unseren *in vivo*-Versuchen zu einer höheren Mortalitätsrate der männlichen Empfängertiere. Die Arbeitsgruppe von Yasuhito Nannya zeigte in ihren Studien mit 225 AML-, ALL-, CML- und MDS-Patienten, dass die Transplantation von weiblichen Stammzellen in männliche Empfänger, mit einer niedrigeren Überlebensrate einhergeht (Nannya et al., 2011). Mit Hilfe von Fluoreszenzbildgebungsverfahren konnten wir, dank des GFP-Reportergens, die Infiltration des C1498-GFP-UTY transgenen Tumors direkt in den Versuchstieren verfolgen. Der transgene Tumor konnte in den männlichen Empfängertieren rasch und ungehindert in vielen Geweben manifestieren. Die histologische Analyse zeigte sowohl eine lymphozytäre Infiltration als auch pathophysiologische Veränderungen (Läsionen) der betroffenen Organe wie Haut, Gastrointestinaltrakt und Lunge (Goker et al., 2001; Vogelsang et al., 2003). Übereinstimmend mit anderen Arbeiten zeigen die experimentellen Daten dieser Arbeit, dass eine HY-Disparität zwischen Spender (♀) und Empfänger (♂) sowohl zu einer signifikant stärkeren GvHD-Entwicklung als auch zu einer signifikant höheren Mortalität der männlichen Empfänger führt (Randolph, Gooley, Warren, Appelbaum, & Riddell, 2004; Toubai et al., 2012). Das mHag HY ist somit eine biologisch relevante Zielstruktur der GvHD-Reaktion nach einer SZT eines männlichen Empfängers durch eine Stammzellspenderin.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Expressionsmuster eines Alloantigens im Empfängergewebe, hier am Beispiel des mHags HY, einen Einfluss auf die Anti-Tumor-Reaktion ausübt. Während in den weiblichen Empfängertieren HY selektiv nur auf dem C1498-GFP-UTY-Tumor exprimiert wird, exprimieren im männlichen Empfängerorganismus fast alle Zellen das mHag HY. In den weiblichen Empfängertieren fungierte das mHag HY also als tumorassoziiertes Antigen (TAA). Zu klären war, ob dieses tumorspezifische Antigen eine zusätzliche spezifische Immunreaktion hervorruft.

Der Vergleich des C1498-GFP-UTY-Wachstumsverhaltens in den beiden verschiedenen Empfängern (♀ vs. ♂) stellte ein optimales Modell zur Untersuchung des HY-Einflusses auf den Anti-Tumor-Effekt, in Abhängigkeit von dessen Expressionsverteilung im Empfängerorganismus (ubiquitär vs. exklusiv auf dem Tumor), dar. Bei einer vergleichbaren GvHD-Stärke in weiblichen und männlichen Empfängertieren, wurde in den weiblichen Tieren gegen das selektiv exprimierte HY eine verstärkte Tumorsuppression gemessen. Die zusätzliche Alloreaktivität gegen HY resultierte in einem verminderten Tumorwachstum des C1498-GFP-UTY transgenen Tumors (Abb. 2.28). Bei drei Transplantationsversuchen mit insgesamt 24 Tieren pro Gruppe, entwickelten beide Versuchsgruppen ähnliche GvHD-Scores, die eine sehr gute Voraussetzung für die Vergleichbarkeit des Tumorwachstums darstellten. Allerdings wurde auch gezeigt, dass das mHag HY in unserem Modell ein relevantes Zielantigen der GvHD-Reaktion ist. So entwickelten die männlichen Empfängertiere in der Regel eine signifikant stärkere GvHD als ihr weibliches Pendant. Dies war bei sieben Transplantationsversuchen, mit weiblichen und männlichen Versuchstieren mit insgesamt 35 Tieren pro Gruppe, der Fall. Die erhöhte T-zelluläre Aktivität durch die GvHD-Entwicklung und das dadurch entstandene inflammatorische Zytokinmilieu, wirkten supprimierend auf das Tumorwachstum (J. L. M. Ferrara & Reddy, 2006; Reddy & Ferrara, 2009). So zeigten sowohl der Wildtyp- als auch der transgene Tumor in den männlichen Gruppen, im Gegensatz zu den weiblichen Gruppen, eine generell signifikant langsamere bzw. verzögerte Wachstumskinetik (Abb. 2.29).

Um den gemessenen Anti-Tumor-Effekt bei gleich verlaufender GvHD optimal untersuchen und charakterisieren zu können, generierten wir, durch gezielte

Immunisierung gegen HY, spezifische anti-HY-T-Lymphozyten in den Spendertieren (James et al., 2003; Y.-H. Kim et al., 2012; Miklos et al., 2004; Verdijk et al., 2004). Eine T-zelluläre Immunreaktion kann durch Generierung antigenspezifischer T-Lymphozyten induziert bzw. eine bereits vorhandene Immunantwort durch gezielte Vakzinierung verstärkt werden (Capitini, Nasholm, Duncan, Guimond, & Fry, 2013). Mit der Vorimmunisierung der Spenderinnen gegen HY sollte die beobachtete HY-vermittelte Alloreaktivität in den weiblichen Empfängertieren hervorgehoben und differenziert werden. Es sollte nachgewiesen werden, dass das mHag HY, als selektiv exprimiertes Alloantigen auf dem Tumor, einen Anti-Tumor-Effekt auslöst und die durch die Vakzinierung generierten spezifischen Anti-HY-T-Lymphozyten, die dafür verantwortlichen Effektorzellen sind.

Unser experimentelles Setting wurde so optimiert, dass das Wachstumsverhalten des C1498-GFP-UTY transgenen Tumors nur bei gleichgeschlechtlichen Empfängertieren und bei gleicher GvHD analysiert wurde. Naives oder gegen HX vorimmunisiertes Transplantat wurde als Kontroll-Transplantat verwendet.

Wie erwartet wies der C1498-GFP-UTY transgene Tumor in der naiven bzw. gegen HX immunisierten Gruppe, im Vergleich zu der Gruppe, die gegen HY immunisiert wurde, eine invasive und exponentielle Tumorkinetik auf. Die Versuchstiere entwickelten bei gleichem GvHD-Verlauf die gleiche GvHD-Stärke, das unterstützte unsere Hypothese, dass die Tumorsuppression in der gegen HY immunisierten Gruppe, nur auf das Vorhandensein von anti-HY-spezifischen T-Zellklonen im Transplantat zurückzuführen war und nicht auf andere pro-inflammatorische Faktoren. Der Anti-Tumor-Effekt gegen HY, gekennzeichnet durch ein supprimiertes Tumorwachstum, wurde in mehreren unabhängigen Transplantationsversuchen (7 mit insgesamt 41 Tieren pro Gruppe) reproduziert.

So konnte in dieser Arbeit experimentell gezeigt werden, dass nach allogener Stammzelltransplantation ein tumorspezifisches Alloantigen eine signifikante Anti-Tumor-Reaktion auslöst. Allerdings war im Falle des mHags HY eine gezielte Vakzinierung der Spender-Tiere gegen HY nötig, um den erwünschten GvT-Effekt zu induzieren. Darüber hinaus konnten wir mit Hilfe immunhistochemischer Antikörper-Färbungen nachweisen, dass die, für die Tumorsuppression verantwortlichen Effektorzellen, in großer Zahl in den Tumor infiltrierten. So zeigte die Gruppe mit dem

gegen HY immunisierten Transplantat, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, eine hohe Infiltration der CD8⁺-Effektorzellen im Tumor.

Ein IFN- γ -*ELISpot*-Assay erlaubt eine Analyse der T-Zell-Funktion bzw. -Aktivität, wobei IFN- γ hauptsächlich durch alloreaktive zytotoxische CD8⁺- und CD4⁺-Th1-Effektorzellen sezerniert wird (Sad & Marcotte, 1995). Die Stimulation der Effektorzellen aus der gegen HY immunisierten Gruppe, sowohl mit dem C1498-GFP-UTY-Tumor als auch mit männlichen Milzzellen, ergab bei der *ELISpot*-Analyse eine erhöhte und spezifische Expression von IFN- γ . Die Effektorzellen der Kontrollgruppen ließen sich dagegen nur unspezifisch stimulieren und produzierten wiederholt die gleiche IFN- γ -Spot-Anzahl, unabhängig von der Stimulanzmenge. Die generell geringe IFN- γ -Spot-Anzahl in der Anti-HY-Immunantwort deutete auf die geringe Anzahl an im peripheren Blutsystem zirkulierenden Anti-HY-Antikörperklonen hin (7%) (Suchin et al., 2001). Aufgrund dieser geringen Zellfrequenz und einer fehlenden Positiv-Kontrolle für die Anti-HY-T-Zellpopulation, konnte bei der Anti-HY-Pentamer-Färbung keine Aussage getroffen werden. Für eine optimale Expansion spezifischer T-Zell-Klone, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, könnten antigenbeladene antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Dendritische Zellen in der zellulären Immuntherapie als Stimulus oder Vakzin sehr nützlich und erfolgsverprechend sein (Duncan & Roddie, 2008; Gigi, Stein, Askenasy, Yaniv, & Ash, 2013).

Die Expression des GFP-Reportergens im C1498-GFP-UTY-Tumor ermöglichte die einfache *in vivo*-Verfolgung und Visualisierung des Tumorstadiums mittels Fluoreszenzbildgebungsverfahren (FRI, engl. *Fluorescence reflectance imaging*). Die gemessene GFP-Fluoreszenzintensität nahm, bis zum Beginn der Tumornekrose (ca. 15 bzw. 18 Tage nach Tumorapplikation), mit der Zeit zu und korrelierte mit dem gemessenen Tumolvolumen. Am Tag 19 nach Transplantation emittierte die weibliche Kontrollgruppe mit dem gegen HX immunisierten Transplantat das höchste GFP-Signal und wies als einzige Gruppe keine nekrotischen Veränderungen der Tumoroberfläche auf. Im Gegenzug wurde bei der gegen HY immunisierten Gruppe die geringste GFP-Signalintensität gemessen. Dies wies auf den apoptotischen Zustand der C1498-GFP-UTY-Tumorzellen in der relevanten Gruppe hin (Remple & Stone, 2011).

Bei den männlichen Versuchstieren konnte, unabhängig vom Transplantat und bei gleicher GvHD-Stärke innerhalb der beiden Gruppen, keinerlei Unterschied im

Wachstumsverhalten des C1498-GFP-UTY-Tumors beobachtet werden (Abb. 2.33 bzw. 2.35). Das Alloantigen HY wurde sowohl auf dem Tumor als auch in fast allen Zellen der männlichen Empfänger exprimiert. Da HY ein Zielantigen der GvHD-Reaktion ist, trat im Gegensatz zu den weiblichen Versuchstieren in den allogenen transplantierten männlichen Tieren eine erhöhte T-zelluläre Aktivität auf, die supprimierend auf das Tumorstadium wirkte. Anfangs zeigte der Tumor in den männlichen Empfängertieren ein verzögertes Wachstum, das aber spätestens nach *Engraftment* des Transplantats einen progredienten Verlauf bei stagnierender GvHD nahm. Das Stagnieren der GvHD ließ sich mit dem Auftreten einer Toleranzinduktion gegenüber dem ubiquitär exprimierten Alloantigen HY erklären, die zentral über die klonale Deletion im Thymus erreicht wurde (Boehmer, 1994; Nossal, 1994). Bereits in den 50-iger Jahren konnte die Arbeitsgruppe um Billingham und Medawar experimentell beweisen, dass eine Allotoleranz nach einer Transplantation aktiv erworben werden kann (Billingham, Brent, & Medawar, 2010; Tolar, Tolarova, & McGrath, 2014). Der Verlust alloreaktiver T-Zellen sowie *bystander* T-Zellen durch Apoptose (AICD, engl. *Activation-induced Cell Death*), nach einer initialen Hyperaktivierung in der akuten Phase der GVHD, könnte der Grund für das Auftreten von Autoimmunität in der chronischen Phase der GVHD sein (Brochu, Rioux-Massé, Roy, Roy, & Perreault, 1999). In unserem Modell wurde gezeigt, dass das Transplantat ca. 12 bis 14 Tage nach allogener Transplantation anwuchs. Das Erreichen eines vollständigen Spenderzellchimerismus führt unter anderem über das lymphatische System (Thymus) zur Regulierung des hämatopoetischen Systems. Dies könnte zur Induktion und zum Erhalt einer zentralen Toleranz führen (Khan, Tomita, & Sykes, 1996; Tomita et al., 1994). Mit größter Wahrscheinlichkeit wurden die generierten Anti-HY-T-Lymphozyten im vorimmunisierten Transplantat durch die männlichen Empfänger-APCs im Thymus deletiert bzw. eliminiert. Durch die Toleranzinduktion könnte der C1498-GFP-UTY transgene Tumor vom weiblichen Transplantat toleriert worden sein und somit in den männlichen Empfängern ungehindert proliferieren und in vielen Organen manifestieren. Das Alloantigen HY, das sowohl auf dem Tumor als auch ubiquitär im Empfänger exprimiert wurde, induzierte, trotz Generierung der spezifischen Effektorzellen im Transplantat, keine zusätzliche Anti-Tumor-Reaktion. Diese experimentellen Ergebnisse wurden zusätzlich durch die Kontrolltransplantation mit männlichen Spendertieren bestätigt. Für die reaktiven Immunzellen des männlichen Transplantats ist HY kein Alloantigen.

Der transgene Tumor C1498-GFP-UTY zeigte sowohl in der gegen HY immunisierten Gruppe als auch in der Gruppe mit männlichem Transplantat die gleiche Wachstums-Progredienz. Es wurde keinerlei Unterschied in seinem Wachstumsverhalten, also keine zusätzliche Immunantwort gegen das ubiquitär exprimierte mHag HY, beobachtet.

Die weiblichen Empfängertiere, bei denen *in vivo* ein signifikanter Anti-Tumor-Effekt gemessen wurde, zeigten eine signifikant verstärkte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , IL-2, IL-4 oder IL-17A, die auf die hochavide T-zelluläre Immunantwort hinwies (Shi et al., 2014). Darüber hinaus wurde in dieser Gruppe eine signifikant erhöhte Expression der Serinprotease Granzyme B und des Transkriptionsfaktors FoxP3, bei dem eine Tumorsuppressor-Funktion beschrieben wurde, gemessen. Die positive Wirkung von IFN- γ auf den Anti-Tumor-Effekt nach allogener SZT und die daraus folgende Granzyme B-Sekretion durch alloreaktive CD8⁺-T-Zellen, wurde bei der Behandlung von soliden Tumoren, wie dem murinen Brustkrebstumor 4T1, nachgewiesen (Zhao et al., 2014). Das Zytokin-Profil der allogenen transplantierten Empfängertiere spiegelte die beschriebene inflammatorische Antwort der Spender-Immunzellen nach einer allogenen Transplantation wieder (J. L. Ferrara, 2000, Cohen, Wang, & Dickinson, 2000; J. L. Ferrara, 1993). Aufgrund der Tatsache, dass das mHag HY, ein HLA-Klasse-I-restringiertes Epitop ist (Simpson et al., 2001) und es zu einer starken CD8⁺-T-Zell-Infiltration in den transgenen Tumor kam, ließ sich die Anti-Tumor-Reaktion auf das tumorspezifisch exprimierte Alloantigen HY und auf die Aktivität der zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen sowie der IFN- γ - und IL-2-produzierenden CD4⁺-Th1-Zellen zurückführen. Das Verständnis des komplexen, immunologischen Prozesses in der GvHD kann für die Optimierung der zellulären Therapie nach allogener Stammzelltransplantation sehr hilfreich sein. Primäres Ziel zukünftiger Strategien der allogenen Zelltherapie wird die selektive Modulation von GvHD und GvT-Reaktionen sein. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit wäre also, die GvHD durch Inhibition bestimmter Zytokine kontrollieren zu können ohne dabei die positive Anti-Tumor-Antwort zu beeinträchtigen (J. L. Ferrara, 1993, Bian et al., 2013).

Die Fähigkeit des Immunsystems, eine große Anzahl von Antigenen (über 1×10^8) zu erkennen, wird durch die Vielfalt des T-Zell-Rezeptors (TCR) ermöglicht (Nikolich-

Zuglich, Slifka, & Messaoudi, 2004). Die große Diversität des TCRs entsteht durch das *Rearrangement* während der Thymozyten-Entwicklung, das heißt durch die somatische Rekombination der variablen (V-), joining (J-), diversity (D-) und konstanten (C-) Gen-Segmente durch Deletion, Inversion oder Translokation und das anschließende Splicing. Zusätzlich werden P- und N-Nukleotide als Verbindungsstücke zwischen die V-, D- und J-Gen-Segmente eingebaut (Alt et al., 1992; Bassing, Swat, & Alt, 2002; Spicuglia, Franchini, & Ferrier, 2006). Die, von den V(D)J-Genen codierte, komplementär bestimmende Region 3, auch CDR3 genannt, (engl. *complementarity determining region 3*) stellt die MHC-Antigenbindungsstelle dar und weist die höchst variablen Sequenzen im TCR auf (Mark M Davis et al., 1998; Garcia et al., 1996; Krogsgaard & Davis, 2005). Durch die somatische Rekombination dieser variablen Gen-Segmente, besitzen verschiedene T-Zellklone unterschiedliche CDR3-Sequenzen bzw. Längen. Durch die Information über ihre Länge, deren relative Häufigkeit und Heterogenität, kann ein TCR-Repertoire oder ein TCR-Profil aller vorhandenen T-Zell-Populationen in einem Individuum, mittels PCR-Amplifikation der Region, hergestellt werden. Während die Gesamtzahl der zirkulierenden Lymphozyten im Blutssystem direkt gemessen werden kann, erfordert die Bestimmung der TCR-Diversität bzw. die Etablierung eines TCR-Repertoires komplexere und indirekte Assays, wie Durchflusszytometrie oder *Spectratyping* bzw. Nukleotid-Sequenzierung (M M Davis & Bjorkman, 1988).

Für diese Arbeit wurden die genetischen T-Zell-Rezeptor-Profile (TCR-Profil) aller vorhandenen T-Zell-Populationen der Spender- sowie der allogenen transplantierten CB6F1-Empfängertiere mit Hilfe der *Spectratyping*-Analyse evaluiert. Die Diversität der β -Kette der CD3⁺-Lymphozyten, die zu der am häufigsten exprimierten TCR α/β -Rezeptor-Variante (95% der TCR) gehört, wurde analysiert.

Wie erwartet wiesen die immunisierten, weiblichen Spendertiere, unabhängig davon ob sie gegen HY oder gegen HX vakziniert wurden, das gleiche T-Zell-Rezeptor-Profil auf (Abb. 2.45-A/B). Die männlichen C57BL/6N-Kontrollspender wiesen hingegen, im Vergleich zu den weiblichen Spendern, abweichende V β -Segmente in 4 TCR-Familien auf (Abb. 2.45-C). Im Vergleich zu den naiven CB6F1-Tieren wiesen die allogenen transplantierten Tiere ein neues, umfangreicheres und spenderähnliches TCR-Repertoire auf (Abb. 2.47). Dies war ein weiterer Hinweis zur Etablierung des Spenderchimärismus, ca. 12 Tage nach Transplantation, da die *Spectratyping*-Analyse erst 19 Tage nach Stammzellgabe durchgeführt wurde. Das

hämatopoetische System der Empfänger wurde durch die Immunzellen der Spender ersetzt. Je vielfältiger das TCR-Reperoire eines Organismus ist, desto besser kann sein Immunsystem fremde Antigene erkennen. Dies ist von besonderem Interesse für allogene transplantierte Patienten, die sich einer Immunrestitution unterziehen (Ciupe, Devlin, Markert, & Kepler, 2013). Die weibliche Gruppe mit dem gegen HY immunisiertem Transplantat wies im Vergleich zu der naiv transplantierten Gruppe zusätzliche V β -TCR-Familien auf (Abb. 2.47). Dies ließ sich auf die neu generierten TCR-Familien durch die Immunisierung zurückführen.

Relevant bei der *Spectratyping*-Analyse in dieser Arbeit war die Präsenz der TBV21/22-Familie in der allogene transplantierten, weiblichen Gruppe mit dem gegen HY immunisierten Transplantat und der Applikation des C1498-GFP-UTY transgenen Tumors (Abb. 2.47). Die vermutlich für die Erkennung des mHags HY relevante TBV21/22 TCR-Familie fehlte sowohl im Tumor der gegen HX transplantierten Gruppe als auch in der Versuchsgruppe mit dem C1498 Wildtyp-Tumor (Abb. 2.48–B/C). Daher scheint diese TCR-Familie für die Erkennung des mHags HY eine relevante Rolle zu spielen.

Das TCR-Repertoire der CD3⁺-Zellen aus dem extrahierten Tumor der allogene transplantierten Tiere wies fast das gleiche Profil auf wie die CD3⁺-Zellen aus den Milzen. Dies zeigt eine gleichmäßige Verteilung der GvHD-vermittelnden T-Zell-Populationen im Empfängerorganismus. Die Restimulation der immunisierten CD3⁺-Zellen mit dem transgenen Tumor erzielte das gleiche umfangreiche TCR-Repertoire wie vor der Restimulation, jedoch zeigten die Histogramme der verschiedenen TCR-Familien nicht mehr die typische Gaußverteilung, sondern lange, schmale Peaks, die auf die Anwesenheit spezifischer TCR-Familien hindeuteten (Abb. 2.49-B). Der schmale Peak der TBV21/22-Familie zeichnete die Positivkontrolle für die anti-HY spezifische T-Zell-Population als solche aus. Genauso zeigten die stimulierten CD3⁺-Zellen der immunisierten Gruppe den bestimmten, spezifischen Peak für die TBV21/22-Familie. Weder die Stimulation durch den C1498 Wildtyp-Tumor noch durch die männlichen Milzzellen der naiv transplantierten Gruppe, führte in dieser Gruppe zur Generierung der TBV21/22-TCR-Familie. Die TBV21/22-TCR-Familie wurde in den allogene transplantierten Tieren nur generiert, wenn diese in Kontakt mit dem C1498-GFP-UTY transgenen Tumor kamen. Demnach scheint diese TCR-Familie für die Erkennung des HY-Epitops verantwortlich zu sein. Nachfolgende Untersuchungen sollen die Sequenzierung der identifizierten TCR-Familie, ihre

Klonierung und Expansion für eine anschließende Transfektion zur Bildung von unter anderem chimären T-Zellen, sein. Aktuelle Publikationen zeigen, dass die Infusion von Spender-Lymphozyten mit bekanntem V β -TCR, die gegen den Tumor alloreaktiv sind, sowohl bei Patienten mit solidem Tumor (Nierenkarzinom) (Kurokawa et al., 2002) als auch bei einem murinen, leukämischen Modell (MMC6), zu einer signifikanten Anti-Tumor-Reaktion führen (Fanning et al., 2013; Patterson & Korngold, 2001). Mit Hilfe der V β -*Spectratyping*-Analyse der infiltrierten Effektorzellen in den geschädigten Geweben und Tumoren, konnte die Arbeitsgruppe um Korngold die T-Zellen, die an GvHD und GvT-Effekt beteiligt waren, identifizieren und trennen. Die Infusion der Tumor-alloreaktiven V β -TCR-Familie, in Korngolds Modell die CD8⁺V β 13⁺-T-Zellen, führte zu einer signifikanten Tumorsuppression. Wurden die CD8⁺V β 13⁺-Effektorzellen zusätzlich mit dem Tumor (MMC6) sensibilisiert, wurde die Anti-Tumor-Reaktion verstärkt, ohne eine GvHD zu induzieren.

Die Identifizierung alloreaktiver T-Zellen mittels *Spectratyping*-Analyse kann ein weiterer Ansatz zur erfolgreichen Trennung der unerwünschten reifen Spender-T-Zellen, die die GvHD induzieren, von den Tumor-reaktiven Effektorzellen, die den Anti-Tumor-Effekt (GvT) vermitteln, sein. Dies ist eine weitere Möglichkeit die zelluläre Therapie mit Stammzellen zu optimieren.

Die Bestimmung der CDR3-Größe durch die *Spectratyping*-Analyse war beim *Screening* auf autoimmun-assoziierte TCR erfolgreich und könnte eine nützliche Methode für die Klassifizierung aller T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen mit unbekanntem Pathomechanismus sein (G. Kim et al., 2014).

4 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass ubiquitär exprimierte minor Histokompatibilitätsantigene (mHags), wie das männliche mHag HY, keine relevanten GvT-Zielstrukturen sind, dafür aber wichtige Zielantigene der GvHD-Reaktion nach einer allogenen Stammzelltransplantation darstellen.

Durch die gezielte Vakzinierung der Spendertiere gegen das Alloantigen, hier gegen das mHag HY, konnte eine verstärkte GvT-Reaktion gegen den transgenen Tumor C1498-GFP-UTY in den weiblichen Empfängertieren erzielt werden. Während das mHag HY in den weiblichen Empfängertieren tumorspezifisch ist, wird es im männlichen Empfänger-Organismus auf fast allen Zellen exprimiert. Jedoch gibt es zwischen den Zelltypen Expressionsunterschiede. So wird das von UTY-kodierte mHag HY in den Epithelialzellen nur schwach exprimiert. Um die Effizienz dieses gewünschten GvT-Effekts zu erhöhen, müssen geweberestringierte mHags, wie das selektiv auf humanen, hämatopoetischen Zellen exprimierte HA-2-Antigen, als Zielantigene herangezogen werden. Die experimentellen Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Versuchstiere, die das Alloantigen Ovalbumin (OVA) selektiv auf den hämatopoetischen Zellen exprimieren, nach einer Transplantation mit syngenen Knochenmark und einer Zugabe von 1×10^4 spezifischen OT-1-T-Zellen, den transgenen Tumor C1498-GFP-OVA vollständig abstoßen.

2001 konnte die Arbeitsgruppe um Fontaine eine effektive Anti-Tumor-Reaktion nach einem adoptiven Transfer von T-Lymphozyten, die gegen ein einzelnes MHC-Klasse-I-restringiertes mHag ($B6^{\text{dom1}}$) geprimt wurden, nachweisen. Die mHag-vermittelte Anti-Tumor-Antwort war effektiv und nicht-toxisch, da keine GvHD hervorgerufen wurde.

Darüber hinaus ist eine der zukünftigen Herausforderungen für eine erfolgreiche Immuntherapie, die Optimierung der Vorimmunisierung der Spender, um die Generierung von TCR-spezifisch tragenden T-Zellklonen zu maximieren. Die Entwicklung von Vakzinen mit Multi-Peptiden stellt eine neue Impfstrategie dar, um eine Immunität gegen mehrere Peptide zu induzieren. Auf dieser neuen Strategie beruhend führte das *National Institutes of Health* bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) eine Immunisierungsstudie mit PR1- und WT1-Peptiden durch. Eine zunehmende Bedeutung in der Tumortherapie erlangt die Entwicklung bispezifischer Antikörper. Sie sind in der Lage, mit einem der scFv-

Fragmente ein bestimmtes Antigen zu binden, mit dem anderen T-Zellen zu rekrutieren und somit die Effektorzellen gezielt zu den Zielzellen zu führen.

5 Material und Methoden

5.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Laborwerkbank mit Laminarflow-Technologie (Fa. Heraeus) durchgeführt.

Die kryokonservierten, murinen Tumorzelllinien wurden für 2 Minuten im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen im Einfriermedium (1:1 Kulturmedium und 10% DMSO in FCS) wurden zügig in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 10-fach gekühltem, kompletten Kulturmedium verdünnt und 7 Minuten bei 420 g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet im Kompletmedium resuspendiert.

5.1.1 Kultivierung muriner Tumorzelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in sterilen Gewebekulturflaschen oder Multi-Well-Platten im Feuchtbrutschrank (37°C, 5%-ige CO₂-Begasung und Luftfeuchtigkeit >95%, Firma. Heraeus).

Je nach Zelltyp wurde das *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) [Cat. No. 21980-065] oder das *RPMI Medium 1640* der Firma Gibco® [Cat. No. 11875-093] mit den jeweils nötigen Zusätzen verwendet.

5.1.2 Murine Tumorzelllinien

➤ BI6xmyc

Die Maus-Lymphoma-Zelllinie *BI6xmyc* (Kovalchuk et al., 2000b) wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. A. Gerbitz des Universitätsklinikums Erlangen zur Verfügung gestellt. Die Zellen mit dem Genotyp [H-2K^b] wurden im C57BL/6-Mausstamm generiert. Der in dieser Arbeit verwendete Zellklon stammt aus einer männlichen Maus (Tiernummer #85), trägt dem Geschlecht entsprechend das Y-Chromosom und exprimiert somit das endogene mHag HY.

Die BI6xmyc #85-Zellen wurden in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), mit Zusatz von 20% FCS [Cat. No. A15-151, PAA], 1% Penicillin-Streptomycin [Cat. No. P11-010, PAA], 1% Natrium-Pyruvat [Cat. No. S11-003, PAA] und 1% Glutamin [Cat. No. M11-004, PAA], kultiviert.

Die Zellpassage fand 2 Mal wöchentlich durch Überführen der gewünschten Zellzahl in frisches Komplettmedium statt.

➤ **C1498, C1498-GFP-PINCO, C1498-GFP-UTY**

Die C1498-Zelllinie (ATCC® TIB-49™) ist eine myeloide, leukämische Zelllinie aus einer weiblichen C57BL/6J-Maus [H-2K^b]. Ziel war es, eine Zelllinie zu generieren, die das, in dieser Arbeit untersuchte, minor Histokompatibilitätsantigen (mHag) HY artifiziell und stabil exprimiert. Damit die Wildtyp-Zelllinie C1498 das mHag HY stabil exprimieren konnte, wurde sie, mit Hilfe des viralen Vektors PINCO-GFP-RFB und des Gateway-Klonierungssystems, mit einem Teil des männlichen Y-Chromosoms, dem UTY-Gen, transduziert, welches das mHag HY codiert. Die neu entstandene Zelllinie C1498-GFP-UTY trägt jetzt in seinem Genom das UTY-Gen und exprimiert somit, im Gegensatz zu den Wildtyp- und Leervektorzelllinien, das mHag HY.

Die C1498-PINCO-GFP-Zelllinie diente als Kontrolle und wurde nur mit dem Leervektor ohne das UTY-Gen transduziert.

Da die transduzierten Zelllinien das Reportergen GFP trugen, konnten sie leicht durch ein Durchflusszytometer (FACS) sortiert und so ihre Reinheit in der Zellkultur gesichert werden.

Die Zellpassage fand ebenfalls 2 Mal wöchentlich durch Überführen der gewünschten Zellzahl in frisches Komplettmedium statt.

Das Komplettmedium aller C1498-Zelllinien bestand aus RPMI Medium 1640 mit Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin (100 I.U./ml Penicillin und 100 µg/ml streptomycin), 1% Natrium-Pyruvat und 1% Glutamin.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer

10 µl Zellsuspension wurden 1:10 mit Trypanblau (90 µl) [Trypan Blue Stain 0,4 %, Cat. No. 15250-061, Invitrogen] verdünnt. Da die intakte Zellmembran der vitalen Zellen eine Diffusion des Farbstoffs in das Zytoplasma verhindert, leuchten diese unter dem Mikroskop hell auf. Die toten Zellen färben sich dagegen dunkelblau. Die vitalen Zellen aller 16 Grundquadrate der 4 Eckquadrate wurden ausgezählt und anschließend der Mittelwert \bar{x} berechnet.

Die Zellzahl pro ml ist gleich Mittelwert mit dem Faktor 10^5 .

$$\text{Zellzahl} = \bar{x} \times 10^5 \text{ pro ml}$$

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Protokoll der Firma Qiagen mit dem *QIAmp RNA Blood Mini Kit* [Cat. No. 52304].

Das Prinzip des *QIAmp RNA Blood Mini Kits* zur zellulären Reinigung von RNA beruht auf der Affinität der Nukleinsäuren an eine Silicagel-Membran zu binden (Chomczynski & Sacchi, 1987). Nach Denaturierung und Homogenisierung der Proben mit der QIAshredder Spin-Säule, bietet die Methode ein einfaches und schnelles Verfahren, um reine RNA für weitere Anwendungen zu gewinnen. Der Lyse-Puffer enthält Guanidium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol zur Inaktivierung von RNAsen.

Für unsere Fragestellung wurde Gesamt-RNA aus Blut, Lymphknoten, Milz und Tumorzellen gewonnen.

Der DNA-Gehalt und deren Reinheit wurden photometrisch ermittelt.

5.2.2 cDNA-Synthese: Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase [Cat. No. 28025-013, Invitrogen] wurde die gewonnene RNA in ihren komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben.

Die Synthese wurde wie folgt durchgeführt:

1 μ g RNA

1 μ l 10 mM Oligo-dT als Primer

1 μ l 10 mM dNTP-Mix

mit Nuklease-freiem Wasser auf 12 μ l auffüllen.

Inkubation des Reaktionsansatzes erst für 5 Minuten im PCR-Cycler bei 65°C, anschließend kurz auf Eis.

Hinzufügen von:

4 μ l 5xFirst-Strand-Puffer

2 μ l 0,1 M DTT

1 μ l RNase-Guard (RNaseOUT, 40 U/ μ l)

1 μ l M-MLV RT (Reverse Transkriptase, 200U/ μ l)

Für die optimale Aktivität des Reverse Transkriptase-Enzyms, wurde der Reaktionsansatz für weitere 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reverse

Transkription wurde durch die Inaktivierung des Enzyms (15 Minuten, 70°C) beendet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C bzw. -80°C für einen längeren Zeitraum.

5.2.3 DNA-Isolierung

Für unsere Fragestellung wurde DNA aus der Milz und den Tumorzelllinien gewonnen. Die DNA wurde mit Hilfe des *QIAmp DNA Blood Mini Kits* der Firma QIAGEN [Cat. No. 51106] isoliert.

Der DNA-Gehalt und deren Reinheit wurden photometrisch ermittelt.

5.2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Der Nukleinsäure-Gehalt und deren Reinheit können photometrisch im UV-Bereich ermittelt werden. Hierbei wird die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die optische Dichte einer Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm (OD₂₆₀) gibt die Nukleotid-Konzentration an, während die OD₂₈₀ etwas über die Verunreinigung mit Proteinen aussagt. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte bestimmte Grenzwerte nicht überschreiten, da sonst keine lineare Abhängigkeit der Absorption bei 260 nm zur Nukleinsäure-Konzentration gegeben ist.

Eine optische Dichte OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml dsDNA und 40 µg/ml ssRNA. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die Messung wird in speziellen Quarzküvetten vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im UV-Bereich besitzen.

Formeln zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration:

- RNA: $40 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$
- dsDNA: $50 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g dsDNA}/\mu\text{l}$
- ssDNA: $30 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g ssDNA}/\mu\text{l}$

5.2.5 Geschlechtsbestimmung mit der Standard-PCR

Für die Geschlechtsbestimmung der Tumorzelllinien wurde ein Primerpaar (YMT/2B, siehe Primerliste) verwendet, das einen spezifischen Abschnitt des Y-Chromosoms erkennt.

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Tabelle 5.1: Pipettierschema der Y-Chromosom-PCR mit dem YMT/2B-Primerpaar

Reagenzien	Volumen (20 µl)	Konzentration
DNA	5 µl	
H ₂ O	9,3 µl	
5x Fusion HF Buffer	4 µl	1 x
25 mM dNTPs	0,2 µl	
Primer YMT/2B sense (10 µM)	0,5 µl	
Primer YMT/2B antisense (10 µM)	0,5 µl	
Phusion High Fidelity Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 Unit

Pro Ansatz wurden 20 ng DNA eingesetzt.

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation verwendet:

Tabelle 5.2: PCR-Programm für das YMT/2B-Primerpaar

Schritt/Temperatur	Zeit	Zyklen
1. 98°C	30 s	
2. 98°C	10 s	2. bis 4. Schritt
3. 59,5°C	30 s	x 29
4. 72°C	30 s	
5. 72°C	5 Min.	
6. 4°C	∞	

5.2.6 Nachweis des Ziel-Gens UTY

Das Ziel-Gen, das murine UTY-Gen (*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene*, Gene ID: 22290, Accession BC140403, MGI: 894810), ist auf dem Y-Chromosom (ChrY:433304-582202 bp) lokalisiert.

Es codiert das zu untersuchende mHag HY und hat eine beachtliche Größe von 3700 bp.

Um eine möglichst fehlerfreie Amplifikation des Ziel-Gens zu erzielen, wurde "Hot Start High Fidelity Polymerase" (Phusion[®] Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase von der Firma ThermoFisher scientific, Cat. No. F-540L oder Q5[®] Hot Start High-

Fidelity DNA Polymerase der Firma New England Biolabs, Cat. No. M0493S) verwendet.

Tabelle 5.3: Pipettierschema der UTY-PCR mit dem UTY-Primerpaar

Reagenzien	Volumen (25 µl)	Konzentration
DNA	5 µl	
H ₂ O	8 µl	
5x Q5 Reaction Buffer	5 µl	1 x
5x Q5 High GC Buffer Enhancer	5 µl	1 x
25 mM dNTPs	0,5 µl	
Primer UTY_fw (10 µM)	0,5 µl	
Primer UTY_rev (10 µM))	0,5 µl	
Q5 Hot Start High Fidelity Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	1 Unit

Pro Ansatz wurden 20 ng DNA eingesetzt.

Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

Tabelle 5.4: PCR-Programm für das UTY-Primerpaar

Schritt/Temperatur	Zeit	Zyklen
1. 94°C	5 Min.	
2. 94°C	15 s	2. bis 4. Schritt
3. 55,7°C	30 s	x 35
4. 68°C	5 Min.	
5. 68°C	20 Min.	
6. 4°C	∞	

5.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA wurde, je nach Größe des gesuchten Fragments, ein 0,7%- oder 1,5%-iges Agarosegel mit Zusatz von 1 µg/100 ml Ethidiumbromid [1%, Cat. No. 2218-1, ROTH] verwendet.

Agarosegel

Agarose	0,7 g (0,7%) bzw. 1,5 g (1,5%)
TBE-Puffer	100 ml

Die Agarose-Lösung wurde aufgeköcht bis sie klar war und anschließend gekühlt. 10 µl Ethidiumbromid (0,1 µg/µl, Endkonzentration 1 µg in 10µl) wurden dazu pipettiert. Das Gel wurde in die Apparatur gegossen und mit dem gewünschten Kamm für die Probenaschen erstarren lassen.

Die DNA-Proben wurden mit einem Volumenverhältnis von 1:5 mit 6x *Loading dye*-Ladepuffer [Cat. No. #R611, Fermentas] versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt.

Zur Abschätzung der replizierten Fragment-Länge wurde je nach gesuchter Fragment-Größe, der Längenmarker *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* [Cat. No. #SM0321] oder der *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* [Cat. No. #SM1331] der Firma Fermentas als Standardgröße auf das Gel mit aufgetragen.

Mit dem YMT/2B-Primerpaar wurde eine Produkt-Größe von 342 bp erwartet und dementsprechend wurde der *100 bp Plus* Marker als Standard-Größe benutzt. Für das 3700 bp UTY-Gen wurde der *1 kb Plus* Größen-Marker (Abb. 1) verwendet.

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

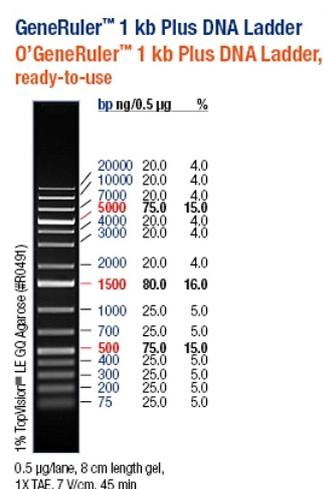
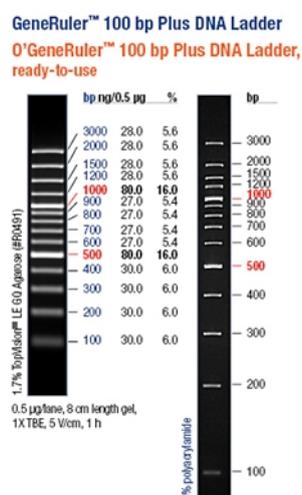


Abb. 5.1: Bandenmuster der *GeneRuler™ 100 bp Plus* bzw. *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*

Mit einem UV-Durchlichtgerät (Gel Doc 2000, BioRad) konnten die im Gel vorhandenen Banden sichtbar gemacht, analysiert und anschließend mit der *Quantity One*-Software (BioRad) dokumentiert werden.

5.2.8 Oligonukleotidprimer

Die Primer wurden, wenn sie nicht aus einer Publikation und dementsprechend zitiert wurden, mit Hilfe von Programmen wie Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

oder (<http://www.oligoarchitect.com/Login.jsp>) gebildet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins-Genomics, TIB Molbiol oder Sigma-Aldrich synthetisiert. Zur Überprüfung der ausgewählten Primer-Sequenzen wurden sie über das Programm der „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oder der „Mouse Genome Informatics“ (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) mit der weltweit existierenden Datenbank verglichen.

5.2.9 Primer für die Standard-PCR

Alle Primer für die Standard-PCR wurden über Sephadex G-50 Gelfiltrationen (GSF) zur Entsalzung gereinigt.

Zur Untersuchung des Geschlechts der Tumorzelllinien wurde das Primerpaar YMT/2B sense/antisense verwendet.

YMT/2B sense	CTG GAG CTC TAC AGT GAT GA
YMT/2B antisense	CAG TTA CCA ATC AAC ACA TCA C

Für den Nachweis des UTY-Gens wurde das Primerpaar UTY-fw/rev verwendet.

UTY-fw	ATG AAA TCT TAC GGA TTA TCT CTC
UTY-rev	TTA AGA TGC AGA AGA TAA CGA AGG A

5.2.10 Primer für die Sequenzierung

UTY-14_f	GCC ATGA AATCTTACGG ATTATCTCTC
UTY-15_r	GAGATGCAGAAGATAACGAAGGAGC
UTY-16_f	TTGCCATCACAAAGTCAAAGC
UTY-17_f	CCATTTCAAACCTGGGTCCAC
UTY-18_f	AAGTTGAATCCACCCACTCC
UTY-19_f	GACCTGGTGATTTGGTTTGG

5.2.11 Primer für die Real-time-quantitative PCR (qPCR)

Die Primer wurden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC, HPR3) gereinigt.

Actinb-r_fw	ATC TTC CGC CTT AAT ACT
Actinb-r_rev	GCC TTC ATA CAT CAA GTT
IFNg-r_fw	CAA CAA CAT AAG CGT CAT T
IFNg-r_rev	CTC AAA CTT GGC AAT ACT C
UTY-r_fw	AGA TGA AGA CGC TGT TGA A
UTY-r_rev	AGT AAG AGA TTG AAG TGA CCT AAT

UTX-r_fw	TAATAGTAGCATTCTGTTGGA
UTX-r_rev	TAGGTGTAGGTGGATTCA
FoxP3-r_fw	AAT AGT TCC TTC CCA GAG TTC
FoxP3-r_rev	GGG TGG CAT AGG TGA AAG
GzmB-r_fw	GGA TAT AAG GAT GGT TCA C
GzmB-r_rev	ATG TTG CTT CTG TAG TTA G
IL4-r_fw	TTGAAGAAGAAGCTCTAGTGTT
IL4-r_rev	GTGGACTTGGACTCATTC
IL10-r_fw	CAACATACTGCTAACCGACTC
IL10-r_rev	ATCATTTCGATAAAGGCTTGG
IL17a-r_fw	TGGATTCAGAGGCAGATT
IL17a-r_rev	AACAAACACGAAGCAGTT

5.2.12 Primer für die *Spectratyping-Immunescope-Analyse*

Alle Primer für die *Spectratyping*-Analyse wurden ebenfalls mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Methode (HPLC) gereinigt.

Die Primer wurden aus der Arbeit von Currier (Currier & Robinson, 2001; Pannetier et al., 1993) entnommen. In dieser Arbeit wurde die β -Kette (TBV) aus dem α/β -heterodimeren T-Zell-Rezeptor analysiert.

Die T-Zell-Rezeptor-V β -Primer (TBV) für das variable V-Gen:

<i>MuBV1</i>	CTGAATGCCAGACAGCTCCAAGC	TBV1
<i>MuBV2</i>	TCACTGATACGGAGCTGAGGC	TBV2
<i>MuBV3.1</i>	CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT	TBV3
<i>MuBV4</i>	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC	TBV4
<i>MuBV5.1</i>	CATTATGATAAAATGGAGAGAGAT	TBV5
<i>MuBV5.2</i>	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC	TBV6
<i>MuBV5.3</i>	AGAAAGGAAACCTGCCTGGTT	TBV7
<i>MuBV6</i>	CTCTCACTGTGACATCTGCCC	TBV8
<i>MuBV7</i>	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC	TBV9
<i>MuBV8.1Nc</i>	GGCTGATCCACTCATATGTC	TBV10
<i>MuBV8.2Nc</i>	TCATATGGTGCTGGCAGCACTG	TBV11
<i>MuBV8.3</i>	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA	TBV12
<i>MuBV9</i>	TCTCTACATTGGCTCTGCAGGC	TBV13
<i>MuBV10</i>	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA	TBV14
<i>MuBV11</i>	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAGC	TBV15
<i>MuBV12</i>	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC	TBV16
<i>MuBV13Nc</i>	AGGCCTAAAGGAACTAACTCCACT	TBV17
<i>MuBV14</i>	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC	TBV18
<i>MuBV15</i>	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC	TBV19
<i>MuBV16</i>	CACTCTGAAAATCCAACCCAC	TBV20

<i>MuBV17Nc</i>	CTAAGTGTTCTCGAACTCAC	TBV21
<i>MuBV18</i>	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC	TBV22
<i>MuBV19</i>	CTGCTAAGAAACCATGTACCA	TBV23
<i>MuBV20</i>	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA	TBV24

Die T-Zell-Rezeptor-C β -Primer (TCB) für das konstante C-Gen:

<i>MuTCB3C</i>	AAGCACACGAGGGTAGCCT	TCB1
<i>MuTCB1-FAM^d</i>	FAM-TTGGGTGGAGTCACATTTCTC	TCB2-
FAM ^d		

5.2.13 *Real-time-quantitative PCR (qPCR)*

Die *Real-time-quantitative PCR* (qPCR) oder quantitative Echtzeit-PCR ist eine molekularbiologische Methode, die auf der Polymerase-Ketten-Reaktion basiert. Sie ermöglicht eine zusätzliche Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte und so einen Rückschluss auf die eingesetzte Menge an Nukleinsäure (cDNA \rightarrow RNA) (Klein, 2002; "Simultaneous Amplification and detection of specific DNA sequences_1992_higuchi-1992.pdf," n.d.).

Die Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der PCR, durch Messung von Fluoreszenzfarbstoffen, hier dem Cyanin-Farbstoff SYBR® Green, durchgeführt ("Quantification of low Copy Transcripts by continuous SYBR Green I Monitoring during amplification_1998_SKMBT_C452120504151_179261a.pdf," n.d.) [Cat. No. 4367659, Applied Biosystems®]. Die abgegebenen Fluoreszenzsignale nehmen, bei idealen Bedingungen und effizienter Reaktion, proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu.

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt pipettiert:

Tabelle 5.5: Pipettierschema der *Real-time-quantitativen PCR (qPCR)*

Reagenzien	Volumen (12,5 μ l)
cDNA	2,5 μ l
RNAse-freies H ₂ O	3,15 μ l
Primer sense (10 μ M)	0,3 μ l
Primer antisense (10 μ M)	0,3 μ l
SYBR GREEN MASTER MIX	6,25 μ l
Gesamtvolumen	12,5 μ l

Pro Ansatz wurden 100-150 ng DNA eingesetzt.

Die *Real-time-quantitative* PCR-Analyse wurde mit einem ABI 7500-Cycler der Firma Applied Biosystems®, unterstützt von dem 7500-Fast Real-Time PCR System und nach dem SYBR-Green-Mastermix-Protokoll der Firma Applied Biosystems®, durchgeführt.

Tabelle 5.6: PCR-Zyklen für alle *Real-time-quantitativen* PCR-Analysen

Schritt/Temperatur	Zeit	Zyklen
1. 50°C	2 Min.	1x
2. 95°C	15 Min.	1x
3. 95°C	15 s	x 40
4. 60°C	1 Min.	
5. 95°C	15 s	5. bis 8. Schritte
6. 60°C	1 Min.	Dissoziation der Primer/
7. 95°C	15 s	Schmelzkurvenanalyse
8. 60°C	15 s	

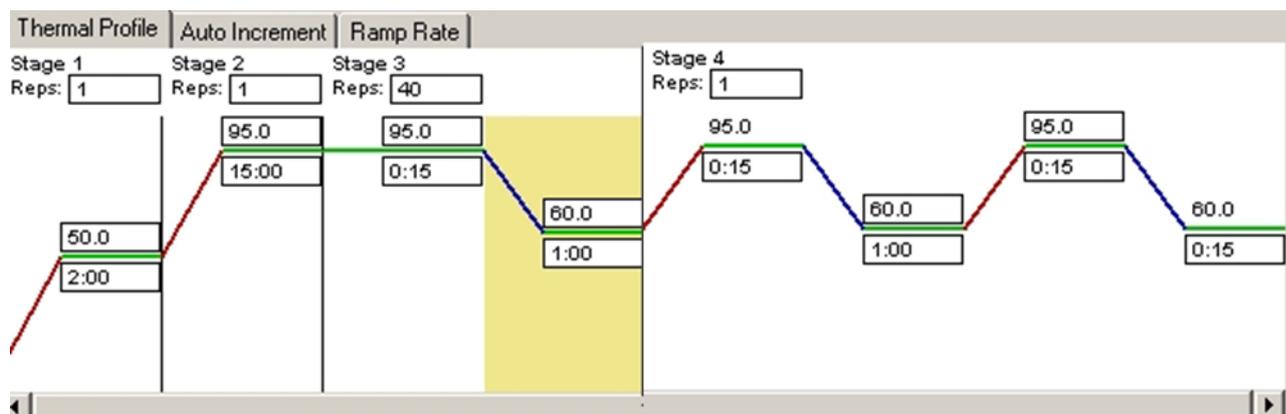
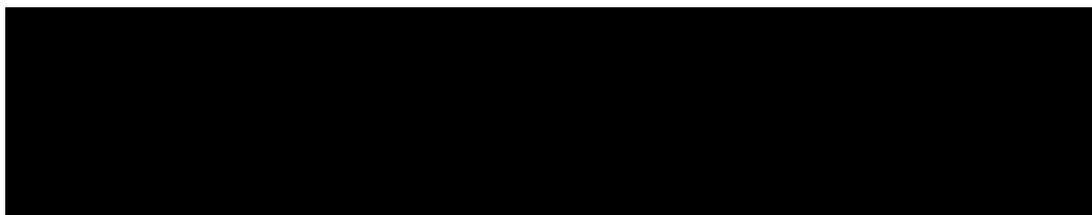


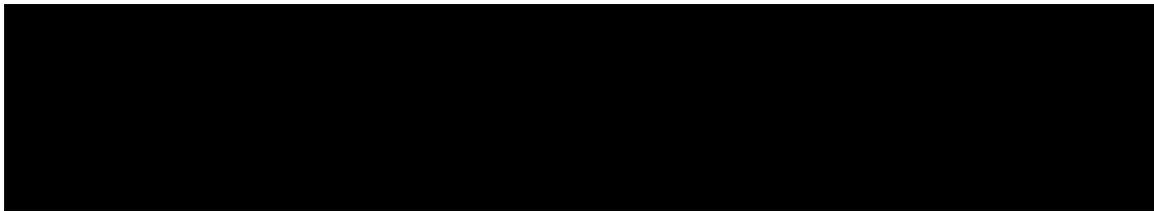
Abb. 5.2 : Der Zyklen-Verlauf der *Real-time-quantitativen* PCR mit dem 7500-Fast Real-Time PCR System

Die relative Expression der zu untersuchenden Gene wurde im Vergleich zu dem *Housekeeping*-Gen β -Actin quantifiziert und mit der unten stehenden Formel berechnet.



Die Potenz $\Delta\Delta C_t$ errechnet sich durch Abzug der Differenz zwischen dem C_t -Wert des zu untersuchenden Gens und dem C_t -Wert des *Housekeeping*-Gens β -Actin

vom durchschnittlichen Ct-Wert des β -Actins. Dieses Ergebnis wird dann von den 40 gemessenen Zyklen abgezogen und ergibt das $\Delta\Delta Ct$.



Alle untersuchten Gene, sowie das β -Actin-Referenzgen und die Negativkontrollen, wurden mit einem dreifachen Ansatz (Triplett) analysiert.

5.2.14 Stabile Transfektion/Gateway Cloning System

❖ Liposomale Transfektion und Elektroporation

Die weiblichen C1498 Wildtyp-Leukämie- und MPC-11 Plasmazytomzellen wurden sowohl mit Hilfe von Lipofectamin[®] 2000 [Cat. No. 11668-027, Invitrogen[™]] laut Protokoll des Herstellers, als auch durch Elektroporation (25 μ g pcDNA3.1-GFP-UTY bei 250V, 500 μ F mit dem BioRad GenePulser), mit dem pcDNA3.1-GFP-UTY-Vektor transfiziert.

❖ Stabile Transfektion durch retrovirale Transduktion

- Etablierung einer Leukämie-Zelllinie, die das mHag HY stabil exprimiert, mit Hilfe des *Gateway Cloning Systems*

1. Isolierung des *Donor Vectors* pENTR223.1 aus dem *Entry Clone DH10B TonA E.coli*

10 μ l, 25 μ l und 100 μ l *DH10B TonA E. coli* Bakteriensuspensionen, die unser Konstrukt (OMM5896-99621102+ BC 140403) trugen, wurden auf Spectinomycin-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Es wurden 3 Klone gepickt und in je 3 ml Spectinomycin-LB-Medium gegeben. Die Flüssigkulturen wurden ebenfalls bei 37°C über Nacht im Schüttler (ca. 170 rpm) inkubiert.

Aus den über Nacht angewachsenen Bakterienkulturen wurden Minipreps nach dem Protokoll von QIAGEN (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Cat. No. 27104) extrahiert.

2. Enzymatische Restriktionsanalyse des isolierten *Donor Vectors* pENTR223.1

Um sicherzustellen, dass die isolierten Klone unser gewünschtes UTY-Gen enthalten, wurde die gewonnene DNA mit den Restriktionsenzymen XbaI [Cat. No.

#ER0681, Fermentas] und EcoRV [Cat. No. #ER0301, Fermentas] verdaut. Das Enzym XbaI hat eine Restriktionsstelle auf dem pENTR223.1-Vektor. Dafür besitzt das Enzym EcoRV sowohl auf dem pENTR223.1-Vektor als auch auf dem UTY-Gen eine Restriktionsstelle.

Ca. 0,1-1 µg Plasmid-DNA wurde für eine Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden Puffer (*Tango Buffer* für XbaI bzw. *10x Buffer R* für EcoRV) enzymatisch verdaut.

3. DNA-Amplifikation und Sequenzierung des *Donor Vectors* pENTR223.1

Die bei der Restriktionsanalyse als positiv klassifizierte Klonen für das UTY-Gen wurden mittels PCR analysiert und anschließend sequenziert.

4. 1. Reaktion des *Gateway Cloning Systems*: LR-Reaktion

Durch die LR-Reaktion wird das gewünschte Gen aus dem *Gateway® entry clone* (OMM5896-99621102+ BC 140403 in pENTR223.1) in den Zielvektor PINCO-GFP-RFB transferiert.

Die LR-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

1. 50-150 ng (1-7 µl) *Entry clone* + 150 ng (1 µl) *Destination vector* wurden zusammengemischt und mit TE-Puffer (pH 8.0) auf 8 µl aufgefüllt.
2. Der Enzymmix *LR Clonase™ II enzyme mix* [Cat. No. 11791-020, Invitrogen™] wurde für ca. 2 Minuten auf Eis aufgetaut.
3. 2 µl Enzymmix wurden der Vektormischung aus Schritt 1 zugegeben.
4. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Nach der Inkubation wurde 1 µl Proteinase K für 10 Minuten bei 37°C zu dem Ansatz gegeben, um die enzymatische Reaktion zu beenden.

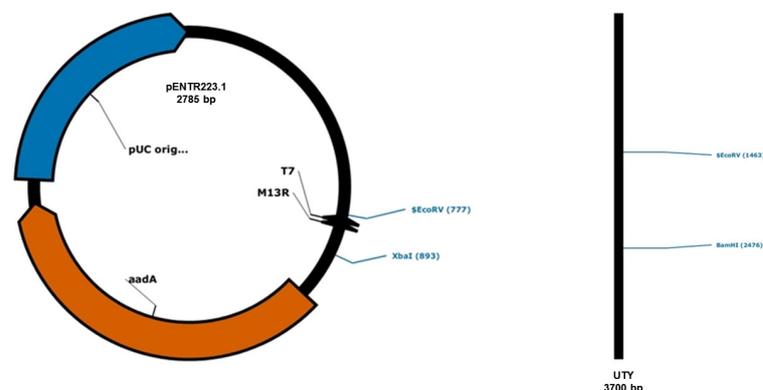


Abb. 5.3: Das pENTR223.1-Konstrukt und das UTY-Gen

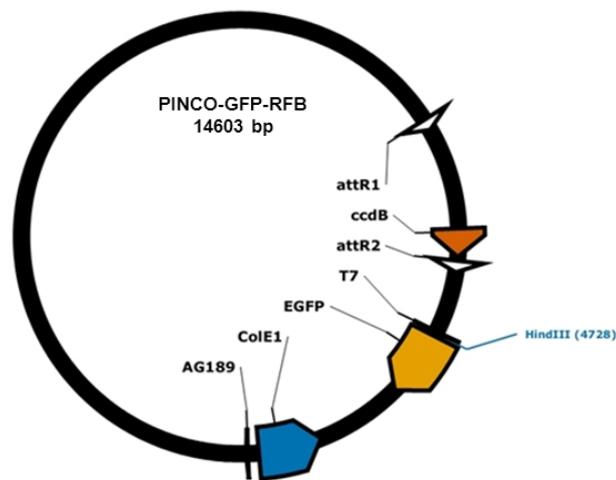


Abb. 5.4: Das PINCO-GFP-RFB-Konstrukt

5. Generierung der *Expressions Clone*: Transformation der kompetenten TOP10 *E. coli* mit dem, aus der LR-Reaktion gewonnenen, Plasmid bzw. Leervektor PINCO-GFP-RFB

Die chemisch-kompetenten TOP10 *E. coli*-Zellen [Cat. No. C4040-10, Invitrogen™] wurden, aus dem -80°C Schrank kommend, auf Eis aufgetaut. 1-5 µl (10 pg-100 ng) Plasmid-DNA wurden zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt (ohne Auf- und Abpipettieren). Die DNA-Zell-Mischung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für exakt 30 Sekunden bei 42°C durch Hitze-Schock behandelt. Der Ansatz wurde für 2 Minuten auf Eis gestellt, damit die Zellen sich regenerieren und das Enzym bilden konnten, das für den Abbau von Ampicillin notwendig war. 250 µl des, auf 20°C temperierten, S.O.C.-Mediums [Cat. No. 15544-034, Invitrogen™] wurden zu den Zellen gegeben und das Ganze für ca. 1 Stunde, bei 37°C, 225 rpm geschüttelt.

Für die Negativkontrolle mit dem Leervektor wurde zusätzlich parallel eine Transformation nur mit dem Vektor PINCO-GFP-RFB ohne das UTY-Gen, also ohne die LR-Rekombinationsreaktion, durchgeführt.

6. Ausplattieren der *Expressions Clone* auf Ampicillin-LB-Platten

10-20 µl der jeweiligen TOP10 *E. coli*-Bakteriensuspensionen wurden auf Ampicillin-LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden saubere Kolonien gepickt und in 250 ml Ampicillin-LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler (225 rpm) kultiviert.

7. Enzymatische Restriktionsanalyse des isolierten *Expressions Vectors* PINCO-GFP-RFB bzw. PINCO-GFP-UTY

Das Plasmid wurde laut Protokoll des Qiagen Kits für Maxiprep [Cat. No. 12362, QIAGEN] aus den *Expressions Clone* isoliert.

Um sicherzustellen, dass die isolierten Klone unser gewünschtes UTY-Gen enthalten, wurde das gewonnene Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI [Cat. No. # ER0051], HindIII [Cat. No. #ER0501] und EcoRV [Cat. No. #ER0301] der Firma Fermentas verdaut. BamHI und HindIII besitzen je vier Restriktionsstellen auf dem PINCO-GFP-RFB-UTY-Vektor. 3 der 4 Restriktionsstellen des Enzyms HindIII, befinden sich auf dem UTY-Gen, weshalb HindIII den Leervektor PINCO-GFP-RFB ohne das UTY-Gen nur linearisieren würde. Das Enzym EcoRV würde 6 Restriktionsstellen auf dem *Expression Vector* erkennen, wenn dieser das UTY-Gen in sich trägt ansonsten nur 5 Restriktionsstellen.

Der enzymatische Verdau wurde für eine Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden Puffer (*Tango Buffer* für BamHI bzw. *10x Buffer R* für HindIII und EcoRV) durchgeführt.

8. DNA-Amplifikation des *Expressions Vectors* PINCO-GFP-UTY

Die bei der Restriktionsanalyse als positiv klassifizierten Klone für das UTY-Gen wurden mittels PCR analysiert. Anschließend wurden sie zusammen mit dem Leervektor PINCO-GFP-RFB sequenziert.

9. Sequenzierung des *Expressions Vectors* PINCO-GFP-UTY bzw. des Leervektors PINCO-GFP-RFB

Die Sequenzierung aller Proben wurde von der Firma Eurofins-Genomics durchgeführt. Es wurden ca. 50 ng der jeweiligen Proben mit den in Frage kommenden Primern, mit je einer Konzentration von 10 µM (10 pmol/µl), sequenziert.

10. Transduktion der Verpackungszellen *Platinum-E Retroviral Packaging Cell Line* mit dem *Expressions Vector* PINCO-GFP-UTY bzw. dem Leervektor PINCO-GFP-RFB mit Hilfe von Nanofectin

Für die Viruspartikelproduktion diente uns die *Platinum-E Retroviral Packaging* Zelllinie [Cat. No. RV-101, Cell Biolabs]. Diese Zelllinie wurde aus den menschlichen, embryonalen Nierenzellen (*engl. Human Embryonic Kidney*, HEK) 293T generiert.

Die Zellen sind in der Lage, bei optimalen Bedingungen, einen durchschnittlichen Virustiter von 1×10^7 Viruspartikel/ml zu produzieren und können bis zu 4 Wochen in Kultur gehalten werden.

Die Transduktion mit dem *Expressions Vector* PINCO-GFP-UTY und dem Leervektor PINCO-GFP-RFB wurde mit Hilfe von Nanofectin [Cat. No. Q052-005, PAA] wie folgt durchgeführt:

1. Die Zellen wurden am Vortag so passagiert, dass sie am Tag der Transduktion zu 70-90% konfluent waren.
2. 8 µg des jeweiligen Plasmids wurden in 500 µl NaCl-Solution (150 mM) gegeben.
3. 25 µl Nanofectin wurden mit 475 µl NaCl-Solution (150 mM) gemischt.
4. Die 500 µl Nanofectin-Lösung aus Schritt 2 wurden zu der Plasmid-Lösung aus Schritt 3 gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Nanofectin-Plasmid-Mischung wurde tropfenweise den *Platinum-E Retroviral Packaging* Zellen zugegeben.

Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Das Medium der *Platinum-E Retroviral Packaging* Zelllinie bestand aus 10%-igem FCS und 1%-igem Penicillin/Streptomycin in DMEM Medium [Cat. No. E15-883, PAA].

Zusätzlich wurde ein Antibiotikum-Cocktail aus Ciprobay (1 µg/ml), Puromycin (1 µg/ml) und Blasticidin (10 µg/ml) zu den Zellen gegeben, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

11. Generierung und Sammeln der Viruspartikel

Nach ca. 24 Stunden exprimierten ca. 50-60% der Zellen GFP und leuchteten unter einem Fluoreszenzmikroskop grün. Der Überstand der Zellen, der die Viruspartikel beinhalten sollte, wurde gesammelt und bis zur Transduktion der Zielzellen im Kühlschrank aufbewahrt. Nach jeder Ernte des Überstandes wurde den Zellen frisches Medium zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte 2 Mal am Tag (morgens und abends). Insgesamt wurde 4 Mal geerntet.

12. Transduktion der Zielzellen mit den gewonnenen Viruspartikeln des Leervektors PINCO-GFP-RFB bzw. des PINCO-GFP-UTY mit Hilfe von RectoNectin

➤ Zielzellen

Als Zielzellen fungierten die weiblichen, murinen Wildtyp-Leukämiezellen C1498 (ATCC[®] TIB-49[™]), die weiblichen, murinen Burkitt-Lymphomzellen Bl6xmyc #67 und Bl6xmyc #291, sowie der solide Tumor LLC (*Lewis Lung Carcinoma*). Alle vier Tumoren stammen aus weiblichen C57BL/6-Mäusen [H-2K^b].

➤ Beschichtung der Kulturplatten (Coating)

Die benötigten 6-Well-Platten [REF 351146, BD] wurden mit 1,5 ml RetroNectin (50 µg/ml, 2,5mg, T100B, TAKARA) beschichtet und über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Anschließend wurden die beschichteten Platten 30 Minuten lang mit 1,5 ml 1%-igem Human-Serum-Albumin (HSA, BEHRING) blockiert. Das Human-Serum-Albumin wurde verworfen und die Platten einmal mit 2 ml Hank's BSS-Medium gewaschen. Um eine Austrocknung der Platten zu vermeiden, wurde PBS zugegeben.

➤ Transduktion

Die Transduktion der Zielzellen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Auf die beschichteten Platten wurden 2 ml des gesammelten Überstandes gegeben und für mindestens 30 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt. Nach jeder Zentrifugation wurden zwei Drittel des Überstandes abgenommen und durch jeweils die gleiche Menge an frischem Überstand ersetzt. Anschließend wurden maximal 2×10^6 der zu transduzierenden Zielzellen pro Well zugegeben. Es musste gewährleistet werden, dass die Zielzellen Kontakt mit der Zellkulturflaschenoberfläche, beziehungsweise den an der Kulturfalsche haftenden Viruspartikeln hatten. Die Zellen wurden wie üblich im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde der Transduktionserfolg unter einem Fluoreszenzmikroskop geprüft. Die Zellen, die erfolgreich transduziert worden waren, sollten das Reporter-gen GFP exprimieren und grün leuchten.

➤ Sortieren am FACS ARIA II

Nach der Transduktion wurden die Zellen mehrmals gewaschen und in Kultur genommen. Nach ca. 1 Woche Kulturzeit wurden die erfolgreich transduzierten Zellen am FACS ARIA II nach ihrer GFP-Positivität von den übrigen Zellen getrennt

und anschließend wieder, nach Zugabe von frischem Antibiotikum (Pen/Strep) ins Kulturmedium, in Kultur genommen.

5.3 Proteinbiochemie

5.3.1 Protein-Isolierung

Ca. 100 µl Blut oder ca. 50-100 mg Milz bzw. Tumorgewebe wurden in 150-200 µl Lyse-Puffer aufgenommen und durch ein Ultraschallgerät homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend bei 12000 U/min und 4° C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen.

Nach Messung der Proteinkonzentration mit einem Nano-Drop, bei einer Wellenlänge von 280 nm, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Lyse-Puffer (pH 7,4)

Tris	25 mM
NaNO ₃	1 mM
SDS	1%
EDTA	2mM

5.3.2 SDS-PAGE

Ca. 30 µg des isolierten Gesamtproteins aus dem Blut, der Milz sowie aus den Tumoren wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Laemmli-Ladepuffer [Cat. No. S3401-1VL, SIGMA-ALDRICH] auf ein 12,5%-iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel*, *SDS-PAGE*) aufgetragen und ihrer Größe nach aufgetrennt.

Tabelle 5.7: Zusammensetzung der Gele

Reagenzien	4,5%-iges Trenngel	12,5%-iges Sammelgel	
Acrylamid	1,5 ml	4,1 ml	
TRIS	2,5 ml (pH 6,8)	2,6 ml (pH 8,8)	
TEMED	10 µl	10 µl	
SDS 10%	100 µl	-	
Wasser	5,8 ml	3,2 ml	
APS 10%	100 µl		100

5.3.3 Immunoblotting (*Western Blotting*)

Beim *Western Blot* werden die Proteine, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden ("© 1970 Nature Publishing Group," 1970), (Laemmli, 1970) auf eine spezielle Membran transferiert, damit sie mit Hilfe von immunohistochemischen Methoden detektiert werden können (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1992).

Die aufgetrennten Proteine werden mit einem Elektroblotter vom Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) transferiert. Anschließend wird die Membran mit Ponceaurot gefärbt, um die Proteinbande sichtbar zu machen.

Die auf der Membran isolierten Proteine können nun durch Bindung eines spezifischen Antikörpers, der mit einem Komplex gekoppelt ist und mit einem Enzym eine Lumineszenz-Reaktion katalysieren kann, nachgewiesen und sichtbar gemacht werden.

Die freien, unspezifischen Bindungsstellen wurden erst für 1 Stunde mit einer 5%-igen Milchpulverlösung gesättigt, bevor die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (1:500 polyklonales anti-UTY, ab95113) hybridisiert wurde. Die Menge der Proteinaufladung wurde mit der β -Aktin-Menge der einzelnen Probe kontrolliert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (1:5000 anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Da der zweite Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist, kann die Detektion mit dem Luminol-basierten ECL™ *Western Blotting*-System erfolgen.

Bevor die Proteinaufladung mit dem β -Aktin-Antikörper kontrolliert werden konnte, musste die Membran, für 30 Minuten bei 75°C, mit dem *Stripping*-Puffer von den hybridisierten Antikörpern gewaschen werden.

***Stripping*-Puffer**

10% SDS	20 ml
Tris/HCl (pH 6,8)	12,5 ml
Mercaptoethanol	700 μ l
Aqua dest.	66,8 ml

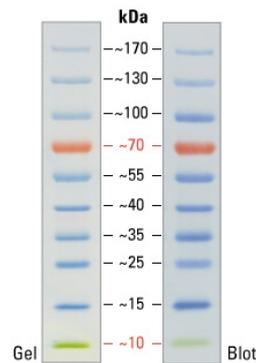


Abb. 5.5: Bandenmuster des *Precision Plus Protein Standards* [Cat. No. #161-0374, BIO RAD]
Es wurde eine Bandengröße von 130 kDa erwartet.

5.4 *In vitro*-Generierung von T-Zellklonen gegen das HY-Antigen

Die Milzen der transplantierten CB6F1-Empfänger wurden an Tag 19 isoliert und präpariert. Die Milzzellen wurden am Sysmex KY-21 gezählt und für die „*Mixed tumor lymphocyte culture*“ (MTLC) weiterverwendet.

Bei der „*mixed tumor lymphocyte culture*“ (MTLC) oder gemischten Tumor-Lymphozytenkultur handelt es sich um ein etabliertes klinisches Untersuchungsverfahren, um die Reaktivität der immunkompetenten Zellen auf ihr spezifisches Antigen zu analysieren. Die Lymphozyten werden mit den antigenpräsentierenden Zellen, hier mit der in *in vivo*-Versuchen benutzten Tumorzelllinie C1498-GFP-UTY, kokultiviert.

Erkennt und reagiert eine T-Zelle mit dem für sie spezifischen Antigen, hier HY, wird sie stimuliert und anschließend proliferieren (Bain, Vas, & Lowenstein, 1964).

5.4.1 Bestrahlung der Targetzellen

Die Tumor- und Milzzellen, die in der *Mixed tumor lymphocyte culture* (MTLC), dem ELISpot und der *Cytometric Bead Array*-Analyse (CBA), als antigenpräsentierende Zellen (Targetzellen) dienten, wurden mit dem radioaktiven Isotop Cäsium 137 (^{137}Cs) im Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des Universitätsklinikums Münster bestrahlt. Die C1498-GFP-UTY-Tumorzellen wurden mit 120 Gy, die männlichen Milzzellen mit 30 Gy bestrahlt. Durch die Bestrahlung wurde gesichert, dass die Targetzellen nicht mehr in der Lage waren zu proliferieren und selbst Zytokine zu produzieren. Ca. 24 Stunden nach der Bestrahlung waren die bestrahlten Targetzellen tot.

5.4.2 Primäre mixed tumor lymphocyte culture (MTLC)

5×10^7 Milzzellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter C1498-GFP-UTY-Tumorzellen (120 Gy) für mindestens 10 Tage in 20 ml Leukozyten Medium im Brutschrank kultiviert. Die Kulturflasche wurde aufrecht gestellt, um den Zell-Zell-Kontakt zu begünstigen.

Leukozyten Medium

RPML mit *high Glucose/stable Glutamine* (1 %)

FCS	10 %
β -Mercaptoethanol	0,05 mM
Pen/Strep	1 %
MEM NEAA (100x)	1 % (1x)
Sodium Pyruvate (100mM)	1 % (1 mM)
HEPES (1M)	1 % (10 mM)

5.4.3 Sekundäre mixed tumor lymphocyte culture (MTLC)

Die Zellsuspension aus der primären *MTLC* wurde für 7 Minuten bei 700 rpm zentrifugiert, anschließend wurde das Zellpellet 2 Mal mit PBS (5 Minuten, 1000 rpm) gewaschen.

Die lebenden Milzzellen aus der primären *MTLC* wurden gezählt und erneut 5×10^6 Zellen mit 5×10^6 bestrahlten C1498-GFP-UTY-Tumorzellen (120 Gy) für weitere 3 Tage in 20 ml Leukozyten Medium im Brutschrank kultiviert. Die Kulturflasche wurde wie bei der ersten *MTLC* aufrecht gestellt.

5.4.4 Subklonieren der HY-spezifischen T-Zellen

Die aus der sekundären *MTLC* lebenden Milzzellen wurden geerntet, indem sie für 7 Minuten bei 700 rpm zentrifugiert und 2 Mal mit PBS (5 Minuten, 1000 rpm) gewaschen wurden. Sie wurden zusätzlich über *Ficoll* (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, Cat. No. L 6115) aufgereinigt und von den toten Targetzellen getrennt.

Die lebenden Milzzellen wurden gezählt und so verdünnt, dass pro Well einer 96-er Well Reihe 1, 3, 7 bzw. 10 T-Zellen mit 1×10^3 bestrahlten C1498-GFP-UTY-Tumorzellen in 200 μ l Leukozyten Medium inkubiert werden konnten (Abb. 5.6).

Die Subklonierung wurde in einer 96-er Well-Platte mit flachem Boden durchgeführt und sah wie folgt aus:

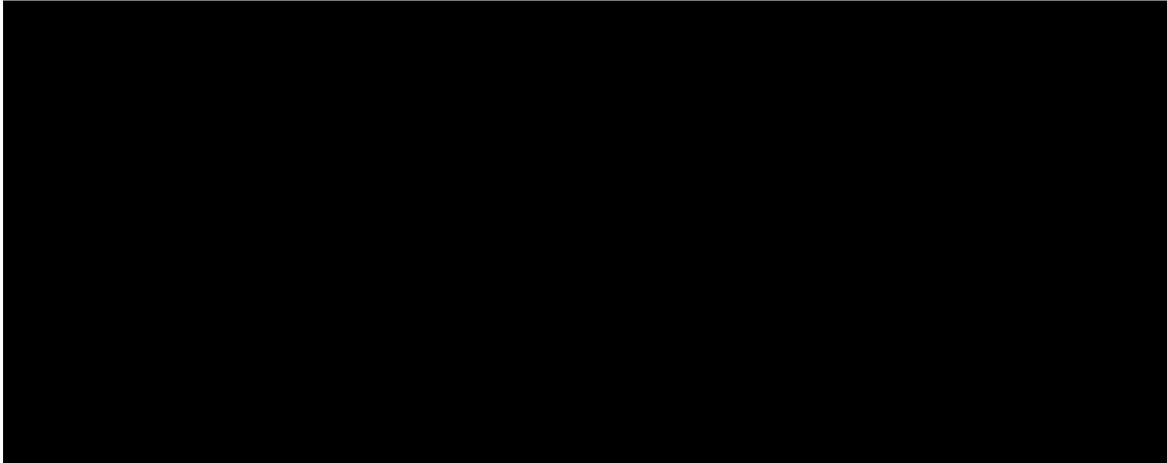


Abb. 5.6: Pipettierschema der Subklonierung nach einer *Mixed tumor lymphocyte culture (MTLC)*

Die Kokultur wurde für weitere 4 Tagen bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

5.4.5 Screening der positiven T-Zellen

Die Kulturplatte wurde unter einem Mikroskop analysiert. Es wurde nach Clustern aus T-Zellen und gebundenen C1498-GFP-UTY-Tumorzellen gesucht. Die Wells, wo Cluster zu finden waren, wurden markiert und die hier befindlichen T-Zellen vorsichtig isoliert und weiterkultiviert.

5.4.6 Kultivierung der positiven T-Zellklone

Die als positiv isolierten Klone wurden in eine neue 96-er Well-Platte überführt und im Leukozyten Medium mit Zusatz von IL-2 (Mouse IL-2, Cat. No. 130-094-054, Miltenyi Biotec) kultiviert.

Die T-Zellen wurden so bis zum Erreichen einer bestimmten Zellzahl hochgezogen. Danach konnten sie eingefroren bzw. für weitere Analysen wie dem *Spectratyping* oder ELISpot verwendet werden.

5.5 T-Zell-Rezeptor(TCR)-Profil (*Spectratyping*)

Die *Spectratyping*- oder *Immunoscope*-Analyse ist eine Methode zur Untersuchung der T-Zell-Rezeptor-Vielfalt (TCR) aller vorhandenen T-Zell-Populationen eines Organismus.

Dabei wird die variable, komplementär bestimmende Region 3 (CDR3, engl. *complementarity determining region 3*) der variablen Gen-Segmente (V) mittels PCR amplifiziert und verglichen. Die CDR3 stellt die Antigenbindungsstelle dar und zeigt die höchst variablen Sequenzen im TCR. Durch die somatische Rekombination

dieser variablen Gen-Segmente, besitzen verschiedene T-Zellklone unterschiedliche CDR3-Sequenzen bzw. CDR3-Längen. Durch die Information über ihre Länge, deren relative Häufigkeit und Heterogenität, kann ein TCR-Repertoire oder ein TCR-Profil aller vorhandenen T-Zell-Populationen in einem Individuum hergestellt werden.

Der T-Zell-Rezeptor erkennt das Peptid, das durch die MHC-Moleküle präsentiert wird (Kronenberg, Siu, Hood, & Shastri, 1986). Es handelt sich hierbei um ein heterodimeres, membrangebundenes Glykoprotein aus einer α - und β - (TCR α/β) bzw. einer γ - und δ -Kette (TCR γ/δ), das strukturell dem Fab-Fragment (Fab, engl. *Fragment antigen binding*) von Antikörpermolekülen ähnelt. Während die TCR α/β -Rezeptor-Variante am häufigsten exprimiert wird (95% der TCR, Abb. 7), wird der TCR γ/δ -Rezeptor-Typ (5%) nur auf unreifen T-Zellen bzw. auf einer Minderheit im peripheren Blut exprimiert.

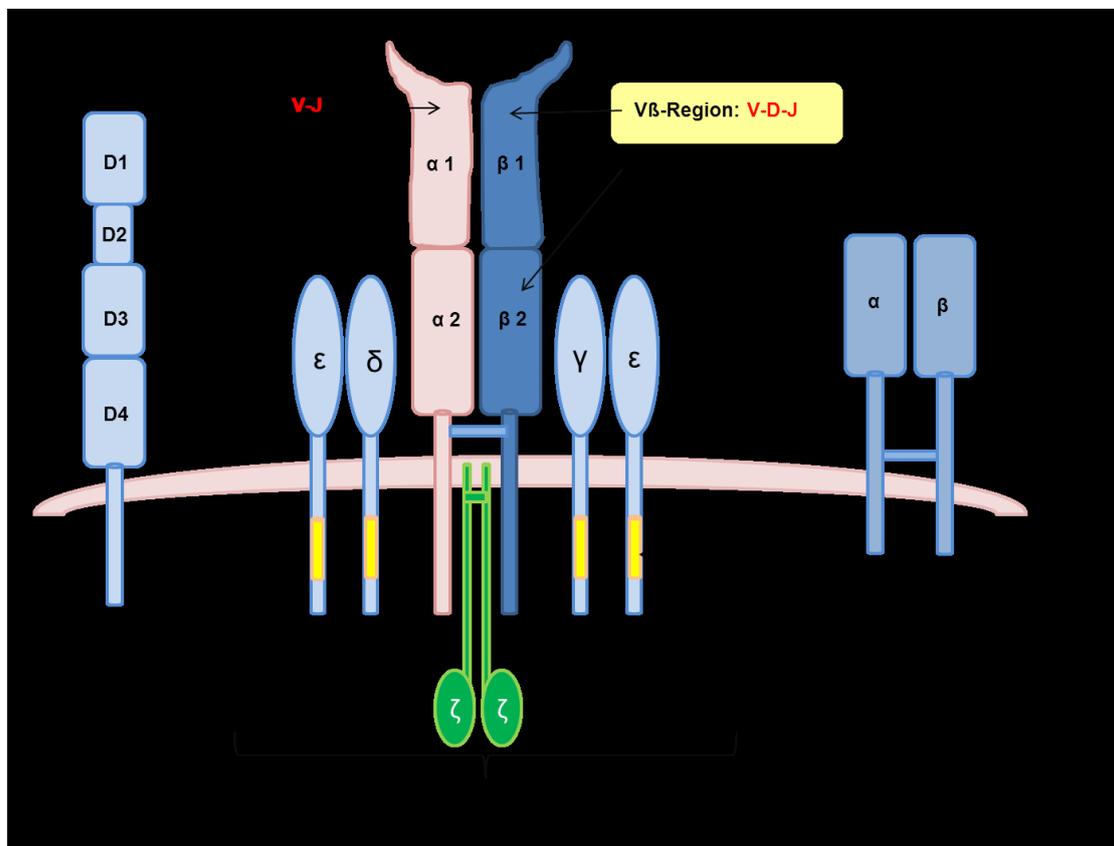


Abb. 5.7: Schematischer Aufbau eines TCR-Komplexes (TCR+CD3) mit dem CD4- bzw. CD8-Molekül als Co-Rezeptor. Die α -Kette ist ein ca. 40-60 kD, die β -Kette ein ca. 40-50 kD schweres Glykoprotein. Während das Gen der α -Kette auf Chromosom 14 lokalisiert ist, befindet sich das der β -Kette auf Chromosom 7. Die variable Region des TCRs ($V\alpha=VxJ$ bzw. $V\beta=VxDxJ$) ähnelt der der Immunglobuline und befindet sich auf verschiedenen Exons.

Die große Diversität der TCR entsteht durch das *Rearrangement*, also die somatische Rekombination der variablen (V-), *joining* (J-), *diversity* (D-) und

konstanten (C-) Gen-Segmente durch Deletion, Inversion oder Translokation und das anschließende *Splicing*. Zusätzlich werden P- und N-Nukleotide als Verbindungsstück zwischen die V-, D- und J-Gen-Segmente eingebaut (Abb. 8).

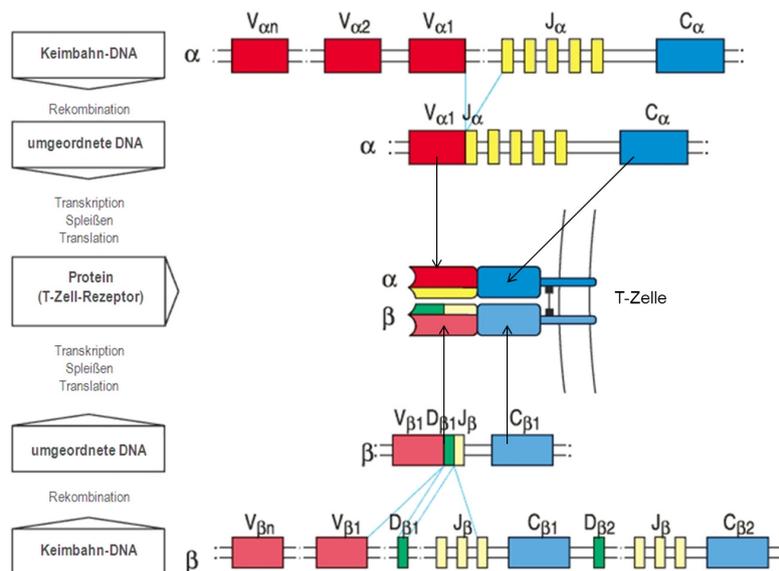


Abb. 5.8: Die genomische Organisation des T-Zell-Rezeptors erklärt die große Variabilität des Moleküls. Aus dem *Rearrangement* der V-, D-, J-Gen-Segmente ergeben sich über 10^{15} mögliche α/β -T-Zell-Rezeptorkombinationen. (Janeway Immunologie)

Um ein TCR-Profil aller in den CB6F1-Empfängertieren vorhandenen T-Zellen herstellen zu können, wurde für diese Arbeit die β -Kette des TCRs analysiert.

Für die $V\beta$ -*Spectratyping*-Analyse wurde an Tag 19 nach allogener Transplantation eine Splenektomie durchgeführt. Die Milzzellen wurden, wie bei dem Abschnitt „Isolierung von Splenozyten“ beschrieben, präpariert. Anschließend wurden die Zellen mit einem, mit FITC gekoppelten, monoklonalen CD8-Antikörper gefärbt. Mittels AREA-II-FACS-Gerät wurden die $CD8^+$ -Zellen von den übrigen Zellen getrennt und isoliert. Aus den isolierten Zellen wurde die RNA extrahiert und in cDNA synthetisiert.

Die *Spectratyping*-Methode besteht aus 3 Schritten (Abb. 9):

1. 1. PCR: Amplifikation der $V\beta$ -Gene der CDR3 mit den Primern aus der variablen Region (TBV1 bis TBV24, siehe Primerliste) und einem Primer aus der konstanten Region (TCB1).
2. 2. PCR = *nested-PCR* (*run-off reaction*) mit einem, mit Farbstoff gekoppelten, Primer der C-Region (6-FAM-5'-MuTCB1 = TCB2)
3. 3. Fragment-Analyse der *nested-PCR*-Produkte

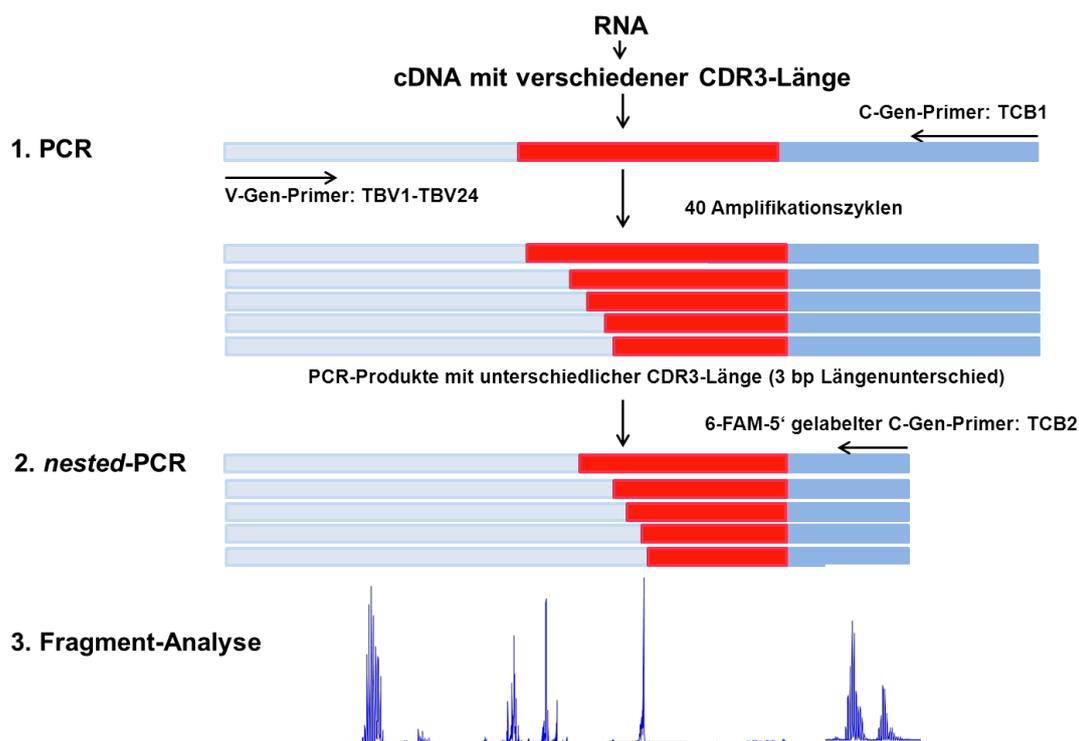


Abb. 5.9: Aufbau der Spectratyping-Analyse mit den 2 Amplifikations-Schritten und der anschließenden Fragment-Analyse nach Jeffrey R. Currier (Currier & Robinson, 2001).

- Die Ansätze für die 1. Amplifikation sahen wie folgt aus:

Die V β -Segmente wurden in 24 Gen-Familien unterteilt (TBV1 bis TBV24). Für diese Arbeit wurden 12 Primerpaare (TBV1+TBV5=TBV1/5 bis TBV23+TBV24=TBV23/24) gebildet.

Es wurden 12 Master-Mixe angesetzt (Tab. 8), die alle denselben *forward* Primer TCB1 und jeweils eines der 12 verschiedenen revers-Primerpaare TBV enthielten. Der Ansatz wurde in einer 96-er PCR-Well-Platte durchgeführt (Abb. 10), wobei pro Well 22 μ l Master-Mix und 3 μ l cDNA (ca. 150 ng) zusammenpipettiert wurden.

Tabelle 5.8: Master-Mix für die 1. Amplifikation

Reagenzien	Volumen (25 μ l)	x 10 (8 Wells+2)	Rev. Primer
H ₂ O	7,5	75	2x(1,25 μ l)=2,5 μ l TBV-Primerpaare (20 μ M) 2,5 μ l x 10 = 25 μ l pro PRIMERPAAR
5xQ5 Reaction Buffer	5	50	
5xQ5 High GC Enhancer	5	50	
10 mM dNTPs	0,5	5	
Fw Primer TCB1 (20 μ M)	1,25	12,5 μ l Fw Primer TCB1	
Q5 Hot Start High-Fidelity	0,25	2,5	
Gesamt	19,5	195	
cDNA	3 μ l	22 μ l Master Mix + 3 μ l cDNA-Probe	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TBV1/5	TBV2/6	TBV3/7	TBV4/8	TBV9/10	TBV11/12	TBV13/14	TBV15/16	TBV17/18	TBV19/20	TBV21/22	TBV23/24
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abb. 5.10: Pipettierschema des 1. Ansatzes. Jede Spalte entspricht einem Primerpaar (1=TBV1/5 bzw. 12=TBV23/24) und jede Reihe einer Probe. So wurde jede Probe mit allen Primern der 24 V β -Gen-Familie analysiert.

Tabelle 5.9: Das PCR-Programm für den 1. Amplifikationsschritt

Schritt/Temperatur	Zeit	Zyklen
1. 98°C	1 m	
2. 98°C	25 s	2. bis 4. Schritt
3. 53°C	45 s	x 40
4. 72°C	45 s	
5. 72°C	5 Min.	
6. 4°C	∞	

- Die 2. *nested-* oder *run-off reaction-*PCR wurde wie folgt pipettiert:

Für die 2. Amplifikation wurde für alle Proben nur der, mit Farbstoff gekoppelte, *forward* Primer TCB2 (6-FAM 5'-MuTCB1=TCB2) verwendet. Der 2. Ansatz wurde wie der erste in einer 96-er PCR-Well-Platte durchgeführt, wobei pro Well 15 μ l Master-Mix und jeweils 10 μ l der Produkte aus der 1. PCR zusammenpipettiert wurden (Tab. 10).

Tabelle 5.10: Master-Mix für die 2. Amplifikation

Reagenzien	Volumen (25 µl)	x 110
H ₂ O	3,75	412,5
5xQ5 Reaction Buffer	5	550
5xQ5 High GC Enhancer	5	550
10 mM dNTPs	0,5	55
Fw Primer 5-FAM 5'-MuTCB1 TCB2 (50µM)	0,5	55 µl
Q5 Hot Start High-Fidelity	0,25	27,5
Gesamt	15	1650
cDNA	10 µl PCR-Produkt aus der 1. Amplifikation	15 µl Master Mix + 10 µl PCR-Produkt aus der 1. Amplifikation

Tabelle 5.11: Das PCR-Programm für den 2. Amplifikationsschritt

Schritt/Temperatur	Zeit	Zyklen
1. 98°C	25 s	
2. 98°C	25 s	
3. 50°C	45 s	2. bis 4. Schritt
4. 72°C	45 s	x 30
5. 72°C	5 Min.	
6. 4°C	∞	

- Fragment-Analyse

Die Fragment-Analyse wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster durchgeführt und anschließend mit der Peak Scanner™-Software (V2_0_1) von der Firma Applied Biosystems ausgewertet.

Tabelle 5.12: Master-Mix für die Fragment-Analyse

Reagenzien	Volume (8µl)	x 110 (96 Wells)
HiDi (Deionized formamide)	7,75	852,5
GeneScan-350 ROX Size Standard (n+1)	0,25	27,5
Gesamt	8 µl	880 µl

8 µl Master mix + 10 µl nested-PCR-Produkt verdünnt (2 µl Probe + 8µl H₂O)

5.6 *Enzyme Linked Immuno Spot Assay (IFN- γ -ELISpot)*

Der *ELISpot*-Assay (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) ist ein Verfahren zum Nachweis freigesetzter Zytokine oder Antikörper nach einer T-zellulären Erkennung eines spezifischen Antigens durch eine einzelne Immunzelle, als Effektorzelle bezeichnet (Zhang et al., 2009).

Bei dieser Arbeit diente der *ELISpot*-Assay zum Nachweis des sekretierten Zytokins Interferon-gamma (IFN- γ) als spezifische Immunantwort der CD8⁺-Effektorzellen.

Der *ELISpot*-Assay wurde mit dem mouse-IFN- γ -*ELISpot*^{PLUS} Kit [3321-4HPT-4] der Firma MABTECH durchgeführt.

Die Effektorzellen wurden, wie bei dem Abschnitt „Isolierung von Splenozyten“ beschrieben, präpariert. Die Targetzellen wurden mit 30 Gy (Milzzellen) bzw. 120 Gy (Tumorzellen) bestrahlt.

Zur Stimulation der Positiv-Kontrolle wurde den Effektorzellen CD3- [Cat. No. 553058, BD] und CD28- [Cat. No. 553295, BD] Antikörper [1:1000] zugegeben (Trickett & Kwan, 2003). Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 37°C mit 5%-iger CO₂ Zufuhr im Feuchtbrutschrank, wurden die Platten von den Zellen freigewaschen. Das sezernierte IFN- γ , das auf der Membran gebunden sein sollte, konnte nun mit einem zugegebenen primären Antikörper R4-6A2-Biotin [1 μ g/ml; 1:1000 in PBS mit 0,5% FCS] reagieren. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, konnte der biotinylierte, primäre Antikörper mit dem sekundären Streptavidin-HRP-Antikörper [1:1000 in PBS mit 0,5% FCS] gebunden werden, der anschließend mit dem TMB-Substrat enzymatisch sichtbar gemacht werden konnte. Die sichtbaren Spots konnten mit Hilfe eines *ELISpot* Readers (CTL ImmunoSpot® S5 UV Analyzer) gezählt (SmartCount) und analysiert werden. Den Effektorzellen der Negativkontrollen wurden weder Stimulantien noch Targetzellen zugegeben.

Bei der Durchführung aller *ELISpot*-Assays wurde jedes Well mit einem dreifachen (Triplett) bzw. vierfachen Ansatz (Quadruplicate) analysiert.

1 nur 1. Effektor ♀ C57BL/6N	2 nur 1. Effektor ♀ C57BL/6N	3 nur 1. Effektor ♀ C57BL/6N	4 nur 2. Effektor Imm. ♀ C57BL/6N	5 nur 2. Effektor Imm. ♀ C57BL/6N	6 nur 2. Effektor Imm. ♀ C57BL/6N	7 nur 3. Effektor ♂ MILZ	8 nur 3. Effektor ♂ MILZ	9 nur 3. Effektor ♂ MILZ	10 nur Target C1498- UTY	11 nur Target C1498- UTY	12 nur Target C1498- UTY
A											
1:1 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	C1498- UTY CD3/CD28	C1498- UTY CD3/CD28	C1498- UTY CD3/CD28
1:1/2 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	♀ C57BL/6N CD3/CD28	♀ C57BL/6N CD3/CD28	♀ C57BL/6N CD3/CD28
1:1/4 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	Imm. ♀ C57BL/6N CD3/CD28	Imm. ♀ C57BL/6N CD3/CD28	Imm. ♀ C57BL/6N CD3/CD28
1:1/8 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	♂ MILZ CD3/CD28	♂ MILZ CD3/CD28	♂ MILZ CD3/CD28
1:1/16 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	Nur Target ♂ MILZ	Nur Target ♂ MILZ	Nur Target ♂ MILZ
1:1/32 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	TC-Medium	TC-Medium	TC-Medium
1:1/64 uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	uty	TC-Medium	TC-Medium	TC-Medium

Abb. 5.11: Beispiel eines ELISpot-Pipettierschemas mit dreifachem Ansatz.

5.7 Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*)

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das auf einem Flüssigkeitsstrom bzw. einer hydrodynamischen Fokussierung basiert. Die Methode beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zellen, wenn diese den Laserstrahl passieren. Sie ermöglicht die Analyse von Zelleigenschaften wie Größe, Granularität oder Oberflächeneigenschaften. Darüber hinaus können die Zellen in sehr hoher Geschwindigkeit gleichzeitig gezählt werden.

Jede einzelne Zelle, die sich im laminaren Probenstrom befindet, wird an einem Laser mit definierter Wellenlänge vorbeigeleitet.

In dieser Arbeit wurden die Zellen unter anderem auf ihren Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD19) analysiert, wobei Antikörper benutzt wurden, die mit Fluorochromen (FITC, PE, APC, PE-Cy5) markiert waren.

Sowohl die Zellen als auch die Fluorochrome, die durch den Laser angeregt werden, streuen Licht, das durch Photodetektoren (Photomultiplier) erfasst werden kann.

Alle durch die Photodetektoren erfassten Informationen können in elektronische Signale umgewandelt, verstärkt und anschließend digitalisiert werden.

Tabelle 5.13: Die eingesetzten Fluorochrome mit ihren jeweiligen Absorptions- und Emissions-Wellenlängen

Fluorochrom	Absorption	Emission
<i>Allophycocyanin</i> (APC)	650 nm	660 nm
<i>Fluorescein-Isothiocyanat</i> (FITC)	495 nm	519 nm
<i>Green fluorescent protein</i> (GFP)	490 nm	510 nm
<i>R-Phycoerythrin</i> (PE)	480, 570 nm	578 nm
PE-Cy5 (Konjugat)	480, 565, 650 nm	670 nm

Alle benutzten Antikörper für die Pentamer- und FACS-Analyse sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 5.14: Antikörper-Liste

Antikörper (AK)	Klon	Katalognummer/Firma
Fc-Block (anti-CD16/CD32)	2.4G2	553142, BD
CD3 ϵ -FITC	145-2C11	100305, BioLegend
CD4-PE	GK1.5	553730, BD
CD8-FITC	KT15	A502-3A, ProImmune
CD19-PE-Cy 5	6D5	A504-5A, ProImmune
H-2K ^b -FITC	AF6-88.5	553569, BD
H-2K ^d -PE	SF1-1.1	553566, BD

5.7.1 Antikörper-Färbung

Alle Schritte der Antikörper-Färbung wurden auf Eis und unter Lichtschutz durchgeführt.

Pro 1×10^6 Zellen wurde wie folgt gefärbt:

Tabelle 5.15: Antikörper-Färbung für die FACS-Analyse (100 µl/Well)

Schritt	Volumen pro 1×10^6 Zellen	Inkubationszeit
1. Antikörper (AK) [1:100]	1 µl	AK, Fc-Block für
2. Fc-Block [1:25]	4 µl	30 Min. bei 2-8°C im Dunkeln
3. 2x Waschen	2x ca. 250 µl FACS-PBS	2x 5 Min. bei 300 g zentrifugieren
4. Pellet in 300 µl FACS-PBS resuspendieren → FACS-Analyse		

FACS-PBS

PBS	487 ml
2,5% FCS	12,5 ml
0,1% Natrium-Azid	500 µl aus 10% Natrium-Azid

5.7.2 Pentamer-Färbung

Für die Pentamer-Färbung wurden Milzen aus den transplantierten CB6F1-Mäusen präpariert. Die isolierten Milzzellen wurden im Pentamer-Waschpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in der Restmenge an Puffer (ca. 50 µl) resuspendiert.

Pentamer-Waschpuffer

PBS	499 ml
0,1 % BSA	500 µl
0,1 % Natriumazid	500 µl aus 10% Natrium-Azid

Alle Schritte der Pentamer-Färbung wurden auf Eis und unter Lichtschutz durchgeführt. Die so gefärbten Milzzellen wurden im FACS-Gerät analysiert oder sortiert.

Pro 1×10^6 Zellen wurde wie folgt gefärbt:

Tabelle 5.16: Pentamer-Färbung (50 µl/Well)

Schritt	Volumen pro 1x10 ⁶ Zellen	Inkubationszeit
1. Pro5 MHC Pentamer: APC-H-2Db WMHHNMDLI	10 µl (1 Test)	10 Min. bei RT
2. Waschen	2 ml Pentamer-Waschpuffer	5 Min. bei 300 g zentrifugieren
3. Anti-CD8-FITC + anti-CD19-PE-Cy5	Je 1 µl (1 Test)	In den 50 µl Rest-Puffer resuspendieren 20 Min. auf Eis
4. Fc-Block	2 µl [1:25]	20 Min. auf Eis
5. 2x Waschen	2 ml Pentamer-Waschpuffer	4 Min. bei 300 g zentrifugieren
6. Pellet in 300 µl FACS-PBS resuspendieren → FACS- Analyse		

5.7.3 Sorten

Die stabil transfizierten Tumorzellen C1498-GFP-UTY wurden regelmäßig nach GFP-Positivität der Zellen gesortet, um die Reinheit der Zellen in der Zellkultur zu gewährleisten. Es wurde eine Mindestzellzahl von $2\text{-}5 \times 10^5$ GFP-positiven Zellen gesortet, die anschließend wieder in Kultur genommen wurden. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen beim Sorten, war es wichtig, frisch angesetztes Komplettmedium mit Penicillin/Streptomycin zur Rekultivierung zu verwenden.

Die Milzzellen aus der Kokultur (*MTLC*) wurden nach einem Waschschrift mit dem selektierenden Antikörper (CD3, CD8), wie oben beschrieben, gefärbt und anschließend mit Hilfe des, am Antikörper gekoppelten, Fluorochroms am *flow sorter* ARIA II von den übrigen Zellen getrennt und isoliert. Die positiv sortierten Zellen wurden entweder wieder in Kultur genommen oder zur RNA-Isolierung für weitere Versuche verwendet.

5.8 Cytometric Bead Array-Analyse (CBA)

Der *Cytometric Bead Array (CBA)* oder *Bead-based immunoassay* ist eine auf Durchflusszytometrie basierende Methode, die sowohl die Detektion als auch die Quantifizierung von Analyten (Zytokinen) in Zellkulturüberständen oder Serum erlaubt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität und somit die Möglichkeit, eine sehr geringe Menge an Analyt zu detektieren. Außerdem wird nur

ein kleines Probenvolumen (50 µl je Probe) benötigt, und es kann bis zu 4 Analyten gleichzeitig gemessen werden.

Es wird unter anderem mit sogenannten *Capture Beads* gearbeitet, die auf ihrer Oberfläche Antikörper für das in Frage kommende Zytokin (z.B. IFN-γ) tragen. Jeder *Bead* hat seine eigene Fluoreszenzintensität und kann im FL-3-Kanal des Zytometers detektiert werden. Außerdem kommt ein sekundärer, mit PE gekoppelter, Antikörper für denselben Analyten in den Ansatz.

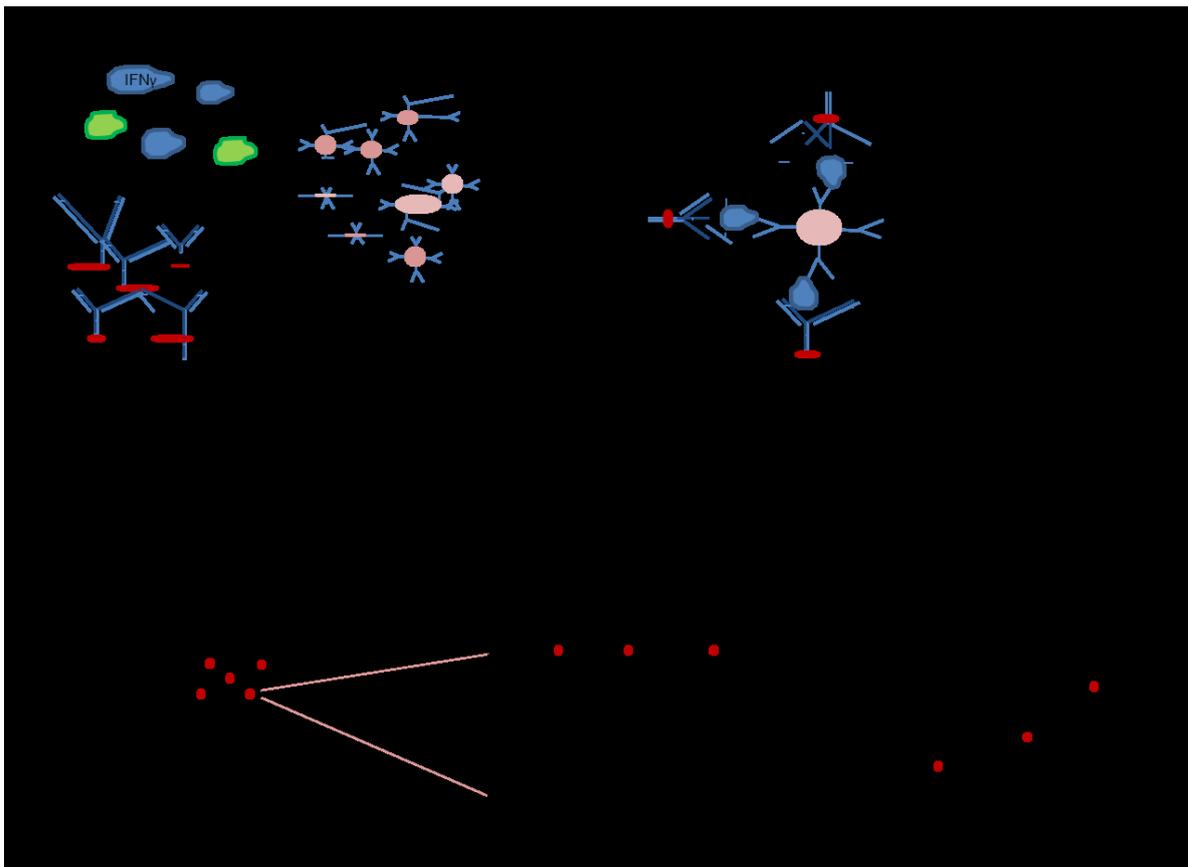


Abb. 5.12: Ablaufprinzip des *Cytometric Bead Arrays* (CBA)

Wird ein Analyt von einem Bead und dem jeweiligen Sekundär-Antikörper gebunden, lässt sich der Komplex, sowohl im PE- als auch im FL-3-Kanal, als positives Signal detektieren.

Mit Hilfe der Software FCAP Array™ v3.0.1 kann die Konzentration des gesuchten Zytokins im Vergleich zu einer Standardkurve ermittelt werden.

- Durchführung der CBA-Analyse (Biosciences, n.d.)
 - I. Ansatz der Standard-Reihe für die Titrationskurve: Die Verdünnungen der Standards wurden in einer 96-er Well-Spitzboden-Platte angesetzt.

- 8x 100 µl/Well *Assay Diluent* [BD Cat. No. 51-9003992] wurden vorgelegt
- Top Standard Well: Je 50 µl der 4-fach konzentrierten Standards (200 µl) zusammenpipettieren.
Zum Beispiel wurden die 4 Zytokine IL-4, IL-13, IL-17A und IFN-γ zusammen analysiert, so musste je 50 µl von den 4-fach konzentrierten Analyten im Top Standard-Well zusammenpipettiert werden, ansonsten muss das Volumen des Top Standards mit *Assay Diluent* auf 200 µl aufgefüllt werden.
- Aus dem Top Standard wurde eine Verdünnungsreihe durch eine 1:1 Verdünnung der vorgelegten 100 µl *Assay Diluent* mit 100 µl aus dem vorherigen Well angesetzt (Abb. 13).

Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	0
200 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	200 µl
	Assay Diluent								
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	100 µl								
	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	



Abb. 5.13: Pipettierschema der Verdünnungsreihe für die Standards

- II. Ansetzen der *Capture Beads* und der Standard-Reihe bzw. Proben
 - 15 µl *Capture Beads* wurden mit 15 µl Standard-Reihe bzw. 15 µl Probe und je 0,2 µl Antikörper zusammenpipettiert.
 - Der Ansatz wurde für 1 Stunde im Dunkeln und bei RT inkubiert.
- III. Zugabe der *Detection Beads*
 - Je 15 µl *Detection Beads* wurden zu jedem Well gegeben.
 - Der Ansatz wurde für eine weitere Stunde im Dunkeln und bei RT inkubiert.
- IV. Waschschrift
 - 150 µl FCS-PBS wurden zu den Proben gegeben und anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert.
 - Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µl FCS-PBS resuspendiert.
- V. Analyse am Durchflusszytometer: Durch die Messung der Standard-Reihe wurde eine Titrationskurve erstellt, mit Hilfe derer die

nachfolgend gemessenen Proben-Ergebnisse abgelesen und verglichen werden konnten.

Für diese Arbeit wurden 7 Analyten untersucht, wobei die Analyten, die in einem Ansatz zusammen gemessen werden konnten, in der folgenden Tabelle (Tab. 17) als Gruppe zitiert werden.

Tabelle 5.17: Analyt/Zytokin-Liste für die CBA-Analyse

Analyt/Zytokin	Katalognummer
IL-4	Cat. No. 558298, BD
IL-13	Cat. No. 558349, BD
IL-17A	Cat. No. 560283, BD
IFN- γ	Cat. No. 558296, BD
IL-2	Cat. No. 558297, BD
IL-10	Cat. No. 558300, BD
TNF	Cat. No. 558299, BD

5.9 Histologie

5.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Es wurden Kryoschnitte (10 μm) verschiedener Gewebe (Tumor, Haut, Magendarmtrakt) angefertigt, die anschließend mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt wurden.

Während der natürliche Farbstoff Hämatoxylin (Hämalaun) alle sauren und basophilen Strukturen im Zellkern färbt, kontrastiert der synthetische, saure Farbstoff Eosin alle acidophilen und basischen Organellen (z.B. Mitochondrien) im Zytoplasma.

Tabelle 5.18: Protokoll zur HE-Färbung nach Mayer

Schritt & Reagenzien	Inkubationszeit
1. Xylol	2x 5 Min. in versch. Xylol
2. absteigende Alkoholreihe [100%, 96%, 70%]	2 Min.
3. Aqua dest.	2 Min.
4. Kernfärbung mit Hämatoxylin	5-10 Min.
5. Leitungswasser (fließend wässern)	5 Min.
6. Aqua dest.	Kurz
7. Eosin	3-10 Min.
8. Aqua dest.	Kurz
9. Differenzierung Ethanol [70% kurz, je 2 Min. in 96%, 100%, 100%]	Je 2 Min.
10. Xylol	2 Min.
11. Eindeckeln	

Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop analysiert bzw. dokumentiert und bei -20°C gelagert.

5.9.2 Immunhistochemische Analyse

Um die Infiltration bestimmter Immunzellen bzw. des C1498-GFP-UTY-Tumors ins Gewebe, z. B. Lunge, Magendarmtrakt oder Tumorgewebe, zu analysieren, wurden Kryoschnitte (10 µm) des Gewebes angefertigt, mit, mit Farbstoff gekoppeltem, Antikörper gefärbt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop gezählt und ausgewertet. Da der Tumor C1498-GFP-UTY das Reporter-Gen GFP in sich trägt, ist der grüne Kanal bereits belegt. So wurden alle weiteren Antikörper mit dem Fluorochrom AlexaFluor594 gekoppelt, das in den roten Kanal emittiert. Um die einzelne Zelle als solche zu definieren, wurde der Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt.

Lösungspuffer für Tyramid

H ₂ O ₂	3%
Imidazol	100mM in PBS

Tabelle 5.19: Die Absorptions- und Emissions-Wellenlänge der eingesetzten Fluorochrome

Fluorochrom	Absorption	Emission
DAPI	355 nm	460 nm
GFP	490 nm	510 nm
AlexaFluor594	590 nm	620 nm

Die Schritte der immunhistochemischen Färbungen sahen wie folgt aus:

Tabelle 5.20: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung

Schritt	Reagenzien/ Konzentration	Inkubationszeit
1. Waschen	PBS	3x
2. Methanol-Behandlung	3% H ₂ O ₂ /Methanol (v/v)	10 Min. bei RT
3. Waschen	H ₂ O/PBS	3x
4. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blockierungslösung	15 Min. bei RT
5. 1. Antikörper (AK) CD3, CD8	1:250 in Blockierungslösung	über Nacht bei 4°C
6. Waschen	PBS	3x
7. 2. Antikörper (AK) BGoaHa	1:100 in Blockierungslösung	45 Min. bei RT
8. Waschen	PBS	3x
9. Streptavidin-HRP	1:100 in Blockierungslösung	45 Min. bei RT
10. Waschen	PBS	3x
11. Biotinyl-Tyramid	1:100 in Lösungspuffer	15 Min. bei RT
12. Waschen	H ₂ O/PBS	3x
13. AlexaFluor594®	1:100 in Blockierungslösung	45 Min. bei RT
14. Eindeckeln	DAPI	

Die gefärbten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert bzw. dokumentiert und bei -20°C gelagert.

5.10 Tierexperimentelle Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden, gem. § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A037 genehmigt.

Die Tiere stammen von der Firma Charles River oder aus eigener Zucht in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät Münster (ZTE).

Alle Versuchsmäuse wurden in einem Systemgestell gehalten, das jedem einzelnen Haltungskäfig gefilterte Sauerstoffzufuhr erlaubt, um eine keimarme Haltung der

Tiere zu sichern. Außerdem wurde die Raumbeleuchtung in einem Zwölfstundenintervall geregelt, um die Tag- und Nachtphasen zu simulieren. Futter und filtriertes Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

5.10.1 Murines Transplantationsmodell

Das „Parent-into-F1-Generation“-Transplantationsmodell erlaubt uns, durch die Wahl des Genotyps der Tumorzelllinie, die GvHD- und GvT-Reaktionen separat zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien (BI6xmyc und C1498) stammen aus C57BL/6-Mäusen [H-2K^b]. Um die „Parent-into-F1-Generation“-Konstellation zu imitieren wurden somit C57BL/6N-Mäuse als Spender und [BALB/c x C57BL/6N]F1 [H-2K^{bxd}] als Knochenmarkzellen-Empfänger ausgewählt.

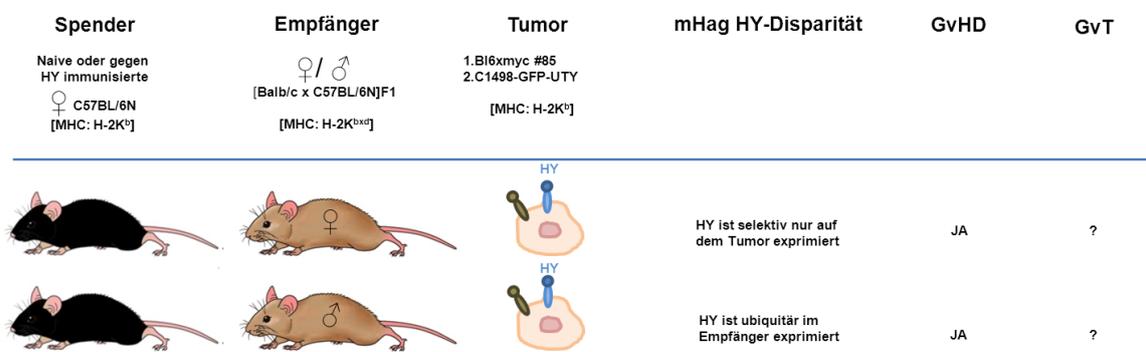


Abb. 5.14: Skizze des „Parent-into-F1-Generation“-Transplantationsmodells für das minor Histokompatibilitätsantigen HY.

5.10.2 Narkotisieren der Mäuse

Den Versuchsmäusen wurde am Tag der Tumorgabe intraperitoneal eine Anästhetika-Mischung (10% Ketamin und 2% Xylazin in 0,9%-igem NaCL) verabreicht, wobei die Endkonzentration des Anästhetikums 10mg/ml für Ketamin und 1 mg/ml für Xylazin betragen sollte.

Anästhetika-Mischung

Ketamin (10%) 100 µl

Xylazin (2%) 50 µl

Mit 0,9% igem NaCL auf 1 ml auffüllen

Jede Maus bekam 10 µl der Anästhetika-Mischung pro g-Gewicht und befand sich somit für ca. 1 Stunde im Tiefschlaf. Um eine Austrocknung der Augäpfel wegen des

nun fehlenden Lidschlussreflexes der Tiere zu vermeiden, wurden diese mit Bepanthen-Augencreme geschützt.

5.10.3 Stammzellgewinnung

Die als Knochenmark- und Lymphozytenspender dienenden Mäuse wurden vor der Entnahme der Organe mit CO₂ getötet, mit 70%-igem Alkohol desinfiziert und unter sterilen Bedingungen präpariert.

5.10.4 Isolierung von Splenozyten (Milzzellen)

Die Splenektomie oder Milzentnahme erfolgte nach Tiefschlafphase und anschließender Tötung der Spendertiere durch CO₂. Die Splenozyten wurden aus den Milzen der jeweiligen Spendertiere isoliert, indem die Milzen durch den Stempel einer sterilen Spritze (10 ml), auf ein Nylon-Sieb mit 100 µm Porengröße gedrückt und homogenisiert wurden. Die Zellen wurden, in einem mit gekühltem PBS gefüllten 50 ml-Falcon-Tube, aufgefangen und für 7 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Um die Erythrozyten durch Hämatolyse zu entfernen, wurden pro Milz 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (Qiagen) zugegeben und für 7 Minuten bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand verworfen.



Abb. 5.15: Behandlung der isolierten Milzzellen mit dem Erythrozyten-Puffer [Buffer EL, Cat. No. 79217]

Die so gewonnene Zellsuspension ist erythrozytenfrei und enthält unterschiedliche Lymphozyten-Populationen wie zum Beispiel T-, B-, NK-, Dendritische Zellen und Epithelzellen. Die Zellen wurden je nach weiterführender Untersuchung und Fragestellung behandelt:

Für eine Stammzelltransplantation wurden die Milzzellen auf eine Zellzahl von 1×10^7 pro Tier in HBSS eingestellt, mit Knochenmarkzellen vermischt und den Empfängern per intravenöser Gabe verabreicht, um eine GvHD-Reaktion hervorzurufen.

Für weitere Analysen und bei Gebrauch nur bestimmter Populationen, wurde eine Depletion der Milzzellsuspension durchgeführt. Die Depletion wurde je nach Fragestellung entweder durch Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und anschließender Sortierung mit Hilfe eines Durchflusszytometers oder durch Färbung mit metallgekoppelten Antikörpern und anschließender Trennung in MACS-Säulen, durchgeführt.

5.10.5 Gewinnung von Knochenmarkzellen

Für die Knochenmarkgewinnung wurden die Hinterläufe von Haut und Muskelgewebe befreit. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer sterilen Spritze und einer 23G-Kanüle aus Oberschenkel- (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) herausgespült. Das Knochenmark aller Spender wurde in gekühltem PBS gesammelt, für 7 Minuten bei 300 g zentrifugiert und im gewünschten Volumen auf eine Zellzahl von 2×10^7 Zellen pro Empfängertier in „1x *Hank's Balanced Salt Solution*“ (HBSS)-Medium eingestellt.

Die Knochenmarkzellen wurden entsprechend mit den Milzzellen (1×10^7 pro Empfängertier) gemischt. Anschließend wurde das Transplantat sorgfältig filtriert, um eine Koagulation der Zellen zu vermeiden und den konditionierten Empfängertieren per intravenöser Gabe verabreicht.

Die Kontrollgruppe, die keine GvHD-Reaktion entwickeln sollte, bekam nur Knochenmark ohne Milzzellen.

5.10.6 Separation von Zellpopulationen

Alle Schritte der Zellseparation mittels *Magnetic Cell Sorting* (MACS) wurden auf Eis und mit gekühltem Puffer durchgeführt.

MACS-Puffer

0,5 % Bovine Serum Albumin (BSA)	2,5 ml
2 mM EDTA	
PBS (pH 7,2)	auf 500 ml auffüllen

Die Milzzellen wurden, wie oben im Abschnitt iv. „Isolierung von Splenozyten“ beschrieben, gewonnen und anschließend mit dem „*Pan T Cell Isolation Kit II*“ der Firma Miltenyi Biotec behandelt, um die $CD3^+$ -T-Zellpopulation zu isolieren.

➤ *Magnetic labeling*

Das „*Pan T Cell Isolation Kit II*“ enthält eine Mischung aus biotinylierten, monoklonalen Antikörpern gegen CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b, (DX5), CD105, Anti-MHC Klasse II und Ter-119. Die *MicroBeads* sind mit Anti-Biotin-Antikörper konjugiert.

Je 1×10^7 Milzzellen wurden in 40 μ l MACS-Puffer aufgenommen.

Tabelle 5.21: *Magnetic labeling* mit dem „*Pan T Cell Isolation Kit II*“

Schritt	Volumen pro 1×10^7 Milzzellen	Inkubationszeit
1. Biotin-Antibody Cocktail	10 μ l	10 Min. bei 2-8°C
2. MACS-Puffer	30 μ l	
3. Anti-Biotin <i>MicroBeads</i>	20 μ l	15 Min. bei 2-8°C

Um die Zellen zu waschen, wurden 2 ml MACS-Puffer dazugegeben und für 10 Minuten bei 300 g und 8°C zentrifugiert.

➤ *Magnetic separation*

Alle unerwünschten und zu depletierenden Zellen sind nach dem *Magnetic Labeling* mit den *MicroBeads* markiert und können leicht von der gewünschten, unmarkierten CD3⁺-Population getrennt werden.

Die gelabelten und ungelabelten Zellpopulationen wurden mit Hilfe einer *LD MACS Separation Column* [Cat. No. 130-042-901] oder eines autoMACS Pro Separators der Firma Miltenyi Biotec nach dem Hersteller-Protokoll getrennt.

Die CD3⁺-T-Zellen wurden als Effektorzellen für die ELISpot-, *Cytometric Bead Array*-Analysen oder als RNA-Quelle für die *Spectratyping*-Analyse verwendet.

5.10.7 Immunisierung der Spendertiere

Um die spezifischen T-Zellen gegen das Antigen HY in den weiblichen Spendertiere zu generieren, wurden sie mit bestrahlten, männlichen Milzzellen aus C57BL/6N [H-2k^b] vakziniert. Die Immunisierung fand 2 Mal innerhalb von 4 Wochen mit 1×10^7 bestrahlten, männlichen Milzzellen statt. Die männlichen Milzzellen wurden laut Protokoll (Abschnitt iv. „Isolierung von Splenozyten“) gewonnen, in sterilem PBS-Puffer aufgenommen und wie die Targetzellen mit 30 Gy (¹³⁷Cs) bestrahlt. Die Immunisierung der Tiere erfolgte intraperitoneal. Die Spendertiere der Kontrollgruppe

wurden mit 1×10^7 bestrahlten, weiblichen Milzzellen aus C57BL/6N [H-2k^b] oder PBS-Puffer immunisiert.

5.10.8 Konditionierung/Bestrahlung der Empfängertiere

Als Empfänger diente die F1-Generation CB6F1 [H-2k^{bxd}] aus der Kreuzung von weiblichen BALB/c- und männlichen C57BL/6N- Mäusen. Sie wurden 24 Stunden vor der Stammzelltransplantation mit 9 Gy (X-Ray) bestrahlt, um die vorhandenen Immunzellen zu zerstören und so ein Anwachsen des neuen Transplantats zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden die Tumorzellen durch die Bestrahlung unter Kontrolle gehalten.

Nach der Bestrahlung bekamen die vorerst immunsupprimierten Tiere das Antibiotikum Cotrim-ratiopharm® [PZN: 3928197] mit dem Wirkstoff Cotrimoxazol (Sulfamethoxazol 400 mg und Trimethoprim 80 mg) in ihr Trinkwasser, um eine bakterielle Infektion zu vermeiden.

5.10.9 Stammzelltransplantation

24 Stunden nach der Ganzkörperbestrahlung (TBI, *engl. Total Body Irradiation*) wurden die Stammzellen intravenös verabreicht. Die Knochenmark- und Milzzellen wurden, wie oben beschrieben, isoliert, präpariert und auf die gewünschte Zellzahl in 1x HBSS-Medium eingestellt:

- 2×10^7 Knochenmark- und 1×10^7 Milzzellen wurden pro Tier transplantiert.

Die Kontrollgruppen erhielten hingegen ein Transplantat nur aus Knochenmarkzellen im gleichen Volumen.

5.10.10 Tumorapplikation

Die Tumorzellen wurden an Tag 1 nach der Stammzelltransplantation verabreicht. Vor jeder Tumorzellapplikation wurden die Tumorzellen auf ihre Reinheit (GFP-positive C1498-UTY-Zellen) und Vitalität verifiziert.

1×10^5 vitale Tumorzellen wurden pro Empfängertier unter Narkose subkutan in die hintere, rasierte Flanke appliziert.

5.10.11 GvHD-Monitoring

Die Versuchstiere wurden dreimal wöchentlich auf ihren Zustand hin kontrolliert und gewogen. Parallel dazu wurde das Tumorwachstum verfolgt.

Die Schwere der GvHD, GvHD-Grad genannt, wurde nach Cooke (Cooke et al., 1996) aus 5 Parametern, wie Gewichtsabnahme, Körperhaltung des Tieres, Vitalität, Fellbeschaffenheit und Hautzustand, bestimmt (Tab. 22).

Tabelle 5.22: GvHD-Score nach Cooke

Parameter	Grad 0	Grad 1	Grad 2
Gewichtsabnahme	<10 %	>10 %- <25 %	>25 %-<30 %, ab >30 % Grad 3
Haltung	Normal	Buckelbildung	stark ausgeprägter Buckel
Vitalität	normal aktiv	weniger aktiv	Aktivität nur nach Berührung
Fellbeschaffenheit	glänzend	rau	rau, schlechter Pflegezustand
Hautintegrität	schuppenfrei	Hautschuppen	Fellverlust

5.10.12 Tumorkinetik

Die Bestimmung der Tumorkinetik erfolgte, parallel zum GvHD-Monitoring, dreimal wöchentlich durch Messung der Länge und Breite des Tumors mittels Schieblehre. Das Tumolvolumen wurde anhand der Messdaten mit der Formel

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{\Delta_{\min} \cdot \Delta_{\max}^2}{6}$$

berechnet. Wobei Δ_{\min} der kleinste gemessene Durchmesser in [mm] und Δ_{\max} der größte gemessene Durchmesser in [mm] sind.

5.10.13 Fluorescence reflectance imaging (FRI)

Die transplantierten Versuchstiere wurden ab dem Tag der Tumorgabe, dreimal wöchentlich mit der Oberflächengewichteten Reflexionsbildgebungsmethode (FRI, engl. *Fluorescence reflectance imaging*) untersucht. Die Methode ist ein nicht invasives, optisches Bildgebungsverfahren *in vivo*, das auf der Detektion von Lichtquanten beruht. Sie ermöglicht eine hochauflösende, zweidimensionale optische Darstellung eines Objekts z.B. eines Kleintieres. Die Reflektionsbildgebung des gesamten Versuchstieres erfolgte im Weißlichtbild, bei einer Akquisitionszeit von 3 Sekunden. Für die *in vivo*-Fluoreszenz-Analyse erfolgte die Akquisition im GFP-Kanal (Ex = 470 nm, Em = 535 nm), bei einer Akquisitionszeit von 5 Sekunden und FOV 110 mm. Die Messungen wurden durch die Arbeitsgruppe Molekulare Bildgebung, Institut für klinische Radiologie TRIC/IZKF Core Unit, mit dem FX Pro (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt.

Die erhaltenen Bilder und Daten wurden mit der *Bruker Molecular Imaging Software* bearbeitet bzw. ausgewertet.

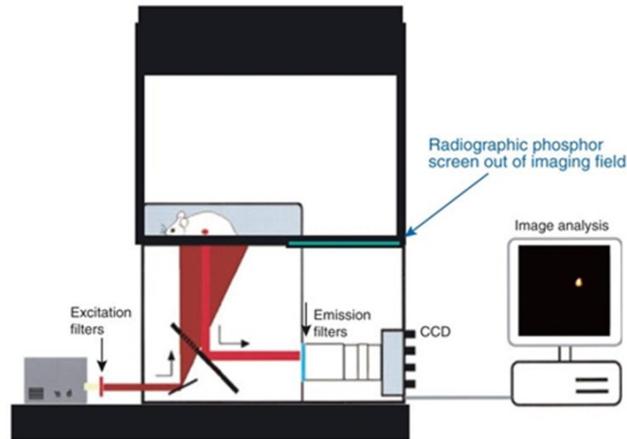
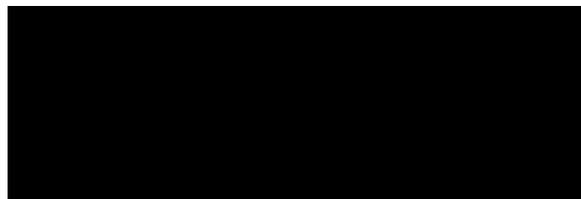


Abb. 5.16: Schematische Darstellung der Imaging-Station zur Fluoreszenz-Reflektionsbildgebung (FRI) (Bruker GmbH, Ettlingen, Deutschland)

5.11 Statistisches Auswertungsverfahren

5.11.1 Bestimmung der Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SEM)

Die Standardabweichung SD (*Standard Deviation*, σ), die ein Maß für die tatsächliche Streuung aller erhobenen Werte vom Gruppenmittelwert \bar{x} beschreibt, wurde mit der unten aufgeführten Formel (Koschack, 2008) berechnet:



Wobei x die erhobenen oder einzelnen Messwerte und n die Anzahl der Werte oder den Stichprobenumfang angibt.

Der Standardfehler SEM (*Standard Error of Mean*) gibt die theoretische Streuung des Stichprobenmittelwerts an. Dieser wird als Quotient der Standardabweichung durch die Wurzel des Stichprobenumfangs n berechnet:



5.11.2 Bestimmung der Signifikanz

Es wird von einem signifikanten Unterschied der verschiedenen Gruppen gesprochen, wenn die Messdaten mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit und nicht durch Zufall zustande kommen. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeiten, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass das gewonnene Ergebnis zufällig zustande gekommen ist, kleiner als 5% ($p \leq 0,05$) ist, wird von einem statistisch signifikanten Ergebnis gesprochen.

Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bzw., bei Normalverteilung der Daten, mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests bestimmt.

Die statistischen Analysen wurden mit dem GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt.

6 Anhang

6.1 UTY-Gensequenz

Uty: *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome [Mus musculus]*, Gene ID: 22290, Accession BC140403, MGI: 894810

```
TCCATGAAATCTTACGGATTATCTCTCACTACTGCTGCCCTAGGTAATGAGGAAAAGAAAATGGCGGGCGGAAAAGGCTAGA
GGCGAGGGCGAAGAGGGGTCTTCAGTCTCACAGTCGAAGAGAAGAAGGCGCTTTGTGGATTAGATAGCAGCTTCTTCGG
GTTCTTGACCCGATGCAAAGATGGCGCCAAGATGAAGACGCTGTTGAACAAGGCAATTCACCTTCTATGAGTCTTTAATAGTA
AAAGCTGAAGGAAAAGTGAATCAGATTTCTTTTGTCAATTAGTCACTTCAATCTCTTACTGGAAGATTATCAAAGCATT
GTCATCTTACCAGAGATACTACAGTTTACAGACTGACTACTGGAAGAATGCTGCCTTTTATATGGTCTTGGTTTGGTCTATT
TCTACTACAATGCAATTCAGTGGGCAATTAGAGCTTTTTCAGGAAGTCTTTTATGTTGACCCTAATTTTTGCAGAGCCAAAGAA
ATCCATTTACGACTTGGTTTATGTTCAAAAATGAATACAGATTATGAATCTAGTTTAAAGCATTTTCAGCTGGCCCTGATCGA
CTGTAATGTCTGTACTTTGTCCAGTGTGCAAAATTCAGTTTCAATTTGCTCACTTATATGAAACCCAGAGGAAATACCATTCTG
CAAAGGCAGCCTATGAACAACTTTTACAGATTGAAAGCTTGCCATCACAAGTCAAAGCAACTGTATTGCAACAGTTAGGTTG
GATGCACCATAATATGGATCAATTTGGAGACAATACCACCAAGAGAGATATGCTATTCAGTATCTCCAAAAGTCATTGGAG
GAAGATCCTAATTCCTGGTCAATCTTGGTATTTCTTGGAAAGGTGTTACTCATGTATTGGGAAGGTTTCAGGATGCCCTTGTAT
CTTACAGGCAATCCATTGATAAATCAGAAGCAAGTGCAGACACATGGTGTTCATAGGTGTGCTGTATCAACAGCAAAATCA
ACCTATGGATGCCTTGCAAGCCTATATATGTGCTGTACAGTTGGATCATGGACATGCAGCAGCCTGGATGGACTTAGGTAT
TCTTTATGAATCTTGCAACCAACCCAGGATGCCATTAATGCTACTTAAATGCAGCTCGGAGCAAATCTTGTAAATAACACC
TCTGCACCTTACATCAAGAATTAAGTTTTTACAGGCTCAGTTGTGTAACCTTCCACAAAAGTAGTCTACAGAATAAAACTAAAT
ACTTCTAGTATTGAGGAGGCATGGAGCCTACCAATACCCGACAGCTTACCTCCAGGCAGGGTGCATGAACACAGCAC
AGCAGAGTGTCTGATACCTGGAATAGTGTCCAGACAGCTTACATCATTACAGTACAGCAGAAAAGTTTATACAGAGTGCTT
CACAGCACAGAAATTACAGAGTTTTGGTAAAGTCAACAACCTCCATTTCAAACCTGGGTCCACACGATATCTCCAAGCAGCT
AGCACTAATGATCAGAATCAGAATGGAAATCACTCTGCCTCAGAATTCAAAAGGGGATGCTCAAAAATCACTTCTTACGTA
TTCCTACCTCAGAAGAACAAGATCATTAACCTTTACCAAAGAGAGCAAGGATTCAGAAGTAAATCCTTGACTTCTAAAAACA
AGTAGGAAAGATAGAGACACATCTAATATCTGTGTTAATGCAAAGAAGCATTCTAATCATATTTATCAGATCTCATCAGTTCC
GATTTCCAGCCTTAATAATAAAGAATCTGTGTACCAGATTTAATAATTGTAGACAATCCTCAGCTTTCTGTCTTAGTTGGAG
AACTATCGACAATGTGGACCATGACATTTGGAACCTTTGTGACAAAAGTCAATAATGTTTCTAGCCATTACAAAAAGCCTGA
TAATCTTTCTGCTTCTTCCACCCTTTCAGCCTTTCCAGCAAGAAACACTTTCTCTAAAAGCTCAGTAAACAGACACACATTGTA
CCAGCTTTATCAGTCTCACAGTGGATTACACACAATTAATGGAGAAGGGCATGAGAACCTTAGAGAGTTCTGCCAGTGTAA
TGTTGGCCCTCAGACCTAGATCTCAAATCATACCATCAATGTCTGTGTCATATACTCCAGTTCAACAGAAAGTTCTGAAAGCG
TGCAGGAGTCTAGGTAATAATGGTTTGTCTAATGGTCAATTTCTTGGATATATGCCACCTCCAAGACCACCAACTTCGC
CATATCCTCCTTTACCAAAGGAGAAGTTGAATCCACCCACTCCTAGTATTTATTTGGAAAATAAGCGAGATGCCTTTTTCTCCT
CCATTACATCAATTTGCATCAATCCAAAAAACCTGTTACAGTAATTCGCGGTCTTGTGGAGCTCTTAAGTTAGATCTTGG
ACTTTTCTCTACAAAAACTTTGGTAGAGGCTAACAATGAACATATCGTAGAAGTGAGGACCCAATTGTTACAGCCAGCAGAT
GAAAACCTGGGATCCCTCTGGAACAAAGAAAATCTGGCGATATGAAAATAAAAGTTCTCATACTACAATTGCTAAATATGCAC
AGTACCAGGCCTGCTCCTTCCAGGAATCATTGAGAGAAGAAAATGAAAGAAGAACAAGTTAAAGACTATTCAGATAATGA
ATCAACATGTTAGATAATTCTGGAAGGAGACAGAAAGCACCCCTTTAAAACCATAAAATGTGGGATTAACATTGATCTGTCT
GATAACAAAAAGTGAAGTTGCAGTTACATGAGCTGACAAAAGCTTCCCTGCTTTTGTACGTGTTGTATCAGCAGGGAATCTTC
TCAGTCAATGTTGGCTATACTATATTGGGGATGAATTCAGTTCAACTATGTATGAAAGTTCCAGGGAGTAGAATACCAGGTCA
CCAAGAAAATAACAATTTCTGTTCTGTTAACAATAAATATTGGTCCAGGTGATTGTGAATGGTTTGTGTACCTGAAGATTAT
GGGGTGTCTGAATGACTTCTGTGAAAAAATAATTTGAATTTCTGATGAGTTCTTGGTGGCCGAACCTTGAAGATCTTTAT
GAAGCAAATGTTCTGTTTATAGGTTTATTCAACGACCTGGTGAATTTGGTTTGGATAAATGCAGGCACTGTTCACTGGGTTT
AGGCTATTGGGTGGTGAACAACATCACCTGGAATGTTGGTCCACTCACAGCCTTCCAATATAAATGGCAGTTGAACGATA
TGAATGGAATAAATGCAAAGTGTCAAGTCAAGTACCCATGGTTTCACTTTTCAATGGAATATGGCACGAAATATCAAAGTC
TCAGATCCAAAAGCTTTTTGAAAATGATTAATAATTGTCTCCTCAAGATTCTAAAGCATTGTGAGACTTTGAGAGAAGCTTTGT
TGCAGCAGGGAAGAGGTTTTGTGGCATGGGAGGATAAATGATGAACCAGCTCCTTACTGTAGCATCTGTGAGGTGGAAG
TTTTTAATTTACTTTTTGTCACTAATGAAAGCAATTCCTCAAAAGACATATATAGTACATTGTGCAAGACTGTGCACGAAAAACAA
GTGGAATTTGGAAAATTTGTAGTGCTAGAACAATACAAAATGGAGGACCTGATTCAAGTCTATGACCAATTTACATTAGCT
CCTTCGTTATCTTCTGCATCTTAA
```

6.2 Abkürzungsverzeichnis

APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
AU	Einheit „ <i>arbitrary units</i> “, Signalintensität
BSA	engl. <i>Bovine serum albumin</i> (Fraktion V)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Nomenklatur der immunphänotypischen Oberflächenmarker
CDR	engl. <i>complementary determining region</i> , Komplementarität bestimmende Region; hypervariable Region von Immunglobulinen (Ig)
CTL	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> , zytotoxischer T-Lymphozyt
Da	Molekulargewichtseinheit „Dalton“
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	engl. <i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
GvHD	engl. <i>Graft-versus-host disease</i> , Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion
GvH	engl. <i>Graft-versus-host</i> , Transplantat-gegen-Wirt
GvT	engl. <i>Graft-versus-leukemia</i> , Transplantat-gegen-Tumor
Gy	Einheit „Gray“, [1 Gy = 1 J/kg = 100 rd]
HBSS	engl. <i>Hank's Buffered Salt Solution</i> , gepufferte Salzlösung
H-2	muriner Haupt-Histokompatibilitätskomplex
HLA	engl. <i>Human-leucocyte-antigen</i> , Humanes Leukozyten Antigen
HSCT	engl. <i>haematopoietic stem cell transplantation</i> , hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	engl. <i>Lipopolysaccharide</i>
M	Molarität [mol/l]
MACS	engl. <i>Magnetic Labelled Bead Cell Separation</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	engl. <i>Major-Histocompatibility-complex</i> , Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MLTC	engl. <i>Mixed-lymphocyte-tumorcell-culture</i> , gemischte-Lymphozyten-Tumorzellkultur
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered-saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
TAA	engl. <i>Tumor associated antigen</i> , Tumor-assoziiertes Antigen
TBI	engl. <i>total body irradiation</i> , Ganzkörperbestrahlung
TCR	engl. <i>T-cell-receptor</i> , T-Zell Rezeptor
T _H	engl. T helper cell, T-Helfer-Zelle
TNF	engl. <i>Tumor necrose factor</i> , Tumor-Nekrose-Faktor
TSA	engl. <i>Tumor specific antigen</i> , Tumor-spezifisches Antigen

6.3 Literaturverzeichnis

© 1970 Nature Publishing Group. (1970).

Alt, F. W., Oltz, E. M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., & Chen, J. (1992). VDJ recombination, *13*(8), 1469–1474.

Alyea, E. P. (2008). Modulating graft-versus-host disease to enhance the graft-versus-leukemia effect. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, *21*(2), 239–50. doi:10.1016/j.beha.2008.02.012

Appelbaum, F. R. (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, *411*, 385–389. doi:10.1038/35077251

Appelbaum, F. R. (2003). The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annual Review of Medicine*, *54*, 491–512. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152456

Bain, B., Vas, M. R., & Lowenstein, L. (1964). the Development of Large Immature Mononuclear Cells in Mixed Leukocyte Cultures. *Blood*, *23*, 108–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14107045>

Barnes, D. J., & Melo, J. V. (2002). Cytogenetic and Molecular Genetic Aspects of Chronic Myeloid Leukaemia. *Acta Haematologica*, *108*(4), 180–202. doi:10.1159/000065655

Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The Mechanism and Regulation of Chromosomal V (D) J Recombination, *109*(D), 45–55.

Berger, R., & Bernheim, A. (1979). Y chromosome loss in leukemias. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *1*(1), 1–8. doi:10.1016/0165-4608(79)90003-7

Bernard, P., & Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, *226*(3), 735–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324324>

Bian, G., Ding, X., Leigh, N. D., Tang, Y., Capitano, M. L., Qiu, J., ... Cao, X. (2013). Granzyme B-mediated damage of CD8+ T cells impairs graft-versus-tumor effect. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(3), 1341–50. doi:10.4049/jimmunol.1201554

Billingham, R. E., Brent, L., & Medawar, P. B. (2010). “Actively acquired tolerance” of foreign cells. 1953. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(1), 5–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028658>

Biosciences, B. D. (n.d.). BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit, *562246*(562246).

- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology*, *15*, 749–95. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749
- Boehmer, H. Von. (1994). Positive Selection of Lymphocytes *Review*, *76*, 219–228.
- Brichard, B. V., Pel, A. Van, Wifel, T., Wifel, C., Plaen, E. De, Leth, B., ... Mainz, I. (1993). *I. Medizinische Klinik tier Johannes Gutenberg-Universi~t; and *Abteihng Far Hiimatologie, IIL Medizinische Klinih, Johannes Gutenberg-Universi~t, I)-6500 Mainz, Germany, *178*(August).
- Brochu, S., Rioux-Massé, B., Roy, J., Roy, D. C., & Perreault, C. (1999). Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood*, *94*(2), 390–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397705>
- Brunet, S., Urbano-Ispizua, a, Ojeda, E., Ruiz, D., Moraleda, J. M., Díaz, M. a, ... Rozman, C. (2001). Favourable effect of the combination of acute and chronic graft-versus-host disease on the outcome of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for advanced haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, *114*(3), 544–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11552978>
- Bundes, G. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010 9*.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, *13*, 1–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4921480>
- Capitini, C. M., Nasholm, N. M., Duncan, B. B., Guimond, M., & Fry, T. J. (2013). Graft-versus-host disease impairs vaccine responses through decreased CD4+ and CD8+ T cell proliferation and increased perforin-mediated CD8+ T cell apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(3), 1351–9. doi:10.4049/jimmunol.1200391
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–9. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Ciupe, S. M., Devlin, B. H., Markert, M. L., & Kepler, T. B. (2013). Quantification of total T-cell receptor diversity by flow cytometry and spectratyping.
- Cohen, S. B., Wang, X. N., & Dickinson, a. (2000). Can cord blood cells support the cytokine storm in GvHD? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *11*(3), 185–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817962>
- Collins, H., Juliano, L., & Dupont, B. (1986). Bone of Graft-v-Host, *68*(3), 770–773.
- Cooke, K. R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Crawford, J. M., & Ferrara, J. L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and

- endotoxin. *Blood*, 88(8), 3230–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8963063>
- Currier, J. R., & Robinson, M. a. (2001). Spectratype/immunoscope analysis of the expressed TCR repertoire. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 10, Unit 10.28. doi:10.1002/0471142735.im1028s38
- Dagleish, A., & Pandha, H. (2007). Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines. *Advances in Cancer Research*, 96, 175–90. doi:10.1016/S0065-230X(06)96009-6
- Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334(6181), 395–402. doi:10.1038/334395a0
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., & Chien, Y. (1998). LIGAND RECOGNITION BY $\alpha\beta$ T CELL RECEPTORS.
- De La Vega, J., Braak, B. Ter, Azzoni, A. R., Monteiro, G. a, & Prazeres, D. M. F. (2013). Impact of plasmid quality on lipoplex-mediated transfection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 3932–41. doi:10.1002/jps.23709
- Dexter, T. M., & Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annual Review of Cell Biology*, 3, 423–41. doi:10.1146/annurev.cb.03.110187.002231
- Duncan, C., & Roddie, H. (2008). Dendritic cell vaccines in acute leukaemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 21(3), 521–41. doi:10.1016/j.beha.2008.07.010
- Eichwald, E. J., & Silmsler, C. R. (1955). Skin. *Transplantation Bulletin*, 2, 148–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12334405>
- EICHWALD, E. J., SILMSER, C. R., & WEISSMAN, I. (1958). Sex-linked rejection of normal and neoplastic tissue. I. Distribution and specificity. *Journal of the National Cancer Institute*, 20(3), 563–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13539607>
- Faber, L. M., van der Hoeven, J., Goulmy, E., Hooftman-den Otter, A. L., van Luxemburg-Heijs, S. A., Willemze, R., & Falkenburg, J. H. (1995). Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA-identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(2), 877–83. doi:10.1172/JCI118134
- Fanning, S. L., Zilberberg, J., Stein, J., Vazzana, K., Berger, S. a, Korngold, R., & Friedman, T. M. (2013). Unraveling graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia responses using TCR V β spectratype analysis in a murine bone marrow transplantation model. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(1), 447–57. doi:10.4049/jimmunol.1201641
- Ferrara, J. L. (1993). Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Current Opinion in Immunology*, 5(5), 794–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8240742>

- Ferrara, J. L. M. (2000). Cytokines and Cellular Effectors PHASE ONE : HOST TISSUE DAMAGE, 306, 299–306.
- Ferrara, J. L. M., Cooke, K. R., & Teshima, T. (2003). The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *International Journal of Hematology*, 78(3), 181–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604275>
- Ferrara, J. L. M., & Reddy, P. (2006). Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Seminars in Hematology*, 43(1), 3–10. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.09.001
- Fontaine, P., Roy-Proulx, G., Knafo, L., Baron, C., Roy, D. C., & Perreault, C. (2001). Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nature Medicine*, 7(7), 789–94. doi:10.1038/89907
- Forsberg, L. a, Rasi, C., Malmqvist, N., Davies, H., Pasupulati, S., Pakalapati, G., ... Dumanski, J. P. (2014). Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. *Nature Genetics*, (April). doi:10.1038/ng.2966
- Fowler, D. H. (2006). Shared biology of GVHD and GVT effects: potential methods of separation. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 57(3), 225–44. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.07.001
- Galo-Hooker, E. G., Ruiz-Delgado, G. J., Zamora-Ortiz, G., Velazquez-Sanchez-de-Cima, S., & Ruiz-Arguelles, G. J. (2013). In pursuit of the graft-versus-myeloma effect: a single institution experience. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 18(2), 89–92. doi:10.1179/1607845412Y.0000000041
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., ... Wilson, I. A. (1996). An o4 T Cell Receptor Structure at 2 . 5 A and Its Orientation in the TCR-MHC Complex, 274(October), 209–219.
- Gasperi, C., Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Matyszak, M. K., Scirpi, M. T., ... Ricciardi-Gastagnoli, P. (1999). Retroviral gene transfer, rapid selection, and maintenance of the immature phenotype in mouse dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(2), 263–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449164>
- Geenen, V., Brilot, F., Hansenne, I., Renard, C., & Martens, H. (2003). of immune receptors able to recognize infectious antigens. The emergence of this novel form of immune defenses exerted a so potent pressure that structures and mechanisms developed along the paths of lymphocyte traffic to impose immunological, 1–12.
- Gigi, V., Stein, J., Askenasy, N., Yaniv, I., & Ash, S. (2013). Early immunisation with dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation elicits graft vs tumour reactivity. *British Journal of Cancer*, 108(5), 1092–9. doi:10.1038/bjc.2013.39
- Goker, H., Haznedaroglu, I. C., & Chao, N. J. (2001). Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Experimental Hematology*, 29(3), 259–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274753>

- Goldie, H., Butler, C. H., Anderson, M. M., Maxwell, M. C., & Hahn, F. (1953). Growth Characteristics of Free C1498 (Granulocytic Leukemia) Tumor Cells in the Peritoneal Fluid and the Blood of C57 Mice Growth Characteristics of Free C1498 (Granulocytic Leukemia) Tumor Cells in the Peritoneal Fluid and the Blood of C57 Mice *, 1498, 125–129.
- Goulmy, E. (1997). Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunological Reviews*, 157, 125–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255626>
- Goulmy, E. (2006). Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Human Immunology*, 67(6), 433–8. doi:10.1016/j.humimm.2006.03.012
- Goulmy, E., Schipper, R., Pool, J., Blokland, E., Falkenburg, J. H., Vossen, J., ... van Rood, J. J. (1996). Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 334(5), 281–5. doi:10.1056/NEJM199602013340501
- Graubert, T. A., Russell, J. H., & Ley, T. J. (1996). The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood*, 87(4), 1232–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608209>
- Greenfield, A., Scott, D., Pennisi, D., Ehrmann, I., Ellis, P., Cooper, L., ... Koopman, P. (1996). An H-YDb epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nature Genetics*, 14(4), 474–8. doi:10.1038/ng1296-474
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., & Pelicci, P. G. (1998). High-Efficiency Gene Transfer and Selection of Human Hematopoietic Progenitor Cells with a Hybrid EBV / Retroviral Vector Expressing the Green Fluorescence Protein Advances in Brief High-Efficiency Gene Transfer and Selection of Human Hematopoietic Progen, 14–19.
- Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G. G., Liu, Y., ... Deng, H. (2008). How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(5), 426–436. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00418.x
- Heinze, E., Baldwin, S., Chan, G., Hansen, J., Song, J., Clements, D., ... Weisbart, R. (2009). Antibody-mediated FOXP3 protein therapy induces apoptosis in cancer cells in vitro and inhibits metastasis in vivo. *International Journal of Oncology*, 35(1), 167–173. Retrieved from <http://www.spandidos-publications.com/ijo/35/1/167/abstract>
- Hoepfl, J., Miething, C., Grundler, R., Götze, K. S., Peschel, C., & Duyster, J. (2002). Effects of imatinib on bone marrow engraftment in syngeneic mice. *Leukemia*, 16(9), 1584–8. doi:10.1038/sj.leu.2402679
- Iqbal, N., Salzman, D., Lazenby, A. J., & Wilcox, C. M. (2000). Diagnosis of gastrointestinal graft-versus-host disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(11), 3034–8. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.03250.x

- James, E., Chai, J., Dewchand, H., Macchiarulo, E., Dazzi, F., & Simpson, E. (2003). Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen , HY , in mice and humans, *102*(1), 388–393. doi:10.1182/blood-2002-10-3170.Supported
- Janeway, C. a. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7461–8. doi:10.1073/pnas.131202998
- Jin, N., Chen, W., Blazar, B. R., Ramakrishnan, S., & Valleria, D. a. (2002). Gene therapy of murine solid tumors with T cells transduced with a retroviral vascular endothelial growth factor–immunotoxin target gene. *Human Gene Therapy*, *13*(4), 497–508. doi:10.1089/10430340252809793
- Johnson, B. D., Becker, E. E., LaBelle, J. L., & Truitt, R. L. (1999). Role of immunoregulatory donor T cells in suppression of graft-versus-host disease following donor leukocyte infusion therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(12), 6479–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586039>
- Kanda, Y., Chiba, S., Hirai, H., Sakamaki, H., Iseki, T., Kodera, Y., & Karasuno, T. (2003). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000), *102*(4), 1541–1547. doi:10.1182/blood-2003-02-0430.Reprints
- Katz, J. B., Muller, A. J., & Prendergast, G. C. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological Reviews*, *222*, 206–21. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00610.x
- Keith, D. S., & Patrie, J. T. (2011). H-Y Antigen Incompatibility Not Associated with Adverse Immunologic Graft Outcomes: Deceased Donor Pair Analysis of the OPTN Database. *Journal of Transplantation*, *2011*, 148457. doi:10.1155/2011/148457
- Khan, A., Tomita, Y., & Sykes, M. (1996). Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance. *Transplantation*, *62*(3), 380–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779687>
- Kim, G., Tanuma, N., Kojima, T., Kohyama, K., Suzuki, Y., Kawazoe, Y., & Matsumoto, Y. (2014). Spectratype-Derived TCR of Spinal Cord T Cells in.
- Kim, Y.-H., Faaij, C. M. J. M., van Halteren, A. G. S., Schrama, E., de Jong, T. a M., Schøller, J., ... Spierings, E. (2012). In situ detection of HY-specific T cells in acute graft-versus-host disease-affected male skin after sex-mismatched stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *18*(3), 381–7. doi:10.1016/j.bbmt.2011.10.038
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, *8*(6), 257–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067606>

- Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., ... Ansari, H. (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, *86*(5), 2041–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655033>
- Kolb, H.-J., Schmid, C., Barrett, A. J., & Schendel, D. J. (2004). Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*, *103*(3), 767–76. doi:10.1182/blood-2003-02-0342
- Koschack, J. (2008). Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied. *ZFA - Zeitschrift Für Allgemeinmedizin*, *84*(6), 258–260. doi:10.1055/s-2008-1073146
- Kovalchuk, a L., Qi, C. F., Torrey, T. a, Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., ... Morse, H. C. (2000a). Burkitt lymphoma in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(8), 1183–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3477743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kovalchuk, a L., Qi, C. F., Torrey, T. a, Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., ... Morse, H. C. (2000b). Burkitt lymphoma in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(8), 1183–90.
- Krebs - Krebs in Deutschland. (n.d.). Retrieved July 10, 2014, from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html;jsessionid=AA8D91F3C0A7326D11697F5A6843A057.2_cid298
- Krensky, a M. (2001). Immunologic tolerance. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, *16*(8), 675–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11519901>
- Krogsgaard, M., & Davis, M. M. (2005). How T cells “see” antigen. *Nature Immunology*, *6*(3), 239–45. doi:10.1038/ni1173
- Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L. E., & Shastri, N. (1986). The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annual Review of Immunology*, *4*, 529–91. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.002525
- Kurokawa, T., Fischer, K., Bertz, H., Hoegerle, S., Finke, J., & Mackensen, A. (2002). In vitro and in vivo characterization of graft-versus-tumor responses in melanoma patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *101*(1), 52–60. doi:10.1002/ijc.10555
- Lameris, R., de Bruin, R. C. G., Schneiders, F. L., van Bergen En Henegouwen, P. M. P., Verheul, H. M. W., de Gruijl, T. D., & van der Vliet, H. J. (2014). Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.08.003
- Laurin, D., Spierings, E., van der Veken, L. T., Hamrouni, A., Falkenburg, J. H. F., Souillet, G., ... Eljaafari, A. (2006). Minor histocompatibility antigen DDX3Y induces HLA-DQ5-restricted T cell responses with limited TCR-Vbeta usage

both in vivo and in vitro. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 12(11), 1114–24. doi:10.1016/j.bbmt.2006.07.012

Linsley, P. S., Clark, E. A., Ledbetter, J. A., & Alerts, E. (2014). Pillars Article : T-Cell Antigen CD28 Mediates Adhesion with B Cells by Interacting with Activation Antigen B7 / BB-1 . 5035.

Ljunggren, H. G., & Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11(7), 237–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201309>

Mandigers, C. M. P. W., Verdonck, L. F., Meijerink, J. P. P., Dekker, A. W., Schattenberg, A. V. M. B., & Raemaekers, J. M. M. (2003). Graft-versus-lymphoma effect of donor lymphocyte infusion in indolent lymphomas relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 32(12), 1159–63. doi:10.1038/sj.bmt.1704290

Margolis, J., Borrello, I., & Flinn, I. W. (2000). New approaches to treating malignances with stem cell transplantation. *Seminars in Oncology*, 27(5), 524–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049020>

Martin, P. J., McDonald, G. B., Sanders, J. E., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Deeg, H. J., ... Storb, R. (2004). Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 10(5), 320–7. doi:10.1016/j.bbmt.2003.12.304

Mehta, J., Powles, R., Singhal, S., Horton, C., & Treleaven, J. (1996). Outcome of autologous rescue after failed engraftment of allogeneic marrow. *Bone Marrow Transplantation*, 17(2), 213–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640169>

Miklos, D. B., Kim, H. T., Zorn, E., Hochberg, E. P., Guo, L., Mattes-ritz, A., ... Ritz, J. (2004). Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors, 103(1), 353–359. doi:10.1182/blood-2003-03-0984.Supported

Moldrem, J. J., Komanduri, K., & Wieder, E. (2002). Overexpressed differentiation antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Current Opinion in Hematology*, 9(6), 503–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12394172>

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (2014). Pillars Article : Two Types of Murine Helper T Cell Clone . I . Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins . J . Immunol ., 1986 , 136 : 2348 – 2357 .

Mutis, T., Verdijk, R., Schrama, E., Esendam, B., Brand, A., & Goulmy, E. (1999). Feasibility of Immunotherapy of Relapsed Leukemia With Ex Vivo-Generated Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Hematopoietic System-Restricted Minor

- Histocompatibility Antigens. *Blood*, 93(7), 2336–2341. Retrieved from <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/93/7/2336.full-text.pdf+html>
- Nannya, Y., Kataoka, K., Hangaishi, A., Imai, Y., Takahashi, T., & Kurokawa, M. (2011). The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 24(5), 469–76. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01229.x
- Nash, R. A., Pepe, M. S., Storb, R., Longton, G., Pettinger, M., Anasetti, C., ... Doney, K. (1992). Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood*, 80(7), 1838–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1391947>
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K., & Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature Reviews. Immunology*, 4(2), 123–32. doi:10.1038/nri1292
- Nishimori, H., Maeda, Y., & Tanimoto, M. (2013). Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Medica Okayama*, 67(1), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439503>
- Nossal, G. J. V. (1994). Negative Selection of Lymphocytes Review, 76, 229–239.
- NOWELL, P. C., & HUNGERFORD, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25, 85–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14427847>
- On, E., & Block, G. (1956). EXPERIMENT ON GANGLION BLOCK TREATMENT OF MURINE LEUKAEMIA WITH X RAYS ' AND HOMOLOGOUS METASTASES FROM CARCINOMA OF, 626–627.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, a, Zöller, M., & Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4319–23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Patterson, a E., & Korngold, R. (2001). Infusion of select leukemia-reactive TCR Vbeta+ T cells provides graft-versus-leukemia responses with minimization of graft-versus-host disease following murine hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 7(4), 187–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11349805>
- Perreault, C., Bélanger, R., Gyger, M., Allard, A., & Brochu, S. (1989). The mechanism of graft-host-tolerance in murine radiation chimeras transplanted across minor histocompatibility barriers. *Bone Marrow Transplantation*, 4(1), 83–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2647191>

- Pierce, R. A., Field, E. D., Mutis, T., Golovina, T. N., Von Kap-Herr, C., Wilke, M., ... Engelhard, V. H. (2001). The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(6), 3223–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544309>
- Piguet, P. F., Grau, G. E., Allet, B., & Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 166(5), 1280–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189667&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1828222/>
- Porter, D. L., & Antin, J. H. (1999). The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy. *Annual Review of Medicine*, 50, 369–86. doi:10.1146/annurev.med.50.1.369
- Quantification of low Copy Transcripts by continuous SYBR Green I Monitoring during amplification_1998_SKMBT_C452120504151_179261a.pdf. (n.d.).
- Randolph, S. S. B., Gooley, T. a, Warren, E. H., Appelbaum, F. R., & Riddell, S. R. (2004). Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood*, 103(1), 347–52. doi:10.1182/blood-2003-07-2603
- Reddy, P., & Ferrara, J. L. M. (2009). Mouse models of graft-versus-host disease. *StemBook*, 1–23. doi:10.3824/stembook.1.36.1
- Remple, K., & Stone, L. (2011). Assessment of GFP expression and viability using the tali image-based cytometer. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (57). doi:10.3791/3659
- Ribeiro, S., Mairhofer, J., Madeira, C., Diogo, M. M., Lobato da Silva, C., Monteiro, G., ... Cabral, J. M. (2012). Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells. *Cellular Reprogramming*, 14(2), 130–7. doi:10.1089/cell.2011.0093
- Rosenberg, S. a. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*, 10(3), 281–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204484>
- Rusakiewicz, S., & Molldrem, J. J. (2006). Immunotherapeutic peptide vaccination with leukemia-associated antigens. *Current Opinion in Immunology*, 18(5), 599–604. doi:10.1016/j.coi.2006.07.005
- Sad, S., & Marcotte, R. (1995). Differentiation of Precursor Mouse CD8 + T Cells into Cytotoxic CD8 + T Cells += FG, 2, 271–279.
- Schietinger, A., Philip, M., & Schreiber, H. (2008). Specificity in cancer immunotherapy. *Seminars in Immunology*, 20(5), 276–85. doi:10.1016/j.smim.2008.07.001

- Scott, D. M., Ehrmann, I. E., Ellis, P. S., Bishop, C. E., Agulnik, A. I., Simpson, E., & Mitchell, M. J. (1995). Identification of a mouse male-specific transplantation antigen, H-Y. *Nature*, *376*(6542), 695–8. doi:10.1038/376695a0
- Shi, G., Zhou, C., Wang, D., Ma, W., Liu, B., & Zhang, S. (2014). Antitumor enhancement by adoptive transfer of tumor antigen primed, inactivated MHC-haploidentical lymphocytes. *Cancer Letters*, *343*(1), 42–50. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.003
- Shpargel, K. B., Sengoku, T., Yokoyama, S., & Magnuson, T. (2012). UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genetics*, *8*(9), e1002964. doi:10.1371/journal.pgen.1002964
- Shtivelman, E., Gale, R. P., Drezzen, O., Berrebi, A., Zaizov, R., Kubonishi, I., ... Dc, W. (2014). bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia in Patients, 971–973.
- Simpson, E., Scott, D., & Chandler, P. (1997). The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annual Review of Immunology*, *15*, 39–61. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.39
- Simpson, E., Scott, D., James, E., Lombardi, G., Cwynarski, K., Dazzi, F., ... Dyson, P. J. (2001). Minor H antigens: genes and peptides. *European Journal of Immunogenetics : Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, *28*(5), 505–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11881817>
- Simultaneous Amplification and detection of specific DNA sequences_1992_higuchi-1992.pdf. (n.d.).
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, *2*(4), 293–9. doi:10.1038/86297
- SNELL, G. D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of Genetics*, *49*(2), 87–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18893744>
- Spicuglia, S., Franchini, D. M., & Ferrier, P. (2006). Regulation of V(D)J recombination. *Current Opinion in Immunology*, *18*(2), 158–63. doi:10.1016/j.coi.2006.01.003
- Spierings, E., Vermeulen, C. J., Vogt, M. H., Doerner, L. E. E., Falkenburg, J. H. F., Mutis, T., & Goulmy, E. (2003). Mechanisms of disease Identification of HLA class II-restricted H-Y-specific T-helper epitope evoking CD4 + T-helper cells in H-Y-mismatched transplantation, 362.
- Stelljes, M., Hermann, S., Ko, G., Lo, M., Franzius, C., Poremba, C., ... Kienast, J. (2008). Clinical molecular imaging in intestinal graft-versus-host disease : mapping of disease activity , prediction , and monitoring of treatment efficiency

by positron emission tomography, *111*(5), 2909–2918. doi:10.1182/blood-2007-10-119164.The

Stelljes, M., Specht, C., Albring, J., Volkmann, S., Schlösser, V., Pauels, H.-G., ... Kienast, J. (2007). Differential requirement for a cellular type-1 immune response in tumor-associated versus alloantigen-targeted GvT effects. *Transplantation*, *83*(3), 314–22. doi:10.1097/01.tp.0000250725.95074.f1

Stelljes, M., Strothotte, R., Pauels, H., Poremba, C., Milse, M., Specht, C., ... Kienast, J. (2004). Graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces a CD8 γ T cell – mediated graft-versus-tumor effect that is independent of the recognition of alloantigenic tumor targets, *104*(4), 1210–1216. doi:10.1182/blood-2003-10-3387.Supported

Stelljes, M., van Biezen, a, Slavin, S., Olavarria, E., Clark, R. E., Nagler, a, ... Ruutu, T. (2008). The harvest and use of autologous back-up grafts for graft failure or severe GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *42*(11), 739–42. doi:10.1038/bmt.2008.254

Suchin, E. J., Langmuir, P. B., Palmer, E., Sayegh, M. H., Wells, a. D., & Turka, L. a. (2001). Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question. *The Journal of Immunology*, *166*(2), 973–981. doi:10.4049/jimmunol.166.2.973

Terpe, K. A. Y. (n.d.). Die Kriterien eines Systems, 389–391.

Tolar, J., Tolarova, S., & McGrath, J. A. (2014). On Medawar's "Actively acquired tolerance of foreign cells". *Experimental Dermatology*, *23*(2), 97–8. doi:10.1111/exd.12227

Tomita, Y., Khan, A., & Sykes, M. (1994). Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *153*(3), 1087–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027542>

Toubai, T., Tawara, I., Sun, Y., Liu, C., Nieves, E., Evers, R., ... Reddy, P. (2012). Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood*, *119*(16), 3844–53. doi:10.1182/blood-2011-10-384057

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, *24*(9), 145–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422008>

Trickett, A., & Kwan, Y. L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, *275*(1-2), 251–255. doi:10.1016/S0022-1759(03)00010-3

- Tricot, G., Vesole, D. H., Jagannath, S., Hilton, J., Munshi, N., & Barlogie, B. (1996). Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood*, *87*(3), 1196–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562947>
- Universitaire, C. M. (1987). TUMOR NECROSIS FACTOR / CACHECTIN IS AN EFFECTOR OF SKIN AND GUT LESIONS OF THE ACUTE PHASE OF GRAFT-VS . -HOST DISEASE BY PIERRE-FRANCOIS PIGUET ,* GEORGES E . GRAD ,* BERNARD ALLET , t AND PIERRE VASSALLI * The introduction of allogeneic T lymphocytes i, *166*(November), 1280–1289.
- Van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., ... Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *184*(5), 1781–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Verdijk, R. M., Kloosterman, A., Pool, J., van de Keur, M., Naipal, A. M. I. H., van Halteren, A. G. S., ... Goulmy, E. (2004). Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. *Blood*, *103*(5), 1961–4. doi:10.1182/blood-2003-05-1625
- Vogelsang, G. B., Lee, L., & Bensen-Kennedy, D. M. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annual Review of Medicine*, *54*, 29–52. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152339
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, *10*(1), 57–63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Warren, E. H., Gavin, M. a., Simpson, E., Chandler, P., Page, D. C., Disteche, C., ... Riddell, S. R. (2000). The Human UTY Gene Encodes a Novel HLA-B8-Restricted H-Y Antigen. *The Journal of Immunology*, *164*(5), 2807–2814. doi:10.4049/jimmunol.164.5.2807
- Wolff, S. N. (2002). Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure , graft rejection or relapse after allogeneic transplantation, 545–552. doi:10.1038/sj/bmt/1703389
- Wu, Y., Xue, Y., & Pan, J. (2005). Y-chromosome loss in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *157*(1), 90–1. doi:10.1016/j.cancergencyto.2004.04.022
- Xia, G., Truitt, R. L., & Johnson, B. D. (2006). Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *12*(4), 397–407. doi:10.1016/j.bbmt.2005.11.519
- Xu, J., Deng, X., Watkins, R., & Disteche, C. M. (2008). Sex-specific differences in expression of histone demethylases Utx and Uty in mouse brain and neurons.

The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 28(17), 4521–7. doi:10.1523/JNEUROSCI.5382-07.2008

Young, A. (1995). Cellular and molecular mechanisms of IFN- γ production by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line induced, 58(August), 225–233.

Zhang, W., Caspell, R., Karulin, a Y., Ahmad, M., Haicheur, N., Abdelsalam, a, ... McArdle, S. (2009). ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring--even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators. *Journal of Immunotoxicology*, 6(4), 227–34. doi:10.3109/15476910903317546

Zhao, Q., Tong, L., He, N., Feng, G., Leng, L., Sun, W., ... Li, Z. (2014). IFN- γ mediates graft-versus-breast cancer effects via enhancing cytotoxic T lymphocyte activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(2), 347–354. doi:10.3892/etm.2014.1760

Zheng, P., Wu, Y., Guo, Y., Lee, C., & Liu, Y. (1998). B7-CTLA4 interaction enhances both production of antitumor cytotoxic T lymphocytes and resistance to tumor challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6284–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Poster/Kongressbeiträge

- ❖ 4th MEETING: „Histopathology of murine GVHD“
Murines GvHD-Symposium
Universitätsmedizin Mainz, 2012
„MHC major and minor antigens in GVHD and GVL-reactions“(Vortrag)

- ❖ 4th Münster Immunology Meeting
Max Planck Institute for Molecular Biomedicine Münster, 2013
“Ubiquitary Expressed Major Histocompatibility Class I and Minor Histocompatibility Alloantigens are not Relevant Targets of Graft-versus-Tumor Reactions in Mice after Allogeneic Bone Marrow Transplantation”
(Poster)

Danksagung

Ich habe das Glück gehabt, an einem ernsten aber spannenden Thema arbeiten zu dürfen, was mir sehr viel Spaß bereitet hat. Ich wurde während der gesamten Promotionszeit von lieben Menschen unterstützt und begleitet. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Stelljes, der mir das Erarbeiten dieses interessanten Promotionsthemas in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat, für die Betreuung, Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Moerschbacher und Frau Prof. Dr. Liebau, nicht nur für die Übernahme des Gutachtens und der Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie, sondern auch für ihre Motivation während der gesamten Promotionszeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barnekow, die immer an mich geglaubt hat und mich immer wieder motiviert hat, weiter zu machen. Sie hat während des Biologiestudiums die Neugier an der Forschung bei mir geweckt.

Für die Korrektur und Hilfe jeglicher Art im Labor bedanke ich mich bei Alessia Grabowski.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und nette Mittagspausen bedanke ich mich bei meinen Kollegen im KMT-Labor Charlott Wilken, Brigitte Grieser, Beate Lindtner, Colette Hühnefeld, Karin Frebel, Corinna Opitz, Claudia Dahrenmöller, Jennifer Urh und dem Angiogenese-Labor Caroline Zerbst und Christian Schwöppe.

Bei allen Computer-Fragen konnte ich mich immer an Herrn Bernhard Fiedler wenden und danke ihm sehr dafür.

Ich habe in Münster eine zweite Heimat gefunden und dafür bedanke ich mich bei all meinen Freunden.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter für die andauernde Unterstützung in allen Belangen, ihre Liebe und Geduld.

Meiner kleinen Familie, Lili, Soary und Sephan, danke ich für ihre Liebe! Ich habe euch lieb!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Stella Ramanantenasoa Robert, gemäß § 6 Abs. 3 (6) der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

.....

Stella Ramanantenasoa Robert

Münster, November 2014