

Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
Innere Medizin I – Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

**Expression von Cancer/Testis-Antigenen
nach Transformation von B-Zellen
mit Epstein-Barr-Virus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von
Dominic Kaddu-Mulindwa
geb.: 06.01.1982 in Berlin

.....meinem Stiefvater Rainer gewidmet

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden am Insitut Innere Medizin I im José-Carreras-Zentrum der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

DGHO Jahrestagung 2010, 01. - 05.10.2010 in Berlin (Posterbeitrag)

DGHO Jahrestagung 2012, 19. - 23.10.2012 in Stuttgart (Vortrag)

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

EBV-transformed Lymphoblastoid Cell Lines as Vaccines against Cancer Testis Antigen-positive Tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2012; *submitted*

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	8
Summary	9
2 Einleitung	10
2.1 Tumorbiologie/Tumorimmunologie	10
2.2 T-Zell-basierte Immuntherapie	11
2.2.1 Aktivierung des Immunsystems auf T-Zell-Ebene.....	11
2.2.2 T-Zellaktivierung als mögliche Therapieoption bei Malignomen	13
2.3 Cancer/Testis-Antigene	15
2.4 Epstein-Barr-Virus	18
2.5 Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs)	19
2.6 Zielsetzung der Arbeit	20
3 Probanden, Material und Methoden	22
3.1 Probanden	22
3.2 Materialien und Geräte	22
3.2.1 Chemikalien	22
3.2.2 Puffer und Lösungen und Zellkulturmedien	23
3.2.3 Enzyme und Kits	24
3.2.4 Primer	24
3.2.5 Größen- und Molekulargewichtsmarker	24
3.2.6 Lymphoblastoide Zelllinien	25
3.2.7 Tumorzelllinien.....	26
3.2.8 Geräte	26
3.2.9 Computersoftware	27
3.3 Methoden	27
3.3.1 Zellbiologische Methoden.....	27
3.3.1.1 Allgemeine Zellkultur	27
3.3.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	28
3.3.1.3 Generierung und Kultur von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)	29
3.3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	29
3.3.1.5 Bereitstellung von Proben adhärenter Zellen für molekularbiologische Analysen	30
3.3.1.6 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	30
3.3.1.7 Durchflusszytometrie.....	30
3.3.2 T-Zell-Kultur	31
3.3.2.1 In-vitro-T-Zell-Stimulationen	31
3.3.2.2 Interferon- γ -ELISPOT-Assay	32
3.3.2.3 Etablierung Epitop-spezifischer T-Zell-Klone	33
3.3.3 DNA-Techniken	33
3.3.3.1 Analytische Minipräparation von Plasmiden nach der TENS-Methode:.....	33
3.3.3.2 Analytische Minipräparation von Plasmiden mit der Spin-Methode:.....	34
3.3.3.3 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	34
3.3.3.4 DNA-Sequenzierung.....	34
3.3.4 RNA-Techniken	35
3.3.4.1 RNA-Isolierung.....	35
3.3.4.1.1 RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode.....	35
3.3.4.1.2 RNA-Isolierung mit TRIZOL® Reagent.....	36
3.3.5 cDNA-Synthese: Reverse Transkription	36
3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion / Polymerase chain reaction (engl, PCR).....	37
3.3.6.1 Semiquantitative PCR.....	37
3.3.6.2 Quantitative PCR (qPCR).....	39
3.3.7 Agarosegelelektrophorese	41
3.3.8 Behandlung lymphoblastoider Zelllinien mit DNA-Methyltransferase 1-(DNMT1-) und Histon-Deacetylase- (HDAC) Inhibitoren	41

4 Ergebnisse	43
4. Expression von CT-Antigenen in Lymphblastoiden Zelllinien	43
4.1 Häufigkeit der CTA-Expression	43
4.2 Expressionrate der einzelnen CT-Antigene	44
4.3 Die Expression von CT-Antigenen im Verlauf der viralen Transformation von B-Zellen	44
4.3.1 Zeitlicher Verlauf der CT-Antigenexpression nach EBV-Transformation	57
4.3.2 Zeitabhängige CTA-Expression bei LCLs.....	59
4.3.3 Konstanz der Expression jenseits von Tag 119	60
4.4 Charakterisierung der LCLs	62
4.5 Vergleich der CTA-Expressionsstärke von LCL und Tumorzelllinien	63
4.5.1 CTA-Expression auf Proteinebene	65
4.6 CTA-Expressionsanalyse nach Behandlung mit HDACi und DNMTi	66
4.7 T-Zell Stimulation	69
5 Diskussion	70
5.1 Expression von CT-Antigenen bei Lymphblastoiden Zelllinien	71
5.2 Die Expression von CT-Antigenen im Verlauf der viralen Transformation von B-Zellen	72
5.4 Co-Expression von CT-Antigenen bei LCLs im zeitlichen Verlauf	74
5.5 CTA-Expression bei LCLs nach Behandlung mit DNMTi und HDACi	75
5.6 Analyse der CTA-Expression auf RNA- und Proteinebene und im Vergleich mit Tumorzelllinien	76
5.6.1 RNA-Ebene (RT-PCR)	76
5.6.2 Proteinebene (Immunhistochemie).....	77
5.7 T-Zell-Stimulation	77
5.7.1 T-Zell-Antwort gegen CTAs.....	77
5.8 Offene Fragen	79
5.9 Ausblick	80
6 Literaturverzeichnis	81
7 Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	engl. antigen presenting cells / Antigen-präsentierende Zellen
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
Aza	5-Azacytidin
BORIS	<i>engl.</i> brother of regulator of imprinted sites
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation / Differenzierungsmuster
cDNA	<i>engl.</i> complementary deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CT-Antigen	<i>engl.</i> Cancer/Testis-Antigen
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor(en)
DSMO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
FACS	<i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
ff.	Fortfolgend
FP	<i>engl.</i> forward primer
g	Gramm
GAGE	<i>engl.</i> G antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor(en)
H ₂ O _{dest}	Einfach destilliertes Wasser
HLA	<i>engl.</i> Human leukocyte antigen / Humanes Leukozytenantigen

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J	Joule
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MAGE	<i>engl.</i> melanoma antigen expression
mRNA	messenger RNA
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
μ	Mikro (x 10 ⁻⁶)
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzelle
NY-ESO1	New York Esophagia-1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBSC	<i>engl.</i> peripheral blood stem cells / Stammzellen aus dem peripheren Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	<i>engl.</i> ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RP	<i>engl.</i> reverse primer
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>engl.</i> reverse transcription polymerase chain reaction
s	Sekunde
SAHA	Suberoylanilid Hydroxyamid Säure
SCP-1	Synaptonemal complex protein 1
SEREX	<i>engl.</i> serological analysis of recombinant cDNA expression libraries
SSX	<i>engl.</i> synovial sarcoma, X breakpoint
TSA	Trichostatin A
VPA	Valproat

Selten verwendete Abkürzungen im Text erläutert

1 Zusammenfassung

Lymphoblastoide Zelllinien, die Cancer/Testis Antigene (CTA) exprimieren, können möglicherweise als prophylaktische oder therapeutische Vakzine bei Krebs eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit war es, die CTA-Expression in lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) näher zu charakterisieren. Initial wurden hierfür 20 LCLs mittels qualitativer RT-PCR (Reverse Transkriptase – Polymerase - Kettenreaktion) auf ihre CTA-Expression hin untersucht. Bei 70% der untersuchten LCLs konnte auf mRNA-Ebene mind. ein CT-Antigen nachgewiesen werden, 50% exprimierten zwei oder mehr CT-Antigene. Am häufigsten wurde SSX4 (synovial sarcoma, X breakpoint 4) exprimiert: in 50% der untersuchten Linien. Im nächsten Schritt wurde die Expression von CTAs im zeitlichen Verlauf nach EBV-Transformation (Epstein-Barr-Virus) von B-Zellen untersucht, mit der Fragestellung, ab wann welche CTAs nachweisbar sind und ob sich ein spezifisches CTA-Expressionsmuster erkennen lässt. Hierfür wurden von 11 gesunden Spendern prospektiv neue LCLs angelegt und mittels qualitativer PCR auf ihre CTA-Expression hin untersucht. In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte kein einheitlicher Startpunkt für die CTA-Expression in B-Zellen nach EBV-Transformation determiniert werden. Auch ließ sich kein einheitliches Expressionsmuster erkennen: weder die einzelnen CT-Antigene noch die einzelnen LCLs betreffend. Weiterführend wurde die Stärke der CTA-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR und auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie untersucht. Als Vergleich für die Expressionsstärke wurden bestehende Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten verwendet. Einzig die LCL LG2 zeigte eine annähernd gleich starke CTA-Expression verglichen mit Tumorzelllinien. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch auf Protein-Ebene. Im Anschluss wurde dann versucht, die CTA-Expression bei LCLs durch den Einsatz von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi) in Kombination mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) *in vitro* hoch zu regulieren. Nach Behandlung von 5 LCLs mit DNMTi und HDACi konnte eine bis zu 700fache Expressionsverstärkung von SSX2 bei der Linie JY beobachtet werden. Von den 5 untersuchten CTAs wurde damit die Expression von SSX2 am stärksten hoch reguliert. Den größten Effekt auf die Stärke der CTA-Expression hatte linienübergreifend die Kombination aus 5-Azacytidin (Aza) und Valproat (VPA). Gleichzeitig kam es durch die Behandlung mit DNMTi und HDACi zu einer CTA-Induktion bei der LCL MGAR. Nach Behandlung konnte die erstmalige Expression von 7 CTAs bei dieser Linie beobachtet werden. Die Behandlung mit DNMTi und HDACi induzierte eine messbare T-Zell-Reaktion, so dass LCLs, als Antigen-präsentierende Zellen (APC), als Impfstoff für eine autologe *in vitro* und gegebenenfalls *in vivo* Tumorstimmulierung in Frage kommen.

Summary

Lymphoblastoid cell lines (LCLs) which express cancer/testis antigens (CTA) might be used as prophylactic or therapeutic vaccine against cancer. The aim of this study was to characterize the CTA expression in LCLs more precisely. Initially 20 lymphoblastoid cell lines were analysed for their CTA expression pattern by PCR. 70% of these cell lines expressed at least one CTA and even 50% of them expressed two or more CTA. The most frequently expressed CTA was SSX 4 with an expression level of 50% in all of the analyzed LCLs. The next step was to investigate the CTA expression in a chronological sequence after transfection of native B cells with the Epstein Barr virus. Objective of this study was to investigate from when until when CTA expression was detectable and if there is any specific expression pattern. Therefore peripheral blood cells from 11 healthy donors were taken to prospectively establish new LCLs and analyse their CTA expression pattern. We demonstrated that no specific start point for the CTA expression in B cells after EBV-transfection could be identified nor was a homogenous expression pattern shown, neither for a given CTA nor for a given LCL. To characterize the CTA expression in more detail the intensity of the CTA expression was investigated by using Real-Time-PCR for quantitative detection at mRNA level and immunohistochemistry at the protein level. For comparison of the expression intensity several established tumor cell lines from different entities were used and only LG2 was shown to express CTA mRNA in an amount comparable to tumor cell lines. The investigations at protein level confirmed these results. Finally, we tried to upregulate the CTA-expression *in vitro* by using DNMTi in combination with HDACi. After the treatment of 5 LCLs with DNMTi and HDACi up to 700times higher expression of SSX 2 in the cell line JY was observed. According to this the expression of SSX2 was the most strongly upregulated one. The combination of 5-azacytidin and valproat acid had the greatest impact on CTA expression in cell lines. We could generate a *de novo* CTA expression in the line MGAR, with 7 CTA being expressed for the first time. Further on, and most important, an increased T-cell reactivity against LCL JY was observed after treatment of this LCL with the combination of HDACi and DNMTi.

Our study is the first to demonstrate and characterize CTA expression in LCLs. LCLs have the ability to induce a T cell response because of their ability to act as APC so they are promising candidates for the use as autologous *in vitro* or *in vivo* tumor vaccine.

2 Einleitung

2.1 Tumorbiologie/Tumorimmunologie

Zellen, die maligne entarten, weisen unabhängig von ihrer Entität gewisse Gemeinsamkeiten auf: die Fähigkeit zur ungehemmten Proliferation, den Verlust der Apoptose-Fähigkeit und das Überschreiten natürlicher Gewebegrenzen (Invasion und Metastasierung). Biologisch unterscheiden sich Tumorzellen demnach deutlich von ihren nicht-malignen Ursprungszellen. Auf Grund von genetischen Veränderungen verfügen Tumorzellen zudem über qualitativ und quantitativ veränderte molekulare Strukturen. In diesem Zusammenhang werden solche Strukturen dann als Tumorantigene bezeichnet, wenn sie vom spezifischen Immunsystem des tumortragenden Individuums erkannt werden. Im Laufe der Jahre konnte eine Vielzahl dieser Antigene identifiziert werden. Auf Grund ihrer Expressionseigenschaften und molekularen Alterationen lassen sich diese Antigene in verschiedene Klassen einteilen. Zu diesen Klassen gehören *Cancer/Testis-Antigene* (CTAs), auf die in der vorliegenden Arbeit noch detaillierter eingegangen wird. Diese Antigene weisen keine Expression in somatischem Gewebe auf, außer in Keimzellen von Hoden und Ovar. Dagegen werden sie auf einem breiten Spektrum verschiedener Tumoren mit unterschiedlicher Frequenz exprimiert^[1]. *Differenzierungsantigene* (Bsp.: Tyrosinase beim Melanom) werden in normalen Geweben nur in Zellen bestimmter Entwicklungsstufen exprimiert (wie z.B. in Melanozyten) und sind damit zelltypspezifische Differenzierungsantigene, wie z.B. Tyrosinase, das am Melaninstoffwechsel beteiligt ist^[2]. *Überexprimierte Antigene* (Bsp.: Her2/neu) sind durch Überproduktion entstandene Proteine - sei es durch verstärkte Transkription oder durch Genamplifikation, die bei Überschreiten der immunologischen Toleranzschwelle zu einer Immunantwort führen. Bei *mutierten Genprodukten* (Bsp.: p53) kommt es durch Änderungen in der Gensequenz zu einer konsekutiv veränderten Aminosäuresequenz des kodierten Proteins, das damit ein neues Epitop bildet^[3]. Bei *tumorspezifischen Spleißvarianten* (Bsp.: Restin) kommt es zu einer beschränkten Expression einer Spleißvariante in Tumorzellen. Für die Therapie maligner Erkrankungen stellen o.g. molekulare Strukturen Angriffspunkte für Therapiestrategien dar, hierbei v.a. unter Nutzung bzw. Miteinbeziehung des Immunsystems, insbesondere von T-Lymphozyten.

2.2 T-Zell-basierte Immuntherapie

2.2.1 Aktivierung des Immunsystems auf T-Zell-Ebene

T-Lymphozyten (T-Zellen) spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen der adaptiven Immunität und sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. T-Zellen lassen sich auf Grund ihrer Funktion in zwei große Kategorien unterteilen: in zytotoxische ($CD8^+$) T-Zellen und in ($CD4^+$) T-Helferzellen^[4]. Zudem unterscheidet man noch mindestens eine dritte Gruppe von T-Zellen, sog. regulatorische T-Zellen ($CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$), die u. a. für die Kontrolle der T-Zellantwort zuständig sind und sowohl durch Sekretion proliferations-supprimierender Zytokine als auch über Zell-Zell-Kontakte limitierend auf die T-Zellantwort wirken^[5].

Die o.g. Populationen von T-Zellen haben bei der Immunantwort sehr unterschiedliche Aufgaben:

Zytotoxische T-Zellen spielen v. a. bei der Zerstörung Virus-infizierter Zellen eine Rolle. Sie erkennen Antigene, die nicht zum Proteinbestand der gesunden Zelle gehören – sowohl körpereigene als auch körperfremde. Die Antigenpräsentation erfolgt hierbei über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse I, auch humanes Leukozytenantigen (HLA) genannt. Der MHC-Komplex wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und weist eine hohe Polygenie und einen hohen Polymorphismus auf. Zur Präsentation zytosolischer Proteine bzw. Polypeptide werden diese in Proteasomen zu Peptiden mit einer Länge von 8-12 AS proteolytisch gespalten. Spezifische Transportproteine (Transporters associated with antigen processing = TAP) schleusen diese Peptide dann in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo die Peptide an MHC-I-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Neben Antigenen von Viren, die den Proteinsynthese-Apparat der Wirtszelle nutzen, können über diesen Weg auch Tumor-spezifische Antigene an der Oberfläche einer Trägerzelle präsentiert werden. Diese MHC/Peptid-Komplexe führen über direkten Kontakt mit T-Zellen, die die „passenden“ T-Zell-Rezeptoren tragen, zur Aktivierung dieser T-Zellen und zur Auslösung der entsprechenden Effektorfunktionen. Somit unterliegen auch Tumorzellen der Kontrolle des adaptiven Immunsystems und sind der Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen zugänglich. Im Gegensatz dazu werden über den MHC-II-Weg v. a. extrazelluläre Antigene präsentiert, die zuvor von der APC durch Endozytose internalisiert wurden. Ebenso werden über diesen Weg jedoch auch solche Antigene präsentiert, die von Pathogenen stammen, die sich in intrazellulären Vesikeln replizieren. Die so aufgenommenen Antigene induzieren einen pH-Abfall, was zur Aktivierung von sauren Proteasen und zum proteolytischen Verdau der Antigene führt. Die Endosomen werden so zu Lysosomen. Diese fusionieren dann mit Transportvesikeln mit

leeren MHC-II-Molekülen, und die Peptide bilden mit den passenden MHC-II-Molekülen stabile Peptid/MCH-II-Komplexe. Diese werden zur Oberfläche der APC transportiert und dort über direkten Zell-Zell-Kontakt den „passenden“ $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert, die dadurch zu Effektorzellen werden. Die Antigenpräsentation über den MHC-II-Weg findet v. a. in sog. professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) statt.

Das primäre Signal zur Induktion einer T-Zell-Antwort wird, wie beschrieben, durch die direkte Interaktion zwischen dem Peptid/MHC-Komplex auf der Seite der APC und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dessen Korezeptoren (CD3, CD8 bzw. CD4) auf der Seite der T-Zelle ausgelöst. Völlig unabhängig davon, ob es sich um MHC-I-restringierte Reaktionen $CD8^+$ CTLs handelt oder um MHC-II-restringierte Antworten $CD4^+$ T-Helferzellen, müssen dabei immer zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Das aus dem Antigen prozessierte Peptid muss zu einem MHC-Molekül passen. Das zu gewährleisten, war die evolutionäre Grundlage für die Entwicklung der enormen Polygenie und multiplen Allelie des MHC-Komplexes. Darin liegt jedoch ein für die Etablierung von Immuntherapien gegen Krebs limitierender Faktor. Zwar wurden soweit schon etliche Peptid-Epitope aus Tumor-spezifischen und auch aus Cancer-Testis-Antigenen gefunden und deren Potential zur Induktion sowohl von zytotoxischen als auch T-Helferzell-Antworten beschrieben, jedoch bleibt aufgrund der MHC-restringierten Bindung dieser Peptide deren klinischer Einsatz auf Patienten beschränkt, die die entsprechenden MHC-Moleküle exprimieren. Nur eine Vakzinierung mit dem Volllänge-Antigen bietet den beiden Präsentationswegen alle Möglichkeiten ein passendes Peptid zu prozessieren und zwar für beliebige MHC-Konstellationen. Deren synthetische Bereitstellung zur klinischen Anwendung am Patienten ist allerdings extrem aufwendig und somit ebenso kostspielig. Dies ist einer der Gründe, warum bis heute Immuntherapien gegen verschiedene Tumoren nur auf Basis einer handvoll Tumorantigene in wenigen klinischen Studien getestet werden konnten.

2. Zu jedem Peptid/MHC-Komplex muss (müssen) eine T-Zelle (oder mehrere) mit einem TCR existieren, die den entsprechenden Komplex auf der APC erkennt. Der TCR gehört zur Immunglobulin-Superfamilie. Die genetische Varianz dieser Familie ist, wengleich auch auf Grund einer anderer Organisation, nahezu genauso breit wie die des MHC-Genkomplexes. Von daher ist sichergestellt, dass prinzipiell sich zu jeder Peptid/MHC-Kombination (eine) T-Zelle(n) mit einem passenden TCR rekrutieren (lässt) lassen.

Um bei naiven T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, eine T-Zell-Antwort zu induzieren, sind neben dem primären Signal (Peptid/MHC-Komplex + TCR) noch weitere sog. kostimulatorische Signale notwendig. Der wichtigste Rezeptor für diesen Kostimulus auf

naiven T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$) ist das CD28-Molekül. Die entsprechenden Liganden für den CD28-Rezeptor auf Seiten der APC sind die beiden Moleküle CD80 bzw. CD86. Diese werden nur auf professionellen APC exprimiert, und diese verfügen über das entsprechende Potential, naive T-Zellen gegen neue Antigene zu mobilisieren. Werden naive T-Zellen kompetent stimuliert, beginnen sie zu proliferieren und entwickeln sich dabei zu sog. Effektor-Zellen^[6].

Diese Entwicklung kann in sehr unterschiedliche Richtungen laufen und bringt T-Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen hervor. Charakteristisch für die verschiedenen Entwicklungsstadien und Funktionen ist das Zytokinmuster, das die T-Zellen dabei exprimieren. Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen verfügen Memory-T-Zellen, die schon primären Antigenkontakt hatten, bereits über Effektorfunktionen und befinden sich schon in einem (mehr oder weniger) finalen Stadium ihrer Entwicklung.

2.2.2 T-Zellaktivierung als mögliche Therapieoption bei Malignomen

Die Möglichkeit, eine spezifische T-Zellantwort gezielt als therapeutische Option zu nutzen, wurde bisher auf unterschiedliche Weise untersucht. So konnte eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen z.B. durch eine immunogene Kostimulation mittels Bakterien erreicht werden. Hierbei zeigte sich, dass die Instillation von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) wirksam bei Blasenkrebs im Carcinoma in situ–Stadium (CIS) ist, da BCG wahrscheinlich durch eine unspezifische Entzündungsreaktion eine zusätzliche T-Zell-Aktivierung über APC auslöst^[7]. Ein anderer therapeutischer Ansatz ist die Nutzung von sog. Donor-Lymphozyten Infusionen (DLI) bei Patienten mit Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation. Der therapeutische Effekt wird hierbei über eine Verstärkung der graft-versus-leukemia-Reaktion erzielt und erwies sich bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie als hoch effektiv^[8]. Bei diesem Ansatz erkennen zytotoxische T-Lymphozyten des Spenders Epitope auf den CML-Zellen und zerstören diese fremden malignen Zellen. Beim Multiplen Myelom beobachtet man nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ebenfalls diesen Effekt („graft-versus-myeloma-Effekt“). Auch hier führt die Gabe von DLI nach allogener SZT zu einem graft-versus-myeloma-Effekt, der möglicherweise mit einem verbesserten OS (overall survival) und PFS (progression free survival) verbunden ist^[9].

Während es sich bei der Verwendung von DLI um eine passive Immuntherapie mittels T-Zelltransfer handelt, zielt der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (MAK) direkt auf eine T-Zellaktivierung als Therapieoption ab. Als Beispiel sei an dieser Stelle Catumaxomab genannt, ein trifunktionaler Anti-CD3-anti-EpCAM MAK. Zugelassen bei der Behandlung des malignen Ascites bei Patienten mit EpCAM-positiven Tumoren, erreicht er über CD3 eine

T-Zellaktivierung^[10]. Zudem gibt es Ansätze, bei denen aktiv versucht wird, eine spezifische T-Zellantwort auszulösen, nämlich in Form einer aktiven Impfung. So versuchten Kwak *et al.* durch eine aktive Immunisierung mit von Myelomzellen gebildeten Immunglobulinen oder – fragmenten bei Myelompatienten spezifische CD4⁺-T-Zellen zu generieren. Diese CD4⁺-T-Zellen lösten dann bei einem Myelompatienten gleichen Myelomsubtyps eine spezifische T-Zellantwort aus, die zu einer Reduktion der Myelomzellen führte^[11]. Vom Prinzip her ist dies ein überaus vielversprechender Ansatz – wenn man die gleichen Effekte wie bei einer prophylaktischen Impfung, wie z.B. gegen das Influenzavirus erreichen könnte. Es gibt jedoch auf diesem Weg noch einige Hindernisse, deren Überwindung Gegenstand der aktuellen Forschung ist.

Die Anfänge der Tumorstimmungs-forschung liegen weit zurück. Bereits vor mehr als 30 Jahren (1981) konnten Brunner *et al.* zeigen, dass die Injektion von Moloney sarcoma leukemia virus (MSLV) bei Mäusen zu einem starken Anstieg der zytotoxischen T-Lymphozyten und gleichzeitig zu einem Schrumpfen von Tumorgewebe führt^[12]. Dies waren die ersten Schritte in Richtung einer therapeutischen Tumorstimmung. Heutzutage ist eine der Herangehensweisen, Tumorstimmungs-antigene über eine *in vitro* hergestellte APC präsentieren, um so (über eine HLA-I - Aktivierung) eine T-Zellantwort hervorzurufen^[13]. Hintergrund hierbei ist die Tatsache, dass Tumorzellen häufig HLA-I oder kostimulatorische Moleküle fehlen, die für eine T-Zellaktivierung notwendig sind - dieses Fehlen kann so über eine Präsentation mittels APC umgangen werden. Voraussetzung für diese Art der T-Zellaktivierung sind tumorspezifische Antigene als Angriffsziele. Hierbei handelt es sich um Antigene, die aufgrund einer Punktmutation in normalem Gewebe, z.B. β -Catenin, CDK-4, im Zuge neoplastischer Veränderung entstehen. So entstehen durch individuelle Mutationen auch Antigene, die für einen Tumor spezifisch sind und damit als Zielantigene für T-Zellen genutzt werden können^[3].

Zu der Gruppe dieser Tumor-assoziierten Antigene (TAA) zählen auch CTAs. Hierbei handelt es sich um Antigene, die von Tumoren unterschiedlichster Entitäten, im somatischen Gewebe aber nur von Hoden und Ovar exprimiert werden. Sie sind somit ideale Kandidaten für eine Immuntherapie sind. Schon Anfang 1990 berichteten Boon *et al.* über das erste erfolgreiche Klonen eines humanen Tumorstimmungs-antigens, bezeichnet als melanoma antigen-1 (MAGE-1)^[14], das eine autologe Antwort von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) in Melanom-Patienten hervorrief^[15].

2.3 Cancer/Testis-Antigene

Wie vorausgehend kurz angedeutet, ist einer der Ansatzpunkte für die Entwicklung einer tumorspezifischen Immuntherapie die Existenz von Tumorantigenen, also von Antigenen, die eine Überexpression in malignen Zellen aufweisen^[16]. Es handelt sich hierbei um Tumor-assoziierte Strukturen, die vom spezifischen Immunsystem erkannt werden und dann zu einer Initiierung zytotoxischer Effektormechanismen führen. Entsprechend ihrem Expressionsmuster und aufgrund der Spezifität der durch sie hervorgerufenen Immunantwort, können Antigene humaner Neoplasien in verschiedene Gruppen klassifiziert werden^[17].

Der Name Cancer/Testis-Antigene (CTAs) leitet sich von den Gewebearten ab, welche diese Antigene auf ihrer Zelloberfläche exprimieren - so werden CTAs ausschließlich von Tumor-, Testis- und Plazentagewebe exprimiert und sind in der Lage, eine humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen^[1]. CTAs von gesundem Hoden- bzw. Plazentagewebe führen zu keiner Immunreaktion, da diese Gewebe zum einen keinerlei HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren (wodurch keine Erkennung durch CTA-spezifische CTL möglich ist)^[18] und zum anderen durch die Blut-Hoden- bzw. Blut-Plazenta-Schranke zusätzlich geschützt sind, da es nicht zu einem direktem Kontakt zwischen Zellen des Immunsystems und testikulären Zellen kommen kann^[19]. Per definitionem dürfen CTAs in nicht mehr als zwei gesunden Gewebearten detektierbar sein^[1]. Die ersten CTAs wurden zunächst durch autologe Typisierung entdeckt, bei der gesunde Zellen und Tumorzellen von einem Patienten mit dessen T- Zellen und Antikörpern konfrontiert wurden^[20]. Im Verlauf wurden dann nach dem Prinzip der autologen Typisierung weitere CTAs gefunden, bis man dazu überging, auf serologischer Ebene mit dem SEREX-Ansatz weiterzuarbeiten. SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) ist eine sehr erfolgreiche serologische Technik zur Identifikation von Tumorantigenen und fand weiter internationale Verbreitung. Für SEREX wurden cDNA-Expressionsbibliotheken, die aus der mRNA von frischem Tumorbiopsiematerial hergestellt werden, in Bakteriophagen kloniert und dann rekombinant in E.Coli-Bakterien exprimiert. Diese Proteine werden dann mit hochtitrierten IgG- bzw. IgA-Antikörpern aus Tumorpatienten-Serum zusammengebracht, um zu testen, ob sie von Antikörpern im Serum von Tumorpatienten erkannt werden. Durch anschließende Sequenzanalyse positiv reagierender Klone wurden die molekulare Struktur dieser Antigene aufgeklärt^[21]. In Ihren ersten Experimenten analysierten Sahin *et al.* zunächst Melanome, Nierenzellkarzinome, Astrozytome und Hodgkin Lymphome und konnten dabei eine große Anzahl von Genen isolieren, einschließlich MAGE-A1 und Tyrosinase, die beide schon vorher als Ziele für zytotoxische T-Lymphozyten identifiziert waren^[22], was darauf

hindeutete, dass Antigene, die eine Antikörper-Antwort bei Tumor-Patienten auslösen, auch gleichzeitig in der Lage sind, eine T-Zell-Antwort auszulösen. Mittels SEREX war damit die serologische Identifikation von Tumorantigenen möglich, so auch bei der Entdeckung des Antigens SSX-2 (synovial sarcoma/X breakpoint) durch Türeci *et al.*^[23]. Einer der großen Vorteile von SEREX ist, dass es - neben dem geringeren Zeit- und Kostenaufwand - unabhängig von der Verfügbarkeit etablierter Tumorzelllinien und tumorspezifischer CTL-Klone verwendet werden kann. Es erlaubt somit auch die Untersuchung von Malignomen, für die eine Etablierung von CTL-Klonen schwierig ist^[24]. Was CT-Antigene neben ihrem charakteristischen Expressionsmuster so interessant macht, ist die Tatsache, dass sie von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Tumorentitäten exprimiert werden und somit nicht spezifisch für eine einzige Tumor-Entität sind. So konnte mittels RT-PCR die Expression von Mitgliedern verschiedener CTA-Familien beim malignen Melanom, Blasenkarzinom, NSCLC, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und vereinzelt auch beim Nieren- und Kolonkarzinom nachgewiesen werden,^{[25], [26]} ebenso wie bei hämatologischen Neoplasien wie z.B. Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom^[27]. Mittlerweile konnten weltweit durch SEREX weit mehr als 1000 Antigene von Tumoren unterschiedlichster Entitäten identifiziert werden^[21].

Mit Modifikationen von SEREX konnten neue CT-Gene identifiziert werden. So klonierten z.B. Gure *et al.* mittels Representational-Difference Analysis (RDA) und dem Vergleich Melanom versus normaler Haut, ein MAGE-A ähnliches CT Gen, CT10^[28] und fanden einen anti-CT10 Antikörper in Melanom-Patienten als Beleg für die Immunogenität von CT10. Durch ein ähnliches Vorgehen isolierten Lucas *et al.*^[29] unabhängig davon ein cDNA-Fragment, das eine signifikante Homologie mit den MAGE-Genen aufwies und bezeichneten es als CT7. Diese Antigene wurden später dann als MAGE-C1 (CT7) und MAGE-C2 (CT10) bezeichnet. In jüngster Zeit wurde u.a. MPSS (massively parallel signature sequencing) genutzt, um das mRNA Expressionsprofil von Testisgewebe, Melanomzelllinien und anderen somatischen Geweben miteinander zu vergleichen^[30]. Dies führte zu der Identifikation von >20 CTAs oder CTA-ähnlichen Genen. Zudem führte die in silico Analyse, z.B. der EST-Datenbanken (expressed sequence tags) für Gene mit CT-beschränkter Expression, zu der Identifikation weiterer CT-Antigene, wie z.B. von dem CTA CRT2^[31]. Um die Daten der mRNA-Expression auf genomischer Ebene zu vergleichen und für den Versuch, alle potentiellen CT Gene zu identifizieren, haben Hoffman *et al.* alle verfügbaren Daten mithilfe der Kombination von vier verschiedenen Methoden, nämlich MPSS, ESTs, CAGE und RT-PCR untereinander bzw. miteinander verglichen^[32].

Bisher wurden 70 Familien von CTAs mit über 140 Mitgliedern identifiziert und in einer Datenbank des Ludwig Institute for Cancer Research gelistet^[33]. CTAs können unterteilt werden nach CTAs, die auf dem X-Chromosom kodiert sind und solche, die es nicht sind, sog. non-X-CTA^[30]. Es wird geschätzt, dass ungefähr 10% aller auf dem X-Chromosom gelegenen Gene zu der X-CTA-Familie gehören^[34]. Die X-CTA-Gene repräsentieren mehr als die Hälfte aller CTAs und sind oft als Multigen-Familien in genau definierten Mustern entlang des X-Chromosoms organisiert. Exemplarisch hierfür ist die Xp11-Region, die alle Gene der SSX-Familie und der GAGE/PAGE/XAGE-Superfamilie enthält sowie die Xq24-q28-Region, die die höchste Dichte von CTA-Genen aufweist, inklusive der MAGE-A, MAGE-C und NY-ESO-1 Multigen-Familie^{[1], [35]}.

Bis heute ist die eigentliche Funktion der CTAs sowohl bei Keim- als auch bei Tumorzellen größtenteils nicht bekannt, jedoch konnten für einige CTAs bestimmte Funktionen nachgewiesen werden. So beeinflusst z.B. das vom SCP-1 Gen kodierte CTA 17SYCP1 die Chromosomenpaarung in der Meiose^[36]. Im regulären Zellzyklus wird SYCP1 nach der meiotischen Prophase degradiert, in Tumorzellen hingegen wird es zellzyklusunabhängig exprimiert, so dass vermutet wird, dass es mit dem regulären Mitose-Ablauf in somatischen Zellen interferiert und dort möglicherweise Chromosomenalterationen induziert^[37]. Bei anderen CTAs ist die Funktion eher vage bekannt, so spielt wohl z.B. MAGE-A3 eine wichtige Rolle in Transkriptionsprozessen^[38] und auch für MAGE-A1 gibt es ebenfalls Hinweise, dass es als potentieller Transkriptionsrepressor fungiert und in dieser Funktion die Expression von Genen, die für die Zelldifferenzierung während der Spermatogenese obligat sind, unterdrückt^[39]. Zudem scheint die Überexpression von MAGE-A2 und MAGE-A6 bei Ovarialkarzinomzellen eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber Paclitaxel und Doxorubicin zu bewirken^[40]. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese einiger Studien, dass die Expression von MAGE-Genen in Tumorzellen zu einem malignem Phänotyp beiträgt.

Ein Schlüsselmechanismus bei der CTA-Expression scheint die Hypo- oder Demethylierung der DNA bzw. insbesondere der Antigen-Promotorregion zu sein^[38], da eine Methylierung die Transkription der Antigen-DNA und damit die Expression der CT-Antigene^[41] blockiert bzw. verhindert. Dieser Prozess der Demethylierung und damit Aktivierung von CT-Antigenen konnte u.a. von Singalotti *et al.* gezeigt werden^[42]. Bei der Methylierung von DNA handelt es sich um eine häufig vorkommende Modifikation der DNA. Hierbei kommt es durch die DNA-Methyltransferase zu einer kovalenten Bindung einer Methyl-Gruppe an die C-5 Position des Cytosin der CpG-Dinukleotide des DNA-Stranges. Diese DNA-Methylierung kann dann zu einem Gen-Silencing führen indem sie zum einen direkt mit der Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren an die DNA interferiert^[43] oder zum anderen indem durch die Bindung

von methyl-CpG-bindenden Proteinen (engl. MBDs = methyl-CpG-binding proteins) die Rekrutierung eines Chromatin-verändernden Co-Repressor-Komplexes erfolgt, der die Gen-Expression verhindert^{[44], [45], [46], [47]}. Im Umkehrschluss gibt es die Möglichkeit, durch den Einsatz von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi) wie z.B. 5'-Aza-Deoxycytidine in Kombination mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) die Expression von CT-Antigenen hoch zu regulieren, wie exemplarisch von Wischneswski *et al.* für einige Mitglieder der MAGE-Familie gezeigt werden konnte^[48]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Umstand berücksichtigt und versucht, experimentell bei LCLs durch den Einsatz von einem DNMTi in Kombination mit verschiedenen HDACi die CTA-Expression anzuschalten bzw. zu verstärken.

Da CTA-Gene eigentlich keine großen Gemeinsamkeiten aufweisen, wurde eine Nomenklatur eingeführt, die sich zu einem nach dem Tumorgewebe, bei dem das CTA zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte (z.B. Melanoma associated antigen = MAGE) richtet und zum anderen an der chronologischen Entdeckung des CTA im Sinne einer Durchnummerierung (MAGEA = CT1; MAGEB = CT2) orientiert^[26].

2.4 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), ein ubiquitäres Virus der Herpesvirus-Familie, ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, dessen eigentliche Hauptzielzellen B-Zellen sind. Es ist jedoch auch in der Lage andere Zellen, unter anderem T-Zellen und Epithelialzellen zu befallen^[49]. Das Virus kann eine großen Bandbreite von B-Zellen befallen, von ruhenden B-Zellen^[50] über Blasten bis hin zu voll ausdifferenzierten Plasmazellen^[51]. Nach Infektion der B-Zellen etabliert das Epstein-Barr-Virus eine Latenz in einer Subpopulation von B-Zellen (ruhende Gedächtnis-B-Zellen). In diesen rezirkulierenden B-Zellen liegt das Virusgenom in mehrfacher Kopie als zirkulär geschlossenes Episom im Zellkern vor^[52].

In diesen latent infizierten B-Zellen werden bis zu neun EBV-codierte Proteine exprimiert^[53]. Es handelt sich hierbei um die nukleären Antigene EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA-LP sowie um die latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. LMP1 ähnelt in vielen Aspekten dem konstitutiv aktiven CD40-Rezeptor^[54]. Die Funktion von LMP2 ist die Blockade von Virus-reaktivierenden Signalen^[55], was erklärt, warum (nach Infektion) keine virale Replikation im peripheren Blut detektierbar ist^[56]. Zwar ist LMP2 auch Zielmolekül von zytotoxischen T-Zellen, jedoch kommt es zu keiner Erkennung durch T-Zellen, da die Viruslatenz in ruhenden B-Zellen stattfindet und diesen B-

Zellen^[57] das kostimulatorische Molekül B7 fehlt, welches Gedächtnis-CTLs aktiviert^[58]. Zudem scheint LMP2A den B-Zell-Rezeptor imitieren zu können, konnte doch in einem transgenen Maus-Modell gezeigt werden, dass die Expression von LMP2A die Überlebens-Signale für B-Zellen, die normalerweise mit der B-Zell-Rezeptor-Expression einhergehen, ersetzen kann^[59].

In den meisten Fällen verläuft eine EBV-Infektion asymptomatisch, symptomatische Verläufe präsentieren sich klinisch als infektiöse Mononukleose.

In der Literatur werden jedoch auch Fälle beschrieben, in denen die transformierenden Eigenschaften des Virus mit der Entwicklung von T-Zell-Lymphomen assoziiert werden^[60]. Weiterhin wird das Virus mit der Entstehung bestimmter Tumoren/Lymphomen, namentlich Hodgkin Lymphom (HL)^[61], Nasopharynx-Karzinom (NPC)^[62], Burkitt Lymphom (BL)^[63] und post-transplant B-Zell Lymphom (PTLD)^[64], assoziiert.

2.5 Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs)

Durch die *in vitro* Transfektion humaner (ruhender) B-Zellen mit EBV werden diese in aktive proliferierende Lymphoblastoide Zell-Linien (LCLs) transformiert. Die Empfindlichkeit der B-Zellen für diese Transformation variiert in der Literatur sehr breit zwischen 10% und 100%^{[65], [66], [67], [68], [69], [70], [71]}. Nach der Etablierung können lymphoblastoide Zellen dann als unbegrenzte Quelle z.B. für Patienten-DNA oder epigenetische Studien genutzt werden^[72]. Auf Grund ihrer geringen somatischen Mutationsrate von nur 0,3%^[73] und ihrer einfachen Handhabung sind LCLs die bevorzugte Wahl bei der Lagerung von genetischem Material von Patienten und eignen sich zudem auch für molekulare und funktionale Studien von Stoffwechselwegen^[74].

Die ursprüngliche Annahme, dass EBV-transformierte B-Zellen immortal sind, gründete wohl auf der ungewöhnlich langen Lebensspanne dieser Zelllinien: durchschnittlich 86.0 PDLs (population doubling levels) für normale LCLs^[75]. Einige Studien^{[75], [76], [77]} haben jedoch gezeigt, dass diese initiale Annahme offenbar nicht korrekt ist^[78]. Bei der Untersuchung von LCLs haben zwei Technologien eine essentielle Rolle gespielt: die Etablierung von LCLs mittels *in vitro* Zugabe von exogenem EBV-Überstand, gewonnen aus der B95-8 (Seidenaffen) Zelllinie^[74] und die Untersuchung der Telomerase-Aktivität^[79].

Sugimoto *et al.* plädierten auf Grund ihrer Studien dafür, LCLs erst dann als immortal zu bezeichnen, wenn sie folgende Kriterien erfüllen: a) Aktivierung der Telomerase; b) Aneuploidie; c) Überschreiten von 180 PDLs. Des Weiteren teilten Sugimoto *et al.* LCLs

aufgrund bestimmter Merkmale (Kolonienwachstum, Telomeraseaktivität, Telomerlänge, Karyotyp, PDLs, Wachstum in nackten Mäusen, andere Veränderungen) in verschiedene Stadien ein (Stadium 0 - 4)^[80].

Stage 0 : ruhende B-Zellen

Stage 1: prä-immortale LCLs mit niedriger Telomeraseaktivität und normalem, diploiden Karyotyp

Stage 2: post-immortale LCLs mit starker Telomeraseaktivität und Aneuploidie

Stage 3: post-immortale LCLs mit der Fähigkeit, Kolonien in Agarose zu bilden

Stage 4: post-immortale LCLs mit der Fähigkeit des Koloniewachstums in Agarose und Fähigkeit, in nackten Mäusen zu wachsen

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Schon seit einigen Jahrzehnten wird auf dem Feld der Tumorimmunologie nach humanen Tumorantigenen gesucht, die sich als potentielle immuntherapeutische Ziele eignen, sei es für eine Antikörper-basierte Therapie oder als Basis für die Entwicklung einer Tumorstoffimpfung. Es ist bekannt, dass genetische Veränderungen in Tumorzellen zu einer Reaktivierung von (normalerweise) stillgelegten Keimzellexpressions-Programmen führen, die den Tumoren zentrale Charakteristika von Malignität verleihen. Da gezeigt worden war, dass einige Cancer-Testis-Antigene in der Lage sind, eine spontane humorale und zellvermittelte Immunantwort hervorzurufen, wurden CTAs als mögliche Zielstrukturen für eine Tumorstoffimpfung in Betracht gezogen. Die Beobachtung, dass CTAs auch von LCLs exprimiert werden, führte zu der Frage, ob LCLs als Tumorstoffimpfung verwendet werden können und ob die CTA-Expression bei LCLs einem bestimmten Muster folgt oder ob sie von bestimmten Faktoren abhängig ist bzw. getriggert wird.

Hierbei stellte sich primär die Frage, ob die CTA-Expression in LCLs z.B. mit der Aktivität des Epstein-Barr Virus korreliert bzw. ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Expression einzelner Virus-Proteine und der Expression von CTAs.

In dieser Arbeit wurden, um die Expression von CTAs bei LCLs zu untersuchen, zunächst 20 bestehende LCLs auf ihre CTA-Expression hin untersucht. Es zeigte sich ein von Linie zu Linie unterschiedliches CTA-Expressionsprofil. Um die CTA-Expression bei B-Zellen nach EBV-Transformation im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können und um zu untersuchen, ob sich ein bestimmtes zeitliches CTA-Expressionsmuster bei LCLs zeigen lässt, wurden von gesunden Spendern 11 neue LCLs angelegt und im zeitlichen Verlauf (nach

EBV-Transformation) auf die Expression von 10 verschiedenen CT-Antigenen analysiert. Es wurden dabei Proben in verschiedenen Tages- bzw. Zeitabständen bis Tag 119 (nach Anlegen der Kultur) entnommen und untersucht. Neben der Frage, welches Expressionsmuster sich für die einzelnen LCLs ergibt, wurde geprüft, ob LCLs CT-Antigene in ausreichender Stärke exprimieren, also in ähnlicher Stärke wie Tumoren. Hierfür wurde auf quantitativer und auf Protein-Ebene die Expression von sechs ausgewählten CT-Antigenen bei LCLs mit der CTA-Expression bei Tumoren unterschiedlicher Entitäten verglichen, um zu sehen, ob die Expressionsstärke von CTAs bei LCLs mit derer in Tumoren vergleichbar stark ist.

Da die DNA-Methylierung eine Rolle bei der Expressionsregulation von CT-Antigenen spielt, wurde abschließend versucht, die CTA-Expression bei LCLs durch den Einsatz von DNMTi und HDACi zu regulieren bzw. ihren Einfluss auf die CTA-Expressionsstärke zu untersuchen. Um LCLs als autologe Vakzine zu nutzen, müssen die exprimierten CT-Antigene auch von T-Zellen erkannt werden. Schließlich sollte durch T-Zell-Stimulation die Frage beantwortet werden, ob durch den Einsatz von HDACi und DNMTi CT-Antigene an der Zelloberfläche über den MHC-1-Komplex stark genug präsentiert werden und dadurch eine stärkere T-Zell-Antwort hervorrufen.

3 Probanden, Material und Methoden

3.1 Probanden

Für das Anlegen der lymphoblastoiden Zelllinien wurde Blut von freiwilligen gesunden Spendern verwendet. Die Spender rekrutierten sich aus dem Personal des Jose-Carreras-Zentrums für Immun- und Gentherapie, sowie aus dem Personal des Immunzelllabors der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Daten der Spender wurden verschlüsselt.

3.2 Materialien und Geräte

3.2.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
Agarose Roti [®] Garose	Roth (Karlsruhe, Germany)
(Streptavidin-gekoppelte) Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Germany)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, Germany)
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Sigma-Aldrich (München, Germany)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Germany)
Essigsäure (Eisessig)	Merck (Darmstadt, Germany)
Ethanol	Sigma-Aldrich (München, Germany)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt, Germany)
Guanidinthiocyanat	Roth (Karlsruhe, Germany)
L-Glutamin	PPA (Pasching, Österreich)
IFN- γ -Detektionsantikörper	Mabtech (Nacka Strand, Schweden)
Isopropanol	Hedinger (Stuttgart, Germany)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Germany)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Germany)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Germany)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, Germany)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt, Germany)
Nukleotide (dNTPs)	Roche (Grenzloch-Wyhlen, Germany)
Penicillin-Streptomycin	PAA (Cölbe, Germany)
Phenol, wassergesättigt, pH 4,5-5	Roth (Karlsruhe, Germany)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich (München, Germany)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem (Gatersleben, Germany)

Trizol®	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
X-Vivo™ (Serum-freies Medium)	Lonza (Verviers, Belgien)
Trypanblau	Roth (Karlsruhe, Germany)

3.2.2 Puffer und Lösungen und Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Germany)
RPMI Medium	500 ml RPMI Medium 50 ml FCS 5 ml Glutamin 2,5 ml Penicillin/Streptomycin
50x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Eisessig 0,05 M EDTA
Natriumacetatlösung pH 4,0	2 M NaAc H ₂ O DEPC
Natriumacetatlösung pH 5,2	3 M NaAc Eisessig
Nitrozellulose-Böden	Merck/Milipore (Darmstadt, Germany)
PBS-Puffer, pH 7,2	140 mM NaCl 25 mM KCl 0,5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM Na-K-Phosphat
TENS-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 M NaOH 0,5% SDS ad 100 ml H ₂ O
Stimulationsmedium	X-Vivo™ 10 % (v/v) humanes AB-Serum 10 ng/ml IL-7 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany)
Solution D	250g Guanidiumthiocyanat in 293ml H ₂ O DEPC 0,75 M Natriumcitrat (17,6 ml) 10% N-Lauroyl-Sacrosine (26,4 ml) β-Mercaptoethanol (0,36 ml in 50 ml Stock)

3.2.3 Enzyme und Kits

Name	Bezugsquelle
Ampli-Taq Gold (Hot-Start)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
AP Conjugate Substrate Kits	Bio-Rad-Laboratories (Hercules, USA)
Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare (München, Germany)
MACS®-Technologie	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (Mannheim, Germany)
Trypsin/EDTA	Roth (Karlsruhe, Germany)
Zytokin-Sekretion-Anreicherungs-Kit	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Deutschland)

3.2.4 Primer

Gene	Sense primer	Antisense primer	Annealing Temp.
GAPDH	5' - GAA GGT GAA GGT CGG AG TC	5' - GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	60 °C
GAGE	5' - AGA CGC TAC GTA GAG CCT	5' - CCA TCA GGA CCA TCT TCA	52 °C
MAGE-C1	5' - CGG AGG GAG GAG ACT TA	5' - TTA AGG TGG TGC TCT AGG	61 °C
MAGE-C2	5' - CGG ATC GAA GGC ATT TGT GAG	5' - GTG AAC TCA CGG GCT CTC TTG AG	52 °C
MAGE-A3	5' - TGG AGG ACC AGA GGC CCC C	5' - GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C	64 °C
MAGE-A4	5' - GAG CAG ACA GGC CAA CCG	5' - AAG GAC TCT GCG TCA GGC	67 °C
NY-ESO-1	5' - AGT TCT ACC TCG CCA TGC CT	5' - TCC TCC TCC AGC GAC AAA CAA	65 °C
SSX-1	5' - CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC	5' - AGA TCT CTT ATT AAT CTT CTC AGA AA	56 °C
SSX-2	5' - GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC	5' - TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G	67 °C
SSX-4	5' - AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T	5' - GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC	60 °C
SCP-1	5' - GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG	5' - GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C	60 °C

3.2.5 Größen- und Molekulargewichtsmarker

Die Größe linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle (dsDNA) kann bei der gelelektrophoretischen Auftrennung in Relation zu einem Größenmarker berechnet (abgeschätzt) werden. Zur Anwendung kam die GeneRuler™ 50bp DNA Ladder der Firma Fermentas (Abb. 1). Dieser Größenstandard umfasst DNA-Fragmente von 50bp bis 1000bp in Schritten à 50 bp. Die Lauffront ist zusätzlich mit einem blauen Farbstoff markiert.

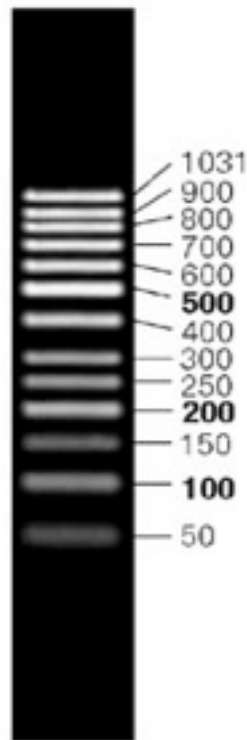


Abb. 1: GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas). Abgebildet ist eine 50bp DNA-Ladder, die zur Größenbestimmung und approximativen Quantifizierung von doppelsträngiger DNA auf Agarose- oder Polyacrylamid-Gel verwendet wird.

3.2.6 Lymphoblastoide Zelllinien

Name	Bezugsquelle
B95-8	Prof. F. Grässer (Universitätsklinikum des Saarlandes - Institut für Virologie)
GS 7/1	selbst angelegt
GS 7/2	selbst angelegt
GS 7/3	selbst angelegt
GS 7/4	selbst angelegt
GS 17	selbst angelegt
GS 40N	selbst angelegt
GS 90N	selbst angelegt
GS 90/2	selbst angelegt
GS 70/126	selbst angelegt
GS 125N2	selbst angelegt
GS 133	selbst angelegt
GS 134	selbst angelegt
GS 141	selbst angelegt
G 355	selbst angelegt
G 393	selbst angelegt
G 418	selbst angelegt

G 476	selbst angelegt
G 478	selbst angelegt
G 506	selbst angelegt
JY	Prof. S. Stevanovic (Inst. für Zellbiologie / Universität Tübingen)
LG2	P. van der Bruggen, Ph.D. (LICR, Brüssel)
MGAR	Prof. S. Stevanovic

3.2.7 Tumorzelllinien

Name	Entität	Bezugsquelle
MCF-7	Mamma-Karzinom	Eigenbestand
Me 275	Malignes Melanom	Dr. D. Speiser (LICR Lausanne)
ESTAB	Malignes Melanom	Dr. A. Waddle (Zürich)
Raji	Burkitt Lymphom	Eigenbestand
HCT 116	Colorektales Karzinom	Eigenbestand
SK-MEL 37	Malignes Melanom	Eigenbestand
SU-DHL-2	B-Zell Lymphom	Eigenbestand
U118	Glioblastom	Prof. Meese (UKS, Homburg)
U 266	Multiples Myelom	Eigenbestand
NB-4	Neuroblastom	Eigenbestand

3.2.8 Geräte

Aufgeführt sind nur solche Geräte mit besonderer Technik und/oder übergeordneter Bedeutung für die Arbeit. Standardgeräte wie Zentrifugen, Wasserbäder etc. sowie Verbrauchsmaterialien (Zentrifugen-Röhrchen, Reagiergefäße etc.) sind nicht aufgeführt. Sterile Ge- bzw. Verbrauchsartikel wurden entweder steril verpackt bezogen oder im Haus autoklaviert.

Gerät	Bezugsquelle
Brutschrank – HERA <i>cell</i> 150	Thermo Electron LED GmbH (Langeselbold, Germany)
BIOREADER 3000 Pro	BIOSYS (Karben, Germany)
Sterile Werkbank – HERA <i>safe</i>	Thermo Electron LED GmbH (Langeselbold, Germany)
Elektrophoresekammer	Biorad (München, Germany)
Feinwaage 440-47	Kern (Balingen, Germany)
Heizblock QBT	neoLab (Heidelberg, Germany)
Heizblock TRIO-Thermoblock	Biometra (Göttingen, Germany)

Kühlzentrifuge 5180R	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Diavert – Mikroskop (Zellzählung)	Leitz (Wetzlar, Germany)
PCR-Gerät PTC200	MJ Research (Waltham, USA)
PCR-Gerät GeneAMP® PCR System 9700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
LightCycler® 2.0	Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany)
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab (Erlangen, Germany)
Autoklav - V 75	Systec (Wettenberg, Germany)
UV/VIS Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg, Germany)
FACS-Calibur	Becton-Dickinson (Heidelberg, Germany)
Fotodokumentationseinheit – High Performance Ultraviolet Transilluminator	UVP (Cambridge, UK)
Videoprinter P91	Mitsubishi (Ratingen, Germany)
Fotodokumentationseinheit (Rechner) – Vilber Lourmat	Peqlab (Erlangen, Germany)

3.2.9 Computersoftware

Diese Arbeit wurde mit verschiedenen Programmen aus dem Microsoft Office-Paket und iWork-Paket erstellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Methoden

3.3.1.1 Allgemeine Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man die Aufrechterhaltung des Wachstums und die Vermehrung vitaler Zellen und Zellverbände *in vitro*. Um Kontaminationen jedweder Art zu vermeiden, werden Zellkulturarbeiten strikt unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Uneingeschränkt wachsende Zelllinien resultieren dabei meist aus Zellauflegern von Tumorzellen, aus unterschiedlich viral transformierten Primärzellen oder auch aus Primärzellen mit auf unterschiedliche Art und Weise ausgeschalteten Faktoren, die *in vivo* das Wachstum kontrollieren und beschränken. Je nach Art des Wachstums unterscheidet man adhärente Zelllinien, die sich von Zellen aus soliden Geweben ableiten. Allerdings organisieren sich solche Zellen *in vitro* nicht (mehr) zu einem Gewebe, sondern wachsen

meist als Einzelschicht (Monolayer) oder in mehrschichtigen Zellschichten (Multilayer). Zur Zellpassage bzw. Subkultivierung wurden adhärenente Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes durch Behandlung mit Trypsin (0,5 mg/ml) und EDTA (0,22 mg/ml) abgelöst. Trypsin ist eine Protease, die die Proteinbrücken zwischen einzelnen Zellen sowie zwischen Zellen und Unterlage auflöst. EDTA, ein sechszähliger Komplexbildner, der besonders stabile 1:1 Chelatkomplexe mit Kationen von einer Ladungszahl von mindestens +2 bildet, da das Ethylendiamintetraessigsäure-Anion 4 Carboxygruppen für eine Komplexverbindung zur Verfügung stellen kann und sich somit 6-fach an ein Kation binden kann, komplexiert $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Danach wurde das überschüssige Trypsin/EDTA-Gemisch ausgewaschen. Den adhärenenten Zellen gegenüber stehen die Suspensionskulturen, die sich typischerweise von Zellen aus dem Knochenmark bzw. Blut ableiten. Auch deren Immortalisierung hat die gleichen Ursachen wie die von adhärenenten Zelllinien.

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert. Diesem halbsynthetischen und gepufferten Nährmedium wurden zusätzlich noch L-Glutaminsäure (2 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 µg/ml) zur Infektionsprophylaxe und je nach Anforderungen der Zelllinie auch fötales Kälberserum (FCS, 10 % bzw. 20 %) zugesetzt.

3.3.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die B-Zellen bilden mit den T-Zellen und den natürlichen Killer-Zellen die Lymphozyten-Population des peripheren Blutes. Zusammen mit den Monozyten wird diese Fraktion der Leukozyten aufgrund ihres mononukleären Status als PBMC (engl. **P**eripheral **B**lood **M**ononuclear Cells) bezeichnet. Der nur einzeln vorliegende Zellkern und weitere zelluläre Eigenschaften sind für die im Vergleich zu den Granulozyten und Erythrozyten geringere Zelldichte der PBMC verantwortlich. Diese Tatsache macht man sich bei Isolierung der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation zu Nutze. Dazu wurden 7-9 ml peripheres EDTA-Blut mit PBS auf 11 ml aufgefüllt. Diese wurden dann in einem Zentrifugenröhrchen auf 4 ml Ficoll-Hypopaque vorsichtig überschichtet. Diese zweiphasige Suspension wurde dann bei Raumtemperatur 30 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abgenommen und verworfen. Danach wurde die Interphase mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und in ein steriles Tube überführt. Die Interphase wurde dann mit 3°C kaltem PBS gewaschen und dann 10 min abzentrifugiert (200 g, 4°C). Der Überstand wurde dann erneut mit kaltem PBS gewaschen und anschließend pelletiert (10 min, 200 g, 4°C). Die Pellets wurden gepoolt und auf Eis gelagert. Abschließend wurden das Pellet mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen gezählt. Nach der Zählung konnten die PBMC in

verschiedener Form genutzt werden (Wegfrieren, FACS-Stimulation, Anlegen von LCLs oder als Elispot).

3.3.1.3 Generierung und Kultur von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)

Die Transformation von B-Zellen durch Epstein-Barr-Viren ist eine sehr effiziente Methode um aus Primärzellen von beliebigen Probanden eine eigene Zelllinie zu etablieren. Oft erreichen diese lymphoblastoiden Linien sogar einen immortalen Status. Unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 2 wurde zunächst EBV-Überstand gewonnen. Dazu wurden Zellen der EBV⁺ Linie B95-8 mit 0,005 µg/ml des Mitogens Phorbol-Myrestol-Acetat (PMA) 4 Tage bei 37°C inkubiert und dabei überstimuliert. Das induziert bei den Viren in den Zellen den Übergang vom latenten in den lytischen Zyklus. In der Folge steigt die Viruslast im Überstand massiv an. Die vergleichbar hohen Titer an EBV-DNA wurden regelmäßig in der Abteilung für Viren-Diagnostik des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes überprüft und bestätigt. Der Überstand wurde filtriert und in 3 ml großen Aliquots bei -80 °C gelagert. So konnte der Überstand für 4 Wochen mit gleich bleibendem virulentem Potential für Transformationen genutzt werden. Für das Anlegen von LCL wurden dann 1×10^7 PBMC in 2,5 ml RPMI-1640 (20% FCS) aufgenommen und dann 2,5 ml EBV-Überstand zupipettiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3-4 Wochen im Brutschrank inkubiert. Stabil wachsende Kulturen wurden alle 3 Tage 1:2 bis 1:3 für die nächste Passage gesplittet.

Von den LCLs wurden in verschiedenen Tages- bzw. Zeitabständen bis Tag 119 nach Stand der Kultur Proben entnommen und auf die CTA-Expression untersucht:

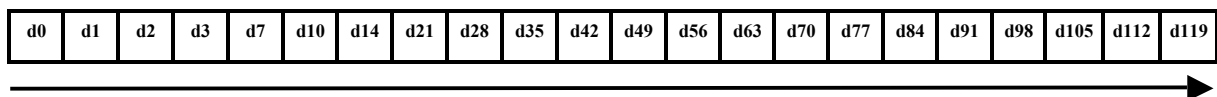


Abb. 2: Zeitachse für die Tage, an denen Proben entnommen wurden

3.3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte nach Neubauer. Hierzu wurde ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension in ein Reagiergefäß geerntet (bei Suspensionszelllinien direkt aus der Kultur und bei adhärennten Linien nach Ablösen). Die Zellen wurden einmal gewaschen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Trypanblau wurden die vitalen Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Um die „Verdünnung“ durch den Trypanblau-Zusatz zu kompensieren, wurden immer 2 Groß-Quadrate à (4 x 4) Kleinquadrate ausgezählt und dann die Zelldichte nach der Neubauer-Formel berechnet. Dabei mussten noch sowohl das Probevolumen in Bezug auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Zelllinien-Suspension als auch der Faktor einer eventuellen Aufkonzentrierung bei der Präparation der Zählprobe

berücksichtigt werden. Auf der Grundlage der so ermittelten Zelldichte wurde dann das Volumen berechnet, das zur Gewinnung einer bestimmten Anzahl von Zellen der jeweiligen Kultur zu entnehmen war.

3.3.1.5 Bereitstellung von Proben adhärenter Zellen für molekularbiologische Analysen

Das alte Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Dann wurden 5-8 ml Trypsin zugegeben und gewartet, bis sich die Zellen abgelöst hatten (ca. 2-5 min). Anschließend wurden 20 ml FCS-haltiges Nährmedium zu der Trypsin-Suspension zugegeben, wodurch das Trypsin abgestoppt wurde. Alles wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (200 g, 5 min, 25°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBC resuspendiert und gezählt, um das notwendige Volumen der Zellsuspension zu ernten. Abschließend wurden die so dosierten Zellen erneut zentrifugiert (800 g, 1 min) und in flüssigem N₂ schockgefroren.

3.3.1.6 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Langzeitlagerung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei Temperaturen zwischen -196 und -150 °C. Um Suspensionszellkulturen einzufrieren, wurden die Zellen zunächst in Medium gewaschen und pelletiert (5 min bei 200 g). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen / 100 µl resuspendiert, wobei für 1×10^6 Zellen 100 µl Einfriermedium verwendet wurden, dann in ein Kryotube überführt und in Stickstoff gelagert. In diesem Zustand können die Zellen für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Das Auftauen eingefrorener eukaryotischer Zelllinien sollte schnell durchgeführt werden. Vorab wurde das Auftaumedium (40% RPMI in FCS) bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und 13 ml Auftaumedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die gefrorenen Zellen im Kryotube wurden anschließend ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in das Auftaumedium überführt. Diese Suspension wurde sofort zentrifugiert (200 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 5 ml Kultur-Medium resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß überführt und im Brutschrank in Kultur genommen.

3.3.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von einzelnen Zellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip bildet die Emission optischer Strahlen durch die Zelle, wenn diese einen Laser passiert. Während der Messung werden die Zellen durch Überdruck so stark beschleunigt, dass sie bei Eintritt in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden. Dieser Vorgang wird als

hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen bzw. der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, das von der Granularität, der Struktur des Zellkerns und der Menge intrazellulärer Vesikel beeinflusst wird. Somit ist die relative Lichtintensität die Messeinheit der Durchflusszytometrie.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen durch Zentrifugation (300 g, 3 min, RT) pelletiert und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl des entsprechenden Antikörpers wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (300 g, 7 min, RT) wurde das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Abschließend wurde der Ansatz in ein systemgerechtes Röhrchen überführt und vermessen. Die Auswertung der dabei erhobenen Daten erfolgte mit der Win Mdi 2.8-Software.

3.3.2 T-Zell-Kultur

3.3.2.1 In-vitro-T-Zell-Stimulationen

Aus Studien war bekannt, dass das SSX2-Peptid p101-111 Antworten zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen im Kontext von HLA-A*0201 induzieren kann^[81]. Um T-Zellen, die spezifisch gegen dieses SSX2-Epitop gerichtet sind, zu generieren, wurden PBMC von Spendern über Ficoll-Dichtegradient isoliert. Daraus wurden die CD8⁺ T-Zellen mittels MACS-Technologie angereichert. Die Fraktion der CD8-negativen Zellen wurde als APC eingesetzt. Dazu wurden die CD8-negativen Zellen in Serum-freiem Medium, 2 mM L-Glutamin mit 2 µg/ml des SSX2-Peptids beladen (1,5 h bei 37 °C), danach mit 30 Gy bestrahlt, gewaschen und in Stimulationsmedium resuspendiert. 1×10^6 Peptid-beladene APC und 1×10^6 CD8⁺ T-Zellen wurden dann in 750 µl Stimulationsmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (Tag d0). Am Tag d1 wurden die Stimulationsansätze mit 250 µl IL-2-Medium auf 1 ml ergänzt. Nach jeweils 7 Tagen erfolgte nach dem gleichen Protokoll eine Restimulation. An den Tagen d21 und d28 wurde die spezifische Reaktivität der in-vitro stimulierten CD8⁺ T-Zellen gegen SSX2/p101-111 im IFN-γ-ELISPOT-Assay getestet.

3.3.2.2. Interferon- γ -ELISPOT-Assay

Werden T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor durch eine komplementäre HLA-Peptid-Kombination spezifisch stimuliert, wird dadurch eine T-Zell-Antwort induziert. Diese führt unter anderem zur Ausschüttung von Zytokinen. Dabei ist das Zytokin-Spektrum je nach T-Zell-Subtyp und Reifegrad der T-Zelle sehr unterschiedlich. IFN- γ wird als „universelles“ Zytokin jedoch sowohl von CD4⁺ T-Helferzellen als auch von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen der unterschiedlichsten Reifestadien sezerniert und eignet sich von daher sehr gut, um eine T-Zell-Antwort zu quantifizieren, wenn keine weitergehende differenzierende Analyse angedacht ist. Die Messung der nach APC-Kontakt sezernierten Zytokine ist dabei prinzipiell auf dreierlei Art möglich. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Zytokine können entweder mittels ELISA analysiert werden oder das Zytokin wird auf einer Membran am Boden um die sezernierende Zelle herum gebunden und anschließend detektiert. Somit kann jede Zytokin-positive Zelle als Spot sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Diese Methode bezeichnet man als „ELISPOT-Assay“. Drittens kann das Zytokin bereits intrazellulär mit entsprechenden Fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert und die T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die T-Zellen gleichzeitig auf mehrere Eigenschaften (weitere Zytokine, Differenzierungscluster) hin charakterisiert werden können. Der Vorteil des ELISPOT-Assays gegenüber der durchflusszytometrischen Analyse liegt in der höheren Sensibilität dieser Methode bei einer gleichzeitig deutlich geringeren Zahl der zur Analyse benötigten T-Zellen. Der ELISPOT-Assay wurde in 96-Well-Platten mit Nitrozellulose-Böden angelegt, die mit anti-IFN- γ -Detektionsantikörper beschichtet worden waren (über Nacht, 4 °C). Danach wurden diese gewaschen, mit 10 % (v/v) humanem AB-Serum geblockt (1,5 h bei 37 °C) und danach nochmals gewaschen. Dann wurden jeweils 5 x 10⁴ der zu testenden, *in-vitro* vorstimulierten CD8⁺ T-Zellen und die APC für ca. 18 h bei 37 °C in 100 μ l Assay-Medium (X-Vivo, 2 mM L-Glutamat) koinkubiert. Die APC waren wie zuvor beschrieben (s. *in vitro*-T-Zell-Stimulationen) mit Peptid beladen: entweder mit dem zur Vorstimulation eingesetzten SSX2-Peptid p101- 111 oder mit einem HLA-A*0201-restringierten Kontroll-Peptid z.B. mit CMV/pp65/p495-503. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände verworfen, die Platten gründlich gewaschen und danach mit biotinylierten IFN- γ -Detektionsantikörper inkubiert (2 h, 37 °C). Erneutes Waschen der Platten und Inkubation (1,5 h bei RT) mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase. Danach wurden die Platten ein letztes Mal gewaschen und die IFN- γ -Spots durch Inkubation (10-15 min

bei RT) mit einer Lösung des AP Conjugate Substrate Kits sichtbar gefärbt. Die Spots wurden mit einem BIOREADER 3000 Pro gezählt. Alle Ansätze in den Assays wurden als Doppelt- bzw. Dreifach-Bestimmungen angelegt. Die statistische Signifikanz-Analyse erfolgte mittels F-Test (Varianz) und zweiseitigem T-Test nach Student (Mittelwerte). Als signifikant unterschiedlich wurden Ansätze mit $p < 0,05$ bewertet.

3.3.2.3 Etablierung Epitop-spezifischer T-Zell-Klone

Spezifisch gegen SSX2/p101-111 reagierende T-Zellen wurden ebenfalls aufgrund ihrer IFN- γ -Sekretion aus dem Stimulationsansatz mit Hilfe des „Zytokin-Sekretion-Anreicherungs-Kit“ angereichert und über eine limitierende Verdünnungsreihe kloniert^[82]. SSX2/p101-111-spezifische CD8⁺ T-Zell-Klone (ELISPOT) wurden expandiert durch 14-tägige Restimulationen unter identischen Bedingungen wie beschrieben (s. in-vitro-T-Zell-Stimulationen).

3.3.3 DNA-Techniken

3.3.3.1 Analytische Minipräparation von Plasmiden nach der TENS-Methode:

Plasmide sind kleine, zirkuläre, extrachromosomale DNA-Moleküle, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen und dort u. a. für die Weitergabe von (Antibiotika-) Resistenzgenen mittels Konjugation verantwortlich sind. In der Molekularbiologie sind sie von Bedeutung, da sie sich relativ einfach gentechnisch manipulieren und in Bakterien einbringen lassen. Auf diese Weise können z.B. Fremdproteine kloniert und Gene vervielfältigt werden. Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab dient die so genannte „Minipräparation“. Die dabei gewonnenen DNA-Mengen sind (z. B.) für die Analyse von Klonierungsschritten ausreichend.

Eine Variante dieser Minipräparation ist die hier angewandte TENS-Methode. Dabei wurden die Bakterien einer 1,5 ml-Übernachtskultur eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst kurz zentrifugiert (15.500 g, 30 s, 25°C) und der Überstand bis auf einen Rest von ca. 50-100 μ l über dem Pellet abgehoben. Das Pellet wurde in 200 μ l LB_{Amp}-Medium (100 μ g/ml) resuspendiert und nach Zugabe von 300 μ l TENS-Puffer und 150 μ l 3 M Natriumacetat (pH 5,2) – nach jeder Zugabe wurde kurz gevortext – wurde der Ansatz zentrifugiert (15.500 g, 4 min, 25 °C). Dieser Überstand wurde in ein steriles Reagier-Gefäß überführt, mit 0,1 ml EtOH 95 % ergänzt und durch Inversion gemischt. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert (15.500 g, 5 min, 25 °C) und das Pellet in 1 ml EtOH 70 % gewaschen. Das Pellet wurde bei RT (22-26 °C) 10 min getrocknet und abschließend in 20 μ l H₂O_{dest} resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.3.2 Analytische Minipräparation von Plasmiden mit der Spin-Methode:

Für die Minipräparation mit der Spin-Methode mittels plasmidPrep Mini Spin Kit (illustra™, GE Healthcare) wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reagier-Gefäß suspendiert und durch Zentrifugation (15.500 g, 1 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde zunächst in 200 µl Lösung I resuspendiert und bis zur vollständigen Suspension gevortext. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben und durch Inversion gemischt. Abschließend wurden nochmals 400 µl Lösung II zugegeben und erneut durch Inversion gemischt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (15.500 g, 4 min, 4°C) und der Überstand auf eine Trennsäule pipettiert. Die Säule wurde 1 min bei RT inkubiert und dann zentrifugiert (15.500 g, 30 s). Der Überstand wurde verworfen und 400 µl Wash Puffer wurden auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (15.500 g, 2 min, RT, Wasch-Überstand ebenfalls verworfen) wurde die Säule in ein frisches Reagier-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 50 µl H₂O_{dest} wurde der Ansatz 1 min bei RT inkubiert und letztmalig zentrifugiert (15.500 g, 1 min, RT). Die Säule wurde dann verworfen und das Eluat mit der Plasmid-DNA bei -20 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3.3 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, deren ursprüngliche Funktion die Abwehr fremder (viraler) DNA durch Fragmentierung war. Jede Restriktionsendonuklease erkennt dabei eine artspezifische DNA-Zielsequenz. Während das eigene Genom durch Methylierung dieser Erkennungssequenz intakt bleibt, werden bei der extragenomischen fremden DNA Phosphodiesterbindungen dieser Zielsequenz gespalten. Für die Molekularbiologie stellen Restriktionsnukleasen somit ideale Werkzeuge dar, um DNA gezielt zu manipulieren, u. a. um zielgerichtet bestimmte DNA-Fragmente zu isolieren, zu klonieren etc.

In der vorliegenden Arbeit kamen die Restriktionsenzyme SmaI, XhoI und HindIII zum Einsatz. Ein analytischer Reaktionsansatz enthielt 2 µl Plasmid-DNA, 10 U Enzym, 15,4 µl H₂O_{dest} und 2 µl des geeigneten 10x Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Bei dem Doppelverdau wurde der Ansatz 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dokumentiert.

3.3.3.4 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden extern am Institut für Immunologie and Genetik, Dr. Thiele, Kaiserslautern (www.immungenetik-kl.de) nach der Didesoxyribonucleotid-Methode gemäß

Sanger durchgeführt. Ein Sequenzieransatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 2-3 µg DNA in 5 mM Tris-HCl pH 8.

3.3.4 RNA-Techniken

3.3.4.1 RNA-Isolierung

In eukaryotischen Zellen befinden sich verschiedene Spezies von RNA. Den größten Teil davon macht die ribosomale RNA (rRNA) aus, der Hauptbestandteil des Ribosoms. Weiterhin findet man Transfer-RNA (tRNA), die als eigentliches Bindeglied zwischen den Aminosäuren und der Gensequenz an der Proteinbiosynthese beteiligt ist, microRNAs, die an der post-transkriptionalen Genregulation beteiligt sind und Messenger-RNA (mRNA), die die proteinkodierende Information des Erbgutes zum Ort der Proteinsynthese trägt. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde zum einen die Phenol-Chloroform-Methode angewandt und zum anderen eine Methode, bei der ein sog. TRIZOL[®] Reagenz Verwendung findet.

3.3.4.1.1 RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode

Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurde sofort 1 ml Lösung D auf die Zellen gegeben. Diese setzt sich aus Guanidiniumthiocyanat, β-Mercaptoethanol und N-Guanosyl-Sarcosin zusammen und lysiert die Zellen. Gleichzeitig werden die Proteine, darunter auch die Ribonukleasen denaturiert. Anschließend wurden 0,1 ml 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 0,2 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (49:1) zupipettiert. Durch Inversion wurde der Ansatz gemischt. Abschließend wurde das Gemisch für 10 s kräftig geschüttelt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C zentrifugiert (4.000 g, 60 min). Nach Zentrifugation wurde die wässrige, RNA-haltige Oberphase (die DNA befindet sich in der Interphase) vorsichtig abgenommen und in ein steriles Reagier-Gefäß überführt. Zum Fällen der RNA wurde 1 ml Isopropanol 100 % zugegeben, über Nacht bei -20 °C inkubiert und die RNA dann durch Zentrifugation pelletiert (15.500 g, 20 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 0,3 ml Lösung D resuspendiert und mit 0,3 ml Isopropanol 100 % bei -20 °C, jetzt jedoch nur 60 min lang, gefällt. Durch Zentrifugation (15.500 g, 10 min) wurde die RNA erneut pelletiert und dann in 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das gewonnene RNA-Pellet konnte dann in 30 µl H₂O_{dest} gelöst und die Konzentration bestimmt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei 80 °C gelagert.

3.3.4.1.2 RNA-Isolierung mit TRIZOL® Reagent

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen in 800 µl TRIZOL® Reagenz (auf RT vortemperiert) suspendiert und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und Herausdrücken durch die Kanüle einer Insulin-Spritze homogenisiert und das Homogenisat sofort auf Eis gelagert. Dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben und gründlich 1 min gevortext. Nach dem Aufwirbeln wurde der Ansatz erneut für 10 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (12.000 rpm, 30 min, 4 °C) kommt es zur Auftrennung in drei Phasen, wobei in der wässrigen Oberphase die RNA enthalten ist. Diese Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit einem Äquivalent an eiskaltem Isopropanol aufgefüllt und invertiert. Zum Fällern wurde die RNA über Nacht bei -20 °C inkubiert und durch Zentrifugation (13.300 g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem Ethanol 75 % gewaschen (Zentrifugation, 5300 g, 5 min, 4 °C). Die RNA wurde bei RT 10 min getrocknet und in 30 µl DEPC-H₂O gelöst, 20 min auf Eis inkubiert und dann die Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.5 cDNA-Synthese: Reverse Transkription

Unter cDNA (complementary DNA) versteht man die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA hergestellte komplementäre DNA. So genannte „random hexamer“-Oligonukleotide dienen als Startpunkt für die Erststrangsynthese. Sie lagern sich entlang der RNA an und fungieren als Anker für die Reverse Transkriptase und definieren so die Startpunkte für die reverse Transkription. Von 5' nach 3' fortlaufend erstellt dann die Reverse Transkriptase in Anwesenheit von dNTPs einen komplementären DNA-Strang. Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mit Hilfe der Super Script II Reversen Transkriptase (Invitrogen) durchgeführt. 2 µg RNA wurden mit DEPC-H₂O auf insgesamt 11,2 µl aufgefüllt. Zu diesen 11,2 µl wurden 1 µl dT18-Primer gegeben und anschließend 5 min im Heizblock bei 65 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 7,8 µl vom Mastermix hinzu gegeben, gevortext und erneut im Heizblock zunächst 60 min bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Pipettier-Schema für den Mastermix-Ansatz [7,8 µl Ansatz] für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen [µl]
First Strand Puffer	4
dNTP's	1
0,1 M DTT	2
Reverse Transkriptase	0,8

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion / Polymerase chain reaction (engl., PCR)

3.3.6.1 Semiquantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur gezielten Vervielfältigung von DNA definierter Länge und Sequenz (Mullis & Faloona, 1987). Bei diesem Verfahren werden DNA-Polymerasen verwendet, die aus thermophilen Mikroorganismen isoliert werden und somit thermostabil sind, so dass sie auch bei hohen Temperaturen ($> 95\text{ °C}$) aktiv sind. Ausgehend von einer einzelsträngigen DNA-Vorlage (Template) wird in multiplen Reaktionszyklen eine exakte komplementäre DNA-Kopie erstellt.

In einem ersten Schritt wird das heterogene dsDNA-Gemisch durch hohe Temperaturen denaturiert. Durch Inkubation bei 95 °C werden die nichtkovalenten chemischen Wechselwirkungen zwischen den beiden DNA-Molekülen eines Doppelstranges gelöst und dieser somit in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Amplifikation vorbereitet. Hierzu wird die Temperatur soweit reduziert, dass die synthetischen Oligonukleotide (Primer) sequenzspezifisch an die ssDNA (single strand DNA = einzelsträngige DNA = Template) hybridisieren. Dieser Vorgang des Annealings definiert die Startpunkte der DNA-Synthese. Die optimale Temperatur zur Primer-Hybridisierung ist abhängig von deren Länge und Sequenz. Das Reaktionsgemisch wurde nun auf 72 °C erwärmt – bei dieser Temperatur erreicht die Polymerase ihre optimale Reaktionsgeschwindigkeit. Es erfolgt ein nukleophiler Angriff des 3'-Hydroxyendes des Oligonukleotids an das α -Phosphat des Desoxynukleosidtriphosphats (dNTPs), welches unter Abspaltung von Pyrophosphat kovalent an den Primer gebunden wird. Diese chemische Reaktion wird von der Polymerase in hoher Geschwindigkeit und Präzision katalysiert. Die DNA wird somit anhand ihres Templates verlängert (Elongation).

Das Resultat ist eine anhand eines festgelegten Startpunktes sequenzspezifische DNA-Kopie. Diese Kopie kann in nachfolgenden Reaktionsrunden ebenfalls als Template fungieren. Durch

mehrmalige Wiederholung dieser Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Auffüllreaktion wird die gewünschte DNA-Sequenz so mit dem *in vitro* Verfahren der PCR exponentiell vermehrt.

„Semiquantitativ“ bedeutet hierbei, dass dieses Verfahren prinzipiell qualitativen Charakter hat und nur ungefähre Mengenverhältnisse nachgewiesen und vergleichend, relativ zu einem Standard, abgeschätzt werden können. Limitierend dabei ist zum einen das PCR-Verfahren per se, da es theoretisch nur eine Verdopplung der DNA pro Zyklus erlaubt, jedoch in der Praxis zumeist nur eine 1,6 – 1,9fache Vermehrung der DNA zulässt. Zum anderen ist die DNA-Nachweismethode mittels agarosegelelektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid zur exakten Quantifizierung ungeeignet.

Tabelle 2: Pipettier-Schema für Standard-PCR-Ansatz [30µl Ansatz]

Komponente	Volumen [µl]
H ₂ O _{dest}	24,6
10x Puffer	3
dNTP's	0,2
Primer forward	0,5
Primer reverse	0,5
Taq-Polymerase	0,2
cDNA	1

Der PCR-Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und abschließend 1µl cDNA hinzugegeben. Die PCR wurde in einem PCR-Gerät nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 3: Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Denaturierung	94	12
Denaturierung	94	1
Annealing	52-67	1 35 Zyklen
Extension	72	1
Letzte Extension	72	12
Pause	4	∞

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von dem eingesetzten Primerpaar und variierte bei den in dieser Arbeit eingesetzten Primern zwischen 52 und 67 °C. Die Anzahl der Zyklen ist je nach PCR-Protokoll variabel und wurde zuvor empirisch bestimmt. Es gilt hierbei, dass low-copy Gene, also Gene, welche nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommen, mit hoher PCR-Zyklenzahl (36 Zyklen) nachgewiesen wurden. Für Plasmid-DNA (in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet) und house-keeping Gene (in dieser Arbeit GAPDH als

Kontrolle eingesetzt) wurden PCR-Programme mit weniger Zyklen verwendet (25 Zyklen). Um die Funktion der PCR beurteilen zu können, wurde als Positivkontrolle immer eine Plasmid-Verdünnungsreihe ($1:10^3$, $1:10^5$, $1:10^7$) und als Negativkontrolle, sowie zur Überprüfung auf etwaige Kontamination ein Ansatz mit H_2O_{dest} (komplett, aber ohne Template) angesetzt.

3.3.6.2 Quantitative PCR (qPCR)

Im Gegensatz zu der „semiquantitativen“ PCR ist die quantitative PCR eine molekularbiologische Technik, die es ermöglicht, die Amplifikation von DNA-Fragmenten in Echtzeit zu verfolgen und zu quantifizieren. Für die Quantifizierung werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie Ethidiumbromid oder SYBR Green I verwendet, die mit der DNA interkalieren. Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wie Taqman-Sonden oder LightCycler-Sonden nutzen das FRET (fluorescence resonance energy transfer) genannte Phänomen. Hierbei gibt ein Donor-Fluorochrom, das durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von o.g. LightCycler-Sonden. Zwei verschiedene, jeweils mit einem FRET-Donor bzw. FRET-Akzeptor markierte Oligonukleotide, die nebeneinander an die Ziel-Sequenz binden und damit die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe bringen, können als Sonden für die Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit angewandte Technik bedient sich des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Diesem Nachteil wurde in dieser Arbeit dadurch Rechnung getragen, dass sowohl eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte als auch eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Reaktion durchgeführt worden ist. Beide Kontrollen dienen der Identifikation mehrerer PCR-Produkte. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur ($50\text{ °C} \rightarrow 95\text{ °C}$) aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung

möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt zudem einen Anhaltspunkt über die Menge des gebildeten Fragments.

Die qPCR wurde in einem LightCycler® 2.0 der Firma Roche mit dem dazugehörigen LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit durchgeführt.

Es wurde mit folgendem PCR-Standard-Ansatz gearbeitet, wobei die Volumina der einzelnen Komponenten variierten (s. folgende Pipettierschemata):

Tabelle 4: Standard qPCR-Ansatz [20 µl]

Komponente	Volumen [µl]
H ₂ O _{dest}	10,8 – 12,4
MgCl ₂	1,6 – 3,2
Primer-Mix	2
SYBR Green I	2
cDNA	2

Der Reaktionsansatz wurde in eine Glaskapillare pipettiert, die in einem vorgekühlten (4°C) Metallblock stand. Es wurden 2 µl cDNA zugegeben, die Glaskapillare verschlossen und anschließend vorsichtig kurz abzentrifugiert (max. 800 g). Nach Positionierung der Kapillare im LightCycler® Karussell wurde das Karussell in die LightCycler® PCR Maschine eingesetzt.

Die Annealing-Temperatur variierte entsprechend dem Primer, das qPCR-Programm sah aber prinzipiell wie folgt aus:

Tabelle 5: Standard qPCR - Programm

Modus	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min : s]
Quantifizierung	Denaturierung	95	15 : 00
	Denaturierung	95	00 : 10
	Annealing	56-67	00 : 04
	Elongation	72	00 : 20
Schmelzkurve	Denaturierung	95	00 : 00
	Annealing	65	15 : 00
	Melting	65-95	00 : 00

Der sog. „threshold-cycle“ C_t (C_p „crossing point“) ist als der PCR-Zyklus definiert, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Diese Zykluszahl ist Grundlage für die Kalkulation der Produktmenge. Bei dieser Arbeit wurde das gewünschte PCR-Produkt in das Verhältnis zu einer internen Kontrolle (GAPDH = Referenzgen) gesetzt. Weiterhin wurde für die Bestimmung der PCR-Effizienz bei jedem Lauf eine Template-Verdünnungsreihe mit gemessen.

Um die Qualität der quantitativen Realtime-PCR hinsichtlich der entstandenen PCR-Amplifikate zu überprüfen, wurde die Möglichkeit genutzt, eine Schmelzpunktanalyse mit den in der PCR generierten PCR-Produkten durchzuführen. Anhand dieser Schmelzpunktanalyse können unspezifische Produkte, wie zusammengelagerte Primer und DNA-Kontaminationen in den Proben festgestellt werden. Bei der Schmelzpunktanalyse werden die PCR-Produkte in mehreren Zyklen einem Temperaturgradienten ausgesetzt und dabei das Fluoreszenz-Signal der Signalgeber aufgenommen. Der Schmelzpunkt der PCR-Produkte ist dabei von der Sequenz und der Länge der Nukleinsäurekette abhängig, so dass jeder DNA-Doppelstrang bei einer charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur, in seine zwei Einzelstränge zerfällt und die entstandenen PCR-Produkte verschiedener Länge erkannt werden können, da eine Unterscheidung anhand der Fluoreszenzabnahme bei Zunahme der Temperatur möglich ist.

3.3.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Gemischen erfolgt standardisiert im Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Hierbei wandert die negativ geladene DNA zur Kathode. Die Gelmatrix sorgt dabei für die Auftrennung der DNA-Fragmente, da sie als Sieb wirkt, in dem sich kleinere Fragmente schneller bewegen können als größere. Der Grad der Vernetzung der Agarosematrix richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. In dieser Arbeit wurden 2 %ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Detektion der DNA-Fragmente ist mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid möglich, der bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert.

Dazu wurde Ethidiumbromid in die etwas abgekühlte, aber noch flüssige Lösung in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml gegeben, die Lösung in einen entsprechenden Gelträger gegossen und anschließend das dann erstarrte Agarosegel zur Elektrophorese in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Lauf-Kammer platziert. Die DNA-Gemische wurden mit 5x Probepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Abschließend wurde eine elektrische Spannung von 5-7 V/cm angelegt.

Nach dem Lauf wurde die in den analytischen Gelen aufgetrennte DNA mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

3.3.8 Behandlung lymphoblastoider Zelllinien mit DNA-Methyltransferase 1- (DNMT1-) und Histon-Deacetylase- (HDAC) Inhibitoren

Die Transkriptionsrate der CT-Gene und somit die Expression der entsprechenden Antigene kann durch den kombinierten Zusatz von DNMT1- und HDAC-Inhibitoren zum Zellkultur-

medium erhöht werden. Beide Substanzklassen besitzen jedoch auch ein zytotoxisches Potential. In Vorversuchen wurde die Verträglichkeit des DNMT1-Inhibitors *5-Azacytidin* (5-Aza, Vidaza®) mit bis zu 2 µM über 72 h ermittelt. Laut Literatur liegt die Dosis in den meisten Studien mit vergleichbarer Fragestellung bei 1 µM. Deshalb wurde 5-Azacytidin 1 µmolar eingesetzt. Die Literaturangaben über die Konzentration der drei verwendeten HDAC-Inhibitoren *Valproat* (Depakene®), *Suberoylanilid Hydroxyamid Säure* (SAHA, Vorinostat®) und *Trichostatin A* (TSA) bezüglich eines optimalen Verhältnisses von Wirksamkeit zu Verträglichkeit schwanken über einen großen Bereich. Die in Tabelle 6 angegebenen Daten liegen im mittleren Bereich der Literaturwerte. Für die Untersuchung wurden 5 LCLs eingesetzt, die nativ ein unterschiedliches Spektrum an CTAs exprimieren: bei MGAR waren unbehandelt keine CTAs nachzuweisen. Dagegen exprimierten auch die nativen Zellen von JY mehrere CTAs. Zur Behandlung wurden von jeder Linie 4 Ansätze à $1,2 \times 10^7$ Zellen in 30 ml Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, Pen/Steep, 2 mM L-Glu) vorgelegt. Diese wurden gemäß dem in Tabelle 6 dargestellten Schema behandelt. Dabei wurde nach 0, 12, 24 und 48 h jeweils das komplette Medium des Ansatzes erneuert und mit den angegebenen Zusätzen ergänzt. Um eine Verdünnung der 12 h zuvor eingesetzten HDAC-Inhibitoren zu vermeiden wurde nach 36 bzw. 60 h Azacytidin lediglich ergänzt. Aufgrund der nur sehr geringen Halbwertszeit von 5-Azacytidin (4 h) und SAHA wurden deren Stock-Lösungen täglich frisch angesetzt. Ein Ansatz blieb unbehandelt. Auch bei diesen Zellen wurde, genau wie bei den behandelten 4 Ansätzen, das Medium zu den jeweiligen Zeiten komplett erneuert. Nach 72 h wurden die Zellen aller Ansätze geerntet, zentrifugiert und die Zell-Pellets zur Isolierung der RNA eingesetzt.

Tabelle 6: Behandlungsschema der LCL mit dem DNMT1-Inhibitor 5-Azacytidin in Kombination mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor

	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
5-Azacytidin	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	Ernte
Valproat	-	-	750 µM	-	750 µM	-	
SAHA	-	-	5 nM	-	5 nM	-	
TSA	-	-	-	-	65 nM	-	

4 Ergebnisse

4. Expression von CT-Antigenen in Lymphoblastoiden Zelllinien

4.1 Häufigkeit der CTA-Expression

Es wurden 20 bereits etablierte LCLs qualitativ mittels RT-PCR auf ihre CT-Antigenexpression hin untersucht. Dabei variierte die Anzahl der exprimierten CT-Antigene bei den einzelnen Linien (Abb.1). 70% der untersuchten LCLs exprimierten mindestens ein CT-Antigen. 50% exprimierten zwei oder mehr CT-Antigene. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 20% der untersuchten LCL sogar sieben oder mehr CT-Antigene exprimierten und damit fast 60% der insgesamt 11 untersuchten CT-Antigene.

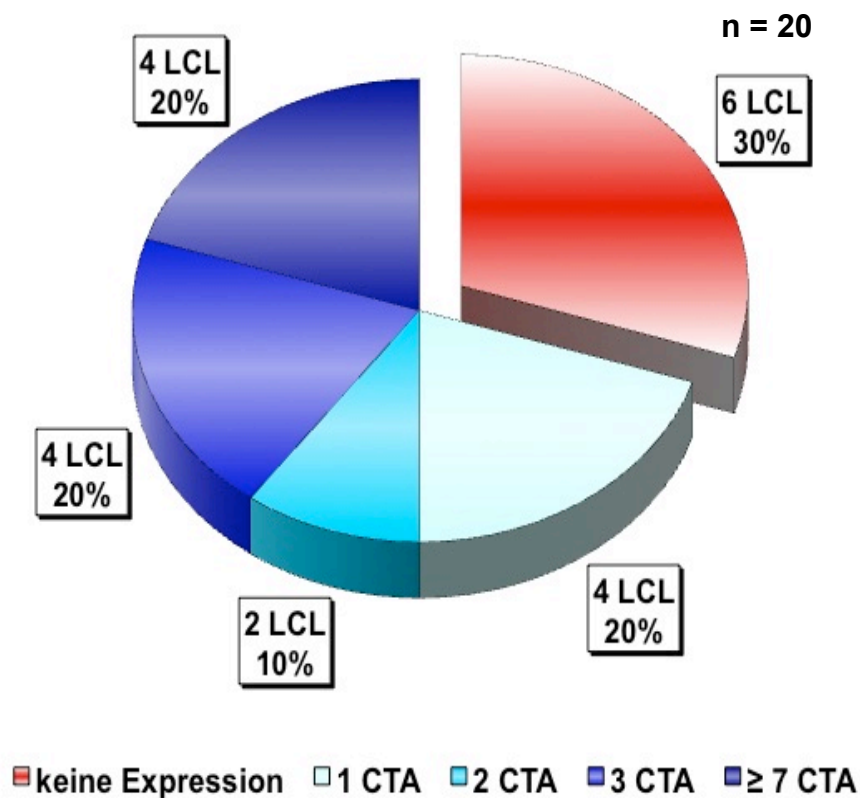


Abb. 3: Prozentuale Verteilung, mit der die LCLs die untersuchten CT-Antigene exprimieren, aufgeschlüsselt nach der Anzahl der exprimierten CT-Antigene (RT-PCR Ergebnisse)

4.2 Expressionrate der einzelnen CT-Antigene

Die Auswertung der PCR-Daten ergab, dass SSX4 in 50 % der untersuchten Linien und somit am häufigsten exprimiert wurde, gefolgt von GAGE mit 45 %. MAGE A4 und NY-ESO-1 wurden von nur 5 % der LCLs exprimiert und zeigten damit die geringste Expressionsrate. Die Expression des CT-Antigens BORIS konnte bei keiner der untersuchten Lymphoblastoiden Zelllinien nachgewiesen werden.

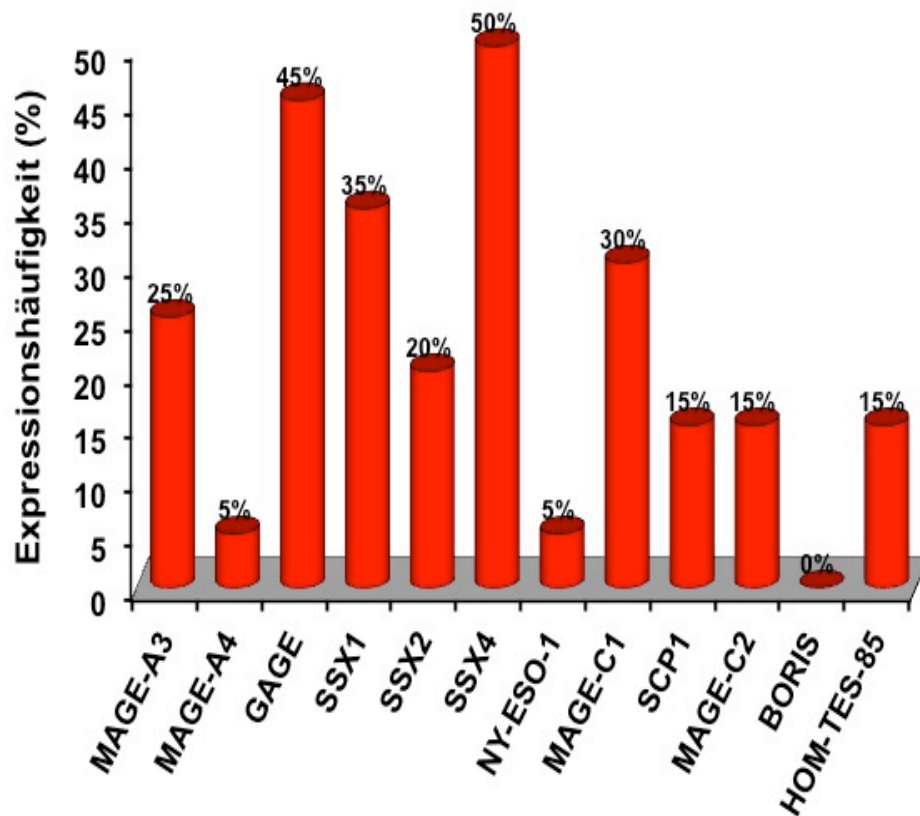


Abb. 4: Relative Expressionshäufigkeit von 11 CT-Antigenen bei 20 LCLs (Untersuchung auf mRNA Ebene)

4.3 Die Expression von CT-Antigenen im Verlauf der viralen Transformation von B-Zellen

Auf Grund der Beobachtung, dass LCLs verschiedene CT-Antigene exprimieren, wurden B-Zellen von 11 Spendern mit Epstein-Barr-Virus transformiert und daraus neue LCLs angelegt. Im Verlauf der Transformation wurden die Linien nach einem vorgegeben Zeitschema auf ihr CTA-Expressionsprofil hin untersucht. Untersucht wurde dabei die Frage, ob die CTA-Expression bei LCLs einem bestimmten Schema folgt: welches CT-Antigen wird zu welchem

Zeitpunkt exprimiert und erfolgt die Expression mit der Zeit konstant? Da naive B-Zellen keine CT-Antigene exprimieren, war es somit gleichzeitig möglich, zu untersuchen, ab welchem Zeitpunkt die Expression dieser Antigene beginnt. Um weiterhin zu überprüfen, ob die CTA-Expression im Verlauf der Transformation dem gleichen oder einem individuellen Muster folgt, wurden von ein und demselben Spender je 3 Linien und von einem zweiten Spender je 2 Linien angelegt. Wie unter Punkt 2.6 im Kapitel Einleitung (Seite 11) beschrieben, wurde in einem bestimmten Zeitabstand jeweils eine Probe entnommen und dann mittels RT-PCR das CTA-Expressionsprofil auf qualitativer Ebene ermittelt. Mit Hilfe einer Plasmid-Titration der entsprechenden PCR-Fragmente als Positivkontrolle konnte zum einen eine verlässliche untere Ausschlussgrenze definiert werden, und zum anderen konnte sie gleichzeitig als Hinweis für die Stärke der mRNA-Expression (wie exemplarisch in Abb.3 dargestellt) herangezogen werden.

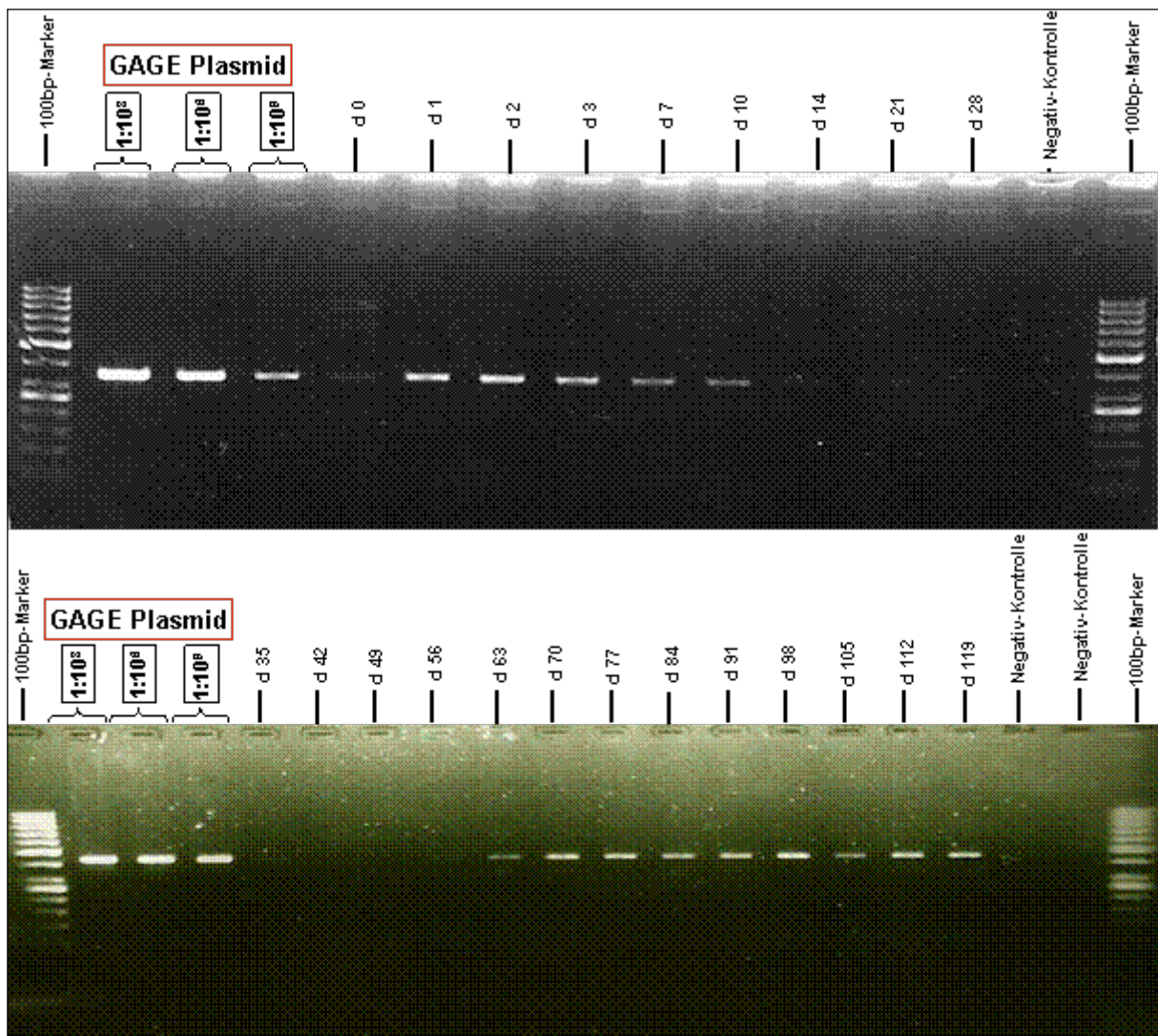


Abb. 5: Exemplarische Darstellung der zeitabhängigen Expression von GAGE bei der LCL GS133N. Auf entsprechender Höhe (600bp) sind die Expressionsbanden für die einzelnen Tage, an denen Expressionsdaten erhoben wurden, abgebildet. Zudem ist die entsprechende Positivkontrolle als Verdünnungsreihe abgebildet.

Für die Untersuchung auf mRNA-Ebene mussten zwischen 1×10^6 - 1×10^7 Zellen eingesetzt werden, um ausreichend RNA für die cDNA-Synthese isolieren zu können. Vereinzelt war es nicht immer möglich, genügend Zellen für die RNA-Isolation zu gewinnen, so dass an den entsprechenden Tagen keine Expressionsanalyse durchgeführt werden konnte.

In den folgenden Tabellen wird, wie vorangehend beschrieben, die CTA-Expression nach EBV-Transformation im zeitlichen Verlauf für jede einzelne der 11 neu angelegten Linien dargestellt und ausgewertet.

**Tabelle 7: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL
GS 7/2**

LCL: GS 7/2	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d2	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
d3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d7	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
d10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d23	++	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-
d28	+++	++	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	-
d35	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
d42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d49	+++	+++	+++	-	+++	-	+	-	+++	-
d56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d63	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
d70	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
d77	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
d84	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
d91	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
d98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d105	+++	+++	++	+++	-	+++	+++	-	+++	-
d112	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d119	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	-

Dabei steht "+" für eine Expression und "-" bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen "+" dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Von der Linie GS 7/2 wurden (im untersuchten Zeitraum) bis auf NY-ESO-1 alle untersuchten CT-Antigene exprimiert. Die Expression von MAGE 3 konnte insgesamt an nur

4 (d84, d91, d105, d119) der untersuchten Tage nachgewiesen werden, während die Expression der übrigen CT-Antigene fast durchgehend war. GAGE konnte an allen untersuchten Tagen nachgewiesen werden.

**Tabelle 8: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL
GS 7/3**

LCL: GS 7/3	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d7	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-
d35	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
d42	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-
d49	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d56	-	-	-	-	+++	-	-	-		-
d63	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
d77	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d84	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d91	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d105	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Die Linie GS 7/3 exprimierte im Untersuchungszeitraum ausschließlic GAGE und MAGE 4 und damit zwei der zehn untersuchten CT-Antigene. Beide CT-Antigene zeigten ein ähnliches Expressionsverhalten, so konnte ihre Expression zu Beginn des Untersuchungszeitraums und dann wieder ab d28 nachgewiesen werden. Die Linie GS 7/3 exprimierte MAGE 4, bis auf d70, durchgehend an d28 – d105. Die Expression von GAGE konnte ab d63 durchgehend an den untersuchten Tagen nachgewiesen werden.

**Tabelle 9: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL
GS 7/4**

LCL: GS 7/4	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1 neu	GAGE	NY- ESO 1
d0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d7	-	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-
d35	-	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-
d42	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-
d49	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d56	-	-	-	-	+++	-	-	-		-
d63	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
d77	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d84	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d91	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d105	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d112	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Von der Linie GS 7/4 wurden am häufigsten MAGE 4 und GAGE exprimiert. Die übrigen untersuchten CT-Antigene wurden nur sehr vereinzelt (SSX-Familie) oder gar nicht exprimiert. Bei der zeitabhängigen Auswertung zeigte sich, dass MAGE 4 fast durchgehend exprimiert wurde, ausgenommen die Tage 1, 2, 10, 14, 21 und 70. GAGE wurde dagegen an einigen Tagen (subjektiv) nur sehr schwach exprimiert, zeigte dann jedoch eine konstante Expression an den untersuchten Tagen ab Tag 63.

Tabelle 10: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 40N

LCL: GS 40N	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d63	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d105	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d112	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d119	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Bei der Linie GS 40 konnte die Expression von nur einem CT-Antigen gezeigt werden, so wurde SSX4 konstant ab d105 an den untersuchten Tagen exprimiert.

Damit exprimierte die Linie GS 40 im untersuchten Zeitraum ausschließlich ein CT-Antigen.

Tabelle 11: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 70/126

LCL: GS 70/126	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d7	-	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d35	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d42	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d49	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d56	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d63	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d77	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d84	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d91	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d105	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d112	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Bei der LCL GS 70/126 wurde ausschließlich die Expression von MAGE 4, GAGE und SSX 2 und damit von drei CT-Antigenen nachgewiesen. Die Expression von MAGE 4 und GAGE konnte hierbei konstant ab Tag 28 nachgewiesen werden (Ausnahme ist d70 bei MAGE 4). Im Gegensatz dazu konnte die Expression von SSX 2 nur einmalig an d7 nachgewiesen werden.

Tabelle 12: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 90N

LCL: GS 90N	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d7	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d63	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d70	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
d77	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d84	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d91	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
d105	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d112	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d119	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Die Linie GS 90N zeigte im Untersuchungszeitraum die Expression von 5 verschiedenen CT-Antigenen. Bei dieser Linie konnte im zeitlichen Verlauf die Expression aller untersuchten CT-Gene aus der SSX-Familie, teilweise jedoch an verschiedenen Zeitpunkten, nachgewiesen werden. Zudem konnte die Expression von Scp1 einmalig an d63, und die von GAGE an den Tagen 105, 112, 119 nachgewiesen werden.

Tabelle 13: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 90/2

LCL: GS 90/2	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d7	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-
d56	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-
d63	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-
d70	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-
d77	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
d84	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
d91	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d105	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d112	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-
d119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Bei der Linie GS 90/2 zeigte sich ein sehr breites Expressionsmuster: so konnte im Verlauf die Expression von 7 der 10 untersuchten CT-Antigene gezeigt werden. Am häufigsten wurde hierbei die Expression von GAGE, sowie SSX2 und SSX4 nachgewiesen. Die Expression von GAGE wurde durchgehend an allen untersuchten Tagen ab d42 beobachtet. Die Expression von SS2, SSX4 und MAGE-C1 begann bei der LCL GS 90/2 synchron ab d42.

Im Vergleich zeigte sich somit bei den LCLs GS90 und GS 90/2 ein unterschiedliches CTA-Expressionsmuster, obwohl die Linien von ein und demselben Spender stammen.

Tabelle 14: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 125N

LCL: GS125N	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
d2	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-
d3	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	-
d7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d10	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-
d14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d28	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d49	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d56	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
d63	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d70	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
d77	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d84	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d91	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-
d105	+++	+++	-	++	+++	-	-	-	+++	-
d112	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Die Linie GS125N exprimierte insgesamt 6 der 10 untersuchten CT-Antigene. Die CT-Antigene SSX1, SSX2, MAGE4 und GAGE wurden am häufigsten exprimiert. Während SSX1, SSX2 ab d70 exprimiert wurden, zeigte sich bei MAGE4 und GAGE ein anderes Expressionsverhalten.

Tabelle 15: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 133N

LCL: GS133N	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d7	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d10	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d63	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d70	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d77	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d84	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d91	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d105	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d112	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d119	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Die LCL GS 133N exprimierte 2 der 10 untersuchten CT-Antigene. Es wurden ausschließlich SSX1 und GAGE exprimiert, wobei GAGE von der Linie fast durchgehend exprimiert wurde, einzig an den Tagen 14-35 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die Expression von SSX1 verhielt sich ein wenig unterschiedlich, so konnte hier eine durchgehende Expression an den Tagen 1-10 gezeigt werden und danach erneut nur an einzelnen Tagen, wobei die Expression zum Ende der untersuchten Tage wieder zuzunehmen schien, zeigte sich doch eine durchgehende, wenn auch teilweise schwache, Expression an den Tagen 105, 112 und 119.

Tabelle 16: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 134

LCL: GS 134N	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
d7	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
d10	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d42	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
d56	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d63	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d77	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Die Expression von CT-Antigenen bei der Linie GS 134 setzte sehr früh ab d1 mit der Expression von GAGE ein, dessen Expression auch am häufigsten im untersuchten Zeitraum nachgewiesen werden konnte. Es wurde kurz am Anfang (d1, d2, d3) und dann durchgehend an den untersuchten Tagen 28 – 77 exprimiert. Zudem konnte an den Tagen d2, d3, d7, 10 die Expression von SSX 2 gezeigt werden. Somit exprimierte die LCL GS 134N insgesamt 2 der untersuchten CT-Antigene.

Tabelle 17: CTA-Expression im Verlauf der EBV-Transformation der LCL GS 141

LCL: GS 141	SSX 1	SSX 2	SSX 4	MAGE 3	MAGE 4	Mage C1	Mage C2	Scp 1	GAGE	NY- ESO 1
d0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d3	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d7	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d28	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	-
d35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d42	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
d49	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d63	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
d77	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d84	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d91	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
d98	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
d105	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-
d112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d119	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Dabei steht “+” für eine Expression und “-“ bedeutet, dass keine Expression vorlag. Die einzelnen “+” dienen als subjektive Abstufung je nach Bandenstärke. + = schwach, ++ = medium, +++ = stark

Wie bei fast allen untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien zeigte sich auch bei der Linie GS 141N die Expression von GAGE und den untersuchten CT-Genen der SSX-Familie. Die Expression von GAGE konnte an fast allen untersuchten Tagen gezeigt werden, während die Expression der CT-Gene der SSX-Familie nur vereinzelt am Ende des Untersuchungszeitraums zu beobachten war. Insgesamt exprimierte die Linie GS 141N somit im Verlauf 4 der untersuchten CT-Antigene.

4.3.1 Zeitlicher Verlauf der CT-Antigenexpression nach EBV-Transformation

Zusammengefasst lassen sich aus den vorhergehenden Ergebnissen in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der CTA-Expression folgende Schlüsse ziehen:

Es ist kein allgemeingültiges Zeit-Schema erkennbar. Dies gilt für alle 11 neu angelegten LCLs, unabhängig davon, ob es sich um die Linien von unterschiedlichen Spendern handelt oder um die verschiedenen Linien ein und desselben Spenders (GS7/2, GS7/3 und GS7/4 bzw. GS90/N und GS90/2). Es gibt keinen erkennbaren einheitlichen Zeitpunkt, der den Beginn der CTA-Expression (im zeitlichen Verlauf nach EBV-Transformation) markiert. So wurde im Falle der LCL GS 141 das CT-Antigen GAGE bereits an Tag d1 exprimiert, die Expression von SSX 4 hingegen konnte bei dieser LCL erstmalig an Tag d105 nachgewiesen werden. Auch bei den übrigen LCLs lässt sich kein einheitlicher Zeitpunkt als Expressionsbeginn ausmachen.

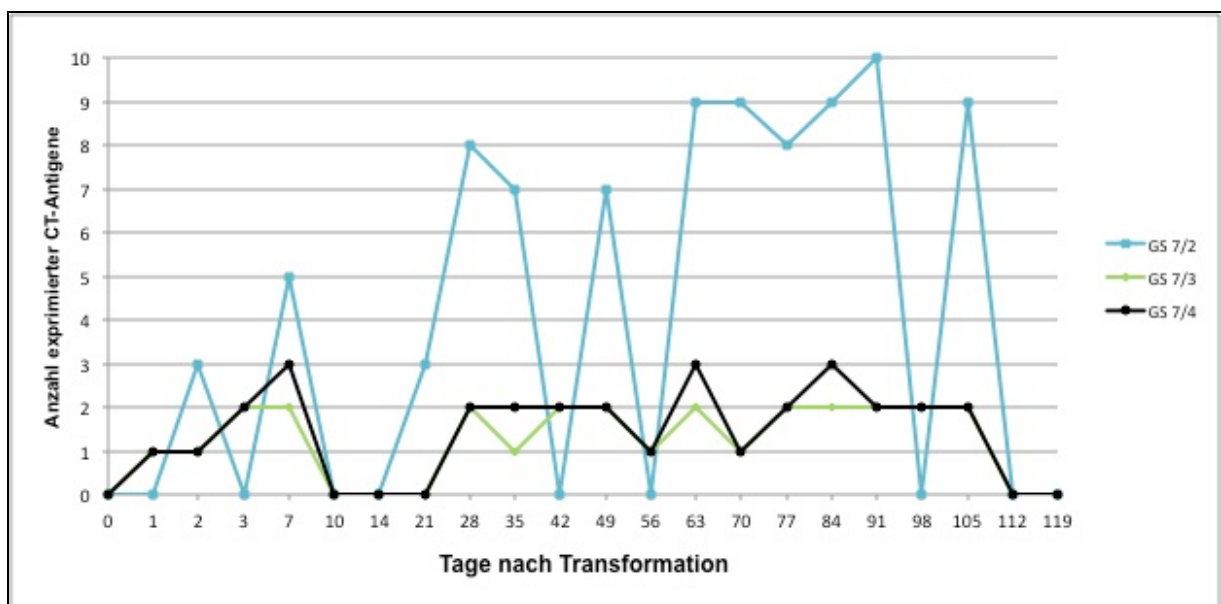


Abb. 6: Linienspezifische, zeitabhängige Expressionsverteilung der untersuchten C/T-Antigene von 3 LCLs desselben Spenders

Die Auswertung (s. Abb 4-6) zeigte, dass sich B-Zellen nach Transformation immer individuell unterschiedlich verhalten. So gab es keinen bestimmten Zeitpunkt, der einheitlich bei allen untersuchten Linien den Beginn der CTA-Expression markiert. Zudem zeigten sich zusätzlich intraindividuelle Unterschiede, da es auch bei den untersuchten Linien desselben Spenders kein einheitliches Zeitmuster gab (s. Abb 4 und 5). Somit ließ sich kein einheitlich Muster erkennen bzw. aufzeigen, was den Expressionsbeginn der untersuchten CT-Antigene angeht.

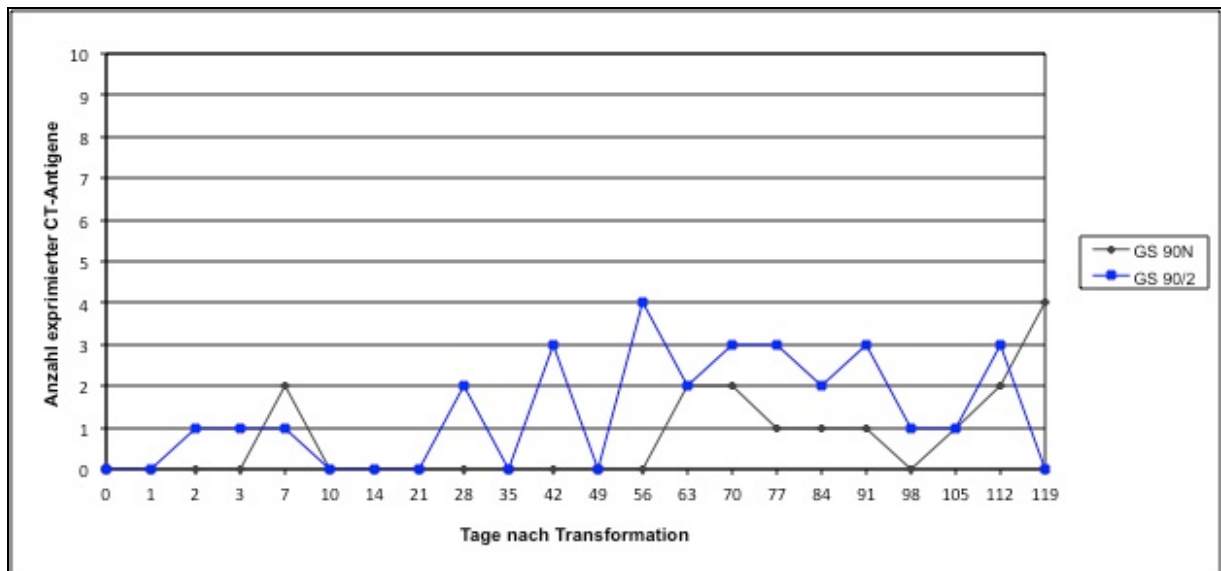


Abb. 7: Linienspezifische, zeitabhängige Expressionsverteilung der untersuchten C/T-Antigene von 2 LCLs desselben Spenders

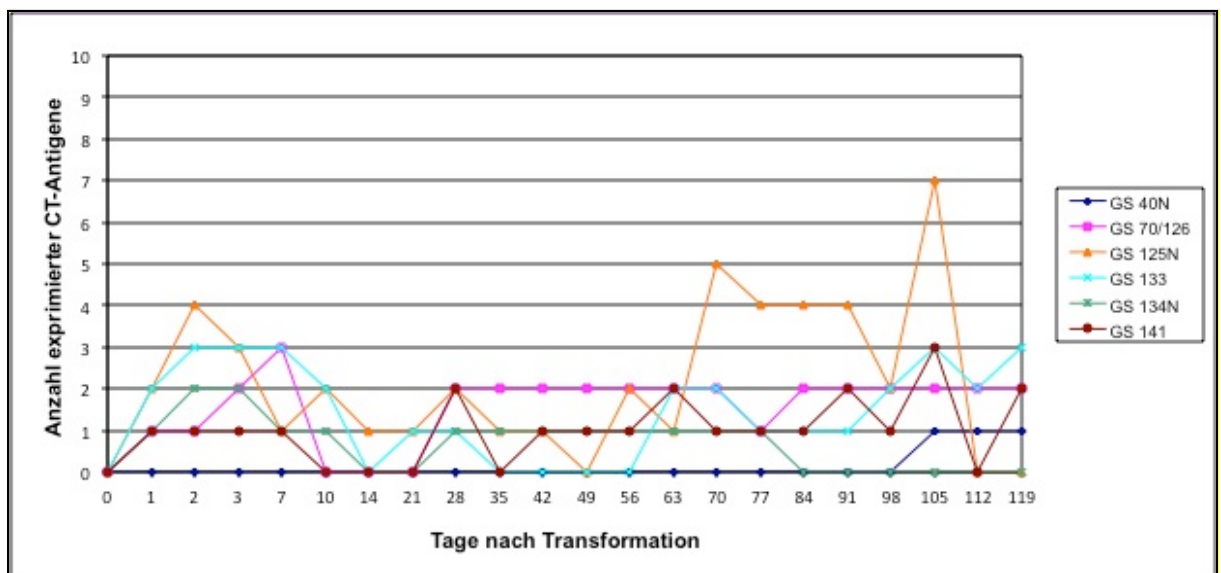


Abb. 8: Linienspezifische, zeitabhängige Expressionsverteilung der untersuchten C/T-Antigene von den (restlichen) 6 LCLs von unterschiedlichen Spendern

Weiterhin existiert auch eine erhebliche CTA-spezifische Varianz. So wurde SSX2 von der LCL GS 134 bereits an Tag d2 exprimiert, bei LCL GS 125N jedoch erst an Tag d70. Auch im Falle von SSX 1 war diese Varianz erkennbar, konnte es doch bei der LCL GS 133N schon an Tag d 1 nachgewiesen werden, während es bei der LCL GS 141 erst an Tag d 119 nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Zeitabhängige CTA-Expression bei LCLs

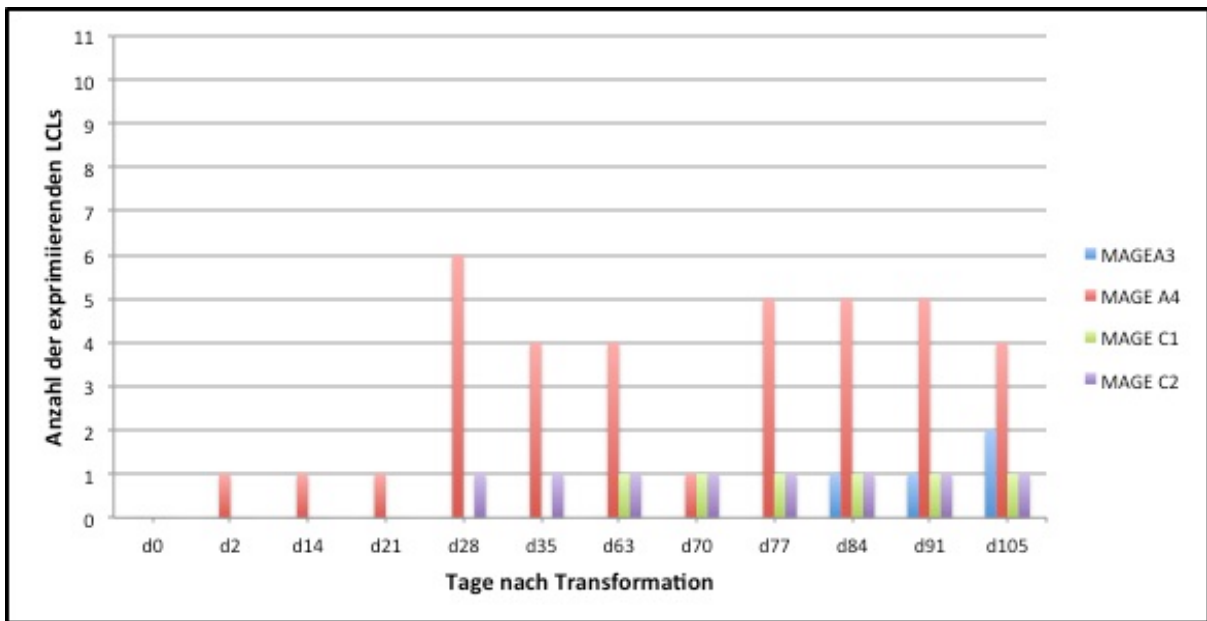


Abb. 9: CTA-Expression von allen 11 LCLs an Tagen, an denen alle Linien auf ihre MAGE-Expression untersucht werden konnten

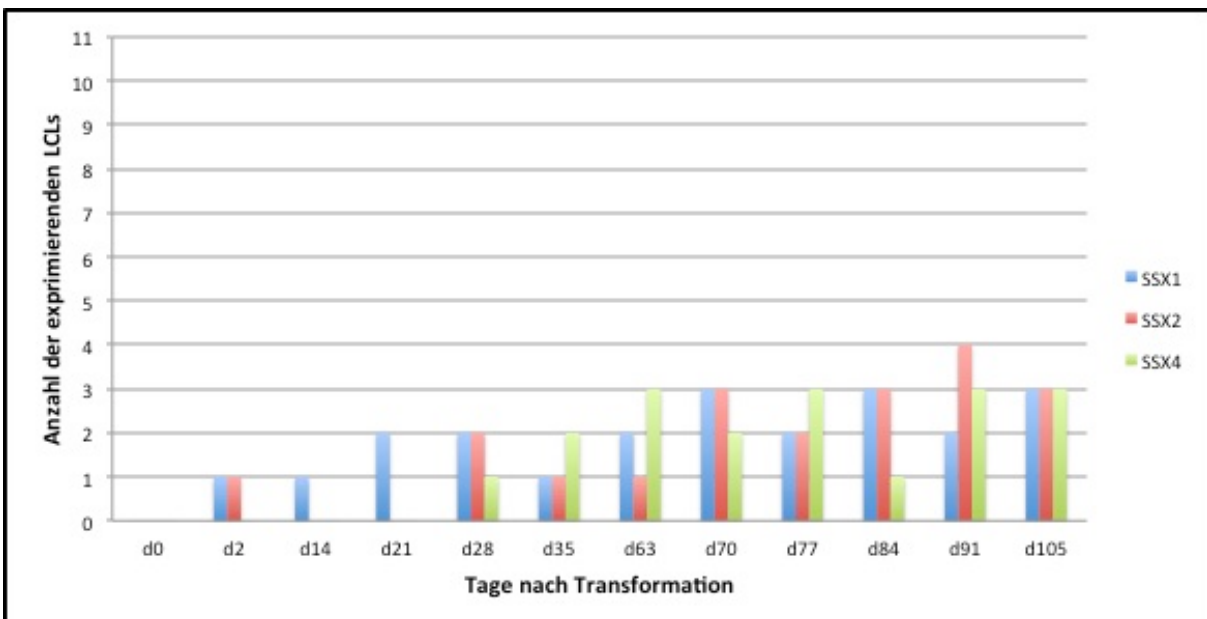


Abb. 10: CTA-Expression von allen 11 LCLs an Tagen, an denen alle Linien auf ihre SSX-Expression untersucht werden konnten

Bei der Betrachtung der Expression aller untersuchten CT-Antigene im zeitlichen Verlauf zeigt sich bei allen CT-Antigenen eine eher wechselhafte Expression mit Hoch- und Tiefständen um ein bestimmtes Expressionslevel. Es lässt sich also auch bezogen auf die einzelnen CT-Antigene kein einheitlicher Beginn der Expression (= CTA-spezifischer Beginn) markieren. Ebenso wenig ließ sich eine Konstanz bei der Expression nachweisen. Jedoch zeigte sich eine Tendenz jenseits von Tag d21 dahingehend, dass von diesem Tag an die meisten CT-Antigene von mehreren LCLs exprimiert wurden.

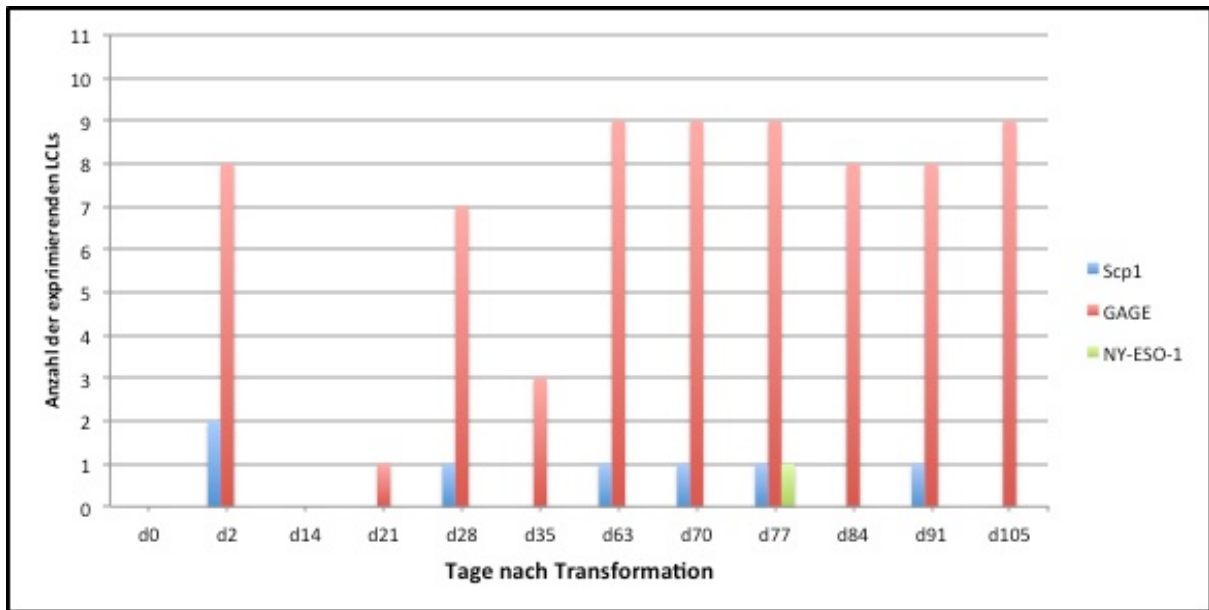


Abb. 11: CTA-Expression von allen 11 LCLs an Tagen, an denen alle Linien auf die CTA-Expression (Scp 1, Gage, NY-Eso-1) untersucht werden konnten

4.3.3 Konstanz der Expression jenseits von Tag 119

Bei den neu angelegten LCLs wurde, wie beschrieben, die CTA-Expression im Zeitverlauf bis Tag d119 untersucht. Der Tag 119 als Endpunkt der Untersuchungen wurde aufgrund von Vorversuchen gewählt: bei diesen Untersuchungen wurden mehrere (neu) angelegte Linien im Zeitverlauf in unregelmäßigen Abständen auf ihre CTA-Expression hin untersucht. Bei diesen Linien ließen sich CT-Antigene im Zeitraum von Tag 100-130 immer konstant nachweisen. Zudem zeigten ältere Linien, wie z.B. die LCL LG2 immer ein konstantes Expressionsmuster ab Tag 100, so dass primär davon ausgegangen werden kann, dass die Expression von CT-Antigenen bei LCLs (zumindest) nach Tag 100 konstant zu sein scheint. Wir setzten Tag 119 als Endpunkt fest, um den zeitlichen Verlauf der CT-Antigenexpression bei B-Zellen nach EBV-Transformation zu untersuchen. Da sich in den obigen Ergebnissen jedoch zeigte, dass die CTA-Expression bei LCLs stark variiert, kam die Frage auf, wie sich die Expression bei LCLs nach Tag d119 verhält.

Einige der neu angelegten LCLs wurden auch nach Abschluss der eigentlichen Versuche weiterhin in Kultur gehalten, so dass es dadurch möglich war, zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt eine CTA-Expressionsanalyse durchzuführen, um zu sehen, ob es Unterschiede in der CTA-Expression zwischen Tag d119 und Tag d ff. (vgl. Tabelle 12) gibt oder ob sich eine Konstanz aufzeigen lässt. Hiefür wurde die Expression von Mitgliedern der SSX-Familie (SSX1, SSX2, SSX4) bei 6 der untersuchten LCLs analysiert.

Von folgenden LCLs konnten spätere Proben aufgearbeitet und mit dem Stand der Expression von Tag d119 verglichen werden:

Tabelle 18: Übersicht der untersuchten LCLs

LCL	Tag d ff.
GS 7/2	d307
GS 40N	d778
GS 70/126	d320
GS 90	d480
GS 90N2	d952
GS 133N	d1139
GS 134N	d554

Tabelle 19: Expression von SSX1, 2 und 4 an Tag d119 und Tag d ff.

SSX1	GS 7/2	GS 40N	GS 70/126	GS 90	GS 90N2	GS 133N	GS 134N
d119	+	-	-	+	-	+	-
d ff.	+	-	+	-	+	-	-

SSX2	GS 7/2	GS 40N	GS 70/126	GS 90	GS 90N2	GS 133N	GS 134N
d119	-	-	-	+	+	-	-
d ff.	+	-	-	-	-	-	-

SSX4	GS 7/2	GS 40N	GS 70/126	GS 90	GS 90N2	GS 133N	GS 134N
d119	-	+	-	+	-	-	-
d ff.	-	-	-	-	-	-	-

Bei dem Vergleich der Expression von SSX1, SSX2 und SSX4 an Tag d119 mit Tag d ff. zeigte sich, dass die Expression auch hier bei einigen der untersuchten LCLs zeitabhängig variiert. So konnte eine Expressionsdifferenz von SSX1 bei 4 LCLs und SSX2, sowie SSX4 bei 2 LCLs zwischen Tag d119 und dem jeweils zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt untersuchtem Tag d ff. nachgewiesen werden.

Zudem war auch hier kein CTA-spezifisches Muster bei der Expression erkennbar: während bei SSX1 die Expression von Linie zu Linie variierte, wurde SSX2 von der LCL GS 90 und GS 90N2 an d119 exprimiert und dann an d ff. (z.B. d480 bei GS90 für SSX2) nicht mehr, ebenso wie SSX4, welches von der Linie GS 40N und GS 90 an Tag d119 exprimiert wurde und dann an Tag d ff. (z.B. d778 bei GS 40 für SSX 4) nicht mehr. In der Zusammenschau werden damit die obigen Ergebnisse bestätigt, zeigte sich doch auch bei dieser Untersuchung ein zeitabhängiges Variationsverhalten, was die Expression von CT-Antigenen, hier repräsentiert durch einige Antigene der SSX-Familie, bei LCLs betrifft.

4.4 Charakterisierung der LCLs

Um die Transformation der B-Zellen zu überprüfen, wurden die auswachsenden Linien auf die Expression Transformations-typischer Marker hin untersucht. Dazu wurde das für lymphoide Blasten charakteristische Differenzierungscluster CD19/CD21/CD23 mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie gemessen. In Abbildung 8 ist die Expression dieser Differenzierungsmarker exemplarisch für 3 der neu angelegten Linien dargestellt. Alle der 11 untersuchten Linien zeigten den gleichen Expressionsverlauf.

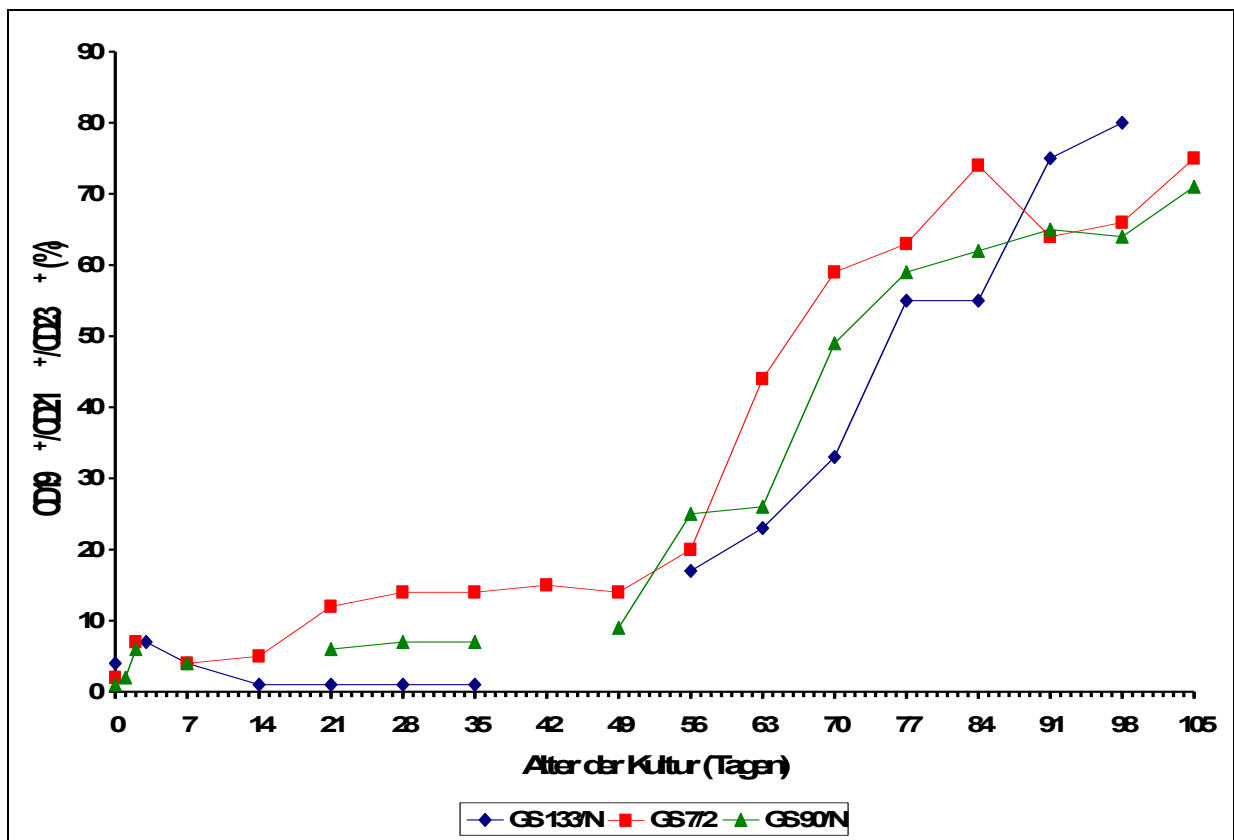


Abb. 12: Exemplarische Darstellung des Differenzierungsclusters CD19/CD21/CD23 für drei LCLs

4.5 Vergleich der CTA-Expressionsstärke von LCL und Tumorzelllinien

Nimmt man LCL als Modell, um die Expression von Cancer Testis Antigenen näher zu charakterisieren, muss im Rahmen dessen auch der Frage nach der Expressionsstärke von CT-Antigenen bei LCLs nachgegangen werden. Interessant hierbei ist der direkte Vergleich der CTA-Expressionsstärke von LCLs verglichen mit der von Tumorzelllinien.

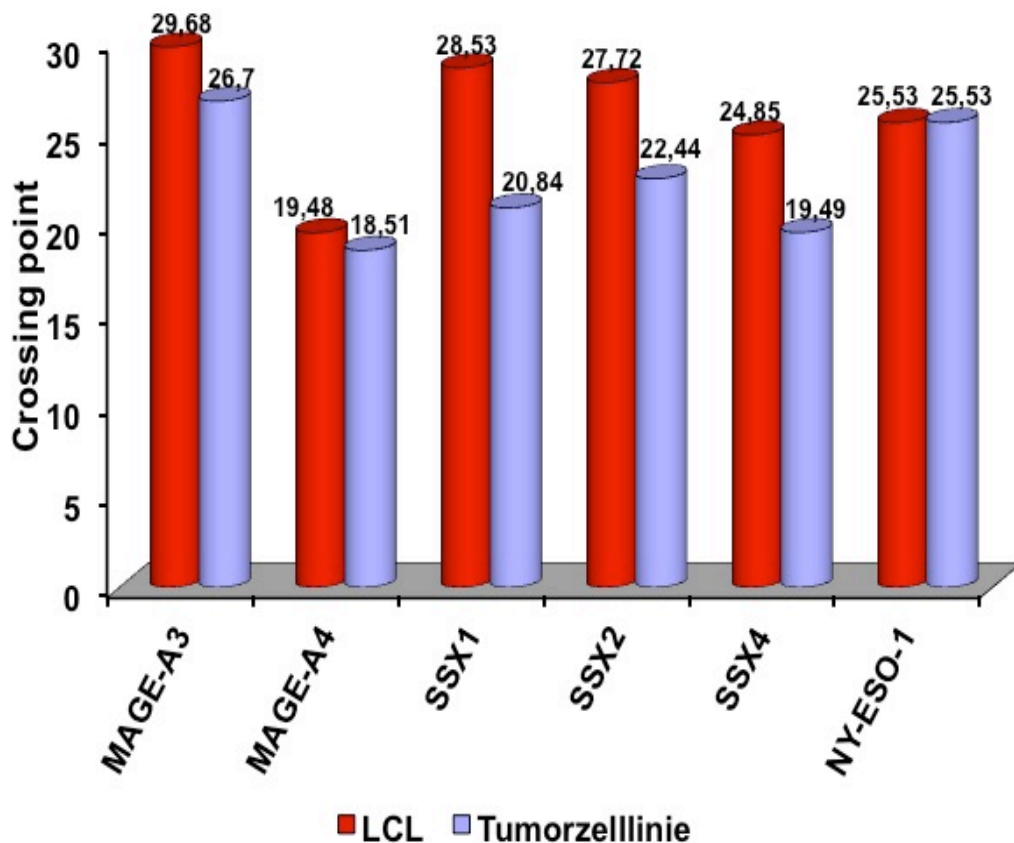


Abb. 13: Vergleich der Expressionsstärke der jeweils am stärksten exprimierenden LCL bzw. Tumorzelllinie. Je niedriger der angegebene Crossing point, desto stärker die Expression

Um zu untersuchen, inwieweit sich Lymphoblastoide Zelllinien im Vergleich mit Tumorzelllinien in der Stärke der CT-Antigen Expression unterscheiden, wurden 6 Cancer Testis Antigene ausgewählt (MAGE 3, MAGE 4, SSX1, SSX2, SSX4 und NY-ESO-1) und die vergleichende Analyse der Expressionsstärke auf quantitativer Ebene mittels Lightcycler PCR durchgeführt. Die Expressionsstärke wurde dann anhand des Crossing point ermittelt. Der Crossing Point, also die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts sich statistisch signifikant von dem des Hintergrunds unterscheidet, ist abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA. Über den Crossing Point (Cp) lässt sich somit eine vergleichende quantitative Aussage über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen; da sich der Crossing Point dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der initial eingesetzten

Kopienzahlen verhält, lassen sich Unterschiede somit noch deutlicher erkennen. Neben der Analyse der Crossing points wurde auch die Schmelzkurvenanalyse miteinbezogen, um die Spezifität der Lightcycler-PCR zu prüfen und zusätzlich wurde das PCR-Produkt nach jedem PCR-Lauf auf 2% Agarose-Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob auch die richtige Sequenz amplifiziert wurde.

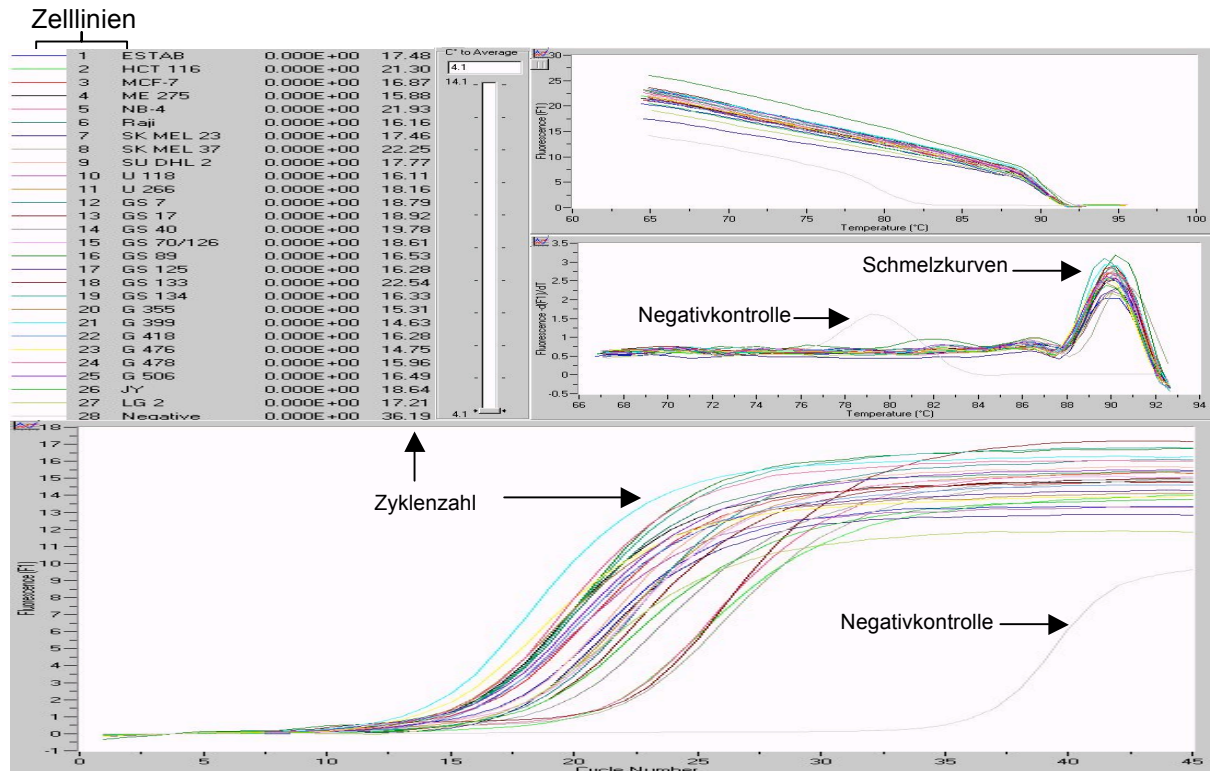


Abb. 14: Exemplarische Ergebnis-Darstellung nach einem RT-PCR-Lauf. Abgebildet ist ein RT-PCR-Lauf mit den einzelnen Zell-/Tumorzelllinien, der entsprechenden Zyklanzahl und der dazugehörigen Schmelzkurvenanalyse.

Insgesamt wurden 17 LCLs und 11 Tumorzelllinien für den quantitativen Vergleich verwendet, wobei nur jeweils Linien miteinander verglichen wurden, die das entsprechende CT-Antigen exprimierten.

Es zeigte sich, dass Tumorzelllinien eine zum Teil deutlich stärkere CTA-Expression aufwiesen als LCLs, so lag der Cp bei den Tumorzelllinien im Vergleich mit den LCLs durchgehend niedriger. Am Beispiel von SSX 1 zeigte sich der Unterschied der Expressionsstärke am deutlichsten, lag der Cp bei der am stärksten exprimierenden Tumorzelllinie U118 bei 20,84 (Cp), während er bei der am stärksten exprimierenden LCL LG 2 bei 28,53 (Cp) lag - es zeigte sich somit eine Differenz von fast 8 Zyklen bzw. Logstufen. Einzig bei NY-ESO 1 zeigten die Tumorzelllinien und LCLs eine gleichwertige Expressionsstärke, da der Cp sowohl bei der am stärksten exprimierenden Tumorzelllinie als auch bei der am stärksten exprimierenden LCL bei 25,53 (Cp) lag. Die quantitative Untersuchung ergab (s. Abb. 9), dass bis auf die LCL LG2, die als einzige der untersuchten

lymphoblastoiden Zelllinien zum einen alle untersuchten CT-Antigene exprimiert und dies zum anderen in ausreichender Kopienzahl (= ähnliche Kopienzahl wie Tumorzelllinien), die Expression von CT-Antigenen in LCLs verglichen mit Tumorzelllinien wesentlich schwächer ausgeprägt ist.

Die Auswertung der Häufigkeiten der exprimierten CT-Antigene zeigte, dass die SSX-Familie (hier SSX 1, 2 und 4) am stärksten und zugleich am häufigsten exprimiert wurde. Das am stärksten exprimierte CT-Antigen sowohl bei den LCLs als auch bei den Tumorzelllinien war MAGE A4 mit einem Cp von 19,48 (LCL) bzw. 18,51 (Tumorzelllinie).

4.5.1 CTA-Expression auf Proteinebene

Auch auf Proteinebene wurde mittels Immunzytologie die Stärke der CTA-Expression von LCLs mit Tumorzelllinien verglichen. Hierfür wurden adhärent wachsende Zellen der jeweiligen Tumorzelllinie bzw. Cyto-Spins der LCL-Zellen nach Formolaceton-Fixierung mit Antikörper des MAGE-A Klons 6C1, des NY-ESO-1 Klons E978 bzw. dem Überstand des anti-SSX2/4 Klons E3AS markiert. Die Detektion erfolgte dann in zwei Schritten jeweils mit Alkalischer-Phosphatase-gekoppeltem sekundärem bzw. tertiärem Antikörper (1) Rabbit-*anti-Maus* und (2) Schwein-*anti-Rabbit* -APAP. Das Ergebnis deckt sich mit der quantitativen RT-PCR-Analyse, da sich auch auf Proteinebene eine deutlich schwächer ausgeprägte Expression von CT-Antigenen bei LCLs im Vergleich mit Tumorzelllinien zeigte. Einzig wiederum die LCL LG2 zeigte ein ähnlich starkes Expressionsverhalten verglichen mit den Tumorzelllinien (Abb. 15).

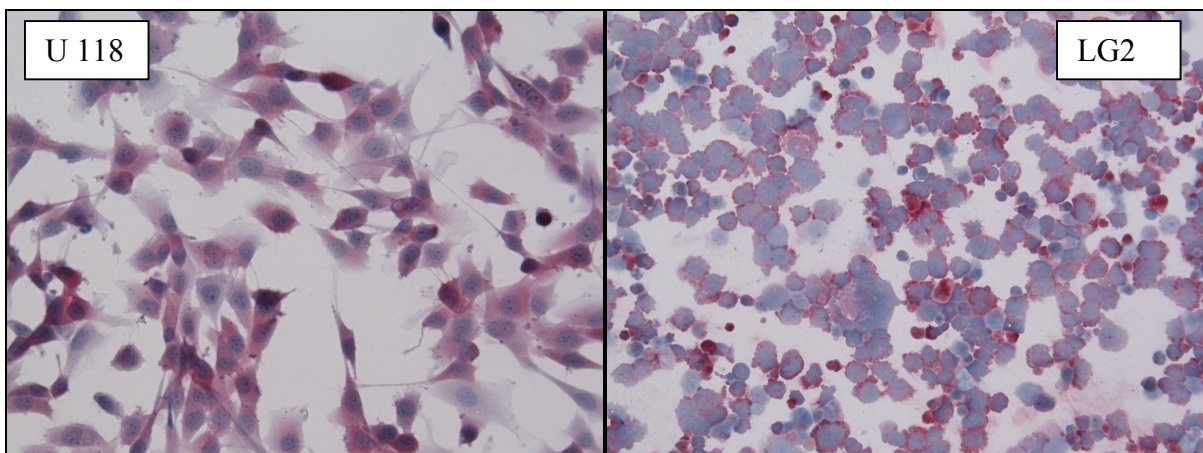


Abb. 15: Vergleich der Expressionsstärke von LCL (LG2) und Tumorzelllinie (U 118) mittels Immunzytologie gegen die MAGE-A-Protein-Familie. Abgebildet ist die Expression von MAGE-A auf Proteinebene - im hier gewählten Bild-Bsp. vergleichbar starke Expression der Tumorzelllinie U118 und der LCL LG2.

4.6 CTA-Expressionsanalyse nach Behandlung mit HDACi und DNMTi

Wie in der Literatur mehrfach beschrieben, lässt sich die Transkriptionsrate von CT-Genen und somit die Expression der entsprechenden Antigene durch den Zusatz von HDAC-Inhibitoren in Kombination mit DNMT1-Inhibitoren zum Zellkultur-Medium erhöhen bzw. verstärken. Für die Untersuchung der CTA-Expression bei LCLs nach Behandlung mit DNMTi und HDACi wurden 5 LCLs (MGAR, JY, LG2, G355, GS 133) eingesetzt, die nativ alle ein unterschiedliches CTA-Expressionspektrum aufwiesen: bei der LCL MGAR waren unbehandelt keine CTAs nachzuweisen, im Gegensatz zu den nativen Zellen der Linie JY, die auch nativ CTAs exprimierten. Bei der Linie GS 133 konnte das verwendete Housekeeping-Gen GAPDH nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese nicht nachgewiesen werden, so dass diese Linie nicht weiter untersucht wurde. Nach der Behandlung mit HDACi in Kombination mit DNMTi (s. Material & Methoden, Kapitel 2.3.7) wurden die einzelnen Linien erneut auf ihre CTA-Expression hin untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse als Balkendiagramm aufgetragen.

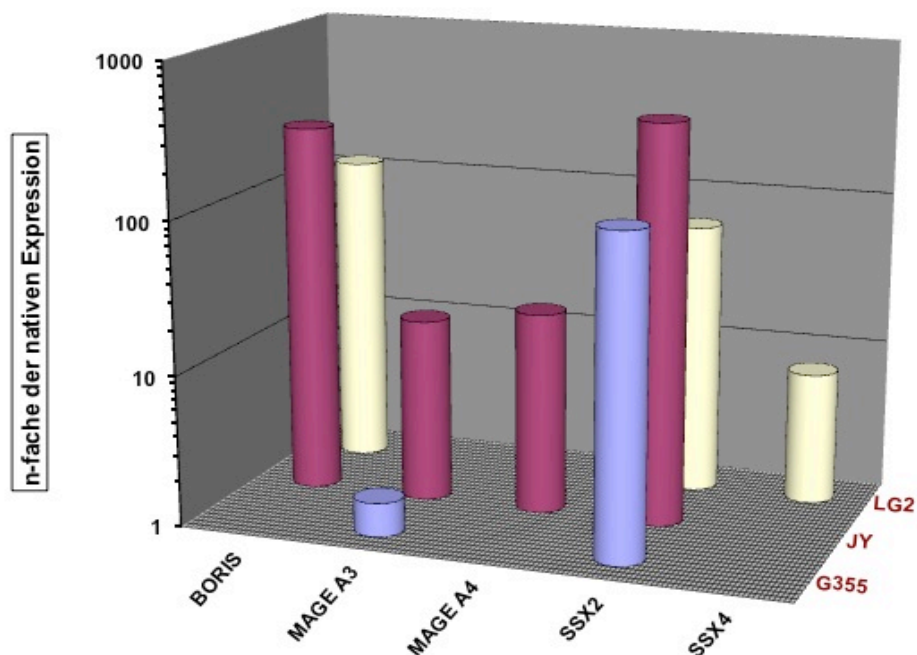


Abb. 16: CTA-Expression der LCLs nach der alleinigen Behandlung mit Aza.

Dargestellt sind die untersuchten CTAs (x-Achse) und LCLs (z-Achse). Auf der y-Achse ist das n-fache der nativen Expression, d.h. vor Behandlung mit dem Agens, aufgetragen.

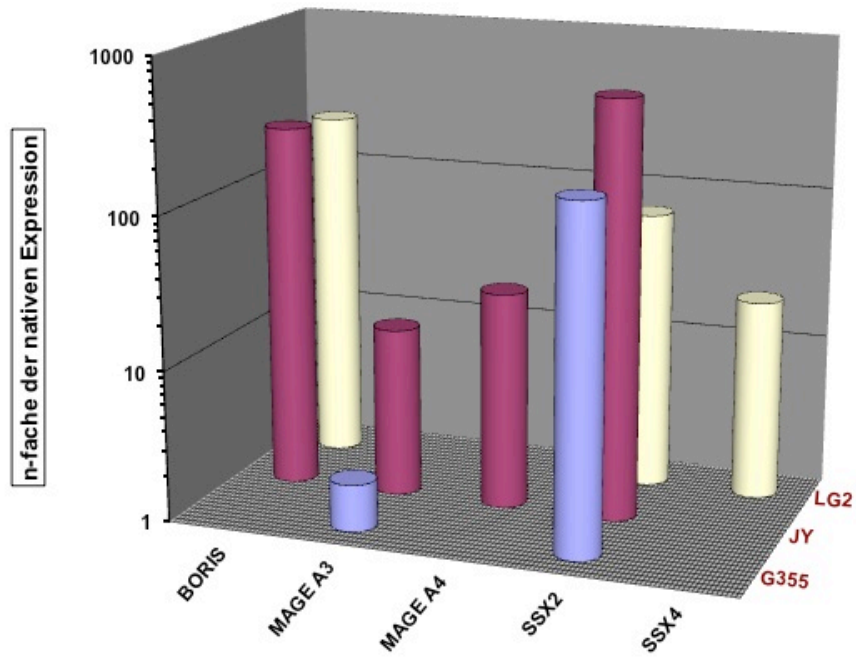


Abb. 17: CTA-Expression der LCLs nach der Behandlung mit Aza + SAHA.

Dargestellt sind die untersuchten CTAs (x-Achse) und LCLs (z-Achse). Auf der y-Achse ist das n-fache der nativen Expression, d.h. vor Behandlung mit dem Agens, aufgetragen.

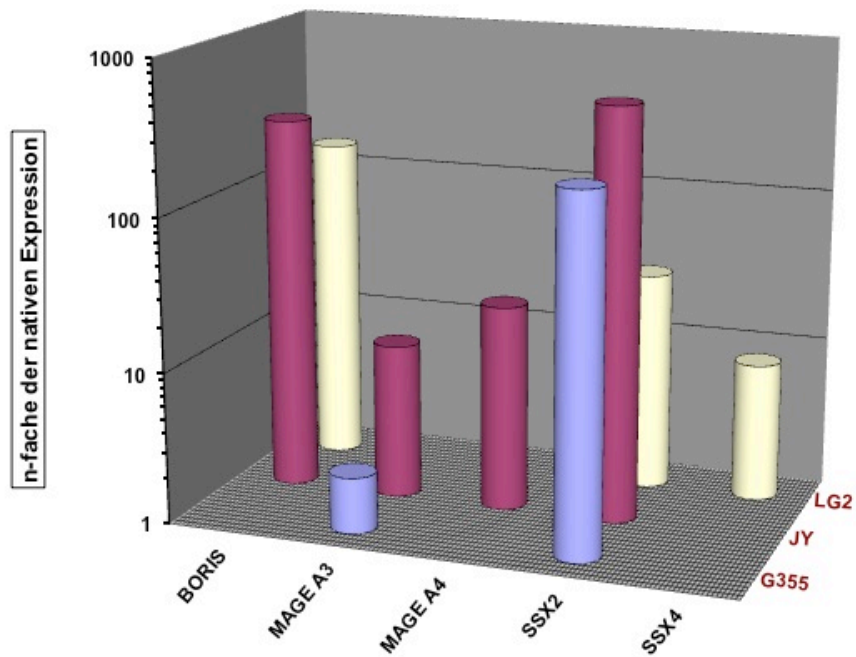


Abb. 18: CTA-Expression der LCLs nach der Behandlung mit Aza + TSA.

Dargestellt sind die untersuchten CTAs (x-Achse) und LCLs (z-Achse). Auf der y-Achse ist das n-fache der nativen Expression, d.h. vor Behandlung mit dem Agens, aufgetragen.

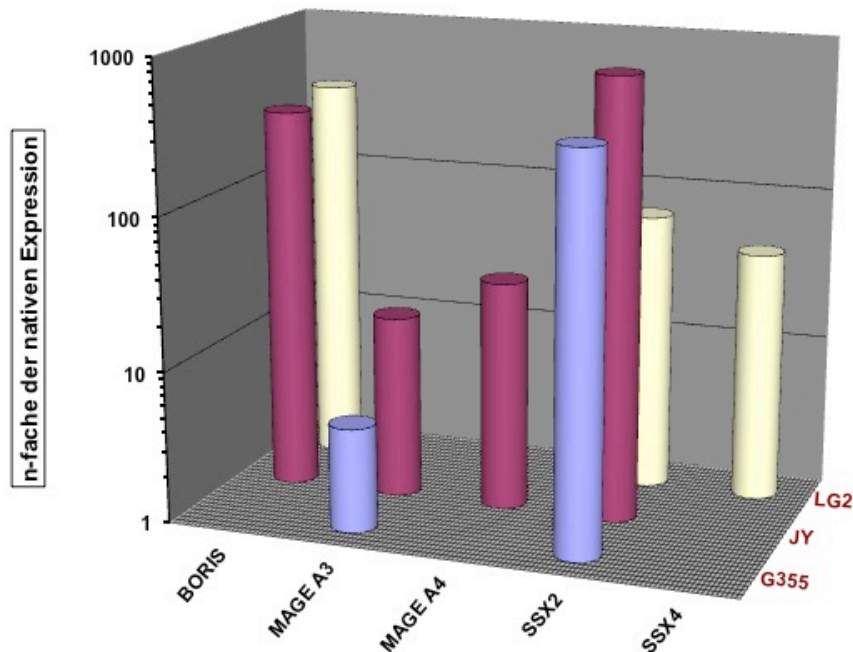


Abb. 19: CTA-Expression der LCLs nach der Behandlung mit Aza + Valproat.

Dargestellt sind die untersuchten CTAs (x-Achse) und LCLs (z-Achse). Auf der y-Achse ist das n-fache der nativen Expression, d.h. vor Behandlung mit dem Agens, aufgetragen.

Nach der Behandlung der LCLs mit HDACi und DNMTi zeigte sich eine deutliche Zunahme der CTA-Expression auf mRNA-Ebene, vor allem bei den CT-Antigenen BORIS und SSX2, unabhängig von den eingesetzten Substanzen. Die Kombination Aza + Valproat führte hierbei in der Zusammenschau am deutlichsten zu einer Erhöhung der CTA-Expression: bis zum 700fachen des Ausgangswertes (s. Abb. 16, SSX2 bei JY). Die einzelnen Linien wiesen eine unterschiedliche Suszeptibilität auf, was die Erhöhung ihrer CTA-Expression anging (s. Abb. 13-16). Sie reichte von gar keiner Erhöhung (BORIS bei GS 355) bis zur (mehrfachen) hundertfachen Erhöhung (SSX2 bei JY). Das gleiche gilt für die einzelnen untersuchten CT-Antigene: bei MAGE A3 und A4 kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression, ebenso wie bei SSX4, während es bei BORIS und SSX2 zu einer sehr starken Erhöhung der Expression kam (s. Abb. 13-16). Die Linie JY zeigte insgesamt die stärkste Erhöhung (700fach) - für das CT-Antigen SSX2 (Abb. 16). Bei der Linie G355 erhöhte sich nur die Expression von SSX2, auch hier wieder durch den Einsatz von Aza in Kombination mit Valproat.

Bei der Linie MGAR, die unbehandelt keinerlei CTA-Expression aufwies, kam es nach dem Einwirken von DNMTi und HDACi zu einer Induktion der CTA-Expression von 7 verschiedenen CT-Antigenen (nicht abgebildet).

4.7 T-Zell Stimulation

Zellen der lymphoblastoiden Linie JY exprimieren im nativen Zustand das CT-Antigen SSX2 nur mäßig. Nach Behandlung entweder nur mit dem DNMT-Inhibitor 5-Azacytidin oder in Kombination mit einem der drei Histon-Deacetylase-Inhibitoren SAHA, TSA oder Valproat kommt es zu einem deutlichen Anstieg der SSX2-Expression (s. Abb. 16-19). SSX2 stellt als CTA ein hoch tumorspezifisches Target für eine Immuntherapie da. Es wurden bereits einige T-Zell-immunogene Epitope aus der SSX2-Sequenz beschrieben^{[83], [84]}. Darüber hinaus stellt der SSX2-Bereich von p101-111 ein Epitop dar, das alle drei Äste des adaptiven Immunsystems stimuliert: dieses Peptid induziert simultan B-Zellen und deren Synthese Peptid-spezifischer Antikörper, es stimuliert CD4⁺ T-Helferzellen und gleichzeitig auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die im Kontext von HLA-A*0201 SSX2⁺ Tumorzellen effizient eliminieren^[81]. Diese Tatsache warf die Frage auf, ob auch SSX2-exprimierende LCLs wie die Linie JY in der Lage sind, T-Zell-Antworten zu induzieren. Um das zu untersuchen, wurden *in-vitro*-T-Zell-Stimulationen durchgeführt, bei denen Zellen von JY als APC dienten. Als Effektorzellen wurden Zellen eines CD8⁺ zytotoxischen T-Zell-Klons, der spezifisch das SSX2-Epitop p101-111 im Kontext von HLA-A*0201 erkennt, eingesetzt. Dieser Klon wurde aus der Bulk-T-Zell-Population nach *in-vitro*-Stimulation mit dem SSX2-Peptid (p101-111) isoliert und expandiert. Seine Epitop-Spezifität, seine HLA-A*0201-Restriktion sowie sein zytotoxisches Potential (Perforin-Expression und -Freisetzung) waren in Vorversuchen genau charakterisiert und bestätigt worden (Daten hier nicht gezeigt). Nach 18-stündiger Koinkubation von Effektor- und antigenpräsentierenden Zellen zeigte sich im IFN- γ -ELISPOT (s. Abb. 20), dass die nativen (unbehandelten) JY-Zellen (HLA-A*0201⁺) keine IFN- γ -Sekretion bei den T-Zellen des SSX2/p101-111-spezifischen CTL-Klons induzieren konnten. Erst nach zusätzlicher Beladung mit dem Ziel-Peptid (vgl. Abb. 20, weiße Balken) wurde die LCL JY als Target erkannt. Ganz anders dagegen stellte sich die Situation nach Vorbehandlung der Zellen dieser LCL dar. Bereits die vermehrte SSX2-Expression nach alleiniger Behandlung mit dem DNMTi 5-Azacytidin führte schon zu einer deutlichen Antwort (IFN- γ -Ausschüttung) des CTL-Klons. Die kombinierte Behandlung von JY mit diesem DNMTi und einem der drei HDACi SAHA, TSA oder Valproat und die daraus resultierende weitergehende Erhöhung der Expression des CTA SSX2 führten zu einer ebenso

verstärkten Reaktion des CTL-Klons. Nach Aza/TSA- bzw. Aza/Valproat-Behandlung war die Reaktion gegen die JY-APC nicht mehr signifikant schwächer als gegen die zusätzlich mit dem Peptid beladenen APC (vgl. Abb. 20, weiße Balken). Die generelle Zunahme der IFN- γ -Spots nach DNMTi- und HDACi-Behandlung und zusätzlicher Peptid-Beladung (weiße Balken) ist auf die dadurch gleichzeitig induzierte verstärkte Expression von MHC-Molekülen, den eigentlichen Antigen-präsentierenden Molekülen, auf den JY-Zellen zurückzuführen.

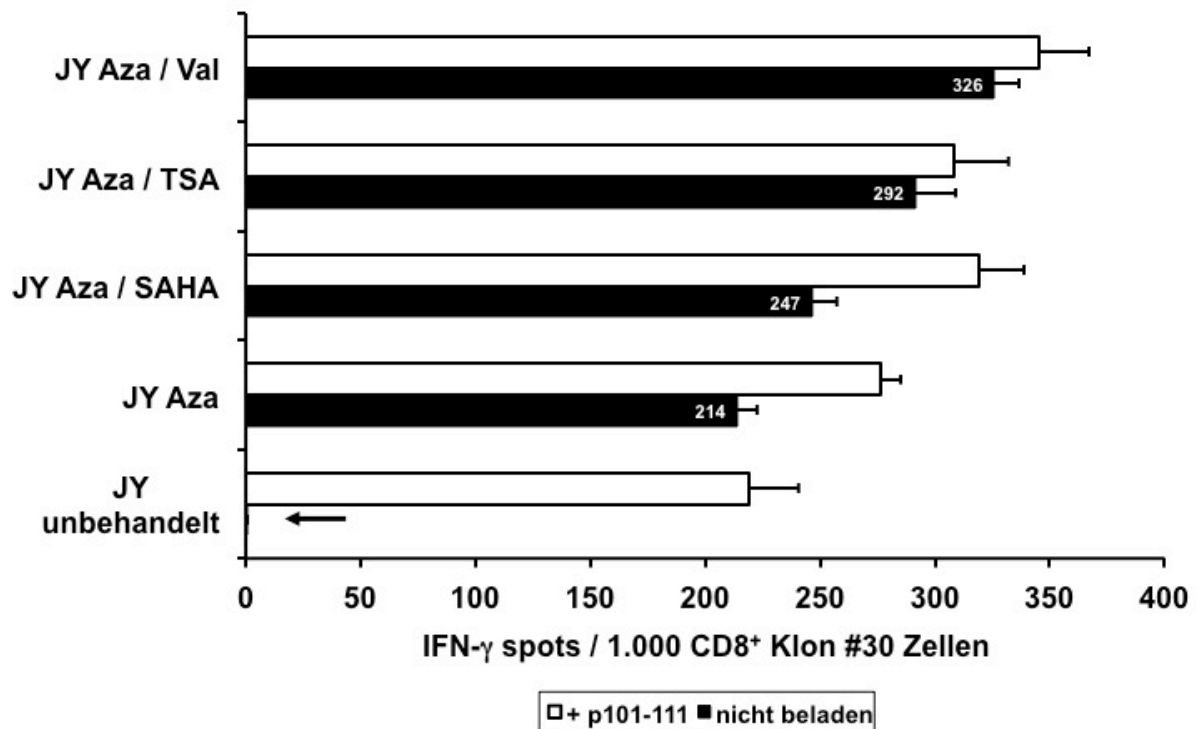


Abb. 20: T-Zell Stimulation mit der LCL JY nach Behandlung mit HDACi und DNMTi.

Dargestellt sind die IFN- γ spots des CTL- Klons gegen die LCL JY nach Behandlung mit DNMTi \pm HDACi (schwarzer Balken) im direkten Vergleich mit der Positivkontrolle (weisser Balken) .

5 Diskussion

Die Entdeckung von Tumorantigenen und die Erkenntnis, dass diese vom Immunsystem erkannt und damit als Zielstruktur genutzt werden können^[85], führte primär zu der Entwicklung von Immuntherapeutika. Innerhalb der Gruppe von Tumorantigenen sind die CT-Antigene von besonderem Interesse, da sie einige wichtige Kriterien vereinen, um sie immuntherapeutisch nutzen zu können. So ist ihre Expression sehr spezifisch, konnten sie doch bisher nur in Tumorgewebe nachgewiesen werden^[86], während sie in somatischem Gewebe einer Expressionsrestriktion, beschränkt auf Hoden- und Plazentagewebe, unterliegen. Bei diesem (somatischen) Gewebe handelt es sich jedoch um immungeschütztes Gewebe, da

es zum einen keinerlei HLA-Klasse I-Expression aufweist^[87] und zum anderen durch die Blut-Hoden- bzw. Plazenta- Schranke zusätzlich geschützt ist^[88]. Da CT-Antigene einen immunogenen Effekt auf T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) haben^{[89], [90], [91]}, liegt die Überlegung nahe, diese Antigene immuntherapeutisch zur Aktivierung der spezifischen zellulären und humoralen Abwehr zu nutzen. Lymphoblastoide Zelllinien können als antigenpräsentierende Zellen fungieren, die T-Lymphozyten stark stimulieren. Die Präsenz von Tumorantigenen in LCLs würde bedeuten, dass sie als potentielle Tumorstoffe zur therapeutischen Vakzinierung herangezogen werden könnten.

5.1 Expression von CT-Antigenen bei Lymphoblastoiden Zelllinien

Bisher gab es keinerlei Untersuchungen zu der Expression von CT-Antigenen bei LCLs. In unseren Vorversuchen wurde zunächst auch die Expression von CT-Antigenen bei naiven B-Zellen untersucht, jedoch konnte hierbei keine Expression von CT-Antigenen bei naiven B-Zellen nachgewiesen werden. Um generell einen Überblick über die Expression von CT-Antigenen bei LCLs zu gewinnen, wurden initial 20 LCLs mittels qualitativer PCR auf ihre CT-Antigen-Expression hin untersucht. Hierbei konnte erstmalig die Expression von CT-Antigenen bei LCLs gezeigt werden. Von den untersuchten LCLs exprimierten 70% mindestens 1 CT-Antigen, so dass sich LCLs als Modell für die Expressionsanalyse von CT-Antigenen nutzen lassen. Im Vergleich dazu liegt die Expression von verschiedenen CT-Antigenen bei Tumoren unterschiedlicher Entitäten ebenfalls in der gleichen Größenordnung. So konnten Akcakanat *et al.* zeigen, dass bei 213 untersuchten Patienten mit Ösophagus-Carcinom 59% der Karzinome mindestens ein CT-Antigen exprimierten (untersucht wurden GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A und SSX)^[92], ebenso wie Li *et al.*, die eine CTA-Expression (mind. 1 CT-Antigen) bei 56% ihrer untersuchten Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigen konnten^[93]. Bei 50% der untersuchten LCLs lag eine Co-Expression verschiedener CT-Antigene vor, d.h. es wurde mehr als 1 CT-Antigen gleichzeitig exprimiert. Interessant ist dies im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung der CT-Antigene als kombinierte oder sequenzielle Vakzinierung, da das Vorhandensein mehrerer CT-Antigene sog. Tumor-„Escape“-Mechanismen vorbeugen oder sie verhindern kann, da somit mehrere Antigene als Zielstrukturen für eine immunbasierte Therapie dienen können. Als „Escape“-Mechanismus wird hierbei die Fähigkeit von Tumorzellen bezeichnet, ihren Antigenbesatz so zu verändern, dass er nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden kann, sei es z.B. durch den Verlust von Antigenen oder durch Verlust der MHC-Moleküle.

Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Ergebnissen vieler unabhängiger Untersuchungen zur CTA-Expression bei soliden Tumoren, die gezeigt haben, dass oft eine Co-Expression

mehrerer CT-Antigene vorliegt, wie z.B. beim malignen Melanom (40% ≥ 3 CT-Antigene), Bronchial-Karzinom (65% ≥ 3 CT-Antigene)^[94], beim NSCLC (86% 2 oder mehr CT-Antigene)^[95] oder auch beim Mamma-Karzinom (38% ≥ 2 CT-Antigene) und gastrointestinalen Tumoren (46% ≥ 2 CT-Antigene)^[96], so dass die CTA-Expression sich bei LCLs ähnlich wie bei soliden Tumoren verhält.

Was die Expressionshäufigkeit der einzelnen CT-Antigene (untersucht an einem Zeitpunkt) angeht, so wurde SSX4 von 50% der untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien und damit am häufigsten exprimiert, gefolgt von GAGE mit 45%, während im Gegenzug die Expression von MAGE-A4 und NY-ESO-1 bei nur 5% und die Expression von BORIS bei keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Die Expression von MAGE-A4 und NY-ESO-1 war insgesamt sehr gering (bei 5% der untersuchten LCLs), werden beide CT-Antigene doch als stark immunogen angesehen und gelten daher als vielversprechende Kandidaten für eine Immunvakzinierung. So konnte bereits mehrfach in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass beide CT-Antigene in der Lage sind, bei Patienten eine CD4+ / CD8+ T-Zellantwort hervorzurufen ebenso wie die Induktion von Antikörpern bei gleichzeitig minimalen Nebenwirkungen^{[92], [97], [98], [99]}. Diese Studien sind damit Schritte in Richtung einer Immunvakzinierung. Die Expression von CT-Antigenen bei LCLs kann im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen mit Tumorgeweben nur *in-vitro* beurteilt werden, da B-Zellen nur *in vitro* zu LCLs auswachsen. Zwar exprimieren auch B-LCLs, die von einem EBV+ Spender stammen CT-Antigene *in vitro* (es handelt sich dann hierbei somit um „spontane“ LCLs), aber primäre B-Zellen von einem EBV+ Spender zeigten zunächst keinerlei CTA-Expression (Daten nicht gezeigt).

5.2 Die Expression von CT-Antigenen im Verlauf der viralen Transformation von B-Zellen

Um zu untersuchen, ab welchem Zeitpunkt LCLs im Verlauf der viralen Transformation CT-Antigene exprimieren, wurden nach einem bestimmten Zeitschema Proben gezogen und mittels qualitativer RT-PCR auf eine CTA-Expression untersucht. In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte kein einheitlicher Zeitpunkt determiniert werden, der den generellen Startpunkt der CTA-Expression bei LCLs markiert, auch wenn 7 Linien einen gemeinsamen Startzeitpunkt der CTA-Expression, nämlich bereits ab Tag 1 aufwiesen, schwankte bei den restlichen Linien der Zeitpunkt, an dem die Expression von CT-Antigenen erstmalig nachgewiesen werden konnte sehr stark, nämlich zwischen Tag 7 und Tag 105. Es ließ sich also kein allgemeingültiges Schema bei der zeitlichen Expression von CT-Antigenen bei LCLs ableiten - die Tendenz geht jedoch in Richtung einer relativ frühen (bezogen auf den

zeitlichen Verlauf nach EBV-Transformation) CTA-Expression, die dann aber im weiteren zeitlichen Verlauf mit Hoch- und Tiefständen um ein bestimmtes Level herum schwankt. Diese Schwankungen in der Expression zeigten sich auch intraindividuell – so wurden im Vorfeld mehrere Linien eines Spenders angelegt (GS7/2, GS7/3 und GS7/4 bzw. GS90/N und GS90/2), um zu sehen, ob sich das gleiche CTA-Expressionsmuster bei verschiedenen Linien eines Spenders aufzeigen lässt. Jedoch zeigten sich auch bei den Linien von ein und demselben Spender intraindividuelle Unterschiede, was das CTA-Expressionsmuster angeht. Somit lässt sich keine Vorhersage für LCLs, was die Cancer/Testis-Antigen Expression angeht treffen. Jede Linie muss individuell betrachtet und untersucht werden. Im Vergleich dazu gibt es bisher bei Tumoren, was die Expression von CT-Antigenen im zeitlichen Verlauf angeht, keinerlei Untersuchungen, d.h. es wurden bisher keine Tumorgewebeproben an verschiedenen Zeitpunkten auf ihr CTA-Expressionsmuster hin untersucht. Der Grund hierfür liegt zum einen in der technisch schwierigen Durchführbarkeit und zum anderen stellt sich die Frage nach dem Sinn, da Tumoren eine sehr heterogene CTA-Expression aufweisen. So gibt es bei Tumorgewebe immer Bereiche, die keinerlei CTA-Expression aufweisen, auch wenn der Tumor in anderen Bereichen CTA+ ist^[100]. Näher betrachtet fällt jedoch auf, dass die CTA-Expression bei den LCLs im zeitlichen Verlauf zwar oft relativ früh einsetzte (ab Tag 1 nach Transformation), sich dann jedoch an den folgenden Untersuchungstagen zunächst nicht weiter nachweisen ließ, dann im Verlauf erst wieder ab bzw. um den Tag 21/28 herum erneut einsetzte, um dann im weiteren zeitlichen Verlauf meist relativ konstant zu bleiben. Diese relativ spät einsetzende Konstanz lässt sich u.U. damit begründen, dass von den eingesetzten PBMC nur 5% B-Zellen sind, von diesen wiederum ca. 95% suffizient transfiziert werden und zunächst polyklonale Zellen vorliegen, bei denen sich erst im zeitlichen Verlauf der stärkste Klon durchsetzt und somit erst nach einiger Zeit oligo- bis monoklonale LCLs vorliegen (auch wenn bei dieser Arbeit auf eine Klonalitätsprüfung verzichtet worden ist), die dann ein relativ konstantes CTA-Expressionsmuster zeigen. Etwas gegen diese Hypothese spricht jedoch das Ergebnis aus der Untersuchung der CTA-Expressionskonstanz jenseits von Tag 119. Hierfür wurden nach Abschluss der eigentlichen Versuche 7 LCLs, die weiterhin in Kultur gehalten wurden, auf die Expression von Vertretern der SSX-Familie (SSX1, SSX2 und SSX, 4) jenseits von Tag 119 untersucht, um zu sehen, ob sich das Ergebnis dieser Untersuchung mit dem Ergebnis von Tag 119 deckt bzw. ob die Expression konstant bleibt. Bei dieser Untersuchung zeigte sich dann insgesamt ein heterogenes Bild, zwar blieb bei der Mehrzahl der Linien die Expression konstant, jedoch gab es auch hier bei jedem der untersuchten CT-Antigen Abweichungen zwischen Tag 119 und Tag ff. (= entsprechender Tag, an dem eine spätere Expressionsanalyse stattfand). Damit bestätigt sich die

Beobachtung, dass LCLs ein sehr variables CTA-Expressionsmuster aufweisen. Diese hohe Variabilität der CTA-Expression kann eingeschränkt auch bei verschiedenen Tumoren beobachtet werden, auch wenn Tumoren bisher immer nur an einem Zeitpunkt untersucht wurden. Die CTA-Expression reicht hierbei von nur einer positiven Zelle oder einer kleinen Gruppe positiver Zellen bis hin zu Tumoren mit einem weitgehend homogenen Expressionsmuster^{[101], [102]}.

Wenn eine der LCLs ein CT-Antigen exprimiert, so wurde von dieser Linie auch gleichzeitig bzw. im zeitlichen Verlauf ein Antigen aus der GAGE-Familie exprimiert. Somit lässt sich GAGE als Marker für die CT-Expression bei LCLs im zeitlichen Verlauf erkennen, ähnlich wie dies in einer Arbeit von Weinert *et al.* für MAGE-A3 bei Ösophagus-Tumoren beschrieben wurde^[103]. Weinert *et al.* zeigten, dass Ösophagus-Tumoren, die MAGE-A3 exprimieren, gleichzeitig eine Vielzahl von anderen CT-Antigenen exprimieren. GAGE könnte damit bei LCLs eine Art Gatekeeper-Funktion übernehmen. Nach Old^[104] besteht die Möglichkeit, dass es bei Tumoren zu einer Induktion oder Aktivierung einer Art gametogenen Programms kommt und damit zu der Expression von CT-Antigenen. Als Aktivator/Trigger könnte hierbei laut Old eine Mutation dienen, die zu einer Veränderung in der Keimzellentwicklung oder einer Aktivierung/Veränderung von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führt. Als andere Möglichkeit sieht Old die Aktivierung eines einzelnen CT-Gens an, das der Schalter für die Aktivierung von anderen Genen des gametogenen Programms ist, ähnlich wie GAGE in der vorliegenden Arbeit. Unterstützt wird diese These durch Studien an Synovialsarkomen, die zeigten, dass ein Translokationsvorgang, in den das SYT-Gen auf Chromosom 18 und das SSX-1 oder SSX-2 Gen auf dem X-Chromosom involviert ist mit einer vermehrten Expression von nicht verwandten Genen, wie z.B. NY-ESO-1 und MAGE einhergeht^{[105], [106]}. Dieses beschriebene Aktivierungsprogramm könnte vor allem die nah beieinander liegenden X-chromosomal lokalisierten CT-Antigene betreffen. Es wird hierbei von einer Demethylierung eines „Gatekeeper-Antigens“ ausgegangen, das im Anschluss zu einer Aktivierung anderer CT-Antigene führt. Diese Theorie könnte auch für die CTA-Expression bei LCLs zutreffen, da in Anwesenheit von dem X-chromosomalen CT-Antigen GAGE eine deutlich häufigere CT-Antigenexpression beobachtet werden konnte.

5.4 Co-Expression von CT-Antigenen bei LCLs im zeitlichen Verlauf

Für das Expressionsmuster von CT-Antigenen bei LCLs im zeitlichen Verlauf gibt es bisher keine gesicherten Daten. In der vorliegenden Arbeit konnte bei LCLs keine Co-Expression von CT-Antigenen einer Familie nachgewiesen werden. Dies steht etwas im Gegensatz zu

einigen früheren Arbeiten, bei denen das Expressionsmuster von CT-Antigenen bei soliden Tumoren untersucht wurde. Hierbei wurde eine Co-Expression und damit fragliche Co-Regulation von Mitgliedern einer CTA-Familie beim malignen Melanom und Bronchial-Ca beobachtet^{[22], [95]}.

5.5 CTA-Expression bei LCLs nach Behandlung mit DNMTi und HDACi

In Untersuchungen zu der Aktivierung von CT-Antigenen konnte als ein entscheidender Prozess die Demethylierung des DNA-Locus und hier insbesondere der Promoterregion von CT-Antigenen identifiziert werden^{[107], [108]}. Durch Methylierung werden Gene inaktiviert – durch eine Demethylierung (Abspaltung von Methylgruppen) werden sie in die Lage versetzt, repliziert zu werden und somit aktiv am Zellzyklus teilzunehmen^{[109], [110], [111]}. Dies trifft auf Gene zu, die in der Embryogenese aktiv waren und im Zuge der weiteren Entwicklung abgeschaltet wurden. Wischniewski *et al.* konnten dies für MAGE A3 zeigen. So führte bei ihren Untersuchungen der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5`-Aza-Deoxycytidine in Kombination mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A zu einer universellen Expression von MAGE A3 in Zelllinien. Durch Einsatz des Histon-Deacetylase-Inhibitors konnte in der Arbeit sowohl bei der methylierten als auch bei der demethylierten Form eine Transkriptionsaktivierung ausgelöst werden^[26]. Auf Grund dieser Tatsache wurde in der vorliegenden Arbeit in einem neuen Ansatz untersucht, ob sich die CTA-Expression auch bei LCLs durch das Einwirken von demethylierenden Substanzen verändern bzw. hochregulieren lässt und wenn ja, wie sich die Kombination dieser Substanzen auf die CTA-Expression bei LCLs auswirkt. Um diesen Mechanismus bei LCLs zu untersuchen, wurden 4 LCLs nach einem bestimmten Schema mit HDACi und DNMTi behandelt (s. Material & Methoden, Kapitel 2.3.7). Bei der Linie MGAR, die nativ keinerlei CTA-Expression aufwies, zeigte sich eine de novo Induktion von 7 CT-Antigenen auf mRNA-Ebene. Somit konnte erstmalig eine CTA-Induktion bei LCLs gezeigt werden. Gleichzeitig bestätigte sich damit auch bei LCLs die Beobachtung aus vielen in der Literatur beschriebenen Experimenten, in denen die Behandlung von Zellen mit DNMTi zu einer Induktion von CTAs führte^{[112], [113], [114]}. Eine signifikante Verstärkung der Expression von MAGE A3 und MAGE A4 konnte bei allen untersuchten LCLs nicht nachgewiesen werden. Da die Stilllegung des MAGE-Gens nicht nur einer Hypermethylierung, sondern auch einer Histon-Deacetylierung, wie von Wischniewski *et al.* gezeigt werden konnte^[26], unterliegt, wäre durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit HDACi und DNMTi eigentlich eine verstärkten Expression von MAGE-A3 und –A4 zu erwarten gewesen. Zwar war eine geringe Verstärkung zu beobachten, jedoch nicht in dem

Ausmaße, wie in der Literatur mehrfach beschrieben. Jedoch ließ sich dieses Ergebnis auch bei einigen anderen Arbeitsgruppen beobachten. So konnte auch von diesen Gruppen bei Tumorzellen trotz Einsatz eines DNMTi keine^[115] bzw. nur eine sehr geringe^[116] Hoch-Regulation von MAGE-A Genen erreicht werden. Die stärkste Hoch-Regulation wurde linienübergreifend durch die kombinierte Behandlung mit Aza (DNMTi) und Valproat (HDACi) erreicht. Hierbei zeigte sich eine bis zu 700fache Verstärkung (im Vergleich mit der Expression vor der Behandlung) der SSX2-Expression. Interessant ist dies für eine mögliche Nutzung zur therapeutischen Vakzinierung, da durch den kombinierten Einsatz von HDACi und DNMTi eine CTA-Hochregulation und damit eine anschließende T-Zell-Reaktion induziert werden könnte, ähnlich wie es bereits von Goodyear *et al.* bei Patienten mit AML gezeigt werden konnte^[117]. LCLs eignen sich zudem wesentlich besser für die Antigen-Präsentation mit nachfolgender CTL-Antwort, da sie konstitutiv über einen MHC-Besatz verfügen, während Tumorzellen in der Lage sind, ihren MHC-Besatz zu verändern, um einer Immunantwort zu entgehen^{[118], [119]}.

Der Vorteil einer Behandlung mit Aza und Valproat liegt darin, dass Valproat bereits in therapeutischer Dosis als HDACi wirkt und seit Jahrzehnten in klinischem Einsatz ist, so dass es auch bei Patienten mit einer Tumorerkrankung eingesetzt werden könnte^[120].

5.6 Analyse der CTA-Expression auf RNA- und Proteinebene und im Vergleich mit Tumorzelllinien

5.6.1 RNA-Ebene (RT-PCR)

Für den Vergleich der CTA-Expressionsstärke von LCLs und Tumorzelllinien wurde die Expression von 6 CT-Antigenen bei 17 LCLs und 11 Tumorzelllinien auf quantitativer Ebene untersucht. Als CT-Antigene wurden MAGE A3, MAGE A4, SSX1, SSX2, SSX4 und NY-ESO-1 ausgewählt – es handelt sich hierbei um CT-Antigene, die immunologisch bisher am interessantesten erscheinen und teilweise in der Lage sind, eine starke Immunantwort hervorzurufen^{[90], [92], [123], [124]}. Für die Expressionstärke wurde der Crossing point ermittelt und die jeweils für das untersuchte Antigen am stärksten exprimierende LCL mit der jeweils am stärksten exprimierenden Tumorzelllinie verglichen bzw. gegenübergestellt. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet, für die Positivkontrolle zusätzlich eine Plasmidtitration und die Schmelzkurvenanalyse. Im Anschluss wurden die amplifizierten Fragmente noch gelelektrophoretisch aufgetragen als abschließende Kontrolle der erfolgreichen PCR. Es zeigte sich, dass Tumorzelllinien eine zum Teil deutlich stärkere CTA-Expression aufweisen als LCLs, so lag der Cp bei den Tumorzelllinien im Vergleich mit den

LCLs durchgehend niedriger. Die Analyse der Häufigkeit der exprimierten CT-Antigene zeigte, dass die SSX-Familie (hier SSX 1, 2 und 4) am stärksten und zugleich am häufigsten exprimiert wurde. Das am stärksten exprimierte CT-Antigen sowohl bei den LCLs als auch bei den Tumorzelllinien war MAGE A4 mit einem Cp von 19,48 (LCL) bzw. 18,51 (Tumorzelllinie). Einzig die Lymphoblastoide Zelllinie LG2 erreichte annähernd ähnlich starke Expressionswerte im Vergleich mit Tumorzelllinien. Damit zeigt sich auch bei der CTA-Expressionsstärke ein heterogenes Verhalten bei den LCLs.

5.6.2 Proteinebene (Immunhistochemie)

Bei der Untersuchung der Expressionsstärke von CT-Antigenen bei LCLs im Vergleich mit Tumorzelllinien ist eine der Schwierigkeiten die mRNA – Protein-Expressionsdiskrepanz von CT-Antigenen^{[108], [109]}. Bisher wurde versucht, durch die geringe Sensitivität der immunhistochemischen Analyse, Gewebeprobenunterschiede oder durch das insgesamt heterogene Expressionsmuster von CTAs^[25] zu erklären. Diese Diskrepanz zeigte sich teilweise sogar auch auf Protein-Ebene, wenn derselbe Antikörper verwendet wurde^{[109], [125]}. Um dieser Diskrepanz zu begegnen bzw. um die Ergebnisse aus der mRNA-Analyse zu bestätigen, wurde auch auf Proteinebene mittels Immunzytologie die Stärke der CTA-Expression von LCLs mit Tumorzelllinien verglichen. Das Ergebnis auf Proteinebene deckt sich mit denen der quantitativen RT-PCR-Analyse, zeigte sich auch hier eine deutlich schwächer ausgeprägte Expression von CT-Antigenen bei LCLs im Vergleich mit Tumorzelllinien. Einzig die LCL LG2 zeigte erneut ein ähnlich starkes Expressionsverhalten verglichen mit den Tumorzelllinien, d.h. auch hier kann man nicht von einem einheitlichem Ergebnis für alle LCLs sprechen, sondern muss davon ausgehen, dass es bei LCLs (teilweise sehr starke) Unterschiede gibt, was die Stärke der CTA-Expression angeht.

5.7 T-Zell-Stimulation

5.7.1 T-Zell-Antwort gegen CTAs

Wie bereits in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, stellen bestimmte Sequenzen von CT-Antigenen T-Zell-immunogene Epitope dar. Einige dieser Epitope induzieren sogar simultan Immunantworten aller 3 Bereiche des adaptiven Immunsystems, so z.B. das Epitop, das sich über den Bereich der SSX2-Aminosäuresequenz von p101-111 erstreckt^[81]. Mit CD8⁺ CTL-Klonen gegen dieses SSX2-Epitop konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Behandlung der HLA-A*0201⁺ LCL „JY“ mit 5-Azacytidin alleine und noch stärker in Kombination mit einem der drei HDACi die Expression von SSX2 auf ein T-Zell-immunogenes Niveau steigert. Darüber hinaus konnten Smith *et al.* zeigen, dass das SSX-2 Peptid p103-111

auch *in vivo* immunogen ist. Die *in vivo* generierten p103-111-spezifischen CTLs waren dort in der Lage, eine HLA-A*0201⁺ Prostatakarzinom-Zelllinie zu lysieren^[121]. Somit konnte in der hier vorgelegten Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sich nach Behandlung mit DNMTi und HDACi die Expression von CTAs in LCLs in einem Ausmaß verstärken lässt, so dass gegen (so behandelte) APC eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort induziert wird. Ein weiterer Beleg also dafür, dass nach Behandlung mit diesen Substanzen und der damit induzierten CTA-Überexpression eine spezifische T-Zell-Antwort auch gegen Tumoren möglich ist. Dies konnte ebenfalls beim metastasierten Chondrosarkom von Pollack *et al.* gezeigt werden, die *in vitro* eine NY-ESO-1/LAGE1-s und PRAME-spezifische CD8⁺-Effektorzell-Antwort gegen HLA-A*0201 exprimierende Chondrosarkom-Zelllinien stimulieren konnten^[122]. In der hier vorgelegten Arbeit zeigte die Kombination aus Aza/Valproat, wie zuvor beschrieben, den deutlichsten Effekt auf die Verstärkung der SSX2-Expression. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Arbeit von Goodyear *et al.*, in der die CTL-Antwort gegen MAGE nach Einsatz von Aza/Valproat bei AML und MDS Patienten untersucht wurde. In dieser Arbeit konnte bei 8 von 22 untersuchten/behandelten Patienten eine major clinical response mit nachgewiesenen zirkulierenden MAGE-CTLs erzielt werden^[117]. Dies zeigt abermals, dass der kombinierte Einsatz von DNMTi und HDACi auch *in vivo* für eine Immuntherapie gegen CTAs anwendbar ist.

Des Weiteren liegt in der Art und Weise, in der LCLs im Träger im Gleichgewicht gehalten werden, ein indirekter therapeutischer Ansatz. So sorgen EBV-spezifische CTLs dafür, dass die Zahl der EBV-transformierten B-Zellen im Träger konstant bleibt. Dieses Gleichgewicht wird (u. a.) durch Lyse der EBV-transformierten B-Zellen bewahrt. Bei der Lyse dieser B-Zellen werden dann auch entsprechend die von den LCLs exprimierten CTAs freigesetzt. Diese können dann wiederum von anderen APC des Trägers aufgenommen, prozessiert und der Immunabwehr des Trägers präsentiert werden.

Bei vielen der bis heute publizierten T-Zell-Antworten gegen CTAs wurden T-Zell-Epitope beschrieben, deren Einsatzmöglichkeit meist wegen der Restriktion auf nur ganz wenige MHC-Subtypen deutlich limitiert ist. Gerade auch unter diesem Aspekt bieten CTA-exprimierende LCLs eine zusätzliche Option, da LCLs sehr leicht und schnell von jedem Patienten angelegt werden können. Somit stellen sie höchst individuelle APC mit einer autologen HLA-Konfiguration dar, die das Antigen zum einen natürlich und zum anderen auch in voller Länge exprimieren. Im Vergleich zu den vielfach bereits in klinischen Vakzinierungsstudien mit CTAs eingesetzten dendritischen Zellen (DC), die zum einen unter erheblichem Kostenaufwand (Zytokine etc.) von den entsprechenden Patienten ebenfalls

individuell etabliert werden müssen und zum anderen danach auch noch mit dem entsprechenden CTA „versetzt“ (z. B. Transfektion) werden müssen, stellen lymphoblastoide Zelllinien, trotz DNMTi- und HDACi-Behandlung, eine kostengünstigere Alternative dar.

5.8 Offene Fragen

Eine Schwierigkeit beim Einhalten des aufgestellten Zeitschemas war die benötigte Zellanzahl für die RNA-Isolation. Für eine suffiziente RNA-Isolation wurden $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen benötigt, d.h. wenn am geplanten Tag der RNA-Isolation nicht ausreichend Zellen zur Verfügung standen, musste an diesem Tag auf die Überprüfung der CTA-Expression verzichtet werden. Ein weiterer möglicher Kritikpunkt ist der willkürlich gewählte Endpunkt der Untersuchung, nämlich Tag 119. Dieser Endpunkt wurde bewusst gewählt aufgrund von Beobachtungen in Vorversuchen mit mehreren neu angelegten LCLs, bei denen sich meist ein konstantes CTA-Expressionsmuster zwischen bzw. ab Tag 100 – 130 zeigte. Die Nachuntersuchungen an Tag X haben gezeigt, dass Tag 119 nicht der Endpunkt einer stabilen Expression ist.

Auf die Expression von EBV-Proteinen bzw. deren Bedeutung für die CTA-Expression bei LCLs konnte aufgrund des hohen Aufwandes nicht näher eingegangen werden. Dies wäre ein Punkt für weitere Versuche, in denen überprüft werden könnte, inwieweit es einen Zusammenhang mit der Expression von CT-Antigenen gibt.

Als Positiv-Kontrolle hätte neben GAPDH und Plasmid-Titrationsen auch Testisgewebe verwendet werden können, was den Vorteil gehabt hätte, dass ein direkter Vergleich mit der Expressionsstärke in somatischem Gewebe möglich gewesen wäre.

Bei der Untersuchung der Auswirkung von DNMTi und HDACi auf die CTA-Expression bei LCLs hätte abschließend noch eine Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA erfolgen können, um damit sicher zu gehen, dass eine Demethylierung wirklich stattgefunden hat. Abschließend hätte dann auch der Einfluss von DNMTi und HDACi auf die Expression von LMP1 untersucht werden können, da Li *et al.* beschrieben haben, dass eine DNA-Hypomethylierung zu einer vermehrten Expression von LMP1 führt^[126]. Damit hätte untersucht werden können, ob die Hoch-Regulation von Virusproteinen ähnlich stark ist wie die von CTAs.

Zudem wurde der Einfluss von HDACi in der alleinigen Anwendung auf die CTA-Expression bei LCLs nicht untersucht. Jedoch ist in der Literatur mehrfach beschrieben, dass eine alleinige Anwendung von HDACi nicht zu einer Induktion der CTA-Expression führt. Das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit lag jedoch auf einer Verstärkung der CTA-Expression.

5.9 Ausblick

Wie bereits vorangehend angedeutet, wäre ein nächster Schritt, experimentell zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression eines EBV-Antigen und der CTA-Expression besteht. Hierfür könnte mittels Gen-Silencing (z.B. durch den Einsatz von siRNA) gezielt untersucht werden, welche(s) der 9 latenten EBV-Gene in Verbindung mit der Expression der CT-Antigene steht.

Aufgrund ihrer Tumorspezifität und ihrer Immunogenität erfüllen CTAs wesentliche Voraussetzungen, um als Antigene bei einer therapeutischen Vakzinierung eingesetzt zu werden. Vor diesem Hintergrund zeigen mehrere klinische Studien, in denen einzelne CTAs als Vakzine verwendet wurden bzw. werden, dass bei Patienten mit Bronchial-Ca^[127], Ovarial-Ca^[128] und malignen Melanom^[129] eine spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst wurde. Da Tumoren oft aber eine sehr heterogene und teiltweise auch nur schwache CTA-Expression aufweisen, wäre eine polyvalente Vakzinierung von Vorteil. Dies könnte z.B. mit LCLs durchgeführt werden, da diese mehrere CTAs exprimieren. LCLs haben diesbezüglich als APC hervorragende immunstimulatorische Eigenschaften. So konnten Kubuschok *et al.* in einer ersten Arbeit bei Patienten mit Pankreas-Ca zeigen, dass durch Vakzinierung mit Tumorantigen transfizierten LCLs eine spezifische T-Zell-Antwort hervorgerufen werden kann^[130]. Im Kontext dieser Arbeit ist der Nachweis, dass LCLs mehrere CTAs exprimieren und deren Expression durch 5-Azacytidin und HDACi hoch reguliert werden kann, somit ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung einer potentiell wirksamen Tumorstimmulierung mit LCLs. Neben dem Einsatz von DNA-hypomethylierenden Agenzien sollte in Zukunft der Einsatz weiterer sekundärer immunstimulatorischer und immunmodulatorischer Agenzien (z.B. Interleukine) in Kombination mit DNMTi / HDACi überprüft werden, um eine CTA-Expressionsverstärkung oder de-novo-CTA-Expression zu erreichen; dies konnte bereits z.B. für GM-CSF oder IL-7 bei der Expression des CT-Antigens SPAN-Xb beim Multiplen Myelom gezeigt werden^[131]. Des Weiteren konnte eine CTA-Expression nicht nur bei soliden Tumoren, sondern auch bei hämatologischen Neoplasien gezeigt werden, so z.B. beim Multiplen Myelom^[132] oder auch bei der chronischen lymphatischen Leukämie^[133]. Vor allem für hämatologische Erkrankungen mit schlechter Prognose wäre eine CTA-basierte Vakzinierung vielversprechend, zeigt doch die Erfahrung bei allogenen Stammzelltransplantationen, dass es durchaus einen graft-versus-tumor Effekt gibt und damit eine gewisse Suszeptibilität von hämatologischen Neoplasien gegenüber zytotoxischen T-Zellen besteht.

6 Literaturverzeichnis

1. Simpson A, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 1-11.
2. Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethé B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; **178**: 489-495.
3. Maio M, Sigalotti L, Coral S, Di Giacomo AM, Altomonte M, Lamaj E, Fonsatti E. Targeting the immune system to Tumor-associated antigens, in *Cancer therapy-molecular targets in tumor-host interactions*, G.F. Weber, Editor. 2005, horizon bioscience. p. 247-264.
4. Charles A. Janeway et al - *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag 2002; 5. Auflage
5. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; **108**: 804-809.
6. Dong C, Flavell RA: Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res*. 2000; **2**:179-188
7. Takenaka A, Yamada Y, Miyake H, Hara I, Fujisawa M. Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *International journal of urology* 2008; **15**: 309-313.
8. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, Craddock JK, Kanfer E, Cwynarski K, Olavarria E, Yong A, Apperley JF, Goldman JM. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**: 2712-2716.
9. Alyea E, Weller E, Schlossman R, Canning C, Webb I, Doss D, Mauch P, Marcus K, Fisher D, Freeman A, Parikh B, Gribben J, Soiffer R, Ritz J, Anderson K. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect *Blood* 2001; **98**: 934-939.
10. Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010; **127**: 2209-2221.

11. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995; **345**: 1016-1020.
12. Brunner K, MacDonald HR, Cerottini JC. Quantitation and clonal isolation of cytolytic T lymphocyte precursors selectively infiltrating murine sarcoma virus-induced tumors. *Journal of Experimental Medicine*, 1981; **154**: 362-373.
13. Butler M, Lee JS, Ansén S, Neuberger D, Hodi FS, Murray AP, Drury L, Berezovskaya A, Mulligan RC, Nadler LM, Hirano N. Long-lived antitumor CD8+ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell. *Clinical cancer research* 2007; **13**: 1857-1867.
14. Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E, *J Exp Med*. 1992; **176**: 1453-1457.
15. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, *Science*. 1991; **254**: 1643-1647.
16. Zendman AJ, Ruiter DJ, van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* 2003; **194**: 272-288.
17. Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 2002; **188**: 43-50.
18. Tomita Y, Kimura M, Tanikawa T, Nishiyama T, Morishita H, Takeda M, Fujiwara M, Sato S. Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma; *J. Urol*. 1993; **149**: 659-663.
19. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites; *Adv. Immunol*. 1997; **25**: 1-54.
20. Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures; *Proc. Natl Acad. Sci*. 1984; **81**: 3511-3515.
21. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens; *Curr Opin Immunol* 1997; **9**: 709-716.
22. Boon T, Cerottini JC, van den Eynde B, van der Bruggen P, van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 337-65.

23. Türeci O, Chen YT, Sahin U, Güre AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of SSX genes in human tumors, *Int J Cancer* 1998; **77**: 19-23.
24. Sahin U, Türeci Ö, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmitts R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11810-11913.
25. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy; *Immunol Rev.* 2002; **188**: 22-32.
26. Scanlan MJ, Simpson AJ. The cancer/testis genes: review, standardization and commentary; *Cancer Immun* 2004; **4**: 1.
27. Gattei V, Fonsatti E, Sigalotti L, Degan M, Di Giacomo AM, Altomonte M, Calabro L, Maio M. Epigenetic immunomodulation of hematopoietic malignancies. *Semin. Oncol.* 2005; **32**: 503-510.
28. Gure AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis; *Int J Cancer* 2000; **85**: 726-732.
29. Lucas S, De Smet C, Arden KC, Viars CS, Lethé B, Lurquin C, Boon T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; **58**: 743-52.
30. Chen YT, Scanlan MJ, Venditti CA, Chua R, Theiler G, Stevenson BJ, Iseli C, Gure AO, Vasicek T, Strausberg RL, Jongeneel CV, Old LJ, Simpson AJ. Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing, *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 7940-7945.
31. Hayashi E, Matsuzaki Y, Hasegawa G, Yaguchi T, Kurihara S, Fujita T, Kageshita T, Sano M, Kawakami Y. Identification of a novel cancer testis-antigen CRT2 frequently expressed in various cancers using representational differential analysis, *Clin Cancer Res.* 2007; **13**: 6267-6274.
32. Hofmann O, Caballero OL, Stevenson BJ, Chen YT, Cohen T, Chua R, Maher CA, Panji S, Schaefer U, Kruger A, Lehvaslaiho M, Carninci P, Hayashizaki Y, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ, Hide W. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 20422-20427.
33. Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, Silva MC, Mundstein AS, Cohen T, Chen YT, Chua R, Gurung S, Gnjatic S, Jungbluth AA, Caballero OL, Bairoch A, Kiesler E, White SL, Simpson AJ, Old LJ, Camargo AA, Vasconcelos AT. CTdatabase: a

- knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens, *Nucleic Acids Res.* 2009; (Database issue): D816-819.
34. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; **434**: 325-337.
 35. Zendman AJ, Ruiters DJ, van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function *J. Cell Physiol.* 2003; **194**: 272-288.
 36. Türeci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; **95**: 5211-5216.
 37. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen, *Onkologie* 1999; **5**: 659-667.
 38. Kalejs M, Erenpreisa J. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brainstorming" session. *Cancer cell international* 2005; **5**: 4.
 39. Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, de Smet C, Hayward SD, Fuks F, Boon T, de Plaen E. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription, *Nucleic Acids Res.* 2004; **32**: 4340-4350.
 40. Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines; *Clin Cancer Res.* 2003; **9**: 2778-85.
 41. De Smet C, de Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; **93**: 7149-7153.
 42. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Tanzarella S, Danielli R, Colizzi F, Fonsatti E, Traversari C, Altomonte M, Maio M. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-desoxycytidine. *Cancer Research*, 2004; **64**: 9167-9171.
 43. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate; *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998; **353**: 831-837.
 44. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription; *Nat. Genet.* 1998; **19**: 187-191.
 45. Wade PA, Geron A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation; *Nat Genet.* 1999; **23**: 62-66.

46. Wade PA. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 2001; **20**: 3166-3173.
47. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinber D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 1999; **13**: 1924-1935.
48. Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter Demethylation and Histone Acetylation Mediate Gene Expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in Human Cancer Cells. *Molecular cancer research* 2006; **4**: 339-49.
49. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Fourth ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001: 2575-2615.
50. Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo *Cell* 1995; **80**: 593-601.
51. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications of the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995; **85**: 744-750.
52. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory cells in vivo. *Immunity* 1998; **9**: 395-404.
53. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. *Fields Virology* 2001, pp. 2575-2627. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
54. Jenson, H.B. Acute-Epstein-Barr virus infections. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* 1996; **3**: 477-506.
55. Miller CL, Burkhardt AL, Lee JH, Stealey B, Longnecker R, Bolen JB, Kieff E. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immun* 1995; **2**: 155-166.
56. Decker LL, Klamon ID, Thorley-Lawson DA. Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol.* 1996; **70**: 3286-3289.
57. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 1997; **71**: 4882-4891.
58. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH, Lanier LL. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogenic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1992; **175**: 353-360.

59. Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMPA2 drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998; **9**: 405-411.
60. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; **318**: 733-741
61. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; **320**: 502-506
62. Zeng Y, Zhang LG, Li HY, Jan MG, Zhang Q, Wu YC, Wang YS, Su GR. Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou City, China. *Int J Cancer* 1982; **29**: 139-141.
63. de-Thé G, Geser A, Day NE, Turkei PM, Williams EH, Beri DP, Smith PG, Dean AG, Bronkamm GW, Feorino P, Henle W. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 1978; **274**: 756-761.
64. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, Habermann TM, Wiesner PH, Swinnen JL, Woodle ES, Bromberg JS. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 1999; **68**: 1517-1525.
65. Nilsson K. The nature of lymphoid cell lines and their relationship to the virus, Springer Verlag Berlin, Germany 1979.
66. Miller G. Epstein-Barr virus biology, pathogenesis and medical aspects. Fields BN Knipe KM eds. . *Virology*, 1921-58, Raven Press New York 1990.
67. Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 1967; **157**: 1064-1065.
68. Miller G, Enders JF, Lisco H, Kohn HI. Establishment of lines from normal human blood leukocytes by co-cultivation with a leukocyte line derived from a leukemic child. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; **132**: 247-252.
69. Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein LI. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 1972; **2**: 988-989.
70. Aman P, Ehlin-Henriksson B, Klein G. Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations. *J Exp Med* 1984; **159**: 208-220.
71. Miller G, Lipman M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; **70**: 190-194.

72. Sie L, Loong S, Tan EK. Utility of Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Neuroscience Research* 2009; **87**: 1953-1959.
73. Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, Carvalho-Silva DR, Mahzar K, Rehman S, Firasat S, Dar A, Tyler-Smith C, Mehdi SQ. Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1670**: 81-83.
74. Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WE. EBV-Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryopreserved whole blood. *Intl J Epidemiol* 2008; **37** Suppl 1: i41-i45.
75. Sugimoto M, Ide T, Goto M, Furuichi Y. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech Ageing Dev* 1999; **107**: 51-60.
76. Kataoka H, Tahara H, Watanabe T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. Immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity; *Differentiation* 1997; **62**: 203-211.
77. Tahara H, Tokutake Y, Maeda S, Kataoka H, Watanabe T, Satoh M, Matsumoto T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr Virus. *Cncogene* 1997; **15**: 1911-1920.
78. Sugimoto M, Furuichi Y, Ide T, Goto M. Incorrect use of „immortalization“ for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology* 1999; **73**: 9690-9691.
79. Kim NW, Piatysczek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011-2015.
80. Sugimoto M, Hidetoshi T, Ide T, Furuichi Y. Steps involveld in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr Virus. *Cancer Research* 2004; **64**: 3361-3364
81. Neumann F, Kubuschok B, Ertan K, Schormann C, Stevanovic S, Preuss KD, Schmidt W, Pfreunds Schuh M. A peptide epitope derived from the cancer testis antigen HOM-MEL-40/SSX2 capable of inducing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell as well as B-cell responses. *Cancer Immunol Immunother* 2011; **60**:1333–1346.
82. zum Büschenfelde CM, Metzger J, Hermann C, Nicklisch N, Peschel C, Bernhard H. The generation of both T killer and Th cell clones specific for te tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells. *J Immunol* 2001; **167**:1712-1719.

83. Wagner C, Kubuschok B, Regitz E, Mischo A, Stevanovic S, Friedrich M, Schmidt W, Rammensee HG, Pfreundschuh M. Identification of an HLA-A*2 restricted immunogenic peptide derived from the cancer testis antigen HOM MEL-40/SSX2. *Cancer Immun.* 2003; **3**:18.
84. Neumann F, Stevanovic S, Kubuschok B, Schormann C, Mischo A, Ertan K, Schmidt W, Pfreundschuh M. Identification of an HLA-DR-restricted peptide epitope with a promiscuous binding pattern derived from the cancer testis antigen HOM MEL-40/SSX2. *Int J Cancer.* 2004; **112**:661-668.
85. Scott AM, Cebon J. Clinical promise of tumour immunology. *Lancet* 1997; 349 Suppl 2: SII19-22.
86. Zendman AJ, Ruiter DJ, van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function; *J Cell Physiol* 2003; **194**: 272-288.
87. Tomita Y, Kimura M, Tanikawa T, Nishiyama T, Morishita H, Takeda M, Fujiwara M, Sato S. Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma. *J. Urol.* 1993; **149**: 659-663.
88. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 1997; **25**: 1-54.
89. Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *Journal of experimental medicine* 1998; **187**: 1349-54.
90. Gnjatic S, Atanackovic D, Jäger E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ. Survey of naturally occurring CD4 T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8862-67.
91. Jäger E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A. Monitoring CD8 T cell responses to NY- ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4760-5.
92. Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T, Komukai S, Yajima K, Nakagawa S, Ohashi M, Hatakeyama K. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: Implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2006; **118**:123-8.

93. Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res.* 2005; **11**:1809-1814.
94. Sahin U, Türeci Ö, Chen YT, Seitz G, Villena-Heinsen C, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: Basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int J Cancer* 1998; **78**: 387-389.
95. Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT 9. *Cancer Lett* 2000; **150**: 155-164.
96. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, Sugimachi K, Mori M. Expression of multiple cancer/testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer* 2001; **85**: 713-720.
97. Kawabata R, Wada H, Isobe M, Saika T, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Monden M, Nakayama E. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007; **120**: 2178-2184.
98. Jäger E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jäger D, Panicali D, Hoffman E, Pan L, Oettgen H, Old LJ, Knuth A. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 14453-14458.
99. Jäger E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8⁺ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1⁺ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12198-12203.
100. Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T, Komukai S, Yajima K, Nakagawa S, Ohashi M, Hatakeyama K. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: Implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2006; **118**:123-128.
101. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int. J. Cancer* 2000; **85**: 460-465.
102. Jungbluth AA, Stockert E, Chen YT, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Busam KJ, Old LJ. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous

- expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br J Cancer* 2000; **83**: 493-497.
103. Weinert BT, Krishnadath KK, Milano F, Pedersen AW, Claesson MH, Zocca MB. Real-time PCR analysis of genes encoding tumor antigens in esophageal tumors and a cancer vaccine. *Cancer Immun.* 2009; **9**: 9.
104. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer immunology* 2001; **1**:1.
105. Jungbluth A, Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old LJ. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1, but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer* 2001; **94**: 252-256.
106. Antonescu C, Busam K, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Spagnoli G, Ladanyi M, Old LJ, Jungbluth A. MAGE antigen expression in monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Hum Pathol.* 2001; **33**: 225-229.
107. Sigalotti L, Coral S, Altomonte M, Natali L, Gaudino G, Cacciotti P, Libener R, Colizzi F, Vianale G, Martini F, Tognon M, Jungbluth A, Cebon J, Maraskovsky E, Mutti L, Maio M. Cancer testis antigen expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 2002; **86**: 979-982.
108. Lim JH, Kim SP, Gabrielson E, Park YB, Park JW, Kwon TK. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation. *Int J Cancer* 2005; **116**: 200-206.
109. Otto SP, Walbot V. DNA methylation in eukaryotes: kinetics of demethylation and *de novo* methylation during the life cycle. *Genetics* 1990; **124**: 429-437.
110. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Dev.* 2001; **15**: 2343-2360.
111. Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; **12**: 198-209. Review. Erratum in: *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 371
112. Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, Engelsberg A, Colizzi F, Cattarossi I, Maraskovsky E, Jager E, Seliger B, Maio M. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2690-2695.
113. Guo ZS, Hong JA, Irvine KR, Chen GA, Spiess PJ, Liu Y, Zeng G, Wunderlich JR, Nguyen DM, Restifo NP, Schrupp DS. De novo induction of a cancer/testis antigen

- by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model. *Cancer Res.* 2006; **66**: 1105-1113
114. Dubovsky JA, McNeel DG. Inducible expression of a prostate cancer-testis antigen, SSX-2, following treatment with a DNA methylation inhibitor. *Prostate* 2007; **67**: 1781-1790.
115. Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, Haraguchi M, Tsuji K, Ueo H, Barnard GF, Akiyoshi T. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 1996; **224**: 183-188.
116. Janssen BL, van de Locht LT, Fourkour A, de Smet C, Mensink EJ, van Muijen GN, de Vries TJ. Transcription of the MAGE-1 gene and the methylation status of its Ets binding promoter elements: a quantitative analysis in melanoma cell lines using a real-time polymerase chain reaction technique. *Melanoma Res.* 1999; **9**: 213-222.
117. Goodyear O, Agathangelou A, Novitzky-Basso I, Siddique S, McSkeane T, Ryan G, Vyas P, Cavenagh J, Stankovic T, Moss P, Craddock C. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute leukemia and myelodysplasia. *Blood* 2010; **116**:1908-1918.
118. Cabrera T, López-Nevot MA, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Jan; **52**: 1-9.
119. Seliger B. Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors. *J Immunotoxicol* 2008; **5**: 361-367.
120. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36734-36741.
121. Smith HA, McNeel DG. Vaccines targeting the cancer-testis antigen SSX-2 elicit HLA-A2 epitope-specific cytolytic T-cells. *J Immunotherapy* 2011; **34**:569-580.
122. Pollack SM, Li Y, Blaisdell MJ, Farrar EA, Chou J, Hoch BL, Loggers ET, Rodler E, Eary JF, Conrad EU 3rd, Jones RL, Yee C. NYESO-1/LAGE-1s and PRAME are targets for antigen specific T cells in chondrosarcoma following treatment with 5-Aza-2-Deoxycytidine. *PLoS One.* 2012; **7**: e32165.
123. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 2001 Jul 15; **61**: 5544-5551.
124. Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune response to tumour antigens: implication for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol.* 2001 Sep; **54**: 669-674.

125. Hofbauer GF, Schaefer C, Noppen C, Boni R, Kamarashev J, Nestle FO, Spagnoli GC, Dummer R. MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1549-1553.
126. Li H, Minarovits J. Host cell-dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes: regulation by DNA methylation; *Adv Cancer Res.* 2003; **89**: 133-156.
127. Brichard VG, Lejeune D. GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine* 2007; **2**: B61-71.
128. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:10697-1702.
129. van Baren N, Bonnet MC, Dreno B, Khammari A, Dorval T, Piperno-Neumann S, Lienard D, Speiser D, Marchand M, Brichard VG, Escudier B, Negrier S, Dietrich PY, Maraninchi D, Osanto S, Meyer RG, Ritter G, Moingeon P, Tartaglia J, van der Bruggen P, Coulie PG, Boon T. Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. *J. Clin. Oncol.* 2005; **23**: 9008-9021.
130. Kubuschok B, Pfreundschuh M, Breit R, Hartmann F, Sester M, Gärtner B, König J, Murawski N, Held G, Zwick C, Neumann F. Mutated Ras-transfected, EBV-transformed lymphoblastoid cell lines as a model tumor vaccine for boosting T cell responses against pancreatic cancer: a pilot trial. *Human Gene Therapy, in print.*
131. Wang Z, Zhang J, Zhang Y, Lim SH. Span-Xb expression in myeloma cells is dependent on promoter hypomethylation and can be upregulated pharmacologically. *Int J Cancer* 2006; **118**: 1436-1444.
132. Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, Niesvizky R, Williamson B, Frosina D, Chen YT, Bhardwaj N, Chen-Kiang S, Old LJ, Cho HJ. The cancer-testis antigens CT17 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlates with plasma-cell proliferation. *Blood* 2005; **106**: 167-174.
133. Li Z, Li W, Meklat F, Wang Z, Zhang J, Zhang Y, Lim SH. A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Ropporin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Int J Cancer* 2007; **121**: 1507-1511.

7 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Chef Herrn Prof. Dr. Pfreundschuh für sein großzügiges Entgegenkommen und sein Vertrauen. Danke, für Ihre antreibenden Worte und die daraus entstandene Motivation. Danke, für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und Ihre Anmerkungen.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Frank Neumann für seine exzellente Betreuung über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Frank, Du hast Dir immer Zeit für mich genommen und warst stets diskussions- und hilfsbereit, vielen Dank!

Ich danke Cora Stephan, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke, für die Einführung in die Methodik und für Deine Geduld.

Ich danke Herrn PD Dr. Boris Kubuschok für die Betreuung der Arbeit, für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die kritische und sehr genaue Durchsicht dieser Arbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Josè-Carreras-Zentrum in Homburg, Saar. Danke für all' die guten Ratschläge, das sehr angenehme Arbeitsklima und die Hilfestellungen. Besonders danke ich Evi Regitz für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Maria Kemele für die kleinen Hilfen im Laboralltag (und ihre "großartigen" Gele...).

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Dr. Dieter Preuß für die überaus schnelle und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Kristina Heyne für Ihr ständiges Interesse an meinem Weiterkommen, für ihr herzliches Lachen, ihr Fussballverständnis und Ihre Freundschaft.

Ich danke Frau "Prof. Dr." Sandra Reichrath, die mir bei meinen Problemen mit der RNA-Isolation sehr geholfen hat und mir gezeigt hat, wie Gleitzeit eigentlich funktioniert.

Abschließend danke ich meiner Familie und all' meinen Freunden, die mich während der gesamten Arbeit untersützt und so lange genervt haben, bis ich endlich abgegeben habe.