

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Induktion von c-Met-spezifischen zytotoxischen
T-Lymphozyten mit Hilfe dendritischer Zellen als
Voraussetzung für einen späteren Einsatz in der
Immuntherapie maligner Tumoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kerstin Schag
aus
Crailsheim**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Stevanovic

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung von malignen Erkrankungen	1
1.1.1	Tumorantigene	1
1.1.2	Tumorstrategien gegen das Immunsystem	2
1.1.3	Therapieoptionen zur Durchbrechung der Immuntoleranz	3
1.1.4	Dendritische Zellen und ihre Schlüsselrolle in der Aktivierung des Immunsystems....	4
1.2	Das Protoonkogen c-Met	6
1.3	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	8
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Material	9
2.1.1	Geräte	9
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3	Medien, Reagenzien, Antikörper.....	11
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	13
2.1.5	Tumorzelllinien	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	Generierung von DC aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC)..	17
2.2.2	Induktion einer zytotoxischen T-Lymphozyten-Reaktion durch DC.....	17
2.2.3	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay	18
2.2.4	Cold-Target-Inhibition- ⁵¹ Chromium-Release-Assay	19
2.2.5	Antikörperblockierung im Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay.....	20
2.2.6	Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	20
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.8	Elektroporation von DC mit RNA aus Tumorzellen.....	22
2.2.9	Western Blotting.....	22
3	Ergebnisse	25
3.1	Untersuchung der Tumorzelllinien auf c-Met Expression.....	25
3.2	Untersuchung gesunder humaner Gewebe auf c-Met Expression	27
3.3	Antigenspezifisches Wiedererkennen des c-Met Epitops durch CTL	28

3.4	Erkennen von endogen c-Met exprimierenden Tumorzellen durch CTL.....	30
3.5	Überprüfung der Antigenpezifität im Cold Target Inhibition ⁵¹ Chromium-Release-Assay	33
3.6	Überprüfung der MHC-Restriktion der induzierten c-Met spezifischen CTL durch Antikörperblockierungsexperimente.....	35
3.7	Antigen spezifisches Wiedererkennen des c-Met Epitops im autologen System unter Einsatz von mit Tumorzell-RNA transfizierten DC	36
4	Diskussion.....	38
4.1	Möglichkeiten zur Identifikation potenzieller Tumorantigene	38
4.2	Ergebnisse dieser Arbeit	39
4.3	Grenzen der Aussagekraft dieser Arbeit	41
4.4	Warum wurde das Protoonkogen c-Met für diese Arbeit ausgewählt?	42
4.4.1	Met und Metastasierung	42
4.4.2	Met und Tumorgenese	43
4.4.3	Met als Marker für Prognose, Verlauf und Bildgebung	46
4.4.4	Risiken beim Einsatz des Met-Rezeptors in Vakzinierungsstudien.....	47
4.5	Vakzinierungsstudien	48
4.5.1	Studien mit Met-ähnlichen Tumorantigenen	48
4.5.2	Erfolge bei Vakzinierungstherapien mit weiteren Tumorantigenen	49
4.5.3	Unerwünschte Wirkungen und Toxizität bei Vakzinierungsstudien	51
4.5.4	Ausblick.....	52
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis.....	55
7	Danksagung	68
8	Lebenslauf.....	69

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in Clinical Cancer Research (Schag, K.; Schmidt, S.M.; Müller, M.R.; Weinschenk, T.; Appel, S.; Weck, M.M.; Grünebach, F.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.G.; Brossart, P. (2004) Identification of c-Met oncogene as a broadly expressed tumor associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. Clin. Cancer Res.; 10, 3658-3666) und mit dem **ASH Travel Award 2002** ausgezeichnet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
ANA	Antinukleärer Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle („Antigen Presenting Cell“)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
bp	Basenpaar
CD	Differenzierungscluster („Cluster of Differentiation“)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (“Complementary Desoxyribonucleinacid”)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CH	Schweiz
Corp.	Corporation
⁵¹ Cr	radioaktiv markiertes Chrom
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
D	Deutschland
DC	Dendritische Zelle („Dendritic Cell“)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E:T	Verhältnis der Effektorzellen (CTL) zu Zielzellen
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Diamintetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	Fötales Kälber Serum

GB	Großbritannien
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor („Hepatocyte Growth Factor“)
HGFA	Aktivator des Hepatozytenwachstumsfaktors („Hepatocyte Growth Factor Activator“)
HIV	Menschliches Immunschwächevirus („Human Immunodeficiency Virus“)
HLA	menschliches Leukozytenantigen („Human Leucocyte Antigen“)
HLA-A2+/c-Met+	HLA-A2 und c-Met positiv
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
i.d.	intradermal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
IU	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemozyanin („Keyhole Limpet Hemocyanin“)
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Morbus
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („Messenger Ribonucleinacid“)
neg.	negativ

NK	Natürliche Killerzelle
NL	Niederlande
No.	Nummer
NP40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononucleosis Cells“)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
pos.	positiv
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure („Ribonucleinacid“)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEREX	Serologische Analyse eines Verzeichnisses der Ex- pression von rekombinanter cDNA menschlicher Tumoren mit autologem Serum („Serological analysis of recombinant cDNA expres- sion library of human tumor with autologous serum“)
SF	Ausstreuungsfaktor („Scatter Factor“)
St.	Sankt („Saint“)
TAA	Tumorantigen
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Tab.	Tabelle
TAP	Antigenprozessierungs-Transporter („Transporter associated with Antigen Processing“)
Taq	Thermophilus aquaticus
TBST	Mischung aus Tris gepufferter Salzlösung und Tween
TEMED	Tetramethylethanediamine

TGF- β	Tumorwachstumsfaktor- β
TM	Handelsmarke („Trademark“)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpr	Translozierte Promotor Region („Translocated Promotor Region“)
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
u-PA	urokinaseähnlicher Plasminogenaktivator („Urokinase-Type Plasminogen Activator“)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor („Vascular Endothelial Growth Factor“)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

3.1A	Exemplarische Darstellung einer RT-PCR	25
3.1B	Exemplarische Darstellung eines Western Blots	26
3.2	PCR mit gesunden menschlichen Geweben	28
3.3A	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit peptidbeladenen T2 und c-Met spezifischen CTL	29
3.3B	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit autologen, peptidbeladenen DC und c-Met spezifischen CTL	29
3.4A	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit HCT 116, K 562, Croft, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL	30
3.4B	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit MZ 1257, Mel 1479, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL	31
3.4C	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit A 498, SK-OV-3, K 562, Croft und c-Met spezifischen CTL	31
3.4D	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit MCF 7, U 266, K 562, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL	32
3.5A	Cold Target Inhibition ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit U 266 und c-Met spezifischen CTL	33
3.5B	Cold Target Inhibition ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit A 498 und c-Met spezifischen CTL	34
3.6	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit HLA-A2-Antikörperblockierung und c-Met spezifischen CTL	35
3.7A	Western Blot mit DC	36
3.7B	Standard- ⁵¹ Chromium-Release-Assay mit autologen, transfizierten DC mit c-Met spezifischen CTL	37

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte	9
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	10
2.3	Verwendete Medien, Reagenzien, Antikörper	11
2.4	Verwendete Puffer und Lösungen	13
2.5	Verwendete Tumorzelllinien	15
2.6	Verwendete Kontrollzelllinien	16
3.1	Ergebnisse der RT-PCR und Western Blot Analyse	27

1 Einleitung

c-Met ist ein in vielen verschiedenen malignen Tumoren und Metastasen von malignen Tumoren nachgewiesenes Protoonkogen. Die Expression von c-Met korreliert mit Transformation, Malignität und schlechter Prognose dieser malignen Erkrankungen. Gelingt es, die körpereigene Immunabwehr gegen dieses Protoonkogen zu aktivieren, so stünde eine wirkungsvolle Methode in der Therapie vieler maligner Erkrankungen zur Verfügung. In dieser Arbeit wird ein von Tumorzellen exprimiertes, von c-Met abgeleitetes Peptid in seiner Funktion als Zielmolekül der Immunabwehr untersucht. Die Grundzüge der Immunologie und der Immuntherapie, das Protoonkogen c-Met sowie die Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit werden im folgenden kurz skizziert.

1.1 Immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung von malignen Erkrankungen

Tumorzellen exprimieren zelleigene Proteine, die nach Präsentation durch den Klasse I Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Klasse I) von körpereigenen CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden können und daraufhin lysiert werden können (3, 10, 15, 16, 23, 33, 94). Diese Proteine nennt man tumorassoziierte Antigene, Tumorabstoßungsantigene oder auch Tumorantigene (TAA). Durch die Entdeckung von Tumorantigenen ergeben sich erweiterte Strategien zur Therapie maligner Erkrankungen auf immunologischer Basis (10, 32, 48, 62), da hiermit neue Zielmoleküle für Therapien zur Verfügung stehen. Da sich die Tumoren aber durch verschiedene Mechanismen der Immuntantwort entziehen können, ist es Ziel der Immuntherapie, dies zu verhindern und eine adäquate Aktivierung des Immunsystems zu erreichen.

1.1.1 Tumorantigene

Man kann fünf verschiedene Klassen von Tumorantigenen unterscheiden (62). Zur ersten Klasse gehören Peptide, die durch spezifische somatische Mutation entstanden sind und daher patientenindividuell sind, z.B. Idiotyp-Immunglobuline

von malignen Lymphomen/Myelomen oder Antigene, die durch Punktmutation entstanden sind (33). Sie sind ideale Tumorantigene, da sie ausschließlich vom Tumor präsentiert werden (48).

Die zweite Kategorie entspricht tumorspezifischen Proteinen, die in Tumorzellen exprimiert werden, nicht aber in gesunden Geweben. Da sie charakteristisch für einen bestimmten Tumor sind, werden sie in Tumoren unterschiedlicher Patienten gefunden. Hierzu gehören z.B. virale Antigene in Malignomen mit viraler Ätiologie (u.a. EBV-induziertes Lymphom, HCV-/HBV-induziertes hepatozelluläres Karzinom, HPV-induziertes Zervixkarzinom) oder Proteine, die durch Mutation oder Translokation von Onkogenen entstehen und bei verschiedenen Patienten zu finden sind (p53-Mutation, ras-Mutation; 48).

Antigene, die in gesunden Geweben mit Ausnahme der Hoden und der Plazenta nicht vorkommen, aber in vielen Tumoren reaktiviert werden, bilden als dritte Gruppe die sogenannten „cancer-testis-Antigene“. Beispiele hierfür sind Proteine der MAGE-, GAGE-, BAGE-Familie (10, 33, 94) oder NY-ESO-1 (61). Die vierte Klasse besteht aus Differenzierungsantigenen, wie etwa Tyrosinase, gp75, gp100 oder MelanA/Mart1 (10, 33), die bei Melanom-Patienten beschrieben sind. Kürzlich wurde mit RU2 ein Differenzierungsantigen für die Niere beschrieben (34).

Zur letzten Kategorie gehören Proteine, die in Malignomen überexprimiert vorliegen, gleichzeitig jedoch auch in gesunden Geweben zu finden sind (36), z.B. HER-2/neu (40), MUC1 (15, 16) sowie das Protoonkogen c-Met.

Die körpereigene Abwehr erkennt aber offensichtlich sämtliche Tumorantigene nicht in einem ausreichenden Maß, denn die malignen Tumoren persistieren und progressieren in der Regel trotz potenzieller Abwehrmaßnahmen des Immunsystems. Grund dafür ist die über den Selektionsdruck geförderte Entwicklung von Strategien durch die Tumorzellen, um ihrer Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen (4, 26, 32, 52).

1.1.2 Tumorstrategien gegen das Immunsystem

Tumorzellen können für das Immunsystem unsichtbar bleiben, indem sie die TAA nicht mehr oder nur unzureichend präsentieren. Sie hemmen entweder ko-

stimulierende Moleküle (z.B. CD28, B7, CD40), so dass das entscheidende zweite Signal zur Aktivierung der T-Zelle fehlt und somit Toleranz induziert wird, oder sie präsentieren zusätzlich T-Zell-inhibierende Moleküle, wie z.B. CTLA-4 (2, 22, 36). Des Weiteren können Tumorzellen die MHC-Klasse I-Moleküle herunterregulieren (26, 47) und dadurch die Präsentation der TAA z.B. durch TAP- oder Proteasom-Defizienz verhindern (38, 117). Außerdem induzieren sie keine Entzündungsreaktionen, wie bei bakteriellen oder viralen Infektionen (47). Deshalb fehlt die Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die die Expression von Adhäsionsmolekülen anregen bzw. professionell antigenpräsentierende Zellen anlocken und zur Reifung bringen, so dass naive T-Zellen letztlich nicht einwandern bzw. aktiviert werden können (36, 96). Zudem können manche Tumoren die Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 blockieren und die Signaltransduktion von IL-2 Rezeptoren auf den T-Zellen verhindern (104). Schließlich bilden Tumorzellen auch immunsuppressive Faktoren wie VEGF, TGF- β , Prostaglandine oder IL-10, die antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen in ihrer Reifung, Proliferation und Funktion hemmen und das gesamte Immunsystem modifizieren (36, 45, 47, 70, 100, 106).

1.1.3 Therapieoptionen zur Durchbrechung der Immuntoleranz

Aufgrund der Vielzahl immunsuppressiver Strategien der Tumoren müssen Behandlungsansätze entwickelt werden, die trotz dieser Mechanismen eine effiziente, dauerhafte Immunantwort gegen den Tumor induzieren können. Dies wird versucht über die Entwicklung von sogenannten Tumorstimmungsimpfungen, die die Immuntoleranz des Abwehrsystems durchbrechen sollen.

Eine Strategie hierbei ist die Initiierung einer Immunantwort durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC). Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten APC mit der einzigartigen Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren und damit die Zerstörung der Tumorzellen einzuleiten (1, 5, 17) – was sie zu einem wertvollen Adjuvanz in der Entwicklung von Vakzinierungstherapien maligner Erkrankungen macht (17, 18, 21, 42, 85, 131). Zudem aktivieren DC nicht nur CD8-positive T-Zellen, sondern sie können ebenfalls MHC-Klasse II-vermittelt die CD4-positiven T-Helferzellen aktivieren, so dass sich in der Bekämpfung der

Tumorzellen ein weiterer Ansatz ergibt (13, 116, 125). Außerdem wurde gezeigt, dass die Präsenz von DC in soliden Tumoren mit einer besseren Prognose und längerem Überleben bei einigen menschlichen Malignomen assoziiert ist (6), was auf die Bedeutung der DC in der immunologischen Kontrolle von Tumoren hinweist. Deshalb stellt die *ex vivo* Generierung von aktivierten, reifen DC, die nach Beladung mit synthetisch hergestellten TAA-Peptiden, rekombinanten Proteinen, Tumorzell-Lysaten, Tumorzell-RNA oder nach Tumor-DC-Fusion die Entstehung spezifischer CTL und T-Helferzellen induzieren, einen Ansatz für Vakzinierungstherapien dar (17, 32, 42, 85, 116, 123). Alternativ können die DC mit rekombinanten Viren transfiziert werden (85). Die exprimierenden DC bzw. aktivierten T-Zellen (31) werden dem Patienten als Tumorstoffinjektion injiziert.

Ein anderer Ansatz ist die direkte Injektion von peptidbeladenen DC (15, 16, 79, 114, 115, 130), von DC, die mit bestrahlten Tumorzellen inkubiert wurden (123), von DC, die mit einem rekombinanten Antigen-Zytokin-Fusionsprotein (Provenge™, Dendreon Corp., Seattle, USA) inkubiert wurden (120) oder von DC, die mit autologen Tumorzell-Lysaten inkubiert wurden (55, 86). Die *in vivo* fehlende Aktivierung der DC durch nicht vorhandene Entzündungsmediatoren wird dabei durch die Gabe *ex vivo* aktivierter, reifer DC umgangen. Schließlich wird zusätzlich zu den zellgebundenen Vakzinen oder auch ohne weitere Zugaben von Vakzinen versucht, die Immunreaktion durch Gabe von GM-CSF (auch in Form von mit GM-CSF/CD40-Liganden transfizierten, bestrahlten Tumorzellen), KLH, Flt3-L, PADRE, Anti-CTLA-4, IL-2, IL-12 oder anderen immunmodulierenden Substanzen zu verstärken (15, 17, 22, 23, 31, 86, 110, 120).

1.1.4 Dendritische Zellen und ihre Schlüsselrolle in der Aktivierung des Immunsystems

Dendritische Zellen (DC) entstehen im Knochenmark und können in fast jedem Gewebe in Form von unreifen Vorläuferzellen vorliegen (20). Neben ihrer physiologischen Entstehung aus CD34-positiven Progenitorzellen kann man DC *in vitro* auch aus CD14-positiven Monozyten mit Hilfe von GM-CSF und IL-4 generieren und mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, LPS oder durch

CD-40-Ligation aktivieren (14, 16, 41, 108). DC spielen eine Schlüsselrolle in der zellvermittelten Immunität (5), denn sie können im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen oder B-Zellen naive, ruhende T-Zellen aktivieren und damit eine primäre T-Zell-Antwort einleiten (1, 5, 17, 54). Ursprünglich sind unreife DC sessil und haben vor Ort die Fähigkeit zur Makropinozytose (87, 125). Nach ihrer Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine oder Bakterienbestandteile werden die DC mobil, reduzieren ihre Phagozytosefähigkeit und erlangen T-Zell-stimulierende Potenz, so dass sie in die regionalen Lymphknoten auswandern und dort mit den naiven T-Zellen in Kontakt treten können (16, 20). Sie induzieren in den T-Zell-Regionen der Lymphknoten durch Antigenpräsentation eine primäre Immunantwort mit Hilfe einer verstärkten Expression von Adhäsions-, MHC- und kostimulierenden Molekülen sowie durch Sekretion von Zytokinen wie IL-12 (20). Die vorangehende Prozessierung des Tumorantigens soll im folgenden genauer beleuchtet werden.

Zunächst werden die phagozytierten Proteine in Proteasomen zerkleinert, durch einen ATP-abhängigen Transporter (TAP) ins Endoplasmatische Retikulum gebracht und dort mit neu gebildeten MHC-Klasse I-Molekülen und β_2 -Mikroglobulin zusammengesetzt. Über den Golgi Apparat werden die MHC-Antigen-Komplexe dann zur Zelloberfläche transportiert (54, 63 S. 132 ff., 98). Inzwischen sind auch TAP-unabhängige Prozessierungswege bekannt (93). Bemerkenswert ist dabei, dass die DC die TAA MHC-Klasse I-restringiert präsentieren können, obwohl die TAA nicht aus dem Zytosol der DC stammen, sondern durch Phagozytose aufgenommene exogene Peptide darstellen (1). Normalerweise präsentieren Zellen aber nur im Zytosol synthetisierte Proteine (z.B. virale oder eigene Proteine) MHC-Klasse I-restringiert. Exogene Peptide (z.B. von Bakterien) werden MHC-Klasse II-präsentiert (63, S. 25). Die Fähigkeit zur MHC-Klasse I-Präsentation von exogenen Peptiden durch die DC wird als „cross-priming“ bezeichnet (13, 87, 107) und stellt einen entscheidenden Mechanismus für die Induktion der zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen dar, denn die DC aktivieren durch diese MHC-Klasse I-Antigenpräsentation naive CD8-positive T-Lymphozyten und somit die zellvermittelte Immunität (63, S. 252 ff.). Im Gegensatz dazu erkennen bei MHC-

Klasse II-Präsentation CD4-positive T-Helferzellen den Komplex und aktivieren die nicht-zellvermittelte, humorale Immunantwort der Antikörperbildung (63, S. 25ff.; S. 515-518). Nach der Wiedererkennung dieses spezifischen MHC-Klasse I-Antigen-Komplexes auf Tumorzellen sind die induzierten CTL, die nach ihrer Aktivierung durch die DC klonal expandieren, nun in der Lage, antigenspezifisch Zellen abzutöten. Der Einsatz von DC ist deshalb ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung wirkungsvoller tumorizider Vakzinierungstherapien (17, 18, 21, 42, 85, 131). Die Erkennung des Peptids durch die CTL kann aber immer nur in Verbindung mit dem individuenspezifischen MHC-Komplex erfolgen (MHC-Restriktion), wobei das MHC-Molekül entscheidend an der Peptidwahl beteiligt ist (35, 119). Menschliche MHC werden als „Human Leucocyte Antigen“ (HLA) bezeichnet, wobei die dahinter stehenden Großbuchstaben einzelne Genloci, die darauf folgenden Zahlen das entsprechende Allel kennzeichnen (63, S. 65-71). Charakteristisch für die in dieser Arbeit benutzten HLA-A2-präsentierten Peptide ist, dass sie 9 Aminosäuren lang sind und an Position 2 und 9 die Anker-Aminosäuren Valin oder Leucin als Sequenzmotiv tragen, über die sie an das MHC-Klasse I-Molekül binden (102, 103).

1.2 Das Protoonkogen c-Met

Das c-Met-Protoonkogen wurde ursprünglich als ein Onkogen identifiziert, das nach Behandlung mit dem chemischen Karzinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in einer menschlichen Osteosarkom-Zelllinie aktiviert wurde (24). c-Met kodiert für einen heterodimeren Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, dessen Ligand der „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) ist, der auch „Scatter Factor“ (SF) genannt wird (12, 83, 111). HGF wird als inaktiver Vorläufer sezerniert und erlangt erst durch eine extrazelluläre, proteolytische Konversion in die heterodimere, aktive Form biologische Funktionalität (81). Das Gleichgewicht zwischen HGF-Aktivator (HGFA) und HGFA-Inhibitor spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der HGF-Aktivität und stellt einen weiteren Ansatzpunkt neuer therapeutischer Strategien in der Krebstherapie dar (68). Der insgesamt 190 kD große Met-Rezeptor besteht aus einer 45-50 kD großen α - und einer 140-145 kD großen β -Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke

verbunden sind und durch endoproteolytische Spaltung aus einer Polypeptidkette entstehen (50, 111). Die stark glykosylierte α -Untereinheit befindet sich extrazellulär, die β -Untereinheit hat neben der extrazellulär gelegenen Ligandenbindungsstelle eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Sobald HGF bindet, findet eine Autophosphorylierung und Dimerisierung des Met-Rezeptors statt, die dann verschiedene Signalkaskaden, z.B. über ras, PI3 Kinase, PCL- γ , MEK oder MAPK vermittelte Signaltransduktionswege, aktiviert (30, 43, 44, 83). Obwohl der Ligand des Met-Rezeptors „Leberwachstumsfaktor“ heißt, werden zahlreiche Funktionen in Zellen verschiedener Organe und Herkunft durch den HGF-Rezeptor vermittelt (46, 143): Zellproliferation (19), Motilität (19), Invasion in die extrazelluläre Matrix (65, 128), Angiogenese (19, 30), Formation von tubulären Strukturen (78, 111), Organregeneration von Leber, Niere (60, 74) und Lunge (141), Wundheilung (88), Wachstum und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (77, 143) und immunologische Funktionen, wie etwa die Regulation der integrinvermittelten Adhäsion und die Differenzierung von B-Zellen im Keimzentrum (137). Des Weiteren spielt c-Met/HGF eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung der Leber (112), der Skelettmuskeln (9, 127), der Plazenta (135) und der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas (89) sowie bei der Migration neuronaler Vorläuferzellen (122) und Melanozyten (127) – weshalb Mäuseembryonen mit einer Nullmutation im HGF/SF-Gen *in utero* sterben (112, 135).

HGF und Met kommunizieren physiologischerweise über eine parakrine Interaktion zwischen HGF-produzierendem, mesenchymalem Stromagewebe und Met-exprimierenden Epithelzellen (121). Dennoch wurde gezeigt, dass eine Reihe nichtepithelialer Zellen, u.a. hämatopoetische Zellen, neurale Zellen und Skelettmuskelzellen, auf HGF reagieren und hämatologische Malignome, wie etwa das Multiple Myelom, der M. Hodgkin, Leukämien und Lymphome, den Met-Rezeptor exprimieren (11, 67, 97, 129). Wenn die Aktivierung des Met/HGF-Systems von ihrem physiologischen Muster abweicht, kann dies zur Entstehung und Metastasierung verschiedener Malignome im Menschen führen, z.B. zu Mammakarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Melanomen, kolorektalen Karzi-

nomen, Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen oder kindlichen hepatozellulären Karzinomen (27, 39, 65, 66, 69, 90, 101, 109, 133, 134).

1.3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurden durch Genexpressionsanalysen zwischen gesunden Geweben und Tumorgeweben Gene identifiziert, die selektiv im Tumor zu finden sind oder dort überexprimiert vorliegen (140). Diese Technik wurde kombiniert mit der Massenspektrometrie, um MHC-gebundene Peptide aus diesen Genen zu identifizieren. Auf diese Weise wurde ein vom c-Met Protoonkogen abgeleitetes HLA-A2-bindendes Peptid gefunden (140). Da das c-Met Protoonkogen in zahlreichen Malignomen und Metastasen überexprimiert wird und entscheidend an der Entstehung von Malignomen, an deren Proliferation und v.a. am Übergang zur Metastasierung beteiligt ist, stellt es ein interessantes Zielmolekül für die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar.

In dieser Arbeit soll die mögliche Funktion dieses Peptides als T-Zell-Epitop untersucht werden und dessen Eignung zur Induktion von spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren soll überprüft werden, ob Tumorzelllinien verschiedener Malignome dieses Epitop endogen exprimieren und ob eine effiziente Erkennung und Lyse der dieses Epitop präsentierenden Zellen möglich ist. Zusätzlich wird analysiert werden, ob die Lyse der Zielzellen antigenspezifisch und HLA-A2-restringiert verläuft und ob die Erkennung des Peptides sowohl bei endogenem oder durch Transfektion erhaltenem als auch bei synthetischem c-Met stattfindet. Schließlich wird erforscht werden, ob die Ergebnisse auch auf ein autologes System übertragbar sind.

Da über c-Met Epitope in diesem Zusammenhang noch keinerlei Erkenntnisse vorliegen, können mit diesen *in vitro* Experimenten entscheidende Voraussetzungen für einen späteren Einsatz in der *in vivo* Vakzinierungstherapie geschaffen werden. Diese Erkenntnis würde den möglichen klinischen Anwendungsbereich von peptidbeladenen DC in der Krebstherapie vergrößern, deren Chancen und Risiken beispielhaft an bereits durchgeführten klinischen Studien am Ende der vorliegenden Dissertation aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Produkt	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, GB
Brutschrank NuAire™ US AutoFlow	NuAire™ Inc., Plymouth, USA
Elektroporationsgerät Easyject Plus™	Peqlab, Erlangen, D
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Gefrierschrank -85°C UF 300	Napco, Winchester, USA
Heizblock Unitek™ HBS 130	Peqlab, Erlangen, D
Kühlschrank Kombination 4°C und -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Olympus MO21	Olympus Optical GmbH, Hamburg, D
Minishaker IKA-Works	IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crails- heim, D
Neubauer Zählkammer 0,1mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, D
PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	PerkinElmer Life Science, Zaventem, B
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Baar, CH
Radioaktivitätsmessgerät 1205 Beta- plate liquid scintillation counter	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, D
Reinluftwerkbank Heraeus Hera Safe HS 18/2	Heraeus, Hanau, D

Schüttelbank Plymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
SDS-PAGE-Kammer Mini-Protean 3 electrophoresis system	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Spannungsgerät EPS 601	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, D
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel, D
Wasserbad WB/OB 7-45 W-BU 45	Memmert, Schwabach, D
Western Blot Kammer Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Heraeus 1.0 R	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Loch-Platte Falcon® Multiwell™ 353046	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
24-Loch-Platte Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
96-Loch-Platte Cellstar® U-shape, with lid, TC-Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
500-PP-Reaktionsgefäße Cellstar® 1,5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Audiographiefilm Kodak Biomax Light Film 13 x 18 cm	Kodak, Rochester, USA
Combitips Plus 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Einwegspritzen Injekt 5ml, 10ml, 20ml	Braun, Melsungen, D
Falcon® Blue Max™, 50ml Blue Cups	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Falcon® 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Handschuhe SafeSkin Satin Plus®	Kimberley Clark, Roswell, USA
Kanülen Microlance 3 26G 0,3/0,45x13	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kanülen Sterican 0,9x70mm	Braun, Melsungen, D
Kryoröhrchen Nunc™ Cryo Tube™	Nalge Nunc Internat., Rochester, USA
Luma Plate™ –96	Packard Bioscience BV, Groningen, NL
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Pipetten Serological Pipet 2ml Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Pipettenspitzen blau 1,0ml und gelb 0,2ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, D
PP-Test Tube 15ml Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Sterilfilter Minisart 0,45µm, 0,2µm	Sartorius, Göttingen, D
TC-Tube Cellstar®, sterile, 14ml, 16,0/100mm Screw Cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0,2µl Vented Blue Plug Seal Cup 70ml, 275ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.1.3 Medien, Reagenzien, Antikörper

Tab. 2.3: Verwendete Medien, Reagenzien, Antikörper

Produkt	Hersteller
Agarose, peqGold Universal	Peqlab, Erlangen, D
Antikörper α HLA-A2 (MoAb BB7.2 (IgG2b))	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
Antikörper Actin I-19, sc-1616, polyclonal goat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D

Antikörper h-Met C 28, sc-161, polyclonal rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Antikörper Chrom Pure Mouse IgG	Dianova, Hamburg, D
Antikörper horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG sc-2054	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Antikörper horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG sc-2020	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Antikörper Streptavidin horseradish peroxidase conjugate 2 ml	Amersham Life Science, Freiburg, D
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Peribo Science, Bonn, D
cDNA-Set: Superscript™, first strand synthesis system for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, D
DMSO	Serva, Heidelberg, D
ECL™ plus detection reagent	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, D
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
GM-CSF Leucomax	Novartis, Basel, CH
Größenmarker Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Größenmarker Biotinylated SDS PAGE Standards High Range	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Größenmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Human Multiple-Choice™ First-Strand cDNA	OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, D
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, D
Medium RPMI 1640 with Glutamax 11875	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
Medium X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA

Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO ₄)	Bio Whittaker Europe, Verviers, B
PCR-Set: Amplitaq	Perkin Elmer, Boston, USA
Penicillin-Streptomycin 100 ml	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
Synthetisch hergestelltes Peptid abgeleitet von c-Met: Aminosäuren 654-662, YVDPVITSI	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
Synthetisch hergestelltes Peptid abgeleitet von HIV: pol HIV-1 reverse Transkriptase, Aminosäuren 476-484, ILKEPVHGV	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
Synthetisch hergestelltes Peptid abgeleitet von Survivin: Aminosäuren 95-104, ELTLGEFLKL	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden, D
Trypanblau	Seromed, Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin-EDTA 25200	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D

Alle verwendeten Reagenzien, die in dieser Tabelle nicht explizit erwähnt wurden, wurden von den Firmen Merck (Hohenbrunn, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma (St. Louis, USA) bezogen.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2.4: Verwendete Puffer und Lösungen

Eingesetzt bei	Name	Zusammensetzung
PCR, S. 21	cDNA-Syntheseansatz	2 μ l 10xRT Buffer 4 μ l MgCl ₂ (25 mM) 2 μ l DTT (0,1 M) 0,25 μ l SuperScript II RT (50 IU/ μ l) 1 μ l Rnase Out Recombinant

		RNase Inhibitor (40 IU/ μ l)
PCR, S. 21	PCR-Syntheseansatz	1,5 μ l 10xBuffer 0,9 μ l MgCl ₂ (25 mM) 0,15 μ l dNTP (10mM) 0,1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 IU/ μ l) 0,8 μ l Forward Primer (10 μ M) 0,8 μ l Reverse Primer (10 μ M) 9,75 μ l DEPC behandeltes Wasser
Gelelektrophorese, S. 21	TAE-Puffer	40 mM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA, pH 8,0
Gelelektrophorese, S. 22	Ladepuffer, 1-fach	5% Glycerin 166,7 μ M EDTA 0,025% Bromphenolblau
Western Blotting, S. 22	NP40 Lysispuffer	2,5 ml 0,2 mM Hepes pH 7,5 0,3 ml 5M NaCl 0,5 ml 20% Igepal 80 μ l EDTA (250 mM) 2,5 ml 40% Glycerin 4,01 ml ddH ₂ O 10 μ l Aprotinin 100 μ l PMSF
Western Blotting (SDS-PAGE), S. 23	7,5% Polyacrylamid- Trenngel	5,475 ml ddH ₂ O 5,625 ml 1M Tris pH 8,8 3,75 ml 30% Polyacrylamid (37,5 : 1 – Acrylamid : Bisacrylamid) 150 μ l 10% SDS 5 μ l TEMED 50 μ l 10% APS

Western Blotting (SDS-PAGE), S. 23	Sammelgel	6,0 ml ddH ₂ O 1,9 ml 2M Tris pH 6,7 2 ml 30% Polyacrylamid 100 µl 10% SDS 5 µl TEMED 100 µl 10% APS
Western Blotting (SDS-PAGE), S. 23	Ladepuffer, 1-fach	9 ml Tris HCL pH 6,8 (1 M) 11,9 ml 25% SDS 14 ml 100% Glycerol 1 ml 0,05% Bromthymolblau 35,9 ml ddH ₂ O
Western Blotting (im SDS- Laufpuffer/ Transferpuffer)	Runningbuffer, 1-fach	192 mM Glycin 25 mM Tris 0.1% (w/v) SDS
Western Blotting (SDS-PAGE), S. 23	SDS-Laufpuffer	35 ml 10xRunningbuffer 3,5 ml 10% SDS 311,5 ml ddH ₂ O
Western Blotting (Blotten), S. 23	Transferpuffer	50 ml 10xRunningbuffer 100 ml Methanol 5 ml 10% SDS 345 ml ddH ₂ O

2.1.5 Tumorzelllinien

Tab. 2.5: Verwendete Tumorzelllinien

Tumorzelllinie	Herkunft	HLA-Status
A 498	Nierenzellkarzinom	HLA-A2+
Croft	EBV-immortalisierte B-Zelllinie	HLA-A2+
HCT 116	Kolonkarzinom	HLA-A2+
MCF 7	Mammakarzinom	HLA-A2+

Mel 1479	Malignes Melanom	HLA-A2+
MZ 1257	Nierenzellkarzinom	HLA-A2+
T2	TAP-defizienter Hybrid aus einer B-Zelllinie und einer T-Lymphoblasten Zelllinie	HLA-A2+
U 266	Multiples Myelom	HLA-A2+

Tab. 2.6: Verwendete Kontrollzelllinien

Tumorzelllinie	Herkunft	Funktion im Chrom-Assay
K 562	Proerythroblastenleukämie	Überprüfung der NK-Zellaktivität
SK-OV-3	Ovariakarzinom	Kontrolle der HLA-A2-Restriktion (HLA-A2-/HLA-A3+)

Die bei den Experimenten verwendeten Tumorzelllinien wurden in RP10 Medium („RPMI 1640 with Glutamax“ komplettiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 50 µM 2-Mercaptoethanol, Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 mg/ml) kultiviert.

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung von DC aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC)

PBMNC wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut isoliert. Das Blut stammte aus heparinisierten „buffy coats“ von freiwilligen Blutspendern der Blutbank Tübingen. Nach Zellzählung der lebenden Zellen in Trypanblaufärbung wurden die PBMNC in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen auf 3 ml RP10 Medium (Herstellung s. S. 16) in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die nicht adhärenierten Zellen durch mehrfaches Waschen mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) entfernt. Die verbliebenen adhärenierten Monozyten wurden in je 3 ml Medium aufgenommen und alle 2 Tage mit humanem, rekombinanten GM-CSF (100 ng/ml), IL-4 (1000 IU/ml) und TNF- α (10 ng/ml) versetzt, um reife DC zu generieren. Je 1×10^7 der nicht ausgesäten PBMNC wurden in Kryoröhrchen in 1 ml RP10 Medium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Induktion einer zytotoxischen T-Lymphozyten-Reaktion durch DC

Zur Induktion einer zytotoxischen T-Lymphozyten-Reaktion (CTL-Reaktion) wurden 5×10^5 DC mit je 50 $\mu\text{g/ml}$ des synthetisch hergestellten Peptides, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen (abgeleitet von c-Met: Aminosäuren 654-662, YVDPVITSI; abgeleitet von Survivin: Aminosäuren 95-104, ELTLGEFLKL; abgeleitet von HIV: pol HIV-1 reverse Transkriptase, Aminosäuren 476-484, ILKEPVHGV) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit $2,5 \times 10^6$ autologen PBMNC in RP10 Medium bei 37°C inkubiert.

Die DC präsentieren nun die entsprechenden Peptide den unter den PBMNC vorhandenen naiven T-Lymphozyten. Erkennt ein T-Zell-Rezeptor spezifisch den präsentierten Peptid-MHC-Komplex, so kommt es nach Aggregation,

Komplexbildung mit dem Korezeptor CD8 und Aktivierung durch weitere kostimulierende Signale der DC zur Auslösung einer Signalkaskade, die letztlich zur klonalen Expansion des spezifischen T-Lymphozyten führt (63, S. 241 ff.).

Nach sieben Tagen erfolgte eine Restimulation der Zellen. Hierzu wurden $2,5 \times 10^6$ autologe PBMNC mit je $50 \mu\text{g/ml}$ synthetischem Peptid zwei Stunden lang bei 37°C in 1 ml RP10 Medium inkubiert, danach 1,3 Minuten lang mit 30 Gray bestrahlt und zu 5×10^5 der induzierten Zellen in 1 ml RP10 Medium in 24-Loch-Platten gegeben. An den Tagen 1, 3 und 5 wurden den Kulturen 1 ng/ml humanes rekombinantes IL-2 (T-Zell-Wachstumsfaktor) zugegeben. Die Restimulation wurde nach jeweils einer Woche ein bis zwei Mal wiederholt. Fünf Tage nach der letzten Restimulation wurde die zytotoxische Aktivität der induzierten T-Lymphozyten in einem Standard- $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay überprüft.

2.2.3 Standard- $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay

Das Standard- $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay wurde durchgeführt, um eine CTL-Reaktion durch die erzielte Lyse der Zielzellen nachzuweisen. Gemessen wird die radioaktive Strahlung im Überstand, die durch Lyse aus den mit $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Zellen austritt.

Zunächst wurden Zielzellen eine Stunde bei 37°C mit $10 \mu\text{g/ml}$ ^{51}Cr -Natriumchromat inkubiert und anschließend gewaschen in RP10 Medium. Als Positivkontrolle wurden T2 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit $50 \mu\text{g/ml}$ synthetischem Peptid auf 1 ml RP10 Medium verwendet. T2 Tumorzellen fehlen die Gene für den TAP-Transporter, deshalb ist die intrazelluläre Beladung der MHC-Klasse I-Moleküle durch die TAP-Defizienz verhindert. Da T2 Zellen aber MHC-Klasse I-Moleküle (HLA-A2) auf der Zelloberfläche unbeladen exprimieren können, kann ein exogenes Peptid mit passendem Bindungsmotiv mit dem MHC-Klasse I-Molekül einen stabilen Komplex bilden und wird nun auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert (93, 98).

Je 1×10^4 der Zielzellen wurden in je $50 \mu\text{l}$ RP10 Medium auf eine 96-Loch-Platte gegeben. Eine unterschiedliche Konzentration CTL in je $100 \mu\text{l}$ RP10 Medium wurde – je nach Verhältnis der CTL-Effektorzellen zu den Zielzellen (E:T Ratio) – sowohl zu den Zielzellen als auch zu den T2 Tumorzellen gege-

ben. Die absteigenden Konzentrationen der CTL gegenüber den Zielzellen betragen 30:1 - 10:1 - 3,33:1 - 1,11:1 - 0,37:1 - 0,12:1. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden pro Loch 50 µl von den Überständen entnommen und die enthaltene radioaktive Strahlung in einem Radioaktivitätsmessgerät (1205 Betaplate liquid scintillation counter, Perkin Elmer Wallac, Freiburg, D) gemessen.

Die prozentuale spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{100 \times (\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}$$

Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung wurde durch Zugabe von 100 µl RP10 Medium anstatt der CTL, die maximale ⁵¹Cr-Freisetzung durch Zugabe von 100 µl 2% Triton X-100 (gelöst in PBS) anstatt der CTL bestimmt.

2.2.4 Cold-Target-Inhibition-⁵¹Chromium-Release-Assay

Um die antigenspezifische Lyse der Zielzellen nachzuweisen, wurde ein Cold-Target-Inhibition-⁵¹Chromium-Release-Assay durchgeführt. Hierbei wurde vorgegangen wie beim oben beschriebenen Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay, allerdings wurden zu den mit ⁵¹Chrom inkubierten Zielzellen („Hot Targets“) zusätzlich 2x10⁵ „Cold Targets“, d.h. peptidbeladene, aber nicht ⁵¹Chrom-markierte T2-Zellen, in 50 µl RP10 Medium zugegeben. Um die T2-Zellen mit Peptid zu beladen, wurden sie zuvor mit 50 µl synthetisiertem Peptid zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Sofern die „Cold Targets“ das immunogene Peptid an der Oberfläche präsentieren, wird es vom spezifischen T-Zell-Rezeptor der CTL erkannt und es kommt zur Lyse dieser T2-Zellen. Aufgrund der Konkurrenz der 20-fach mehr vorhandenen „Cold Targets“ mit den „Hot Targets“ kommt es zu einer Hemmung der Lyse der „Hot Targets“. Die T2-Zellen sind aber nicht ⁵¹Chrom-markiert, somit wird im Überstand keine Radioaktivität messbar sein. Wird den CTL durch die „Cold Targets“ allerdings ein irrelevantes Peptid präsentiert, beispielsweise abgeleitet von HIV oder Survivin, so wird die Lyserate der „Hot Targets“ nicht beeinflusst, da der T-Zell-Rezeptor der induzierten CTL dieses irrelevante Peptid

nicht spezifisch erkennt. Es werden also die ^{51}Cr -markierten „Hot Targets“ lysiert, d.h. es wird Radioaktivität im Überstand messbar sein.

Die prozentuale spezifische Lyserate wurde wie oben beschrieben berechnet. Um die spontane bzw. maximale ^{51}Cr -Freisetzung zu erhalten, wurde anstelle der CTL jeweils RP10 Medium bzw. 2% Triton X-100 zu den „Hot Targets“ und „Cold Targets“ gegeben.

2.2.5 Antikörperblockierung im Standard- ^{51}Cr -Chromium-Release-Assay

Um zu zeigen, dass die zytotoxische Aktivität der CTL HLA-A2-restringiert ist, wurde zu den Zielzellen ein Antikörper gegen HLA-A2 gegeben (10 $\mu\text{l/ml}$ MoAb BB7.2 (IgG2b), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Universität Tübingen). Des Weiteren wurden Kontroll-Assays zum Ausschluss einer unspezifischen Blockade mit einem irrelevanten Maus-Antikörper (10 $\mu\text{l/ml}$ Chrom Pure Mouse IgG, Dianova, Hamburg, D) und zur Überprüfung der Zytotoxizitätsreaktion der CTL ohne Zugabe von Antikörpern durchgeführt.

2.2.6 Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Ziel einer PCR ist die Amplifizierung von einer Ziel-DNA. Die Doppelstränge der Ziel-DNA werden durch Erhitzen aufgetrennt, danach erfolgt unter Zugabe von Primern und einer thermostabilen DNA-Polymerase die Synthese der DNA komplementär zu den Einzelsträngen. Durch Wiederholen dieses Zykluses kann rasch eine große Menge DNA gewonnen werden. Bei der RT-PCR muss jedoch zuvor mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus RNA eine cDNA generiert werden.

Die RNA wurde aus den Tumorzelllinien mit Hilfe des QIAGEN RNeasy „Mini“ Kits (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach der Herstellerinformation isoliert. Die erhaltene Menge an isolierter RNA wurde im RNA/DNA Calculator Gene Quant II (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D) gemessen und bis zur Verwendung in den Experimenten bei -80°C gelagert.

Um die PCR Experimente zu standardisieren, wurden zur cDNA-Synthese jeweils gleiche Mengen eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe, D) wie folgt:

1 µl Oligo(dT) als Primer, 1 µl dNTP und die aus Tumorzelllinien isolierte RNA wurden mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 10,75 µl aufgefüllt und bei 65°C fünf Minuten lang denaturiert und anschließend eine Minute lang auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 9,25 µl cDNA-Syntheseansatz (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C für 50 Minuten, gefolgt von 15 minütiger Inkubation bei 70°C. Anschließend wurde 1 µl RNase H zugegeben und bei 37°C 20 Minuten lang inkubiert. Je 1 µl der cDNA wurde zu 14 µl PCR-Syntheseansatz (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) zugegeben. Die dabei verwendeten Primer wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Innere Medizin II, Universitätsklinik Tübingen):

c-Met (145): 5' AGTCAAGGTTGCTGATTTTGGT 3' und 5' AGTGCTCCC-CAATGAAAGTAGA 3';

β2-Mikroglobulin: 5' GGGTTTCATCCATCCGACAT 3' und 5' GATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'.

Die β2-Mikroglobulin-Primer wurden verwendet, um die Integrität und Effizienz der cDNA-Synthese zu kontrollieren.

Nun erfolgte die PCR im Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Life Science, Zaventem, B) nach folgendem Protokoll: Zwei Minuten Denaturierung bei 94°C, anschließend folgten 30 Zyklen mit je 94°C Denaturierung für 30 Sekunden, 59°C „Annealing“ für 30 Sekunden und eine Minute Elongation bei 72°C. Nach Durchlaufen der 30 Zyklen wurde die PCR über sieben Minuten bei 72°C mit der terminalen Elongation beendet. Die PCR Produkte wurden anschließend auf einem 2,5% Agarosegel analysiert.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für ein 2,5% Agarosegel wurden 2,5 g Agarose (peqGold Universal, Peqlab, Erlangen, D) in 100 ml TAE-Puffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) aufgeköcht, mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine Gelkammer gegos-

sen. Die PCR-Produkte wurden nun auf das 2,5% Agarosegel mit 6-fach Lade-
puffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) aufgetragen und bei 70 Volt nach ihrer
Größe aufgetrennt. Als Größenmarker wurden 6 µl GeneRuler™ 1 kb DNA
Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Durch das in dop-
pelsträngige DNA interkalierend Ethidiumbromid konnten die PCR-Produkte
unter UV-Licht mit Hilfe des Biometra Bio Doc Analyze (Whatman Biometra
GmbH, Göttingen, D) visualisiert werden.

2.2.8 Elektroporation von DC mit RNA aus Tumorzellen

Die DC-Generierung erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Am sechsten Tag
wurden die DC zwei Mal mit serumfreiem X-VIVO 20 Medium (BioWhittaker,
Walkersville MD, USA) gewaschen und in einer Endkonzentration von 2×10^7
Zellen/ml resuspendiert. Die zur Elektroporation verwendete RNA ist zuvor nach
Herstellerinformation (Qiagen GmbH, Hilden, D) aus den Tumorzelllinien isoliert
worden und wurde bei -80°C gelagert. 200 µl der DC-Zellsuspension wurde mit
10 µg dieser RNA gemischt und in eine 4 mm Küvette gegeben. Die Elektropo-
ration erfolgte im Easyject Plus™ (Peqlab, Erlangen, D) unter folgenden Para-
metern: 300 Volt Spannung, 150 µF Ladung, 1540 Ω Widerstand und 231 ms
Impulszeit (53). Nach der Elektroporation erfolgte die sofortige Überführung in
vorgewärmtes RP10 Medium.

2.2.9 Western Blotting

Western Blotting ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von
markierten Antikörpern. Nach Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese
werden sie durch Blotten auf eine Nitrozellulosefolie übertragen und anschlie-
ßend mit Antikörpern detektiert.

Zur Gewinnung der Proteine wurden die Tumorzellen gewaschen, ab-
zentrifugiert und zehn Minuten lang in 200 - 300 µl NP40 Lysispuffer (s. 2.1.4.
Puffer und Lösungen) auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Lysat 5 Minuten
bei 14000 Umdrehungen/Minute und 4°C zentrifugiert. Der abzentrifugierte
Überberstand wurde in gekühlten Kryoröhrchen bei -80°C weggefroren.

Die Messung der Proteinkonzentration in diesen Lysaten erfolgte mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach Herstelleranweisung für Microplates im Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D).

Für die Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein 7,5% Polyacrylamid-Trenngel (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde nach Abgießen des Isopropanols das Sammelgel (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) darüber gegossen und ebenfalls mit 1ml Isopropanol überschichtet. Je 30 µg Protein wurden mit NP40 Puffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und zusammen mit 10 µl 3-fach Ladepuffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) nach vierminütigem Kochen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zusätzlich wurde vor dem Kochen 10% DTT zugegeben. Das im Puffer enthaltene SDS überdeckt die Eigenladung der Aminosäuren und entfaltet die Proteine, so dass eine Auftrennung nach Molekulargewicht ermöglicht wird (denaturierende, diskontinuierliche Methode). 1,5 µl Größenmarker „Biotinylated SDS PAGE Standards High Range“ (Bio Rad Laboratories GmbH, München, D) wurde ebenfalls mit Ladepuffer (10:1) versetzt und nach 30 sekündigem Kochen aufgetragen, 7 µl Größenmarker „Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Marker“ (Invitrogen, Karlsruhe, D) wurde ohne Kochen und ohne Zugabe von Ladepuffer aufgetragen. Die SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 Volt in SDS-Laufpuffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) mit dem „Mini-Protean 3 Electrophoresis System“ (Bio Rad Laboratories GmbH, Karlsruhe, D). Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am Gelende angekommen war.

Die aufgetrennten Proteine wurden in der Western Blot Kammer Mini Trans Blot Cell (Bio Rad Laboratories GmbH, Karlsruhe, D) bei 100 Volt über 1,5 Stunden durch Blotten in Transferpuffer (s. 2.1.4. Puffer und Lösungen) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in 4% Slim Fast Lösung (gelöst in TBST 0,5%) eine Stunde lang inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte die einstündige Inkubation mit polyklonalem, vom Kaninchen stammendem c-Met-Antikörper (h-Met C 28, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D), der 1:500 in 2,5 % Slim Fast Lösung eingesetzt wurde.

Danach wurde die Nitrozellulosemembran dreimal in 2,5 % Slim Fast Lösung gewaschen, um den nicht gebundenen c-Met Antikörper zu entfernen und anschließend 30 bis 60 Minuten mit dem 1:5000 verdünnten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Zweitantikörper in 2,5% Slim Fast Lösung bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Da der c-Met Antikörper vom Kaninchen stammte, konnte der gegen Kaninchen-IgG gerichtete Zweitantikörper spezifisch am c-Met Antikörper binden, sofern dieser zuvor an vorhandenes c-Met Protein gebunden hatte und deshalb nicht gewaschen worden war. Die Konjugation des Zweitantikörpers mit HRP ermöglichte die im folgenden beschriebene Detektion mit dem ECLTM Plus System. Der Teil der Membran, auf dem sich der biotinylierte Größenmarker befand, wurde mit HRP-gekoppeltem Streptavidin 1:10000 in 0,5% TBST 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Teile der Membran wurden im Anschluss daran gewaschen (2 x 5 Minuten in 0,5% TBST, 1 x 5 Minuten in 3% TBST, 2 x 5 Minuten in 0,5% TBST, 1 x 5 Minuten in TBS). Der Teil der Membran, auf dem sich der biotinylierte High Range Größenmarker befand, wurde anstatt mit 3% TBST mit 0,5% TBST gewaschen. Reagenz A und B des ECLTM Plus Systems wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Die Membran wurde mit dieser Mischung 1 Minute lang inkubiert und danach in Folie verpackt. Durch die Zugabe der ECLTM-Mischung oxidiert die an die Zweitantikörper konjugierte HRP das in der ECLTM Plus-Mischung enthaltene Lumigen PS-3 Acriden Substrat. Das entstandene Produkt luminesziert und färbt somit den in einer Röntgenfilmkassette auf die Membran aufgelegten Autodiagraphiefilm (Kodak, Rochester, USA). Die Belichtungszeit lag zwischen zwei und zehn Sekunden.

Um zu zeigen, dass jeweils identische Proteinmengen bei den unterschiedlichen Proben analysiert wurden, wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde lang mit polyklonalem, von der Ziege stammendem Actin-Antikörper (1:500 in 2,5 % Slim Fast Lösung) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 2,5% Slim Fast Lösung erfolgte die Inkubation über 30 Minuten mit dem gegen Ziegen-IgG gerichteten Zweitantikörper (1:2000 in 2,5% Slim Fast Lösung). Die Visualisierung erfolgte ebenfalls durch das ECLTM Plus-System.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Tumorzelllinien auf c-Met Expression

Um Kontroll- und Tumorzelllinien als Zielzellen oder Kontrollen in den Standard-⁵¹Chromium-Release-Assays oder Cold Target Inhibition ⁵¹Chromium-Release-Assays einsetzen zu können, musste zunächst ihr c-Met Expressionsverhalten untersucht werden.

Die Überprüfung der Tumorzelllinien und Kontrollzelllinien auf ein c-Met Transkript erfolgte mit RT-PCR. Mit dem Western Blot Verfahren wurde zur Kontrolle die Proteinexpression dieser Zelllinien analysiert. Die RT-PCR und die Western Blot Versuche wurden mehrmals wiederholt.

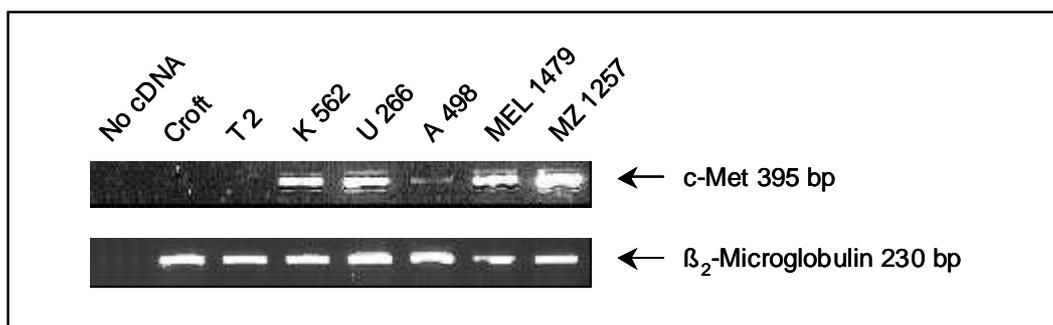


Abb. 3.1A: Exemplarische Darstellung einer RT-PCR. Zur Kontrolle wurden β_2 -Mikroglobulin Primer eingesetzt sowie eine PCR ohne Zugabe von cDNA durchgeführt („no cDNA“). Größenangabe der sichtbaren Banden jeweils in Basenpaaren (bp).

Bei der RT-PCR erfolgte zur Kontrolle des Versuches jeweils eine PCR mit dem „house-keeping-gene“ β_2 -Mikroglobulin, das in jeder Zelllinie vorhanden ist. β_2 -Mikroglobulin konnte bei jeder Zelllinie amplifiziert werden, man erhielt eine Bande in der erwarteten Höhe bei 230 bp. Um die Verunreinigung von Reagenzien mit einer Ziel-DNA zu überprüfen, wurde jeweils eine PCR ohne cDNA durchgeführt („no cDNA“). Bei der Kontrolle ist kein amplifiziertes Produkt sichtbar, es ist also davon auszugehen, dass die Proben nicht verunreinigt waren.

Bei den Zelllinien A 498, HCT 116, K 562, MCF 7, Mel 1479, MZ 1257, SK-OV-3, U 266 waren jeweils in der zu erwarteten Höhe bei 395 bp eine Bande zu sehen, d.h. bei diesen Zelllinien ist der Nachweis von für c-Met kodierender mRNA gelungen. Bei den Zelllinien Croft und T2 war hingegen kein c-Met spezifisches Signal sichtbar. Um die PCR Ergebnisse auf Proteinebene zu verifizieren, wurden mit gleichen Zelllinien Western Blots durchgeführt.

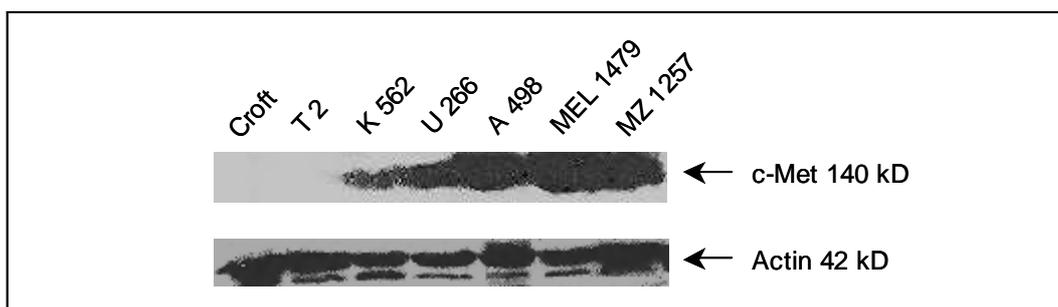


Abb. 3.1B: Exemplarische Darstellung eines Western Blots (mit einem gegen die β -Untereinheit von c-Met gerichteten polyklonalen Antikörper). Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Actin-Antikörper eingesetzt. Größenangabe der sichtbaren Banden jeweils in Kilodalton (kD). Der Größenmarker ist in der Abbildung nicht zu erkennen, da es sich um einen Größenmarker handelt, der nur auf der Nitrozellulosemembran sichtbar ist. Größenzuordnung erfolgte durch Vergleich der Membran mit dem Audiographiefilm.

In Höhe von 140 kD ist bei den c-Met positiven Zelllinien jeweils eine Bande zu sehen, die bei den c-Met negativen Zelllinien Croft und T2 fehlt.

Anschließend wurde als versuchsinterne Kontrolle die Proteinexpression des zur Grundausstattung aller humanen Zellen gehörenden 42 kD großen Proteins Actin nachgewiesen. Mit der Detektion einer Bande bei 42 kD konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien, auch die für c-Met negativen Zelllinien Croft und T2, detektierbares Protein in diesem Versuch präsentierten und nicht durch Fehldetektion oder Fehlen von Protein ein falsch negatives Ergebnis entstanden war. Diese Western Blot Ergebnisse bestätigen also die im PCR Verfahren erhaltenen Aussagen.

Tab. 3.1: Ergebnisse der RT-PCR und Western Blot Analyse.
 („+“: c-Met mRNA in der RT-PCR nachgewiesen, bzw. c-Met Protein-Expression im Western Blot nachgewiesen; „-“: kein Nachweis von c-Met mRNA oder c-Met Protein)

Tumorzelllinie	RT-PCR	Western Blot
A 498	+	+
Croft	-	-
HCT 116	+	+
K 562	+	+
MCF 7	+	+
Mel 1479	+	+
MZ 1257	+	+
SK-OV-3	+	+
T2	-	-
U 266	+	+

Alle untersuchten Zelllinien mit Ausnahme der B-Zelllinie Croft und der TAP-defizienten T-Zelllinie T2 exprimierten sowohl c-Met mRNA, als auch c-Met Protein.

3.2 Untersuchung gesunder humaner Gewebe auf c-Met Expression

Um die Expression von c-Met in verschiedenen nicht malignen menschlichen Geweben zu untersuchen wurde cDNA von 15 nicht maligne transformierten humanen Geweben (OriGene Technologies Inc., Rockville, USA) in eine c-Met PCR eingesetzt. Dies ist interessant hinsichtlich zu erwartender Nebenwirkungen, falls das c-Met Epitop eines Tages in Vakzinierungsstudien eingesetzt werden kann.

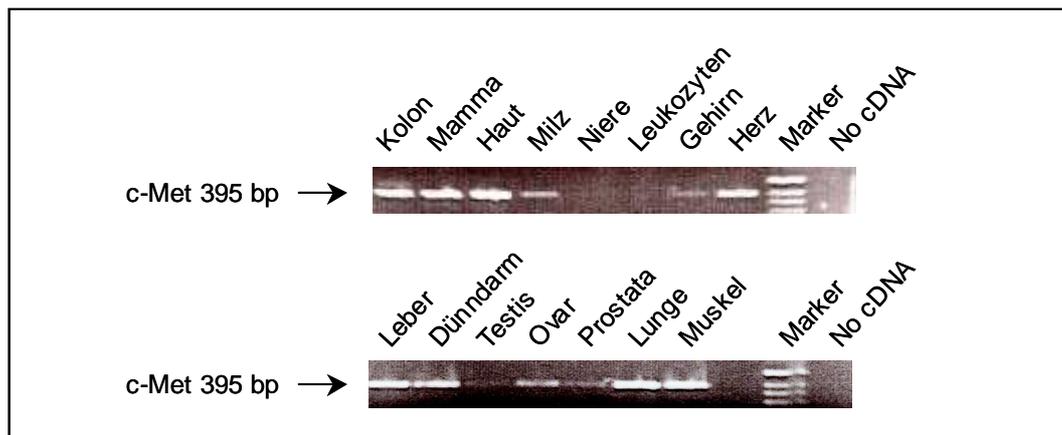


Abb. 3.2: PCR mit gesunden menschlichen Geweben. Zur Kontrolle wurde eine PCR ohne Zugabe von cDNA durchgeführt („no cDNA“). Größenangabe der sichtbaren Banden jeweils in Basenpaaren (bp). Der Größenmarker (Marker) ist teilweise dargestellt. Die Anzahl der Zyklen betrug 30.

Es ist zu sehen, dass c-Met in menschlichem Kolon, Mamma, Haut, Herz, Leber, Dünndarm, Lunge, Muskeln, Milz, Ovar, Gehirn, Testis und Prostata exprimiert wurde. Leukozyten und Nierengewebe zeigten keinerlei c-Met Expression. Der Einsatz von c-Met in Vakzinierungsstudien ist also mit Vorsicht anzugehen.

3.3 Antigen spezifisches Wiedererkennen des c-Met Epitops durch CTL

Es wurden c-Met spezifische CTL *in vitro* mit Hilfe von DC induziert, die zuvor durch Adhärenz aus PBMNC HLA-A2 positiver, gesunder Spender isoliert worden sind. Die DC wurden dazu mit dem HLA-A2-bindenden c-Met Peptid inkubiert und als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt.

Die Zytotoxizitäts-Analyse der induzierten CTL erfolgte nach mehrmaliger wöchentlicher Restimulation in einem Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay. Als Zielzellen wurden hierbei T2-Zellen bzw. autologe DC nach zwei Stunden Inkubation mit c-Met Peptid bzw. HLA-A2-bindenden irrelevanten Peptiden eingesetzt. Wie aus Abb. 3.7A bzw. Tab. 3.1 ersichtlich ist, exprimieren die DC bzw. die T2 Zellen (die außerdem durch TAP-Defizienz keine endogenen Peptide präsentieren können) kein endogenes c-Met, so dass nur eine Lyse der mit c-Met inkubierten Zielzellen zu erwarten ist.

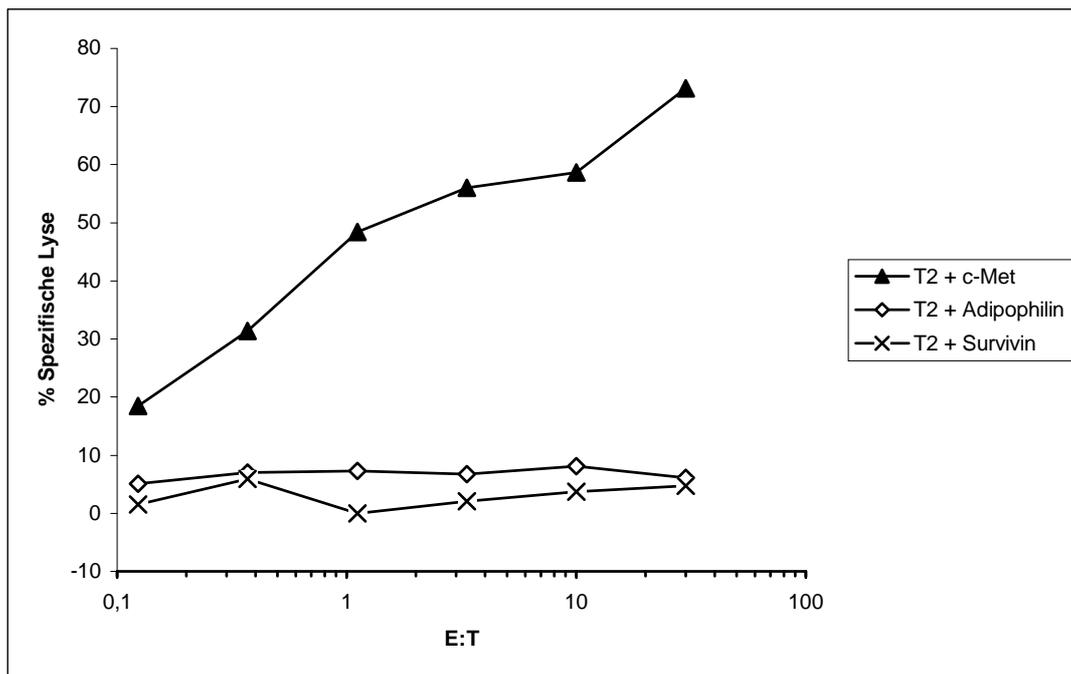


Abb. 3.3A: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit peptidbeladenen T2 und c-Met spezifischen CTL. T2-Zellen wurden mit dem antigenen c-Met Peptid oder mit den irrelevanten HLA-A2-bindenden Peptiden Survivin bzw. Adipophilin beladen und als Zielzellen im Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay eingesetzt.

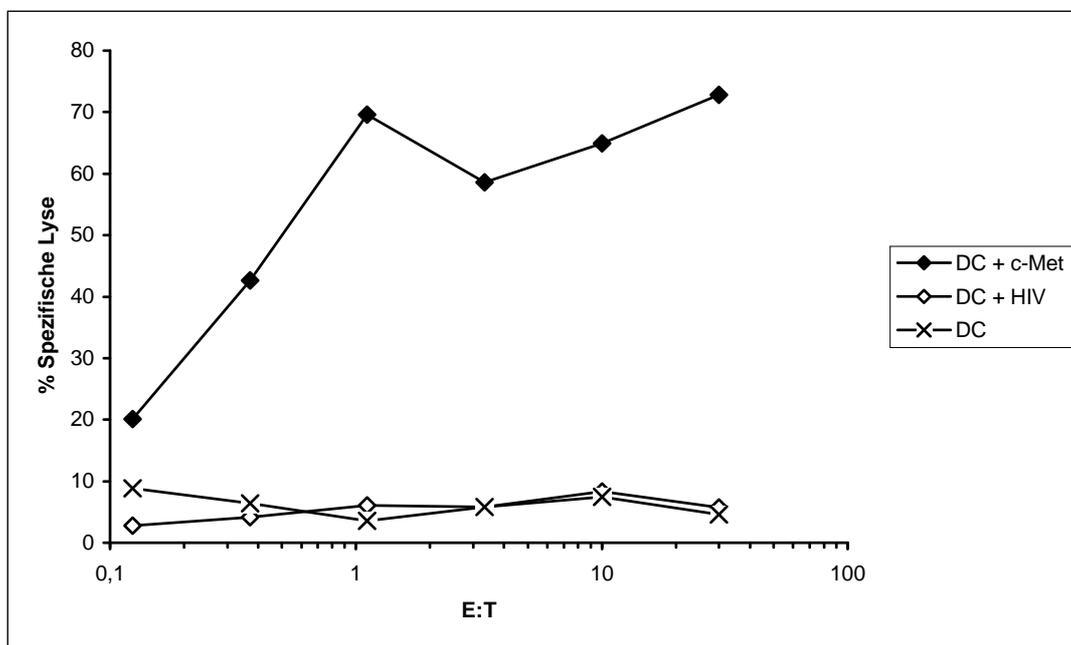


Abb. 3.3B: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit autologen, peptidbeladenen DC und c-Met spezifischen CTL. Autologe DC, die durch Inkubation mit dem c-Met Peptid beladen wurden und autologe DC, die durch Inkubation mit dem irrelevanten Peptid HIV beladen wurden bzw. unbeladen waren, wurden als Zielzellen im Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay eingesetzt.

In Abb. 3.3A und 3.3B ist zu erkennen, dass die CTL die mit synthetischem, von c-Met abgeleiteten Peptid beladenen Zellen antigenspezifisch lysieren, während die mit einem irrelevanten HLA-A2-bindenden Peptid beladenen Zellen (T2 + Survivin, T2 + Adipophilin bzw. DC + HIV oder DC ohne synthetisches Peptid) nicht lysiert wurden. Somit wurde gezeigt, dass die induzierten CTL das synthetisch hergestellte, von c-Met abgeleitete Epitop (140) antigenspezifisch wiedererkennen.

3.4 Erkennen von endogen c-Met exprimierenden Tumorzellen durch CTL

Mit weiteren Standard-⁵¹Chromium-Release-Assays wurde die Fähigkeit der CTL untersucht, Tumorzellen zu lysieren, die c-Met endogen exprimieren.

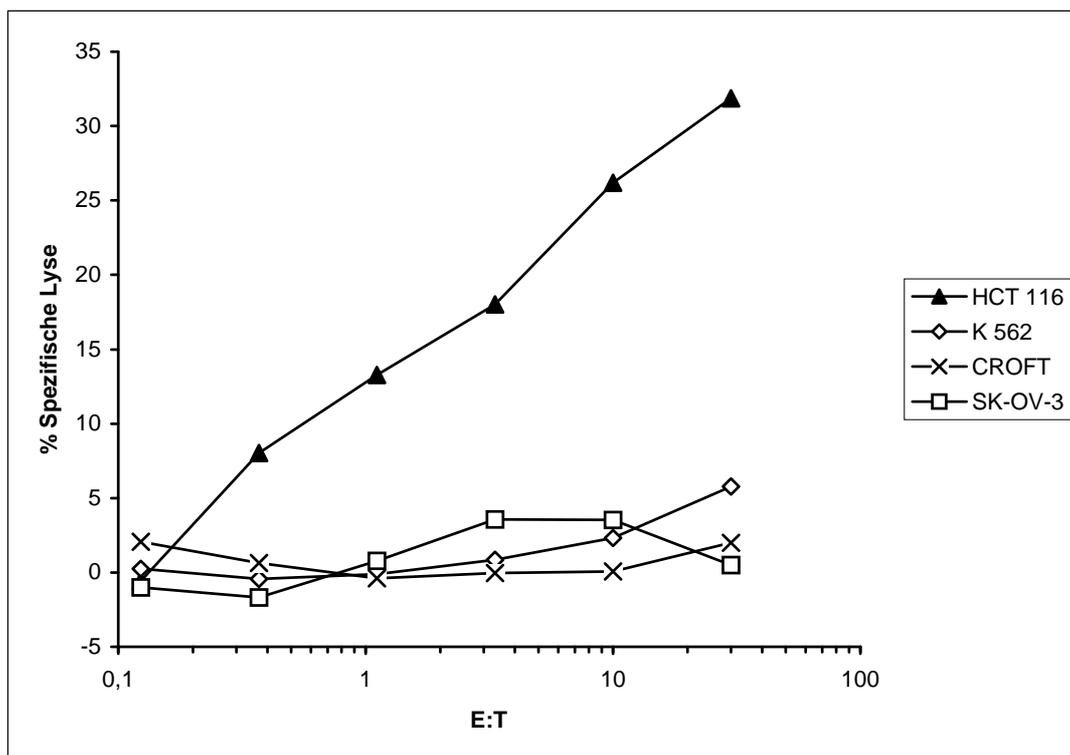


Abb. 3.4A: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit HCT 116, K 562, Croft, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL. Als Zielzellen wurde die Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und als Negativkontrollen wurden K 562 (zur Bestimmung der NK-Aktivität), Croft (HLA-A2 positiv, c-Met negativ) und SK-OV-3 (HLA-A2 negativ, c-Met positiv) eingesetzt.

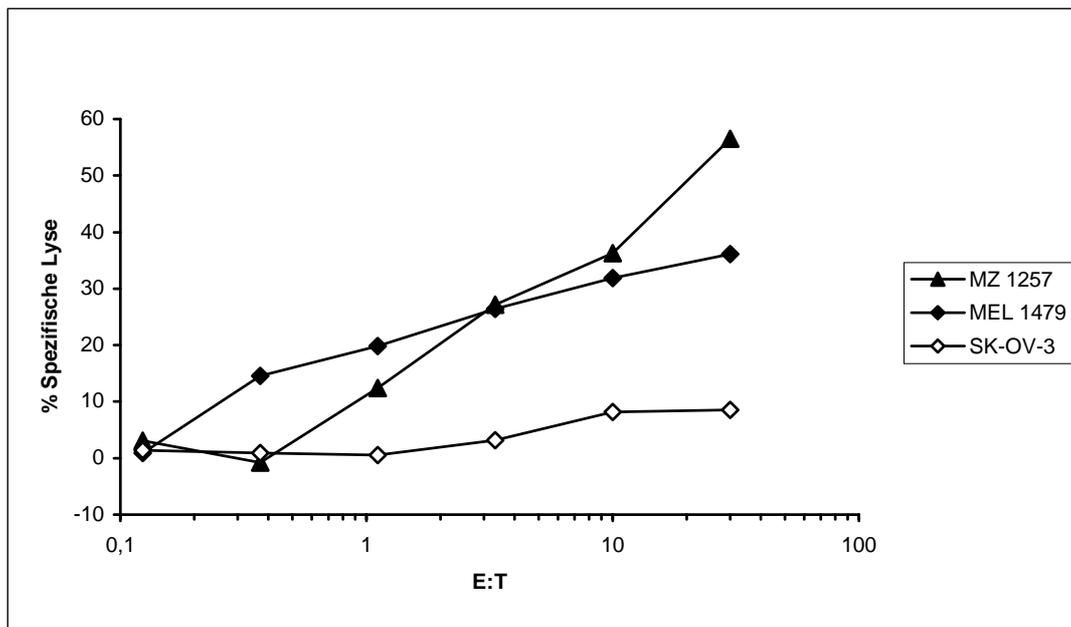


Abb. 3.4B: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit MZ 1257, Mel 1479, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL. Als Zielzellen wurden die Nierenzellkarzinomzelllinie MZ 1257 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und die Melanomzelllinie Mel 1479 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und als Negativkontrolle wurde SK-OV-3 (HLA-A2 negativ, c-Met positiv) eingesetzt.

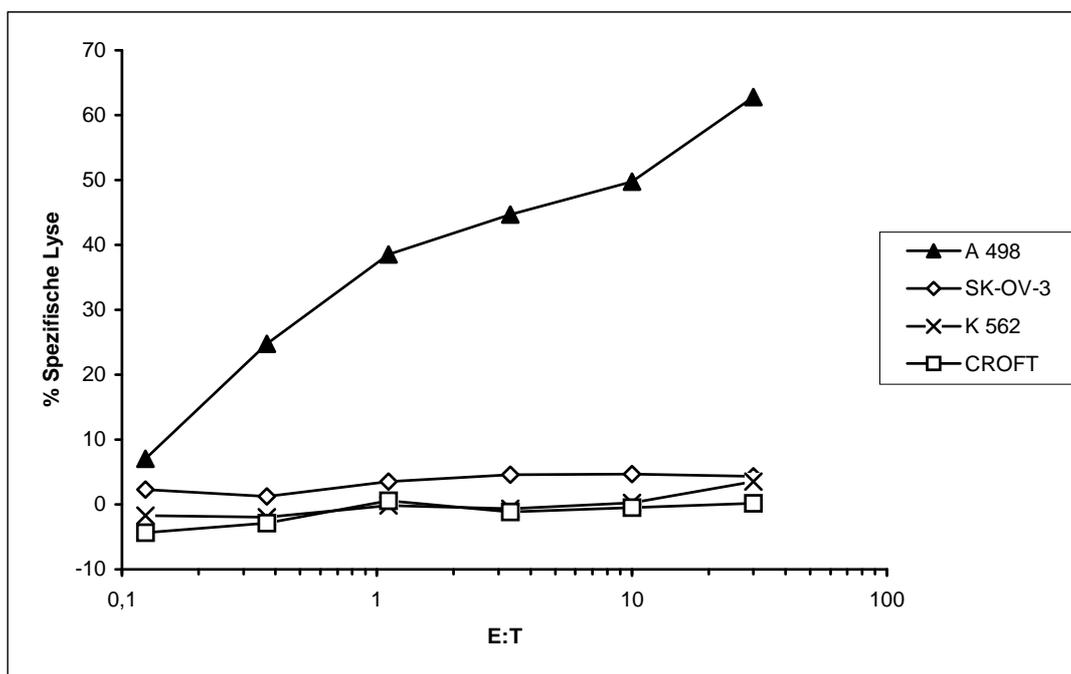


Abb. 3.4C: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit A 498, SK-OV-3, K 562, Croft und c-Met spezifischen CTL. Als Zielzellen wurde die Nierenzellkarzinomzelllinie A 498 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und als Negativkontrollen wurde K 562 (zur Bestimmung der NK-Aktivität), Croft (HLA-A2 positiv, c-Met negativ) und SK-OV-3 (HLA-A2 negativ, c-Met positiv) eingesetzt.

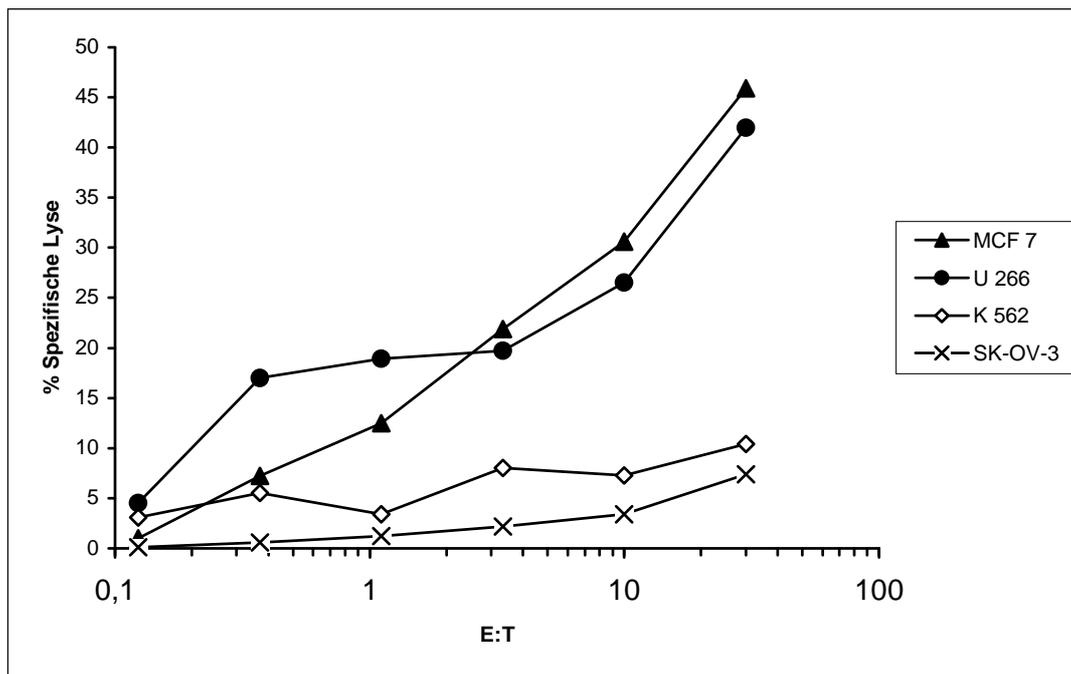


Abb. 3.4D: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit MCF 7, U 266, K 562, SK-OV-3 und c-Met spezifischen CTL. Als Zielzellen wurden die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und die Multiple Myelomzelllinie U 266 (HLA-A2 positiv und c-Met positiv) und als Negativkontrolle wurden K 562 (zur Bestimmung der NK-Aktivität) und SK-OV-3 (HLA-A2 negativ, c-Met positiv) eingesetzt.

Wie in Abb. 3.4A – 3.4D demonstriert, waren die c-Met spezifischen CTL in der Lage, die HLA-A2 positiven und endogen c-Met exprimierenden Tumorzelllinien antigenspezifisch und HLA-A2-restringiert zu erkennen und zu lysieren, währenddessen sie nicht HLA-A2 positive oder nicht c-Met exprimierende Zelllinien nicht lysierten: Es erfolgte keine Lyse der Kontrollzelllinien K 562, SK-OV-3 (HLA-A3 positiv) und Croft (c-Met negativ). Die Lyse der K 562 Zellen kann bedingt durch einen Defekt der Oberflächenmoleküle trotz c-Met Expression nur durch NK-Zellen erfolgen. Da keine Lyse erfolgte, kann man eine NK-vermittelte Lyse in den Versuchen ausschließen.

Somit wurde die antigenspezifische MHC-restringierte Lyse der endogen c-Met präsentierenden Tumorzelllinien durch die *in vitro* mit synthetischem Peptid induzierten CTL belegt und gezeigt, dass die Tumorzellen dieses Peptid gebunden am HLA-A2-Molekül präsentieren.

3.5 Überprüfung der Antigen-spezifität im Cold Target Inhibition $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay

In einem Cold Target Inhibition $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay wird die Lyse der mit $^{51}\text{Chrom}$ markierten c-Met positiven Zielzellen („Hot Targets“) durch die Konkurrenz mit den 20-fach höher konzentrierten peptidbeladenen und nicht $^{51}\text{Chrom}$ markierten T2-Zellen („Cold Targets“) gehemmt, wenn die CTL die von den T2-Zellen präsentierten Peptide antigenspezifisch erkennen.

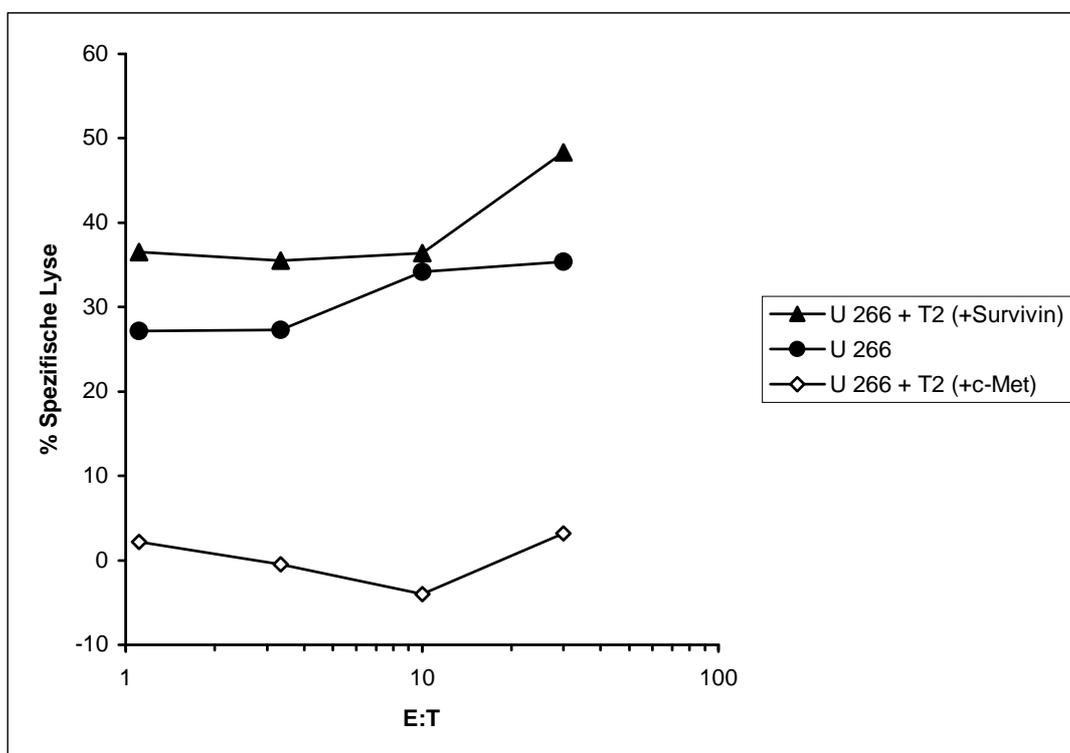


Abb. 3.5A: Cold Target Inhibition $^{51}\text{Chromium}$ -Release-Assay mit U 266 und c-Met spezifischen CTL. Die antigenspezifische Lyse der Multiplen Myelomzelllinie (HLA-A2+/c-Met+) U 266 wurde untersucht unter Zugabe von nicht $^{51}\text{Chrom}$ markierten T2-Zellen (Inhibitoren), die mit dem relevanten Peptid c-Met oder einem irrelevanten Peptid (Survivin) beladen waren. Das Verhältnis der Tumorzelllinien U 266 zu den Inhibitorzellen betrug 1:20.

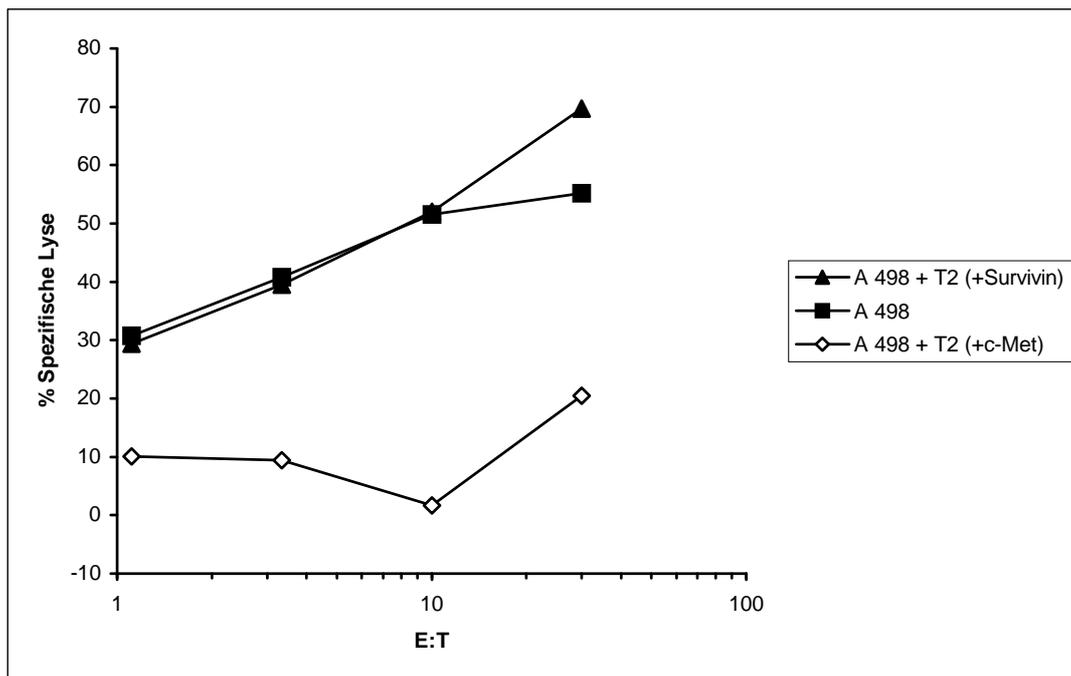


Abb. 3.5B: Cold Target Inhibition 51 Chromium-Release-Assay mit A 498 und c-Met spezifischen CTL. Die antigenspezifische Lyse der Nierenzellkarzinomzelllinie (HLA-A2+/c-Met+) A 498 wurde untersucht unter Zugabe von nicht 51 Chrom markierten T2-Zellen (Inhibitoren), die mit dem relevanten Peptid c-Met oder einem irrelevanten Peptid (Survivin) beladen waren. Das Verhältnis der Tumorzelllinien A 498 zu den Inhibitorzellen betrug 1:20.

In Abb. 3.5A und 3.5B zeigt sich erwartungsgemäß, dass die antigenspezifische Lyserate der c-Met exprimierenden Zielzellen U 266 bzw. A 498 („Hot Targets“) jeweils unter Zugabe nicht 51 Chrom markierter T2-Zellen („Cold Targets“), die das relevante c-Met Peptid präsentieren, stark reduziert wurde, während die Lyseraten unter Zugabe von mit einem irrelevanten Peptid beladenen T2-Zellen nicht wesentlich von den Lyseraten abwichen, welche die Zielzelllinien U 266 bzw. A 498 allein erzielten.

Es konnte also gezeigt werden, dass die CTL spezifisch Antigene erkennen können und spezifisch Zellen lysieren können, die das c-Met Antigen präsentieren, während Zellen, die das spezifische Peptid nicht präsentieren, nicht lysiert wurden.

3.6 Überprüfung der MHC-Restriktion der induzierten c-Met spezifischen CTL durch Antikörperblockierungsexperimente

Um die HLA-A2-Restriktion der CTL nachzuweisen, wurde ein HLA-A2-spezifischer, monoklonaler Antikörper (MoAb BB7.2 (IgG2b), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) im Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay eingesetzt. Da dieser Antikörper die HLA-A2-Moleküle der Zielzellen blockiert und diese aber für die CTL-Erkennung zwingend notwendig sind, ist keine Lyse der c-Met exprimierenden Zielzellen zu erwarten.

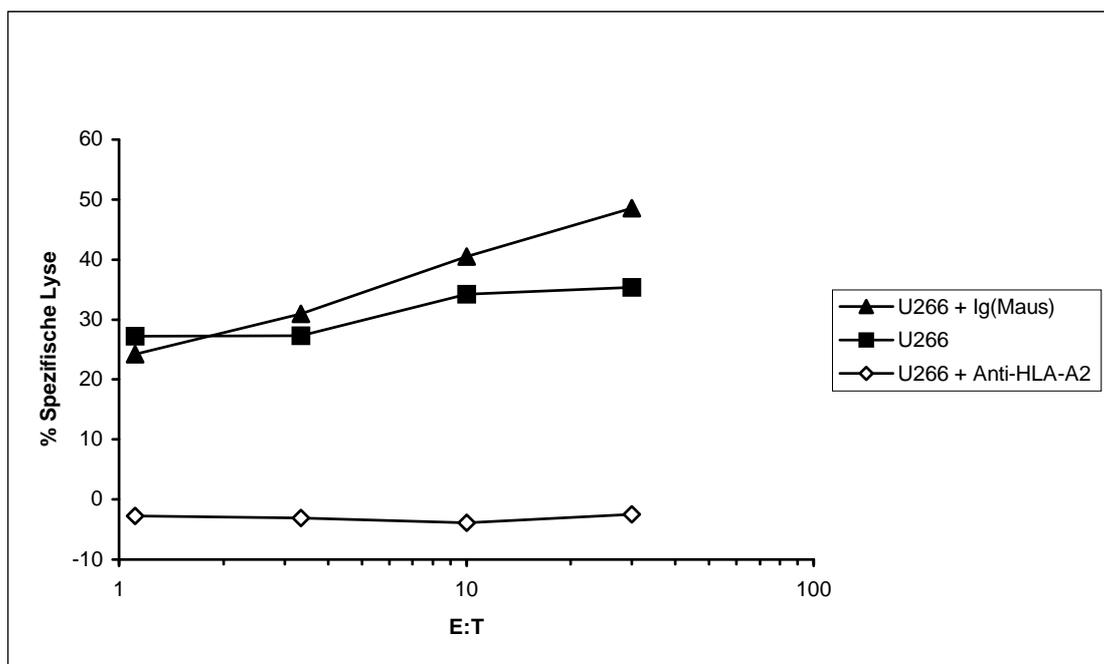


Abb. 3.6: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit HLA-A2-Antikörperblockierung und c-Met spezifischen CTL. Um die HLA-A2 Restriktion der CTL nachzuweisen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das HLA-A2-Molekül eingesetzt (Anti-HLA-A2) und zur Zielzelle U 266 gegeben. Der Zusatz eines irrelevanten Antikörpers (Ig(Maus)) sowie der Einsatz von U 266 allein diente als Kontrolle.

Wie Abb. 3.6 zeigt, sinkt unter Einsatz eines gegen das HLA-A2-Molekül gerichteten Antikörpers die Lyserate der Zielzelle U 266 auf Werte nahe 0%.

Unter Einsatz eines irrelevanten, nicht HLA-A2-spezifischen Antikörpers wurden hingegen deutlich höhere Lyseraten der Zielzelle U 266 erzielt, die in etwa den

Lyseraten der c-Met positiven Zelllinie U 266 entsprachen, die ohne Antikörperzugabe erreicht werden konnten.

Die HLA-A2-Restriktion wurde also nachgewiesen.

3.7 Antigen-spezifisches Wiedererkennen des c-Met Epitops im autologen System unter Einsatz von mit Tumorzell-RNA transfizierten DC

Um ein autologes System zu erzeugen, wurden als Zielzellen DC aus dem Blut desselben HLA-A2 positiven Spenders eingesetzt, aus dem die CTL generiert wurden. Zunächst wurden sowohl unreife als auch reife DC mit einem Western Blot auf ihre endogene c-Met Expression untersucht (Abb. 3.7A).

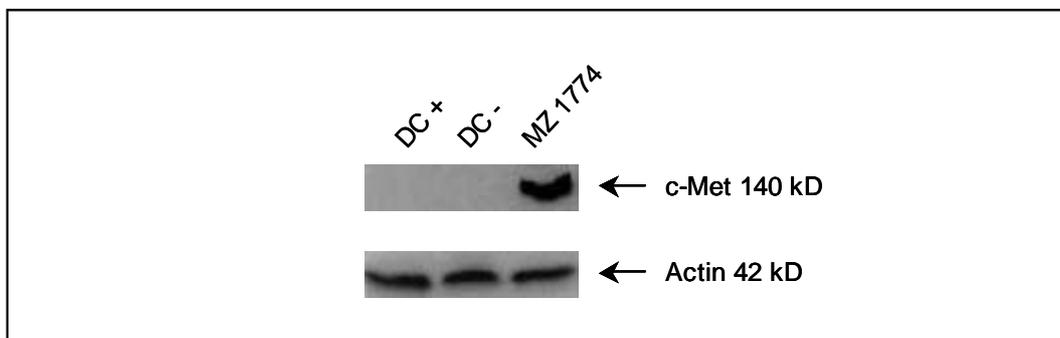


Abb. 3.7A: Western Blot mit DC. Zur Kontrolle wurde ein monoklonaler Actin-Antikörper eingesetzt. Untersucht wurden reife DC (DC+), unreife DC (DC-) und als Positivkontrolle die c-Met positive Tumorzelllinie MZ 1774. Größenangabe der sichtbaren Banden jeweils in Kilodalton (kD).

Sowohl bei unreifen DC, die aus Monozyten mit IL-4 und GM-CSF generiert wurden, als auch bei TNF- α -stimulierten DC konnte im Western Blot keine c-Met-Expression nachgewiesen werden.

Deshalb wurden die DC mit Gesamt-RNA von c-Met positiven Tumorzellen transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion und c-Met Präsentation wurden einige DC mit der RNA der c-Met negativen Tumorzelllinie Croft transfiziert.

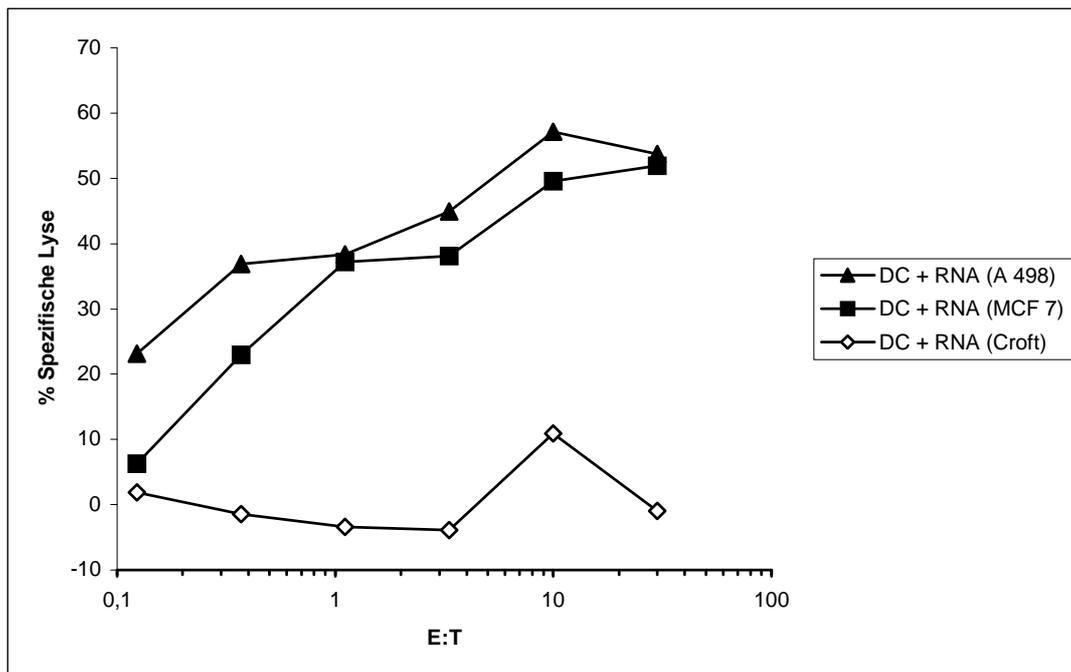


Abb. 3.7B: Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay mit autologen, transfizierten DC. Die DC wurden elektroporiert mit der aus c-Met positiven Tumorzelllinien (A 498, MCF 7) isolierten RNA. Als Kontrolle wurden DC eingesetzt, die mit der c-Met negativen Zelllinie Croft elektroporiert wurden.

In Abb. 3.7B zeigt sich, dass die c-Met spezifischen CTL die autologen DC lysierten, nachdem sie transfiziert worden waren mit RNA aus Tumorzellen, die c-Met exprimieren.

Nicht elektroporierte DC und DC, die mit c-Met negativer Gesamt-RNA transfiziert worden waren, wurden hingegen nicht lysiert (vgl. Abb. 3.3B). Dies zeigt, dass die DC nach der Transfektion fähig waren, c-Met zu prozessieren und zu präsentieren. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die c-Met spezifischen CTL auch auf autologen Zellen c-Met antigenspezifisch erkennen können und diejenigen Zellen verschonen, die kein c-Met exprimieren.

4 Diskussion

Therapeutisches Vakzinieren von Patienten mit malignen Erkrankungen beruht auf einer Stimulation der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Auf zellulärer Ebene geschieht dies durch T-Lymphozyten, die fähig sind, maligne Zellen zu erkennen und zu lysieren. In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, mit welchen man Antigene identifizieren konnte, die von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden können.

4.1 Möglichkeiten zur Identifikation potenzieller Tumorantigene

Unter anderem wurde dies ermöglicht durch den Einsatz von SEREX, Expressionsklonierung oder durch die Isolierung antigener Peptide von MHC-Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen, die nach anschließender Sequenzierung durch computergestützte Proteinsequenzanalysen als mögliche T-Zell-Epitope identifiziert wurden (48, 61, 103, 138). Die meisten der identifizierten T-Zell-Epitope beschränken sich aber auf eine limitierte Anzahl von Malignomen und HLA-Molekülen (17, 48, 62).

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung jedoch konnten neue Peptidkandidaten durch die Kombination von Genexpressionsanalyse und Massenspektrometrie identifiziert werden (140). Durch den Vergleich von Tumor und dem entsprechenden autologen gesunden Gewebe mit Hilfe der „DNA Mikroarray Technik“ können Antigene definiert werden, die selektiv in Tumoren exprimiert werden oder überexprimiert vorliegen, was diese Antigene zu potenziellen Angriffspunkten immuntherapeutischer Strategien macht. Die anschließende Massenspektrometrie ermöglicht die Charakterisierung von antigenen Peptiden, die durch diese Gene kodiert werden.

Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte u.a. das vom Protoonkogen c-Met abgeleitete HLA-A2-bindende Peptid (140) identifiziert werden, welches in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzt wurde. Der Vorteil eines HLA-A2-bindenden Peptids besteht darin, dass es das am häufigsten vorkommende HLA-Allel in der kaukasischen Bevölkerung ist (115).

4.2 Ergebnisse dieser Arbeit

Zunächst wurden TAP-defiziente Zellen mit diesem synthetischen c-Met Peptid (140) inkubiert, die als Zielzellen im Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay das Antigen MHC-restringiert präsentieren sollten. Es wurde hierbei gezeigt, dass *in vitro* induzierte CTL dieses Peptid antigenspezifisch erkennen können und die mit diesem Peptid beladenen Zellen antigenspezifisch lysieren.

Des Weiteren wurden Tumorzellen auf endogene c-Met Expression mit Hilfe der Western Blot Technik und des RT-PCR-Verfahrens untersucht. c-Met Expression wurde auf zahlreichen humanen Tumorzelllinien nachgewiesen, wobei der Nachweis von c-Met sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene positiv verlief. Diese Tumorzelllinien wurden anschließend als Zielzellen in einem Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay eingesetzt, um zu zeigen, dass die *in vitro* mit synthetischem c-Met Peptid induzierten CTL fähig sind, endogen c-Met präsentierende Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass die Tumorzellen dieses synthetische Peptid aus natürlich vorkommendem, endogenem c-Met generieren und präsentieren, denn dies stellte die Voraussetzung für die erfolgreiche Erkennung durch die peptidspezifischen CTL dar. Zusätzlich erfolgte die Erkennung des Antigens HLA-A2-restringiert, denn die CTL lysierten ausschließlich Tumorzelllinien, die c-Met auf HLA-A2-Molekülen präsentierten, und ignorierten gleichzeitig c-Met positive HLA-A3-restringierte Tumorzellen.

Die HLA-A2 Restriktion der Antigenerkennung durch die CTL wurde zudem mit einem Antikörperblockierungsexperiment im Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay überprüft. Der Einsatz des Antikörpers induziert die Blockierung des HLA-A2-Moleküls, so dass das c-Met Peptid von den Zielzellen nicht mehr in Verbindung mit diesem MHC-Molekül präsentiert werden kann und deshalb eine T-Zell-Interaktion nicht mehr möglich ist. Unter Zugabe dieses HLA-A2-blockierenden Antikörpers fand im Experiment keine Lyse der c-Met exprimierenden Zielzellen statt. Der Einsatz von mit einem irrelevanten Antikörper inkubierten Tumorzellen hatte jedoch keinen Einfluß auf die Lyserate der c-Met exprimierenden Zellen.

Die Antigen-spezifität der *in vitro* induzierten CTL wurde zusätzlich in Cold Target Inhibition ⁵¹Chromium-Release-Assays überprüft. Es wurde gezeigt, dass unter Zugabe von mit c-Met Peptid beladenen, nicht markierten „Cold Targets“ die Lyse der radioaktiv markierten „Hot Targets“ gehemmt wurde, währenddessen unter Zugabe von nicht c-Met beladenen, mit einem irrelevanten Peptid beladenen „Cold Targets“ die Lyse der „Hot Targets“ unverändert hoch blieb. Es wurde also erneut belegt, dass die CTL spezifisch Antigene erkennen können und antigenspezifisch Zellen lysieren.

Da bei den vorangegangenen Versuchen als Zielzellen jeweils nicht autologe Zellen eingesetzt wurden, wurden die Experimente zusätzlich im autologen System durchgeführt. Als Zielzellen wurden DC in ein Standard-⁵¹Chromium-Release-Assay eingesetzt, die aus dem Blut desselben Spenders hergestellt wurden, das auch für die Generierung der antigenpräsentierenden DC und für die Gewinnung von CTL eingesetzt wurde.

Zunächst wurden die generierten DC mit der Western Blot Technik auf endogene c-Met Expression untersucht. Da weder die mit IL4 und GM-CSF generierten, noch die zusätzlich mit TNF- α stimulierten DC endogen c-Met exprimierten, wurden sie mit RNA aus endogen c-Met präsentierenden Tumorzelllinien transfiziert. Die *in vitro* induzierten CTL lysierten die autologen, mit Tumor-RNA transfizierten Zellen und ignorierten die DC, die mit Tumor-RNA aus einer nicht endogen c-Met exprimierenden Tumorzelllinie transfiziert wurden. Die Lyse der transfizierten DC demonstriert, dass die Zellen nach der Transfektion das c-Met Peptid prozessiert und präsentiert haben.

Derselbe Versuch wurde mit autologen DC wiederholt, die mit synthetisch hergestelltem, von c-Met abgeleitetem Peptid inkubiert wurden. Auch hier zeigte sich, dass die das Peptid präsentierenden DC antigenspezifisch erkannt wurden, während mit einem irrelevanten Peptid beladene DC nicht lysiert wurden. Dies macht deutlich, dass die antigenspezifische Erkennung und Lyse von Zielzellen auch im autologen System funktioniert und kein Effekt ist, der sich auf körperfremde Zielzellen beschränkt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *in vitro* induzierte c-Met spezifische zytotoxische T-Lymphozyten c-Met exprimierende Tumorzellen auf eine antigenspezi-

fische und MHC-restringierte Weise erkennen können. Somit wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Möglichkeit der Induktion spezifischer gegen das c-Met Epitop gerichteter CTL nachgewiesen. Dies legt nahe, dass das c-Met Protoonkogen ein neues tumorassoziertes Antigen mit vielversprechenden therapeutischen Optionen darstellen könnte und das Potenzial besitzt, in Vakzinierungsstudien gegen eine Vielzahl von malignen Erkrankungen eingesetzt werden zu können.

4.3 Grenzen der Aussagekraft dieser Arbeit

Es muss beachtet werden, dass in dieser Arbeit ausschließlich Experimente *in vitro* durchgeführt wurden und die Übertragbarkeit auf das komplexe System der Immunabwehr *in vivo* nicht untersucht werden konnte. Eine Aussage über die Qualität und Wirksamkeit von c-Met als Tumorabstoßungsantigen in der Vakzinierungstherapie beim Menschen lässt sich daher nicht treffen.

Die mit Hilfe der PCR untersuchte c-Met Expression bei nicht maligne transformierten menschlichen Geweben könnte allerdings Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen beim Einsatz in der Vakzinierungstherapie geben. Zumindest bei den stark c-Met exprimierenden Geweben wie Leber, Herz, Darm, Brust, Lunge, Muskeln oder Haut scheint Vorsicht geboten zu sein, wenngleich zu erwarten ist, dass die CTL v.a. selektiv Tumorzellen lysieren werden, da der c-Met Rezeptor auf diesen Zellen in einer wesentlich höheren Dichte exprimiert ist als auf nicht maligne transformierten Zellen.

Eine quantitative Erfassung der c-Met Expression von gesunden menschlichen Geweben war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen, so dass sich genauere Aussagen über differenzielle Expression nicht treffen lassen. Genau so wenig wurde dieses Experiment in ausreichender Anzahl wiederholt bzw. bei verschiedenen Spendergeweben eingesetzt. Anhand der in dieser Arbeit vorgelegten Daten lässt sich deshalb keine grundsätzliche Risikoabschätzung in Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Vakzinierungstherapie durchführen. Dennoch ergibt sich durch diese Experimente der hoffnungsvolle Ansatz, weitere Anstrengungen zu unternehmen, um eines Tages eine wirkungsvolle weitere Option in der Therapie von Malignomen zu entwickeln.

4.4 Warum wurde das Protoonkogen c-Met für diese Arbeit ausgewählt?

c-Met ist ein heterodimerer Tyrosinkinase-Rezeptor, der die multifunktionellen und potenziell onkogenen Effekte des „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) vermittelt (12, 83, 111, 143). Einige dieser HGF-vermittelten Effekte sind besonders interessant im Hinblick auf die Bedeutung des HGF-Rezeptors bei der Metastasierung von Tumoren. Andere Effekte spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorneogenese. Zusätzlich kann das Protoonkogen c-Met auch als Marker für Prognose und Verlauf oder in der Bildgebung eingesetzt werden. Die folgenden Abschnitte vertiefen die Bedeutung dieses Protoonkogens bei der Entstehung, Persistenz, Progression und Verbreitung eines malignen Tumors und deuten die Risiken aufgrund des Verlustes physiologischer Funktionen des Rezeptors c-Met an.

4.4.1 *Met und Metastasierung*

Durch c-Met werden wesentliche Fähigkeiten übertragen, die eine Tumorzelle braucht, um sich aus dem festen Zellverband zu lösen, mobil zu werden und sich an entfernten Stellen anzusiedeln. Zunächst werden durch HGF interzelluläre Verbindungen wie z.B. E-Cadherin oder Desmoglein 1 herunterreguliert (73), gleichzeitig erhöht sich die Zellmotilität über eine verstärkte Phosphoinositol 3-Kinase Aktivierung (82) und es beginnt die Dissoziation der Zellen aus den zuvor fest verbundenen Gewebeverbänden („Scattering“, 64). Nun benötigen die Zellen Fähigkeiten, um in fremde Gewebe einzudringen. HGF stimuliert die Invasivität der Tumorzelle und ermöglicht die Invasion in die extrazelluläre Matrix (7, 51, 65, 128). Durch HGF wird zu diesem Zweck die Produktion von Proteasen wie z.B. u-PA gesteigert (95), das beim Abbau der extrazellulären Matrix/Basalmembran eine Rolle spielt und gleichzeitig die Prozessierung des HGF-Vorläufers in ein aktives, heterodimeres HGF verstärkt, so dass noch mehr Met-Rezeptoren aktiviert werden können. Die Invasivität der Tumorzellen kann durch autokrine Koexpression von HGF und Met-Rezeptor innerhalb einer Zelle noch erhöht werden, wie es bei Blasenkarzinomzellen der Ratte beobachtet wurde (8). Des Weiteren vermittelt HGF über MEK- und PI3K-Signal-

transduktionswege die Stimulation der Angiogenese (19, 30) und der Zellproliferation (19) sowie die Induktion von Apoptoseresistenz (75).

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass eine Amplifizierung des Met-Genes in Metastasen maligner Tumoren gefunden wurde (27) und überdurchschnittlich hohe HGF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit metastasierten Tumoren beschrieben wurden (84).

4.4.2 Met und Tumorgenese

Aber das Met/HGF System ist nicht nur an der Metastasierung, sondern auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt (65, 101, 109). Hierbei stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, die sich proneoplastisch auswirken können: Mutation, autokrine Koexpression von HGF und Met in einer Zelle, chromosomale Umordnung („Rearrangement“), Überexpression, ligandenunabhängige Aktivierung durch Zelladhäsion und Apoptoseresistenz.

Verschiedene Met-aktivierende Mutationen im Met-Rezeptor maligner Zellen wurden beschrieben, die für die neoplastische Transformation mitverantwortlich sein könnten (49, 92, 113). Die Mutationen können sowohl sporadisch auftreten als auch als Keimbahnmutationen vorliegen, wie im Falle des hereditären papillären Nierenzellkarzinoms (39). Hier wurden sporadische „Missense“-Mutationen und „Missense“-Keimbahnmutationen im Exon 16 (39), bzw. in den Exons 17-19 (113) beschrieben, die begleitet wurden von einer Trisomie verschiedener Chromosomen, u.a. des Chromosoms 7 (144) – des Chromosoms also, auf dem der Met-Rezeptor kodiert wird. So kann zusätzlich zur mutationsbedingten, konstitutiven Aktivierung des Met-Rezeptors durch die Trisomie die Dosis an mutiertem c-Met gesteigert werden.

In Anlehnung an den Aufbau der Insulinrezeptortyrosinkinase (57) wurde beschrieben, dass das Exon 16-19 für einen Bereich kodieren könnte, der in Abwesenheit des Liganden die enzymatische Aktivität des Rezeptors blockiert, den sogenannten „activation loop“(113). Dieser „activation loop“ versperrt im inaktiven Zustand des Rezeptors den Zugang zu den ATP- und Substratbindungsstellen des Met-Protoonkogens und wird stabilisiert über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken (113). Damit der Rezeptor nach

Ligandenbindung in seine aktive Form übergehen kann, ändert der „activation loop“ in diesem Fall seine Konformation und gibt den Weg zu den Substratbindungsstellen frei (57). Werden die stabilisierenden Mechanismen durch eine Mutation aufgehoben oder wird die inhibierende Form des „activation loops“ durch Mutationen destabilisiert, so entfällt die blockierende Wirkung und es kommt zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (92, 113).

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des Met/HGF-Systems an der Tumorgenese ergibt sich aus der Beobachtung, dass athymische Mäuse nach Injektion von Zellen, die mit der RNA eines auf diese Weise mutierten Met-Rezeptors transfiziert wurden, nach kürzester Zeit Tumoren entwickelten (66).

Interessanterweise kann eine Mutation dazu führen, dass einzelne Signaltransduktionswege blockiert und andere hingegen aktiviert werden. Die Punktmutation H1351 → N z.B. erhöht die Fähigkeit des Met-Onkogens zur neoplastischen Transformation und verkleinert gleichzeitig das metastatische Potenzial (49).

Ein anderer Mechanismus bei der Entstehung von malignen Tumoren ist die simultane Expression von Rezeptor und Wachstumsfaktor innerhalb einer Zelle, auch „autocrine loop“ genannt. Normalerweise kommunizieren HGF und Met über eine parakrine Interaktion zwischen HGF-produzierendem, mesenchymlalem Stromagewebe und Met-exprimierenden Epithelzellen (121). Wenn nun aber HGF-produzierende Zellen gleichzeitig den Met-Rezeptor exprimieren oder Met-exprimierende Zellen HGF selbst produzieren, kommt es zur konstitutiven Aktivierung des Met-Rezeptors, was eine Rolle bei der Entstehung von Malignomen spielen könnte (8). So wurde z.B. in Myofibroblasten eines Lungendadenokarzinoms die Expression von Met nachgewiesen, wobei zwischen der Expression des Met-Rezeptors in diesen mesenchymalen Zellen und einer verkürzten Überlebensspanne der Patienten eine signifikante Korrelation bestand (132). Auch bei menschlichen Osteosarkomen wurde eine autokrine Koexpression von HGF und Met-Rezeptor beschrieben (37). Des Weiteren führt die Injektion von Zellen, die sowohl HGF als auch Met exprimieren, zur Entstehung von Tumoren in Mäusen (90, 109).

Das chromosomale Rearrangement stellt einen weiteren Ansatz bei dem Versuch dar, Tumorgenese durch Met/HGF zu verstehen.

Hierbei verbinden sich eine trunkierte Form des Met (d.h. die Juxtamembran-, Transmembran- und extrazelluläre Domäne fehlen) vom Chromosom 7q21-31 und ein Segment des Chromosom 1 namens „tpr“ („translocated promotor region“) miteinander. Dies führt zur Expression eines onkogenen Met-Rezeptors durch konstitutive Dimerisierung (91). In diesem Falle ist das Fehlen der Juxtamembrandomäne, die die Funktion des Met-Rezeptors inhibiert, verantwortlich für die konstitutive Aktivierung des Rezeptors (136).

Schließlich spielt auch die Überexpression des Met-Rezeptors eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. In zahlreichen menschlichen Tumoren wurde eine Überexpression des Met-Rezeptors gefunden, u.a. im papillären Schilddrüsenkarzinom (101), kolorektalen Karzinom (27), Osteosarkom (37), Mammakarzinom (133), hepatozellulären Karzinom (124), papillären Nierenzellkarzinom (39, 144), Pankreaskarzinom (29, 69), kleinzelligen Bronchialkarzinom (76), Prostatakarzinom (58), Ovarialkarzinom (28), in Gliomen (71), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (59), epitheloiden und synovialen Sarkomen (72), beim Multiplen Myelom (11), M. Hodgkin (129), in Leukämien und Lymphomen (67, 97). Bei manchen dieser Tumoren führte eine strukturelle oder numerische Aberration von Chromosom 7 zur Überexpression des Rezeptors (39, 67, 144). Ein zusätzlicher Hinweis für die Bedeutung der Überexpression ergibt sich aus der Beobachtung, dass in transgenen Mäusen, die HGF überexprimieren, die Inzidenz für maligne Tumoren (darunter hepatozelluläre Karzinome, Mammakarzinome, Melanome, Rhabdomyosarkome, Plattenepithelzellkarzinome, Hämangiosarkome) sprunghaft anstieg (126, 139).

Außerdem wurde eine ligandenunabhängige Aktivierung des Met-Rezeptors allein durch Zellanheftung adhärenter Hepatozyten beobachtet, die abhängig von der Überexpression des Rezeptors zu sein scheint und verschwindet, wenn man die Hepatozyten in Einzelzellen dissoziiert (139).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass HGF eine Resistenz gegen Apoptose induziert, so dass die neoplastischen Zellen durch diesen Mechanismus einen Schutz gegen einen programmierten Zelltod haben (75).

Dem Met/HGF-System stehen also vielfältige Wege zur Verfügung, um die Signaltransduktion des Met-Rezeptors dauerhaft auf ein pathologisch erhöhtes

Niveau zu heben - ob durch Überexpression oder Mechanismen, die zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen -, was letztlich zur Entstehung von Malignomen führen kann. Zusammen mit weiteren HGF-vermittelten Faktoren wie Apoptoseresistenz (75), Wachstum (19) und dem metastatischen Potenzial also ein idealer Cocktail, um eine systemische Tumorerkrankung auszulösen und zu unterhalten.

4.4.3 Met als Marker für Prognose, Verlauf und Bildgebung

Neben der Bedeutung bei der Entstehung und Metastasierung von malignen Tumoren kann das Met/HGF-System auch zur Diagnostik, Verlaufskontrolle und Prognoseabschätzung eingebracht werden. Dies würde sich gerade beim möglichen Einsatz in der Tumorstabilisierung anbieten.

Die Expression des Met-Rezeptors bzw. die Serumkonzentration von HGF kann als Marker beim Staging des Nasopharynxkarzinoms (25) bzw. zur Einschätzung der Prognose von Malignomen, z.B. des nasopharyngealen Karzinoms (99), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (59) oder auch anderer Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Je höher die Met-Expression bzw. die HGF-Konzentration ist, desto kürzer ist das durchschnittliche Überleben eines Patienten einzuschätzen (99, 113). Es wurde außerdem eine signifikante Korrelation zwischen dem HGF-Spiegel im Serum und einer B-Symptomatik beschrieben und gezeigt, dass Patienten in Remission eines M. Hodgkin oder gesunde Probanden signifikant niedrigere HGF-Spiegel haben als Patienten mit aktiven malignen Erkrankungen (129), so dass die HGF-Expression zur Verlaufskontrolle der Erkrankung eingesetzt werden könnte.

In der molekularen Bildgebungstechnik kann die Met-Expression zur frühzeitigen Detektion Met-exprimierender Metastasen oder Tumoren eingesetzt werden. Unter Zugabe von HGF verändert sich dosisabhängig der Blutfluss im Zentrum eines Met-exprimierenden Tumors abhängig von der lokalen Met-Expression. Diese hämodynamischen Alterationen sind kernspintomographisch erfassbar. Somit können Areale mit hoher Alteration und damit hoher Met-Expression erkannt werden - und Metastasen frühzeitig entdeckt und überwacht werden (118). Da zudem die Met-Expression/HGF-Serumkonzentration mit ei-

ner schnelleren Progression, schlechteren Prognose und kürzerem Überleben der Patienten assoziiert ist (99, 113, 129), stellt es einen therapeutischen Ansatz dar, der gerade auch in den fortgeschrittenen, bisher häufig therapieresistenten Stadien, als erweiterte Alternative zur bisherigen Palliativbehandlung herangezogen werden könnte mit der Aussicht auf einen zukünftigen (neo)adjuvanten Einsatz.

4.4.4 Risiken beim Einsatz des Met-Rezeptors in Vakzinierungsstudien

Neben den Chancen, die sich aus der Unterdrückung c-Met vermittelter Zelleffekte ergeben, muss bedacht werden, dass der c-Met-Rezeptor für eine Reihe von physiologischen Funktionen eine wichtige Bedeutung hat. Eine Blockierung dieser physiologischen Funktionen kann ein nicht zu unterschätzendes Risiko für erhebliche Nebenwirkungen darstellen. Ganz entscheidend ist das Met/HGF-System z.B. an der normalen Entwicklung eines Embryos beteiligt, was sich daran zeigt, dass Mäuseembryonen mit einer Nullmutation im HGF/SF-Gen *in utero* sterben (112, 135).

Außerdem vermittelt der Met-Rezeptor auch beim geborenen Menschen zeitlebens eine Fülle von wichtigen physiologischen Funktionen. Dazu gehören u.a. Zellproliferation (19), Motilität (19), Angiogenese (19, 30), Formation von tubulären Strukturen (78, 111), Organregeneration von Leber, Niere (60, 74) und Lunge (141) oder auch Wundheilung (88). Zusätzlich werden hämatopoetische und immunologische Funktionen durch den Met-Rezeptor signalisiert (77, 137, 143). HGF wird von Knochenmarkszellen produziert und induziert zusammen mit anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren Proliferation und Differenzierung von c-Met positiven Vorläuferzellen (77). Außerdem spielt das Met/HGF-System eine entscheidende Rolle bei der Induktion sowohl von Adhäsion als auch von Migration aktivierter B-Lymphozyten (137).

Der Einsatz von c-Met in der Vakzinierungstherapie darf deshalb nur mit Vorsicht angegangen werden. Durch die Überexpression des c-Met-Rezeptors in Tumoren bleibt aber zu hoffen, dass die aktivierten T-Lymphozyten vor allem die Tumorzellen lysieren werden und es nach einer Vakzinierung zu keinen therapielimitierenden Nebenwirkungen an gesunden Organen kommen muss.

Zudem könnte das Vorkommen von c-Met in gesunden Zellen sogar von Vorteil für die Effektivität der Immunantwort sein. Wenn ein TAA nämlich keine physiologische Bedeutung besitzt und dessen Expression für das Überleben der Tumorzelle nicht essentiell ist, so haben diejenigen Tumorzellen keinen Selektionsvorteil, die dieses TAA präsentieren. Das kann dazu führen, dass die Tumorzellen, die das TAA präsentieren, von anderen Tumorzellen verdrängt werden, so dass der Tumor in der Folge zu einem Großteil aus Zellen besteht, die das spezifische TAA nicht präsentieren. Diese Zellen können dann aber damit nicht mehr von den induzierten CTL erkannt werden - und der Tumor würde ungehemmt weiter progressieren.

Im Falle von Met/HGF könnte man aber annehmen, dass die Expression von c-Met quasi zur „onkogenen Grundausstattung“ der Tumorzelle gehört und deshalb beibehalten werden muss, gerade um der Tumorzelle die Fähigkeit zu Proliferation und Metastasierung zu ermöglichen. Dies stellt dann aber einen Selektionsvorteil dar, so dass schließlich ein Großteil des Tumors diesen Angriffspunkt anhand der Präsentation des TAA darbieten dürfte.

Da das c-Met Protoonkogen also in unterschiedlichster Weise an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt ist, das Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen fördert und induziert und zusätzlich in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt, stellt es ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung immuntherapeutischer Vakzinierungsstrategien dar. Außerdem beschränkt es sich nicht wie die meisten der identifizierten T-Zell-Epitope auf eine limitierte Anzahl von Malignomen (17, 48, 62), sondern kann in sehr vielen Tumoren, v.a. aber im metastasierten Stadium in vielen Metastasen, gefunden werden, wodurch es als universelles Tumorabstoßungsantigen einsetzbar wäre.

4.5 Vakzinierungsstudien

4.5.1 Studien mit Met-ähnlichen Tumorantigenen

Bisher wurden zahlreichen andere potenzielle Tumorabstoßungsantigene beschrieben, die wie c-Met in Malignomen überexprimiert vorliegen, gleichzeitig jedoch in gesunden Geweben zu finden sind (Klasse 5 der Tumorantigene).

Ein zu dieser Gruppe gehörendes potenzielles Tumorabstoßungsantigen ist z.B. das Apoptoseinhibitionsprotein Survivin (3, 114, 115).

Es wurde gezeigt, dass CD8-positive T-Lymphozyten *in vitro* spezifisch gegen von Survivin abgeleitete Peptide aktiviert werden konnten (114, 115) und *in vivo* spontane CTL Antworten bei Mammakarzinompatientinnen, Leukämie- und Myelompatienten zu finden waren (3).

Ein anderes weitverbreitetes TAA dieser Kategorie ist das MUC1 Peptid. Bei diesem Transmembranglykoprotein wurden HLA-A2-restringierte T-Zellepitope entdeckt, gegen die eine CTL Reaktion induzierbar war (15, 16).

Auch Her2/neu gehört zu dieser Gruppe der TAA. Hier wurden ebenfalls Peptide beschrieben, gegen die CTL induziert werden können (18, 40). In einer Studie mit Patientinnen, die an metastasierten Ovarial- und Mammakarzinomen erkrankt waren, wurden mit MUC1 und HER-2/neu beladene DC subkutan verabreicht (18). Dabei konnten bei fünf von zehn Patientinnen spezifische CTL im peripheren Blut isoliert werden. Eine Patientin entwickelte interessanterweise zusätzlich eine gegen CEA und Mage-3 gerichtete CTL-Antwort, obwohl sie nur mit MUC-1 Peptid beladenen DC behandelt wurde. Vorstellbar wäre, dass die Destruktion des Tumors durch die CTL zu einer Induktion anderer tumorspezifischer CTL führen kann, indem antigenpräsentierende Zellen die Tumorzellen aufnehmen, prozessieren und durch „cross-priming“ präsentieren (13, 87, 107). Bei keinem dieser Patienten wurden jedoch Autoimmunphänomene beobachtet.

4.5.2 Erfolge bei Vakzinierungstherapien mit weiteren Tumorantigenen

Eine der frühesten Studien wurde 1998 mit 16 Patienten durchgeführt, die an einem metastasierten Melanom erkrankt waren (86). Die Patienten wurden mit autologen DC, die mit Tyrosinase-, gp100-, MelanA-Peptiden oder Tumorzellysaten beladen waren, intralymphatisch geimpft. Zur Stimulation der CD4-Helferzellen wurde KLH verwendet. Bei fünf von 16 Patienten konnte ein Ansprechen auf die Therapie verzeichnet werden, darunter zwei Komplettremissionen mit einer Dauer von über 15 Monaten.

In einer weiteren Studie mit 13 Melanompatienten im Stadium IV, die alle trotz Chemotherapie progressiv waren, wurde eine Tumolvakzine aus mit Mage-3A1

Peptid beladenen, autologen, reifen DC subkutan, intradermal und intravenös injiziert (130). Bei acht von elf noch lebenden Patienten wurde eine Expansion der CD8-positiven CTL beschrieben, bei sechs von elf Patienten konnte nach fünf Injektionen sogar eine komplette Remission der Metastasen in Haut, Lunge, Lymphknoten und Leber erzielt werden. 17 Monate nach dieser Studie waren bei einer initialen Lebenserwartung von nur vier Monaten unter Weiterführung der Therapie noch fünf Patienten am Leben. Bei weiteren vergleichbaren Studien wurden gerade in der Therapie des Melanoms vielversprechende Erfolge verzeichnet (31, 61, 116).

In einer anderen Studie wurden 35 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen mit tumorlysatbeladenen DC intravenös oder intradermal geimpft (55). Bei 27 Patienten, die die Behandlung komplett durchlaufen haben, waren zwei Totalremissionen, eine Partialremission und sieben stabile Erkrankungen beobachtet worden.

21 Patienten mit CEA-exprimierenden metastasierenden Tumoren, darunter Kolon-, Mamma-, Ovar- und Pankreaskarzinome, wurden in eine Studie eingeschlossen, in der mit Cap-1-beladene (abgeleitet vom CEA-Protein) DC intradermal oder intravenös injiziert wurden (79). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Stabilisierung der Erkrankung zu erreichen war, die mit einem Rückgang der CEA Werte einherging. Interessanterweise wurde beobachtet, dass die i.v. verabreichten DC sich ausgehend von der Lunge in Leber, Milz und Knochenmark verteilten und die Tumoren und regionalen Lymphknoten nicht erreichten. Nur durch i.d. Injektionen wurde erreicht, dass die DC in die regionalen Lymphknoten auswanderten.

Auch beim Prostatakarzinom wurden Vakzinierungstherapien eingesetzt (80, 120). DC, die mit einem rekombinanten Antigen-Zytokin-Fusionsprotein (Provenge™, Dendreon Corp., Seattle, USA) beladen wurden, wurden den Patienten intravenös injiziert (120). Die Patienten, die eine Immunantwort auf die Vakzine entwickelten, hatten ein wesentlich längeres progressionsfreies Überleben und zeigten einen Rückgang des PSA-Spiegels.

In einer Phase II Studie erhielten 33 Patienten eine Vakzinierung mit peptidbeladenen DC (80). Sechs Patienten hatten eine Partialremission, bei zwei Patien-

ten trat eine Komplettremission auf unter gleichzeitigem Rückgang des PSA-Spiegels.

Bei idiotypproduzierenden Malignomen wie dem Multiplen Myelom oder dem folliculären B-Zell-Lymphom konnte gezeigt werden, dass durch Leukapherese gewonnene autologe DC-Vorläuferzellen des Patienten eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort induzieren können, wenn sie mit den Idiotypimmunoglobinen des patienteneigenen Tumors beladen wurden (56, 105).

Vier Patienten mit einem folliculären B-Zell-Lymphom erhielten eine auf diese Weise hergestellte Vakzine (56). Ein Patient reagierte mit einer Vollremission, ein weiterer mit einer Partialremission und bei einem Patienten waren anschließend sogar keinerlei molekularbiologische Hinweise mehr auf die Erkrankung nachzuweisen.

Bei einer anderen Studie, die zwölf Patienten mit Multiplem Myelom einschloss, trat bei zwei Patienten eine komplette Remission auf, die 30 und 17 Monate lang anhielt (105).

Dass eine Vakzinierung mit tumorpeptidbeladenen DC sogar bei Tumoren des ZNS wirksam sein kann und die Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, wurde kürzlich in einer Studie mit Gliompatienten nachgewiesen (142). Bei vier von sieben geimpften Patienten wurde eine systemische Zytotoxizität beobachtet, die bei zwei Patienten zu einer intrakraniellen T-Zell-Infiltration im Tumor führte.

4.5.3 Unerwünschte Wirkungen und Toxizität bei Vakzinierungsstudien

Bei keiner der Studien wurde von schwerwiegenden Nebenwirkungen berichtet, die zum Therapieabbruch führten. Bei den meisten Studien traten allerdings ein vorübergehender Temperaturanstieg (55, 79, 86, 105, 130, 142), Frösteln (55, 105), Lymphknotenvergrößerung (130, 142), Kopfschmerzen (55), Übelkeit (142) und ein lokales Erythem mit milder Induration und Pruritus an der Einstichstelle im Sinne einer T-Zell vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV) auf (55, 79, 86, 130). Letzteres sollte allerdings eher als Zeichen für die Entwicklung einer zellulären Immunität gewertet werden (62). Ein Patient entwickelte ein zirkadianes Fieber mit nächtlichen Temperaturen von 39°C, das

erst nach 3 Monaten verschwand (55), bei einem weiteren Patienten trat nach der i.v. Gabe der Vakzine eine Thrombophlebitis auf (105).

Der gemeinsame Tenor aller hier dargestellten Studien lautet, dass die Vakzinierungen grundsätzlich gut vertragen wurden und es nur zu vorübergehenden leichten und gut tolerierten Nebenwirkungen kam.

Denkbar wäre auch eine Induktion von Autoimmunerkrankungen durch die Vakzine, da ja eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene induziert wird (47). Bisher wurde in einer Studie mit Menschen lediglich von einer autoimmunen Destruktion der Melanozyten nach autologem T-Zelltransfer berichtet, die einen Vitiligo verursachte und bei einem Patienten mit einer beidseitigen Uveitis einherging (31). In einer anderen Studie wurden als Marker für eine Autoimmunreaktion Anti-Thyreoglobulin, ANA und Rheumafaktoren gemessen (79). Bei zahlreichen Patienten war der ANA-Titer sowie die Rheumafaktoren bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie erhöht, allerdings ohne klinisch manifeste Autoimmunerkrankung. Nach den Vakzinierungen sank der ANA-Titer bei drei Patienten, bei weiteren Patienten stieg er an und blieb ansonsten in etwa konstant. Ähnliche unterschiedliche Ergebnisse wurden bei den zwei anderen Parametern beschrieben, wobei die Antikörper gegen Thyreoglobulin bei sieben von 21 Patienten zum Teil beträchtlich (z.B. von zehn auf 153 Units) anstiegen. Ein Anstieg der ANAs und der Antikörper gegen TSH berichtete auch Nestle et al. (86), jedoch wurde bei keinem der Patienten dieser beiden Studien eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse oder anderer Organe beobachtet. Dies ist umso erstaunlicher und erfreulicher, da in Tierversuchen mit Tumorstoffen durchaus schwerwiegende Autoimmunerkrankungen induziert worden sind, wie z.B. experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis, Prostatitis, Kardiomyopathie und Diabetes (47).

4.5.4 Ausblick

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien wecken bei allen Schwierigkeiten und ungeklärten Fragen eine hoffnungsvolle Sicht auf die Zukunft der Therapie von Malignomen. Durch die Resultate dieser Arbeit wurde ein neuer interessanter Kandidat für einen Einsatz in zukünftigen Studien identifiziert. Das von c-Met

abgeleitete untersuchte Peptid kann in Zukunft vielleicht dazu beitragen, die Prognose mancher Tumorerkrankungen zu verbessern, auf jeden Fall aber wird diese Arbeit dazu beitragen, die Optionen für eine mögliche Therapie von Tumorerkrankungen zu erweitern und neue Angriffspunkte zu definieren.

Solange neue Zielmoleküle entdeckt werden können, besteht begründete Hoffnung, dass mehr und mehr Menschen mit malignen Erkrankungen besser geholfen werden kann.

Es steht noch aus, das wirkungsvollste Immunisierungsprotokoll mit allen Feinheiten der Dosierung, der Adjuvantien, der Applikation oder der Injektionsintervalle beurteilen zu können, und viele immunologische Phänomene bleiben unverstanden, dennoch kann eindeutig davon ausgegangen werden, dass uns mit der erfolgreichen und gezielten Aktivierung des körpereigenen Immunsystems eine neue wirkungsvolle Waffe im Kampf gegen eine der schrecklichsten und unbezwingbarsten Erkrankungen der Menschheit zur Verfügung steht, deren Chancen und deren Grenzen in den kommenden Jahren genauer definiert werden müssen.

5 Zusammenfassung

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnten durch die Kombination von Genexpressionsanalyse und Massenspektrometrie HLA-Klasse I-bindende Peptide selektiert werden, die in malignen Tumoren überexprimiert oder selektiv exprimiert vorlagen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eines dieser Peptide, ein vom Protoonkogen c-Met abgeleitetes HLA-A2-bindendes Peptid, auf seine mögliche endogene Expression in Tumorzellen und auf seine mögliche Funktion als T-Zell Epitop untersucht. Sowohl auf Proteinebene (Western Blot) als auch auf RNA-Ebene (RT-PCR) wurden bei Zelllinien vom Mamma-, Nierenzell-, Kolon-Karzinom, Melanom und Multiplen Myelom c-Met-Expression festgestellt. Zur Induktion von Met-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) wurden mit IL-4 und GM-CSF generierten dendritischen Zellen (DC) verwendet. Die c-Met spezifischen CTL lysierten in Zytotoxizitätsassays sowohl Zellen, die das synthetische Peptid präsentierten, als auch c-Met positive Tumorzelllinien, die das Peptid von endogen vorhandenem c-Met präsentierten. Die Lyse geschah auf eine antigenspezifische und HLA-restringierte Weise - in allen Versuchen wurden stets diejenigen Zelllinien nicht lysiert, die ein irrelevantes Peptid präsentierten, einen differenten HLA-Status hatten oder deren HLA-Molekül durch einen Antikörper blockiert war. Des Weiteren wurden diese Ergebnisse in einem autologen System bestätigt. Hierbei wurden mit c-Met positiven Tumorzelllinien transfizierte, autologe DC als Zielzellen verwendet, die in erwarteter Weise antigenspezifisch und HLA-restringiert lysiert worden sind. Im Gegensatz dazu wurden DC, die mit RNA aus c-Met negativen Tumorzellen transfiziert worden sind, nicht erkannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als Grundlage für einen potenziellen Einsatz von c-Met in der *in vivo* Vakzinierungstherapie maligner Tumoren dienen. Denn durch sein ubiquitäres, überexprimiertes Vorkommen in sehr vielen unterschiedlichen malignen Tumoren und Metastasen und seine Bedeutung bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren ist c-Met ein vielversprechendes Zielmolekül, das gegen eine Vielzahl verschiedener menschlicher maligner Erkrankungen eingesetzt werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- 1.) Albert, M.L.; Sauter, B.; Bhardwaj, N. (1998)
Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs
Nature, 392, 86-89
- 2.) Alexandroff, A.B.; Jackson, A.M.; Paterson, T.; Haley, J.L.; Ross, J.A.; Longo, D.L.; Murphy, W.J.; James, K.; Taub, D.D. (2000)
Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours
Mol. Immunol., 37, 515-526
- 3.) Andersen, M.H.; Pedersen, L.Ø.; Capeller, B.; Bröcker, E.-B.; Becker, J.C.; thor Straten, P. (2001)
Spontaneous cytotoxic T-cell responses against Survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as *ex vivo* in cancer patients
Cancer Res., 61, 5964-5968
- 4.) Anichini, A.; Molla, A.; Mortarini, R.; Tragni, G.; Bersani, I.; Di Nicola, M.; Gianni, A.M.; Pilotti, S.; Dunbar, R.; Cerandolo, V.; Permiani, G. (1999)
An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions
J. Exp. Med., 190, 651-667
- 5.) Banchereau, J.; Steinman, R.M. (1998)
Dendritic cells and the control of immunity
Nature, 392, 245-252
- 6.) Becker Y. (1992)
Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers – a review
Anticancer Res., 12, 511-520
- 7.) Beilmann, M.; Vande Woude, G.F.; Dienes, H.-P.; Schirmacher, P. (2000)
Hepatocyte Growth Factor-stimulated invasiveness of monocytes
Blood, 95, 3964-3969
- 8.) Bellusci, S.; Moens, G.; Gaudino, G.; Comoglio, P.; Nakamura, T.; Thiery, J.P.; Jouanneau, J. (1994)
Creation of an Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity
Oncogene, 9, 1091-1099
- 9.) Bladt, F.; Riethmacher, D.; Isenmann, S.; Aguzzi, A.; Birchmeier, C. (1995)
Essential role for the c-Met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud
Nature, 376, 768-771
- 10.) Boon, T.; Cerottini, J.C.; Eynde, B. van der; Bruggen, P. van der; Pel, A. van (1994)
Tumor antigens recognized by T lymphocytes
Annu. Rev. Immunol., 12, 337-365
- 11.) Børset, M.; Seidel, C.; Hjorth-Hansen, H.; Waage, A.; Sundan, A. (1999)
The role of Hepatocyte Growth Factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies
Leuk. Lymphoma, 32, 249-256

- 12.) Bottaro, D.P.; Rubin, J.S.; Faletto, D.L.; Chan, A.M.-L.; Kmieciak, T.E.; Vande Woude, G.F.; Aaronson, S.A. (1991)
Identification of the Hepatocyte Growth Factor receptor as the c-Met proto-oncogene product
Science, 251, 802-804
- 13.) Brossart, P.; Bevan, M.J. (1997)
Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines
Blood, 90, 1594-1599
- 14.) Brossart, P.; Grünebach, F.; Stuhler, G.; Reichardt, V.L.; Möhle, R.; Kanz, L.; Brugger, W. (1998)
Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Blood, 92, 4238-4247
- 15.) Brossart, P.; Heinrich, K.S.; Stuhler, G.; Behnke, L.; Reichardt, V.L.; Stevanovic, S.; Muhm, A.; Rammensee, H.-G.; Kanz, L.; Brugger, W. (1999)
Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies
Blood, 93, 4309-4317
- 16.) Brossart, P.; Schneider, A.; Dill, P.; Schammann, T.; Grünebach, F.; Wirths, S.; Kanz, L.; Bühring, H.-J.; Brugger, W. (2001)
The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes
Cancer Res., 61, 6846-6850
- 17.) Brossart, P.; Wirths, S.; Brugger, W.; Kanz, L. (2001)
Dendritic cells in cancer vaccines
Exp. Hematol., 29, 1247-1255
- 18.) Brossart, P.; Wirths, S.; Stuhler, G.; Reichardt, V.L.; Kanz, L.; Brugger, W. (2000)
Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells
Blood, 96, 3102-3108.
- 19.) Bussolino, F.; Di Renzo, M.F.; Ziche, M.; Bocchietto, E.; Olivero, M.; Naldini, L.; Gaudino, G.; Tamagnone, L.; Coffey, A.; Comoglio, P.M. (1992)
Hepatocyte Growth Factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth
J. Cell Biol., 119, 629-641
- 20.) Cella, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (1997)
Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells
Curr. Opin. Immunol., 9, 10-16
- 21.) Celluzzi, C.M.; Mayordomo, J.I.; Storkus, W.J.; Lotze, M.T.; Falo L.D. (1996)
Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity
J. Exp. Med., 183, 283-287
- 22.) Chambers, C.A.; Kuhns, M.S.; Egen, J.G.; Allison, J.P. (2001)
CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy
Annu. Rev. Immunol., 19, 565-594

- 23.) Chiodoni, C.; Paglia, P.; Stoppacciaro, A.; Rodolfo, M.; Parenza, M.; Colombo, M.P. (1999)
Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response
J. Exp. Med., 190, 125-134
- 24.) Cooper, C.S.; Park, M.; Blair, D.G.; Tainsky, M.A.; Hübner, K.; Croce, C.M.; Vande Woude, G.F. (1984)
Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically-transformed human cell line
Nature, 31, 29-33
- 25.) Cortesina, G.; Martone, T.; Galeazzi, E.; Olivero, M.; De Stefani, A.; Bussi, M.; Valente, G.; Comoglio, P.M.; Di Renzo, M.F. (2000)
Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the Met oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases
Int. J. Cancer, 89, 286-292
- 26.) Costello, R.T.; Gastaut, J.A.; Olive, D. (1999)
Tumor escape from immune surveillance
Arch. Immunol. Ther. Exp., 47, 83-88
- 27.) Di Renzo, M.F.; Olivero, M.; Giacomini, A.; Porte, H.; Chastre, E.; Mirossay, L.; Nordlinger, B.; Bretti, S.; Bottardi, S.; Giordano, S.; Plebani, M.; Gespach, C.; Comoglio, P.M. (1995)
Overexpression and amplification of the Met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer
Clin. Cancer Res., 1, 147-154
- 28.) Di Renzo, M.F.; Olivero, M.; Katsaros, D.; Crepaldi, T.; Gaglia, P.; Zola, P.; Sismondi, P.; Comoglio, P.M. (1994)
Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer
Int. J. Cancer, 58, 658-662
- 29.) Di Renzo, M.F.; Poulson, R.; Olivero, M.; Comoglio, P.M.; Lemoine, N.R. (1995)
Expression of the Met/Hepatocyte Growth Factor receptor in human pancreatic cancer
Cancer Res., 55, 1129-1138
- 30.) Dong, G.; Chen, Z.; Li, Z.-Y.; Yeh, N.T.; Bancroft, C.C.; Waes, C. van (2001)
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma
Cancer Res., 61, 5911-5918
- 31.) Dudley, M.E.; Wunderlich, J.R.; Robbins, P.F.; Yang, J.C.; Hwu, P.; Schwartzentruber, D.J.; Topalian, S.L.; Sherry, R.; Restifo, N.P.; Hubicki, A.M.; Robinson, M.R.; Raffeld, M.; Duray, P.; Seipp, C.A.; Rogers-Freezer, L.; Morton, K. E.; Mavroukakis, S.A.; White, D.E.; Rosenberg, S.A. (2002)
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes
Science, 298, 850-854
- 32.) Espinoza-Delgado, I. (2002)
Cancer vaccines
Oncologist, 7, 20-33
- 33.) Eynde, B.J. van den; Boon, T. (1997)
Tumor antigens recognized by T lymphocytes
Int. J. Clin. Lab. Res., 27, 81-86

- 34.) Eynde, B.J. van den; Gaugler, B.; Probst-Kepper, M. Michaux, L.; Devuyst, O.; Lorge, F.; Weynants, P.; Boon, T. (1999)
A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription
J. Exp. Med., 190, 1793-1800
- 35.) Falk, K.; Rotzschke, O.; Rammensee, H.G. (1990)
Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules
Nature, 348, 248-251
- 36.) Fenton, R.G.; Longo, D.L. (1997)
Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes
J. Natl. Cancer Inst., 89, 272-275
- 37.) Ferracini, R.; Di Renzo, M.F.; Scotlandi, K.; Baldini, N.; Olivero, M.; Lollini, P.; Cremona, O.; Campanacci, M.; Comoglio, P.M. (1995)
The Met/ HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit
Oncogene, 10, 739-749
- 38.) Ferrone, S. Marincola, F.M. (1995)
Loss of HLA-class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance
Immunol. Today, 16, 487-494
- 39.) Fischer, J.; Palmedo, G.; Knobloch, R. von, Bugert, P.; Prayer-Galetti, T.; Pagano, F.; Kovacs, G. (1998)
Duplication and overexpression of the mutant allele of the Met proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours
Oncogene, 17, 733-739
- 40.) Fisk, B.; Blevins, T.L.; Wharton, J.T.; Ioannides, C.G. (1995)
Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines
J. Exp. Med., 181, 2109-2117
- 41.) Flores-Romo, L.; Björck, P.; Duvert, V.; Kooten, C. van; Saeland, S.; Banchereau, J. (1997)
CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells
J. Exp. Med., 185, 341-350
- 42.) Fong, L.; Engleman, E.G. (2000)
Dendritic cells in cancer immunotherapy
Annu. Rev. Immunol., 18, 245-273
- 43.) Furge, K.A.; Kiewlich, D.; Le, P.; Vo, M.N.; Faure, M.; Howlett, A.R.; Lipson, K.E.; Vande Woude, G.F.; Webb, C.P. (2001)
Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10722-10727
- 44.) Furge, K.A.; Zhang, Y.W.; Vande Woude, G.F. (2000)
Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins
Oncogene, 19, 5582-5589

- 45.) Gabrilovich, D.I.; Chen, H.L.; Girgis, K.R.; Cunningham, H.T.; Meny, G.M.; Nadaf, S.; Kavanaugh, D.; Carbone, D.P. (1996)
Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells
Nat. Med., 2, 1096-1103
- 46.) Gherardi, E.; Stoker, M. (1991)
Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor: mitogen, motogen, and Met
Cancer Cells, 3, 227-232
- 47.) Gilboa, E. (2001)
The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy
Nat. Immunol., 2, 789-792
- 48.) Gilboa, E. (1999)
The makings of a tumor rejection antigen
Immunity, 11, 263-270
- 49.) Giordano, S.; Bardelli, A.; Zhen, Z.; Menard, S.; Ponzetto, C.; Comoglio, P.M. (1997)
A point mutation in the Met oncogene abrogates metastasis without affecting transformation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13868-13872
- 50.) Giordano, S.; Ponzetto, C.; Di Renzo, M.F.; Cooper, C.S.; Comoglio, P.M. (1989)
Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-Met protein
Nature, 339, 155-156
- 51.) Giordano, S.; Zhen, Z.; Medico, E.; Gaudino, G.; Galimi, F.; Comoglio, P.M. (1993)
Transfer of motogenic and invasive response to Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor by transfection of human Met protooncogen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 649-653
- 52.) Gouttefangeas C.; Rammensee H.-G. (2000)
Problem solving for tumor immunotherapy
Nat. Biotechnol., 18, 491-492
- 53.) Grünebach, F.; Müller, M.R.; Nencioni, A.; Brossart, P. (2003)
Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes
Gene Ther., 10, 367-374
- 54.) Guermontprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Théry, C.; Amigorena, S. (2002)
Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells
Annu. Rev. Immunol., 20, 621-667
- 55.) Höltl, L.; Zelle-Rieser, C.; Gander, H.; Papesh, C.; Ramoner, R.; Bartsch, G.; Rogatsch, H.; Barsoum, A.L.; Coggin, J.H.; Thurnher, M. (2002)
Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells
Clin. Canc. Res., 8, 3369-3376
- 56.) Hsu, F.J.; Benike, C.; Fagnoni, F.; Liles, T.M.; Czerwinski, D.; Taidi, B.; Engleman, E.G.; Levy, R. (1996)
Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells
Nat. Med., 2, 52-58
- 57.) Hubbard, S.R.; Wei, L.; Ellis, L.; Hendrickson, W.A. (1994)
Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor
Nature, 372, 746-754

- 58.) Humphrey, P.; Zhu, X.; Zarnegar, R.; Swanson, P.E.; Ratliff, T.I.; Vollmer, R.T.; Day, M.I. (1995)
Hepatocyte Growth Factor and its receptor (c-Met) in prostatic carcinoma
Am. J. Pathol., 147, 386-396
- 59.) Ichimura, E.; Maeshima, A.; Nakajima, T.; Nakamura, T. (1996)
Expression of c-Met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas *in vitro* and *in vivo*
and its prognostic significance
Jpn. J. Cancer Res., 87, 1063-1069
- 60.) Igawa, T.; Matsumoto, K.; Kanda, S.; Saito, Y.; Nakamura, T. (1993)
Hepatocyte Growth Factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute
renal injury
Am. J. Physiol., 265, F61-F69
- 61.) Jäger, E.; Chen, Y.-T.; Drijfhout, J.W.; Karbach, J.; Ringhoffer, M.; Jäger, D.; Arand, M.;
Wada, H.; Noguchi, Y.; Stockert, E.; Old, L.J.; Knuth, A. (1998)
Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1:
definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes
J. Exp. Med., 187, 265-270
- 62.) Jäger, E.; Jäger, D.; Knuth, A. (2002)
Clinical cancer vaccine trials
Curr. Opin. Immunol., 14, 178-182
- 63.) Janeway, C.A.; Travers, P. (1997)
Immunologie
2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997
- 64.) Jeffers, M.; Fiscella, M.; Webb, C.P.; Anver, M.; Koochekpour, S.; Vande Woude, G.F.
(1998)
The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14417-14422
- 65.) Jeffers, M.; Rong, S.; Vande Woude, G.F. (1996)
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Met signaling in tumorigenicity and
invasion/metastasis
J. Mol. Med., 74, 505-513
- 66.) Jeffers, M.; Schmidt, L.; Nakaigawa, N.; Webb, C.P.; Weirich, G.; Kishida, T.; Zbar, B.;
Vande Woude, G.F. (1997)
Activating mutations for the Met tyrosine kinase receptor in human cancer
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11445-11450.
- 67.) Jücker, M.; Günther, A.; Gradl, G.; Fonatsch, C.; Krueger, G.; Diehl, V.; Tesch, H. (1994)
The Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of
human leukemia and lymphoma
Leuk. Res., 18, 7-16
- 68.) Kataoka, H.; Hamasuna, R.; Itoh, H.; Kitamura, N.; Kono, M. (2000)
Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor in colorectal carcinoma
Cancer Res., 60, 6148-6159
- 69.) Kiehne, K.; Herzig K. H.; Folsch U. R. (1997)
C-Met expression in pancreatic cancer and effects of Hepatocyte Growth Factor on pancreatic
cancer cell growth
Pancreas, 15, 35-40

- 70.) Kim, J.; Modlin, R.L.; Moy, R.L.; Dubinet, S.M.; McHugh, T.; Nickoloff, B.J.; Uyemura, K. (1995)
IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response
J. Immunol., 155, 2240-2247
- 71.) Koochekpour, S.; Jeffers, M.; Rulong, S.; Taylor, G.; Klineberg, E.; Hudson, E.A.; Resau, J.H.; Vande Woude, G.F. (1997)
Met and Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Expression in human gliomas
Cancer Res., 57, 5391-5398
- 72.) Kuhnen, C.; Tolnay, E.; Steinau, H.U.; Voss, B.; Müller, K.-M. (1998)
Expression of c-Met receptor and Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor in synovial sarcoma and epithelioid sarcoma
Virchows Arch., 432, 337-342
- 73.) Li, G.; Schaidler, H.; Satyamoorthy, K.; Hanakawa, Y.; Hashimoto, K.; Herlyn, M. (2001)
Downregulation of E-cadherin and desmoglein 1 by autocrine Hepatocyte Growth Factor during melanoma development
Nature, 20, 8125-8135
- 74.) Lindroos, P.M.; Zarnegar, R.; Michalopoulos, G.K. (1991)
Hepatocyte Growth Factor (Hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration
Hepatology (Baltimore, Md.), 13, 743-750
- 75.) Liu, Y.; Sun, A.M.; Dworkin, L.D. (1998)
Hepatocyte Growth Factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death
Biochem. Biophys. Res. Commun., 246, 821-826
- 76.) Maulik, G.; Kijima, T.; Ma, P.C.; Ghosh, S.K.; Lin, J.; Shapiro, G.I.; Schaefer, E.; Tibaldi, E.; Johnson, B.E.; Salgia, R. (2002)
Modulation of the c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in small cell lung cancer
Clin. Cancer Res., 8, 620-627
- 77.) Mizuno, K.; Higuchi, O.; Ihle, J.N.; Nakamura, T. (1993)
Hepatocyte Growth Factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 178-186
- 78.) Montesano, R.; Soriano, J.V.; Malinda, K.M.; Ponce, M.L.; Bafico, A.; Kleinman, H.K.; Bottaro, D.P.; Aaronson, S.A. (1998)
Differential effects of Hepatocyte Growth Factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis
Cell Growth Differ., 9, 355-365
- 79.) Morse, M.A.; Deng, Y.; Coleman, D.; Hull, S.; Kitrell-Fisher, E.; Nair, S.; Schlom, J.; Ryback, M.-E.; Lyster, H.K. (1999)
A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen
Clin. Canc. Res., 5, 1331-1338

- 80.) Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Jarisch, J.; Bowes, V.A.; Ragde, H.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Cobb, O.E.; Ireton, R.C.; Troychak, M.J.; Salgaller, M.L.; Boynton, A.L. (1999)
Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease
Prostate, 38, 73-78
- 81.) Naka, D.; Ishii, T.; Yoshiyama, Y.; Miyazawa, K.; Hara, H.; Hishida, T.; Kitamura, N. (1992)
Activation of the Hepatocyte Growth Factor by proteolytic conversion of single chain form to a heterodimer
J. Biol. Chem., 267, 20114-20119
- 82.) Nakamura, T.; Kanda, S.; Yamamoto, K.; Kohno, T.; Maeda, K.; Matsuyama, T.; Kanetake, H. (2001)
Increase in Hepatocyte Growth Factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation
Oncogene, 20, 7610-7623
- 83.) Naldini, L.; Vigna, E.; Narshimhan, R.P.; Gaudino, G.; Zarnegar, R.; Michalopoulos, G.K.; Comoglio, P.M. (1991)
Hepatocyte Growth Factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-Met
Oncogene, 6, 501-504
- 84.) Naughton, M.; Picus, J.; Zhu, X.; Catalona, W.J.; Vollmer, R.T.; Humphrey, P.A. (2001)
Scatter Factor-Hepatocyte Growth Factor elevation in the serum of patients with prostate cancer
J. Urol., 165, 1325-1328
- 85.) Nestle, F.O. (2000)
Dendritic cell vaccination for cancer therapy
Oncogene, 19, 6673-6679
- 86.) Nestle, F.O.; Alijagic, S.; Gilliet, M.; Sun, Y.; Grabbe, S.; Dummer, R.; Burg, G.; Schadendorf, D. (1998)
Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells
Nat. Med., 4, 328-332
- 87.) Norbury, C.C.; Hewlett, L.J.; Prescott, A.R.; Shastri, N.; Watts, C. (1995)
Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages
Immunity, 3, 783-791
- 88.) Nusrat, A.; Parkos, C.A.; Bacarra, A.E.; Godowski, P.J.; Delp-Archer, C.; Rosen, E.M.; Madara, J.L. (1994)
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and non transformed cell lines, basolateral polarization of c-Met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium
J Clin. Invest., 93, 2056-2065
- 89.) Otonkoski, T.; Beattie, G.M.; Rubin, J.S.; Lopez, A.D.; Baird, A.; Hayek, A. (1994)
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells
Diabetes, 43, 947-953.

- 90.) Otsuka, T.; Takayama, H.; Sharp, R.; Celli, G.; LaRochelle, W.J.; Bottaro, D.P.; Ellmore, N.; Vieira, W.; Owens, J.W.; Anver, M.; Merlino, G. (1998)
c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype
Cancer Res., 58, 5157-5167
- 91.) Park, M.; Dean, M.; Cooper, C.S.; Schmidt, M.; O'Brien, S.J.; Blair, D.G.; Vande Woude, G.F. (1986)
Mechanisms of Met oncogene activation
Cell, 45,895-904
- 92.) Park, W.S.; Dong, S.M.; Kim, S.Y.; Na, E.Y.; Shin, M.S.; Pi, J.H.; Kim, B.J.; Bae, J.H.; Hong, Y.K.; Lee, K.S.; Lee, S.H.; Yoo, N.J.; Jang, J.J.; Pack, S.; Zhuang, Z.; Schmidt, L.; Zbar, B.; Lee, J.Y. (1999)
Somatic mutations in the kinase domain of the Met/Hepatocyte Growth Factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas
Cancer Res., 59, 307-310
- 93.) Paulsson, K.M.; Anderson, P.O.; Chen, S.; Sjögren, H.-O.; Ljunggren, H.-G.; Wang, P.; Li, S. (2001)
Assembly of tapasin-associated MHC class I in the absence of the transporter associated with antigen processing (TAP)
Int. Immunol., 13, 23-29
- 94.) Pel, A. van; Bruggen, P. van der; Coulie, P.G.; Brichard, V.G.; Lethe, B.; Eynde, B. van den; Uyttenhoven, C.; Renauld, J.C.; Boon, T. (1995)
Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes
Immunol. Rev., 145, 229-250
- 95.) Pepper, M.S.; Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Orci, L.; Montesano, R. (1992)
Hepatocyte Growth Factor increases urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and u-PA receptor expression in Madin-Darby canine kidney epithelial cells
J. Biol. Chem., 267, 20493-20496
- 96.) Piali, L.; Fichtel, A.; Terpe, H.J.; Imhof, B.A.; Gisler, R.H. (1995)
Endothelial vascular cell adhesion molecule I expression is suppressed by melanoma and carcinoma
J. Exp. Med., 181, 811-816
- 97.) Pons, E.; Uphoff, C.C.; Drexler, H.G. (1998)
Expression of Hepatocyte Growth Factor and its receptor c-Met in human leukemia-lymphoma cell lines
Leuk. Res., 22, 797-804
- 98.) Purcell, A.W. (2000)
The peptide-loading complex and ligand selection during the assembly of HLA class I molecules
Mol. Immunol., 37, 483-492
- 99.) Qian, C.-N.; Guo, X.; Cao, B.; Kort, E.J.; Lee, C.-C.; Chen, J.; Wang, L.-M.; Mai, W.-J.; Min, H.-Q.; Hong, M.-H.; Vande Woude, G.F.; Resau, J.H.; Teh, B.T. (2002)
Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma
Cancer Res., 62, 589-596
- 100.) Radoja, S.; Frey, A.B. (2000)
Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing
Mol. Med., 6, 465-479

- 101.) Ramirez, R.; Hsu, D.; Patel, A.; Fenton, C.; Dinauer, C.; Tuttle, R.M.; Francis, G.L. (2000)
Over-expression of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) and the HGF/SF
receptor (c-Met) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and
young adults with papillary thyroid carcinoma
Clin. Endocrinol., 53, 635-644
- 102.) Rammensee, H.-G.; Bachmann, J.; Emmerich, N.P.; Bachor, O.A.; Stevanovic, S. (1999)
SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs
Immunogenetics, 50, 213-219
- 103.) Rammensee, H.-G.; Falk, K.; Rötzschke, O. (1993)
Peptides naturally presented by MHC class I molecules
Annu. Rev. Immunol., 11, 213-244
- 104.) Rayman, P.; Uzzo, R.G.; Kolenko, V.; Bloom, T.; Cathcart, M.K.; Molto, L.; Novick, A.C.;
Bukowski, R.M.; Hamilton, T.; Finke, J.H. (2000)
Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a
mechanism of immune escape
Cancer J., 6, 81-87
- 105.) Reichardt, V.L.; Okada, C.Y.; Liso, A.; Benike, C.J.; Stockerl-Goldstein, K.E.; Engleman,
E.G.; Blume, K.G.; Levy, R. (1999)
Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell
transplantation for multiple myeloma – a feasibility study
Blood, 93, 2411-2419
- 106.) Restifo, N.P. (2000)
Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape
Nat. Med., 6, 493-495
- 107.) Rock, K.L. (1996)
A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world
Immunol. Today, 17, 131-137
- 108.) Romani, N.; Reider, D.; Heuer, M.; Ebner, S.; Kampgen, E.; Eibl, B.; Niederwieser, D.;
Schuler, G. (1996)
Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special
regard to clinical applicability
J. Immunol. Methods, 196, 137-151
- 109.) Rong, S.; Bodescot, M.; Blair, D.; Dunn, J.; Nakamura, T.; Mizuno, K.; Park, M.; Chan, A.;
Aaronson, S.; Vande Woude, G.F. (1992)
Tumorigenicity of the Met proto-oncogene and the gene for Hepatocyte Growth Factor
Mol. Cell. Biol., 12, 5152-5158
- 110.) Rosenberg, S.A. (2001)
Progress in human tumour immunology and immunotherapy
Nature, 411, 380-384
- 111.) Rubin, J.S.; Bottaro, D.P.; Aaronson, S.A. (1993)
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and its receptor, the c-Met proto-oncogene product
Biochim. Biophys. Acta., 1155, 357-371
- 112.) Schmidt, C.; Bladt, F.; Goedecke, S.; Brinkmann, V.; Zschiesche, W.; Sharpe, M.; Gherardi,
E.; Birchmeier, C. (1995)
Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor is essential for liver development
Nature, 373, 699-702

- 113.) Schmidt, L.; Junker, K.; Nakaigawa, N.; Kinjerski, T.; Weirich, G.; Miller, M.; Lubensky, I.; Neumann, H.P.H.; Brauch, H.; Decker, J.; Vocke, C.; Brown, J.A.; Jenkins, R.; Richard, S.; Bergerheim, U.; Gerrard, B.; Dean, M.; Linehan, W.M.; Zbar, B. (1999)
Novel mutations of the Met proto-oncogene in papillary renal carcinomas
Oncogene, 18, 2343-2350
- 114.) Schmidt, S.M.; Schag, K.; Müller, M.R.; Weck, M.M.; Appel, S.; Kanz, L.; Grünebach, F.; Brossart, P. (2003)
Survivin is a shared tumor associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T-cells
Blood, 6, 4966-4971
- 115.) Schmitz, M.; Distelkoetter, P.; Weigle, B.; Schmachtenberg, F.; Stevanovic, S.; Ockert, D.; Rammensee, H.G.; Rieber, E.P. (2000)
Generation of Survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides
Cancer Res., 60, 4845-4849
- 116.) Schuler-Thurner, B.; Schultz, E.S.; Berger, T.G.; Weinlich, G.; Ebner, S.; Woerl, P.; Bender, A.; Feuerstein, B.; Fritsch, P.O.; Romani, N.; Schuler, G. (2002)
Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells
J. Exp. Med., 195, 1279-1288
- 117.) Seliger, B.; Maeurer, M.J.; Ferrone, S. (1997)
TAP off-tumors on
Immunol. Today, 18, 292-299
- 118.) Shaharabany, M.; Abramovitch, R.; Kushnir, T.; Tsarfaty, G.; Ravid-Megido, M.; Horev, J.; Ron, R.; Itzchak, Y.; Tsarfaty, I. (2001)
In vivo molecular imaging of Met tyrosine kinase growth factor receptor activity in normal organs and breast tumors
Cancer Res., 61, 4873-4878
- 119.) Shastri, N.; Schwab, S.; Serwold, T. (2002)
Producing nature's gene-chips: The generation of peptides for display by MHC class I molecules
Annu. Rev. Immunol., 20, 463-493
- 120.) Small, E.J.; Fratesi, P.; Reese, D.M.; Strang, G.; Laus, R.; Peshwa, M.V.; Valone, F.H. (2000)
Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells
J. Clin. Oncol., 18, 3894-3903
- 121.) Sonnenberg, E.; Meyer, D.; Weidner, K.M.; Birchmeier, C. (1993)
Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development
J. Cell Biol., 123, 223-235
- 122.) Streit, A.; Stern, C.D.; Thery, C.; Ireland, G.W.; Aparicio, S.; Sharpe, M.J.; Gherardi E. (1995)
A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation
Development, 121, 813-824
- 123.) Strome, S.E.; Voss, S.; Wilcox, R.; Wakefield, T.L.; Tamada, K.; Flies, D.; Chapoval, A.; Lu, J.; Kasperbauer, J.L.; Padley, D.; Vile, R.; Gastineau, D.; Wettstein, P.; Chen, L. (2002)
Strategies for Antigen Loading of Dendritic Cells to Enhance the Antitumor Immune Response
Cancer Res., 62, 1884-1889

- 124.) Suzuki, K.; Hayashi, N.; Yamada, Y.; Yoshihara, H.; Miyamoto, Y.; Ito, Y.; Ito, T.; Katayama, K.; Sasaki, Y.; Ito, A.; Kisida, Y.; Kashiwagi, T.; Fusamoto, H.; Kamada, T. (1994)
Expression of the c-Met protooncogene in human hepatocellular carcinoma
Hepatology (Baltimore, Md.), 20, 1231-1236
- 125.) Svensson, M.; Stockinger, B.; Wick, M.J. (1997)
Bone-marrow derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells
J. Immunol., 158, 4229-4236
- 126.) Takayama, H.; LaRochelle, W.J.; Sharp, R.; Otsuka, T.; Kriebel, P.; Anver, M.; Aaronson, S.A.; Merlino, G. (1997)
Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 701-706
- 127.) Takayama, H.; LaRochelle, W.J.; Anver, M.; Bockman, D.E.; Merlino, G. (1996)
Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5866-5871
- 128.) Tamagnone, L.; Comoglio, P.M. (1997)
Control of invasive growth by Hepatocyte Growth Factor (HGF) and related factors
Cytokine Growth Factor Rev., 8, 129-142
- 129.) Teofili, L.; Di Febo, A.L.; Pierconti, F.; Maggiano, N.; Bendandi, M.; Rutella, S.; Cingolani, A.; Di Renzo, N.; Musto, P.; Pileri, S.; Leone, G.; Larocca, L.M. (2001)
Expression of the c-Met proto-oncogene and its ligand, Hepatocyte Growth Factor, in Hodgkin disease
Blood, 97, 1063-1069
- 130.) Thurner, B.; Haendle, I.; Röder, C.; Dieckmann, D.; Keikavoussi, P.; Jonuleit, H.; Bender, A.; Maczek, C.; Schreiner, D.; Driesch, P. von den; Bröcker, E.B.; Steinman, R.M.; Enk, A.; Kämpgen, E.; Schuler, G. (1999)
Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma
J. Exp. Med., 190, 1669-1678
- 131.) Timmerman, J.M.; Levy, R. (1999)
Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy
Annu. Rev. Med., 50, 507-529
- 132.) Tokunou, M.; Niki, T.; Eguchi, K.; Iba, S.; Tsuda, H.; Yamada, T.; Matsuno, Y.; Kondo, H.; Saitoh, Y.; Imamura, H.; Hirohashi, S. (2001)
c-Met expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma
Am. J. Pathol., 158, 1451-1463
- 133.) Tsarfaty, I.; Alvord, W.G.; Resau, J.H.; Altstock, R.T.; Lidereau, R.; Biche, I.; Bertrand, F.; Horev, J.; Klabansky, R.L.; Keydar, I.; Vande Woude, G.F. (1999)
Alteration of Met protooncogene product expression and prognosis in breast carcinoma
Anal. Quant. Cytol. Histol., 21, 397-408
- 134.) Tuck, A.B.; Park, M.; Sterns, E.E.; Boag, A.; Elliott, B.E. (1996)
Coexpression of Hepatocyte Growth Factor and receptor (Met) in human breast carcinoma
Am. J. Pathol., 148, 225-232

- 135.) Uehara, Y.; Minowa, O.; Mori, C.; Shiota, K.; Kuno, J.; Noda, T.; Kitamura, N. (1995)
Placental defect and embryonic lethality in mice lacking
Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
Nature, 373, 702-705
- 136.) Vigna, E.; Gramaglia, D.; Longati, P.; Bardelli, A.; Comoglio, P.M. (1999)
Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation
of TPR-Met
Oncogene, 18, 4275-4281
- 137.) Voort, R. van der; Taher, T.E.I.; Keehnen, R.M.J.; Smit, L.; Groenink, M.; Pals, S.T. (1997)
Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-Met-Hepatocyte Growth
Factor/Scatter Factor pathway
J. Exp. Med., 185, 2121-2131
- 138.) Wang, R.-F. (1999)
Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development
J. Mol. Med., 77, 640-655
- 139.) Wang, R.; Ferrell, L.D.; Faouzi, S.; Maher, J.J.; Bishop, J.M. (2001)
Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular
carcinomas in transgenic mice
J. Cell Biol., 153, 1023-1033
- 140.) Weinschenk, T.; Gouttefangeas, C.; Schirle, M.; Obermayr, F.; Walter, S.; Schoor, O.;
Kurek, R.; Loeser, W.; Bichler, K.-H.; Wernet, D.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.-G. (2002)
Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines
Cancer Res., 62, 5818-5827
- 141.) Yanagita, K.; Matsumoto, K.; Sekiguchi, K.; Ishibashi, H.; Niho, Y.; Nakamura, T. (1993)
Hepatocyte Growth Factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute
lung injury
J. Biol. Chem., 268, 21212-21217
- 142.) Yu, J.S.; Wheeler, C.J.; Zeltzer, P.M.; Ying, H.; Finger, D.N.; Lee, P.K.; Yong, W.H.; In-
cardona, F.; Thompson, R.C.; Riedinger, M.S.; Zhang, W.; Prins, R.M.; Black, K.L. (2001)
Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicited systemic
cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration
Cancer Res., 61, 842-847
- 143.) Zarnegar, R.; Michalopoulos, G.K. (1995)
The many faces of Hepatocyte Growth Factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis
J. Cell Biol., 129, 1177-1180
- 144.) Zhuang, Z.; Park, W.S.; Pack, S.; Schmidt, L.; Vortmeyer, A.O.; Pak, E.; Pham, T.; Weil,
R.J.; Candidus, S.; Lubensky, I.A.; Linehan, W.M.; Zbar, B.; Weirich, G. (1998)
Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant Met allele in hereditary papillary
renal carcinomas
Nature Genet., 20, 66-69

Internetquelle:

- 145.) http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html am 15.08.2001
GenBank; Accession # NM_000245
Software: Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000); Primer3 on the WWW for general
users and for biologist
Programmers in: Krawetz, S.; Misener, S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols
Methods in: Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

7 Danksagung

Danken möchte ich ...

... PD Dr. med. Peter Brossart für die Überlassung dieses Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit, die kompetente Betreuung und die gute Anleitung.

... PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic für die Herstellung der synthetischen HLA-A2-bindenden Peptide und die freundliche Überlassung des HLA-A2-Antikörpers.

... Dr. rer. nat. Frank Grünebach für die Hilfe und Unterstützung sowie für die Herstellung des c-Met Primers.

... Markus Weck und Dr. rer. nat. Silke Appel für die Einführung in die Methoden der Versuche sowie für Hilfe und Aufmunterung während der praktischen Phase dieser Arbeit.

... Sylvia, Bruni und Regina für die Unterstützung und die gute Laune bei der praktischen Ausführung der Versuche.

... meiner Mitstreiterin Susi für den Spaß, den wir hatten und für die flexiblen Vertretungen.

... meinem Freund Sven für die wertvollen Tipps und Tricks am Computer und die liebevolle Unterstützung.

... meinen Eltern, die mir die Grundlagen für diese Arbeit und für vieles mehr mit auf den Weg gegeben haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Schag
Geburtsdatum: 14.09.1978
Geburtsort: Crailsheim

Schulbildung

1985-1989 Leonhard-Sachs-Grundschule Crailsheim
1989-1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife,
ausgezeichnet mit dem Geschichtspreis des Historischen
Vereins für Württembergisch Franken

Hochschulbildung

1998 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
2000 Ärztliche Vorprüfung
2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (16.11.2004)

Praktika

1997 Krankenpflegepraktikum in der Chirurgie, Centre Hospitalier
du Val d'Ariège, Pamiers, Frankreich
1999 Krankenpflegepraktikum in der Onkologie, Robert-Bosch-
Krankenhaus, Stuttgart
2001 Famulatur in der Nephrologie, Robert-Bosch-Krankenhaus,
Stuttgart
2001 Famulatur in der Neurologie, Betlehem Hospital, Melbourne,
Australien
2002 Famulatur in der Immuntherapie, Universitätsklinik Tübingen

- 2002 Famulatur in der unfallchirurgischen Ambulanz, Kreiskrankenhaus Böblingen
- 2003/2004 Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Esslingen a. N., Wahlfach Pädiatrie
- 2004 Chirurgie-Teiltertial des Praktischen Jahrs am GZO Spital Wetzikon, Schweiz

Publikationen

Schag, K.; Schmidt, S.M.; Müller, M.R.; Weinschenk, T.; Appel, S.; Weck, M.M.; Grünebach, F.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.G.; Brossart, P. (2004)

Identification of c-Met oncogene as a broadly expressed tumor associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes

Clin. Cancer Res.; 10, 3658-3666

Schmidt, S.M.; Schag, K.; Müller, M.R.; Weck, M.M.; Appel, S.; Kanz, L.; Grünebach, F.; Brossart, P. (2003)

Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells

Blood, 102, 571-576

Schmidt, S.M.; Schag, K.; Müller, M.R.; Weinschenk, T.; Appel, S.; Schoor, O.; Weck, M.M.; Grünebach, F.; Kanz, L.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.G. ; Brossart, P. (2003)

Induction of Adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis

Cancer Res.; 64, 1164-1170

Weitere Veröffentlichungen (Poster)

ASH Annual Meeting Abstracts 2002:

Schag, K.; Schmidt, S.M.; Müller, M.R.; Weinschenk, T.; Appel, S.; Weck, M.; Grünebach, F.; Kanz, L.; Stevanovic, S.; Rammensee, H.G.; Brossart, P. (2002)

(2654) Identification of c-Met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes

Blood; Volume 100, Issue 11

Schmidt, S.M.; Schag, K.; Müller, M.R.; Weck, M; Appel, S.; Kanz, L;
Grünebach, F; Brossart, P. (2002)

(3675) Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad
variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T-cells
Blood; Volume 100, Issue 11

Auszeichnungen und Preise

ASH Travel Award (2002)

verliehen durch die American Society of Hematology, Washington, DC, USA

Carl Liebermeister-Preis (2004)

verliehen durch die Medizinische Fakultät der Universität Tübingen und das
Interdisziplinäre Zentrum für klinische Forschung