Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie, Rheumatologie)
Leitender Ärztlicher Direktor und Vorstandsvorsitzender
Prof. Dr. med. L. Kanz

Induktion von MMP-7-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten mit Hilfe dendritischer Zellen als Voraussetzung zur Immuntherapie maligner Tumore

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von
Yuko Grichisch, geb. Yokoyama
aus
Kanagawa / Japan
2009

Dekan:		Professor Dr. med. I. B. Autenrieth
1.	Berichterstatter:	Professor Dr. med. P. Brossart
2.	Berichterstatter	Professor Dr. med. R. Handgretinger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 4
1 Einleitung 7
1.1 DC 7
1.2 DC und Tumor 10
1.3 Tumorantigene 10
1.4 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) 13
1.4.1 Rolle der MMP-7 bei Tumorinvasion 14
1.4.2 Rolle der MMP-7 bei der Tumorentwicklung 14
1.4.3 Rolle der MMP-7 bei Apoptose 15
1.4.4 Rolle der MMP-7 bei Angiogenese 15
1.5 Ziele dieser Arbeit 16
2 Material und Methodik 17
2.1 Verwendete Materialien 17
2.1.1 Geräte 17
2.1.2 Medien und Puffer (Eigenherstellung) 19
2.1.3 Reagenzien 19
2.1.4 Antikörper 20
2.1.5 Peptide und RNA 21
2.1.6 Kits 21
2.1.7 Tumorzelllinien 22
2.2 Methode 22
2.2.1 Isolierung von mononuklearen Zellen aus peripherem Blut 22

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl 23
2.2.3 Ex vivo Generierung von DC 23
2.2.4 Durchflusszytometrie FACS und FACS Färbung 23
2.2.5 Kryokonservierung von Zellen 27
2.2.6 Elektroporation 27
2.2.7 CTL-Induktion 28
2.2.8 Restimulation 29
2.2.9 ^{51}Chrom-Release-Assay 31
2.2.10 Isolierung von B Zellen und T Zellen 32
3 Ergebnisse 34
3.1 Expressionsanalyse der MMP7 34
3.2 Induktion der MMP-7-spezifischen CTLs mittels mit MMP-7-IVT-elektroporierten DCs. 35
3.3 Induktion der MMP-7-spezifische CTLs mittels mit Peptid beladenen DCs. 36
3.4 Induktion der MMP-7-spezifische CTLs mittels mit MMP-7-IVT elektroporierten DCs; Targetzellen wurden mit MMP-7-Peptiden beladen ... 39
3.5 Induktion der CTLs mittels DCs einer Patientin mit ALL 39
4 Diskussion 41
4.1 Probleme und Grenzen dieser Arbeit 43
4.2 Vakzinierungsstudien-Melanom 44
4.3 Kann diese Immuntherapie andere Therapieoptionen ersetzen? 44
4.4 Verbesserung der Vakzinierung 45
4.4.1 Quelle der DCs 45
4.4.2 Antigenbeladung 45
4.4.3 Die Reife der DCs 46
4.4.4 Die Route der Verabreichung 46

4.4.5 Ausbreitung der Antigene („Antigen spreading“) 46
4.5 Ausblick 48
5 Zusammenfassung 49
6 Abbildung und Tabellen 50
6.1 Abbildungen 50
6.2 Tabellen 51
7 Literaturverzeichnis 52
8 Verzeichnis der Abkürzungen 59
9 Danksagung 61
10 Lebenslauf 62

1 Einleitung

Humane Tumore exprimieren eine Reihe von Proteinantigenen die von T-Zellen erkannt werden und dabei eine Immunantwort induzieren. DC spielen als antigenpräsentierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung dieser Immunantwort. Im Rahmen der Immunotherapie gegen Tumore wird diese Fähigkeit der DCs ausgenützt, um eine Sensibilisierung naiver T-Zellen zu antigen-spezifischen CTLs anzuregen. （Timmerman J.M., 1999）

1.1 DC

DC sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die aus dem Knochenmark abstammen. Die Vorläuferzellen migrieren aus dem Knochenmark und zirkulieren im Blut. Sie werden durch das vaskuläre Endothel in die peripheren Gewebe transportiert und dort an Hand von MIP-1α, MIP-3α und RANTES angelockt. In diesem Stadium befinden sie sich noch in unreifem Zustand.

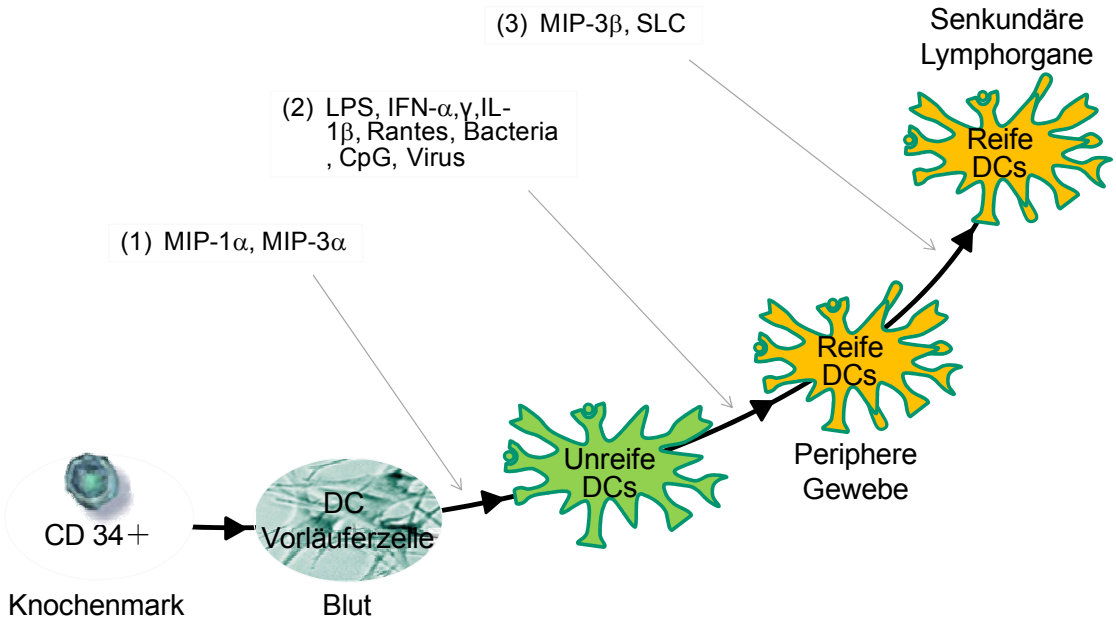


Abbildung 1: Lebenszyklus der DCs; Quelle: vgl. C.A. Janeway et.al, Immunologie, 5.Aufl.

Im Anschluss an die Aktivierung durch Stimuli wie zum Beispiel LPS, IFN-α oder -γ, RANTES, Bakterien, Viren und CpG, migrieren DCs aus dem peripheren Gewebe durch afferente Lymphgefäße in die Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen interagieren. （Fong L., 2000） In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Eigenschaften reifer und unreifer DC aufgelistet.

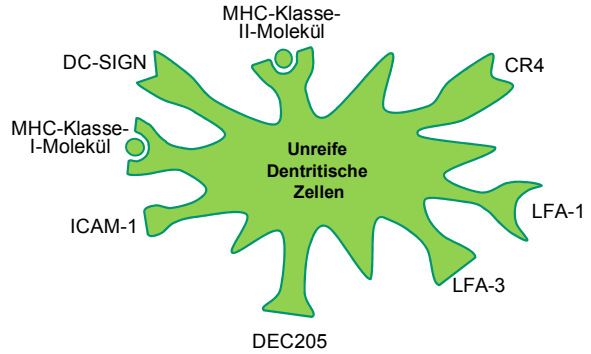
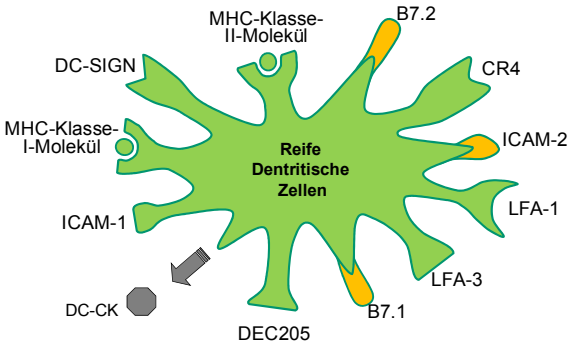
Unreife DC	Reife DC
• keine prominente Dendrite • niedrige MHC - Klasse – Moleküle - Expression • keine costimulirende B7-Moleküle • wenige Adhäsionsmoleküle • schwache Stimulation der naiven T-Zellen • starke Phagozytotische Funktion über Rezeptoren wie DEC205	• prominente Dendrite • hohe MHC – Klasse – Moleküle - Expression • starke costimulierende B7 – Moleküle - Expression • starke Adhäsionsmoleküle - Expression z.B. DC-SIGN • wenige Phagozytotische Funktion • potenziell starke Stimulation der naiven T-Zellen. • Reife DCs sezenieren das Chemokin DC-CK, das spezifisch naive T-Zellen anlockt.
	

Tabelle 1: Vergleich Reife und Unreife Dentritische Zellen

1.2 DC und Tumor

Bei Tierexperimenten wurde die Fähigkeit zur Induktion einer Antitumorimmunantwort der DCs demonstriert. Hierzu wurden DCs in vitro mit Tumorlysaten, ganzen Proteinen oder von Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden beluden. Dabei zeigte sich eine tumorspezifische Immunantwort. Außerdem sind antigenbeladene DCs in der Lage, die Rückbildung bereits vorhandener Tumore zu fördern. （Cerundolo V.，2004） （Figdor C.G.，2004） （Gilboa E.，1998） （Whiteside T.L.，2004）

Zur Identifizierung einer optimalen therapeutischen Vakzinierungsmaßnahme ist es notwendig Tumorantigene zu charakterisieren.

1.3 Tumorantigene

Bei der Induktion der Tumor-spezifischen zytotoxischen Lymphozyten spielt die Identifizierung der MHC Klasse I Liganden aus TAA (tumor assaociated antigen) eine große Rolle. （Andersen M.H.，2001） （Boon T.，1994） （Brossart P.，1999） （Brossart P.，2001） （Chiodoni C.，1999） （Eynde B.J. van den，1997） （Pel A. van，1995）TAA sind hauptsächlich in malignen Zellen vorhanden und in verschiedene Gruppen unterteilt. （Nencioniet al.，2001） （Jäger E.，2002）

Die erste Gruppe umfasst Antigene, die streng tumorspezifisch sind. Sie entstehen durch Punktmutationen oder Genumlagerungen und sind häufig an der Onkogenese beteiligt. Diese haben theoretisch Vorteile bei der Vakzinierungstherapie mit geringem Risiko der Schädigung normaler Gewebe. Beispiele hierfür sind p21/ras und p53.

Die zweite Gruppe von Tumorantigenen besteht aus Proteinen, deren Gene normalerweise nur in männlichen Keimzellen exprimiert werden. （Boon T.，1994） （Eynde B.J. van den，1997） （Pel A. van，1995）Hierzu gehören z.B. MAGE-1 und -3.

Die dritte Gruppe umfasst, in spezifischen Gewebetypen exprimierte Gene, sogenannte Differenzierungsantigene.

Z.B. die von Melanozyten und Melanomzellen exprimiert werden. （Boon T.， 1994） （Pel A. van， 1995）Beispiele hierfür sind Tyrosinase, MART-1, gp100, Prostata-Phosphatase.

Die vierte Gruppe enthält die Antigene, die in Tumorzellen verglichen mit den normalen Zellen stark überexprimiert werden, z.B. HER-2/neu, CEA und Muc-1. （Brossart P.， 1999） （Brossart P.， 2001） （Fenton R. G.， 1997） （Fisk B.， 1995）

Die fünfte Gruppe beinhaltet die Proteine, die von viralen Onkogenen exprimiert werden. Hierzu gehören z.B. HPV Typ 16, Proteine E6 und E7. (Siehe Tabelle 2: Potenzielle Tumorantigene für Vakzinierungstherapie

Antigenklasse	Antigen	Tumortyp
Tumorspezifische Antigene	Immunoglobulin Idiotyp	B-Zell non Hodgikin's Lymphom, multiple Myelom
	TCR	T-Zell non-Hodgikin's Lymphom
	Mutant p21/ras	Pankreas-, Kolon-, Lungenkarzinom
	Mutant p53	Kolorektal-, Lungen-, Blasenkarzinom
Keimzelle	MAGE-1, MAGE-3	Melanom, Mamakarzinom, Pankreaskarzinom
Gewebe-spezifische Differenzierungsantigen	Tyrosinase	Melanom
	MART-1	Melanom
	Gp100	Melanom
	Prostata-spezifische Antigen	Prostatakarzinom
	Prostata-phosphatase	Prostatakarzinom
	Prostata spezifische Membranantigen	Prostatakarzinom
Überexprimierte Antigene	HER-2/neu	Brustkrebs, Ovarialkarzinom
	CEA	Kolorektal-, Lungen-, Mamakarzinom
	Muc-1	Kolorektal-, Pankreas-, Ovarial-, Lungenkarzinom
Onkovirale Proteine	HPV Typ 16, Proteine E6 und E7	Zervixkarzinom

Tabelle 2: Potenzielle Tumorantigene für Vakzinierungstherapie

1.4 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Matrix-Metalloproteinase-Familie besteht aus mehr als 20 Zink-abhängigen Proteinasen. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der Extrazellulären Matrix (ECM), bei pathologischen Prozessen sowie bei dem Gewebeumbau bei entzündlichen Krankheiten, Tumorinvasionen und Fernmetastasen.

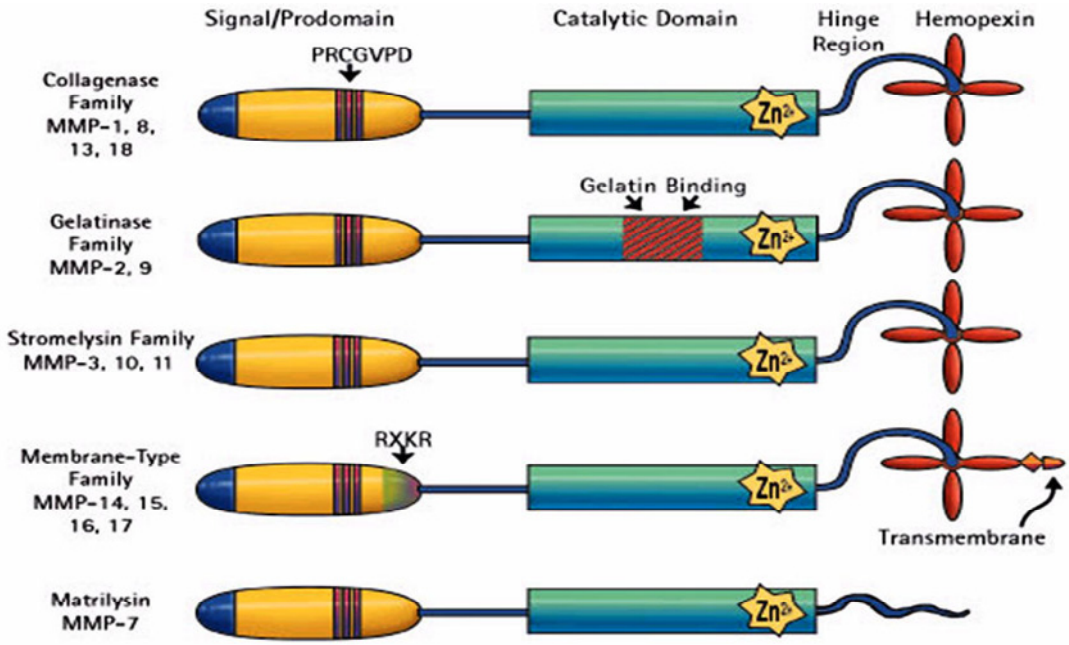


Abbildung 2: Matrix Metalloproteinase; Quelle:
http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/proteases_inhibitors_matrix_metalloproteinase.htm

Die MMP-Expression wird normalerweiser bei malignen Tumoren hochreguliert. Die Überexprimierung der MMPs korreliert mit der Aggressivität der Tumorzellen und mit schlechter Prognose der Patienten. （Crawford H.C.，2002）（Kruger T.，2005）

Zusätzlich zum Abbau der ECM, regulieren einige MMPs die Aktivität bioaktiver Moleküle z.B. Zytokine, Zytokine-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren.

Einige MMPs besitzen eine so genannte „shedding“ Funktion. Shedding ist ein Prozess, bei dem die extrazelluläre Domäne transmembranöser Moleküle von

der Zellenoberfläche (proteolytisch) abgelöst wird. Durch die Ablösung kann das Zelloberflächensignal verändert werden.

Die meisten MMPs werden bei Stromazellen so wie Stromafibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen produziert. （Hanemaaijer R.，1993） （Jackson C.J.，1997） （Nagashima Y.，1997）Einige MMPs z.B. MMP-7 werden durch Tumorzellen selbst produziert. MMP-7 wird bei vielen Humantumoren exprimiert und spielt beim Tumorwachstum und -metastasierung eine entscheidende Rolle.

1.4.1 Rolle der MMP-7 bei Tumorinvasion

MMP-7 ist das kleinste Mitglied der MMPs. So wie andere MMPs, kann MMP-7 die Tumorinvasion durch Spaltung des ECM Substrates fördern. MMP-7 aktiviert andere MMPs z.B. Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9, um Tumorinvasion zu unterstützen. （Wang F.，2006） （Tan X.，2005）

Ein weiteres Beispiel ist E-cadherin. Es ist ein transmembranöses Protein, das an der positiven Regulierung von Zelladhäsion durch ihre Interaktion mit den zytoplastischen Ende von Catenin beteiligt ist. MMP-7 setzt durch shedding lösliche E-cadherin frei. Das lösliche E-cadherin inhibiert die E-cadherin-Funktionen und fördert die Migration und Invasion der Tumorzellen. （Noe V.，2001）

1.4.2 Rolle der MMP-7 bei der Tumorentwicklung

MMP-7 schneidet die extrazelluläre Domäne von Pro-HB-EGF (Heparin-binding epidermal growth factor) ab und produziert reife HB-EGF. Dadurch werden Erb-B4-Rezeptoren aktiviert und die Apoptose gehemmt, was die Zellproliferation fördert. （Yu W.H.，2002）

Durch ihren mitogenetischen und antiapoptotischen Effekt spielt IGF (Insulin-like growth factor) eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung. MMP-7 baut die IGF bindenden Proteine ab, die die biologische Verfügbarkeit der IGFs aktivieren. Dies begünstigt das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen. （Miyamoto S.，2004）

1.4.3 Rolle der MMP-7 bei Apoptose

Fas Ligand ist ein transmembranöser Stimulator der Fas-Rezeptoren. Er ist einer der wichtigsten Apoptoseinduktoren. Fas Ligand exprimiert in aktivierten Immunzellen, immunprivilegiertem Gewebe (Augen, Hoden, Gehirn, Plazenta) und vielen Tumoren. Viele dieser Tumore exprimieren zusätzlich Fas Rezeptoren.

MMP-7 spaltet Fas Ligand ab und generiert lösliches Fas Ligand. Sowohl Fas Ligand als auch lösliches Fas Ligand induzieren Apoptose, wobei die Induktion durch lösliches Fas Ligand wesentlich uneffektiver ist. （Powell W.C.，1999）（Vargo-Gogola T.，2002）Es weist drauf hin, dass die Spaltung des Fas Ligand durch MMP-7 einer der Mechanismen zum Schutz der Tumorzellen vor Apoptose ist.

Zusätzlich spaltet MMP-7 circa 2-3 kDa von dem N-terminalen, extrazellulären Ende des Fas Rezeptors ab.

1.4.4 Rolle der MMP-7 bei Angiogenese

Angiogenese ist der Prozess des Wachstums und der Entwicklung neuer Blutgefäße. Zur Ausbreitung und Invasion von Tumorzellen ist die Neo-Angiogenese notwendig.

Bei der Expression von MMP-7 in Tumorzellen wurde gezeigt, dass dies mit dem Vorhandensein von MMP-7 mRNA und Proteinen bei nahen vaskulären Endothelzellen korreliert. （Nagashima Y.，1997）Weitere Untersuchungen zeigten, dass MMP-7 die DNA-Synthese der kultivierten vaskulären Endothelzellen stimuliert. Es weist drauf hin, dass MMP-7 die Angiogenese direkt induziert. （Nishizuka I.，2001）Auf der anderen Seite dient MMP-7 durch Angiostatin und Endostatin (beide Angiogenese-Hemmer) auch zur Hemmung der Angiogenese. （Lucas R.，1998） （Lin H.C.，2001）Ungewiss ist die Balance zwischen proangiogenetischem und antiangiogenetischem Effekt. Dies muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

（Ii M.，2006）

1.5 Ziele dieser Arbeit

Kürzlich wurden an Hand von mikroarray- und RT-PCR-Analyse matrixmetalloproteinase (MMP)-7 identifiziert, das in vielen verschiedenen malignen Zellen überexprimiert wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung dieses tumor-assoziierten Antigens, MMP-7, als T-Zell-Epitop, das sowohl zur Angiogenese als auch zur Tumorinvasion beiträgt. Mit Hilfe der Chrom-Release-Assay wurde untersucht, ob das MMP-7-Peptid durch endogene Antigenprozessierung der Tumorzelllinien als T-Zell-Epitop lytische Aktivitäten der CTL hervorrufen kann.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen in antigen-spezifischer und HLA-restringierter Weise erfolgt. Ferner wurde noch untersucht, ob diese Ansätze auch auf ein autologes System übertragen werden können. Dazu wurden DCs aus dem peripheren Blut einer ALL-Patientin in kompletter Remission generiert und mit MMP-7-IVT transfiziert. Diese Erkenntnisse leisten damit einen Beitrag zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien zur Behandlung maligner Erkrankungen.

2 Material und Methodik

2.1 Verwendete Materialien

Im Rahmen zur Durchführung der Arbeit wurden folgende Materialen verwendet:

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bestrallungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, Großbritannien
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Brutschrank NuAireTM US Auto Flow	NuAireTM Inc., Plymouth, USA
Elektroporationsgerät EPI 2500	Dr. L. Fischer, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -85Grad UF 300	Napco, Winchester, USA
Kühlschrank Kombination 4 Grad und -20 Grad	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Mikropipetten 10µ, 20µ, 200µ, 1000µ	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten 10µ, 20µ, 200µ, 1000µ	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Olympus CK 30	Olympus Optical GmbH, Hamburg, Deutschland
Minishaker IKA-Works	IKA-Works Inc., WIlmington, USA
Neubauer Zählkammer 0,1mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Baar, Schweiz
Reinluftwerkbank Heraeus Hera Safe HS 18/2	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasserbad WB/OB 7-45 W-BU 45	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatte Falcon® Multi-wellTM 353046	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
24-Well-Zellkulturplatte Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte Cellstar® U-shape	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
500-PP-Reaktionsgefäße Cellstar® 1,5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Combitips Plus 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalpipette für alle Küvetten	PeqLab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Einwegspritzen Injekt 5ml, 10ml, 20ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Elektroporationsküvetten 4mm	PeqLab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Falcon® Blue MaxTM, 50ml Blue Cups	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon® 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Safe Skin Satin Plus®	Kimberley Clark, Roswell, USA
Kryoröhrchen NuncTM Cryo TubeTM	Nalge Nunc Internat., Rochester, USA
Luma PlateTM -96	Packard Bioscience BV, Groningen, Niderlande
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Parafilm®	Pechney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipetten Serological Pipet 2ml Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning GmbH, Kauserslautern, Deutschland
Pipettenspitzen blau 1,0ml und gelb 0,2ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland
PP-Test Tube 15ml Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0,2μ Vented Blue Plug Seal Cup 70ml, 275ml	Becton Dickerson, Franklin Lakes, USA

Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.2 Medien und Puffer (Eigenherstellung)

Bezeichnung	Reagenzien
Gefriermedium	RP10 ergänzt mit 10% DMSO
RP 10	RPMI 1640 mit Glutamax ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin 100IU/ml und Streptomycin 100mg/ml
MACS-Puffer	DPBS 5% BSA 2mM EDTA

Tabelle 5: Verwendete Medien und Püffer (Eigenherstellung)

2.1.3 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll Seperating Solution	Bio Chrom AG, Berlin, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
^{51}Chrom-Natrium-Chromat	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
DMSO	Serva, Heidelberg, Deutschland
GM-CSF Leukomax	Novartis, Basel, Schweiz
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO4)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Penicillin – Streptomycin 100ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA 25200	Invitrogen Gibco^{TM}, Karlsruhe, Deutschland
X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA
R848	Invivogen, San Diego, USA

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
MHC class I	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
MHC class II	Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
FITC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

2.1.5 Peptide und RNA

Bezeichnung	Bereitgestellt von:
MMP-7 (A3)-Peptid	Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
RGS-5 (A3)-Peptid	Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
MMP-7 RNA	Dr. Frank Grünebach, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen
EGFP-RNA	Dr. Frank Grünebach, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen

Tabelle 8: Verwendete Peptide und RNA

2.1.6 Kits

Produkt	Hersteller
MACS Pan T cell Isolations Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Pan B cell Isolations Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD 3 Micro Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD 19 Micro Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Kits

2.1.7 Tumorzelllinien

Tumorzelllinie	Herkunft	HLA-Status
A498	Humanes Nierenzellkarzinom adhärent	HLA-A2
K562	Chronisch myeloische Leukämie	HLA-A2
SK-OV-3	Humanes Ovarialkarzinom, adhärent	HLA-A3

Tabelle 10: Verwendete Tumorzelllinien

2.2 Methode

2.2.1 Isolierung von mononuklearen Zellen aus peripherem Blut

Für die Versuche wurden mononukleare Zellen von HLA-A3-positiven gesunden Spendern der Blutbank an der Universität Tübingen und von Leukämiepatienten aus heparinisiertem Blut verwendet. Buffy Coat wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig in einem 50 ml Röhrchen auf 12 ml bereits vorgelegtes Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) überschichtet. Dabei sollte eine klare Grenzschicht zwischen den Flüssigkeiten gebildet werden. Die Röhrchen wurden 18 min. bei Raumtemperatur bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Abnahme der PBMNC-Schicht (die milchige Schicht zwischen Ficoll und Serum) mit einer sterilen Pasteurpipette. Die PBMNC-Schicht enthält Lymphozyten und Monozyten. Nach zweimaligem Waschen der PBMNCs in 25 ml PBS mit jeweils 5 min. Zentrifugation bei 1500 rpm, wurden die Pellets in 10 ml RPMI-1640-Medium aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde 10µl Zellsuspension mit10µl Trypanblau und 80µl Medium gemischt und in die Zählkammer eingefüllt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt. Die Zellzahl berechnet sich nach folgender Formel:

$$Z_n = Z_{n16(gezählt)} \times 2 \times \frac{1}{10} Ver. \times Vol_{Med.} \times 10^4$$

Z_{n} = Zellzahl
Z_{n16}= Gezählte Zellen in 16 Quadranten
Ver.= Verdünnung
Vol_{Med}= Volum des Mediums in ml

2.2.3 Ex vivo Generierung von DC

Aus Buffy Coat isolierte PBMNCs wurden in Zellkulturflaschen in einer Dichte von 1 x 10 ^{8}Zellen/ Flasche und in jeweils 10ml Ex-vivo verteilt. Nach 1,5 Stunden Inkubation bei 37.0 Grad und 5% CO_2 wurden nichtadhärente Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen.

Die verbliebenen adhärenten Monozyten wurden in jeweils 10ml RPMI-1640-Medium aufgenommen und an den Tagen 0, 2, 4, 6 mit 20mg/ml IL-4 und 100ng/ml GM-CSF versetzt und am Tag 6 (24 Stunden vor dem Ernten) wurde zusätzlich 2µg/ml R848 zugegeben, um reife DCs zu generieren. Am Tag 7 wurden die reifen DCs geerntet. Mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) wurde die Reife und Qualität beurteilt und in die CTL-Induktion angesetzt.

Für spätere autologe Restimulation und Cr^{51}-Release-Assay erfolgte die Kryokonservierung der reifen DCs.

2.2.4 Durchflusszytometrie FACS und FACS Färbung

Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und das Sortierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle

verursacht Streulicht, das die in der Durchflusszytometrie gemessene Eigenschaft der Zelle ist. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Das Vorwärtsstreulicht gibt Information über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark von Granularität der Zellen ab. Die Zellen werden in einem Dot-Plot dargestellt, da auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen wird. Dadurch kann man die wichtige Untergruppe der weißen Blutkörperchen unterscheiden. Außerdem kann man auch durch Fluoreszenzmessung eine Vielzahl von Merkmale der Blutzellen untersuchen. Um die Reife der DC zu prüfen erfolgte folgende FACS-Färbung:

a) Mouse IgG FITC / Mouse IgG PE
b) CD 1a FITC / CD 83 PE
c) CD 14 FITC / HLA DR PE
d) CD 86 FITC / CD 80 PE

Bei reifen DCs sieht die FACS-Färbung entsprechend Abbildung 3 aus:

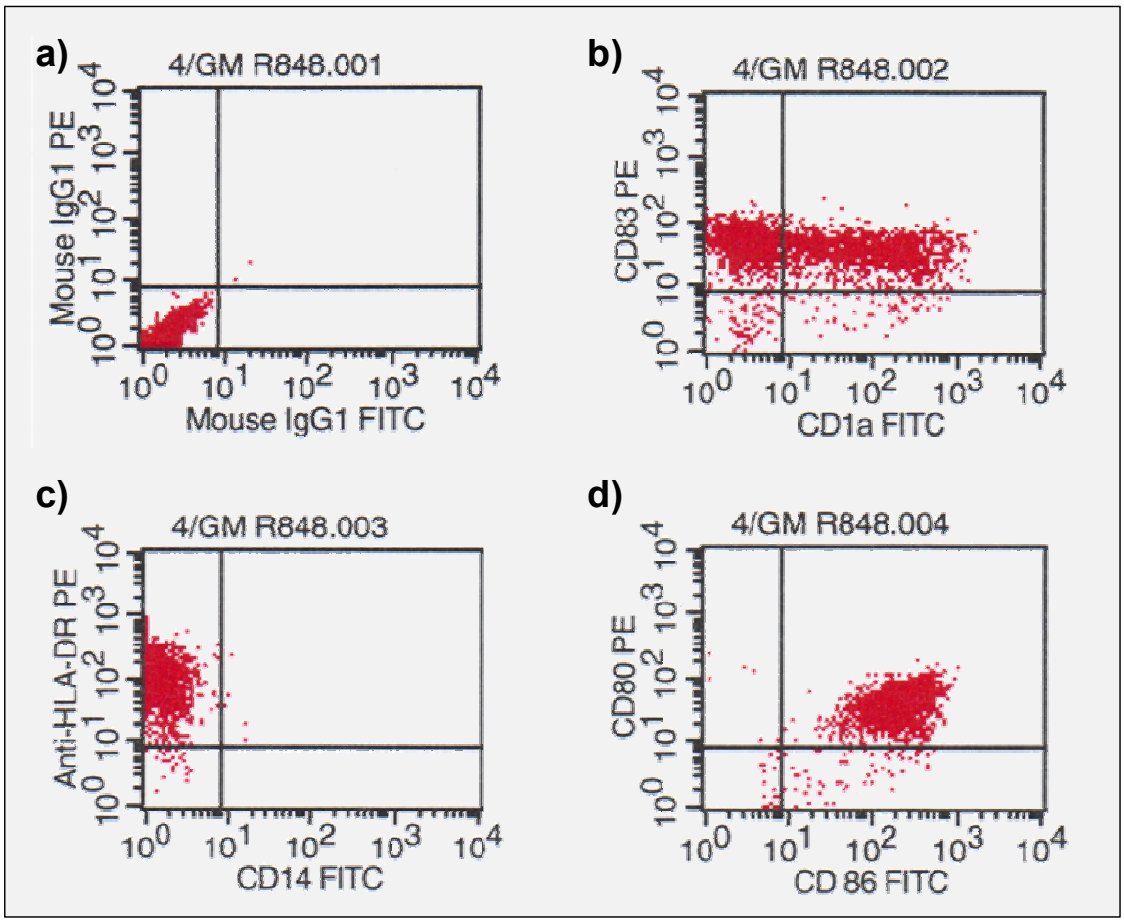


Abbildung 3: FACS Analyse

CD-Antigen	Antigen exprimierende Zellen	Funktion	Alternativ-bez.
CD1a,b,c,d	Corticale Thymocyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen (CD1c), Darmepithel, glatte Muskulatur, Blutgefäße (CD1c)	MHC-Klasse-I-ähnliches Molekül, hat möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Antigenpräsentierung	
CD3	Thymocyten, T-Zellen	Assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen	T3
CD14	Myelomonocytische Zellen	Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein	
CD19	B-Zellen	bildet Komplex mit CD21 und CD81	
CD80	Untergruppe von B-Zellen	Costimulator; Ligand von CD28 und CTLA-4	B7.1
CD83	Reife dendritische Zellen		
CD86	Monocyten, aktivierte B-Zellen, dendritische Zellen	Costimulator; Ligand von CD28 und CTLA-4	B7.2
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül	NKH-I

Tabelle 11: Übersicht der CD Antigene und Ihrer Funktion

2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung erfolgte auf Eis. Die Zellen wurde jeweils in entsprechendem Mengen (Maximal $1x10^7$) in 1ml Einfriermedium (90% RP10 Medium, 10% DMSO) suspendiert und in Kryoröhrchen pippetiert und zügig bei -80 Grad eingefroren. Aufgetaut wurden die Zellen mit 10 ml aufgewärmtem RP10 Medium, suspendiert und sofort für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden noch einmal mit dem RP10 Medium gewaschen damit das zellschädigende DMSO entfernt wurde.

2.2.6 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode zur RNA-Transfektion von Zellen.

Vor der Elektroporation wurden DC zweimal mit serumfreiem X-Vivo 20-Medium gewaschen und in einer Konzentration von $1x10^7$ DC/ml in X-Vivo 20-Medium aufgenommen. 200µ Zellsuspension wurden mit RNA (je nach Konzentration in entsprechendem Mengen) in einer 4mm Kuvette mit dem Elektroporationsgerät EPI 2500 elektropoliert. Die Berechnung der benötigen RNA-Menge (X in µg, Y in µl) waren folgende:

$$X_{RNA(m)} = \frac{2{,}5 \times Z}{10^6} \qquad Y_{RNA(Vol)} = \frac{X_{RNA(m)}}{C}$$

$X_{RNA(m)}$ = Masse der RNA in µg
$Y_{RNA(Vol)}$ = Volumen der RNA in µl
Z = Anzahl gezählter DC
C = Konzentration der RNA in $(\frac{\mu g}{\mu l})$

Die Einstellung des Geräts waren folgende:

Einstellungsparameter	Werte
Spannung	360 V
Widerstand	1540 Ω
Ladung	150µF
Impulszeit	10ms

Tabelle 12: Einstellparameter und Werte bei der Elektroporation

Nach der Elektroporation wurden die DC sofort in das bereits vorgelegte RP 10 Medium mit IL-4, GM-CSF und TNF-α aufgenommen und im Brutschrank einen Tag aufbewahrt. Diese transfizierten DCs bildeten die Basis für die Weiterbearbeitung anhand der Methoden:

- CTL-Induktion
- Restimulation
- ^{51}Chrom-Release-Assay

verwendet.

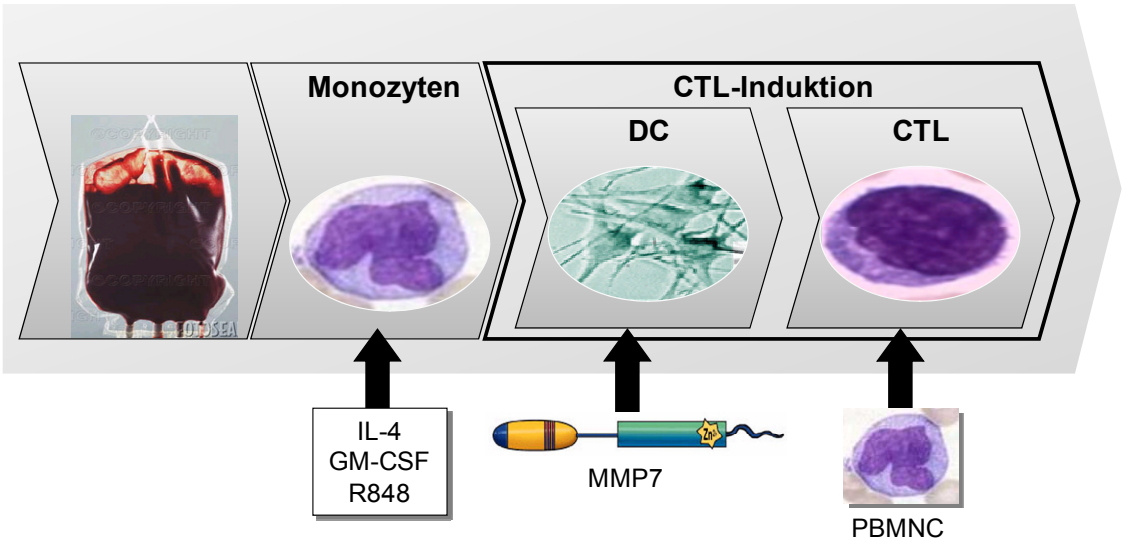
2.2.7 CTL-Induktion

2.2.7.1 CTL-Induktion mit A3-Peptide

Reife DCs wurden am Tag 7 geerntet. Nach der Zellzahlbestimmung wurden DCs in entsprechender Zahl in 1 ml Medium aufgenommen und mit 5µl MMP-7 Peptid(=50µg/ml) bei 37 Grad für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden autologe PBMNCs aufgetaut und pro Well $3x10^6$ eingesetzt. Mit Peptid beladene DCs wurden zu den vorgelegten PBMNCs in eine 24-Well-Platte gegeben und 7 Tage Ruhe im Brutschrank gelassen. Das Endvolumen pro Well in einer 24 well Platte ist 2 ml. Pro Well werden $5x10^5$ DCs eingesetzt.

2.2.7.2 CTL-Induktion mit RNA

Nach dem Ernten von DC am Tag 7 wurde die Zellzahl bestimmt, $2x10^6$ DC pro Cup in Eppendorfcups überführt und in 200µl Ex-vivo aufgenommen. Nach Zu-



gabe von MMP-7-RNA wurde das Ganze elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die DCs sofort in eine 6-Well-Platte mit vorgelegtem Medium gebracht und IL-4, GM-CSF und TNF-α zugegeben. Am Tag 8 wurden die elektroporierten DCs wieder geerntet und $5x10^5$ pro Well in eine 24-Well-Platte eingesetzt. Dazu wurden $3x10^6$ pro Well aufgetaute autologe PBMNCs gegeben. Sie wurden 7 Tage lang im Brutschrank aufbewahrt.

Abbildung 4: Vorgehensweise bei der DC Generierung und DTL Induktion; Quelle: eigene

2.2.8 Restimulation

Nach 7 Tagen erfolgte die erste Restimulation. Die durch CTL-Induktion induzierte CTLs wurden von der 24-Well-Platte abgenommen und zur Restimulation $5x10^5$ Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte eingesetzt.

2.2.8.1 Restimulation mit A3 Peptid

Autologe PBMNCs wurden aufgetaut und $2{,}5x10^6$ pro Well benötigt. Diese Menge der PBMNCs wurde in 1ml Medium aufgenommen und 5µl MMP-7 Peptid zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die mit Pep-

tid beladene PBMNCs bei 30 Gy 100% bestrahlt und auf die bereits vorgelegten CTLs der 24-Well-Platte gegeben.

2.2.8.2 Restimulation mit RNA

DCs wurden am Vortag aufgetaut und elektroporiert. Zudem wurden IL-4, GM-CSF und TNF-α gegeben. Am Tag der Restimulation wurden die bereits elektroporierte DCs geerntet und $5x10^5$ pro Well in eine 24-Well-Platte gegeben. Autologe PBMNCs wurden aufgetaut und bei 30 Gy 100% bestrahlt. Anschließend wurden $2,5x10^6$ pro Well von bestrahlten PBMNCs auf die bereits vorgelegten CTLs und DCs in eine 24-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden am Tag 1, 3 und 5 IL-2 in einer Konzentration von 2ng/ml zugegeben. Nach 7 Tage erfolgte die 2. Restimulation.

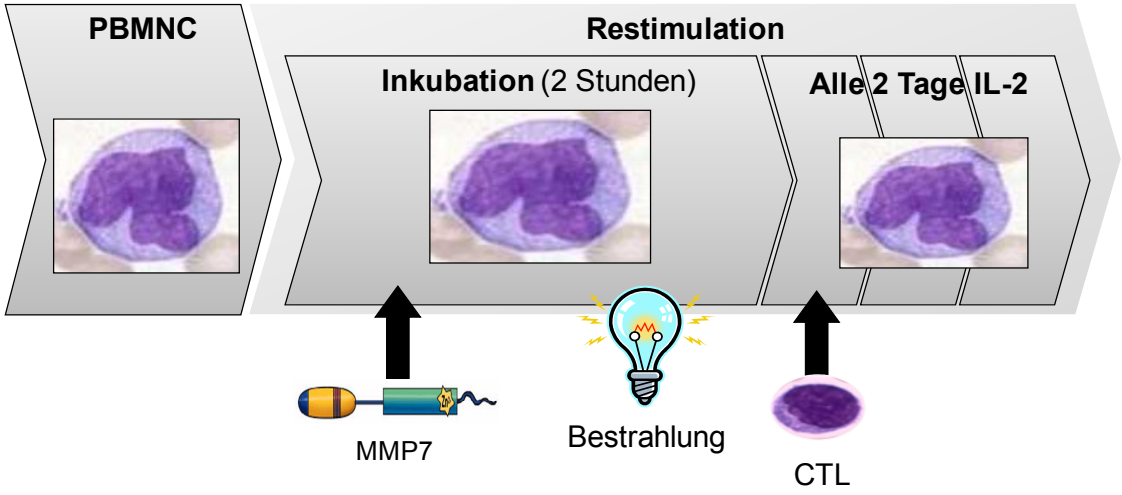


Abbildung 5: Vorgehensweise bei der Restimulation; Quelle: eigene

2.2.9 ^{51}Chrom-Release-Assay

2.2.9.1 1) Standard-^{51}Chrom-Release-Assay

Die zytotoxische Aktivität der tumorantigen-spezifisch induzierten T-Lymphozyten wurden 7 Tage nach der 2. Restimulation in einem $_{51}$Cr-Release-Assay untersucht.

Zunächst wurden Ziehlzellen (Targetzellen) mit radioaktivem Chrom[^{51}Cr] ([^{51}Cr]-Natrium-Chromat) für 1 Stunde bei 37 Grad beladen und anschließend mit 10ml Medium einmal gewaschen. In der Zwischenzeit wurden CTL aus den 24 Well Platten abgenommen und die Zell zahl bestimmt. Eingesetzt wurden pro Anfangswell 3x10^5 in 100µl Medium und die CTL wurden von Well zu Well immer 1:3 verdünnt. Die 6 Verdünnungsstufen sind: 30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1, 0,1:1. Zur Messung der spontanen Chrom-Freisetzung durch die Ziehlzellen wurden in 3 Wells nur Ziehlzellen, also statt CTL, 100µl Medium eingesetzt. Zur Messung der maximalen Chrom-Freisetzung durch die Ziehlzellen wurden in übrigen 3 Wells statt CTL, 100µl 2% Triton X-100, welches die Zellmembranen zerstört, zugegeben.

Die 1x10^4 von bereits mit Chrom[^{51}Cr] beladene Zielzellen pro Well in 100µl Medium wurden auf 96-Well-Platten verteilt und danach erfolgte Inkubation für 4 Stunden bei 37 Grad. Anschließend wurden 50µl Überstand pro Well mit Multikanalpipette abgenommen und auf Lumaplate pippetiert. Nach dem Trocknen über Nacht, wurden die Radioaktivität in einem Radioaktivitätsmessgerät (1205 Betaplate liquid scintillation counter, Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die potenzial spezifische Lyse (%) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\textit{potenziale spezifische Lyse (\%)} = \frac{100\,(F\,gem - F\,sp)}{F\,max - F\,sp}$$

F_{gem}= gemessene ^{51}Cr-Freisetzung

F_{sp}= spontane 51Cr-Freisetzung

F_{max}= maximale 51Cr-Freisetzung

2.2.9.2 Cold Target Inhibition ^{51}Chrom-Release-Assay

Um die antigenspezifische Lyse der Zielzellen nachzuweisen, wurde Cold Target Inhibition ^{51}Chrom-Release-Assay durchgeführt. Dabei wurden zu den mit ^{51}Chrom beladenen Zielzellen (Hot Targets) zusätzlich 20 fache Menge ($2x10^5$ pro Well) der mit Peptid beladenen PBMNC (Cold Targets) zugegeben. Die als Hot Targets angesetzte SKOV präsentieren das MMP-7-Peptid auf ihrer Oberfläche und werden von CTL lysiert. Durch die Kompetition der 20 fache Menge vorhandenden MMP-7 präsentierenden Cold Targets, wird die Lyse der Hot Targets inhibiert. Werden Cold Targets mit irrelevanten Peptid (z.B. RGS-5) beladen, so wird die Lyse der Hot Targets nicht inhibiert und Chrom wird freigesetzt.

2.2.9.3 3) Antikörper-Blockierung im ^{51}Chrom-Release-Assay

Um nachzuweisen, dass die CTL-induzierte Lyse durch MHC Klasse I vermittelt wird, wurde zu den Zielzellen (SKOV) ein Antikörper gegen MHC Klasse I gegeben. Zur Kontrolle wurde parallel ein Ansatz mit MHC Klasse II Antikörper durchgeführt.

2.2.10 Isolierung von B Zellen und T Zellen

B- und T-Zellen wurden von einer CLL Patientin mittels MACS Technologie (magnetic associated cell sorting) isoliert.

Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der für ein bestimmtes Oberflächenantigen (für T-Zelle CD3, für B-Zelle CD19) spezifisch ist, wird an paramagnetische Partikel gekoppelt. Diese werden mit einer heterogenen Lymphozytenpopulation vermischt und in eine Säule gegeben, die Stahlwolle enthält. Dann legt man ein magnetisches Feld an, sodass die an die Antikörper gebundenen Zellen an der Stahlwolle hängen bleiben, während nicht gebundene Zellen ausgewaschen werden. Diese bezeichnet man als negativ selektiert, da ihnen das gesuchte Molekül fehlt. Die gebundenen Zellen werden durch Abschalten des Magnetfeldes freigesetzt: man bezeichnet sie als positiv selektiert, da

das Antigen vom Antikörper erkannt wurde. Anschließend erfolgte die FACS Färbung mit folgendem Panel:

1) Mouse IgG FITC/ Mouse IgG PE
2) CD3 FITC/ CD19 PE
3) CD14 FITC/ CD 56PE

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse der MMP7

Um die Expression der MMP-7 mRNA in humanen primären Nierenzellkarzinomen, im Vergleich mit normalen renalen Gewerbe, zu beurteilen, haben wir high-density oligonucleotide microassay analysis durchgeführt. Bei der 4 von 11 Tumorproben wurde MMP-7 überexprimiert. (1)

Um den Nutzen der MMP-7 als Target-antigen für die Entwicklung der Impfungstherapie zu beurteilen, wurde RT-PCR bei humanen primären ALL Zellen durchgeführt und etablierte Tumorzelllinien. Wie im Abbildung 1, wurde MMP-7-Expression bei Caki-1, MZ1257, SKOV-3, CROFT, NT-2, A498, HL-60 Tumorlinien und Blutprobe der Patienten mit ALL gesehen.

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.

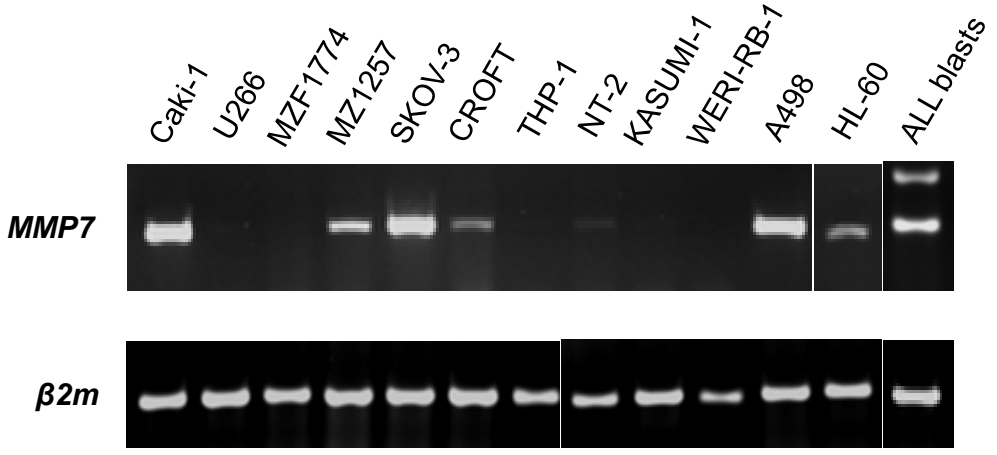


Abbildung 6: ; Expressionsanalyse der MMP-7 Quelle: Dr. Frank Grünebach, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen

3.2 Induktion der MMP-7-spezifischen CTLs mittels mit MMP-7-IVT-elektroporierten DCs.

In der ersten Serien der Experimenten, wurde die Durchführbarkeit der Induktion der MMP-7-spezifischen CTLs getestet. CTLs, die mit MMP-7-IVT elektroporiert wurden, wurden mittels DCs von Gesunden HLA-A3$^+$ Spendern induziert. Als Targetzellen wurden mit MMP-7-IVT elektroporierte DCs und mit irrelevanten EGFP-IVT elektroporierte DCs als Kontrolle verwendet. In Abbildung 2A zu erkennen, dass DCs, die mit MMP-7-IVT elektroporiert wurden, Lyseraten von bis zu 70% zeigten, während DCs, die mit irrelevantem EGFP-IVT elektroporiert wurden, von den CTL nicht lysiert wurden.

Für die weitere Bestätigung unserer Ergebnisse, haben wir MMP-7-exprimierende HLA-A3$^+$ Tumorzelllinien SKOV-3 als Targetzellen eingefügt. Es zeigte sich im Abbildung 2B, dass die CTLs erfolgreich die SKOV-3 lysiert haben. Die A498 wurde trotz MMP-7-Expression auf Grund fehlender Expression des HLA-A3$^+$ Moleküls nicht erkannt. K-562 wurde ebenfalls nicht lysiert, was darauf hinweist, dass die zytotoxische Aktivität nicht von NK-Zellen vermittelt wurde. Außerdem wurde antigen-spezifische Lyse der Targetzellen durch monokolonale Antikörper gegen HLA-Klasse-I-Moleküle blockiert, während Antikörper gegen HLA-Klasse-II-Moleküle die Lyse der Tumorzelle nicht blockierte. Es stellt da, dass die T-Zell medierte Lyse HLA-Klasse-I restringiert ist.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die DCs, die mit „pure full length“ MMP-7-IVT elektroporiert wurden, zur Präsentation der von MMP-7 abgeleiteten Peptiden bei der Oberfläche der Zellen führten und diese konnte MMP-7-spezifische CTLs induzieren, die MMP-7-exprimierenden Targetzellen auf antigen-spezifische Weise in vitro erkannte.

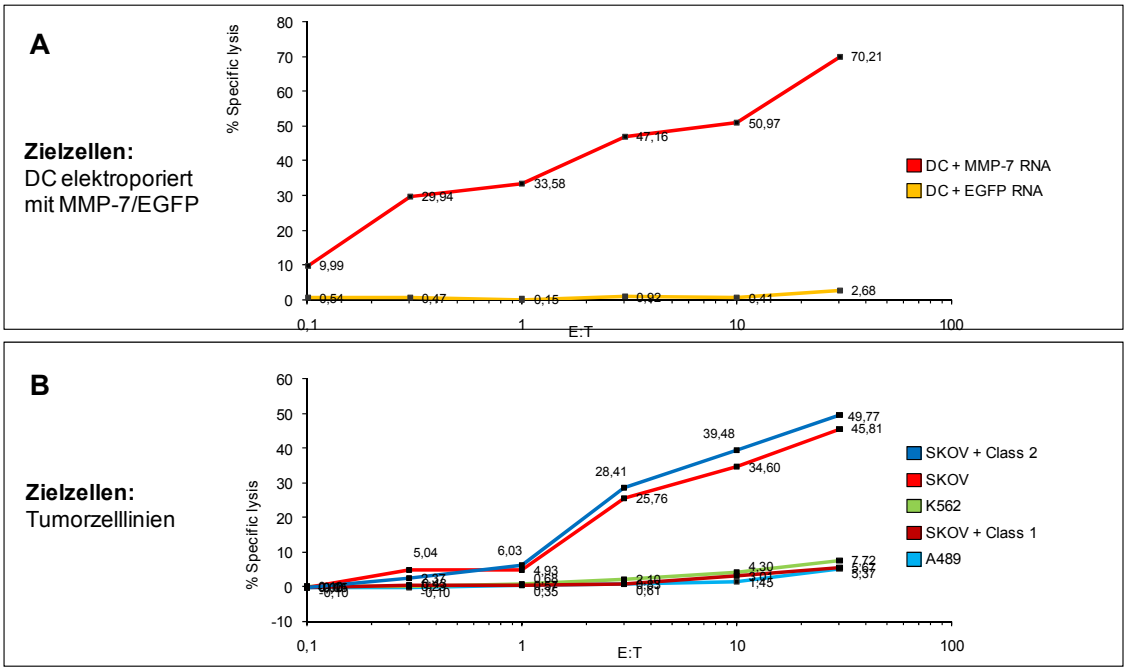


Abbildung 7: Killing Rate: elektroporierte Zielzellen MMP-7/EGFP; Quelle: eigene

3.3 Induktion der MMP-7-spezifische CTLs mittels mit Peptid beladenen DCs.

Um die immunogene Aktivität der neu identifizierten von MMP-7 abgeleiteten Peptide zu analysieren, wurden CTLs, die mit HLA-3-bindenden Peptiden beladen wurden, mittels DCs von Gesunden HLA-A3^{+} Spendern induziert. Wie aus Abbildung 3A ersichtlich ist, haben CTLs nur die autologe DCs, die mit MMP-7-A3-Peptide beladen wurden und mit MMP-7-IVT elektroporiert wurden, lysiert, während sie die autologe DCs, die mit irrelevanten RGS-5-A3-Peptide beladen wurden und mit irrelevanten EGFP-IVT-elektroporiert wurden, nicht erkannt haben.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die DCs, die mit von MMP-7 abgeleiteten Peptiden beladen wurden, auf antigen-spezifische und HLA-restringende Weise spezifische CTLs induzieren konnten, die in der Lage sind, MMP-7- exprimierende Targetzellen zu erkennen.

Mit weiteren Standard-^{51}Chromium-Release-Assays wurden MMP-7- und HLA-A3-exprimierende Tumorzellen SKOV-3 als Targetzelle angesetzt. In Abbildung

3B zu erkennen, haben CTLs erfolgreich die MMP-7- und HLA-A3-exprimierende Tumorzellen SKOV-3 lysiert. Die A498 wurde trotz MMP-7-Expression auf Grund fehlender Expression des HLA-A3^{+} Moleküls nicht erkannt. K-562 wurde ebenfalls nicht lysiert, was darauf hinweist, dass die zytotoxische Aktivität nicht von NK-Zellen vermittelt wurde.

Für die weitere Bestätigung der Antigenspezifität, haben wir Cold Target Inhibition ^{51}Chromium-Release-Assays durchgeführt. In Abbildung 3C zeigt sich, dass die Lyse der mit ^{51}Chromium markierten MMP-7-exprimierende Targetzellen -Hot Targets- durch die Kompetition mit den 20-fach höher konzentrierten mit MMP-7-Peptide-beladenen und nicht mit ^{51}Chromium markierten PBMCs –Cold Target- blockiert wurde. Im Gegensatz wurde die Lyse der Hot Targets nicht durch mit den 20-fach höher konzentrierten mit RGS-5-Peptide-beladenen und nicht mit ^{51}Chromium markierten PBMCs –Cold Target- blockiert.

Außerdem wurde antigen-spezifische Lyse der Targetzellen durch monokolonale Antikörper gegen HLA-Klasse-I-Moleküle blockiert, während Antikörper gegen HLA-Klasse-II-Moleküle die Lyse der SKOV-3 nicht blockiert haben. Es zeigt sich, dass die T-Zell medierte Lyse HLA-Klasse-I restringiert ist.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass DCs, die mit von MMP-7 abgeleiteten Peptiden beladen wurden, die MMP-7-spezifische HLA-A3-restringende CTLs induzieren konnten, die auf antigenspezifische und HLA-restringende Weise in vitro MMP-7-exprimierende Tumorzellen erkennen.

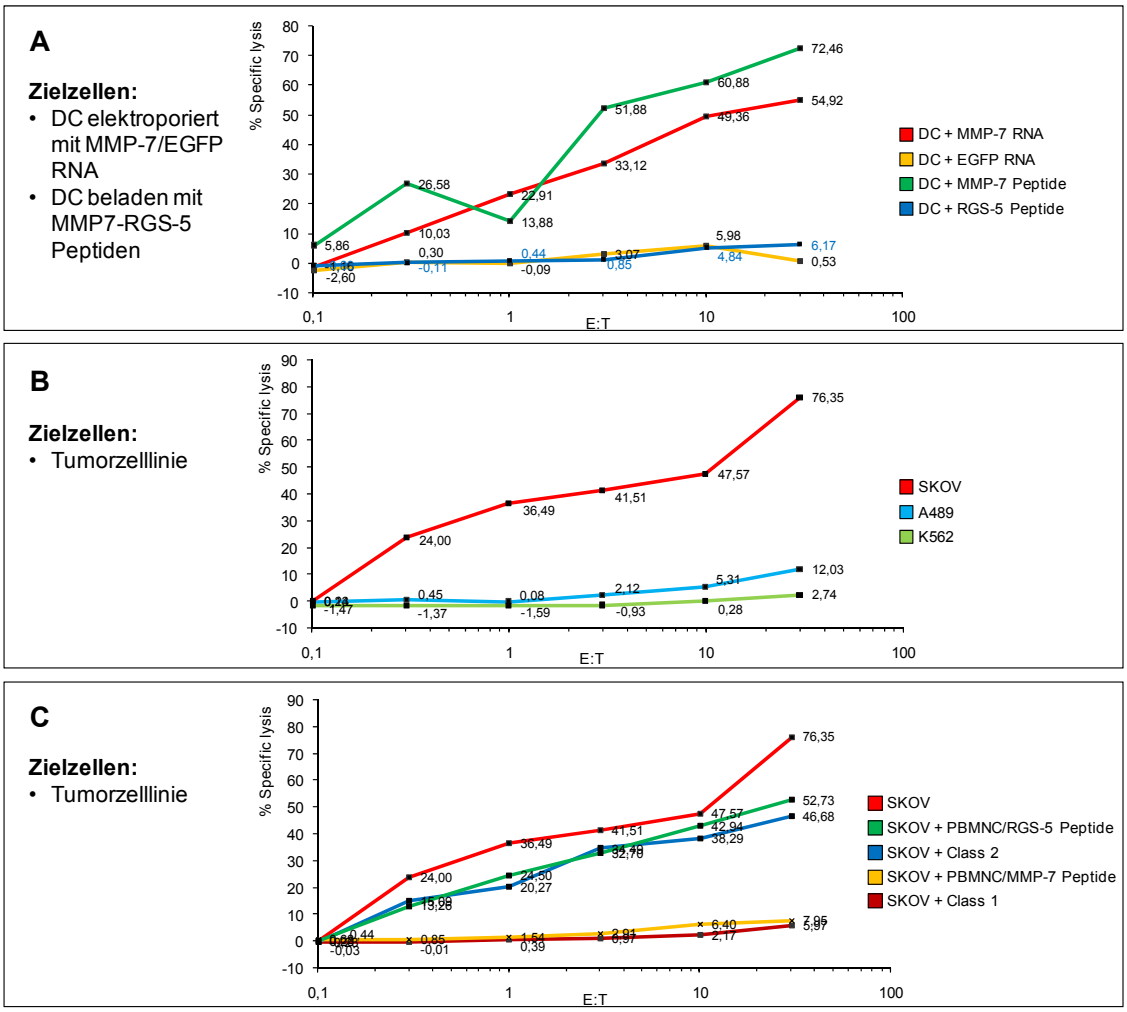


Abbildung 8: Killing Rate: CTL beladen mit MMP-7 Peptiden; Quelle: eigene

3.4 Induktion der MMP-7-spezifische CTLs mittels mit MMP-7-IVT elektroporierten DCs; Targetzellen wurden mit MMP-7-Peptiden beladen

In der nächsten Experimenten wollten wir prüfen, ob MMP-7-spezifische CTLs, die mittels mit MMP-7-IVT elektroporierten DCs induziert wurden, in der Lage sind, die Targetzellen zu erkennen, die mit MMP-7-Peptiden beladen wurden.

Wie in Abbildung 4 demonstriert, haben die CTLs die mit MMP-7-A3-Peptid beladenen DCs erfolgreich lysiert, während sie die mit irrelevanten RGS-5-A3-Peptid beladenen DCs nicht erkannt haben. Zusätzlich haben die CTLs die mit MMP-7-IVT elektroporierten DCs lysiert, während sie die mit irrelevanten EGFP-IVT elektroporierten DCs nicht lysiert haben.

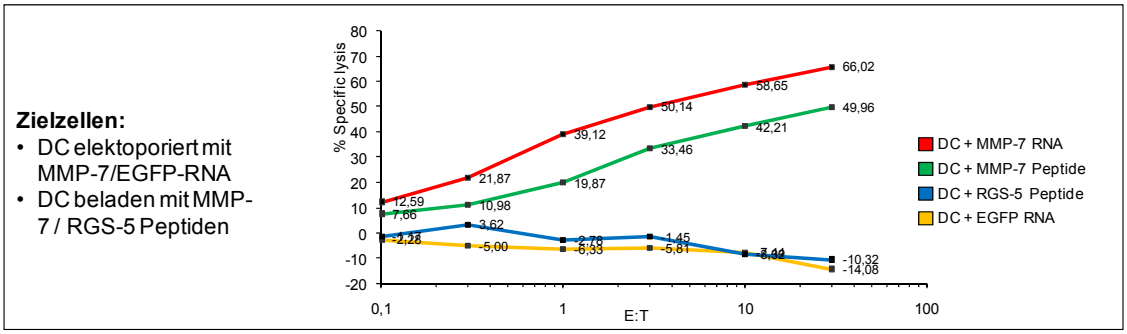


Abbildung 9: Killing Rate: DC elektroporiert mit MMP-7; Quelle: eigene

3.5 Induktion der CTLs mittels DCs einer Patientin mit ALL

In der letzten Reihe der Experimente haben wir analysiert, ob die vorherigen Ergebnisse auch mit ALL-Blasten applizierbar sind. Dafür haben wir DCs aus einer HLA-$A2^+$ /-$A3^+$ ALL Patientin in einer komplette Remission nach der Chemotherapie generiert und diese als antigenpresentierende Zelle für die CTL Induktion verwendet. DCs wurden mit MMP-7-IVT elektroporiert. Als Targetzelle wurden autologe DCs, die mit MMP-7-Peptide beladen wurden oder mit MMP-7-IVT elektroporiert wurden, eingesetzt. Wie Abbildung 5A zeigt, diese Zellen wurden effizient lysiert, während Zellen, die mit irrelevantem RGS-5-Peptid beladen oder mit EGFP-IVT elektroporiert wurden, wurden nicht lysiert wurden. Zusätzlich haben wir autologe ALL-Blasten von der Patientin, die zum Zeitpunkt

der Diagnose weggefroren wurden, als Targetzellen verwendet. Die Lyserate der autologe ALL-Blasten erreichte bis zu 70 %. Sehr bedeutend ist, dass die normale autologe gereinigte $CD3^+$ T und CD19 B^+Zelle von den CTLs nicht erkannt wurden.

Diese Ergebnisse zeigten sich, dass DCs, die aus einer ALL-Patientin in einer kompletten Remission generiert und mit MMP-7-IVT elektroporiert wurden, spezifische CTLs auf antigen-spezifische Weise *in vitro* induzieren konnten, die autologe MMP-7-exprimierenden ALL-Blasten erkennen.

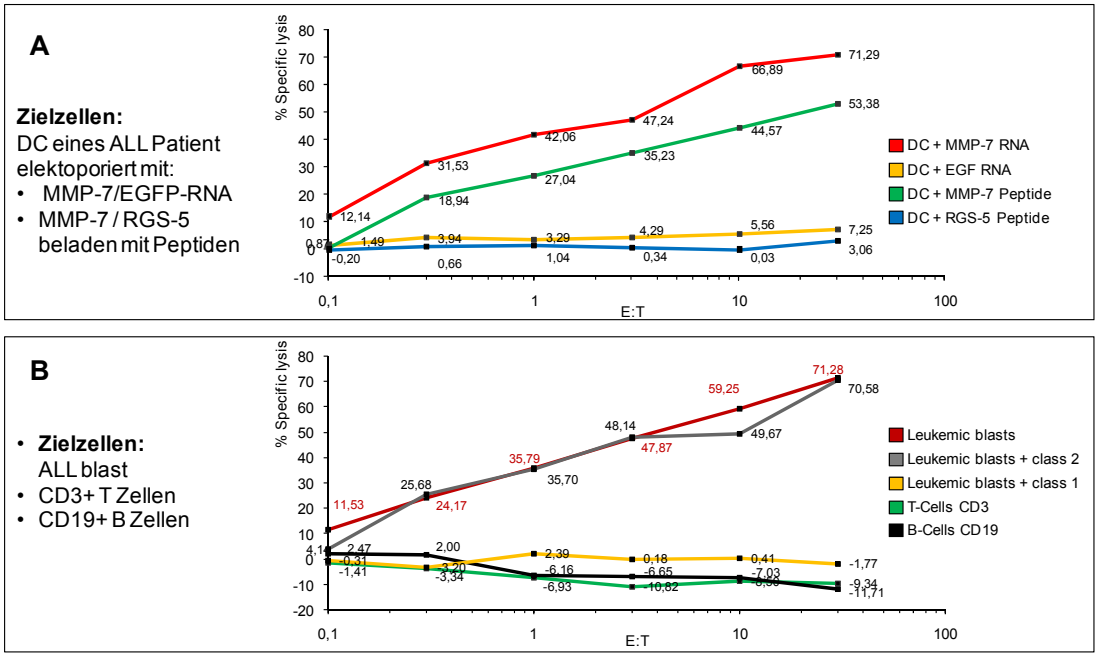


Abbildung 10: Killing rate: CTL eines ALL Patienten elektroporiert mit MMP7 RNA; Quelle: eigene

4 Diskussion

In den Industrieländern ist Krebs, folgend der Herz-Kreislauferkrankungen, die zweit häufigste Todesursache. In Deutschland erkranken jedes Jahr rund 420.000 Menschen an Krebs. Die Gesamtzahl der Todefälle betrug 209.000 im Jahr 2002. Die Anzahl ist zwar zurückgegangen, dennoch ist die Tendenz der Krebsneuerkrankungen steigend.

Die traditionelle Krebsbehandlung besteht aus 3 Hauptsäulen: Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Trotz des großen Fortschrittes in diesen Bereichen sowie der Verbesserungen der Maßnahmen zur Tumorfrüherkennung, hat man in den letzten Jahren leider keinen Erfolg bezüglich der Verlängerungen der Lebenserwartung der tumorerkrankten Patienten im fortgeschrittenen Stadium gesehen. Man brauchte für diese Patienten dringend eine neue Therapieoption als Alternativ oder Ergänzung. Immunotherapie, die eine Immunantwort gegen fortschreitenden Krebs induziert, ist einer der neuen Zugänge zur hoffnungsvollen Heilungschance und zur Erhöhung der Lebenserwartung. Dies basiert auf der Idee, die Fähigkeit des Immunsystems, fremde Substanzen und fehlerhaftes Gewebe zu erkennen, zu verstärken.

Dieses Konzept gibt es zwar schon lange, jedoch ist der Entwicklungsstand der immuntherapeutischen Behandlung des Krebses weit davon entfernt das komplexe Immunsystem komplett zu verstehen. Im Bereich der Tumorimmunologie und Molekularbiologie fand durch ein besseres Verständnis immunologischer Mechanismen unter der Tumorexistenz in den letzten Jahren ein erheblicher Fortschritt statt. Der Einsatz von Immunmodulatoren z.B. Interferon-alfa und Interleukin-2 ist mittlerweile etabliert. Unter der Behandlung mit Interferon-alfa erreichen ca.80 % der CML-Patienten eine Remission mit Blutbildnormalisierung. Bei etwa 20 % der Patienten mit Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen wurden unter der Therapie mit Interferon-alfa und/oder Interleukin-2 Tumorrückbildungen beobachtet. Zusätzlich zu dieser unspezifischen Immuntherapie, werden im klinischen Bereich immer mehr rekombinante monoklonale Antikörper als eine selektive Therapie in der Praxis eingesetzt. Sie sind teilweise für die Behandlung bestimmter Leukämiearten und solider Tumoren, bereits

zugelassen. Beispiele hierfür sind die Rituximab (Mab Thera®) für die B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, Trastuzumab (Herceptin®) für das HER-2-positiven Mamakarzinom, Cetuximab (Erbitux®) für das Dickdarmkarzinom, Alemtuzumab (MabCampath®) für die chronisch-lymphatischen Leukämie und Gemtuzumab (Ozogamicin®) für die akuten myeloischen Leukämie.(55) Zudem leisteten die Identifizierung und Charakterisierung vieler neuer humaner Tumorantigene sowie das Verständnis für die Rolle der dendritischen Zellen und CTLs bei der Antigenaufnahme, –präsentation und der Antigenerkennung einen wesentlichen Beitrag.

Eine der bedeutendsten Herausforderungen in der Immunotherapie ist das Hervorrufen der tumorantigen spezifischen T-Zellen-Immunantwort durch dendritische Zellen (DC – Dentric Cells). Dendritische Zellen sind professionelle, leistungsfähige antigen-präsentierende Zellen. Immunisierung mittels Tumorantigen beladener DCs ist eine schlagkräftige Methode für die Stimulierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen-Antwort und für die Induktion der Antitumorimmunität.

In dieser Arbeit analysierten wir mittels Antigen beladener (TSA, TAA) dendritischer Zellen die Spezifität und Effektivität der in vitro generierten CTLs. Verwendet wurden MMP-7 Antigenpeptide, die zur MMP Familie gehören. Sie degradieren Makromoleküle der ECM (extra cellular matrix). Die Degradation der Bindegewebe umfasst viele physiologische Prozesse wie z.B. Embryogenese, Knochenumsatz, Gewebewiederherstellung, Angiogenese sowie pathologische Prozesse wie z.B. Arthritis, Dekubitus und Tumorinvasion. Angiogenese ist ein entscheidender Schritt der Tumorentstehung, Ausweitung und Invasion in umliegende Gewebe. Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene MMPs in vaskulärem Endothel in der Nähe von Tumorzellen exprimiert werden. Dies weist auf die Beteiligung der MMPs in Prozessen der Angiogenese hin. Es werden dabei Durchgänge in der ECM gebildet durch die, die neugenerierten Kapillargefäße eindringen und sich ausbreiten können. Außerdem wird MMP-7 in vielen verschiedenen Tumoren überexprimiert und korreliert mit der Invasivität. Das macht dieses Antigen zu einem interessanten Kandidaten für immuntherapeutische Ansätze und wurde daher in dieser Arbeit zur Induktion der antigen-spezifischen CTLs verwendet.

Um MMP-7-spezifische CTLs zu generieren, verwendeten wir zuerst PBMCs von HLA-3+ gesunden Spendern. Zur Induktion der T-Zell-Antwort wandten wir zwei Methoden an: 1. Beladen der DCs mit MMP7-Peptiden, 2. Elektropolieren der DCs mit MMP-7-mRNA. Als Zielzellen setzten wir DCs und Tumorzellen, die MMP-7 endogen exprimieren, ein. Die DCs wurden zuvor entweder mit MMP-7-Peptiden beladen oder mit MMP-7-mRNA elektropoliert. Diese wurden erfolgreich von den in vitro generierten CTLs in einer antigen-spezifische und HLA-restringierenden Weise lysiert.

Die Spezifität der lytischen Aktivität wurde durch monoklonale Antikörper gegen HLA-Moleküle oder durch Cold Target Inhibition Assays bestätigt. Abschließend untersuchten wir diesen experimentellen Ansatz bei einer Patientin mit ALL. Die CTLs wurden von PBMCs der Patientin in kompletter Remission mittels autologer DCs, die mit MMP-7IVT elektroporiert wurden, induziert. Als Zielzellen setzten wir die autologen ALL-Blasten, die zum Zeitpunkt der Diagnose eingefroren wurden, ein. Die induzierten CTLs lysierten effizient die autologen ALL-Blasten, während sie die normalen B-Zellen und T-Zellen der Patientin nicht lysierten.

4.1 Probleme und Grenzen dieser Arbeit

Da alle Experimente ausschließlich in vitro durchgeführt wurden, können die Ergebnisse aufgrund des komplexen Immunsystems nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. In dieser Arbeit wurde auf die Rolle der CD4+T-Helfer-Zellen in der Initiierung, dem Hervorrufen und der Aufrechterhaltung der Antitumorimmunität keine Rücksicht genommen.

Ein potentielles Risiko beim Einsatz in der Vakzinierungstherapie ist die Autoimmunreaktion. MMP-7 ist bei vielen physiologischen Prozessen wie z.B. Embryogenese, Knochenumsatz, Gewebewiederherstellung und Angiogenese involviert. Daher kann der Einsatz des Antigens eine Immunantwort gegen gesundes, eigenes Gewebe des Patienten hervorrufen. Bei der Therapie ist dies zu beachten.

4.2 Vakzinierungsstudien-Melanom

Aufgrund von zahlreich charakterisierten tumorassoziierten Antigenen wie z.B. gp100, MART-1, Tyrosinase, MAGE-1, MAGE-3, ist das Melanom eines der am meisten erforschten Tumoren im Bereich der DC-Vakzinierungstherapie. Nestle et al führten eine Vakzinierung von 16 Melanom Patienten mittels DCs durch, die mit Melanompeptiden oder Tumorlysate beladen wurden.(). Aus PBMCs generierte DCs wurden mit gp100, MART-1, Tyrosinase, MAGE-1 oder MAGE-3 beladen und direkt in die Lymphknoten injiziert. Die Vakzinierungstoleranz war gut, 5 der 16 Patienten zeigten ein klinisches Ansprechen, darunter 2 komplette Remissionen über 15 Monate.

Die klinische Melanomstudie inklusiv dieser von Nestle weisen darauf hin, dass die DC-Vakzinierung beim Menschen ohne relevanten Nebenwirkungen angewandt und antigen-spezifische T-Zell Antworten in vivo induzieren werden kann.

4.3 Kann diese Immuntherapie andere Therapieoptionen ersetzen?

Schadendorf und Mitarbeiter verglichen die DC-Vakzinierung mit der DTIC(Dacarbazine)-Chemotherapie. Dies wurde in der klinischen Studie Phase III mit Melanompatienten im Stadium IV durchgeführt. Derzeit wird DTIC trotz ihres Mangels an Beweisen zur Erhöhung der Überlebensrate als eine Standard-First-Line Therapie anerkannt. 55 Patienten erhielten DTIC und 53 Patienten DC-Vakzinierung. DCs wurden mit verschiedenen MHC-Klasse-I und –II-restringierten Antigenen beladen und anschließend alle 2 Wochen subkutan injiziert. Das Ansprechen wurde durch CT und/oder MRT im Abstand von 12 Wochen bewertet. Es konnte nicht demonstriert werden, dass die DC-Vakzinierung effektiver als die DTIC-Chemotherapie ist. Insgesamt war das Ansprechen in beiden Gruppen niedrig (DTIC 5,5%, DC-Vakzinierung 3,8%). Aufgrund dieser sehr niedrige Gesamt-Ansprechbarkeitsrate der beiden Arme, wurde die Studie auf Empfehlung des „Data Safety & Monitoring Bord“ frühzeitig beendet.

Bis zum heutigen Tag liegen nur wenige erfolgreiche Ergebnisse klinischer Studien, die über eine komplette Eliminierung der vorbestehenden Tumore oder Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten berichten, vor. Daraus resultiert, dass die DC-Vakzinierung nach dem heutigem Stand noch nicht konventionelle Therapiemöglichkeiten wie z.B. Chemotherapie und Bestrahlung ersetzen kann.

4.4 Verbesserung der Vakzinierung

Die folgenden Punkte sind die entscheidenden Faktoren, die die Wirksamkeit von DC-Vakzinierung beeinflussen können.

4.4.1 Quelle der DCs

Da DCs in peripherem Blut nur 0,2% der Leukozyten ausmachen, wurden verschiedene Methoden für die Generierung der DCs aus Vorläuferzellen, Monozyten oder CD34+ Vorläuferzellen, untersucht. Die Gewinnung der Blut DCs nach Leukapherese ist zwar möglich, jedoch ist die Wiederholung der Leukapherese aufgrund der geringen Anzahl nötig. Die Methode der Generierung von DCs aus Monozyten durch Zusatz von GM-CSF und IL-4 wird daher am häufigsten in klinischen Studien angewendet. （Sallusto F., 1994） （Romani N., 1994） （Hsu F.J., 1996）

4.4.2 Antigenbeladung

Viele klinische Studien verwenden, mit autologen Tumorlysaten oder MHC-Klasse-I-Peptiden beladene, DCs. Tumorlysate haben den Vorteil, dass sie ohne Antigene zu identifizieren einsetzbar sind. Nachteilig hingegen ist der hohe Bedarf an Tumorgewebe bei der Herstellung. Die kurze Halbwertszeit der MHC-Peptid-Komplexe und die begrenzte Möglichkeit der Verwendung von Antigenen sind die Nachteile der MHC-Klasse-I-Peptide. （Butterfield L.H., 2003）

4.4.3 Die Reife der DCs

Die Reife der DCs spielt eine entscheidende Rolle für die Induktion der immunologischen Reaktion bei Tumorpatienten. Die reifen DCs exprimieren mehr HLA-Moleküle und besitzen co-stimulierende Moleküle und eine erhöhte Migrationskapazität. In klinischen Studien mit Melanompatienten wurden DCs mit Peptiden wie z.B. Tyrosinase, Melan A/MART-1, MAGE-1 oder Recall- Antigen beladen. Diese konnten die antigenspezifische Immunantwort bei 7 von 8 Patienten induzieren, während unreife DCs nur bei 3 von 8 Patienten eine entsprechende Antwort hervorriefen. Die Expansion der Peptid-spezifischen IFN-γ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen wurde bei 5 von 7 Patienten mit der Vakzinierung der reifen DCs beobachtet. Im Vergleich hierzu konnte durch die Vakzinierung unreifer DCs nur bei 1 von 7 Patienten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Diese Studien zeigten, dass der Einsatz der reifen DCs mit besseren klinischen Ergebnissen korreliert. （Jonuleit H., 2001） （De Vries I. J.，2003）

4.4.4 Die Route der Verabreichung

Die Migration der antigen-beladenen DCs in periphere Lymphorgane ist für die effektive Induktion der antigen-spezifischen CTL unerlässlich. Bedrosian und Mitarbeiter führten eine DC-Vakzinierungsstudie mit verschiedenen Routen -1. intravenös, 2. Intranodal, 3.intradermal - der DC-Verabreichung, bei metastasierten Melanompatienten durch. Dabei zeigte sich, dass die intranodale Injektion eine höhere Sensibilisierung der $CD8^+$ T-Zellen in 3 Evaluierungsuntersuchungen – 1. tetramer staining, 2. in vitro peptide recognition assays, 3.delayed-type hypersensitivity responses - verglichen mit anderen Routen hat. Diese Studie weist darauf hin, dass die intranodale Verabreichung die bevorzugte Route für die DC-Vakzinierung sein könnte. （Bedrosian I.，2003）

4.4.5 Ausbreitung der Antigene („Antigen spreading“)

Bei der Vakzinierung mit einem bestimmten Epitop erfolgt, nach der Lyse der Tumorzellen, eine Freisetzung anderer Tumorantigene. Sie werden von DCs

aufgenommen und den T-Zellen präsentiert. Dies führt zur T-Zell-Immunantwort gegen Antigene, die nicht bei der Vakzinierung eingesetzt wurden. Butterfield und Mitarbeiter beschrieben bei einem Melanompatienten, dass durch die Beladung mit einem einzigen Antigen eine T-Zell-Reaktivität gegen andere Antigene ausgelöst wurde. Sie zeigten, dass die Antigenausbreitung in relevantem Zusammenhang zum erfolgreichen Ansprechen steht. （Butterfield L.H.，2003）

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden für die Generierung der dendritischen Zellen, Beladung des Tumorantigens auf DCs und Applikationen für Patienten erforscht und entwickelt. Wichtig ist jedoch nicht nur die Quantität der aktivierten T-Zellen, sondern auch die Qualität, das heißt, wie lange die aktivierte T-Zellen bestehen. Gilboa beschrieb, dass die labile aber langlebige Immunantwort bei Krebserkrankungen sehr wichtig ist.

Dannull und Mitarbeiter entwickelten mehrere Methoden, um die Wirksamkeit der Vakzinierungstherapie zu verbessern. Eine davon ist, DCs mit mRNA die den Liganden für mit stimulierende Moleküle wie z.B. OX40, 4-1BB oder CD40 kodieren, zu transfizieren. Dannull und Mitarbeiter demonstrierten eine relevante Verstärkung der antigen-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zell-Immunantwort in vitro durch DCs, die mit OX40mRNA transfiziert wurden. Darüber hinaus zeigten sie bei der Vakzinierung der Tumor-tragenden Mäuse mittels DCs, die mit OX40mRNA transfiziert wurden, eine Verstärkung der Antitumorimmunaktivität. （Dannull，2005） Eine solche Transfektion von Zellen mit mRNA, die Zytokine oder co-stimulierende Faktoren kodieren, könnte in Zukunft eine ergänzende Strategie für die klinische Applikation sein.

Tumorzellen besitzen eine genetische Instabilität und können daher dem Immunsystem des Wirts entkommen. Eine Strategie dabei ist, auf die Bindegewebszellen als universale Antigene zu zielen. Die Vakzinierung von Mäusen mittels mRNA transfizierter DCs, die für die Angiogenese assoziierten Produkte wie z.B. VEGF kodiert wurden, blockierte das Tumorwachstum. （Nair，2003）

Nair und Mitarbeiter zeigten außerdem einen synergistischen Effekt gegen Tumorzellen durch Kombination der anti-angiogenetischen Therapie und der Tumorimmunotherapie. Der VEGF-Antagonist, Bevacizumab, ist seit 2005 auf dem Markt und ist für metastasierte Kolorektale Karzinome zugelassen. （www.avastin.de/） Die Therapie mit Bevacizumab in Kombination mit Irinotecan, 5-FU und Leucovorin zeigte eine verlängerte Überlebenszeit von 5 Monaten verglichen mit der alleinigen Standardtherapie. （www.journalonko.de/newsview.php?id=740，2004）

Zusammengenommen, ist die Vakzinierung mit MMP-7 als Zielmolekül eine hoffnungsvolle neue therapeutische Strategie bei der Tumorbekämpfung, da sie sowohl anti-angiogenetisch als auch anti-tumorinvasiv wirken könnte.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit wecken trotz der ungelösten Probleme für die Tumortherapie große Hoffnungen. Dieses neu identifizierte und charakterisierte Peptid – MMP-7 – hat ein großes Potenzial, da MMP-7 bei der Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt. Die Herausforderungen liegen dabei in der Optimierung und im Fortschritt der Verabreichungsroute, der Reifung der DCs, der Antigenbeladung und der Dosierung. Die DC-Vakzinierung in Kombination mit der Transfektion von mit stimulierenden Molekülen könnte die Persistenz bereits induzierter Antigen-spezifischen Immunantwort verlängern. Dann könnte in der Vakzinierung ein relevanter Vorteil gegenüber konventionellen Tumortherapien als nebenwirkungsarme und zielgerichtete Strategie verschiedener maligner Tumore liegen.

Momentan ist es noch zu früh, die konventionelle Tumortherapie durch die DC-Vakzinierung komplett zu ersetzen. Dennoch könnte sie dazu beitragen, die Prognose der Tumorpatienten zu verbessern und Therapieoptionen zu erweitern.

5 Zusammenfassung

DCs sind antigenpräsentierende Zellen, die bei der Induktion einer antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen. Bei vielen klinischen Vakzinierungsstudien maligner Tumore wurden diese wirkungsvollen Zellen zur Induktion der Immunoantwort gegen Krebs verwendet.

Als Antigen zur Beladung der DCs wurde in dieser Studie das Peptid MMP-7 verwendet. Es ist das kleinste Mitglied der MMP-Familie das die Makromoleküle der extrazellulären Matrix degradiert. Aufgrund ihrer Überexprimierung auf verschiedene humane Tumore und der Korrelation mit Metastasierung und Angiogenese, ist es ein interessanter Kandidat als Antigen für eine breit anwendbare Vakzinierungstherapie gegen Metastasierung mit Antiangiogenese.

Um die Effektivität und Antigenspezifität der DC-Vakzinierung zu analysieren, induzierten wir, mit Hilfe von autologen DC und MMP-7, antigen-spezifische CTL in vitro. Die CTL lysierten im ^{51}Chrom Release Assay die Zielzellen, die MMP-7 exprimierten auf antigenspezifische und HLA-restringierte Weise. Dies konnte bei der Cold Target Inhibition und der Blockierung durch Antikörper gegen HLA-Klasse-I demonstriert werden.

Diese antigen-spezifische CTL Induktion in vitro wurde auch mit Tumorzellen einer Patientin mit ALL durchgeführt, um den Einsatz von MMP-7 in der möglichen DC-Vakzinierungstherapie zu bewerten. Die CTLs wurden von PBMCs von einer Patientin mit ALL in kompletter Remission mittels autologer DCs, die mit MMP-7IVT elektroporiert wurden, induziert. Dazu wurden die autologen ALL-Blasten, die zum Zeitpunkt der Diagnose eingefroren wurden, als Zielzellen verwendet. Die in vitro induzierten CTL lysierten primäre autologe Blasten, während die normalen B- und T-Zellen nicht lysiert wurden. Sie stellen damit einen Beitrag für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien zur Behandlung maligner Erkrankungen dar.

6 Abbildung und Tabellen

6.1 Abbildungen

Abbildung 1: Lebenszyklus der DCs; Quelle: vgl. C.A. Janeway et.al, Immunologie, 5.Aufl..... 7
Abbildung 2: Matrix Metalloproteinase; Quelle: http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/proteases_inhibitors_matrix_metalloproteinase.htm..... 13
Abbildung 3: FACS Analyse 25
Abbildung 4: Vorgehensweise bei der DC Generierung und DTL Induktion; Quelle: eigene 29
Abbildung 5: Vorgehensweise bei der Restimulation; Quelle: eigene 30
Abbildung 6: ; Expressionsanalyse der MMP-7 Quelle: Dr. Frank Grünebach, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen..... 34
Abbildung 7: Killing Rate: elektroporierte Zielzellen MMP-7/EGFP; Quelle: eigene 36
Abbildung 8: Killing Rate: CTL beladen mit MMP-7 Peptiden; Quelle: eigene.. 38
Abbildung 9: Killing Rate: DC elektroporiert mit MMP-7; Quelle: eigene 39
Abbildung 10: Killing rate: CTL eines ALL Patienten elektroporiert mit MMP7 RNA; Quelle: eigene..... 40

6.2 Tabellen

Tabelle 1: Vergleich Reife und Unreife Dentritische Zellen 9
Tabelle 2: Potenzielle Tumorantigene für Vakzinierungstherapie..... 12
Tabelle 3: Verwendete Geräte..... 17
Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien..... 19
Tabelle 5: Verwendete Medien und Püffer (Eigenherstellung) 19
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien 20
Tabelle 7: Verwendete Antikörper 20
Tabelle 8: Verwendete Peptide und RNA..... 21
Tabelle 9: Verwendete Kits..... 21
Tabelle 10: Verwendete Tumorzelllinien..... 22
Tabelle 12: Übersicht der CD Antigene und Ihrer Funktion 26
Tabelle 13: Einstellparameter und Werte bei der Elektroporation 28

7 Literaturverzeichnis

Andersen M.H.PedersenL., Capeller B., Brocker E.B., Becker J.C., thor Straten P. 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.*2001, 61, S.5964-5968.

Bedrosian I.MickR., Xu S., Nisenbaum H., Faries M., Zhang P., Cohen P.A., Koski G., Czerniecki B.J. Intranodal administration of peptide pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+T-cell function in mel. *J Clin Oncol .* 2003, 21, S.3826-3835.

BedrosianI. Intranodal administration of peptide pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol .* 2003, 21, S.3826-3835.

Boon T.CerottiniJ.C., Eynde B. van der, Bruggen P. van der, Pel, A. van Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*1994, 12, S.337-365.

BoonTet al. Tumor antigens recognized by lymphocytes. *Annual Review Immunology.* 1994, 12, S.337-365.

Brossart P.HeinrichK.S., Stuhler G., Behnke L., Reichardt V.L., Stevanovic S., Muhm A., Rammensee H.G., Kanz L., Brugger W. Identification of HLA-A2-rescricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood .* 1999, 93, S.4309-4317.

Brossart P.SchneiderA., Dill P., Schammann T., Grunebach F., Wirths S., Kanz L., Buhring H.J., Brugger W. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res. .* 2001, 61, S.6846-6850.

Butterfield L.H.RibasA., Dissette V.B., Amarnani S.N., Vu H.T., Oseguera D., Wang H.J., Elashoff R.M., McBride W.H., Mukherji B., Cochran A.J.,

Glaspy J.A., Economou J.S. Determinant spreadingassociated with clinical res. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, S.998-1008.

ButterfieldL.H. Determinant spreadingassociated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res .* 2003, 9, S.998-1008.

Cerundolo V.HermansI.F., Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol.* 2004, 5, S.7-10.

Chiodoni C.PagliaP., Stoppacciaro A., Rodolfo M., Parenza M., Colombo M.P. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocytes/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. .* 1999, 190, S.125-134.

Crawford H.C.ScogginsC.R., Washington M.K., Matrisian L.M., Leach S.D. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest .* 2002, 109, S.1437-1444.

DannullJ.,Nair S., Su Z., Boczkowski D., DeBeck C., Yang B., Gilboa E.,Vieweg J. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood.* 2005, 105, S.3206-3213.

De Vries I. J.LesterhuisW.J., Scharenborg N.M., Engelen L.P., Ruiter D.J., Gerritsen M.J., Croockewit S., Britten C.M., Torensma R., Adema G.J., Figdor C.G., Punt C.J. Maturation of dendritic cells is a prerequisit. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, S.5091-5100.

embiosiences
http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/proteases_inhibitors_matrix_metalloproteinase.htm. 2006.

Eynde B.J. van denBoonT. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* . 1997, 27, S.81-86.

F.Sallusto

Fenton R. G.LongoD. L. Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cyto-toxic T lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* . 1997, 89, S.272-275.

Figdor C.G.deVries I.J., Lesterhuis W.J., Melief C.J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004, 10, S.475-80.

Fisk B.BlevinsT. L., Wharton J. T., Ioannides C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protppncogene recognized by ovarian tumor-specific cztotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* . 1995, 181, S.2109-2117.

Fong L.Engelman,E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annual Review Immunology*. 2000, 18, S.245-273.

Gilboa E.NairS.K., Lyerly H.K. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* . 1998, 46, S.82-87.

GurichischuJan *Aber hallo.* Tübingen, s.n., 2007.

Hanemaaijer R.KoolwijkP., le Clercq L., de Vree W.J., van Hinsbergh V.W. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* . 1993, 296(Pt3), S.803-809.

Hsu F.J.BenikeC., Gagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996, 2, S.52-58.

HsuF.J. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996, 2, S.52-58.

http://www.journalonko.de/newsview.php?id=740 Bevacizumab verlängert Überleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. *Journal Oncology*. 2004.

Ii M.YamamotoH. Yasushi A., Yumiko M., Yasuhisa S.,Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).*2006, 231(1), S.20-27.

Jackson C.J.NguyenM. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases.*Int J Biochem Cell Biol.* 1997, 29, S.1167-1177.

Jäger E.JägerD., Knuth A.2002.

—. Clinical cancer vaccine trials. *Curr. Opin. Immunol. .* 2002, 14, S.178-182.

JanewayCharlesA.et al. *Immunologie.* Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, 2002.

Jonuleit H.Giesecke-TuettenbergA., Tüting T., Thurner-Schuler B., Stuge T.B., Paragnik L., Kandemir A., Lee P.P., Schuler G., Knop J., Enk A.H.A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the inductio. *Int J Cancer.* 2001, 15;93(2), S.243-51.

Kruger T.SchoorO., Lemmel C., Kraemer B., Reichle C., Dengjel J., Weinschenk T., Muller M., Hennenlotter J., Stenzl A., Rammensee H.G., Stevanovic S. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother. .* 2005, 54, S.826-836.

LesterhuisW.J. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy. *Annals of Oncology .* 2004, 15(4), S.145-151.

Lin H.C.ChangJ.H., Jain S., Gabison E.E., Kure T., Kato T., Fukai N., Azar D.T. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci .* 2001, 42, S.2517-2524.

Lucas R.HolmgrenL., Garcia I., Jimenez B., Mandriota S.J., Borlat F., Sim B.K., Wu Z., Grau G.E., Shing Y., Soff G.A., Bouck N., Pepper M.S. Multiple

forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood*. 1998, 92, S.4730-4741.

Miyamoto S.YanoK., Sugimoto S., Ishii G., Hasebe T., Endoh Y., Kodama K., Goya M., Chiba T., Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor-binding protein 3. *Cancer Res*. 2004, 64, S.665-671.

Nagashima Y.HasegawaS., Koshikawa N., Taki A. Ichikawa Y., Kitamura H., Misugi K., Kihira Y., Matuo Y., Yasumitsu H.,Miyazaki K. Expression of matrilysin in vascular endothelial cells adjacent to matrilysin-producing tumors. *Int J Cancer*. 1997, 72, S.441-445.

NairS. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy. *Blood*. 2003, 102, S.964-971.

NairS.,Boczowski D., Moeller B., Dewhirs M., Vieweg J., Gilboa E. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy. *Blood*. 2003, 102, S.964-971.

NencioniA., BrossartPeter New perspectives in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Bio Drugs*. 2001, 15, S.667-679.

Nishizuka I.IchikawaY., Ishikawa T., Kamiyama M., Hasegawa S., Momiyama N., Miyazaki K., Shimada H. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and insuces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett*. 2001, 173, S.175-182.

Noe V.FingletonB., Jacobs K., Crawford H. C., Vermeulen S., Steelant W., Bruyneel E., Matrisian L.M., Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stro-melysin-1. *J Cell Sci*. 2001, 114, S.111-118.

Opalka B.SchuettP., Nowrousian M. R., Moritz T Impfung gegen Krebs. *Essener Unikate 27*. 2006.

Opalka B.SchuettP., Nowrousian M. R., Moritz T. Impfung gegen Krebs. *Essener Unikate 27*. 2006.

Pel A. vanBruggerP. van der, Coulie P.G., Brichard V.G., Lethe B., Eynde B. van den, Uyttenhoven C., Renauld J.C., Boon T Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* . 1995, 145, S.229-250.

Powell W.C.FingletonB., Wilson C.L., Boothby M., Matrisian L.M. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptisis. *Curr Biol* . 1999, 9, S.1441-1447.

Romani N.GrunerS., Brang D., Kämpgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P.O., Steinman R.M., Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994, 180, S.83-93.

RomaniN. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994, 180, S.83-93.

Sallusto F.LanzavecchiaA. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin4 and downregulated by tumor necrosis f. *J Exp Med.* 1994, Bd. 179, S.1109-1118.

SallustoF. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic clls is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994, 179, S.1109-1118.

Tan X.EgamiH., Ishikawa S., Sugita H., Kamohara H., Nakagawa M., Nozawa F., Abe M., Ogawa M. Involvement of matrix metalloproteinase-7 in invasion-metastasis through induction of cell dissociation in pancreatic cancer. *Int J Oncol* . 2005, 26, S.1283-1289.

Timmerman J.M.Levy,R. *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy.* 1999.

Vargo-Gogola T.CrawfordH.C., Fingleton B., Matrisian L.M. Identification of novel matrix metalloproteinase-7(matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys* . 2002, 408, S.155-161.

Wang F.ReierstadS., Fishman D. A. Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation.*Cancer Lett (in press)*. 2006, 18;236(2), S.292-301.

Whiteside T.L.OdouxC. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2004, 53, S.240-248.

www.avastin.de/

www.journalonko.de/newsview.php?id=740 Bevacizumab verlängert Überleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. *Journal Onkologie*. 2004.

Yu W.H.WoessnerJ.F.J., McNeish J.D., Stamenkovic I.CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epider-mal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodelling. *Genes Dev*. 2002, 16, S.307-323.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zellen
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
^{51}Cr	radioaktiv markiertes Chrom
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
E:T	Verhältnis der Effektorzellen zu Zielzellen
et al.	Und andere
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötales Kälber Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
NK	Natürliche Killerzellen
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
TAA	Tumorantigen
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumfaktor

9 Danksagung

Danken möchte ich

Professor Dr. med. Peter Brossart für die Möglichkeit diese Doktorarbeit durchführen zu können, die Überlassung dieses Themas sowie hervorragenden Betreuung.

Professor Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic für die Herstellung der synthetischen MMP-7(A3)- sowie RGS-5-Peptide und die freundliche Überlassung der MHC class I sowie II Antikörper.

Dr. rer. nat. Frank Grünebach für die fachliche Betreuung sowie Korrektur meiner Arbeit und für die Herstellung der MMP-7-RNA sowie EGFP-RNA.

Sylvia, Bruni, Solweig und Regina für die exzellente Einarbeitung und die Aufmunterung während der praktischen Ausführung dieser Arbeit.

Meinem Ehemann Jan Grichisch für die wertvolle Tipps am Computer und die liebevolle Unterstützung.

Meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Yuko Grichisch

Geburtsdatum: 03.12.1978

Geburtsort: Kanagawa/Japan

Studium/Schule

2007 - Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Assistenzärztin an der Medizinische Klinik IV

2006 - Eberhard-Karls-Universität, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Promotion an der Medizinische Klinik II, AG Experimentelle Immuntherapie bei Prof. Dr. med. Brossart
Thema: Induktion von MMP7-spezifischen CTL *in vitro*

17.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 –2005 Eberhard-Karls-Universität, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Praktisches Jahr im Bereich Chirurgie, Innere Medizin und Dermatologie sowie

1998 – 2004 Medical University Oita, Japan
Examiation for Gakushi (Igaku) (M.D.)

1997 –1998 St.Viti Gymnasium Zeven, Deutschland
Schüleraustausch mit Rotary Youth Exchange
Teilnahme am Unterricht der 11. und 12. Klasse

1994 – 1997 Koka gakuen (Marianist Sisters) High school Tokio, Japan

1991 – 1994 Koka gakuen Junior high school Tokio, Japan

1985 – 1991 Chiyogaoka shogakkou Grundschule Kawasaki, Japan

Praktika/Nebentätigkeit

2006-	Universitätsklinik Tübingen, Deutschland Arbeit als Pflegehelferin (Radioonkologie)
2004	Universitätsklinikum Münster, Deutschland Ärztliches Praktikum (Endokrinologie, Diabetologie, Ernährungsmedizin, Gastroenterologie, Hepatologie, Rheumatologie)
2003	Kanto Medical Center NTT Tokio, Japan Ärztliches Praktikum (Endokrinologie)
2002	International Medical Center of Japan Tokio, Japan Ärztliches Praktikum (Kardiologie)
2002	Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland Ärztliches Praktikum (Endokrinologie)
2002	Diakonie-Krankenhaus Rotenburg (Wümme), Deutschland Ärztliches Praktikum (HNO)
1998	Yufuin Welfare Hospital Oita, Japan Pflegerisches Praktikum (Geriatrie)

Publikationen

O. Tschritter, H. Preissl, Y. Yokoyama, F. Machicao, H.-U. Häring, A. Fritsche (2007)

Variation in the *FTO* gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans

Diabetologia: 50(12), 2602-2603

Y. Yokoyama, Frank Grünebach, S. Schmid, S. Stevanovic, H.-G. Rammensee, P. Brossart

(2008)

Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells

Clinical Cancer Research: 1;14(17):5503-11

Weitere Veröffentlichungen (Poster)

American Diabetes Association 68th Scientific Sessions Abstract:

Y. Yokoyama, A. Kirsch, O. Tschritter, H. Preissl, M. Hallschmid, B. Schultes, H.-U. Haering, N. Birbaumer, R. Veit, A. Fritsche

Insulin Modulation of Brain Activity during Processing of Food related Pictures