

---

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Kanz**

**Induktion von Survivin-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  
Susanne Malaika Schmidt**

**aus  
Kirchheim/Teck**

**2005**

---

---

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Stevanović

---

---

Den besten Eltern Doris und Hajo gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen .....</b>	<b>V</b>
<b>Verzeichnis der Tabellen .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Die angeborene Immunität .....	1
1.1.2 Die adaptive Immunität.....	2
1.1.3 Dendritische Zellen und T-Zell vermittelte Immunität .....	4
1.1.3.1 Antigenprozessierung .....	6
1.1.3.2 Die T-Zell Aktivierung.....	7
1.1.3.3 Effektorzellen .....	8
1.1.4 Tumorummunologie.....	9
1.1.4.1 Tumor-escape Mechanismen.....	10
1.1.4.2 Tumorantigene.....	10
1.1.4.3 Spezifische Immuntherapie .....	12
1.2 Das Tumorantigen Survivin.....	13
1.3 Zielsetzung.....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Geräte .....	17
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	18
2.3 Reagenzien.....	18
2.4 Kits.....	20
2.5 Antikörper.....	21
2.6 Medien und Puffer.....	22
2.7 Peptide.....	23
2.8 Tumorzelllinien.....	24
2.9 Kultivierung von Zellen.....	25
2.10 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	25
2.11 Kryokonservierung von Zellen.....	26
2.12 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.12.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung .....	26
2.12.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) .....	27
2.12.3 Gelelektrophorese .....	29
2.12.3.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	29

---

2.12.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
2.12.4	Herstellung der Zelllysate und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	31
2.12.5	Western Blot.....	32
2.13	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	33
2.14	<i>Ex-vivo</i> Generierung von dendritischen Zellen.....	34
2.15	Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) .....	35
2.16	<i>Chrom</i> [ <sup>51</sup> Cr]-Release-Assay.....	36
2.16.1	<i>Cold Target Inhibition</i> .....	37
2.16.2	Antikörper-Blockierung im <i>Chrom</i> [ <sup>51</sup> Cr]-Release-Assay .....	38
2.17	Isolierung und Aktivierung von B- und T-Zellen .....	38
2.18	Elektroporation von DC .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	PCR und <i>Western Blot</i> Analyse der Tumorzelllinien .....	41
3.2	PCR Analyse humaner Gewebe .....	43
3.3	<i>Chrom</i> [ <sup>51</sup> Cr]-Release-Assays.....	44
3.3.1	Antigenspezifische Lyse von Peptid-beladenen Zielzellen ...	45
3.3.2	Erkennung Survivin-exprimierender Tumorzellen durch spezifische CTL.....	46
3.3.3	Überprüfung der HLA-Restriktion durch Antikörper- Blockierung.....	47
3.3.4	Überprüfung der HLA-Restriktion und Antigen-spezifität in <i>Cold Target Inhibition Chrom</i> [ <sup>51</sup> Cr]-Release-Assays .....	48
3.4	Lyse primärer Leukämie-Zellen.....	50
3.5	Lyse RNA transfizierter dendritischer Zellen .....	51
3.6	Expression von Survivin in reifen DC und aktivierten B- und T- Zellen .....	52
3.7	Lyse primärer maligner B-Lymphozyten.....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>59</b>
4.1	Bedeutung des Expressionsmusters von Survivin in der Tumor- Vakzinierung .....	62
4.2	Probleme und Grenzen dieser Arbeit.....	64
4.3	Vakzinierungsstudien .....	64
4.4	Ausblick.....	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>80</b>

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

Ω	Ohm
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen Presenting Cell
CD	Cluster of Differentiation
CLIP	Class II Associated Invariant Peptid
CLL	Chronische Myeloische Leukämie
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen
DC	Dendritic Cell
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ELISPOT	Enzym-linked immuno spot
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LFA	Lymphocyte Functional Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
ms	Milli-Sekunden
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optical Density
p	pico
PADRE	Pharmacovigilance Adverse Drug Reactions Europe

## Abkürzungen

---

PCR	polymerase chain Reaction
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetat
Pos.	Positiv
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SFL	slim fast Lösung
SPI- 6	serine protease inhibitor 6
Sv	Survivin
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	<u>t</u> ransporter associated with <u>a</u> ntigen <u>p</u> rocessing
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-cell receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
TSA	Tumor-spezifische Antigene
V	Volt

## Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1 1:** Dendritische Zelle
- Abb. 1.2:** Prozess der Reifung dendritischer Zellen
- Abb. 3.1:** Exemplarische Darstellung einer durchgeführten RT-PCR
- Abb. 3.2:** Exemplarische Darstellung eines Western Blot
- Abb. 3.3:** PCR aus cDNA gesunder humaner Gewebe
- Abb. 3.4:** Standard *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* zur Analyse der Antigen-spezifität
- Abb. 3.5:** Exemplarisches Standard *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* der Tumorzelllinien
- Abb. 3.6:** Antikörper-Blockierung im *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay*
- Abb. 3.7:** *Cold Target Inhibition* im *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay*
- Abb. 3.8:** Antikörper-Blockierung im *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay*
- Abb. 3.9:** *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* primärer Leukämie-Zellen
- Abb. 3.10:** *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* im autologen System
- Abb. 3.11:** Nachweis von Survivin im *Western Blot*
- Abb. 3.12:** Nachweis von Survivin in aufgereinigten ruhenden und aktivierten B- und T-Zellen im *Western Blot*
- Abb. 3.13:** *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* reifer und unreifer DC
- Abb. 3.14:** *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* aktivierter B- und T-Zellen
- Abb. 3.15:** Survivin Nachweis in Zellen eines HLA-A2 positiven CLL Patienten mittels RT-PCR
- Abb. 3.16:** Lyse autologer CLL Zellen im *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay*



## **Verzeichnis der Tabellen**

Tabelle 2.1: Geräte

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Reagenzien

Tabelle 2.4: Kits

Tabelle 2.5: Antikörper

Tabelle 2.6: Medien und Puffer

Tabelle 2.7: Peptide

Tabelle 2.8: Tumorzelllinien

Tabelle 2.9: Material SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tabelle 3.1: Expression von Survivin in Tumorzelllinien.

Tabelle 3.2: HLA-Status der eingesetzten primären Leukämie-Zellen

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die Gesundheit des Menschen ist von der Fähigkeit abhängig, Fremdkörper und Mikroorganismen abzuwehren aber auch körpereigene Zellen zu überwachen und bei eventueller Entartung abzutöten. Dazu verfügt der Körper über eine unspezifische angeborene, sowie eine spezifische adaptive Immunität.

### 1.1.1 Die angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem setzt sich an den äußeren Grenzflächen aus physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Schutzmechanismen zusammen. Beispiele sind

- der physiologische Säuremantel der Haut
- die Reinigung der Atemluft durch Flimmerepithel-Transport und Bronchialschleim
- mureinspaltendes Lysozym in Speichel und Tränenflüssigkeit
- saures Sekret der Magenschleimhaut, gefolgt von rapider pH-Änderung im Duodenum
- Bakterienflora von Gastrointestinaltrakt und Urogenitalsystem
- Spülwirkung der Flüssigkeitsströmung in den Harnwegen
- Saurer pH-Wert der Vagina

Im Inneren des Körpers werden Pathogene meist relativ unspezifisch an Hand bestimmter verbreiteter Oberflächenstrukturen von Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) erkannt. Es kommt zur Ausschüttung verschiedener Mediatoren, die der Kommunikation mit anderen Effektorzellen dienen, diese an den Ort des Geschehens locken und sie auch aktivieren können.

Das Komplementsystem kann über den sogenannten alternativen Weg durch Bakterienpolysaccharide aktiviert werden, was zur Freisetzung chemotaktischer Substanzen und zur Zytolyse des Bakteriums führt.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verfügen über Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Über diese werden unspezifische Zellen attackiert, die mit humoralen Antikörpern markiert sind. Dieser Prozess wird als Antikörpervermittelte Zytotoxizität bezeichnet. Zusätzlich können sie auch ohne Vermittlung von Antikörpern Zellen abtöten. Beispielsweise führt der Verlust von schützenden MHC-Molekülen bei Tumorzellen dazu, dass sie von NK-Zellen eliminiert werden. Die Funktion von NK-Zellen wird über aktivierende bzw. hemmende Rezeptoren auf den NK-Zellen und die Expression von MHC-Molekülen reguliert. Schließlich sind noch die Proteine der akuten Phase an der unspezifischen Immunität beteiligt. Diese führen über die Ausschüttung von Botenstoffen zu einer Entzündungsreaktion (gesteigerte Durchblutung, erhöhte Kapillarpermeabilität und Wärmeentwicklung).

Alle diese Mechanismen sind stets im Körper vorhanden, die Reaktionen ändern sich auch nach wiederholtem Kontakt mit dem Pathogen nicht. Sie sind demzufolge nicht an die Erkennung eines spezifischen Antigens gebunden.

### **1.1.2 Die adaptive Immunität**

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist die adaptive oder erworbene Immunität hochspezifisch für das jeweilige Pathogen und stets Antigenvermittelt. Sie zeichnet sich durch die folgenden vier Merkmale aus: Spezifität, Diversität, Gedächtnis und Unterscheidung von selbst und fremd.

Das adaptive Immunsystem stützt sich dabei auf drei Zelltypen. Antigenpräsentierende Zellen (APC), die der myeloiden Stammzellreihe entspringen, B- und T-Lymphozyten, denen die lymphatische Reihe zugrunde liegt.

In der Entwicklung des Immunsystems entstehen für eine riesige Vielzahl von möglichen Antigenen jeweils spezifische erkennende T-Lymphozyten, die einen entsprechenden T-Zell-Rezeptor exprimieren.

Als negative Selektion wird dabei die Elimination von T-Zellen bezeichnet, die körpereigene Antigene fälschlicherweise als fremd erkennen. T-Lymphozyten mit nieder-affinen Interaktionen können den Thymus verlassen (=positive Selektion). Zur Aktivierung des Systems wird ein Antigen von dem entsprechenden Rezeptor eines Lymphozyten spezifisch erkannt und gebunden. Dies führt zu ihrer Differenzierung in Effektorzellen und zu deren Proliferation. Die Immunantwort auf ein ganz bestimmtes Antigen entspringt durch diese klonale Selektion einiger weniger Zellen.

B-Lymphozyten produzieren Antikörper (Immunglobuline). Der menschliche Körper verfügt über ein Antikörper-Repertoire mit ca.  $10^{12}$  Spezifitäten, die durch Mechanismen wie *Rearrangement* oder somatische Mutation entstehen. Jede B-Zelle produziert nur Antikörper, die gegen das eine, von ihr zu erkennende Antigen gerichtet sind. Zusätzlich exprimiert sie auf ihrer Oberfläche das von ihr produzierte Immunglobulin als Rezeptor. Bindet dieser an sein Antigen, so wird der B-Lymphozyt aktiviert und es kommt zur Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und in Gedächtniszellen. Durch deren Bildung wird bei erneutem Kontakt mit dem Antigen die Immunantwort beschleunigt.

Immunglobuline können nahezu jede chemische Struktur als Epitop erkennen und erfüllen eine Reihe von Aufgaben, die der Elimination von extrazellulären Pathogenen dienen. Beispielsweise können durch Anlagerung von Antikörpern an Pathogene diese markiert (Opsonisierung) oder durch Bildung von Immunkomplexen lösliche Antigene (z.B. Toxine) neutralisiert werden.

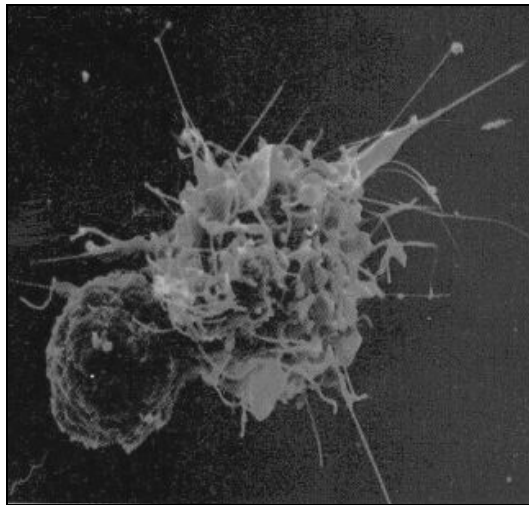
T-Zellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (z.B. Langerhans-Zellen der Haut, dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten) aktiviert. Sie verfügen über einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der jeweils ein bestimmtes Antigen erkennt. Dazu müssen die Antigene an besondere Moleküle, den MHC (*major histocompatibility complex*), auf APC gebunden sein<sup>43; 77; 106</sup>. An der Antigen-Erkennung sind neben dem TCR auch die Korezeptoren CD4 und CD8 beteiligt (CD=*cluster of differentiation*).

Dabei bindet CD4 nur an MHC Moleküle der Klasse II, CD8-Moleküle nur an MHC-Klasse-I. Nach Aktivierung der T-Zellen erfolgt ihre Differenzierung in folgende Effektorzellen:

- Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), verantwortlich für die Abtötung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen. Sie exprimieren den Korezeptor CD8 und erkennen somit Antigene, die an MHC-Klasse-I Moleküle gebunden sind.
- Inflammatorische T-Zellen. Sie dienen der Aktivierung von Makrophagen. Sie tragen, wie auch die folgenden T-Helferzellen das CD4 Molekül auf ihrer Oberfläche und binden somit an Moleküle der MHC-Klasse-II.
- T-Helferzellen aktivieren B-Zellen, T-Zellen und APC

Damit übernehmen die T-Lymphozyten die zellulären Effekte der adaptiven Immunität<sup>59; 79; 102</sup>.

### 1.1.3 Dendritische Zellen und T-Zell vermittelte Immunität



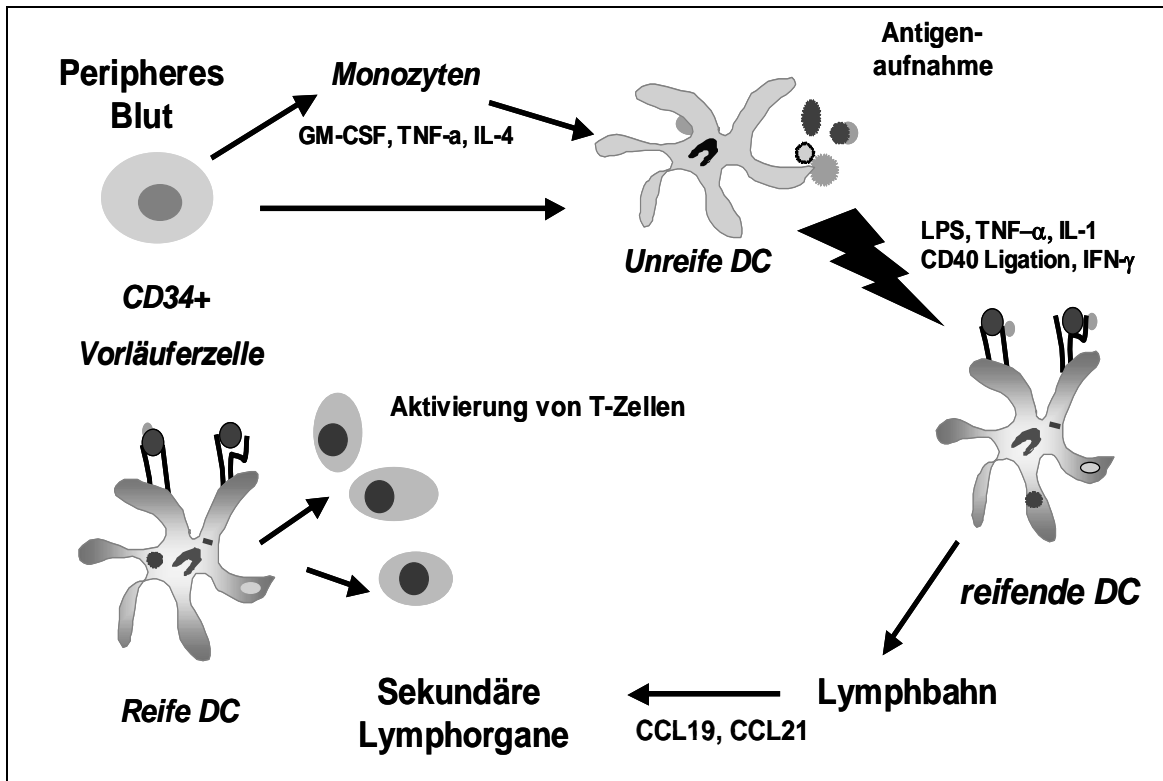
**Abb. 1.1:** Dendritische Zelle

<http://www.koelner-modell.de>

Dendritische Zellen (DC) gehören, zusammen mit den Langerhans-Zellen der Haut, den Makrophagen und B-Lymphozyten, zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Diese Zellen exprimieren neben MHC-Klasse-I Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, zusätzlich auch MHC-Klasse-II Moleküle<sup>65</sup>.

Dendritische Zellen gelten als die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen. Sie stellen Wächter des Immunsystems dar, indem sie in der Peripherie als unreife DC Antigene aufnehmen, prozessieren, und sie in großer Anzahl als MHC-Peptid-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentieren. Der unreife Zustand ist also gekennzeichnet durch die Spezialisierung auf die Antigenaufnahme, während die Voraussetzungen zur T-Zell Stimulation noch gering ausgebildet sind. Durch Interaktion der DC mit Pathogenen, aktivierten T-Zellen, Zytokinen wie Tumor nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1 $\beta$  oder auch Lipopolysacchariden (LPS), kommt es zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86), zur Sekretion von Zytokinen wie IL-12 und damit zur Ausreifung der DC. Der Reifungsprozess beinhaltet die Produktion verschiedener Chemokine, eine Hochregulation von CCR7<sup>95</sup> und einer größeren Empfindlichkeit gegenüber ELC (MIP-3 $\beta$ ) und SLC (6CKine), wodurch die Migration der DC über die Lymphbahnen in Lymphknoten und Milz geleitet wird. Hier treffen sie als reife DC – nun spezialisiert auf die Induktion einer primären Immunantwort – auf spezifische T-Lymphozyten und aktivieren diese. Dabei genügen eine kleine Anzahl dendritischer Zellen und geringe Antigen-Konzentrationen, um eine starke T-Zell Antwort auszulösen. Darüber hinaus spielen DC eine wichtige Rolle in der Induktion der Immuntoleranz. Mit ihrer Hilfe können gegen den eigenen Körper gerichtete Thymozyten eliminiert und reife T-Lymphozyten in einen anergen Zustand gebracht werden<sup>15</sup>.

Erst die Erkenntnisse zur Gewinnung und Kultivierung von DC ermöglichten über die Generierung einer größeren Anzahl an Zellen deren Einsatz in der Immuntherapie. *In vitro* können DC aus CD34+ Stammzellen<sup>38; 125</sup> oder adhärennten CD14+ Monozyten des peripheres Bluts generiert werden<sup>127</sup>. Dies erfolgt unter Zugabe von Zytokinen wie GM-CSF und IL-4<sup>94</sup>. Auch über Leukapherese des peripheren Bluts können DC gewonnen werden<sup>40</sup>, wobei die Ausbeute durch Injektion von GM-CSF oder Flt3L erhöht werden kann<sup>74; 89</sup>.



**Abb. 1.2:** Prozess der Reifung dendritischer Zellen<sup>80</sup>

Dendritische Zellen können aus CD34+ Vorläuferzellen oder aus Monozyten des peripheren Bluts unter Zugabe von GM-CSF, TNF- $\alpha$  und IL-4 generiert werden. Diese unreifen DC nehmen Antigene auf und reifen unter dem Einfluss von LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, CD40L und IFN- $\gamma$  heran. Sie treten in die Lymphbahn ein und finden – geleitet durch die Chemokine CCL19 und CCL21 – ihren Weg in die sekundären Lymphorgane wie Lymphknoten und Milz. Hier nehmen die nun auf die Antigen-Präsentation spezialisierten reifen DC Kontakt mit T-Zellen auf und aktivieren diese.

### 1.1.3.1 Antigenprozessierung

CD8+ CTL erkennen antigene Peptide, die an Moleküle der MHC-Klasse-I gebunden an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Peptide stammen in der Regel aus zytoplasmatischen Proteinen. Intrazelluläre Antigene wie beispielsweise virale Proteine oder Tumorproteine werden im Zytosol der DC durch das Proteasom gespalten. Das Proteasom ist eine fassartige Struktur, die denaturierte oder Ubiquitin-markierte Proteine aufnimmt und zu Peptiden einer Länge von 5-15 Aminosäuren degradiert.

Diese werden anschließend über den heterodimeren TAP Transporter (*transporter associated with antigen processing*) ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo unter Beteiligung mehrerer *Chaperone* (Calnexin, Calretikulin, ERP57) der Zusammenbau von MHC-I-Peptid Komplexen erfolgt. Über den Golgi-Apparat gelangen die Komplexe an die Zelloberfläche<sup>14; 49; 87; 102</sup>.

Extrazelluläre Antigene gelangen über Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose ins Innere der Zelle und werden in den Lysosomen zu Peptiden prozessiert. Die Beladung erfolgt in einem speziellen lysosomal-endosomalen Zellkompartiment (*MIIC=MHC-class-II compartment*) auf MHC-Klasse-II Moleküle. Das MHC-Klasse-II Molekül tritt als Komplex mit einer invarianten Ketten ins MIIC ein. Diese wird im folgenden in kleine Peptide gespalten, wobei ein als CLIP (*class II associated invariant peptid*) bezeichnetes Peptid, so lange in der Peptidbindungsfurche verweilt, bis es von dem zu präsentierenden Antigen ersetzt wird. Auch dieser Komplex wandert daraufhin an die Zelloberfläche<sup>18; 26; 31; 64; 68</sup>.

Dendritische Zellen nehmen hier eine Sonderstellung ein, da sie in der Lage sind auch extrazelluläre Antigene auf MHC-Klasse-I Molekülen zu präsentieren, ein Mechanismus, der als *cross-priming* bezeichnet wird.

### 1.1.3.2 Die T-Zell Aktivierung

Die T-Zell Aktivierung erfolgt in vier Schritten: Adhäsion, antigenspezifische Aktivierung, Kostimulation und Zytokinausschüttung. Die initiale Kontaktaufnahme zwischen APC und T-Zellen im drainierenden Lymphknoten erfolgt durch eine unspezifische Bindung von Adhäsionsmolekülen. CD2 der T-Zelle bindet an LFA-3 (=CD58) der APC und LFA-1 der T-Zelle bindet an ICAM-1 und ICAM-2 der APC. In dieser Phase tastet der TCR der T-Zelle die MHC-Peptid-Komplexe der APC nach einem passenden Peptid ab. Erkennt die T-Zelle „ihr“ Peptid, so resultiert dies in einem engeren Zell-Zell-Kontakt, der durch Erhöhung der Affinität des LFA-1 der T-Zelle zu den ICAM-Molekülen 1- und 2 der APC zustande kommt.



Diese spezifische Interaktion alleine, reicht jedoch nicht aus, um die T-Zelle vollständig zu aktivieren. Erst die Bindung der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (=CD80) und B7.2 (=CD86) der APC an CD28 der T-Zelle führen zur endgültigen Aktivierung der T-Zelle. Über diese Bindung wird die Synthese von IL-2 und dessen Rezeptor in der T-Zelle eingeleitet. Die T-Zelle stimuliert sich so über einen autokrinen Mechanismus selbst. Diese Aktivierung führt zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen in Effektorzellen. Über das kostimulatorische Molekül CTLA-4 kann die T-Zell-Aktivierung wieder limitiert werden. Nach Aktivierung wird CTLA-4 verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert und bindet mit höherer Affinität als CD28 an die B7-Moleküle B7.1 und B7.2. Die T-Zelle empfängt daraufhin kein weiteres aktivierendes Signal. Fehlt das kostimulatorische Signal, so wird die T-Zelle inaktiviert und kann auch auf eine spätere Aktivierung nicht mehr reagieren. Diese Situation wird als Anergie bezeichnet<sup>99</sup>.

### 1.1.3.3 Effektorzellen

Die Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ) kann nochmals in zwei Subpopulationen ( $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ ) unterteilt werden.  $T_{H1}$  beeinflussen über die Sekretion von Interferon- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  und Expression des CD40 Liganden die Aktivität von T-Killerzellen, DC und Makrophagen, also Teile der zellulären Immunität,  $T_{H2}$  hingegen produzieren IL-4, IL-5 und IL-10 und aktivieren über B-Zellen die humorale Immunantwort.

Die andere Gruppe von T-Zellen ist die der CD8<sup>+</sup> T-Killer- oder auch zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Ihre Aufgabe besteht darin, die Körperzellen zu überwachen. Sie erkennen ihr Peptid nur in Assoziation mit MHC-Klasse-I Molekülen, die jedoch auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. CTL erkennen so beispielsweise virusinfizierte oder entartete Zellen und bewirken eine Elimination dieser Zellen<sup>17; 92</sup>. Dazu stehen den CTL verschiedene Mechanismen zur Verfügung, die in den Zielzellen die Apoptose induzieren (programmierter Zelltod)<sup>17</sup>.

Eine Möglichkeit besteht in der Freisetzung von Perforin und Proteasen wie Granzym B aus Granula der T-Zelle.

Perforin bildet Poren in der Membran der Zielzellen, Granzym B kann so eindringen und die Apoptose induzieren. Der Zelltod kann jedoch auch Rezeptor-vermittelt eingeleitet werden. Zytokine wie TNF- $\beta$  (Tumor nekrose Faktor-beta) oder Liganden wie Fas-Ligand binden an ihre Rezeptoren (TNF-Rezeptor, Fas), die eine Kaspase-Kaskade im Inneren der Zellen auslösen. Kaspasen sind Proteasen, die ihre Substrate an der C-terminalen Seite von Aspartatresten schneiden.

### 1.1.4 Tumorimmunologie

Maligne Tumoren sind neben den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Die Ursachen für eine Tumorentstehung sind vielfältig. So sind ein Anstieg des Lebensalters aber auch der ständige Kontakt des Körpers mit bestimmten Agenzien wie chemischen Karzinogenen, ionisierenden Strahlen und Viren ursächlich für die Zunahme der Tumorerkrankungen in den vergangenen Jahrzehnten.

Ausgangspunkt jedes Tumors ist jedoch eine entartete Zelle, die unkontrolliert proliferiert. Als Tumorprogression bezeichnet man die Entstehung weiterer Mutationen in den Tochterzellen der entarteten Zelle<sup>5</sup>. Nun müssten entartete Zellen über die Präsentation von Antigenen auf ihren MHC-Molekülen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dennoch gelingt es dem Tumor im Laufe der Zeit, sich nicht nur lokal zu vermehren, sondern auch sich aus dem Zellverband zu lösen und entartete Zellen über die Lymph- oder Blutbahn im Körper zu verteilen (Metastasierung).

### 1.1.4.1 Tumor-escape Mechanismen

Tumoren entwickeln verschiedene Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen. So verschlechtert eine verminderte MHC-Expression auf Tumorzellen die Erkennung durch CTL<sup>6; 29; 47; 109</sup>. Dadurch können die Zellen nicht lysiert werden und der Tumor nimmt an Größe zu.

Ein Restbestand an MHC-I Molekülen bleibt jedoch meist bestehen, da die Tumorzellen sonst dem Angriff von NK-Zellen ausgesetzt sind. Daneben kann auch die Prozessierung von Antigenen durch Blockade des TAP-Transporters z.B. durch Herpesviren oder Mutationen gestört sein<sup>36; 100</sup> oder die Tumorantigene können durch die verstärkte Expression von Glykokalix-Molekülen sozusagen versteckt werden, ein Mechanismus, der als Antigenmaskierung bezeichnet wird<sup>1</sup>. Eine weitere Strategie ist eine veränderte oder fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tumorzellen, was zur klonalen Anergie der CD8+ oder CD4+ T-Zellen führen kann<sup>6; 25; 35</sup>. Der Tumor kann sich auch durch Produktion von immunsuppressiven Substanzen wie IL-10 oder TGF- $\beta$ <sup>112; 120</sup> gegen den Angriff des Immunsystems schützen. Einige Tumoren können durch Blockierung der IL-2 Produktion die T-Zellen an ihrer Proliferation hindern<sup>90</sup>. Dem schnellen Wachstum von Tumoren liegt häufig nicht allein eine vermehrte Proliferation, sondern auch ein verminderter Apoptose-Index zu Grunde. Der programmierte Zelltod ist an irgendeiner Stelle durch die Entartung der Zellen unterbrochen. Schließlich führt eine verminderte Ausschüttung von Entzündungs-Mediatoren dazu, dass das Immunsystem den Tumor erst wahrnimmt, wenn er bereits ein beträchtliches Ausmaß erreicht hat<sup>35; 88</sup>.

### 1.1.4.2 Tumorantigene

Obwohl Tumorzellen aus körpereigenen Zellen entstehen, präsentieren sie auf ihrer Oberfläche häufig Antigene, die in dieser Form als fremd erkannt werden können.

Tumorspezifische Antigene (TSA) sind Antigene, die nur auf Tumorzellen, nicht jedoch auf normalen Körperzellen präsentiert werden. Tumor-assoziierte Antigene (TAA) werden gleichzeitig auch auf nicht entarteten Körperzellen exprimiert. Diese induzieren aufgrund der Selbsttoleranz in der Regel keine Immunantwort.

Nach ihrem Ursprung werden Tumorantigene, die sich für die Verwendung in der Immuntherapie von Tumoren eignen, in folgende Gruppen eingeteilt<sup>82</sup>.

Tumorspezifische Antigene, Antigene embryonalen Ursprungs (*Cancer-testis* Antigene), gewebespezifische Antigene (Differenzierungsantigene), Oncovirale Proteine und in Tumoren überexprimierte Antigene.

Tumorspezifische Antigene können aus Onkogenprodukten bzw. aus mutierten Tumorsuppressor-Genen hervorgehen. Beispiele sind p53, ein Zellzyklusregulator, der in ca. 50 % aller Tumoren zu finden ist und das Protoonkogen ras, das an der Signalübertragung beteiligt ist.

Antigene embryonalen Ursprungs sind Produkte embryonaler Gene. Beispiele hierfür sind die Mitglieder der Genfamilie MAGE (*melanoma antigen*), die in gesunden Zellen nicht exprimiert werden<sup>96</sup> mit Ausnahme von Plazenta und Testis. Hier sind die Gene aktiv, es werden allerdings keine MHC Moleküle exprimiert, so dass sie dem Immunsystem unbekannt sind.

Gewebsspezifische Antigene (Differenzierungsantigene) werden auf Tumoren überexprimiert, sind aber auch auf dem Ursprungsgewebe zu finden. Die Tyrosinase ist ein Enzym das zur Melaninsynthese in Melanozyten benötigt wird und auf einer Vielzahl von Melanomen präsentiert wird<sup>119</sup>. Andere Beispiele sind  $\alpha$ -Fetoprotein und gp100<sup>107</sup>.

Verschiedene Tumoren können viral induziert sein: Das Zervixkarzinom beispielsweise ist häufig mit einer HPV-Infektion (Humanes Papilloma Virus 16 und 18) verbunden. Es konnte eine CTL-Antwort gegen HPV 16 assoziierte Proteine in Patientinnen mit Zervixkarzinom gefunden werden<sup>30</sup>. Diese Gruppe von Tumorantigenen geht aus onkoviralen Proteinen hervor. Ein anderes Beispiel ist das Epstein-Barr-Virus, das mit der Entstehung von Naso-Pharynx-Karzinomen, sowie Burkitt-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen in Zusammenhang gebracht wird.

Überexprimierte Tumorantigene wie Her-2/neu (Mamma-, Ovarial-, Kolon- und Nierenzell-Karzinom) und MUC-1 (Pankreas-, Ovarial-, Mamma-, Kolorektales Karzinom) sind auf bestimmten Tumoren verstärkt exprimiert, finden sich aber auch auf gesundem Gewebe<sup>19; 20</sup>.

### 1.1.4.3 Spezifische Immuntherapie

Bisherige Therapieoptionen für Tumorpatienten, die aus Operation, Chemotherapie und/oder Bestrahlung bestehen, sind meist belastend, mit vielen Nebenwirkungen behaftet und ein langfristiger Erfolg ist nicht immer gesichert.

Die spezifische Immuntherapie verfolgt das Ziel, die Immuntoleranz von Tumoren zu durchbrechen und eine dauerhafte effiziente Immunantwort gegen die entarteten Zellen zu induzieren. Eine Möglichkeit einer selektiv gegen Tumorzellen gerichteten Therapie ist die Aktivierung und Expansion von tumorspezifischen CTL.

Tumorzellen an sich sind trotz Expression von Tumorantigenen meist wenig immunogen. Ein Grund hierfür ist das Fehlen kostimulatorischer Moleküle, d.h. Tumorzellen sind auch nach Erkennung durch spezifische T-Zellen nicht in der Lage, eine ausreichende Immunantwort zu induzieren. Die Immuntherapie nutzt zur Umgehung dieses Problems die Fähigkeiten professioneller Antigen-präsentierender Zellen und hier vor allem die dendritischer Zellen.

Diese zeichnen sich durch ihre hohe Effizienz in der Antigenpräsentation und die Induktion einer starken primären Immunantwort auch gegen Tumorzellen aus<sup>4; 15; 21; 22; 24; 40; 83; 117</sup>. Für DC konnte gezeigt werden, dass ihr Auftreten in Tumoren mit einer besseren Prognose und längeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert ist<sup>16</sup>.

Darüber hinaus sind sie nicht nur auf die Aktivierung CD8+ T-Zellen beschränkt, sondern erweitern die Immunantwort durch Aktivierung von T-Helferzellen über die Präsentation von Peptiden auf MHC-Klasse-II Molekülen.

Zum Einsatz als Vakzine werden autologe DC *ex vivo* generiert, durch die Zugabe verschiedener Zytokine aktiviert und zur Ausreifung gebracht.

DC können auf verschiedenen Wegen mit Antigenen beladen werden, die sie dem Immunsystem präsentieren sollen. Eine Möglichkeit ist die Beladung der MHC Moleküle von außen mit tumorspezifischen Peptiden<sup>62; 118</sup>. Hierfür ist die Kenntnis tumorassoziierter, besser noch tumorspezifischer Epitope notwendig, sowie des HLA-Typs des Patienten.

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid wurde über sogenanntes *Peptid Motif Scoring* identifiziert. Bei diesem Ansatz werden aus der Primärsequenz des Proteins Sequenzen einer Länge von 8-10 Aminosäuren ausgewählt, die bestimmten Bindungsanforderungen der MHC-Klasse-I Moleküle entsprechen<sup>97</sup>. Weitere Möglichkeiten der Identifikation von TAA sind die Elution der Peptide von MHC Molekülen oder deren Klonierung aus vorhandenen cDNA Bibliotheken, die aus Tumorgewebe generiert wurden.

Andere Ansätze der Vermittlung von Tumorantigenen sind der Einsatz von Tumorzelllysaten<sup>37</sup>, RNA<sup>81</sup>, rekombinanten Proteinen, rekombinante virale Vektorsysteme<sup>32</sup> oder aus Tumorzellen und DC hervorgehende Fusionen<sup>50</sup>. Die so veränderten DC können nun *ex vivo* autologe spezifische T-Zellen aktivieren und zur Proliferation bringen. Die induzierten T-Zellen werden dem Patienten verabreicht<sup>21; 33; 34; 40; 98; 110</sup>. Die Aktivierung und Expansion spezifischer T-Zellen kann auch *in vivo* erreicht werden, indem dem Patienten die behandelten autologen DC appliziert werden<sup>78; 105; 116</sup>.

Durch Zugabe verschiedener Zytokine wie IL-2, IL-12, GM-CSF und Flt3-L oder Adjuvantien wie PADRE, Anti-CTLA-4 und CpG wird versucht, die Immunantwort zusätzlich zu verstärken<sup>21; 25; 28; 39; 91</sup>.

## 1.2 Das Tumorantigen Survivin

Survivin gehört der Genfamilie *Inhibitor of Apoptosis (IAP)* an und wird mit Ausnahme von Thymozyten<sup>9</sup>, Plazenta, CD34+ Stammzellen<sup>23; 45</sup> und Basalzellen des Kolonepithels<sup>46; 126</sup> normalerweise nur in embryonalem und fötalem Gewebe exprimiert<sup>2; 67</sup>. Eine Überexpression von Survivin ist in fast allen menschlichen Tumoren zu beobachten<sup>8</sup> und ist assoziiert mit einer kürzeren Überlebenszeit dieser Patienten<sup>3</sup>, einer erhöhten Rezidivquote<sup>111</sup> und

Therapieresistenz<sup>55; 121</sup>. Dies wurde für das Neuroblastom<sup>56</sup>, das Harnblasen-Karzinom<sup>111</sup> und das Melanom<sup>69</sup> gezeigt. Die Transkription des Survivin-Gens in Tumorzellen unterliegt einer globalen Deregulation, da eine Zellzyklus-unabhängige Expression nachgewiesen werden konnte<sup>51</sup>.

Vor Kurzem wurde eine Beteiligung von Survivin bei der Mitose- und Apoptose-Regulation beschrieben<sup>48</sup>.

Der *Survivin-Pathway* der Apoptose-Regulation spielt bei der Erhaltung der Lebensfähigkeit entarteter Zellen eine wichtige Rolle<sup>10; 27; 52; 71; 86</sup>. Diese Eigenschaften machen Survivin zu einem interessanten Protein in der Diagnose und Therapie von Tumoren.

Das Umgehen der Apoptose ist ein *Tumor-escape* Mechanismus, der in vielen menschlichen Tumoren beobachtet wird. Dieser Mechanismus ermöglicht der Tumorzelle sich durch weitere Mutationen immer wieder zu verändern und sich so sowohl der Elimination durch das Immunsystem als auch einer zyto-reduktiven Therapie zu entziehen. Morphologisch sind apoptotische Zellen durch Zellschrumpfung, Membranausstülpungen (Zeiosis), Chromatinkondensation, Zellerfall in Apoptosekörperchen und deren Phagozytose<sup>63</sup> gekennzeichnet. Die Apoptose wird durch Auslösung einer Kaspase-Kaskade in Gang gesetzt. Dies kann durch die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren wie TNF-R (Tumor nekrose Faktor Rezeptor) oder CD95 (Fas) erfolgen<sup>13</sup>, oder mitochondrien-abhängig durch Permeabilitätszunahme der Membran und Freisetzung toxischer Verbindungen wie Cytochrom c.

Zwei Familien von Apoptose-Regulatoren sind bekannt, die Bcl-2 Familie und die IAP-Familie. Beim Menschen wurden bisher 8 Mitglieder der IAP-Familie identifiziert. Die Suppression der Apoptose erfolgt durch Hemmung von Kaspasen<sup>61; 66; 113</sup>. Dabei wird sowohl der Rezeptor- als auch der Mitochondrien-abhängige Weg beeinflusst. Proteine, die bei der Apoptose-Induktion aus den Mitochondrien frei werden, können wiederum an IAP binden und damit ihre inhibierende Wirkung an den Kaspasen aufheben<sup>85; 103</sup>.

P53 ist ein Zellzyklusregulator und Tumor-Suppressor-Protein, das in geschädigten Zellen den Zellzyklus anhalten und die Zellen in die Apoptose treiben kann. Mutationen im p53-Gen werden in ca. 50 % aller Tumoren beobachtet. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass p53 die Genexpression von Survivin unterdrückt<sup>53; 76</sup> und die Expression von Survivin die p53-abhängige Apoptose behindert.

Eine Inaktivierung von p53 in Tumorzellen führt zur unkontrollierten Expression von Survivin und vermehrtem Tumorwachstum.

Während der Zellteilung bindet Survivin an verschiedenen Komponenten des Mitoseapparats<sup>41; 60; 71; 104</sup>, wie Zentrosomen und Mikrotubuli. Auch in der Angiogenese scheint Survivin eine Rolle zu spielen. Die Möglichkeit, eigene Blutgefäße zu bilden ist, wie auch das Umgehen der Apoptose, ein Mechanismus, der in der Entwicklung vieler menschlicher Tumoren zu beobachten ist. Nach Stimulation mit Faktoren der Angiogenese wird Survivin vermehrt exprimiert<sup>84; 122</sup>.

Die selektive Expression von Survivin in Tumorzellen führte zu der Annahme, dass dieses Protein als fremd erkannt wird und somit auch eine Immunantwort auslösen könnte<sup>12</sup>. Kürzlich konnten aus dem peripheren Blut von Patienten mit malignem Melanom und chronische lymphatischer Leukämie (CLL) reaktive CTL isoliert werden, die allogene HLA-identische Mammakarzinom- und Melanomzellen lysierten<sup>7; 11; 73; 97; 113</sup>.

Damit ist eine der Voraussetzungen für den Einsatz dieses Proteins in der spezifischen Immuntherapie von Tumoren gegeben.



### 1.3 Zielsetzung

Schmitz et al. konnten ein HLA-A2-bindendes Survivin-Peptid (ELTLGEFLKL) identifizieren, das sich zur Induktion Survivin-spezifischer CTL eignet. Über die Beladung dendritischer Zellen mit diesem Peptid konnten CTL induziert werden, die EBV-immortalisierte B-Zellen, die mit Survivin transfiziert wurden, lysierten.

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob dieses Peptid auch von Tumorzellen präsentiert wird und ob Survivin-spezifische CTL primäre autologe maligne Zellen antigenspezifisch erkennen können. Dazu werden DC generiert, mit dem beschriebenen Peptid beladen und als APC zur *in vitro* Induktion von Survivin-spezifischen CTL verwendet.

Des Weiteren sollen verschiedene Tumorzelllinien auf die endogene Expression von Survivin hin untersucht werden.

An Hand von *Chrom*<sup>51</sup>*Cr*-Release-Assays soll dann gezeigt werden, ob das Survivin-Peptid auch aus der endogenen Antigenprozessierung der Tumorzelllinien hervorgeht, entsprechend präsentiert wird und von den induzierten CTL erkannt wird. Anschließend wird analysiert, ob die Lyse der Zielzellen antigenspezifisch und HLA-A2-restringiert abläuft. Zum Schluss wird noch überprüft, ob diese Ansätze auch auf ein autologes System zu übertragen sind. Dazu werden DC aus dem peripheren Blut eines sich in Remission befindenden CLL Patienten generiert und mit Survivin-Peptid beladen.

Der Einfluss von Survivin auf die Viabilität von Tumorzellen, die Mitose- als auch Apoptose-Regulation sowie die Tatsache, dass es in fast allen menschlichen Tumoren, in gesundem Gewebe jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimiert wird, bietet einen vielversprechenden Ansatzpunkt für einen späteren Einsatz in der Immuntherapie maligner Erkrankungen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, Großbritannien
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Elektroporationsgerät Easyjet Plus™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis System	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	Pekin Elmer Life Science, Wellesley, USA
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Kendro, Hanau, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
6-Well-Zellkulturplatte Falcon® Multiwell™ 353046	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
96-Well-Zellkulturplatte U-shape Cellstar®, with lid, TC-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Blue Max™ 50 ml Blue Cups	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Luma Plate™ –96	Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande
TC-Tube Cellstar®, steril, 14 ml, 16,0/100 mm Screw Cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0,2 µl Vented Blue Plug Seal Cup 70 ml, 275 ml	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA

## 2.3 Reagenzien

Chemikalien und Biochemikalien, die hier nicht explizit erwähnt sind, wurden von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth & Co. (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.3: Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Bench Mark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Separating Solution	BioChrom AG, Berlin, Deutschland
Biotinylated SDS Page Standards Low Range	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
CD40L	Biozol, Eching, Deutschland
<sup>51</sup> Cr-Natrium-Chromat	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
DMSO	Serva, Heidelberg, Deutschland
ECL™ plus detection reagent	Amersham biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
GM-CSF Leukomax	Novartis, Basel, Schweiz
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO4)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Penicillin.Streptomycin 100 ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin horseradish peroxidase conjugate	Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland
TNF- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA

## 2.4 Kits

Tabelle 2.4: Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Peribo Science, Bonn, Deutschland
cDNA-Set: Superscript™, first strand synthesis system for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Set: Amplitaq	Perkin Elmer, Boston, USA
MACS Pan T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
	Gladbach, Deutschland
MACS CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
RNeasy® Mini Kits	Qiagen GmbH, Hilden

## 2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Antikörper

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
HLA-A2 (MoAb BB7.2 (IgG2b))	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
Actin I-19, sc-1616, polyclonal goat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Chrom Pure Mouse IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Survivin rabbit polyklonal, AF 886	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

## 2.6 Medien und Puffer

Tabelle 2.6: Medien und Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Reagenzien</b>
DNA-Ladepuffer	5 % Glycerin 166,7 $\mu$ M EDTA 0,025 % Bromphenolblau
Gefriermedium	RP 10 ergänzt mit 10 % DMSO
RP 10	RPMI 1640 mit Glutamax ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 mg/ml Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer <i>Western Blot</i> 3-fach	0,18 M Tris HCL pH 6,8 6 % SDS 28 % Glycerin 0,001 % Bromphenolblau
Laufpuffer (Runningbuffer) <i>Western Blot</i> 1-fach	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % SDS
MACS-Puffer	DPBS 5 % BSA 2 mM EDTA
NP40 Lysispuffer	Hepes 0,05 M NaCl 0,15 M Igepal 1 % EDTA 2 mM Glycerin 10 % Aprotinin 2 $\mu$ g/ml PMSF 1 mM

Puffer	Reagenzien
TAE	40 mM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8.0
TBS 1-fach	0,14 M NaCl 0,01 M Tris/HCl pH 8,0
TBST 0,5 %	1-fach TBS 0,5 % Tween
TBST 3 %	1-fach TBS 3 % Tween
Transferbuffer <i>Western Blot</i>	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % Methanol 0,1 % SDS

## 2.7 Peptide

Tabelle 2.7: Peptide

Peptid	Bereitgestellt von:
Abgeleitet von Survivin: 95-104 ELTLGEFLKL	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland <a href="http://www.syfpeithi.de">www.syfpeithi.de</a>
Abgeleitet von HIV: HIV-1 (BRU) RT 476-484, ILKEPVHGV	
Abgeleitet von Adipophilin: ADFP ( <i>adipose differentiation-related protein</i> ) 129-137 SVASTITGV	



## 2.8 Tumorzelllinien

Tabelle 2.8: Tumorzelllinien

<b>Tumorzelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>HLA-Status</b>	<b>Bezogen von</b>
A 498	Humanes Nierenzellkarzinom adhärent	HLA-A2	Prof. A Knuth, Frankfurt, Deutschland
Croft	Humane EBV- immortalisierte B-Zelllinie	HLA-A2	O. J. Finn, Pittsburgh, USA
HCT 116	Humanes Kolonkarzinom	HLA-A2	ATCC
K 562	Chronisch myeloische Leukämie	HLA-A2	ATCC
MCF 7	Humanes Mammakarzinom	HLA-A2	ATCC
Mel 1479	Humanes Malignes Melanom	HLA-A2	Prof. G. Pawelec, Tübingen, Deutschland
MZ 1774	Humanes Nierenzellkarzinom, adhärent	HLA-A2	Prof. A Knuth, Frankfurt, Deutschland
MZ 1257	Humanes Nierenzellkarzinom, adhärent	HLA-A2	Prof. A Knuth, Frankfurt, Deutschland
SK-OV-3	Humanes Ovarialkarzinom, adhärent	HLA-A3	O. J. Finn, Pittsburgh, USA

---

<b>Tumorzelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>HLA-Status</b>	<b>Bezogen von</b>
T2	Humanes Hybrid aus B-Zelllinie und T-Lymphoblasten Zelllinie, TAP-defizient	HLA-A2	ATCC
U 266	Humanes Multiples Myelom	HLA-A2	ATCC

---

## 2.9 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Es wurde RP 10-Medium verwendet.

Durch die Verwertung der Nährstoffe und die damit verbundenen Änderung des pH-Wertes, verfärbte sich der Indikator im Medium. Adhärent wachsende Tumorzelllinien wurden beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % mit sterilem PBS gewaschen, die Flüssigkeit dekantiert und mit Trypsin-EDTA von den Wänden der Kulturflasche abgelöst. Die so gelösten Zellen, sowie die nicht adhärent wachsenden Tumorzelllinien wurden in je ein 50 ml Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen bei 1500 rpm, Raumtemperatur, 5 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung in RP 10 resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde zur weiteren Kultivierung auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

## 2.10 Bestimmung der Lebendzellzahl

20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau gemischt. Die Farbstoffmoleküle können die intakte Zellmembran nicht durchdringen und ermöglichen so die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

Die ungefärbten Zellen wurden in 16 Quadranten einer Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl/ml ergab sich wie folgt:

(Gezählte Zellen in 16 Quadranten)  $\times 10^4 \times 2$  Zellen/ml

Der dimensionslose Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau. Bei weiterer Verdünnung durch Zugabe von Medium muss der entsprechende Faktor zusätzlich berücksichtigt werden.

## 2.11 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml RP 10 Medium unter Zusatz von 10 % DMSO in Kryo-Röhrchen überführt und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  erwärmt und anschließend mit Medium gewaschen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Gesamt-RNA wurde aus Tumorzelllinien mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach mitgeliefertem Protokoll für tierische Zellen isoliert. Prinzip dieser Methode ist die Bindung von RNA einer Größe von 200 Nukleotiden und mehr an eine Siliciumdioxid-Membran (Säulenchromatographie). DNA und andere Zellbestandteile werden mit mehreren Puffern abgewaschen und die RNA schließlich mit Wasser eluiert. Pro Säule können bis zu  $100\ \mu\text{g}$  RNA isoliert werden.

Die Bestimmung der Reinheit der Proben erfolgte durch spektrophotometrische Messung (*RNA/DNA Calculator Gene Quant II*) und Bildung des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Verhältnisses (Ziel: zwischen 1,8 und 2,0). Zur Bestimmung der Konzentration wurde die OD<sub>260</sub> gemessen.

Die RNA wurde bei –80 °C gelagert.

### **2.12.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll von *Superscript<sup>TM</sup> First- Strand Synthesis System for RT-PCR*.

In diesem Experiment erfolgt die cDNA-Synthese durch die Bindung von Oligo(dT)-Primern, bestehend aus 16-20 Thymidinresten an den Poly-dA-Schwanz der mRNA. Dies führt zur Synthese von cDNA einer Länge von 1-2 kb durch die zugegebene Reverse Transkriptase. Es können 1 bis 5 µg RNA in cDNA konvertiert werden. Ein möglicher Nachteil dieses Systems besteht darin, dass mRNA häufig länger als 1-2 kb ist und der proteinkodierende Teil am 5'-Ende sitzen kann. Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase geführt.

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Ein DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Erhöhung der Temperatur auf über 90 °C in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Nach Abkühlung auf ca. 50 °C binden die aus 15-25 Basen bestehenden Oligonukleotide, die der spezifischen Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge (in diesem Falle synthetisierte cDNA) komplementär sind (*Annealing*). Diese werden als *Forward* und *Reverse Primer* bezeichnet. Eine zugegebene DNA-Polymerase, polymerisiert die spezifischen Abschnitte zum Doppelstrang (Synthese). Eingesetzt wird hierbei meist die thermostabile *Taq*-Polymerase, die aus dem erstmals in den heißen Quellen des Yellowstone National Parks (USA) entdeckten thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Daraufhin wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf über 90 °C wieder in Einzelstränge

zerlegt (Denaturierung), die Primer binden erneut und die *Taq*-Polymerase beginnt mit der Synthese zum Doppelstrang. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus können spezifische DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt werden.

PCR-Set: Amplitaq:

1  $\mu$ l cDNA wurde zur PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz ohne cDNA geführt, um mögliche Kontaminationen der eingesetzten Reagenzien detektieren zu können.

Zugabe folgender Substanzen:

- 1,5  $\mu$ l 10 x Buffer
- 0,9  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 0,15  $\mu$ l dNTP 10 mM
- 0,1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase 5 U/ $\mu$ l
- 0,8  $\mu$ l *Forward Primer* (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,8  $\mu$ l *Reverse Primer* (10 pmol/ $\mu$ l)
- 9,75  $\mu$ l DEPC behandeltes Wasser

Zur Vervielfältigung der gesuchten Sequenz wurde ein

*Survivin-Primer* verwendet: 5' CGACCCCATAGAGGAACATAAA 3' und  
5' GGAATAAACCTGGAAGTGGTG 3'  
(AF-077350)

Als sogenanntes *house-keeping* Gen (Kontroll-Gen) wurde  $\beta_2$ -Mikroglobulin verwendet. *House-keeping* Gene werden in allen Zellen in annähernd gleichem Ausmaß exprimiert und dienen so als Kontrolle bezüglich Integrität und Effizienz der cDNA Synthese bzw. Expressions-Ausmaß des untersuchten Proteins:

5' GGGTTTCATCCATCCGACAT 3' und  
5' GATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'  
(NM-004048)

(Primersequenzen freundlicherweise bereitgestellt von Dr. rer. nat. F. Grünebach, Tübingen, Deutschland).

Die PCR erfolgte im *Thermocycler Gene Amp PCR System 9600* (Pekin Elmer Life Science, Wellesley, USA).

*Pre-Treatment:* 2 min bei 94 °C  
30 Zyklen: Denaturierung: 30 s 94 °C  
*Annealing:* 30 s 59 °C  
DNA-Synthese: 60 s 72 °C  
Extensionsschritt: 5 min 72 °C

### 2.12.3 Gelelektrophorese

#### 2.12.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge zu analytischen und präparativen Zwecken aufgetrennt werden. Die Trennung nach Molekülgröße beruht dabei auf dem Molekularsiebeffekt des Gelmaterials. Dabei hängt der Bereich der Fragmentlängen, die effizient getrennt werden, von der Agarosekonzentration ab. Gele der üblichen Konzentration von 0,5-2 % Agarose trennen DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Größe auf. Hier wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet.

Die Nukleinsäuren werden durch Ethidiumbromid<sup>101</sup> visualisiert. Diese Substanz interkaliert in die DNA und wird durch UV-Licht in diesem Zustand zur Fluoreszenz angeregt.

Die entsprechende Menge an Agarose wird mit der berechneten Menge an 1 x TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle unter mehrmaligem vorsichtigem Aufkochen gelöst. Daraufhin wird Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gel) zugegeben und das leicht abgekühlte Gel in die bereitstehenden Gelkammern gegossen. Nach Erhärten des Gels und Befüllen der Kammer mit 1 x TAE-Puffer werden die Proben mit 6-fach Ladepuffer versetzt und in die vorgesehenen Geltaschen aufgetragen. Als Größenmarker wurden 6 µl *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 70 V. Die Banden wurden mit Hilfe des *Biometra Bio Doc* visualisiert und dokumentiert.

### 2.12.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen, die im Anschluss in einem *Western Blot* detektiert werden können. SDS führt dabei zu einer Überdeckung der proteinspezifischen Ladungen, die Protein-SDS-Komplexe haben eine einheitliche Form und ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis. Dadurch werden die Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wird dem Probenpuffer Dithiothreitol (DTT) beigemischt.

Hier wird die diskontinuierliche SDS-Page eingesetzt, bei der durch Vorschaltung eines Sammelgels eine starke Fokussierung der Proteinbanden und damit eine verbesserte Trennleistung erreicht wird.

Tabelle 2.9: Material SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<b>Material</b>	<b>Trenngel 15 %</b>	<b>Sammelgel 6 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	1,75 ml	6,0 ml
1 M Tris pH 8,8	5,6 ml	-
2 M Tris pH 6,7	-	1,9 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	7,5 ml	2 ml
10 % SDS	150 µl	100 µl
TEMED	10 µl	5 µl
10 % APS	100 µl	100 µl

Es wurde zunächst ein 15 % Trenngel gegossen und bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Daraufhin wurde dieses entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und gleichzeitig ein Kamm zur Bildung von Auftragsaschen eingeschoben. Nach Polymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in die SDS-Page-Kammer *Mini-Protean 3 Electrophoresis System* eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig entnommen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Ziel war eine Lademenge von 30 µg Protein in einem Endvolumen von 20 µl, was durch Auffüllen mit der entsprechenden Menge NP40 Puffer erreicht wurde. Jedem Ansatz wurden dann noch 10 µl 2 x-Ladepuffer zugegeben und die Ansätze vier Minuten gekocht. 1,5 µl Größenmarker *Biotinylated SDS Page Standards Low Range* wurden im Verhältnis 1:10 mit Ladepuffer versetzt, 30 Sekunden gekocht und aufgetragen. Zusätzlich wurden 7 µl *Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Marker* geladen. Dieser hat den Vorteil, dass die einzelnen Banden auf Grund ihrer Färbung schon während des Laufs sichtbar sind.

Die Auftrennung erfolgte bei 120 Volt über eine Stunde.

### **2.12.4 Herstellung der Zelllysate und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die als Pellet vorliegenden Tumorzellen wurden auf Eis 10 Minuten lang mit 200-300 µl (je nach Pelletgröße) NP40 Lysispuffer durch mehrmaliges Aufziehen des Zelllysates mit der Pipette lysiert.

Daraufhin wurden die Überstände bei 14000 rpm und 4 °C fünf Minuten abzentrifugiert und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *BCA Protein Assay Reagent Kit* nach Anweisung des Herstellers für *Microplates* im *Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow*.



### 2.12.5 Western Blot

Der *Western Blot* ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen, die durch denaturierende SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine entsprechende Membran (hier: Nitrocellulose) transferiert, und nach Bindung von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden können.

Beim *Blotten* erfolgt der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Hierzu wurde ein *Sandwich* in folgender Orientierung gebildet: mit Transferbuffer durchtränkte Schwämme, Filterpapier, Gel, Nitrocellulose Membran, Filterpapier, Schwämme. Dieses wurde luftblasenfrei in die *Western Blot Kammer Mini trans Blot Cell* eingespannt (Anode unten, Kathode oben) und im *Transferbuffer* bei 350 mA über 1,5 Stunden bei 4 °C *geblottet*.

Danach wurde die Membran in 4 % *Slim Fast* Lösung (SFL, gelöst in TBST 0,5 %) eine Stunde lang bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Der Survivin-Antikörper (AF 886, rabbit polyklonal, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde in 2,5 % SFL 1:1000 verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten lang in 2,5 % SFL gewaschen.

Zur Bindung des Zweit-Antikörpers (*Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG sc-2054*, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) wurde dieser im Verhältnis 1:5000 in 2,5 % SFL bei RT 60 Minuten inkubiert. Dieser ist gegen alle Hasen-Proteine gerichtet und ist konjugiert mit einer Peroxidase, die die Detektion mit dem *ECL<sup>TM</sup> Plus* System ermöglicht.

Der Teil der Membran, auf dem sich der biotinylierte Größenmarker befand, wurde nach dem Transfer abgeschnitten und gesondert behandelt. Hierbei wurde er mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin im Verhältnis 1:10000 in 0,5 % TBST 60 Minuten bei RT inkubiert.

Beide Membranabschnitte wurden im Anschluss daran gewaschen (2 x 5 min 0,5 % TBST, 1 x 5 min 3 % TBST, 2 x 5 min 0,5 % TBST, 1 x 5 min TBS). Beim Größenmarker wurde der 3 % TBST-Waschschritt durch einen mit 0,5 % TBST ersetzt.

Die Detektion erfolgte mit dem *ECL<sup>TM</sup> Plus System*. Reagenz A und B des *ECL<sup>TM</sup> Plus Systems* wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Die Membran wurde in dieser Lösung eine Minute geschwenkt und in Folie gepackt. Das in der *ECL<sup>TM</sup>-Lösung* enthaltene *Lumigen PS-3 Acridin* Substrat wird durch die Antikörper-gebundene Peroxidase oxidiert. Das Produkt luminesziert und färbt den in einer Röntgenfilmkassette aufgelegten Autoradiographiefilm an der entsprechenden Stelle und detektiert dadurch das gesuchte Protein. Die Belichtungszeit lag zwischen 10 s und 1 min.

Um zu zeigen, dass jeweils identische Proteinmengen geladen wurden, wurde die Membran anschließend 3 x 5 min in 0,5 % TBST gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem polyklonalem Actin-Antikörper (Actin I-19, Ziege polyklonal) 1:5000 in 2,5 % SFL inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang (3 x 5 min in 3,5 % SFL) erfolgte die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper 1:2000 in 2,5 % SFL für 60 min (*horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG*). Die Visualisierung erfolgte mit dem oben beschriebenen System.

### **2.13 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Das verwendete Blut stammte aus *Buffy coats* gesunder Spender der Blutspendezentrale Tübingen. Zur Auftrennung des Blutes wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Das eingesetzte Ficoll hat dabei eine größere Dichte als *peripheral blood mononuclear cells* (PBMNC) und eine geringere als die von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Beim Zentrifugieren bildet sich auf dem Ficoll eine weiße Schicht von PBMNC, die leicht abgenommen werden kann.

Je 12 ml Ficoll werden in sechs 50 ml Röhrchen vorgelegt. Das Blut wird 1:1 mit PBS verdünnt und dieses Gemisch vorsichtig dem Ficoll überschichtet. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation in der Zentrifuge Heraeus 1.0 R (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: 1900 rpm, RT, 20 min, ohne Bremse. Die sich nun abzeichnende weiße Schicht zwischen Ficoll und Serum beinhaltet die PBMNC und wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Es folgen ein zweimaliges Waschen der PBMNC mit 40 ml PBS durch Zentrifugation bei 1400 rpm, RT, 5 min. Das sich dabei bildende Zell-Pellet wird in X-Vivo Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

## **2.14 *Ex-vivo* Generierung von dendritischen Zellen**

Die so gewonnenen PBMNC werden in Sechs-Well-Zellkulturplatten in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro well suspendiert und in 3 ml X-Vivo Medium ausplattiert. Die Zellen werden so über 2 h im Brutschrank inkubiert, dabei adhärieren die CD14+ Monozyten spezifisch an den Kunststoff der Zellkulturplatten. Anschließend werden die Überstände abgenommen und die Platten mehrmals mit kaltem PBS gespült. Die im Überstand befindlichen nicht adhärenten Zellen (NAZ) werden - wie auch die nicht verwendeten PBMNC - in Kryoröhrchen  $\grave{a}$   $1 \times 10^7$ /ml Medium unter Zugabe von 10 % DMSO bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Platten werden nun mit 3 ml RP 10 Medium pro well befüllt und unter Zugabe folgender Zytokine an Tag 0, 2, 4 und 6 zur Differenzierung in reife dendritische Zellen im Brutschrank aufbewahrt:

IL-4 (1000 IU/ml)

GM-CSF (100 ng/ml)

TNF- $\alpha$  (10 ng/ml).

Nach einer Woche können die ausgereiften DC zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt werden.

## 2.15 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)

Durch Beladung dendritischer Zellen mit aus Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden, können spezifische CTL induziert werden. Dazu werden beladene DC mit autologen PBMNC co-kultiviert. Die DC präsentieren die MHC-gebundenen Peptide den spezifischen naiven T-Zellen über deren T-Zell-Rezeptor. Es kommt nach Aktivierung der T-Zellen zu deren Expansion.

Nach 7 Tagen erfolgt eine Restimulation, die bis zu drei Mal wiederholt wird. Dabei werden autologe PBMNC mit dem entsprechenden Peptid inkubiert und zu den Kulturen gegeben. Zur Wachstumsstimulation werden 2 ng/ml IL-2 zugeführt.

Zur Induktion werden  $5 \times 10^5$  DC pro well mit 50 µg des synthetisch hergestellten Peptids in 1 ml Medium über zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgt zweimaliges Waschen der DC mit PBS.

$2,5 \times 10^6$  autologe PBMNC pro well werden mit den DC zusammen geführt und in 2 ml RP 10 Medium in 24-Well-Zellkulturplatten über sieben Tage im Brutschrank inkubiert.

Zur Restimulation werden  $2,5 \times 10^6$  autologe PBMNC pro well aufgetaut, gewaschen und mit 50 µg synthetischem Peptid in 1 ml RP 10 Medium über zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Währenddessen werden die induzierten Zellen aus den 24-Well-Platten durch mehrmaliges Spülen mit eiskaltem PBS entfernt. Die Zellzahl wird bestimmt und die Zellen werden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ /well in je 1 ml RP 10 erneut in 24-Well-Platten ausplattiert. Die autologen PBMNC werden nach der Inkubation 11,3 Minuten mit 30 Gray bestrahlt, gewaschen und in einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$ /ml pro well zu den induzierten Zellen gegeben. An den Tagen 0, 2, 4, 6 werden den Kulturen 2 ng/ml IL-2 zugegeben. Nach 7 Tagen und eventuell nochmals nach 14 Tagen wird die Restimulation wiederholt. An Tag 5 nach der letzten Restimulation erfolgt dann der Einsatz der CTL in einem *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay.

## 2.16 Chrom<sup>[51Cr]</sup>-Release-Assay

Das Chrom<sup>[51Cr]</sup>-Release-Assay dient der Überprüfung der Zytotoxizität von Effektorzellen (CTL). Dabei werden sogenannte *Targets* (Zielzellen) mit radioaktiv-markiertem Chrom<sup>[51Cr]</sup> (<sup>[51Cr]</sup>-Natrium-Chromat) inkubiert, das von den Zielzellen inkorporiert wird. Daraufhin wird das restliche freie Chrom abgewaschen und die markierten Zielzellen mit den Effektorzellen in Kultur gebracht. Werden die *Targets* von den CTL erkannt und lysiert, so tritt Chrom<sup>[51Cr]</sup> aus. Die Überstände werden abgenommen und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen. Die Tumorzelllinie K 562 wird zum Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in jedem Chrom<sup>[51Cr]</sup>-Release-Assay eingesetzt.

Zellen dieser CML-Linie exprimieren keine MHC-Klasse-I Moleküle und können auf Grund dessen von NK-Zellen erkannt und zerstört werden.

T2 Tumorzellen werden zwei Stunden im Brutschrank mit 50 µg synthetischem Peptid (Survivin oder irrelevantes Peptid, z.B. HIV oder Adipophilin) in 1 ml Medium beladen. T2 Tumorzellen fehlt der TAP (*transport associated with antigen processing*), der die im Zytosol durch das Proteasom entstandenen Peptide ATP-abhängig in das ER (endoplasmatisches Retikulum) transportiert. Hier findet der Zusammenbau des Peptids mit dem MHC-I Molekül statt. Dieser Komplex wird schließlich über den Golgi-Apparat in exozytotischen Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Die MHC-I Moleküle der T2 Tumorzellen enthalten keine endogenen Peptide und können daher von außen mit den entsprechenden Peptiden sehr effizient beladen werden. Anschließend werden die Zellen gewaschen und eine Stunde mit Chrom<sup>[51Cr]</sup> inkubiert (10 µl pro *Target*). Gleichzeitig werden alle anderen Tumorzellen, die als *Targets* dienen mit Chrom<sup>[51Cr]</sup> markiert. Das freie Chrom<sup>[51Cr]</sup> wird abgewaschen und die Zielzellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro well in 100 µl RP 10 Medium auf 96-Well-Platten verteilt. Dabei wird von jeder Zelllinie eine Reihe (entspricht 12 wells) belegt. In der Zwischenzeit werden die spezifischen CTL mit kaltem PBS aus den Platten gelöst, gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Entsprechend der Anzahl an Zielzellen werden CTL-Verdünnungsreihen hergestellt. Die Verdünnungsreihe beginnt mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  CTL im Effektor- zu *Target*-Zellen Verhältnis (E:T) 30:1 im ersten well, welches in 5 Schritten jeweils gedrittelt wird (10:1 im zweiten, 3:1 im dritten, gefolgt von 1:1, 0.3:1, 0.1:1 im vierten bis sechsten well). Zur Ermittlung der spontanen Chrom[ $^{51}\text{Cr}$ ]-Freisetzung durch die *Targets* werden in 3 wells, die nur *Targets*, jedoch keine CTL enthalten 100  $\mu\text{l}$  reines RP 10 Medium gegeben.

Die übrigen 3 wells pro *Target*-Zelllinie werden zur Ermittlung der maximalen Chrom[ $^{51}\text{Cr}$ ]-Freisetzung mit je 100  $\mu\text{l}$  2 % Triton X-100, welches die Zellmembranen zerstört, gefüllt. Nach vierstündiger Inkubation der Platten im Brutschrank, werden pro well 50  $\mu\text{l}$  des Überstands abgenommen und auf *Luma Plates<sup>TM</sup>-96* (Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande) überführt.

Die Platten trocknen über Nacht, die Radioaktivität wird dann gemessen (1205 *Betaplatte liquid scintillation counter*, Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland). Die prozentuale spezifische Lyse wird nach folgender Formel ermittelt:

$$100 \times \frac{(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}{(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})} = \% \text{ spez. Lyse}$$

### 2.16.1 *Cold Target Inhibition*

Zur Überprüfung der Antigenspezifität der Lyse wurden *Cold Target Inhibition Chrom[ $^{51}\text{Cr}$ ]-Release-Assays* durchgeführt. Dabei werden T2 Tumorzellen mit relevantem (Survivin) Peptid beladen, jedoch nicht mit Chrom[ $^{51}\text{Cr}$ ] markiert (*Cold Target*). Diese T2 Zellen werden dann zu Chrom[ $^{51}\text{Cr}$ ]-markierten *Target*-Zellen (*Hot Target*, z.B. A 498) in je 50  $\mu\text{l}$  Medium im Verhältnis 20:1 gegeben. Die als *Hot Target* eingesetzte Tumorzelllinie präsentiert das Survivin-Peptid auf ihrer Oberfläche. Da die *Cold Targets* jedoch im Überschuss im Ansatz vorhanden sind, werden praktisch nur sie von den spezifischen CTL lysiert.

D.h. die *Hot Targets* bleiben erhalten und somit wird auch kein Chrom<sup>[51Cr]</sup> freigesetzt.

Parallel dazu wird noch ein Ansatz durchgeführt, bei dem die T2 Zellen mit einem irrelevanten Peptid (z.B. Adipophilin, HIV) beladen werden und somit von den für Survivin spezifischen CTL nicht erkannt werden. Die eingesetzten Chrom<sup>[51Cr]</sup>-markierten *Hot Targets* werden jedoch lysiert und Chrom<sup>[51Cr]</sup> freigesetzt.

### **2.16.2 Antikörper-Blockierung im *Chrom<sup>[51Cr]</sup>-Release-Assay***

Um die HLA-A2 Restriktion der spezifischen CTL nachzuweisen, wurden Ansätze mit Antikörper-Blockierung durchgeführt. Dazu wurden Chrom<sup>[51Cr]</sup>-markierte *Targets* (z.B. Survivin-exprimierende Tumorzelllinie A 498) in 1 ml Medium mit einem gegen HLA-A2 gerichteten Antikörper (MoAb BB7.2 (IgG2b)) inkubiert. Der an das HLA-A2 bindende Antikörper verhindert das Erkennen des MHC-Peptid Komplexes durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor der CTL und dadurch die Lyse der *Targets*.

Zur Kontrolle dieses Ansatzes wurde parallel ein Ansatz mit unspezifischem Maus-Antikörper durchgeführt. Dieser sollte die Erkennung des MHC-Peptid Komplexes durch spezifische CTL nicht blockieren und dadurch ein Lyse zulassen.

## **2.17 Isolierung und Aktivierung von B- und T-Zellen**

B- und T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Blutspender der Blutspendezentrale Tübingen oder von CLL Patienten mittels MACS Technologie (*magnetic associated cell sorting*) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden zunächst PBMNC über Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen (siehe 2.6).

Prinzip der Isolation ist eine Antikörper-Bindung an Oberflächen-Moleküle der zu isolierenden Zellen. Die Antikörper sind an magnetische Partikel gekoppelt, die dann über eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, isoliert werden können. Antikörper-markierte Zellen verbleiben in der Säule, während nicht-markierte Zellen durchfließen. Die markierten Zellen können nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld aus der Säule eluiert werden. Es ist auch möglich, all diejenigen Zellpopulationen zu markieren, die man von der zu isolierenden abtrennen möchte, so dass die gewünschten Zellen im Durchfluss zu finden sind (*untouched isolation*).

Für die T-Zell Aufreinigung wurde dieses Verfahren verwendet (*Pan T cell Isolation Kit*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland), während die Aufreinigung der B-Zellen über positive Isolation erfolgte (*CD19 Microbeads*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Auf diese Weise aufgereinigte T-Zellen wurden über Nacht durch Inkubation mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (35 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) aktiviert.

Die Aktivierung der B-Zellen erfolgte durch Inkubation mit sCD40L (1 µg/ml) und IL-4 (10 µg/ml) über Nacht bei 37 °C.

## 2.18 Elektroporation von DC

Die Elektroporation ist eine Methode zur Transfektion von Zellen.

Hier wurde RNA eingesetzt, die aus Survivin-exprimierenden Tumorzelllinien isoliert wurde (siehe 2.5.1). Als Kontrolle wurde ein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) *in-vitro*-Transkript eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Dr. med. Martin R. Müller, Tübingen, Deutschland).

Unreife DC wurden am Tag 6 zweimal mit X-Vivo Medium gewaschen und in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  DC/ml Medium aufgenommen. 200 µl Zellsuspension wurden mit 10 µg RNA in einer 4 mm Kuvette mit dem *Easyject Plus unit Elektroporationsgerät* (PepLab, Erlangen, Deutschland) elektroporiert.

Die Einstellungen des Geräts waren folgende:

Spannung 300 V, Widerstand 1540 Ω, Kapazität 150 µF, Impulszeit 231 ms.



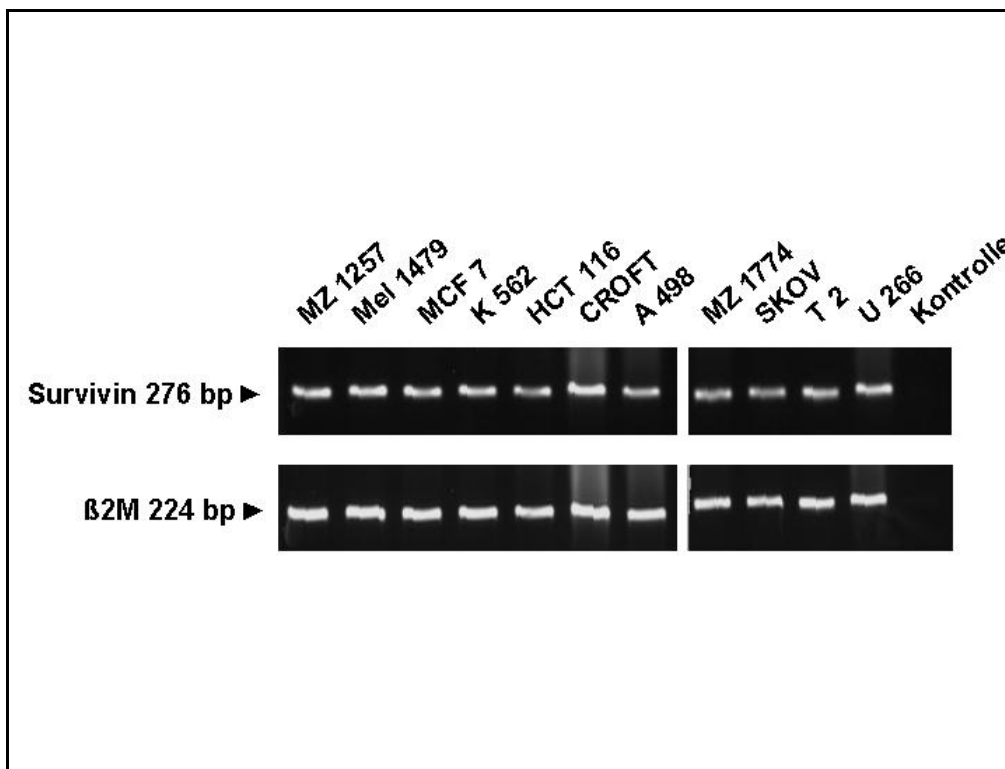
Nach der Elektroporation wurden die DC sofort in mit GM-CSF und IL-4 komplementiertes RP 10 Medium aufgenommen und in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurden die transfizierten Zellen als Zielzellen in *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-Release-Assays eingesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 PCR und *Western Blot* Analyse der Tumorzelllinien

Eine Expression von Survivin wurde für eine Vielzahl humaner Neoplasien beschrieben, zum Beispiel im malignen Melanom, Harnblasenkarzinom, Mammakarzinom und oralen Neoplasien<sup>69; 111; 114; 115</sup>.

Zur Überprüfung der Expression in den hier verwendeten Tumorzelllinien wurde zunächst das Vorkommen von Survivin mRNA mittels RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse wurden in wiederholten Experimenten bestätigt.



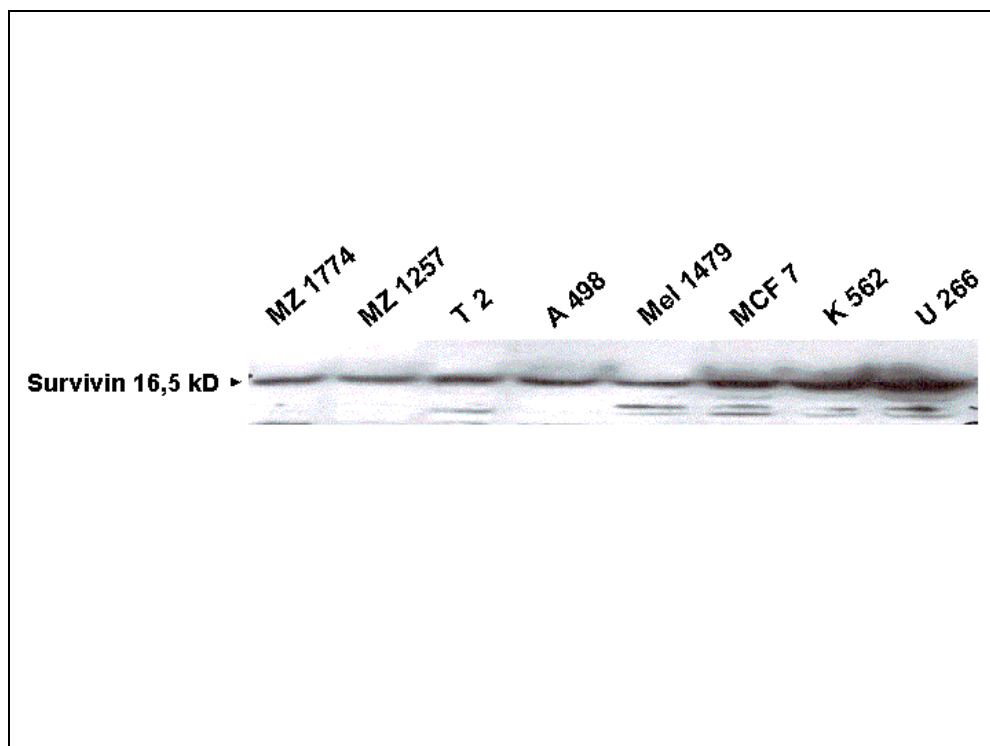
**Abb. 3.1:** Exemplarische Darstellung einer durchgeführten RT-PCR: Als Kontrollen wurde ein Ansatz ohne Zugabe von cDNA (Kontrolle), sowie parallel eine PCR unter Verwendung von  $\beta_2$ -Mikroglobulin Primern ( $\beta_2$ M) durchgeführt.

## Ergebnisse

---

Zur Kontrolle von Integrität und Expressionsausmaß wurde eine RT-PCR mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin spezifischen Primern durchgeführt. Survivin mRNA konnte in jeder untersuchten Tumorzelllinie detektiert werden (A 498, CROFT, HCT 116, K 562, MCF 7, Mel 1479, MZ 1257, MZ 1774, SKOV, T2, U 266). Eine Kontamination der Reagenzien wurde durch die Negativkontrolle ausgeschlossen.

Die Proteinexpression von Survivin wurde im *Western Blot* für alle eingesetzten Tumorzelllinien untersucht. In Abbildung 2 sind beispielhaft acht, der elf eingesetzten Tumorzelllinien dargestellt.



**Abb. 3.2:** Exemplarische Darstellung eines *Western Blot* durchgeführt mit einem polyklonalen Survivin Antikörper. MZ 1774, MZ 1257, T2, A 498, Mel 1479, MCF 7, K 562 und U 266 sind verwendete humane Tumorzelllinien (siehe Tabelle 3.1: Expression von Survivin in Tumorzelllinien).

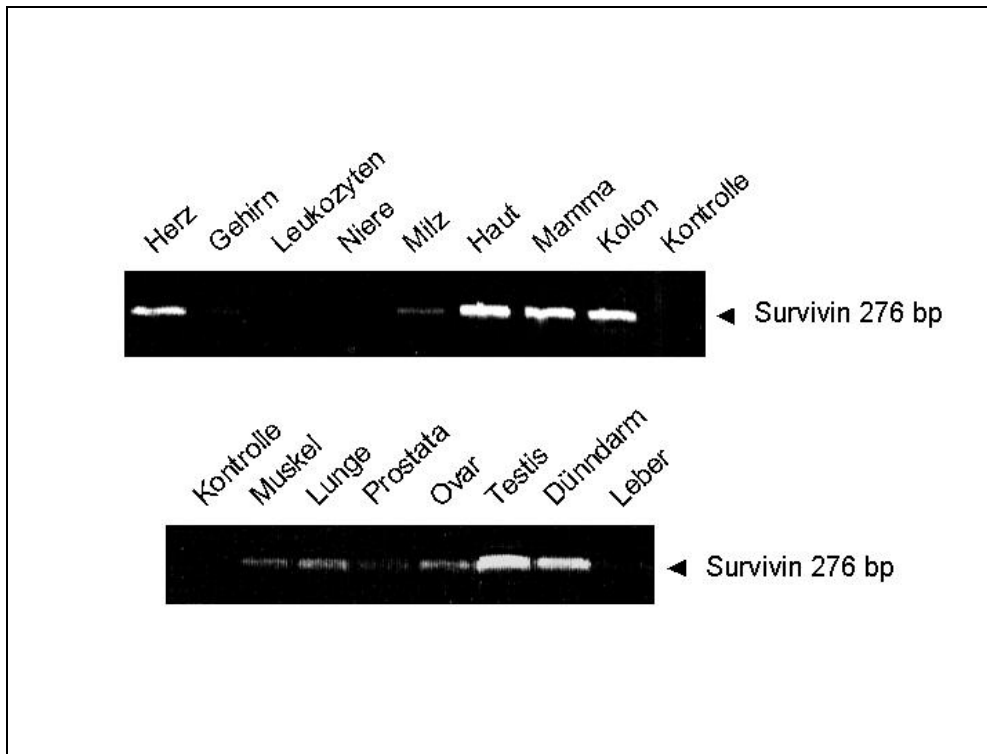
Die Ergebnisse zur Survivin-Transkription und -Expression sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Expression von Survivin in Tumorzelllinien.

<b>Tumorzelllinie</b>	<b>Ursprung</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Western Blot</b>
A 498	Nierenzellkarzinom	+	+
Croft	EBV-immortalisierte B-Zelllinie	+	+
HCT 116	Kolonkarzinom	+	+
K 562	CML	+	+
MCF 7	Mammakarzinom	+	+
Mel 1479	Malignes Melanom	+	+
MZ 1774	Nierenzellkarzinom	+	+
MZ 1257	Nierenzellkarzinom	+	+
SK-OV-3	Ovarialkarzinom	+	+
T2	Humanes Hybrid aus B- Zelllinie und T- Lymphoblasten Zelllinie, TAP-defizient	+	+
U 266	Multiples Myelom	+	+

### 3.2 PCR Analyse humaner Gewebe

Die cDNA von 15 verschiedenen menschlichen Geweben wurde in eine PCR eingesetzt und auf die Expression von Survivin hin untersucht. In einigen gesunden Geweben konnte keine Survivin mRNA detektiert werden (Gehirn, Leukozyten, Niere und Leber), während in Muskel, Lunge, Prostata, Ovar, Herz, Haut, Mamma, Kolon, Dünndarm und Milz eine Expression nachweisbar war.



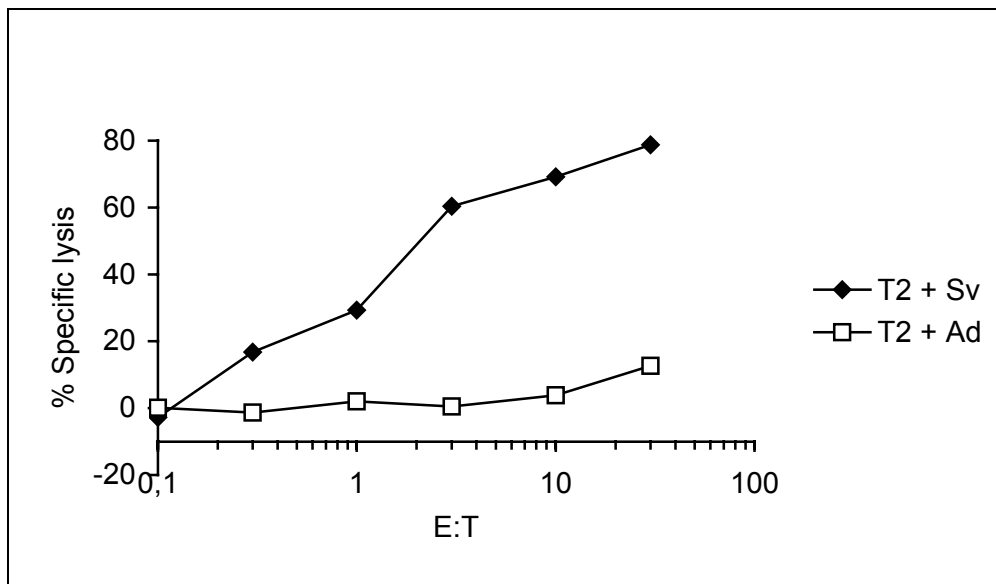
**Abb. 3.3:** PCR aus cDNA gesunder humaner Gewebe. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA durchgeführt (Kontrolle).

### 3.3 *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-Release-Assays

Um zu analysieren, ob in den verwendeten Survivin-exprimierenden Tumorzelllinien auch eine Antigenprozessierung dieses Proteins und darauf folgend eine Präsentation in Form von MHC-gebundenen Epitopen statt findet, wurden *in vitro* Survivin-spezifische CTL induziert. DC wurden dazu über Plastik-Adhärenz aus PBMC HLA-A2 positiver Spender generiert, mit einem kürzlich beschriebenen Survivin-Peptid<sup>97</sup> beladen, und als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt. Die nach zweimaliger Restimulation gewonnenen CTL wurden zur Beurteilung ihrer Zytotoxizität in *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-Release-Assays eingesetzt.

### 3.3.1 Antigen-spezifische Lyse von Peptid-beladenen Zielzellen

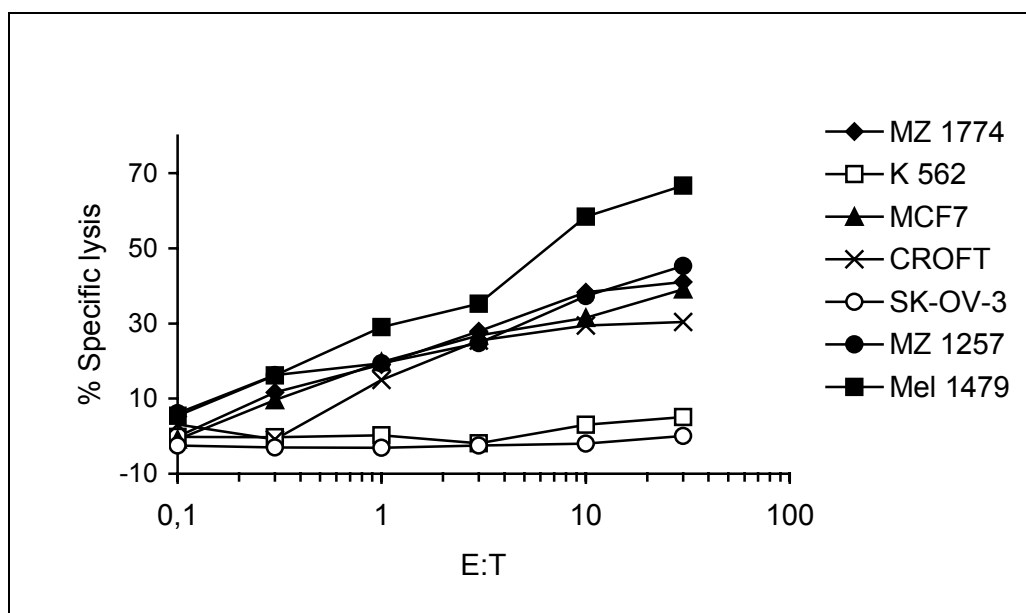
Um die Antigen-spezifität der generierten CTL zu analysieren, wurden TAP-defiziente T2 Zellen mit verschiedenen Peptiden beladen. T2 Zellen, die mit dem HLA-A2 bindenden Survivin-Peptid inkubiert wurden, zeigten Lyseraten von bis zu 80 %, während T2 Zellen, die mit irrelevantem Adipophilin-Peptid beladen wurden, von den CTL nicht erkannt wurden.



**Abb. 3.4:** Standard  $Chrom[^{51}Cr]$ -Release-Assay zur Analyse der Antigen-spezifität. Survivin-spezifische CTL erkennen und lysieren T2 Zellen, die mit antigenem Survivin-Peptid beladen wurden (T2 + Sv), während diejenigen, die ein irrelevantes Peptid präsentieren (T2 + Ad) nicht lysiert werden.

### 3.3.2 Erkennung Survivin-exprimierender Tumorzellen durch spezifische CTL

In den folgenden Experimenten sind die Lyseraten Survivin-exprimierender Tumorzellen epithelialen und hämatologischen Ursprungs durch spezifische CTL dargestellt. Dazu wurden folgende Tumorzelllinien, die alle Survivin exprimieren, in *Chrom<sup>51</sup>Crj-Release-Assays* eingesetzt: A 498, CROFT, MCF 7, Mel 1479, MZ 1257 und MZ 1774, SK-OV-3 (HLA-A3) und K 562.



**Abb. 3.5:** Exemplarisches Standard *Chrom<sup>51</sup>Crj-Release-Assay* der Tumorzelllinien. Als Zielzellen wurden folgende Survivin-exprimierende Tumorzelllinien eingesetzt. MZ 1774 (HLA-A2), MZ 1257 (HLA-A2), Mel 1479 (HLA-A2), MCF 7 (HLA-A2), CROFT (HLA-A2), SK-OV-3 (HLA-A3), K 562 (kein HLA).

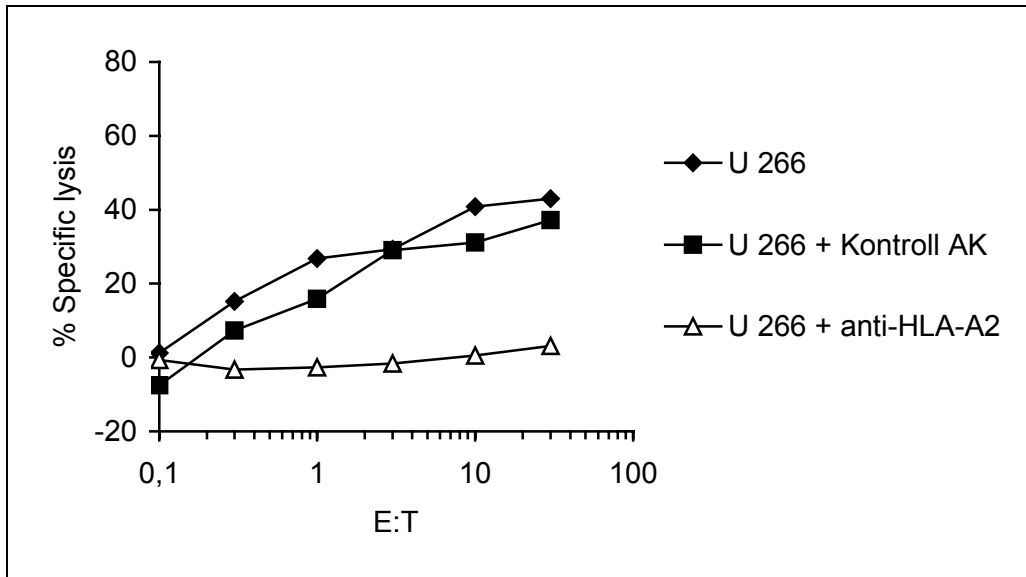
Es zeigte sich, dass die CTL die eingesetzten Zielzellen HLA-A2 restringiert lysieren. Die Ovarialkarzinom-Zelllinie SK-OV-3 wurde – trotz Survivin-Expression – auf Grund fehlender Expression des HLA-A2 Moleküls nicht lysiert. Somit ist für eine erfolgreiche Erkennung und Lyse der Tumorzellen durch die generierten Survivin-spezifischen CTL eine Präsentation des spezifischen Epitops durch HLA-A2 Moleküle notwendig.

Zum Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurde die Kontroll-Zelllinie K 562 eingesetzt.

### 3.3.3 Überprüfung der HLA-Restriktion durch Antikörper-Blockierung

Um zu überprüfen, ob die CTL tatsächlich HLA-A2 restringiert lysieren, wurden Blockierungsversuche durchgeführt. Dazu wurde ein HLA-A2 bindender Antikörper verwendet. Als Zielzelle diente U 266, eine HLA-A2 positive Zelllinie, die Survivin exprimiert. Die Zellen wurden effizient lysiert.

Durch Inkubation mit dem HLA-A2 bindenden Antikörper konnte die Lyse jedoch erfolgreich blockiert werden (U 266 + anti-HLA-A2). Zum Nachweis der spezifischen Bindung wurde ein Ansatz mit einem Kontroll-Immunglobulin (U 266 + Kontroll AK) durchgeführt, was keine Auswirkungen auf die Zytotoxizität der CTL hatte.

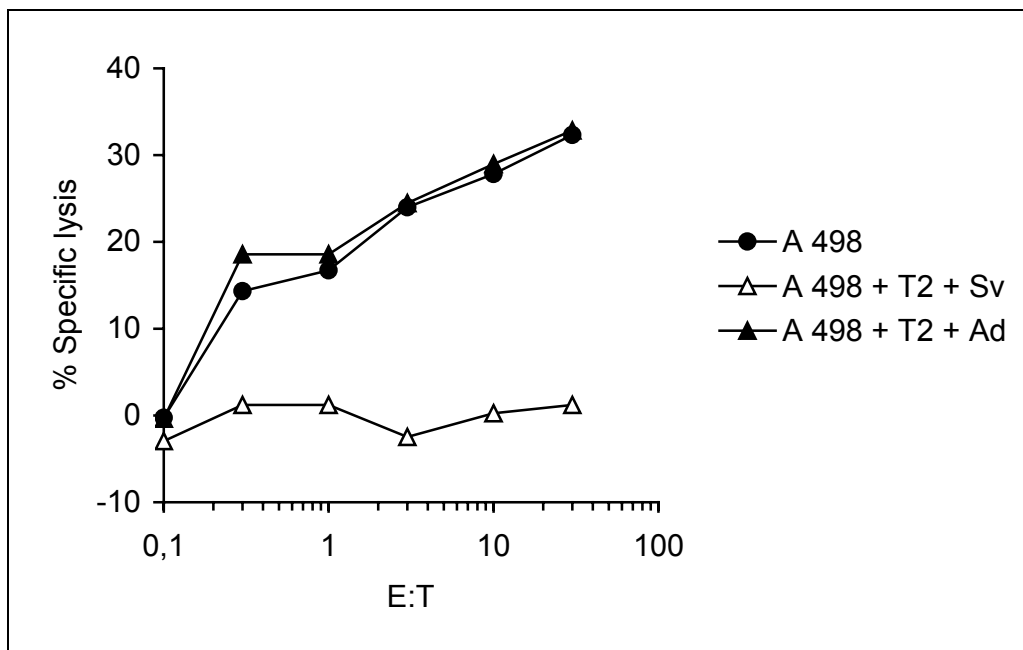


**Abb. 3.6:** Antikörper-Blockierung im  $Chrom[^{51}Cr]$ -Release-Assay. Inkubation der Tumorzelllinie U 266 (Myelom) mit einem HLA-A2 spezifischen monoklonalen Antikörper (MoAb BB7.2 (IgG2b)) inhibiert die Lyse der Tumorzellen (U 266 + anti-HLA-A2). Zur Kontrolle wurde ein irrelevantes Immunglobulin (U 266 + Kontroll AK) eingesetzt.



### 3.3.4 Überprüfung der HLA-Restriktion und Antigen-spezifität in *Cold Target Inhibition Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assays*

Zur weiteren Analyse der HLA-Restriktion und Antigen-spezifität wurden *Cold Target Inhibition Assays* durchgeführt. Hier hemmen die in 20-fach höherer Konzentration vorliegenden *Cold Targets* (nicht Chrom-markiert) die Lyse der *Hot Targets* (Chrom-markiert). Es wurde die Survivin-exprimierende Nierenzellkarzinom-Linie A 498 verwendet, die in Vorversuchen sehr effizient lysiert wurde. Die Zugabe Survivin-beladener, nicht Chrom-markierter T2 Zellen (*Cold Target*) im Verhältnis von 20:1 verhinderte die Lyse der A 498 (*Hot Target*) Zellen (A 498 + T2 + Sv).

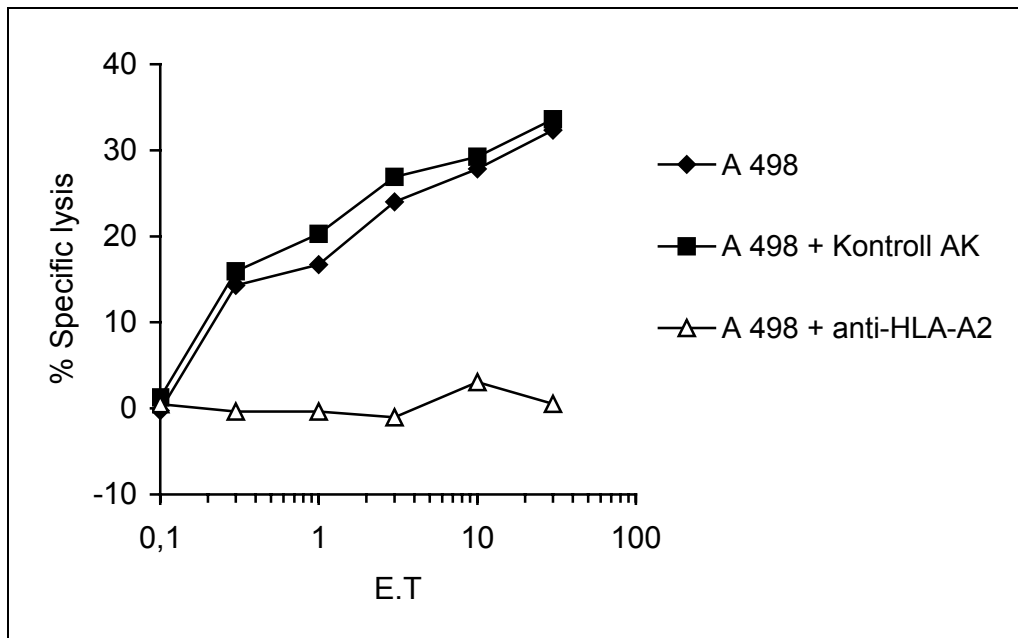


**Abb. 3.7:** *Cold Target Inhibition* im *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay*. *Cold Target Inhibition* erfolgte durch Zugabe von Survivin beladenen T2 Zellen (TAP defizient) zu Zellen der Nierenkarzinom-Zelllinie A 498 im Verhältnis *Cold Target* : *Hot Target* = 20:1 (A 498 + T2 + Sv) und zur Kontrolle Einsatz von T2 Zellen, die mit irrelevantem Adipophilin beladen wurden als *Cold Target* (A 498 + T2 + Ad).

## Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde gleichzeitig ein Ansatz durchgeführt, in dem den Chrommarkierten A 498 Zellen (*Hot Target*) im oben genannten Verhältnis T2 Zellen (*Cold Target* : *Hot Target* = 20:1) zugegeben wurden, die mit einem irrelevanten Peptid (hier: Adipophilin) beladen waren (A 498 + T2 + Ad).

Im gleichen Ansatz wurde erneut die HLA-A2 restringierte Lyse der Tumorzellen (A 498) mit Hilfe des blockierenden anti-HLA-A2 Antikörpers bestätigt (Abb. 3.8). Wie in Abb. 3.6 konnte durch die Hinzugabe des Antikörpers die zytotoxische Aktivität der CTL sehr effizient inhibiert werden.



**Abb. 3.8:** Antikörper-Blockierung im *Chrom*<sup>[51Cr]</sup>-Release-Assay. Antikörper-Blockierung der Lyse von A 498 (Nierenzellkarzinom) durch Inkubation mit einem HLA-A2 spezifischen Antikörper (A 498 + anti-HLA-A2), zur Kontrolle Inkubation mit einem irrelevanten Immunglobulin (A 498 + Kontroll AK).

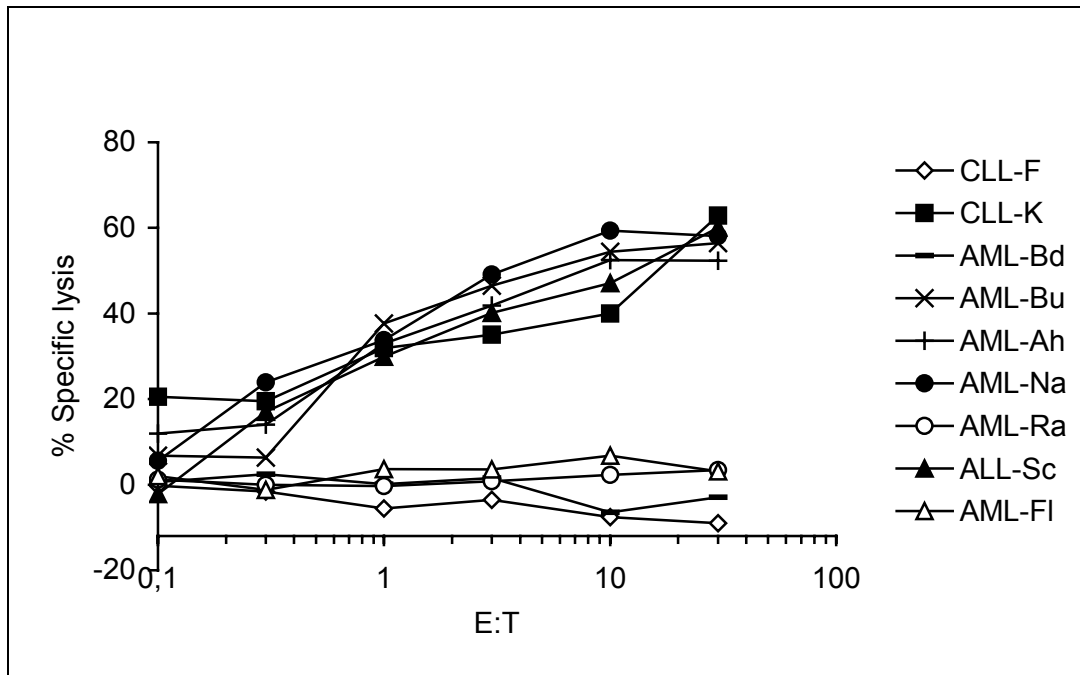
### 3.4 Lyse primärer Leukämie-Zellen

Im folgenden Experiment kamen primäre Tumorzellen von Leukämiepatienten zum Einsatz. Isoliert wurden maligne Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer (CLL), akuter lymphatischer (ALL) und akuter myeloischer Leukämie (AML) und bekanntem HLA-Status (Tabelle 3.2). Die Survivin Expression in den malignen Zellen wurde mittels RT-PCR überprüft und bestätigt.

Tabelle 3.2: HLA-Status der eingesetzten primären Leukämie-Zellen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>HLA-Status</b>
CLL-F	Chronisch lymphatische Leukämie	HLA-A2-
CLL-K	Chronisch lymphatische Leukämie	HLA-A2+
AML-Bd	Akute myeloische Leukämie	HLA-A2-
AML-Bu	Akute myeloische Leukämie	HLA-A2+
AML-Ah	Akute myeloische Leukämie	HLA-A2+
AML-Na	Akute myeloische Leukämie	HLA-A2+
AML-Ra	Akute myeloische Leukämie	HLA-A2-
ALL-Sc	Akute lymphatische Leukämie	HLA-A2+
AML-Fi	Akute lymphatische Leukämie	HLA-A2-

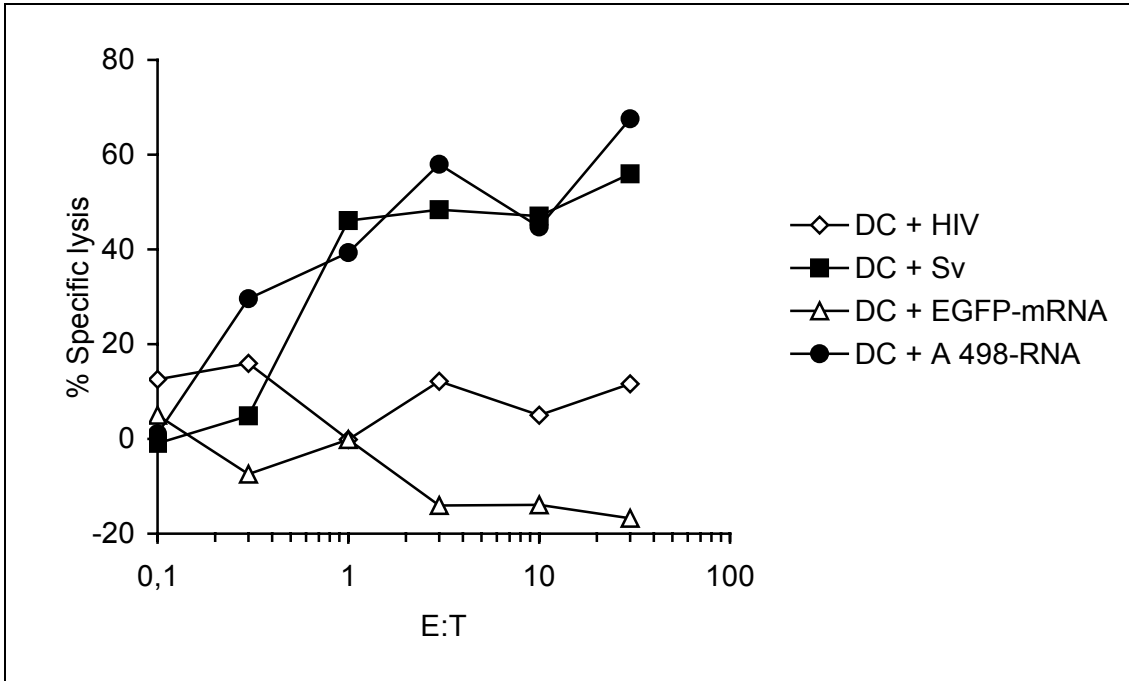
Es zeigte sich eine effiziente Lyse primärer Leukämiezellen, die von HLA-A2 positiven Spendern stammten. Bei HLA-A2 negativen Spendern blieb eine Lyse aus.



**Abb. 3.9:** *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay primärer Leukämie-Zellen. Survivin-spezifische CTL lysieren HLA-A2 positive primäre Leukämie-Zellen (CLL-K, AML-Bu, AML-Ah, AML-Na, ALL-Sc) während maligne Zellen von Patienten mit negativem HLA-A2 Status nicht erkannt werden (CLL-F, AML-Fi, AML-Ra, AML-Bd).

### 3.5 Lyse RNA transfizierter dendritischer Zellen

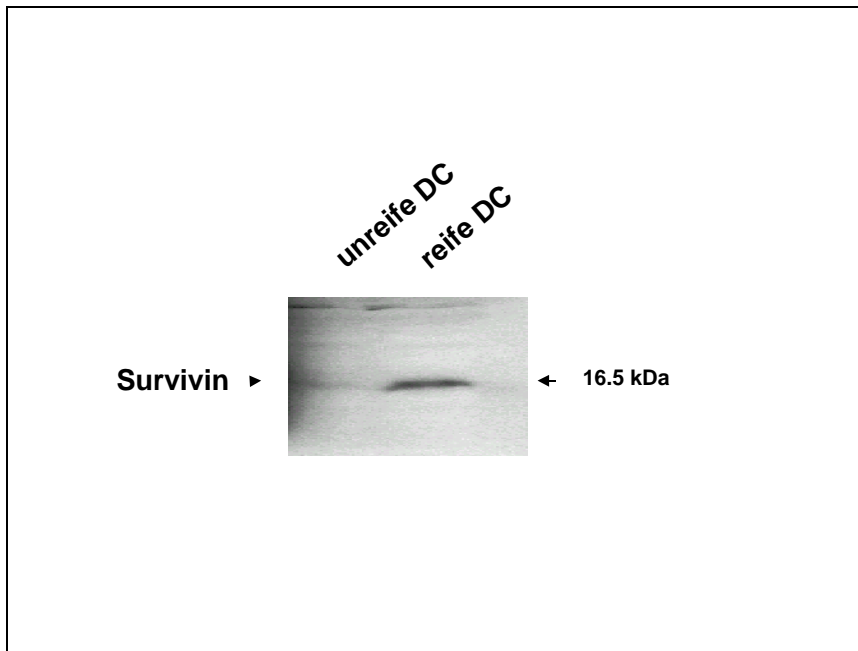
Zur Analyse der Zytotoxizität im autologen System wurden autologe dendritische Zellen aus PBMNC desselben Spenders generiert, die auch zur Induktion von CTL verwendet wurden. Diese DC wurden zum Nachweis einer Präsentation Survivin-spezifischer T-Zell Epitope mit Tumor-RNA transfiziert und als Zielzellen im *Chrom*-Assay eingesetzt. Gesamt RNA wurde aus der Survivin-positiven Tumorzelllinie A 498 isoliert. Wie in Abbildung 10 dargestellt, erkennen die induzierten T-Zellen die mit Tumor-RNA transfizierten autologen DC, während die Lyse autologer DC, die mit EGFP mRNA transfiziert wurden, ausblieb. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es nach Transfektion zur Prozessierung und Präsentation Survivin-spezifischer T-Zell Epitope auf HLA-Klasse-I Molekülen kommt. Zur Kontrolle der Antigen-Spezifität wurden autologe DC einerseits mit dem relevanten Survivin-Peptid und andererseits mit einem irrelevanten HIV-Peptid beladen.



**Abb. 3.10:** *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* im autologen System. Im autologen System werden Survivin-beladene DC (DC + Sv), sowie autologe DC, die mit Tumor-RNA einer Survivin-exprimierenden Nierenzellkarzinom-Linie (DC + A 498-RNA) transfiziert wurden, von spezifischen CTL lysiert. Die Beladung mit irrelevantem Peptid (DC + HIV) oder Transfektion mit irrelevanter EGFP-mRNA (DC + EGFP-mRNA) dient als Kontrollen.

### 3.6 Expression von Survivin in reifen DC und aktivierten B- und T-Zellen

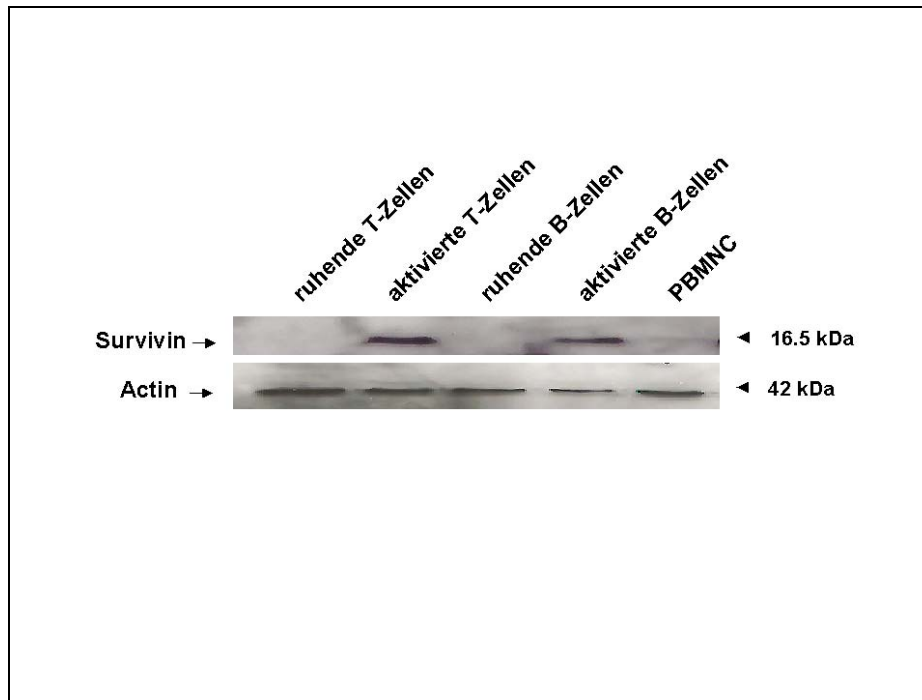
Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch in nicht malignen Zellen während der Ausreifung oder Differenzierung zur Hochregulation der Expression von Survivin kommt<sup>45; 67</sup>. Daher überprüften wir zunächst die Survivin Expression in unreifen und ausgereiften dendritischen Zellen. Erst nach Stimulation der DC durch Zugabe von TNF- $\alpha$  zum Kulturmedium konnte Survivin im *Western Blot* nachgewiesen werden.



**Abb. 3.11:** Nachweis von Survivin im *Western Blot*. Hochregulation von Survivin in DC nach Ausreifung mit TNF- $\alpha$  (reife DC), kein Nachweis in unreifen DC (unreife DC).

Des weiteren konnte die Expression von Survivin Protein in aufgereinigten aktivierten B- und T-Lymphozyten festgestellt werden. Die B-Lymphozyten wurden unter Zugabe von CD40L und IL-4, die T-Zellen durch Inkubation mit PMA und Ionomycin über Nacht aktiviert. Hier konnte gezeigt werden, dass es nach Aktivierung zur Hochregulation von Survivin kommt. In ruhenden T- und B-Lymphozyten sowie in PBMNC ist das Protein nicht nachweisbar.

Als Kontrolle wurde ein *Western Blot* mit einem Aktin-Antikörper durchgeführt. Das Kontrollprotein Aktin hat eine Größe von 42 kD, während das Survivin Protein eine Größe von 16,5 kD hat.

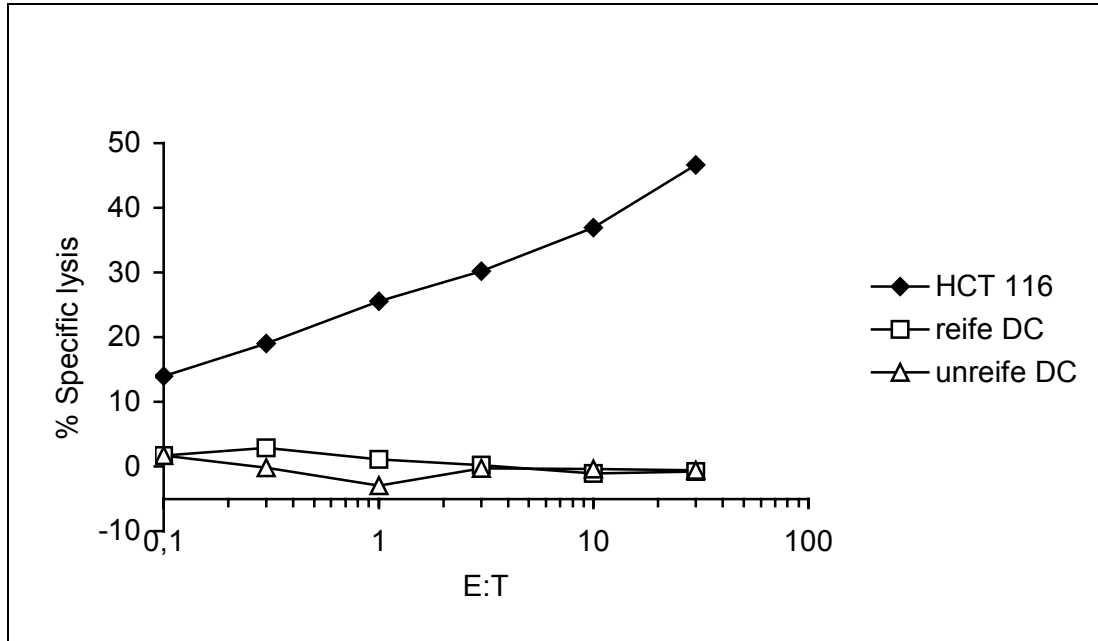


**Abb. 3.12:** Nachweis von Survivin in aufgereinigten ruhenden und aktivierten B- und T-Zellen im *Western Blot*. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Aktin-Antikörper eingesetzt.

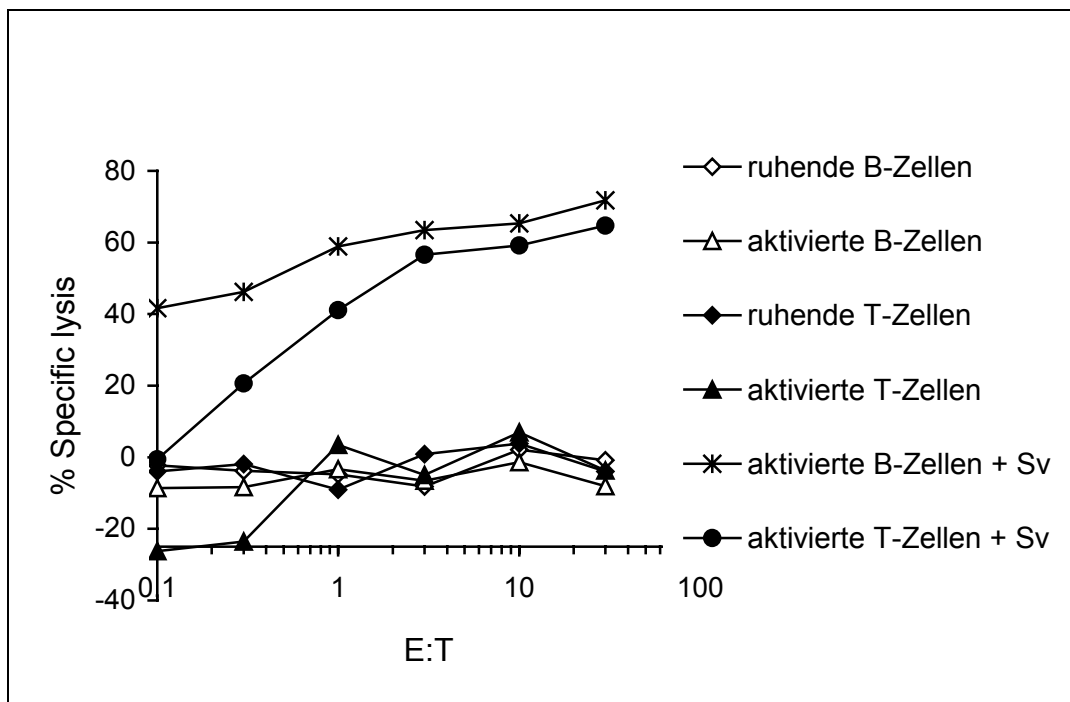
Die *in vitro* generierten unreifen und TNF- $\alpha$  stimulierten DC wurden als Zielzellen in ein *Chrom*[ $^{51}\text{Cr}$ ]-*Release-Assay* eingesetzt. Es konnte jedoch weder für unreife (Behandlung mit IL-4 und GM-CSF) noch für TNF- $\alpha$  behandelte, reife DC eine spezifische Lyse festgestellt werden, während die zum Nachweis der spezifischen Zytotoxizität eingesetzte HLA-A2 positive und Survivin-exprimierende Kolonkarzinom-Zelllinie (HCT 116) erfolgreich lysiert wurde (siehe Abb. 3.13).

Auch die aufgereinigten und aktivierten B- und T-Zellen wurden auf Lyse durch Survivin-spezifische CTL analysiert. Eine Lyse der aktivierten T- und B-Zellen trat hier ebenfalls erst nach Beladung mit Survivin-Peptid auf, obwohl sie wie auch die reifen DC das Survivin Protein exprimieren.

## Ergebnisse



**Abb. 3.13:** *Chrom*<sup>51</sup>*Cr*-Release-Assay reifer und unreifer DC. Es stellt sich weder bei reifen (IL-4, GM-CSF und TNF- $\alpha$ ), noch bei unreifen DC (IL-4 und GM-CSF) eine spezifische Lyse ein. Zur Kontrolle der eingesetzten CTL wurde die Survivin-exprimierende Kolonkarzinom-Zelllinie HCT 116 verwendet.

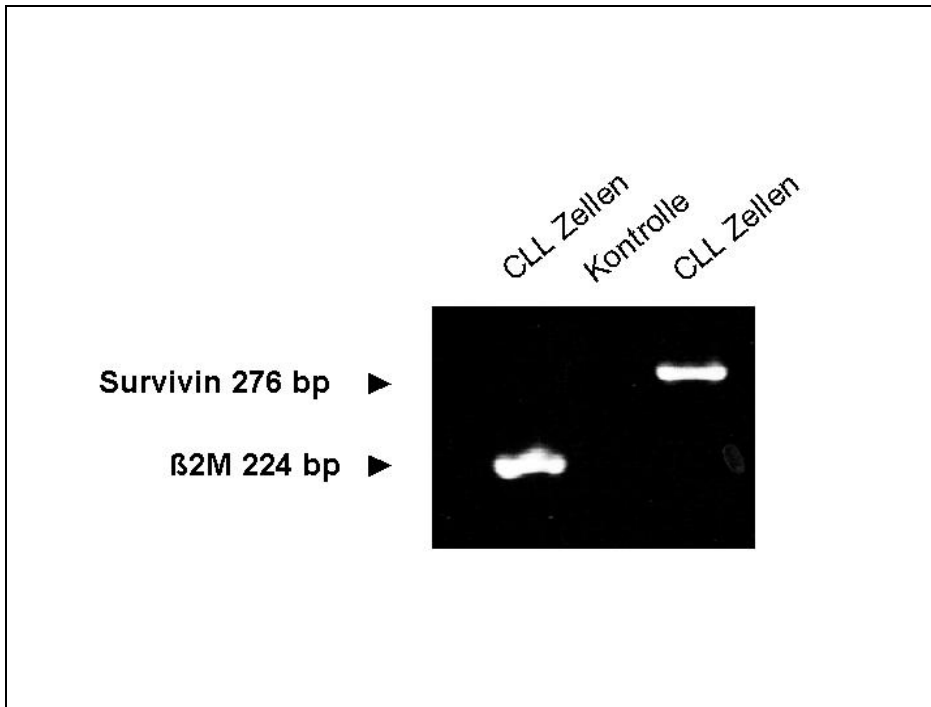


**Abb. 3.14:** *Chrom*<sup>51</sup>*Cr*-Release-Assay aktivierter B- und T-Zellen. Survivin-spezifische CTL erkennen weder aktivierte noch ruhende B- und T-Zellen. Peptid-beladene aktivierte T- und B-Zellen (aktivierte B-Zellen + Sv; aktivierte T-Zellen + Sv) werden lysiert.



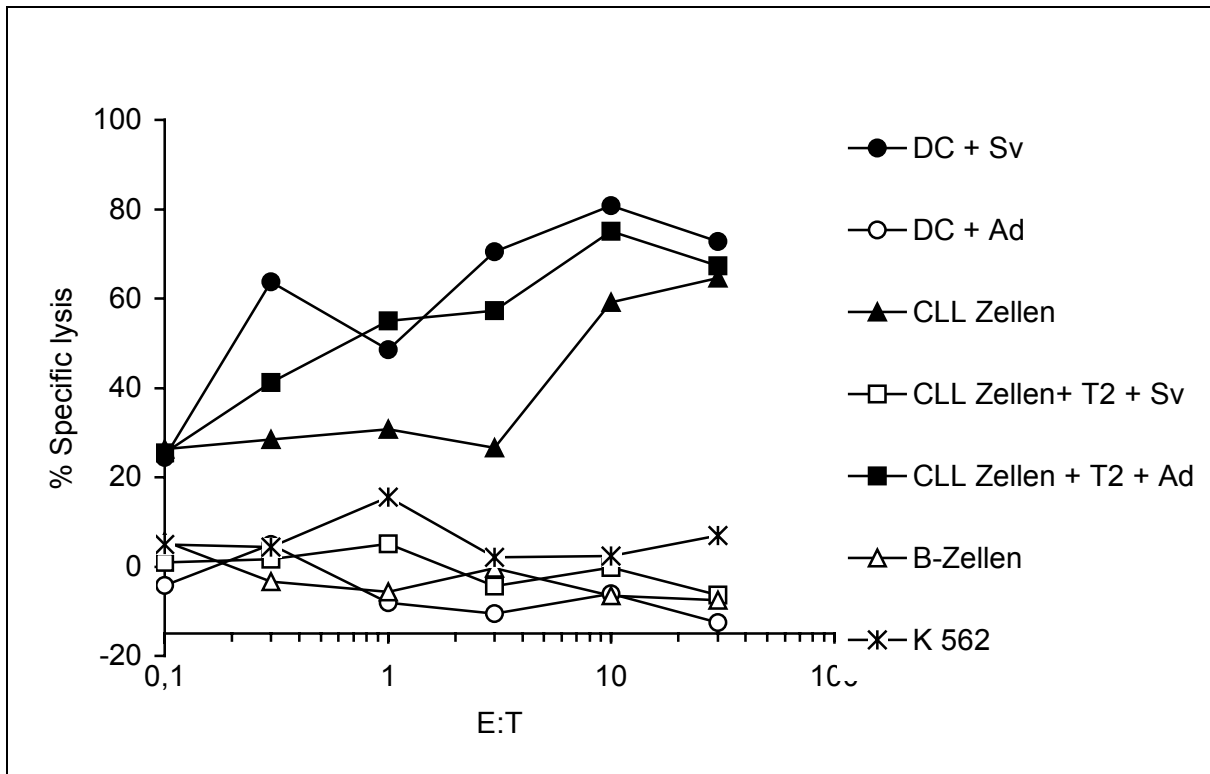
### 3.7 Lyse primärer maligner B-Lymphozyten

In malignen B-Zellen eines HLA-A2 positiven CLL Patienten, der sich nach Behandlung mit Fludarabine in Remission befand, konnte eine Expression von Survivin nachgewiesen werden. Wir generierten Survivin-spezifische CTL aus PBMNC dieses Patienten und analysierten die Präsentation von T-Zell Epitopen, aus dem Survivin Protein durch die CLL-Zellen. Die Expression von Survivin in aufgereinigten malignen B-Zellen, die 90 % der Lymphozyten des peripheren Blutes ausmachten, wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (siehe Abb. 3.15). Diese malignen B-Zellen sowie aufgereinigte nicht maligne B-Zellen des sich in Remission befindenden Patienten wurden zur Ermittlung einer spezifische Lyse in ein *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-*Release-Assay* eingesetzt. Die malignen CLL-B-Lymphozyten können durch die Expression von CD23 und CD5 von den nicht malignen B-Lymphozyten im Durchflußzytometer unterschieden werden. Diese Unterschiede im Phänotyp ermöglichten auch die Aufreinigung und Isolierung der einzelnen B-Zell-Populationen aus dem peripheren Blut des Patienten mit Hilfe der MACS-Technologie. Wie in Abb. 16 dargestellt, wurden die eingesetzten CLL Zellen lysiert, während autologe nicht-maligne B-Zellen nicht erkannt wurden. Zum Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurde die CML-Zelllinie K 562 eingesetzt. Die antigenspezifische Lyse der CLL Zellen wurde zudem mittels *Cold Target Inhibition Assay* verifiziert. Dazu wurden TAP-defiziente nicht Chrom-markierte T2 Zellen mit relevantem Survivin- oder irrelevantem Adipophilin-Peptid beladen und im Verhältnis von 20:1 zu den CLL Zellen gegeben.



**Abb. 3.15:** Survivin Nachweis in Zellen eines HLA-A2 positiven CLL Patienten mittels RT-PCR. Als Kontrollen wurde ein Ansatz ohne Zugabe von cDNA (Kontrolle) sowie parallel dazu eine PCR unter Verwendung von  $\beta_2$ -Mikroglobulin Primern ( $\beta_2$ M) durchgeführt.

## Ergebnisse



**Abb. 3.16:** Lyse autologer CLL Zellen im *Chrom<sup>51</sup>Cr*-Release-Assay. Survivin-spezifische CTL lysieren autologe maligne B-Zellen (CLL Zellen) eines CLL Patienten und autologe unreife DC, die mit Survivin-Peptid beladen wurden (DC + Sv). Nicht-maligne autologe B-Zellen (B-Zellen), sowie DC, die mit dem irrelevanten Adipophilin-Peptid (DC + Ad) beladen wurden, zeigen keine Lyse. Die Antigen-spezifität wurde im *Cold Target Inhibition Assay* verifiziert. Nicht Chrom-markierte T2 Zellen wurden mit relevantem (CLL Zellen + T2 + Sv) oder irrelevantem (CLL Zellen + T2 + Ad) Peptid beladen und im Verhältnis von 20:1 zu den CLL Zellen gegeben. K 562 Zellen wurden zum Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität eingesetzt.

## 4 Diskussion

Die Tumorthérapien basieren seit Jahrzehnten auf den drei Säulen Operation, Bestrahlungstherapie und Chemotherapie. Die laufenden Verbesserungen der operationstechnischen, radiotherapeutischen und chemotherapeutischen Verfahren und Therapiestrategien, sowie Maßnahmen zur Früherkennung sind wesentlich für die zunehmend erfolgreicherer Heilungschancen bei Tumorerkrankungen. Dennoch ist eine Therapie, die eine Heilung der Patienten ermöglicht noch nicht etabliert, und daher sind neue Therapieoptionen notwendig.

Die Tumor-Immuntherapie hat sich in den letzten 20 Jahren zu einer möglichen Behandlungsalternative entwickelt, die erfolgreich in der Primär- und Rezidivbehandlung bösartiger Tumore eingesetzt werden könnte. Der Tumor-Immuntherapie liegt die Idee zugrunde, die Aufmerksamkeit der Immunsystems gegenüber Krebszellen so zu beeinflussen, dass der Körper selbst gegen den Tumor vorgeht.

Einige Ansätze beruhen auf der Verabreichung von sogenannten Immunmodulatoren wie Interferonen und Interleukinen, die die Immunantwort beeinflussen. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz monoklonaler Antikörper, die gegen Tumorantigene gerichtet sind. Ein Beispiel hierfür ist Herceptin, ein Antikörper gegen das Tumorantigen Her-2/neu, der bereits erfolgreich in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird.

In dieser Arbeit wurde mit der Generierung spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch dendritische Zellen ein weiterer Ansatz verfolgt. Der Angriff gegen den Tumor erfolgt dabei auf zellulärer Ebene. Dendritische Zellen werden als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt und von außen mit Peptiden beladen, die sich von Tumorantigenen ableiten. Dies führt zur Induktion spezifischer T-Lymphozyten, die maligne Zellen erkennen und zerstören können.

Das hier verwendete antigene Peptid ist von Survivin abgeleitet. Survivin ist ein erst vor kurzem identifiziertes Mitglied der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP) Genfamilie, das in fast allen maligne entarteten Zellen überexprimiert, in normalem menschlichen Gewebe jedoch kaum zu finden ist<sup>3; 9; 51; 52; 124</sup>.

Die erhöhte Expression dieses Proteins korreliert in vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose<sup>57; 69; 111</sup>. Survivin wird eine Rolle in der Erhaltung der Zell-Viabilität sowie in der Regulation der Apoptose in Tumorzellen zugesprochen<sup>7; 41; 42; 48; 70; 108; 123</sup>. Die Kaspasen 3, 7, und 9 werden gehemmt, aber auch eine Induktion des Zelltodes über Fas-Rezeptor oder Chemotherapie wird verhindert<sup>71; 75; 84</sup>. Die Verwendung von *antisense*-DNA oder dominant negativen Mutanten konnte diese Wirkungen des Survivin-Proteins unterdrücken und eine normale Apoptose-Induktion in Tumorzellen wiederherstellen. Diese Beobachtungen führten zu der Idee, dass sich Survivin als möglicher Angriffspunkt für eine neue immuntherapeutische Strategie in der Behandlung von Tumorpatienten eignen könnte.

Andersen und Mitarbeitern gelang die Isolation Survivin-spezifischer CTL aus Patienten, die an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankt waren und Patienten, die unter einem malignem Melanom litten. Diese T-Zellen zeigten eine erfolgreiche Lyse allogener Mammakarzinom- und Melanom-Zellen. Das führte zur Annahme, dass bestimmte von Survivin abgeleitete Epitope auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden sind. Die Identifikation eines HLA-A2 bindenden Peptids, das sich zur Induktion Survivin-spezifischer CTL eignet, unterstützte diese Vermutung<sup>97</sup>. Die nach Peptidbeladung dendritischer Zellen generierten CTL zeigten eine effektive Lyse autologer EBV-immortalisierter B-Zellen, die mit Survivin transfiziert wurden.

Bisher wurde eine Erkennung autologer Tumorzellen durch spezifische CTL noch nicht berichtet.

Basierend auf Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen konnte eine Expression von Survivin für alle verwendeten Tumorzelllinien mittels RT-PCR auf RNA-Ebene und *Western Blot* auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Darunter waren Zelllinien hämatologischen und epithelialen Ursprungs wie Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Melanom, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom, CML und Plasmozytom. Damit zeichnet sich Survivin als universelles Tumorantigen aus.

Wir untersuchen daher, ob von Survivin abgeleitete immunogene T-Zell Epitope auch auf der Oberfläche Survivin-exprimierender Tumorzelllinien präsentiert werden. Das von der Arbeitsgruppe Schmitz identifizierte HLA-A2 bindende Peptid wurde zur Induktion Survivin-spezifischer CTL eingesetzt. Dazu wurden DC aus Monozyten HLA-A2+ Spender unter Einsatz von GM-CSF, IL-4 und TNF- $\alpha$  generiert und nach Beladung mit dem Peptid als Antigen-präsentierende Zellen zur *in vitro* Generierung von spezifischen CTL eingesetzt. Die nach mehreren wöchentlichen Restimulationen gewonnenen CTL zeigten als Effektorzellen im *Chrom<sup>51</sup>Crj-Release-Assay* eine erfolgreiche Lyse Survivin-exprimierender Tumorzellen sowie Peptid-beladener Zielzellen. Die Antigen-Spezifität und HLA-Restriktion wurde mittels Antikörper-Blockierung und *Cold Target Inhibition* bestätigt.

Zur Erzeugung eines autologen Systems wurden DC des Spenderblutes, aus dem auch die Survivin-spezifischen CTL generiert wurden, als Zielzellen im *Chrom<sup>51</sup>Crj-Release-Assay* eingesetzt. Die autologen DC wurden dazu entweder von außen mit Survivin-Peptid beladen oder mit RNA einer Survivin-positiven Tumorzelllinie elektroporiert. Die generierten CTL lysierten sowohl die Peptid-beladenen als auch die RNA-transfizierten DC, so dass die Antigen-Spezifität der generierten CTL-Linie nochmals demonstriert werden konnte. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass es auch nach Transfektion mit Tumor-RNA zur Prozessierung und Präsentation eines immunogenen Epitops auf der Oberfläche der eingesetzten autologen DC kommt.

Ziel der folgenden Experimente war die Bewertung eines möglichen Einsatzes des Survivin-Peptids in Tumorpatienten. Wie bereits erwähnt, konnten Survivin-spezifische CTL im peripheren Blut von CLL Patienten mittels ELISPOT (*enzym-linked immuno spot*) identifiziert werden.

Diese CTL lysierten allogene Tumorzellen<sup>11</sup>, die Erkennung autologer Tumorzellen durch Survivin-spezifische T-Zellen galt es jedoch noch zu belegen. Aus dem peripheren Blut eines HLA-A2 positiven CLL Patienten, der sich nach Behandlung mit Fludarabin in Remission befand, wurden zunächst mittels Peptid-Beladung Survivin-spezifische CTL generiert. Diese wurden anschließend als Effektorzellen in *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assay* eingesetzt und führten zur erfolgreichen Lyse autologer maligner B-Zellen, die mittels RT-PCR als Survivin-positiv identifiziert worden waren. Demgegenüber wurden nach Remission des Patienten aufgereinigte nicht maligne B-Zellen und autologe DC von einer Lyse durch die spezifischen T-Zellen verschont. Diese Ergebnisse demonstrieren also, dass es gelingt in Tumorpatienten Survivin-spezifische CTL zu induzieren, die in der Lage sind, autologe Tumorzellen zu erkennen.

### **4.1 Bedeutung des Expressionsmusters von Survivin in der Tumor-Vakzinierung**

Die Expression von Survivin in der Fötal- und Embryonalentwicklung deutet auf eine wichtige Rolle dieses Proteins in der Mitoseregulation und möglicherweise auch auf gewisse Auswirkungen in differenziertem Gewebe hin. Der kürzlich erbrachte Nachweis von Survivin in Thymusgewebe<sup>67</sup> und eine vermehrte Expression in CD34+ Zellen durch hämatopoetische Zytokine sowie in Endothelzellen während der Angiogenese<sup>44</sup> zeigt, dass es sich bei Survivin nicht um ein tumorspezifisches anti-apoptotisches Antigen handelt. Bei einem Einsatz dieses Proteins in der Tumor-Vakzinierung ist also Vorsicht geboten.

Eine im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Analyse von cDNA verschiedener menschlicher Gewebe erbrachte den Nachweis von Survivin in Herz, Haut, Mamma, Kolon und Dünndarm. Es handelte sich hierbei jedoch nicht um eine quantitative Erfassung, eine genaue Expression über differenzielle Expression in diesen Geweben lässt sich also nicht treffen. Darüber hinaus wurden diese Experimente nicht in ausreichender Anzahl mit verschiedenen Spendern wiederholt, was jedoch nicht Ziel dieser Arbeit war.

Eine Risikoabschätzung der hier beobachteten Ergebnisse ist also nicht möglich.

In dieser Arbeit konnte mittels *Western Blot* Analyse eine Expression von Survivin in aktivierten B- und T-Zellen sowie nach TNF- $\alpha$  Behandlung in dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden allerdings, als Zielzellen in *Chrom*[ $^{51}\text{Cr}$ ]-*Release-Assay* eingesetzt, von autologen Survivin-spezifischen CTL nicht erkannt. Den Effektorzellen gelang jedoch eine effektive Lyse nach Peptidbeladung der Zielzellen sowie nach Elektroporation der TNF- $\alpha$  behandelten DC mit Tumor-RNA einer Survivin-exprimierenden Tumorzelllinie. Der Grund für die ausbleibende Lyse ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise wird eine ausreichende Affinität der induzierten T-Zellen erst durch eine quantitativ höhere Expression von Peptiden auf Tumorzellen erreicht. Auch ein Unterschied im Repertoire von T-Zell-Epitopen bei nicht-malignen Zellen und Tumorzellen könnte eine Rolle spielen. Demgegenüber wurden autologe DC nach Transfektion mit Tumor-RNA einer Survivin-exprimierenden Tumorzelllinie effizient lysiert. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich Prozessierung und Präsentation unterscheiden, je nachdem, ob es sich um ein endogen exprimiertes Protein oder ein exogen zugeführtes handelt.

Medema und Mitarbeiter konnten zeigen, dass reife DC durch die Expression von *serine protease inhibitor 6* (SPI-6), ein Mitglied der *serpin* Genfamilie, das zur Inaktivierung von Granzym B führt vor einer CTL-induzierten Apoptose geschützt werden. Unreife dendritische Zellen sind hingegen einer CTL-induzierten Lyse noch zugänglich.

In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine Lyse reifer TNF- $\alpha$  behandelter DC erreicht werden, wenn die DC entweder mit dem entsprechenden Peptid beladen oder mit Tumor-RNA transfiziert wurden. Bei diesen Mechanismen der Survivin-Expression scheint der von Medema et al beobachtete Schutz vor CTL-induzierter Apoptose nicht beteiligt zu sein.



## 4.2 Probleme und Grenzen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden alle Experimente *in vitro* durchgeführt, so dass sich die Ergebnisse nur begrenzt auf das komplexe System des menschlichen Immunsystems übertragen lassen.

Eine gewisse Limitierung stellt bei der Verwendung von Peptiden aus Tumorantigenen die HLA-Restriktion dar. Das hier verwendete Survivin-Peptid bindet nur an HLA-A2-Moleküle. Es sind jedoch immerhin 50 % der kaukasischen Bevölkerung HLA-A2+, und das hier verwendete Peptid kann bei dieser Gruppe eingesetzt werden.

Zusätzlich ignoriert dieser Ansatz die Bedeutung von CD4+ T-Helfer-Zellen bei der Induktion und Erhaltung der CTL-vermittelten Immunantwort.

## 4.3 Vakzinierungsstudien

Die meisten klinischen Studien wurden in Melanom-Patienten durchgeführt, wobei sowohl Peptid-beladene als auch mit Tumorzelllysaten beladene DC verwendet wurden<sup>22; 54; 72; 116; 117</sup>. Diese Studien zeigten, dass die hier eingesetzten Tumorstoffe mit nur sehr geringen Nebenwirkungen verbunden sind und *in vivo* eine antigenspezifische CTL-Antwort induzieren können. Remissionen wurden jedoch nur in wenigen Patienten erreicht, was jedoch auf eine hohe Tumormasse und vorangehende Chemotherapien zurückzuführen ist.

Nestle und Mitarbeiter setzten 1998 aus Melanomen abgeleitete HLA-Klasse-I bindende Peptide und Tumorzelllysate in die Vakzinierung ein. Autologe DC wurden damit beladen und in die Lymphknoten injiziert. Fünf von 16 Patienten wiesen ein klinisches Ansprechen auf, darunter zwei Komplettremissionen über 15 Monate.

In einer Vakzinierungsstudie mit Patientinnen, die an fortgeschrittenem Mamma- und Ovarialkarzinom litten, wurden von Brossart und Mitarbeiter *in vitro* unter Verwendung von GM-CSF, IL-4 und TNF- $\alpha$  generierte autologe DC eingesetzt.

Diese wurden mit HER-2/neu- oder MUC-1-Peptiden beladen und führten *in vivo* zur Induktion antigenspezifischer CTL in fünf von zehn Patientinnen. In einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom wurde eine Rückbildung subkutaner Metastasen beobachtet.

Der Versuch gastrointestinale Tumoren (Magen-, Kolon- und Ösophaguskarzinom) durch Beladung autologer DC mit MAGE-3 zu therapieren, führte zur Detektion spezifischer CTL in *Chrom*[<sup>51</sup>Cr]-*Release-Assays*<sup>93</sup>. Vier Patienten zeigten Besserung und in sieben Patienten kam es zur Reduktion der Tumormarker.

Die Nebenwirkungen in den Studien beschränkten sich auf Temperaturanstieg, Lymphknotenvergrößerungen, Kopfschmerzen, Übelkeit und ein lokales Erythem an der Einstichstelle. Diese Beobachtung sollte im Sinne einer T-Zell vermittelten Typ IV Immunreaktion eher als Zeichen der Entwicklung einer zellulären Immunantwort gedeutet werden<sup>58</sup>. In keinem Fall führten die aufgetretenen Nebenwirkungen zum Therapieabbruch.

Eine stets gefürchtete Nebenwirkung bei der Tumorimmuntherapie ist die Auslösung einer Immunantwort, die gegen gesundes menschliches Gewebe des Patienten gerichtet ist. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass bei dieser Therapie das Immunsystem direkt aktiviert wird und die induzierte Immunantwort teilweise gegen Antigene gerichtet ist, die auch auf gesunden menschlichen Zellen präsentiert werden.

Hinweise auf die Auslösung einer derartigen Reaktion ergaben sich beim Auftreten von Vitiligo in Patienten eine Melanom-Studie. Hier erfolgte eine autoimmune Zerstörung der körpereigenen Melanozyten nach autologem T-Zell Transfer. Bei der Verwendung von Antigenen wie MUC1, Her-2/neu oder Telomerase wurden bislang keine Autoimmunreaktionen beobachtet.

## 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Vakzinierungsstudien sind vielversprechend. Zwar sind viele Fragen bezüglich eines optimalen Vakzinierungsintervalls, der wirkungsvollsten Adjuvantien, Dosierungen und Applikation noch offen und viele immunologische Phänomene unverstanden, es kann jedoch mit dieser Methode eine nachweisbare gezielte Aktivierung des Immunsystems gegen einen Tumor erreicht werden.

Für Survivin wurden in der vorliegenden Arbeit die experimentellen Voraussetzungen für einen Einsatz in der Tumorkvakzinierung erbracht.

In Anlehnung an den bei Patienten mit malignem Melanom beobachteten Verlust der Expression von Tumorantigenen während der Tumorphrogression, wurde auch bei Vakzinierungstherapien mit einzelnen Tumorantigenen diese Erfahrung gemacht. Diese Art der Vakzinierung kann zur Selektion von Tumorzellen und darauf folgend zur Progression der Erkrankung durch ein Entkommen vom Immunsystem trotz Therapie führen. Durch den Einsatz mehrerer TAA in einer Vakzinierungstherapie versucht man eine Selektion von Tumorzellen sowie ein Entkommen der malignen Zellen vom Immunsystem durch Antigenverlust zu verhindern.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führten zur Aufnahme von Survivin in eine derartige Studie. Dabei soll Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem Nierenzellkarzinom RNA, die für verschiedene Tumorantigene, darunter Survivin, kodieren intradermal verabreicht werden.

Die Hoffnung dieses Forschungsgebiets stützt sich auf die Entwicklung einer effizienten, nebenwirkungsarmen Therapie für Tumorkpatienten. Klinische Erfahrungen konnten bisher hauptsächlich in stark vortherapierten Patienten gesammelt werden. Es besteht Grund zu der Annahme, dass die Ergebnisse bei frühem Einsatz der Immuntherapie positiver ausfallen. Ein großer Vorteil der Tumork-Immuntherapie besteht in der Möglichkeit einer frühen Elimination sich aus dem Zellverband lösender entarteter Zellen bevor es zur Ausbildung von Metastasen kommt und vor allem bevor diese mit einem bildgebenden Verfahren erfassbar werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe um Schmitz identifizierte vor Kurzem ein von Survivin abgeleitetes HLA-A2 bindendes Peptid, das sich zur Induktion spezifischer CTL eignet. Survivin ist in fast allen menschlichen Tumoren überexprimiert, in normalen Gewebe jedoch kaum detektierbar. Daher eignet es sich für die Entwicklung einer breit anwendbaren Vakzinierungstherapie.

Wir induzierten mit Hilfe autologer DC und des oben genannten Peptids Survivin-spezifische zytotoxische T-Zellen *in vitro*. Diese lysierten alle als Zielzellen in *Chrom<sup>51</sup>Cr]-Release-Assays* eingesetzten Survivin-exprimierenden Tumorzelllinien sowie Peptid-beladene Zellen. Die Lyse erfolgte antigenspezifisch und HLA-A2-restringiert wie in *Cold Target Inhibition Assays* und mittels Antikörper-Blockierung demonstriert werden konnte. Darüber hinaus konnten wir die Lyse primärer Leukämiezellen zeigen.

Auch im autologen System, in dem autologe DC entweder mit RNA einer Survivin-exprimierenden Tumorzelllinie transfiziert oder mit Survivin-Peptid beladen wurden, erfolgte die Lyse HLA-restringiert und antigenspezifisch. Um den möglichen Einsatz von Survivin in der Tumorthherapie weiter zu analysieren, wurden Survivin-spezifische CTL unter Verwendung von PBMNC und DC eines CLL Patienten induziert. Die *in vitro* induzierten CTL lysierten maligne CLL Zellen, während aufgereinigte nicht-maligne Zellen des Patienten verschont wurden.

Interessanterweise konnte eine Expression von Survivin in aktivierten B- und T-Zellen, sowie in reifen DC nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden jedoch nicht von autologen Survivin-spezifischen CTL lysiert. Nach Peptidbeladung der DC konnte jedoch eine effiziente Lyse beobachtet werden, ebenso nach Elektroporation der reifen DC mit RNA einer Survivin-exprimierenden Tumorzelllinie.

Die hier erzielten Ergebnisse zeichnen Survivin als ein universelles Tumorantigen aus, das die vorklinischen Voraussetzungen für eine breit anwendbare Immuntherapie bei multipler Indikation in der Onkologie erfüllt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Juli 2003 im Journal *BLOOD* unter dem Titel „Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells“ publiziert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abbas A.K. LAH, Pober J.S. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company; 1997.
2. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol.* 1998;152:43-49.
3. Adida C, Haioun C, Gaulard P, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000;96:1921-1925.
4. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998;392:86-89.
5. Alberts B. BDLJRMRKWJD. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York & London; 1994.
6. Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T, et al. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol.* 2000;37:515-526.
7. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001;7:542-547.
8. Altieri DC. Blocking survivin to kill cancer cells. *Methods Mol Biol.* 2003;223:533-542.
9. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3:917-921.
10. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem.* 1998;273:11177-11182.
11. Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Brocker EB, Becker JC, thor SP. 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;61:5964-5968.
12. Andersen MH, thor SP. Survivin-a universal tumor antigen. *Histol Histopathol.* 2002;17:669-675.
13. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305-1308.
14. Bai A, Forman J. The effect of the proteasome inhibitor lactacystin on the presentation of transporter associated with antigen processing (TAP)-dependent and TAP-independent peptide epitopes by class I molecules. *J Immunol.* 1997;159:2139-2146.
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-252.

16. Becker Y. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers-a review. *Anticancer Res.* 1992;12:511-520.
17. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:735-773.
18. Brachet V, Raposo G, Amigorena S, Mellman I. Ii chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. *J Cell Biol.* 1997;137:51-65.
19. Brossart P, Schneider A, Dill P, et al. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 2001;61:6846-6850.
20. Brossart P, Stuhler G, Flad T, et al. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 1998;58:732-736.
21. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001;29:1247-1255.
22. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000;96:3102-3108.
23. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97:2784-2790.
24. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med.* 1996;183:283-287.
25. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:565-594.
26. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:93-102.
27. Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia.* 2000;2:235-241.
28. Chiodoni C, Paglia P, Stoppacciaro A, Rodolfo M, Parenza M, Colombo MP. 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.* 1999;190:125-133.
29. Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47:83-88.

30. De Bruijn ML, Greenstone HL, Vermeulen H, et al. L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus-like particles. *Virology*. 1998;250:371-376.
31. Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4516-4521.
32. Di Nicola M, Milanese M, Magni M, et al. Recombinant adenoviral vector-lipofectAMINE complex for gene transduction into human T lymphocytes. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1875-1884.
33. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298:850-854.
34. Espinoza-Delgado I. Cancer vaccines. *Oncologist*. 2002;7 Suppl 3:20-33.
35. Fenton RG, Longo DL. Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:272-275.
36. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*. 1995;16:487-494.
37. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9482-9487.
38. Fisch P, Kohler G, Garbe A, et al. Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens ex vivo from peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol*. 1996;26:595-600.
39. Flores-Romo L, Bjorck P, Duvert V, van Kooten C, Saeland S, Banchereau J. CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med*. 1997;185:341-349.
40. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:245-273.
41. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci*. 2002;115:575-585.
42. Fraser AG, James C, Evan GI, Hengartner MO. Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol*. 1999;9:292-301.
43. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science*. 1996;272:1001-1004.
44. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth



factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood*. 2001;98:2091-2100.

45. Fukuda S, Pelus LM. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle*. 2002;1:322-326.

46. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol*. 2001;32:119-125.

47. Gilboa E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001;2:789-792.

48. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res*. 2002;62:2462-2467.

49. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*. 1992;357:375-379.

50. Gottfried E, Krieg R, Eichelberg C, Andreesen R, Mackensen A, Krause SW. Characterization of cells prepared by dendritic cell-tumor cell fusion. *Cancer Immunol*. 2002;2:15.

51. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol*. 1999;113:1076-1081.

52. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest*. 1999;79:1121-1126.

53. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277:3247-3257.

54. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996;2:52-58.

55. Ikeguchi M, Kaibara N. Changes in survivin messenger RNA level during cisplatin treatment in gastric cancer. *Int J Mol Med*. 2001;8:661-666.

56. Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A. Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatr Oncol*. 2000;35:550-553.

57. Islam A, Kageyama H, Takada N, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2000;19:617-623.

58. Jager E, Jager D, Knuth A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:178-182.

59. Janeway CA, Jr., Travers P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag; 1997.

60. Jiang X, Wilford C, Duensing S, Munger K, Jones G, Jones D. Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. *J Cell Biochem.* 2001;83:342-354.
61. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem.* 2001;276:3238-3246.
62. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res.* 1999;59:431-435.
63. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994;73:2013-2026.
64. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol.* 1997;139:639-649.
65. Knight SC, Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol.* 1993;5:374-382.
66. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:1457-1462.
67. Kobayashi Y, Yukiue H, Sasaki H, et al. Developmentally regulated expression of survivin in the human thymus. *Hum Immunol.* 2002;63:101-107.
68. Lanzavecchia A, Reid PA, Watts C. Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells. *Nature.* 1992;357:249-252.
69. Lee KH, Panelli MC, Kim CJ, et al. Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol.* 1998;161:4183-4194.
70. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol.* 1999;1:461-466.
71. Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998;396:580-584.
72. Mackensen A, Herbst B, Chen JL, et al. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer.* 2000;86:385-392.
73. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.* 1999;59:6097-6102.
74. Maraskovsky E, Pulendran B, Brasel K, et al. Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice. *Adv Exp Med Biol.* 1997;417:33-40.

75. Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest.* 2001;108:981-990.
76. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene.* 2002;21:2613-2622.
77. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med.* 1986;163:903-921.
78. Morse MA, Deng Y, Coleman D, et al. 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 Cancer Res.* 1999;5:1331-1338.
79. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
80. Mueller MR, Brossart P. Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Mod Asp Immunobiol.* 2002;141-144.
81. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer.* 1999;82:121-124.
82. Nencioni A, Brossart P. New perspectives in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *BioDrugs.* 2001;15:667-679.
83. Nestle FO. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19:6673-6679.
84. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13103-13107.
85. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2:43-54.
86. Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 2000;60:2805-2809.
87. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:323-358.
88. Piali L, Fichtel A, Terpe HJ, Imhof BA, Gisler RH. Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *J Exp Med.* 1995;181:811-816.

89. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol.* 2000;165:566-572.
90. Rayman P, Uzzo RG, Kolenko V, et al. Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J Sci Am.* 2000;6 Suppl 1:S81-S87.
91. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001;411:380-384.
92. Rotzschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature.* 1990;348:252-254.
93. Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, et al. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2001;7:2277-2284.
94. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109-1118.
95. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1998;28:2760-2769.
96. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2002;188:22-32.
97. Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, et al. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 2000;60:4845-4849.
98. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, et al. 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.* 2002;195:1279-1288.
99. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science.* 1990;248:1349-1356.
100. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off-tumors on. *Immunol Today.* 1997;18:292-299.
101. Sharp JJ, Cassman KG, Doolittle RF. Amino acid sequence of the carboxy-terminal cyanogen bromide fragment from bovine and human fibrinogen gamma-chains. *FEBS Lett.* 1972;25:334-336.
102. Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, et al. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell.* 1993;74:577-584.

103. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9:459-470.
104. Skoufias DA, Mollinari C, Lacroix FB, Margolis RL. Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol.* 2000;151:1575-1582.
105. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol.* 2000;18:3894-3903.
106. Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol.* 1996;156:4182-4190.
107. Spagnoli GC, Schaefer C, Willmann TE, et al. Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients. *Int J Cancer.* 1995;64:309-315.
108. Speliotes EK, Uren A, Vaux D, Horvitz HR. The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell.* 2000;6:211-223.
109. Stevanovic S, Schild H. Quantitative aspects of T cell activation-peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol.* 1999;11:375-384.
110. Strome SE, Voss S, Wilcox R, et al. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res.* 2002;62:1884-1889.
111. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med.* 1999;341:452-453.
112. Tada T, Hu FY, Kishimoto H, Furutani-Seiki M, Asano Y. Molecular events in the T cell-mediated suppression of the immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;636:20-27.
113. Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998;58:5315-5320.
114. Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, Yokoe H, Noma H, Tanzawa H. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis. *J Dent Res.* 2003;82:607-611.
115. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000;6:127-134.
116. Thurner B, Haendle I, Roder C, et al. 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.* 1999;190:1669-1678.

117. Timmerman JM, Levy R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J Immunol.* 2000;164:4797-4803.
118. Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, et al. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol.* 1998;160:4449-4456.
119. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, et al. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9461-9465.
120. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1486-1490.
121. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4349-4354.
122. Tran J, Rak J, Sheehan C, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264:781-788.
123. Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, et al. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:10170-10175.
124. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet.* 1999;23:387-388.
125. Young JW, Szabolcs P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1995;182:1111-1119.
126. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61:8664-8667.
127. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2588-2592.

## 7 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Peter Brossart danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Engagement und die sowohl fachlich als auch persönlich stets liebevolle Betreuung

Meiner Mitdoktorandin Kerstin Schag möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit, die Aufmunterungen, fürs Aushelfen und die fröhlichen Stunden.

Dr. med. Martin Müller danke ich für die vielen Tipps, seinen unübertroffenen Einsatz für meine Zukunft, die stete Unterstützung und unsere Freundschaft

Sylvia Stephan, Bruni Schuster und Regina Heselmaier für die hervorragende technische Unterstützung, die gute Organisation des Labors und die stets gute Stimmung

Dr. rer. nat. Silke Appel danke ich von Herzen fürs Korrekturlesen, dafür dass sie sich immer Zeit nahm zur Beantwortung aller Fragen und dafür, dass sie einfach alles kann

Herrn Dipl. Biochem. Markus Weck danke ich ganz besonders für die Vermittlung der ersten Labortechniken, die Beantwortung aller Fragen, für viele praktische Ratschläge und vor allem dafür, dass er sich nie aus der Ruhe bringen lässt

Beiden möchte ich danken für die Bereitstellung des Refugium D 013, gefüllt von Ausgeglichenheit, Erfahrung, Spass an der Arbeit und am Leben, Orientierungshilfe (auch Bestrafung) und enorm viel Wissen

Daniela Dörfel für die gemeinsamen Laborstunden, ihr zurückgewonnenes Lachen und ihre freundliche und liebevolle Art

Anna Heine danke ich für unsere Freundschaft und dafür, dass sie mir so viele Tage erhellt, weil sie so unwiderstehlich hübsch und fröhlich ist.

Anette Rupf und ihrem Freund Mickey für ihre Zuverlässigkeit, Hilfe, Gelassenheit und gute Laune und für all die schönen gemeinsamen Stunden.

Dr. rer. nat. Frank Grünebach für die Bereitstellung der Primer, die Erklärungen zur RNA-Isolation und Elektroporation

PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie danke ich für die Bereitstellung der Peptide.

Anita Patel danke ich von ganzem Herzen für ihr Lachen, ihr Verständnis und Interesse an meiner Arbeit, ihren kontinuierlichen Optimismus und ihre nie abbrechende Unterstützung und Freundschaft

Dr. med. Margarete Pick für die vielen Erklärungen, Aufmunterungen, Ratschläge, fürs Zuhören, für das große Gut der Freundschaft und der Liebe. Und für die wunderschönen gemeinsamen Stunden, in der Hoffnung, dass bald wieder mehr Zeit dafür bleibt.

## Danksagung

---

Edith Halder-Oehler für ihre Lebenserfahrung, ihre Ausdauer und Menschlichkeit, die kulinarischen Köstlichkeiten, die gemeinsam durchstandenen Tücken des Lebens und die viel zu seltenen Besuche und Übernachtungen

Angie, Biggi, Christl, Ina, Miri, Sina, Steffi, Queenie, Jan, Martin H., Martin O. und Sven für die lustige Studienzeit.

Tobias Holderried für die Computer-Tricks, die vielen Anrufe und SMS und für unsere Freundschaft

Tim zur Nieden für die viel zu seltenen Kaffeepausen, das Verständnis für meine Arbeit, fürs Necken und dafür, dass er mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hat.

Constanze Renz für die spielerische Ablenkung von dieser Arbeit, die wenigen gemeinsamen Stunden, von denen ich keine missen möchte und dafür, dass wir schon so lange befreundet sind

Chrischi Paech für seine Fröhlichkeit, seinen Charme und seinen Unternehmungsgeist

Marco Gottelt und Thomas Prill für das Interesse an meiner Arbeit, ihre Intelligenz und ihre Ausdauer, die ich immer bewundert habe; für die Ermunterungen und für die Magie, die nur Mitglieder einer bestimmten Vereinigung ausstrahlen können Δ

Meinem Freund Philipp Autenrieth fürs Zuhören, dafür dass er mich liebt, respektiert und glücklich macht

Seiner Mutter Eva Autenrieth für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums

Carmen Sturm, Katrin und Veit Autenrieth für ihr Interesse und ihre Unterstützung.

Meinen Eltern Maminska und Hajo für die Sicherheit, das Interesse an meiner Arbeit, unser Zuhause und dafür, dass sie mich zu dem gemacht haben, was ich jetzt bin

Katharina, Niklas und Ursula für die Lösung der Computerprobleme und die aufheiternden Familienwochenenden

Meiner Oma für die regelmäßigen Anrufe, ihr Interesse und ihre immer währende Unterstützung

Tante Doti für ihr Interesse und ihre großzügige auch finanzielle Unterstützung.

Tante Uschi und Onkel Wolle, Tante Heidi und Onkel Ebi für ihre Unterstützung, Ratschläge, die Parties und ihr heiteres und fröhliches Wesen.

Ich bedanke mich von Herzen bei allen, die mir bei dieser Arbeit Unterstützung schenken



## 8 Lebenslauf

### **PERSÖNLICHE INFORMATION:**

Name: Susanne Malaika Schmidt

Geboren am 19.2.1979 in Kirchheim/Teck.

Eltern: Dr. Doris Rosine Schmidt (Chirurgin) und Dr. Hanns-Joachim Schmidt (Gynäkologe)

Geschwister: Niklas Maximilian (Student der Umweltschutztechnik) und Katharina Magdalena (Dipl. Ing. Innenarchitektur)

### **AUSBILDUNG:**

28.04.2005	<u>3. Staatsexamen</u>
2004-2005	Praktisches Jahr in Reutlingen, Wahlfach Gynäkologie
1998-2005	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
April 2004	<u>2. Staatsexamen</u>
Okt. 2001	<b>Beginn der Doktorarbeit</b>
Aug. 2001	<u>1. Staatsexamen</u>
Aug. 2000	<u>Physikum</u>
Aug. 1996	Cushing Academy, Massachusetts, USA: Summer Session
1989-1998	Schloßgymnasium Kirchheim/Teck:
1988-1989	Konrad-Wiederholt Grundschule, Kirchheim/Teck
1984-1988	Sir Harry Johnson Primary School, Zomba, Malawi, Afrika

### **ARBEITSERFAHRUNG:**

2003	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universität Tübingen bei PD Dr. Brossart, AG Immuntherapie
März 2003	Famulatur in der Medizinischen Klinik, Notaufnahme, Uniklinik Tübingen
Sept. 2002	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin, Nephrologie, Klinik am Eichert, Göppingen
März 2002	Famulatur in der Medizinischen Klinik, Abteilung II, Immuntherapie und Labormedizin, Uniklinik Tübingen
2001-2002	Nachtwache in der Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universität Tübingen
März 2001	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin, University of Barroda, Indien
1998-2003	Aushilfe in der gynäkologischen Praxis meines Vaters

### **PREISE:**

2003 Travel Award der American Society of Hematology

2004 Doktorandenförderpreis der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie