

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian Paul Speer**

**„Expression und Immunogenität von Melan-A in
Glioblastomzellen“**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Bernhard Wolfgang Klopsch

aus Veitshöchheim

Würzburg, März 2019

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Wölfel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Professor Dr.med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung 06.11.2019

Der Promovend ist Arzt

Inhalt:

1. Einleitung.....	1
1.1 Hirntumore des Kindesalters	2
1.2 Standardtherapie bei hochgradig malignen Gliomen	3
1.3 Allgemeine immuntherapeutische Ansätze	4
1.3.1 Passive Immuntherapie.....	6
1.3.2 Aktive Immuntherapie	8
1.4 Adoptive T-Zell-Therapie.....	13
1.5 Tumorassoziierte Antigene beim Glioblastom.....	16
1.5.1 Übersicht	16
1.5.2 Melan-A als Tumorantigen	17
1.6 Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden	21
2.1 Labormaterialien und Geräte.....	21
2.1.1 Zelllinien	21
2.1.2 T Zell-Kultur, Caspase Assay, Zytokinfärbung	23
2.1.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	23
2.1.4 Primärgewebe von GBM Patienten	24
2.1.5 Verwendete Antikörper und deren Anwendung.....	25
2.1.6 PCR Materialien	26
2.1.7 Westernblot Reagenzien und Material.....	27
2.1.8 Immunhistologie	28
2.1.9 Allgemeine Chemikalien und Lösungen.....	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur.....	30
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	31
2.2.3 Herstellung von Cytospin-Präparaten	31
2.2.4 Immunhistologie	32
2.2.5 Western Blot	34
2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)	39
2.2.7 T-Zell-Kultur und Generierung Melan-A spezifischer T-Zellen	40
2.2.8 Caspase 3 Assay	42

2.2.9	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	42
2.2.10	Quantitative Realtime PCR	43
3.	Ergebnisse.....	46
3.1	Intrazelluläre Expression von Melan-A.....	46
3.2	Cytospins	48
3.3	Melan-A Expressionsnachweis mittels Westernblot	49
3.4	Melan-A Expression auf mRNA Ebene.....	54
3.5	Melan-A Expressionsnachweis mittels Immunhistochemie.....	55
4.	Diskussion	59
5.	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis	65
	Abbildungsverzeichnis.....	69
	Tabellenverzeichnis.....	70
	Abkürzungsverzeichnis	71

1. Einleitung

Die Behandlungsmöglichkeiten von Krebserkrankungen haben sich in den letzten Jahrzehnten durch die rasche Entwicklung molekularbiologischer Methoden und den daraus resultierenden Erkenntnisgewinnen stark gewandelt. Im Jahre 2013 veröffentlichte das Journal Science verstärkt Artikel und Studien aus dem Bereich der immunologischen Krebstherapie, was wohl der ausschlaggebende Punkt dafür war, dass die Herausgeber des Magazins die Immuntherapie von Krebserkrankungen zum „Breakthrough of the year 2013“ (Couzin-Frankel ¹) wählten. Dies ist ein Zeichen dafür, dass eine Trendwende in der Behandlung von Krebserkrankungen stattfindet. Die Immuntherapie manifestiert sich somit, wie in Abbildung 1 dargestellt, neben der chirurgischen Onkologie sowie der Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie, als eine weitere Säule der Onkologie.

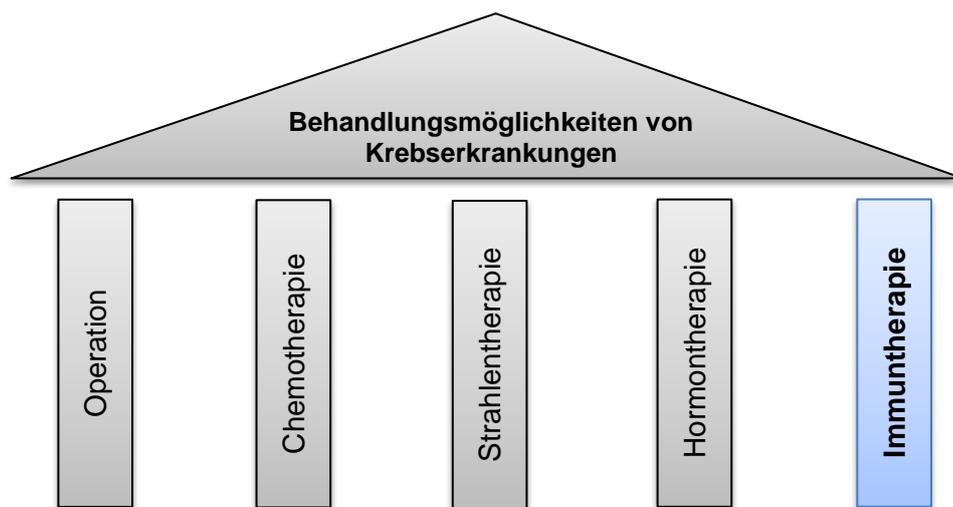


Abbildung 1: Säulen der Krebstherapie. Seit einigen Jahren manifestiert sich die Immuntherapie als weitere Behandlungsmöglichkeit von Krebserkrankungen

Weltweit forschen Wissenschaftler seit Jahren daran, dass das körpereigene Abwehrsystem gezielt für die Krebs-Therapie eingesetzt werden kann. Die größte Hürde hierbei ist es, dass das Immunsystem in der Lage sein muss, gesunde von bösartig veränderten Zellen zu unterscheiden. Durch die Erforschung des Immunsystems sollen geeignete Therapieverfahren gefunden bzw. weiterentwickelt werden, damit Tumorzellen unabhängig von ihrer

Lokalisation im Körper gezielt zerstört werden können. Der große Vorteil von Krebsimmuntherapien liegt darin, dass durch die Spezifität der eingesetzten Komponenten Kollateralschäden, wie sie beispielsweise bei einer Chemo- oder Strahlentherapie auftreten können, begrenzt werden. Zudem könnte diese Art von Therapie gerade für solche Tumore erfolgsversprechend sein, die bereits bei der Diagnosestellung inoperabel und sehr aggressiv sind und somit eine schlechte Prognose haben, wie es zum Beispiel beim Glioblastom (GBM) der Fall ist (Mitchell, et al. ²).

1.1 Hirntumore des Kindesalters

Die Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) sind mit etwa 26% aller Krebserkrankungen im Kindesalter die größte Diagnosegruppe unter den soliden Tumoren in der BRD (Kinderkrebsregister Deutschland 2016) und nach den Leukämien die zweithäufigste Tumorerkrankung im Kindesalter. Jährlich gibt es hier pro 100.000 Kinder ca. 3,6 Neuerkrankungen mit einem Hirntumor. Jungen erkranken ca. 1,3 Mal häufiger daran als Mädchen. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt bei 6 Jahren (Kaatsch, et al. ³).

Histopathologisch erfolgt die Einteilung nach der WHO Klassifikation 2007 (Louis, et al. ⁴), wobei römisch I und II als *niedrig maligne*, dagegen römisch III und IV als *hoch maligne* bezeichnet werden.

Tabelle 1 zeigt den Malignitätsgrad, die jeweiligen Häufigkeiten und die Inzidenzen der häufigsten Hirntumore im Kindesalter auf.

Histologie	WHO Grad	Häufigkeit in Bezug auf alle Hirntumore	Häufigkeit in Bezug auf alle pädiatrische Tumore	Inzidenz 1.000.000/Jahr
Astrozytom	I-IV	46%	11%	18
Embryonale Tumore, z.B. Medulloblastom	IV	18%	4%	7
Ependymom	I-III	8%	2%	3

Tabelle 1: Inzidenzen der häufigsten Hirntumore im Kindesalter (Quelle Kinderkrebsregister 2016). Astrozytome (WHO I-IV) stellen die häufigsten pädiatrischen Hirntumore dar und machen 11% aller pädiatrischen Tumore aus

Rund 60% der ZNS Tumore sind glialen Ursprungs, hierunter fallen die astrozytären Tumore (Einteilung siehe Tabelle 2), Ependymome und oligodendrogliale Tumore. 40 % sind nicht glialen Ursprungs, wie z.B. das Medulloblastom, Kraniopharyngeome und die Meningiome.

Histologie	WHO	Häufigkeit (%)
Pilozytisches Astrozytom	I	14,8
Diffuses Astrozytom	II	2,2
Anaplastisches Astrozytom	III	1,9
Glioblastom	IV	2,8

Tabelle 2: Einteilung und Häufigkeit der Astrozytome (bezogen auf alle pädiatrischen ZNS Tumore außer Keimzelltumore) in die wichtigsten Untergruppen nach Kaatsch, et al.³ und Louis et al. 2007⁴ aus Pfister and Witt⁵. Das GBM kommt mit einer Häufigkeit von ca. 3% vor.

Klinisch treten Hirntumore durch Symptome des erhöhten Hirndrucks, wie etwa Kopfschmerzen und Nüchternerebrechen auf. Aber auch Krampfanfälle, Ataxie, Paresen und Sehstörungen können auf einen Hirntumor hinweisen (J. Kühl †⁶). Nahezu ein Drittel der Hirntumore des Kindesalters ist von hoher Malignität. Aufgrund der Invasivität, der hohen Rückfallrate vor allem bei verbliebenem Resttumor, Mikrometastasierung in einem frühen Stadium sowie der Metastasierung über die Liquorwege (z.B. Medulloblastom) gestaltet sich die Therapie als sehr schwierig.

Besonders das Glioblastom zeichnet sich durch rasches Wachstum und Infiltrationsneigung mit anschließender Metastasierung aus. Dies hat zur Folge, dass bereits bei Diagnosestellung eine vollständige Resektion nicht mehr möglich ist, da Mikro-Metastasen sich fernab - auch auf der Gegenseite - im MR-tomographisch oder auch OP-mikroskopisch unauffälligem Hirngewebe befinden können und früh für ein Rezidiv sorgen (Gadner⁷).

1.2 Standardtherapie bei hochgradig malignen Gliomen

Bei den hochgradig malignen Gliomen, zu denen das Glioblastom gezählt wird, besteht die Therapie aus Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie mit Temozolomid. Erwachsene werden nach dem sogenannten Stupp-Schema

(Stupp, et al. ⁸) behandelt: Operation, Radiotherapie (54-60 Gy) kombiniert mit Temozolomid (75 mg/m² pro Tag) für 7 Tage, gefolgt von 6 Zyklen adjuvanter Temozolomid-Therapie mit einer jeweiligen Dauer von 5 Tagen alle 28 Tage (150 mg/m² – 200mg/m²).

Dadurch konnte eine durchschnittliche Lebensverlängerung von 14,6 Monaten (vgl. 12,1 Monate alleinige Bestrahlung) mit nur etwas erhöhter Toxizität erreicht werden. Mit der kombinierten Therapie liegt die 2-Jahres Überlebensrate bei 26,5% (vgl. 10,4% alleinige Bestrahlung [Stupp, et al. ⁸]).

Kinder wurden in Deutschland im Rahmen der HIT-HGG 2007 Studie therapiert, bei der gegenwärtig aber die Rekrutierung abgeschlossen ist. Das Therapieprinzip bleibt im aktuellen Studienregister aber das gleiche:

Operation, gefolgt von kombinierter Radiochemotherapie mit Temozolomid für 5-6 Wochen und danach Konsolidierungstherapie aus 12 Zyklen mit Temozolomid für jeweils 5 Tage alle 28 Tage, in Anlehnung an das Erwachsenenschema. Für pädiatrische GBM Patienten liegt die 2-Jahres-Überlebensrate ebenfalls bei 26% (Driggers, et al. ⁹).

Diese Zahlen verdeutlichen die hohe Letalität und die sehr ungünstige Prognose nach Diagnosestellung eines Glioblastoms.

Die Art der bisherigen konventionellen Therapie für Gehirntumore führt häufig zu irreversibler Beschädigung des umgebenden gesunden Hirngewebes, was zu Spätfolgen wie z.B. neurologische Ausfallserscheinungen, Konzentrationsstörungen, Störungen der Pubertätsentwicklung oder Sekundärmalignomen führen kann (J. Kühl † ⁶).

Aus den genannten Gründen wird die Suche nach neuen Therapieansätzen forciert. Insbesondere immuntherapeutische Ansätze werden derzeit untersucht, da man sich eine zusätzliche präzise nebenwirkungsarme Bekämpfung des Tumors und der Mikrometastasen durch das spezifische Immunsystem erhofft (Mitchell, et al. ²).

1.3 Allgemeine immuntherapeutische Ansätze

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus vor Mikroorganismen und körperfremden Stoffen zu schützen. Es unterteilt sich in ein angeborenes und

ein erworbenes System, sowie in ein humorales und zelluläres System. Der Aufbau und die Bestandteile sind in Tabelle 3 dargestellt. Daraus lässt sich auch erkennen, dass der erworbene, spezifische Teil für eine Effektor-Reaktion mehrere Tage braucht.

	Angeboren, Unspezifisch, natürlich	Erworben, Spezifisch, adaptiv
Zellen	Makrophagen (auch gewebsspezifisch) Granulozyten (Eosinophilen, Basophile, Segmentkernige) Natürliche Killer Zellen Dendritische Zellen	B Lymphozyten T Lymphozyten -CD 4-Helfer/Regulator -CD 8-Zytotoxisch
Lösliche Bestandteile/ humoral	Komplement Zytokine, z.B. Interferone G	Antikörper IgA, Ig G, Ig M, Ig G, Ig E
Spezifität	Breit	Antigenspezifisch
Latenz	Keine/wenige Tage	> 3 Tage

Tabelle 3: Bestandteile des Immunsystems. Unterschieden werden angeborene unspezifische und erworbene spezifische Anteile, sowie zelluläre und humorale Komponenten

Zudem hat sich gezeigt, dass das Immunsystem in der Abwehr von Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Dabei spielt die Erkennung der tumorassoziierten Antigene („Tumor associated antigens“ = TAA) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinne kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von einem Element des Immunsystems erkannt wird und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen bezeichnet werden. Für den Einsatz in der Immuntherapie sollte ein TAA idealerweise folgende Eigenschaften besitzen:

- Kontinuierliche Expression nur im Tumor sowie in dessen Metastasen

- Im Vergleich zu normalem Gewebe Überexpression innerhalb eines Tumors
- Essentielle Funktion für das Tumorwachstum
- Hohe Konzentration innerhalb des Tumors

Da das ZNS auf Grund der Bluthirnschranke und dem fehlenden Anschluss an das Lymphsystem, eine immunologische Sonderrolle spielt, können Zweifel an der Möglichkeit einer Immuntherapie bei Hirntumoren aufkommen. In den vergangenen Jahren wurde jedoch erkannt, dass es gerade im krankhaft veränderten Gehirn durchaus möglich ist, dass Leukozyten die Bluthirnschranke überwinden können. Darüber hinaus bestehen Verbindungen zwischen dem Liquor- und Lymphsystem (Parney ¹⁰). Im Allgemeinen werden folgende immuntherapeutische Ansätze beim Glioblastom (Mitchell, et al. ²) verfolgt:

1.3.1 Passive Immuntherapie

Antikörperbehandlung (Chen and Mitchell ¹¹):

Zum Einsatz kommen hier monoklonale Antikörper. Die Applikation kann i.v. oder aber auch intrathekal bzw. intracavital nach OP erfolgen. Die i. v. Gabe ist auf Grund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke im Bereich des Tumors möglich (Chen and Mitchell ¹¹).

Die Antikörper können entweder unkonjugiert (ungebunden) oder mit Toxinen (z.B. anti- IL-13-Rezeptor-alpha 2 mit Pseudomonas Exotoxin [Kioi, et al. ¹²]) oder mit radioaktiven Nukleotiden konjugiert sein. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, wie die Antikörper den Zelltod der Tumorzelle bewirken können. Gebunden an die Zell-Oberfläche werden durch Opsonisierung natürliche Killerzellen und andere Effektorzellen aktiviert (Clynes, et al. ¹³). Antikörper können aber auch an Oberflächenrezeptoren binden und somit die „Kommunikation“ (Signalwege) des Tumors mit der Umgebung unterbinden. Des Weiteren können Antikörper auch direkt an Botenstoffe wie Zytokine oder Hormone binden und somit deren Funktion ausschalten.

Ein Beispiel hierfür ist der *Epidermal Growth Factor Receptor Variante III* (EGFRvIII). Dieser wird in malignen Gliomen überexprimiert und vermittelt Signale für die Zellteilung. Eine Bindung an EGFRvIII mittels anti-EGFRvIII

(Scott, et al. ¹⁴) induziert die Apoptose. Variante III ist dabei entscheidend, da der „normale“ EGFR auch in anderen Organen exprimiert wird.

Ein anderes Beispiel für einen tumorspezifischen Rezeptor ist IL-13-Rezeptor-alpha 2, gegen den ebenfalls monoklonale Antikörper für therapeutische Zwecke entwickelt und in Studien getestet werden (siehe oben).

Ein weiteres Ziel für monoklonale Antikörper ist die Neoangiogenese. Hier wird der Einsatz von anti-VEGF (Bevacizumab, Avastin®) im GBM erprobt (Chamberlain and Johnston ¹⁵).

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern ist auf Oberflächenantigene beschränkt.

Zytokine

Zytokine („Zellbotenstoffe“) sind von Zellen gebildete lösliche Polypeptide oder Glykoproteine, die über spezifische Rezeptoren und daran angeschlossene Signalkaskaden einen Effekt auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung von anderen Zellen haben. Darüber hinaus besitzen sie auch pro- oder antiinflammatorische Wirkung (Kenneth M. Murphy ¹⁶ S.107).

Ein Beispiel ist Interleukin 2 (IL-2), auch Wachstumsfaktor des Immunsystems genannt (Kenneth M. Murphy ¹⁶ S.435f.), das nicht nur Zellen stimuliert und die Ausschüttung anderer Zytokine (z.B. IL-1 oder IFN- γ) fördert, sondern auch eine Antitumorwirkung hat, die erstmals 1986 auch bei Glioblastomen beobachtet wurde (Jacobs, et al. ¹⁷).

Ein weiteres Beispiel ist IL-4, welches von einer Vielzahl von Zellen, insbesondere T-, B-, NK- und dendritische Zellen, gebildet wird. IL-4 hat vielfache Funktionen: Bei den B-Zellen fördert es u.a. die Expression des B-Zell-Rezeptors, den Antikörper-Switch von Ig1 auf IgE sowie die Immunglobulin Produktion an sich.

Daneben wirkt IL-4 wachstumsfördernd auf CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie die Differenzierung der CD4+ T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen.

IL-4 spielt zudem eine wichtige Rolle für die Vermehrung und Reifung von IL-12 sezernierenden Tumor infiltrierenden dendritischen Zellen, welche eine Tumor spezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion (CTL) auslösen können. Darüber

hinaus wird die Histaminfreisetzung aus Mastzellen durch IL-4 ausgelöst und es hat einen direkten wachstumshemmenden Effekt auf Tumorzellen (Angus W. Thomson ¹⁸, Volume 2 S.237ff).

Okada et al. haben autologe transfizierte IL-4 sezernierenden Fibroblasten in Kombination mit autologen bestrahlten Gliomzellen Patienten mit GBM nach Tumorresektion intradermal verabreicht. Neben einer lokalen Entzündung (IL-4 Dosis abhängige CD4+/CD8+ T-Zellen Infiltration) an der Impfstelle wurde auch eine systemische tumorspezifische Immunantwort in Form einer durch CD8+ T-Zellen induzierten IFN- γ Antwort gegen die HLA A2 restringierten Tumor assoziierten Antigene EphA2₈₈₃₋₈₉₁ und IL-13-Rezeptor-alpha 2 gemessen. Für die Herstellung dieses Impfstoffes benötigen die Wissenschaftler 7 Wochen, was eine gewisse Limitierung des Verfahrens bei fortgeschrittener Erkrankung darstellt (Okada, et al. ¹⁹).

Ein weiterer Ansatz ist die Koppelung von IL-4 mit Pseudomonas-Exotoxin (Weber, et al. ²⁰). Auch IL-13 ist als Target hierfür gut geeignet (s.u.)

1.3.2 Aktive Immuntherapie

Vakzinierung mit dendritischen Zellen:

Bei dieser Form der Therapie soll sich das Immunsystem, ähnlich dem Prinzip einer aktiven Immunisierung durch Impfung, in vivo aktiv mit den Tumorantigenen auseinandersetzen. Unter den antigenpräsentierenden Zellen nehmen insbesondere die dendritischen Zellen (= dendritic cells = DCs) eine wichtige Rolle ein, da diese das Antigen durch Phagozytose aufnehmen, die Proteine aufspalten und die entstandenen Fragmente über MHC-I Rezeptoren CD 8+ T-Zellen und über MHC –II Rezeptoren CD 4+ T-Zellen präsentieren.

Der MHC-I-Komplex wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Über den MHC-I Rezeptor können alle kernhaltige Zellen Peptide präsentieren, z.B. von einem Virus während einer Infektion. Memory-CD8+ T-Zellen können mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den MHC-I/Peptid-Komplex binden und die Zelle zerstören. Zuvor muss es aber zu einer Aktivierung naiver CD8+ T-Zellen kommen, indem das entsprechende Antigen über den MHC-I Komplex im Kontext entsprechender kostimulierender Faktoren (z.B. CD86) präsentiert wird.

Dies ist nur durch professionelle antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen (=dendritic cells = DCs) oder mit Einschränkungen auch B-Zellen möglich. Naive CD8+ T-Zellen differenzieren nach Aktivierung via MHC-I zu zytotoxischen T-Zellen, CD4+ T-Zellen differenzieren zu Th1-, Th2- und regulatorischen T-Zellen mit unterschiedlichen Funktionen. Dieser Vorgang der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen wird auch Priming (Prägung) genannt (Kenneth M. Murphy ¹⁶ S.433f). Jeder T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennt dabei spezifische Peptidsequenzen, die über MHC-I präsentiert werden. Diese Peptide sind in der Regel 8-10 Aminosäuren lang. Der TCR ist spezifisch für eine bestimmte Kombination aus MHC-Komplex und Peptid.

Im Vergleich hierzu kommen MHC-II-Moleküle nur auf antigenpräsentierenden Zellen vor und präsentieren den CD4+ T-Zellen Antigene, die vorher durch Phagozytose aufgenommen worden sind. Die Länge der Peptide beträgt hierbei mindestens 13 Aminosäuren.

Praktisch wird, um eine Tumoringpfung mit DCs durchzuführen, vom Patienten mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut Leukozyten gesammelt. Aus diesen werden in weiteren Schritten die Monozyten separiert, woraus sich dann DCs leicht in großen Zellzahlen differenzieren lassen (Peng, et al. ²¹). Anschließend ist es ex vivo möglich, DCs mit Tumorantigenen in Form von Peptiden oder Tumor-Lysat zu beladen und die Zellen dann als Vakzine einzusetzen. Über diesen Weg der Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen wird nun das Tumorantigen dem Immunsystem zugänglich gemacht (Parney ¹⁰).

Als Antigenquellen dienen hierbei beispielsweise intakte Tumorzellen, Tumor-Protein-Lysate, vom Tumor gewonnene mRNA, synthetische Peptide oder von Tumor MHC-I Molekülen isolierte Peptide (Vauleon, et al. ²²).

Eine Applikation kann alleine oder zusammen mit Adjuvanzen erfolgen.

Ein Beispiel für die Vakzinierung mit DCs beim GBM ist die experimentelle Studie von De Vleeschouwer, et al. ²³: Hierbei wurden 56 Patienten (Kinder und Erwachsene) mit GBM-Rezidiv in Gruppen aufgeteilt und bekamen in unterschiedlichen Abständen dreimal eine Impfung appliziert.

Das progressionsfreie Überleben dieser Rezidivpatienten lag in dieser Studie bei 3 Monaten, das Gesamtüberleben bei 9,6 Monaten und die 2-Jahres Überlebensrate bei 14%.

In Abbildung 2 ist das Prinzip der DC Vakzinierung noch einmal zusammengefasst dargestellt.

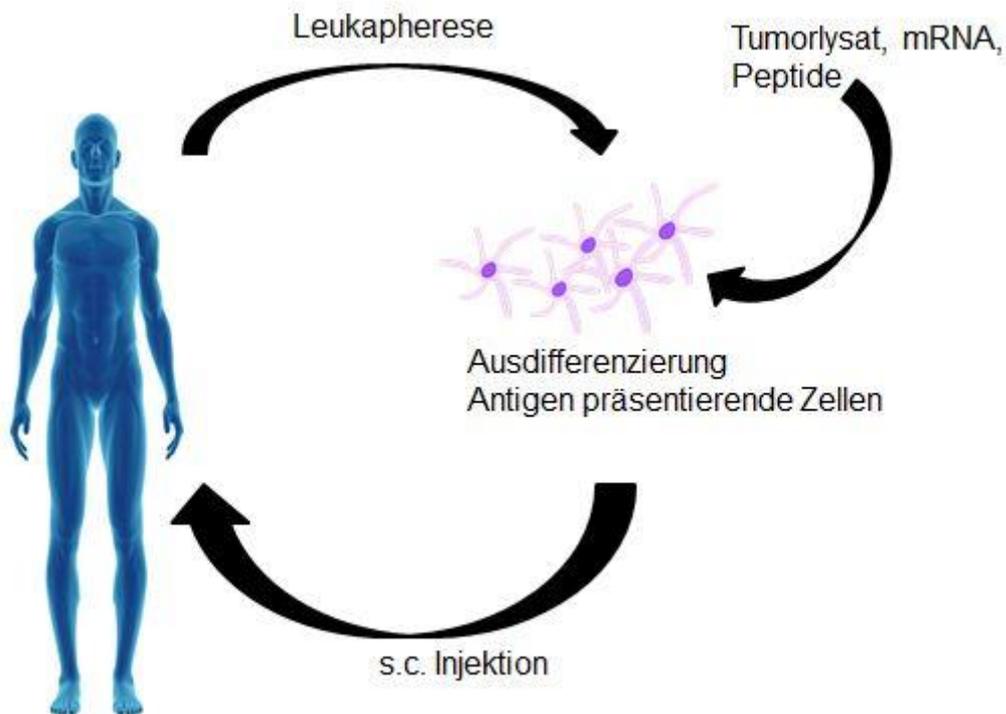


Abbildung 2: Prinzip DC Vakzinierung. Durch Leukapherese werden antigenpräsentierende Zellen isoliert und mit Hilfe von Tumorlysat, mRNA oder Peptiden zum Ausdifferenzieren gebracht. Danach können die Zellen dem Patienten mittels s.c. Injektion verabreicht werden.

Peptid Vakzinierung

Bei dieser Methode erfolgt eine s.c. Injektion tumorspezifischer Peptide oder Peptid-Mischungen kombiniert mit Adjuvanzen zur Verstärkung der Immunantwort beim Patienten. Diese werden dann *im Körper* von dendritischen Zellen der Haut aufgenommen und T-Zellen präsentiert, um eine tumorspezifische Immunantwort auszulösen. Der Schlüssel dieser Technik liegt darin, Peptide zu verwenden, die tumor-spezifisch sind und dort stark exprimiert werden. In Frage kommen hierbei ausgewählte synthetisch hergestellte

Peptide, aus Tumorlysat extrahierte spezifische Proteine oder unspezifische Peptidmischungen gewonnen aus Tumorlysaten (Bloch ²⁴).

Bislang am besten wurde der epidermale Wachstumsfaktor Variante III (EGFRvIII) erforscht. Er wurde und wird bereits in zahlreichen Studien (z.B. Sampson, et al. ²⁵) eingesetzt. Das progressionsfreie Überleben in der ACTIVATe Studie lag bei den 18 Studienteilnehmern bei 12,3 Monaten und das Gesamtüberleben bei 20,4 Monaten. Da es sich um eine Phase II Studie handelte, müssen weitere Studien durchgeführt werden, um mehr Daten auch in Bezug auf Nebenwirkungen zu erhalten.

Onkolytische Viren

Ein relativ neuer Therapieansatz besteht darin, gentechnisch veränderte onkolytische Viren, einem trojanischen Pferd entsprechend, zu verwenden.

Paradebeispiel ist Wild-Typ HSV-1, das schwere Enzephalitiden verursachen kann. Durch künstliche Mutationen konnten Markert, et al. ²⁶ einen Virus-Typ generieren, der gesunde Nervenzellen im Gehirn nicht befällt, während Tumorzellen infiziert werden. Durch weitere Mutationen wurde eine onkolytische Wirkung erreicht. Des Weiteren gibt es Ansätze zur Veränderung des Virengensoms, indem beispielsweise Gene von Immunstimulatoren, wie z.B. IL-4, direkt in das Virengenom eingebaut werden, um eine Lyse der Tumorzellen zu erreichen. Befällt das veränderte Virus eine Tumorzelle und setzt dadurch bei Benutzung des Syntheseapparats der Tumorzelle das Virengenom frei, wird die Tumorzelle ebenso IL-4 produzieren. Dies hat zur Folge, dass eine zelluläre Immunantwort aktiviert wird (Okada, et al. ²⁷).

Adoptive Zell Transfer Immuntherapie (Vauleon, et al. ²²)

Unter diesem Therapieverfahren versteht man im Allgemeinen die Verwendung von autologen, also patienteneigenen, spezifischen oder unspezifischen Effektorzellen. Diese werden ex vivo gegen tumorspezifische Antigene aktiviert, vermehrt und anschließend dem Patienten appliziert (intravenös, intrathekal, intracavital). Unterschieden wird prinzipiell von tumorspezifischen und unspezifischen Verfahren (Ishikawa, et al. ²⁸):

1. Tumor unspezifische Zellen

- *Lymphocyte/lymphokine-activated-killer (LAK) cells*

(nach NCI Drug Dictionary)

Sie werden durch Kultivierung von peripheren Lymphozyten in Anwesenheit von IL-2 generiert. Sie haben als zytotoxische Effektorzellen (Mischung aus NK Zellen und CD8+ T-Zellen) ein breites Zielspektrum, sowohl gegen Tumorgewebe als auch normales Gewebe unterschiedlicher Herkunft

Beispiel: Dillman, et al. ²⁹

- *Natural killer cells*

Sie werden mittels Leukapherese gewonnen und in Kultur angereichert und expandiert. Sie erkennen via Fc Rezeptor in vivo mittels Antikörpern opsonisierte Tumorzellen und können diese mit Perforinen, Granzymen und Tumor-Nekrose-Faktor lysieren. Zur Therapie erfolgt eine i.v. oder i.c. Injektion.

Beispiel: Ishikawa, et al. ³⁰

2. Tumor Spezifische Zellen

- *Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)*

Es handelt sich dabei um Lymphozyten, die bereits in das Tumorgewebe eingewandert sind. Daraus werden sie isoliert und mit IL-2 und anderen Lymphokinen kultiviert und angereichert. Es handelt sich um eine Mischung aus CD 8+, CD 4+ T-Zellen (Effektor T-Zellen). Anschließend werden sie dem Patienten infundiert und sollen eine Tumorzell-Lyse hervorrufen. Beispiele: Quattrocchi, et al. ³¹, Liu, et al. ³²

- *Cytotoxic T-Lymphocytes (CTL)*

Hierbei handelt es sich um spezifische CD8+ T-Zellen, die Tumorzellen auf Grund ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors und der vorangegangenen MHC I gebundenen Aktivierung in vitro mittels Peptid (in der Regel ein TAA) erkennen. Sie werden ex vivo aus peripheren Lymphozyten durch Antigen-Stimulation gewonnen. Beispiel: Kruse, et al. ³³

Im Folgenden wird näher auf die CTL-Technik, der sogenannten adoptiven T-Zell-Therapie, eingegangen und erläutert, warum sich tumorspezifische T-Zellen für therapeutische Ansätze eignen.

1.4 Adoptive T-Zell-Therapie

Zytotoxische T-Zellen sind maßgeblich bei der Abstoßung eines Tumors beteiligt. So zeigte sich bei Patienten mit malignem Melanom regelmäßig eine sehr hohe spontane T-Zell-Antwort gegen den Tumor sowie eine Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von CD8+ T-Zellen und dem klinischen Verlauf der Regression nach T-Zell-Vakzinierung (Boon, et al. ³⁴).

Die Tatsache, dass zytotoxische T-Zellen Tumore identifizieren können, beruht auf der Bindung zwischen Peptidsequenzen der TAA via MHC I mit den jeweils spezifischen T-Zell-Rezeptoren (Stobo ³⁵).

Nur wenn ein Peptidantigen über eine bestimmte allelische Variante eines MHC Moleküls gebunden ist, kann eine T-Zelle dies auch erkennen. Dieses Prinzip wird MHC-Restriktion genannt und wurde 1974 von Rolf Zinkernagel und Peter Doherty (Zinkernagel and Doherty ³⁶) erstmalig beschrieben.

Eine T-Zelle erkennt dasselbe Peptid nicht, wenn es an eine andere allelische Variante des MHC gekoppelt ist (Kenneth M. Murphy ¹⁶ S. 267). Die Bindung erfolgt ähnlich dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und nur unter der Voraussetzung, dass die Peptidsequenz zum TCR passt. Ist dies gegeben, wird die CD8+ T-Zelle aktiviert und ihre Effektor Mechanismen ausgelöst.

Zu den von tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitope zählen Moleküle, die aus allen Proteinklassen stammen können (z.B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme [Kawakami, et al. ³⁷]). Diese Proteine müssen nicht zwangsläufig an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper erforderlich ist, sondern es werden Peptidfragmente als Abbauprodukte, auch von intrazellulären Molekülen, im Kontext von MHC-I und MHC-II präsentiert.

Für die Immuntherapie ist hierbei entscheidend, dass die verwendeten Antigene in der Lage sind, eine T-Zell Antwort gegen den Tumor auszulösen und deren

Peptidsequenzen über MHC Moleküle präsentiert werden, also immunogen sind.

Das Prinzip der adoptiven T-Zell-Therapie wird in Abbildung 3 verdeutlicht. Durch Leukapherese werden von einem Patienten sog. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) gewonnen. Durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren können daraus DCs und mittels Separationsverfahren naive CD8+ T-Zellen generiert werden. Durch die Zugabe eines geeigneten Reifungscocktails reifen die DCs aus und können mit einem tumorspezifischen Peptid beladen werden. Diese Zellen stimulieren dann CD8+ T-Zellen. Die weitere Expansion dieser T-Zell-Linien erfolgt dann – je nach Protokoll – mit T-Zell-Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-7 und IL-15. Die Zellen werden in mehreren Zyklen mit peptid-beladenen antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten/PBMC/B-LCL) restimuliert, bis eine antigen-spezifische Population, beispielsweise mittels Multimertechnologie, nachweisbar ist (Wolfl, et al. ³⁸). Es folgt die Expansion antigenspezifischer T-Zellen, die dann dem Patienten wieder reinfundiert werden (z.B. Chapuis, et al. ³⁹). Bei einer klonalen Expansion antigen-spezifischer T-Zellen ist die Reinheit des T-Zell-Präparates am höchsten, wobei damit nicht automatisch auf die höchste Wirksamkeit geschlossen werden kann. Eine alternative Methode des adoptiven T-Zell-Transfers ist die Expansion tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs), die ebenfalls unter unterschiedlichen Stimulations- und Expansionsbedingungen ex vivo in großer Zahl vermehrt werden. Innerhalb dieser heterogenen TIL-Population sind tumor-spezifische T-Zellen angereichert, weshalb dieses T-Zell-Produkt dann als tumorspezifisches Produkt eingesetzt werden kann (Rosenberg and Dudley ⁴⁰, Yang and Rosenberg ⁴¹).

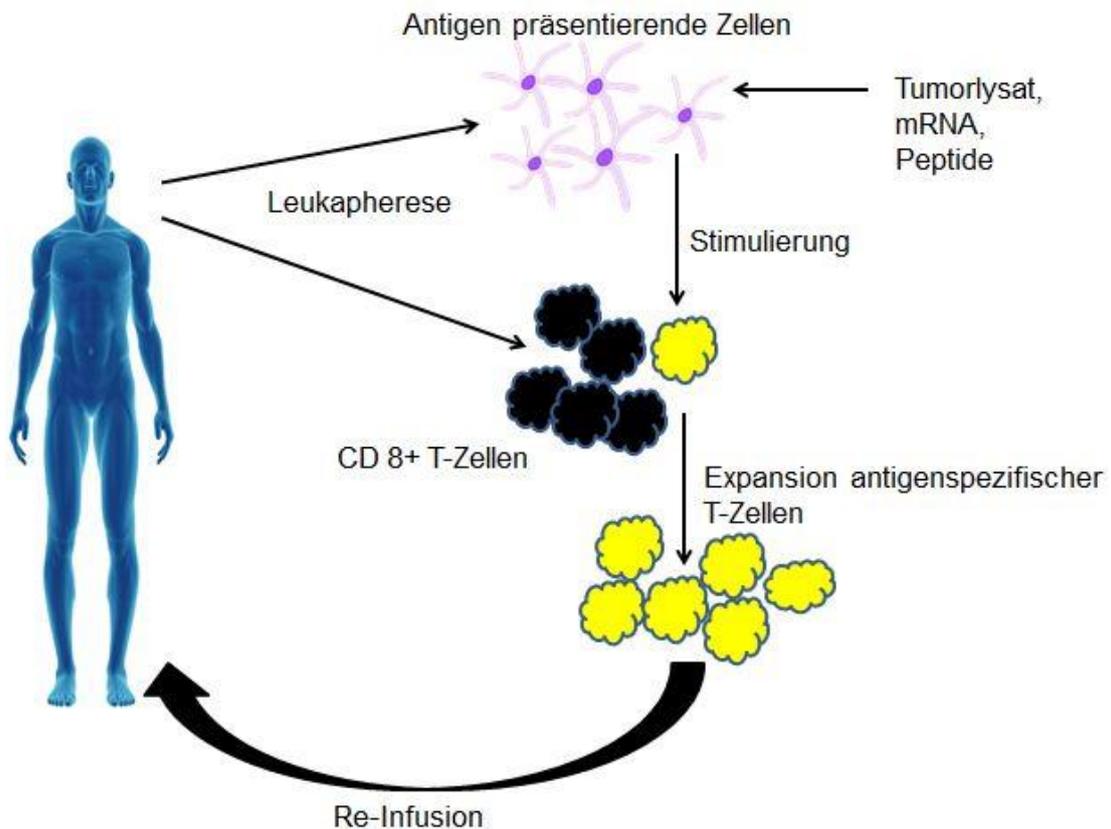


Abbildung 3: Prinzip der Adoptiven T-Zell-Therapie. Mittels Leukapherese werden patienteneigene PBMC gewonnen. Hieraus werden CD8+ T-Zellen und DCs isoliert. Letztere werden nun mit Tumorlysat, mRNA oder Peptiden zum Ausdifferenzieren gebracht und anschließend mit den CD8+ T-Zellen inkubiert. Dies bewirkt eine Stimulierung der Tumor spezifischen T-Zellen, die jetzt expandiert und dem Patienten reinfundiert werden können.

Die Vorteile einer adoptiven T-Zell-Therapie liegen in folgenden Eigenschaften (Disis, et al. ⁴²): T-Zellen wandern in das Tumorgewebe ein und spüren die Antigen exprimierenden Zellen auf, egal wo diese lokalisiert sind. Außerdem können die T-Zellen vor Ort proliferieren und ein Gedächtnis (in dem Fall gegen Tumorantigene) ausbilden, was wiederum einem möglichen Tumor Rezidiv entgegenwirkt. Durch die hohe Spezifität des TCR verspricht diese Technik eine niedrige Nebenwirkungsrate. Im Vergleich zu Antikörpern, reagieren T-Zellen via MHC-I auch auf intrazelluläre tumorspezifische Antigene und deren Fragmente.

Im Folgenden wird näher auf die tumorassoziierten Antigene im Glioblastom eingegangen, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden und die für eine adoptive T-Zell-Therapie in Frage kommen.

1.5 Tumorassoziierte Antigene beim Glioblastom

1.5.1 Übersicht

Folgende Antigene sind in Gliomen beschrieben worden und werden von CTL erkannt (Grauer, et al. ⁴³):

- Cancer/testis antigens: Diese werden in verschiedenen Tumorarten sowie in Hoden, Eierstöcken und Plazenta exprimiert. Die Gene kommen normalerweise in Keimzellen vor. Als Beispiele sind das melanoma-associated-encoding gene-1 (MAGE-1) oder SOX6 zu nennen (Syed, et al. ⁴⁴).
- Überexprimierte Eigenantigene: Diese kommen auch in den normalen Zellen des den Tumor umgebenden Gewebes vor, werden aber in den Tumorzellen überexprimiert. Beispiele hierfür sind u.a. EGFRvIII, IL-13-Rezeptor-alpha 2, Her-2, WT-1 oder das Apoptose-Inhibitor Protein Survivin. Ferner sind Epitope von EphA2, EphB6, AIM-2, ARF4L, SART-3, SOX11, KIF1C, KIF3 beschrieben (Toda ⁴⁵).
- Differenzierungsantigene: Diese werden nur während einer Phase des Zellzyklus exprimiert, z.B. Melan-A, gp100 oder tyrosinase related protein (TRP-2).
- Stroma-Antigene: Sie werden im Stroma des Tumors gebildet, wie z.B. Tenascin, ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix.

Eine besondere Rolle spielt der IL-13-Rezeptor-alpha 2. Dieser wird in Glioblastomen sehr stark exprimiert (Joshi, et al. ⁴⁶) und eignet sich daher besonders gut als immunhistochemischer Marker (Saikali, et al. ⁴⁷). Es existieren mehrere Studien, die mittels monoklonalem Antikörper gegen IL-13-Rezeptor-alpha 2 kombiniert mit einem Toxin, z.B. Pseudomonas-Exotoxin (Maini, et al. ⁴⁸, Kioi, et al. ¹²), versucht haben, eine spezifische GBM Therapie zu entwickeln (vgl. Abschnitt 1.3.1). Darüber hinaus werden Epitope des IL-13-Rezeptor-alpha 2 von CTLs erkannt, so dass er als mögliche Zielstruktur für eine adoptive T-Zell-Therapie geeignet ist.

1.5.2 Melan-A als Tumorantigen

Wie bereits unter Abschnitt 1.4 beschrieben, wurde bei Melanom Patienten bereits in den 1980er Jahren eine spontane T-Zell Antwort gegen Tumorzellen *in vitro* beobachtet. Beim Charakterisieren dieser Reaktion wurde das „melanosomal-antigen-recognized-by T-cells 1“ (MART-1) *oder auch* „melanosomal differentiation antigen“ (Melan-A) als Antigen identifiziert (Wang, et al. ⁴⁹, Coulie, et al. ⁵⁰). Im Folgenden wird nur der Begriff Melan-A weiterverwendet.

Es handelt sich um eine HLA-A2 restringierte T-Zell Antwort gegen ein Peptid von Melan-A (Boon, et al. ³⁴). Melan-A ist ein Melanozyten-Differenzierungsantigen mit einem Molekulargewicht von 18 KDa (Busam and Jungbluth ⁵¹). Es eignet sich besonders als Differenzierungsmarker bei der Diagnose eines malignen Melanoms, da es in diesen überexprimiert wird. Das Melan-A Gen kodiert ein Polypeptid von 118 Aminosäuren Länge. Die Funktion ist bislang noch unklar. Es scheint eine wichtige Rolle bei der Pigmentierung von Säugetieren (Hoashi, et al. ⁵²) zu spielen. Es kommt im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi Apparat vor und gehört zu den Typ-III-Signal-Anker Proteinen. Das HLA-A2 restringierte immundominante Peptid ist Bestandteil der Transmembranregion des Polypeptids und die Wild-Typ-Form hat die Aminosäure-Sequenz „EAAGIGILTV“ (26-35) (Romero, et al. ⁵³).

Beim immunogenen heteroclitischen Peptid von Melan-A, welches aus den Aminosäuren 26-35L (ELAGIGILTV) besteht, wird zur Optimierung der Bindung an HLA-A2 an Position 2 Alanin durch Leucin ersetzt, da dieses besser in der Bindungstasche bindet. Dadurch wird das Peptid länger präsentiert, was zu einer längeren Stimulation in den T-Zellen führt. *In vitro* konnte eine sehr gute Stimulation mit dem veränderten Peptid bei T-Zellen von Melanompatienten gemessen werden (Kawakami, et al. ⁵⁴). Aufgrund seiner Immunogenität (Romero, et al. ⁵³) und der hohen Frequenz an Melan-A spezifischen T-Zellen bei Tumorpatienten wurde Melan-A bereits in zahlreichen klinischen Studien für Immuntherapien beim metastasierten malignen Melanom als Zielstruktur eingesetzt (Yee, et al. ⁵⁵, Mackensen, et al. ⁵⁶).

So zählt Melan-A inzwischen zu den 20 besten Antigenen für eine Immuntherapie (Cheever, et al. ⁵⁷) bei malignen Tumoren.

Wegen der gemeinsamen embryonalen Abstammung von Melanozyten und glialen Zellen aus dem Neuroektoderm, wurden melanomsomale Antigene auch in Gliomen entdeckt (Chi, et al. ⁵⁸). Zhang, et al. ⁵⁹ analysierten die Expression von TAAs in Gliomzellen und fanden dort ebenso eine Expression von Melan-A. In diesem Zuge wurde beschrieben, dass Melan-A spezifische CD 8+ T-Zellen in der Lage sind, HLA-A2 positive Gliomazellen, die Melan-A exprimieren, zu erkennen und zu zerstören.

1.6 Zielsetzung

In gesunden Zellen ist Melan-A primär in Melanozyten und zum Teil im Innenohr und der Retina exprimiert. Im Vergleich zu vielen anderen Antigenen ist es damit relativ spezifisch für die Tumore, in denen es exprimiert wird (vor allem Melanome). Auf Grund der verhältnismäßig hohen Frequenz Melan-A-spezifischer T-Zellen sowohl bei Patienten als auch im gesunden, naiven T-Zell-Repertoire, lassen sich diese T-Zellen gut ex vivo für eine Immuntherapie expandieren. Wenn deshalb eine spezifische Expression von Melan-A in Glioblastomen regelhaft nachgewiesen werden kann, wie die Arbeit von Zhang et al. ⁵⁹ vorschlägt, wäre es ggf. ein geeignetes Tumorantigen für eine adoptive T-Zell-Therapie-Strategie für diese Patientengruppe. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Wöfl wurde eine Aktivierung Melan-A-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit HLA-A2+ Glioblastomzellen gesehen. Gleichzeitig wurden die Glioblastomzellen von den T-Zellen lysiert.

Abbildung 4 zeigt wie Melan-A spezifische CD8+ T-Zellen mit Bildung von Interferon-Gamma und IL-2 nach Inkubation mit den HLA-A0201 positiven gliomalen Zellen U 373 und den Melanomzellen FM 55 reagieren, aber nicht mit HLA-A2 negativen Zelllinien.

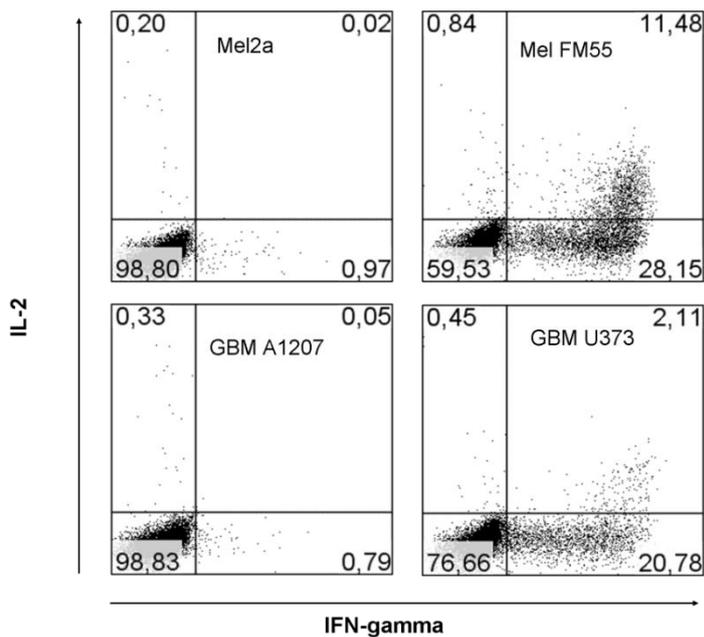


Abbildung 4: Melan-A spezifische CD8+ Zellen reagieren (IFN Gamma Synthese) nach Kontakt mit den HLA-A0201+ gliomalen Zellen U 373 und den Melanomzellen FM 55. Die Zellen Mel 2a (Melanom) und A 1207 (GBM) sind HLA A0201 negativ.

Die Aktivierung von Caspase-3 ist ein Marker für Zellen, die in Apoptose gehen. Im Caspase-Assay (Abbildung 5) wird gemessen, wie gut T-Zellen in den Tumorzellen Apoptose induzieren können. Nach Kokultivierung der T-Zellen mit den Zellkulturen erfolgt die Aktivierung mit Caspase 3. Danach kann mittels intrazellulärer Färbung mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern die Caspase in den HLA-A2+ Zelllinien (hier T6217 und FM 88) nachgewiesen werden.

Für eine adoptive T-Zell-Therapie ist eine hohe Anzahl spezifischer CD8+ T-Zellen nötig. Dies wird durch klonale Expansion in vitro erreicht. Die Expansion antigen-spezifischer T-Zellen aus dem naiven Repertoire ist normalerweise schwierig und langwierig, da die Vorläuferfrequenz solcher Zellen auf Grund der thymischen Depletion oft sehr gering ist und lange Kulturzeiten und Stimulationen nötig sind. Melan-A stellt eine Ausnahme dar, auch wenn die Frequenz immer noch niedrig ist.

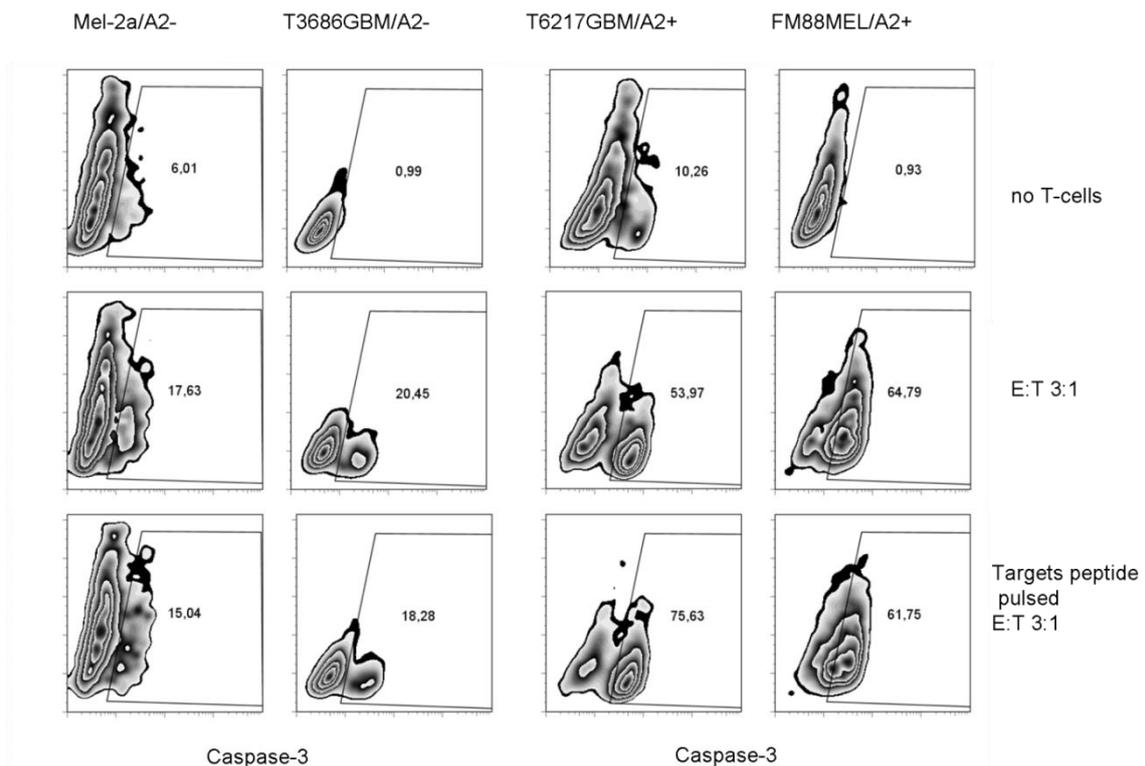


Abbildung 5: Caspase-3 Aktivierung in Melan-A spezifischen T-Zellen nach gemeinsamer vierstündiger Kultur von Tumorzellen (GBM: T 3686, T 6217; Melanom: Mel 2a, FM 88)

Da ein Expansionsprotokoll entwickelt wurde, das eine rasche Expansion in nur 10 Tagen im klinischen Maßstab ermöglicht, stellen diese Zellen ein gut zugängliches T-Zell-Produkt für die Immuntherapie bei Glioblastomen dar (Wolfl, et al. ³⁸).

Zusammenfassend stellte sich für diese Arbeit deshalb die Frage, wie stark und regelmäßig Melan-A in Glioblastomen exprimiert wird. Dabei sollten sowohl verschiedene Zelllinien untersucht, als auch Primärmaterial ausgewertet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Labormaterialien und Geräte

2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinie U373, sowie die Primärzelllinien Prim 1027/1194/1415/1399/1414/1427 stammen aus der Arbeitsgruppe (AG) Dres. Vince und Hagemann der Klinik für Neurochirurgie der Universität Würzburg. Die Zelllinien Mel 2a, FM 55 und FM 88 stammen aus der AG Prof. Dr. Becker der Klinik für Dermatologie der Universität Würzburg.

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Medien enthielten jeweils 10% fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin) und 2ml Penicillin/ Streptomycin (PAA) je Medium-Flasche.

DMEM	Invitrogen/Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom/Berlin
L-15+GlutaMax Leibovitz	Invitrogen/Karlsruhe

Zellen	Herkunft	Medium	HLA
U87	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	
U138	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	
U251	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2+
U343	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2+
U373	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2+
T3868	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2-
T5135	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	
T6217	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2+
A1207	GBM Linie	DMEM, 10% FCS	A2-
GAMG	Human glioma	DMEM, 10% FCS	
Prim 1027	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Prim 1194	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Prim 1415	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Prim 1399	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Prim 1414	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Prim 1427	GBM Patient	DMEM, 10% FCS	
Mel 2a	Melanom	RPMI 1640, 10% FCS	A2-
Mel624	Melanom	RPMI 1640, 10% FCS	
Mel 397	Melanom	RPMI 1640, 10% FCS	A2-
FM 55	Melanom	RPMI 1640, 10% FCS	A2+
FM 88	Melanom	RPMI 1640, 10% FCS	A2+
Gyn MCF 7	human breast adeno-ca	RPMI 1640, 10% FCS	A2+
Gyn OVAR	ovarian carcinoma	RPMI 1640, 10% FCS	
Gyn SKOV	human ovarian carcinoma	RPMI 1640, 10% FCS	
Gyn Ishikawa	human endometrial adeno-ca	RPMI 1640, 10% FCS	
SW13	human adrenocortical carcinoma	L-15+GlutaMax, Leibovitz, 10% FCS	
K562	human chronic myeloid leukemia in blast crisis	DMEM, 10% FCS	

Tabelle 4: Merkmale der verwendeten Zelllinien

2.1.2 T Zell-Kultur, Caspase Assay, Zytokinfärbung

DC-Medium	CELLGRO [®] + 1% HS + GM-CSF/IL4	CellGenix, Freiburg
T-Zell-Medium	CELLGRO [®] + 5% HS+ IL-7 + IL-15	CellGenix, Freiburg
GM-CSF		Gentauer, Aachen
IL4		Peprotech, Hamburg
IL7		Peprotech, Hamburg
IL15		Peprotech, Hamburg
IL21		Peprotech, Hamburg
IFN-gamma		Peprotech, Hamburg
LPS		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CD8 T-cell isolation kit II		Miltenyi, Bergisch Gladbach
Melan-A Peptid	ELAGIGILTV	JPT, Berlin
Accutase		GE Healthcare Lifescience, Freiburg
Waschpuffer	PBS 1% HS	GIBCO Lifetechnologies, Schwerte
Brefeldin A		Biolegend, Fell

Tabelle 5: Reagenzien für T-Zellkultur, Caspase Assay und Zytokinfärbung

2.1.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Für die Durchflusszytometrie wurden folgende Reagenzien benötigt:

Human Serum off the clot, Type AB	Biochrome
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Biosciences/Heidelberg
BD Perm/Wash	BD Biosciences/Heidelberg

Die Analyse erfolgte am FACS Typ Calibur der Firma BD Biosciences/Heidelberg, die Auswertung erfolgte mit der Software Cell-Quest Pro, ebenfalls von BD Biosciences.

2.1.4 Primärgewebe von GBM Patienten

Verwendet wurden Paraffinschnitte von GBM Resektionen aus dem Institut der Pathologie, Abteilung Neuropathologie der Universität Würzburg, ehemals Prof. Roggendorf, wobei versucht wurde möglichst viele pädiatrische Proben zu verwenden. Es gab zwei verschiedene Studien:

Zunächst wurden in Serie 1 Proben von 12 jungen Patienten getestet, die jedoch einer sehr heterogenen Gruppe entstammten: zum Zeitpunkt der Probengewinnung waren die Patienten unterschiedlich vortherapiert, andererseits lagen unterschiedliche histologische Subtypen des GBM vor. Zudem gab es teilweise mehrere zeitlich versetzt gewonnene Proben pro Patient, was die Vergleichbarkeit sehr schwierig machte. In Tabelle 6 sind die Merkmale der einzelnen Präparate der Serie 1 aufgeführt.

Aufgrund der bereits erwähnten Heterogenität wurde in einer 2. Serie versucht, Präparate auszuwählen, bei denen die Patienten keine Vorbehandlung mittels Chemo- oder Strahlentherapie erhalten haben. Des Weiteren wurden seltene histologische Subtypen ausgeklammert.

Patient Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	WHO-Grad
1	0,5	w	IV, sarkomatöse Komponente
2	15	m	IV, ehemalige Riesenzellkomponente
3	19	w	IV, Spindelzellkomponente
4	0,8	w	GBM of the spinal cord
5	8	m	IV
6	16	w	IV, Rezidiv, Tumorfraktion
7	6	m	IV, polymorph, biphasisch, Primärtumor
8	26	m	IV, Rezidiv nach Astrozytom (5 Jahre Abstand), z.n. RTX
9	15	m	Riesenzellkomponente
10	17	m	IV, z.n. OP, RTX, CTX, Riesenzellkomponente
11	19	w	IV, Riesenzellkomponente
12	24	w	IV, oligoastrozytär, Mischgliom, z.n. OP, RTX; CTX

Tabelle 6: Übersicht Patienten Serie 1

Allerdings führte das Institut für Pathologie nur 2 pädiatrische Proben, die die Auswahlkriterien der 2.Serie erfüllten, weshalb auch Proben von Erwachsenen miteinbezogen wurden (Tabelle 7).

Patient Nr.	Alter	Geschlecht	WHO-Grad
13	24	m	IV
14	24	m	IV
15	7	w	IV
16	14	m	IV
17	47	m	IV
18	69	w	IV
19	66	m	IV
20	76	w	IV
21	56	m	IV
22	28	w	IV

Tabelle 7: Übersicht Patienten Serie 2

Als Positivkontrolle für Melan-A wurden aus der AG Prof. Dr. Becker der Klinik für Dermatologie der Universität Würzburg Paraffinschnitte eines malignen Melanoms verwendet.

2.1.5 Verwendete Antikörper und deren Anwendung

Für die Immunhistologie, den Westernblot, die FACS Analysen, den Caspase-Assay, die Zytokinfärbung und die T-Zell-Kultivierung wurden folgende Antikörper verwendet:

Spezies	Target	Klon/Fluoreszenz	Hersteller	Anwendung
Rabbit	Human Beta-Actin	mAb	Cell Signaling	Westernblot
Mouse	Human Melan-A	A103, mAb M2-7C10 mAb	DAKO/Hamburg	Westernblot, Immunhisto, FACS
Mouse	Human IL13-R- alpha2	BD13 mAb	Diaclone/Frankreich	Immunhisto
Goat	Mouse IgG	IRDye 800CW	Licor/Bad Homburg	Westernblot
Goat	anti-Rabbit IgG	IRDye 680	Licor/Bad Homburg	Westernblot
Goat	Rabbit IgG	Alexa 488	Invitrogen/Karlsruhe	FACS
Rabbit	Mouse IgG	Alexa 488	Invitrogen/Karlsruhe	FACS
Mouse	IgG1		Invitrogen/Karlsruhe	FACS Negative Kontrolle
Rabbit	Human Caspase-3	PE	BD Biosciences/Heidelberg	Caspase Assay
Mouse	Human CD8	PerCPCy5.5	Biologend, Fell	T-Zell- Kultivierung
Mouse	Human CD45	Pacific Blue	Biologend, Fell	T-Zell- Kultivierung
Mouse	Human IFN- gamma-	APC	Biologend, Fell	Zytokinfärbung
Rat	Human IL2	PE	Biologend, Fell	Zytokinfärbung
Mouse	Human CD57	Microbeads	Miltenyi, Gladbach	T-Zell Kultivierung
Mouse	Human CD45RO	Microbeads	Miltenyi, Gladbach	T-Zell Kultivierung

Tabelle 8: Merkmale verwendeter Antikörper

2.1.6 PCR Materialien

Für die PCR waren verschiedene Reagenzien und KITs nötig:

High Pure RNA Isolation Kit	Roche/Mannheim
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen/Karlsruhe

Primer for cDNA Synthesis p(dt) ₁₅	Roche/Mannheim
dNTP Set	Genaxxon/Ulm
Power SYBR Green [®] PCR Master Mix	Applied Biosystems/Darmstadt
Wasser PCR Grade	Roche/Mannheim

Folgende Primer kamen bei der Realtime PCR zum Einsatz:

Primer	Sequenz	Hersteller
Primer Melan-A	Forw: 5`-TCT ATG GTT ACC CCA AGA AGG-3` Rew: 5`-GGG AAC CAC AGG TTC ACA GT-3` Produktlänge 269 bp	Eurofins MWG Operon/Ebersberg
Primer GAPDH (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase)	Forw: 5`- CGA TGC TGG CGC TGA GTA C -3` Rew: 5`- CGT TCA GCT CAG GGA TGA CC – 3` Produktlänge: 200 bp	Eurofins MWG Operon/Ebersberg

Tabelle 9: Verwendete Primer

Für die cDNA Synthese wurde der Mastercycler der Firma Eppendorf eingesetzt. Der ABI Prism 7300 der Firma Applied Biosystems wurde für die Real-Time-PCR verwendet. Die Reaktion fand in 96 Well Optical Reaction Plates von Applied Biosystems/Darmstadt statt.

2.1.7 Westernblot Reagenzien und Material

Die Westernblotreagenzien und Materialien sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Elektrophorese und das Blotten erfolgten mit der xCell[®] II Sure lock Elektrophoresis Cell und dem xCell[®] II Blot Module von Invitrogen. Zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde das Licor Odyssey Infrared Imaging System der Firma Licor/ Bad Homburg eingesetzt. Das Consort E835 Elektrophoresis Power Supply versorgte die Blot-Kammer und die Elektrophorese-Kammer mit der nötigen elektrischen Spannung. Die Proteinproben wurden zu Beginn mittels Eppendorf Bio-Photometer auf ihren Proteingehalt untersucht.

Protease-Inhibitor Cocktail		Sigma-Aldrich/München
RIPA Buffer		Sigma-Aldrich/München
Blockpuffer	PBS 0,1% Tween 20 5% BSA	
Diluent-Puffer	PBS 0,1% Tween 20 3% BSA	
Waschpuffer	PBS 0,1% Tween 20	
NuPage® 4x LDS Sample Buffer		Invitrogen/Karlsruhe
NuPage® Antioxidant		Invitrogen/Karlsruhe
NuPage® MOPS SDS Running Buffer 20x	MOPS 1mM Tris Base 1mM EDTA 20,5mM SDS 69,3mM	Invitrogen/Karlsruhe
NuPage® Novex 10% Bis-Tris Gele		Invitrogen/Karlsruhe
NuPage® Transferpuffer 20x	Bicine 500mM Bis-Tris 500mM EDTA 20,5 mM Chlorbutanol 1mM	Invitrogen/Karlsruhe
Prestained Protein Marker	Broad Range 7-175 KDa	New England Biolabs/Frankfurt
PVDF Membran		Carl Roth/Karlsruhe
Sponge Pads		Invitrogen/Karlsruhe
Filterpapier		Whatman/Dassel

Tabelle 10: Westernblot Materialien

2.1.8 Immunhistologie

Eine Übersicht über die Reagenzien ist in Tabelle 11 dargestellt.

DAB Chromogen System	IHC Detektionssystem	DAKO/Hamburg
Dampfdrucktopf	Antigenretrieval	WMF
Ethanol	Re-/Dehydrierung	Merck/Darmstadt
Eukitt	Eindeckmedium IHC	Roth
Human Serum, AB Rh-	Blockserum Cytospin	Institut für Transfusionsmedizin Universitätsklinik Würzburg
Kaiser´s Glyceringelantine	Eindeckmedium Cytospin	Merck/Darmstadt
LSAB®2 System K5001	labelled streptavidin biotin (LSAB) + HRP	DAKO/Hamburg
Mayer´s Hämalan	Kernfärbung IHC	Merck/Darmstadt
Mouse-anti-Rabbit	APAAP-Komplex	DAKO/Hamburg
Neufuchsin Substrat System	Cytospin Detektionssystem	DAKO/Hamburg
Normal goat Serum	Blockserum IHC	Invitrogen
Nova Red®	Peroxidase (HRP) Substrat	Vector Laboratories
Pappenheim-Färbung	May Grünwald Lösung Giemsa-Lösung	Merck/Darmstadt Merck/Darmstadt
POD Blocking Solution		DAKO/Hamburg
Rabbit-anti-Mouse IgG	Brücken-Antikörper	DAKO/Hamburg
Retrieval-Puffer 1 Melan-A Färbung	10mM Tris 1mM EDTA pH 9	
Retrieval Puffer 2 IL-13Ralpha2 Färbung	Citratpuffer pH 6	
TBS	Tris-HCl 0,05M NaCl 0,15 M pH 7,6	
Superfrost Objektträger		Langenbrink
Plastikware		

Tabelle 11: Immunhistologie Materialien

Sämtliche hergestellte Präparate wurden mit dem Mikroskop Leitz Diaplan der Firma Leica/Wetzlar mikroskopiert und Fotos mit Hilfe der Leica DC 480 Kamera und der Leica IM 50 Image Software erstellt.

2.1.9 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

Für die unterschiedlichen Versuche wurden folgende Chemikalien und Lösungen benötigt:

1,4-Dithiothreit	Carl Roth/Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/München
Aceton	Sigma-Aldrich/München
Bradford Lösung	Appllichem/Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Carl Roth/Karlsruhe
Zitronensäure-Monohydrat	Carl Roth/Karlsruhe
Methanol	Fluka
NaOH Plättchen	Carl Roth/Karlsruhe
PBS Dulbecco´s	Biochrom/Berlin
RLT Puffer	Quiagen
Trypanblau	Biochrom
Tween 20	Carl Roth/Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden als Monolayer in sterilen Plastikflaschen (Cellstar® Greiner Bio-One, 250 ml / 75 cm²) in den entsprechenden Medien unter Zusatz Penicillin/Streptomycin (PAA) und Zusatz von 10% FCS (fötales Kälberserum, Biochrom Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zweimal in der Woche bei ca. 80-90% Konfluenz mit Hilfe von Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) vom Untergrund gelöst und passagiert.

Für die RNA Isolation und cDNA-Synthese sowie für die Proteingewinnung wurden jeweils $\sim 5 \times 10^6$ Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1mm ermittelt. Dazu wurden Zellen in 2 ml Medium suspendiert und daraus eine 1:20 Verdünnung mit Trypanblau 0,5% hergestellt. Während Trypanblau nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird, werden um die Zahl/µl zu bestimmen nur lebende (farblose) Zellen in allen 4 Quadraten gezählt. Hierfür wurde nachfolgende Formel angewendet:

Zellzahl/0,4 x (Verdünnungsfaktor 20) x (Volumen 2000µl)

2.2.3 Herstellung von Cytospin-Präparaten

Mit Hilfe von Cytospin-Präparaten werden Zellen aus Punktionsmaterial (z.B. Liquor) oder Sputum gewonnen. „Cytospin“ ist der Handelsname für eine spezielle Zentrifuge (Cytospin III Zentrifuge, Fa. Shandon), mittels derer Zellen aus einer Suspension durch Zentrifugation in einem Trichter angereichert und auf einen darunter befindlichen Objektträger aufgebracht werden (Lang ⁶⁰). Zwischen Träger und Trichtergrundplatte eingelegte, für den Zelldurchtritt auf den Träger gelochte Filterpapiere nehmen überschüssige Suspensionsflüssigkeit auf. Die in der Suspension befindlichen Zellen werden gleichmäßig auf dem vorgegebenen Feld verteilt. Diese Methode ist im klinischen Labor der Kinderklinik der Universität Würzburg etabliert für die Liquordiagnostik und wurde für eine orientierende immunzytologische Untersuchung der Zelllinien FM88, U87, U373, Mel 624, A1207, GAMG und MCF auf die Expression von Melan-A gewählt.

Für die Herstellung von jeweils 2 Objektträgern werden 100.000 Zellen benötigt (Erfahrungswert). Es wurden maximal 100 Zellen pro µl eingesetzt und insgesamt maximal 400 µl Volumen in die Cytospinrichter der Cytospin III Zentrifuge der Firma Shandon eingefüllt. Als Verdünnungslösung wurde PBS 1% FCS verwendet. Die Zellsuspensionen wurden in die Trichter der vorbereiteten Objektträger pipettiert und 5 Minuten bei 700 U/min in der Cytospin-Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet. Jeweils ein Präparat wurde nach der Pappenheim-Färbung (Giemsa/May-Grünwald-Färbung) gefärbt. Dies hat den Vorteil, dass die Zell-Morphologie und die Qualität der Cytospins unmittelbar

beurteilt werden konnte. Das jeweils zweite Präparat wurde mit Anti-Melan-A Klon A 103 mittels APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Methode nach Herstellerangaben (DAKO) gefärbt.

2.2.4 Immunhistologie

Mit Hilfe der Immunhistologie lassen sich intra- und extrazelluläre Antigene selektiv darstellen. Die Detektion erfolgt in der Regel mit antigenspezifischen monoklonalen Antikörpern. Um diese Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen kommen verschiedene Labeling Systeme zum Einsatz:

APAAP Methode für die Anwendung bei Cytospinpräparaten

Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) Methode beruht auf einem

- Primärantikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist,
- Brückenantikörper, der sowohl gegen den Primärantikörper als auch den markierten Tertiärantikörper gerichtet ist.
- Tertiärantikörper, ein monoklonaler Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, der die anschließend hinzugegebene alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes bindet.

Nach Zugabe von Naphthol-As-Biphosphat, dem Substrat der alkalischen Phosphatase, ergibt sich ein Spaltprodukt, das mit Neufuchsin einen roten Farbniederschlag ergibt. Die getrockneten Cytospin-Objektträger wurden in Methanol/Aceton (1:1) 30 Sekunden fixiert und in PBS gespült. Der Antikörper Mouse-anti-Melan-A (Klon A103, DAKO) wurde mit TBS 0,5% BSA 1:20 verdünnt und pro Objektträger 35µl eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT wurden die Präparate mit PBS gewaschen. Der Brückenantikörper wurde mit PBS 30% Humanserum 1:50 verdünnt und 35 µl pro Feld eingesetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten in der feuchten Kammer. Nach einem weiteren Wasch-Schritt erfolgte die Inkubation mit dem APAAP Komplex. Für eine Intensivierung des Signals wurden die Schritte mit dem Brückenantikörper und dem APAAP Komplex insgesamt zweimal durchgeführt. Erst danach sind alle Präparate mit einem

Neufuchsin-Substrat-System als Chromogen für 30 Minuten inkubiert worden und anschließend gewaschen worden. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun. Eingedeckt werden die Präparate mit Kaiser's Glyceringelantine.

LSAB Methode für die Anwendung bei Paraffinschnitten

Bei dieser Methode wird in einem Drei-Schritt-Verfahren markiertes Streptavidin-Biotin eingesetzt. Nachdem das Gewebe mit einem Primärantikörper inkubiert wurde, wird der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben. An das Biotin bindet im nächsten Schritt Streptavidin-Horse-Reddich-Peroxidase. Die Detektion erfolgt mit einem Substratkomplex bestehend aus DAB (Diaminobenzidin)-Chromogen oder Nova Red® (Serie 1) und Horse Reddich Peroxidase Substrat. Es kommt zu einem kontrastreichen braunen bzw. rötlichem Endprodukt am Zielantigen.

Für die Immunhistologie wurden vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg, Sektion Neuropathologie, Paraffinschnitte aus Resektionsmaterial von GBM Patienten zur Verfügung gestellt. Die Färbungen erfolgten im Labor der Neuropathologie.

Im Versuchsansatz der 2. Serie wurde neben Melan-A parallel auch IL-13-Rezeptor-alpha 2 als spezifischer Marker bzw. TAA für Glioblastome (Saikali, et al. ⁴⁷) getestet. Es erfolgte eine Austestung der Antikörper Klon A 103 (DAKO) für Melan-A und Klon B-D13 (Diacclone) für IL-13-Rezeptor-alpha 2 zum Festlegen der optimalen Konzentration. Außerdem wurden verschiedene Lösungen zum Blockieren unspezifischer Bindungen getestet.

Des Weiteren wurde bei dieser Studie das Setting durch Vorbehandlung der Schnitte (Antigen Retrieval) mittels unterschiedlicher Temperatur (70°C vs. 120 °C) und Puffer (Citrat vs. EDTA) für beide Antikörper optimiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens können Antigene im Gewebe demaskiert werden. Dies ist sehr wichtig, da durch die Formaldehyd-Fixierung der Gewebeproben Proteine vernetzt werden, also maskiert werden und somit die Epitope der Antigene nicht für die AK-Antigen Bindung offen liegen.

Von jedem Tumorpräparat wurde ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin, ein Schnitt mit Mouse-anti-Melan-A (DAKO, Klon A103) in der Verdünnung 1:50 und ein

Schnitt mit Mouse-anti- IL-13-Rezeptor-alpha 2 (Diacclone, Klon BD 13) in der Verdünnung 1:200 nach entsprechender Austestung gefärbt. Als Kontrollen wurden Melanom-Schnitte (Positivkontrolle für Melan-A) und GBM Schnitte ohne Antikörperinkubation als Reagenzienkontrolle verwendet.

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte für die Melan-A Färbung 20 Minuten bei 70°C mit Retrieval-Puffer-1 (10 mM Tris 1mM EDTA-Puffer bei pH 9) und für IL-13-Rezeptor-alpha 2 10 Minuten bei 120°C mit Retrieval-Puffer-2 (Citratpuffer bei pH 6) behandelt. Im Anschluss erfolgte nach einem Block der endogenen Peroxidase (DAKO S2023) und der unspezifischen Oberflächenantigenen mit Normal Goat Serum das Auftragen der Antikörperverdünnungen und Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 Minuten. Für die Reagenzien-Kontrollen wurde, anstatt der Antikörperverdünnungen, 0,1%BSA in TBS verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem DAKO LSAB System (K5001) und DAB. Anschließend wurden die Zellkerne durch Hämalaun dargestellt. Das Eindecken nach Dehydrierung in der aufsteigender Alkoholreihe erfolgte mit Eukitt®.

Zudem wurde von jedem Patienten ein Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt angefertigt.

2.2.5 Westernblot

Beim Westernblot wird ein Proteingemisch elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht in einem Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran, z.B. Polyvinylidenfluorid (PVDF) übertragen (geblottet). Auf dieser werden die Proteine immobilisiert. Das im Gel produzierte Trennmuster bleibt auf der Membran erhalten. Die Proteine können nun auf der Membran detektiert werden. Hierzu verwendet man einen Primärantikörper, der gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtet ist. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann entweder durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper oder mit einer Enzym-Substrat-Reaktion sichtbar gemacht werden.

Für diese Arbeit wurden fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper verwendet. Diese Technik erlaubt den gleichzeitigen Einsatz von zwei verschiedenen Sekundärantikörpern auf einer Membran und ermöglicht so die parallele

Darstellung von zwei Proteinen: Melan-A und Beta-Actin als House Keeping Gen zur internen Kontrolle zum Nachweis dafür, dass in jeder Geltasche ein Proteingemisch vorhanden war. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper waren durch die Herstellerfirma des Detektionssystems (Licor) vorgegeben. Als Positivkontrolle für Melan-A wurde die Melanomzelllinie FM 55 verwendet.

Proteinlysatherstellung

Aus den Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen 3x mit PBS (4°C) gewaschen und anschließend mit einem Cell Scraper abgeschabt. Im Anschluss daran sind die Zellen in 5ml PBS suspendiert und 5 Minuten bei 517 x g zentrifugiert worden. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 100 µl RIPA Lyse-Puffer (+20 µl Protease-Inhibitor-Cocktail) suspendiert und für 15 Minuten in 4°C inkubiert. Das entstandene Lysat wurde 10 Minuten bei 13.000g/4°C zentrifugiert, der Überstand eingefroren und das Pellet verworfen.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Methode nach Bradford angewendet. Eine Standardreihe aus einer 2mg/ml BSA Lösung wurde mitgeführt. Jeweils 1µl Proteinlysate wurde mit Aqua dest. (A.d.) 1:100 verdünnt und mit 900µl Bradford-Lösung inkubiert. Das BioPhotometer (Eppendorf) wurde mit einem Leerwert auf null kalibriert und die Proben in einer Doppelbestimmung bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Mittels einer erstellten Standardkurve konnten die Konzentrationen in µg/µl abgelesen werden. Insbesondere die Primärzelllinien wuchsen hier relativ schlecht, was zu einer reduzierten Zellzahl und daraus resultierenden geringeren Proteinkonzentration führte. Durch Zusammenführen entsprechender Anzahl Zellkulturflaschen bei der Lysat-Herstellung konnte eine ausreichende Proteinkonzentration erreicht werden.

Westernblot Durchführung

Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt. Das Handling der Membran erfolgte mit einer Pinzette.

Für die elektrophoretische Auftrennung der zellulären Proteingemische wurden jeweils 40 µg Gesamtprotein einer Zelllinie je Geltasche eines 10% Tris NuPage® Gel der Firma Invitrogen eingesetzt. Der Probenansatz bestand aus 7,5 µl LDS Sample Buffer, 3 µl 0,5 M DTT, A.d. und dem errechneten Volumen der Zellysate. Insgesamt fassten die Geltaschen 30 µl. Alle Proben wurden für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Um die angezeigten Banden einer Proteingröße zuordnen zu können, wurde ein Prestained Marker mit 7-175 KDa Banden der Firma New England Biolabs verwendet. Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. Als Positivkontrolle wurde eine FM 55 Probe mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese im xCell® System der Firma Invitrogen betrug 90 Minuten bei einer Spannung von 130 V. Danach erfolgte das Blotten auf eine PVDF Membran (Carl Roth) für 60 Minuten bei einer Spannung von 40 V.

Zur Proteindetektion wurden die geblotteten Membranen für 60 Minuten bei RT in einem Blockpuffer geblockt und hinterher 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Nach vorangegangener Austestung (siehe unten) wurden als Primärantikörper 0,2 µg Mouse-anti-Melan-A (Klon A103, DAKO) in 5 ml Diluent Puffer (je Membran) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde in allen Proben ein Rabbit-anti-Beta-Actin (New England Biolabs) Antikörper 1:1000 (Herstellerangabe) verdünnt mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht in 4°C. Nach dreimaligem Waschen à 5 Minuten wurden die fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper zugegeben. Verwendet wurde ein Goat-anti-Mouse 800 CW (Licor, Anregung bei 778nm/ Emission bei 795nm → grünes Leuchten) der den Primärantikörper gegen Melan-A detektiert und ein Goat-anti-Rabbit 680 IRDye (Licor, Anregung 683nm, Emission 710nm → rotes Leuchten), der den Beta-Actin Antikörper detektiert hat. Beide Sekundärantikörper wurden 1:10.000 in 5ml Diluent Puffer (je Membran) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei RT. Zuerst mussten die optimale Antikörperkonzentration sowie Sensitivitäts-Vergleiche zwischen den Anti Melan-A Klonen M2-7C10 und A 103

etabliert werden. Abbildung 6 zeigt Beta-Actin als rote Bande bei ca. 50 KDa in allen eingesetzten Proben, Melan-A wird grün bei ca. 20 KDa dargestellt.

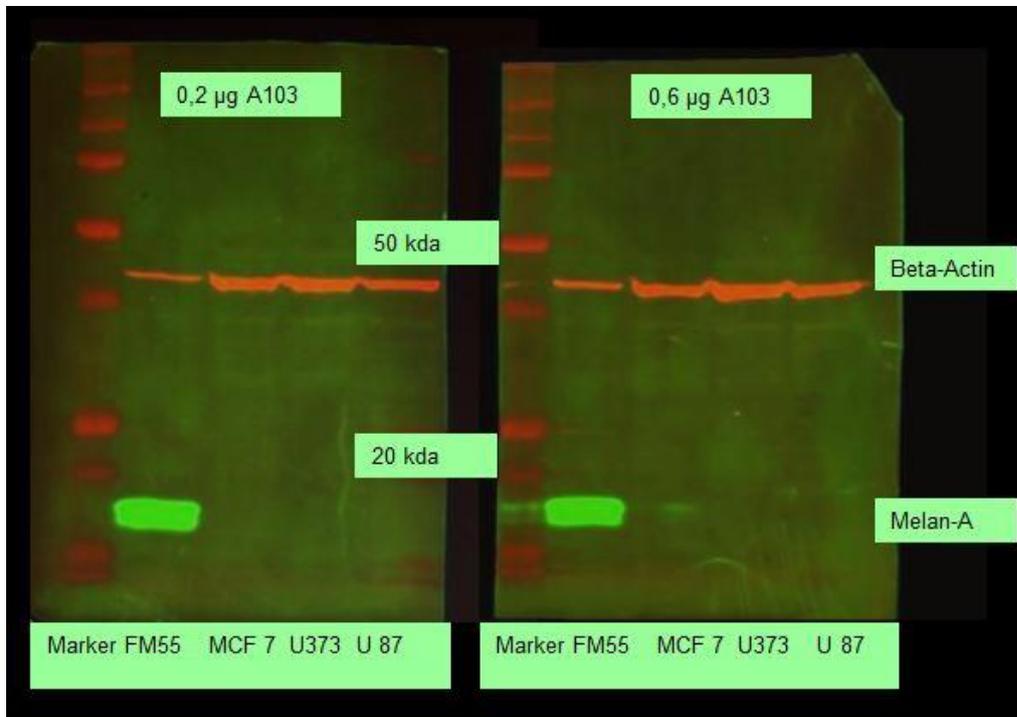


Abbildung 6: Konzentrationen von A103. Im rechts dargestellten Blot erscheint die grüne Melan-A Bande dicker und unschärfer (0,6µg) als im linken Blot (0,2mg). In beiden Blots sind nur FM 55 Zellen positiv für Melan-A. Beta Actin konnte in allen getesteten Zell-Linien nachgewiesen werden (rote Bande).

Im linken Blot wurden 0,2 µg und im rechten Blot 0,6µg von A103 eingesetzt. Rechts erscheint die grüne Bande dicker und unschärfer. Außer FM 55 waren keine weiteren Proben positiv für Melan-A. Eine Erhöhung der Konzentration (z.B. auf 0,6 µg) hat keine verbesserte Detektion bewirkt, weshalb in den folgenden Versuchen immer 0,2 µg eingesetzt wurden. Bei den Proben von MCF 7, U373 und U87 war zudem die Proteinkonzentration sehr niedrig. In jede Gel-Tasche können maximal 30 µl Lösung pipettiert werden. Als Standard haben sich 40 µg Protein etabliert. Da das Proteinlysate zusammen mit 7,5 µl LDS und 3 µl DTT in die Taschen pipettiert werden, folgt daraus dass maximal 20 µl Lysat eingesetzt werden können. Dies wurde bei den o.g. Proben mit schwacher Proteinkonzentration ebenfalls angewendet, ohne eine Verbesserung der Detektion, trotz verdreifachter Antikörperkonzentration von A103, zu erreichen. Zum Vergleich der Sensitivität wurde das Lysat von FM 55

in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 23 µg (entsprechend einer 1:2) Verdünnung bis zu 0,72 µg (entspricht einer 1:64 Verdünnung) eingesetzt. Die Antikörper A 103 und M2-7C10 wurden jeweils in der Konzentration von 0,2 µg eingesetzt.

Abbildung 7 zeigt bei der Verdünnung von 1:2 noch Beta-Actin, bei den übrigen Verdünnungen nicht mehr. Melan-A lässt sich bis zu einer Verdünnung des Lysats von 1:8, was einer Proteinkonzentration von 5,8 µg entspricht, mit A103 nachweisen.

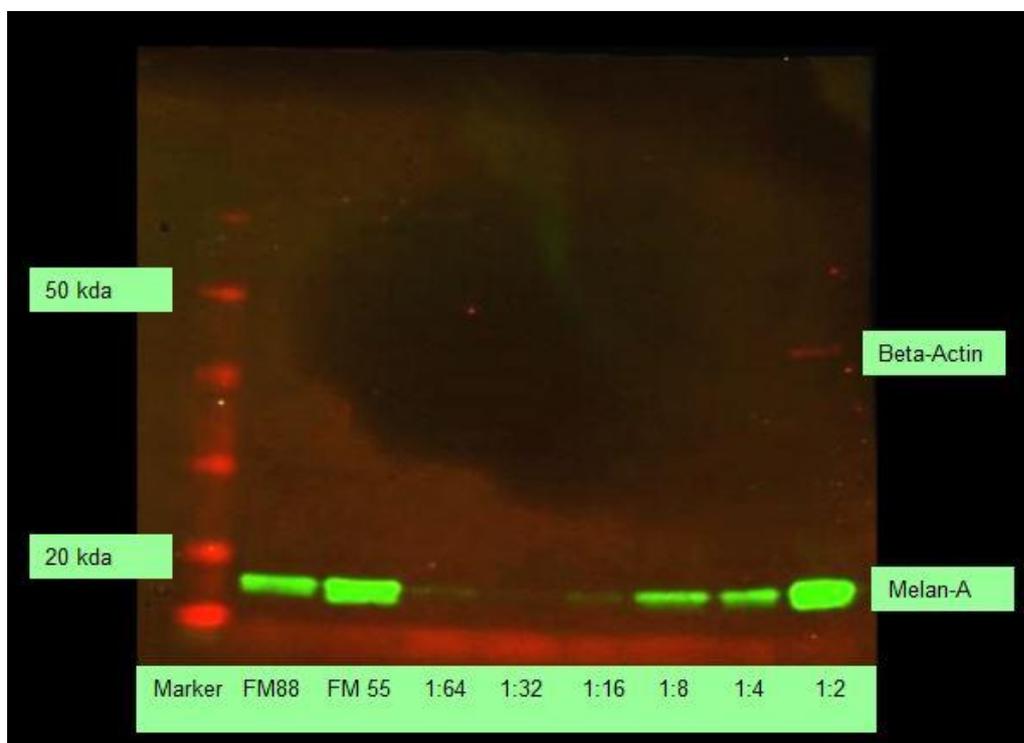


Abbildung 7: Bestimmung der Sensitivität von A103 (0,2µg) anhand einer FM55 Verdünnungsreihe ausgehend von einer 1:2 Verdünnung (entspr. 23µg) bis 1:64 (entspr. 0,72 µg). Eine Detektion von A103 von Melan-A in FM55 Zellen gelingt problemlos bis zur 1:8 Verdünnung. Die weiteren Verdünnungsstufen sind nur noch schwach zu erkennen.

In Abbildung 8 wird zum Vergleich der Antikörper M2-71C10 eingesetzt. Hier lässt sich Melan-A bis zu einer Verdünnung von 1:16 nachweisen. Im Vergleich zu A103 erscheinen die Banden jedoch schwächer und unschärfer. Auf Grund dieser Tatsache und dass A 103 in der Literatur verstärkt eingesetzt wurde, ist für alle Untersuchungen im Westernblot der Klon A103 verwendet worden.

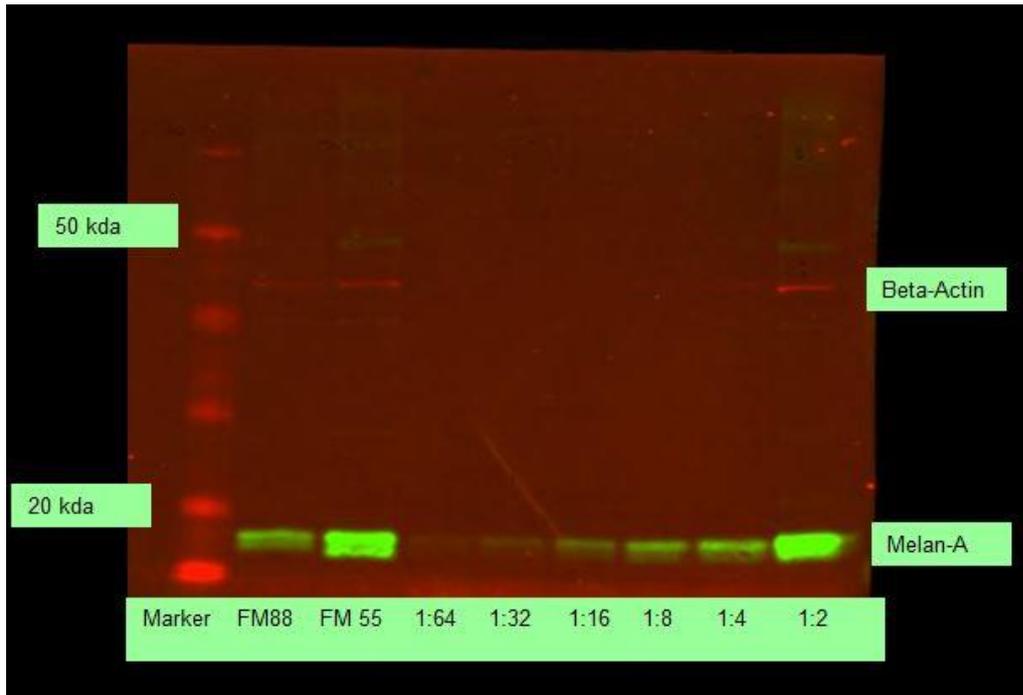


Abbildung 8: Bestimmung der Sensitivität von M2-7C10 (0,2µg) anhand einer FM55 Verdünnungsreihe ausgehend von einer 1:2 Verdünnung (entspr. 23µg) bis 1:64 (entspr. 0,72 µg). Eine Detektion von M2-7C10 von Melan-A in FM55 Zellen gelingt bis zur 1:16 Verdünnung. Die weiteren Verdünnungsstufen sind nur noch schwach zu erkennen. Die Banden erscheinen unschärfer als bei A103.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS (= Fluorescence Activated Cell Scanner) ermöglicht die Analyse von einzelnen Zellen nach Größe und Granularität mittels eines Lasers und einer Sensoreinheit. Eine vibrierende Flusskammer unterteilt den Zellstrom durch das Analysegerät in feine Tröpfchen. Die Zellen treten einzeln durch den Laserstrahl und werden in Abhängigkeit der Beugung des Laserlichts durch einen Sensor erfasst. Das Ergebnis der Messung wird in einem Punktdiagramm oder einem Histogramm der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl dargestellt. In dem Diagramm bilden sich charakteristische Punktgruppen, die den einzelnen Zellpopulationen zugeordnet werden können. Die Methode eignet sich insbesondere zur Darstellung intrazellulärer Antigene wie Melan-A. Um Antigene zu markieren, werden entsprechende monoklonale fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe reagieren auf Anregung durch Laserlicht mit typischen, nach dem Emissionsspektrum klar einzuordnenden Lichtemissionen. Detektoren

empfangen quantitativ das charakteristische Licht und machen somit die Unterscheidung der Fluorochrome untereinander möglich.

Mittlerweile können bis zu 22 Farben gleichzeitig durch FACS Geräte erfasst werden. Für die intrazelluläre Melan-A Färbung wurden jeweils 1×10^6 Zellen eingesetzt, mit einer formalinhaltigen Lösung (Fixperm, BD) fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 Röhrchen aufgeteilt und die eine Hälfte mit dem Antikörper Mouse-anti-Melan-A (DAKO, Klon A103), die andere Hälfte mit einer Isotyp Kontrolle inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden ein Rabbit-anti-Mouse IgG, Alexa 488 (Invitrogen) und ein Goat-anti-Rabbit IgG, Alexa 488 (Invitrogen) verwendet.

Die Messung wurde am FACS Calibur der Firma BD Bioscience durchgeführt.

2.2.7 T-Zell-Kultur und Generierung Melan-A spezifischer T-Zellen

Ziel ist es, tumorspezifische bzw. Melan-A spezifische T-Zellen zu generieren. Hierfür wurden zunächst dendritischen Zellen aus PBMC von HLA-A2 positiven Spendern gewonnen. Nach Leukapherese erfolgte das Einstellen der PBMC Zellzahl auf 10^7 PBMC/ml. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine 6-well-Platte verteilt und für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem Wasch-Schritt erfolgte die Zugabe des DC Mediums (CELLGRO[®]+1% HS + GM-CSF/IL-4) und Inkubation für 48 Stunden. GM-CSF bedeutet *granulocyte macrophage colony stimulating growth factor* und dient der Differenzierung und dem Wachstum der DCs. IL-4 fördert Wachstum und Genexpression.

Anschließend erfolgte erneutes Waschen und Zugabe von frischem Medium mit gesteigerter GM-CSF/IL-4 Konzentration und Inkubation für weitere 72 Stunden. Danach wurden die noch unreifen DC „geerntet“. Nach Einstellung von 10^5 Zellen/well erfolgte die Zugabe von DC-Medium (CELLGRO[®]+ 1% HS+ GM-CSF+ IL-4+ LPS+ IFN-gamma) und Melan-A Peptid $0,5\mu\text{l/ml}$ in einer neuen 6-well-Platte. IFN-gamma erhöht die Expression von MHC Molekülen und der Komponenten der Antigen-Prozessierung. Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert die Synthese von Toll-like-Rezeptoren.

Am selben Tag wurden die naiven T-Zellen aus den PBMC desselben Spenders isoliert: Dies erfolgte mittels dem „CD8 negative selection kit II“ (Miltenyi) nach Herstellerangaben:

Das Prinzip ist, dass Nicht-CD8+ T-Zellen, insbesondere CD4+ T-Zellen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, B-Zellen, Stammzellen, Dendritische Zellen, NK Zellen, Granulozyten mit Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR gamma/delta, CD235a markiert werden. In einem zweiten Schritt werden monoklonale Antikörper, die mit magnetischen MicroBeads konjugiert sind, zugegeben. Diese sind gegen Biotin, CD14 und CD61 gerichtet. Über eine magnetische Säule werden die Zellen aufgetrennt: alle magnetisch markierten Zellen bleiben hängen (Nicht CD8+) während die CD8+ T-Zellen durch die Säule eluiert werden können.

Die PBMC- Zellsuspension mit 10^7 Zellen wurde mit dem ersten Antikörper-Cocktail versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von einem zweiten Antikörper-Cocktail. Nach 20 Minuten Inkubation erfolgte die Isolierung der T-Zellen aus den PBMC über eine LS-Säule (Miltenyi). Im nächsten Schritt wurden aus den T-Zellen die CD8+ T-Zellen nach Inkubation mit anti-CD45RO beads sowie anti-CD57-beads (beides für CD8+ Gedächtniszellen) über eine LS-Säule isoliert. Die Zellen wurden in T-Zell-Medium (CELLGRO[®] +5%HS) aufgenommen und die Zellzahl auf 3×10^6 /ml eingestellt. Nun erfolgte die Inkubation über Nacht mit IL-7, was das Wachstum naiver T-Zellen fördert.

Am Folgetag erfolgte die morphologische Kontrolle der DCs und der T-Zellen unter dem Mikroskop. Nach Bestrahlung mit 30 Gy der DCs, was die Proliferation von ggf. beigemischten, kontaminierenden T- und NK-Zellen verhindert, wurden diese in einem Verhältnis von 1:4 mit den T-Zellen unter Zugabe von IL-21 (induziert T-Zell Proliferation) inkubiert. Nach 72 Stunden (Tag 5) erfolgte die erste Zytokinzugabe mit IL-7 und IL-15 (stimuliert Wachstum der T-Zellen). Nach weiteren 72 Stunden (Tag 7) erfolgte die nächste Medium- und Zytokinzugabe. Am Tag 10 oder 11 wurde mittels FACS

Analyse das Ergebnis der expandierten Melan-A spezifischen CD8+ T-Zellen kontrolliert.

2.2.8 Caspase 3 Assay

Die Aktivierung von Caspase-3 ist ein Marker für Zellen, die in Apoptose gehen. Im Caspase-Assay soll gemessen werden, wie gut spezifische T-Zellen in den Tumorzellen Apoptose induzieren können. Im Assay ist entscheidend, durchflußzytometrisch Tumorzellen und T-Zellen auseinanderzuhalten.

Verwendet wurden (siehe [Abbildung 5](#), Seite 20) die HLA-A2 positiven Zelllinien T6217 (GBM) und FM 88 (malignes Melanom) sowie HLA-A2 negativen Zelllinien T3686 (GBM) und Mel 2a (malignes Melanom). Nach Herstellung einer Zellsuspension wurden die eingesetzten Zelllinien mit den zuvor generierten Melan-A spezifischen T-Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Accutase wurden die Zellen mit CD8-PerCP und CD45-PB für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit einer formalinhaltigen Lösung (Fix/Perm, BD) fixiert und permeabilisiert. Dann wurde der Caspase-3-PE-AK zugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Waschschritt konnte dann am FACS Gerät gemessen werden, indem auf die auf die CD45- und CD8- negativen Tumorzellen gated wurde.

2.2.9 Intrazelluläre Zytokinfärbung

T-Zellen produzieren Zytokine, insbesondere IFN-gamma, wenn sie über den T-Zell-Rezeptor durch Bindung an den Peptid-MHC-Komplex einer Zielzelle ein Signal erhalten. Im Ruhezustand werden diese Zytokine nicht produziert, deshalb ist der Nachweis ein Zeichen der Aktivierung. Damit während der Inkubationsphase nicht laufend IFN-gamma aus der Zelle transportiert wird, wird Brefeldin A zugegeben, welches dessen Exozytose hemmt. Nach der Inkubationsphase werden erst Oberflächenmarker gefärbt, dann werden die Zellen fixiert und permeabilisiert und schließlich intrazellulär gefärbt.

Die HLA-A2 negativen Zelllinien Mel 2a (malignes Melanom) und A1207 (GBM) sowie die HLA-A2 positiven Zelllinien FM 55 (malignes Melanom) und U373 (GBM) wurden in einer Konzentration von 30.000/ well eingesetzt. Im nächsten

Schritt wurden die zuvor generierten Melan-A spezifischen T-Zellen (Konzentration von $0,75 \times 10^6/\text{ml}$) mit Brefeldin A für 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach erfolgt die Inkubation mit den Antikörpern für die Oberflächenantigene CD8-PerCPCy5.5 für 20 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit einer formalinhaltigen Lösung fixiert und permeabilisiert (Fix/Perm, BD). Nun erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern IFN-gamma-APC und IL2-PE für 45 Minuten bei RT und anschließend die Messung am FACS Gerät (siehe Abbildung 4, Seite 19).

2.2.10 Quantitative Realtime PCR

Die Realtime PCR ist eine hoch sensitive Methode um quantitativ geringe DNA Mengen, in diesem Fall aus mRNA gewonnene cDNA, zu bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, dass während eines PCR Zyklus die vorhandene DNA Menge nahezu verdoppelt wird. Solange eine exponentielle Verdopplung stattfindet, befindet sich die Reaktion in einem linear-logarithmischem Bereich. Das heißt, je mehr Ausgangsmenge vorhanden ist, desto rascher geht die Reaktion in diesen Bereich über und es ist eine niedrige Zyklenzahl notwendig. Die PCR Produktmenge bei der Realtime PCR wird durch Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, in diesem Fall SYBR Green[®] (Applied Biosystems), der in die doppelsträngige cDNA eingebaut wird, nach jedem Zyklus gemessen. Die Menge des eingebauten Farbstoffs ist proportional zur vorhandenen DNA Menge.

Die Quantifizierung kann absolut erfolgen, d.h. anhand einer mitgeführten Kalibrierungskurve, oder relativ. Letzteres bedeutet, dass die Genexpression des Zielgens in Bezug zu einem anderen kontinuierlich exprimierten Gen wie z.B. einem Housekeeping Gen gesetzt wird. Als Maß für die Quantifizierung wird der Ct Wert (oder auch Crossing Point, CP Wert) herangezogen. Der Ct Wert entspricht der Zykluszahl, bei der ein konstantes Fluoreszenzniveau innerhalb der linear logarithmischen Phase erreicht wird und vom Hintergrundrauschen klar abzugrenzen ist. Am Ct Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche DNA Menge. In der vorliegenden Versuchsreihe

wurde die relative Quantifizierung mittels Delta Ct Methode (Livak and Schmittgen ⁶¹) verwendet. Dabei wird der Unterschied der relativen Expression von Melan-A in relativem Bezug zur GAPDH Expression gesetzt und relative Expressionseinheiten für die eingesetzten Zelllinien berechnet. Dies setzt eine optimale Effizienz der Reaktion und eine Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus. Da bei einem Großteil der Proben nach 40 Zyklen kein Ct Wert für Melan-A messbar war, jedoch für GAPDH wurde für die weitere Analyse, um einen möglichen Fehler einer zu geringen Ausgangsmenge auszuschalten, ein fiktiver Ct Wert von 40 für die Melan-A Proben angenommen und in der Delta Ct Methode verwendet.

RNA Isolation und Konzentrationsbestimmung

Mit dieser Methode wird die mRNA von Melan-A in den verwendeten Zelllinien gemessen. Die mRNA ist Ausdruck für die genetische Expression und Proteinbiosynthese.

Alle Aufreinigungsschritte wurden mit Handschuhen und RNase freien Reagenzien und Pipetten durchgeführt. Die RNA Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Roche high Pure RNA Isolation Kit. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen zur RNA Isolation verwendet. Nach Auszählung wurden diese in 200 μ l PBS resuspendiert und mit 400 μ l Lysis/Binding Buffer versetzt. Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll. Nach Abfiltration zellulärer Bestandteile und Inkubation mit DNase wurde die Lösung in mehreren Schritten mit Fertigguffern und einer Glasfaser-Säule aufgereinigt. Das fertige Eluat wurde bei -70°C eingefroren.

Es folgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Bestimmung der optischen Dichte in Form der Extinktion am Spektralphotometer (Eppendorf Biophotometer) in Quarzküvetten. Das Maximum des Absorptionsspektrums für Nucleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch die gemessene Extinktion bei 260 nm errechnet das Photometer automatisch die Konzentration. Zusätzlich kann die Reinheit der Proben ermittelt werden. Verunreinigungen können durch Rückstände der Fällungsreagenzien und von Proteinresten stammen. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Wellenlänge

von 280 nm. Der Quotient aus den Extinktionen von OD_{260nm} / OD_{280nm} ist ein Parameter für die Reinheit der Nukleinsäuren Lösung. Bei RNA Präparationen liegt dieser Quotient idealerweise bei 1,6.

Die photometrische Absorptions-Messung der getesteten Proben ergab Konzentrationen im Bereich von 300-628 µg/ml. Die Extinktion bei 320 nm war für alle RNA 0, was ebenfalls die Reinheit der Proben bedeutet.

Der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} lag jeweils im Bereich 1,42 – 1,50.

cDNA Umschreibung

Um für die PCR eine DNA zu bekommen, muss die gewonnene mRNA in cDNA mittels reverser Transkription von 1 µg RNA umgeschrieben werden.

Es wurden 2,5 µl des p(dt)₁₅ Oligo mit RNA (Volumen von 1µg) und 1 µl 10mM dNTP's für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurde 1µl Superscript III Reverse Transkriptase (200U/µl), 1 µl 0,1M DTT, 1µl RNase out (40U/µl) und 4µl 5xFirst Strand Puffer untereinander gemischt und zupipettiert. Das Gemisch wurde für 50 Minuten bei 50°C und abschließend 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Realtime PCR

Alle Zelllinien wurden mittels Realtime PCR auf die mRNA von Melan-A und dem House-Keeping Gen GAPDH (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase) untersucht. Hierfür wurden 2 µl der jeweiligen cDNA als Template verwendet.

Mastermix (1X)

	GAPDH	Melan-A
Wasser	9,25 µl	9,25 µl
SYBR Green®	12,5µl	12,5µl
Primer Forw. 10µmol	0,625µl	0,625µl
Primer Rev. 10µmol	0,625µl	0,625µl
Totales Volumen	23 µl	23 µl

Tabelle 12: Realtime PCR Mastermix

Die Ansätze wurden in eine 96-Well „Optical Reaction Plate“ pipettiert. Dabei wurden pro Platte 2 Negativkontrollen mitgeführt (anstelle von cDNA Wasser). Von allen Zelllinien erfolgte immer eine Doppelbestimmung von GAPDH und Melan-A auf separaten Platten. Als Mastermix wurde Power SYBR Green[®] verwendet und die PCR auf einem ABI Prism 7300 Realtime PCR Cycler durchgeführt.

Im ABI Prism 7300 Programm wurde der Detektor SYBR Green[®] gewählt. Der Lauf setzte sich zusammen aus 2 Minuten 50°C, 10 Minuten 95°C und 40 Zyklen zu 15 Sekunden 95°C und 1 Minute bei 60°C. Es wurde immer eine Schmelzpunkt-Analyse angefertigt.

Die Effizienz der beiden Primerpaare wurde im Voraus mit einer cDNA Verdünnungsreihe und Schmelzpunktanalyse mit annähernd 2 (1,9 und 2,1) getestet und für die Berechnung verwendet.

3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expression von Melan-A in Glioblastomzellen mittels verschiedener Methoden nachzuweisen.

3.1 Intrazelluläre Expression von Melan-A

Durch Behandlung von Zellen in Suspension, wie beispielsweise Zellkulturen, mittels Permeabilisation und Zugabe von monoklonalen Antikörpern, die mit Fluoreszenz gekoppelt sind, ermöglicht es die FACS Analyse, intrazelluläre Strukturen wie z.B. Melan-A in der Zelle nachzuweisen.

Diese Methode ist für stark exprimiert Proteine, wie z.B. Zytokine nach Stimulation, gut etabliert und sehr verlässlich. Für Proteine wie Melan-A, bei dem die Expression grundsätzlich unklar ist, muss von einer eher schwachen Bindung, d.h. einem schwachen Signal ausgegangen werden. Um dieses schwache Signal zu verstärken, wurde in diesem Ansatz das Signal des Sekundärantikörpers (Rabbit-anti-Mouse IgG, Alexa 488 (Invitrogen)) durch einen Tertiärantikörper, der mit dem gleichen Fluorochrom gekoppelt war (Goat-anti-Rabbit IgG, Alexa 488 (Invitrogen)) verstärkt. Als Primärantikörper

wurde mit dem Mouse-anti-Melan-A (DAKO, Klon A103) bzw. mit einer Isotyp Kontrolle inkubiert.

Während die Melanomzellen Mel 2a, Mel 397 FM 55 und FM 88 positiv für Melan-A waren, waren Glioblastomzellen U 251 fraglich positiv, U 373, GAMG und T 5135 negativ für Melan-A. Ebenso negativ für Melan-A war die Brustkrebszelllinie MCF 7.

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die Histogramme der getesteten Melanom-Zelllinien und GBM-Zelllinien.

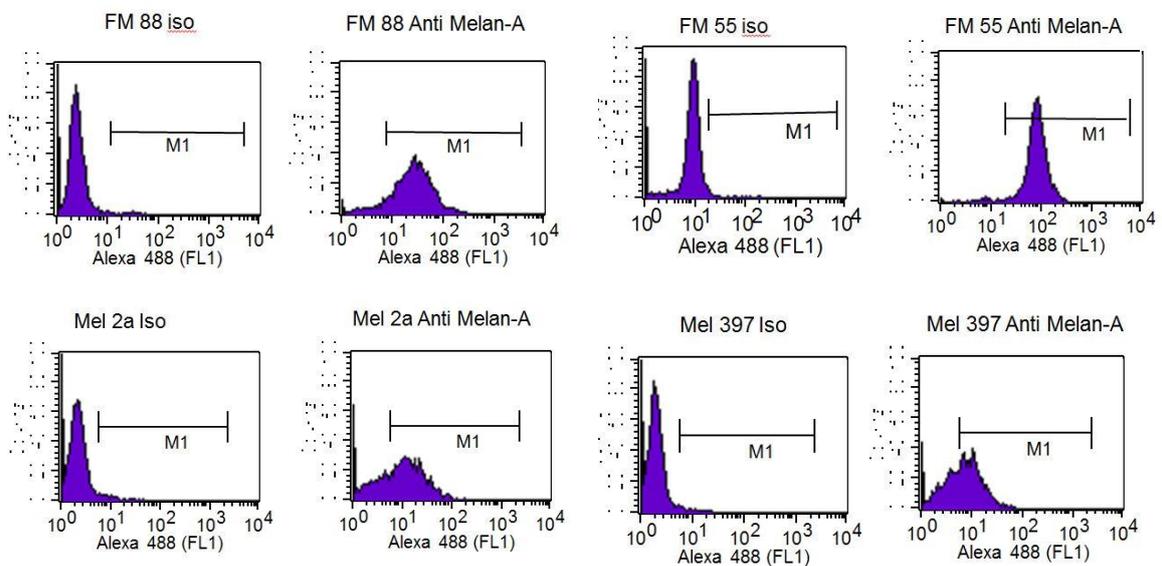


Abbildung 9: Histogramme der Melanom-Zelllinien. Die Signale, die in den M1 markierten Bereich fallen gelten als positiv. Zu jeder Zelllinie wurde eine ISO Kontrolle ohne Anti-Melan-A mitgeführt. FM88, FM55, Mel2a und Mel 397 sind Melan-A positiv.

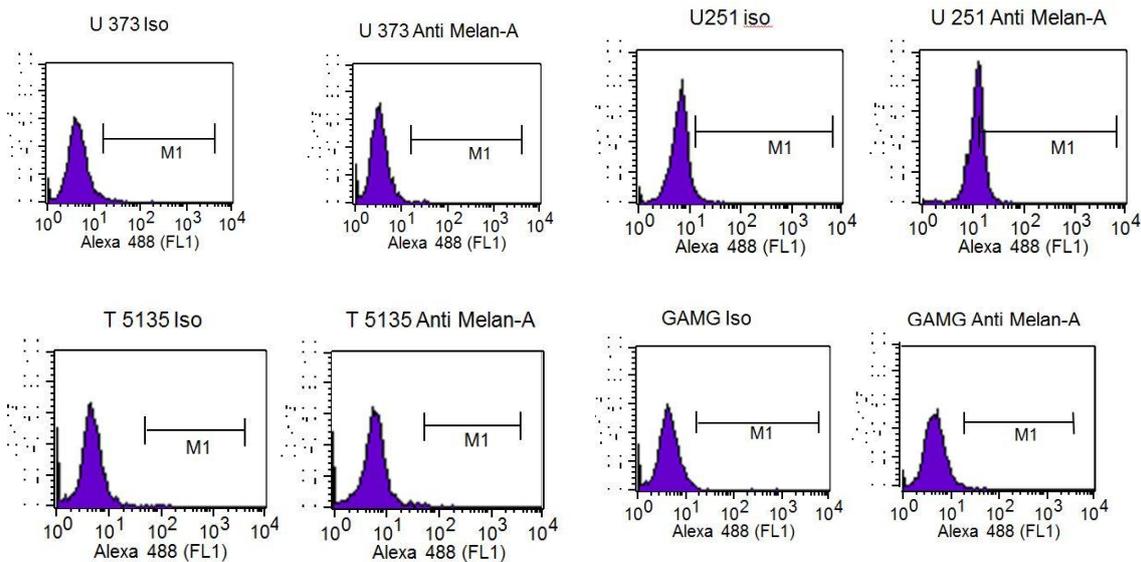


Abbildung 10: Histogramme der GBM Zelllinien. Die Signale, die in den M1 markierten Bereich fallen gelten als positiv. Zu jeder Zelllinie wurde eine ISO Kontrolle ohne Anti-Melan-A mitgeführt. Keine der getesteten GBM Zelllinie ist Melan-A positiv.

Alle Signale, die innerhalb der Region M1 fallen, werden als positiv gewertet, die jeweiligen Prozentwerte sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Es wurden mindestens 5000 Ereignisse gemessen.

Ursprung	Zellen	Melan-A	%	MFI
GBM	U251	fraglich	21,29	15,73
GBM	U373	negativ	0,30	3,13
GBM	T5135	negativ	1,98	6,67
GBM	GAMG	negativ	0,86	4,96
GBM	A1207	negativ	0,02	3,45
Melanom	Mel 2a	positiv	67,88	12,62
Melanom	Mel 397	positiv	57,63	8,16
Melanom	FM55	positiv	98,68	80,08
Melanom	FM88	positiv	95,33	30,72
Mamma Ca	MCF 7	negativ	1,05	3,53

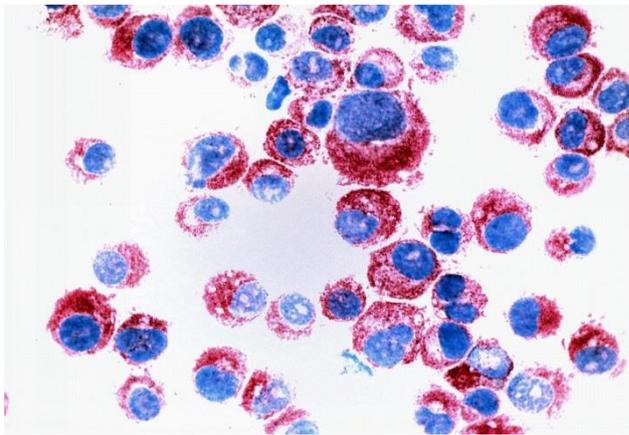
Tabelle 13: Übersicht FACS Ergebnis

3.2 Cytospins

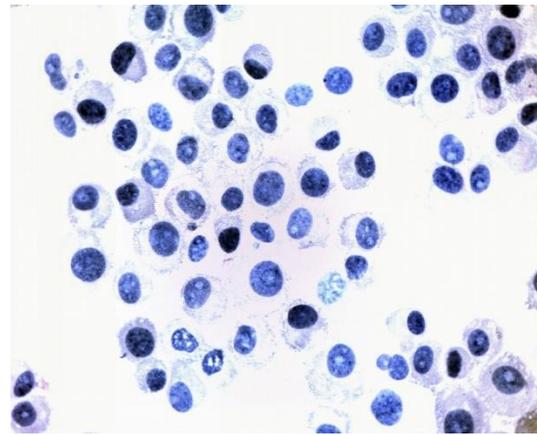
Eine andere Methode zum Nachweis eines Proteins in einzelnen Zellen ist die Immunhistochemie. Der Nachweis erfolgt entweder mittels Gewebeschnitten oder in einzelnen auf Objektträgern fixierten Zellen, beispielsweise mittels der

Cytospin Technik. Die Auswertung erfolgt unter dem Lichtmikroskop. Letztere Methode wurde für eine orientierende immunzytologische Untersuchung der ausgewählten Zelllinien auf die Expression von Melan-A gewählt, um die Ergebnisse der intrazellulären Färbung zu kontrollieren. Es wurden die Zelllinien U87, U343, A1207, GAMG, Mel 624, FM 88 und MCF 7 mittels Cytospin auf Melan-A mit dem Antikörper Klon A 103 (Dako) untersucht. Nach Färbung mittels APAAP Methode mit Neurofuchsin Substrat und Hämalaun Gegenfärbung wurden die Präparate im Lichtmikroskop untersucht.

Dabei bestätigten sich die FACS Ergebnisse, denn nur die Melanomzellen (Mel 624 und FM 88) waren positiv. Beispiele für Cytospins sind in Abbildung 11 mit FM 88 und U 87 Zellen in der Anti-Melan-A Färbung dargestellt.



FM 88 Zellen, 500x, rot = Melan-A



U 87 Zellen, 500x, rot = Melan-A

Abbildung 11: Beispiele für Cytospins. Getestet wurden hier die Zelllinien FM88 und U87 mit Anti Melan-A Klon A103. Die Detektion erfolgte mittels APAAP Methode. Melan-A erscheint rot. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. 500x Vergrößerung.

3.3 Melan-A Expressionsnachweis mittels Westernblot

Da eine mögliche Expression des Melan-A-Proteins in GBM offensichtlich deutlich geringer ist als in Melanomzellen ist – und ggf. unter der Nachweisgrenze für eine intrazelluläre Färbung liegt - sollte der Nachweis mittels Westernblot geführt werden, der technisch eine größere Sensitivität hat.

Es wurde eine Methodik verwendet, bei der durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper gleichzeitig sowohl das spezifische Protein (Melan-A) als auch die Ladekontrolle (β -Actin) nachgewiesen werden können. (Andernfalls müsste

man die Westernblotmembran nach der ersten Färbung von Antikörperbindungen befreien (stripfen) und nochmals gegen den zweiten Antikörper färben). Die eingesetzten Zelllinien wurden hierfür analog der Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.2.5 aufbereitet.

Verwendet wurde der Melan-A Antikörper Klon A 103 (Mouse), da dieser in Studien und der entsprechenden Literatur (Chen, et al. ⁶²) als sehr geeignet beschrieben wurde.

Als Ergebnis erscheinen die entsprechenden Banden von Melan-A bei 18 KDa grün. Beta-Actin erscheint bei 46 KDa in rot. Im Vorfeld wurde die optimale Konzentration der Zellproteine bestimmt, sowie die optimale Verdünnung der primären Antikörper ermittelt (siehe auch Abschnitt 2.2.5). Alle Proben haben als Loadingkontrolle Beta-Actin (rote Bande) enthalten.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass die als Positivkontrolle mitgeführten Melanomzelllinien FM55 und Mel2a tatsächlich positiv für Melan-A sind.

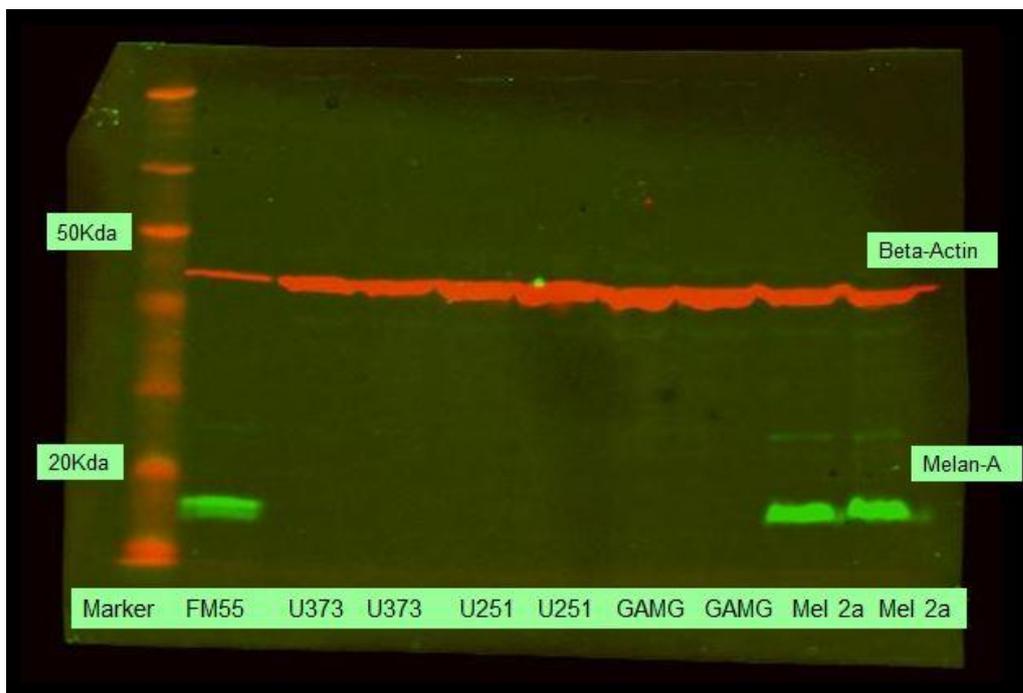


Abbildung 12: zeigt exemplarisch ein Westernblot mit gleichzeitiger Färbung von 2 Antikörpern Grün= Melan-A [A103], rot= Beta-Actin. Es erfolgte von jeder Zelllinie eine Doppelbestimmung. Zu erkennen ist, dass nur FM 55 und Mel2a Melan-A positiv sind. Die GBM Linien U373, U251 und GAMG sind Melan-A negativ. Alle Geltaschen enthalten Proteinlysate, da Beta-Actin in allen Taschen positiv ist.

Da Beta Actin in allen Taschen nachgewiesen positiv ist, ist somit auch Proteinlysate in allen Geltaschen enthalten.

Alle weiteren Melanom-Zelllinien (siehe Tabelle 14) Mel 624, Mel 397, FM 55, FM 88 waren positiv für Melan-A (grüne Bande) getestet.

Ursprung	Zellen	Beta-Actin	Melan-A
Melanom	Mel 2a	+	+
Melanom	Mel 624	+	+
Melanom	Mel 397	+	+
Melanom	FM55	+	+
Melanom	FM88	+	+

Tabelle 14: Westernblot-Ergebnis Melanom Zellen

In den Glioblastomlinien (Abbildung 12 und Abbildung 13) U 87, U 138, U 251, U 343, U 373, T 3868, T 5135, T 6217, A 1207 und GAMG konnte kein Melan-A mit Hilfe des Antikörpers A 103 nachgewiesen werden.

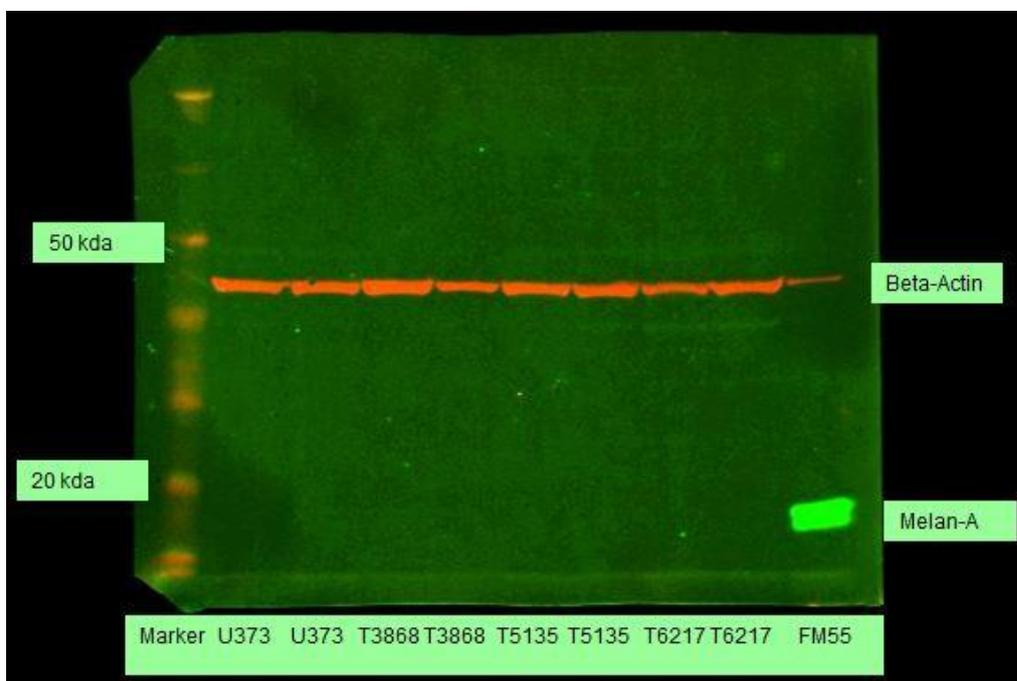


Abbildung 13: Westernblot GBM Linien. U373, T3868, T5135 und T6217 sind Melan-A negativ. FM55 ist als Positiv-Kontrolle Melan-A positiv. Alle Geltaschen enthalten Proteinlysate, da Beta-Actin in allen Taschen positiv ist.

Die Ergebnisse der GBM Zelllinien werden in Tabelle 15 zusammengefasst.

Ursprung	Zellen	Beta-Actin	Melan-A
GBM	U87	+	-
GBM	U138	+	-
GBM	U251	+	-
GBM	U343	+	-
GBM	U373	+	-
GBM	T3868	+	-
GBM	T5135	+	-
GBM	T6217	+	-
GBM	A1207	+	-
GBM	GAMG	+	-

Tabelle 15: Westernblot-Ergebnis GBM Zellen

Die Glioblastomzelllinien sind einerseits grundsätzlich gut für in vitro Versuche geeignet, andererseits möglicherweise aber durch die Kultur schon verändert. Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit in Primärmaterial ein Signal zu detektieren war. Es standen 6 primäre GBM Zelllinien zur Verfügung, die aus Tumorsektaten der Neurochirurgie der Universitätsklinik Würzburg stammten. Aufgrund im Vorfeld schwach gemessener Proteinkonzentrationen erfolgte die Bestimmung mit maximal möglicher Lysatkonzentration und Volumen. Trotzdem konnte in keiner der Primärlinien Melan-A mittels des eingesetzten Antikörpers A 103 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 und Tabelle 16).

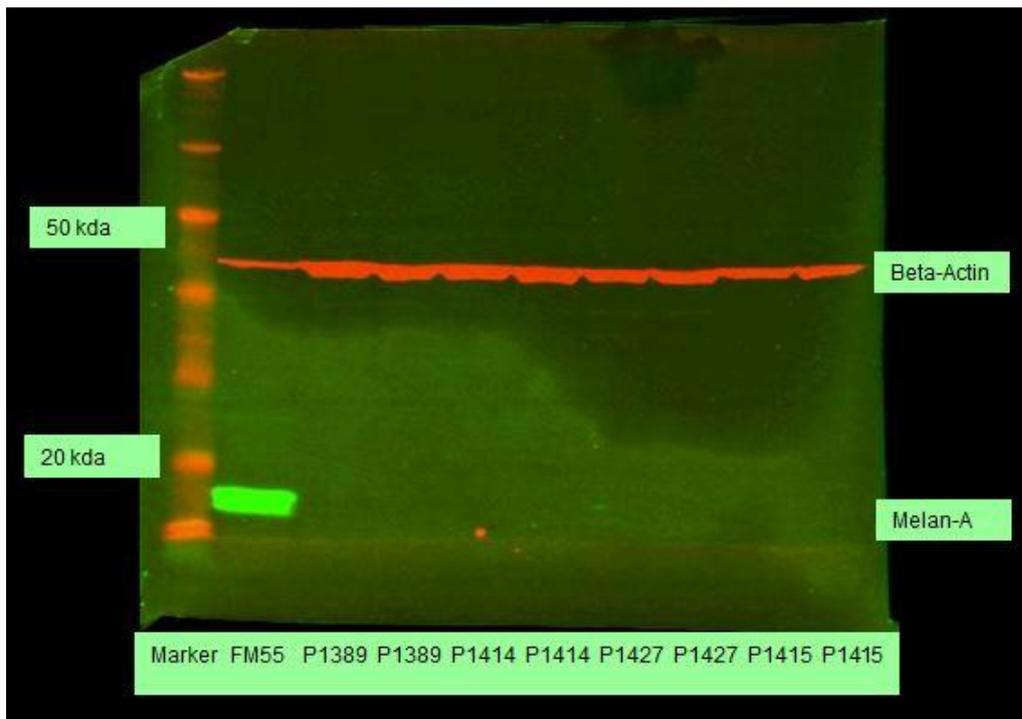
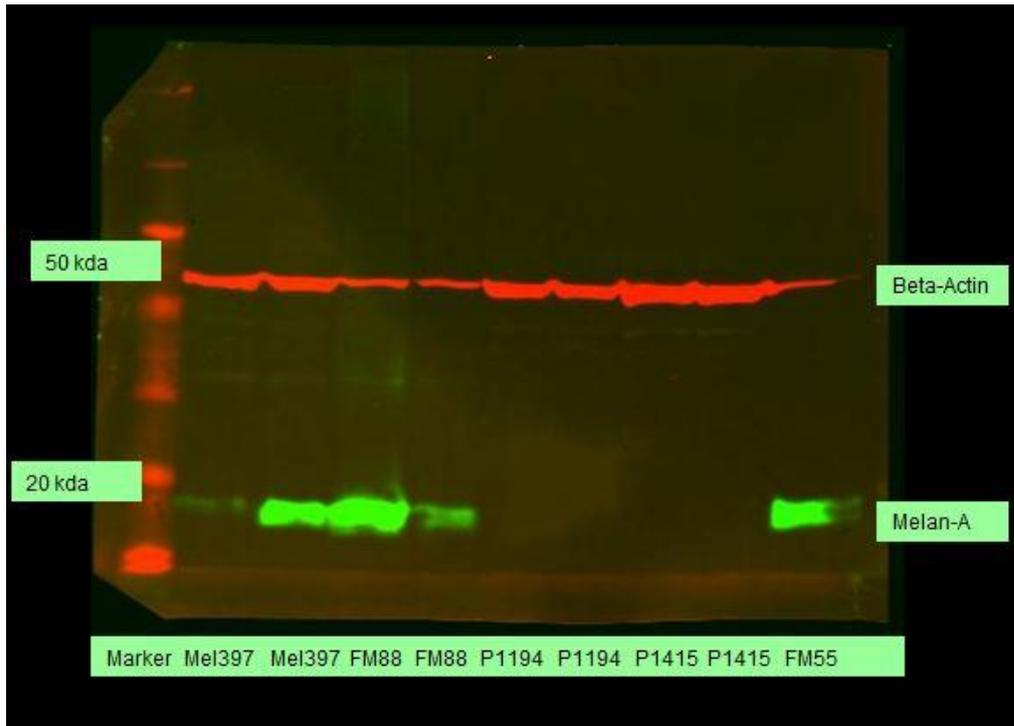


Abbildung 14: Westernblot primäre GBM Linien. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Primärzelllinien mit maximal möglicher Konzentration und Taschen volumen. In allen Gel taschen ist Beta-Actin positiv. Nur die mitgeführten Melanom-Zelllinien Mel397, FM88 und FM55 sind Melan-A positiv.

Ursprung	Zellen	Beta-Actin	Melan-A
Primär GBM	P1194	+	-
Primär GBM	P1415	+	-
Primär GBM	P1399	+	-
Primär GBM	P1414	+	-
Primär GBM	P1427	+	-
Primär GBM	P1389	+	-

Tabelle 16: Westernblot-Ergebnis primäre GBM Zellen

In den übrigen Zellreihen, überwiegend gynäkologischer Herkunft, konnte ebenfalls kein Melan-A detektiert werden (siehe Tabelle 17).

Ursprung	Zellen	Beta-Actin	Melan-A
Mamma Ca	MCF 7	+	-
Ovar Ca	Ovar	+	-
Ovar Ca	SKov	+	-
Endometrium Ca	Ishikawa	+	-
NNR Ca	SW13	+	-
CML	K562	+	-

Tabelle 17: Westernblot-Ergebnis sonstige Zellen

3.4 Melan-A Expression auf mRNA Ebene

Eine mögliche Ursache für die in den Vorversuchen festgestellte HLA-spezifische Erkennung von Glioblastomzellen durch Melan-A-spezifische T-Zellen könnte sein, dass das Protein in den Glioblastomzellen rasch abgebaut wird und somit mit der herkömmlichen Proteinbiochemie nicht nachweisbar ist. Da aber auch Abbauprodukte des Zellapparates rasch als Epitope auf MHC-Moleküle geladen werden, können T-Zellen auch Epitope von Proteinen erkennen, die sehr rasch abgebaut werden.

Mittels Realtime PCR wurde deshalb die Expression von Melan-A mRNA auf RNA-Ebene in den eingesetzten Zelllinien gemessen. Als interne Referenz wurde die Kopienzahl von GAPDH mitbestimmt.

Im Vergleich zur GAPDH Expression, bilden nur die Melanom-Zell-Linien Mel2a, Mel 624, Mel 397, FM 55 und FM 88 Melan-A cDNA. In den Glioblastomlinien und den anderen Tumorklinien konnte keine Melan-A cDNA gemessen werden, siehe auch Abbildung 15.

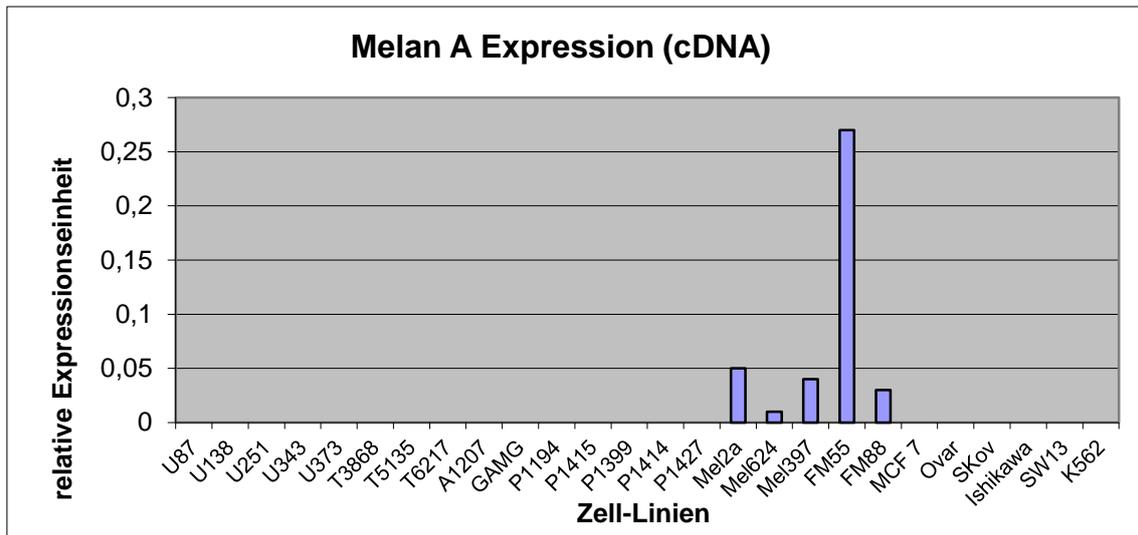


Abbildung 15: Ergebnisse Realtime PCR. Nur die Melanom-Zelllinien Mel2a, Mel624, Mel397, FM55 und FM88 bilden Melan-A cDNA. Die relative Expressionseinheit ist das Verhältnis von der GAPDH zur Melan-A cDNA Menge.

3.5 Melan-A Expressionsnachweis mittels Immunhistochemie

Die Expression von Melan-A wurde in den vorangegangenen Versuchen nur an Zellen aus Zellkulturen untersucht. Im nächsten Schritt wurde Primärgewebe aus OP Resektaten verwendet. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg, Abteilung Neuropathologie, wurden in zwei Serien Proben ausgewählt (siehe auch Abschnitt 2.1.4).

Zunächst wurden in Serie 1 Proben von 12 jungen Patienten getestet, die jedoch einer sehr heterogenen Gruppe entstammten: zum Zeitpunkt der Probengewinnung waren die Patienten unterschiedlich vortherapiert, andererseits lagen unterschiedliche histologische Subtypen des GBM vor. Zudem gab es teilweise pro Patient mehrere zeitlich versetzt gewonnene Proben, was die Vergleichbarkeit sehr erschwerte.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch eine Probe aus der ersten Serie. Es handelt sich um das Präparat eines 15 jährigen männlichen Patienten mit einem

Glioblastom mit Riesenzellkomponente. Links eine Übersicht in 100x Vergrößerung, rechts eine einzelne Riesenzelle bei 400x Vergrößerung. Deutlich zu erkennen ist die intrazelluläre Lage von Melan-A

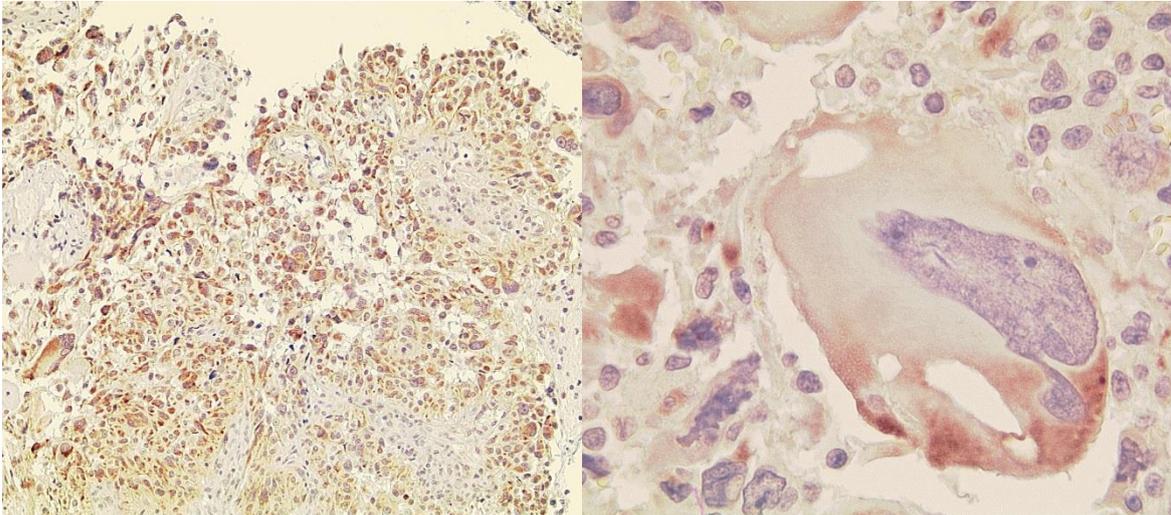
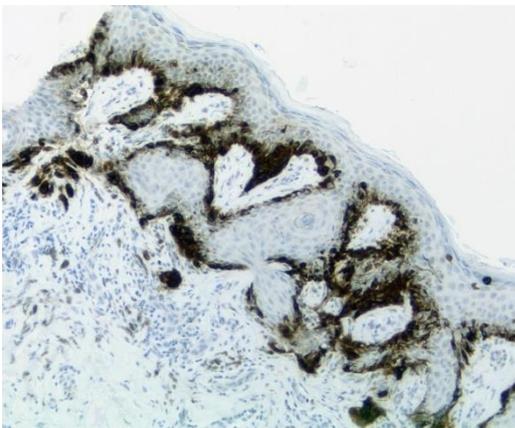


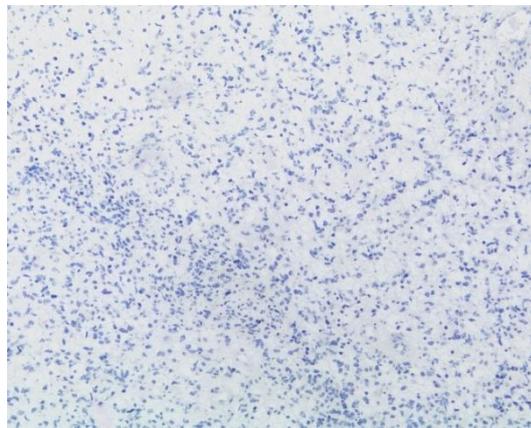
Abbildung 16: Serie 1, Patient 15 Jahre, männlich, GBM Riesenzellkomponente, Anti Melan-A (rot). Rechts 400x und links 100x Vergrößerung. LSAB Methode mit NovaRed, Gegenfärbung mit Hämalaun.

Wie bereits beschrieben, war auf Grund der Heterogenität der ersten Serie eine Vergleichbarkeit der einzelnen Präparate schwierig. Außerdem muss eine Veränderung der Proteinexpression in den Tumorzellen auf Grund der Vorbehandlung der Patienten mit Chemotherapie und Bestrahlung diskutiert werden. Für Melan-A wurde dies noch nicht in der Literatur beschrieben, jedoch gibt es Daten für die Auswirkung ionisierender Strahlung auf das Expressionsmuster von Osteoklasten (Yang, et al. ⁶³) und beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (Pushkarev, et al. ⁶⁴). Da es unklar ist, ob eine entsprechende Vorbehandlung der Patienten eine Auswirkung auf die Melan-A Expression hat, wurde in einer zweiten Serie versucht, Präparate von Patienten auszuwählen, die keine Vorbehandlung mittels Chemo- oder Strahlentherapie erhalten hatten. Zudem wurden seltene histologische Subtypen ausgeklammert. Die aufgeführten Bilder der zweiten Serie in Abbildung 17 zeigen ausschnittsweise einige Schnitte, in denen punktuell eine Reagibilität gegenüber Melan-A-Antikörpern nachzuweisen war. Als Vergleich und Kontrolle der Färbung selbst wurde bei allen GBM Präparaten eine Färbung mit einem

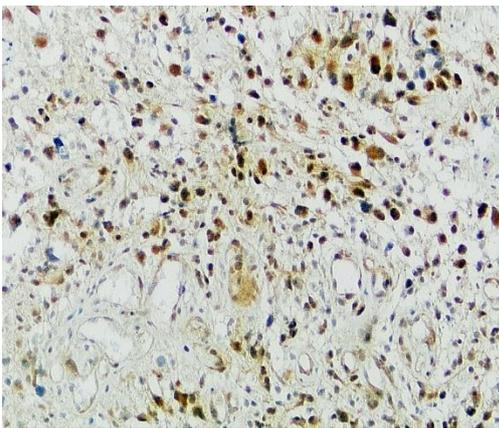
Antikörper gegen IL-13-Rezeptor-alpha 2 mitgeführt, die vorwiegend positiv war.



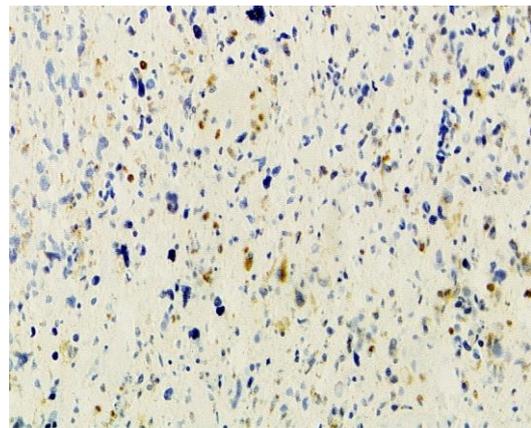
Als Positiv Kontrolle wurde ein Melanom-Schnitt verwendet 100x, Anti-Melan-A



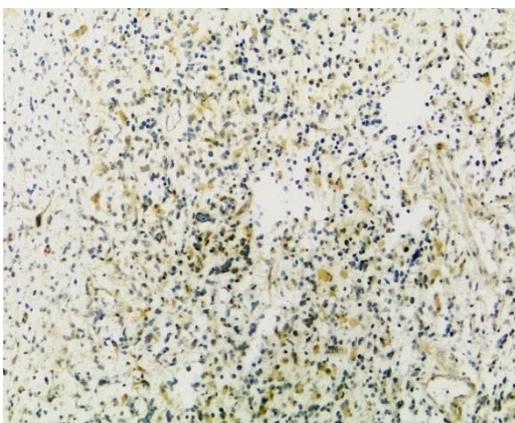
Reagenzkontrolle ohne Primär-Antikörper, zur Definition des Backgrounds 100x



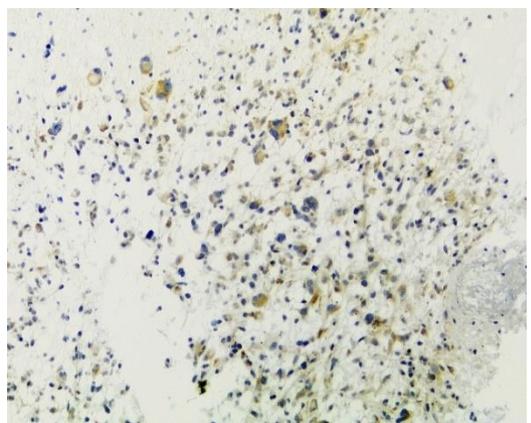
Patient 21 Anti-IL13R-alpha2 200x



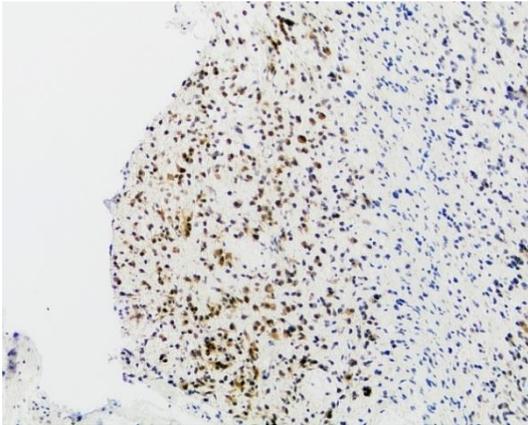
Patient 21 Anti-Melan-A 200x



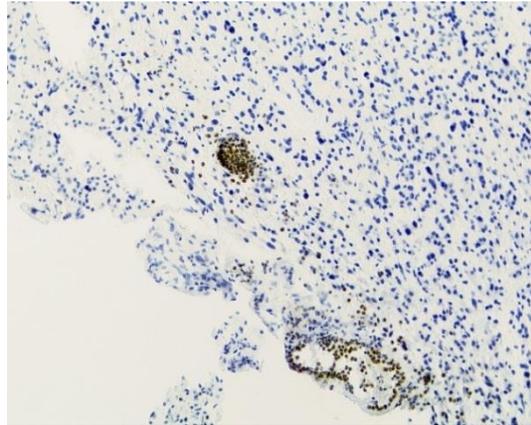
Patient 19 Anti-IL13R-alpha2 200x



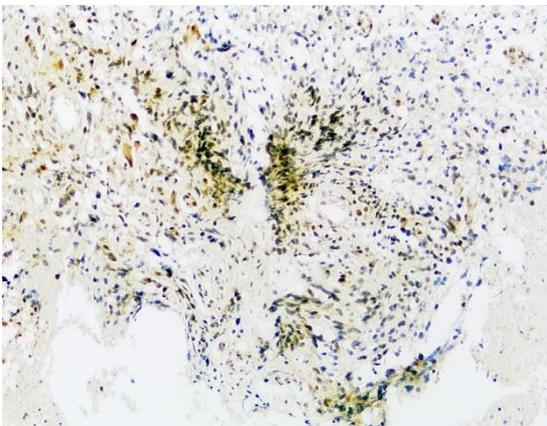
Patient 19 Anti-Melan-A 200x



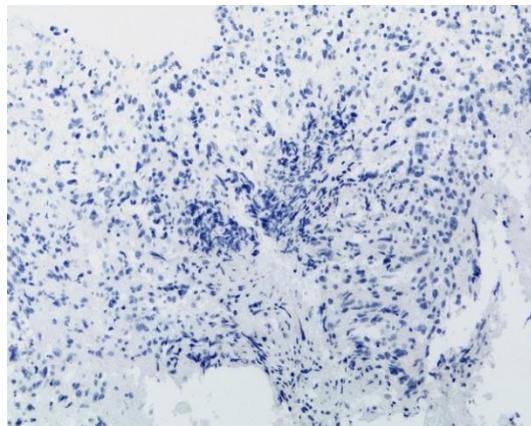
Patient 13 Anti- IL13R-alpha2 200x



Patient 13 Anti-Melan-A 200x



Patient 16 Anti-IL13R-alpha2 200x



Patient 16 Anti-Melan-A 200x

Abbildung 17 zeigt ausgewählte Färbungen aus der zweiten Serie, Anti-Melan-A und Anti-IL13-Ralpha 2 sind braun/schwarz gefärbt (LSAB Methode mit DAB). Gegenfärbung mit Hämalaun.

Tabelle 18 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der Immunhistochemie der GBM Patienten aus der zweiten Serie. Die Prozentangaben richten sich nach manueller Auszählung von 100 Zellen und beziehen sich auf den kompletten Schnitt bzw. im Präparat erfassten Tumor.

Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass Melan-A in den Schnitten nicht flächendeckend positiv war. Vielmehr waren es einzelne Gewebeabschnitte, die positive Zellen aufzeigten. Im Gegensatz dazu war IL-13-Rezeptor-alpha 2 in den meisten Schnitten weitgehend flächendeckend positiv.

Patient Nr.	Alter	Geschlecht	GBM	Melan-A	IL13R-alpha2
13	24	m	WHO IV	1-5%	50-70%
14	24	m	WHO IV	5-10%	25-50%
15	7	w	WHO IV	<1%	25-50%
16	14	m	WHO IV	<1%	50-75%
17	47	m	WHO IV	5-10%	25-50%
18	69	w	WHO IV	5-10%	50-75%
19	66	m	WHO IV	10-25%	50-75%
20	76	w	WHO IV	<1%	25-50%
21	56	m	WHO IV	10-25%	50-75%
22	28	w	WHO IV	1-5%	25-50%

Tabelle 18: Ergebnis für Melan-A und IL13R-alpha2 in der Immunhistologie

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass im Unterschied zu all den Versuchen mit den Zelllinien in den vorliegenden Patientenschnitten überraschenderweise doch eine – wenn auch überwiegend schwache – Expression von Melan-A nachzuweisen war.

4. Diskussion

Auf Grund der Tatsache, dass aktuell die Standard-Therapie (vgl. Abschnitt 1.2) des GBM wegen der bislang schlechten Prognose (2 Jahres Überlebensrate 26% [Stupp, et al. ⁸]) unbefriedigend ist, wird die Suche nach weiteren therapeutischen Ansätzen vorangetrieben. Dabei kommt den immuntherapeutischen Verfahren wegen ihrer Spezifität eine besondere Bedeutung zu. Beispiele bisheriger immuntherapeutischer Ansätze in der GBM Therapie wurden unter Abschnitt 1.3 vorgestellt. Vielversprechend ist u.a. die adoptive T-Zell-Therapie. In der Literatur sind für das GBM mehrere tumor-assoziierte Antigene beschrieben, die für eine adoptive T-Zelltherapie in Frage kommen, u.a. auch Melan-A (Zhang, et al. ⁵⁹).

Die Expansion antigen-spezifischer T-Zellen in vitro ist nicht einfach, besonders dann, wenn eine T-Zell-Antwort aus dem naiven T-Zell-Repertoire generiert werden soll, denn der Erfolg hängt stark von der Vorläuferfrequenz der T-Zellen

ab. Für tumor-assoziierte Antigene ist die Frequenz meist so gering, dass eine selektive Stimulation und Expansion nur schwer gelingt. Eine Ausnahme stellen tatsächlich Melan-A-spezifische T-Zellen dar, weil hier aus nicht eindeutig geklärten Gründen selbst im naiven Repertoire eine höhere Vorläuferfrequenz besteht. Gerade Melan-A-spezifische T-Zellen können also mit optimierten Protokollen recht gut in vitro expandiert werden. So stellte sich die Frage, ob sich hier ein geeignetes Zielprotein für eine T-Zell-Therapie auch beim Glioblastom bietet. Sowohl in der Literatur (Zhang, et al.⁵⁹) als auch im Labor der Arbeitsgruppe, zeigte sich eine spezifische Lyse von Gliomzellen durch Melan-A spezifische T-Zellen, so dass die ursprüngliche Hypothese für diese Arbeit war, dass Glioblastomzellen vermutlich Melan-A exprimieren.

Mittels FACS Analyse sollte eine intrazelluläre Expression von Melan-A auf Proteinebene nachgewiesen werden. Um eine transiente Expression in den Zellkulturen zu erfassen, wurde die Realtime PCR als Ergänzung zum Nachweis auf Genom-Ebene bzw. einer Genexpression (mRNA) eingesetzt. Auf Grund einer höheren Sensitivität als die intrazelluläre FACS Detektion wurde zum Nachweis von Melan-A auf Proteinebene der Westernblot als zusätzliche Methode gewählt.

Durch die schnell verfügbare orientierende Untersuchung ausgewählter Zelllinien mit der Cytospin Methode konnte zusätzlich immunzytologisch die Ergebnisse der PCR und der FACS Analyse bestätigt werden.

Mit der Immunhistochemie des Primärgewebes sollte im Rahmen dieser Arbeit die Fehlerquelle der Zellkultur-Technik – bestehend aus Veränderung des Expressionsmusters und Verlust von Eigenschaften während der andauernden Passagierung der Zellen - ausgeschaltet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also mit verschiedenen Methoden auf RNA- und Proteinebene belegt werden, dass in der Regel Melan-A in Glioblastomlinien nicht exprimiert wird. In Primärtumoren war immerhin eine schwache, meist punktuelle Expression erkennbar, die aber vermutlich nicht ausreicht, um Melan-A als Zielprotein einer Immuntherapie auszuwählen. Damit stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu einer Arbeit von Zhang, et al.⁵⁹, die 2007 publiziert wurde: in dieser Arbeit wurde von einem Melan-A-Protein-

Nachweis in 76% der GBM Zelllinien gesprochen (Analyse mittels FACS). Patientenproben waren mittels PCR untersucht worden und in 36% der Fälle positiv (Zhang, et al. ⁵⁹). Allerdings veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe ein Jahr später eine weitere Untersuchung, in der kein RNA-Nachweis von Melan-A aus Gewebeproben adulter und pädiatrischer GBM erbracht werden konnte (Zhang, et al. ⁶⁵).

Syed (Syed, et al. ⁴⁴) konnte 2012 in 2% der untersuchten GBM Patientenproben Melan-A nachweisen. Angesichts dieser in sich widersprüchlichen Datenlage, hat diese Arbeit dazu beigetragen, ein eigenes Bild bezüglich Melan-A als Zielstruktur beim GBM zu gewinnen.

Neben den unterschiedlichen Aussagen in der Literatur, mussten aber auch Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe selbst, bezüglich der Erkennung von Glioblastomzellen durch Melan-A spezifische T-Zellen hinterfragt werden. Diese zum Teil sehr deutlich zu erkennende Aktivierung der T-Zellen und Lyse der GBM Zellen war der eigentliche Ausgangspunkt dieses Projekts.

In Anbetracht der nun nachgewiesenen, fehlenden Melan-A-Expression ist die wahrscheinlichste Interpretation die, dass es sich um eine Kreuzreaktion handelt. Eine solche Kreuzreaktion gegenüber einem anderen Peptid ist ebenfalls HLA-restringiert und wird über den T-Zell-Rezeptor vermittelt.

In der Literatur sind solche Kreuzreaktionen für Melan-A spezifischen T-Zellen beschrieben. Loftus, et al. ⁶⁶ haben anhand der Peptid Sequenz von Melan-A in einer Protein-Datenbank nach ähnlichen Peptidsequenzen gesucht und diejenigen mit großer Übereinstimmung synthetisiert. Es handelte sich um über 40 natürlich vorkommende Peptide, v.a. Antigene von Bakterien, Mensch, Hefe und Glykoprotein C von HSV-1. Von diesen synthetisierten Peptiden wurden 12 durch Melan-A spezifische T-Zellen erkannt und die präsentierenden Zellen lysiert. Loftus et al. ⁶⁶ haben sich die Frage gestellt, ob bakterielle Eigenantigene der Selektion im Thymus entkommen und somit nicht als fremd erkannt werden. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Rubio-Godoy, et al. ⁶⁷: 72 verschiedene Antigene (Eigen-, als auch bakterielle, virale Antigene) wurden über eine Peptid Datenbank als kreuzreaktiv zu Melan-A selektiert. 39% der eingesetzten

Peptide wurden von mehreren verwendeten Melan-A spezifischen T-Zell-Klonen erkannt. Wieder wurden bakterielle Peptide häufiger erkannt.

Bereits 1998 hat Mason ⁶⁸ eine Hypothese aufgestellt, dass der T-Zell-Rezeptor generell ein hohes Maß an natürlicher Kreuzreaktivität zu haben scheint. Er begründete es u.a. damit, dass ein Organismus gar nicht in der Lage sein kann, für jedes vorkommende Antigen eine eigene spezifische T-Zelle zu haben. Am Beispiel der Maus verdeutlichte er, dass die Masse an monospezifischen T-Zellen um ein Vielfaches die tatsächliche Masse einer Maus übersteigen würde.

Ein weiteres Beispiel für Kreuzreaktivität von Melan-A Peptid haben Christensen, et al. ⁶⁹ im Falle des Multiplen Myeloms beschrieben. Dort hatten Melan-A spezifische T-Zellen von Patienten mit multiplen Myelom spezifisch über eine Kreuzreaktion mit HM 1.24 autologe Myelomzellen lysiert.

In weiteren Versuchen in der AG Prof. Dr. Wöfl (Klopsch B ⁷⁰) konnte eine Kreuzreaktion Melan-A spezifischer CD8+ T-Zellen zu Mykoplasmen bewiesen werden. Glioblastom Zell-Linien, die ursprünglich von Melan-A spezifischen T-Zellen erkannt wurden, haben nach einer Behandlung der Zelllinien mit Antibiotika gegen Mykoplasmen, diese nicht mehr erkannt.

Hierfür gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten:

1. Ein Mykoplasmen-assoziiertes Antigen hat mit der Melan-A spezifischen T-Zelle reagiert auf dem Boden einer gemeinsamen Peptidstruktur
2. Auf Grund der Infektion kommt es in der Tumorzelle zu einer Stressreaktion, die dann zu einer Änderung des Expressionsmusters führt

Da Melan-A ein weit verbreitetes Tumor-Antigen (Top 20 der Tumor-Antigene [Cheever, et al. ⁵⁷]) darstellt und bereits in der Immuntherapie eingesetzt wird, ist dieser Aspekt sehr entscheidend für weitere therapeutische Ansätze beim GBM. Im Gegensatz zu extrakraniellen soliden Tumoren mit Melan-A Expression könnte eine Kreuzreaktion von Melan-A spezifischen T-Zellen im Gehirn eine Neurotoxizität bewirken.

5. Zusammenfassung

Da mit der derzeitigen Therapie des Glioblastom bei Kindern die 2-Jahres Überlebensrate bei 26% liegt (Driggers, et al. ⁹), wird die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten vorangetrieben. Die Immuntherapie könnte die Möglichkeiten einer spezifischen möglichst nebenwirkungsarmen Therapie bieten. Wie bereits aufgezeigt, ist das ZNS im Krankheitsfall für das Immunsystem zugänglich (Parney ¹⁰).

Als Standardtherapie wird derzeit eine Operation in Kombination mit einer Radio-Chemotherapie mit Temozolomid angewendet. Bereits bei Rezidiven werden bestehende Therapieverfahren z.B. mit monoklonalen Antikörpern wie Bevacizumab (Anti-VEGF) kombiniert und getestet (Chamberlain and Johnston ¹⁵).

Auch die adoptive T-Zell-Therapie ist ein vielversprechender Ansatz. Ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Therapie ist aber die Auswahl geeigneter Tumorantigene.

Melan-A ist ein in der Immuntherapie der malignen Melanome gut charakterisiertes und mehrfach eingesetztes Ziel (Mackensen, et al. ⁵⁶). Dies beruht unter anderem auf der Eigenschaft, in vitro tumorspezifische CD8+ T-Zellen in großer Zahl expandieren zu können (Wolfl, et al. ³⁸).

Angesichts der gemeinsamen neuroektodermalen Herkunft von Melanozyten und glialen Zellen gibt es Berichte, in denen Melan-A in Gliomen nachgewiesen werden konnte (Zhang, et al. ⁵⁹, Syed, et al. ⁴⁴).

In dieser Arbeit wurde mit eigenen experimentellen Daten nochmals exakt nachvollzogen, inwieweit Melan-A als Tumorantigen bei Glioblastomen eine relevante Zielstruktur sein könnte. Da die Ergebnisse aus den Versuchen mit Zelllinien negativ ausfielen, wurden verschiedene Techniken angewandt, um unzureichende Sensitivität eines Assay als mögliche Fehlerquelle auszuschließen. Letztlich waren in den Schnitten von Primärgewebe tatsächlich vereinzelt Zellen positiv für Melan-A (und diese Tumore wären in den Arbeiten, in denen hauptsächlich mit PCR gearbeitet wurde, positiv gewertet worden). Auch wenn nicht definiert ist, wie hoch der Expressionslevel eines Antigens für eine erfolgreiche Immuntherapie sein muss, relativieren die hier vorgestellten

Ergebnisse aber doch deutlich die Erwartungen an eine durch Melan-A-spezifische T-Zellen vermittelte Therapie beim Glioblastom.

Darüber hinaus unterstreichen die Ergebnisse auch die Bedeutung von potenziellen Kreuzreaktionen, die grundsätzlich für jeden T-Zell-Rezeptor auftreten können, möglicherweise aber gerade bei dem Melan-A-Epitop eine größere Relevanz haben.

Auch wenn es möglich ist relativ schnell Melan-A spezifische T-Zellen zu generieren, so scheint es sinnvoller andere Tumor assoziierte Antigene, die im Glioblastom vorkommen, wie z.B. EGFRvIII, IL-13-Rezeptor-alpha 2, gp100 oder MAGE in die Entwicklung einer adoptiven T-Zell Therapie mit einzubinden. Eventuell besteht die Möglichkeit mit Hilfe eines „Cocktails“ aus mehreren spezifischen T-Zellen, die gegen unterschiedliche TAAs gerichtet sind, einen Therapieerfolg zu erhalten.

Weitere Forschung ist hier notwendig, um eine sichere Immuntherapie für Glioblastome zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

1. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013;342(6165):1432-1433.
2. Mitchell DA, Fecci PE, Sampson JH. Immunotherapy of malignant brain tumors. *Immunol Rev*. 2008;222:70-100.
3. Kaatsch P, Rickert CH, Kuhl J, Schuz J, Michaelis J. Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer*. 2001;92(12):3155-3164.
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
5. Pfister S, Witt O. Pediatric gliomas. *Recent Results Cancer Res*. 2009;171:67-81.
6. J. Kühl † SR, P.-G. Schlegel. Hirntumore. In: Speer CP, Gahr, Manfred, ed. Pädiatrie. Vol. 3. Auflage: Springer; 2009:822 f.
7. Gadner HG, G.; Niemeyer, C.; Ritter, J. (Hrsg.). ZNS Tumore. In: J. Kühl † RK, ed. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie: Springer; 2006.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-996.
9. Driggers L, Zhang JG, Newcomb EW, Ge L, Hoa N, Jadus MR. Immunotherapy of pediatric brain tumor patients should include an immunoprevention strategy: a medical hypothesis paper. *J Neurooncol*. 2010;97(2):159-169.
10. Parney IF. Basic concepts in glioma immunology. *Adv Exp Med Biol*. 2012;746:42-52.
11. Chen KS, Mitchell DA. Monoclonal antibody therapy for malignant glioma. *Adv Exp Med Biol*. 2012;746:121-141.
12. Kioi M, Seetharam S, Puri RK. Targeting IL-13Ralpha2-positive cancer with a novel recombinant immunotoxin composed of a single-chain antibody and mutated *Pseudomonas* exotoxin. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(6):1579-1587.
13. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6(4):443-446.
14. Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4071-4076.
15. Chamberlain MC, Johnston SK. Salvage therapy with single agent bevacizumab for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. 2010;96(2):259-269.
16. Kenneth M. Murphy PT, Mark Walport. Janeway Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag.
17. Jacobs SK, Wilson DJ, Kornblith PL, Grimm EA. Interleukin-2 or autologous lymphokine-activated killer cell treatment of malignant glioma: phase I trial. *Cancer Res*. 1986;46(4 Pt 2):2101-2104.
18. Angus W. Thomson MTL. The Cytokine Handbook, Two-Volume Set (ed 4th Edition): Elsevier; 2003.

19. Okada H, Lieberman FS, Walter KA, et al. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med.* 2007;5:67.
20. Weber F, Asher A, Bucholz R, et al. Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 2003;64(1-2):125-137.
21. Peng JC, Thomas R, Nielsen LK. Generation and maturation of dendritic cells for clinical application under serum-free conditions. *J Immunother.* 2005;28(6):599-609.
22. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010.
23. De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, et al. Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):3098-3104.
24. Bloch O. Immunotherapy for malignant gliomas. *Cancer Treat Res.* 2015;163:143-158.
25. Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, Bigner DD. Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma. *Semin Immunol.* 2008;20(5):267-275.
26. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 2000;7(10):867-874.
27. Okada H, Pollack IF, Lotze MT, et al. Gene therapy of malignant gliomas: a phase I study of IL-4-HSV-TK gene-modified autologous tumor to elicit an immune response. *Hum Gene Ther.* 2000;11(4):637-653.
28. Ishikawa E, Takano S, Ohno T, Tsuboi K. Adoptive cell transfer therapy for malignant gliomas. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:109-120.
29. Dillman RO, Duma CM, Schiltz PM, et al. Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother.* 2004;27(5):398-404.
30. Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res.* 2004;24(3b):1861-1871.
31. Quattrocchi KB, Miller CH, Cush S, et al. Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol.* 1999;45(2):141-157.
32. Liu Z, Meng Q, Bartek J, Jr., et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from patients with glioma. *Oncoimmunology.* 2017;6(2):e1252894.
33. Kruse CA, Cepeda L, Owens B, Johnson SD, Stears J, Lillehei KO. Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother.* 1997;45(2):77-87.
34. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:175-208.
35. Stobo JD. T cell activation. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1988;99:196-202.
36. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974;248(5450):701-702.

37. Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J Med.* 1996;45(2):100-108.
38. Wolfl M, Merker K, Morbach H, et al. Primed tumor-reactive multifunctional CD62L+ human CD8+ T cells for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(2):173-186.
39. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med.* 2013;5(174):174ra127.
40. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):233-240.
41. Yang JC, Rosenberg SA. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. *Adv Immunol.* 2016;130:279-294.
42. Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet.* 2009;373(9664):673-683.
43. Grauer OM, Wesseling P, Adema GJ. Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain Pathol.* 2009;19(4):674-693.
44. Syed ON, Mandigo CE, Killory BD, Canoll P, Bruce JN. Cancer-testis and melanocyte-differentiation antigen expression in malignant glioma and meningioma. *J Clin Neurosci.* 2012;19(7):1016-1021.
45. Toda M. Glioma antigen. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:77-84.
46. Joshi BH, Plautz GE, Puri RK. Interleukin-13 receptor alpha chain: a novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas. *Cancer Res.* 2000;60(5):1168-1172.
47. Saikali S, Avril T, Collet B, et al. Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *J Neurooncol.* 2007;81(2):139-148.
48. Maini A, Hillman G, Haas GP, et al. Interleukin-13 receptors on human prostate carcinoma cell lines represent a novel target for a chimeric protein composed of IL-13 and a mutated form of Pseudomonas exotoxin. *J Urol.* 1997;158(3 Pt 1):948-953.
49. Wang RF, Robbins PF, Kawakami Y, Kang XQ, Rosenberg SA. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;181(2):799-804.
50. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1994;180(1):35-42.
51. Busam KJ, Jungbluth AA. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol.* 1999;6(1):12-18.
52. Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem.* 2005;280(14):14006-14016.
53. Romero P, Valmori D, Pittet MJ, et al. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev.* 2002;188:81-96.

54. Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, et al. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods*. 1997;202(1):13-25.
55. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16168-16173.
56. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):5060-5069.
57. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5323-5337.
58. Chi DD, Merchant RE, Rand R, et al. Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol*. 1997;150(6):2143-2152.
59. Zhang JG, Eguchi J, Kruse CA, et al. Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):566-575.
60. Lang G. Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik: Springer; 2006.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
62. Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, et al. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5915-5919.
63. Yang B, Zhou H, Zhang XD, Liu Z, Fan FY, Sun YM. Effect of radiation on the expression of osteoclast marker genes in RAW264.7 cells. *Mol Med Rep*. 2012;5(4):955-958.
64. Pushkarev VM, Kovzun OI, Pushkarev VV, Tronko MD. Biochemical effects of combined action of gamma-irradiation and paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cells. *Ukr Biokhim Zh (1999)*. 2013;85(1):51-61.
65. Zhang JG, Kruse CA, Driggers L, et al. Tumor antigen precursor protein profiles of adult and pediatric brain tumors identify potential targets for immunotherapy. *J Neurooncol*. 2008;88(1):65-76.
66. Loftus DJ, Castelli C, Clay TM, et al. Identification of epitope mimics recognized by CTL reactive to the melanoma/melanocyte-derived peptide MART-1(27-35). *J Exp Med*. 1996;184(2):647-657.
67. Rubio-Godoy V, Dutoit V, Zhao Y, et al. Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL. *J Immunol*. 2002;169(10):5696-5707.
68. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*. 1998;19(9):395-404.

69. Christensen O, Lupu A, Schmidt S, et al. Melan-A/MART1 analog peptide triggers anti-myeloma T-cells through crossreactivity with HM1.24. *J Immunother.* 2009;32(6):613-621.
70. Klopsch B SP, Hagemann C, Vince GH, Roggendorf W and Wölfl M. Crossreactivity of Melan-A specific T-cells to Melan-A negative glioblastoma cells. 6th International Symposium on the Clinical Use in Cellular Products Cellular Therapy. Erlangen, Germany; 2011.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Säulen der Krebstherapie.....	1
Abbildung 2: Prinzip DC Vakzinierung.....	10
Abbildung 3: Prinzip der Adoptiven T-Zell-Therapie	15
Abbildung 4: IFN Gamma Synthese	19
Abbildung 5: Caspase-3 Aktivierung in Melan A spezifischen T-Zellen	20
Abbildung 6: Konzentrationen von A103	37
Abbildung 7: Bestimmung der Sensitivität von A103	38
Abbildung 8: Bestimmung der Sensitivität von M2-7C10.....	39
Abbildung 9: Histogramme der Melanom-Zelllinien	47
Abbildung 10: Histogramme der GBM Zelllinien.....	48
Abbildung 11: Beispiele für Cytospins	49
Abbildung 12: exemplarischer Westernblot	50
Abbildung 13: Westernblot GBM Linien.....	51
Abbildung 14: Westernblot primäre GBM Linien.....	53
Abbildung 15: Ergebnisse Realtime PCR	55
Abbildung 16: Beispiel Patient Studie 1.....	56
Abbildung 17: Beispiel Patienten Studie 2.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenzen der häufigsten Hirntumore im Kindesalter	2
Tabelle 2: Einteilung und Häufigkeit der Astrozytome	3
Tabelle 3: Bestandteile des Immunsystems	5
Tabelle 4: Merkmale der verwendeten Zelllinien	22
Tabelle 5: Reagenzien für T-Zellkultur, Caspase Assay und Zytokinfärbung ..	23
Tabelle 6: Übersicht Patienten Studie 1	24
Tabelle 7: Übersicht Patienten Studie 2	25
Tabelle 8: Merkmale verwendeter Antikörper	26
Tabelle 9: Verwendete Primer	27
Tabelle 10: Westernblot Materialien	28
Tabelle 11: Immunhistologie Materialien	29
Tabelle 12: Realtime PCR Mastermix	45
Tabelle 13: Übersicht FACS Ergebnis	48
Tabelle 14: Westernblot-Ergebnis Melanom Zellen	51
Tabelle 15: Westernblot-Ergebnis GBM Zellen	52
Tabelle 16: Westernblot-Ergebnis primäre GBM Zellen	54
Tabelle 17: Westernblot-Ergebnis sonstige Zellen	54
Tabelle 18: Ergebnis für Melan-A und IL13R-alpha2 in der Immunhistologie..	59

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
AIM-2	Interferon-inducible protein AIM2
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ARF-4L	ADP-ribosylation factor like gene
AS	Aminosäure
ATC	Autologous tumor cells
ATTL	Autologous tumor specific T-lymphocytes
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	kodierende DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic cell
EGFR (VIII)	Epidermal growth factor receptor (Variante III)
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
EphB6	Ephrin type-B receptor 6
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetale calf serum
GBM	Glioblastom
Gp100	glycoprotein 100
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIT-HGG	Hirntumor-Studie für hochgradige Gliome bei Patienten im Kindes- und Jugendalter
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horse reddich peroxidase

HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
KIF1C/3	Kinesin Family Member 1C/3
LAK	Lymphocyte/lymphokine activated killer cells
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
MAGE-1	Melanoma associated encoding gene 1
MART-1	Melanosomal antigen recognized by T-cells 1
Melan-A	Melanosomal differentiation antigen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCF	Relative centrifugal force [entspricht RZP = relative Zentrifugalbeschleunigung]
RT	Raumtemperatur
SART-3	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3
SOX-6/11	Transcription factor SOX-6/11
TAA	Tumor associated antigen
TAPP	Tumor antigen precursor protein
TCR	T-cell receptor
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TRP-2	Tyrosinase related protein 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
WT-1	Willms Tumor gene 1

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei den MTAs der AG Wölfl aus der Kinderklinik: Katharina Merker, Stefanie Schwinn und besonders bei Marie Reiß für die Unterstützung und für die Vorarbeiten mit dem Caspase Assay und der T-Zell-Kultur. Außerdem bei den MTAs des Hämato-Onkologischen Labors der Univ. Kinderklinik Würzburg Frau Ottensmeier (Westernblot), Frau Bünting (PCR) und Frau Petrasch (Cytospins), sowie beim übrigen Team.

Des Weiteren bedanke ich mich

- bei PD Dr.med. Henner Morbach für die theoretische Unterstützung bei der Realtime PCR,
- bei Prof. Dr. med. Roggendorf (Emeritus) und Frau PD Dr. med. Monoranu und dem Institut für Pathologie, Abt. Neuropathologie der Univ. Würzburg (MTAs Fr. M. Hartmann, Fr. P. Herud, Fr. H. Schraut) für das Bereitstellen der Paraffinschnitte der Glioblastompräparate und die Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistochemie
- bei der AG Dres. Vince und Hagemann der Klinik für Neurochirurgie der Univ. Würzburg für das Bereitstellen diverser Zelllinien
- und bei der AG Prof. Dr.med. Becker der Klinik für Dermatologie der Univ. Würzburg, ebenfalls für das Bereitstellen diverser Zelllinien sowie den Melanom-Paraffinschnitten.

Die *Eltern-Initiative Tumorkrankter Kinder Würzburg und Main-Tauber e.V.* hat mit der Finanzierung des Westernblot-Systems der Firma Invitrogen einen sehr wichtigen Beitrag für meine Arbeit geleistet. An dieser Stelle sage ich herzlichen Dank für diese Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Matthias Wölfl und Prof. Paul Gerhardt Schlegel für die Unterstützung, die hervorragende Betreuung und die Geduld ganz herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine liebe Ehefrau Benita.

Lebenslauf von Bernhard Klopsch

1981	Geburt in Starnberg, Deutschland
2001	Allgemeine Hochschulreife in Würzburg
2001-2004	Ausbildung als Medizinisch-Technischer-Laborassistent (MTLA) in Würzburg
01/2005 - 02/2006	MTLA am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe Polyomaviren (Dr. K. Dörries)
04/2006-04/2012	Studium Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2012-06/2015	Assistenzarzt Innere Medizin Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim
07/ 2015-08/2017	Assistenzarzt in der Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin Schmotz/Machann/Wind in Retzbach/Zellingen
09/2017-06/2018	Assistenzarzt in der Praxis für Dermatologie/Allergologie/Phlebologie und Venerologie Dr. Dunkel in Karlstadt
seit 01.10.2018	Praxis für Allgemeinmedizin Raab/Magers/Scheuerlein Arnstein
seit 11/2018	Facharzt für Allgemeinmedizin

Nachweis bereits veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten

Klopsch B, Schlegel PG, Hagemann C, Vince GH, Roggendorf W and Wölfel M
„Crossreactivity of Melan-A specific T-cells to Melan-A negative glioblastoma cells“.

6th International symposium on the clinical use of cellular products Cellular Therapy, March 2011 in Erlangen (Poster)

Klopsch B, Schwinn S, Bünting B, Reiß ML, Hagemann C, Vince GH, Monoranu C, Schlegel PG and Wölfel M

„Crossreactivity of Melan-A specific T-cells to Melan-A negative glioblastoma cells is associated to mycoplasma infection: a cautionary note“

3rd International conference on immunotherapy in pediatric oncology
2012 in Frankfurt (Poster)