

**PSCA als DNA-Vakzine zur Behandlung des duktaalen
Pankreaskarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Minh-Triet Nguyen
aus Saigon/ Vietnam

2012

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. I. Schmidt-Wolf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.05.2012

Aus der Medizinischen Klinik III, Universitätsklinikum der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. P. Brossart

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		8
<hr/>		
1.	Einleitung	10
<hr/>		
1.1	Klinik und Prognose des Pankreaskarzinoms	10
1.2	Tumorimmunologie	11
1.2.1	Tumorantigene	12
1.2.2	Interleukin-2	13
1.2.3	Immune-Escape Mechanismen von malignen Tumorzellen	14
1.3	Immuntherapie bei malignen Tumoren	15
1.3.1	Nackte DNA-Vakzine	16
1.4	PSCA (Prostate Stem Cell Antigen)	16
1.5	Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden	19
<hr/>		
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Puffer und Stammlösungen	20
2.1.4	Nährmedien	21
2.1.5	Geräte	21
2.1.6	Panc02 Zellen	22
2.1.7	Mäuse	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	23
2.2.1.2	Isolierungen von Plasmid-DNA	23
2.2.1.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	23
2.2.1.2.2	Midipräparation von Plasmid-DNA	23
2.2.1.3	Isolierungen von mRNA aus Zellen	24

2.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	24
2.2.3	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	25
2.2.4	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	25
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	26
2.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.6.1	Reverse Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion)	27
2.2.6.2	PCR an cDNA	27
2.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	28
2.2.8	Sequenzierung nach Sanger et al.	29
2.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.9.1	Herstellung kompetenter E.coli	29
2.2.9.2	Ligation von DNA mit Plasmid DNA	30
2.2.9.3	Hitze-Schock Transformation	30
2.2.10	Klonierung der PSCA-DNA	31
2.2.10.1	Synthese der PSCA-cDNA aus mRNA mit anschließender Amplifikation	31
2.2.10.2	TOPO Klonierung	32
2.2.11	Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
2.2.12	Zellernte	34
2.2.13	Prinzip Zellzählung	34
2.2.14	Lymphozytenseparation aus der Maus-Milz	34
2.2.15	Interferon-γ ELISPOT-Assay	35
2.2.16	Durchflusszytometrie (FACS)	37
2.2.16.1	Zellfärbung zum Oberflächenantigennachweis	38
2.2.16.2	Auswertung	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Klonierung der PSCA -DNA	40
3.1.1	PCR der PSCA-cDNA mit Testung des PCR-Produktes	40
3.1.2	Restriktionsenzymatische Spaltung von pCR2.1.-PSCA an verschiedenen Klonen	41
3.1.3	Sequenzierung der PSCA-pCR2.1 DNA	42

3.1.4	Klonierung von PSCA-DNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1	43
3.1.5	Testung der Orientierung von pcDNA3.1-PSCA	45
3.2	Untersuchung einer T-Lymphozyten-Aktivierung invitro	45
3.2.1	ELISPOT-Assay nach Stimulation mit ConA	45
3.2.2	ELISpot nach Vakzination	47
3.3	PSCA-Nachweis auf Zelloberfläche von Panc02	47
4.	Diskussion	51
4.1	PSCA als DNA-Vakzine	52
4.2	Insuffiziente Transfektionsrate	53
4.3	Inadäquate DNA-Menge und Zeitabstand bei der Vakzinierung	54
4.4	Fehlende invitro Restimulation mit Pankreas Lysat/ Costimulation mit IL-2/GM-CSF beim ELISPOT-Assay	55
4.5	Nackte DNA Vakzine vs. DC	56
4.6	Expression von PSCA auf Panc02-Zellen	57
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Danksagung	66
8.	Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zellen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
c-	Centi- (1×10^{-2})
°C	Grad Celsius
Con-A	Concanavalin A
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zellen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescent-activated-cell-sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
et al.	et alteres
g	Gramm
h	Stunde
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
i.m.	intramuskulär
kb	Kilobasen
l	Liter
m	Meter
m-	Milli (1×10^{-3})
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
μ -	Mikro (1×10^{-6})
OD	optische Dichte

P	Penicillin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	pH-Wert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSCA	Prostata Stammzellantigen
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Streptomycin
SEM	Standardfehler
s.c.	subkutan
TAA	Tumorassoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Tumorstromungsfaktor- β
U	Unit
V	Volt
Vol.	Volumen

1. Einleitung

1.1 Klinik und Prognose des Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine maligne Entartung duktaler Pankreasepithelien. Histologisch ist diese zu unterscheiden vom Karzinom der azinären Zellen und dem Papillenkarzinom. Das duktale Pankreaskarzinom macht einen Anteil von 72-92% aller Pankreastumoren aus (Chowdury et al., 2000). Es stellt in westlichen Ländern die fünfthäufigste Todesursache durch Malignome dar. Die Inzidenz liegt bei ca. 5-10/100000 Einwohner/Jahr und blieb in den letzten Jahren auf gleichbleibend hohem Niveau (Parkin et al., 1999). Dabei ist das relative Risiko an Pankreaskarzinom zu erkranken, bei Männern doppelt so hoch wie bei Frauen. Begünstigend wirken Nikotinabusus (2-3fach erhöhtes Risiko) (Howe et al., 1991) sowie ein hoher Anteil an Fleisch und tierischen Fetten in der Ernährung (La Vecchia et al., 1997). Weitere Risikofaktoren sind C2-Abusus (Silverman et al., 1995), Adipositas (Silverman et al., 1997) und eine chronische Pankreatitis (Lowenfels et al., 1997). Der Häufigkeitsgipfel liegt im 7. Lebensjahrzehnt. Mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5% und einer 1-Jahresüberlebensrate von 15% zeichnet sich das Pankreaskarzinom durch eine sehr schlechte Prognose aus. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befindet sich die Erkrankung fast immer bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, da sie zu Beginn mit lediglich unspezifischer Symptomatik wie z.B. gürtelförmigen Oberbauchschmerzen, Inappetenz oder Gewichtsverlust einhergeht und daher erst relativ spät erkannt wird.

Die chirurgische Therapie stellt mit der Whipple Operation derzeit die einzige kurative Behandlung im sehr frühen Anfangsstadium dar. Aus o.g. Gründen sind ca. 80% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits inoperabel, da der Tumor lokal stark fortgeschritten ist oder Fernmetastasen gebildet hat. Selbst bei operativ therapierten Patienten lässt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 10% erzielen.

Den Patienten mit nicht mehr resizierbarem Pankreastumor bleiben nur noch palliative Therapieverfahren. Die mittlere Überlebenszeit beträgt in dieser Gruppe 4-7 Monate. Sowohl Chemo-, als auch Strahlentherapie haben keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit und dienen lediglich der klinischen Verbesserung der Lebensqualität (QOL, quality-of-life). Da die heute zur Verfügung stehenden therapeutischen

Maßnahmen nur unzufriedenstellende Ergebnisse zeigen, ist es wichtig neue alternative Behandlungskonzepte, wie z.B. die Immuntherapie zu untersuchen.

1.2 Tumorimmunologie

Man weiß bereits seit längerem, dass auch Tumorzellen im Prinzip der Kontrolle durch Immunsystem unterliegen. Von entarteten Zellen werden auf ihrer Oberfläche speziellen Peptide, sog. tumorassoziierte Antigene (TAA), exprimiert. Aus frühen Experimenten geht hervor, dass die Immunantwort gegen Tumorzellen vor allem durch T-Lymphozyten vermittelt wird (Foley et al., 1953; Gross et al. 1949). T-Lymphozyten sind Bestandteil des adaptiven Immunsystems und spielen bei der Immunabwehr intrazellulärer Erreger eine entscheidende Rolle. Sie entstehen aus Stammzellen im Knochenmark und gelangen nach ihrer Reifung im Thymus ins Blut und schließlich zu den lymphatischen Organen. T-Lymphozyten weisen auf ihrer Oberfläche T-Lymphozytenrezeptoren (TCR) auf, die jeweils für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind. Es werden jedoch nur Antigene erkannt, welche an Proteine des Hauptverträglichkeitskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) auf Oberflächen kernhaltiger Körperzellen gebunden sind. Man unterscheidet MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle. Während MHC-Klasse-I Moleküle sich auf Körperzellen selbst befinden und endogene Antigenpeptide binden, befinden sich MHC-Klasse-II Moleküle ausschließlich auf Oberflächen professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) und präsentieren exogen aufgenommene Antigene. Zur initialen Aktivierung der naiven T-Lymphozyten ist zusätzlich ein zweites Signal durch costimulierende Moleküle, wie CD28 und CD4 bzw. CD8 notwendig (Campanelli et al., 2002; June et al., 1990). Hierzu bedarf es der APC: Makrophagen, B-Lymphozyten, und vor allem dendritische Zellen (DC). Diese Zellen sind in der Lage, neben der Antigenpräsentation an MHC-Molekülen, durch die Expression der CD28 Liganden B7.1 bzw. B7.2, den T-Lymphozyten gleichzeitig das costimulatorische Signal bereitzustellen (Bretscher et al., 1979; Lafferty et al., 1975) und so die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten zu stimulieren. Bleibt eine Costimulation aus, werden die T-Lymphozyten anerg. Anhand ihrer Co-Rezeptoren werden bei den T-Lymphozyten zwei Untergruppen differenziert. Zellen mit CD8-Rezeptoren bilden die Gruppe der

zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), welche in der Lage sind über ihren TCR spezifische MHC-I/Antigenkomplexe zu erkennen und die Zielzelle durch Freisetzung von Zytokinen wie Interferon- γ oder lytische Enzyme wie Perforine und Granzyme zu töten. Daneben existieren Lymphozyten mit CD4-Rezeptoren, welche als so genannte CD4+ T-Helferzellen (Th-Zellen) MHC-II/Antigen Komplexe erkennen und durch Ausschüttung von Zytokinen andere Effektorzellen des Immunsystems, wie z.B. B-Lymphozyten und Makrophagen, aktivieren. Einmal von APC aktiviert, benötigen reife T-Lymphozyten keine Co-Stimulation mehr und sind in der Lage Körperzellen mit TAA autonom anzugreifen.

1.2.1 Tumorantigene

Damit das Immunsystem Tumorzellen erkennen und von gesunden Körperzellen unterscheiden kann, müssen Tumorzellen an ihrer Oberfläche spezielle Merkmale aufweisen, welche als tumorassoziierte Antigene (TAA) bezeichnet werden. Diese sind in der Regel für jeden Tumor spezifisch und werden in Form von meist neun Aminosäuren langen Peptidfragmenten (Epitope) auf der Oberfläche der Zellen von MHC-I Molekülen präsentiert. T-Lymphozyten sind in der Lage, die mit MHC-I assoziierten Epitope, mit Hilfe ihres TCR zu erkennen und eine Immunantwort einzuleiten. Häufig sind es Proteine, welche normalerweise nur von Embryonalzellen exprimiert werden. Da während der frühen embryonalen Entwicklung das Immunsystem noch nicht voll ausgebildet ist, kann keine ausreichende Toleranzentwicklung gegen diese körpereigenen Antigene stattfinden, sodass diese immunogen bleiben (Finn, 1993; Slingluff et al., 1994). In anderen Fällen kommt es zur Überexpression eines endogenen Proteins, wodurch eine ausreichend hohe Konzentration an spezifischen Antigen-MHC-I-Komplexen resultiert, die für eine effektive Immunantwort notwendig ist. Durch Säurebehandlung ist es möglich, eine große Zahl von TAA zu isolieren. Zudem ist es gelungen, nach Erstellen einer cDNA-Sammlung sämtlicher Gene eines Tumors und anschließender Transfektion in MHC-I exprimierende Zellen, durch Analyse aktivierter antigenspezifischer T-Lymphozyten, das zum jeweiligen TCR komplementäre TAA indirekt zu ermitteln (Cox et al., 1994). Die in den letzten Jahren zunehmende

Identifizierung verschiedener TAA, stellt eine bedeutende Grundlage zur Entwicklung einer tumorspezifischen Immuntherapie dar.

1.2.2 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) gehört zu der Gruppe der Zytokine, welche als hormonähnliche Mediatoren zwischen Immunzellen eine große Bedeutung bei der Vermittlung der zytotoxischen Immunreaktion haben. Es ist als T-Lymphozyten-Wachstumsfaktor (T-cell growth factor, TCGF) in der Lage, die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten zu stimulieren. Zudem stimuliert IL-2 die Produktion anderer Zytokine (z.B. Interferone), steigert die Proliferation der B-Lymphozyten und induziert die Zytotoxizität aktivierter Makrophagen. IL-2 wird bei der Erkennung eines Peptid/MHC-Komplexes, bei gleichzeitiger Costimulation durch CD28, von den aktivierten T-Lymphozyten selbst gebildet (Fraser et al., 1991). Parallel wird die Expression hochaffiner IL-2 Rezeptoren induziert. Durch die Bindung von B7 an CD28 kommt es zu einer Stabilisierung der IL-2-mRNA sowie einer Steigerung der IL-2-mRNA Transkriptionsrate, in deren Folge die IL-2 Produktion um den Faktor 100 erhöht ist (Lindsten et al., 1998). Ohne Costimulation, synthetisieren die T-Lymphozyten zu wenig IL-2 um die eigene Proliferation zu stimulieren, was zu einer Inaktivierung der T-Lymphozyten (Anergie) führt (Mueller et al. 1995). Anerge T-Lymphozyten sind nicht mehr in der Lage IL-2 zu produzieren, sodass eine Proliferation zu Effektorzellen selbst dann ausbleibt, wenn die Antigenpräsentation durch eine APC erfolgt. Dieser Mechanismus erklärt teilweise die Toleranzentwicklung gegenüber körpereigenen Antigenen. Für die Expression des IL-2-Rezeptors ist eine einfache Aktivierung durch Erkennen eines an MHC gebundenen Antigens ausreichend. Dadurch kommt es zu einer Art Kettenreaktion, bei der IL-2 synthetisierende T-Lymphozyten die Proliferation benachbarter spezifischer T-Lymphozyten bewirken kann. IL-2 findet u.a. als Immunmodulator bei der Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms und des Melanoms im fortgeschrittenen Stadium Verwendung (Rosenberg et al., 1994).

1.2.3 Immune-Escape Mechanismen von malignen Tumorzellen

Obwohl, wie zuvor beschrieben, Tumorzellen grundsätzlich der Kontrolle durch das Immunsystem unterliegen, besitzen maligne Tumoren die charakteristische Eigenschaft, sich einem Angriff durch das Immunsystem entziehen zu können. Hierfür existieren mehrere verschiedene „Immune Escape“ Mechanismen. Bestimmte Tumorzellen, wie z.B. das Colonkarzinom oder das Prostatakarzinom, exprimieren keine MHC-I Moleküle (Bodmer et al., 1993). Andere Tumorzellen dagegen verlieren durch Kernmutationen die Fähigkeit das Antigen oder das immunogene Peptid zu exprimieren, welches durch ein MHC-I Molekül präsentiert werden kann. In beiden Fällen werden die Tumorzellen von zytotoxischen T-Lymphozyten nicht mehr erkannt. Die schwache Immunogenität von Tumorzellen ist außerdem durch die Tatsache bedingt, dass sie aus körpereigenen Zellen hervorgehen und somit TAA, im Gegensatz zu viralen oder bakteriellen Antigenen, eine sehr große Ähnlichkeit mit Antigenen normaler körpereigener Zellen haben, bzw. mit ihnen identisch sind und lediglich überexprimiert sind. Darum ist es dem Immunsystem häufig nicht möglich TAA zu erkennen. Einige Tumore sind in der Lage immunsuppressive Zytokine, wie den transformierenden Tumorwachstumsfaktor- β (TGF- β) zu produzieren, welche T-Lymphozyten direkt hemmen können (Tada et al., 1991). Wie bereits erwähnt, benötigen T-Lymphozyten zur vollen Aktivierung, neben der Erkennung des durch ein MHC-präsentierten Antigens, noch ein zusätzliches costimulatorisches Signal durch B7.1 bzw. B7.2. Da Tumorzellen jedoch nicht über solche Moleküle verfügen, ist folglich auch keine vollständige Aktivierung der T-Lymphozyten möglich (Stavely-O'Carroll et al., 1998; Townsend et al., 1993). Aus diesem Grunde ist eine Antigenpräsentation durch APC notwendig, welche jedoch eine erfolgreiche Aufnahme der Antigene voraussetzt. In jenen Fällen, bei denen eine Immunantwort beobachtet wurde, war diese fast ausschließlich durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten vermittelt. Gleichzeitig fehlt die Antigenpräsentation durch MHC-II Moleküle, weshalb auch keine Aktivierung der CD4+ T-Helferzellen und somit keine zusätzliche Rekrutierung immunologischer Effektorzellen und APC erfolgt.

1.3 Immuntherapie bei malignen Tumoren

Obwohl Tumorzellen prinzipiell der körpereigenen Immunabwehr unterliegen, gelingt es Tumoren häufig sich einer effizienten Immunantwort zu entziehen (Smyth et al. 2001). Ziel der Immuntherapie ist es, die schwache Immunogenität von Tumoren zu steigern und auf diese Weise eine gezielt gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion zu induzieren, sodass dieser wirkungsvoll bekämpft wird. Das Immunsystem bietet hierfür unterschiedliche Angriffspunkte. Ein unspezifischer Ansatz der Immuntherapie ist die Applikation von Zytokinen, z.B. IL-2, welche für die Aktivierung immunologischer Effektorzellen eine bedeutende Rolle spielen. Sie können daher eine verstärkte Immunreaktion induzieren. Eine weitere Methode ist die Injektion monoklonaler TAA-spezifische Antikörper. Analog zu Impfungen gegen virale und bakterielle Erreger, wird die Antikörpertherapie als passive Immunisierung bezeichnet. Rekombinante therapeutische Antikörper sind in der Tumorthherapie mittlerweile etabliert und finden u.a. klinische Anwendung beim Nierenzell- und Prostatakarzinom. Demgegenüber steht die aktive Immunisierung, bei der sog. Tumorstoffe verwendet werden. Es werden dem Organismus tumorspezifische Antigene angeboten, wodurch es zu einer Aktivierung des Immunsystems kommen soll. Dabei ist entscheidend, dass TAA von APC aufgenommen und effizient präsentiert werden. Hierzu sind in den letzten Jahren hauptsächlich drei verschiedene Verfahren entwickelt worden. Eine Strategie besteht darin DCs, die potentesten der APCs, mit antigenen Peptiden, Proteinen, Tumor-RNA oder Tumorlysaten zu pulsen, um so eine Steigerung der Antigenpräsentation auf den MHC-Molekülen zu erreichen, was wiederum eine effizientere Immunantwort induzieren soll (Nestle et al., 1998). Einige Arbeitsgruppen haben in Versuchen erfolgreich rekombinante Viren als Vehikel benutzt, um das Tumorstoffe in die Zellen einzuschleusen (Zhu et al., 2000). Eine weitere Methode besteht in der direkten Applikation von TAA kodierender DNA. Im Tiermodell ist diese Strategie bereits erfolgreich gegen virale und bakterielle Erreger wie HIV (Lecutis et al., 1997), Hepatitis-B (Etchart et al., 1997) und Malaria (Martin et al., 1999), als auch bei malignen Tumoren wie dem B-Zell Lymphom (Abe et al., 1996) getestet worden.

1.3.1 Nackte DNA-Vakzine

Eine Möglichkeit der Immuntherapie stellen DNA-Vakzine dar. Bei der DNA-Vakzinierung wird nackte, unbehüllte DNA intramuskulär oder subkutan injiziert. Diese besteht aus einem Plasmid mit einem potenten Promotor sowie dem gewünschten Gen, welches zusammen mit einem Start- und Stopkodon in den Vektor hinein kloniert wurde. Man verwendet hierbei Gene, welche identifizierte Tumorantigene kodieren (Donnelly et al., 1997). Die Plasmide werden in Bakterien vermehrt, gereinigt, in Flüssigkeit aufgenommen und können anschließend direkt appliziert werden. Es wird angenommen, dass nach der Injektion ein Teil der DNA von Muskelzellen oder dendritischen APC aufgenommen, in RNA transkribiert und in Proteine übersetzt wird. Nach Spaltung in Form von Oligoproteinen, wird sie als Protein-MHC-I-Komplex an die Zelloberfläche transportiert, wo schließlich zytotoxische T-Lymphozyten durch die endogen synthetisierten Antigene stimuliert werden (Chow et al., 1997). Dies sind jedoch lediglich Hypothesen - der genaue Mechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden. In Versuchen mit Mäusen konnte eine längerfristige Expression der injizierten Gene sowie die Induktion einer Immunantwort nachgewiesen werden.

1.4 PSCA (Prostate Stem Cell Antigen)

Das Prostata spezifische Antigen PSCA, welches erstmalig von Reiter et al. (1998) beschrieben wurde, ist ein 123 Aminosäuren enthaltendes Glykoprotein und gehört zur Thy1/Ly6 Familie der GPI verankerten Zelloberflächenantigene. Es weist eine 30% Übereinstimmung mit Stem Cell Antigen 2 (SCA2), einem Zelloberflächenmarker unreifer T-Lymphozyten, auf (Antica et al., 1997). PSCA wird vor allem von der Prostata und der Plazenta exprimiert. Beim Prostatakarzinom erfolgt in 88% der Fälle eine deutlich erhöhte PSCA-mRNA Expression. Durch Vergleich der Genexpression von Tumorgewebe und normalem Gewebe anhand der Sage-Datenbank (serial analysis of gene expression) konnte eine PSCA-mRNA Überexpression in 14 von 19 Pankreaskarzinomzelllinien, sowie PSCA Proteinüberexpression in 36 von 60 (60%) Pankreaskarzinomfällen, nachgewiesen werden (Argani et al., 2001). Die Untersuchung

muriner PSCA ergab eine 70% Homologie zu humanem PSCA. Die murine PSCA Expression erfolgt während der fetalen Entwicklung im urogenitalen Sinus, in der Haut, sowie in der obersten Schicht des Gastrointestinaltraktes. In adulten Mäusen wird PSCA ausschließlich in der Mukosa der Harnwege exprimiert. Eine erhöhte Expression wurde beim murinen Prostatakarzinommodell in neoplastischen Arealen beobachtet (Ross et al., 2001). In Versuchen ist es gelungen, mit monoklonalen anti-PSCA Antikörper, PSCA positive Zellen *in vitro* abzutöten (Ross et al., 2002) sowie im Tiermodell, eine Reduktion der Tumorprogression *in vivo* zu erzielen (Wente et al., 2005). PSCA bietet sich daher, trotz der Unterschiede im murinen und humanen Expressionsmuster, als Studienmodell bei der Erforschung von PSCA als einen potentiellen Angriffspunkt für eine Immuntherapie von Prostata- und Pankreaskarzinom an.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Eignung von nackter PSCA-DNA als Plasmid-Konstrukt für eine Immuntherapie beim Pankreaskarzinom im murinen Modell zu prüfen. Dazu soll primär untersucht werden, ob nach Vakzinierung mit PSCA-DNA eine Immunantwort *in vitro* induziert werden kann. Zunächst wird in einem ersten Schritt aus der Pankreastumorzelllinie Panc02 die Gesamt-RNA isoliert. Zur Gewinnung der für die Klonierung benötigten PSCA-mRNA, die neben der kodierenden Region zunächst auch die 5' und 3' nicht translatierte Region enthält, wird eine RT-PCR mit PSCA-spezifischen Primern für die Amplifikation der cDNA durchgeführt. Das so generierte PCR-Produkt wird in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert, durch Sequenzierung überprüft und mit der in der NCBI Datenbank veröffentlichten Sequenz verglichen. Anschließend wird die PSCA-cDNA in den Expressions-Vektor pcDNA3.1 umkloniert und mittels Transformation von *E.coli* amplifiziert. Es resultiert hieraus das fertige Plasmid-PSCA Konstrukt pcDNA3.1-PSCA.

Danach werden Mäuse mit einer definierten Menge der zuvor klonierten pcDNA3.1-PSCA-DNA *s.c.* vakziniert und nach einer Woche eine Resektion der Milz mit nachfolgender Lymphozytenseparation durchgeführt. Die Aktivierung zytotoxischer T-

Lymphozyten wird mittels Interferon- γ ELISPOT-Assay getestet, wobei die Interferon- γ Sekretion als Maßstab zur Quantifizierung einer spezifischen T-Lymphozyten Antwort nach Vakzinierung mit PSCA-DNA gewertet wird.

Als Voraussetzung für ein zukünftiges in vivo Experiment soll in einem zweiten Experiment die Frage beantwortet werden, ob PSCA auf der Zelloberfläche von Panc02-Zellen exprimiert wird. Es wird hierzu eine Durchflusszytometrie mit einem indirekt fluoreszenz-gekoppelten spezifischen anti-PSCA-AK durchgeführt. Die Auswertung erfolgt anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität. Bei positivem Antigen-Nachweis auf der Zelloberfläche böte sich die Verwendung von Panc02 für die Tumordinokulation, z.B. beim Tumor-Challenge, an.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Agarose	BMA
Biologisches Agar	Sigma Aldrich
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (Bovines Serum Albumin)	Peppo Tech
CaCl	Merck
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	KMF Laborchemie
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
Glycerol	Sigma Aldrich
HCl	Merck
Isopropanol	Sigma Aldrich
KH ₂ PO ₄	Merck
Methylenblau	Sigma Aldrich
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Trypanblau	Sigma Aldrich
Trypsin	Gibco
Tryptone	ICN Biomedicals
Trysma Base	Sigma Aldrich
Tween20	Serva

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson
Faltenfilter 150 mm	Schleicher & Schuell

Konisches Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson
Zählkammer	Neubauer
Pasteurpipetten aus Glas	Brand
Petrischale für Zellkultur	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen blau	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen gelb	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 2.0 ml	Eppendorf
Rundbodenröhrchen 14 ml	Becton Dickinson
Serologische Pipette 5 ml	Becton Dickinson
Serologische Pipette 10 ml	Becton Dickinson
Serologische Pipette 25 ml	Becton Dickinson
Spritze 1 ml	Braun
Spritze 2 ml	Braun
Zellkulturflasche	Becton Dickinson
Zellsieb 100 µm Nylon	Becton Dickinson
Zellsieb 50 µm Nylon	Becton Dickinson
Kanüle 0,5 x 25 mm	BD Microlance
96-Loch Nitrozelluloseplatte	Millipore

2.1.3 Puffer und Stammlösungen

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	130 mM NaCl 27 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
5xTBE (TRIS-Borat-EDTA)	445 mM Trisma Base 445 mM Borsäure 10 mM EDTA

6xLadepuffer

25%Glycerin

0.4% Bromphenolblau

1xTBE

2.1.4 Nährmedien

LB-Medium

Sigma Aldrich

RPMI-Medium

PAA

RPMI-Medium + 10% FCS + 1% P/S

PAA

2.1.5 Geräte

Analysenwaage BP 211 D

Sartorius

Brutschrank

Heraeus

Eismaschine

Ziegra

ELISPOT-Lesegerät

Carl Zeiss Jena

Durchflusszytometer FACSCanto II

Becton Dickinson

Gelkammer

Biorad

Inkubator

Heraeus

Lamina

Heraeus

Magnetrührer

Cenco

Mikroskop

Hund

PH-Meter pH 526

WTW

Photometer

Shimadzu

Pipettierhilfe

Hirschmann

Präzisionswaage

Mittler

Thermomixer 5436

Eppendorf

Vortex

Janke & Kunkel

Wasserbad Themed 5001

Memmut

Zählkammer

Neubauer

Zentrifuge	Braun
Zentrifuge	Sorvall
Zentrifuge	Heraeus

2.1.6 Panc02-Zellen

Die Panc02-Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Mazzoloni (Universität Navarra, Pamplona, Spanien) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde 1984 aus einem mit Methycholanthren induzierten Tumor bei einer weiblichen C57/6 Maus, zum Studium der Wirkung von Chemotherapeutika hergestellt. Es handelt sich um ein duktales Adenokarzinom des Pankreas, welches sich durch rasches lokales Wachstum nach s.c. Inokulation auszeichnet. Diese Zelllinie stellte die erste Möglichkeit dar, murine Pankreaskarzinomzellen zu transplantieren. Die Injektion von 10^3 Zellen in immunkompetente C57BL/6 Mäuse ist ausreichend für eine Tumorgenese und führt in der Regel infolge der Tumorprogression zum Tod der Versuchstiere innerhalb von wenigen Wochen.

2.1.7 Mäuse

Es wurden ausschließlich männliche 6-12 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse für die Experimente verwendet. Die Tiere wurden von Fa. CHARLES RIVER (Bad Sulzfeld) bezogen und in einer Pathogen-freien Umgebung gehalten. Alle Experimente wurden in Einklang mit den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Hierfür liegt eine Tierversuchsgenehmigung (Registrierungsnummer 50.203.2-BN 22) vor. Am Ende der Versuche wurden die Mäuse, nach tiefer Inhalationsnarkotisierung mit Isofluran durch kraniozervikale Hyperextension getötet und die Milz komplett reseziert.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.1.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) verwendet. Die Methode ist geeignet zur Gewinnung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA pro 5 ml Bakterienkultur. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 rpm) wurde das Bakterien-Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert und anschließend mit 250 µl Lysepuffer P2 gemischt, welcher die alkalische Lyse der Zellen bewirkt. Die Lyse-Reaktion wurde nach 5min durch Zugabe des Neutralisationspuffers N1 (350 µl) gestoppt. Proteine und genomische DNA welche dabei ausgefällt wurden, formten bei der darauf folgenden Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) ein kompaktes weißes Pellet. Der Überstand wurde zur Aufreinigung in eine aus Silika-Gel bestehende Säule (QIAprep Spin Column) überführt und 60 s zentrifugiert. Die Säule wurde mit 0.75 ml Puffer (PF) in einem weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer (EB).

2.2.1.2.2 Midipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Midiprep Kit (QIAGEN) verwendet. Die Methode basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher Säule. RNA und Proteine werden mit einem Puffer ausgewaschen, die Plasmid-DNA mit einem stark salzhaltigen Puffer eluiert und anschließend über eine Isopropanol-Präzipitation konzentriert und von Salz befreit. Das Protokoll ist geeignet zur Gewinnung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA. Alle verwendeten Puffer waren Bestandteil des Kits. Die am Vortag angeimpfte Übernachtskultur (100 ml Selektiv-

Medium) wurde zunächst 15 min (6000 rpm, 4 °C) zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Unter Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert. Die Lyse-Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 gestoppt und die Lösung einer Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C) über 30 min unterzogen. Der Überstand wurde in die Anionenaustauschersäule überführt, welche mit 10 ml Puffer QC gewaschen wurde. Die danach mit 5 ml Puffer QF eluierte Plasmid-DNA wurde mit 3.5 ml Isopropanol gemischt und 30 min zentrifugiert (1500 rpm, 4 °C), um eine Präzipitation zu erreichen. Zuletzt wurde das Pellet zur Ausfällung von Salzen mit 2 ml Ethanol (70%) gewaschen und nach kurzem Trocknen in einer adäquaten Menge H₂O resuspendiert.

2.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Es wurden 1×10^7 PANC 02 Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 3000 rpm) pelletiert. Die Zellen wurden nach Aspiration des Überstandes durch Zugabe von RLT Puffer lysiert und das Lysat zur Homogenisierung in einer QIAshredder spin Säule 2 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Zur Förderung der selektiven Bindung an die RNeasy Membran wurde dem Lysat 1 Volumen Ethanol (70%) hinzu gegeben. Anschließend wurde das Lysat auf eine RNeasy Säule überführt und 15 s bei 15.000 rpm zentrifugiert. In einem ersten Waschschrift wurde 700 µl RW1 Puffer zugegeben und die Probe 15 s bei 15.000 rpm zentrifugiert. In zwei weiteren Waschschriften wurden nach Zugabe von jeweils 500 µl RPE Puffer 15 s bzw. 2 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die an der Membran gebundene RNA wurde schließlich durch Zugabe von 50 µl RNase freies Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei 20°C gelagert.

2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde im Photometer bestimmt. Das Absorptionsmaximum beträgt für Nukleinsäure 260 nm (A₂₆₀) und für Proteine 280 nm (A₂₈₀). Eine

Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung ergibt sich aus dem Quotient aus A260 und A280 welcher zwischen 1,7 – 1,9 betragen sollte.

2.2.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonuklease-Puffer der Fa. ROCHE verwendet. In der Regel wurden Reaktionsansätze mit einem Volumen von 10 µl hergestellt. Pro 1 µg DNA wurden 1 U Enzym benötigt. Übertraf der relative Anteil der verwendeten Enzyme zum Gesamtvolumen 10%, wurde das Volumen entsprechend angepasst. Bei Inkubation im Thermomixer bei 37° C betrug die Reaktionszeit 1 h bei 1 U Enzym pro 1µg DNA. Plasmid-DNA benötigt 5 U Enzym pro 1µg DNA. Bei Vektoren war nach der restriktionsenzymatischen Spaltung der DNA zusätzlich eine Dephosphorylierung erforderlich, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation bei Klonierungsversuchen zu reduzieren. Sie erfolgte durch Gabe von 1 µl alkalischer Phosphatase zu dem Reaktionsansatz und 15 min Inkubation bei 37 °C.

Beispiel für einen typischen Reaktionsansatz:

DNA	1 µg
EcoRI (1 U)	1 µl
Puffer HI	2,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

2.2.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Je nach Größe des aufzutrennenden Fragments, werden Agarosegele von 0.5-1.5% verwendet, wobei 1 x TBE-Puffer als Elektrophoresepuffer dient. Die nach Erhitzung in TBE-Puffer gelöste Agarose, wurde in eine Gelkammer gegossen, in die ein

Kamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde die Form mitsamt dem Gel in eine mit 1 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die nach dem Entfernen des Kammes entstandenen Taschen wurden mit den zu analysierenden DNA-Proben beladen, welche zuvor mit Ladebuffer (Bromphenolblau + Glycerin) versetzt wurden. Als Molekulargewichtsstandard wurde zusätzlich ein Marker (Roche) aufgetragen. Legte man nun eine Spannung (100 V) an, wanderte die DNA wegen ihrer negativen Ladung mit der ihrer Größe entsprechenden Geschwindigkeit in Richtung der Anode. Nach 1 h Laufzeit wurde das Gel zur Färbung ca. 10 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente mit einem UV-Transilluminator bei 300 nm sichtbar gemacht werden. Die Bestimmung der DNA-Fragmentgröße erfolgte anhand der Markersonde.

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) verwendet. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell möglichst knapp aus dem Agarosegel geschnitten und in einem Reaktionsgefäß gewogen. 3 Vol. Puffer QG wurden dazugegeben und der Ansatz für 10 min bei 50 °C unter gelegentlichem Mischen inkubiert bis sich das Gel gelöst hat. Nach Zugabe von 1 Vol. Isopropanol wurde die Probe in eine, mit einer Silika-Gel Membran ausgestattete, Säule (QIAquick Column) überführt und 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde dann unter Zugabe von 0.75 ml PE Puffer gewaschen. Die von der Silika-Gel Membran absorbierte DNA wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl H₂O eluiert.

2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al.,1985)

2.2.6.1 Reverse Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion) (Kogan et al., 1987)

Die Reverse PCR ermöglicht mit Hilfe der Reversen Transkriptase die Umschreibung von mRNA in cDNA. Unter Verwendung des Superscript II RT Kit (INVITROGEN) wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

RNA	5 µg
dNTP (10 mM)	1 µl
Oligo (dt) (500 µg/ml)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65 °C erhitzt und im Anschluss 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Reverse Transkriptase-Puffer (10x), 4 µl MgCl₂, 2 µl DTT sowie 1 µl RNase Inhibitor wurde die Probe für 2 min bei 42 °C erwärmt. Danach wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz zuerst für 50 min bei 42 °C, dann zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zusatz von 1 µl RNase H wurde zur Degradation der RNA der Ansatz 20 min bei 37 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

2.2.6.2 PCR an cDNA

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt hergestellt:

cDNA	50 ng
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
dNTP (je 2 mM)	5 µl
Taq-Puffer (10x)	5 µl

Taq-Polymerase (10U)	1 µl
MgCl ₂ (25mMol)	4 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde der Reaktionsansatz zur vollständigen Denaturierung der DNA 2 min bei 94 °C inkubiert. Die PCR wurde für 30 Zyklen in einem Thermozykler unter folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	94 °C, 30 s
Annealing	62 °C, 1 min
Elongation	72 °C, 1 min

Zur Auffüllung unvollständiger PCR-Produkte wurde der PCR-Ansatz zum Schluss für 7 min auf 72 °C erwärmt und anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Sequenzen der verwendeten Primer (THERMO SCIENTIFIC):

PSCA 3: 5'-AAGCTTGACCATGAAGACAGTCTTCTTTCTCC- 3'
3'-TTCGAACTGGTACTTCTGTCAGAAGAAAGAGG- 5'

PSCA 4: 5'-GCTCCAGGATAACAACAGTCGTGTAGGATCC- 3'
3'-CGAGGTCCTATGTTGTCAGCACATCCTAGG- 5'

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Fragmente von 100 bp bis 10 kb werden mit dieser Methode von Primern, Nukleotiden und Polymerase befreit. Das PCR-Produkt wurde mit Puffer PB im Verhältnis 1:5 auf eine mit einer Silika-Gel Membran ausgestatteten Säule (QIAquick spin column) gegeben und anschließend zentrifugiert (60 s). Die Säule wurde dann mit 0.75 ml Puffer PE gewaschen. Die an die Silika-Gel Membran gebundene DNA wurde durch Zugabe von 50 µl H₂O eluiert.

2.2.8 Sequenzierung nach Sanger et al.

Zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt zur Fa. GATC BIOTECH AG (Konstanz) geschickt. Sie erfolgte nach der Methode von Sanger et al. (1979). Es kommen dabei nichtradioaktiv markierte Didesoxynukleotide (ddNTP) zum Einsatz welche bei der PCR einen Kettenabbruch herbeiführen, sobald sie an Stelle der Desoxynukleotide komplementär dem einsträngigen DNA-Fragment eingebaut werden. Der Grund dafür ist die fehlende 3'OH-Gruppe der ddNTPs die für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids notwendig wäre. Dadurch bilden sich Fragmente unterschiedlicher Länge die mittels der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Durch die unterschiedliche radioaktive Markierung jedes der vier verschiedenen ddNTPs lassen sich deren Positionen anhand der jeweiligen Fragmentgröße eindeutig zuordnen. Es werden stets vier Ansätze mit jeweils verschiedenen ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) verwendet, sodass man anschließend aus dem Vergleich der Bandenmuster die komplementäre Basensequenz und damit die Sequenz des untersuchten DNA-Fragments ableiten kann.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Herstellung kompetenter E.coli

Durch Behandlung der Zelloberfläche mit CaCl_2 soll die Kompetenz der Bakterien, freie DNA aufzunehmen, künstlich erhöht werden. Es wurde zunächst eine Einzelkolonie gepickt, in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 4 ml dieser Vorkultur wurden dann 400 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln (300 rpm) bei 37 °C solange inkubiert, bis die Messung der optischen Dichte OD 600 nach ca. 3 h den Wert 0.6 (= 10^8 Zellen/ μl) ergab. Nun befanden sich die Zellen in ihrer optimalen Wachstumsphase. Nach 10 min Kühlung auf Eis wurde die Bakteriensuspension bei 3000 rpm (=2500 g) und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml CaCl_2 (0.1 M) resuspendiert. Nach Zugabe von 880 μl Glycerin (=10%) wurden die Bakterien in

100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.9.2 Ligation von DNA mit Plasmid DNA

Zur Ligation eines DNA-Fragments und einer Vektor-DNA wurde T4-DNA Ligase (INVITROGEN) mit dem entsprechenden Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt hergestellt.

DNA-Fragment	10 µl
Vektor-DNA	1 µl
T4-DNA Ligase	1 µl
Puffer 10x	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde für 24 h bei 16 °C inkubiert.

2.2.9.3 Hitze-Schock Transformation

Die Transformation von E.coli DH5α erfolgte nach der Hitze-Schock Methode (Hanahan et al., 1985). Es wurden 1-10 ng DNA aus der Ligationsreaktion zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 45 s im Wasserbad bei 42 °C erhitzt und dann weitere 2 min auf Eis gekühlt. Es wurde dann 1 ml vorgewärmtes LB-Medium dazugegeben und die Bakterien bei 800 rpm und 37 °C für 1 h geschüttelt. Anschließend wurden 100-200 µl der Bakterienlösung auf eine Selektivagarplatte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.10 Klonierung der PSCA-DNA

2.2.10.1 Synthese der PSCA-cDNA aus mRNA mit anschließender Amplifikation

Die Sequenz der kompletten PSCA-mRNA (Yang et al., 2001) der Maus wurde aus der NCBI Datenbank (AF 319173) ermittelt (Abb.1). Die PSCA-mRNA enthält 864 bp, wobei sich das Startcodon ATG an Position +5 und das Stopkodon TAG an Position +376 befindet. Die Generierung der PSCA-cDNA erfolgte mittels RT-PCR an Gesamt-RNA aus Panc02-Zellen (murines Adenokarzinom des Pankreas). Dabei wurde für die cDNA Synthese ein Oligo(dt)-Primer verwendet.

Für die Amplifikation der cDNA mit 5´und 3´nicht translaterter Region in der anschließenden PCR wurden die beiden sequenzspezifischen Primer PSCA 3 und PSCA 4 ausgewählt. Zur weiteren Subklonierung der DNA wurden dem Primer PSCA 3 am 5´-Ende eine HindIII-Schnittstelle (5´AAGCTT), dem Primer PSCA 4 eine BamHI-Schnittstelle (5´GGATCC) angehängt (Abb. 1).

5´ AAGCTT PSCA 3 →
gaccatgaag acagtcttct ttctcctgct ggccacctac ttagccctgc atccaggtgc 61
tgctctgcag tgctattcat gcacagcaca gatgaacaac agagactgtc tgaatgtaca 121
gaactgcagc ctggaccagc acagttgctt tacatcgcgc atccgggcca ttggactcgt 181
gacagttatc agtaagggtc gcagctcaca gtgtgaggat gactcggaga actactattt 241
gggcaagaag aacatcacgt gctgctactc tgacctgtgc aatgtcaacg gggcccacac 301
cctgaagcca cccaccacc tggggctgct gaccgtgctc tgcagcctgt tgctgtgggg 361
ctccagccgt ctgtaggctc tgggagagcc ctaccatagc ccgattgtga agggatgagc 421
tgcacctcca cccccaccc cacacaggag caaccaccac caccacttt aactcccaca 481
tagggctggc ctccctcacc ccaaccctt ccaccagggc ctttctcct ctctgctgct 541
attccacag ctagcgcttg gccacccca ccccatcagc actgtgccct accaagtctt 601
gctcagatgc ttcagctgaa ggactccctc gccaccctac tctccagggc ctgagccagt 661

```
gtgcacagca gcactggggg aggggcctgg tagaggctga gatgggatgg actgagcaga 721
aatggagctg ggaggtgggt gtgaggcacc aggagtccca ggagatgatg cctgggtggg 781
gacatgctct ccgtttatag agctccagga tacaacagtc gtgtaataaa tacctgctga 841
gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa PSCA 4 GG ATCC 3`
```

Abb. 1: PCR von PSCA-cDNA. Für die PCR wurde der Primer PSCA3 mit einer HindIII-Schnittstelle (AAGCTT) am 5'Ende, sowie der Primer PSCA4 mit einer BamHI-Schnittstelle (GGATCC) am 3'Ende verwendet. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 839 bp.
PCR= Polymerase Chain Reaction, PSCA= Prostate Stem Cell Antigen

Als PCR-Endprodukt erhält man die PSCA-DNA mit einer Länge von 839 bp. Eine Nullkontrolle mit H₂O anstelle von cDNA diente dem Ausschluss von Kontamination des PCR-Reaktionsansatzes. Um eine Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, wurde das identische PCR-Protokoll direkt an der RNA ohne vorherige cDNA-Synthese durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese wurden die Proben anschließend nach Größe aufgetrennt.

2.2.10.2 TOPO Klonierung der PSCA-DNA

Nach Identifikation des PSCA-Fragmentes, wurde die DNA aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Zur Klonierung des PCR Produkts wurde das TOPO TA Cloning Kit (INVITROGEN) verwendet. Die für die PCR Reaktion verwendete Taq-Polymerase hat über ihre Transferase Aktivität jeweils an das 3'-Ende der DNA ein 3'A-Überhang angefügt. Der bereits linearisierte pCR2.1 Topo-Vektor besitzt seinerseits einen 3'T-Überhang sowie eine kovalent gebundene Topoisomerase, welche eine direkte Ligation mit dem PCR-Produkt ermöglicht (Abb. 2). Dazu wurde zu 1 µl pCR2.1-TOPO Vektor 1 µl PCR-Produkt gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Transformation der mitgelieferten kompetenten One-Shot E.coli Zellen 21 erfolgte nach der Hitzeschock Methode. Zu den Zellen wurden 2 µl des Ligationsansatzes gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C herbeigeführt und im sofortigen Anschluss darauf der Reaktionsansatz wieder auf Eis

gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt und danach auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen welche über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurden.

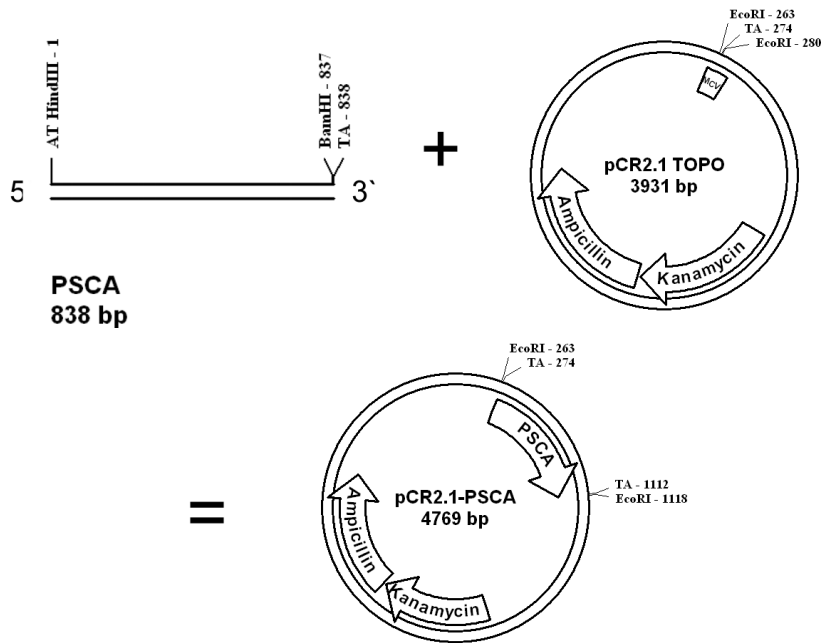


Abb. 2: Klonierung von PSCA in pCR21 TOPO Vektor. Durch die für die PCR verwendete Taq-Polymerase wurde am 3'Ende des DNA-Fragmentes ein 3'A-Überhang angefügt. Dieser ermöglicht nach Linearisierung die Ligation mit dem 3'T-Überhang des Topo-Vektors. Es entstand so der 4769 bp große pCR2.1-PSCA-Vektor.

PSCA= Prostate Stem Cell Antigen, PCR= Polymerase Chain Reaction, Taq= *Thermus aquaticus*

2.2.11 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Panc02-Zellen erfolgte in 12 ml RPMI Medium (PAA), mit 10% FCS (GIBCO) und 1% Penicillin/ Streptomycin in einer 75 cm² Zellkulturflasche, welche über mehrere Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde. Die Zellen sind stark adhärent und haften an der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche.

2.2.12 Zellernte

Zum Ernten wurden die adhärennten Zellen nach Verwerfen des Mediums, zunächst durch Hinzugabe von 1,5 ml Trypsin von der Plastikoberfläche der Kulturflaschen gelöst. Alternativ wurde ein steriler Gummi-Schabers (Cell-Scraper) verwendet. Nach 2 min Inkubation bei 37 °C und Suspension in 10 ml RPMI, wurden die Zellen in ein Zentrifugalröhrchen überführt und 10 min bei 800 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml RPMI resuspendiert. Es folgt eine Zellzählung mit 10 µl Zellsuspension und 90 µl Trypanblau nach Protokoll.

2.2.13 Prinzip Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension wurden 20µl Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau 0,5% 1:10 verdünnt. Nach 5 min Inkubation unter Raumtemperatur, wurde ein Aliquot unter ein Deckplättchen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Durch kapilläre Saugkräfte füllt sich die Zählkammer. Man kann anschließend im Lichtmikroskop die Zellen in den vier Eckquadraten (4 mm²) auszählen. Ein Quadrant enthält 0,1 µl Zellsuspension. Die Zellzahlen lassen sich nach folgender Formel ermitteln: Zellzahl im Quadrant × Verdünnung × 10⁴ = Zellzahl/ ml

2.2.14 Lymphozytenseparation aus der Maus-Milz

Die Methode ist geeignet zur Gewinnung von 4-5 x 10⁷ Zellen pro Maus-Milz. Nach der Präparation wurde die Milz zuerst in RPMI-Medium (5 ml) überführt. Dann wurde das Organ in einem Zellsieb (100 µm Nylon) mit dem Stempel einer 5 ml Spritze zerkleinert. Die Suspension wurde nach Abspülen von Stempel und Sieb in einem Röhrchen gesammelt. Nach einem zweiten Sieben durch ein engmaschigeres Zellsieb (50 µm) wurden die Zellen pelletiert (8 min bei 800 rpm). Das Zellpellet wurde in 10 ml Erylyse-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation

(8 min bei 800 rpm) wurde das Pellet zur Zellzählung in 1 ml PBS resuspendiert. Die separierten Milzellen wurden anschließend direkt in einem Interferon- γ ELISPOT Assay eingesetzt.

2.15 Interferon- γ ELISPOT-Assay

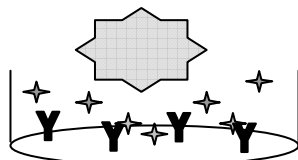
Der Interferon- γ ELISPOT-Assay (Enzyme Linked Immuno Spot) basiert auf der antikörpervermittelten Zytokin-Detektion und dient dem indirekten Nachweis spezifischer T-Lymphozyten (Abb. 3). Die Methode ist geeignet T-Lymphozytenantworten, selbst bei Häufigkeit von unter 1 in 100.000 Fällen darzustellen (Herr et al. 1996; Scheibenbogen et al. 1997).

Tag 1



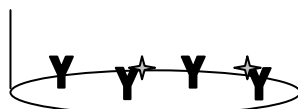
Beschichtung des Wells mit Captive AK

Tag 2



Inkubation von Interferon- γ exprimierenden Zellen

Tag 4



Entfernen der Zellen durch Waschen



Zugabe von Detection AK

Tag 5

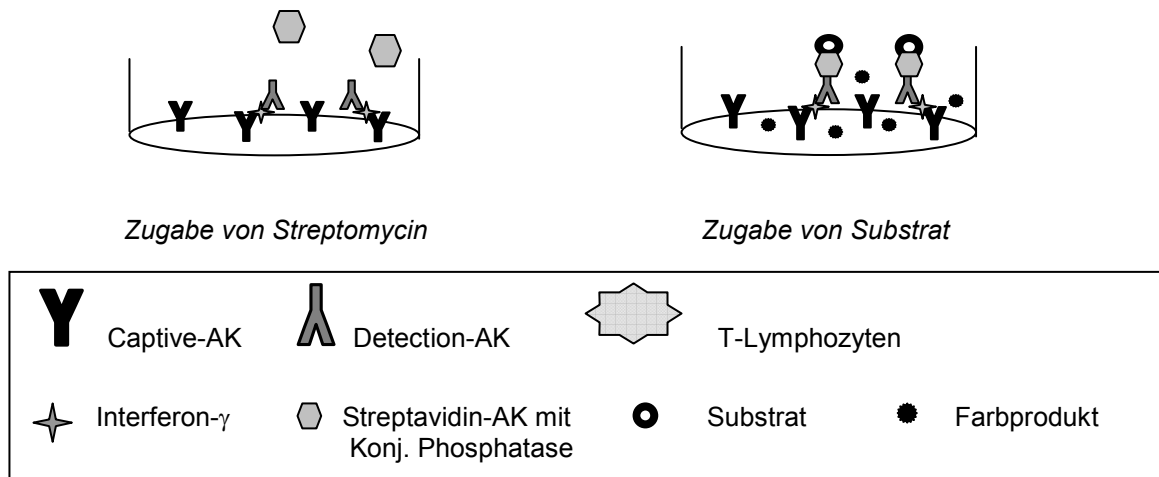


Abb. 3: Interferon- γ ELISPOT-Assay. Zunächst erfolgt die Beschichtung der Wells mit zytokinspezifischen Captive-AK. Am Folgetag werden die zu untersuchenden, mutmaßlich Interferon- γ produzierenden, Zellen inkubiert und nach eintägiger Inkubation durch Waschen entfernt. Das von den Zellen sezernierte Interferon- γ wird an den Erstantikörper gebunden. Nach Inkubation mit Detection-AK über Nacht, wird das mit Phosphatase konjugierte Streptavidin hinzugegeben, das an den Zweitantikörper bindet. Gibt man das Farbsubstrat hinzu, wird dieses durch enzymatische Spaltung in ein Farbprodukt umgewandelt. Die so entstandenen Spots können nun ausgezählt werden. AK= Antikörper, ELISPOT= Enzyme Linked Immuno Spot

96-Loch Nitrozelluloseplatten wurden mit 1:60 verdünnten Capture Antibody (100 μ l pro Well) gefüllt und anschließend bei 2-8 °C über Nacht inkubiert. Nach fünfmaligen Waschen mit jeweils 200 μ l Waschpuffer (PBS) pro Well wurde 200 μ l Blocking Buffer (PBS + 5% BSA) dazugegeben und die Platten 90 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte wieder viermaliges Waschen mit 200 μ l PBS. Anschließend wurden die Wells mit 1×10^5 bzw. 2×10^5 Lymphozyten (100 μ l) gefüllt und die Platten 48 h im Brutschrank (37 °C bei 5% CO₂) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 200 μ l PBS-Tween 20 (0,05%) wurden pro Well 100 μ l Detektions-AK in PBS-FCS (0,5%) zugegeben und über Nacht bei 2-8 °C inkubiert. Die Platte wurde danach dreifach mit 200 μ l Waschpuffer (200 μ l pro Well PBS + 0,05% Tween 20) gewaschen. 100 μ l Streptavidin-AK (1:60) in PBS-FCS (0,5%) (BIO-RAD) wurden in jedes Well gegeben und 1,5 h im Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurde noch dreimal mit 200 μ l PBS-Tween 20 (0,05%) gewaschen und anschließend 200 μ l pro Well Farbsubstrat (BCIP/NBT)

zugegeben. Nach 10-30 min Inkubation im Schüttler bei Raumtemperatur in dunkler Umgebung wurde die Reaktion unter fließendem Wasser gestoppt. Die Zählung der Spots erfolgte unter einem Binokular-Mikroskop oder automatisch mit einem ELISPOT Lesegerät. Dabei entspricht ein Spot in der Regel jeweils einer Interferon- γ produzierenden Zelle (Abb. 4).

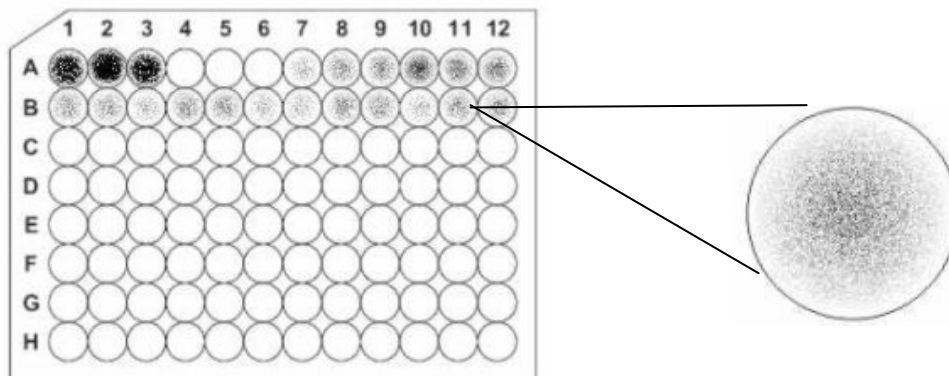


Abb. 4: Beispiel für eine 96-Loch Nitrozelluloseplatte nach ELISPOT-Assay. Die Spots können mit einem Mikroskop oder automatisch mit einem ELISPOT Lesegerät detektiert und gezählt werden. Die Anzahl der detektierten Spots erlaubt Rückschluss auf die Aktivität der Immunzellen. Ein Spot entspricht einer Interferon- γ produzierenden Zelle.
ELISPOT= Enzyme Linked Immuno Spot

2.2.16 Durchflusszytometrie (Fluorescent-activated-cell-sorting "FACS")

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse (Herzenberger et al. 1976) ist eine optische Messmethode, die eine Charakterisierung von Zellen nach Form, Größe und Färbung erlaubt. Dabei werden Zellen nach Stimulation mit einem Laserstrahl anhand unterschiedlicher Streulichteigenschaften bzw. Fluoreszenzintensität differenziert. Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von Antigenen auf Zelloberflächen verwendet.

Hierzu ist eine Färbung der Antigene mit fluoreszenz-markierten Antikörpern notwendig. Die Zellsuspension wird anschließend im Durchflusszytometer (BECTON DICKINSON) in der Probenkammer über eine speziell konstruierte Meßküvette, nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung, in Einzellzellen getrennt und nacheinander, in einem

dünnen Flüssigkeitsstrahl, an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Sensoren detektieren das dabei entstehende Streulicht, welches nachfolgend mit Hilfe von Photovervielfältiger (PMT, Photomultiplier Tubes) in ein elektronisches Signal umgewandelt wird. Dabei ist die Vorwärtsstreuung (FSC-Signal „Forward-Scatter“) von der Zellgröße, die Seitwärtsstreuung (SSC-Signal „Side-Scatter“) von der Morphologie abhängig. Die Fluorochrome der markierten Antikörper absorbieren das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht mit einer für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge. Dieses wird parallel zu der Streulichtkomponente vom Detektor registriert. Dabei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Zelloberfläche. So können anhand des für den Farbstoff spezifischen Absorptionsspektrums die entsprechenden Antikörper sicher identifiziert werden.

2.2.16.1 Zellfärbung

Als Farbstoff zur Markierung der Oberflächenantigene, wurde FITC (Fluoresceinisothiocyanat) verwendet. Aus Mangel an verfügbaren FITC-gekoppelten anti-PSCA-AK, erfolgte die Zellfärbung in zwei Schritten. Zuerst wurden jeweils 1×10^5 - 1×10^6 Zellen mit einem anti-PSCA-rabbit-AK (SANTA CRUZ) im Verhältnis 1:50 über 45 min, abgedunkelt bei 0 °C auf Eis bzw. bei Raumtemperatur, inkubiert. Nach Waschen mit 500 µl PBS/BSA bei 800 rpm über 7 min, erfolgte in einem zweiten Schritt die Inkubation mit einem goat-anti-rabbit-FITC-AK (EPCAM) im Verhältnis 1:100 entsprechend der ersten Färbung. Nach erneutem Waschvorgang, wurden die Zellen in 300 µl PBS/BSA resuspendiert und schließlich der Fluoreszenzmessung zugeführt.

2.2.16.2 Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden durch die Software FACSDiva (BECTON DICKINSON) grafisch, in Form eines Punktwolkendiagramms bzw. Histogramms dargestellt. Für die statistische Auswertung der Daten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Da es bei der

hiesigen Untersuchung lediglich um den Expression von Oberflächenantigenen ging und keine Korrelation notwendig war, reichte die Einparameterdarstellung in Form eines Histogramms aus. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl, ergibt in der Regel eine Normalverteilung. Als statistische Größe liefert die Software den Mean-Wert, welcher jener Position entspricht, bei der jeweils 50% der Werteverteilung darunter bzw. darüber liegen. Durch Eliminierung von Ausreißern, erlaubt der Mean-Wert eine Einordnung des Signalwertes der Hauptpopulation.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der PSCA-DNA

3.1.1 PCR der PSCA-cDNA mit Testung des PCR-Produktes

Aus der nach o.g. Protokoll durchgeführten PCR der PSCA-cDNA entstand die PSCA-DNA mit einer Länge von 839 bp. Die Gelelektrophorese des PCR-Produktes (Probe 1, Abb. 5), zusammen mit der Nullkontrolle mit H₂O anstelle von cDNA (Probe 2, Abb. 5), sowie des Produktes aus der PCR direkt an der mRNA ohne vorherige cDNA-Synthese (Probe 3, Abb. 5), führte zu dem erwarteten Ergebnis. Die Probe 1 entsprach mit einer Länge von ca. 800 bp ungefähr der Länge der PSCA-DNA, während Proben 2 und 3 negativ waren.

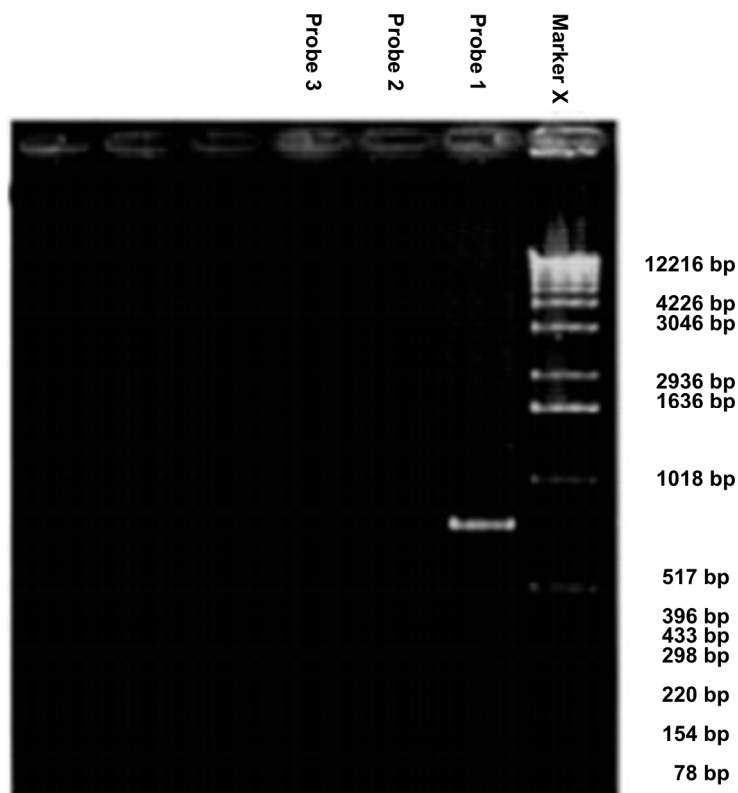


Abb. 5: : Gel-Foto unter UV-Licht von PCR-Produkt nach Amplifikation der PSCA-cDNA. Die Probe Nr. 1 entspricht mit einer Länge ca. 800 bp der Länge des PCR-Produktes. Die Proben Nr. 2 und 3 mit der Nullkontrolle bzw. der PCR ohne Primer, waren negativ.

PSCA= Prostate Stem Cell Antigen, cDNA= copy DNA, PCR= Polymerase Chain Reaction

3.1.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von pCR2.1-PSCA an verschiedenen Klonen

Es folgte anschließend die Klonierung in den Topo-Vektor pCR2.1 nach o.g. Protokoll. Da es hierbei zu einer Vektor-Selbstligation kommen kann, musste eine sichere Differenzierung der Plasmide mit und ohne DNA erfolgen. Nach einer Minipräparation (QIAGEN) der pCR2.1-PSCA, wurden verschiedene Klone gepickt und einer restriktionsenzymatischen Spaltung mit EcoRI zugeführt. Da die PSCA-DNA enthaltenen Vektoren, im Gegensatz zu den relegierten Leervektoren, zwei Restriktionsstellen besitzen, können diese in der anschließenden Gelelektrophorese (Abb. 6) identifiziert werden. Auf dem Gelfoto waren bei den Klonen Nr. 2 und Nr. 3 jeweils zwei Banden zu erkennen, wobei die kleinere Bande mit einer Länge von 800-900 bp dem PCR-Produkt, die größere Bande mit einer Länge von 3931 bp der Vektorsonde entsprach. Die restlichen Klone waren relegierte Vektor-DNA ohne Insert.

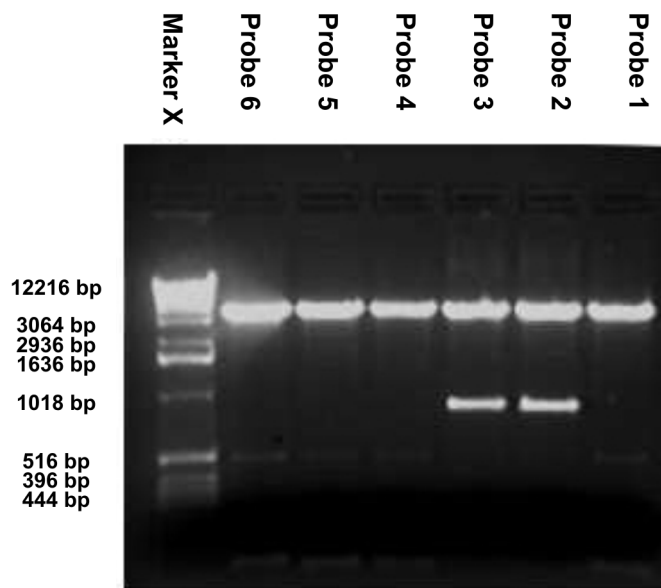
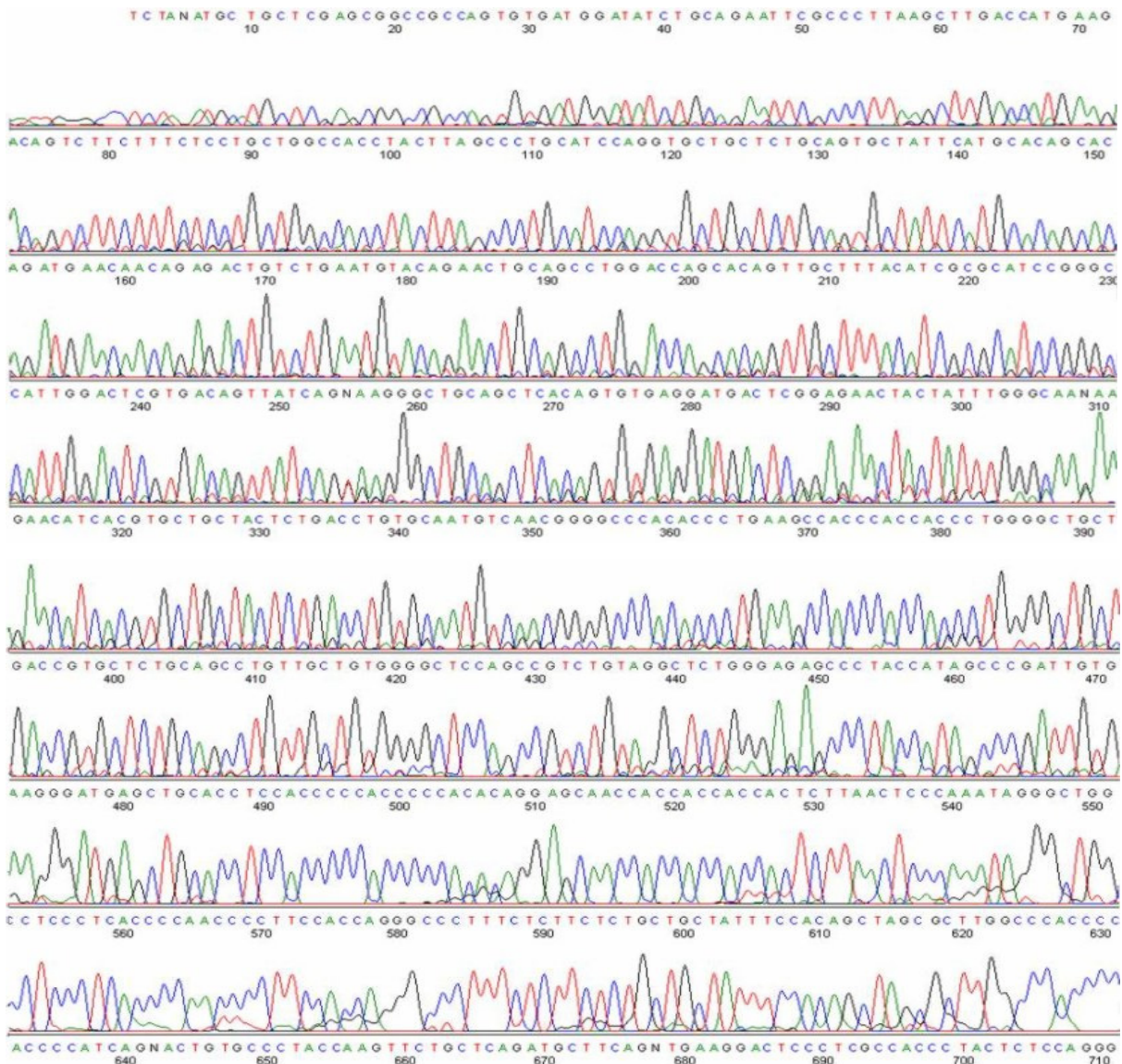


Abb. 6: Gelfoto unter UV-Licht nach restriktionsenzymatischer Spaltung von pCR2.1-PSCA mit EcoRI nach Minipräparation. Als Längenstandard diente der Marker X (ROCHE). Die kleine Banden bei den Klonen Nr.2 und Nr.3 entsprechen mit ihrer Länge von 800-900 bp der Länge des PCR-Produkts (839 bp).

PCR= Polymerase Chain Reaction

3.1.3 Sequenzierung der pCR2.1-PSCA DNA

Zur endgültigen Kontrolle der erfolgreichen Klonierung, wurde eine Sequenzierung der Plasmid- DNA von Klon Nr. 2 durch die Fa. GATC-BIOTECH veranlasst. Von der Bakterienkultur mit dem zu sequenzierenden Plasmid wurde ein Glycerinstock angelegt, indem nach Zugabe von 200 µl Glycerin zu 800 µl Kultur der Ansatz bei -80 °C eingefroren wurde. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten eine 100% Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Abb. 7).



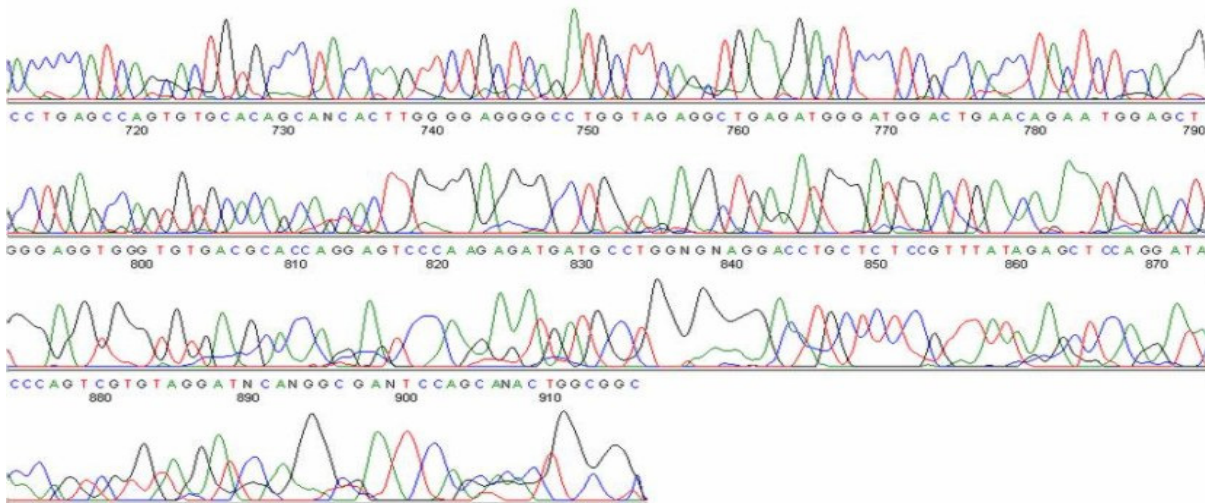


Abb.7: Das Ergebnis der Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al. (19979) des PSCA-Klon Nr. 2 durch GATC Biotech entspricht der in der NCBI Datenbank veröffentlichten PSCA-Sequenz PSCA= Prostate Stem Cell Antigen

3.1.4 Klonierung von PSCA-DNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1

Nach Feststellung der exakten Übereinstimmung des Ergebnisses aus der Sequenzierung mit der veröffentlichten PSCA-mRNA Sequenz, wurde eine Midipräparation mit dem zuvor angelegten Glycerinstock durchgeführt. Es folgte erneut eine restriktionsenzymatische Spaltung mit EcoRI (ROCHE) sowie eine Gelelektrophorese. Aus dem Testgel wurde die 839 bp PSCA-Bande mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten und die DNA mit dem Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die so gewonnene PSCA-DNA wurde mit dem ebenfalls EcoRI linearisierten pcDNA3.1-Vektor (INVITROGEN) ligiert. Danach wurde eine Transformation von DH5 α Bakterien mit dem Ligationsprodukt nach der Hitze-Schock Methode durchgeführt und auf festem Selektivagar ausplattiert. Schließlich wurden transformierte DH5 α Bakterien-Kolonien gepickt und in 5ml Selektivmedium über Nacht bei 37 °C kultiviert, um am nächsten Tag ihre DNA zu präparieren.

3.1.5 Testung der Orientierung von pcDNA3.1-PSCA

Da das PSCA Fragment sowohl sense, als auch anti-sense im Vektor vorliegen kann, ist eine Überprüfung der Orientierung vor der weiteren Verwendung notwendig. Dazu führt man nach einer Minipräparation, eine restriktionsenzymatische Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII durch. Wie in Abb. 8 ersichtlich, bilden die sense orientierten Klone bei der Gelelektrophorese zwei Banden (Proben 1/3/5/6/7, Abb. 9), während die anti-sense orientierten Klone eine einzelne Bande darstellen (Proben 2/4, Abb. 9). Dies ist dadurch bedingt, dass bei dem anti-sense Insert die HindIII Schnittstelle der PSCA-DNA am 5'Ende sehr nahe zu der HindIII Schnittstelle des pcDNA3.1 Vektors liegt, während beim sense Insert sich die HindIII Schnittstelle am 5'Ende in größerer Entfernung zur HindIII-Schnittstelle des Vektors befindet. Bei einer Hind-restriktionsenzymatische Spaltung wird somit das komplette Insert bis zu HindIII-Schnittstelle des Vektors abgespalten.

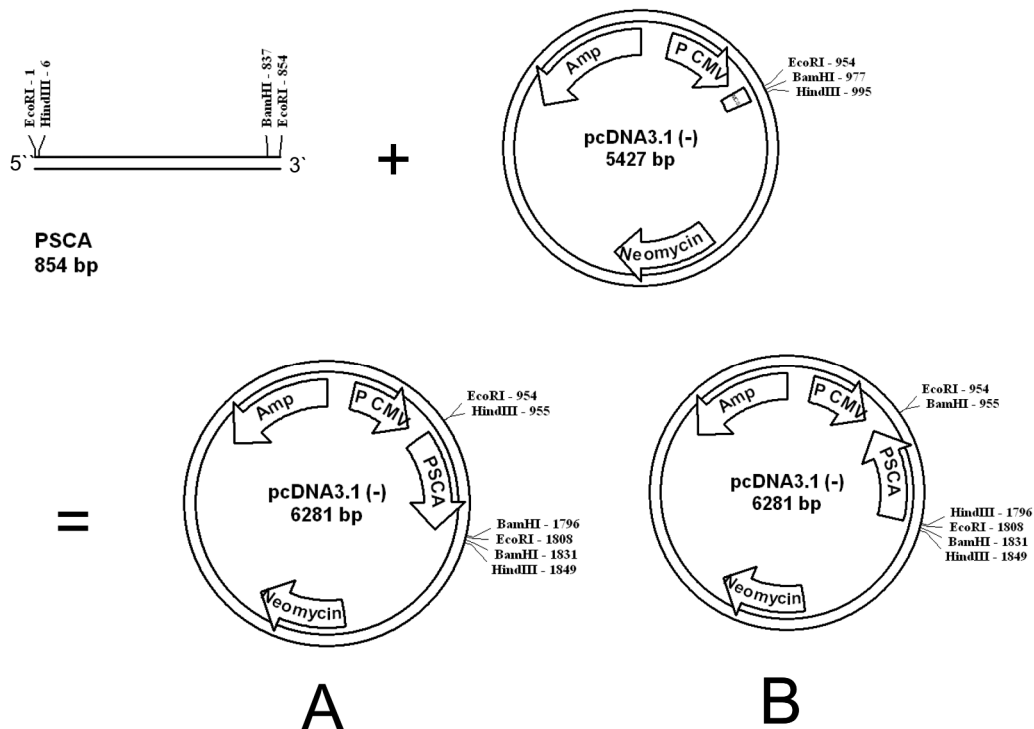


Abb. 8: Klonierung von PSCA in pcDNA3.1(-) Vektor. Die aus den vorangegangenen Klonierungsschritten entstandene 854 bp große PSCA-DNA liegt nach Klonierung in den Expressionsvektor pCR2.1 im Vektor A als Insert in der sense Orientierung, im Vektor B in anti-sense Orientierung vor. PSCA= Prostate Stem Cell Antigen

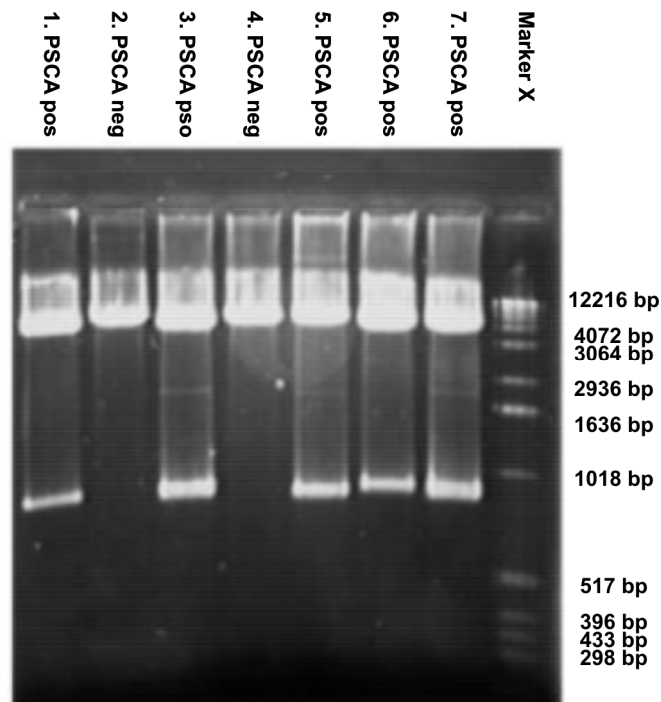


Abb. 9: Gelfoto unter UV-Licht zur Testung der Orientierung von PSCA in pcDNA3.1. Die Proben 1, 3, 5, 6, 7 stellen die korrekt orientierten Klone, die Proben 2, 4 die verkehrt orientierten Klone dar. Die Größe des Insert betrug 854 bp. Die Banden zwischen den Markierungsbanden 1018 bp und 517 bp entsprechen somit der Länge der PSCA DNA.
PSCA= Prostate Stem Cell Antigen

Es wurde mit der sense pcDNA3.1-PSCA DNA aus dem Ansatz 6 sowie mit der anti-sense pcDNA3.1-PSCA DNA aus dem Ansatz 4 weitergearbeitet.

3.2 Untersuchung einer T-Lymphozyten-Aktivierung invitro

3.2.1 ELISPOT-Assay nach Stimulation mit ConA

Zum Nachweis Interferon- γ sezernierender T-Lymphozyten, diente ConA als Positivkontrolle für eine unspezifische Stimulation von T-Lymphozyten. Es wurden zunächst T-Lymphozyten aus der Milz zweier gesunder Mäuse isoliert und aufgereinigt. Nach Bestimmung der Zellzahl, wurden jeweils $1,4 \times 10^7$ Zellen in Ansätzen ausgesät. Zur Stimulation der Interferon- γ Sekretion wurde in einem ersten Ansatz 2 $\mu\text{g/ml}$ ConA, in einen zweiten Ansatz 300U/ ml rmlL-2 und in einen dritten Ansatz 2 $\mu\text{g/ml}$ ConA

zusammen mit 300 U/ml rIL-2 den T-Lymphozyten zugegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend noch einmal einer Zellzählung unterzogen. Es wurden danach auf einer 96-Loch Nitrozelluloseplatte von jedem Ansatz jeweils ein Triplet mit 1×10^5 Zellen/Well, sowie ein Triplet mit 2×10^5 Zellen pro Well gefüllt. Schließlich wurde anhand eines ELISPOT die Anzahl Interferon- γ produzierender T-Lymphozyten quantifiziert (Abb. 10). Bei den mit den mit ConA und IL-2 stimulierten Ansätzen ließen sich bei 1×10^5 Zellen 65 Spots bzw. bei 1×10^5 Zellen 253 Spots zählen. Die Stimulation mit ConA ergab bei 1×10^5 Zellen 70 bzw. bei 2×10^5 Zellen 127 Spots. Nach der Stimulation mit IL-2 alleine zeigten sich keine Spots.

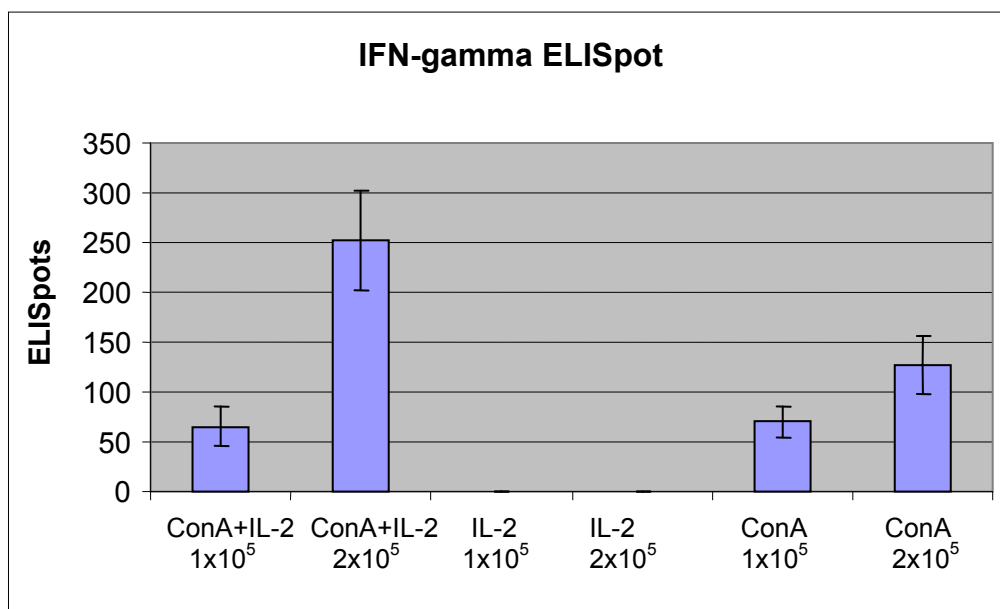


Abb. 10: Balkendiagramm zur Darstellung der ELISPOT Ergebnisse. Die Auswertung zeigt die höchste Anzahl von Spots bei den mit ConA und IL-2 stimulierten Zellen, gefolgt von den mit ConA stimulierten Zellen. Die Ansätze mit alleiniger Stimulation durch IL-2 zeigten keine Spots. SEM = s/\sqrt{n} , $n=6$

ELISPOT = Enzyme Linked Immuno Spot, ConA = Concanavalin A, IL-2 = Interleukin 2,

SEM = Standardfehler

3.2.1 ELISPOT nach Vakzination

Nach erfolgreicher Etablierung der ELISPOT Methode wurde mit der Vakzinierung der Mäuse begonnen. Dazu wurde den Mäusen je 5 µg PSCA-DNA, gelöst in 120 µl PBS, s.c. injiziert. Wir unterteilten die Mäuse in vier verschiedenen Gruppen mit jeweils zwei Mäusen pro Gruppe. Die Mäuse der ersten Gruppe wurden mit der sense pcDNA3.1-PSCA DNA vakziniert und die Mäuse der zweiten Gruppe mit dem anti-sense Konstrukt vakziniert. Den Mäusen der dritten Gruppe wurde der Leervektor injiziert. Als Nullkontrolle diente die Injektion von PBS bei den Mäusen der vierten Gruppe. Eine Woche nach der Vakzinierung wurden alle Mäuse getötet und eine Splenektomie durchgeführt. Aus der Milz wurden dann die Lymphozyten isoliert. Anschließend wurden auf der 96-Loch Nitrozelluloseplatte, von jeder Mausgruppe 1×10^5 bzw. 2×10^5 Zellen in Triplets ausgesät. Mit dem ELISPOT-Assay konnten keine Interferon- γ sezernierenden Zellen nachgewiesen werden. In keiner der untersuchten Gruppen ließen sich Spots detektieren.

3.3 PSCA-Nachweis auf Zelloberfläche von Panc02

Der Nachweis von PSCA auf der Oberfläche von Panc02-Zellen erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie. Es wurden jeweils drei verschiedene Versuchsgruppen mit je drei Ansätzen zusammengestellt. Neben den zu untersuchenden Zellen aus der Panc02-Zelllinie, wurden zur Positivkontrolle sicher PSCA exprimierende Zellen aus der Prostata tumorzellreihe Tramp-C2 (Yang et al., 2001), sowie zur Negativkontrolle OPM-Myelomzellen verwendet. Um die Möglichkeit eines falsch-positiven Resultates auszuschließen, wurde in jeder Gruppe als Nullkontrolle, das o.g. Färbeprotokoll zusätzlich nur mit goat-anti-rabbit-FITC-AK bzw. nur mit PBS wiederholt. Wegen eines zuvor nur schwach positiven Ergebnisses des Test-Durchlaufs der Durchflusszytometrie bei den PSCA-positiven Tramp-C2-Zellen nach Färbung auf Eis, wurde die Färbung in zwei parallelen Versuchsschienen einmal auf Eis und einmal, zur Verbesserung der Effektivität und unter Tolerierung eines höheren Hintergrundrauschens, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die bei der Durchflusszytometrie gewonnenen Werte

werden von den nachfolgenden Tabellen und Grafiken wiedergegeben. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit beschränkt sich die graphische Darstellung der Messergebnisse auf das Histogramm.

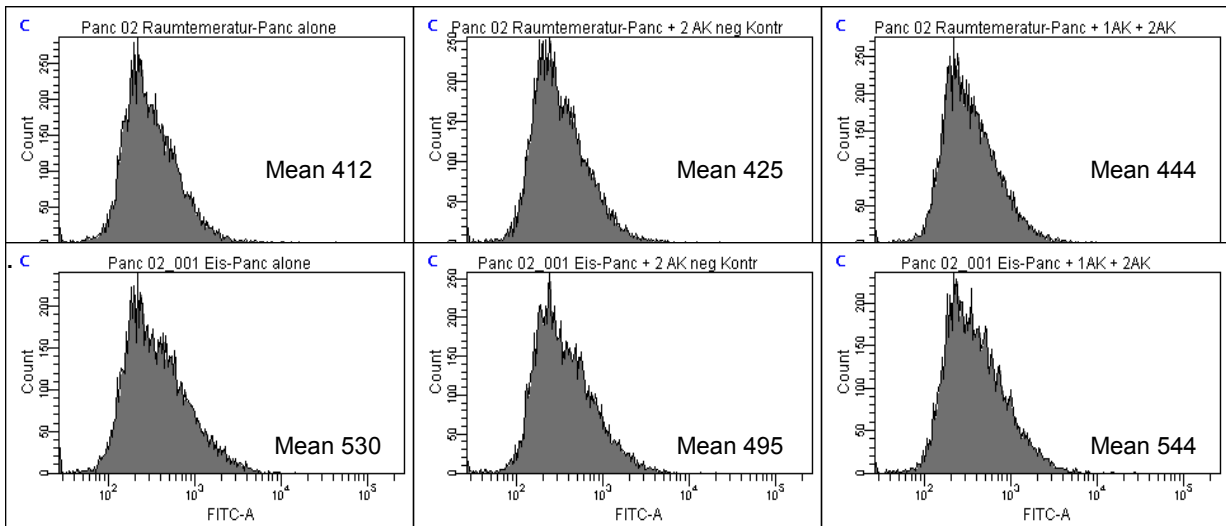


Abb. 11.a: FACS-Analyse der PSCA-Expression bei Panc02-Zellen jeweils nach Färbung unter Raumtemperatur (oben) und auf Eis (unten)

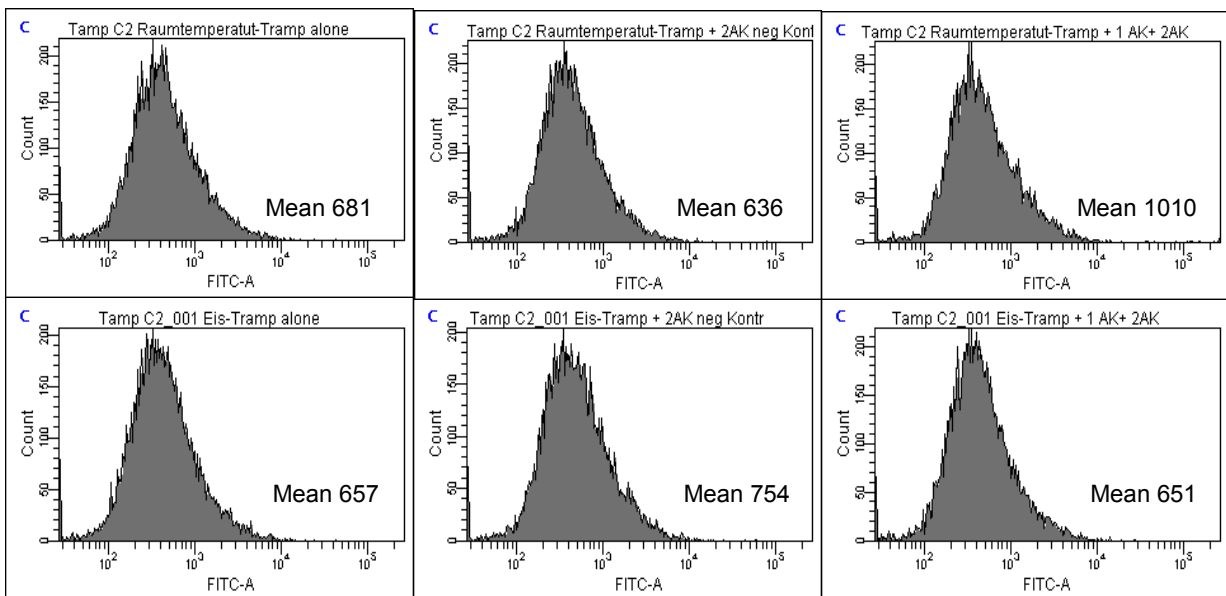


Abb. 11.b: FACS-Analyse der PSCA-Expression bei TrampC2-Zellen jeweils nach Färbung unter Raumtemperatur (oben) und auf Eis (unten)

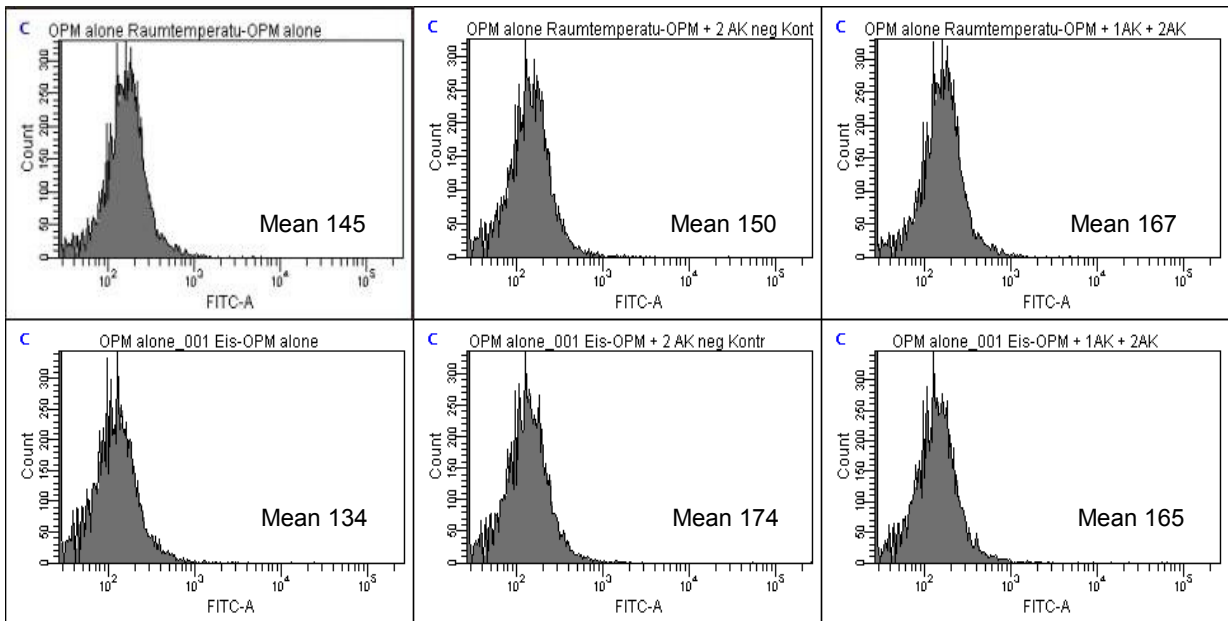


Abb. 11.c: FACS-Analyse der PSCA-Expression bei OPM-Zellen jeweils nach Färbung unter Raumtemperatur (oben) und auf Eis (unten)
 FACS= Durchflusszytometrie, PSCA= Prostata Stem Cell Antigen, AK= Antikörper

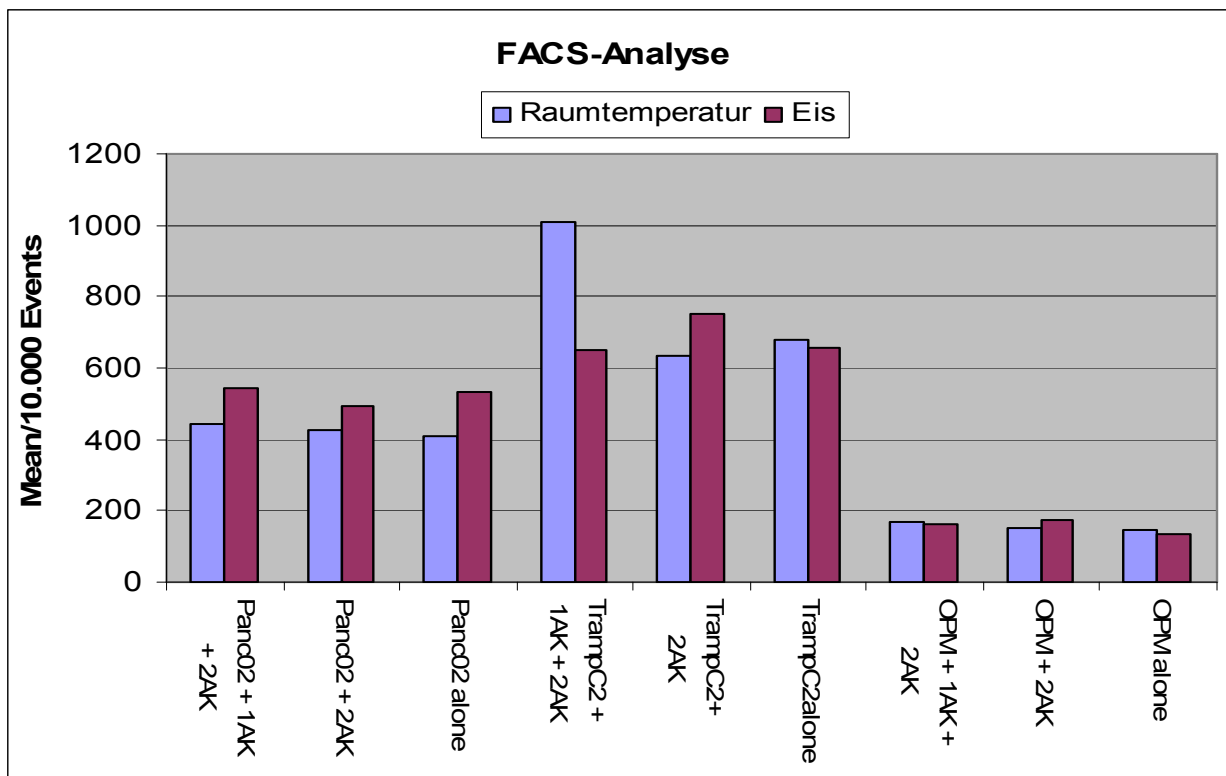


Abb. 12: Balkendiagramm zur vergleichenden Darstellung der FACS aller ermittelten Mean-Werte der FACS-Analyse nach Färbung unter Raumtemperatur und auf Eis. Es zeigte sich einzig unter Raumtemperatur bei TrampC2-Zellen eine signifikant erhöhte Fluoreszenzaktivität nach Färbung mit Erst- und Zweit-AK gegenüber den ungefärbten bzw. nur mit dem Erst-AK gefärbte Ansätzen.

FACS= Durchflusszytometrie, PSCA= Prostata Stem Cell Antigen, AK= Antikörper

Die FACS-Analyse der Panc02-Zellen (Abb 11.a) und der OPM-Zellen (Abb 11.c) ergab keinen Unterschied in der ermittelten Fluoreszenzintensität zwischen den gefärbten und nichtgefärbten Ansätzen. Im Gegensatz dazu war bei der Positivkontrolle mit TrampC2-Zellen (Abb 11.b) eine erhöhte Fluoreszenzintensität nach Färbung mit PSCA-AK nachweisbar. Somit ließen sich mit der Durchflusszytometrie keine PSCA-Expression an der Zelloberfläche von Panc02-Zellen nachweisen. Die einzelnen Mean-Werte wurden zusätzlich im Blakendiagramm (Abb. 12) korrelierend dargestellt, wodurch das Ergebnis noch mal verdeutlicht wird.

4. Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist ein aggressiver Tumor mit nahezu hundertprozentiger Mortalität. Selbst operativ behandelte Patienten weisen lediglich eine 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 10% auf. Derzeit existiert keine Therapieform, welche eine realistische Chance auf Heilung verspricht. Mit den in den letzten Jahren erzielten Fortschritten in der Immuntherapieforschung, eröffnen sich auch für die Therapie des Pankreaskarzinoms neue Perspektiven. In vielen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass das Immunsystem potentiell in der Lage ist Tumorzellen zu vernichten. Tumorzellen haben jedoch die Eigenschaft, durch verschiedene Mechanismen der Immunabwehr zu entgehen („Immune Escape“). Tumorzellen weisen an ihrer Zelloberfläche bestimmte Antigene auf, welche durch Immunzellen erkannt werden. Ein Ansatz der Immuntherapie ist es die Effektivität der körpereigenen Immunantwort, durch Stimulation mit exogen synthetisierter DNA, bis zu jenem Punkt zu steigern, bei dem es zu einer effektiven Immunabwehr der Tumorzellen kommt. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Überexpression des PSCA auf Pankreastumorzellen durch Argani et al. (2001), welches einen potentiellen Angriffspunkt für Immuneffektorzellen darstellt.

Zum indirekten in vitro Nachweis aktivierter T-Lymphozyten durch ihre Interferon- γ Synthese, nach in vivo Stimulation mit PSCA-DNA, etablierten wir zunächst einen ELISPOT-Assay. Wir konnten in einem ersten Versuch mit, durch ConA und IL-2, bzw. exklusiv mit ConA oder IL-2 stimulierten Lymphozyten, wie erwartet bei den gleichzeitig mit ConA und IL-2 stimulierten Lymphozyten die höchste Anzahl von Spots nachweisen; gefolgt von allein mit ConA stimulierten Lymphozyten. Mit diesem Ergebnis konnten wir zeigen, dass die ELISPOT Methode prinzipiell geeignet ist, Interferon- γ produzierende Zellen quantitativ zu ermitteln. Es besteht eine nachgewiesene Korrelation zwischen den Ergebnissen des ELISPOT-Assay und dem CYTOTOX-Assay, wonach sich aus der Anzahl der ermittelten Interferon- γ Synthese, Rückschlüsse auf den Grad der Zytotoxizität ziehen lassen (Derby et al. 2001; Di Fabio et al. 1994; Scheibenbogen et al. 2000; Schmittel et al. 2000). Nach erfolgreicher Etablierung der Methode, konnte der ELISPOT-Assay anschließend mit in vivo stimulierten Lymphozyten durchgeführt

werden. Dabei wurden je 2 Mäuse, die zuvor aus mehreren Klonierungsschritten hervorgegangenen sense bzw. anti-sense pcDNA3.1-PSCA-DNA sowie reines PBS s.c. injiziert. Die Milz-Präparation und Lymphozyten-Separation erfolgte 1 Woche nach der Vakzinierung. Im nachfolgenden ELISPOT-Assay ließ sich in keiner Versuchsgruppe Interferon- γ nachweisen.

Zur Klonierung von PSCA-DNA wurden Zellen aus der Pankreastumorzelllinie Panc02 verwendet. Da eine PSCA-Expression auf Pankreastumorzellen beschrieben wurde (Argani et al., 2001), nahmen wir eine PSCA Expression auch auf Zellen der Pankreastumorzelllinie Panc02 an. Dies würde eine wichtige Grundvoraussetzung für eine potentielle Verwendung von Panc02 zur Tumorinokulation in einem in vivo Experiment darstellen. Trotz gewissenhafter Recherche fand sich hierfür keine Angabe in der Fachliteratur. Es sollte daher in einem weiteren Experiment untersucht werden ob Panc02 PSCA auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Hierfür wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit anti-PSCA-AK, welche mit einem FITC-markierten Sekundär-AK gekoppelt wurden, durchgeführt. Die naheliegende Vermutung, dass Panc02-Zellen, aus denen PSCA-DNA isoliert wurde, auch PSCA auf Ihrer Zelloberfläche exprimieren, ließ sich dabei nicht bestätigen.

Es sind in vorangegangenen Arbeiten bereits verschiedene methodisch ähnliche in vitro Versuche mit positivem Ergebnis durchgeführt worden. Im Folgenden sollen abweichende Faktoren unserer Arbeit gegenüber den Vergleichsarbeiten, welche möglicherweise einen Einfluss auf das vorliegende Ergebnis haben, konkret benannt und analysiert werden.

4.1 PSCA als DNA-Vakzine

Es wurden in den letzten Jahren mehrere Arbeiten mit vergleichbaren Ansätzen publiziert. In zwei erst kürzlich veröffentlichten Arbeiten (Ahmad et al., 2009; Garcia-Hernandez et al., 2008) konnte nach Vakzinierung mit PSCA-DNA im experimentellen Prostatakarzinom-Modell erfolgreich eine Antitumor-Antwort in vitro und in vivo induziert

werden. Statt der von uns verwendeten Zellen der Pankreastumorzellreihe Panc02, wurden dabei Zellen der Prostatatumorzelllinie TrampC2 verwendet, bei denen eine Expression von PSCA bereits bekannt war. Im Ahmad et al. Versuch konnte zunächst in vivo im Tumor-Challenge Experiment eine verzögerte Tumorprogression und teilweise Tumorfreiheit nach Vakzination mit PSCA-DNA gezeigt werden. Gleichzeitig konnte in vitro in einem nachfolgenden Zytotoxizitätsassay eine erhöhte Aktivität bei von vakzinierten Mäusen isolierten T-Lymphozyten beobachtet werden. Die DNA-Vakzine wurden hierbei i.m. mit Elektroporation appliziert. Ein ähnliches Resultat konnte Garcia-Hernandez et al. nach DNA-Vakzinierung mit einer Genkanone und anschließender Boosterung mit einem rekombinanten Virus erzielen, das PSCA exprimiert. Auch hier konnte ein tumorprotektiver Effekt in vivo im Tumor-Challenge beschrieben werden. In vitro konnte zudem im ELISPOT-Assay eine Stimulation Interferon- γ produzierender T-Lymphozyten bei den mit PSCA-DNA vakzinierten Mäusen nachgewiesen werden. In beiden Versuchen wurde eine grundsätzliche Eignung von PSCA als DNA-Vakzine zur Behandlung maligner Erkrankungen demonstriert. Es wurde gezeigt, dass die Überwindung der Immuntoleranz gegenüber dem Autoantigen PSCA durch DNA-Vakzinierung möglich ist.

4.2 Insuffiziente Transfektionsrate

Ein offensichtlicher methodischer Unterschied der vorliegenden Arbeit gegenüber beiden o.g. Arbeiten, besteht in der abweichenden Applikationsweise der DNA-Vakzine. So beschränkten wir uns auf eine einmalige s.c. Applikation der Plasmid-DNA, anstatt einer in vivo Elektroporation oder der Verwendung einer Genkanone. Der Vorteil der in vivo Elektroporation liegt in einer höheren Transfektionsrate und einer größeren Potenz der zellulären Immuninduktion (Kusumanto et al., 2007; Mir et al., 1998; Satkauskas et al., 2002). Auch die durch Garcia-Hernandez et al. verwendete Methode der Applikation mittels Genkanone und zusätzlicher Boosterung durch ein rekombinantes Virus, resultiert in einer effektiveren Immunantwort als eine einfache Vakzinierung mit Plasmid-DNA (Goldberg et al., 2005). In weiteren Studien ist zur Verbesserung der Transfektionsrate, eine Reihe von Adjuvantien zum Einsatz gekommen, welche den

Abbau von DNA verhindert. Mit guten Ergebnissen wurden Lipide/ Cholesterin (D'Souza et al., 2002), polymere Mikropartikel (Evans et al., 2004; Luby et al., 2004; O'Hagan et al. 2004) und Aluminiumphosphat (Ulmer et al. 1999) untersucht, wobei jeweils unterschiedliche Wirkungsmechanismen bestehen. Es ist möglich, dass die Transfektionsrate der in diesem Versuch applizierten DNA nicht ausreichend war für eine signifikante CTL-Antwort.

4.3 Inadäquate DNA-Menge und Zeitabstand bei der Vakzinierung

Neben o.g. Experimenten mit einer speziellen Applikationsform der DNA-Vakzine, wurden auch Arbeiten publiziert, in denen eine einfache Applikationsform der DNA-Vakzine verwendet wurde. So wurden im Experiment von Graham et al. (2005) in dreiwöchigen Abständen insgesamt $3 \times 100 \mu\text{g}$ MUC1-cDNA intramuskulär in den Quadrizeps der Versuchsmäuse appliziert. Nach Inokulation RMA-MUC1-Tumorzellen zeigten vakzinierte Mäusen eine signifikant höhere Überlebensrate. Insgesamt waren 78% der vakzinierten Mäuse tumorfrei, im Gegensatz zu 46% in der Kontrollgruppe. Dabei spielte es keine Rolle mit welcher Methode: Lithium-Chlorid-Präparation (LiCl), Caesium-Chlorid-Präparation (CsCl) oder wie in hiesigen Experiment mit „QIAGEN anion exchange column“, gearbeitet wurde. Im selben Experiment wurde die Effektivität verschiedener DNA-Dosen verglichen: 5, 15, 50 und $100 \mu\text{g}$ pro Injektion. Die Injektion von 50 oder $100 \mu\text{g}$ DNA resultierte in einer Tumorfreiheit von 78%. Die prozentuelle Tumorfreiheit nahm mit weiterer Dosisreduktion jedoch immer weiter ab und betrug in der $25 \mu\text{g}$ Gruppe 60%, in der $5 \mu\text{g}$ Gruppe lediglich 30%. Derzeit werden aber in einzelnen Versuchen sogar DNA-Mengen bis zu mehreren Milligramm verwendet (Wang et al., 1999). Im Gegensatz dazu, wurde in der vorliegenden Arbeit, bereits nach einmaliger Applikation von $5 \mu\text{g}$ DNA, die Milz reseziert und der Lymphozytenseparation für den ELISPOT-Assay zugefügt. Insbesondere vor dem Hintergrund der einfachen Applikationsweise und der damit verbunden niedrigen Transfektionsquote, ist daher von einer zu niedrigen Dosis der applizierten DNA-Vakzine auszugehen.

4.4 Fehlende in vitro Restimulation mit Pankreas Lysat/ Costimulation mit IL-2/GM-CSF beim ELISPOT-Assay

Die in vitro Experimente von Ahmad et al. und Garcia-Hernandez et al. erfolgten erst nach Tumor-Challenge, d.h. nach einem Kontakt mit TAA tragenden Zellen. In der Arbeit von Graham et al. wurde zusätzlich untersucht, ob die alleinige Injektion von DNA für den in vitro Nachweis einer Tumorantwort ausreicht. Dabei waren spezifische CTL nach einfacher DNA-Immunsierung nicht nachweisbar, sondern erst nach Tumor-Challenge. Dies lässt darauf schließen, dass eine signifikante CTL-Proliferation erst nach Kontakt mit TAA tragenden Zellen erfolgt. Bei unserem Versuch in vitro eine CTL-Proliferation mit ELISPOT nachzuweisen, fehlte eine direkte Exposition mit Tumorzellen, sowohl in vivo als invitro.

Im Versuch von Abe et al. (1996) konnte ebenfalls eine positive CTL-Reaktion auf s.c. Applikation nackter scFv-DNA nachgewiesen werden. 7 Tage nach dreimaliger s.c. Injektion nackter DNA, wurde die Milz präpariert und die Milzzellen wurden u.a. einem Zytotoxizitätsassay zugeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante CTL-Antwort auf TAA exprimierende Zellen. Es ist jedoch anzuführen, dass die Milzzellen zuvor mit Tumorzellen invitro restimuliert wurden. Zudem wurde in dem im Graham-Experiment als Stimulanzen IL-2 und GM-CSF verwendet. Bei unserem Versuch wurde auf eine Costimulation, aufgrund möglicher qualitativer und quantitativer Veränderungen der Versuchsergebnisse (Monsurro et al., 2002), verzichtet. Ebenso erfolgte keine Restimulation mit Pankreas-Lysat. Es ist daher möglich, dass durch die fehlende Costimulation bzw. Restimulation mit dem TAA, eine signifikante CTL-Antwort ausblieb. Da es sich bei o.g. Versuch jedoch um ein Zytotoxizitätsassay handelte, ist die Vorgehensweise nicht direkt mit unserem ELISPOT-Assay gleichzusetzen, da bei diesen bekanntermaßen eine Co-Stimulation mit IL-2 und eine erneute Restimulation mit dem Antigen zwingend erforderlich ist. Beim ELISPOT-Assay ist in der Regel keine Restimulation mit dem Antigen notwendig (Czerkinsky et al., 1983). Es ist anzunehmen, dass die Immunogenität vom TAA eine entscheidende Rolle in der Frage der Notwendigkeit einer Costimulation bzw. in vitro Restimulation spielt.

4.5 Nackte DNA Vakzine vs. DC

Die meisten Studien im Bereich der Immuntherapie, befassen sich mit zellbasierten Vakzinierungsverfahren, insbesondere den DCs (z.B. Gong et al., 1997; Nestle et al., 1998). Als potenteste aller APCs, ergibt sich bei Vakzinierungen mit DCs ein größerer Stimulationseffekt als mit reiner DNA. Zellbasierte Vakzinierungsverfahren haben jedoch den großen Nachteil, dass sie aufwendig in der Herstellung sind. Unter den verschiedenen Ansätzen der Immuntherapie ist die DNA-Vakzination, aufgrund der relativ einfachen Herstellung, insbesondere in frühexperimentellen Umgebungen, am praktikabelsten anzuwenden. Es ist erwiesen, dass Plasmid-DNA, i.m. injiziert, zu einer Synthese der kodierten Proteine führt (Wolff et al., 1990). Trotz der geringen Proteinmenge und dem Fehlen einer offensichtlichen Transfektion von APC, konnte mit nackter DNA eine CD8+ CTL Immunantwort, z.B. gegen Influenza erzielt werden (Ulmer et al., 1993). Der Mechanismus der DNA-Verarbeitung war bereits Gegenstand umfangreicher Studien. Zusammenfassend wird angenommen, dass die DNA-Injektion zu einer Transfektion von Myozyten führt; die direkte Transfektion von APC war hingegen seltener zu beobachten (Manan et al., 2000). Die Zahl, der die Target-Zellen erreichenden DNA-Moleküle, beträgt nach einer i.m. Injektion lediglich einen Bruchteil der applizierten Menge. In einem Experiment mit p53-TAA-DNA (Hurpin et al., 1998), konnte lediglich bei intravenöser oder intrasplenischer Applikation eine CTL-Antwort erzielt werden, nicht jedoch bei einer s.c. oder i.m. Applikation. Die Ergebnisse der Untersuchung unterschiedlicher Applikationswege sind teilweise widersprüchlich und hängen wohl eng mit dem zu applizierenden TAA zusammen.

In verschieden Versuchen konnte in vitro, eine Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten mit PSCA gepulsten DCs nachgewiesen werden (Danull et al., 2000; Kiessling et al., 2002). Ein erster klinischer Versuch ergab Hinweise auf eine gesteigerte Anti-Tumor Antwort beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom (Thomas-Kaskel et al., 2006). Die Vakzinierung mit nackter PSCA-DNA war im hiesigen Experiment jedoch nicht in der Lage, eine signifikant gesteigerte Immunantwort zu induzieren. Ein direkter Vergleich dieser beiden unterschiedlichen Methoden, bietet sich als Gegenstand zukünftiger Experimente an.

4.6 Expression von PSCA auf Panc02-Zellen

In der Arbeit von Argani et al. (2001), wurde eine Überexpression von PSCA auf der Oberfläche von 14 von 19 Pankreastumorzellreihen nachgewiesen. Es handelte sich dabei jedoch ausschließlich um humane Pankreastumorzellreihen, eine Beschreibung von PSCA-Oberflächenexpression auf murinen Pankreastumorzellreihen ließ sich auch nach intensiver Literaturrecherche nicht finden. Eine Oberflächenexpression bei den Panc02-Zellen, aus denen schließlich die PSCA-DNA zur Vakzin-Herstellung kloniert wurde, war jedoch anzunehmen. Diese Hypothese konnte in unseren Experimenten widerlegt werden. Damit sind Zellen der Panc02-Reihe auch nicht zur Tumornokulation bei für weitergehenden Versuchen, z.B. Tumor-Challenge geeignet. Da nach heutigem Stand PSCA-Expression lediglich für humane Pankreastumor-Zellreihen untersucht sind und bei Mäusen ausschließlich im Prostatakarzinommodell eine Überexpression beschrieben wurde (Wente et al., 2005), ist bei zukünftigen Experimenten mit einem murinen Pankreaskarzinommodell, eine vorherige Untersuchung auf PSCA-Oberflächenexpression für die zu verwendende Alternativ-Zellreihe notwendig.

5. Zusammenfassung

In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Immunsystem grundsätzlich in der Lage ist, Tumore zu bekämpfen. Dennoch gelingt es Tumorzellen, durch verschiedene Mechanismen, der Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem zu entgehen. Für eine effektive Immunantwort benötigt das Immunsystem daher eine zusätzlichen Stimulation. Hierzu existieren verschiedene Methoden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem beim Pankreaskarzinom überexprimierten Tumorantigen PSCA als DNA-Vakzine in einem murinen Modell. Es soll der Antitumor-Effekt invitro, anhand der Bestimmung der Interferon- γ Sekretion zytotoxischer T-Lymphozyten mittels ELISPOT untersucht werden.

Im ELISPOT-Assay, konnte nach Milz-Präparation vakzinierter Mäuse, keine Interferon- γ Synthese nachgewiesen werden. Es wurden mehrere Aspekte als Ursache für die ungenügende Immunantwort diskutiert. So wich die Versuchsanordnung in mehreren Punkten von vergleichbaren Arbeiten ab: u.a. fehlender TAA-Kontakt, fehlende Restimulation, fehlende Costimulation, fehlende Adjuvantien, insuffiziente Transfektionsrate durch Verwendung einer einfachen Applikationstechnik, unterschiedliche DNA-Menge und unterschiedliche Inokulationszeit. Zudem wurde mit der Verwendung nackter DNA bewusst auf eine Methode gesetzt, die zwar eine einfache Herstellung erlaubt, jedoch z.B. gegenüber dendritischen Zellen ein bekanntes Defizit in der potentiellen Immunogenität aufweist. Die unterschiedliche Immunogenität von Antigenen und die Stabilität ihrer Expression scheint ebenso eine Rolle zu spielen. Eine PSCA Expression bei Zellen der für die Klonierung von PSCA verwendeten Panc02-Zellreihe war in der publizierten Literatur zuvor nicht beschrieben. In einem weiteren Experiment sollte mittels Durchflusszytometrie daher die Frage beantwortet werden ob eine PSCA-Expression auf der Oberfläche von Panc02-Zellen vorliegt. Dabei ließ sich keine PSCA-Expression auf der Zelloberfläche feststellen. Diese ist insbesondere bei der Planung weiterer Versuche, wie z.B. Tumor-Challenge mit PSCA-Vakzinen, von Belang. Somit ist die Verwendung von Panc02-Zellen für die Tumorinokulation nicht geeignet.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe A, Emi N, Taji H, Kasai M, Kohno A, Saito H. Induction of humoral and cellular anti-idiotypic immunity by intradermal injection of naked DNA encoding a human variable region gene sequence of an immunoglobulin heavy chain in a B cell malignancy. *Gene Ther* 1996; 3: 988-993
2. Ahmad S, Casey G, Sweeney P, Tangney M, O'Sullivan GC. Prostate Stem Cell Antigen DNA Vaccination Breaks Tolerance to Self-antigen and Inhibits Prostate Cancer Growth. *Mol Ther* 2009; 17: 1101-1108
3. Antica M, Wu L, Scollay R. Development of T Lymphocytes at Extrathymic Sites. *Immunol Letts* 1997; 55: 47-51
4. Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner H.G, Goggins M, Jaffee EM, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RHI. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4320-4324
5. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690: 42-49
6. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 1970; 169: 1042-1049
7. Campanelli R, Palermo B, Garbelli S, Mantovani S, Lucchi P, Necker A, Lantelme E, Giachino C. Human CD8 co-receptor is strictly involved in MHC-peptide tetramer-TCR binding and T cell activation. *Int Immunol* 2002; 14: 39-44
8. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264: 716-719
9. Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol* 1997; 71: 169-178
10. Chowdury P, Rayford PL. Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 869-877

11. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65: 109-121
12. Dannull J, Diener PA, Prikler L, Furstenberger G, Cerny T, Schmid U, Ackermann DK, Groettrup M. Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 5522–5528
13. D'Souza S, Rosseels V, Denis O, Tanghe A, De Smet N, Jurion F, Palfliet K, Castiglioni N, Vanonckelen A, Wheeler C, Huygen K. Improved Tuberculosis DNA Vaccines by Formulation in Cationic Lipids. *Infect Immun* 2002; 70: 3681-3688
14. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 617-648
15. Etchart N, Buckland R, Liu MA, Wild TF, Kaiserlian D. Class I-restricted CTL induction by mucosal immunisation with naked DNA encoding measles virus haemagglutinine. *J Gen Virol* 1997; 78: 1577-1580
16. Finn OJ, Tumor-Rejection Antigens Recognized by T Lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 701-708
17. Foley EJ. Antigenic properties of cholantrene-induced tumors in mice of the same strain origin. *Cancer Res* 1953; 13: 835-836
18. Fraser JD, Irving BA, Grabtree GR, Weiss A. Regulation of Interleukin-2 Gene Enhancer Activity by the T-Cell Accessory Molecule CD28. *Science* 1991; 251: 313-316
19. Garcia-Hernandez Mde L, Gray A, Hubby B, Klinger OJ, and Kast WM. Prostate stem cell antigen vaccination induces a long-term protective immune response against prostate cancer in the absence of autoimmunity. *Cancer Res* 2008; 68: 861–869
20. Goldberg SM, Bartido SM, Gardner JP, Guevara-Patiño JA, Montgomery SC, Perales MA, Maughan MF, Dempsey JA, Donovan GP, Olson WC, Houghton AN, Wolchok JD. Comparison of two cancer vaccines targeting tyrosinase: plasmid DNA and recombinant avirus replicon particles. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8114–8121

21. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, Qu H, Rowse GJ, Gendler SJ, Kufe D. Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6279-6283
22. Graham RA, Burchell JM, Beverley P, Taylor-Papadimitriou J. Intramuscular immunisation with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumour cells. *Int J Cancer* 1996; 65: 664-670
23. Gross L. Interdermal immunization of C3H mice against sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943; 3: 326-333
24. Herzenberg LA, Sweet RG. Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Sci Am* 1976; 234: 108-117
25. Hurpin C, Rotarioa C, Bisceglia H, Chevalier M, Tartaglia J, Erdile L. The mode of presentation and route of administration are critical for the induction of immune responses to p53 and antitumor immunity. *Vaccine* 1998; 16: 208-215
26. Howe GR, Jain M, Burch JD. Ciragette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based-control-study in Toronto, Canada. *Int J Cancer* 1991; 47: 323-328
27. Johnen H, Kulbe H, Pecher G. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1). *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 356-360
28. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; 11: 211-216
29. Kiessling A, Schmitz M, Stevanovic S, Weigle B, Holig K, Fussel M, Fussel S, Meye A, Wirth MP, Rieber EP. Prostate stem cell antigen: identification of immunogenic peptides and assessment of reactive CD8+ T cells in prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2002; 102: 390-397
30. Kusumanto YH, Mulder NH, Dam WA, Losen M, Losen MH, De Baets MH, et al. Improvement of *in vivo* transfer of plasmid DNA in muscle: comparison of electroporation versus ultrasound. *Drug Deliv* 2007; 14: 273-277
31. Lafferty KJ, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975; 188: 259-261

32. La Vecchia C, Negri E. Fats in seasoning and the relationship to pancreatic cancer. *Eur J Cancer Prev* 1997; 6: 370-373
33. Lekutis C, Shiver JW, Liu MA, Letvin NL. HIV-1 env DNA vaccine administered to rhesus monkeys elicits MHC class II-restricted CD4+ T helper cells that secrete IFN- γ and TNF- α . *J. Immunol* 1997; 158: 4471-4477
34. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of Lymphocyte Messenger RNA Stability by a Surface-Mediated T-Cell Activation Pathway. *Science* 1989; 244: 339-342
35. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andr en-Sandberg A, Domell f L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International pancreatitis study group. *N Eng J Med* 1993; 328: 1433-1437
36. Luby TM, Cole G, Baker L, Kornher JS, Ramstedt U, Hedley ML. Repeated immunization with plasmid DNA formulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles is well tolerated and stimulates durable T cell responses to the tumor-associated antigen cytochrome P450 1B1. *Clin Immunol* 2004; 112: 45-53
37. Martin T, Parker SE, Hedstrom R, Le T, Hoffman SL, Norman J, Hobart P, Lew D. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 759-768
38. Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, and Scherman D. Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III, Sci Vie* 1998; 321: 893-899
39. Mueller DL, Jenkins MK. Molecular Mechanisms Underlying Functional T-Cell Unresponsiveness. *Curr Opin Immunol* 1997; 7: 375-381
40. Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-332
41. O'Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. *Immunol Rev* 2004; 199: 191-200

42. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 265-269
43. Reiter RE, Gu Z, Watabe T. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1735-1740
44. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994; 271: 907-913
45. Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. *Lancet* 1997; 349: 485-489
46. Ross S, Spencer SD, Lasky LA, Koeppen H. Selective expression of murine prostate stem cell antigen in fetal and adult tissues and the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model of prostate carcinogenesis. *Am J Path* 2001; 158: 809-816
47. Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, Lutz RJ, Frantz G, Hillan K, Peale F, Tobin P, Eberhard D, Rubin MA, Lasky LA, Koeppen H. Prostate Stem Cell Antigen as Therapy Target. *Cancer Research* 2002; 62: 2546-2553
48. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467
49. Satkuskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM. Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002; 5: 133-140
50. Scheibenbogen C, Lee KH, Stevanovic S, Witzens M, Willhauck M, Waldmann V, Naeher H, Rammensee HG, Keilholz U. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN γ -ELISPOT assay. *Int J Cancer* 1997; 71: 932-936
51. Schneider W, Lohse J, Meyer AW, zum Bischenfelde KH, Wölfel T. Detection and quantification of blood-derived CD8 $^+$ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Meth* 1996; 191: 131-142

52. Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985 to 1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 1-7
53. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Swanson GM, Hayes RB, Greenberg RS, Benichou J. Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer Res* 1995; 55: 4899-4905
54. Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, Hayes RB, Swanson GM, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG, Fraumeni JF Jr, Hoover RN. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case control study based on direct interviews. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 1710-1719
55. Slingluff CL, Hunt DF, Engelhard VH. Direct Analysis of Tumor associated Peptide Antigens. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 733-749
56. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299
57. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1178-1183
58. Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamoaka H. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 1991; 146: 1077-1082
59. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R, Robbel C, Schultze-Seemann W, Waller CF, Veelken H. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119: 2428-2434
60. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259: 368-370

61. Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine* 1999; 18: 18-28
62. Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998; 282: 476-480
63. Wente MN, Jain A, Kono E, Berberat PO, Giese T, Reber HA, Friess H, Büchler MW, Reiter RE, Hines OJ. Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer. *Pancreas* 2005; 31: 119-125
64. Wild J, Gruner B, Metzger K, Kuhrober A, Pullodek HP, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid, *Vaccine* 1998; 16: 353
65. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-1468
66. Yang D, Holt GE, Velders MP, Kwon ED, Kast WM. Murine six-transmembrane epithelial stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 2001; 61: 5857-5860
67. Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 24-33

7. Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. I. Schmidt-Wolf für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Frank, Frau Dr. E. Sievert, Frau P. Alpmann, Herrn Dr. M. Nowak und dem gesamten Laborteam für die intensive Betreuung bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Ebenso möchte ich mich bei Bogdan Pintea und Minh Khoa Nguyen für das Korrekturlesen, sowie bei Hélène Mouvier für die Hilfe bei Layout und die moralische Unterstützung bedanken.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre große Unterstützung, erst den erfolgreichen Abschluss meines Studiums und meiner Dissertation ermöglicht haben.