

Untersuchungen zu Chromogranin A als potentielles Tumorantigen beim malignen Phäochromozytom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christiane Y. Kouatchoua
aus Kamerun

Düsseldorf, Mai 2012

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ-Prof. Dr. Eckhard Lammert
Korreferent: Univ-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. Einleitung	1
1.1. Die adaptive Immuntherapie	2
1.2. Dendritische Zellen	4
1.3. Chromogranin A	5
1.4. Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Materialien	9
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	9
2.1.2. Chemikalien, Enzyme und Zytokine	9
2.1.3. Kits.....	11
2.1.4. Medien und Puffer	11
2.1.5. Lösungen	11
2.1.6. Zellkulturmedien.....	11
2.1.7. Mausstämme	12
2.1.7.1. C57BL/6-Inzuchtstamm.....	12
2.1.7.2. Ret/Cal-Mäuse	12
2.1.8. Zelllinien.....	13
2.1.8.1. Murine Phäochromozytom-Zelllinie (mPC)	13
2.1.8.2. Kontrollzelllinie	13
2.1.9. Antikörper.....	14
2.1.9.1. Fluorochrom-markierte Antikörper	14
2.1.9.2. konjugierte Antikörper mit paramagnetischen MikroBeads	15
2.1.9.3. Antikörper für die immunhistologische Färbung.....	16
2.1.9.4. Selektions-Antikörper	16
2.1.10. Primer	17
2.1.11. Peptide.....	17
2.1.11.1. Murine CgA-Peptide.....	17
2.1.11.2. Kontrollprotein	18
2.1.12. Tetramer	18
2.2. Methoden	19
2.2.1. Versuchstiere	19

2.2.2.	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.2.1.	Extraktion genomischer DNA aus Mausschwänzen	20
2.2.2.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	20
2.2.2.3.	Real-Time-PCR (RT-PCR)	21
2.2.3.	Zellbiologische Methode.....	21
2.2.3.1.	Zellkultur	21
2.2.3.2.	Kultivierung der Zelllinien mPC und mMTC	21
2.2.3.3.	Passagieren von Zellen.....	22
2.2.3.4.	Passagieren von Suspensionskulturzellen	22
2.2.3.5.	Zählen von Zellen.....	22
2.2.3.6.	Isolation von Subpopulationen mittels Mikrobeads	22
2.2.3.7.	Phänotypische Analysen der Zellen	23
2.2.3.8.	Kryokonservierung von Zellen	23
2.2.3.9.	Auftauen von Zellen	23
2.2.4.	Durchflusszytometrische Analyse von Zellpopulationen	24
2.2.4.1.	Antikörperfärbung von Molekülen auf der Zelloberfläche.....	24
2.2.5.	Organentnahme	25
2.2.6.	Isolation von Knochenmark- und Lymphknotenzellen sowie Splenozyten	25
2.2.6.1.	Präparation von Knochenmarkszellen.....	25
2.2.6.2.	Präparation von Splenozyten	26
2.2.7.	Generierung von dendritischen Zellen.....	26
2.2.8.	Beladen von dendritischen Zellen	26
2.2.9.	Immunisierung von Mäusen	27
2.2.10.	Herstellung der Einzelzellsuspension aus T-Lymphozyten	27
2.2.11.	Isolation und Kultivierung von T-Zellen.....	27
2.2.12.	Isolation und Kultivierung von CD8-T-Zellen	28
2.2.13.	Selektion von Interferon-gamma sezernierenden CD8 ⁺ T-Zellen.....	28
2.2.14.	Messung der zytotoxischen Aktivität.....	29
2.2.15.	Blockierungsanalysen (<i>Cold Target Assay</i>).....	30
2.2.16.	Tetramer-Analysen.....	30
2.2.17.	Injektion von neuroendokrinen Tumorzellen	31
2.2.18.	Immunhistologie	31
2.2.18.1.	Herstellung von Kryogewebeschnitten	31
2.2.18.2.	Antikörperfärbungen von Kryoschnitten.....	31

2.2.18.3. Messung der TumorgroÙe	32
2.2.19. Statistische Auswertung	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Generierung von dendritischen Zellen	34
3.1.1. Phänotypisierung von Knochenmarkzellen	34
3.1.2. Phänotypisierung von unreifen dendritischen Zellen	35
3.1.3. Oberflächenmarkerexpression von reifen dendritischen Zellen	37
3.2. Analyse der CgA-Epitop-spezifischen T-Lymphozyten	38
3.2.1. Tetramer-Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Ret/Cal-Mäusen mit einzelnen CgA-Epitopen	38
3.2.2. Tetramer-Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Ret/Cal-Mäusen mit einem Cocktail aus drei verschiedenen CgA-Epitopen	43
3.2.2.1. Tetramer-Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einem Cocktail aus drei verschiedenen physiologischen CgA-Epitopen	43
3.2.2.2. Tetramer-Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einem Cocktail aus drei verschiedenen Aminosäure-veränderten CgA-Epitopen	43
3.3. Charakterisierung von Interferon-gamma-produzierenden CgA-Epitop-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	46
3.3.1. Lyse von murinen Phäochromozytomzellen durch tumorspezifische, Interferon-gamma-sezernierende, zytotoxische T-Zellen nach T-Zell-Stimulation mit allen sechs Chromogranin A Peptiden (P1-P6)	47
3.4. Blockierungsanalysen (Cold Target Assays)	48
3.5. Chromogranin A-Färbung von Gewebeschnitten der Nebennieren	49
3.6. Immunhistologische Analyse	50
3.6.1. Analyse von tumorinfiltrierten zytotoxischen T-Zellen	50
3.6.2. Analyse der TumorgroÙen	51
4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung	60
6. Summary	61
7. Literaturverzeichnis	62
8. Anhang	76
8.1. Abbildungsverzeichnis	76
8.2. Tabellenverzeichnis	77
9. Danksagung	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Avidin-Biotin Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
β 2m	beta-2-Mikroglobulin
CD	Differenzierungscluster („ <i>cluster of differentiation</i> “)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure („ <i>completary DNA</i> “)
CgA	Chromogranin A
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
⁵¹ Cr	Chrom-51
CT	Calcitonin
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
DCs	Dendritische Zellen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
EC-Zellen	enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
E:T	Effektor:Zielzellen-Verhältnis
FACS	fluoreszenz-aktivierter Zellsorter („ <i>fluorescence activated cell sorter</i> “)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszenz-5-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht („ <i>Forward Scatter</i> “)
GEP	Gastroenteropankreatisches System
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen („ <i>human leucocyte antigen</i> “)
HCl (aq)	Salzsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
LK	Lymphknoten
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>"Magnetic Cell Sorting"</i>)
MEN 2	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>"Major Histocompatibility Complex"</i>)
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
mPC	Murine Phäochromozytomzellen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>"messenger ribonucleic acid"</i>)
mMTC	Murines medulläres Schilddrüsenkarzinom (<i>"murine medullary thyroid carcinoma"</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neuroendokrine Tumore
NF-1	Neurofibromatose Typ 1 Recklinghausen
NK	Natürlichen Killerzellen
NKT	Natürlichen Killer T-Zellen
P	Peptid
P1-P6	Peptide 1 bis 6
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>"phosphate buffered saline"</i>)
PC	Prohormonkonvertase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>"polymerase chain reaction"</i>)
PE	Phykoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHEO	Phäochromozytom
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
RET	<i>"rearranged during transfection"</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>"ribonucleic acid"</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverses Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>"reverse transcription-polymerase chain reaction"</i>)
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>"Side Scatter"</i>)
StAW	Standardabweichung
T	Tetramer
T1-T6	Tetramer 1 bis 6
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAE	Tris-Acetat-EDTA-(Puffer)

TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helferzellen
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

Das neuroendokrine Zellsystem des Menschen umfasst eine Vielzahl verschiedener endokriner Zellen mit neuronalen Merkmalen, die in der Lage sind, spezifische Marker-Proteine, Hormone und/oder Polypeptide zu synthetisieren. Früher wurden diese Zellen zu dem sogenannten APUD-System zusammengefasst. Mittlerweile bezeichnet man diese Zellen allgemein als neuroendokrine Zellen. Diese sind z. B. im gastrointestinalen System nachzuweisen, aber auch in der Schilddrüse, in der Nebenschilddrüse und dem Nebennierenmark. Neuroendokrine Tumore (NET) sind Neoplasien, die von den neuroendokrinen Zellen abstammen. Zum großen Teil sind sie im Gastrointestinaltrakt lokalisiert. Dort werden sie unter anderem als Karzinoide bezeichnet. Daneben gibt es noch neuroendokrine Tumore der Schilddrüse (medulläres Schilddrüsenkarzinom) oder auch Nebenschilddrüsentumore. Auch das Nebennierenmark gehört zum neuroendokrinen System. Tumore, die hier entstehen, werden als Phäochromozytome bezeichnet. In den sympathischen Nerven des Grenzstranges können ebenfalls Tumore entstehen, die wie Phäochromozytome imponieren. Diese werden als Paragangliome bezeichnet, die nicht selten maligne sind. Phäochromozytome sind Katecholamin-produzierende Tumore, die insbesondere mit einem Hormonexzess-Syndrom und daraus resultierenden Blutdruckkrisen einhergehen. Extraadrenale Phäochromozytome (Paragangliome) sind häufig nur wenig Hormon-sezernierend. Die Therapie der Phäochromozytome liegt in der operativen Entfernung des Tumors (40,76,77). Phäochromozytome können sporadisch auftreten oder vererbt werden. Hereditäre Phäochromozytome, die meist multipel und bilateral sind, werden manchmal erst durch Manifestation anderer Tumorerkrankungen wie zum Beispiel den multiplen endokrinen Neoplasien Typ 2a (MEN 2a), Typ 2b (MEN 2b) detektiert (97,155). Diese Tumorerkrankungen werden durch verschiedene Mutationen, meistens im Kodon 634 im Exon 11 des RET-Protoonkogens, verursacht. Die meisten Phäochromozytome sind benigne Tumore. Im Falle eines Kapseldurchbruchs oder einer Gefäßinvasion kann schon die Diagnose eines Malignoms gestellt werden. Ansonsten kann die Diagnose erst mit dem Auftreten von Metastasen in Leber, Lunge, Skelett oder auch in Lymphknoten bewiesen werden (36,76,136). Der Malignitätsgrad ist abhängig von der Lage des Primärtumors und der zugrundeliegenden Keimbahnmutation und kann zwischen 10 % und 40 % oder mehr variieren (5). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 50 % für maligne Phäochromozytome (16,68). Für die metastasierten Phäochromozytome und Paragangliome existiert bisher kein kurativer Therapieansatz. Es kommt die nuklearmedizinische Therapie mit Metaiodbenzylguanidin (MIBG) zum Einsatz, die in Abhängigkeit des Speicherverhaltens zu einer Regression der Metastasen führen kann. Eine komplette Remission ist selten zu erreichen (137). Eine neue Therapieoption stellt der Einsatz des Multikinaseinhibitors Sunitinib

dar (91,169). Auf Grund dieser Daten ist es zwingend erforderlich, neue Therapien zu erforschen. Eine Vakzinierung stellt dabei eine Möglichkeit dar. Im vergangenen Jahrzehnt wurde eine Vielzahl an Studien zur Anti-Tumorimmunisierung bei Patienten mit metastasierten malignen Erkrankungen durchgeführt. Einen vielversprechenden Ansatz liefert dabei die Zelltherapie mit sogenannten dendritischen Zellen (DCs). Andere Therapie-Optionen sind z. B. der adaptive T-Zell-Transfer (35,73,83). Um eine Immuntherapie durchführen zu können, bedarf es jedoch der Identifizierung von spezifischen Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs). TAAs sind Oberflächenmoleküle wie z.B. sezernierende Proteine, Membranproteine oder Rezeptoren, die meistens spezifisch von Tumorzellen produziert werden. Sie werden häufig auf der Oberfläche von Tumorzellen überexprimiert und vom Immunsystem als fremd erkannt, das wiederum zytotoxische T-Zellen aktiviert, um diese Tumorzellen zu zerstören.

Da neuroendokrine Tumore hohe Mengen an Polypeptidhormonen sezernieren, könnten diese als spezifische Tumorantigene verwendet werden. Ein Vertreter dieser Tumormarker ist das Chromogranin A (CgA). CgA könnte als potentielles Zielmolekül dienen, weil es sehr konzentriert in sekretorischen Vesikeln neuroendokriner Zellen und als Vorläufer verschiedener funktioneller Peptidhormone zu finden ist (38,41,53,123,159).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits tumorspezifische Polypeptidhormone (Calcitonin und Parathormon), die spezifisch von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, identifizieren (13,14,112,113,141). In der Arbeitsgruppe von Professor Schott konnte die Fähigkeit von dendritischen Zellen (DCs), als Antigen-präsentierende Zellen (APC) zur Induktion tumorspezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten (CTLs) genutzt werden (112,141,171). In einem Mausmodell, sowie bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom (MTC), konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit reifen DCs, die mit Calcitonin (CT) beladen waren, zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums bei Ret/Cal-Mäusen und einer Regression von Tumoren bei Patienten führte. Weil DCs als einzige in der Lage sind, Antigene in der Peripherie aufzunehmen und sie zur antigenspezifischen Aktivierung naiver T-Zellen in den sekundären Lymphorganen zu präsentieren, sind sie von besonderem immunologischem Interesse.

1.1. Die adaptive Immuntherapie

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine hohe Antigenspezifität aus, im Gegensatz zum antigenunspezifischen angeborenen Immunsystem. Dabei bildet das adaptive Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis aus. Ein wichtiger Faktor für die Induktion einer adaptiven Immunreaktion ist die Fähigkeit, Antigen präsentieren zu können. Diese Fähigkeit besitzen neben den Makrophagen auch die DCs. Im Vergleich zu den Makrophagen reichen wenige DCs aus, um eine T-Zell-Antwort auszulösen und werden daher als

professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet. Unreife DCs sind in der Lage eine effektive Immunantwort zu initiieren, indem sie Antigene in der Peripherie aufnehmen, prozessieren und sie nach Migration in lymphatisches Gewebe den T-Zellen präsentieren (Abbildung 1).

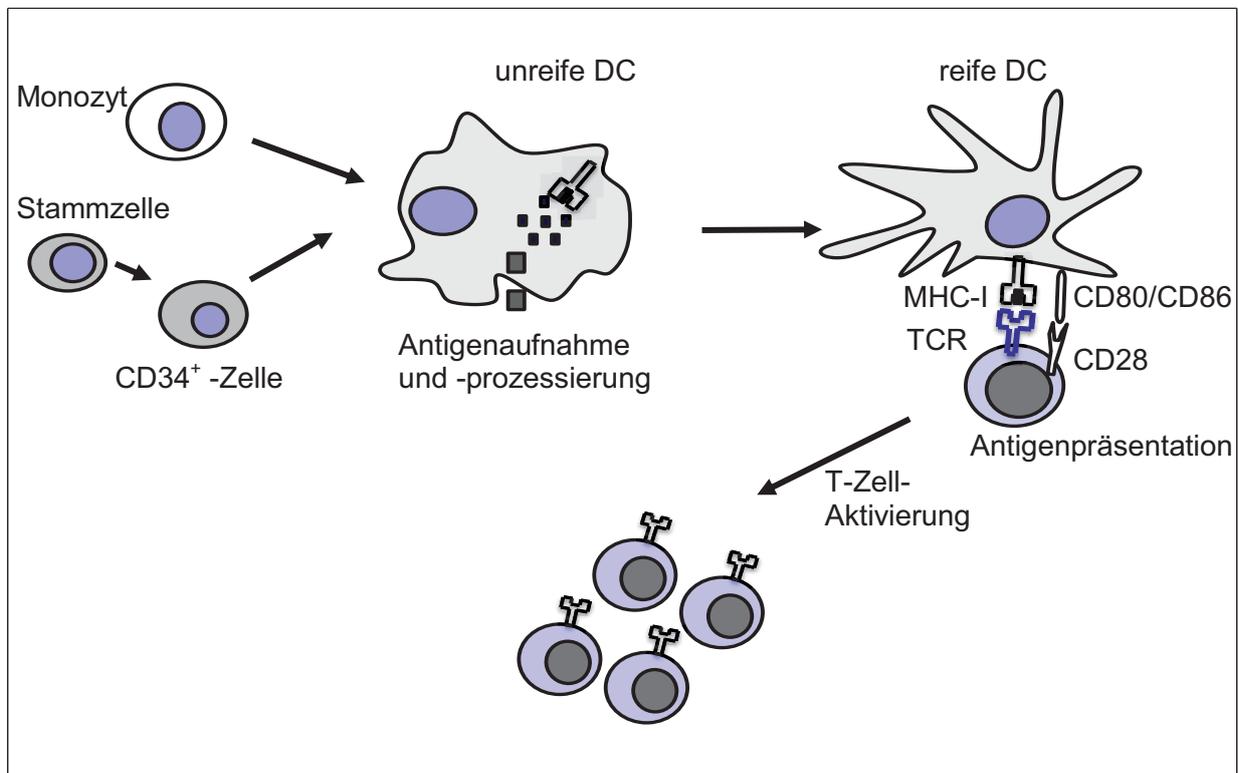


Abbildung 1: Rolle der dendritischen Zellen bei der Induktion einer Immunantwort

Aufgrund fortschreitender Erkenntnisse und technischer Möglichkeiten werden für die Tumorerkrankungen zunehmend adaptive Immuntherapiestrategien entwickelt. Ziel der adaptiven Immuntherapie ist die Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort. Hierbei werden Mechanismen des Immunsystems zur Eliminierung von definierten Zielzellen ausgenutzt. Dabei erkennt das Immunsystem die Tumorzellen meistens ohne Probleme, aber deren Eradikation misslingt jedoch, weil die Tumore über zahlreiche Strategien verfügen um der Immunabwehr zu entkommen, die sogenannte Immunescape (*tumor escape*)-Mechanismen. Immunescape-Mechanismen wie z.B. fehlende bzw. herunterregelte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle (26), Hemmung der IL-2-Produktion (125), Modulation natürlicher Killerzellen (NK), fehlende kostimulierende Faktoren wie z.B. B7 und CD40 (3) oder Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie VEGF, TGF- β , Prostaglandine und IL-10, führen zur ineffektiven Immunantwort (34). Aufgrund der Vielfalt immunsuppressiver Mechanismen der Tumoren sind Behandlungsmöglichkeiten gefragt, die diese Mechanismen durchbrechen und eine effiziente, und dauerhafte Immunantwort gegen den Tumor induzieren können. Jedoch kann die natürliche Anti-Tumor-

Antwort durch einige Methoden, wie z.B. die Injektion von TAAs zusammen mit verschiedenen Adjuvantien wie Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) (88), Toll-Like-Rezeptor-Ligande (TLR) (165) und DCs wiederhergestellt oder verstärkt werden. Der Einsatz von Interferon-alpha (IFN- α) konnte auch zur Aktivierung von CTLs und NKs führen (112,113). Infolgedessen besteht einer erfolgreichen Therapie darin das Effektorsystem zu stärken, um eine adäquate Eliminierung der Tumorzellen zu induzieren. Neben CTLs und DCs sind auch Antigene wichtig für eine erfolgreiche Anti-Tumor-Immuntherapie von Bedeutung.

1.2. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) gehören zur Gruppe der Leukozyten und wurden erstmals von Steinman und Cohn nachgewiesen (153). DCs sind heterogen und unterscheiden sich in ihrer Funktion, in ihrer Lokalisation und der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle. Sie sind in den lymphatischen Organen, den Lymphknoten und der Milz, sowie in der Epidermis der Haut vorhanden. DCs spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer zellulären Immunantwort. Unreife DCs sind in der Lage eine effektive Immunantwort zu initiieren, indem sie Antigen in der Peripherie aufnehmen und sie auf MHC-Molekülen präsentieren. Verschiedene Faktoren wie Pathogene, Zytokine, Antigene aber auch T-Zellen können unreife DCs dazu veranlassen, sich phänotypischen und funktionellen Veränderungen zu unterziehen, welche zur Reifung dieser Zellen führt. Kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 die auf reifen DCs stark exprimiert werden, sind wichtig für die Stimulatorische Potenz von DCs. Die Hauptaufgabe dieser Zellen ist die Regulation des Immunsystems, indem sie Fremdartigene (u.a. TAAs) im Körper aufnehmen, prozessieren und sie nach Migration in die regionären Lymphknoten und in die Milz den T-Zellen präsentieren (9). Darüber hinaus besitzen DCs die Fähigkeit exogen aufgenommene Antigene sowohl auf MHC-Klasse II- als auch auf MHC-Klasse I-Molekülen exprimieren. Durch diese Eigenschaft können DCs Antigene über die MHC-Klasse II-Moleküle den T-Helferzellen (CD4⁺ T-Zellen) präsentieren, die daraufhin Zytokine freisetzen und verschiedene Immunzellen zur antigen-spezifischen Immunreaktion primen. Aber es kann auch über die MHC-Klasse I-Moleküle durch sogenannte Kreuzpräsentation zu einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) kommen (12,51). Außerdem können DCs auch eine humorale Immunität induzieren, indem sie naive B-Zellen, NK und NKT-Zellen aktivieren (92).

Die Auswahl des richtigen Antigens als Angriffsziel ist für eine zielgerichtete Zerstörung der Tumorzellen sehr wichtig. Leider liefert die Analyse des Tumormaterials nur selten ein komplettes Antigenpanel, das zur Vakzinierung verwendet werden kann. Deshalb ist die Identifizierung neuer Tumorantigene für Tumorerkrankungen von großer Bedeutung.

Die Idee, CgA als TAA zu verwenden, ist in der Erkenntnis begründet, dass neuroendokrine Tumore hohe Mengen an CgA sezernieren und dieser Tumormarker auf der Oberfläche neuroendokriner Tumorzellen zu finden ist.

1.3. Chromogranin A

CgA ist ein saures, hydrophiles Glykoprotein aus 439 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa, das zur Granin-Gruppe gehört. CgA wird überwiegend in sekretorischen Vesikeln durch enterochromaffine Zellen (EC-Zellen) synthetisiert. Nach der Synthese wird es exozytotisch über das endoplasmatische Retikulum transportiert und aus der Zelle (Abbildung 2) mit einer Vielzahl von Hormonen kosezerniert. CgA wird als Signalsubstanz in Sekretgranula von neuroendokrinen Zellen gespeichert und dient als Vorläufer hormonell aktiver Substanzen des neuroendokrinen Systems. In den Speicher-Granula reguliert CgA die Aktivität von Peptidasen (z.B. Prohormon-Konvertasen) durch Substrat-Kompetition und moduliert die Packung der Botenstoffe. Ebenso spielt CgA eine wichtige Rolle bei der Sekretion und Regulation von Peptidhormonen und Neuropeptiden (107,158). CgA ist ein Glykoprotein, das verschiedene Domänen dibasischer Aminosäuren (AS) enthält, die zu gewebespezifischen, biologisch aktiven Peptiden verarbeitet werden können. Je nach gewebespezifischen Proteasen können durch autokrine und parakrine Mechanismen verschiedene Fragmente wie Pankreastatin, Catestatin, Parastatin, Vasostatin und Chromacin entstehen, die bakteriolytische und antifungale Eigenschaften besitzen und regulatorisch die Sekretion von Katecholaminen aus der Nebenniere und von Parathormonen hemmen (147,158). CgA kommt in normalen neuroendokrinen Geweben ubiquitär vor und wird hauptsächlich im Nebennierenmark überexprimiert (106). CgA wird von einer Vielzahl funktionaler als auch nicht funktionaler neuroendokriner und endokriner Tumore sezerniert wie dem Phäochromozytom, dem medullären Schilddrüsenkarzinom, den Karzinoiden, dem Nebenschilddrüsenkarzinom, dem neuroendokrinen Lungenzellkarzinom und den Tumoren der Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (29,39,101,103,108,146). Aufgrund dessen kann es als klassischer Marker für immunhistochemische Analysen von neuroendokrinen Tumoren dienen (101,108,158). Auch andere Erkrankungen, wie z.B. die nicht-endokrinen Neoplasien (Prostatakarzinom und hepatozelluläres Karzinom), der Bluthochdruck, (106), die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (95), die Nieren- (104,175) und Herzinsuffizienz (18) und die chronisch atrophische Gastritis, können mit erhöhten CgA-Werte einhergehen. Wegen seiner hohen Sensitivität als immunhistochemischer Marker wird CgA auch zum histologischen Nachweis der Expression verschiedener Antigene der Gewebeschnitte oder der Einzelzelle zum Rückschluss auf spezifische Zell- und Gewebefunktionen verwendet.

Als besonders stabiles und gut reagierendes Protein eignet sich CgA gut für die Diagnostik. Zur Diagnosestellung der Tumoren kann eine starke Erhöhung des CgA-Plasmaspiegels, der eine starke Korrelation mit der Tumormasse aufweist, sehr hilfreich sein (1,43,44,60,101,103).

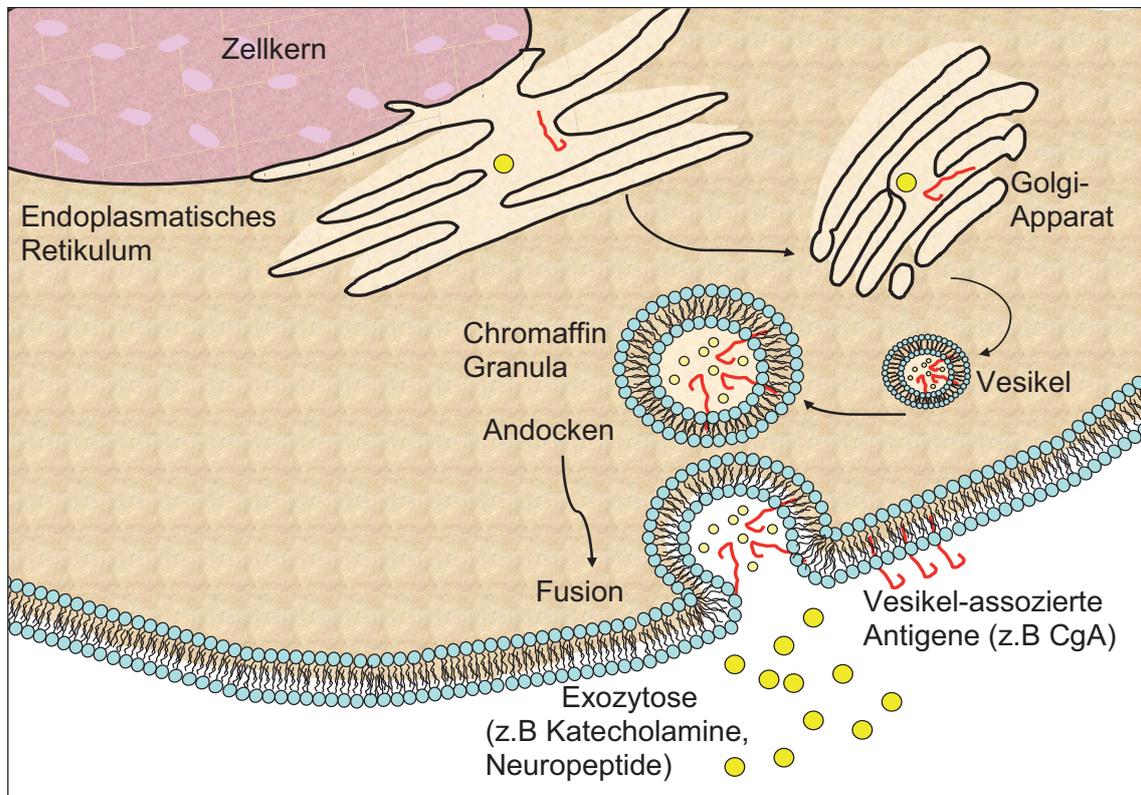


Abbildung 2: Sekretionsweg von Chromogranin A. Chromogranin A wird nach der Synthese über das endoplasmatische Retikulum exozytotisch zum Golgi-Apparat und anderen Zellmembranen transportiert und aus der Zelle ausgeschleust (modifiziert aus: Ehlers *et al.*, Identifying of TAA; Trends in Endocrinology & Metabolism, 2009).

Die Immunreaktivität von CgA wurde zum ersten Mal von O'Connor und Bernstein beschrieben (102). Seitdem konnten die Struktur und einige immundominante CgA-Epitope durch Peptid-Mapping und Peptid-Antikörper Bindungsexperimente charakterisiert werden (19,32,42). Hierbei wurden zwei stark bindende immunogene Bereiche in den Regionen CgA₇₉₋₁₁₃ und CgA₉₁₋₁₀₂ identifiziert (25,42). Die ausstehende Frage ist, ob diese oder andere CgA-Epitope als Zielmoleküle spezifisch von CTLs erkannt werden und für die Entwicklung effektiver immuntherapeutischer Ansätze bei neuroendokrinen Tumoren, vor allem beim malignen Phäochromozytom, genutzt werden können. Die Untersuchung der Funktion von CgA-Epitopen als therapeutische Zielantigene wurde zum ersten Mal an Patienten mit Mitteldarm-Karzinoiden, die hohe Mengen CgA aufwiesen, durchgeführt (168). Dabei wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen und RT-PCR in Blutproben von Patienten ein erhöhter Anteil an spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert, die ein HLA-A*0201 restringiertes Bindungsmotiv für das CgA erkannten (167,168). Hier wurde der Nachweis größerer Mengen

CgA-spezifischer und Interferon-gamma (IFN- γ) produzierender CD8⁺ T-Zellen erbracht. Dieses Ergebnis zeigte, dass CgA als potentielles Tumorantigen verwendet werden könnte. Außerdem wurde festgestellt, dass eine Patientengruppe mit niedriger Tumorlast eine höhere Häufigkeit für CgA im Vergleich zu Patienten mit hoher Tumorlast hatte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass eine höhere Tumorlast weitgehend die Aktivität der tumorreaktiven T-Zellen herabsetzt oder blockiert (127).

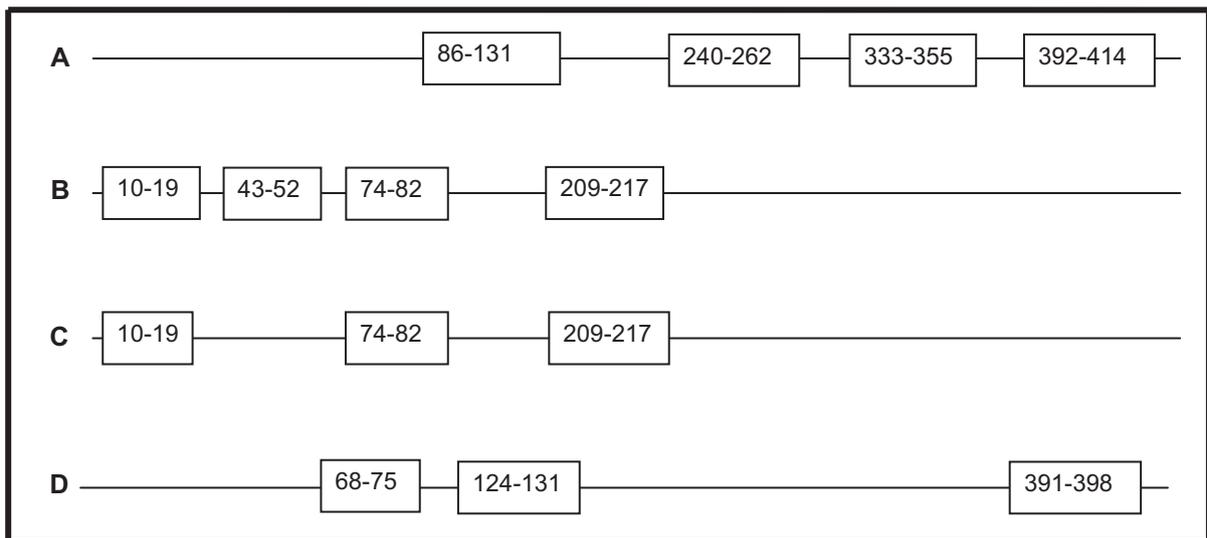


Abbildung 3: Potentielle CgA-Epitope mit immunmodulatorischen Eigenschaften. (a): Antigen-Bereiche, die von Corti *et al.* nachgewiesen wurden (25). (b): die mit dem Computer-basierten Algorithmus BIMAS identifizierte immunogenen Bereiche (74) sowie (c) nachgewiesenes immunogenes HLA-A*0201 Bindungsmotiv (168) und (d): die mit www.syfpeithi.de identifizierte Bereiche.

1.4. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine CgA-basierte Immuntherapie für die Behandlung von malignen Phäochromozytomen zu etablieren. Hierzu sollten syngene Tumormäuse mit CgA-Peptiden beladenen reifen DCs immunisiert werden. Als Versuchstiere wurden transgene Ret/Cal-Mäuse genutzt, da diese Mäuse eine Mutation im Ret-Protoonkogen aufweisen, die auch bei Patienten mit endokrinen Tumoren zu finden ist (85). Deswegen entwickeln alle transgenen Ret/Cal-Mäuse, in denen das humane Onkogen RET überexprimiert ist, schon im Alter von drei Wochen bilaterale C-Zellhyperplasien und bilaterale MTCs. Außerdem konnten erhöhte CgA-Serumkonzentrationen bei Patienten mit diesen Tumoren nachgewiesen werden (113). Bei dem Ret-Protoonkogen handelt es sich um ein Gen, das für eine Tyrosinkinase einen Rezeptor für Wachstumsfaktoren, kodiert. Dieser Rezeptor enthält mehrere Domänen mit Cystein-reichem extrazellulärem Ligand-Bindungsteil, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Substratbindungsdomäne. Mutationen im Ret-Protoonkogen führen zur

konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und somit zur ungehemmten Proliferation und schließlich zur malignen Transformation der C-Zellen der Schilddrüse (82). In dieser Studie wurden transgene Ret/Cal-Mäuse mit reifen DCs, die mit potentiellen CgA-Epitopen (siehe Abbildung 3d) beladen waren, immunisiert. Insbesondere war wichtig, ob und inwieweit eine CgA-spezifische, zytotoxische T-Zellantwort induziert werden konnte, und inwieweit diese Zellen eine zytotoxische Aktivität aufweisen.

Mit Hilfe einer Tetramer-Analyse sollte der Anteil induzierter CgA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ermittelt werden. Weiterhin sollte in einem funktionellen Test die zytotoxische Aktivität dieser reaktiven T-Zellen gegen Phäochromozytomzellen untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere die Effizienz der immundominanten CgA-Epitope ermittelt werden. Dies geschah auf der Basis eines Computer-basierten Algorithmus (www.syfpeithi.de) mit dessen Hilfe CgA-Epitope mit hoher Bindungsaffinität zu den immunologischen Oberflächenmolekülen MHC-Klasse-I (HLA-Moleküle) ermittelt wurden. Mit der Epitopvorhersage lässt sich a priori eine geringere Anzahl möglicher Peptide detektieren, gegen die eine T-Zell-Antwort generiert werden kann. Hierbei wurden neben den unter Abbildung 2D aufgeführten CgA-Epitopen drei weitere ausgewählt, die den Epitopen möglichst ähnlich waren, aber höhere Bindungswahrscheinlichkeiten zum MHC-Klasse-I (H-2K^b) aufwiesen. Dabei wurden den drei physiologischen CgA-Epitopen CgA₆₈₋₇₅, CgA₁₂₄₋₁₃₁ und CgA₃₉₁₋₃₉₈ mit den Bindungswerten von 14 bis 19 drei weitere hinzugefügt, die durch gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz höhere Bindungswerte von 24 und 30 aufwiesen. Es ist bekannt, dass Epitope mit Bindungswerten ≥ 15 signifikant immunogen sind. So könnten Epitope mit höheren Bindungsaffinitäten stark immunogen wirken, da sie sich möglicherweise perfekt in die Bindungstasche eines MHC-Moleküls einfügen. Jedoch blieb ungeklärt, ob diese Peptide auch als natürliche Liganden tatsächlich in vitalen Zellen gebildet werden (121). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, spezifische CgA-Epitope als Zielantigene zu verwenden, um eine Immunisierungsstrategie zu entwickeln die eine effizientere Behandlung von malignen Phäochromozytomen ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Automatic Gamma Counter 1470 Wizard	Wallac, Watertown (USA)
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
FACS-Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland)
Injektionskanülen (20G)	Braun, Melsungen (Deutschland)
Insulinspritzen (1 ml/U)	Braun, Melsungen (Deutschland)
Kryostat: Jung Frigocut 2800 E	Leica Microsystem; Wiesbaden (Deutschland)
Kryoröhrchen (1 ml)	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
MACS Separations-Säulen (MS/LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar (Deutschland)
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde (Deutschland)
Petrischalen (94 ×16 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Starlab, Ahrensburg (Deutschland)
Separationsfilter (<i>Cell Strainer</i> : 40/70 µl)	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Spitzen (5/10/20 ml)	Braun, Melsungen (Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Zellkulturflaschen (250/550 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Zellkulturröhrchen (15/50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Zentrifuge Universal R 40	HettichLab, Mülheim a.d. Ruhr (Deutschland)
Zentrifugentube (0,5/1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

2.1.2. Chemikalien, Enzyme und Zytokine

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Accutase	PAA Laboratories, Pasching (Deutschland)
Accumax	PAA Laboratories, Pasching (Deutschland)
AEC+ Substrate Chromogen	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)
Biotin Blocking	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)

BSA stock solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Chrom ⁵¹	Hartmann Analytik, Braunschweig (Deutschland)
DEPC treated water	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
DMSO (Dimethyl sulphoxide)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)
dNTP Mix (10 mM)	Promega, Heidelberg (Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Gel loading solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)
GO Taq, DNA Polymerase	Promega, Heidelberg (Deutschland)
green GO Taq Buffer (5 ×)	Promega, Heidelberg (Deutschland)
Hämatoxilin Gill II	Merck, Darmstadt (Deutschland)
HCL _{aq} (1 N),	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Humanalbumin (20 % Octalbin)	Aventis Behring GmbH, Marburg (Deutschland)
L-Glutamin (100 ×)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
MgCl ₂ (25 mM)	Promega, Heidelberg (Deutschland)
NaCl (0,9 %)	Braun, Melsungen (Deutschland)
Natrium Pyruvat (100 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Natronlauge (0,1 mol)	Riedel-de Haën, Seelze (Deutschland)
Nichtessentielle Aminosäure	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin (10000 U/ml)	
Streptomycin (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)
Peroxidase Blocking Reagenz	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)
Pferde Serum	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Propidiumjodid (1 mg/ml; 1000 ×)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)
Purified anti-maus H-2K ^b	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Purified anti-maus H-2K ^d	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Purified anti-maus H-2D ^b	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Ready-To-Go TM	Amersham Biosciences, Piscataway (USA)
Ret/Cal Sonde	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin (Deutschland)
rMaus GM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden (Deutschland)
rMaus IL-2	R&D Systems, Wiesbaden (Deutschland)
Schweinsersum (normal)	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)
Taq Man [®] , universal PCR Master Mix	AB, Roche, Mannheim (Deutschland)
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)
Tris-Acetat-EDTA Buffer (TAE, 10 ×)	SERVA GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Tween 20	Sigma, Steinheim (Deutschland)

2.1.3. Kits

ABC kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
DNeasy, Blut- und Gewebe Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Maus IFN- γ Sekretionsprobe	Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Pan T-Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)
RNeasy Protect; Mini Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)

2.1.4. Medien und Puffer

CellGro® DC	CELL Genix, Freiburg (Deutschland)
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Qiagen, Hilden (Deutschland)
FACS-Abreiniger/Spülen	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Paramount Mounting-Medium	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)
FcR Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Tissue-Tek®, OCT Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoude (Niederlande)

2.1.5. Lösungen

Einfriermedium: 90 % FKS (100 %) und 10 % DMSO (100 %)

DNS-Agarose Gel: 1× TAE (10 ×), 1,7 % Agarose (100 %), 0,7 $\mu\text{g/ml}$ EtBr (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ad dH₂O

HCl (0,5 N): 5 ml 1 N HCl ad 100 ml dH₂O

Tween 20 (10 %): 0,1 % Tween 20 ad dH₂O

DNS-Elektrophorese Laufpuffer (1 ×): 1 ml TAE (10×) ad 9 ml dH₂O

Waschpuffer: 0,5 % BSA in PBS

2.1.6. Zellkulturmedien

Zur Ausreifung von DCs:

DC-Medium

5 % FKS

50 U/ml Penicillin / Streptomycin

200 U/ml mGM-CSF

ad 50 ml Cell Gro DC

Zur Kultivierung von T-Zellen:**IL-2-Medium**

0,03 % L-Glutamin (w/v)
 10 % FKS
 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
 25 U/ml mIL-2
 ad RPMI 1640 (50 ml).

Zur Kultivierung von murinen Tumorzellen:**mPC-Medium**

0,03 % L-Glutamin (w/v)
 0,03 % Natriumpyruvat
 5 % FKS
 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
 0,03 % nichtessentielle Aminosäure
 10 % Pferdeserum

mMTC-Medium

0,03 % L-Glutamin (w/v)
 0,03 % Natriumpyruvat
 5 % FKS
 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
 4,5 g/l D-(+)-Glukose
 10 % Pferdeserum

2.1.7. Mäusstämme**2.1.7.1. C57BL/6-Inzuchtstamm**

Für die Experimente wurden weibliche und männliche Mäuse verwendet. Die Mäuse stammten aus der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Diese Mäuse besaßen den H-2K^b-Phänotyp der MHC-Klasse-I und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Diese Mäuse hatten ein Gewicht von ca. 20-25 g.

2.1.7.2. Ret/Cal-Mäuse

Ret/Cal-Mäuse sind transgene Mäuse, die durch eine Kreuzung von C57BL/6-Mäusen mit Mäusen des Inzuchtstammes DBA 2 entstanden sind (86). Die Versuchstiere verfügen über eine Mutation im RET-Protoonkogen an der Position 634 wie die meisten Patienten, die an „Multiple endokrine Neoplasie Typ 2a“ (MEN 2a) erkrankt sind. Bei dieser Mutation wird der Cysteinrest 634 durch ein Argininrest ersetzt (TGC → CGC). Aufgrund dieser Ret-Protoonkogen Mutation entwickeln die Mäuse ab der dritten Woche bilaterale C-Zellhyperplasien und später ein medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC) und produzieren erhöhte Mengen an Calcitonin, das zur Diagnose des Tumors hilfreich ist. Das MTC tritt meistens in Assoziation mit primärem

Hyperparathyreoidismus und Phäochromozytomen auf. Deshalb zeigten diese Mäuse infolge erhöhter CgA-Konzentration eine Hyperplasie des Nebennierenmarks. Für die Versuche wurden transgene Mäuse aus dem Labor von Professor Saarma der Universität Helsinki (Finnland) eingesetzt. Für die Experimente wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet.

2.1.8. Zelllinien

2.1.8.1. Murine Phäochromozytom-Zelllinie (mPC)

Die mPCs wurden freundlicherweise von Professor A. Tischler vom Institut für Pathologie, Tufts Medical Center, Boston (USA) bereitgestellt. Diese mPCs exprimieren hohe Mengen an CgA und in hoher Dichte das MHC-Molekül H-2K^b.

2.1.8.2. Kontrollzelllinie

Als Kontrollzelllinien wurden eine murine medulläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie (mMTC; ATCC: CRL 1806) und OT-1 Zellen verwendet.

Die mMTCs exprimieren das MHC-Klasse-I Allel H-2D^b und große Mengen an CgA. Die OT-1 Zellen stammten aus OT-1 Mäusen. Diese Mäuse stellen ein transgenes Mausmodell für den passenden spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) dar, welcher die MHC-Klasse-I (H-2K^b)-Moleküle und das Ovalbumin spezifische Tetramer (SIINFEKL) erkennt. Weil mehr als 90 % aller OT-1 Zellen dieser Mäuse das Transgen tragen, dienten diese Zellen als positive Kontrolle für die Tetramer-Analyse. Die OT-1 Zellen stammten von der Firma Glycotope, Heidelberg (Deutschland).

2.1.9. Antikörper

2.1.9.1. Fluorochrom-markierte Antikörper

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland) bezogen.

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Cat. No.
CD3	145-2C11	Hamster-anti-Maus	ham-IgG1	FITC	555274
CD29	Ha2/5	Hamster-anti-Maus	ham-IgM	FITC	555005
CD40	3/23	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	FITC	553790
CD14	rmC5-3	Ratte-anti-Maus	rat-IgG1	FITC	553739
CD11b	M1/70	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2b	FITC	553310
CD19	1D3	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	PE	553786
CD69	MIH5	Hamster-anti-Maus	ham-IgG1	PE	553237
CD11c	HL 3	Hamster-anti-Maus	rat-IgG1	FITC	553801
CD45- B220	RA3-6B2	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	FITC	503093
CD49b	HM α 2	Ratte-anti-Maus	rat-IgG1	PE	558759
CD80	16-10 A1	Hamster-anti-Maus	ham-IgG2	FITC	553768
CD86	GL1	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	PE	553692
I-A ^K	MHCII 10-3.6	Ratte-anti-Maus	rat-IgG1	FITC	553540
Ly-6C	RB6-8 C5	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2b	PE	553128
NK1.1	PK136	Maus-anti-Maus	rat-IgG2a	FITC	557391
RT-1 ^A	MHCI OX-18	Maus-anti-Ratte	rat-IgG2a	PE	559993

Die entsprechenden Isotypen wurden parallel als Kontrollen verwendet.

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Cat. No.
Isotyp	A19-3	Hamster-anti-Maus	ham-IgG1	PE	553954
Isotyp	HA418	Hamster-anti-Maus	ham-IgG2	FITC	550056
Isotyp	A110-1	Ratte-anti-Maus	rat-IgG1	FITC	553924
Isotyp	RA3-34	Ratte-anti-Maus	rat-IgG1	PE	553925
Isotyp	R35-95	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	FITC	553929
Isotyp	R35-95	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2a	PE	553930
Isotyp	30-F11	Hamster-anti-Maus	CD45	FITC	553079
Isotyp	30-F11	Hamster-anti-Maus	CD45	PE	553081
Isotyp	G235-1	Hamster-anti-Maus	ham-IgM	FITC	553960
Isotyp	A95-1	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2b	FITC	556923
Isotyp	R35-95	Ratte-anti-Maus	rat-IgG2b	PE	553989

2.1.9.2. konjugierte Antikörper mit paramagnetischen MikroBeads

Alle MikroBeads stammen von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland).

MikroBeads	Isotyp	Klon
Anti- Maus CD11c	ham IgG1	N418
Anti-Maus CD4	rat IgG 2b	L3T4

2.1.9.3. Antikörper für die immunhistologische Färbung

Die Gefrierschnitte wurden vor der Färbung mit entsprechenden Antikörpern markiert.

Erstantikörper	Hersteller
Ratte anti-Maus CD4 (GK1,5), Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Oregon (USA)
Kaninchen anti-Maus CD3, Polyklonal	Abcam, Cambridge (England)
Ratte anti-Maus CD8 α (53-6,7), Monoklonal	AbD Serotec, Oxford (England)
Kaninchen anti-Chromogranin A, Polyklonal	Abcam, Cambridge (England)
Zweitantikörper	
Biotinylierter Affinität aufgereinigte Maus anti-Ratte IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Kaninchen anti-Maus IgG Peroxidase (HRP)	DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)

2.1.9.4. Selektions-Antikörper

Zur Selektion von Zellpopulationen wurden Isolationskits der Firma Miltenyi Biotec, (Deutschland) verwendet. Bei nicht konventionell vorhandenen Kits wurden die Zellen indirekt mit Biotin markiert. Dazu wurden Biotin-markierte Antikörper der Firma BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland) und anschließend anti-Biotin-MikroBeads der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland) verwendet.

Pan-T-Zell Isolationskit:

Bestehend aus:

- Cocktail aus Biotin-konjugierten, monoklonalen Antikörpern gegen CD11b (Mac-1; Ratte IgG2b), CD45R (B220; Ratte IgG2a), CD49b (DX5; Ratte IgM) und Ter-119 (Ratte IgG2b).
- Anti-Biotin MikroBeads: Monoklonale Anti-Biotin-Antikörper, konjugiert mit kolloidalen super-paramagnetischen MikroBeads (Klon: Bio3-18E7.2; Maus IgG1)

Maus IFN- γ Sekretionsproben und Detektionskit:

Bestehend aus:

- Fang-Reagenz: Gegen Maus IFN- γ (Ratte IgG1) gerichtete Antikörper, konjugiert mit gegen CD45 (Ratte IgG2b) gerichtete Maus-Antikörper
- Antikörpererkennung: Gegen Maus IFN- γ (Ratte IgG1) gerichtete Antikörper, konjugiert mit PE gegen MikroBeads.

- Gerichtete Antikörper (PE): Monoklonale Maus-Anti-PE-Antikörper (Maus IgG1), konjugiert mit kolloidalen super-paramagnetischen MikroBeads.

2.1.10. Primer

Die Primer stammen von TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin (Deutschland).

Zur Untersuchung der HLA-Phänotypen von transgenen Ret/Cal-Mäusen und Kontrolltieren wurden die folgenden humanen und murinen Primer-Sequenzen verwendet.

Bezeichnung	Sequenz
retcal-Maus-fw	5'-GCA-CAG-GAG-CCG-CTG-CCC-AGA-TCA-AGA-GTC-AC-3'
retcal-Maus-rev	5'-CAG-GAG-CTA-TGG-TCC-AGG-CTC-CGG-TTA-AGG-3'
mur RET se	5'-GACGCCCTGAGGAG-3'
mur RET as	5'-AGCCGTGTACGGTAGACG-3'
hu RET se	5'-GACGCCCTGAGGAG-3'
hu RET as	5'-CCGTGTGCGGTACGTG-3'

2.1.11. Peptide

2.1.11.1. Murine CgA-Peptide

Mit Hilfe eines computerbasierten Algorithmus (www.syfpeithi.de) wurden sechs immunogene Bereiche des Tumormarkers CgA ausgesucht, die sich durch eine hohe Bindungsaffinität zu MHC-Klasse-I Molekülen (H-2K^b) auszeichnen. Die Peptide P4 bis P6 unterscheiden sich von den Peptiden P1 bis P3 durch den Austausch von Aminosäuren (Tabelle 1). Diese CgA-Epitope dienen zur Aktivierung von Tumorantigen-spezifischen CD8-T-Zellen aus den Lymphknoten und Milzen von immunisierten Mäusen. Alle verwendeten Peptide (P1-P6) hatten eine Länge von acht Aminosäuren und stammten von der Firma Glycotope. Die Reinheit der Peptide lag bei 90 %. Die Peptide wurden in DMSO der Firma Sigma Aldrich, Deisenhofen (Deutschland) aufgelöst, mit einer NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

Peptide		Sequenzen	Bindungs- -affinität	Peptide	Sequenzen	Bindungs- -affinität
Peptid 1	CgA ₃₉₁₋₃₉₈	RAYGFRDP	19	Peptid 4	RAYGFRDL	29
Peptid 2	CgA ₆₈₋₇₅	SILRHQNL	14	Peptid 5	SIYRFQNL	30
Peptid 3	CgA ₁₂₄₋₁₃₁	LSEVFENQ	14	Peptid 6	LSEVFENL	24

Tabelle 1: Synthetisierte Chromogranin A-Epitope und ihre Bindungsstärke zu H-2K^b

2.1.11.2. Kontrollprotein

Als Kontrollprotein wurde das Humanalbumin der Firma Aventis, Marburg (Deutschland) verwendet. Das Protein wurde auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.12. Tetramer

Tetramere sind Komplexe, die aus vier gleichen MHC-Klasse-Molekülen bestehen. (Abbildung 4) Jedes Molekül ist mit den entsprechenden Peptidantigenen beladen und über Biotin- und Fluorochrom-markiertes Streptavidin aneinander gekoppelt.

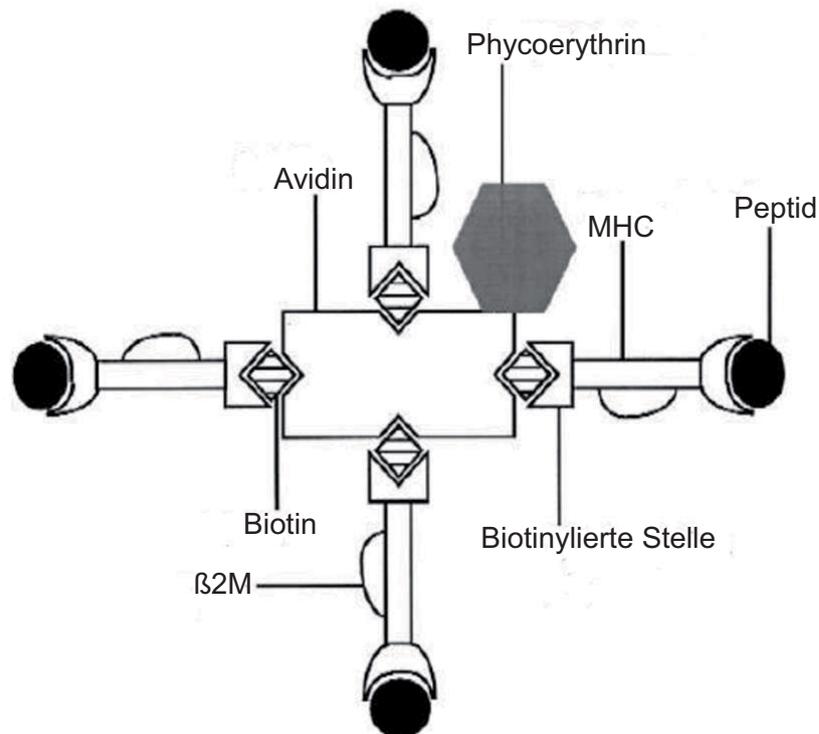


Abbildung. 4: Aufbau eines MHC Klasse-I Tetramers. (modifiziert, nach Pittet, MJ. *et al*, 2001 Intern. Immunopharmacology).
β2M: beta-2-Mikroglobulin; MHC: Histokompatibilitätskomplex

Die entstandenen peptid-spezifischen MHC-Tetramere können mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Die MHC-Tetramere können stark von spezifischen T-Zell-Rezeptoren gebunden und stabilisiert werden, was zu einer erhöhten Bindungsavidität führt. Dadurch können sie im Gegensatz zu einzelnen MHC/Peptid-Komplexen nicht schnell von der Oberfläche dissoziieren. Mit diesen MHC-Tetrameren können antigen-spezifische T-Zellen unabhängig von ihrem Funktionsstatus direkt sichtbar gemacht und genau im Durchflusszytometer gemessen werden.

Entsprechend der sechs zur Immunisierung verwendeten CgA-Epitope (P1-P6) wurden für diese CgA-Epitope spezifische Tetramere (T1-T6), die mit Phycoerythrin (PE) konjugiert waren, konstruiert (Glycotope). Als positive Kontrolle diente SIINFEKL (Glycotope). Für die Negativkontrolle wurde das humane Tetramer GNLSTCML (Glycotope), mit dem HLA Klasse-I Allel HLA-A2, eingesetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere

Der Status der transgenen Ret/Cal-Mäuse wurde durch DNA-Isolierung nach dem Herstellungsprotokoll (DNeasy, Blood & Tissue Kit) der Firma Qiagen, Hilden (Deutschland)

und PCR (siehe 2.2.2.2) ermittelt. Die Expression des RET-Genes und damit indirekt die Bestimmung der Kopienzahl wurde mit Hilfe einer RNA-Isolierung nach dem Herstellungsprotokoll (siehe DNeasy, Blood & Tissue Kit) der Firma Qiagen, Hilden (Deutschland) und einer RT-PCR (siehe 2.2.2.3) durchgeführt.

Für die Präparation der Knochenmarkzellen (siehe 2.2.6.1) und die Generierung der dendritischen Zellen (siehe 2.2.7) wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Extraktion genomischer DNA aus Mausschwänzen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurden diese kurzen Gewebestücke der Schwanzspitze abgeschnitten, mit 180 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt und anschließend mit einem Polytron Homogenisator (PT 2100 Polytron) der Firma Kinematica AG für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Die Gewebeproben wurden für 1,5 Stunden bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA-Fragmente nach Herstellungsprotokoll (DNeasy, Blood & Tissue Kit) der Firma Qiagen, Hilden (Deutschland).

2.2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Das Grundprinzip der PCR besteht in der enzymatischen Duplikation einer spezifischen DNA-Sequenz. In dieser Arbeit ermöglichte die PCR-Methode die Typisierung genomischer DNA von potentiellen transgenen Mäusen und die Expression verschiedener Gene nach cDNA Synthese durch reverse Transkription.

Nach der Präparation der DNA aus Mausschwänzen wurden sie in DEPC-Wasser aufgenommen. Für die Analyse der PCR-Produkte wurden jeweils 25 µl eines Reaktionsansatzes mit 4 µl DNA pipettiert. Anschließend wurden 1 µl MgCl₂ (1 mM), 0,5 µl dNTPs (2,5 mM von je dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,5 µl von jedem Primer (retcal-Maus fw und rev, siehe Abbildung 2.1.10), 5 µl Promega-Puffer, 13,2 µl DEPC-Wasser und 0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) zugegeben. Die PCR wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt, und die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

Denaturierung 5' 95°C

Denaturierung	1'	94°C	
Annealing	1'	57°C	30 Zyklen
Elongation	1'	72°C	

Schlussphase 7' 72°C

Die DNA-Konzentration der Amplifikate wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Gel geprüft.

2.2.2.3. Real-Time-PCR (RT-PCR)

Diese Methode diente zum quantitativen Nachweis der Genotypen der transgenen Mäuse und Kontrolltiere. Die quantitative RT-PCR ist eine Methode zur Bestimmung von DNA Mengen, die auf der herkömmlichen PCR-Methode beruht. Hier können DNA-Fragmente durch die Bestimmung von Fluoreszenz, die proportional zur Menge an PCR-Produkten zunimmt, quantifiziert werden. Diese beruht auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Effekt. Dabei befindet sich ein Donor-Fluorochrom in räumlicher Nähe eines korrespondierenden Akzeptor-Fluorochroms (Quencher), was zur Folge hat, dass bei Lichteinstrahlung keine Fluoreszenz emittiert wird. Bei dieser Arbeit wurden TaqMan® Sonden eingesetzt. Bei diesen Sonden sind Reporter (FAM, 6-Carboxyfluorescein) und Quencher (nichtfluoreszierend) auf Hybridisierungsstellen zu finden, die von der Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges abgebaut werden. Dadurch wird die räumliche Nähe aufgehoben und die Fluoreszenz kann gemessen werden.

Die Reaktionen aus 10 µl TaqMan® Master Mix (Polymerase, Transkriptase, Nukleotide und Magnesium), 0,4 µl 6FAM Sonde (10 µM) und je 0,4 µl murinen und humanen spezifischen Primern (10 µM), 7,8 µl DEPC-Wasser und 1 µl cDNA wurden in einem Volumen von 20 µl in 96 Well-Platten eingesetzt und in Zweifachansätzen bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft Excel.

2.2.3. Zellbiologische Methode

2.2.3.1. Zellkultur

Für die Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich sterile Gefäße, Puffer und Kulturmedien verwendet. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Wachstum und Morphologie der Zellen wurden täglich mit dem Mikroskop DM IL von Leica, Bernstein (Deutschland) untersucht.

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung.

2.2.3.2. Kultivierung der Zelllinien mPC und mMTC

Um zu untersuchen, ob die aktivierten T-Lymphozyten selektiv gegenüber ausgewählten Tumorzellen zytotoxisch sind, wurden mPC (Tischler A., Boston USA) und mMTC (ATCC: CRL 1806) als Zielzellen verwendet. Je 2×10^6 Zellen wurden in 175 cm^2

Gewebekulturflaschen der Firma Greiner-bio-One, Frickenhausen (Deutschland) in einem Volumen von 25 ml mit mMTC- oder mPC-Medium (siehe 2.1.6) im Brutschrank BBD 6220 von Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland) kultiviert.

2.2.3.3. Passagieren von Zellen

Die adherenten mPCs wurden mit PBS gewaschen und mit 2 ml Accutase (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) 10 min bei 37 °C inkubiert, danach mit Accumax (PAA Laboratories) vereinzelt. Die vereinzelteten Zellen wurden in frischem RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen, und mit 8×10^4 Zellen/ml in 175 cm² Gewebekulturflaschen (Greiner-bio-One, Frickenhausen (Deutschland) subkultiviert.

Parallel dazu wurden die nicht adherenten mMTC geerntet, mit PBS gewaschen und wie die mPC weiterverarbeitet.

2.2.3.4. Passagieren von Suspensionskulturzellen

Suspensionskulturzellen wurden für 5 Minuten bei $300 \times g$ und 4 °C, zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in RPMI 1640-Kulturmedium resuspendiert und nach Einstellung der Zellzahl (6×10^4 Zellen/ml) weiterkultiviert.

2.2.3.5. Zählen von Zellen

Es wurden aus der entsprechenden Zellsuspension je 10 µl abgenommen und in ein 150 µl Eppendorf-Tube mit 100 µl Trypanblau überführt. Anschließend wurden 16 µl der Zellsuspension abgenommen und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und gezählt.

2.2.3.6. Isolation von Subpopulationen mittels Mikrobeads

Das zur Zellseparation eingesetzte System (MACS[®]-System der Firma Miltenyi von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) beruht auf der magnetischen Zellsortierung (*Magnetic Cell Sorting*). Je nach Protokoll wurden bestimmte Zellpopulationen mit monoklonalen Antikörpern oder mit Biotin konjugierten monoklonalen Antikörpern, die mit paramagnetischen Mikropartikeln gekoppelt sind, markiert. Zu den mit Biotin markierten Zellpopulationen wurde zusätzlich ein Sekundärantikörper (anti-Biotin-Mikrobead) hinzugegeben. Die Zellen wurden nach Inkubation bei 4 °C und einem Waschschrift mit MACS-Puffer auf Trennsäulen (MACS MS- oder LS-Säule, Miltenyi Biotec), die am MACS-Separator (starker Magnet) fixiert sind, gebracht. Die markierten Zellen wurden durch diesen Säulenlauf am Magneten der MACS-

Säulen zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule passierten. Die Trennsäulen wurden vor Zugabe der Zellsuspensionen und nach Durchlauf der unmarkierten Zellen dreimal mit MACS-Puffer gespült. Die markierten Zellen konnten nach Entfernung des Magnetfeldes mit einem bestimmten Volumen an Puffer eluiert werden.

2.2.3.7. Phänotypische Analysen der Zellen

Die Untersuchung von Oberflächenantigenen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Das FACS-Calibur Gerät (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ist mit zwei Lasern ausgestattet, einem blauen 488 nm- und einem roten 635 nm-Laser. Der blaue Laser diente der Anregung der Farbstoffe Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC, $E_{m_{max}}$: 519 nm) und Phycoerythrin (PE, $E_{m_{max}}$: 578 nm), mit dem roten Laser wurde der Farbstoff Apo (APC) angeregt. Bei der Färbung wurden die Zellen mit einer Fc Block-Lösung (Miltenyi Biotec) für 30 Minuten, bei 4 °C zur Verringerung unspezifischen Bindungen, vorinkubiert und anschließend 20 Minuten mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Für die Analyse wurden jeweils 1×10^5 Zellen auf der Basis von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ausgewählt. Die Daten wurden mit der Cell-Quest-Pro-Software gemessen und ausgewertet.

2.2.3.8. Kryokonservierung von Zellen

Die Phäochromozytom- und die medullären Schilddrüsenkarzinomzellen wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Einfrieren wurden die Zellen, die sich in der Wachstumsphase befanden, geerntet und 5 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.5) resuspendiert, auf eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Kryoröhrchen wurden dann in einer Einfrierbox von Nalgene® Labware, (USA) bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.9. Auftauen von Zellen

Für die Kultivierung wurden die eingefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und direkt in 15 ml frisches, auf 37 °C erwärmtes RPMI-Kulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation wurden 6×10^4 Zellen/ml in entsprechendem Kulturmedium in eine 75 cm² Gewebekulturflasche gegeben, und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank BBD 6220 von Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland) kultiviert.

2.2.4. Durchflusszytometrische Analyse von Zellpopulationen

Die durchflusszytometrische Analyse dient der simultanen Quantifizierung verschiedener Zelloberflächenmarker. Diese FACS-Geräte (*fluorescence-activated-cell-sorter*) verfügen neben der Analyse (Abbildung 5) auch über die Fähigkeit, verschiedene Subpopulationen anhand der morphologischen Parameter Größe und Granularität zu unterscheiden. Das Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse beruht darauf, Zellen einzeln nacheinander durch einen Laser zu führen und Größe und Granularität sowie gebundene Fluorochrome zu messen. Diese emittieren dadurch in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften Signale, die mittels entsprechender Lichtdetektoren gemessen werden. Dabei wird das monochromatische Licht des Lasers beim Auftreten auf die Zellen abgelenkt. Das Seitwärtsstreulicht (*Side scatter*, SSC) stellt ein Maß für die Granularität der Zellen dar, wohingegen das Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter*, FSC) Informationen über die relative Größe der Zellen liefert. Die Epitope auf der Zelloberfläche können durch Fluorochrom-markierte Antikörper sichtbar gemacht werden. Dadurch können die Zellen anhand von Oberflächenmarkern quantifiziert werden.

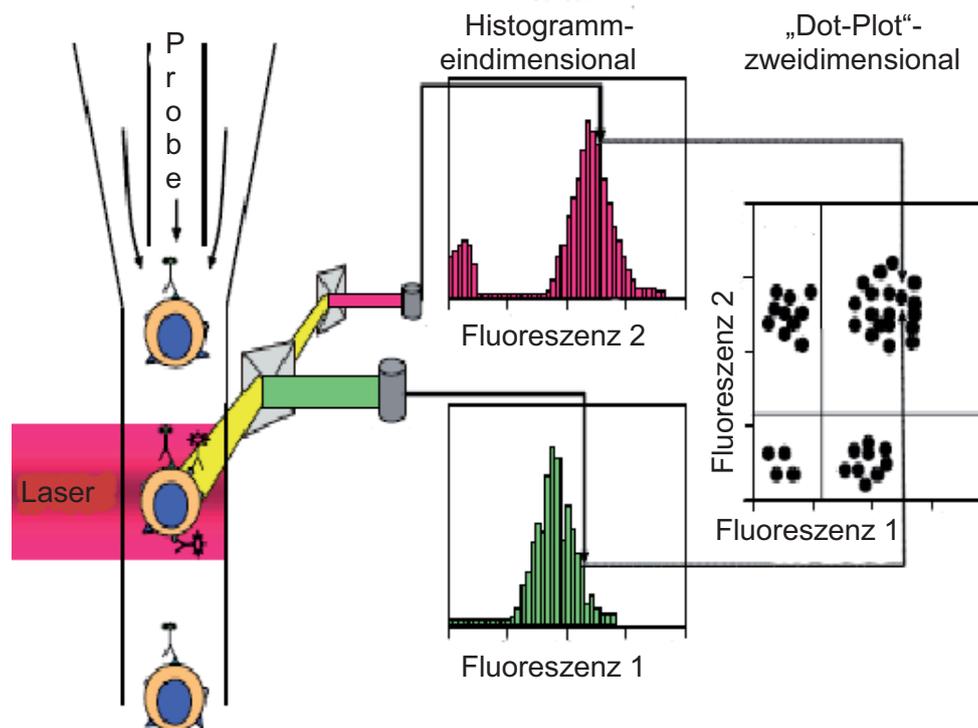


Abbildung. 5: Detektor und Identifizierung eines FACS-Gerätes

2.2.4.1. Antikörperfärbung von Molekülen auf der Zelloberfläche

Im Verlauf der Arbeit wurden Oberflächen-Färbungen an Zellen durchgeführt, um sie anschließend durchflusszytometrisch zu charakterisieren. Vor der Antigenfärbung wurden die gereinigten Zellen mit Fc-Block-Reagenz (1:10 verdünnt) von Miltenyi Biotec, (Bergisch-

Gladbach) behandelt, um die unspezifischen Bindungen zu verringern. Hierbei wurden je 1×10^7 Zellen/ml in kaltem MACS-Puffer aufgenommen und 10 μ l Fc-Block-Reagenz hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den entsprechenden Oberflächenmarkern (siehe 2.1.9.1) in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/ μ l eingestellt, und für weitere 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in 2.2.3.4 weiterverarbeitet und später mit Hilfe des FACS Calibur von BD, Biosciences, Heidelberg, (Deutschland) gemessen.

2.2.5. Organentnahme

Die Mäuse wurden in einer CO₂-Kammer getötet. Oberschenkel und Tibias sowie Milzen wurden entnommen und sofort in kaltes PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Die Präparation der Einzelzellsuspensionen erfolgte sofort nach Transfer aus der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine Universität.

Zur Analyse der Immunisierungsexperimente wurden aus transgenen Ret/Cal-Mäusen die Milzen, die inguinalen Lymphknoten, das Blut, die Schilddrüse und die Nebennieren entnommen. Die Milzen und die Lymphknoten wurden in kaltes PBS überführt, das Blut kaltgestellt, die Schilddrüse und die Nebennieren in Gewebeschaln (Tissue-Tek[®], Cryomold[®], der Firma Sakura Finetek, Zoeterwoude, (Niederlande) in ein Polyvinylalkohol und Carbo-Wachs enthaltendes Medium (Tissue-Tek[®], OCT Compound) eingebettet und in Flüssigem Stickstoff vorsichtig eingefroren.

Zur Untersuchung der in Ret/Cal-Mäuse injizierten Tumorzellen (mPC und mMTC) wurden Leber, Lunge und Muskeln entnommen, wie oben beschrieben in Gewebeschaln gebracht und mit OCT-Medium eingefroren.

2.2.6. Isolation von Knochenmark- und Lymphknotenzellen sowie Splenozyten

2.2.6.1. Präparation von Knochenmarkzellen

Tibias und Femurknochen wurden freipräpariert und die Zellen mit einer 5 ml Spritze (Kanüle: 29G) mit 5 ml RPMI 1640 Kulturmedium von Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland) ausgespült. Die Zellsuspension wurde mit einem 70 μ m Separationsfilter (*Cell Stainer*, BD Biosciences) filtriert und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer und einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten entfernt. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurden die Zellen in DC-Medium (siehe 2.1.6) aufgenommen, auf eine Zellzahl

von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und für die folgenden Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

2.2.6.2. Präparation von Splenozyten

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen in einem 100 µm Sieb in der Petrischale mit der Rückseite eines Spritzenstempels unter leichtem Druck zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde mit PBS über ein 100 µm Sieb in eine 50 ml Falcon-Tube transferiert. Die Zellen wurden gewaschen und die Erythrozyten durch Zugabe des Erylyse-Puffers entfernt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen, wie in 2.2.3.3 beschrieben, ins IL-2-Medium (siehe 2.1.6) aufgenommen und im Brutschrank inkubiert.

2.2.7. Generierung von dendritischen Zellen

Die Einzelzellsuspensionen aus dem Knochenmark von Femuren und Tibias (siehe 2.2.6.1) und der Milz (siehe 2.2.6.2) wurden nach drei Tagen Inkubation geerntet und gezählt. Die aus Monozyten ausdifferenzierten DCs wurden mit CD11c-Mikrobeads von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (Deutschland) auf den Oberflächenmarker CD11c (N418) selektioniert. Der Zellpopulation wurden zur Markierung von DCs, pro 1×10^7 Zellen jeweils 40 µl MACS-Puffer und 10 µl CD11c Mikrobeads zugegeben. Die Zellen wurden wie in 2.2.3.4 beschrieben, weiterprozessiert.

Vor und nach der Selektion von positiven CD11c-Zellen wurde ein Teil der Zellen zur phänotypischen Analyse von Einzelzellpopulationen abgenommen. Die restlichen CD11c-Zellen wurden in supplementiertem DC-Medium (siehe 2.1.6) aufgenommen, auf eine Endkonzentration von 8×10^4 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Nach einer weiteren dreitägigen Inkubation wurden die Zellen mittels Zell-Schaber geerntet, gewaschen (siehe 2.2.3.2) und gezählt. Ein Teil der Zellen wurde zur Phänotypisierung entnommen. Die restlichen Zellen wurden, wie in 2.2.3.3 beschrieben, weiterprozessiert.

2.2.8. Beladen von dendritischen Zellen

Die reifen DCs wurden am sechsten Tag geerntet und mit MACS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie dreimal mit je 10 ml NaCl-Lösung gewaschen und anschließend mit je 100 µg des jeweiligen Chromogranin A Peptides für eine Stunde bei 37 °C (Brutschrank) inkubiert. Die Konzentration der beladenen DCs wurde auf 2×10^4 Zellen/µl in physiologischem NaCl der

Firma Braun, Melsungen (Deutschland) eingestellt und auf eine 0,5 ml Insulinspritze (Braun) aufgezogen.

2.2.9. Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte inguinal. Dazu wurden die transgenen Ret/Cal-Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt: so wurde die erste Gruppe mit DCs, die zuvor mit allen sechs CgA-Peptiden (P1-P6) beladen wurden, immunisiert. Der zweiten Gruppe wurden DCs, die mit den physiologischen CgA-Peptiden (P1-P3) beladen wurden, verabreicht. Diese Peptide wurden aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zu H-2K^b ausgewählt. Die dritte Gruppe wurde mit DCs, die mit Aminosäure-veränderten Peptiden (P4-P6) gepulst waren, behandelt. Bei diesen Peptiden handelte es sich um Peptide, die sich um eine bzw. zwei Aminosäuresequenzen von den physiologischen Peptiden unterschieden und dadurch noch höhere Bindungsaffinitäten aufwiesen. Als Kontrolle wurden weitere transgene Ret/Cal-Mäuse verwendet, deren DCs mit 100 µg Humanalbumin beladen wurden.

2.2.10. Herstellung der Einzelzellsuspension aus T-Lymphozyten

Die aus immunisierten transgenen Ret/Cal-Mäusen entnommenen inguinalen Lymphknoten wurden in einem 100 µm Sieb in der Petrischale mit der Rückseite eines Spritzenstempels unter leichtem Druck zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde mit PBS über ein 70 µm Sieb in eine 50 ml Falcon-Tube transferiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, die Zellen wurden dann ins MACS-Puffer aufgenommen und wie in 2.2.16 weiterprozessiert.

2.2.11. Isolation und Kultivierung von T-Zellen

Zur Isolation von T-Zellen wurden Milzen aus immunisierten transgenen Ret/Cal-Mäusen entnommen und die T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) aufgereinigt und, wie in 2.2.3.4 beschrieben, weiterprozessiert. Die Einzelzellsuspension wurde gesammelt und 5 Minuten bei 300 × g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit reinem PBS wurden die Erythrozyten mit Hilfe von Erythrozyten-Lyse-Puffern entfernt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Mit Hilfe des Pan T-Zell-Isolationskits (siehe 2.1.9.4) und des MACS[®]-Systems der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (Deutschland) wurden die T-Zellen isoliert. Hierbei wurden 1×10^7 Milzzellen in 40 µl MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl biotinylierter Antikörper zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 bis

8 °C wurden den Zellen 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin MikroBeads zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten bei 4 bis 8 °C wurde die Zellsuspension, wie in 2.2.3.3 beschrieben, weiterverarbeitet.

Für die Tetramer-Analyse wurden je 2×10^6 T-Zellen pro Milz entnommen und in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Zellfraktion wurde mit den entsprechenden Peptiden gepulst, die andere diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Die Zellen wurden in 1 ml IL-2-Medium (siehe 2.1.6) aufgenommen, auf einer 24 Well-Platte für zwei Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die restlichen Zellen wurden mit zusätzlichen CD4 MikroBeads auf CD8-T-Zellen isoliert und wie in 2.2.4.4 weiterprozessiert.

2.2.12. Isolation und Kultivierung von CD8-T-Zellen

Die Gewinnung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus frisch selektionierten T-Zellpopulationen wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe von CD4 (L3T4) MikroBeads von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl CD4 Mikrobeads erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 bis 8 °C. Anschließend wurden die Zellen, wie in 2.2.3.4 beschrieben, weiterverarbeitet. Die CD8-T-Zellen wurden aufgefangen und mit MACS-Puffer gewaschen. Die T-Zellen wurden gezählt, ins IL-2-Medium (siehe 2.1.6) aufgenommen, mit den verschiedenen CgA-Epitopen beladen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank für einen Tag kultiviert.

2.2.13. Selektion von Interferon-gamma sezernierenden CD8⁺ T-Zellen

CD8-T-Zellen wurden nach einem Tag Kultivierung geerntet, gewaschen und gezählt. Die Isolation von IFN-γ-sezernierenden CD8⁺ T-Zellen erfolgte nach Herstellerprotokollen mit Hilfe des Maus IFN-γ Sekretionskits (siehe 2.1.9.4) und des MACS[®]-Systems von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (Deutschland). Dabei wurde zuerst ein IFN-γ-spezifisches Reagenz zugegeben, das an Zelloberflächen der T-Zellen anheftet. Die Zellen wurden in 37 °C warmen Kulturmedium (komplettes Kulturmedium) aufgenommen, in Rotation mittels eines Rotators (MACSmix[™] Tube Rotator, Miltenyi Biotec) versetzt und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, um so die Sekretion von IFN-γ zu ermöglichen. Das sekretierte IFN-γ bindet an das Fang-Reagenz auf den positiv sezernierenden Zellen. Diese Zellen wurden durch Zugabe des sekundären Antikörpers (siehe 2.1.9.4) markiert. Über MS-Magnetsäulen (Miltenyi Biotec) wurden dann die IFN-γ-produzierenden CD8⁺ T-Zellen aufgefangen, gesammelt und weiterverarbeitet.

2.2.14. Messung der zytotoxischen Aktivität

Für die Untersuchung der spezifischen Lyse durch IFN- γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen wurde der „Chrom-Freisetzungsversuch“ verwendet. Der Chrom-Freisetzungsversuch dient dem Nachweis der Zytotoxizität von Effektorzellen. Hierzu wurden als Zielzellen Phäochromozytom und medulläre Schilddrüsenkarzinomzellen mit radioaktivem Chrom⁵¹ (⁵¹Cr) markiert. Als Effektorzellen dienten die *in vivo* aktivierten IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen. Die markierten Tumorzellen konnten dann mit den Effektorzellen kokultiviert werden. Nach definierten Inkubationszeiten bei 37 °C wurde ein Teil des Kultur-Überstandes abgenommen und die Radioaktivität gemessen. Die Radioaktivität ist umso höher, je mehr Tumorzellen abgestorben sind, wodurch die aufgenommene radioaktive Substanz freigesetzt wird. Für die Kokultivierung wurden 1×10⁶ mPC bzw. mMTC geerntet, gewaschen und mit 100 μ l Chrom⁵¹ für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, gezählt und je 5×10³ mPC / Well in einer 96-Well Spitzboden-Platte verteilt. In einem Endvolumen von 200 μ l mit IL-2- (R&D Systems, Wiesbaden) supplementierten Kulturmedium wurden die Effektorzellen in verschiedenen Konzentrationen (50:1; 25:1) zugegeben und kokultiviert. Alle Ansätze erfolgten als Triplet. Als Kontrollen wurden die Zielzellen in IL-2-Medium (Negativkontrolle), mit 0,5 N HCl oder 10 % Tween 20 (Positivkontrolle) im Kulturmedium ausgesät und inkubiert. Parallel dazu wurden Ansätze mit MHC-Klasse-I Antikörper-Blockierungen durchgeführt, indem 10 μ l gegen H-2K^b gerichtete Antikörper zugegeben wurden. Dabei soll der an das H-2K^b bindende Antikörper verhindern, dass die T-Zell-Rezeptoren von CgA-spezifischen, IFN- γ -produzierenden CD8⁺-T-Zellen, MHC-Peptid-Komplexe erkennen und dadurch die Zielzellen lysieren. Zur Kontrolle wurden zusätzlich mMTCs, die CgA exprimieren, aber ein anderes MHC-Molekül (H-2K^d) als die mPC vorweisen, eingesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden 100 μ l des Kultur-Überstandes aus jeder Well-Platte entnommen und die Radioaktivität am Gamma-Counter der Firma Wallak, (Finnland) bestimmt. Da der Anteil der Radioaktivität in Bezug zur Anzahl der lysierten Zellen steht, kann die prozentuale spezifische Lyse der Ansätze nach folgender Formel berechnet werden:

$$\% \text{ zytotoxische Aktivität} = \frac{\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} * 100$$

Dabei wurden die Mittelwerte der gemessenen Triplikate \pm Standardabweichung angegeben.

2.2.15. Blockierungsanalysen (*Cold Target Assay*)

Um zu untersuchen ob die *in vivo* aktivierten CgA-spezifischen und IFN- γ -produzierenden CTLs fähig waren, Phäochromozytomzellen *in vitro* zu lysieren, indem sie die exprimierte CgA-Epitope erkennen, wurde die Blockierungsanalyse (*Cold Target Assay*) angewandt. Dabei dienten 1×10^4 DCs, die mit 50 μg des jeweiligen CgA-Epitopes beladen waren, als kalte und 1×10^4 radioaktiv markierte Phäochromozytomzellen als heiße Zielzellen. mMTC, die ebenfalls den MHC-Typen H-2K^d tragen, dienten als heiße negative Kontrolle, die von den Effektorzellen nicht lysiert werden sollten. Zum Beweis der MHC-vermittelten Lyse wurden Ansätze mit MHC-Klasse-I blockierenden Antikörpern durchgeführt, indem 0,5 mg/ml des gegen H-2K^b gerichteten Antikörpers hinzugegeben wurden. Zusätzlich wurde zum Beweis der Peptid-spezifischen Lyse ein Ansatz durchgeführt, in dem DCs mit dem humanen Peptid GNLSTCML (Calcitonin) beladen wurden. Die Proben und die anschließende Messung der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen erfolgten gemäß 2.2.14.

2.2.16. Tetramer-Analysen

Bei dieser Methode handelt es sich um die Quantifizierung von Tumorantigen-reaktiven CD8-T-Zellen als Antwort auf die Immunisierung.

Entsprechend der sechs zur Immunisierung verwendeten Epitope des Tumormarkers CgA (P1-P6) wurden für die CgA-Epitope konstruierte, spezifische Tetramere (T1-T6) der Firma Glycotope, Heidelberg (Deutschland) verwendet. Für die unspezifische Färbung wurde ein humanes Tetramer (GNLSTCML; H-2K^b) eingesetzt. Als positive Kontrolle dienten die T-Zellen von TCR transgenen OT-1 Mäusen (siehe 2.1.8.2). Diese Mäuse besitzen eine immunogene Spezifität für ein Ovalbumin-spezifisches Tetramer (SIINFEKL; H-2K^b).

Für das Experiment wurden 1×10^6 Lymphknoten- (siehe 2.2.10) und *in vitro* aktivierte T-Zellen (siehe 2.2.12) verwendet. Die Zellen wurden gewaschen, mit Fc-Block-Reagenz inkubiert, und mit 10 pmol/ml des entsprechenden Tetramer für eine Stunde bei 4 °C gefärbt. Danach wurden die T-Zellen mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD8a für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Waschpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen. Kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die T-Zellen mit 1 mg/ml Propidiumjodid behandelt, um tote Zellen auszuschließen. Abschließend wurden die T-Zellen mit 2 ml Waschpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen und im FACS-Calibur mit dem Computerprogramm „Cell-Quest Pro“ gemessen.

2.2.17. Injektion von neuroendokrinen Tumorzellen

Da die transgenen Ret/Cal-Mäuse keine Metastasierung aufweisen, wurden ihnen die entsprechenden Tumorzellen mPC bzw. mMTC verabreicht. Zwanzig Versuchstiere, die mit DCs, die zuvor mit allen sechs CgA-Epitopen gepulst und immunisiert waren, erhielten je 5×10^6 mPCs sowohl intravenös (n=10) als auch intramuskulär (n=10), um die Tumorphysion und die Infiltrationen von zytotoxischen T-Zellen zu untersuchen. Den Kontrollgruppen wurden 5×10^6 mMTCs appliziert.

2.2.18. Immunhistologie

Mit Hilfe der Immunhistologie ist es möglich, immunreaktive Strukturen, wie z.B. Proteine auf oder in Zellen bzw. Gewebe, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Dabei werden die entsprechenden zellulären Antigene im histologischen Präparat durch die Erzeugung von Antikörper-Farbkomplexen sichtbar gemacht. Das Ziel der Immunhistologie ist es, entscheidende Hinweise auf das Tumorzuchstum und die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen von Leber- und Lungenmetastasen zu finden.

Um den zellulären Effekt der Immunisierung auf die Tumorzellen zu untersuchen, wurden die immunisierten Mäuse vierzehn Tage nach Applikation von Tumorzellen getötet. Zur Analyse wurden Nebennieren (n=55), Leber und Muskeln (jeweils n=20) entnommen, in OCT-Medium von SAKURA Finetek (Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung der Organe erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.18.1. Herstellung von Kryogewebeschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden mittels eines Kryostaten Jung Frigocut 2800 E, von Leica Microsystem GmbH, Wiesbaden (Deutschland) $7\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte der o.g. eingefrorenen Gewebeproben angefertigt, auf Objektträger gezogen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Färbung aufbewahrt.

2.2.18.2. Antikörperfärbungen von Kryoschnitten

Die hier verwendete, indirekte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) ist ein hoch sensitives System zum *in situ* Nachweis von Antigenen. Die Kryoschnitte wurden für 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und weitere 10 Minuten in Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Nach einem Waschschriff mit PBS von fünf Minuten wurden die Objektträger getrocknet und die Inkubationsfläche der Schnitte durch einen hydrophoben Stift von PAP™-PEN, Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland) eingegrenzt. Nach jeweils 10-minütiger Inkubation mit

einem Avidin-, einem Biotin- und einem Peroxidase-Block der Firma DakoCytomation, (Dänemark) zur Blockierung der endogenen Peroxidasen und je zweimal 5 minütige Waschgängen mit PBS folgte eine 30-minütige Inkubation mit 5 % Schweinserum (DakoCytomation), um unspezifische Bindung des Erstantikörpers zu reduzieren. Danach wurden die Erstantikörper (gegen CD3 gerichtete; gegen Chromogranin A gerichtete, polyklonale Kaninchen, gegen CD4 bzw. gegen CD8 α gerichtete, monoklonale Antikörper) auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem 5-minütigen Waschschrift wurden die Schnitte mit PBS gewaschen, bevor sie mit einem sekundären Antikörper versetzt wurden. Vor und nach einer halbstündigen Inkubation mit ABC-Elite-Komplex (1:100 verdünnt, DakoCytomation), bestehend aus 10 μ l Reagenz A (Avidin) und 10 μ l Reagenz B (Biotin), wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen. Desweiteren wurden die Schnitte mit AEC-Substratpuffer (DakoCytomation) bei gleichzeitiger Kontrolle am Mikroskop inkubiert. Nach einem zweiminütigen Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für eine Minute mit Hämatoxilin II von Merck, Darmstadt (Deutschland) gefärbt. Parallel dazu wurde eine Kontrollfärbung mit DAPI durchgeführt. Abschließend wurde das überschüssige Hämatoxilin mit Leitungswasser entfernt und die Schnitte für zwei Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden mit anti-Fading Mounting Medium (DakoCytomation) überdeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.18.3. Messung der Tumorgröße

Die Tumorgröße wurde in tumortragenden Tieren bestimmt, um festzustellen, ob das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen reduziert wurde. Dabei wurden die Größen der Tumore von zwei Personen, unabhängig von Messwerten des anderen, dokumentiert. Da es in den Lebern der Mäuse zur Entstehung von mehreren Tumoren gekommen war, wurde die Summe der Tumordurchmesser für die jeweilige Maus ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Photomikroskops (Nikon Eclips TE300), das über eine integrierte Digital Kamera (DXM1200) verfügt. Dazu wurden die Schnitte der Tumore fotografiert und digitalisiert. Anschließend konnten die Tumore auf den Digitalfotos mit dem analytischen Programm (Leica QWin V3) integriert und ausgewertet werden.

2.2.19. Statistische Auswertung

Die statische Auswertung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) und Prism Version 3 (GraphPad Software Inc., USA). Für die Darstellung und Auswertung der FACS-Analysen wurde das Programm WinMDI Version 2.9 (von Joseph Trotter) verwendet. Zur Vorhersage von Peptiden wurde das Programm

SYFPEITHI von H.G. Rammensee (www.syfpeithi.de) benutzt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde der t-test („*paired test*“) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung von dendritischen Zellen

Zur Charakterisierung der Zellen wurden direkt markierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene verwendet und eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Nach Präparation der Zellen aus den Milzen bzw. dem Knochenmark stellte sich eine einheitliche Zellpopulation dar (Abbildung 6), wohingegen nach DC-Generierung mehrere Populationen zu finden waren, die sich in der Größe (FSC) und ihrer Granularität (SSC) unterschieden. Dabei erfolgte die Eingrenzung vitaler Zellpopulationen auf Monozyten der Ausgangszellen (R1), auf unreifen DC-Populationen nach drei Tagen vor (R2) bzw. nach (R3) Selektion auf CD11c-positiven dendritischen Zellen, und auf ausgereiften DC-Populationen (R4) nach sechs Tagen Kultivierung (Abbildung 6). Nach der DC-Isolierung wurde überprüft, ob die Zellen eine entsprechende Reinheit erreichten. In den Ausgangszellen wurden 50,19% Monozyten gemessen.

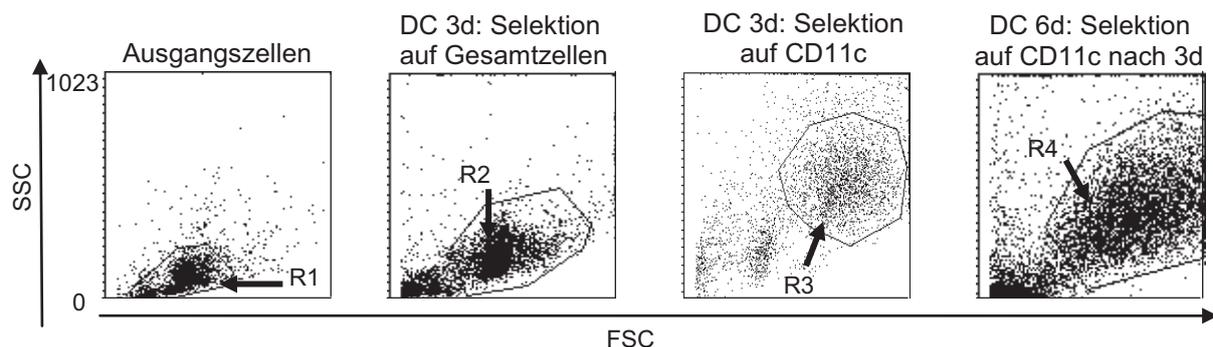


Abbildung 6: Reinheitskontrolle der Monozyten der Ausgangszellen sowie der Zellen nach 3 (3d) bzw. 6 Tagen (6d). Die eingegrenzten Bereiche stellen den Anteil der Monozyten innerhalb der Ausgangszellen (R1), der DC-Populationen nach 3 Tagen vor (R2) bzw. nach Selektion auf CD11c-positiven dendritischen Zellen (R3), sowie die ausgereiften DC-Populationen (R4) nach weiteren 6 Tagen Kultivierung.

3.1.1. Phänotypisierung von Knochenmarkszellen

In den Ausgangszellen konnten sowohl Monozyten als auch insgesamt $41,6 \pm 3,14$ % Granulozyten (Ly-6C) dargestellt werden. Darüber hinaus wurden folgende Populationen detektiert: $3,03 \pm 1,81$ % T-Zellen (CD3); $8,73 \pm 1,82$ % NK-Zellen (CD49b) und $16,74 \pm 2,16$ % B-Zellen (CD19) (Abbildung 3.3A). Der Anteil der DCs (CD11c) war mit $0,82 \pm 0,33$ % entsprechend geringer (Abbildung 7).

Die hohen Expressionen von Zelloberflächenmolekülen Ly-6C (Granulozyten) und CD14 (Monozyten) zeigten eine für Ausgangspopulationen typische Charakterisierung. Nach der Präparation wurden die Zellen zur Kultur in GM-CSF aufgenommen.

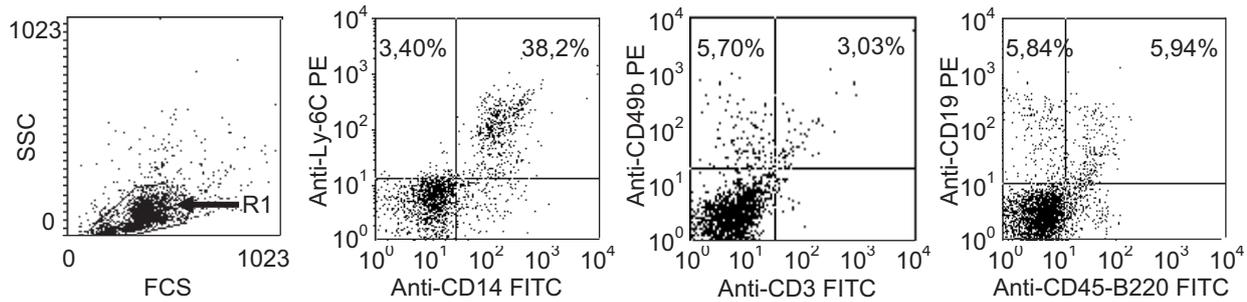


Abbildung 7: Charakterisierung von Zelloberflächenmarkern auf Ausgangszellen.

Dargestellt sind die eingegrenzten vitalen Zellpopulationen (ganz links), die zuvor mit den im Diagramm angezeigten Antigenen (gekoppelt mit FITC oder PE) markiert wurden.

3.1.2. Phänotypisierung von unreifen dendritischen Zellen

Eine phänotypische Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie fand am Tag der Zellgewinnung sowie nach 3 bzw. 6 Tagen Kultivierung statt (Abbildungen 8, 9A und 9B).

Nach dreitägiger Kultur konnte eine Expressionszunahme aller untersuchten DC-spezifischen Oberflächenantigene (CD80, CD86, CD40, CD11c und der Antigenpräsentationsmoleküle (MHC-I und MHC-II) detektiert werden (Abbildungen 8 und 9B), wohingegen eine gleichzeitige Abnahme der Expression von CD14, CD3, CD49b, CD19 und Ly-6C festgestellt wurde (Abbildungen 7 und 9A). Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigte, dass der Anteil an CD11c in der Kultur von $0,02 \pm 0,32$ % auf $12,11 \pm 0,52$ % ($p = 0,003$) anstieg. Die Expression von CD40 stieg von $0,70 \pm 0,27$ % auf $9,18 \pm 0,71$ % ($p = 0,02$) und von anderen kostimulatorischen Molekülen wie CD80 von $2,62 \pm 1,23$ % auf $7,58 \pm 1,69$ % ($p = 0,2$) und CD86 von $8,40 \pm 1,64$ % auf $19,95 \pm 1,78$ % ($p = 0,06$). Die Expression der Antigenpräsentationsmoleküle MHC-Klasse-I (RT-1A) von $5,45 \pm 1,33$ % auf $7,95 \pm 1,40$ % ($p = 0,08$) und MHC-Klasse-II (I-K^A) von $3,63 \pm 1,05$ % auf $11,30 \pm 1,83$ % ($p = 0,04$). Die Expressionszunahme von DC-Markern demonstrierte, dass die Knochenmarkszellen nach drei Tagen in GM-CSF zu unreifen DCs differenziert werden konnten.

Um eine reine DC-Population zu erhalten, wurden die Zellen über eine positive MACS-Selektion auf CD11c-positive Zellen selektioniert. Nach dieser Aufreinigung zeichnete sich im SSC/FSC-Diagramm eine deutliche DC-Population ab (siehe Abbildungen 8A und B). Die CD11c-positiven Zellen wiesen höhere FSC- sowie SSC-Werte als vor der Trennung auf, was auf eine stärkere Größe bzw. Granularität hinwies. Der Anteil von CD11c-positiven Zellen konnte durch die Aufreinigung von $0,82 \pm 0,33$ % auf $30,01 \pm 1,25$ % erhöht werden.

Die Abbildung 8 zeigt die repräsentative Analyse der Oberflächenmarker auf unreifen DC-Populationen vor (Abbildung 8A) bzw. nach (Abbildung 8B) Selektion auf CD11c sowie auf ausgereiften DC-Population (Abbildung 8C).

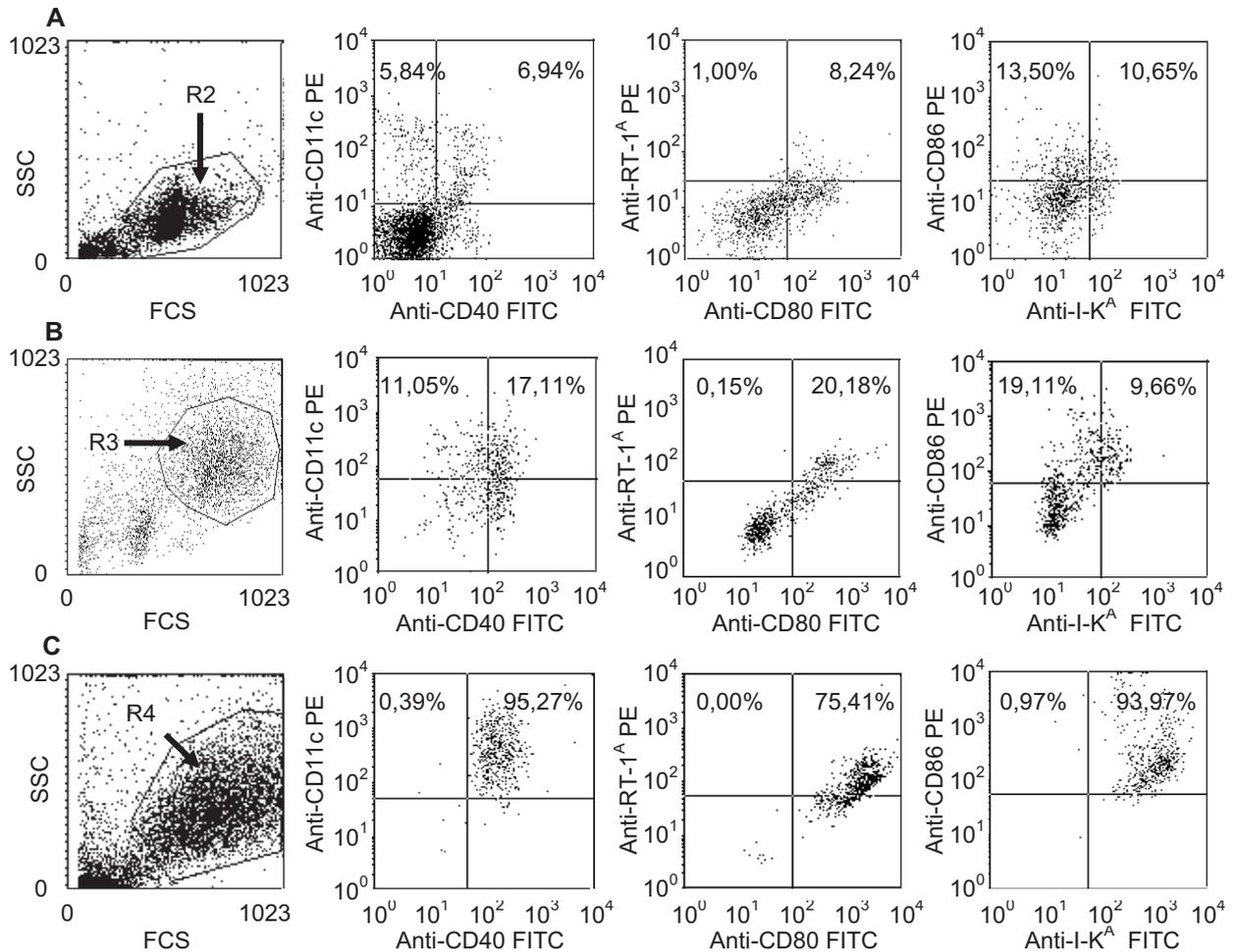


Abbildung 8: Repräsentative Ergebnisse der Expression von Zelloberflächenmarkern.

Dargestellt sind die eingegrenzten vitalen Zellpopulationen (ganz links), die zuvor mit den im Diagramm angezeigten Antigenen (gekoppelt mit FITC oder PE) markiert wurden. Gezeigt werden unter (A) DCs nach 3 Tagen, (B) DCs nach Selektion auf CD11c-positive Zellen und (C) reife DCs nach sechs Tagen.

Die Abbildung 9 zeigt die Zelloberflächenanalyse von verschiedenen Zellpopulationen.

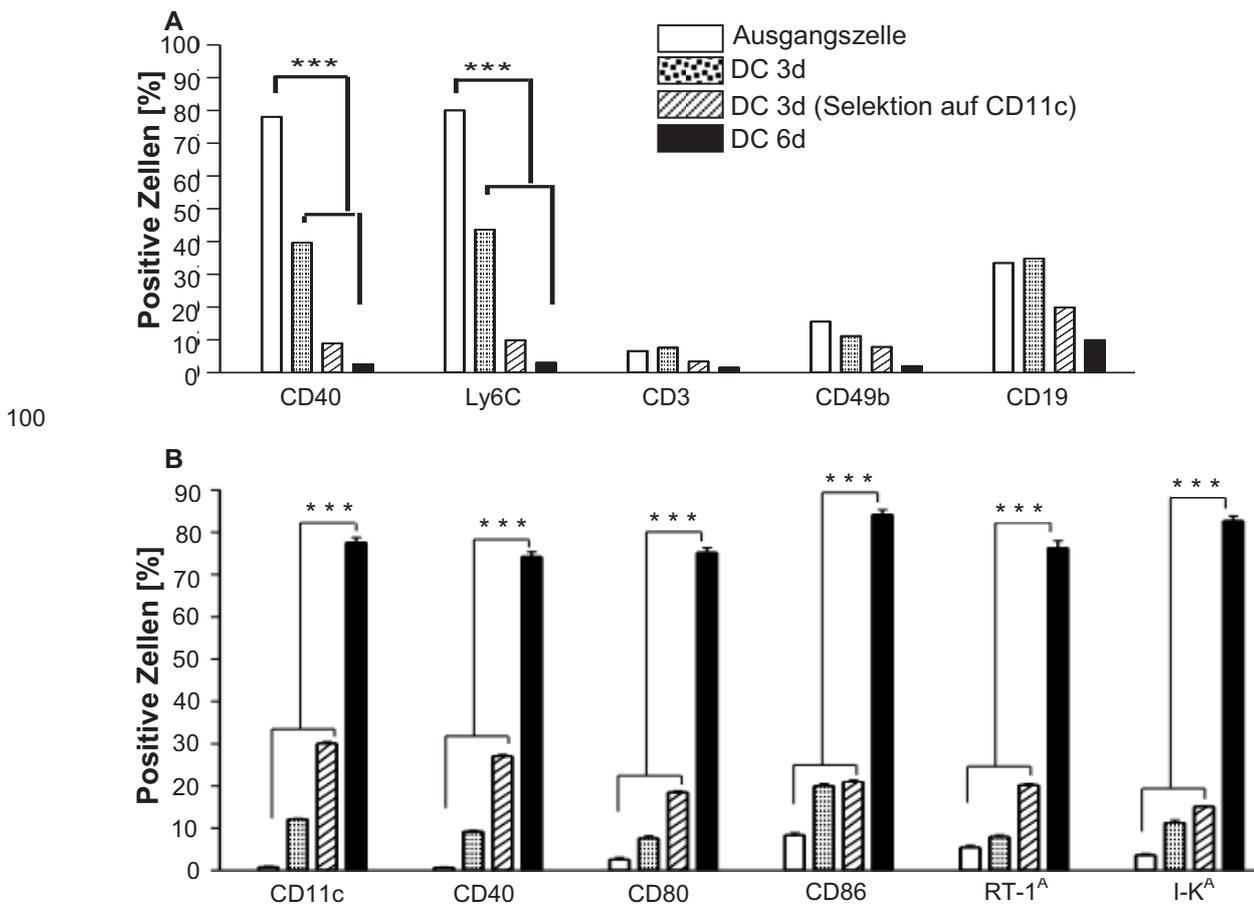


Abbildung 9: Zelloberflächenanalyse von Zellpopulationen. Nach drei Inkubationstagen im GM-CSF supplementierten Medium und anschließender Selektion auf CD11c-positive Zellen, wurden die unreifen DCs für weitere drei Tage kultiviert. Gezeigt werden unter A und B die prozentualen Anteile der durchschnittlichen Werte an positiven Zellpopulationen ($p < 0,0005$).

3.1.3. Oberflächenmarkerexpression von reifen dendritischen Zellen

Nach weiteren drei Tagen Kultivierung konnte erneut eine deutliche Expressionszunahme aller verwendeten DC-Marker nachgewiesen werden (Abbildungen 8 und 9B). Die Reinheit der CD11c-positiven DCs lag bei $78,35 \pm 4,10$ %.

Die weiteren Oberflächenmarker, die mit der Reifung von DCs assoziiert sind, zeigten für das Glykoprotein CD40 $74,22 \pm 3,48$ % auf reifen DCs. Dieses zeigt eine signifikant größere Expressionszunahme im Vergleich zu $0,70 \pm 0,27$ % ($p < 0,001$) in den Ausgangszellen. Eine Steigerung der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 konnte ebenfalls nachgewiesen werden: CD80 $75,21 \pm 3,49$ % in den DCs gegen $2,62 \pm 1,23$ % in den Ausgangszellen ($p < 0,0005$) und für CD86 $84,15 \pm 3,59$ % in DCs gegen $8,40 \pm 1,64$ % in den Ausgangszellen ($p < 0,0005$).

Zusammenfassend erwies sich die Kultivierung der DCs in GM-CSF als geeignet, um aus murinen Knochenmarkzellen dendritische Zellen zu generieren und diese nach einer positiven Selektion auf CD11c-positive Zellen im weiteren Verlauf der Kultur zu reifen DCs zu differenzieren. Die ausgereiften DCs wurden aufgrund ihrer Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren für die nachfolgenden Versuche eingesetzt.

3.2. Analyse der CgA-Epitop-spezifischen T-Lymphozyten

Die T-Zellkultur, die zwei Tage mit und ohne 1 µg/ml CgA-Peptide stimuliert worden war, wurde mit entsprechenden CgA-Epitop-Tetrameren und einem CD8-Antikörper gefärbt. Die Antigenität der CgA-Epitope erfolgte mittels Tetramer-Tests und die Auswertung am Durchflusszytometer mit Hilfe des Computerprogramms „Win 2.9“. Eine Immunantwort galt als erwiesen, wenn das Ergebnis der Sensitivität der Tetramer bindenden CD8⁺ T-Zellen bei mehr als 1 % lag. Es wurden jeweils mindestens 3000 Ereignisse gemessen.

3.2.1. Tetramer-Analyse der CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Ret/Cal-Mäusen mit einzelnen CgA-Epitopen

Hier wurden die CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert, die nach Immunisierung mit den jeweiligen CgA-Peptiden aktiviert worden waren.

Die folgenden DotPlots (Abbildung 10) stellen die Daten einer repräsentativen Tetrameranalyse nach T-Zell-Stimulation mit einzelnen CgA-Peptiden (P1-P6) dar.

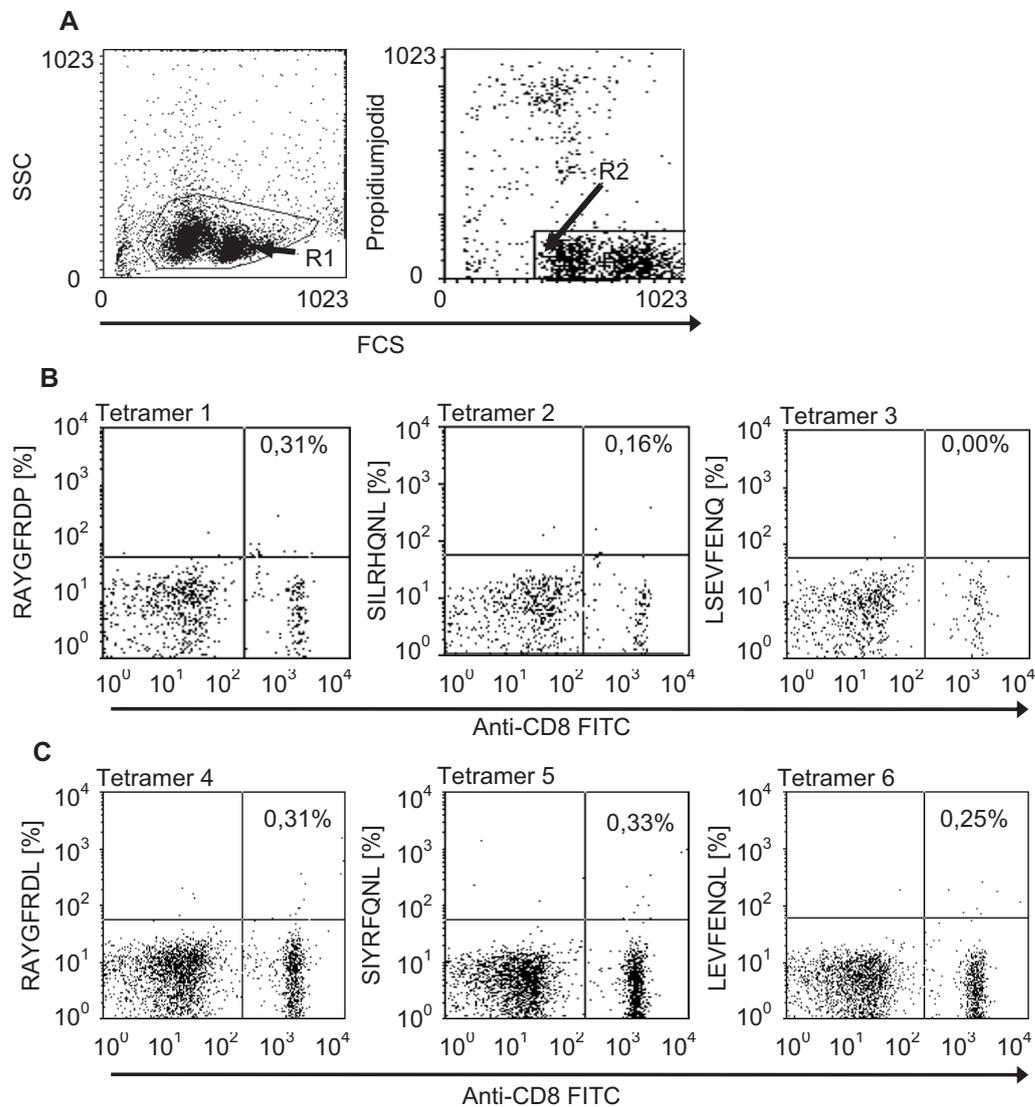


Abbildung 10: Repräsentative Tetrameranalyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einzelnen CgA-Peptiden (P1-P6). Die Daten zeigen eine Einzelzellpräparation von T-Zellen aus Milzen. Basierend auf der Lichtstreuung (FSC/SSC) und mittels Propidiumjodid erfolgte die Eingrenzung vitaler T-Zellpopulationen (R1 und R2). Gezeigt werden unter (A) die eingegrenzten T-Zellpopulationen R1 und R2 und unter (B und C) die Anteile der Tetramer-bindenden CD8⁺ T-Zellen (oberer rechter Quadrant).

Es konnte keine signifikante Anzahl an Tetramer-positiven, CgA-spezifischen CD8-T-Zellen registriert werden. Auffällig ist, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den physiologischen (P1-P3) und den Aminosäure-veränderten (P4-P6) CgA-Epitopen zu sehen war (Abbildungen 10B und C).

In Abbildung 11 wurden die Mittelwerte ($n = 5$) der Tetramer-bindenden $CD8^+$ T-Zellen, die nach Immunisierung mit einzelnen physiologischen CgA-Epitopen (P1-P3) aktiviert wurden, dargestellt.

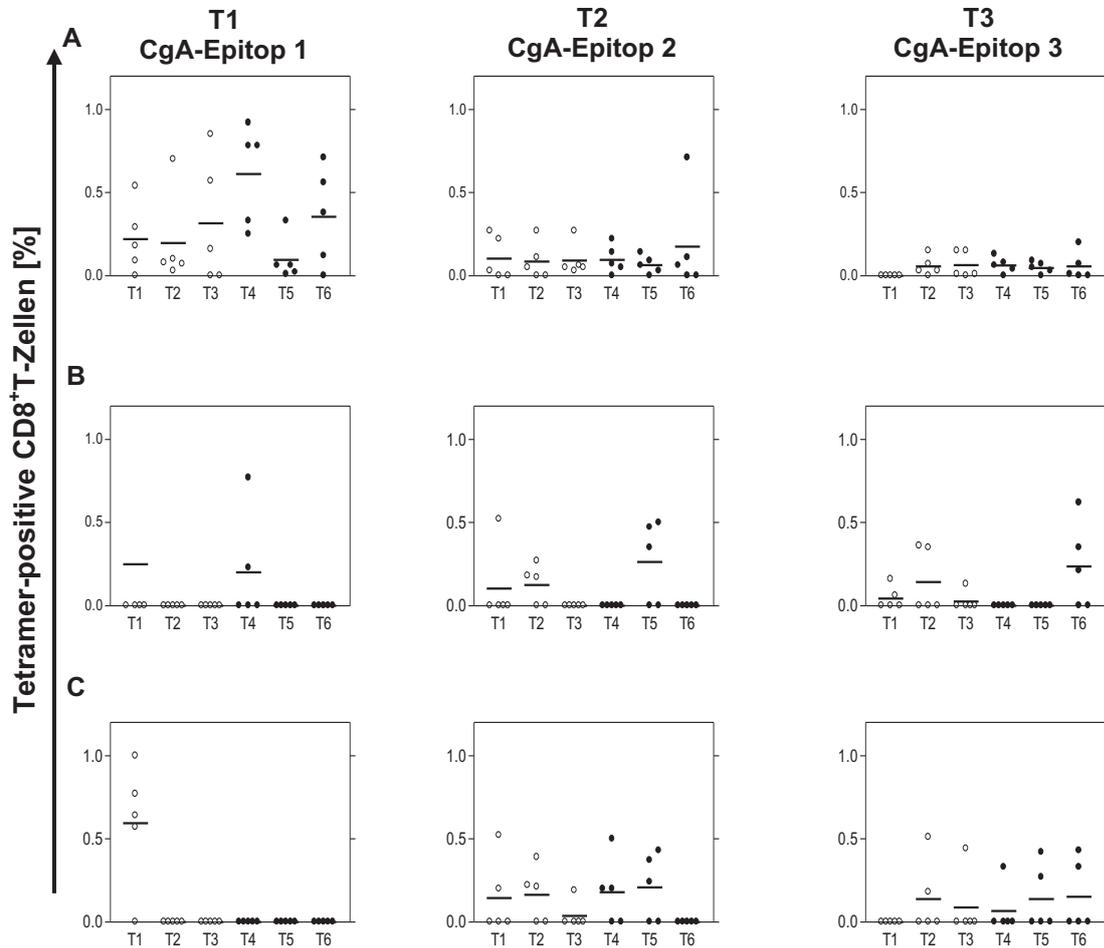


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse von CgA-Epitop-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit einzelnen physiologischen CgA-Peptide (P1-P3). Die T-Zellen aus Milzen und Zellen der Lymphknoten wurden mit FITC-Antikörper gegen $CD8\alpha$ und den jeweiligen Peptid/PE-konjugierten Tetrameren gefärbt und analysiert. Gezeigt wird der prozentuale Anteil reaktiver $CD8^+$ -T-Zellen der Lymphknoten (A), der T-Zellen aus Milzen (B) und der behandelten T-Zellen aus Milzen (C). Gezeigt werden die durchschnittlichen Werte von fünf individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. (○): physiologische CgA-Epitope; (●): Aminosäuresequenz-veränderte CgA-Epitope und T: verschiedene Tetramere.

Die Analyse der Tetramer (T1) CgA-Epitop-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit dem CgA-Epitop P1 ergab einen Anteil von $0,22 \pm 0,09$ % in den LK (Abbildung 11A, links) verglichen mit $0,25 \pm 0,25$ %; ($p = 0,005$) in den unbehandelten Milz- (Abbildung 11B, links) und $0,6 \pm 0,17$ % in den behandelten Milzzellen (Abbildung 11C, links).

Nach Immunisierung mit dem CgA-Epitop P2 lagen die Tetramer (T2) CgA-Epitop-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen bei ca. $1,00 \pm 0,05$ % in den LK (Abbildung 11A, Mitte) und $0,12 \pm$

0,01 % in den unbehandelten Milz-, ($p = 0,08$) (Abbildung 11B, Mitte) bzw. $0,16 \pm 0,07$ % in den behandelten Milzzellen (Abbildung 11C, Mitte).

Für das CgA-Epitop P3 wurden in den LK $0,06 \pm 0,03$ % Tetramer (T3) CgA-Epitop-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen detektiert (Abbildung 11A, rechts) im Vergleich zu $0,25 \pm 0,02$ % in den unbehandelten Milz- (Abbildung 11B, rechts) bzw. $0,16 \pm 0,07$ % in den behandelten Milzzellen (Abbildung 11C, rechts).

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die höchsten Werte an CgA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in den inguinalen LK erzielt wurden (Abbildung 11A). Auffallend war das sogenannte „*epitop Spreading*“ mit dem Nachweis von $CD8^+$ T-Zellen, die andere Tumorepitope erkannten. Außerdem wurden in den unbehandelten Milzzellen die höchsten Werte von $CD8^+$ T-Zellen für das Tetramer (T4) nach Immunisierung mit dem CgA-Epitop P1, für T5 nach Immunisierung mit CgA-Epitop P2 und für T6 nach Immunisierung mit T3 (Abbildung 11B) detektiert. Diese Epitope (P4-P6) unterscheiden sich um mindestens eine Aminosäuresequenz von den physiologischen Epitopen P1-P3.

Da die Immunisierung mit einzelnen physiologischen CgA-Epitopen (P1-P3) nur eine schwache Immunantwort liefert, wurde mit AS-veränderten CgA-Epitopen (P4-P6) immunisiert, um die Immunogenität zu verbessern.

Verglichen mit den natürlichen CgA-Epitopen wurden für die AS-veränderten CgA-Epitope die höheren Werte für Tetramer-spezifische $CD8^+$ T-Zellpopulationen gemessen (Siehe Abbildungen 11 und 12).

Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte der Tetramer-positiven $CD8^+$ T-Zellen nach Immunisierung mit einzelnen AS-veränderten CgA-Epitope (P4-P6).

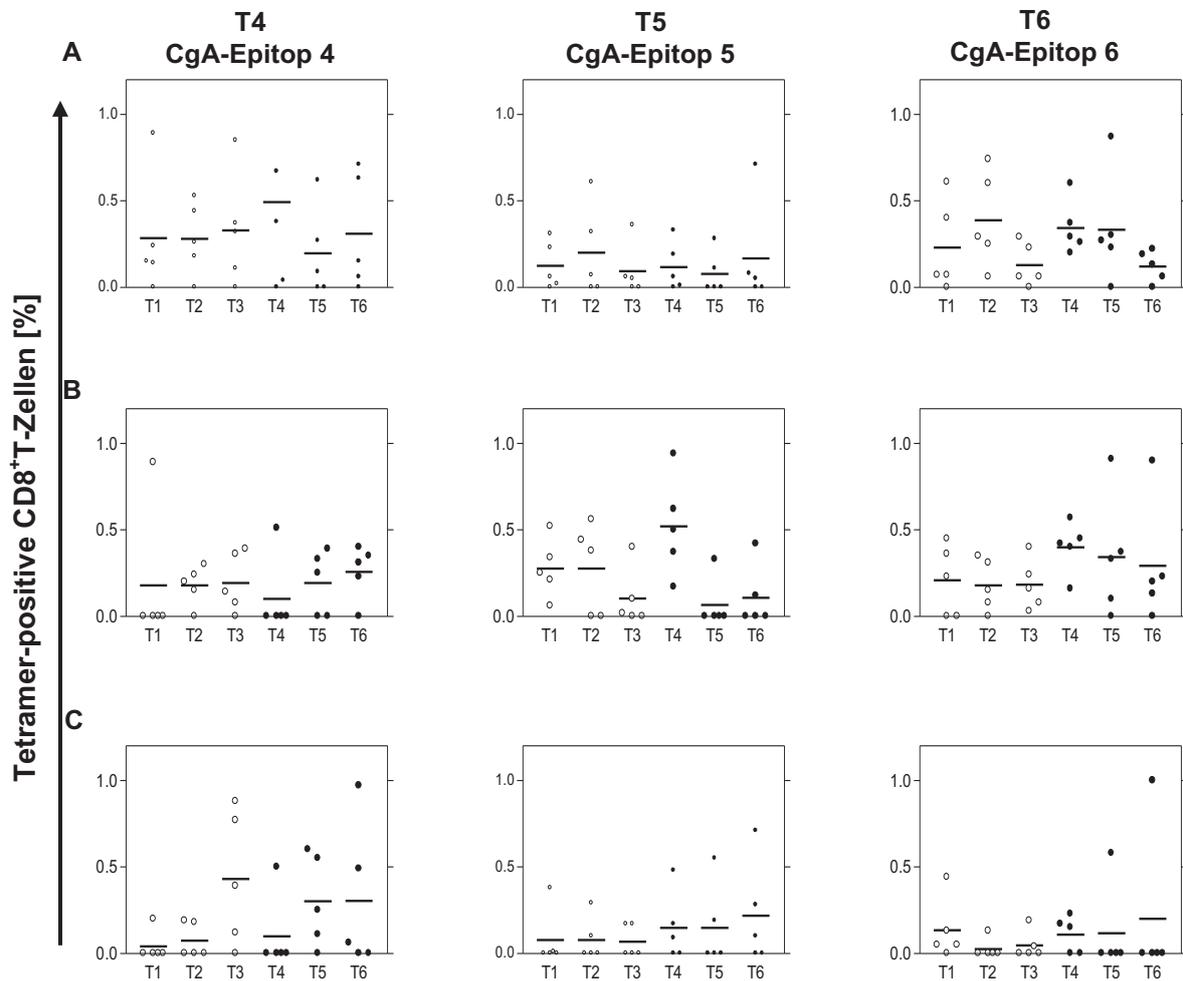


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse von CgA-Epitop-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach Immunisierung mit einzelnen Aminosäure-veränderten CgA-Peptiden (P4-P6). Die Lymphknotenzellen und T-Milzzellen wurden mit dem Antikörper CD8 und den entsprechenden Tetramere (T1-T6) gefärbt und analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an tetramerpositiven $CD8^+$ -T-Zellen in den Lymphknoten (A), in unbehandelten (B) und in mit CgA-Epitopen behandelten (C) Milzzellen. (○): physiologische CgA-Peptid; (●): Aminosäure-veränderte CgA-

Nach Immunisierung mit dem CgA-Epitop P4 waren $0,49 \pm 0,25$ % $CD8^+$ T-Lymphozyten für das Tetramer T4 in den LK (Abbildung 3.6A, links) und $0,11 \pm 0,10$ % in den unbehandelten Milz- (Abbildung 12B, links) bzw. $0,52 \pm 0,12$ % in den behandelten Milzzellen (Abbildung 12C, links) zu finden.

Die Anzahl der CgA-Epitop-reaktiven $CD8$ T-Zellen für das Tetramer T5 betrug $0,15 \pm 0,10$ % in den LK (Abbildung 12A, Mitte), $0,33 \pm 0,14$ % in den unbehandelten Milz- (Abbildung 12B, Mitte) und $0,34 \pm 0,15$ % in den behandelten Milzzellen (Abbildung 12C, Mitte).

Die Ergebnisse zeigten, dass trotz der hohen Bindungsaffinitäten zu MHC-Molekülen keine signifikanten Anteile an CgA-Epitop-reaktiven CD8⁺ T-Zellen für die einzelnen Tetramere (T4-T6) nachgewiesen werden konnten.

Weil die Immunisierung mit einem einzelnen CgA-Peptid sich nur gegen einzelne Antigene richtet, war es schwierig, aus einem Peptid, große Mengen antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, wurde deshalb mit einem Cocktail aus verschiedenen CgA-Peptiden immunisiert, zur Induktion einer effizienten Stimulation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen.

3.2.2. Tetramer-Analyse der CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Ret/Cal-Mäusen mit einem Cocktail aus drei verschiedenen CgA-Epitopen

Für die Immunisierung der Ret/Cal Mäuse mit gemischten CgA-Peptiden ergaben sich drei Gruppen:

Gruppe 1 mit einem Gemisch aus den drei physiologischen Epitopen (P1-P3),

Gruppe 2 mit einem Gemisch aus den drei AS-veränderten Epitopen (P4-P6) und

Gruppe 3 wurde mit einem Gemisch aus allen sechs Epitopen (P1-P6) immunisiert.

3.2.2.1. Tetramer-Analyse der CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einem Cocktail aus drei verschiedenen physiologischen CgA-Epitopen

Nach Immunisierung mit den verschiedenen drei physiologischen CgA-Epitopen (P1-P3) lagen die Anteile an Tetramer bindenden CD8⁺ T-Zellen zwischen 0 % und 0,8 %.

3.2.2.2. Tetramer-Analyse der CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einem Cocktail aus drei verschiedenen Aminosäure-veränderten CgA-Epitopen

Nach Immunisierung mit den verschiedenen drei AS-veränderten CgA-Epitopen (P4-P6) konnten hingegen bis zu 8,51 % Tetramer positiven CD8⁺ T-Zellen gemessen werden (Abbildungen 13 und 14).

Abbildung 13 zeigt die Daten einer Tetrameranalyse nach einer T-Zell-Stimulation mit einem Cocktail aus drei verschiedenen AS-veränderten CgA-Epitopen (P4 bis P6).

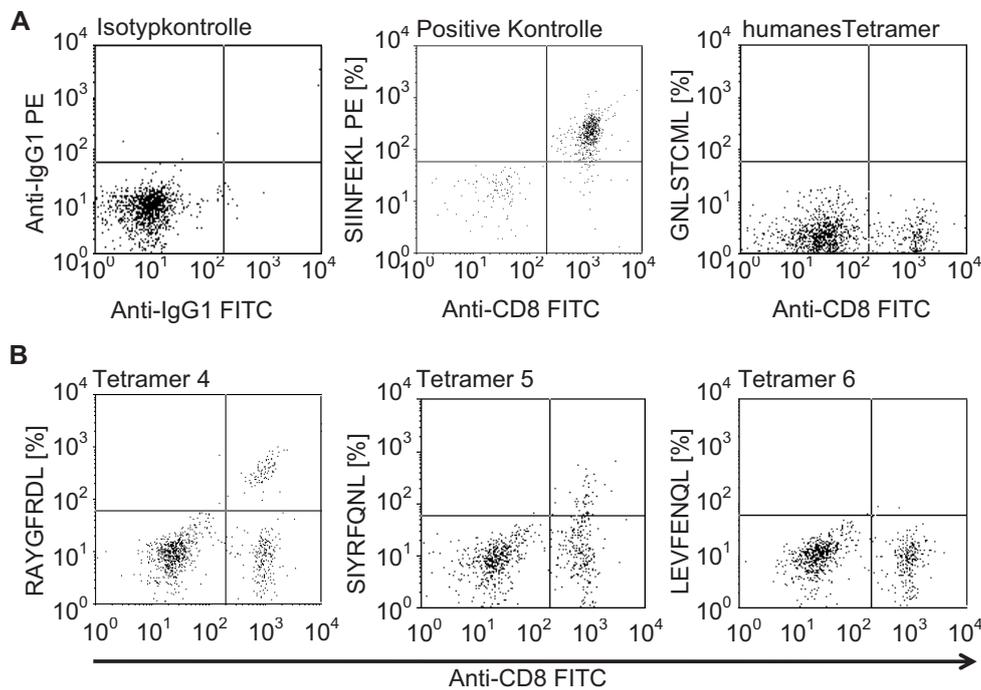


Abbildung 13: Repräsentative Tetramer-Analyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit drei verschiedenen AS-veränderten Peptiden (P4-P6). Gezeigt werden die Prozentzahl in oberen rechten Quadranten an Tetramere bindenden CD8⁺ T-Lymphozyten. Der Anteil an CgA-Epitopen spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten für T4, T5 und T6 wurden ermittelt (B). Neben der Isotypkontrolle (A, links) wurde als Kontrolle der Spezifität der Tetramerfärbung SIINFEKL (H2-K^b) verwendet (A, Mitte). Für die unspezifische Färbung wurde das humane Tetramer GNLSTCML verwendet (A, rechts).

Hier konnte eine Expansion von CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen von 0,3 % bis zu 8,51 % für T4 (Bindungswert: 29), von 0,2 % bis zu 7,55 % für T5 (Bindungswert: 30) und von 0,19 % bis zu ca. 1 % für T6 (Bindungswert: 24) ermittelt werden (Abbildung 3.7B), verglichen mit den einzelnen CgA-Epitopen (Abbildung 3.6). Erwartungsgemäß konnten bis zu 95,4 % SIINFEKL-Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen ermittelt werden (Positivkontrolle). Außerdem konnten keine reaktiven CD8⁺ T-Zellen für das humane Tetramer (GNLSTCML), welches als Negativkontrolle diente, detektiert werden (Abbildung 3.7A).

Die Immunisierung mit drei verschiedenen physiologischen CgA-Epitopen lieferte Werte von CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen 0,0 % für T3 bis 0,1 % für T1.

Die folgenden Diagramme stellen die Mittelwerte der detektierten Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen für die physiologischen (P1-P3) und die AS-veränderten CgA-Epitopen (P4 bis P6) dar.

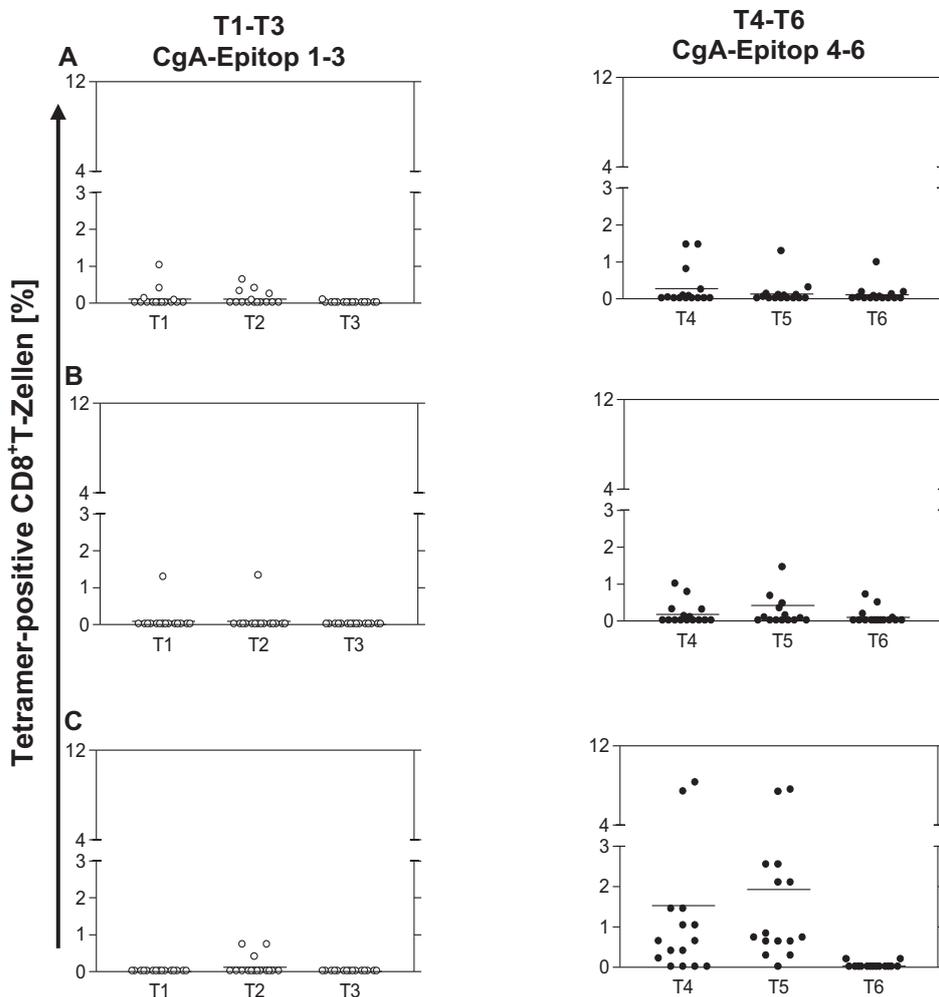


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse CgA-Epitop spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit einem Cocktail aus drei verschiedenen Peptiden. Ret/Cal Mäuse, die mit je 50 µg/µl CgA-Peptiden [(P1-P3) bzw. (P4-P6)]-gepulsten DCs immunisiert worden waren, wurden getötet. Die T-Zellen aus Milzen und LK wurden mit FITC-AK gegen CD8α und den jeweiligen Peptid/PE-konjugierten Tetrameren gefärbt und analysiert. Gezeigt werden reaktiven CD8⁺ T-Zellen der LK (A), aus unbehandelten (B) und mit CgA-Epitopen behandelten Milzen (C). Gezeigt werden die Ergebnisse von fünfzehn individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. (○): Physiologische CgA-Peptidepitope; (●): AS-veränderte CgA-Epitope.

Die Analyse zeigte, dass die meisten CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für die AS-veränderten Peptide (P4-P6) identifiziert wurden (Abbildung 14, rechts).

Insgesamt wurden $0,10 \pm 0,07$ % CgA-Epitop spezifische CD8⁺ T-Zellen für T1; $0,11 \pm 0,05$ % für T2 und $0,006 \pm 0,02$ % für T3 in den inguinalen LK detektiert (Abbildung 14A, links). Für die AS-veränderten CgA-Epitope konnten $0,82 \pm 0,13$ % für T4; $0,20 \pm 0,08$ % für T5 und $0,10$

$\pm 0,06\%$ für T6 ermittelt werden (Abbildung 14B, links). Für die natürlichen CgA-Epitope wurden keine Tetramer-positiven CD8⁺ T-Lymphozyten sowohl in unbehandelten als auch in solchen, die mit CgA-Epitopen behandelt wurden detektiert (Abbildungen 14B und C, links). Demgegenüber wurden für T4 $0,173 \pm 0,80 \%$, für T5 $0,42 \pm 0,22 \%$ und für T6 $0,09 \pm 0,05 \%$ reaktive CD8⁺ T-Zellen in unbehandelten Milzzellen (Abbildung 14B, rechts) nachgewiesen. In behandelten Milzzellen konnten für T4 $1,52 \pm 0,67 \%$, für T5 $1,92 \pm 0,61 \%$ und für T6 $0,19 \pm 0,01 \%$ tetramer-positive CD8⁺ T-Zellen erkannt werden (Abbildungen 14B und C, rechts).

Zusammenfassend führte nur die Immunisierung mit drei verschiedenen AS-veränderten CgA-Peptiden zur Entwicklung einer Anzahl relevanter CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die die untersuchten Tetramere (T4-T6) erkennen konnten.

Da die Tetramer-Analyse nur quantitative Informationen über T-Zellen liefert und keine Aussagen über die Qualität der identifizierten T-Zellen macht, wurde im Folgenden auch die zytotoxische Aktivität untersucht. Auf diese Weise konnte die Funktionalität der CgA-Epitop-bindenden T-Zellen, aufgrund ihrer Fähigkeit, Phäochromozytomzellen zu lysieren, überprüft werden.

3.3. Charakterisierung von Interferon-gamma-produzierenden CgA-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die Hauptfunktion der CD8⁺ T-Zellen ist neben der Sekretion von Immunregulatoren die Erkennung und Zerstörung von Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen. Die Zerstörung kann durch Induktion von Apoptose über den Perforin-, und Granule-Weg oder über den Fas-FasL-vermittelten Signalweg erfolgen (21).

Zur Untersuchung der lytischen Aktivität von IFN- γ -sekretierenden CTLs wurde ein Chrom-Freisetzungsversuch durchgeführt. Hierzu wurden mPCs als Zielzellen eingesetzt, als Kontrollzellen dienten mMTCs, bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis (E:T) von 25:1. Um die Spezifität der CTLs nachzuweisen, wurden die Rezeptoren der MHC-Klasse-I-Moleküle durch Zugabe eines H-2K^b-bindenden Antikörpers blockiert. Über die Lyseaktivität der Effektorzellen sollte herausgefunden werden, ob die *in vitro* stimulierten IFN- γ produzierenden CTLs, die nach Immunisierung mit den einzelnen CgA-Peptiden (P1-P6) und mit einem Cocktail aus drei verschiedenen physiologischen (P1-P3) bzw. AS-veränderten CgA-Peptiden (P4-P6) sowie mit allen CgA-Peptiden (P1-P6) aktiviert wurden, in der Lage waren, die Tumorzellen abzutöten.

3.3.1. Lyse von murinen Phäochromozytomzellen durch tumorspezifische, Interferon-gamma-sezernierende, zytotoxische T-Zellen nach T-Zell-Stimulation mit allen sechs Chromogranin A Peptiden (P1-P6)

Die Immunisierung mit allen sechs CgA-Epitopen führte zur Entwicklung von IFN⁺- γ -sezernierenden CTLs, die fähig waren, die mPCs spezifisch zu erkennen und sie am effektivsten zu lysieren. Eine lytische Aktivität der IFN⁺- γ -produzierenden CTLs von $58,3 \pm 17,8$ % konnte gemessen werden, die durch H-2K^b-Antikörper fast komplett blockiert werden konnte (7,8 %; $p = 0,007$). Im Gegensatz hierzu konnte keine signifikante lytische Wirkung von nicht-aktivierten IFN- γ -negativen CTLs nachgewiesen werden (Abbildung 15), wohingegen nur eine irrelevante lytische Wirkung ($2,0 \pm 1,8$ %) von aktivierten IFN- γ -positiven CTLs auf mMTCs (H2-K^d) nachgewiesen werden konnte.

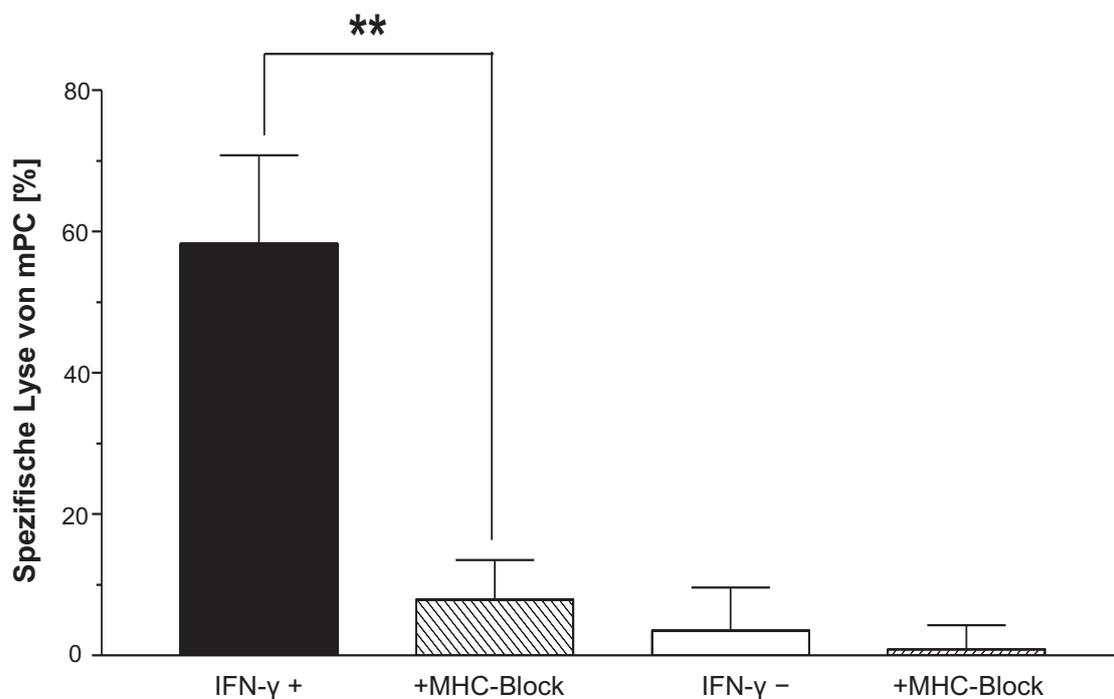


Abbildung 15: Messung der Lyse von CgA-spezifischen IFN- γ produzierenden CTLs. Nach Immunisierung mit allen sechs CgA-Peptiden (P1-P6) wurde die lytische Aktivität der aktivierten IFN⁺ und I IFN⁻-sezernierende CTLs nach Co-Kultierung mit Phäochromozytom-zellen (E:T 25:1) gemessen. Durch Zugabe von MHC-Block (H-2K^b-Antikörper) wurde die zytotoxische Aktivität von CTLs komplett blockiert. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. IFN⁺: aktivierte IFN- γ in CTLs. IFN⁻: nicht-aktivierte IFN- γ in CTL.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass IFN⁺- γ -produzierende CTLs mit einem spezifischen lytischen Effekt nur nach Immunisierung mit einem Cocktail aus allen sechs CgA-Peptiden, d.h. aus den physiologischen sowie auch aus den AS-veränderten Peptiden stimuliert werden konnten.

3.4. Blockierungsanalysen (Cold Target Assays)

Um nachzuweisen, dass die Lyse CgA-Epitop spezifisch ist, wurde die Tumorantigen-spezifität der aktivierten IFN- γ sezernierenden CTLs in Chrom-Freisetzungsversuchen analysiert. Dabei wurde die Blockierungsanalyse (*Cold Target Assay*) angewandt. Hierzu sollte die Lyse der radioaktiv markierten mPCs durch Konkurrenz mit den CgA-Epitopen beladenen, nicht-markierten DCs gehemmt werden, sofern die IFN- γ -positiven CTLs, die von den DCs präsentierten Epitopen spezifisch erkennen.

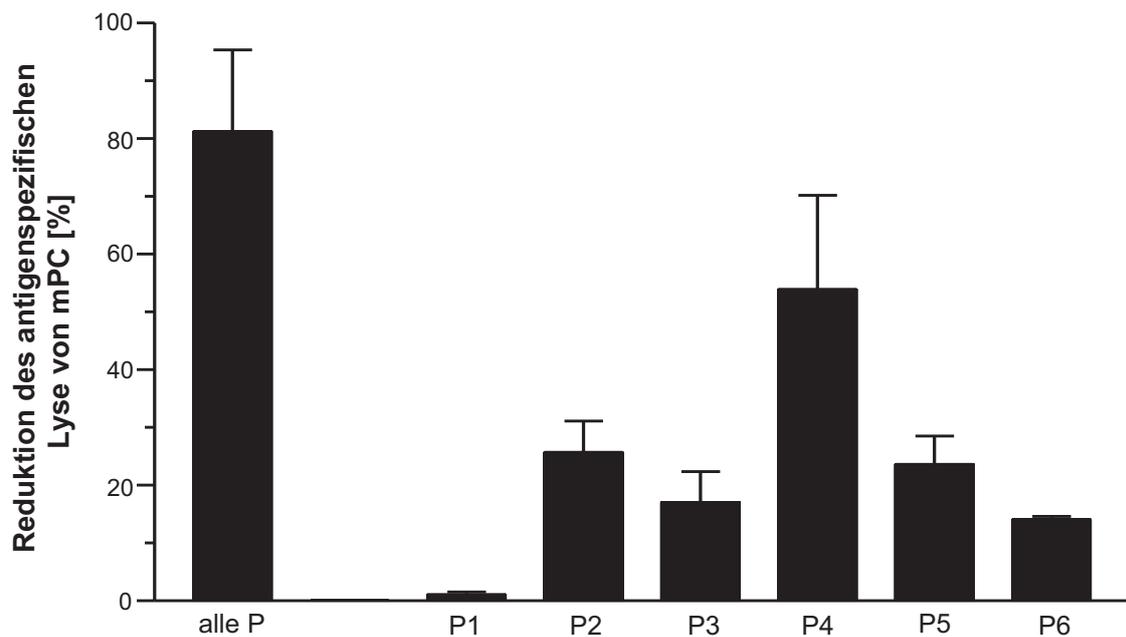


Abbildung 16: Blockierungsanalysen (cold target assays). Zur Messung der Tumorantigen-spezifität wurden 1×10^4 DCs, die mit $50 \mu\text{g}$ des jeweiligen CgA-Epitopes beladen waren, als kalte und 1×10^4 radioaktiv markierte Phäochromozytomzellen als heiße Zielzellen verwendet. Hierbei wurden die mit allen sechs CgA-Epitopen stimulierten IFN+ sezernierenden CTLs als Effektorzellen eingesetzt. P: alle sechs CgA-Epitope (P1-P6), P1 bis P6: CgA-Epitop P1 bis P6.

Es konnte bei allen Proben eine Abnahme der lytischen Aktivität von aktivierten CTLs nachgewiesen werden (Abbildung 16), was auf eine Inhibition der Lyse von mPCs durch peptidbeladene DCs hindeutet. Dabei lag die Reduktion der Lyse für alle sechs CgA-Epitope gleichzeitig bei $81,2 \pm 14,2 \%$. Mit der Ausnahme von CgA-Epitop P1 konnte eine signifikante Reduktion der Lyse für alle anderen CgA-Epitope (P2-P6) gemessen werden, wobei die stärkste Reduktion der Lyse von $53,9 \pm 16,3 \%$ beim CgA-Epitop P4 mit der höchsten Bindungsstärke (29) registriert wurde, was auf eine hohe CgA-Peptidspezifität dieser T-Zellen schließen ließ. Dieses Ergebnis spricht für eine CgA-spezifische Erkennung von Tumorzellen durch CTLs.

3.5. Chromogranin A-Färbung von Gewebeschnitten der Nebennieren

Mit Hilfe histologischer Färbungen sollten der Expressionsort und die Lokalisation von CgAs in der Nebenniere nachgewiesen werden. Dabei wurden die Gewebeschnitte der Nebennieren transgener Ret/Cal-Mäusen mit CgA-Antikörpern markiert. Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse.

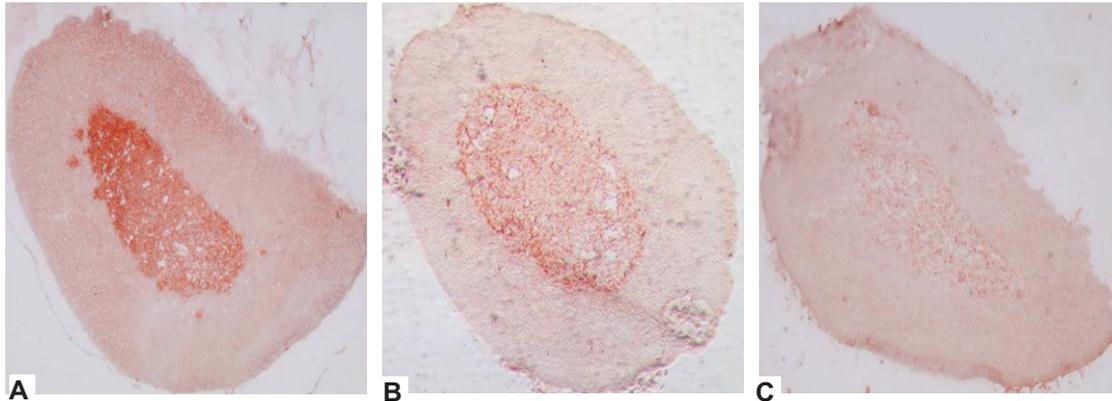


Abbildung 17: Chromogranin A-Färbung des Nebennierenmarks. Die immunisierten Ret/Cal Mäuse wurden getötet, die Nebennieren entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff gebracht und anschließend bei -20 °C bis zur Färbung konserviert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden Kryoschnitte in einer Dicke von 7 µm angefertigt. Die Chromogranin A-Färbung von Kryoschnitten der Nebennieren erfolgte nach ABC-Protokollen (2.2.17.2). Gezeigt ist eine Färbung der Ret/Cal-Maus (A) verglichen zur C57BL/6 Maus (B) sowie zur Kontrollfärbung (C) Vergrößerung, x 40.

Die Abbildung 17 stellt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Nebennieren dar. Es konnte eine starke CgA-Färbung und dichte Expression dieses präsentierenden Tumormarkers in Nebennierenmark von Ret/Cal-Mäusen detektiert werden (Abbildung 17A), wohingegen eine sehr schwache CgA-Färbung und diffuse Verteilung des Proteins im Nebennierenmark von C57BL/6-Mäusen zu finden war (Abbildung 17B). Außerdem war die Kontrollfärbung negativ (Abbildung 17C). Diese Ergebnisse lassen auf eine geringe, natürliche Expression von CgAs in gesunden Geweben schließen. Sie zeigten auch, dass CgA stark im Nebennierenmark von Ret/Cal-Mäusen überexprimiert wird.

3.6. Immunhistologische Analyse

3.6.1. Analyse von tumorinfiltrierten zytotoxischen T-Zellen

Da durch die intravenöse Applikation von Tumorzellen diese nicht nur in die Tumore, sondern auch in entfernte Gewebe wie die Leber oder die Lunge wandern, sollte untersucht werden, inwieweit die Immunisierung mit CgA-Peptiden beladenen DCs und die dadurch aktivierten spezifischen CTLs einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben können. Hierzu wurden die Gewebe aus den Mäusen vierzehn Tage nach intravenöser Injektion der mPCs und mMTC, die als Kontrolle dienten, mit den Antikörpern CD3 und CD8 gefärbt; um tumorinfiltrierende zytotoxische T-Zellen nachzuweisen. Dafür wurden die Gewebeschnitte zuerst mit dem Antikörper CD3 gefärbt, dies gilt als ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung von T-Zellen bei der Bekämpfung von Tumorzellen (Abbildungen 18A und B, Mitte). Danach wurden die T-Zellen auch mit CD8 gefärbt, um CgA-Epitop-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu Charakterisieren (Abbildungen 18A und B, links).

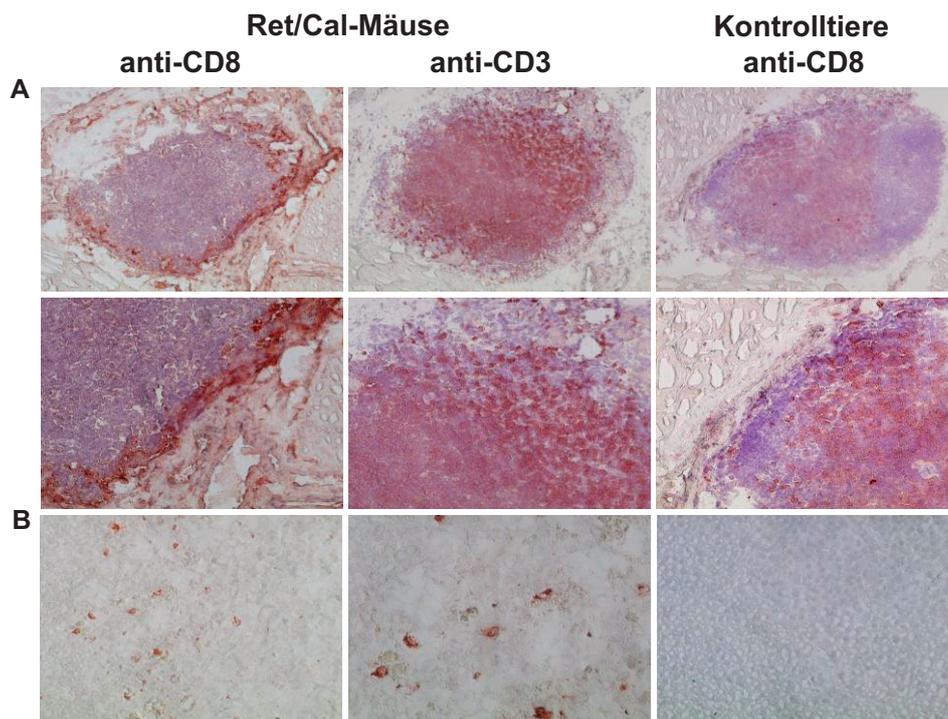


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse. Den immunisierten Ret/Cal-Mäusen wurden i.v. 5×10^6 mPCs injiziert. Vierzehn Tage danach wurden die Mäuse getötet, die tumorinfiltrierten Lebern geschnitten und mit den Antikörpern CD3 und CD8 gefärbt. Gezeigt werden die Färbungen der Tumore mit anti-CD3 (Mitte), mit anti-CD8 (links) und der Kontrolltiere (rechts). Die T-Zell-Infiltration von Leber (A) und die des Nebennierenmarks (B). n = 3; Originale Vergrößerung x 100 (A) und Vergrößerung, x 200 (B).

Die Leberschnitte zeigten Infiltrationen von CD8⁺ T-Zellen in die Tumore von immunisierten Mäusen (Abbildung 18A, links). Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Lunge, detektiert werden. Auch ein ausgeprägtes Lymphozyteninfiltrat mit der CD3-Färbung konnte nachgewiesen werden (Abbildung 18A, Mitte). Dagegen zeigten die Kontrolltiere, die mit Humanalbumin behandelt wurden, keine Tumordinfiltration (Abbildung 18A, rechts). Außerdem waren schwache Tumordinfiltrationen von CD8⁺ T-Zellen im Nebennierenmark der immunisierten Ret/Cal-Mäuse zu sehen (Abbildung 18B, links). Dieses Ergebnis deutet auf die Spezifität der detektierten CD8⁺ T-Zellen hin, die die Tumorzellen erkannten und abtöteten.

3.6.2. Analyse der Tumorgößen

Um den Einfluss der Immunisierung auf die Tumorgöße zu untersuchen, wurden immunisierten Ret/Cal-Mäusen 10⁶ mPCs intravenös (i.v.) appliziert. Als Kontrolle dienten immunisierte Ret/Cal-Mäuse, die Humanalbumin erhalten hatten. Hier wurden an den Leberschnitten histologisch Lebermetastasen detektiert. In den mit CgA-Epitopen behandelten Mäusen konnte eine signifikante Reduktion des Tumorzustands (Abbildungen 19D, E und F) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildungen 19D, E und F).

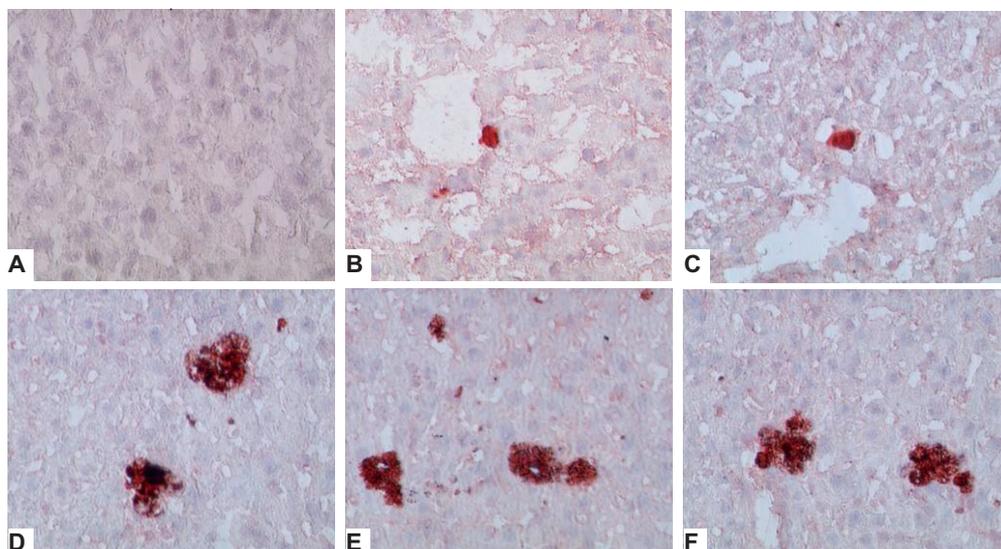


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse zur Bestimmung der Tumorgöße. Immunisierten Ret/Cal-Mäusen wurden i.v. 5×10^6 mPC bzw. mMTC als Kontrolle appliziert. Nach vierzehn Tagen wurden die Lebern entnommen und geschnitten. Die Leberschnitte wurden mit CgA-Antikörpern gefärbt. Gezeigt wurden die Kontrollfärbung (A), mit CgA-Epitopen (P1-P6) behandelte Leber (B, C) und mit Humanalbumin behandelte Leber (D, E, F).

Die Abbildung 20 verblendet die Auswertung der Daten bezüglich der Tumorgöße. Hierzu wurde die Größe der Tumore von zwei Personen dokumentiert. Da es in den Lebern der

Mäuse zur Entstehung mehrerer Tumore gekommen war, wurde die Summe der Tumordurchmesser für die jeweilige Maus ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Photomikroskops (Nikon Eclips TE300), das über eine integrierte Digital Kamera (DXM1200) verfügt. Dazu wurden die Lebermetastasen nach einer Färbung der Leberschnitte fotografiert und digitalisiert. Anschließend konnten die Tumore auf den Digitalfotos mit dem analytischen Programm (Leica QWin V3) integriert und ausgewertet werden. Nach intravenöser Applikation von Tumorzellen (mPC und mMTC) zeigte die Analyse der Lebermetastasen eine deutliche Reduktion der von mPC ausgehenden Metastasen-Bildung von $0,104 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ auf

$0,0242 \pm \text{mm}^2$, was einer Tumorreduktion von 87,4 % ($p = 0,0001$) entspricht, im Vergleich zur Reduktion der von mMTC ausgehender Metastasen $0,13 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ auf $0,15 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ (Abbildung 20).

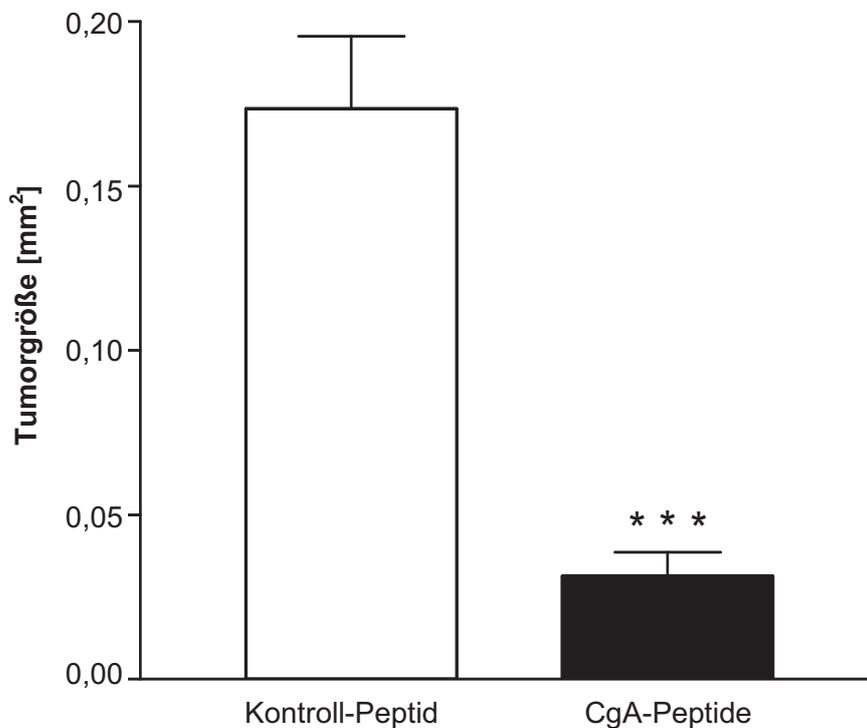


Abbildung 20: Messung der Tumorgößen.

Das Ausmessen der Tumorgößen aller therapierten Mäuse fand vierzehn Tage nach intravenöser Injektion von 5×10^6 Tumorzellen (mPCs und mMTC) statt. Die Lebermetastasen wurden nach einer Färbung der Leberschnitte fotografiert und digitalisiert. Danach konnten die Tumore auf den Digitalfotos mit dem analytischen Programm (Leica QWin V3) integriert und ausgewertet werden. (+): immunisierte Ret/Cal Mäuse. (-): nicht-immunisierte Ret/Cal Mäuse.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Immunisierung mit allen sechs CgA-Peptiden (P1 bis P6) gleichzeitig zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen führt, die eine deutliche Reduktion von Metastasen in Ret/Cal-Mäusen bewirkt.

4. Diskussion

In den letzten Jahren konnten mehrere Studien zeigen, dass DCs als hochpotente Antigen-präsentierende Zellen in der Lage sind, das gesamte Immunsystem zu modulieren und eine zytotoxische Immunantwort zu induzieren (7,152). In einer Vielzahl klinischer Studien konnten erste Erfolge DC-basierter Therapien bei einigen malignen Erkrankungen erreicht werden, so z.B. bei Nierenzell- (151) und Prostatakarzinomen (52), Melanomen (83) sowie bei Nebenschilddrüsen- (142) und Schilddrüsenkarzinomen (113,141,171). Da zur Zeit keine erfolgreiche, konventionelle Therapie des metastasierten Phäochromozytoms vorhanden ist, wurde in dieser Arbeit ein Konzept zur Immuntherapie unter Verwendung immunogener CgA-Epitope untersucht. CgA wurde als Tumorantigen ausgewählt, da es in neuroendokrinen Tumoren per se überexprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung transgener Ret/Cal-Mäuse mit CgA-Epitope beladenen DCs zur Aktivierung und Proliferation von CgA-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen führte. Die Reaktivität der T-Zellen konnte durch zytotoxische T-Zellinfiltrationen in Tumoren, einem funktionellen Test zur antigenspezifischen Lyse von Tumorzellen, und dem *in vivo* induzierten verminderten Tumorwachstum nachgewiesen werden.

CgA wird in Phäochromozytomen, Paragangliomen, in endokrinen und neuroendokrinen Tumoren wie z.B. des Darmes (sogenannte Karzinoide) und der Schilddrüse (medulläres Schilddrüsenkarzinom) überexprimiert (48,146). Eine Studie von Vikman *et al.* mit Mitteldarmkarzinoid-Patienten zeigte, dass hohe CgA-Expressionen mit einer natürlichen Immunantwort gegen das CgA assoziiert sein können. Die Arbeitsgruppe belegte, dass die Erkennung von Tumorantigenen, die mit neuroendokrinen Tumoren assoziiert sind, durch Analyse von spezifischen, aktivierten IFN- γ -positiven CD8⁺ T-Zellen möglich ist. In der besagten Studie wurden im Blut von Patienten 16 verschiedene HLA-A*0201 restringierte Bindungsmotive für sechs identifizierte Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) getestet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der größte Anteil IFN- γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen in neuroendokrinen Tumoren, spezifisch für den neuroendokrinen Tumormarker CgA war (168). Diese Untersuchungen wurden *in vitro* durchgeführt und unterstützten das Konzept dieser Doktorarbeit, eine CgA-basierte Immunisierungsstrategie in transgenen Ret/Cal-Mäusen zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen des Knochenmarks mit GM-CSF differenziert und durch Sortierung nur die gut ausgereiften DCs mit hoher Expression von immunmodulatorischen Oberflächenmolekülen wie CD40, CD80, CD86, sowie MHC-Klasse-I und II-Molekülen verwendet. Dadurch waren die entsprechenden Zellen in der Lage, definierte CgA-Epitope aufzunehmen und durch deren Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle oder durch cross-presentation über MHC-Klasse-I-Moleküle antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren und

zur Proliferation anzuregen. In anderen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass sich diese Zellen als Träger der Zielantigene zur Auslösung einer zytotoxischen Immunantwort eignen, sowohl im Mausmodell (171), als auch bei Patienten, die mit individuellen Heilverfahren behandelt wurden (113).

Die noch ausstehende Frage war, ob die Immunisierung mit Aminosäuresequenz modifizierten Tumorepitopen die Immunantwort gegen Tumorzellen steigern könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Immunisierung von Ret/Cal-Mäusen mit Aminosäure-veränderten, CgA-Peptiden beladenen DCs, eine stärkere Immunreaktion hervorrief als mit unveränderten, natürlichen CgA-Peptiden. Der Grund für die unterschiedliche Immunantwort könnte darin liegen, dass die Effizienz und die Selektivität der T-Zellen unterschiedlich waren. Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedliche Bindungsaffinität der CgA-Peptide zu den jeweiligen MHC-Klasse-I-Molekülen zurückzuführen sein. Aufgrund der niedrigen Bindungswerte entstehen nur schwache Bindungen zwischen den natürlichen, schwach immunogenen CgA-Peptiden und MHC-Klasse-I-Molekülen, was zu einer geringen Stabilität von Peptid/MHC-I-Komplex führt. Es konnte auch hier mit Hilfe von Tetrameranalysen gezeigt werden, dass Ret/Cal-Mäuse, die mit DCs, beladen mit Aminosäure-modifizierten CgA-Peptiden, immunisiert worden waren, einen Anstieg der Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen insbesondere für die am meisten immunogenen Aminosäure-veränderten CgA-Epitope P4 und P5, in der Milz vorwies. Die Ursache hierfür könnte eine hohe Bindungsaffinität der Aminosäure-veränderten CgA-Peptide an das jeweilige MHC-Klasse-I-Molekül sein, was zu einer hohen Stabilität von Peptid/MHC-I-Komplex führt. Außerdem zeigten die Analysen der mit allen sechs CgA-Epitopen gleichzeitig immunisierten Mäuse hohe potentielle Kreuzreaktivitäten, da sowohl die Aminosäure-modifizierten als auch die äquivalenten, natürlichen CgA-Epitope von stimulierten CD8⁺ T-Zellen erkannt wurden. In Übereinstimmung mit Daten anderer Arbeitsgruppen konnte in unserem Mausmodell gezeigt werden, dass die Immunisierung mit mehreren Peptiden zur Induktion einer starken antigenspezifischen Immunantwort führte.

Zusätzlich konnte die Antigenpezifität der Lyseaktivität dieser Zellen mit Hilfe der Blockierungsanalyse (*Cold Target Assays*) im *in vitro* Chrom-Freisetzungsversuch gezeigt werden. Auf der Basis dieser Assays war es möglich, Epitope der zytotoxischen Reaktion exakt zu definieren. Ähnliches konnte auch von anderen Tumoren anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden (61,94). Dafür wurden DCs mit einzelnen Peptidsequenzen beladen und als „kalte“ Zielzellen eingesetzt. Hierbei wurde eine starke Reduktion der lytischen Aktivität für mindestens ein verändertes CgA-Epitop (P4), aber auch für die natürlichen CgA-Epitope P2 und P3 erreicht, was auf eine hohe Epitop-Spezifität dieser Zellen schließen lässt. Somit bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die mit xenogenen Tumorepitopen

induzierten, spezifischen CTLs auch fähig sein können, Primärtumore zu lysieren, unabhängig von der Bindungsaffinität zu natürlichen Polypeptiden (176).

In anderen Studien zu endokrinen Malignomen wurde gezeigt, dass xenogene Polypeptidhormone vom Immunsystem erkannt werden konnten und zu einer Th1-Immunität führten (13,14,112). Außerdem wurden bereits in der Vergangenheit sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten vergleichbare Studien mit xenogenen Tumorepitopen erfolgreich für nicht-endokrine Malignome durchgeführt (45,46,129,176). Auch hier führte der Austausch von Aminosäuren im ursprünglichen Epitop zu einer verbesserten Erkennung durch Antigenpräsentierende Zellen. Dies könnte an einer erhöhten Bindungsaffinität durch gezielte Substitutionen von verschiedenen Aminosäuresequenzen an Ankerresten des MHC-Klasse-I-Moleküls an den Positionen fünf und acht der H-2K^b-bioaktiven Stellen liegen (109,122). Eine weitere Erklärung wäre die erhöhte Stabilität des MHC/Peptidkomplexes durch Austausch der dritten Aminosäure als zusätzlichen Ankerrest (17,116). Durch Stimulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen kann auch die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen, die hauptsächlich die zelluläre Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) unterdrücken, ausgeblendet werden. Modifikationen der Aminosäuresequenzen natürlicher Polypeptide führten so zu der erwarteten Kreuzreaktivität.

Entsprechend konnten weitere Studien unserer und anderer Forschergruppen demonstrieren, dass die Immunisierung von Mäusen (171) und Patienten (13,14,112,113) mit AS-modifizierten Peptiden zu einer starken antigenspezifischen Immunantwort führten. Bei Mäusen konnte eine Unterdrückung der Tumorentstehung und bei Patienten eine Verminderung der Tumormasse nachgewiesen werden. Diese Verbesserung der zellulären Immunantwort konnte durch gesteigerte Bindungsaffinitäten von Aminosäuresequenzen zu MHC-Molekülen selbst, aber auch aufgrund einer Bindung an Ankerpositionen in den MHC-Molekülen durch die Stabilität des MHC/Peptidkomplexes, wie oben beschrieben, erreicht werden (13,17,109,116,122).

Bei histologischen Betrachtungen der Leber zeigte sich zwei Wochen nach Applikation von Tumorzellen anhand von mikroskopischen Präparaten eine klare Abnahme der Tumorgroße um 87,4 % im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 20). Im Gegensatz zu Ret/Cal-Mäusen, die eine deutliche T-Zell-Infiltration aufwiesen, wurden nur vereinzelt zelluläre T-Zell-Infiltrate bei Kontrolltieren beobachtet. Ebenfalls konnte auch eine schwache T-Zell-Infiltration im Nebennierenmark von Ret/Cal-Mäusen visualisiert werden.

Von besonderer Bedeutung ist der Unterschied zwischen der starken T-Zellinfiltration in Bereichen, in denen die Tumorzellen exogen appliziert wurden und die schwache T-Zellinfiltration im Nebennierenmark, in dem das CgA stark exprimiert wird. Hier sind folgende Erklärungen denkbar: (1) Trotz hoher CgA-Expression im Nebennierenmark von transgenen Ret/Cal-Mäusen scheint diese nicht ausreichend, um eine starke zytotoxische Antwort

auszulösen, verglichen mit der CgA-Expression in den neuroendokrinen Tumorzellen (167); (2) Möglich wäre, dass normale, neuroendokrine Zellen, die große Mengen an CgA aufweisen, verschiedene CgA-Epitope exprimieren, die nicht in den Tumorzellen vorkommen. Das kann dazu führen, dass gegen diese Epitope die Auswahl an passenden T-Zell-Rezeptoren gering ist und nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen mit entsprechend geringer T-Zellinfiltration erkannt werden konnte, (118); (3) Die schwache T-Zellinfiltration des Nebennierenmarks könnte durch eine verringerte bzw. fehlende Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erklärt werden, die zu einer besseren Präsentation der Tumorantigene und so zur besseren Erkennung durch T-Zellen notwendig sind (66,164); (4) In der extrazellulären Mikroumgebung des Tumors könnten verschiedene Chemokine und Cytokine sezerniert werden, von denen einige immunsuppressive Eigenschaften besitzen, und die somit die Zahl und Aktivität reaktiver T-Zellen mindern (49,89,114) oder die Immunantwort manipulieren, indem sie regulatorische T-Zellen anlocken oder stimulieren (6,90).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass sowohl die normalen und präkanzerösen Zellen des Nebennierenmarks, im Gegensatz zu hoch-proliferativen Phäochromozytomzellen keiner T-Zell-Invasion unterworfen sein könnten. Bemerkenswert ist jedoch, dass in Anbetracht aller Erklärungen kein histologischer Hinweis der Tumorentstehung im Nebennierenmark von transgenen Ret/Cal-Mäusen nachweisbar war.

Unterschiede in der Expression von Tumorepitopen für andere bösartige Tumore konnten bereits nachgewiesen werden. Hierfür stellt die Expression von „*Cancer-Testis*“-Epitopen ein besonders gutes Beispiel dar. Diese Antigene bilden eine heterogene Gruppe von Peptiden, die vorwiegend auf Keimzellen der „Testis“ und Trophoblasten exprimiert werden (135). Einige dieser „Testis“-Antigene wurden auch bei verschiedenen anderen Tumorarten beschrieben (56,64,135). Weil ihre Expression in Normalgeweben beschränkt ist, und die „Testis“-Antigene aufgrund fehlender MHC-Klasse-I- und II-Moleküle im Hodengewebe immunprivilegiert sind und somit nicht angegriffen werden können, eignen sie sich besonders als Zielantigene für neue Anti-Tumor-Therapiestrategien. Deshalb könnten sie als Zielantigene zur Entwicklung von therapeutischen Krebsimpfstoffen dienen (56,65,110,162).

Mit Ausnahme von Melanompatienten, die mit Melanom-Antigenen immunisiert wurden und Vitiligo, eine Immunreaktion der Haut, die durch Infiltrationen gesunder Haut mit Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen ausgelöst wird, entwickelten, konnte nach der Immunisierung mit einigen „Testis“-Antigenen eine Infiltration der Tumorgewebe mit T-Zellen, aber nicht des Normalgewebes nachgewiesen werden (8,63,172). Es wird jedoch vermutet, dass infolge der T-Zell-Infiltrationen von Tumorzellen Tumorantigene spezifisch von CTLs erkannt und abgetötet werden könnten, wohingegen nur marginal normale Zellen angegriffen werden. Dieser Effekt scheint auch bei neuroendokrinen Tumoren vorzukommen, bei denen verschiedene Tumorepitope je nach Malignitätsgrad und Tumormasse erkannt wurden

(55,167). Dies könnte eventuell Unterschiede in der Expression von Prohormonkonvertasen und anderen Enzymen hervorrufen, die für die Prozessierung von Proteinen in Sekretgranula verantwortlich sind. Die Expression solcher proteolytischer Enzyme in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks unterscheidet sich von der in Tumorgeweben des Phäochromozytoms (49,89). Aus diesem Grund zeigen diese Zellen entsprechende Unterschiede im Expressionsmuster von Peptidprodukten in den Sekretgranula, ein Ereignis, das aktiv zur Diagnosestellung von chromaffinen Tumorzellen und auch zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Tumoren genutzt wird (6,49,89). Demzufolge konnte eine 10fach höhere Expression des Peptidfragments CgA₃₂₄₋₃₃₇ in benignen Gewebeproben von Tumorpatienten mit Phäochromozytomen nachgewiesen werden im Vergleich zu malignen Tumoren (6). Abgesehen von ihrer großen Bedeutung zur Diagnose- und Prognosestellung, könnten die gewonnenen Erkenntnisse dazu dienen, eine peptidbasierte spezifische Immuntherapie mit Tumor-assoziierten Peptiden aus den Sekretgranula zu entwickeln. Die Charakterisierung von Proteinexpressionsmustern sowohl bei benignen als auch bei malignen Tumoren könnte somit neue Wege zur Identifizierung vielversprechender Tumorepitope im Vergleich zu normalen Geweben eröffnen. Diese Tumorepitope aus Sekretgranula könnten für die Entwicklung neuer Immuntherapien gegen neuroendokrine Tumore dienen, die in klinischen Studien angewandt werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit CgA-Epitopen zur Induktion von aktivierten IFN- γ -sezernierenden CTLs führte, die fähig waren, CgA exprimierende Tumorzellen direkt zu lysieren. Die Untersuchung von syngenesischen Maus-Tumormodellen bewies, dass CgAs als Zielmoleküle für eine neue Immuntherapie gegen maligne Phäochromozytome verwendet werden könnten.

Über ihre Anwendung an Patienten mit bekannten malignen Hormon-sezernierenden Tumoren hinaus bietet diese Therapie neue Möglichkeiten. So könnte sie auch zur Prophylaxe gegen Tumore nach Immunisierung von Patienten mit malignen oder benignen Phäochromozytomen infolge früherer Tumorerkrankungen oder prädisponierenden Keimbahnmutationen eingesetzt werden. Besonders betroffen sind neben den oben genannten Patienten aber auch diejenigen, die Mutationen in der B-Untereinheit des Succinatdehydrogenase-Gens (SDHB-Gen) tragen. Diese Genmutationen sind mit einem deutlich erhöhten Risiko für einen malignen, chromaffinen Tumor verbunden und können damit maligne neuroendokrine Tumoren verursachen (4,98).

Die vorliegenden Ergebnisse bieten neue Therapieoptionen nicht nur gegen maligne Phäochromozytome, sondern auch gegen andere neuroendokrine und endokrine Tumore, die CgA überexprimieren. Dazu zählen insbesondere die am meisten verbreiteten und malignen, neuroendokrinen Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP). Diese Tumore zeigen häufig eine hohe CgA-Expression und stellen daher mögliche Ziele einer CgA-

basierten Immuntherapie dar (10). Dadurch würde sich die Überlebensrate der Patienten verbessern.

5. Zusammenfassung

Es gibt keine effektiven Therapieoptionen für die Behandlung von metastasierten neuroendokrinen Tumorerkrankungen wie dem malignen Phäochromozytom und Paragangliom, und dem medullären Schilddrüsenkarzinom. Im Fall des malignen Phäochromozytoms sind bisher keine Tumor-Antigene bekannt, und die klinischen Zeichen sind leider häufig unspezifisch und wenig sensitiv, was die Diagnosestellung erschwert. Daher wurde das Chromogranin A (CgA) als Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) identifiziert, das in den meisten neuroendokrinen Tumoren stark überexprimiert wird. Eine CgA-basierte Immuntherapie in Form von dendritischen Zellen konnte angewandt werden, um eine zytotoxische Immunität zu induzieren und somit neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. So konnte bereits eine Verminderung des Tumorwachstums bei transgenen Ret/Cal-Mäusen nach Immunisierung mit CgA beladenen dendritischen Zellen erzielt werden. In dieser Arbeit wurden transgene Ret/Cal-Mäuse im Abstand von zwei Wochen und über einen Zeitraum von sechs Wochen mit HLA-identischen (H-2K^b), dendritischen Zellen, die mit verschiedenen CgAs beladen waren, immunisiert. Dabei wurden verschiedene Immunisierungsstrategien durchgeführt, um die Effizienz der starken immunogenen Epitope zu untersuchen. Als Kontrollpeptid diente Humanalbumin. Weil die Ret/Cal-Mäuse keine Metastasen vorwiesen, wurden ihnen Phäochromozytomzellen injiziert. Nach Applikation von Tumorzellen wurden bei den therapierten Mäusen Infiltrationen von CD8⁺ T-Zellen in den Tumorgewebe nachgewiesen. Dabei konnten CgA-spezifische CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit veränderten Peptiden detektiert werden. Außerdem wurde eine spezifische Lyse von Phäochromozytomzellen durch IFN- γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen ($58,3 \pm 17,8$ %) beobachtet. Die höchste zytotoxische Aktivität fand sich für das AS-veränderte Peptid P4 als auch für die natürlichen Epitope P2 und P3.

Die Ergebnisse zeigen, dass CgAs als Zielmoleküle für eine neue Immuntherapie gegen maligne Phäochromozytome verwendet werden könnten. Außerdem könnten diese Erkenntnisse dazu dienen, eine peptidbasierte spezifische Immuntherapie mit Tumor-assoziierten Peptiden aus den Sekretgranula zu entwickeln. Diese Tumorepitope aus Sekretgranula könnten für die Entwicklung neuer Immuntherapien gegen neuroendokrine Tumore dienen, die in klinischen Studien angewandt werden könnten.

6. Summary

There is no effective therapy option for the treatment of metastasized neuroendocrine tumors such as malignant pheochromocytoma or paraganglioma, and medullary thyroid carcinoma. In the case of malignant pheochromocytoma so far no tumor antigens are well-known, and the clinical indications are often nonspecific and, unfortunately, less sensitive, which complicates the diagnostic. Therefore, the Chromogranin A (CgA) was identified as tumor-associated antigen (TAA) which is strongly overexpressed in most neuroendocrine tumors. A CgA-based immunotherapy in the form of dendritic cells could be used, in order to induce a cytotoxic immunity and thus to develop new possibilities of treatment. So a reduction for tumor growth could be already obtained with transgenic Ret/Cal mice after immunization with CgA-loaded dendritic cells.

In this work transgenic Ret/Cal mice were treated with DCs pulsed with six different CgA-peptides over a period of six weeks and at injection intervals of two weeks. Various immunization strategies have been conducted in order to investigate the efficiency of the strong immunogenic epitopes. Human albumin was monitored in control experiments. The mice were injected with pheochromocytoma cells, because initially they did not show metastases. Tetramer analyses of inguinal lymphocytes showed large increases of CgA-specific CD8⁺ T cells in mice treated with CgA peptides. Immunohistochemistry of tumors indicated extensive infiltration by CD8⁺ T cells. In vitro chromium release assays revealed strong cytotoxic activity ($58,3 \pm 17,8$ %) of IFN- γ secreting CD8⁺ T cells. Cold targeting analyses revealed that lysis activity of cytotoxic T cells was mainly mediated by CD8⁺ T cells specific for the modified peptid 4 as well as for the natural epitopes P2 und P3.

This study shows that CgA can serve as target molecule for novel immunotherapies directed at malignant pheochromocytoma. These findings have additional significance for development of immunotherapies targetings secretory peptides.

7. Literaturverzeichnis

1. **Aardal, S., N. P. Aardal, T. H. Larsen, R. H. Angeletti, M. Stridsberg, L. Taupenot, D. Aunis, and K. B. Helle.** 1996. Human pheochromocytoma: different patterns of catecholamines and chromogranins in the intact tumour, urine and serum in clinically unsuspected cases. *Scand.J.Clin.Lab Invest* **56**:511-523.
2. **Aardal, S., K. B. Helle, S. Elsayed, R. K. Reed, and G. Serck-Hanssen.** 1993. Vasostatsins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J.Neuroendocrinol.* **5**:405-412.
3. **Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, T. Paterson, J. L. Haley, J. A. Ross, D. L. Longo, W. J. Murphy, K. James, and D. D. Taub.** 2000. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol.Immunol.* **37**:515-526.
4. **Amar, L., E. Baudin, N. Burnichon, S. Peyrard, S. Silvera, J. Bertherat, X. Bertagna, M. Schlumberger, X. Jeunemaitre, A. P. Gimenez-Roqueplo, and P. F. Plouin.** 2007. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**:3822-3828.
5. **Amar, L., A. Servais, A. P. Gimenez-Roqueplo, F. Zinzindohoue, G. Chatellier, and P. F. Plouin.** 2005. Year of diagnosis, features at presentation, and risk of recurrence in patients with pheochromocytoma or secreting paraganglioma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**:2110-2116.
6. **Anouar, Y., L. Yon, J. Guillemot, E. Thouennon, L. Barbier, A. P. Gimenez-Roqueplo, J. Bertherat, H. Lefebvre, M. Klein, M. Muresan, E. Grouzmann, P. F. Plouin, H. Vaudry, and A. G. Elkahloun.** 2006. Development of novel tools for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma using peptide marker immunoassay and gene expression profiling approaches. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1073**:533-540.
7. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* **18**:767-811.
8. **Banchereau, J. and A. K. Palucka.** 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat.Rev.Immunol.* **5**:296-306.
9. **Banchereau, J. and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
10. **Baudin, E., A. Gigliotti, M. Ducreux, J. Ropers, E. Comoy, J. C. Sabourin, J. M. Bidart, A. F. Cailleux, R. Bonacci, P. Ruffie, and M. Schlumberger.** 1998. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br.J.Cancer* **78**:1102-1107.
11. **Benedum, U. M., P. A. Baeuerle, D. S. Konecki, R. Frank, J. Powell, J. Mallet, and W. B. Huttner.** 1986. The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J.* **5**:1495-1502.

12. **Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E. M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau, and A. K. Palucka.** 2000. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J.Exp.Med.* **192**:1535-1544.
13. **Betea, D., A. R. Bradwell, T. C. Harvey, G. P. Mead, H. Schmidt-Gayk, B. Ghaye, A. F. Daly, and A. Beckers.** 2004. Hormonal and biochemical normalization and tumor shrinkage induced by anti-parathyroid hormone immunotherapy in a patient with metastatic parathyroid carcinoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**:3413-3420.
14. **Bradwell, A. R. and T. C. Harvey.** 1999. Control of hypercalcaemia of parathyroid carcinoma by immunisation. *Lancet* **353**:370-373.
15. **Brekke, J. F., J. Kirkeleit, K. Lugardon, and K. B. Helle.** 2000. Vasostatins. Dilators of bovine resistance arteries. *Adv.Exp.Med.Biol.* **482**:239-246.
16. **Brouwers, F. M., G. Eisenhofer, J. W. Lenders, and K. Pacak.** 2006. Emergencies caused by pheochromocytoma, neuroblastoma, or ganglioneuroma. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* **35**:699-724, viii.
17. **Butler, N. S., A. Theodossis, A. I. Webb, R. Nastovska, S. H. Ramarathinam, M. A. Dunstone, J. Rossjohn, A. W. Purcell, and S. Perlman.** 2008. Prevention of cytotoxic T cell escape using a heteroclitic subdominant viral T cell determinant. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000186.
18. **Ceconi, C., R. Ferrari, T. Bachetti, C. Opasich, M. Volterrani, B. Colombo, G. Parrinello, and A. Corti.** 2002. Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *Eur.Heart J.* **23**:967-974.
19. **Cetin, Y. and D. Grube.** 1991. Topology of chromogranins in secretory granules of endocrine cells *Histochemistry* **96**:301-310.
20. **Chanat, E.** 1993. [Mechanism of sorting of secretory proteins and formation of secretory granules in neuroendocrine cells]. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* **187**:697-725.
21. **Chavez-Galan, L., M. C. renas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, and R. Lascurain.** 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol.Immunol.* **6**:15-25.
22. **Ciesielski-Treska, J., G. Ulrich, S. Chasserot-Golaz, J. Zwiller, M. O. Revel, D. Aunis, and M. F. Bader.** 2001. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *J.Biol.Chem.* **276**:13113-13120.
23. **Ciesielski-Treska, J., G. Ulrich, L. Taupenot, S. Chasserot-Golaz, A. Corti, D. Aunis, and M. F. Bader.** 1998. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J.Biol.Chem.* **273**:14339-14346.
24. **Colombo, B., F. Curnis, C. Foglieni, A. Monno, G. Arrigoni, and A. Corti.** 2002. Chromogranin A expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models. *Cancer Res.* **62**:941-946.
25. **Corti, A., R. Longhi, A. Gasparri, F. Chen, M. Pelagi, and A. G. Siccardi.** 1996. Antigenic regions of human chromogranin A and their topographic relationships with structural/functional domains. *Eur.J.Biochem.* **235**:275-280.

26. **Costello, R. T., J. A. Gastaut, and D. Olive.** 1999. [Mechanisms of tumor escape from immunologic response]. *Rev.Med.Interne* **20**:579-588.
27. **Courel, M., M. S. Vasquez, V. Y. Hook, S. K. Mahata, and L. Taupenot.** 2008. Sorting of the neuroendocrine secretory protein Secretogranin II into the regulated secretory pathway: role of N- and C-terminal alpha-helical domains. *J.Biol.Chem.* **283**:11807-11822.
28. **Cranston, A. N., C. Carniti, K. Oakhill, E. Radzio-Andzelm, E. A. Stone, A. S. McCallion, S. Hodgson, S. Clarke, P. Mondellini, J. Leyland, M. A. Pierotti, J. Whittaker, S. S. Taylor, I. Bongarzone, and B. A. Ponder.** 2006. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res.* **66**:10179-10187.
29. **d'Herbomez, M., G. Forzy, C. Bauters, C. Tierny, P. Pigny, B. Carnaille, F. Pattou, J. L. Wemeau, and N. Rouaix.** 2007. An analysis of the biochemical diagnosis of 66 pheochromocytomas. *Eur.J.Endocrinol.* **156**:569-575.
30. **de Bruine, A. P., T. Wiggers, C. Beek, A. Volovics, M. M. von, J. W. Arends, and F. T. Bosman.** 1993. Endocrine cells in colorectal adenocarcinomas: incidence, hormone profile and prognostic relevance. *Int.J.Cancer* **54**:765-771.
31. **Defetos, L. J.** 1991. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr.Rev.* **12**:181-187.
32. **Dillen, L., B. J. De, L. L. Van, and P. W. De.** 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for chromogranin A. *Clin.Chem.* **35**:1934-1938.
33. **Drees, B. M. and J. W. Hamilton.** 1992. Pancreastatin and bovine parathyroid cell secretion. *Bone Miner.* **17**:335-346.
34. **Dudley, M. E. and S. A. Rosenberg.** 2007. Adoptive cell transfer therapy. *Semin.Oncol.* **34**:524-531.
35. **Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. M. Sherry, F. M. Marincola, S. F. Leitman, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, A. Nahvi, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg.** 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.* **25**:243-251.
36. **Eisenhofer, G.** 2006. Pheochromocytoma: recent advances and speed bumps in the road to further progress. *J.Hypertens.* **24**:2341-2343.
37. **Fasciotto, B. H., S. U. Gorr, D. J. DeFranco, M. A. Levine, and D. V. Cohn.** 1989. Pancreastatin, a presumed product of chromogranin-A (secretory protein-I) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. *Endocrinology* **125**:1617-1622.
38. **Fasciotto, B. H., C. A. Trauss, G. H. Greeley, and D. V. Cohn.** 1993. Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology* **133**:461-466.
39. **Feng, C., H. Z. Li, W. G. Yan, Y. F. Luo, and J. L. Cao.** 2005. [The expression and significance of chromogranin A and synaptophysin in adrenal gland tumors]. *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **27**:486-488.

40. **Frezza, E. E., S. Ikramuddin, W. Gourash, and P. Schauer.** 2002. Laparoscopic resection of a large periadrenal nonmalignant pheochromocytoma. *Surg.Endosc.* **16**:362-363.
41. **Gallo, M. P., R. Levi, R. Ramella, A. Brero, O. Boero, B. Tota, and G. Alloatti.** 2007. Endothelium-derived nitric oxide mediates the antiadrenergic effect of human vasostatin-1 in rat ventricular myocardium. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **292**:H2906-H2912.
42. **Gill, B. M., J. A. Barbosa, R. Hogue-Angeletti, N. Varki, and D. T. O'Connor.** 1992. Chromogranin A epitopes: clues from synthetic peptides and peptide mapping. *Neuropeptides* **21**:105-118.
43. **Giovanella, L.** 2005. Serum chromogranin-A assay in differential diagnosis of incidentally discovered adrenal masses. *Anticancer Res.* **25**:1547-1550.
44. **Giovanella, L. and L. Ceriani.** 2002. Serum chromogranin-alpha immunoradiometric assay in the diagnosis of pheochromocytoma. *Int.J.Biol.Markers* **17**:130-134.
45. **Gold, J. S., C. R. Ferrone, J. A. Guevara-Patino, W. G. Hawkins, R. Dyll, M. E. Engelhorn, J. D. Wolchok, J. J. Lewis, and A. N. Houghton.** 2003. A single heteroclitic epitope determines cancer immunity after xenogeneic DNA immunization against a tumor differentiation antigen. *J.Immunol.* **170**:5188-5194.
46. **Graff-Dubois, S., O. Faure, D. A. Gross, P. Alves, A. Scardino, S. Chouaib, F. A. Lemonnier, and K. Kosmatopoulos.** 2002. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J.Immunol.* **169**:575-580.
47. **Grimes, M., A. Iacangelo, L. E. Eiden, B. Godfrey, and E. Herbert.** 1987. Chromogranin A: the primary structure deduced from cDNA clones reveals the presence of pairs of basic amino acids. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **493**:351-378.
48. **Grossrubatscher, E., P. Dalino, F. Vignati, M. Gambacorta, R. Pugliese, M. Boniardi, O. Rossetti, A. Marocchi, M. Bertuzzi, and P. Loli.** 2006. The role of chromogranin A in the management of patients with phaeochromocytoma. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **65**:287-293.
49. **Guillemot, J., L. Barbier, E. Thouennon, V. Vallet-Erdtmann, M. Montero-Hadjadje, H. Lefebvre, M. Klein, M. Muresan, P. F. Plouin, N. Seidah, H. Vaudry, Y. Anouar, and L. Yon.** 2006. Expression and processing of the neuroendocrine protein secretogranin II in benign and malignant pheochromocytomas. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1073**:527-532.
50. **Hager, J. H. and D. Hanahan.** 1999. Tumor cells utilize multiple pathways to down-modulate apoptosis. Lessons from a mouse model of islet cell carcinogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **887**:150-163.
51. **Heath, W. R. and F. R. Carbone.** 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* **1**:126-134.
52. **Heiser, A., D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, and J. Vieweg.** 2002. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J.Clin.Invest* **109**:409-417.

53. **Helman, L. J., T. G. Ahn, M. A. Levine, A. Allison, P. S. Cohen, M. J. Cooper, D. V. Cohn, and M. A. Israel.** 1988. Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J.Biol.Chem.* **263**:11559-11563.
54. **Helman, L. J., A. F. Gazdar, J. G. Park, P. S. Cohen, J. D. Cotelingam, and M. A. Israel.** 1988. Chromogranin A expression in normal and malignant human tissues. *J.Clin.Invest* **82**:686-690.
55. **Helpap, B. and J. Kollermann.** 2001. Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence?. *Virchows Arch.* **438**:86-91.
56. **Hofmann, O., O. L. Caballero, B. J. Stevenson, Y. T. Chen, T. Cohen, R. Chua, C. A. Maher, S. Panji, U. Schaefer, A. Kruger, M. Lehvaslaiho, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. V. Jongeneel, A. J. Simpson, L. J. Old, and W. Hide.** 2008. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:20422-20427.
57. **Hook, V. and M. H. Metz-Boutigue.** 2002. Protein trafficking to chromaffin granules and proteolytic processing within regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **971**:397-405.
58. **Houben, K., K. Dardashti, and B. D. Howard.** 1994. PC12 variants deficient in norepinephrine transporter mRNA have wild type activities of several other related transporters. *Neurochem.Res.* **19**:743-751.
59. **Hsiao, R. J., H. P. Neumann, R. J. Parmer, J. A. Barbosa, and D. T. O'Connor.** 1990. Chromogranin A in familial pheochromocytoma: diagnostic screening value, prediction of tumor mass, and post-resection kinetics indicating two-compartment distribution. *Am.J.Med.* **88**:607-613.
60. **Hsiao, R. J., R. J. Parmer, M. A. Takiyyuddin, and D. T. O'Connor.** 1991. Chromogranin A storage and secretion: sensitivity and specificity for the diagnosis of pheochromocytoma. *Medicine (Baltimore)* **70**:33-45.
61. **Hunder, N. N., H. Wallen, J. Cao, D. W. Hendricks, J. Z. Reilly, R. Rodmyre, A. Jungbluth, S. Gnjjatic, J. A. Thompson, and C. Yee.** 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N.Engl.J.Med.* **358**:2698-2703.
62. **Iacangelo, A., H. Okayama, and L. E. Eiden.** 1988. Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. *FEBS Lett.* **227**:115-121.
63. **Jacobs, J. F., E. H. Aarntzen, L. A. Sibelt, W. A. Blokx, A. C. Boullart, M. J. Gerritsen, P. M. Hoogerbrugge, C. G. Figdor, G. J. Adema, C. J. Punt, and V. de, I.** 2009. Vaccine-specific local T cell reactivity in immunotherapy-associated vitiligo in melanoma patients. *Cancer Immunol.Immunother.* **58**:145-151.
64. **Jager, E., Y. T. Chen, J. W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L. J. Old, and A. Knuth.** 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J.Exp.Med.* **187**:265-270.

65. **Jager, E., J. Karbach, S. Gnjatic, A. Neumann, A. Bender, D. Valmori, M. Ayyoub, E. Ritter, G. Ritter, D. Jager, D. Panicali, E. Hoffman, L. Pan, H. Oettgen, L. J. Old, and A. Knuth.** 2006. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**:14453-14458.
66. **Jassim, A., W. Ollier, A. Payne, A. Biro, R. T. Oliver, and H. Festenstein.** 1989. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur.J.Immunol.* **19**:1215-1220.
67. **Jiang, Q., L. Taupenot, S. K. Mahata, M. Mahata, D. T. O'Connor, L. A. Miles, and R. J. Parmer.** 2001. Proteolytic cleavage of chromogranin A (CgA) by plasmin. Selective liberation of a specific bioactive CgA fragment that regulates catecholamine release. *J.Biol.Chem.* **276**:25022-25029.
68. **John, H., W. H. Ziegler, D. Hauri, and P. Jaeger.** 1999. Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted? *Urology* **53**:679-683.
69. **John, H., W. H. Ziegler, D. Hauri, and P. Jaeger.** 1999. Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted?. *Urology* **53**:679-683.
70. **Karagiannis, A., D. P. Mikhailidis, V. G. Athyros, and F. Harsoulis.** 2007. Pheochromocytoma: an update on genetics and management. *Endocr.Relat Cancer* **14**:935-956.
71. **Katzir, I., J. Shani, D. Shabashov, J. Dagan, and P. Lazarovici.** 2003. Establishment and characterization of pheochromocytoma tumor models expressing different levels of trkA receptors. *Cancer Lett.* **200**:177-185.
72. **Kennedy, B. P., S. K. Mahata, D. T. O'Connor, and M. G. Ziegler.** 1998. Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides* **19**:1241-1248.
73. **Khammari, A., N. Labarriere, V. Vignard, J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, A. C. Knol, G. Quereux, S. Saiagh, A. Brocard, F. Jotereau, and B. Dreno.** 2009. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *J.Invest Dermatol.* **129**:2835-2842.
74. **Knierman, M. D., J. E. Coligan, and K. C. Parker.** 1994. Peptide fingerprints after partial acid hydrolysis: analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **8**:1007-1010.
75. **Lamberts, S. W., L. J. Hofland, and F. R. Nobels.** 2001. Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol.* **22**:309-339.
76. **Lehnert, H., K. Hahn, and H. Dralle.** 2002. [Benign and malignant pheochromocytoma]. *Internist (Berl)* **43**:196, 199-196, 209.
77. **Lenders, J. W., G. Eisenhofer, M. Mannelli, and K. Pacak.** 2005. Phaeochromocytoma. *Lancet* **366**:665-675.
78. **Lugardon, K., R. Raffner, Y. Goumon, A. Corti, A. Delmas, P. Bulet, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue.** 2000. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J.Biol.Chem.* **275**:10745-10753.

79. **Machens, A., M. Brauckhoff, O. Gimm, and H. Dralle.** 2006. Risk-oriented approach to hereditary adrenal pheochromocytoma. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1073**:417-428.
80. **Machens, A., M. Brauckhoff, H. J. Holzhausen, P. N. Thanh, H. Lehnert, and H. Dralle.** 2005. Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *J.Clin Endocrinol Metab* **90**:3999-4003.
81. **Machens, A. and H. Dralle.** 2006. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the RET protooncogene: from bedside to bench to bedside. *Mol.Cell Endocrinol* **247**:34-40.
82. **Machens, A., P. Niccoli-Sire, J. Hoegel, K. Frank-Raue, T. J. van Vroonhoven, H. D. Roehrer, R. A. Wahl, P. Lamesch, F. Raue, B. Conte-Devolx, and H. Dralle.** 2003. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N.Engl.J.Med.* **349**:1517-1525.
83. **Mackensen, A., N. Meidenbauer, S. Vogl, M. Laumer, J. Berger, and R. Andreesen.** 2006. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J.Clin.Oncol.* **24**:5060-5069.
84. **Mahata, S. K., D. T. O'Connor, M. Mahata, S. H. Yoo, L. Taupenot, H. Wu, B. M. Gill, and R. J. Parmer.** 1997. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J.Clin.Invest* **100**:1623-1633.
85. **Michiels, F. M., S. Chappuis, B. Caillou, A. Pasini, M. Talbot, R. Monier, G. M. Lenoir, J. Feunteun, and M. Billaud.** 1997. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:3330-3335.
86. **Michiels, F. M., S. Chappuis, B. Caillou, A. Pasini, M. Talbot, R. Monier, G. M. Lenoir, J. Feunteun, and M. Billaud.** 1997. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:3330-3335.
87. **Modi, W. S., M. A. Levine, H. N. Seunanz, M. Dean, and S. J. O'Brien.** 1989. The human chromogranin A gene: chromosome assignment and RFLP analysis. *Am.J.Hum.Genet.* **45**:814-818.
88. **Molenkamp, B. G., P. A. van Leeuwen, S. Meijer, B. J. Sluijter, P. G. Wijnands, A. Baars, A. J. van den Eertwegh, R. J. Scheper, and T. D. de Gruijl.** 2007. Intra-dermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin.Cancer Res.* **13**:2961-2969.
89. **Montero-Hadjadje, M., H. Vaudry, V. Turquier, J. Leprince, J. L. Do Rego, L. Yon, N. Gallo-Payet, P. F. Plouin, and Y. Anouar.** 2002. Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. *Cell Tissue Res.* **310**:223-236.
90. **Moser, M. and K. M. Murphy.** 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* **1**:199-205.
91. **Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, R. Pili, G. A. Bjarnason, X. Garcia-del-Muro, J. A. Sosman, E. Solska, G. Wilding, J. A. Thompson, S. T. Kim, I. Chen, X. Huang, and R. A. Figlin.** 2009. Overall survival and updated results for sunitinib compared with

- interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* **27**:3584-3590.
92. **Munz, C., R. M. Steinman, and S. Fujii.** 2005. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J.Exp.Med.* **202**:203-207.
93. **Murray, S. S., L. L. Deaven, D. W. Burton, D. I. O'Connor, P. L. Mellon, and L. J. Deftos.** 1987. The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **142**:141-146.
94. **Nair, S. K., D. Boczkowski, M. Morse, R. I. Cumming, H. K. Lyerly, and E. Gilboa.** 1998. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat.Biotechnol.* **16**:364-369.
95. **Namwongprom, S., F. C. Wong, U. Tateishi, E. E. Kim, and S. Boonyaprapa.** 2008. Correlation of chromogranin A levels and somatostatin receptor scintigraphy findings in the evaluation of metastases in carcinoid tumors. *Ann.Nucl.Med.* **22**:237-243.
96. **Neumann, H. P., D. P. Berger, G. Sigmund, U. Blum, D. Schmidt, R. J. Parmer, B. Volk, and G. Kirste.** 1993. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. *N.Engl.J.Med.* **329**:1531-1538.
97. **Neumann, H. P., D. P. Berger, G. Sigmund, U. Blum, D. Schmidt, R. J. Parmer, B. Volk, and G. Kirste.** 1993. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. *N.Engl.J.Med.* **329**:1531-1538.
98. **Neumann, H. P., C. Pawlu, M. Peczkowska, B. Bausch, S. R. McWhinney, M. Muresan, M. Buchta, G. Franke, J. Klisch, T. A. Bley, S. Hoegerle, C. C. Boedeker, G. Opocher, J. Schipper, A. Januszewicz, and C. Eng.** 2004. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* **292**:943-951.
99. **Nobels, F. R., D. J. Kwekkeboom, R. Bouillon, and S. W. Lamberts.** 1998. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Eur.J.Clin.Invest* **28**:431-440.
100. **Nobels, F. R., D. J. Kwekkeboom, W. Coopmans, C. H. Schoenmakers, J. Lindemans, W. W. De Herder, E. P. Krenning, R. Bouillon, and S. W. Lamberts.** 1997. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**:2622-2628.
101. **Nobels, F. R., D. J. Kwekkeboom, W. Coopmans, C. H. Schoenmakers, J. Lindemans, W. W. De Herder, E. P. Krenning, R. Bouillon, and S. W. Lamberts.** 1997. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**:2622-2628.
102. **O'Connor, D. T. and K. N. Bernstein.** 1984. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N.Engl.J.Med.* **311**:764-770.
103. **O'Connor, D. T. and L. J. Deftos.** 1986. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N.Engl.J.Med.* **314**:1145-1151.

104. **O'Connor, D. T., M. R. Pandlan, E. Carlton, J. H. Cervenka, and R. J. Hsiao.** 1989. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: in vitro stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. *Clin.Chem.* **35**:1631-1637.
105. **O'Connor, D. T., R. J. Parmer, and L. J. Deftos.** 1984. Chromogranin A: studies in the endocrine system. *Trans.Assoc.Am.Physicians* **97**:242-250.
106. **O'Connor, D. T., R. J. Parmer, and L. J. Deftos.** 1984. Chromogranin A: studies in the endocrine system. *Trans.Assoc.Am.Physicians* **97**:242-250.
107. **O'Connor, D. T., H. Wu, B. M. Gill, D. J. Rozansky, K. Tang, S. K. Mahata, M. Mahata, N. L. Eskeland, J. S. Videen, X. Zhang, and .** 1994. Hormone storage vesicle proteins. Transcriptional basis of the widespread neuroendocrine expression of chromogranin A, and evidence of its diverse biological actions, intracellular and extracellular. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **733**:36-45.
108. **Oberg, K. and M. Stridsberg.** 2000. Chromogranins as diagnostic and prognostic markers in neuroendocrine tumours. *Adv.Exp.Med.Biol.* **482**:329-337.
109. **Obst, R., C. Munz, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee.** 1998. Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. *Eur.J.Immunol.* **28**:2432-2443.
110. **Odunsi, K., F. Qian, J. Matsuzaki, P. Mhawech-Fauceglia, C. Andrews, E. W. Hoffman, L. Pan, G. Ritter, J. Vilella, B. Thomas, K. Rodabaugh, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, and S. Gnjjatic.** 2007. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:12837-12842.
111. **Pacak, K., G. Eisenhofer, H. Ahlman, S. R. Bornstein, A. P. Gimenez-Roqueplo, A. B. Grossman, N. Kimura, M. Mannelli, A. M. McNicol, and A. S. Tischler.** 2007. Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat.Clin Pract.Endocrinol Metab* **3**:92-102.
112. **Papewalis, C., M. Wuttke, B. Jacobs, J. Domberg, H. Willenberg, T. Baehring, K. Cupisti, A. Raffel, L. Chao, R. Fenk, J. Seissler, W. A. Scherbaum, and M. Schott.** 2008. Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma. *Horm.Metab Res.* **40**:108-116.
113. **Papewalis, C., M. Wuttke, J. Seissler, Y. Meyer, C. Kessler, B. Jacobs, E. Ullrich, H. S. Willenberg, S. Schinner, T. Baehring, W. A. Scherbaum, and M. Schott.** 2008. Dendritic cell vaccination with xenogenic polypeptide hormone induces tumor rejection in neuroendocrine cancer. *Clin.Cancer Res.* **14**:4298-4305.
114. **Pardoll, D. M.** 2002. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* **2**:227-238.
115. **Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan.** 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J.Immunol.* **152**:163-175.
116. **Parkhurst, M. R., M. L. Salgaller, S. Southwood, P. F. Robbins, A. Sette, S. A. Rosenberg, and Y. Kawakami.** 1996. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J.Immunol.* **157**:2539-2548.

117. **Parmer, R. J., M. Mahata, Y. Gong, S. K. Mahata, Q. Jiang, D. T. O'Connor, X. P. Xi, and L. A. Miles.** 2000. Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion. *J.Clin.Invest* **106**:907-915.
118. **Portela-Gomes, G. M., J. R. Gayen, L. Grimelius, M. Stridsberg, and S. K. Mahata.** 2008. The importance of chromogranin A in the development and function of endocrine pancreas. *Regul.Pept.* **151**:19-25.
119. **Quayle, F. J., E. A. Fialkowski, R. Benveniste, and J. F. Moley.** 2007. Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN 2A. *Surgery* **142**:800-805.
120. **Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic.** 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
121. **Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic.** 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
122. **Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rotzschke.** 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **5**:35-44.
123. **Rao, F., G. Wen, J. R. Gayen, M. Das, S. M. Vaingankar, B. K. Rana, M. Mahata, B. P. Kennedy, R. M. Salem, M. Stridsberg, K. Abel, D. W. Smith, E. Eskin, N. J. Schork, B. A. Hamilton, M. G. Ziegler, S. K. Mahata, and D. T. O'Connor.** 2007. Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation* **115**:2271-2281.
124. **Ratti, S., F. Curnis, R. Longhi, B. Colombo, A. Gasparri, F. Magni, E. Manera, M. H. Metz-Boutigue, and A. Corti.** 2000. Structure-activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **275**:29257-29263.
125. **Rayman, P., R. G. Uzzo, V. Kolenko, T. Bloom, M. K. Cathcart, L. Molto, A. C. Novick, R. M. Bukowski, T. Hamilton, and J. H. Finke.** 2000. Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J.Sci.Am.* **6 Suppl 1**:S81-S87.
126. **Redmond, W. L. and L. A. Sherman.** 2005. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity.* **22**:275-284.
127. **Redmond, W. L. and L. A. Sherman.** 2005. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity.* **22**:275-284.
128. **Reynolds, L., K. Jones, D. J. Winton, A. Cranston, C. Houghton, L. Howard, B. A. Ponder, and D. P. Smith.** 2001. C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene* **20**:3986-3994.
129. **Rubio, V., T. B. Stuge, N. Singh, M. R. Betts, J. S. Weber, M. Roederer, and P. P. Lee.** 2003. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat.Med.* **9**:1377-1382.

130. **Russell, J., P. Gee, S. M. Liu, and R. H. Angeletti.** 1994. Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides. *Endocrinology* **135**:337-342.
131. **Sanchez-Margalet, V., C. Gonzalez-Yanes, J. Santos-Alvarez, and S. Najib.** 2000. Pancreastatin. Biological effects and mechanisms of action. *Adv.Exp.Med.Biol.* **482**:247-262.
132. **Sanchez-Margalet, V., M. Lucas, and R. Goberna.** 1996. Pancreastatin: further evidence for its consideration as a regulatory peptide. *J.Mol.Endocrinol.* **16**:1-8.
133. **Santin, A. D.** 2000. Lymph node metastases: the importance of the microenvironment. *Cancer* **88**:175-179.
134. **Sbiera, S., S. Wortmann, and M. Fassnacht.** 2008. Dendritic cell based immunotherapy--a promising therapeutic approach for endocrine malignancies. *Horm.Metab Res.* **40**:89-98.
135. **Scanlan, M. J., A. J. Simpson, and L. J. Old.** 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**:1.
136. **Schlumberger, M., C. Gicquel, J. Lumbroso, F. Tenenbaum, E. Comoy, J. Bosq, E. Fonseca, P. P. Ghillani, B. Aubert, J. P. Travagli, and .** 1992. Malignant pheochromocytoma: clinical, biological, histologic and therapeutic data in a series of 20 patients with distant metastases. *J.Endocrinol.Invest* **15**:631-642.
137. **Scholz, T., G. Eisenhofer, K. Pacak, H. Dralle, and H. Lehnert.** 2007. Clinical review: Current treatment of malignant pheochromocytoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**:1217-1225.
138. **Scholz, T., G. Eisenhofer, K. Pacak, H. Dralle, and H. Lehnert.** 2007. Clinical review: Current treatment of malignant pheochromocytoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**:1217-1225.
139. **Schott, M.** 2006. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr.Relat Cancer* **13**:779-795.
140. **Schott, M.** 2008. Advances in cellular therapy. *Horm.Metab Res.* **40**:73-74.
141. **Schott, M., J. Feldkamp, M. Klucken, G. Kobbe, W. A. Scherbaum, and J. Seissler.** 2002. Calcitonin-specific antitumor immunity in medullary thyroid carcinoma following dendritic cell vaccination. *Cancer Immunol.Immunother.* **51**:663-668.
142. **Schott, M., J. Feldkamp, D. Schattenberg, J. Seissler, and W. A. Scherbaum.** 1999. Dendritic cell immuno-therapy in disseminated parathyroid carcinoma. *Lancet* **353**:1188-1189.
143. **Schott, M., W. A. Scherbaum, and J. Seissler.** 2004. Dendritic cell-based immunotherapy in thyroid malignancies. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* **4**:245-251.
144. **Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R. M. Steinman.** 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* **15**:138-147.
145. **Seidah, N. G., G. N. Hendy, J. Hamelin, J. Paquin, C. Lazure, K. M. Metters, J. Rossier, and M. Chretien.** 1987. Chromogranin A can act as a reversible processing

- enzyme inhibitor. Evidence from the inhibition of the IRCM-serine protease 1 cleavage of pro-enkephalin and ACTH at pairs of basic amino acids. *FEBS Lett.* **211**:144-150.
146. **Seregni, E., L. Ferrari, E. Bajetta, A. Martinetti, and E. Bombardieri.** 2001. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. *Ann.Oncol.* **12 Suppl 2**:S69-S72.
147. **Simon, J. P. and D. Aunis.** 1989. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem.J.* **262**:1-13.
148. **Simon, J. P., M. F. Bader, and D. Aunis.** 1988. Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**:1712-1716.
149. **Simon-Chazottes, D., H. Wu, R. J. Parmer, D. J. Rozansky, J. Szpirer, G. Levan, T. W. Kurtz, C. Szpirer, J. L. Guenet, and D. T. O'Connor.** 1993. Assignment of the chromogranin A (Chga) locus to homologous regions on mouse chromosome 12 and rat chromosome 6. *Genomics* **17**:252-255.
150. **Sobol, R. E., V. Memoli, and L. J. Deftos.** 1989. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. *N.Engl.J.Med.* **320**:444-447.
151. **Soleimani, A., A. Berntsen, I. M. Svane, and A. E. Pedersen.** 2009. Immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with dendritic cells pulsed with tumor lysate. *Scand.J.Immunol.* **70**:481-489.
152. **Steinman, R. M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* **9**:271-296.
153. **Steinman, R. M. and Z. A. Cohn.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp.Med.* **137**:1142-1162.
154. **Tatemoto, K., S. Efendic, V. Mutt, G. Makk, G. J. Feistner, and J. D. Barchas.** 1986. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* **324**:476-478.
155. **Tatic, S., M. Havelka, I. Paunovic, V. Bozic, A. Diklic, D. Brasanac, R. Jankovic, and M. Jancic-Zguricas.** 2002. [Pheochromocytoma--pathohistologic and immunohistochemical aspects]. *Srp.Arh.Celok.Lek.* **130 Suppl 2**:7-13.
156. **Taupenot, L., J. Ciesielski-Treska, G. Ulrich, S. Chasserot-Golaz, D. Aunis, and M. F. Bader.** 1996. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience* **72**:377-389.
157. **Taupenot, L., K. L. Harper, and D. T. O'Connor.** 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N.Engl.J.Med.* **348**:1134-1149.
158. **Taupenot, L., K. L. Harper, and D. T. O'Connor.** 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N.Engl.J.Med.* **348**:1134-1149.
159. **Taylor, C. V., L. Taupenot, S. K. Mahata, M. Mahata, H. Wu, S. Yasothornsrikul, T. Toneff, C. Caporale, Q. Jiang, R. J. Parmer, V. Y. Hook, and D. T. O'Connor.** 2000. Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *J.Biol.Chem.* **275**:22905-22915.

160. **Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, D. P. von den, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen, and G. Schuler.** 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J.Exp.Med.* **190**:1669-1678.
161. **Toledo, S. P., M. A. dos Santos, R. A. Toledo, and D. M. Lourenco Junior.** 2006. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics.* **61**:59-70.
162. **Valmori, D., N. E. Souleimanian, V. Tosello, N. Bhardwaj, S. Adams, D. O'Neill, A. Pavlick, J. B. Escalon, C. M. Cruz, A. Angiulli, F. Angiulli, G. Mears, S. M. Vogel, L. Pan, A. A. Jungbluth, E. W. Hoffmann, R. Venhaus, G. Ritter, L. J. Old, and M. Ayyoub.** 2007. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:8947-8952.
163. **van Bleek, G. M. and S. G. Nathenson.** 1991. The structure of the antigen-binding groove of major histocompatibility complex class I molecules determines specific selection of self-peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:11032-11036.
164. **van Bleek, G. M. and S. G. Nathenson.** 1992. Presentation of antigenic peptides by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* **2**:202-207.
165. **van, D. D., R. Medzhitov, and A. C. Shaw.** 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.* **27**:49-55.
166. **Videen, J. S., M. S. Mezger, Y. M. Chang, and D. T. O'Connor.** 1992. Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *J.Biol.Chem.* **267**:3066-3073.
167. **Vikman, S., M. Essand, J. L. Cunningham, T. M. de la, K. Oberg, T. H. Totterman, and V. Giandomenico.** 2005. Gene expression in midgut carcinoid tumors: potential targets for immunotherapy. *Acta Oncol.* **44**:32-40.
168. **Vikman, S., V. Giandomenico, R. Sommaggio, K. Oberg, M. Essand, and T. H. Totterman.** 2008. CD8+ T cells against multiple tumor-associated antigens in peripheral blood of midgut carcinoid patients. *Cancer Immunol.Immunother.* **57**:399-409.
169. **Wollenberg, A., M. Staehler, and T. Eames.** 2010. [Cutaneous side effects of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib]. *Hautarzt* **61**:662-667.
170. **Wuttke, M., C. Papewalis, Y. Meyer, C. Kessler, B. Jacobs, H. S. Willenberg, S. Schinner, C. Kouatchoua, T. Baehring, W. A. Scherbaum, and M. Schott.** 2008. Amino acid-modified calcitonin immunization induces tumor epitope-specific immunity in a transgenic mouse model for medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology* **149**:5627-5634.
171. **Wuttke, M., C. Papewalis, Y. Meyer, C. Kessler, B. Jacobs, H. S. Willenberg, S. Schinner, C. Kouatchoua, T. Baehring, W. A. Scherbaum, and M. Schott.** 2008. Amino acid-modified calcitonin immunization induces tumor epitope-specific immunity in a transgenic mouse model for medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology* **149**:5627-5634.

172. **Yagi, H., H. Hashizume, T. Horibe, Y. Yoshinari, M. Hata, A. Ohshima, T. Ito, M. Takigawa, A. Shibaki, H. Shimizu, and N. Seo.** 2006. Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. *Cancer Res.* **66**:10136-10144.
173. **Yoo, S. H. and J. P. Albanesi.** 1991. High capacity, low affinity Ca²⁺ binding of chromogranin A. Relationship between the pH-induced conformational change and Ca²⁺ binding property. *J.Biol.Chem.* **266**:7740-7745.
174. **Zhang, K., F. Rao, G. Wen, R. M. Salem, S. Vaingankar, M. Mahata, N. R. Mahapatra, E. O. Lillie, P. E. Cadman, R. S. Friese, B. A. Hamilton, V. Y. Hook, S. K. Mahata, L. Taupenot, and D. T. O'Connor.** 2006. Catecholamine storage vesicles and the metabolic syndrome: The role of the chromogranin A fragment pancreastatin. *Diabetes Obes.Metab* **8**:621-633.
175. **Ziegler, M. G., E. C. Morrissey, B. Kennedy, and H. Elayan.** 1990. Sources of urinary catecholamines in renal denervated transplant recipients. *J.Hypertens.* **8**:927-931.
176. **Zirlik, K. M., D. Zahrieh, D. Neuberg, and J. G. Gribben.** 2006. Cytotoxic T cells generated against heteroclitic peptides kill primary tumor cells independent of the binding affinity of the native tumor antigen peptide. *Blood* **108**:3865-3870.
177. **Zou, W.** 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* **6**:295-307.

8. Anhang

8.1. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Rolle der dendritischen Zellen bei der Induktion einer Immunantwort	3
Abbildung 2: Sekretionsweg von Chromogranin A.....	6
Abbildung 3: Potentielle CgA-Epitope mit immunmodulatorischen Eigenschaften	7
Abbildung 4: Aufbau eines MHC Klasse-I Tetramers.....	19
Abbildung 5: Detektor und Identifizierung eines FACS-Gerätes.....	24
Abbildung 6: Reinheitskontrolle der Monozyten der Ausgangszellen sowie der Zellen nach 3 (3d) bzw. 6 Tagen (6d)	34
Abbildung 7: Charakterisierung von Zelloberflächenmarkern auf Ausgangszellen	35
Abbildung 8: Repräsentative Ergebnisse der Expression von Zelloberflächenmarkern.....	36
Abbildung 9: Zelloberflächenanalyse von Zellpopulationen	37
Abbildung 10: Repräsentative Tetrameranalyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einzelnen CgA-Peptiden (P1-P6).....	39
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit einzelnen physiologischen CgA-Peptide (P1-P3).....	40
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit einzelnen AS-veränderten CgA-Peptiden (P4-P6).....	42
Abbildung 13: Repräsentative Tetramer-Analyse von CgA-Epitop-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit drei verschiedenen AS-veränderten Peptiden (P4-P6)	44
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse CgA-Epitop spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit einem Coctail aus drei verschiedenen CgA-Peptiden	45
Abbildung 15: Messung der Lyse von CgA-spezifischen IFN- γ -produzierenden CTLs.....	47
Abbildung 16: Blockierungsanalysen.(<i>cold target assays</i>)	48
Abbildung 17: Chromogranin A-Färbung des Nebennierenmarks.....	49
Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse.....	50
Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse zur Bestimmung der Tumorgröße.....	51
Abbildung 20: Messung der Tumorgrößen.....	52

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Synthetisierte Chromogranin A-Epitope und ihre Bindungsstärke zu H-2K^b 18

9. Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Matthias Schott für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, seine Hilfe und Unterstützung während der Verfassung dieser Arbeit bedanken.

Für die Übernahme des Koreferats bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Eckhard Lammert, Leiter des Instituts für Stoffwechselfysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Frau Dr. Claudia Papewalis danke ich vielmals für die Zusammenarbeit und die vielfältigen praktischen Hilfestellungen in Laborfragen.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kollegen aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Mein Dank richtet sich vor allem an Frau Magareth Ehlers für die schöne Zusammenarbeit und allzeit gewährte Hilfeleistung und Frau Charko Roswitha für die technische Unterstützung.

Frau Elvira Derscheid danke ich für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Meinen Freunden Karin Lichey, Thomas Kirste, Jacqueline Cimatche, Chantal Nkoule, Sonja Süßmann, Swenja Bergmann, Sibylle Reckert, Ushi Haverkoss, Anton und Pauline Mipo möchte ich ganz herzlich für den seelisch, moralischen Beistand während der Anfertigung meiner Dissertation und das stets offene Ohr für Sorgen und Klagen, aber auch fröhliche Momente danken.

Vielmals möchte ich mich bei meiner Schwester Nadine Ngueya und meiner guten Freundin Annette Grauer für die geistliche Unterstützung bedanken. Liebe Annette, danke für alles, vor allem für die gemeinsamen guten und schlechten Zeiten.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre liebevolle ausdauernde und großzügige Unterstützung.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem HERRN Jesus Christus, der mir in der schwierigsten Zeit meines Lebens beistand, darüber hinaus mir Durchhaltevermögen und immer wieder neuen Mut geschenkt hat, trotz aller Schwierigkeiten die vorliegende Arbeit zu ihrem Abschluss zu bringen.