

Marco Randazzo

Dr. med.

Schnellaufreinigung des Stressproteins Gp96 aus humanem Tumorgewebe zur autologen, antigenspezifischen Immuntherapie

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Terness

Die Krebserkrankung ist die zweithäufigste Todesursache in den Industrieländern mit steigender Tendenz. Die gegenwärtigen Therapieformen zeigen bei vielen Tumorentitäten nur unzureichende Erfolge und weisen häufig ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil auf. In den vergangenen Jahrzehnten hat jedoch die Immuntherapie als viel versprechende und zugleich gut verträgliche Therapieoption zunehmend an Popularität gewonnen und in Form von Antikörpertherapien bereits Einzug in den klinischen Alltag erhalten.

Der Kern einer aktiven Immuntherapie besteht in einer spezifischen, zytotoxischen T-Zell-Reaktion, wofür individuelle Tumorantigene benötigt werden. Die Entdeckung, dass Stressproteine durch ihre zahlreichen molekularen Kontakte „Peptid-Fingerabdrücke“ des Proteinreservoirs der Zelle aufnehmen, machte ihre Aufreinigung zu einem besonders attraktiven Therapieansatz in (pra-) klinischen Studien. Das Stressprotein Gp96 nimmt hier eine besondere Stellung ein, da es sich am Umschlagsplatz für intrazelluläre Antigene (dem endoplasmatischen Retikulum) befindet. Zudem besitzt es die Fähigkeit der Kreuzpräsentation und vermag dendritische Zellen zur Reifung zu bringen. Überdies existieren spezifische Gp96-Rezeptoren im Säugetierorganismus. Werden Gp96-Moleküle nativ aus einer malignen Zelle extrahiert, verfügt man automatisch über das individuelle Tumorpeptid-Profil und wäre so imstande, eine spezifische Immuntherapie einzuleiten.

In der Fachliteratur werden unterschiedliche Gp96-Aufreinigungsmethoden beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine Ein-Schritt-Methode durch einen rekombinanten Single-Chain-Antikörper getestet, welcher native Gp96-Moleküle mit hoher Affinität erkennt. Ziel dieser Arbeit war zunächst die affinitätschromatographische Aufreinigung von Gp96 aus Mammakarzinomzellen über den Antikörper. In einem weiteren Schritt wurde in humanisierten NOD/SCID-Mäusen der Effekt einer Gp96-Immuntherapie überprüft. Hierfür wurden in Mäusen durch Injektion von humanen Krebszellen Mammakarzinome induziert.

HLA-kompatible PBMCs wurden sodann mit Gp96 der Mammakarzinomzellen *in vitro* inkubiert. Die so „aktivierten“ PBMCs wurden der Testgruppe verabreicht, die Kontrolltiere erhielten nicht-aktivierte PBMCs. In der Testgruppe gelang auf diese Weise eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens nach zwei Impfungen. Allerdings musste dieser Therapieerfolg bei Nachweis von Endotoxinen im Eluat relativiert werden.

Im anschließenden Teil wurde der Single-Chain-Antikörper zur Aufreinigung von Gp96 aus humanem Gewebe getestet. Hierfür wurde gesundes und malignes Gewebe aus humanem Pankreas, Kolon und der Leber aufgearbeitet. Die Ein-Schritt-Aufreinigung eignete sich hier sehr gut zur Gp96-Aufreinigung. Zu bemerken sind die zuweilen auftretenden Nebenbanden in der Gelelektrophorese sowie im Western Blot, weswegen sich die Frage nach der nativen Gp96-Struktur bzw. des Peptidverlustes aufdrängte. Diese Nebenbanden waren v.a. in einer Probe eines Pankreaskarzinoms aufgetreten, was eine enzymatische Degradation vermuten lässt. Zusätzliche Schritte erforderte die Ein-Schritt-Methode ferner bei den Proben der hepatozellulären Karzinome, welche gehäuft eine Komponente an fibrotischer extrazellulärer Matrix aufweisen, die die Chromatographiesäule blockieren konnte. Aus diesem Grund waren bis zu zwei zusätzliche Ultrazentrifugationsschritte notwendig gewesen. Es deutete sich überdies an, dass ein Mindestgewicht von 1 Gramm Tumorgewebe notwendig war, um ein ausreichendes Signal von Gp96 in der Gelelektrophorese zu erhalten.

Die Ein-Schritt-Aufreinigung für Gp96 erwies sich im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen Methode für Tumorproben ab 1 Gramm als sehr ergiebig, da deutlich höhere Gp96-Mengen aufgereinigt werden konnten, als in der Literatur angegeben.

Der Vergleich der einzelnen Proben des Pankreas, Kolon sowie der Leber zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der Gp96-Konzentration. Einzig die Proben der Leber hatten im Vergleich zu gesundem Kolongewebe signifikant höhere Gp96-Konzentrationen.

Die Ein-Schritt-Aufreinigung für Gp96 ist demzufolge für humane Gewebeproben eine effiziente und schnelle Aufreinigungsmethode. Das gewonnene Material ist ein qualitativ und quantitativ hochwertiges Protein.

Die vorliegende Untersuchung weist aufgrund ihrer geringen Anzahl an Versuchstieren und Tumorproben zweifellos einige Kritikpunkte auf. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Single-Chain-basierte Gp96-Aufreinigung neben ihrer einfachen Handhabung, ihres geringen zeitlichen Aufwands sowie aufgrund des reinen und hohen Gp96-Ertrags eine herausragende Methodik darstellt. Dies sollte Anlass genug sein, die Effektivität einer Gp96-Vakzine im Tiermodell mit größerer Anzahl zu prüfen.