

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Anna-Lena Krause

aus Werl

Tag der mündlichen Prüfung:

Induktion spontaner T-Zell-Antworten gegen Brustkrebsantigene während der Schwanger- schaft und Stillzeit

Gutachter: Prof. Dr. Philipp Beckhove

Prof. Dr. Viktor Umansky

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Heidelberg, den 24. März 2015

Anna-Lena Krause

angefertigt in der
Abteilung Translationale Immunologie
(Leitung: Prof. Dr. Philipp Beckhove)
am
Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen
und
Deutschen Krebsforschungszentrum,
Heidelberg

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

1. Anna-Lena Krause, Yingzi Ge, Andreas Bonertz, Christoph Domschke, Florian Schütz und Philipp Beckhove. „T-cell recognition of Tumor-associated antigens in patients with preinvasive lesions of the breast.“ **Vortrag** und **Posterbeitrag** zum *CIMT Annual meeting* (2012), Mainz.
2. Anna-Lena Krause, Hans-Henning Schmidt, Yingzi Ge, Felix J. Hartmann, Heinke Conrad, Felix Klug, Sina Nittel, Helga Bernhard, Christoph Domschke, Florian Schütz, Christof Sohn und Philipp Beckhove. „Antigen-spezifische regulatorische T-Zellen im Mammakarzinom.“ **Vortrag** zum 5. Symposium der Translationalen Forschungskommission der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (2013), Bergisch Gladbach.
3. Anna-Lena Krause, Christoph Domschke, Florian Schütz und Philipp Beckhove. „Mammakarzinom – Immunprotektion durch Schwangerschaft?“ **Vortrag** zur *Conference on Molecular Basics and Therapeutic Implications in Breast Cancer* (2013), Lübeck.
4. Anna-Lena Krause, Mark Boudewijns, Christoph Domschke, Florian Schütz und Philipp Beckhove. „Immunologische Zusammenhänge der Tumorgenese des Mammakarzinoms mit Schwangerschaft und Stillen.“ **Vortrag** zur 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (2014), Berlin.
5. Mark Boudewijns, Anna-Lena Krause, Philipp Beckhove, Christof Sohn, Christoph Domschke und Florian Schütz. "Pregnancy – A natural vaccination against tumor-associated antigens of the breast?" *Geburtshilfe Frauenheilkd* 74(S 01): FV_06_04 und **Posterbeitrag** zum 60. Kongress der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2014), München.

1. Zusammenfassung

Verglichen mit kinderlosen Frauen (Nullipara) haben Mütter ein bis zu 50% geringeres Brustkrebsrisiko. Die Ursachen hinter dem protektiven Effekt von Schwangerschaften sind noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Lymphozyten von Müttern Brustkrebszellen effektiver abtöten können. Dabei handelt es sich vermutlich um T-Zellen, die Tumor-assoziierte Antigene (TAA) auf Krebszellen erkennen. Daneben gibt es auch regulatorische T-Zellen (Treg), die den Körper vor überschießenden Immunreaktionen schützen, aber auch die Immunabwehr gegen Tumoren unterdrücken können. Patientinnen, bei denen sich Treg im Brusttumor ansammeln, haben eine geringere Lebenserwartung und sie erleiden mit größerer Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv. In vorangegangenen Arbeiten wurden im Blut von Brustkrebspatientinnen T-Zellen nachgewiesen, die gegen TAA reagieren, aber auch von TAA-spezifischen Treg gehemmt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bereits während einer Schwangerschaft spontane T-Zellantworten gegen TAA induziert werden, die möglicherweise einen langlebigen Immunschutz gegen Brustkrebs bewirken, und welche Eigenschaften diese aufweisen. Zudem sollte herausgefunden werden, in wie fern sich vorangegangene Schwangerschaften auf die Anti-Tumor Immunität von Patientinnen mit Mammakarzinom auswirken.

Dafür wurden T-Zellen aus Blutproben von Nullipara, Erstgebärenden, Müttern und Brustkrebspatientinnen auf ihre Spezifität für TAA, ihre Funktionalität und ihren Phänotyp untersucht. Die Frequenz TAA-spezifischer T-Zellen wurde nach *in vitro* Restimulation mit TAA-beihaltenden langen synthetischen Peptiden unter Verwendung des Interferon- γ ELISpot Assays erfasst. Dieser wurde jeweils vor und nach der Depletion von Treg durchgeführt, um deren Einfluss auf Anti-Tumor Antworten zu beurteilen. Parallel wurden die Antigenspezifität und suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen im Treg-Spezifitätsassay bestimmt. Die phänotypische Charakterisierung zur Bestimmung des Gedächtnis-Zelltyps und dem Erschöpfungszustand TAA-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Methoden.

Die Untersuchungen ergaben, dass bereits im ersten Schwangerschaftstrimenon T-Zellen gebildet werden, die gegen zahlreiche TAA reagieren und in 85% der gesunden Mütter, nicht aber in Nullipara nachweisbar sind. Diese sind hochgradig funktionell und bilden ein lebenslanges immunologisches Gedächtnis, das sich positiv auf die Anti-Tumor Immunität auswirkt, da diese bei Müttern mit Mammakarzinom signifikant stärker ausgeprägt ist und weniger durch Treg abgeschwächt wird als bei kinderlosen Brustkrebspatientinnen.

Die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse befürworten die Durchführung einer prospektiven Studie, bei der das Auftreten TAA-spezifischer T-Zellen mit der Brustkrebsinzidenz korreliert werden soll, um den möglichen Nutzen eines präventiven Impfstoffes für Nullipara abschätzen zu können.

2. Abstract

Compared to childless (nulliparous) women, the breast cancer risk of mothers can be 50% lower. The cause of the protective effect of parity is not yet clarified. However, it has been shown that immune cells of mothers show an enhanced cytotoxicity against tumor cells. Hence, it was assumed that T cells mediate the anti-cancer effect *via* the recognition of tumor-associated antigens (TAA). Moreover, regulatory T cells (Treg), being essential for the prevention of pathological immune responses, can also suppress anti-tumor immunity. In breast cancer patients, the intratumoral accumulation of Treg cells is associated with a lower overall survival and an increased risk of relapse. Previous studies have revealed the presence of TAA-specific T cells in the blood of breast cancer patients. On the downside, the anti-tumor immunity of these patients is frequently suppressed by TAA-specific Treg cells.

The aim of this study was to investigate the induction and characteristics of spontaneous T cell responses against TAA during pregnancy, which may form a lifelong immune protection against breast cancer. Furthermore, we asked whether previous pregnancies may also have an impact on the anti-tumor immunity of breast cancer patients.

We isolated peripheral blood T cells from nulliparous and primigravid women, mothers and breast cancer patients and analyzed their TAA specificity, functional properties and phenotype. IFN- γ ELISpot analyses with long synthetic peptides were performed to detect the frequency of TAA specific T cells in blood samples. The impact of TAA-specific Treg cells on anti-tumor immunity was assessed by performing the IFN- γ ELISpot analyses before and after depletion of CD4⁺CD25⁺ T cells. By applying the Treg-specificity assay, we analyzed the antigenic specificities of these Treg cells.

The results of this study indicate a spontaneous induction of anti-tumor immune responses during the first trimester of pregnancy. Highly functional TAA-specific memory T cells were detected in 85% of healthy mothers, but in none of the nulliparous controls. Furthermore, we found that a lifelong immunological memory is formed, that positively impacts on anti-tumor immunity, since TAA-specific T cell responses in mothers with breast cancer were significantly stronger and less impaired by Treg cells, as compared to nullipara.

The findings obtained in this thesis support the implementation of a prospective study, which correlates the prevalence of TAA-specific T cells with the incidence of breast cancer. Based on this study, the potential benefit of a preventive vaccine is to be estimated, which may be applied to nulliparous women.

3. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	I
2. Abstract	III
3. Inhaltsverzeichnis	IV
4. Einleitung	1
4.1 Die weibliche Brustdrüse.....	1
4.1.1 Anatomie und Funktion.....	1
4.1.2 Entwicklungsstadien.....	2
4.2 Brustkrebs.....	4
4.2.1 Epidemiologie.....	4
4.2.2 Biologie und klinische Eigenschaften	7
4.2.3 Therapie	11
4.3 Grundlagen der Immunologie	14
4.3.1 Das adaptive Immunsystem	16
4.3.2 Tumor-assoziierte Antigene	24
4.3.3 Immuntherapie des Mammakarzinoms.....	35
4.3.4 Das Immunsystem während der Schwangerschaft und Stillzeit	39
4.3.5 Gemeinsamkeiten von Schwangerschaft und Krebs.....	41
4.3.6 Die Schwangerschaft als endogene Vakzinierung gegen Brustkrebs.....	42
4.4 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	43
5. Material und Methoden	45
5.1 Materialien	45
5.1.1 Puffer.....	45
5.1.2 Zellkulturmedien und Supplemente	46
5.1.3 Peptide	46
5.1.4 Reagenzien	47
5.1.5 Kits.....	48

5.1.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie	49
5.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	50
5.1.8	Laborgeräte	51
5.1.9	Software	52
5.1.10	Proben von peripherem Blut	52
5.2	Methoden.....	53
5.2.1	Auswahl von 50-mer Peptiden aus Proteinen.....	53
5.2.2	Zellkultur	54
5.2.3	Aufreinigung und Generierung verschiedener Zellpopulationen	55
5.2.4	Lösen der Peptide.....	57
5.2.5	ELISpot Assay.....	57
5.2.6	Treg Spezifitätsassay	60
5.2.7	Durchflusszytometrie	62
5.2.8	Statistik.....	68
6.	Ergebnisse	70
6.1	T-Zellen gesunder Mütter sind gegen zahlreiche TAA gerichtet	70
6.2	TAA-spezifische T-Zellen werden in den ersten Schwangerschaftsmonaten induziert	76
6.3	Ausgeprägte Immunreaktionen gegen TAA werden durch Treg abgeschwächt.....	78
6.4	Stärkere Anti-Tumor-Immunität bei Nullipara, als bei Müttern mit Brustkrebs.....	80
6.5	T-Zell Reaktionen gegen TAA sind unabhängig von biologischen Tumoreigenschaften.....	85
6.6	Schwächere Anti-Tumor Immunität bei Brustkrebspatientinnen, die nicht gestillt haben .	88
6.7	Anti-Tumor Antworten kinderloser Brustkrebspatienten werden von Treg unterdrückt ...	89
6.8	TAA-reaktive T-Zellen von Patienten mit DCIS produzieren große Mengen an TNF- α	97
6.9	Polyfunktionelle TAA-spezifische T-Zellen in gesunden Müttern und Brustkrebspatienten	98
6.10	Anti-Tumor reaktive T-Zellen sind überwiegend vom Effektor-Gedächtnis Subtyp	99
6.11	TAA-spezifische T-Zellen exprimieren coinhibitorische Rezeptoren.....	104
7.	Diskussion	107
7.1	Induktion TAA-spezifischer T-Zellen während der Schwangerschaft.....	107
7.2	Der Phänotyp Anti-Tumor reaktiver T-Zellen in gesunden Müttern.....	110

7.3	Entstehung eines Langzeitgedächtnisses gegen Brusttumorantigene.....	112
7.4	Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Anti-Tumor Immunität gesunder Mütter....	113
7.5	Auswirkungen prä-existenter TAA-spezifischer T-Zellen auf die Anti-Tumor Immunität ..	115
7.6	Klinische Relevanz	118
8.	Literaturverzeichnis	120
9.	Abkürzungsverzeichnis	151
10.	Danksagung.....	155

4. Einleitung

4.1 Die weibliche Brustdrüse

Die Brustdrüse ist das einzige Organ, nach dem eine gesamte Tierklasse benannt wurde: Die Säugtiere. Sie dient der Bildung und Absonderung von Milch (Laktation), welche die Ernährung des Neugeborenen sicherstellt und ihn vor Infektionskrankheiten schützt (Gjorevski und Nelson 2011).

4.1.1 Anatomie und Funktion

Das Milch erzeugende und transportierende Organ besteht aus verzweigten Gängen (Dukti) und Drüsengruppen (Lobi), welche in Fett- und Bindegewebe eingebettet sind (Abbildung 1). Im umliegenden Gewebe, dem Stroma, befinden sich zudem zahlreiche Blut- und Lymphgefäße, Nerven sowie Immunzellen (Gjorevski und Nelson 2011).

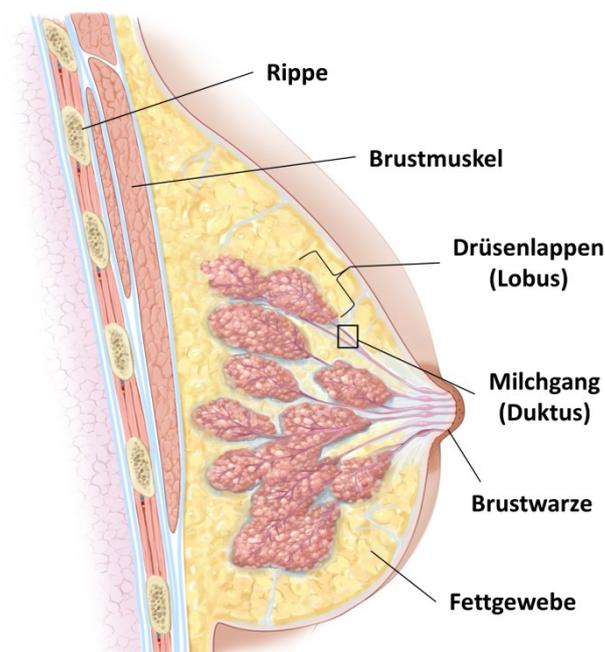


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der weiblichen Brust. Adaptiert nach: National Cancer Institute Visuals Online, © 2012 Therese Winslow LLC. Die U.S. Regierung hat bestimmte Rechte.

Die milchbildenden Einzelkomponenten der ausgereiften Brustdrüse nennt man Alveoli. Abbildung 2 schematisiert den Aufbau eines Alveolus im Querschnitt. Sein innerer Hohlraum, das Lumen, ist mit

Epithelzellen ausgekleidet. Diese luminalen Epithelzellen produzieren ab dem Ende der Schwangerschaft ausgiebig Milch, welche in den Hohlraum abgesondert wird. Basal, also nach außen hin, befinden sich die Myoepithelzellen, welche sich zusammenziehen können. Dadurch fließt die Milch aus den Alveoli in Richtung der Brustwarze. In Form gehalten werden diese Einheiten von einer Basalmembran, welche auch als schützende Barriere zum umliegenden Gewebe fungiert. In jedem Drüsenläppchen (Lobulus), welches immer über einen Milchgang (Duktus) mit der Brustwarze verbunden ist, befinden sich mehrere Alveoli. Eine Gruppe von Drüsenläppchen bildet wiederum einen Drüsenlappen (Lobus). In jeder weiblichen Brust befinden sich 15 bis 20 Drüsenlappen, die mit sechs bis zehn Hauptmilchgängen verbunden sind (P. A. Thomas 2010).

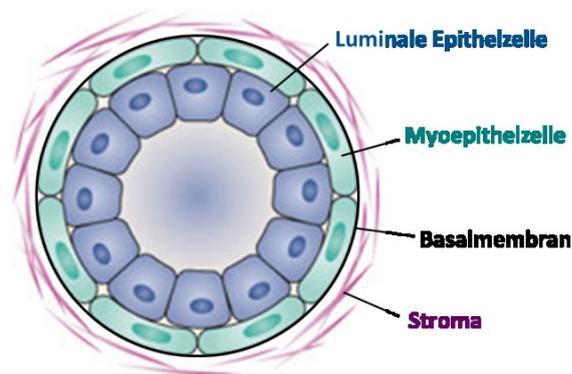


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch einen Alveolus. Adaptiert nach Brisken (2013).

4.1.2 Entwicklungsstadien

Im Laufe der menschlichen Entwicklung durchläuft die Brust eine Reihe von umfangreichen Veränderungen. Bereits im Mutterleib entsteht das embryonale Organ als ektodermaler Auswuchs. Im Kleinkind finden sich nur kleine duktale Strukturen, die in beiden Geschlechtern bis zur Pubertät unverändert bleiben (Howard und Gusterson 2000). Die Milchgänge beginnen sich dann unter dem Einfluss von Hormonen während der Pubertät zu verzweigen (Abbildung 3). Mit dem Beginn einer Schwangerschaft findet eine umfangreiche Proliferation der Epithelzellen statt (Riordan 2005). Die Milchgänge verzweigen sich weiter und die Anzahl und Größe der Lobuli nimmt zu. Auch die Anzahl der Alveoli pro Drüsenläppchen steigt an (Tot 2010). Während der zweiten Schwangerschaftshälfte differenzieren sich die luminalen Epithelzellen der Alveoli erstmalig zu milchbildenden sekretorischen Zellen (Riordan 2005). Die vollständige Differenzierung und Ausreifung der weiblichen Brust wird also erst nach der Geburt eines voll ausgetragenen Kindes erreicht (P. A. Thomas 2010).

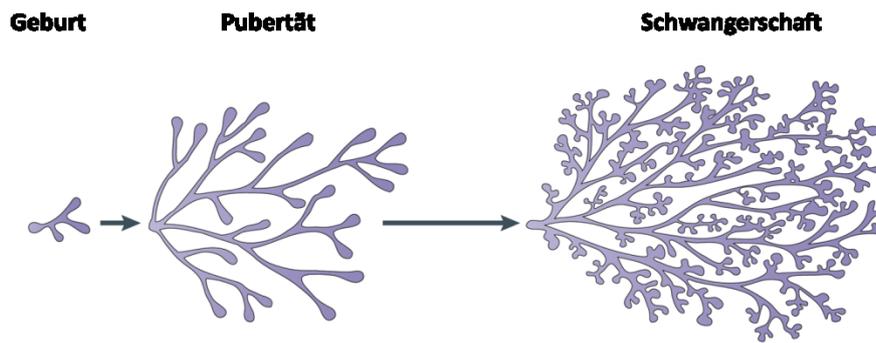


Abbildung 3: Entwicklung der Brustdrüse von der eigenen Geburt bis zur Schwangerschaft.

Adaptiert nach Gjorevski und Nelson (2011).

Durchschnittlich 40 Tage nach dem Abstillen setzt die Involution ein (Riordan 2005). In dieser Phase sterben bis zu 80% der Epithelzellen der Brustdrüse durch Apoptose, dem programmierten Zelltod (N. I. Walker *et al.* 1989). Anschließend wird die Brust radikal umgestaltet (Abbildung 4). Dabei werden die toten Epithelzellen von anderen Epithelzellen und Makrophagen, den Fresszellen des Immunsystems, verdaut und durch Fettgewebe ersetzt (C. J. Watson 2006). Die Brust einer Mutter unterscheidet sich dann morphologisch, physiologisch und molekular von der Brust einer kinderlosen Frau (Balogh *et al.* 2006, Russo und Russo 2011).

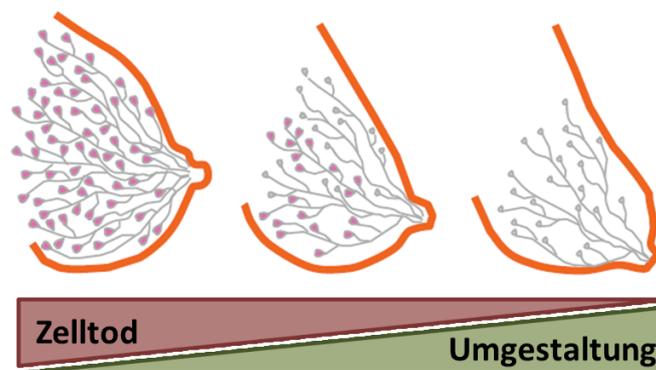


Abbildung 4: Involution der Brustdrüse nach der Stillphase.

Adaptiert nach Kobayashi *et al.* (2012).

4.2 Brustkrebs

Krebs entsteht, wenn in einer gesunden Zelle mehrere Veränderungen des Erbgutes auftreten, durch die sie neue Eigenschaften erlangt. Krebszellen können sich unendlich teilen, die Bildung neuer Blutgefäße bewirken, in umliegendes Gewebe und Gefäße eindringen, sich vom Zellverband lösen, ihren Stoffwechsel an den erhöhten Energiebedarf anpassen und sie sind resistent gegen den programmierten Zelltod und die Zerstörung durch das Immunsystem (Hanahan und Weinberg 2011).

4.2.1 Epidemiologie

In der weltweiten weiblichen Bevölkerung ist Brustkrebs, das Mammakarzinom, die am häufigsten auftretende Krebserkrankung (Ferlay *et al.* 2013). Das Risiko daran zu erkranken ist kaum beeinflussbar, jedoch ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass reproduktive Faktoren einen entscheidenden Einfluss haben können.

4.2.1.1 Inzidenz und Mortalität

Im Jahre 2012 wurde bei fast 1,7 Millionen Frauen weltweit ein Mammakarzinom diagnostiziert, davon 70.000 in Deutschland. Es handelt sich um das am häufigsten zum Tode führende Krebsleiden unter Frauen. Global verstarben 2012 mehr als 520.000 daran, in der Bundesrepublik waren es 15.000. In Deutschland liegt das Risiko einer Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken bei 10%. 1,7% der Bewohnerinnen der Bundesrepublik sterben aufgrund dieser Erkrankung (Ferlay *et al.* 2013). Selten kann ein Brustkarzinom auch bei Männern auftreten. In Deutschland werden 0,7% bis 0,8% der Brusttumoren bei Männern diagnostiziert (GEKID 2013).

Am häufigsten tritt Brustkrebs nach den Wechseljahren auf. 2012 waren in Deutschland 14% der Frauen mit Mammakarzinom jünger als 50 und 27% älter als 70. Die meisten Fälle von Brustkrebs (59%) werden also zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr diagnostiziert (Ferlay *et al.* 2013). Deshalb wurde in mehreren Ländern, darunter in Deutschland, das Mammographie-Screening-Programm aufgebaut. Es richtet sich an Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren, denen alle zwei Jahre eine Maßnahme zur Früherkennung von Brustkrebs angeboten wird. Während der Untersuchung werden pro Brust zwei Röntgenaufnahmen gemacht. Auf diesen kann Mikrokalk detektiert werden, dessen Vorhandensein auf Brustkrebs hindeuten kann (Nalawade 2009). Bei Verdacht wird zur weiteren Abklärung eine Biopsie entnommen und pathologisch untersucht. Durch das Mammographie-Screening konnte die Wahrscheinlichkeit einer Frau im Alter über 50 an Brustkrebs zu versterben um 22% bis 28% reduziert werden (Kerlikowske *et al.* 1995, Humphrey *et al.* 2002, Gotzsche und Jorgensen 2013).

4.2.1.2 Risikofaktoren

Wird Brustkrebs in jüngeren Frauen vor den Wechseljahren diagnostiziert, so ist der Tumor meist aggressiver und die Prognose schlechter. Dies liegt zum Teil an vererbaren Mutationen wie dem Tumorsuppressorgen *BRCA* (BRCA) (Phipps und Li 2010). Die BRCA Gene dienen der Reparatur beschädigter DNA und verhindern eine ungehinderte Zellteilung (Kinzler und Vogelstein 1997). Wenn diese Funktionen aufgrund einer Mutation ausbleiben, besteht eine 80-prozentige Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken (King *et al.* 2001).

Hinzu kommt eine Vielzahl weiterer Risikofaktoren für Brustkrebs. Da das Wachstum der meisten Brusttumoren durch Östrogene stimuliert wird, ist eine hohe Östrogenkonzentration im Blut nach der Menopause ein Faktor, der die Wahrscheinlichkeit erhöht an Brustkrebs zu erkranken (Feigelson und Henderson 1996). Auch Androgene spielen hier eine Rolle, da sie Vorstufen von Östrogenen sind (Nicolas Diaz-Chico *et al.* 2007). Ein weiterer Risikofaktor sind von außen zugeführte Steroidhormone, welche zum Beispiel im Rahmen einer Hormonersatztherapie während der Wechseljahre eingenommen werden können (Writing Group for the Women's Health Initiative 2002). Da die Bildung von Hormonen in den Eierstöcken während der reproduktiven Phase am stärksten ist, erhöhen eine frühe Menarche und ein spätes Einsetzen der Menopause das Brustkrebsrisiko (Clavel-Chapelon und Group 2002). Auch Übergewicht erhöht das Risiko postmenopausaler Frauen an Brustkrebs zu erkranken (World Cancer Research Fund. und American Institute for Cancer Research. 2007). Ein erhöhter Körperfettanteil wirkt sich auch auf den Hormonhaushalt aus, da übergewichtige Frauen eine erhöhte Konzentration an Testosteron haben und dieses im Fettgewebe zu Östrogenen umwandelt wird (Grodin *et al.* 1973). Zudem wird der Östrogenspiegel in Frauen durch den Konsum von Alkohol erhöht (Reichman *et al.* 1993, Dorgan *et al.* 2001).

Auch reproduktive Faktoren beeinflussen das Brustkrebsrisiko. Auf diese wird im nächsten Abschnitt detailliert eingegangen.

4.2.1.3 Parität und Brustkrebsrisiko

Bereits im 18. Jahrhundert fanden Forscher heraus, dass Brustkrebs besonders häufig unter Nonnen auftritt (Ramazzini 1743). Daraufhin bestätigten zahlreiche Studien, dass sogenannte Nullipara, Frauen ohne Geburt, häufiger an Brustkrebs versterben (Gilliam 1951, Stocks 1957, Wynder *et al.* 1960). Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Schwangerschaft entgegengesetzte Effekte auf das Brustkrebsrisiko haben kann. Denn unmittelbar nach der Entbindung steigt das Risiko vorübergehend an, anschließend sinkt es aber langfristig ab (Albrektsen *et al.* 2005).

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass vor allem Frauen, die in einem jüngeren Alter ihre erste Schwangerschaft hatten, ein verringertes Brustkrebsrisiko haben. Findet die erste Geburt vor dem 20. Lebensjahr der Mutter statt, so ist ihr Risiko nur halb so groß wie das einer kinderlosen Frau. Bekommt eine Frau ihr erstes Kind erst mit 35 oder später, ist ihr Risiko ähnlich dem der Nullipara (Kelsey *et al.* 1993). Auch weitere Geburten wirken dem Brustkrebsrisiko entgegen, solange sie in einem jüngeren Alter erfolgen (Wohlfahrt und Melbye 2001). Zusätzlich wird für jedes Jahr, in dem eine Frau im Laufe ihres Lebens stillt eine Risikoreduktion um 4% erreicht (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002). Ein Schwangerschaftsabbruch wirkt sich nicht auf das Risiko aus (Michels *et al.* 2007).

Die zu Grunde liegenden Mechanismen, durch die Schwangerschaften das Brustkrebsrisiko beeinflussen, sind bis heute nicht ausreichend geklärt. In einer tierexperimentellen Studie wurde untersucht, warum das Brustkrebsrisiko unmittelbar nach der Schwangerschaft ansteigt. Darin wurde gezeigt, dass bereits in der Brust vorhandene prämaligene Läsionen durch die Schwangerschaftshormone zum Tumorwachstum angeregt und vor dem programmierten Zelltod bewahrt werden (Haricharan *et al.* 2013). Weitere mögliche Vorgänge sind eine Schwangerschafts-assoziierte Immunsuppression, sowie entzündliche Prozesse während der Involution, die die Entstehung und das Fortschreiten von Brustkrebs begünstigen können (Schedin 2006, Shakhar *et al.* 2007). Der langanhaltende protektive Effekt hingegen resultiert wahrscheinlich aus der Differenzierung der Brustdrüse, da undifferenziertes Brustparenchym empfindlicher gegenüber Karzinogenen ist (Russo *et al.* 1982). Dieser Effekt konnte in Tierexperimenten deutlich gezeigt werden, denn Rattenmütter sind wesentlich resistenter gegen chemisch induzierten Brustkrebs als jungfräuliche Kontrolltiere (Russo *et al.* 1991). Bei einer frühen Schwangerschaft ist die Zeitspanne von der Menarche bis zur Schwangerschaft, in der das Brustgewebe undifferenziert ist, verkürzt. Zudem verlangsamt sich in Folge einer Schwangerschaft die Vermehrung von Brustepithelzellen und der Östrogenspiegel wird langfristig gesenkt (Bernstein *et al.* 1985, Russo und Russo 1994).

4.2.1.4 Prävention

Der überwiegende Teil der Risikofaktoren ist nicht oder nur schwer beeinflussbar. Jedoch können der Verzicht auf Hormonersatztherapie und Alkohol, regelmäßige Bewegung und die Vermeidung von Übergewicht das Brustkrebsrisiko senken (NCI 2014).

4.2.2 Biologie und klinische Eigenschaften

Bei Brustkrebs handelt es sich um eine heterogene Erkrankung, die in mehrere verschiedene Subtypen unterteilt wird (Schatten 2013). Die verschiedenen Subtypen bedürfen einer unterschiedlichen Behandlung und haben verschiedene klinische Verläufe. Diese Untergruppen ergeben sich aus den Patientenmerkmalen wie dem Alter, dem menopausalen Zustand, sowie dem Auftreten von Brustkrebs in der Familie und den Eigenschaften des Tumors selbst. Zu den Tumoreigenschaften zählen das Stadium, der Differenzierungsgrad der Krebszellen, die Histologie und die Expression molekularer und genetischer Biomarker (Phipps und Li 2010).

Brustkrebs entsteht in den Epithelzellen der Brustdrüse und gehört somit zu den Karzinomen (Schatten 2013). 80% bis 85% der nicht invasiven Brusttumoren entstehen in den Milchgängen. Man spricht dann von einem duktalem Karzinom *in situ* (DCIS) (Li und Daling 2007). Unter den invasiven Mammakarzinomen sind 70% bis 80% auf die Milchgänge begrenzt (Schatten 2013). Sind die Drüsenläppchen betroffen, handelt es sich um ein lobuläres Karzinom. Nur 5% der *in situ* Brusttumoren und etwa 15% der invasiven Karzinome wachsen in den Lobuli heran (Li *et al.* 2003, Li und Daling 2007). Daneben existiert eine Vielzahl seltener und verschiedenartiger histologischer Brustkrebssubtypen, welche nicht in diese Arbeit eingeschlossen wurden (Schatten 2013).

4.2.2.1 Tumorstadium

Anhand des Stadiums wird beschrieben, wie weit sich der Tumor im Körper ausgebreitet hat. Dabei wird die Größe des Tumors erfasst, ob und in wie vielen Lymphknoten Krebszellen gefunden werden können und ob eine Ausbreitung in andere Körperregionen stattgefunden hat. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach dem *American Joint Committee of Cancer* von 0 bis IV, wobei die Größe und die Ausbreitung mit dem Stadium zunehmen und die Prognose schlechter wird. Während die 10-Jahres-Überlebensrate bei einem Tumor mit Stadium 0, dem duktalem Karzinom *in situ*, nahezu 100% ist, liegt es bei einer Erkrankung im Stadium IV, dem metastasierten Mammakarzinom, bei unter 10% (Bland *et al.* 1998, Singletary und Connolly 2006).

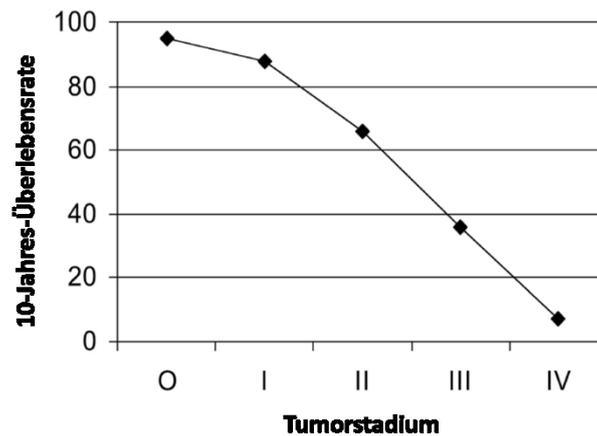


Abbildung 5: Relative 10-Jahres-Überlebensrate von Brustkrebspatienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Adaptiert nach Singletary und Connolly (2006).

4.2.2.2 Tumorgrad

Der Tumorgrad beschreibt inwiefern die Krebszellen mikroskopisch vom gesunden Brustgewebe abweichen. Üblicherweise wird als Maß für den Differenzierungsgrad die Bloom-Richardson Skala von 1 bis 3 verwendet. Während ein Tumor vom Grad 1 normal erscheinende Zellen aufweist, die sich langsam teilen, befinden sich in einer Grad 3 Läsion stark abnormale Zellen, die sich schnell vermehren (Bloom und Richardson 1957). Hochgradige Karzinome sind somit aggressiver, schreiten schneller voran und verschlechtern die Überlebensprognose der Patienten (Elston und Ellis 1991, J. Rosenberg *et al.* 2005).

4.2.2.3 Molekulare Subtypen

Molekulare Marker werden verwendet, um ein Mammakarzinom einem von fünf Subtypen zuordnen zu können, die sich anhand der Prognose und dem Ansprechen auf Therapien unterscheiden. Zu den Markern gehören unter anderem der Östrogenrezeptor (*Estrogen receptor*, ER), der Progesteronrezeptor (PR), der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) (Schnitt 2010).

Gesundes Brustgewebe wird zum Wachstum angeregt, indem Östrogen an die ER und Progesteron an die PR bindet (D. S. Taylor *et al.* 2009). Deswegen sind auch die meisten Brusttumoren (75%) abhängig von diesen Wachstumshormonen (Li *et al.* 2003). Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus ist besonders wichtig, weil dieser Auskunft darüber gibt, ob eine antihormonelle Therapie in Frage kommt. Patienten, deren Mammakarzinom die Hormonrezeptoren (HR) exprimiert, haben eine güns-

tigere Prognose (Grann *et al.* 2005). Dies liegt unter anderem daran, dass HR-positive Tumoren besser differenziert sind (Rolland *et al.* 1980). Das Proto-Onkogen Her2 ist in 10% bis 36% der invasiven Brusttumoren überexprimiert und/oder amplifiziert (Gusterson *et al.* 1988, Ross und Fletcher 1998, Etorh *et al.* 1999). HER2 positive Tumoren kehren oft zurück und führen zu einer verschlechterten Prognose (Riou *et al.* 2001). Im Kapitel 4.3.2. wird näher auf den HER2 Rezeptor eingegangen.

Unter den molekularen Subtypen von Brustkrebs unterscheidet man Luminal A, Luminal B, HER2 überexprimierend, *basal-like* und *normal-like*. Um die luminalen Subtypen voneinander zu unterscheiden, zieht man die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 hinzu. Die Charakteristika dieser Subtypen sind in Tabelle 1 dargestellt (Phipps und Li 2010). Der Subtyp Luminal A tritt am häufigsten auf (X. R. Yang *et al.* 2007). Brustkrebs, der aufgrund einer BRCA1 Mutation entsteht ist meistens *basal-like* (Foulkes *et al.* 2003). *Normal-like* Tumoren entstehen aus Zellen, die keine Epithelzellen sind (Sørli 2004). Tumoren vom *basal-like* und *normal-like* Subtyp sind meist schlechter differenziert, was zur Folge hat dass die Prognose für die betroffenen Patienten in der Regel wesentlich ungünstiger ist (Banerjee *et al.* 2006, Carey *et al.* 2007).

Tabelle 1: Molekulare Subtypen von Brustkrebs mit jeweiligem Biomarkerprofil. Adaptiert nach Phipps und Li (2010).

Subtyp	Subgruppe	HR	HER2	Ki67	Zytokeratin/EGFR	Häufigkeit
Luminal A	/	+	-	niedrig	/	55-65%
Luminal B	HER2 positiv	+	+	niedrig oder hoch	/	7-12%
	HER2 negativ	+	-	hoch	/	
HER2	/	-	+	/	/	6-10%
<i>Basal-like</i>	/	-	-	/	+	10-15%
<i>Normal-like</i>	/	-	-	/	-	5-10%

4.2.2.4 Das duktales Karzinom *in situ*

Das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) ist ein maligner, nicht invasiver Brusttumor. Es handelt sich um proliferierende duktales Epithelzellen, die die Basalmembran (noch) nicht durchbrochen haben

(Abbildung 6). Das DCIS ist eine nicht-obligate Vorläuferläsion des invasiven Brustkrebses (Allred 2010). Bleibt ein *in situ* Karzinom unbehandelt, so entwickelt sich in 20% bis 50% der Fälle daraus ein invasives Karzinom (Rosen *et al.* 1980, D. L. Page *et al.* 1982, D. L. Page *et al.* 1995, Collins *et al.* 2005). Unter welchen Umständen dies geschieht, ist bis heute weitestgehend unbekannt. Deshalb werden heute alle *in situ* Karzinome operativ entfernt. Im Falle einer Mastektomie, der chirurgischen Entfernung der Brust, bleiben 98% der Patientinnen gesund (Cutuli *et al.* 2001). In der Regel kann jedoch der Großteil der Brust erhalten bleiben (Kulkarni 2011). Die Expression von Biomarkern und die zu Grunde liegenden Risikofaktoren sind ähnlich wie im invasiven Brustkrebs (siehe Abschnitte 4.2.1.2 und 4.2.2.3) (Hannemann *et al.* 2006, P. A. Thomas 2010).

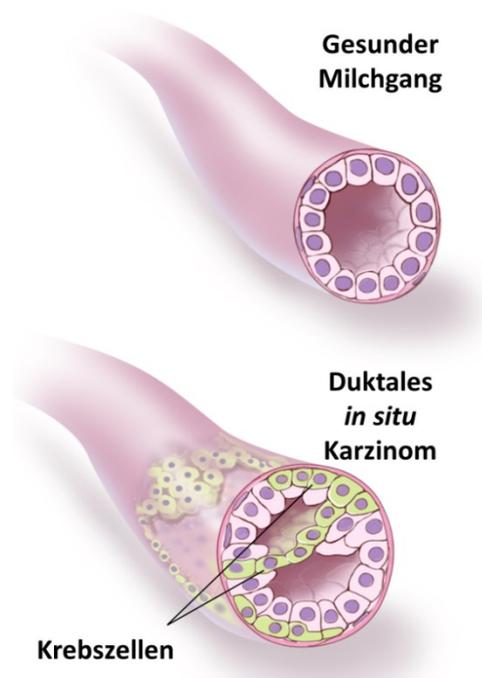


Abbildung 6: Schematischer Querschnitt eines Milchganges (Duktus) einer gesunden Brust im Vergleich zu einem DCIS. Adaptiert nach: National Cancer Institute Visuals Online, © 2012 Therese Winslow LLC. Die U.S. Regierung hat bestimmte Rechte.

Detektiert werden *in situ* Karzinome überwiegend durch Mammographie, da sie häufig mit Mikroverkalkungen assoziiert sind (Allred 2010). Daher ist mit der Einführung des Mammographie-Screenings die Inzidenz von DCIS stark angestiegen. Abbildung 7 verdeutlicht diesen Anstieg von 1995 bis 2008 in den neuen Bundesländern (Wilsdorf-Köhler *et al.* 2011). In den Industrienationen erweist sich etwa jede sechste detektierte Brustläsion als duktales *in situ* Karzinom (Lynge *et al.* 2014).

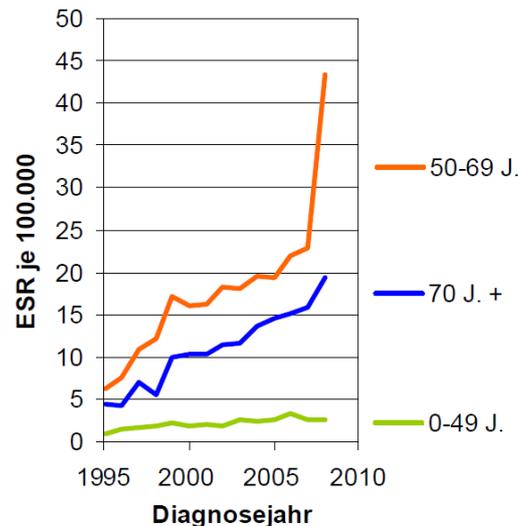


Abbildung 7: Inzidenz des DCIS nach Altersgruppen in den neuen Bundesländern von 1995 bis 2008. Adaptiert nach Wilsdorf-Köhler *et al.* (2011).

4.2.3 Therapie

Die Behandlung von Brustkrebs hängt im Wesentlichen von dem Tumorstadium, der Expression von Hormonrezeptoren und dem Vorhandensein einer Überexpression und/oder Amplifikation des HER2-Rezeptors ab. In den meisten Fällen findet eine Operation statt, die durch Bestrahlung, Chemotherapie, Antihormontherapie und zielgerichtete Therapien ergänzt werden kann. Während die Therapie von Brustkrebs im Stadium 0 bis III auf eine komplette Heilung abzielt, ist die erfolgreiche Bekämpfung des Mammakarzinoms mit Fernmetastasen nur selten möglich. In diesem Falle soll eine Linderung der Beschwerden und eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden (Kurian und Carlson 2010).

4.2.3.1 Behandlung von örtlich begrenzten Brusttumoren

Bei großen Tumoren wird zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt, um die Größe zu verringern und damit eine anschließende brusterhaltende Operation zu erleichtern. Je nach Lage, Größe, Ausbreitung, klinischen Eigenschaften des Tumors und Wunsch des Patienten wird entweder die gesamte Brust (Mastektomie) oder nur der Tumor mit einem Teil des angrenzenden Gewebes (Lumpektomie) chirurgisch entfernt (Gradishar *et al.* 2014, Yeo *et al.* 2014). Nach einer Lumpektomie wird die Brust zudem bestrahlt. Bei Krebsgeschwüren mit über 5 cm kann auch eine Bestrahlung der Brustwand nach einer Mastektomie angezeigt sein (Kurian und Carlson 2010, Gradishar *et al.* 2014).

Frauen, die das mutierte BRCA1 oder BRCA2 Gen tragen, kann eine prophylaktische beidseitige Mastektomie vor dem Auftreten von Brustkrebs bewahren (Hartmann *et al.* 2001).

Zusätzlich zur Brust-OP werden die Wächterlymphknoten, zu denen die Gewebeflüssigkeit aus der Tumorregion abfließt, entfernt und auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Lassen sich dort Krebszellen nachweisen, werden weitere Lymphknoten aus der Achselhöhle und hinter dem großen Brustmuskel entnommen (Yeo *et al.* 2014). Je nach Ausbreitung des Tumors in die Lymphknoten wird auch die Achselregion bestrahlt (Gradishar *et al.* 2014).

Ist der Brusttumor invasiv und größer als 1 cm, wird zudem eine adjuvante Chemotherapie verabreicht (Kurian und Carlson 2010). Chemotherapeutika zerstören alle Zellen, die sich schnell teilen. Somit werden Krebsgeschwülste, aber auch Haarfollikel, Knochenmarkszellen und der Magen-Darm-Trakt beschädigt. Durch die zusätzliche Gabe von Mitteln gegen Übelkeit und Knochenmarkswachstumsfaktoren wird heute jedoch eine bessere Verträglichkeit von Chemotherapeutika erreicht (Priestman 2012). Die Standard-Therapie umfasst eine kombinierte Gabe von Anthrazyklinen und Taxanen (Kurian und Carlson 2010). Während Anthrazykline unter anderem die Synthese neuer DNA verhindern, hemmen Taxane den Abbau des mitotischen Spindelapparates. Auf diese Weise wird die Zellteilung unterbunden (Priestman 2012). Aufgrund der schnelleren Teilungsrate hochgradiger Tumoren sprechen diese besser auf eine Chemotherapie an (Pinder *et al.* 1998).

Hormonrezeptor-positive Brusttumoren von prämenopausalen Frauen behandelt man mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen (Yeo *et al.* 2014). Dieser hemmt Östrogenrezeptoren in der Brust, nicht aber in anderen Geweben (K. J. Walker *et al.* 1991). Für Frauen nach den Wechseljahren eignen sich Aromatase-Inhibitoren besser (Yeo *et al.* 2014). Damit wird das Aromatase-Enzym gehemmt, welches Androgene in Östrogene umwandelt (Abul-Hajj *et al.* 1979).

Ist das Onkogen Her2 amplifiziert oder das Protein überexprimiert und der Tumor größer als 1 cm, wird der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Handelsname: Herceptin) nach der Chemotherapie verabreicht (Kurian und Carlson 2010). Dieser bindet an den extrazellulären Teil des HER2-Rezeptors, dessen Wirkweise in Kapitel 4.3.2 näher erläutert wird. Mit Hilfe dieser zielgerichteten Therapie treten nur halb so viele Rezidive auf und die Sterblichkeitsrate sinkt um ein Drittel (Romond *et al.* 2005).

4.2.3.2 Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms

Wenn Krebszellen vom Brusttumor in Blut- oder Lymphgefäße einwandern, können sie in andere Organe gelangen und dort Metastasen bilden (Fidler 2003). Zu den Orten, an denen sich neue Krebsgeschwüre bilden, zählen die Knochen, das Gehirn, die Leber und die Lunge. Metastasen betreffen in

den Industrienationen eher Patienten, die schon einmal wegen eines Brusttumors behandelt wurden, als solche, bei denen die Krankheit erstmalig diagnostiziert wird (Kurian und Carlson 2010). Das mittlere Überleben liegt dann bei nur noch zwei bis vier Jahren (Chia *et al.* 2007).

Der metastasierte Krebs wird ebenfalls auf die biologischen Marker ER, PR und HER2 untersucht. Ist er Hormonrezeptor-positiv, wird in erster Linie eine Antihormontherapie durchgeführt.

Bei negativem Befund wird eine Chemotherapie angewandt. Chemotherapeutika werden auch dann bevorzugt eingesetzt, wenn Hormonrezeptor-positive Metastasen ausgedehnt sind, die Eingeweide beeinträchtigen, oder resistent gegen eine Antihormontherapie sind. Wegen möglicher Resistenzen werden andere Chemotherapeutika ausgewählt als die, die der Patient eventuell in einer früheren Behandlung erhalten hat. Wegen der palliativen Anwendung wird bei der Auswahl des Therapeutikums auf möglichst geringe Nebenwirkungen geachtet (Kurian und Carlson 2010).

Zusätzlich kann die zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab gegen HER2-positive Tumoren das Überleben verlängern. Bei Knochenmetastasen, die bei 70% der Patienten mit fortgeschrittenem Mammakarzinom vorkommen, verhindert die Einnahme von Herceptin den Knochenabbau durch Osteoklasten (Coleman und Rubens 1987, Coleman *et al.* 2014).

4.3 Grundlagen der Immunologie

Das Immunsystem dient der Abwehr von Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten. Neben den roten Blutkörperchen, welche für den Gasaustausch der Körperzellen zuständig sind, und den Blutplättchen, die vor allem dem Wundverschluss dienen, stammen auch die Immunzellen aus dem Knochenmark. Sie wandern aus dem Knochenmark ins Blut, das etwa zu einem Volumenprozent aus Immunzellen, den Leukozyten, besteht. Insgesamt befinden sich rund 10 Millionen Leukozyten in einem Milliliter Blut (Alberts 2002). Innerhalb der Immunzellen unterscheidet man Zellen, die dem angeborenen oder dem adaptiven Immunsystem angehören (Abbildung 8).

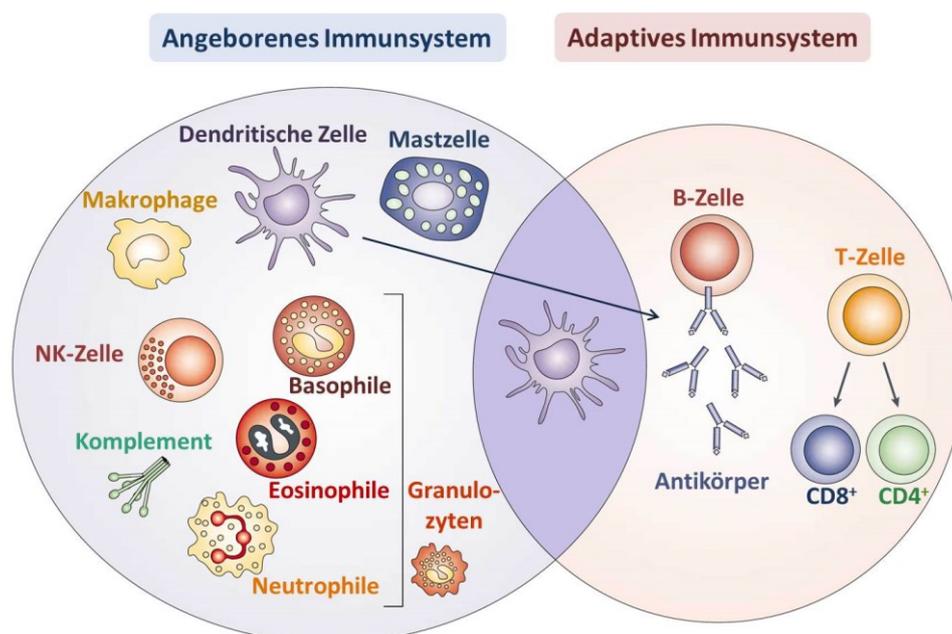


Abbildung 8: Die Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Adaptiert nach Dranoff (2004).

Leukozyten des angeborenen Immunsystems erkennen mit Hilfe einer begrenzten Anzahl von unveränderlichen Rezeptoren bestimmte Strukturen, die viele Krankheitserregern besitzen, nicht aber die körpereigenen Zellen. Im Falle einer Infektion wandern sie gezielt über das Blut zum Entzündungsherd. Den größten Anteil machen die neutrophilen Granulozyten aus, die besonders effizient Mikroorganismen verdauen und dann absterben. Größere Krankheitserreger wie Parasiten, die nicht im Zellinneren zerstört werden können, werden von eosinophilen und basophilen Granulozyten durch das Freisetzen von toxischen Proteinen und Enzymen abgetötet. Die inneren Oberflächen des Körpers werden von Mastzellen geschützt, welche unter anderem Wurmparasiten abtöten. Zudem

werden in das Gewebe eindringende Mikroorganismen von Fresszellen, den Makrophagen, aufgenommen und verdaut. Auch Dendritische Zellen können Krankheitserreger aufnehmen. Sie sind darauf spezialisiert Antigene der Umgebung auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. In Körperflüssigkeiten gibt es ein weiteres System, das Mikroorganismen bekämpft: Das Komplement. Es besteht aus 30 verschiedenen Proteinen, die direkt Zellmembranen von Mikroorganismen angreifen, oder Immunzellen auf diese aufmerksam machen können. Eine spezielle Untergruppe der Immunzellen, die Lymphozyten, reifen in den Lymphgeweben. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die Virus-infizierte und Tumorzellen abtöten können und B-Zellen, die nach weiteren Differenzierungsschritten Antikörper produzieren können, reifen im Knochenmark. T-Zellen, die ebenfalls Virus-infizierte und Tumorzellen abtöten, aber auch andere Immunzellen regulieren können, entwickeln sich im Thymus, einem Organ oberhalb des Herzens. Die letzteren beiden Zelltypen gehören zum adaptiven Immunsystem, welches im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben wird (Murphy 2011).

Unter den genannten Mitgliedern des Immunsystems sind einige in der Lage Tumorzellen abzutöten (Abbildung 9). Hierzu zählen neben den bereits genannten T-Zellen die NK-Zellen. Auch Makrophagen und das Komplementsystem können Tumoren angreifen, wenn Antikörper an deren Oberfläche gebunden haben (Scott *et al.* 2012).

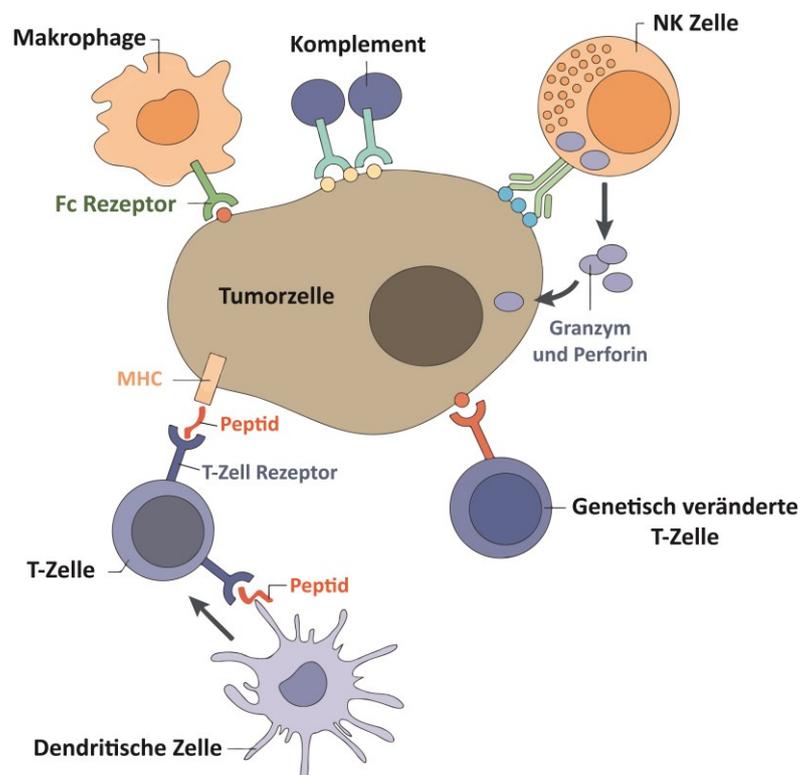


Abbildung 9: Immunkomponenten, die Tumorzellen abtöten können. Adaptiert nach Scott *et al.* (2012).

4.3.1 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunantwort wird eingeleitet, wenn angeborene Mechanismen nicht ausreichen, um Krankheitserreger abzuwehren. Im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems, deren Rezeptoren bei jedem Menschen die gleichen Strukturen erkennen, können T- und B-Zellen jeweils schätzungsweise 25 Millionen verschiedene Antigene erkennen, wobei einzelne Zellen mehrere Rezeptoren der gleichen Spezifität tragen (Arstila *et al.* 1999). Ein Mensch besitzt zwischen $1 \cdot 10^{11}$ und $1 \cdot 10^{12}$ T-Zellen (Westermann und Pabst 1990, Perelson und Wiegel 2009, Warren *et al.* 2011). Deren Antigenrezeptor, der T-Zell-Rezeptor (TCR), besteht aus zwei verschiedenen Proteinen. Diese werden von Genen kodiert, die durch unterschiedliche Kombinationen von Gensegmenten zusammengesetzt werden. Beim Zusammenfügen dieser Segmente in dem sich entwickelnden Lymphozyten können einzelne Nukleotide hinzugefügt oder entfernt werden. Auch der B-Zell-Rezeptor, welcher ein membrangebundener Antikörper ist, besteht aus zwei Teilen. Hier verbindet sich eine von zwei „leichten“ mit einer „schweren“ Kette, deren Diversität wiederum aus Kombinationen verschiedener Gensegmente resultiert. Zusätzlich kann die Vielfalt von B-Zell-Rezeptoren nach der Aktivierung der Zelle noch durch das Einbringen von Punktmutationen erweitert werden. Auf diese Weise entstehen Lymphozyten, die theoretisch bis zu 10^{18} verschiedene Strukturen binden. Somit ermöglicht das adaptive Immunsystem dem Körper auf eine große Vielfalt an Krankheitserregern reagieren zu können. Durch die zufällige Zusammensetzung des Antigenrezeptors kann es jedoch auch vorkommen, dass Lymphozyten körpereigene Strukturen erkennen. Solche Immunzellen werden jedoch im Laufe ihrer Entwicklung durch spezielle Selektionsprozesse abgetötet (Murphy 2011).

B-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung Antikörper, die an die Oberflächen von beispielsweise Mikroorganismen oder deren Produkte binden und sie auf diese Weise unschädlich machen. Die Mehrheit der T-Zellen können ausschließlich kurze Peptidfragmente von Antigenen erkennen, die auf der Oberfläche von Zellen mit Hilfe von *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen präsentiert werden. MHC Klasse I Moleküle befinden sich auf nahezu jeder Körperzelle. Sie präsentieren Fragmente von allen Proteinen, die in der Zelle gebildet wurden, zum Beispiel auch solche, die aus Virusinfektionen stammen oder durch genetische Mutationen verändert sind. Diese MHC-Peptidkomplexe können zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) aktivieren, welche den Corezeptor CD8 tragen und die Zelle anschließend abtöten (Abbildung 10). Auf den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, wie den Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen befinden sich zusätzlich MHC Klasse II Moleküle, welche Peptide präsentieren, die von extrazellulär aufgenommenen und verdauten Partikeln stammen. Mit Peptid beladene MHC II Moleküle können von $CD4^+$ Helfer-T-Zellen (T_H) oder regulatorischen T-Zellen (Treg) erkannt werden (Abbildung 11), die unter anderem

CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen aktivieren bzw. Immunreaktionen unterdrücken können (Murphy 2011).

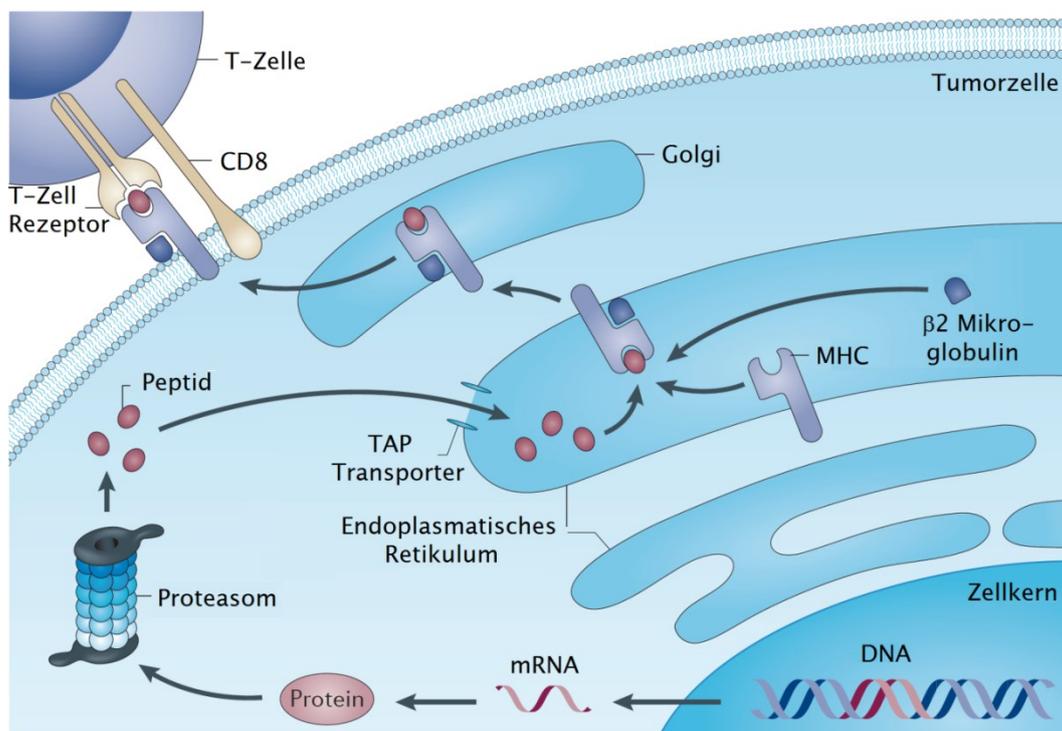


Abbildung 10: Prozessierung von Tumorantigenen, die von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden.

Adaptiert nach Coulie (2014).

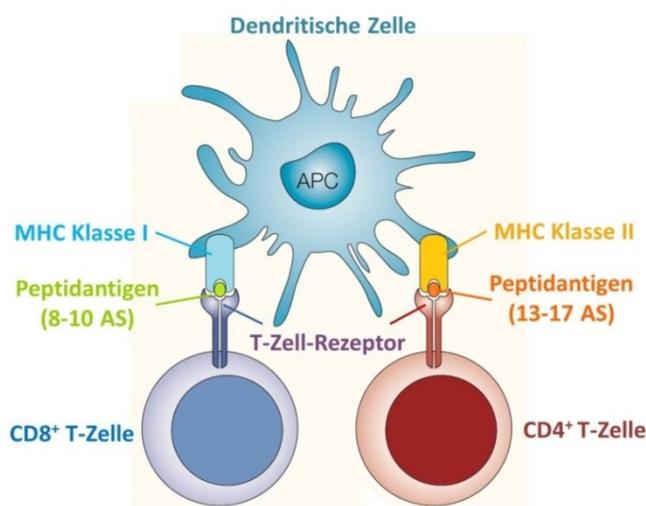


Abbildung 11: Antigenpräsentation an T-Zellen. AS=Aminosäuren, APC=Antigenpräsentierende Zelle.

Adaptiert nach Bluestone und Abbas (2003)

4.3.1.1 Entwicklungsschritte von T-Zellen

Vorläufer von T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein, wo sie Thymozyten genannt werden. Hier werden die Gene für den T-Zell-Rezeptor durch eine zufällige Kombination von Gensegmenten umgestaltet. Diejenigen Zellen, die daraus keinen funktionellen Rezeptor erzeugen können, sterben durch Apoptose. Alle anderen unreifen T-Zellen werden dann auf die Zweckmäßigkeit ihres Rezeptors getestet. Die Epithelzellen im Thymus exprimieren eine Vielzahl an Selbst-Peptid-MHC-Komplexen. Nur wenn die sich entwickelnden Thymozyten leicht an diese binden können, erhalten sie ein Überlebenssignal. Dieses stellt sicher, dass sie auch später in der Lage sein werden, Fremdantigen-MHC-Komplexe binden zu können. Je nach der Signalstärke, die aus dem Binden der MHC I oder II Moleküle resultiert, entscheidet sich nun auch, ob sie als zytotoxische, regulatorische oder Helfer-T-Zelle aus dem Thymus wandern wird. Zunächst werden sie jedoch weiter auf ihre Fähigkeit getestet, mit MHC-Selbst-Peptid-Komplexen auf Dendritischen Zellen und Makrophagen zu interagieren. Zudem werden den T-Zellen vom Thymusepithel zahlreiche Antigene präsentiert, die in unterschiedlichen Organen des Körpers vorkommen. Ist die Bindung sehr stark, stirbt der Thymozyt ab oder wird zur regulatorischen T-Zelle mit immunhemmenden Eigenschaften (siehe nächstes Kapitel). Er würde ansonsten körpereigenes Gewebe angreifen. Die toten T-Zellen werden von Makrophagen aufgenommen und verdaut. Nach diesen Selektionsprozessen bleiben nur etwa 2% bis 4% der T-Zellen übrig. Diese wandern aus dem Thymus aus und zirkulieren durch die Blut- und Lymphgefäße des Körpers. Da sie bis dahin noch nicht mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt gekommen sind, nennt man sie in diesem Lebensabschnitt naive T-Zellen (Murphy 2011).

Um eine Immunreaktion durch T-Zellen einleiten zu können, bedarf es einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), die drei bestimmte Signale aussendet. Dendritische Zellen sind hierfür am effizientesten. Man nennt sie deswegen auch professionelle APC. Vorläufer Dendritischer Zellen kommen im Blut vor und wandern vor allem in die Gewebe ein, die häufig Kontakt mit eindringenden Mikroorganismen haben, wie die Haut, die Lunge oder der Darm. Dort nehmen sie in einem unreifen Stadium kontinuierlich Flüssigkeiten und Partikel, oder ganz gezielt Mikroorganismen aus der Umgebung auf und zersetzen diese. Mit Hilfe verschiedenster Rezeptoren können APC spezifische Strukturen von Krankheitserregern erkennen. Darunter sind es bestimmte Bestandteile von Zellhüllen und Fortbewegungsproteinen, sowie spezielle Formen von RNA und DNA, welche nur Bakterien, Pilze und Viren besitzen, nicht aber menschlichen Zellen. Erkennt eine Dendritische Zelle solche Strukturen, wird sie aktiviert und wandert in die lymphatischen Gewebe, zum Beispiel in den nächstgelegenen Lymphknoten. Auf dem Weg dorthin werden von außen aufgenommene Mikroorganismen oder Fragmente eigener Zellen in kleinen von einer Membran umgebenen Bläschen, den Vesikeln, von Enzymen ver-

daut. Daraus resultierende Peptide werden dann mit Hilfe von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. In der Zellflüssigkeit, dem Zytosol, befindliche Proteine werden im Proteasom zu Peptiden mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren gespalten, auf MHC Klasse I Moleküle geladen und ebenfalls auf die Zelloberfläche transportiert. Es kann sich dabei um zelleigene Proteine oder Antigene von Viren handeln, die in das Zellinnere der Dendritischen Zellen eindringen. Außerdem ist es möglich, dass APC von außen aufgenommene Antigene auf Klasse I Molekülen präsentieren: Ein Prozess, den man Kreuzpräsentation nennt. Während der Wanderung durch die Lymphgefäße findet auch eine Reifung der Dendritischen Zelle statt, bei der sie neben den MHC noch weitere Moleküle auf ihrer Oberfläche verstärkt exprimiert. Dabei handelt es sich um die costimulatorischen Moleküle, welche zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind. (Murphy 2011).

In den zahlreichen Lymphknoten des Körpers treffen die zirkulierenden naiven T-Zellen ständig auf antigenpräsentierende Zellen und binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor an die MHC-Moleküle. In den meisten Fällen erkennen sie das präsentierte Antigen nicht, lösen sich und wandern zur nächsten APC. Nur etwa jede tausenste bis millionste T-Zelle ist für ein bestimmtes Antigen spezifisch. Wird das Antigen erkannt, bleibt sie an die Dendritische Zelle gebunden. Wird gleichzeitig kein costimulatorisches Signal abgegeben, bleibt der Lymphozyt inaktiv oder sie stirbt ab. Werden die costimulatorischen Moleküle der APC gebunden, wird die T-Zelle aktiviert und beginnt sich zu teilen. Für eine erfolgreiche Immunreaktion muss noch ein drittes Signal weitergegeben werden. Es handelt sich dabei um lösliche Signalproteine, Zytokine, die von umgebenen Zellen, unter anderem von der kontaktierten APC, stammen. Die sezernierten Zytokine binden an spezielle Rezeptoren auf den T-Zellen und entscheiden über deren Differenzierung zu einem bestimmten Effektortyp. Bindet eine $CD4^+$ T-Zelle die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12), wird sie zu einer T_H1 -Zelle, die ihrerseits die Entzündungsmoleküle IFN- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie den T-Zellwachstumsfaktor IL-2 produziert (Murphy 2011). T_H1 Zellen sind auch bei der Tumorbekämpfung wichtig, da sie Tumorzellen direkt abtöten und zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen sowie Dendritische Zellen aktivieren können (W. D. Thomas und Hersey 1998, Knutson und Disis 2005). CTL können jedoch auch direkt von Dendritischen Zellen aktiviert werden. Ist in der Umgebung der naiven T-Zelle jedoch in größeren Mengen TGF- β vorhanden, wird sie zu einer induzierten regulatorischen T-Zelle, welche die anti-entzündlichen Signalmoleküle IL-10 und/oder TGF- β freisetzt und damit andere Immunzellen hemmt (Murphy 2011). Die Funktionen der Treg werden im nächsten Kapitel ausführlicher beschrieben.

Die T-Zellen, die nun, etwa vier Tage nach der Entdeckung des Pathogens, in großer Anzahl vorhanden sind und alle das gleiche Antigen erkennen, wandern zum größten Teil als Effektorzellen aus den Lymphgeweben zum Entzündungsherd. Dort haben die Immunzellen des angeborenen Immunsys-

tems als Reaktion auf den Krankheitserreger Zytokine freigesetzt, die andere Immunzellen anlocken: Die Chemokine. Die Effektor-T-Zellen (T_E) bewegen sich nun entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort mit der höchsten Chemokinkonzentration, dem Entzündungsort. Hier werden nun die Virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch CTL und/oder T_H1 -Zellen abgetötet. Sind Bakterien in das Gewebe eingedrungen, werden durch T_H1 -Zellen Makrophagen und B-Zellen aktiviert, welche die Mikroorganismen aufnehmen und zersetzen bzw. mit Antikörpern unschädlich machen. Parasiten werden mit Hilfe von T_H2 -Zellen bekämpft, welche B-Zellen zur Produktion eines speziellen Antikörpertyps anregen, die wiederum Mastzellen zum Abtöten der Eindringlinge bringen. Sind die Erreger abgetötet, stirbt der größte Teil der nicht mehr benötigten Effektorzellen ab. Einige langlebige Gedächtniszellen bleiben jedoch im Körper vorhanden und sind bei einer weiteren Infektion mit dem gleichen Erreger wesentlich schneller in der Lage eine Immunantwort auszulösen. Unter den Gedächtnis-T-Zellen, die im Gegensatz zu naiven (T_N) und Effektorzellen das Protein CD45RO auf ihrer Oberfläche tragen, gibt es zwei Untergruppen mit unterschiedlicher Aktivierungsschwelle. Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) werden schnell zu Effektorzellen und befinden sich überwiegend in Geweben. Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) tragen im Gegensatz zu den Effektor-Gedächtniszellen den Chemokinrezeptor CCR7, der ihnen ebenso wie den naiven T-Zellen Zutritt zu den Lymphgeweben ermöglicht (Murphy 2011). Sie benötigen nach ihrer Reaktivierung mehr Zeit um sich zu Effektorzellen umzubilden, sind aber langlebiger und können sich häufiger teilen als T_{EM} (Murphy 2011, Caserta *et al.* 2012). Zudem ist noch eine weitere Gedächtnis-T-Zell Population entdeckt worden: Die Gedächtnis-Stamm-T-Zellen (T_{SCM}). Dabei handelt es sich um einen langlebigen, weniger differenzierter Gedächtniszelltyp mit verstärkter Kapazität zur Selbsterneuerung. Wie naive T-Zellen exprimieren T_{SCM} CCR7 und sind negativ für CD45RO. Dagegen bilden sie kurze Zeit nach ihrer Stimulation, im Gegensatz zu T_N , größere Mengen der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α . Gedächtnis-Stamm-T-Zellen können und sich sowohl zu T_E , als auch zu T_{CM} und T_{EM} weiterentwickeln (Gattinoni *et al.* 2011).

Die genannten Differenzierungsstufen der T-Zellen lassen sich also weitestgehend über den Nachweis der zwei Oberflächenmoleküle CD45RO und CCR7 unterscheiden (Abbildung 12).

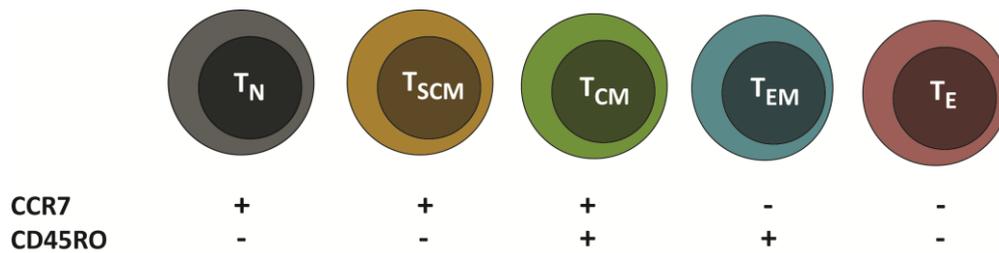


Abbildung 12: Differenzierungsstadien von T-Zellen. T_N : Naive T-Zelle, T_{SCM} : Gedächtnis (*memory*) Stamm-T-Zelle, T_{CM} : Zentrale Gedächtnis-T-Zelle, T_{EM} : Effektor-Gedächtnis-T-Zelle, T_E : Effektor-T-Zelle. Adaptiert nach Mahnke *et al.* (2013).

Die Induktion dieser Gedächtniszellen, die Jahrzehnte lang im Körper überleben können, ist das Ziel von Impfungen (Imamichi *et al.* 2014). Hier werden anstatt der Pathogene unschädliche Erreger oder deren Bestandteile in Kombination mit einem Adjuvans gegeben, welches als entzündungsfördernder Hilfsstoff dient. Es gibt zahlreiche Versuche auch mit Tumorantigenen (Kapitel 4.3.2) zu impfen, um Tumoren zu bekämpfen. Solche Studien zeigen, beispielsweise in Tierexperimenten, dass es möglich ist, zentrale Gedächtnis T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen durch einen Impfstoff mit einem Brustkrebsantigen zu erzeugen (Lerret *et al.* 2012). Die meisten Anti-Tumor Impfstudien mit Menschen werden derzeit durchgeführt, wenn diese bereits an Krebs erkrankt sind (siehe Kapitel 4.3.3).

Auch im Knochenmark von Brustkrebspatienten befinden sich sowohl zentrale Gedächtnis CTL, als auch Effektor-Gedächtnis-CTL, die in der Lage sind Tumorzellen abzutöten (Beckhove *et al.* 2004).

4.3.1.2 Regulatorische T-Zellen

Eine Immunreaktion muss auf eine effiziente Weise in den Körper eindringende Erreger eliminieren ohne dabei Kollateralschäden zu verursachen. Die Aufgabe der regulatorischen T-Zellen (Treg) ist es, diese Reaktionen zu kontrollieren, indem sie Funktionen anderer Immunzellen unterdrücken. Auf diese Weise tragen sie dazu bei, dass Immunreaktionen gegen Pathogene und Allergene nicht übermäßig werden, kommensale Mikroorganismen toleriert werden und dass transplantierte, körpereigene und embryonale Gewebe nicht angegriffen werden (Shevach 2000, Aluvihare *et al.* 2004, Curotto de Lafaille und Lafaille 2004, Waldmann *et al.* 2006, Belkaid und Tarbell 2009, Nutsch und Hsieh 2012). Man findet sie im Thymus, in Lymphknoten, im Blut und in der Milz, wo sie etwa 5% bis 10% der $CD4^+$ T-Zellen ausmachen. Besonders angereichert sind sie im Knochenmark, wo es sich bei einem Viertel der dortigen $CD4^+$ Zellen um Treg handelt (Zou *et al.* 2004). Im Thymus kann nicht jede potenziell autoreaktive T-Zelle abgetötet werden. Daher werden alle übrigen T-Zellen, die gegen das eigene Gewebe reagieren können, durch Treg kontrolliert. Dies kann jedoch auch dazu führen, dass

Tumoren durch die Anlockung von Treg vor Angriffen durch das Immunsystem geschützt werden (Sakaguchi *et al.* 2001).

Treg umfassen mehrere Subgruppen mit unterschiedlichen Herkunftsorten und Eigenschaften (Duhon *et al.* 2012). Im Menschen wurde bislang kein Molekül gefunden, welches spezifisch für alle regulatorischen T-Zellen ist (Vignali *et al.* 2008). Daher werden zur Identifizierung von Treg das CD25 Molekül (Interleukin 2 Rezeptor α -Kette) und der Transkriptionsfaktor *Forkhead box Protein 3* (FOXP3) verwendet (Sakaguchi 2005). Diese Strukturen können jedoch auch kurzzeitig von aktivierten zytotoxischen und Helfer-T-Zellen exprimiert werden (J. Wang *et al.* 2007, Kmiecik *et al.* 2009). Das FoxP3 Gen ist für die Funktion von Treg unerlässlich. Ist es aufgrund einer Mutation funktionslos, so entwickelt der Mensch oder das Tier schwerwiegende Autoimmunerkrankungen (Bennett *et al.* 2001, Brunkow *et al.* 2001). Treg werden in die Haupttypen natürliche (nTreg) und induzierte (iTreg) unterteilt. Während nTreg aus dem Thymus stammen (siehe Kapitel 4.3.1.1), werden iTreg als Reaktion auf Signale aus der Mikroumgebung in der Peripherie gebildet. (Vignali *et al.* 2008).

Durch die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β hemmen Treg die Funktionen von T-Zellen, antigenpräsentierenden und NK Zellen (Abbildung 13). Da sie selbst aufgrund des Transkriptionsfaktors FOXP3 kein überlebenswichtiges IL-2 produzieren können, nehmen sie es aus der Umgebung auf und beeinträchtigen somit andere T-Zellen (de la Rosa *et al.* 2004). Zudem bilden sie vermehrt Enzyme, die den Energieträger Adenosintriphosphat in der Zellumgebung spalten. Das dadurch entstehende Abbauprodukt Adenosin hemmt ebenfalls die entzündungsfördernden Funktionen von Effektor-T-Zellen und APC (Mandapathil *et al.* 2010, Challier *et al.* 2013). Zudem können sie autologe APCs und T-Zellen durch die Ausschüttung von Granzymen und Perforin direkt abtöten (Grossman *et al.* 2004).

Auch Tumorzellen selbst können durch die Abgabe von Signalmolekülen wie IL-10 und TGF- β die Induktion von Treg herbeiführen und die Funktion von Anti-Tumor reaktiven T-Zellen einschränken (W. Chen *et al.* 2003, Domschke *et al.* 2009). Die Ansammlung von regulatorischen T-Zellen in Brusttumoren führt zu einem erhöhten Tumorgrad und Stadium, kürzeren Überlebenszeiten und einer größeren Wahrscheinlichkeit, dass die Krebserkrankung nach der Behandlung wiederkehrt (Bates *et al.* 2006). Deshalb wird in immuntherapeutischen Ansätzen versucht, Treg im Tumorpatienten zu vermindern (siehe Kapitel 4.3.3).

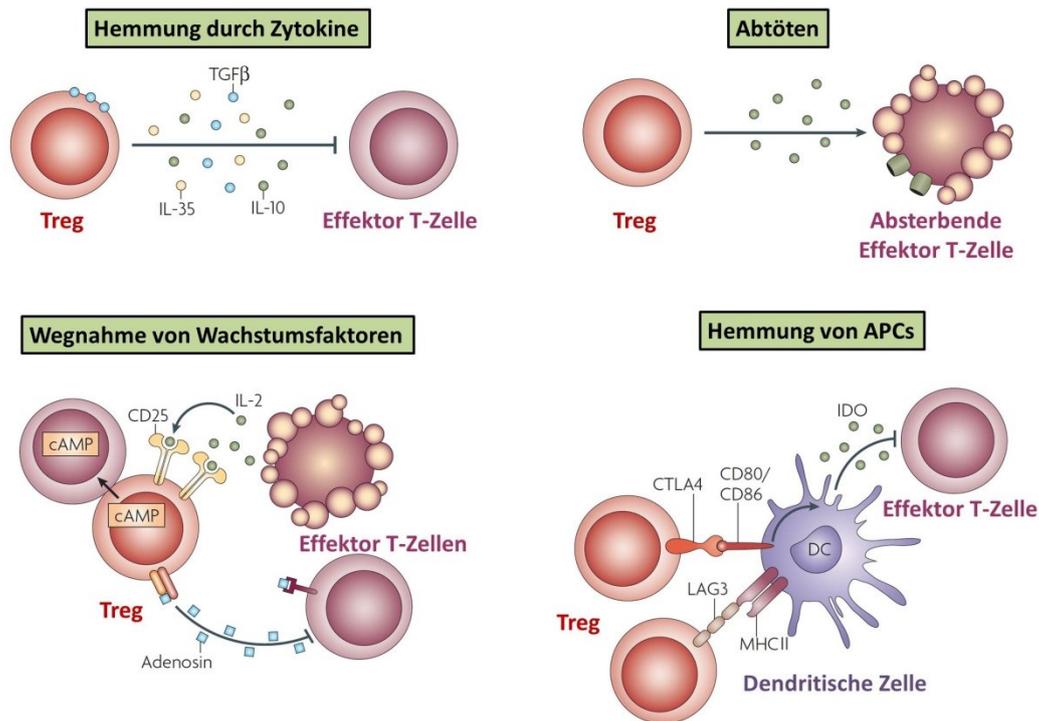


Abbildung 13: Immunsuppressive Mechanismen von regulatorischen T-Zellen. Adaptiert nach Vignali *et al.* (2008).

4.3.1.3 T-Zell Exhaustion

Wie chronische Infektionserkrankungen sind auch Tumoren langlebige Antigenquellen, die durch eine ständige Aktivierung von T-Zellen zu deren Erschöpfung führen können (Wherry 2011). Im Vergleich zu Lymphozyten aus dem Blut sind Tumor-infiltrierende T-Zellen in ihrer Funktionalität eingeschränkt (Benigni *et al.* 2005, Appay *et al.* 2006). Sie exprimieren vermehrt inhibitorische Rezeptoren wie *programmed cell death 1* (PD1), *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3* (TIM-3) und das Produkt des Lymphozyten-Aktivierungsgens 3 (LAG-3) (Wherry 2011). Eine Übersicht hierzu ist in Abbildung 14 skizziert. Derartige Veränderungen des T-Zell-Phänotyps durch Tumoren konnten bereits in Brustkrebspatienten im frühen Tumorstadium gezeigt werden (Poschke *et al.* 2012). Wenn LAG-3 anstatt von CD4 an MHC Klasse II Moleküle, PD1 an PD-L1 und TIM-3 an Galectin-9 binden, führt dies zu einer verminderten Aktivierung der T-Zelle (Hannier *et al.* 1998, Freeman *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2005). Ein Teil der malignen Brusttumoren können durch Expression dieser Liganden die Funktion von T-Zellen abschwächen (Whitwell *et al.* 1984, Irie *et al.* 2005, Muenst *et al.* 2014).

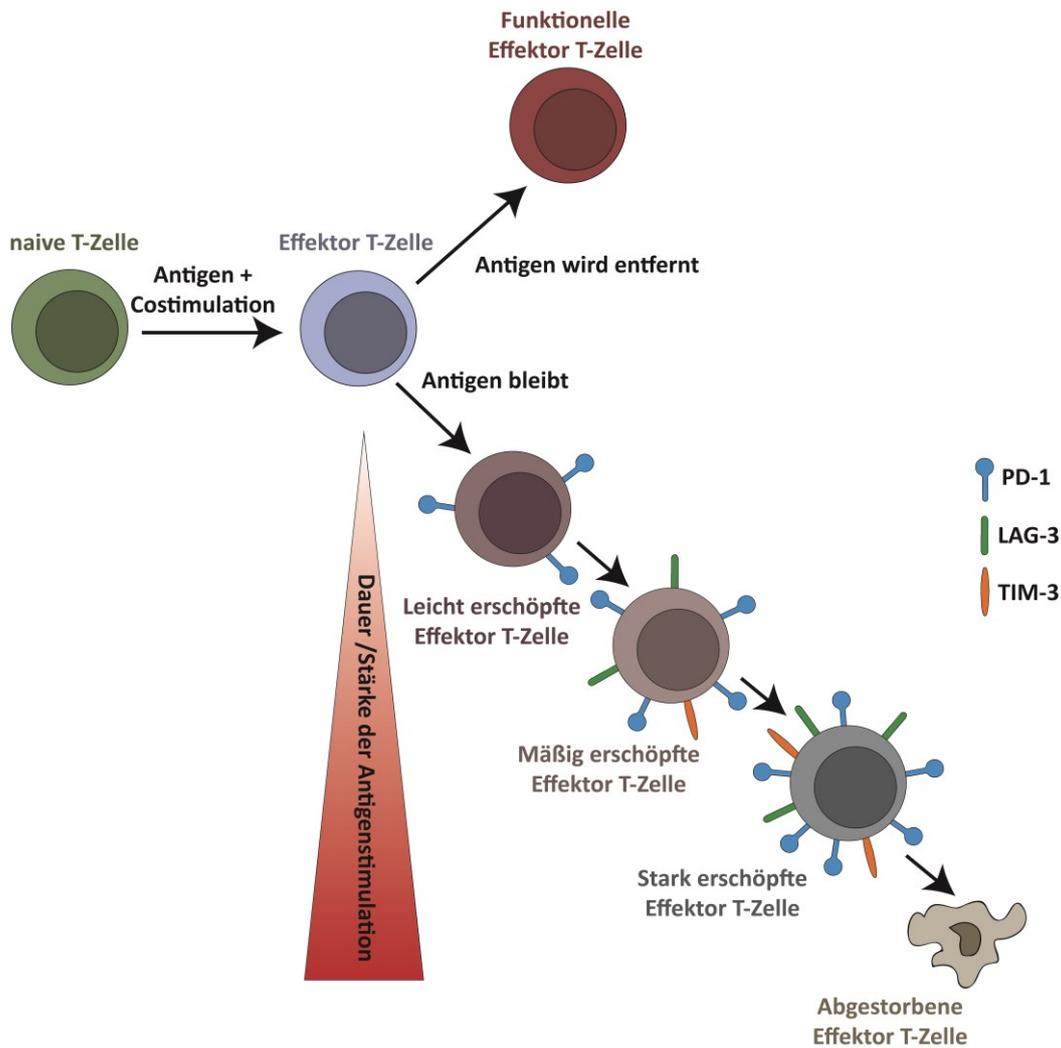


Abbildung 14: Die Erschöpfung von T-Zellen durch chronische Antigenstimulation. Nach Wherry (2011).

Bis zu einem gewissen Erschöpfungsgrad lassen sich die Funktionen durch den Einsatz blockierender Antikörper wiederherstellen (siehe Kapitel 4.3.3).

4.3.2 Tumor-assoziierte Antigene

Die Grundlage der Tumorimmuntherapie (Kapitel 4.3.3.) ist das Vorhandensein von Tumorantigenen auf Krebszellen, die Angriffspunkte für das adaptive Immunsystem darstellen. Diese können zur Induktion spontaner T-Zell Antworten führen oder als Bestandteil eines Impfstoffes Tumor-reaktive T-Lymphozyten induzieren (Coulie *et al.* 2014).

Im Idealfall unterscheiden sich die Krebsantigene von denen auf gesunden Zellen. In diesem Fall handelt es sich um Produkte mutierter und onkoviraler Gene, die Tumor-spezifische Antigene genannt werden. In der Regel jedoch ist der Großteil der Tumorantigene auch auf gesunden Zellen vorhan-

den, jedoch im Tumorgewebe stark überexprimiert. Man spricht dann von Tumor-assoziierten Antigenen (Criscitiello 2012).

In diesem Abschnitt sind das Vorkommen und die Funktionen der Tumorantigene zusammengefasst, welche für den experimentellen Teil der Dissertationsarbeit ausgewählt wurden. Kriterien für die Auswahl waren eine geringe Expression im gesunden Brustgewebe, eine deutliche Nachweisbarkeit in präinvasiven duktalem Läsionen und eine starke Überexpression im invasiven Mammakarzinom.

4.3.2.1 PCNA

Das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) ist ein Ringklemmenprotein, das die DNA-Doppelhelix umschließen kann. Dort interagiert es mit Proteinen, die den DNA Metabolismus, die Gentranskription und die epigenetische Modifikation kontrollieren. Daher wird das PCNA auch als Biomarker für Zellproliferation angewandt. Außerhalb des Zellkerns reguliert es die Apoptose, den Fettstoffwechsel und die Glykolyse (S. C. Wang 2014). Zudem kann es als Ligand für den aktivierenden Rezeptor NKp44 NK-Zellen inhibieren (Rosental *et al.* 2011).

Da die Zellproliferation eine Voraussetzung für das Fortschreiten einer Krebserkrankung ist, wird es in Tumoren überexprimiert, unter anderem in 100% der *in situ* und 94% der invasiven Brustkarzinome (Terry *et al.* 2006). Hierbei korreliert die verstärkte Synthese von PCNA mit der Überexpression von HER2 und EGFR, sowie einem schlechterem Überleben der Patienten (Shrestha *et al.* 1992). In Tierexperimenten mit Ratten konnte gezeigt werden, dass die Expression von PCNA in den Milchgängen während der induzierten Karzinogenese von der gutartigen Hyperplasie über das *in situ* Karzinom zum invasiven Mammakarzinom graduell bis zu 15-fach ansteigt (Al-Dhaheri *et al.* 2008). Zudem wurde herausgefunden, dass das Protein in Tumoren jungfräulicher Ratten signifikant stärker vorhanden ist als bei Rattenmüttern (Zhao *et al.* 2011).

Auch in den Milchdrüsen schwangerer, gesunder Mäuse wurde eine verstärkte Expression nachgewiesen, die während der Stillzeit wieder absinkt (Sigurdsson *et al.* 2013).

Als mögliche neue Zielstruktur für Tumor-Immuntherapien wurde das PCNA erstmals 2011 von Xu *et al.* beschrieben. In dieser Studie konnten HLA-A*0201 restringierte Epitope für zytotoxische T-Zellen identifiziert werden (W. Xu *et al.* 2011). Daraufhin hat die Arbeitsgruppe um Stefan Stevanović einen natürlichen HLA-A*01-Liganden des PCNA-Proteins von Krebszellen aus Lungenkrebspatienten isoliert (Neumann *et al.* 2013).

4.3.2.2 ID1

Der *inhibitor of differentiation 1* (ID1) gehört zu den Helix-Loop-Helix (HLH) Proteinen, welche das Wachstum, die Differenzierung, das Überleben und die Seneszenz von Zellen regulieren (De Candia *et al.* 2004). ID1 ist eines der vier verwandten ID Proteine, die an HLH-Transkriptionsfaktoren binden und so die Genexpression negativ regulieren (Benezra *et al.*).

Das Protein kann jedoch auch die Bildung, Invasivität und Blutgefäßneubildung von Tumoren begünstigen (Desprez *et al.* 1998, Lyden *et al.* 1999, Yokota und Mori 2002). Daher wird ID1 in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert, darunter in einem Fünftel der *in situ* und zwei Dritteln der infiltrierenden Mammakarzinome (Lin *et al.* 2000). Da ID1 überwiegend in aggressiven und schlecht differenzierten Tumoren vermehrt gebildet wird, haben Brustkrebspatienten mit ID1 überexprimierenden Tumoren eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (Schoppmann *et al.* 2003, H. Y. Yang *et al.* 2010).

Zudem erfüllt es eine Rolle bei der Entwicklung und Remodellierung der Brustdrüse, vor allem bei der Bildung und Vermehrung loboalveolärer Strukturen (Shin *et al.* 2011). Während der frühen Schwangerschaft konnte es im hohen Maße in murinen duktalem Epithelzellen und in humanen Placentae nachgewiesen werden (Meinhardt *et al.* 2005, Itahana *et al.* 2008).

Als T-Zell Antigen wurde ID1 bislang nicht beschrieben.

4.3.2.3 GLI1

Die *Glioma associated oncogene* (GLI) Proteine sind Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren im Hedgehog (Hh) Signalweg (Abbildung 15). Sie wurden nach ihrem Entdeckungsort in einem Hirntumor, dem Gliom, benannt (Kinzler *et al.* 1987). Der Signalweg reguliert die Strukturentstehung während der Embryogenese und Organogenese. Zudem reguliert er die Zellvermehrung. Beim Erwachsenen ist der Hh Signaltransduktionsweg überwiegend inaktiv. Seine Funktion beschränkt sich dann auf die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung von Geweben (Briscoe und Therond 2013).

Vereinfacht dargestellt läuft der Hedgehog Signalweg wie folgt ab: Wird kein Signalprotein von einer Nachbarzelle sezerniert, hemmt im Rezeptorkomplex der anderen Zelle die erste Untereinheit Patched (PTCH) die zweite Untereinheit Smoothed (SMO). Daraufhin bleiben die Zielgene inaktiv. Bindet jedoch ein Signalprotein wie *Sonic Hedgehog* (SHH) an PTCH, wird die Inhibition von SMO aufgehoben, Transkriptionsfaktoren wie GLI1 werden aktiviert und Zielgene angelesen. GLI1 ist der einzige der drei Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, der nicht als Repressor (rep) fungieren kann (Briscoe und Therond 2013).

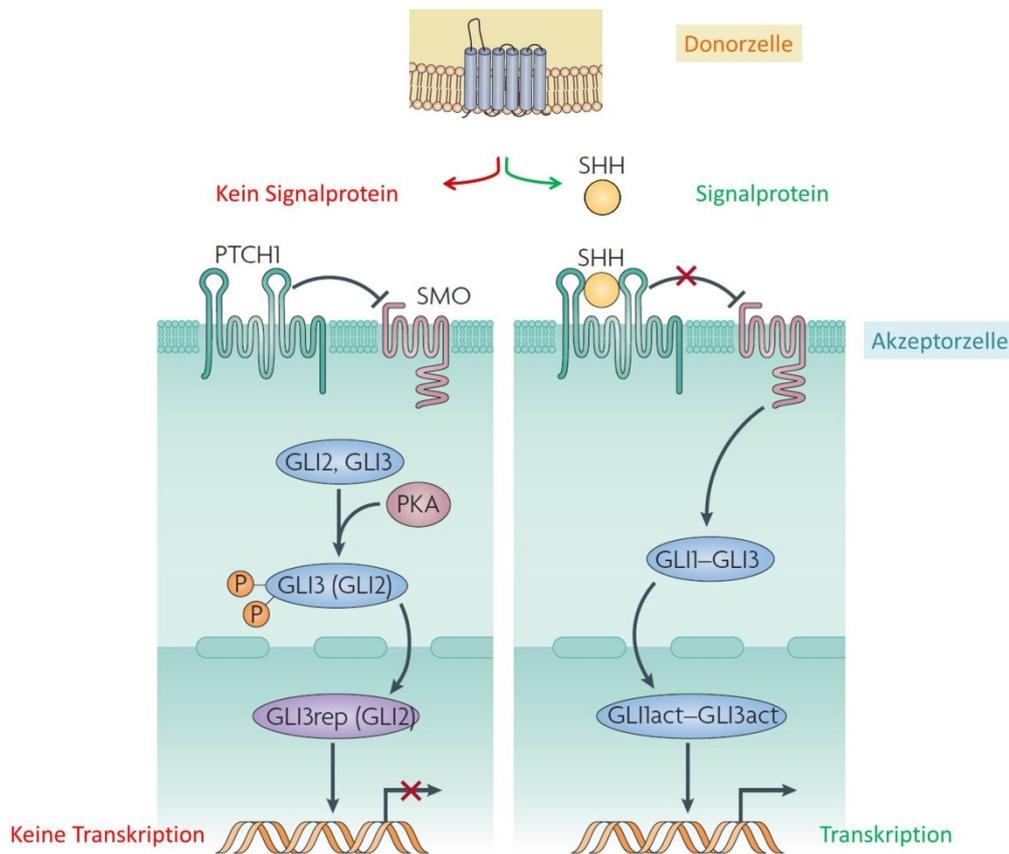


Abbildung 15: Vereinfachte Darstellung des Hedgehog Signalwegs. SHH: Sonic Hedgehog (Signalprotein), PTCH: Patched (Rezeptoruntereinheit 1), SMO: Smoothed (Rezeptoruntereinheit 2), GLI: *Glioma associated oncogene* (Transkriptionsfaktor), rep: Repressor, act: Aktivator, PKA: Proteinkinase A. Adaptiert nach Crompton *et al.* (2007).

Eine unangemessene Aktivierung des Hedgehog Signalwegs kann in vielen Geweben zur Onkogenese führen (Di Magliano und Hebrok 2003). Daraus resultieren 20% bis 25% aller Krebserkrankungen (Briscoe und Therond 2005). In transgenen Mäusen, die zielgerichtet in der Brustdrüse GLI1 überexprimieren, entstehen Tumore, die dem duktalem Karzinom *in situ* ähneln (Fiaschi *et al.* 2009). In Brusttumoren des Menschen konnte gezeigt werden, dass die Menge an GLI1 im Zellkern beim Fortschreiten des DCIS zum invasiven Karzinom seriell ansteigt. Dabei korreliert die GLI1 Expression mit der Invasivität des Mammakarzinoms und der Expression des Östrogenrezeptors- α (Souzaki *et al.* 2011).

Während der frühen Schwangerschaft der gesunden Ratte ist die Gli1 mRNA im Endometrium sechs Mal stärker exprimiert als in der Proöstrus Phase (Kubota *et al.* 2008). Vergleichbare Beobachtungen wurden in Experimenten mit Mäusen gemacht (Matsumoto *et al.* 2002).

Auch GLI1 wurde bisher nicht als T-Zell Antigen beschrieben.

4.3.2.4 Smoothened

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt eingeführt wurde, handelt es sich bei Smoothened (SMO) um ein Transmembran-Effektormolekül im Hedgehog Signalweg (Abbildung 15), der auch an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sein kann (Chang-Claude *et al.* 2003). In den ausgereiften Milchgängen des Menschen ist er normalerweise inaktiv (Moraes *et al.* 2007).

Führt man in transgenen Mäusen in nur 5% der Brustepithelzellen die Bildung von aktiviertem humanen SMO herbei, resultiert daraus eine verstärkte Proliferation und eine gestörte Differenzierung der Zellen, sowie die Entstehung duktaler Dysplasien. Mit Hilfe von Tumorproben aus Brustkrebspatienten konnte nachgewiesen werden, dass die Veränderung der Hedgehog Signalwege früh in der Brustkarzinogenese beginnt. Während im normalen Brustgewebe kein SMO nachweisbar ist, ist es in 70% der *in situ* und 30% der invasiven Brusttumoren exprimiert (Moraes *et al.* 2007).

Studien zur T-Zell-Antigenität von SMO liegen bislang nicht vor.

4.3.2.5 Mammaglobin-A

Mammaglobin-A (MAM) ist ein Glykoprotein aus der Familie der epithelialen Sekretoglobine. Es besitzt ein Signalpeptid, welches von der Zelle sezerniert werden kann. Seine Funktion ist bisher ungeklärt (Galvis-Jimenez *et al.* 2013).

Während die mRNA des Mam-A im gesunden Brustgewebe nur vereinzelt von einigen Epithelzellen gebildet wird, ist sie in 80% der dukталen Mammakarzinome, auch im DCIS, stark überexprimiert (M. A. Watson *et al.* 1999). Davon ist in etwa einem Viertel der Tumorproben die Menge an mRNA mehr als zehnfach gegenüber dem Normalgewebe erhöht (M. A. Watson und Fleming 1996). Die Expression ist nicht vom Tumorgrad oder dem histologischen Typ abhängig (M. A. Watson *et al.* 1999). Zudem wird das Protein im Endometrium, in Ovarien, im Zervix, in manchen Prostata-Gewebeproben und in Schweißdrüsen gebildet (Classen-Linke *et al.* 2012).

Die Expression von Mammaglobin-A wird durch das Hormon Progesteron gesteuert und ist somit auch bei der Zellvermehrung und der Differenzierung der Brustdrüse während der Schwangerschaft erhöht (M. A. Watson *et al.* 1998, Fleming und Watson 1999, Classen-Linke *et al.* 2012). Außerdem wird in der frühen Schwangerschaft, wenn sich der Embryo an die Gebärmutter Schleimhaut anheftet, die Mam-A Genexpression im Endometrium zwölfmal hochreguliert (Kao *et al.* 2002).

Mammaglobin-A-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnten in einigen Studien in Patienten mit Mammakarzinom nachgewiesen werden. *In vitro* generierte Zelllinien aus MAM-A-spezifischen zytotoxischen T-Zellen führten in diesen Studien ein signifikantes Abtöten von Brustkrebszellen herbei (Jaramillo *et al.* 2002, Jaramillo *et al.* 2004, Ilias Basha *et al.* 2011, Tiriveedhi *et al.* 2012, Soysal *et al.* 2014). Die Frequenz MAM-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war in der Studie von Jaramillo *et al.* (2002) in Patienten mit Brustkrebs signifikant höher als bei gesunden Individuen (Jaramillo *et al.* 2002). In unserer Arbeitsgruppe ist es zudem erstmalig gelungen MAM-spezifische CD4⁺ T-Zellen in gesunden Probanden und Patienten mit bösartigen Brusttumoren zu quantifizieren. Mittels Mammaglobin-A₃₄₋₄₈-markierter HLA Klasse II-Tetramere wurden in Patienten 0,2% der Treg und „konventionellen“ T-Zellen (Tcon) als Antigen-spezifisch detektiert. In der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden waren es jeweils nur 0,07%. (Schmidt *et al.* 2013).

4.3.2.6 Heparanase-1

Heparanase-1 (HPA-1) ist ein Enzym, das dem Abbau der Gewebekomponenten zwischen Zellen, der extrazellulären Matrix, dient. Genauer gesagt handelt es sich um Endo-β-Glucuronidase, die Heparansulfatseitenketten von Proteoglykanen abspaltet. Es wird von vielen Zelltypen gebildet, die in das umliegende Gewebe einwandern müssen, wie zum Beispiel Neutrophile, Makrophagen, Zytotrophoblasten (des Embryos), Keratinozyten (der Haut), Blutgefäßendothelzellen und Nervenzellen. Durch den Abbau der extrazellulären Matrix werden auch viele Wachstumsfaktoren freigesetzt, die normalerweise an Heparansulfate gebunden sind. Diese sind unter anderem für die Neubildung von Blutgefäßen nötig (Zcharia *et al.* 2001).

Östrogen kann die Synthese von Heparanase-1 regulieren. Während der Schwangerschaft stimuliert es die Neubildung von Blutgefäßen für den Embryo und ermöglicht die Zersetzung der die Milchgänge umgebenden Basalmembran, damit sich ein milchbildendes Drüsengewebe formen kann (Zcharia *et al.* 2004, Wirstlein *et al.* 2013). Wird das Enzym in Mäusen überexprimiert, so ist die Verzweigung und Differenzierung der Milchgänge in den Brustdrüsen stark beschleunigt (Zcharia *et al.* 2001).

Neben seiner Enzymaktivität kann HPA-1 auch als Zelladhäsionsmolekül fungieren. Diese Funktion ist beispielsweise in der frühen Schwangerschaft wichtig, wenn der Embryo sich an die Gebärmutter-schleimhaut anheftet. (D'Souza *et al.* 2007).

Die erleichterte Invasion in das umliegende Gewebe, die Blutgefäßneubildung und die erhöhte Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren mit Hilfe von Heparanase-1 machen sich auch Tumoren zu nutze.

Das Enzym wird von praktisch allen Krebsarten verstärkt gebildet. Die Stärke der Expression ist mit der Größe und Blutgefäßbildung des Tumors, dem Auftreten von Metastasen und dem Überleben des Patienten assoziiert (Vlodavsky *et al.* 2012). Unter den Brustkarzinomen ist das Protein in 44% der *in situ*, in 23% der invasiven nicht metastasierten und in 53% der invasiven Läsionen mit Wächterlymphknotenmetastasen nachweisbar. Alle getesteten Normalgewebe waren in dieser Studie negativ. Wahrscheinlich trägt Heparanase-1 zur Progression eines DCIS zum invasiven Karzinom bei. Zudem haben Patientinnen, deren Tumoren HPA-positiv sind, ein höheres Risiko ein Rezidiv zu erfahren (Maxhimer *et al.* 2002, Maxhimer *et al.* 2005).

4.3.2.7 MAGE-A3

Das Melanom-Antigen A3 (MAGE-A3) gehört zu den Krebs-Keimbahn Antigenen, die normalerweise nur von Keimzellen der Hoden und des fötalen Ovars, sowie in der Plazenta gebildet werden (Simpson *et al.* 2005, Jungbluth *et al.* 2007). Über seine Funktion ist bislang wenig bekannt.

Die Melanom-Antigene wurden in einem Patienten mit Melanom und ungewöhnlich gutem klinischen Verlauf entdeckt. Der Patient wies zytotoxische T-Zellen auf, die spezifisch für diese Tumoran-tigene waren (Knuth *et al.* 1989). Später wurde eine Vielzahl anderer Tumorentitäten beschrieben, in denen die Krebs-Hoden-Gene reaktiviert wurden. Dies ist im Falle des MAGE-A3 in 6% der Brustkarzi-nome der Fall. Dabei wird das Protein überwiegend in ER negativen Karzinomen synthetisiert (Grigoriadis *et al.* 2009). Unter den duktalem *in situ* Karzinomen exprimieren 13% dieses Antigen, wiederum vorwiegend die ER negativen. In präinvasiven Läsionen ist es nicht nachweisbar (Caballero *et al.* 2014). Die Expression von MAGE-A3 in Tumoren korreliert mit einer starken Proliferation, ei-nem geringen Differenzierungsgrad und einem hohen Stadium (Otte *et al.* 2001, Hussein *et al.* 2011, Ayyoub *et al.* 2014).

MAGE-A3-spezifische T-Zellen sind in geringer Frequenz in gesunden Spendern und Patienten mit Krebs nachweisbar, darunter auch das Mammakarzinom (Chaux *et al.* 1998, Dhodapkar *et al.* 2000, Inokuma *et al.* 2007).

4.3.2.8 MUC1

MUC1 ist ein in der Zellmembran verankertes Mucin. Der aus der Zelle herausragende Teil ist Be-standteil der Schleimhülle, welche unter anderem die Epithelzellen in der Lunge, der Brustdrüse und dem weiblichen Fortpflanzungstrakt schützt (Gendler und Spicer 1995, Brayman *et al.* 2004). Dage-gen interagiert der intrazelluläre Teil des Moleküls mit Transkriptionsfaktoren und reguliert auf diese Weise Gene, die an der Morphogenese, sowie am Energiestoffwechsel, der Vermehrung, Migration

und Invasion von Zellen beteiligt sind (Singh und Hollingsworth, X. Liu *et al.* 2014, Mehla und Singh 2014). Strukturell handelt es sich um ein Glykoprotein mit 20 AS langen Serin-Threonin-reichen Tandem-Wiederholungen in der Aminosäuresequenz des Proteingerüsts, die stark mit Zuckerseitenketten, den O-Glykanen, verknüpft werden können (Abbildung 16) (Hattrup und Gendler 2008).

MUC1 ist in fast allen duktalem *in situ* Karzinomen und in 90% der invasiven duktalem Mammakarzinome überexprimiert (Diaz *et al.* 2001, Croce *et al.* 2003, Chang *et al.* 2005, Do *et al.* 2013). 70% der Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs haben auch im Blut eine erhöhte Konzentration des Moleküls (Hayes *et al.* 1986). In vielen Adenokarzinomen wird es sowohl verstärkt gebildet, als auch abweichend glykosyliert, was unter anderem aus einer veränderten Expression von Glykosyltransferasen in Krebszellen resultiert (J. M. Burchell *et al.* 2001). Die hypoglykosylierten MUC1 Moleküle im Mammakarzinom (Abbildung 16) besitzen entsprechend andere Antigeneigenschaften und können zur Induktion Krebs-spezifischer IgG Antikörper führen (Sørensen *et al.* 2006). Etwa ein Drittel der Frauen mit Brustkrebs im Frühstadium besitzen solche Autoantikörper. Es hat sich gezeigt, dass auch genau diese Frauen eine bessere Prognose haben (von Mensdorff-Pouilly *et al.* 1996, Blixt *et al.* 2011). In Tumorzellen ist häufig die basal-apikale Ausrichtung des Moleküls verloren gegangen, was zu einer abweichenden Signalweiterleitung führen kann. Diese erleichtert das Überleben von Tumorzellen unter sauerstoff- und nährstoffarmen Bedingungen und führt zu einem schnelleren und invasiven Wachstum (Mehla und Singh 2014).

In der gesunden, ruhenden Brust exprimieren weniger als 10% der Alveoli und Dukti das Protein. Jedoch ist es in großer Menge während der Schwangerschaft und in allen luminalen Bereichen der laktierenden Brust nachweisbar, was auch eine Bildung von Autoantikörpern nach sich zieht (Arklie *et al.* 1981, J. Burchell *et al.* 1987, Finn *et al.* 1995, Croce *et al.* 2001, Schroeder *et al.* 2001, Adriaance und Gendler 2004). Da das Glykoprotein auch in der Lage ist Pathogene zu binden und vor einer Infektion des Neugeborenen zu schützen, wird es in die Brustmilch sezerniert (J. Burchell *et al.* 1984, Peterson *et al.* 1998). Man findet es zudem in großer Menge im Blut der werdenden Mutter (Kenemans *et al.* 1992, McGuckin *et al.* 1993, Bon *et al.* 2001).

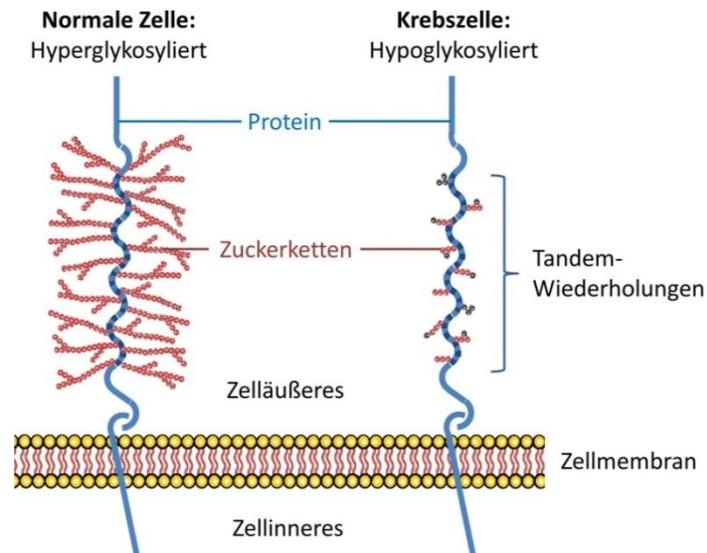


Abbildung 16: Glykosylierung des MUC1 in gesunden und Krebszellen. Adaptiert nach Roulois *et al.* (2013).

Eine präexistente T-Zell-Immunität gegen MUC1 konnte in gesunden Frauen und Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden (Agrawal *et al.* 1995, Agrawal *et al.* 1996, Snijdwint *et al.* 1999, Rentzsch *et al.* 2003, Guckel *et al.* 2006). Weitere Informationen hierzu finden sich im Kapitel 4.3.6.

4.3.2.9 CEA

Das *carcinoembryonic antigen* (CEA) ist ein Glykoprotein aus der Immunglobulin Superfamilie (Oikawa *et al.* 1987). Es ist mit Hilfe eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers mit der Zellmembran von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, des weiblichen Geschlechtstraktes, der Schweißdrüsen und der Prostata verknüpft (Hammarström 1999, Beauchemin und Arabzadeh 2013). Der Name ergibt sich aufgrund der starken Expression während der embryonalen Entwicklung und in Tumoren, jedoch handelt es sich wegen des verbreiteten Vorkommens in gesunden Geweben des Erwachsenen nicht um ein onkofetales Antigen (Hammarström 1999). CEA oder CEACAM5 ist ein Mitglied der *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAM), welche als interzelluläre Adhäsions-, und Signalmoleküle, sowie als Wirtsrezeptoren für pathogene Bakterien fungieren (Beauchemin und Arabzadeh 2013, Tchoupa *et al.* 2014). Durch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen kann es den Zelltod verhindern und die Gewebearchitektur stören, die Zytotoxizität von NK-Zellen beeinträchtigen, zur Toleranzinduktion in T-Zellen beitragen und spielt somit eine entscheidende Rolle beim Fortschreiten und der Metastasierung von Tumoren (Beauchemin und Arabzadeh 2013).

Im gesunden oder atypischen Brustgewebe ist CEA nicht nachweisbar, jedoch in nahezu der Hälfte der DCIS, sowie in 70% der invasiven duktaalen Mammakarzinome, vor allem in hochgradigen Tumoren (Bocker *et al.* 1985, De Potter *et al.* 1988). Als prognostischer Marker in Brusttumoren weist eine starke Expression auf eine erhöhte Tumorlast und eine geringe Überlebenszeit, sowie auf ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten des Tumors hin (J. S. Lee *et al.* 2013, Saadatmand *et al.* 2013).

Im Blut der (werdenden) Mutter steigt die CEA-Konzentration während der Schwangerschaft signifikant an (Ercan *et al.* 2012). Auch im Fruchtwasser ist eine erhöhte Menge nachweisbar (Sarandakou *et al.* 2007).

Die natürliche T-Zell Immunität gegen CEA wird als eher schwach beschrieben (Nagorsen *et al.* 2003, Rentzsch *et al.* 2003, Iero *et al.* 2007, Fauquembergue *et al.* 2010). Grund hierfür ist die Toleranzinduktion durch regulatorische T-Zellen und das Unvermögen CEA-spezifischer T-Zellen auf das Antigen zu reagieren, welches man auch als immunologische Ignoranz bezeichnet (Aubry *et al.* 1990, Pickford *et al.* 2007). Diese Toleranz kann allerdings gefahrlos mit Hilfe von therapeutischen Vakzinen gebrochen werden (Gameiro *et al.* 2013).

4.3.2.10 HER2

Der *human epidermal growth factor receptor*, HER2 oder ERBB2, gehört zu der ERBB Familie, die vier Transmembranrezeptoren für Wachstumsfaktoren mit intrazellulärer Tyrosinkinasedomäne umfasst (Lupu *et al.* 1995). Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern ist für HER2 kein Wachstumsfaktorligand bekannt. Eine Aktivierung findet erst nach der Zusammenlagerung mit einem anderen ERBB Rezeptor statt (Baselga und Swain 2009). Dieses geschieht bevorzugt mit ERBB3 (HER3, Abbildung 17), nachdem dieser an den Wachstumsfaktor Heregulin gebunden hat (Hynes und Lane 2005). Daraus resultiert eine Verstärkung der Zellteilung und des Überlebens der Zelle (Yarden und Slwkowski 2001). In der Brustdrüse sind diese Signale vor allem beim Wachstum und der Verzweigung der Dukti notwendig (Hynes und Watson 2010).

Bereits früh in der Brustkarzinogenese kann das Her2 Gen amplifiziert werden, eine aktivierende Mutation erwerben, oder das Protein wird überexprimiert (E. Liu *et al.* 1992). Während in gutartigen Läsionen der Brust keines dieser Ereignisse stattfindet, sind 26% bis 63% der *in situ* Karzinome und nur 10% bis 36% der invasiven Tumoren davon betroffen (Gusterson *et al.* 1988, E. Liu *et al.* 1992, Shrestha *et al.* 1992, Etorh *et al.* 1999, Suo *et al.* 2001, Lebeau *et al.* 2003, Roses *et al.* 2009, Stackievicz *et al.* 2010, Siziopikou *et al.* 2013, Vermeulen *et al.* 2013, Van Bockstal *et al.* 2014). Vor allem hochgradige Läsionen bilden verstärkt HER2, sie invadieren dann meist stärker, metastasieren

häufiger und werden öfter resistent gegen Chemotherapeutika (Pegram *et al.* 1997, Hynes und Watson 2010).

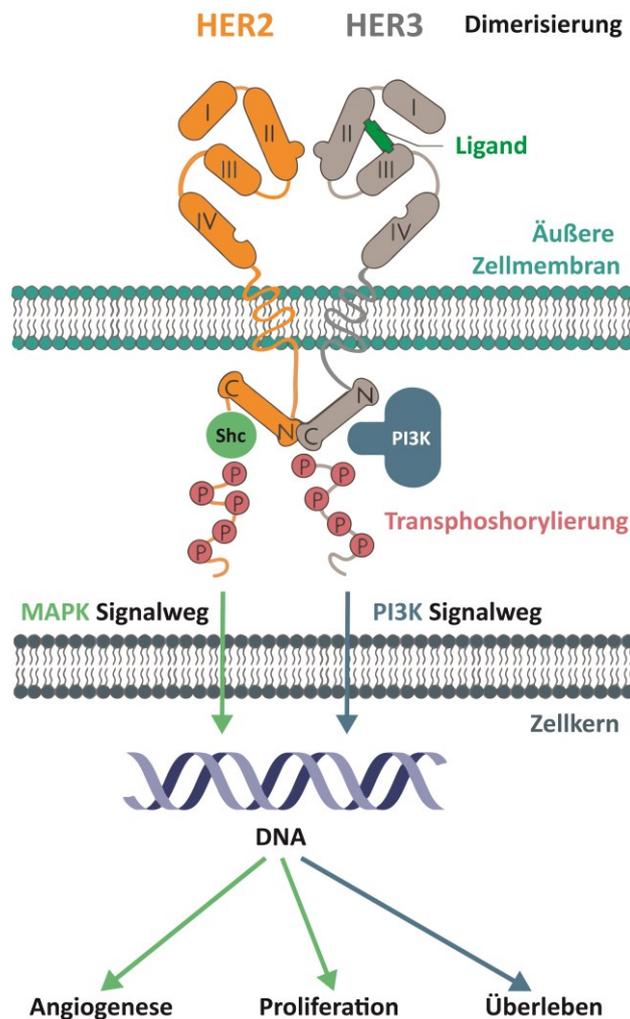


Abbildung 17: Interaktion von HER2 und HER3 in Tumorzellen. Shc: *Src homology 2 domain containing*, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase. Adaptiert nach Baselga und Swain (2009).

Eine Rolle von HER2 während der Schwangerschaft konnte in den Brustdrüsen von Mäusen gezeigt werden, da das Protein dann verstärkt gebildet wird und in seiner aktivierten Form vorherrscht (Schroeder und Lee 1998). In Tierexperimenten, bei denen in Ratten chemisch Brusttumoren erzeugt wurden, fiel auf, dass Tumoren von Nullipara wesentlich häufiger HER2 überexprimierten als die von Rattenmüttern (Zhao *et al.* 2011).

HER2-Peptide, die auf der Oberfläche von Brustkrebszellen mittels HLA-DR präsentiert werden, werden von $CD4^+$ T-Zellen erkannt (Perez *et al.* 2002). Zytotoxische T-Lymphozyten, die gegen den Re-

zeptor gerichtet sind, wurden sowohl in Brustkrebspatientinnen mit HER2-positiven als auch in solchen mit negativen Tumoren nachgewiesen (Disis *et al.* 2000, Rentzsch *et al.* 2003, Muraro *et al.* 2011).

4.3.2.11 EGFR

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gehört wie HER2 zu der ERBB Familie. Bindet ein Ligand wie EGF (*epidermal growth factor*) an den EGFR (auch ERBB oder HER1 genannt), wird die Zelle zur Zellteilung angeregt (Ullrich *et al.* 1984). Wie bereits für HER2 beschrieben wurde, reguliert auch der EGF-Rezeptor die Entwicklung und Funktion der Brustdrüse (Troyer und Lee 2001, Stern 2003). In Mausexperimenten konnten große Mengen aktivierten EGFRs während der Schwangerschaft und Laktation nachgewiesen werden (Schroeder und Lee 1998, Stern 2003) und es ist auch in der milchproduzierenden Brust des Menschen vorhanden (Shrestha *et al.* 1992). Im Gegensatz zur gesunden Brust, in der Wachstumsfaktoren an einer Stelle gebildet werden, und an anderer Stelle mit ERBB Rezeptoren interagieren, können Krebszellen beide Komponenten produzieren und sich somit selbst aktivieren (Sporn und Todaro 1980).

Unter den *in situ* Karzinomen exprimieren 16% bis 48% den EGF-Rezeptor (Suo *et al.* 2001, Vermeulen *et al.* 2013). Im invasiven Mammakarzinom sind es 10% bis 44%, wobei dazu überwiegend basale Karzinome zählen (Shrestha *et al.* 1992, Magkou *et al.* 2008, Thike *et al.* 2009, Nozoe *et al.* 2011, Shao *et al.* 2011, Stebbing *et al.* 2011). In Brusttumoren korreliert die EGFR-Expression mit einer vermehrten Blutgefäßneubildung, einer verstärkten Invasivität, einem höheren Tumorgrad, sowie mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten (Magkou *et al.* 2008).

Spontane T-Zell-Antworten, die gegen EGFR gerichtet sind, wurden in Patienten mit Kopf- und Nackentumoren oder Blasenkrebs nachgewiesen (Andrade Filho *et al.* 2010, Beckhove *et al.* 2010, Schuler *et al.* 2011, Horn *et al.* 2013, Kumai *et al.* 2013). Für ihr Vorkommen in Brustkrebspatienten liegen bislang noch keine Publikationen vor.

Neben seiner Funktion im Brustgewebe ist der EGF-Rezeptor auch für die Funktion der Gebärmutter-schleimhaut in der frühen Schwangerschaft notwendig (Large *et al.* 2014).

4.3.3 Immuntherapie des Mammakarzinoms

Da sich Tumoren vermutlich erst dann ausbreiten, wenn immunogene Zellen bereits abgetötet wurden und immunsuppressive Mechanismen greifen, zielen Immuntherapien darauf ab, die Anti-Tumor Immunität des Patienten zu verstärken bzw. wiederherzustellen (Dunn *et al.* 2004, Schreiber *et al.*

2011). Man unterscheidet dabei passive von aktiven Vorgehensweisen. Passive Immuntherapien umfassen die Verabreichung von Tumor-reaktiven T-Zellen (Abbildung 18), NK-Zellen, Antikörpern oder Zytokinen, während bei den aktiven Strategien die Aktivierung der Immunität im Körper durch Impfstoffe in Form von mit Tumorantigen beladenen Viren, DNA, RNA, Peptiden, Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen oder inaktivierten Tumorzellen erfolgt.

Da die immunologische Toleranz des Tumors der Hauptgrund dafür ist, dass Tumoren nicht vom eigenen Immunsystem zerstört werden, sollen Immuntherapien dieser entgegenwirken. Folglich ist als Nebenwirkung mit Autoimmunreaktionen zu rechnen. Somit ist das Finden der richtigen Balance zwischen Immunität und Autoimmunität eine der größten Herausforderungen, die den Erfolg von Tumorimmuntherapien bestimmen.

Monoklonale Antikörper als Immuntherapeutika sind hochspezifisch und haben zum Teil gute klinische Ergebnisse erzielt, jedoch sind sie teuer und dringen nicht immer effizient in das Tumorgewebe ein (Chames *et al.* 2009). Für das Mammakarzinom hat sich der humanisierte Anti-HER2 Antikörper Trastuzumab für den klinischen Gebrauch als wirksam erwiesen. Nach dem Binden des Antikörpers an den Wachstumsrezeptor aktiviert er Makrophagen, natürliche Killerzellen und andere Immunzellen, die die Krebszellen anschließend abtöten (Bianchini und Gianni 2014). Neben diesen Effekten auf die Immunzellen der angeborenen Immunität, tragen auch T-Zellen und eine Antikörperproduktion durch B-Zellen zur Wirksamkeit von Trastuzumab bei (Park *et al.* 2010). Zusätzlich wird die Signalweiterleitung und somit die Vermehrung der Krebszellen durch das Binden des Antikörpers gestoppt, was schließlich zu einem verlängerten Überleben führt (Le *et al.* 2003, I. Smith *et al.* 2007). Ein weiterer monoklonaler Antikörper, Pertuzumab, verhindert die Dimerisierung von HER2 und wird derzeit in einer klinischen Phase II Studie in Kombination mit Trastuzumab getestet (Miller *et al.* 2014). In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die Effekte von Trastuzumab auch in Kombination mit Antikörpern gegen die inhibitorischen Rezeptoren PD1 und CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen verstärkt werden können (Persson *et al.* 2011, Stagg *et al.* 2011). Da eine Vielzahl HER2-„negativer“ Brustkarzinome das Onkogen in geringer Menge exprimieren und dessen Peptide auf HLA Klasse I präsentiert werden, eignen sich sogenannte T-Zell Rezeptor *Mimetics* für die Immuntherapie dieser Tumoren (Neethling *et al.* 2008). Der Antikörper RL1B bindet einen HER2-Peptid-MHC-Komplex und hat sich bislang in Tierexperimenten und *in vitro* als Tumorzell-abtötend erwiesen (Jain *et al.* 2013). Neben PD1 und CTLA-4 ist LAG-3 (siehe Kapitel 4.3.1.3) ein weiterer Angriffspunkt, um die T-Zell-Reaktivität gegen Tumoren zu verstärken (D. B. Page *et al.* 2014). Bindet das Protein an MHC Klasse II Moleküle, werden die Funktionen der T-Zelle herabgesetzt. Der Inhibitor IMP321 verhindert dies und wird gegenwärtig in klinischen Studien erprobt (Brignone *et al.* 2007, Brignone *et al.* 2010). Regulator-

rische T-Zellen können mit einem Antikörper gegen CD25 vermindert werden. In Mäusen führt dieser Ansatz zu einer verstärkten Abtötung von Brusttumoren durch T-Zellen (P. D. Bos *et al.* 2013), während er in Patienten bereits zu einem verbesserten Erfolg von Immuntherapien beiträgt (Rech *et al.* 2012).

Therapeutische Impfstoffe gegen Krebserkrankungen zielen die Bildung eines langanhaltenden immunologischen Gedächtnisses ab und sollen auf diese Weise auch das Wiederauftreten von Tumoren verhindern. Ihre Vorteile liegen in der geringen Toxizität und den niedrigen Behandlungskosten, jedoch können eine geringe Immunogenität, sowie Toleranz- und *immune escape* Mechanismen deren Wirksamkeit herabsetzen (Igney und Krammer 2002, Criscitiello und Curigliano 2013). Die neoadjuvante Anwendung von DZ-basierten Peptidvakzinen für Patienten mit HER2 positivem DCIS wird gerade klinisch getestet. Sie führt zu T-Zell-Antworten in 80% der Patienten mit gesteigerter Infiltration von CTL in den Tumor, einem Verlust der Expression in der Hälfte der Tumoren und einer kompletten Eradikation der Geschwulste in fast 20% der Fälle (Koski *et al.* 2012, Sharma *et al.* 2012). Ein adjuvanter Impfstoff gegen HER2 hat in einer klinischen Studie bei Patienten mit invasivem Mammakarzinom und einem hohen Risiko des Wiederauftretens letzteres komplett verhindern können (Mittendorf *et al.* 2012). In einer klinischen Studie der Phase III hat die Anwendung einer MUC1-Peptidvakzine ein Wiederauftreten von Brustkrebs signifikant senken können (Vassilaros *et al.* 2013). Ein präventiver MUC1 Impfstoff konnte Immunantworten in 43% von Patienten auslösen, denen in der Vergangenheit prämaligne Läsionen des Kolons entfernt wurden. Der Effekt hinsichtlich des Auftretens neuer Kolonadenome wird derzeit untersucht (Kimura *et al.* 2013). Impfstudien mit den Antigenen MAGE-A3 führten in manchen Melanompatienten zu einem Rückgang des Tumors und verliefen ohne starke Nebenwirkungen (van Baren *et al.* 2005).

Der adoptive Transfer von Tumor-spezifischen Lymphozyten hat in Einzelfällen zu einer langjährigen Beseitigung metastasierter Krebserkrankungen geführt (Restifo *et al.* 2012). Sind vom Patienten keine Tumor-reaktiven TIL isolierbar, können gentechnisch veränderte T-Zellen verwendet werden (Abbildung 18). Doch diese sehr wirksamen Therapien bergen zum Teil auch lebensbedrohliche Nebenwirkungen. In einer klinischen Studie mit T-Zellen, welche man mit einem MAGE-A3 spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert hatte, kam es durch eine Kreuzreaktion mit MAGE-A12 positiven Zellen im Gehirn zum Tode von zwei Patienten (Morgan *et al.* 2013). In einer anderen Studie starben zwei Krebspatienten aufgrund einer Kreuzreaktion des gentechnisch veränderten TCR des Muskelproteins Titin im Herzen (Cameron *et al.* 2013). Menschen mit spontanen Anti-MAGEA3 Immunantworten zeigen jedoch keine Anzeichen immunpathologischer Symptome (Ayyoub *et al.* 2014). Des Weiteren tragen in einer klinischen Studie, in der Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom gen-

technisch veränderte T-Zellen gegen CEA verabreicht wurden, lebensbedrohliche Nebenwirkungen durch die Zerstörung gesunder Darmepithelzellen auf (Harao *et al.* 2015). Ein adoptiver Transfer Mammaglobin-A-spezifischer T-Zellen in Kombination mit einer Niedrigdosis-Bestrahlung führte hingegen in Tierexperimenten mit Mäusen zur andauernden Rückbildung von bereits vorhandenen Brusttumoren und es kam zu keinen Rezidiven (Lerret *et al.* 2012).

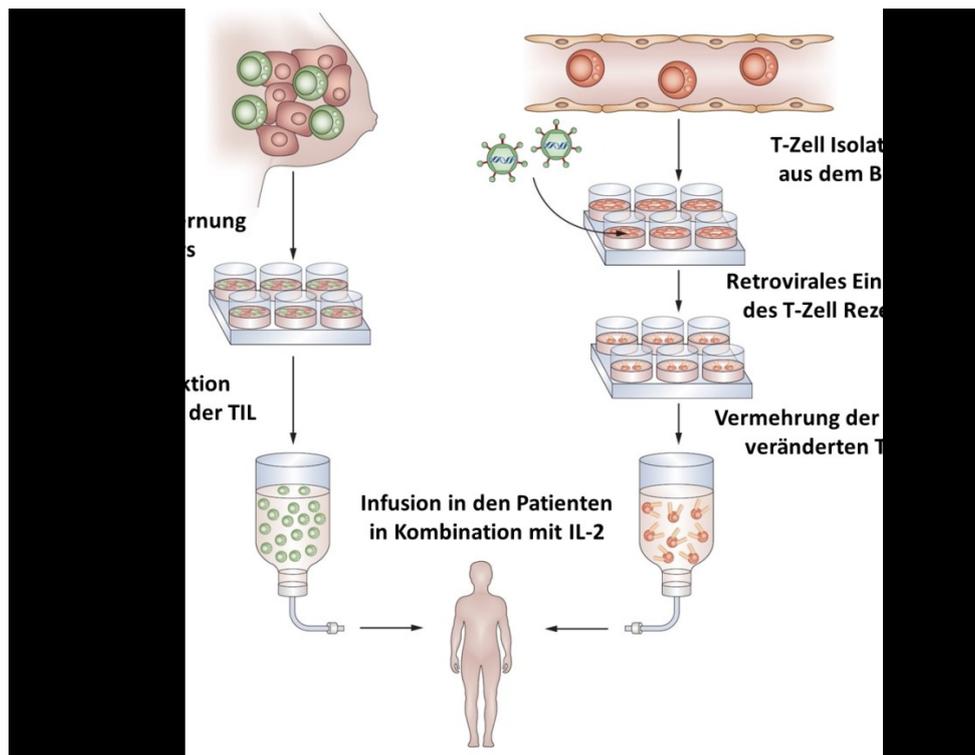


Abbildung 18: Zwei mögliche T-Zell-Quellen für den adoptiven Transfer. Links: Autologe TIL; Rechts: Gentechnisch veränderte T-Zellen. Adaptiert nach S. A. Rosenberg (2011).

Immuntherapeutika können synergistische Wirkungen in Kombination mit anderen Immuntherapeutika oder mit Standard-Therapien haben (D. B. Page *et al.* 2014). Durch abgetötete Tumorzellen im Rahmen von Chemotherapie und Bestrahlung kann eine Immunaktivierung eingeleitet werden (Golden *et al.* 2014). Daneben kann sich auch eine thermische Zerstörung, die Kryoablation, positiv auf die Anti-Tumorimmunität auswirken (Waitz *et al.* 2012). Ein immunstimulatorischer Nebeneffekt des Chemotherapeutikums Cyclophosphamid ist die Verringerung der Anzahl und immununterdrückenden Fähigkeiten von $CD4^+$ $CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, wenn man es in geringen Dosen einsetzt (Ge *et al.* 2012).

4.3.4 Das Immunsystem während der Schwangerschaft und Stillzeit

Die Schwangerschaft ist eine Herausforderung für die Immunabwehr der werdenden Mutter und bedarf einer strengen Regulation. Zum einen muss die Abstoßung des Embryos, der körperfremde (Allo-) Antigene trägt, verhindert werden. Andererseits dürfen Immunreaktionen gegen körperfremde Krankheitserreger nicht beeinträchtigt werden. Nach der Schwangerschaft übernimmt die Brustdrüse die Aufgabe das Neugeborene mit Antikörpern zu versorgen und sich dabei selbst vor Infektionen zu schützen.

4.3.4.1 Feto-maternale Toleranz

Die Toleranz gegenüber den Alloantigenen des (potenziellen) Vaters beginnt bereits vor der Schwangerschaft. Die Samenflüssigkeit enthält immunsuppressive Signalmoleküle wie TGF- β und Prostaglandin E, die eine lokale Induktion von Vaterantigenspezifischen regulatorischen T-Zellen, deren Einwanderung in den Uterus und ihre dortige Vermehrung auslösen (Moldenhauer *et al.* 2009, Guerin *et al.* 2011, Robertson *et al.* 2013). Des Weiteren bewirkt sie eine Anlockung von Dendritischen Zellen und deren Differenzierung zu einem tolerogenen Subtyp (Berlier *et al.* 2006, Remes Lenicov *et al.* 2012). Auf diese Weise bereitet sich schon im Anschluss an die Kopulation das Immunsystem auf die Toleranz eines Embryos vor, bei dem es sich im immunologischen Sinne um ein Semi-Allotransplantat handelt, das also zur Hälfte „fremd“ ist.

Bis kurz vor dem Eisprung wandern Treg aus dem peripheren Blut in den Uterus ein und sammeln sich dort an (Arruvito *et al.* 2007, Tilburgs *et al.* 2008). Mit Hilfe von Mausexperimenten wurde gezeigt, dass diese nicht nur Fremdantigen-, sondern auch Selbstantigenspezifisch sind und sich nicht nur in der Gebärmutter, sondern auch in den drainierenden Lymphknoten ansammeln. Sobald sich der Embryo eingenistet hat, werden sie aktiviert (T. Chen *et al.* 2013). Auch der Trophoblast trägt zu einer zusätzlichen Induktion von Treg bei, indem er große Mengen TGF- β und PD-L1 sezerniert (Martinez *et al.* 2013, W. J. Wang *et al.* 2013). Des Weiteren nimmt die Anzahl Vaterantigenspezifischer Effektor-T-Zellen während der Schwangerschaft ab, während die übrigen selektiv von regulatorischen T-Zellen unterdrückt werden (Tafari *et al.* 1995). Welche Antigene die zytotoxischen T-Zellen und Treg in der Dezidua, der Gebärmutter Schleimhaut der schwangeren Frau, erkennen, ist bislang größtenteils unerforscht (Tilburgs und Strominger 2013, Klatzmann 2014).

Die Notwendigkeit der Treg als Beschützer des Embryos wird deutlich, wenn man diese im Tierversuch mit trächtigen Mäusen *in vivo* entfernt: Die Folgen sind eine Infiltration des Uterus mit allospezifischen Effektor-T-Zellen und ein Schwangerschaftsabbruch (Darasse-Jèze *et al.* 2006). In der Gebä-

mutter von Patientinnen mit regelmäßigen spontanen Aborten konnte man gegenüber Frauen mit erfolgreichen Schwangerschaften eine reduzierte Menge von Treg mit verminderter suppressiver Leistung nachweisen (Jasper *et al.* 2006). Nach dem Wurf ist im Mäuseweibchen die Anzahl an induzierten Treg, die spezifisch für die fötalen Antigene sind, am größten. Sie verbleiben noch lange Zeit in größerer Menge und vermehren sich nochmals bei einer späteren zweiten Schwangerschaft. Bei der ersten Schwangerschaft hingegen werden sowohl präexistente Treg vermehrt, als auch neue induziert (Rowe *et al.* 2012).

Unter den Immunzellen der Dezidua befinden sich neben 20% T-Zellen, die mindestens zur Hälfte Treg und ansonsten überwiegend aktivierte Effektor-CD8⁺ T-Zellen sind, 70% natürlichen Killerzellen, sowie einige Makrophagen und Dendritischen Zellen (Bulmer *et al.* 1991, Holtan und Creedon 2011). Diese erfüllen dort aber eine andere Funktion als in anderen Körperregionen, denn sie tragen unter anderem zur Blutgefäßbildung zwischen Mutter und Embryo bei (Robson *et al.* 2012, Tilburgs und Strominger 2013, Klatzmann 2014).

Die entzündungsfördernden Funktionen antigenpräsentierender und T-Zellen werden auch durch das Freisetzen von zahlreichen Substanzen durch die Trophoblasten gehemmt. Darunter sind *pregnancy-specific glycoproteins* (PSG), Komplement-Inhibitoren, Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), B7-H3, und Hormone wie das humane Choriongonadotropin (Kamimura *et al.* 1991, Munn *et al.* 1998, C. Xu *et al.* 2000, Petroff *et al.* 2005, Martinez *et al.* 2013, Enninga *et al.* 2014). Außerdem fehlen auf den Oberflächen der Trophoblasten die klassischen MHC-Moleküle (HLA-A, -B, -DP, -DQ, -DR), die Abstoßungsreaktionen durch zytotoxische T-Zellen auslösen können. Stattdessen exprimieren sie HLA-C, welches eine NK-Zell-Toleranz induziert, HLA-E, das die Zytotoxizität von NK und T-Zellen mindert, und HLA-G, welches die zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen und T-Zellen unterdrückt und Treg induzieren kann (LeMaout *et al.* 2004, Riley 2008, Juch *et al.* 2012).

Allerdings findet nicht die gesamte Schwangerschaft in einem durchgehend anti-inflammatorischen Umfeld statt. Zum Zeitpunkt der Embryoimplantation und zur Vorbereitung auf die Geburt tragen auch Entzündungsprozesse zu einer erfolgreichen Schwangerschaft bei (Mor 2008).

4.3.4.2 Immunzellen in der Brust

Welche Veränderungen eine Schwangerschaft in der Immunzellinfiltration in der menschlichen Brustdrüse auslöst, ist bislang kaum erforscht worden. In einer Studie von 1985 wird beschrieben, dass von allen Zellen der „ruhenden“ (ohne Angaben zur Parität), sowie der Brust während der Schwangerschaft und Laktation rund 10% intraepitheliale Immunzellen sind, darunter überwiegend

Lymphozyten und wenige Makrophagen (Ferguson 1985). Aus Untersuchungen der Brustdrüse trächtiger Ratten geht hervor, dass sich bereits in der frühen Schwangerschaft Makrophagen im Stroma ansammeln, welches an das Epithelgewebe angrenzt (Kumar *et al.* 1988). Vom Beginn der Schwangerschaft bis zum Einsetzen der Milchbildung erhöht sich der Anteil der murinen intraepithelialen Immunzellen von 3,5% auf 8,7% (Seelig 1980). In der laktierenden Brustdrüse der Ratte wurden zudem Dendritische Zellen nachgewiesen (Joshi *et al.* 1985).

Wie die lymphatischen Gewebe des Darms und der Lunge gehören auch die der laktierenden Brustdrüse zum Mukosa-assoziierten Immunsystem (Brandtzaeg 2010). Plasma-B-Zellen, die sich an den Basalmembranen anlagern, sezernieren IgA Antikörper, die durch die Epithelien der Brust wandern und so in die Milch gelangen. Auf diese Weise wird der Darm des Neugeborenen vor einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen geschützt. Andere Immunzellen, die in die weibliche Brust einwandern, werden in die Milch abgesondert (Goldman und Goldblum 1997). Neutrophile Granulozyten schützen die Brust zusätzlich vor eindringenden Mikroorganismen (D. L. Watson 1980). Innerhalb der ersten Woche nach der Geburt befinden sich in der Brustmilch des Menschen eine bis drei Millionen Immunzellen pro Milliliter (C. W. Smith und Goldman 1968). Sie bestehen aus 80% neutrophilen Granulozyten, 15% Makrophagen, und 4% Lymphozyten, die wiederum zu rund 83% T-Zellen sind. Die T-Lymphozyten sind überwiegend vom Effektor-Gedächtnis Phänotyp und der Anteil CD8⁺ Zellen ist größer als im Blut. (Bertotto *et al.* 1990, Wirt *et al.* 1992, Keeney *et al.* 1993, Sabbaj *et al.* 2005). Die Makrophagen in der Milch sind in der Lage Antigene zu prozessieren und den T-Zellen zu präsentieren. *In vitro* restimulierte T-Zellen aus Brustmilch reagieren gegen zahlreiche Antigene wie pathogene Bakterien und Viren (Oksenberg *et al.* 1985, Sabbaj *et al.* 2002).

Nach dem Abstillen werden die abgestorben Epithelzellen der Brustdrüse von einer großen Menge einwandernder Makrophagen aufgenommen (siehe Kapitel 4.2.1). Dabei handelt es sich um einen Prozess, der einer Wundheilungsreaktion gleichkommt und unter Umständen auch das Wachstum bereits vorhandener Tumoren fördern kann (O'Brien *et al.* 2010). Ebenso wandern nach der Schwangerschaft regulatorische T-Zellen in das Brustgewebe der Mutter ein. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen in dieser Phase um das Achtfache zunimmt (Martinson *et al.* 2014).

4.3.5 Gemeinsamkeiten von Schwangerschaft und Krebs

Wie der Embryo, so sind auch Tumore zum einen Teil körpereigen und zum anderen, wegen der Expression Tumor-spezifischer Antigene, körperfremd. Damit sie im Körper überleben können, nutzen sie gemeinsame Prozesse wie schnelles Wachstum, Invasion in das umliegende Gewebe, Blutge-

fäßneubildung und die Induktion einer immunologischen Toleranz (Holtan *et al.* 2009). Brusttumoren entgehen der Zerstörung des Immunsystems, ebenso wie die Trophoblasten, durch die Expression von HLA-G, PD-L1, IDO, PSG und Komplement-Inhibitoren, den Verlust klassischer HLA Klasse I Moleküle, sowie die Induktion regulatorischer T-Zellen (Fagnart *et al.* 1985, Moller *et al.* 1989, Thorsteinsson *et al.* 1998, Kaneko *et al.* 2011, Dong *et al.* 2012, Lal *et al.* 2013, Isla Larrain *et al.* 2014, Muenst *et al.* 2014). Des Weiteren exprimieren sowohl die Epithelzellen der Brust von schwangeren und laktierenden Frauen, als auch ein Teil der Brustkrebsgewebe HLA-DR, welches der Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen in der Brust dienen kann (Bartek *et al.* 1987, Dadmarz *et al.* 1995, Oldford *et al.* 2006). Außerdem können Zellen des fötalen Trophoblasten, wie auch vereinzelte Tumorzellen, in das Blut der Mutter bzw. des Patienten übergehen (Mueller *et al.* 1990, Pukazhendhi und Gluck 2014). Diese sind noch mehrere Jahrzehnte nach der Geburt bzw. Entfernung des Tumors nachweisbar und stellen somit eine mögliche langlebige Antigenquelle dar (Evans *et al.* 1999, Meng *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu Tumoren ist die Plazenta jedoch ein kurzlebiges Organ und die Umgehung des Immunsystems nur vorübergehend.

4.3.6 Die Schwangerschaft als endogene Vakzinierung gegen Brustkrebs

1970 wurde von Brawn *et al.* postuliert, dass eine Schwangerschaft Immunreaktionen gegen gemeinsame Antigene von Embryonen und Tumoren auslöst, die zum Abtöten von Krebszellen, aber nicht von gesunden Zellen führen (Brawn 1970). Daraufhin bestätigten weitere Studien, dass Lymphozyten von Ratten- und Mäusemüttern Tumorzellen effektiver abtöten als die ihrer jungfräulichen Artgenossen und dass diese auch lange Zeit nach der Schwangerschaft noch im Muttertier vorhanden sind (Baldwin *et al.* 1972, Hellström und Hellström 1975, Chakravarty *et al.* 1991, Chakravarty und Sinha 2000). In weiteren Tierexperimenten wurde zudem festgestellt, dass nach Verabreichung von Karzinogenen Mäusemütter wesentlich seltener und kleinere Tumoren entwickeln als jungfräuliche Mäuse (Chandradasa und Barnes 1979). Die Tumor-reaktiven Lymphozyten sind auch nach adoptivem Transfer in jungfräuliche Ratten in der Lage die Induktion von Brustkrebs zu verhindern (Chakravarty und Sinha 2000).

Im Menschen konnten Agrawal *et al.* eine natürliche Immunisierung gegen das Tumor-assoziierte Antigen MUC1 durch Schwangerschaft belegen. Sie konnten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien aus dem Blut von Müttern generieren, die nach der Stimulation mit einem synthetischen MUC1 Peptid IFN- γ produzierten und MUC1-positive Tumorzellen abtöteten. Es gelang ihnen nicht, solche T-Zelllinien aus dem Blut von Männern oder Frauen ohne Kinder zu erhalten. Allerdings konnten sie in Studienteil-

nehmerinnen, die später schwanger wurden, im ersten Trimenon MUC1-reaktive T-Zellen nachweisen (Agrawal *et al.* 1995, Agrawal *et al.* 1996). Die Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen während der ersten drei Schwangerschaftsmonate wurde später in einer anderen Studie bestätigt (Snijdwint *et al.* 1999).

4.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Mütter ein geringeres Brustkrebsrisiko haben als kinderlose Frauen, sofern Geburten in einem jungen Alter erfolgt sind. Die Ursachen hinter dem protektiven Effekt von Schwangerschaften sind noch nicht eindeutig geklärt. Tierexperimente haben Hinweise darauf erbracht, dass dieser durch Immunzellen vermittelt werden könnte. Zudem wurden in Blutproben von Müttern T-Zellen nachgewiesen, die gegen das Tumor-assoziierte Antigen (TAA) Mucin 1 reagieren. TAA sind Proteinstrukturen, die von verschiedenen Krebszellen in großer Menge produziert werden können, aber kaum in gesunden Geweben vorkommen. Werden diese von T-Zellen erkannt, wird eine Immunantwort gegen die Krebszellen induziert, die zu einer Vernichtung des Tumors führen kann.

In Brustkrebspatientinnen konnte bereits eine spontane Entstehung von T-Zell Reaktionen gegen TAA nachgewiesen werden. Diese gegen den Tumor gerichteten Immunantworten können jedoch durch regulatorische T-Zellen (Treg) unterdrückt werden. Je nachdem, welcher Typ von T-Zellen sich in einem Tumor ansammelt, wird auch die Prognose von Brustkrebspatienten positiv (zytotoxische T-Zellen) oder negativ (Treg) beeinflusst.

Bislang ist unbekannt, ob im Zuge der Schwangerschaft ein lang anhaltender Immunschutz gegen Brustkrebs induziert wird und ob dieser die Anti-Tumor-Immunität bei Brustkrebs Erkrankungen beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung von spontanen T-Zell-Antworten gegen verschiedene Brustkrebsantigene, die im Zuge einer Schwangerschaft im Sinne einer endogenen Vakzinierung induziert werden könnten. Dazu wurden folgende Sachverhalte erforscht:

- I. Wie hoch ist die Inzidenz spontaner T-Zell Reaktionen gegen Tumor-assoziierte Antigene durch Schwangerschaft?
- II. Werden diese während der Schwangerschaft oder Stillzeit induziert?
- III. Wird dadurch ein Langzeit-Gedächtnis aufgebaut?

- IV. In wieweit wird die Anti-Tumor-Reaktivität durch regulatorische T-Zellen beeinträchtigt und was ist ihre Antigen-spezifität?
- V. Wie wirken sich durch Schwangerschaften induzierte, prä-existente T-Zellantworten auf die Anti-Tumor-Immunität bei Brustkrebs aus?
- VI. Unterscheiden sich TAA-reaktive T-Zellen von Gesunden und Brustkrebspatienten bezüglich ihrer Funktionalität?

Die Antworten auf diese Fragen können wertvolle Informationen im Hinblick auf die Entwicklung eines prophylaktischen Impfstoffes gegen Brustkrebs hervorbringen, der das Brustkrebsrisiko von kinderlosen Frauen senken könnte. Dazu zählen unter anderem die Auswahl relevanter Antigene, mögliche unerwünschte Effekte wie die Induktion von regulatorischen T-Zellen und Informationen zum Langzeiteffekt.

Zur Beantwortung dieser Fragen haben wir Blutproben gesunder kinderloser, schwangerer, und stillender Frauen, sowie von älteren Müttern und Brustkrebspatientinnen entnommen. Aus diesen wurden T-Zellen isoliert und mit synthetischen Peptiden von TAA stimuliert. Die Anwesenheit TAA-spezifischer T-Zellen äußert sich dann in deren Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , welche mittels ELISpot-Analysen und durchflusszytometrisch mit Hilfe von Antikörpern detektiert wurden. Unter Verwendung eines Durchflusszytometers wurden TAA-spezifische T-Zellen zudem hinsichtlich ihrer Polyfunktionalität, sowie der Expression von Gedächtniszellmarkern und coinhibitorischen Rezeptoren charakterisiert. Der Einfluss von Treg auf T-Zell Antworten gegen TAA wurde analysiert, indem die ELISpot-Analysen vor und nach der Depletion von Treg durchgeführt wurden. Ihre Antigen-spezifität wurde mittels des Treg-Spezifitätsassays ermittelt, der in unserem Labor entwickelt wurde.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

Die verwendeten Marken- und Produktnamen sind geschützte Markenzeichen.

5.1.1 Puffer

Waschpuffer für ELISpot mit TWEEN		
TWEEN20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	0,001%
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	

Waschpuffer für Zellkultur und ELISpot	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

MACS-Puffer		
EDTA (1 % in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})	Biochrom, Berlin	2 mM
Humanes AB-Serum	PAN Biotech, Aidenbach	0,01%
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	

FACS-Puffer		
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin	2%
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	

5.1.2 Zellkulturmedien und Supplemente

Medium für T-Zellen		
Humanes, rekombinantes IL-2 Proleukin S	Novartis, Basel, Schweiz	100 IU/ml
Humanes, rekombinantes IL-4 premium grade	Miltenyi, Bergisch Gladbach	60 IU/ml
X-VIVO 20	Lonza, Verviers, Belgien	

Medium für Dendritische Zellen		
Humanes, rekombinantes IL-4 premium grade	Miltenyi, Bergisch Gladbach	1000 IU/ml
Humanes, rekombinantes GM-CSF Leukine	Sanofi-Aventis, Frankfurt	50 ng/ml
X-VIVO 20	Lonza, Verviers, Belgien	

Waschmedium für Zellkultur	
RPMI 1640 mit L-Glutamin, Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

5.1.3 Peptide

Peptid	Sequenz
PCNA ₂₀₁₋₂₅₀	EPVQLTFALRYLNFFTKATPLSSTVTLSMSADVPLVVEYKIADMGHLYN
ID-1 ₁₀₁₋₁₄₆	YIRDLQLELNSESEVGTGGRRGLPVRAPLSTLNGEISALTAEEACV
GLI1 ₃₆₅₋₄₁₁	KLPGCTKRYTDPSSLRKHVKTVHGPDHAVTKRHRGDGGLPRAPSIST
SMO ₅₅₇₋₆₀₃	DDEPKRIKSKMIAKAFSKRHELLQNPQELFSMHTVSHDGPVAGL
Mammaglobin-A ₄₋₅₆	LMVLMLAALSQHCYAGSGCPLENVISKINPQVSKTEYKELLQEFIDNATT
HPA1 ₁₋₅₀	MLLRSKPALPPPLMLLLLGLPLGPLSPGALPRPAQAQDVVDLDFFTQEPLH
MUC1 _{(137-157)x5}	(GVTSAPDTRPAGSTAPPAH)x5

Peptid	Sequenz
MAGEA3 ₂₇₁₋₃₁₄	FLWGPRALVETSIVKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGEE
CEA ₅₆₉₋₆₁₈	YVCGIQNSVSVANRSDPVTLDVLYGPDTPHISPPDSSYLSGANLNLSCSA
HER2 ₃₅₁₋₃₈₄	REVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
EGFR ₄₇₉₋₅₂₈	KLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN
Kollagen IV ₁₋₅₀	MKLRGVSLAAGLFLALSLWGQPAEAAACYGCSPGSKCDCSGIKGEKGER
IMP ₂₃₋₇₂	EIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSER

Alle Peptide wurden in der Zentralen Peptid- und Proteinsyntheseeinheit des DKFZ hergestellt.

5.1.4 Reagenzien

Produkt	Hersteller
³ H-Thymidin	Amersham, Little Chalfont, UK
Anti-CD3 Antikörper	Dr. Moldenhauer, Heidelberg
Anti-CD19 Antikörper	Dr. Moldenhauer, Heidelberg
Anti-CD56 Antikörper	Beckman-Coulter, Krefeld
Anti-IFN- γ Antikörper	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Anti-IFN- γ Antikörper, biotinyliert	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun, Melsungen
Betaplate Scint	Perkin Elmer, Waltham, USA
Biocoll Separierungslösung (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin
<i>Cytometer Setup & Tracking beads</i>	BD Biosciences, Heidelberg

Produkt	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Dynabeads Pan Mouse IgG</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethidiumbromidmonoazid (EMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>FACS Clean</i> Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACS Flow Sheath</i> Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACS Shutdown</i> Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
Kompensationsbeads anti Maus Igk	BD Biosciences, Heidelberg
Kompensationsbeads anti Ratte Igk	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumhydroxid Pellets	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sandoglobulin (humanes IgG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Spitacid	Ecolab, Düsseldorf, Deutschland
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

5.1.5 Kits

Produkt	Hersteller
Alkalische Phosphatase Konjugat Substrat Kit	Bio-Rad , München
Dynabeads Untouched Human T Cells	Life Technologies, Carlsbad, USA
LIVE/Dead Fixable Yellow Dead Cell Staining Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA

Produkt	Hersteller
MACS CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS IFN- γ Secretion Assay Detection Kit (FITC) human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS IFN- γ Secretion Assay Detection Kit (APC) human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS IL-2 Secretion Assay Detection Kit (PE) human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS TNF- α Secretion Assay Detection Kit (APC) human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

5.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Spezies	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller
CCR7	Ratte	IgG2a, κ	PE-Cy7	3D12	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	Maus	IgG1, κ	V500	RPA-T4	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	Maus	IgG1, κ	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	Maus	IgG1, κ	V450	RPA-T8	BD Biosciences, Heidelberg
CD45RO	Maus	IgG2a, κ	APC-H7	UCHL1	BD Biosciences, Heidelberg
LAG-3	Ziege	IgG	Fluorescein	polyklonal	R&D, Minneapolis, USA
PD1	Maus	IgG1, κ	PE-Cy7	EH12.2H7	BioLegend, San Diego, USA
TIM-3	Ratte	IgG2a	PE	344823	R&D, Minneapolis, USA
Isotyp-Kontrolle	Ratte	IgG2a, κ	PE-Cy7	R35-95	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle	Maus	IgG2a, κ	APC-H7	G155-178	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle	Ziege	IgG	Fluorescein	polyklonal	R&D, Minneapolis, USA
Isotyp-Kontrolle	Maus	IgG1, κ	PE-Cy7	MOPC-21	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle	Ratte	IgG2a	PE	eBR2a	R&D, Minneapolis, USA

5.1.7 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einfrierröhrchen (2ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalnadeln	BD Biosciences, Heidelberg
Konische Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
MACS MS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikroreaktionsgefäße (0,5, 1, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
MultiScreen-HA-Platten für ELISpot (96 Loch)	Merck, Schwalbach
Pasteur Einwegpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Gilson, Limburg
Pipettenspitzen für Mehrkanalpipetten (10, 200 µl)	Steinbrenner, Wiesenbach
Polypropylenrundboden-Röhrchen (5 ml)	Neolab, Heidelberg
Probenbeutel für 1450 MicroBeta	Perkin Elmer, Waltham, USA
Reagenzreservoir	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Rundbodenplatte beschichtet (96 Loch)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Rundbodenplatte unbeschichtet (96 Loch)	BD Biosciences, Heidelberg
Separationsröhrchen Leucosep (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Einwegpipetten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spritzen (20 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen (50 ml)	Terumo, Eschborn
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Vorgedruckte Filtermatten (90 x 120 mm)	Perkin Elmer, Waltham, USA

Produkt	Hersteller
Zellkulturplatten unbeschichtet (6, 12, 24 Loch)	Neolab, Heidelberg
Zellkulturplatten beschichtet (6, 12, 24 Loch)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen unbeschichtet (Ø 6 cm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen beschichtet (Ø 6, 14 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

5.1.8 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD, Franklin Lakes, USA
Dynamag™ Separations Magnet	Life Technologies, Carlsbad, USA
Eismaschine	Hoshizaki, Willich-Münchheide
Flüssigkeitsszintillationszähler (1450 MicroBetac)	Perkin Elmer, Waltham, USA
Glasware	Schott, Mainz
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Mikropipetten (2-1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop Axiovent 25	Zeiss, Göttingen
Milli-Q Wasseraufbereitungsgerät	Millipore, Eschborn
Multikanalpipetten (8,12 Kanäle)	Rainin, Leiden, Niederlande
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Plattenlesegerät Immunospot für ELISpot	CTL, Bonn
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Präzisionswaage (PB602-S/FACT)	Mettler Toledo, Gießen
Rollenmischer	Heräus, Hanau
Sterilbank	SterilGARD Hood Baker, Stanford, USA
Tischzentrifuge	Heräus, Hanau

Produkt	Hersteller
Tiefkühlgerät (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühlgerät (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Tomtec Harvester Mach 3	Tom Tec, Unterschleißheim
Vortexer (Reax 2000)	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad (SW21)	Julabo, Seelbach
Zellkulturinkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
Zentrifuge Biofuge fresco	Heräus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heräus, Hanau
Zentrifuge Multifuge X3FR	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

5.1.9 Software

Produkt (Version)	Hersteller
Adobe Acrobat (XI)	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe Illustrator (CS6)	Adobe Systems, San Jose, USA
EndNote (X7)	Adept Scientific, Frankfurt
FACS Diva (6)	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo (X)	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism (6)	GraphPad Software, LaJolla, USA
Immunospot	CTL, Bonn
Microsoft Office (2010)	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Windows (7)	Microsoft, Redmond, USA

5.1.10 Proben von peripherem Blut

Die Entnahme peripheren Blutes von gesunden Spenderinnen und primären Brustkrebs-Patienten erfolgte in der Frauenklinik der Universität Heidelberg. Die gesunden Probandinnen ab einem Alter von 50 Jahren nahmen am Mammographiescreening teil und wurden negativ getestet. Es wurden nur Patienten mit Mammakarzinom eingeschlossen, die keine neoadjuvante Therapie erhalten haben

und bei denen in der Vergangenheit keine Tumorerkrankung festgestellt wurde. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg zugelassen (Zeichen: S-293/2011). Alle Probanden wurden über das Versuchsvorhaben aufgeklärt. Die Einwilligung zur Studienteilnahme erfolgte schriftlich.

5.2 Methoden

5.2.1 Auswahl von 50-mer Peptiden aus Proteinen

Als zu testende Tumor-assoziierte Antigene wurden für sämtliche Experimente dieser Arbeit synthetische Polypeptide verwendet (siehe 5.3.1). Um die Aminosäuresequenzen der Peptide von ausgewählten Proteinen auszuwählen, wurden *in silico* Vorhersagen für die Bindungsstärke an die in der deutschen Population am häufigsten vorkommenden Klasse I MHC Moleküle durchgeführt, sofern nicht bereits in der Literatur beschriebene T-Zell-Epitope vorhanden waren. Hierzu eignen sich die im Internet frei verfügbaren Algorithmen SYFPEITHY (<http://www.syfpeithi.de/>), NetMHC 3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>), und BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/).

Die Aminosäuresequenzen für einige der in dieser Arbeit getesteten Tumor-assoziierten Antigene wurden bereits von anderen Mitarbeitern des Labors bestimmt. Die Antigene PCNA, SMO, GLI1 und ID-1 wurden für die Experimente ausgewählt, da sie bereits im *in situ* Karzinom überexprimiert sind, aber nur in geringen Mengen im ruhenden Brustgewebe vorkommen (siehe Kapitel 4.3.2). Als *Recall*-Antigen, welches bei einem großen Anteil von Probanden eine Immunreaktion hervorruft, wurde ein Polypeptid des Influenza Matrix Proteins (IMP) ausgewählt.

Als Kriterien für die Auslese der Aminosäuresequenzen wurde eine als möglichst stark vorhergesagte Bindung (hoher *score*) an möglichst viele der humanen MHC Klasse I Moleküle HLA-A*01, HLA-A*0201, HLA-A*03, HLA-B*0702 festgelegt. Als Beispiel ist in Abbildung 19 die Vorgehensweise für die Selektion eines Peptids von PCNA anhand der Vorhersagen der Algorithmen für HLA-A*0201-Moleküle aufgeführt. Anhand der Auswahl wurden schließlich Polypeptide einer Länge von 50 Aminosäuren synthetisiert, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch MHC Klasse II Epitope enthalten.

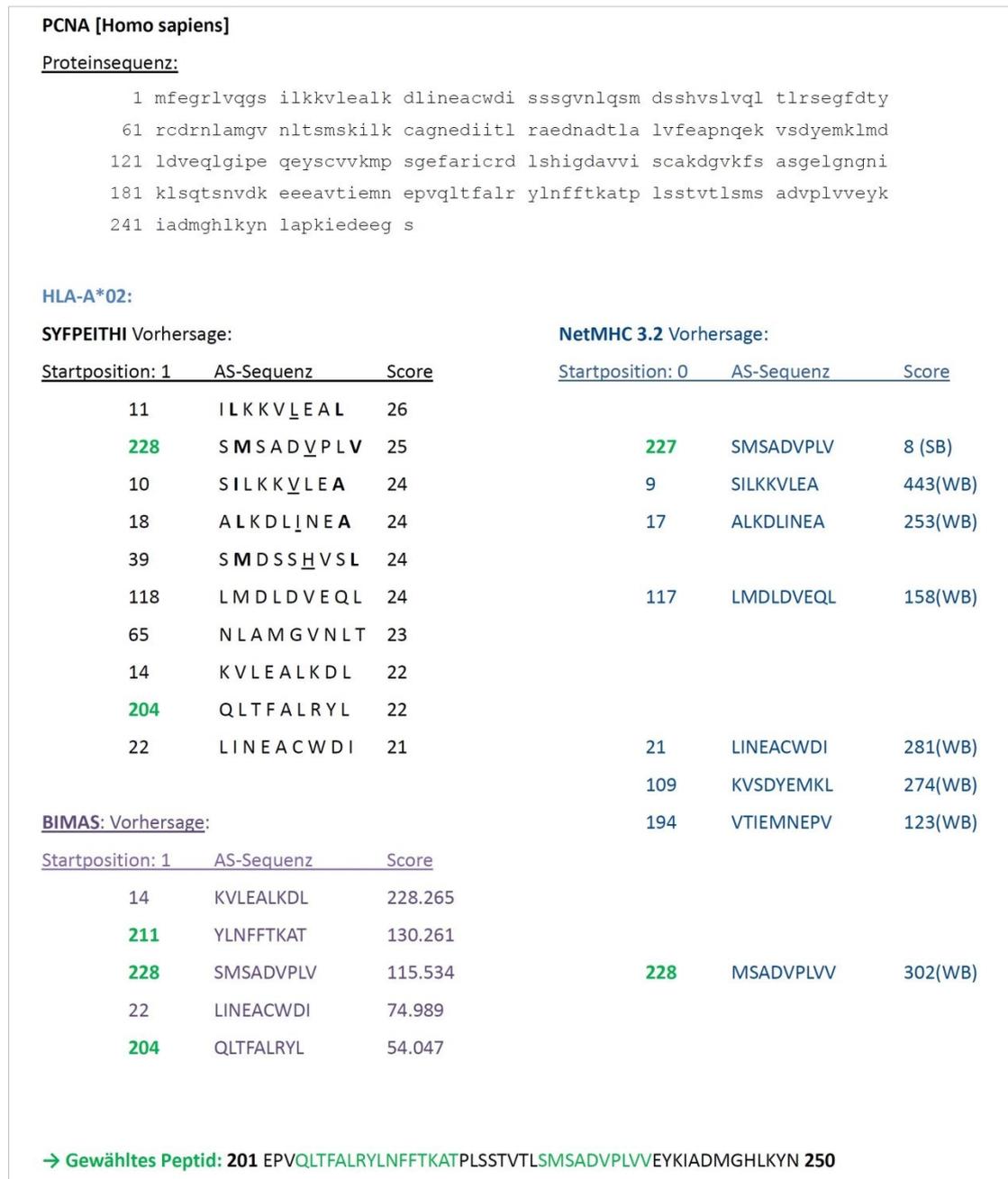


Abbildung 19: Auswahl der Aminosäuresequenzen (AS) der in der Arbeit verwendeten Peptide am Beispiel für die *in silico* vorhergesagten HLA*A2-Liganden des Proteins PCNA. SB: *strong binder*, WB: *weak binder*.

5.2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Hierfür wurden 15 ml speziellen Mediums für T-Zellen oder Dendritische Zellen verwendet und alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde. Sämtliche Waschschrte erfolgten mittels Zentrifugation bei 427 g für 10 Minuten mit anschließen-

dem Verwerfen des Überstandes. 24 Stunden vor jedem Experiment und während der Experimente wurden alle verwendeten Zellen in X-VIVO 20 Medium ohne Zytokinzusatz überführt, um deren mögliche unspezifische Aktivierung zu vermeiden.

5.2.3 Aufreinigung und Generierung verschiedener Zellpopulationen

Für alle Experimente wurden aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes Dendritische Zellen (DZ) generiert und T-Zellen aufgereinigt.

5.2.3.1 Isolation mononukleärer Zellen

Die Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden Separationsröhrchen verwendet, die mit 15,5 ml Ficoll-Lösung kurz zentrifugiert wurden, um die Lösung unter die Trennschicht zu bringen. Anschließend wurde das Blut auf die Trennschicht gegeben und mit RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Proben wurden für 20 min bei 872 g und 20 °C zentrifugiert, wobei die Zentrifuge ohne Bremse ausgelaufen lassen wurde. Die mononukleären Zellen, die sich durch den Dichtegradienten in der Interphase anreichern, wurden entnommen und mit RPMI-Medium gewaschen.

5.2.3.2 Generierung von Dendritischen-Zellen aus mononukleären Zellen

Nach der Isolation wurden die mononukleären Zellen in 15 ml X-VIVO-Medium bei 37 °C in beschichteten Petrischalen kultiviert. Die nicht adhärenen Zellen wurden nach 45 min abgospült und in T-Zell Medium (siehe 5.1.1) kultiviert. Die adhärenen Monozyten wurden im Medium für Dendritische Zellen (siehe 5.1.1) innerhalb von fünf bis acht Tagen zu Dendritischen Zellen differenziert. Der Reifungszustand wurde durch die Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Das Kriterium für die abgeschlossene Differenzierung war das Vorhandensein der für DZ charakteristischen Zellausläufer, der Dendriten (Abbildung 20 B).

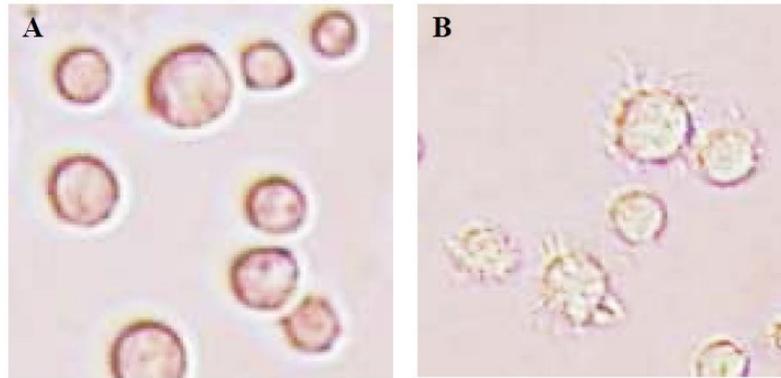


Abbildung 20: Differenzierte dendritische Zellen (B) unterscheiden sich in ihrer Morphologie von Vorläuferzellen (A), da sie verzweigte Ausläufer des Zytoplasmas bilden, welche als Dendriten bezeichnet werden. Lichtmikroskopische Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

5.2.3.3 Aufreinigung der Dendritischen Zellen

Die Dendritischen Zellen wurden nach ihrer Differenzierung aufgereinigt, indem eventuell verbleibende T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen entfernt wurden. Hierfür wurden pro $5 \cdot 10^7$ Zellen jeweils 100 μ l der Pan Mouse IgG Dynabeads mit 1 ml MACS-Puffer (siehe 5.1.2) und einer Mischung aus Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD56 (je 0,2 bis 0,5 μ g) für 30 min bei 4° C auf einem Rollenmischer vermischt. Die Antikörper-beladenen Beads wurden zweimal gewaschen, und anschließend mit 1 ml MACS-Puffer und den Zellen vermischt. Die Suspension wurde 30 min bei 4° C durchmischt und mit MACS-Puffer auf 5 ml aufgefüllt. Danach erfolgte mittels eines Zellseparationsmagneten die negative Selektion der Dendritischen Zellen. Während die an die Beads gebundenen unerwünschten Zellen im magnetischen Feld festgehalten wurden, wurde die Zellsuspension mit den Dendritischen Zellen entnommen. Die übrigen Zellen wurden schließlich verworfen.

5.2.3.4 Isolation der T-Zellen aus den nicht adhärenen Zellen

Zur Isolation von T-Zellen aus den nicht adhärenen Zellen wurde das *Dynabeads Untouched Human T Cell Kit* nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Auf diese Weise wurden Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten, B- und NK-Zellen magnetisch separiert und verworfen.

5.2.3.5 Depletion von Treg

Die aufgereinigten T-Zellen wurden aufgeteilt, um eine nicht-Treg-depletierte Fraktion für den ELI-Spot und/oder durchflusszytometrische Analysen zur Verfügung zu haben. Zur Depletion von

CD4⁺CD25⁺ Treg aus der Gesamtpopulation von T-Zellen wurde das *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit* gemäß der Herstellerangaben verwendet. Dabei werden zunächst die CD8⁺ Zellen magnetisch abgetrennt und aufbewahrt, sodass die ungebundenen CD4⁺ Zellen weiter aufgetrennt werden können. Anschließend werden die CD4⁺ Zellen mit starker Expression des CD25 Moleküls magnetisch isoliert. Diese enthalten die mit Treg angereicherte Zellfraktion. Die CD4⁺ Zellen mit niedriger CD25-Expression und die CD8⁺ Zellen wurden vereinigt und als „konventionelle“ oder Treg-depletierte T-Zellen weiterverwendet.

5.2.4 Lösen der Peptide

Alle Peptide wurden in der Zentralen Peptid- und Proteinsyntheseinheit des DKFZ synthetisiert und in lyophilisierter Form bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden sie je nach Löslichkeit in *Aqua ad iniectabilia* mit 10% bis 30% DMSO gelöst und in 50 µl Aliquots bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Die Peptidkonzentration betrug 10 µg/µl.

5.2.5 ELISpot Assay

Der ELISpot Assay (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) dient dem Nachweis einzelner, aktivierter Zellen. Er funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs und ermöglicht unter anderem die Quantifizierung Zytokin-sezernierender Immunzellen als Reaktion auf die Stimulation mit einem Antigen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren angewandt, um die Reaktivität von T-Zellen aus dem Blut gegen Tumor-assoziierte Antigene (siehe 4.3.2) zu untersuchen.

5.2.5.1 Funktionsweise

Ein Schema, welches die Funktionsweise des ELISpot Assays erläutert, ist in Abbildung 21 dargestellt. Zunächst wird eine Membran mit gegen das zu analysierende Zytokin, z. B. IFN-γ, gerichteten Primärantikörpern beschichtet. Anschließend wird eine Zellsuspension, zum Beispiel mit T-Zellen, zugegeben, die dem zu testenden Stimulans, wie peptidpräsentierende Dendritische Zellen, ausgesetzt ist oder war. Die Zellen sinken auf die Membran und die Suspension darf ab diesem Zeitpunkt nicht mehr bewegt werden. Werden einzelne T-Zellen aktiviert und beginnen diese IFN-γ zu sezernieren, bindet es an die membrangebundenen Primärantikörper. Nun kann die Zellsuspension abgewaschen werden. Der Nachweis der durch die Peptide aktivierten T-Zellen erfolgt über drei weitere Schritte: Zuerst werden biotinylierten Antikörper, die ebenfalls an IFN-γ binden, hinzugegeben. Alle ungebundenen Sekundärantikörper werden abgespült. Für die Substratreaktion wird über eine Kopplung an an Steptavidin ein biotinyliertes Enzym an den Zweitantikörper gebunden. Überschüssige und unge-

bundene Enzyme werden ebenfalls durch Waschen entfernt. Die Zugabe eines Substrates, das nach enzymatischer Spaltung farbig wird, führt zu dem Erscheinen kreisrunder Flecken auf der Membran. Jeder dieser Flecken entspricht einer T-Zelle, die auf das jeweilige Peptid reagiert hat. Wir haben den Assay stets nach zwei Tagen abgestoppt. Diese Zeit ist zu kurz um naive T-Zellen zu aktivieren (Gattinoni *et al.* 2011). Daher können damit ausschließlich differenzierte T-Zellen erfasst werden. Um zahlreiche Peptide in Triplikaten zu testen, eignet sich ein 96-Loch Verfahren, wobei jedes Loch mit einer einzelnen Membran verschlossen ist.

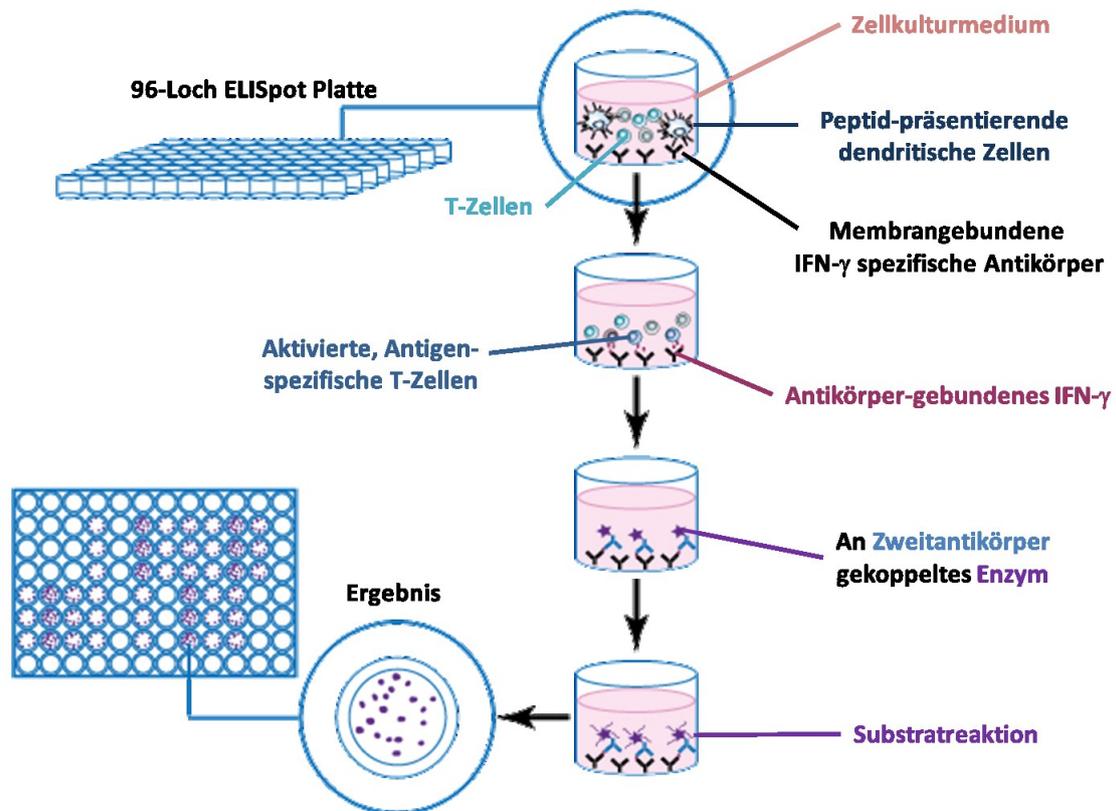


Abbildung 21: Schematische Darstellung zur Funktionsweise des ELISpot Assays. Die Illustration wurde freundlicherweise von Frau Dr. Slava Stamova zur Verfügung gestellt.

5.2.5.2 Durchführung des ELISpot Assays

Alle ELISpot Assays dieser Dissertation wurden folgendermaßen durchgeführt: Jedes Loch einer ELISpot-Platte wurde mit 1 μg Antikörper gegen IFN- γ in 100 μl sterilem PBS versetzt. Die Membranen wurden bei 4 $^{\circ}\text{C}$ über Nacht mit dem Antikörper beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Membranen unter einer Sicherheitswerkbank gewaschen, indem sie drei Mal mit sterilem PBS + TWEEN (sie-

he 5.1.2) gespült und ausgeklopft und wurden. Anschließend wurde überschüssiges TWEEN durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Dann wurden 100 µl einer Lösung aus RPMI mit einem 10-prozentigen Zusatz humanen AB-Serums in die Löcher gegeben. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran mit Serumproteinen zu blocken, wurde diese Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Membranen, wie im vorherigen Schritt beschrieben, gewaschen.

Die Tests wurden in Triplikaten durchgeführt. In jedes Loch wurden, außer für die Kontrollen „T-Zellen alleine“ und „SEB“, $1 \cdot 10^4$ aufgereinigte Dendritische Zellen pipettiert. Diese wurden in 100 µl X-VIVO 20 mit oder ohne (für die Kontrolle „Dendritische Zellen alleine“) Zusatz von 20 µg Polypeptid resuspendiert. Als Negativkontrolle diente humanes IgG, gegen welches keine spezifische T-Zell-Antwort zu erwarten ist, da es in großen Mengen im peripheren Blut vorhanden ist. Bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Dendritischen Zellen über Nacht inkubiert, um die Aufnahme und Prozessierung der Polypeptide zu gewährleisten. Im Anschluss wurden pro Loch $5 \cdot 10^4$ nicht-Treg-depletierte oder Treg-depletierte T-Zellen in 100 µl X-VIVO 20 zu den Dendritische Zellen gegeben (außer für die Kontrolle „Dendritische Zellen alleine“). Zusätzlich wurden in drei Löcher nur mit T-Zellen gefüllt (für die Kontrolle „T-Zellen alleine“). In eines der Löcher wurde als Positivkontrolle für den Erfolg der Durchführung des Assays 1 µg/ml *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) hinzugegeben, welches als sogenanntes Superantigen zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung der T-Zellen führt.

Nach 40-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde der Assay abgestoppt. Hierfür wurde zunächst die Zellsuspension verworfen und jedes Loch dreimal mit TWEEN-haltigem PBS und zweimal mit reinem PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Loch 100 µl eines 1:1000 in PBS verdünnten biotinylierten IFN-γ-spezifischen Antikörpers in PBS hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationsphase von 90 min bei 37 °C und 5% CO₂. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Membranen wurden 100 µl einer Lösung mit an Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase in einer 1:1000 Verdünnung in PBS in jedes Loch gegeben. Die Steptavidin-Biotin Kopplung erfolgte bei 37 °C für 45 min und 5% CO₂. Erneut wurden die Membranen fünf Mal gewaschen. Daraufhin erfolgte die Substratreaktion. Dafür wurden jedes Loch 100 µl einer Substratmischung gegeben, die aus destilliertem Wasser mit 1% Lösung A, 1% Lösung B und 4% 25-fach Substratpuffer des Alkalische Phosphatase Konjugat Substrat Kits (siehe 5.1.5) bestand. Die ELISpot-Platte mit der Substratmischung wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis erste Spots sichtbar wurden. Schließlich wurde die Substratmischung verworfen, jedes Loch dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Plastikhülle unter der Membran entfernt. Die Platte wurde über Nacht in ein Papiertuch eingewickelt getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte automatisch mit dem CTL Immunospot System. Die Ergebnisse wurden

einer manuellen Qualitätskontrolle unterzogen und nicht auswertbare Löcher gegebenenfalls ausgeschlossen.

5.2.6 Treg Spezifitätsassay

Der Treg Spezifitätsassay wurde im Labor der Abteilung für T-Zell Immunität der Translationalen Immunologie am DKFZ entwickelt (Bonertz *et al.* 2009). Er dient dem Nachweis von Treg, die spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene sind.

5.2.6.1 Funktionsweise

Der Treg Spezifitätsassay basiert auf der Eigenschaft antigenspezifischer Treg die Proliferation aktivierter „konventioneller“ T-Zellen (Tcon) zu unterdrücken. Hierfür werden peptidpräsentierende Dendritische Zellen (DZ) mit CD4⁺CD25⁺ Treg koinkubiert. Zeitgleich werden die Tcon antigenunspezifisch, also polyklonal, aktiviert und einen Tag später zu den Treg gegeben. Sind Treg spezifisch durch das Antigen aktiviert worden, unterdrücken sie die Proliferation der Tcon, welche durch die Aufnahme radioaktiv markierten Thymidins gemessen werden kann (Abbildung 22).

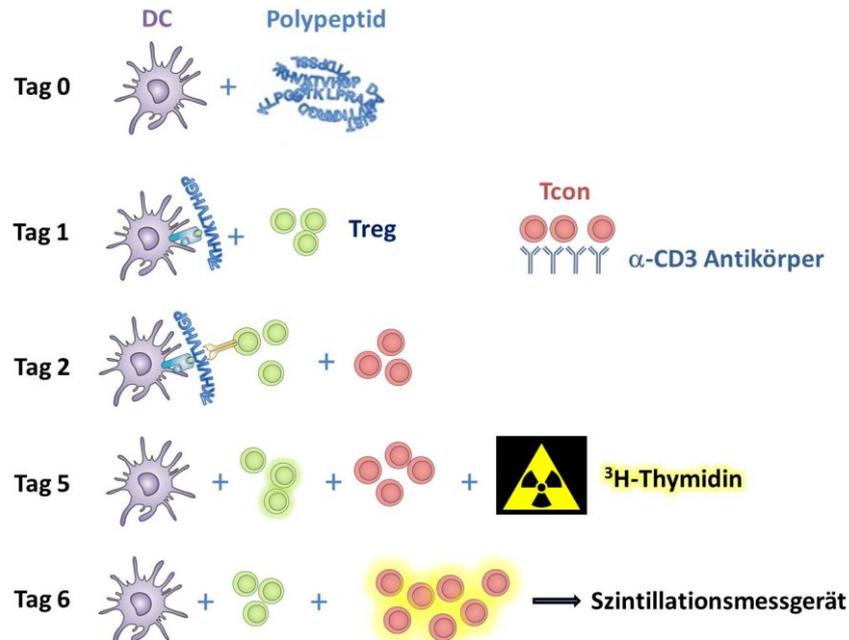


Abbildung 22: Schematische Darstellung zur Funktionsweise des Treg Spezifitätsassays.

5.2.6.2 Vorbereitung der Zellpopulationen für deren Kokultur im Treg Spezifitätsassay

In den 96 Löchern einer Rundboden-Platte (Assay-Platte) wurden jeweils $5 \cdot 10^3$ Dendritische Zellen mit 50 μ l X-VIVO 20 und 10 μ g Polypeptid vermischt. Als Negativkontrolle diente humanes IgG. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Diese wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um die Aufnahme und Prozessierung der Polypeptide durch Dendritische Zellen zu gewährleisten. Zudem wurden in jedes Loch einer 24-Loch Platte mit Flachboden 1 ml von 1:1000 in PBS gelösten Antikörpern gegen CD3 (Klon OKT-3) gegeben. Diese wurden über Nacht bei 4 °C an die Böden 24-Loch Platte gebunden. Im Anschluss wurden in jedes Loch der Assay-Platte $2,5 \cdot 10^4$ Treg in 50 μ l X-VIVO 20 hinzugefügt und für 24 h mit den Dendritischen Zellen kokultiviert. Parallel wurde jedes Loch der 24-Loch Platte zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und anschließend je $1 \cdot 10^6$ Tcon in 1 ml X-VIVO 20 hinzugegeben. Der Erfolg der polyklonalen Aktivierung der Tcon durch den CD3-Antikörper in der 24-Loch Platte wurde nach 24 h mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Davon wurden schließlich $2,5 \cdot 10^4$ in jedes Loch der Assay-Platte in 50 μ l X-VIVO 20 zu den Treg gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Positivkontrolle diente ein Triplikat mit DZ und aktivierten Tcon ohne Zugabe von Treg, um die maximale Proliferation der Tcon zu bestimmen.

5.2.6.3 Quantifizierung der Proliferation mittels ³H-Thymidin

Zur Quantifizierung der Proliferation der Tcon wurde den Zellen nach 72 h Kultur 1 μ Ci ³H-Thymidin in 20 μ l X-VIVO 20 Medium zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationsphase für 18 h bei 37° C und 5% CO₂ wurden diese durch zwei aufeinander folgende Zyklen von Einfrieren und Auftauen lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate durch eine Membran gesaugt und jedes Loch mit destilliertem Wasser gespült. Auf diese Weise wurde die gesamte DNA eines Loches auf ein bestimmtes Feld der Membran übertragen. Nachdem die Membran getrocknet wurde, erfolgte das Einschweißen mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Plastikfolie. Die Messung der Radioaktivität, welche proportional zur Proliferation der Tcon ist, erfolgte mit Hilfe eines Szintillationsgerätes. Die Proliferation nach Stimulation der Treg mit den zu testenden Peptiden wurde mit derjenigen nach Stimulation mit humanem IgG verglichen und der Unterschied mit Hilfe eines zweiseitigen Student'schen-t-Test auf dessen statistische Signifikanz untersucht. Das Signifikanzlevel wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. War die Proliferation in den Testlöchern signifikant niedriger als in den Kontrolllöchern, wurde das für die jeweilige Probe getestete Antigen als Treg-spezifisch definiert.

5.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine laserbasierte Methode zum Nachweis von Biomarkern auf einzelnen Zellen in einer Suspension. Die Biomarker werden überwiegend mit Hilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern detektiert. Bei der Arbeit mit Fluorophoren muss darauf geachtet werden, dass diese möglichst wenig Licht ausgesetzt sind, da sie photosensitiv sind. Alle im Rahmen dieser Arbeit getätigten Messungen wurden mit einem FACSCanto II Durchflusszytometer durchgeführt, welches simultan acht Parameter erfassen kann. Die nachfolgenden Analysen erfolgten mit der Software FlowJo.

5.2.7.1 Funktionsweise und Vorbereitung des Zytokinsekretionsassays

Beim Zytokinsekretionsassay handelt es sich um eine durchflusszytometrische Methode zum Nachweis sezernierter Zytokine. Wir haben den Assay angewandt um zu messen, welche und wie viele T-Zellen nach einer Stimulation mit TAA die Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α freisetzen. T-Zellen, welche diese T_H1 Zytokine sezernieren, sind besonders reaktiv gegen Tumoren (Wilde *et al.* 2012). Im Gegensatz zum intrazellulären Nachweis von Zytokinen kann hier die Funktionalität lebender Zellen nachverfolgt werden. Zudem ist die aktive Abgabe von Zytokinen biologisch relevanter als deren Speicherung im Inneren der Zelle. Im Vergleich zum ELISpot können gleichzeitig auch andere Merkmale der Zytokin-sezernierenden T-Zellen untersucht werden, wie die Expression von Gedächtnis-Markern (5.2.7.2) oder *Exhaustion*-Markern (5.2.7.3).

Die Durchführung des Assays erfolgte mit Hilfe der *MACS Secretion Assay – Detection Kits* (siehe 5.1.5). Er funktioniert ebenfalls nach dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Die Kits enthalten ein Auffang-Reagenz mit Antikörpern, die gleichzeitig an den Leukozytenmarker CD45 und das jeweilige Zytokin binden, sowie Fluorophor-markierte Detektions-Antikörper, welche dem Nachweis des gebundenen Zytokins dienen (Abbildung 23).

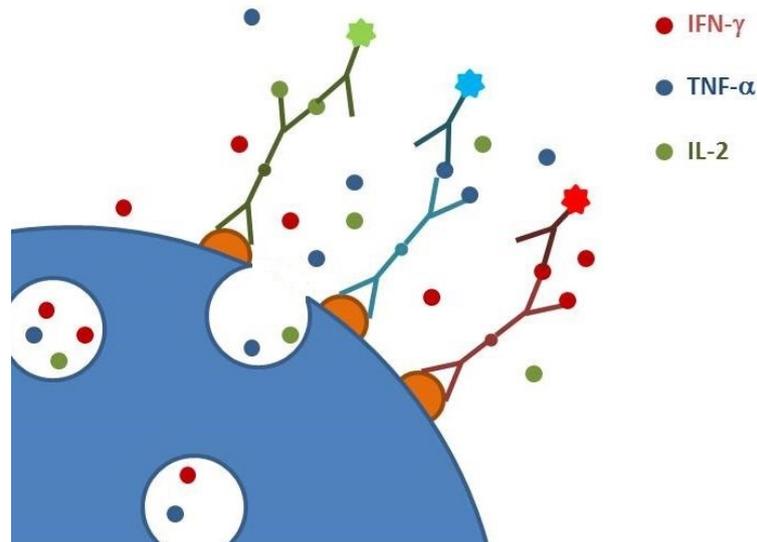


Abbildung 23: Illustration zur Methodik des Zytokinsekretionsassays.

Der IFN- γ Freisetzungssassay nach Stimulation mit TAA wurde bereits von Frau Dr. Maria Xydia optimiert und etabliert. Daher wurde ihr Protokoll für diese Arbeit übernommen. Der gleichzeitige Nachweis von drei Zytokinen wurde allerdings in unserem Labor noch nicht durchgeführt, weshalb diese Durchführung zunächst anhand von Blutproben von gesunden Spendern auf ihre Präzision getestet wurde.

Zur Vorbereitung des Freisetzungssassays wurden die aufgereinigten T-Zellen mit angereicherten peptidpräsentierenden Dendritischen Zellen (siehe 5.2.3) coinkubiert. Als TAA wurde ein Peptidgemisch aus gleichen Teilen von ID-1, Mammaglobin-A, MUC1 und Heparanase1 (siehe 4.3.2 und 5.1.3) verwendet. Als Negativkontrolle diente humanes IgG. SEB wurde für die Positivkontrolle verwendet. Die folgenden Ansätze wurden in zweifacher Ausführung präpariert: Von jeder Probe wurden je 10^5 DZ morgens mit 500 μ l X-VIVO 20 Medium in mindestens drei Löcher einer beschichtete 48 Loch Platte gegeben. Davon wurde je eine mit 100 μ g Peptidmix, 100 μ g humanem IgG bzw. 1 μ g SEB vermischt. Abends wurden je $5 \cdot 10^5$ der autologen TZ in 500 μ l X-VIVO 20 hinzugefügt. Nach 12 Stunden Cokultur wurde der Zytokinsekretionsassay durchgeführt.

5.2.7.2 Durchführung des Zytokinsekretionsassays

Die Zellen wurden aus den Löchern entnommen, in jeweils ein 15 ml Röhrchen überführt und dieses auf Eis gestellt. Danach wurden die Löcher nochmals mit eiskaltem FACS Puffer (siehe 5.1.2) gewaschen und die Flüssigkeit in die jeweiligen Röhrchen hinzugefügt, um möglichst viele Zellen analysieren zu können. Die adhärennten Dendritischen Zellen verbleiben dabei überwiegend in der Platte.

Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 427 *g* wurden alle Proben mit 5 µl humanem IgG *ad* 100 µl in eiskaltem FACS Puffer vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient dem Blocken freier Fc-Rezeptoren, an welche die Detektionsantikörper unspezifisch binden können. Anschließend wurden die Zellen in jedem Röhrchen mit eiskaltem MACS Puffer (siehe 5.1.2) gewaschen. Danach wurden jeweils 10 µl des Auffang-Reagenz gründlich *ad* 100 µl mit eiskaltem MACS Puffer vermischt, zu den Zellen gegeben und ein weiteres Mal gut durchmischt. Drei Aliquote der T-Zellen wurden für die Kompensation am Durchflusszytometer ungefärbt belassen. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 37 °C warmem X-VIVO 20 Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 45 min auf einem Rollenmischer bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Röhrchen auf Eis gestellt, mit eiskaltem MACS Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Nicht gebundene Antikörper und Zytokine wurden durch Verwerfen des Überstandes entfernt. Direkt im Anschluss wurden jeweils 10 µl der Detektionsantikörper *ad* 100 µl in eiskaltem MACS Puffer zu den Zellen gegeben und gut vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in eiskaltem FACS Puffer gewaschen und der Inhalt jedes einzelnen Röhrchens in ein Loch einer unbeschichteten 96 Loch Platte mit Rundböden überführt und erneut gewaschen.

5.2.7.3 Charakterisierung des Gedächtnis-Phänotyps TAA-spezifischer T-Zellen

Um den Gedächtnis-Phänotyp der T-Zellen zu bestimmen, welche nach der Stimulation mit dem TAA-Mix IFN- γ produzierten, wurden die gleichen Proben im Anschluss an den Zytokinsekretionsassay für die Marker CCR7 und CD45RO (siehe Abschnitt 4.3.1), sowie CD4 und CD8 gefärbt. Zusätzlich wurde ein Farbstoff verwendet, der tote Zellen anfärbt, um diese bei den Analysen auszuschließen. Abgestorbene Zellen neigen dazu Antikörper unspezifisch zu binden.

Zunächst wurden sämtliche Proben, abgesehen von zwei Kontrollen, mit den Farbstoffen Ethidiumbromidmonoazid (EMA) oder *LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain* im Verhältnis 1:250 bzw. 1:1000 *ad* 200 µl in eiskaltem FACS-Puffer versetzt. Die Färbung mit EMA erfolgte für 10 Minuten auf Eis im Licht einer Lampe. Der *Yellow Dead Cell Stain* wurde für 15 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Beide Farbstoffe dringen nur durch nicht intakte Membranen in das Zellinnere ein und färben somit ausschließlich absterbende oder tote Zellen. Während der *Yellow Dead Cell Stain* freie Amine bindet, wird EMA mit Nukleinsäuren verknüpft. Anschließend wurden alle Zellen zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen.

Danach erfolgte die Färbung der CCR7-Chemokinrezeptoren (siehe 4.3.1). Hierfür wurden 0,375 µg des Anti-CCR7-Antikörpers in 100 µl FACS-Puffer gelöst und mit den Zellen vermischt. Davon ausgenommen wurden die zwei ungefärbten Kontrollen und die Kontrolle, die nur mit dem Lebend/Tot-

Farbstoff behandelt wurde. Außerdem wurden einer Probe anstatt des für CCR7 spezifischen Antikörpers 0,375 µg der mit PE-Cy7 gekoppelten Isotypkontrolle zugesetzt. Alle Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend zweimal in eiskaltem FACS-Puffer gewaschen.

Daraufhin wurden alle übrigen Zellmarker (CD4, CD8 und CD45RO) gefärbt. Es wurden jeweils 0,5 µg der Antikörper gegen CD4 und CD8, sowie 0,75 µg des Antikörpers gegen CD45RO in 100 µl FACS-Puffer verdünnt und mit den Zellen vermischt. Die beiden ungefärbten Proben wurden so belassen. In einem Aliquot wurde anstatt des CD45RO Antikörpers die gleiche Menge der korrespondierenden APC-H7-markierten Isotypkontrolle hinzugefügt. Alle Kontrollen einhielten die gleiche Zellzahl wie die Proben und, für ein optimales *gating*, sowohl aktivierte, als auch unstimulierte T-Zellen. Die Inkubation erfolgte abgedeckt für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen, mit 100µl FACS-Puffer vermischt und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

5.2.7.4 Nachweis coinhibitorischer Rezeptoren auf TAA-spezifischen T-Zellen

Aufgrund der limitierten Anzahl der messbaren Parameter wurde die Bestimmung von inhibitorischen T-Zellrezeptoren nur in Bezug auf die IFN-γ-Sekretion gemessen. Daraufhin erfolgte die Färbung für die Marker CD4, CD8, PD1, TIM-3 und LAG-3. Von den jeweiligen Antikörpern wurden jeweils 0,5 µg (CD4 und CD8), 0,25 µg (TIM-3 und LAG-3) bzw. 1 µg (PD1) ad 100 µl FACS-Puffer mit den Zellen vermischt. Für die Marker PD1, TIM-3 und LAG-3 wurde jeweils eine entsprechende Isotypkontrolle angesetzt. Eine der bis dahin ungefärbten Proben wurde für die Kompensation mit dem Anti-LAG-3 Antikörper gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung erfolgte die Aufbewahrung im Dunkeln auf Eis.

Um Zellmaterial zu sparen, können für die Kompensation des Durchflusszytometers Beads verwendet werden, welche in unterschiedlichen Größen erwerbbar sind und die gängigsten Antikörper binden (siehe 5.1.4). Hierfür wurde je ein Tropfen gekoppelter und ungekoppelter (binden keine Antikörper) Beads mit 100 µl FACS-Puffer und der zuvor verwendeten Antikörpermenge vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Färbung der Beads war mit allen Antikörpern außer denen gegen LAG-3 und TNF-α möglich, da diese aus der Ziege bzw. von humanen Zellen stammen und es die Beads nur für Antikörper aus der Maus, der Ratte und dem Hamster gibt. Die Einzelfärbung gegen LAG-3 wurde daher mit Zellen durchgeführt. Für die Kompensation wurde anstatt des TNF-α-APC Antikörpers der IFN-γ-APC Antikörper des gleichen Herstellers verwendet. Nach zwei Waschschritten mit FACS Puffer erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

5.2.7.5 Analyse der mit dem Durchflusszytometer erfassten Daten

Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo zweidimensional in einem Dot Plot dargestellt. Hier steht jeder Punkt für eine Zelle, dessen Position im Diagramm von der Fluoreszenzintensität, also der Expression der beiden ausgewählten Biomarker abhängt.

Zur Auswahl bestimmter Zellpopulationen wird das *Gating* verwendet (Abbildung 24). Dabei wurden zunächst anhand der Lichtstreuung, die Abhängig von der Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen ist, die Lymphozytenpopulation von Zellfragmenten und anderen Zelltypen abgetrennt. Da aneinanderhaftende Zellen das Messergebnis verfälschen, wurden auch diese aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden unter den einzelnen Lymphozyten nur die lebenden selektiert, also die Zellen, die negativ für den Lebend/Tot-Farbstoff sind. Diese wurden zunächst in CD4- und CD8- positive Zellen aufgetrennt. Da die T-Zellen vor Versuchsbeginn bereits aus den Lymphozyten isoliert wurden, handelt es sich bei den ausgewählten Zellpopulationen um T-Zellen. Die CCR7-, CD45RO-, PD1-, LAG-3- und TIM-3- positiven T-Zellpopulationen wurden mit Hilfe der Isotypkontrollen ausgewählt. In dieser Kontrolle wurden alle Marker, außer der zu ermittelnde, angefärbt. Der Kontroll-Antikörper ist, abgesehen von der spezifischen Bindungsstelle, mit dem Testantikörper identisch. Er bindet an eine Struktur, die auf Lymphozyten nicht vorkommt und zeigt daher die unspezifische Bindung an.

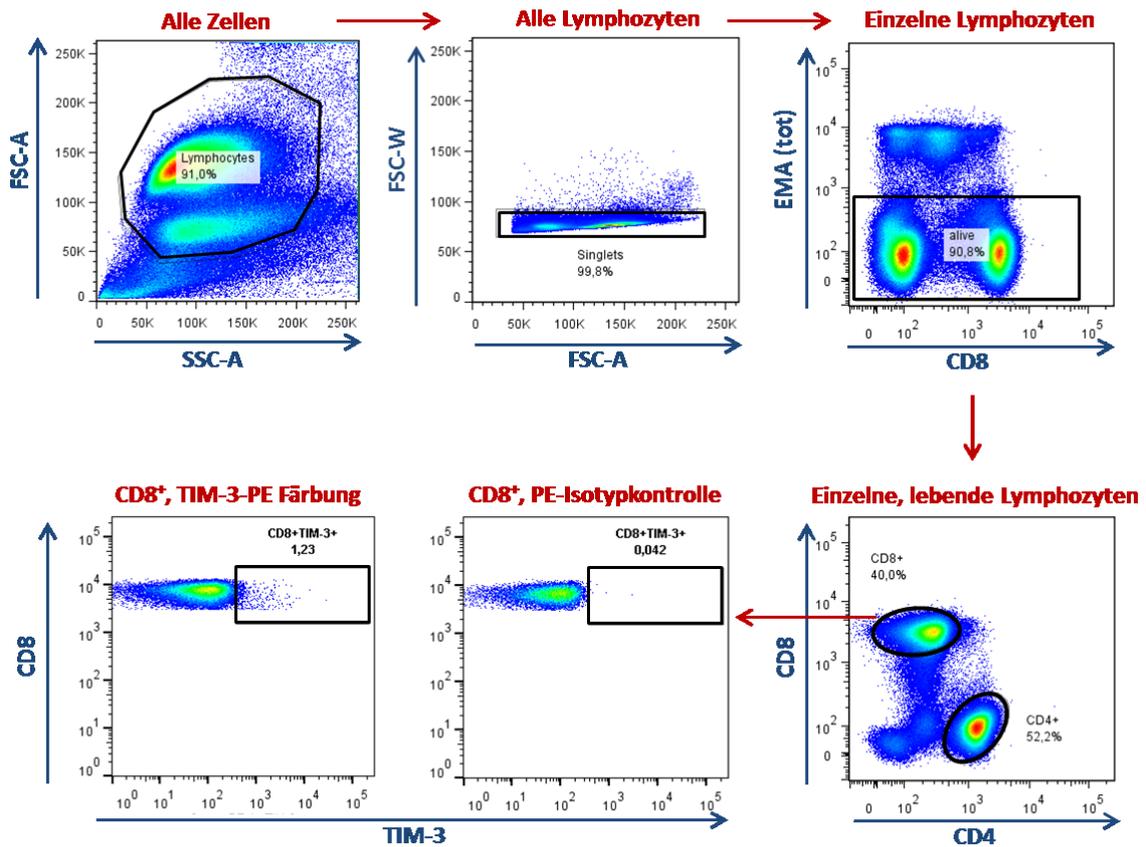


Abbildung 24: Gating Strategie. FSC: Forward Scatter, SSC: Sideward Scatter, A: Area, W: Width

Als TAA-reaktiv wurden solche Zellen angesehen, die mehr Zytokin produzierten als Zellen, die mit IgG behandelt wurden (siehe Abbildung 25). Bei der Berechnung der Prozentwerte TAA-spezifischer T-Zellen wurde der Wert der Zytokin-positiven Zellen in der Negativkontrolle (= Unspezifische Aktivität der Zellen in der jeweiligen Probe) vom Wert Zytokin-positiver Zellen nach Stimulation mit TAA abgezogen.

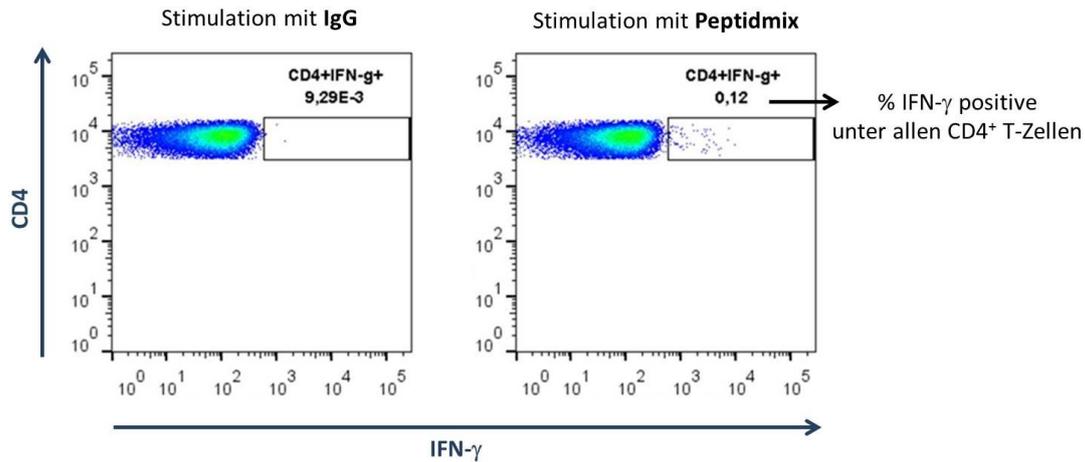


Abbildung 25: Gating der Zytokin-sezernierenden Zellen anhand der Negativkontrolle.

5.2.8 Statistik

Die ELISpot und Treg Spezifitätsassays wurden in Triplikaten durchgeführt. Es wurde stets ein Signifikanzniveau von 5 % ($p < 0,05$) verwendet. Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Graph Pad Prism Software, Version 6.

Im ELISpot Assay wurde die Anzahl der Spots in den jeweiligen Testlöchern (Peptid) mit der Anzahl der Spots in den Kontrolllöchern (IgG) verglichen. Der Unterschied wurde mit Hilfe eines ungepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Test auf dessen statistische Signifikanz untersucht. Waren zudem in den Löchern mit TAA stimulierten Zellen im Mittel zweimal so viele Spots wie in der Negativkontrolle, so wurden die T-Zellen als TAA-spezifisch definiert. Um die Übersichtlichkeit der kumulativen Abbildungen zu verbessern, wurde für jeden einzelnen Patienten der Mittelwert aller einzeln getesteten Peptide gebildet. Da die Datenpunkte in den kumulativen Darstellungen vielmehr exponential als normal verteilt waren, wurden zur statistischen Analyse alle Einzeldaten zunächst logarithmisch transformiert. Die Berechnung der statistischen Signifikanz in unterschiedlichen Patientengruppen erfolgte mit dem ungepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Test. Die Daten vor und nach der Depletion von Treg wurden mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Tests auf eine signifikante Veränderung hin untersucht. Der Anteil von Datenpunkten, der oberhalb eines bestimmten Wertes lag, wurde mit dem Exakten Fisher-Test auf signifikante Unterschiede verglichen. Um die Korrelation von zwei Parametern auf deren Signifikanz zu testen, wurden lineare Regressionsanalysen angewandt. Die Kriterien zur Bestimmung der Stärke der Korrelation sind in Tabelle 2 aufgezeigt.

Tabelle 2: Kriterien zur Bestimmung der Stärke der Korrelation anhand des Korrelationskoeffizienten. Nach www.strath.ac.uk/aer/materials/4dataanalysisineducationalresearch/unit4/correlationsdirectionandstrength/.

Wert des Korrelationskoeffizienten	Stärke der Korrelation
1	perfekt
0,8 – 0,9	sehr stark
0,5 – 0,8	stark
0,3 – 0,5	mittel
0,1 – 0,3	mäßig
> 0,1	schwach
0	Null

Für die Analyse des Treg Spezifitätsassays wurde die mittlere Proliferation in den Ansätzen mit Testpeptiden mit der mittleren Proliferation in der Negativkontrolle verglichen. Die Unterschiede wurden mit einem ungepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Test auf Signifikanz geprüft. War die Proliferation in den Test-Löchern signifikant niedriger als in den Kontroll-Löchern, so wurde definiert, dass der/die getestete Patient/in Treg besitzt, die spezifisch für dieses getestete Antigen sind.

Kumulative FACS Daten wurden, je nach Verteilung der Datenpunkte, mittels eines ungepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Test oder des Mann-Whitney Tests analysiert. Gepaarte Analysen erfolgten mit dem ungepaarten zweiseitigen Student'schen-*t*-Test oder Wilcoxon Test.

6. Ergebnisse

6.1 T-Zellen gesunder Mütter sind gegen zahlreiche TAA gerichtet

Ob und wie viele T-Zellen ein Mensch besitzt, die gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) reagieren kann mit Hilfe des Interferon- γ (IFN- γ) ELISpots gemessen werden. Dabei werden dendritische Zellen aus Vorläuferzellen aus dem Blut des Probanden differenziert und mit Polypeptiden von TAA versetzt. Fragmente dieser TAA können sie dann den T-Zellen präsentieren. Erkennen diese das Antigen wieder, weil sie bereits Kontakt mit ihm hatten, reagieren sie mit der Sekretion des Zytokins IFN- γ , welches pro Zelle im ELISpot als blauer Punkt sichtbar wird. Inwiefern TAA-spezifische Treg diese Reaktion unterdrücken, kann man messen, in dem man die Treg mit magnetischen Antikörpern markiert und über einen Magneten entfernt

In Abbildung 26 sind repräsentative Ergebnisse des IFN- γ ELISpot Assays mit Blutproben zweier gesunder Spenderinnen dargestellt. In Abbildung 26 A ist das Resultat einer Frau ohne Kinder (Nullipara) zu sehen. Bei ihr konnten keine TAA-reaktiven T-Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 26 B ist das Ergebnis des gleichen Assays mit dem Blut einer Mutter abgebildet. In diesem Fall wurden signifikant mehr IFN- γ Spots in den Löchern gemessen, in denen den T-Zellen mit den TAA *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), *Heparanase 1* (HPA1), *Melanoma-associated antigen A3* (MAGEA3) und *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) stimuliert wurden.

Der ELISpot Assay wurde mit 30 gesunden Spenderinnen im Alter von 19 bis 58 Jahren durchgeführt. Ihr mittleres Alter lag bei 46 Jahren. Dabei handelte es sich um zehn Blutproben von Nullipara und 20 Blutproben von Müttern, die ein negatives Ergebnis bei der mammographischen Untersuchung der Brust erhalten hatten.

Um auszuschließen, dass positive Tests überwiegend dann auftraten, wenn ein niedriger Hintergrund für die Kontrollen (IgG) gemessen wurde, haben wir die Spotzahlen aller negativ getesteten Spender mit denen aller positiv getesteten verglichen (Abbildung 27). Die Anzahl der Spots in den mit IgG versetzten Löchern ist in beiden Gruppen ähnlich hoch. Dagegen ist die T-Zell Reaktivität in den positiven gegenüber den negativen Tests mit TAA hoch signifikant erhöht.

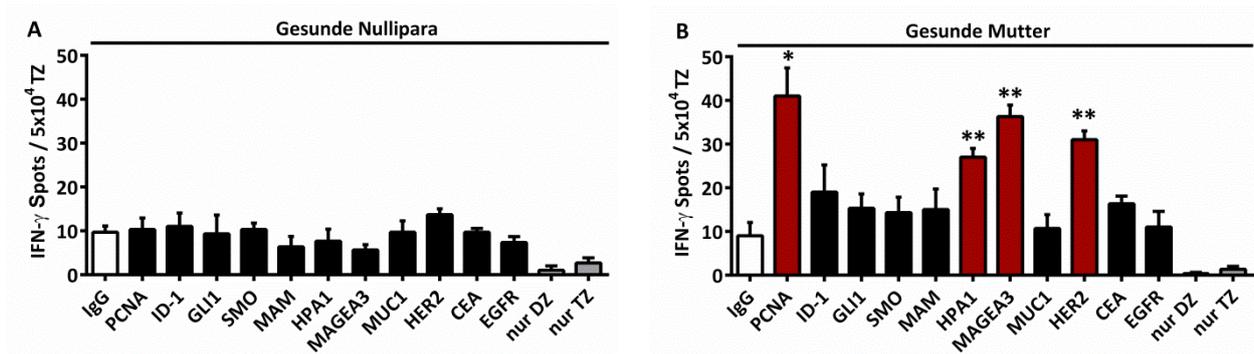


Abbildung 26: Repräsentative Ergebnisse von ELISpot Assays. Die Blutproben wurden von einer gesunden kinderlosen Frau (Nullipara, A) bzw. von einer gesunden Mutter (B) entnommen. Alle Tests wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert der gezählten IFN- γ Spots pro $5 \cdot 10^4$ T-Zellen je Loch + Standardfehler an. Die Werte für die Testantigene wurden mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests auf signifikante Abweichungen von den Werten der Negativkontrolle untersucht. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. Rote Balken zeigen einen positiven Test an, welcher durch eine signifikante ($p < 0,05$) und im Mittel mehr als zweifach erhöhte Spot-Anzahl in den Testlöchern (schwarze Balken) im Vergleich zu den Kontrolllöchern (weiße Balken) definiert wird. IgG: Immunglobulin G, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, ID-1: *Inhibitor of differentiation 1*, GLI1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*, SMO: *Smoothed*, MAM: *Mammaglobin-A*, HPA1: *Heparanase 1*, MAGEA3: *Melanoma-associated antigen A3*, MUC1: *Mucin 1*, HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*, CEA: *Carcinoembryonic antigen*, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*, DZ: Dendritische Zellen, TZ: T-Zellen.

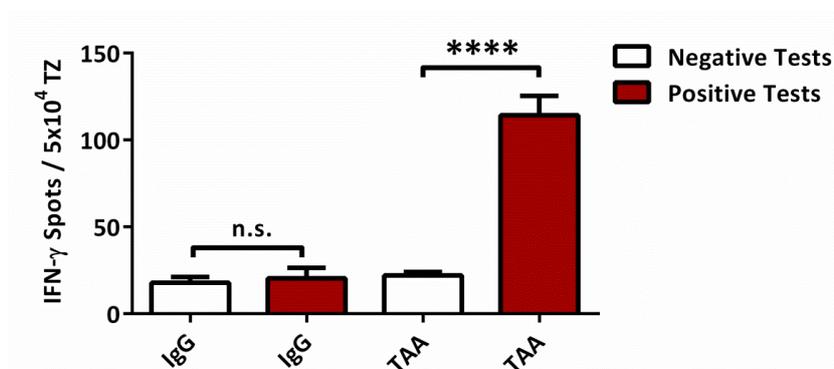


Abbildung 27: Positive Testresultate entstehen nicht aufgrund niedrigerer Spotzahlen in der Negativkontrolle. Kumulative Darstellung der Spot-Anzahl aller mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen, vor der Depletion von Treg. Die Mittelwerte der Spot-Anzahl in der Negativkontrolle (IgG) wurden für Spender ohne (weiß) und mit (rot) positiven Testresultaten aufgeteilt. Die Mittelwerte der Spots für die einzeln getesteten Antigene + Standardfehler wurden als negative (weiß) oder positive (rot) Testresultate getrennt voneinander dargestellt. Zum Vergleich der mittleren Anzahl von Spots in negativen und positiven Tests wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test herangezogen. ****: $p < 0,0001$. TAA: Tumor-assoziierte Antigene, TZ: T-Zellen.

In Abbildung 28 sind die ELISpot-Ergebnisse aller getesteten Nullipara und Mütter zusammengefasst. In keiner der kinderlosen Frauen wurden TAA-reaktive T-Zellen nachgewiesen, auch nicht nach der Depletion regulatorischer T-Zellen. Unter den getesteten Blutproben von Müttern weisen hingegen 80% eine T-Zell-Reaktion gegen mindestens eines der elf Test-Antigene auf. In beiden Testgruppen führte eine Depletion von Treg lediglich zu einer marginalen Erhöhung der Aktivität von T-Effektorzellen.

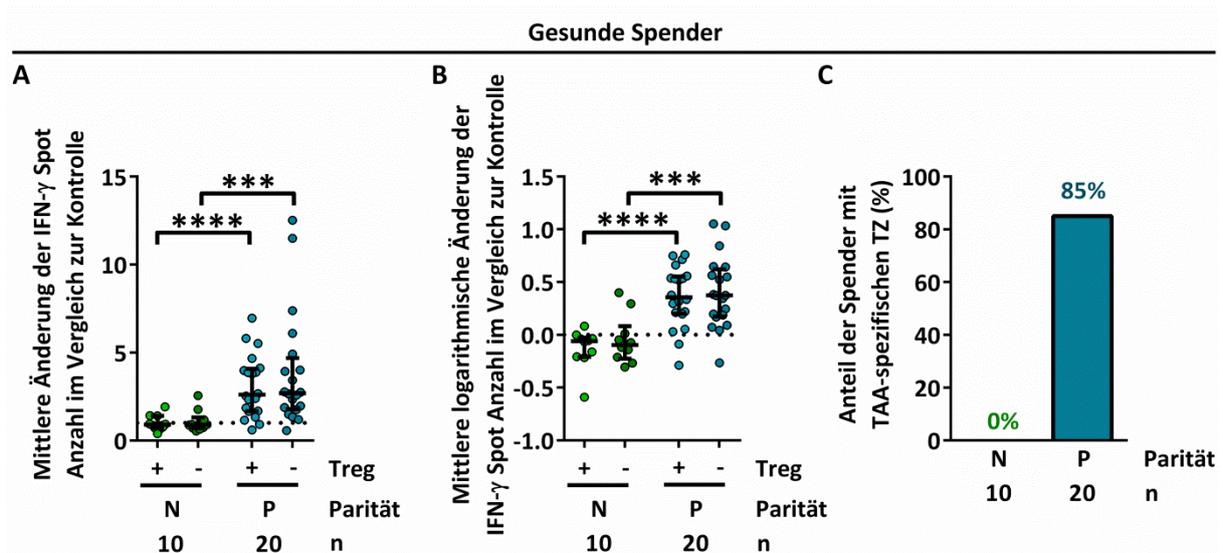


Abbildung 28: Unter gesunden Frauen sind Anti-TAA reaktive T-Zellen nur in Müttern nachweisbar. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach dem Paritätsstatus der Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. **A:** Mittlere Änderung der Spot-Anzahl in den Tests im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Um eine Gleichverteilung der Datenpunkte zu erhalten, erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz mit logarithmierten Werten (**B**). Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. **C:** Prozentualer Anteil der Spender mit mindestens einem positiv getesteten Antigen in der Treg-undepletierten Zellfraktion. N: Nullipara, P: Para, TZ: T-Zellen, n: Anzahl der Studienteilnehmer.

Die Reaktivität TAA-spezifischer T-Zellen korreliert nicht mit dem Alter der Spenderinnen (Abbildung 29).

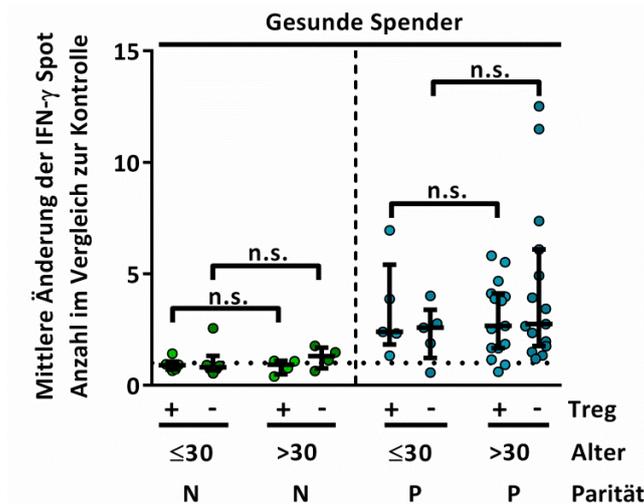


Abbildung 29: Die Anti-TAA Reaktivität von T-Zellen ist unabhängig vom Alter der Spender. Kumulative ELISpot-Ergebnisse gesunder Spenderinnen, aufgeteilt nach dem Alter der Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. N. s.: Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$). N: Nullipara, P: Para.

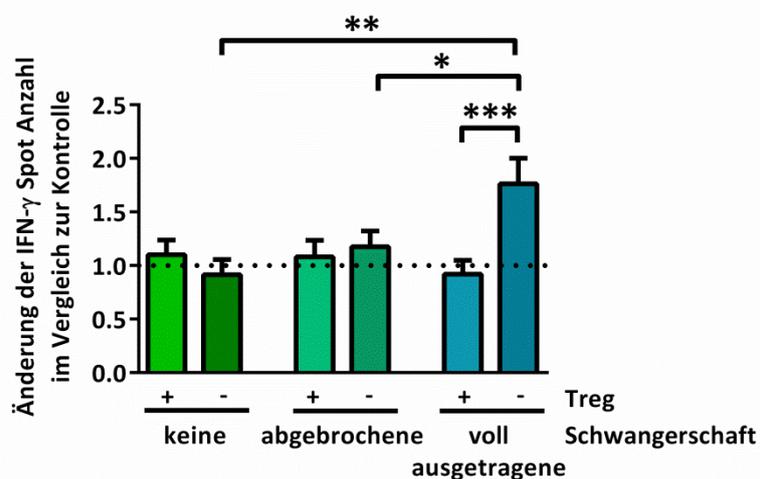


Abbildung 30: Analysen mit Blutproben eineiiger Drillinge bestätigen die Abhängigkeit des Auftretens TAA-reaktiver T-Zellen vom Paritätsstatus. Ergebnisse der ELISpot-Analysen mit Blutproben von eineiigen Drillingen mit unterschiedlicher reproduktiver Vergangenheit. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle für jedes Testantigen + Standardfehler. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Während die statistische Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in der selben Blutprobe mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den Schwestern unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Das Auftreten eineiiger Drillinge ist ein sehr seltenes Ereignis. Glücklicherweise hatten wir die Möglichkeit Blutproben von eineiigen Drillingsschwestern im Alter von 56 Jahren zu erhalten, bei denen jede eine andere reproduktive Vergangenheit aufwies. Eine davon hatte nie versucht schwanger zu werden. Die zweite hatte einen Kinderwunsch, aber kein Kind geboren. Zwei Mal wurde eine Schwangerschaft im Eileiter festgestellt, die daher beide Male abgebrochen werden musste. Die dritte der Schwestern hat ein gesundes Kind zur Welt gebracht. Die Resultate der ELISpot-Analysen sind in Abbildung 30 zu sehen. Tatsächlich wurden TAA-spezifische T-Zellen nur in der Schwester detektiert, die ein Kind hat. Allerdings wurden diese erst nach der Depletion regulatorischer T-Zellen aktiv.

Die erste Niederkunft mancher Mütter, die für diese Studie Blut spendeten, lag mehr als 30 Jahre zurück. Daher wollten wir herausfinden, ob die Zeitspanne nach der ersten Geburt Auswirkungen auf die Stärke der Immunantwort gegen die TAA hat. Um einen möglichen Zusammenhang darzustellen, wurden die Mittelwerte aus allen getesteten Antigenen pro Spenderin gegen die Zeit nach der letzten Niederkunft aufgetragen (Abbildung 31). Hierbei wird deutlich, dass selbst 38 Jahre nach der ersten Geburt noch robuste T-Zell Antworten gegen TAA gemessen werden können.

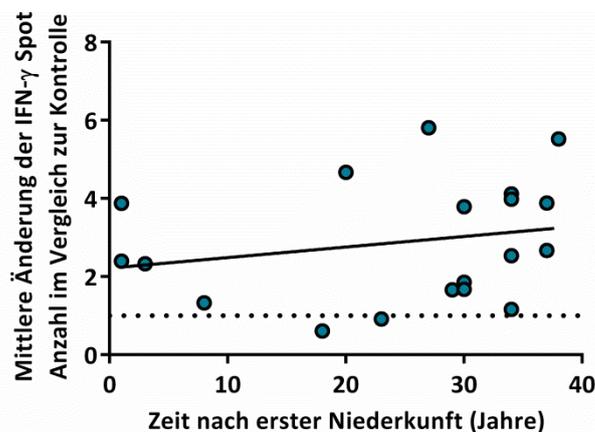


Abbildung 31: TAA-reaktive T-Zellen sind über Jahrzehnte nach der Niederkunft in Müttern nachweisbar. Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen in Abhängigkeit von der Zeit nach der ersten Niederkunft vergangenen Zeit zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Studienteilnehmer wurden über das Geburtsdatum ihres ältesten Kindes befragt, welches anschließend vom Geburtsdatum des Spenders subtrahiert wurde. Dieser Wert wurde gegen die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade berechnet.

Es ist bekannt, dass das Brustkrebsrisiko von Frauen, die in einem jungen Alter mehrere Kinder geboren und diese zudem lange Zeit gestillt haben, am geringsten ist (siehe 4.2.1.3). Deshalb haben wir untersucht, ob die Reaktivität TAA-spezifischer T-Zellen mit einem dieser Parameter korreliert. Jedoch weisen Multipara keine stärkeren T-Zell Reaktionen auf als Primipara (Abbildung 32).

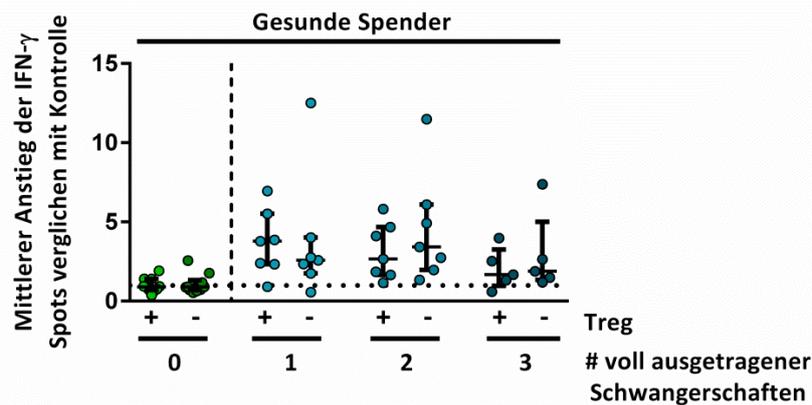


Abbildung 32: Die Anzahl der Lebendgeburten hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Reaktivität TAA-spezifischer T-Zellen. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach der Anzahl voll ausgetragener Schwangerschaften der Spenderinnen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

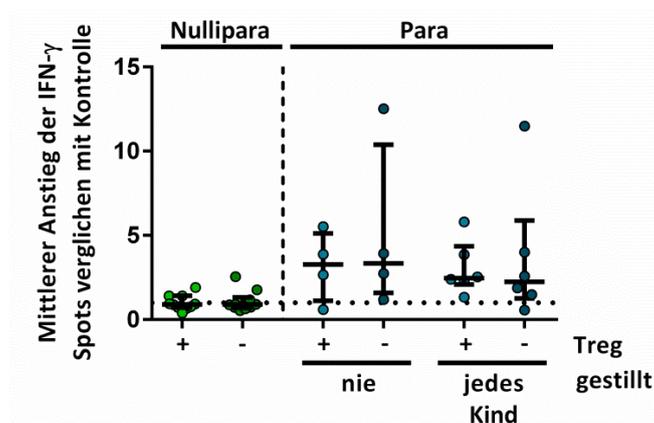


Abbildung 33: Die Anti-TAA-Reaktivität von T-Zellen ist unabhängig vom Stillverhalten der Spenderinnen. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen. In diesem Graphen sind nur Daten von Spendern aufgeführt, die entweder keines oder jedes ihrer Kinder gestillt haben. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Auch Frauen, die sämtliche ihrer Kinder gestillt haben, besitzen keine stärkeren T-Zell Antworten gegen TAA, als Frauen, die nie gestillt haben (Abbildung 33).

Aus epidemiologischen Untersuchungen geht hervor, dass nur Mütter, die vor ihrem 25. Lebensjahr gebären, ein andauernd erniedrigtes Brustkrebsrisiko haben (Albrektsen *et al.* 2005). Anhand von Daten des statistischen Bundesamtes (Abbildung 34 A) wird allerdings deutlich, dass das Alter von Erstgebärenden stetig ansteigt. Dennoch korreliert die Anti-Tumor Reaktivität der T-Zellen von Müttern nicht mit deren Alter bei der ersten Niederkunft (Abbildung 34 B).

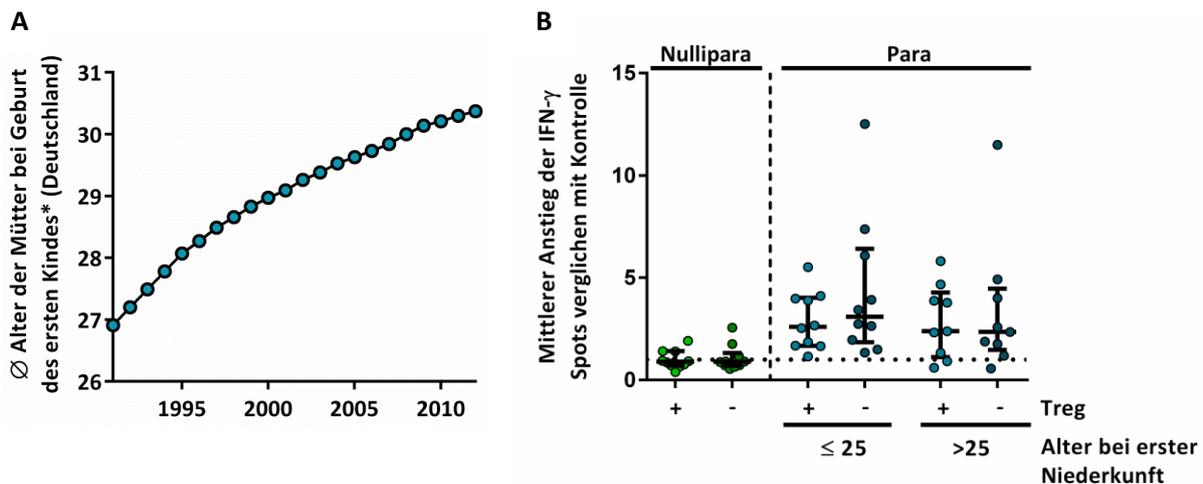


Abbildung 34: Die Anti-TAA-Reaktivität von T-Zellen korreliert nicht mit dem Alter der Spender bei der Geburt ihres ersten Kindes. **A:** Durchschnittliches Alter von Frauen in Deutschland bei der Geburt ihres ersten Kindes von 1991 bis 2012. *: Die Daten enthalten nur Lebendgeburten. Die Werte sind freundlicherweise vom statistischen Bundesamt zur Verfügung gestellt worden. **B:** Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach dem Alter der Mütter zum Zeitpunkt der Geburt ihres ersten Kindes. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. N. s.: Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$).

6.2 TAA-spezifische T-Zellen werden in den ersten Schwangerschaftsmonaten induziert

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Mütter T-Zellen besitzt, die gegen Tumor-assoziierte Antigene reagieren. T-Zellen kinderloser Frauen weisen hingegen eine derartige Reaktivi-

tät nicht auf. Die Frage, wann TAA-spezifische T-Zellen induziert werden, ist jedoch noch offen. Die Induktion könnte während der Schwangerschaft, in der Stillzeit, während oder nach der Involution der Brust geschehen. Daher haben wir zusätzlich Blutproben von 29 gesunden Erstgebärenden während und nach der Niederkunft entnommen. Dabei wurden folgende Zeitpunkte zur Entnahme festgelegt: In Schwangerschaftswoche 12 und 21, innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt, also vor dem Milcheinschuss, sowie vier Wochen später. Auch mit diesen Proben wurden IFN- γ ELISpot Analysen durchgeführt.

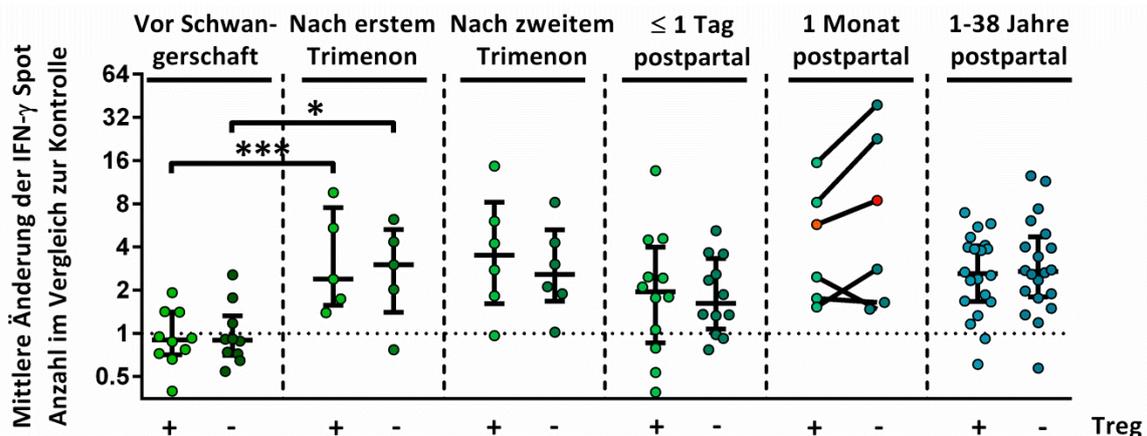


Abbildung 35: TAA-spezifische T-Zellen treten bereits im ersten Schwangerschaftstrimenon auf und werden in der Stillzeit teilweise von Treg unterdrückt. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender durchgeführten ELISpot-Analysen. Es wurden zusätzlich Blutproben von Frauen während und nach ihrer ersten Schwangerschaft untersucht. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Von vier Spendern konnten sowohl direkt nach der Geburt, als auch vier Wochen später Blutproben entnommen werden. Von den übrigen Spendern wurde nur eine Probe zu einem der Zeitpunkte erhalten. Die Veränderungen der T-Zell Reaktivität nach der Depletion von Treg aus Blutproben von Müttern vier Wochen nach der Niederkunft sind mit Verbindungslinien dargestellt. Rote Datenpunkte stellen die Ergebnisse der Spenderin dar, die ihr Kind nicht gestillt hat. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach der Depletion von Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht, besitzen alle der getesteten Frauen bereits nach dem ersten Schwangerschaftstrimenon TAA-reaktive T-Zellen. Die T-Zell Reaktivität nimmt im Laufe des zweiten Trimesters leicht zu und ist nach der Geburt wieder etwas verringert. Bis zum Milcheinschuss wirkt sich die Depletion $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eher nachteilig auf die Antwort gegen TAA aus. Während der Stillphase („1 Monat postpartal“) wurde jedoch in vier von sechs Spendern eine verstärkte IFN- γ Sek-

rektion nach der Depletion regulatorischer T-Zellen gemessen. Diese ist besonders bei Spendern mit sehr starken T-Zell Reaktionen beobachtet worden und trat auch bei einer Spenderin auf, die ihr Kind nicht gestillt hatte (rote Datenpunkte in Abbildung 35).

6.3 Starke Immunreaktionen gegen TAA werden durch Treg abgeschwächt

Von vier Erstgebärenden haben wir zu zwei Zeitpunkten Blutproben erhalten. Die Entwicklung der T-Zell Antworten mit der Zeit und die Suppression der IFN- γ Sekretion durch Treg werden für jede Spenderin einzeln in Abbildung 36 gezeigt. In keiner der Blutproben, die unmittelbar nach der Geburt entnommen wurden, bewirkte die Depletion von Treg eine deutlich verstärkte Anti-TAA Reaktivität. Nach vierwöchigem Stillen hingegen hatte sich nach der Treg-Depletion die T-Zell Reaktivität in den ersten beiden Proben mehr als verdoppelt. Insgesamt trat die außerordentlich starke Suppression durch Treg vor allem dann auf, wenn die Reaktion gegen TAA sehr ausgeprägt war (siehe Erstgebärende 1 und 2).

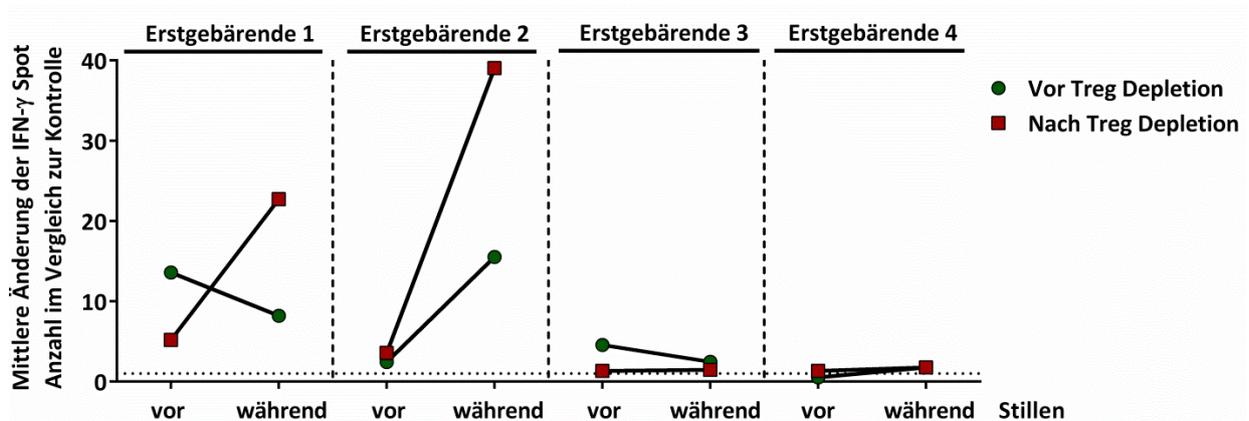


Abbildung 36: Starke Anti-TAA-Reaktionen, die nach der Geburt des ersten Kindes auftreten können, werden durch Treg unterdrückt. Ergebnisse der IFN- γ ELISpot Analysen von Blutproben, welche direkt nach der Geburt ihres ersten Kindes und nach vier Wochen Stillzeit von den gleichen Probanden entnommen wurden. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Jeder Assay wurde vor (grün) und nach (rot) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt.

Die Antigen-spezifität der regulatorischen T-Zellen wurde, sofern das Zellmaterial ausreichte, für jede Blutprobe parallel zu den ELISpot Analysen untersucht. Hierfür wurde der Treg Spezifitätsassay angewendet, der in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde.

Bei diesem Test wird gemessen, ob eine antigenspezifische Aktivierung der isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen stattfindet, welche dann in der Unterdrückung der Proliferation polyklonal aktivierter „konventioneller“ T-Zellen resultiert. Zwei unterschiedliche Ergebnisse dieses Assays sind in Abbildung 37 dargestellt. Die in A abgebildete Probe enthielt keine TAA-spezifischen Treg. In keinem der Test-Triplikate wurde eine gegenüber der Negativkontrolle (IgG) erniedrigte Proliferation der polyklonal aktivierten Tcon gemessen. Die Kontrolle „ohne Treg“ bestätigt hingegen, dass die Vermehrung der Zellen nicht aufgrund eines Mangels an Platz oder Nährstoffen zum Erliegen kam. Bei der anderen Spenderin (B) konnten hingegen regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden, welche für die Antigene *Glioma-associated oncogene homolog 1* (GLI1), Heparanase 1 (HPA1) und Mucin 1 (MUC1) spezifisch sind.

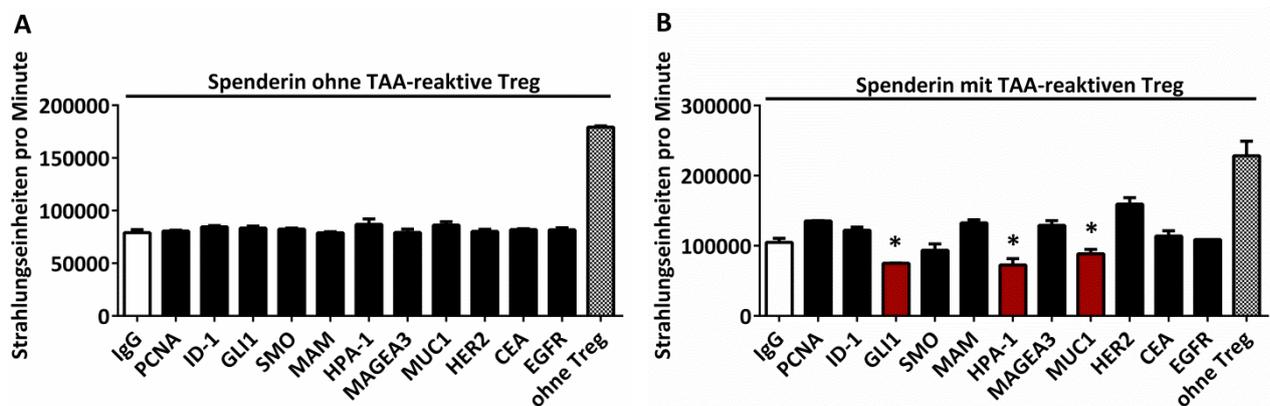


Abbildung 37: Repräsentative Ergebnisse von Treg Spezifitätsassays mit negativen und positiven Testresultaten. Alle Tests wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert der Strahlungseinheiten pro Minute + Standardfehler an. Die radioaktive Strahlung ist direkt proportional zur Zellteilung. Die Werte in den Testlöchern wurden mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests auf signifikante Abweichungen von den Werten der Negativkontrolle untersucht. *: $p < 0,05$. Rot eingefärbte Balken zeigen einen positiven Test an, welcher durch eine signifikant niedrigere ($p < 0,05$) Zellproliferation in den Testlöchern im Vergleich zu den Kontrolllöchern definiert wird. Eine Positivkontrolle („ohne Treg“) diente der Überprüfung der Zellteilungsaktivität der polyklonal aktivierten und von Treg depletierten T-Zellen. IgG: Immunglobulin G, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, ID-1: *Inhibitor of differentiation 1*, GLI1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*, SMO: *Smoothed*, MAM: *Mammaglobin-A*, HPA1: *Heparanase 1*, MAGEA3: *Melanoma-associated antigen A3*, MUC1: *Mucin 1*, HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*, CEA: *Carcinoembryonic antigen*, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*, Treg: regulatorische T-Zellen.

Die Ergebnisse der Treg Spezifitätsassays mit den Blutproben gesunder Probanden sind in Abbildung 38 dargestellt. Hier ist der Anteil der getesteten Antigene aufgetragen, der pro Patient positiv getestet wurde. In jeder Testgruppe wurden in einem Anteil der Probanden TAA-spezifische Treg nachgewiesen. Dieser Anteil war bei Müttern in der Stillphase und später signifikant höher, als während und unmittelbar nach der Schwangerschaft. Die drei Blutproben von den Frauen in der Stillphase sind die

gleichen, bei denen eine hohe Reaktivität im ELISpot Assay aufgezeigt wurde, welche nach der Depletion regulatorischer T-Zellen nochmals deutlich anstieg (Abbildung 35, davon die höchsten drei Datenpaare in der Gruppe „1 Monat postpartal“). Auch bei der Frau, die ihr Kind nicht gestillt hatte, wurden Treg mit Spezifitäten für mehrere TAA entdeckt.

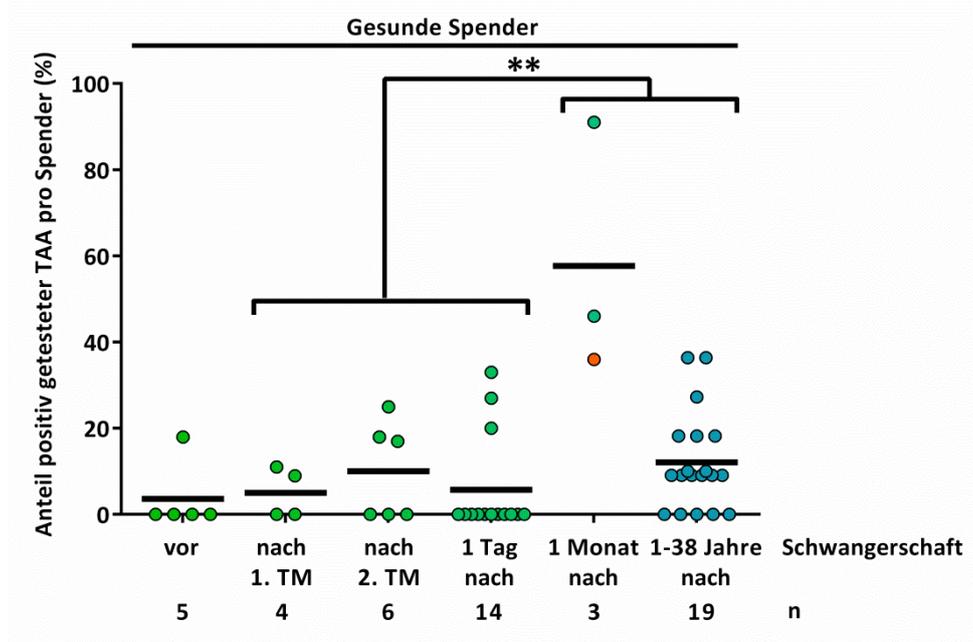


Abbildung 38: Der Anteil der von Treg erkannten Antigene steigt während der Stillzeit an. Kumulative Ergebnisse des Treg Spezifitätsassays mit Blutproben gesunder Spender. Für jede Probandin wurde der prozentuale Anteil der positiv getesteten Antigene aufgetragen. Das Verhältnis von Frauen mit und ohne TAA-reaktiven Treg wurde mit Hilfe des Exakten Fisher-Tests verglichen. Um einen größeren Anzahl an Tests zu erhalten, wurden hierfür jeweils die Resultate der Gruppen während und unmittelbar nach der Schwangerschaft, sowie zur Stillzeit und danach zusammengefasst. **: $p < 0,01$. Das Ergebnis der Spenderin, die ihr Kind nicht gestillt hat, ist in orange dargestellt. Der Mittelwert (horizontale Linie) soll der Anschaulichkeit dienen. TM: Trimenon, n: Anzahl der Spender.

6.4 Bei Brustkrebspatienten ist die Anti-Tumor-Immunität von Nullipara schwächer als von Müttern

Um zu untersuchen, inwiefern sich die während und nach der Schwangerschaft induzierten Immunantworten gegen TAA auf die Anti-Tumor-Immunität bei Brustkrebspatienten auswirkt, wurden Blutproben von 102 Frauen mit Brustkrebs entnommen. Diese waren zwischen 28 und 80 Jahre alt und ihr mittleres Alter lag bei 56 Jahren. 59 hatten ein duktales Karzinom *in situ*, wobei es sich um eine präinvasive Form von Brustkrebs handelt, und 43 Frauen ein invasives Mammakarzinom. Die Blut-

entnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Operation. Es wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die bis zum Zeitpunkt des Eingriffs keine Chemo- oder Strahlentherapie erhalten hatten. Zudem wurden die Probanden hinsichtlich der Anzahl ihrer Lebendgeburten, sowie zur Stilldauer befragt. Sobald der histopathologische Befund vorlag, wurden für jede Probe Angaben zu Tumorart, -stadium, -grad, Lymphknotenstatus und der Expression der Tumormarker ER, PR, HER2 und Ki67 vermerkt (siehe Kapitel 4.2.2).

Die Resultate der ELISpot Analysen sind in Abbildung 39 zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass auch in Nullipara TAA-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden können, wenn ein Mammakarzinom entstanden ist. Interessanterweise wurden in Proben von Müttern mit DCIS niedrigere T-Zell Antworten gemessen als bei gesunden Müttern oder Para mit invasivem Brustkrebs. Die stärksten Reaktivitäten gegen TAA wurden in Müttern mit invasivem Mammakarzinom detektiert. Bei der Betrachtung der Daten ist zu beachten, dass zum Zwecke der Übersichtlichkeit die x-Achse logarithmisch dargestellt wurde.

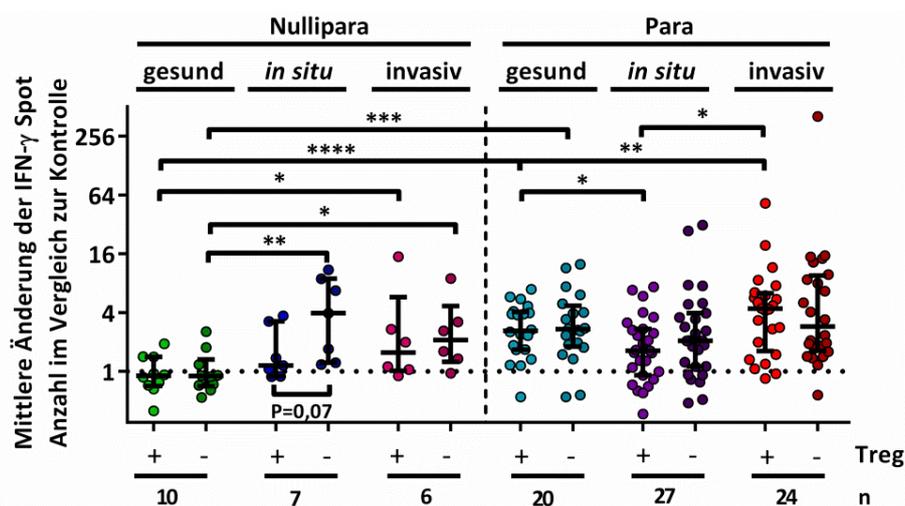


Abbildung 39: Anti-TAA reaktive T-Zellen werden auch bei Brustkrebserkrankungen induziert. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender, Frauen mit duktalem Karzinom *in situ* und invasivem Brustkrebs durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach Paritätsstatus der Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Median mit Interquartilabstand abgebildet. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Um eine Gleichverteilung der Datenpunkte zu erhalten, erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz mit logarithmierten Werten. Während die Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$, n: Anzahl der Studienteilnehmer.

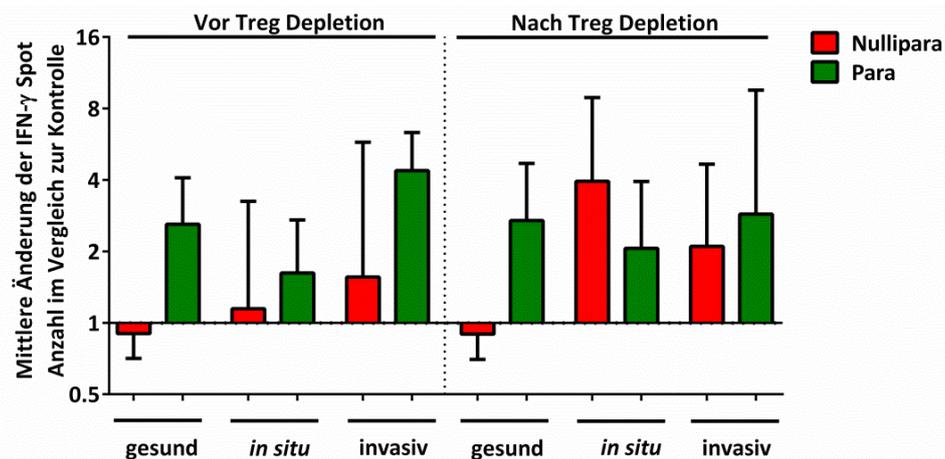


Abbildung 40: Unter Frauen mit Brustkrebs haben Mütter stärkere Anti-TAA T-Zell-Reaktionen als Nullipara. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender, Frauen mit duktalem Karzinom *in situ* und invasivem Brustkrebs durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach dem Paritätsstatus der Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Es handelt sich um die gleichen Werte wie in Abbildung 39. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die Resultate von Nullipara (rot) und Para (grün) direkt nebeneinander gestellt. Dargestellt ist der Median der mittleren Änderung der Spot-Anzahl in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle + Interquartilabstand. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt.

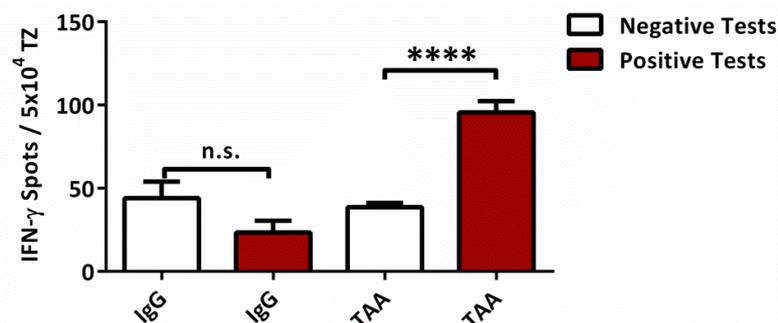


Abbildung 41: Die basale T-Zell Reaktivität von Erstgebärenden und Brustkrebspatienten hat keinen Einfluss auf die Testergebnisse. Kumulative Darstellung der Spot-Anzahl aller mit Blutproben von Erstgebärenden, Patienten mit DCIS und invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELISpot-Analysen, beschränkt auf die Treg-undepletierte Fraktion der T-Zellen. Die Mittelwerte der Spot-Anzahl in der Negativkontrolle (IgG) wurden für Spender ohne (weiß) und mit (rot) positiven Testresultaten aufgeteilt. Die Mittelwerte der Spots für die einzeln getesteten Antigene + Standardfehler wurden als negative (weiß) oder positive (rot) Testresultate getrennt dargestellt. Zum Vergleich der mittleren Anzahl von Spots in negativen und positiven Tests wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test herangezogen. ****: $p < 0,0001$. TAA: Tumor-assoziiertes Antigen, TZ: T-Zellen.

Um den Vergleich der Immunantworten von Nullipara und Para zu vereinfachen, sind diese in Abbildung 40 direkt nebeneinander dargestellt. Anhand der Mediane wird deutlich, dass auch unter den Brustkrebspatientinnen Mütter über die stärkeren Immunantworten gegen TAA verfügen. Die Reaktivität der T-Zellen von Para mit invasivem Karzinom ist fast drei Mal höher als die der Nullipara. Bei

den Frauen ohne Kinder, die an einem DCIS erkrankt sind, wird zudem ein drastischer Anstieg der Anti-Tumor-Antwort nach der Depletion regulatorischer T-Zellen deutlich.

Auch für sämtliche Messungen, die mit Blutproben von Primipara und Tumorpatienten durchgeführt wurden, kann bestätigt werden, dass positive Testresultate im ELISpot Assay nicht aufgrund niedriger Spotzahlen in der Negativkontrolle entstanden sind (Abbildung 41).

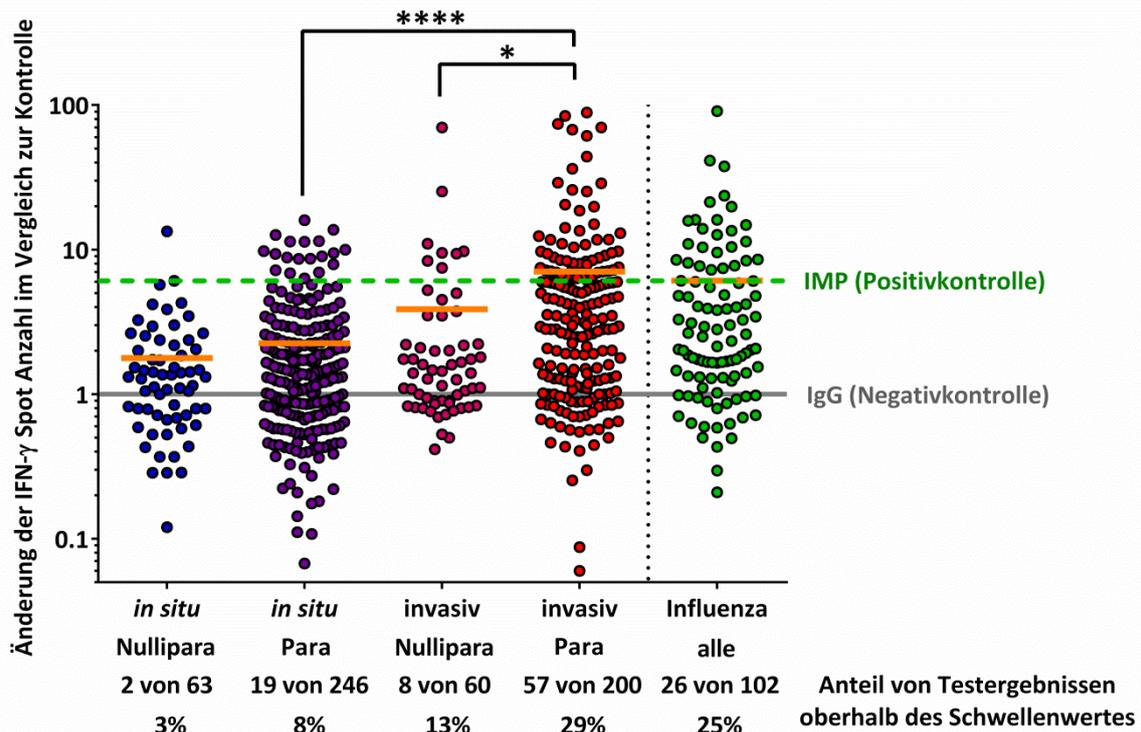


Abbildung 42: Unter den Brustkrebspatienten zeigen Mütter die stärksten T-Zell-Reaktionen gegen TAA. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben gesunder Spender, Frauen mit duktalem Karzinom *in situ* und invasivem Brustkrebs durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach Paritätsstatus der Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Als Positivkontrolle für starke Immunreaktionen sind die Ergebnisse der mit einem Peptid des Influenza Matrix Proteins (IMP) stimulierten Proben beigefügt. Dargestellt ist die mittlere Änderung der Spot-Anzahl pro Antigen in Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Als besonders intensive T-Zell Antworten wurden solche definiert, die oberhalb des Mittelwertes für IMP liegen (Schwellenwert, grüne gestrichelte Linie). Der Anteil der starken Immunantworten gegen TAA wurde mit Hilfe des Exakten Fisher-Tests verglichen. *: $p < 0,050$, ***: $p < 0,0001$. Mittelwerte sind in Orange dargestellt. Die graue Linie zeigt den Wert der Negativkontrolle (IgG) an.

Um die Stärke der T-Zell Antworten gegen TAA einordnen zu können, wurden zusätzlich Messungen mit einem *Recall*-Antigen durchgeführt. Hierfür wurde ein Polypeptid aus der Sequenz eines Virusäulnenproteins des Influenza Virus gewählt: Das Influenza Matrix Protein (IMP). Dieses wurde als zusätzliches Testantigen im ELISpot Assay verwendet. Als besonders starke T-Zell Antworten wurden solche

betrachtet, die oberhalb des Mittelwertes der Messungen mit IMP liegen (Abbildung 42). Die bei Müttern mit invasivem Brustkrebs gemessenen Immunreaktionen gegen TAA waren im Mittel ein wenig stärker als die mittlere T-Zell Antwort gegen das Influenza-Peptid. In kinderlosen Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom konnten hingegen signifikant weniger starke Anti-TAA Reaktionen nachgewiesen werden. Die T-Zellen von Müttern mit DCIS produzierten nach der Stimulation mit TAA signifikant seltener große Mengen an IFN- γ als die von Para mit einer invasiven Krebserkrankung. Bei Nullipara mit DCIS wurden nur selten starke Immunreaktionen gemessen.

Zur Untersuchung der Unterschiede in der T-Zell Reaktivität gegen bestimmte Antigene zwischen den Probandengruppen wurde jedes TAA einzeln getestet. Die aus den ELISpot Analysen resultierenden Ansprechraten sind in Abbildung 43 illustriert. Generell haben gesunde Mütter bei fast allen TAA die höchste Ansprechrate. Mehr als zwei Drittel dieser Probandinnen besitzen T-Zellen, die spezifisch für Mammaglobin-A sind. Im Vergleich zu den Krebspatientinnen weisen gesunde Para zudem öfter Immunreaktionen gegen Mucin 1 und MAGE-A3 auf. Weiterhin fällt auf, dass in keiner der Blutproben von Müttern mit *in situ* Karzinom T-Zell Reaktionen gegen Mammaglobin-A oder HER2 gemessen wurden.

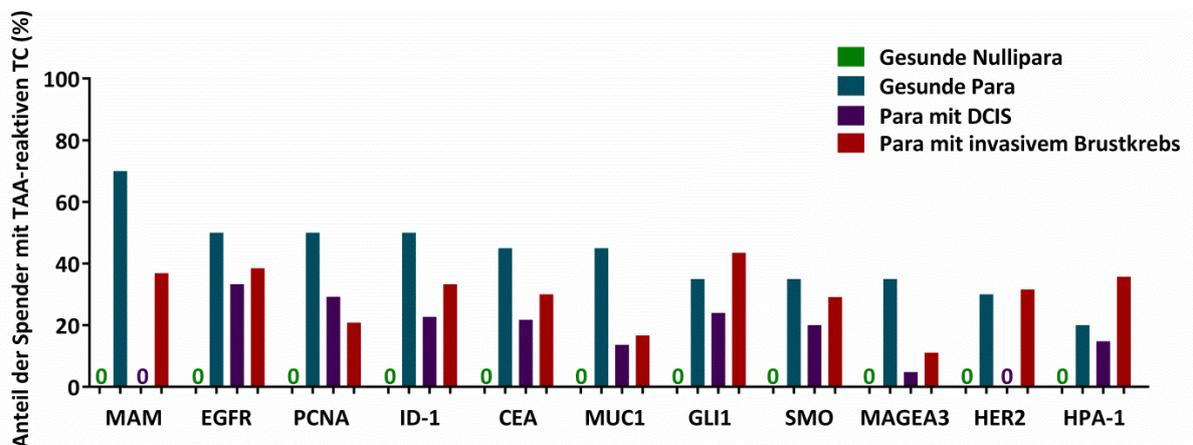


Abbildung 43: TAA werden am häufigsten von T-Zellen gesunder Mütter erkannt. In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil der Spender gezeigt, bei dem eine positive T-Zell Reaktion gegen die verschiedenen TAA festgestellt wurde. MAM: Mammaglobin-A, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, ID-1: *Inhibitor of differentiation 1*, CEA: *Carcinoembryonic antigen*, MUC1: *Mucin*, GLI1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*, SMO: *Smoothed*, MAGEA3: *Melanoma-associated antigen A3*, HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*, HPA-1: *Heparanase 1*.

6.5 T-Zell Reaktionen gegen TAA sind unabhängig von biologischen Tumoreigenschaften

Da hochgradige Tumoren stark von gesundem Gewebe abweichen, wollten wir zudem untersuchen, ob sich die Anti-Tumor Reaktivität von T-Zellen mit steigendem Tumorgrad verändert. Anhand der kleinen Probenmenge werden jedoch keine signifikanten Unterschiede deutlich (Abbildung 44).

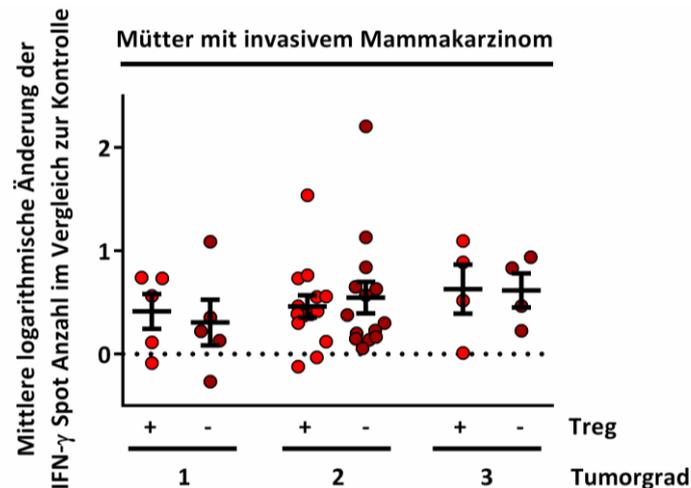


Abbildung 44: Bei Brustkrebspatienten ist die T-Zell-Reaktivität gegen TAA unabhängig vom Tumorgrad. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von Patienten mit invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELI-Spot-Analysen, aufgeteilt nach dem histopathologisch ermittelten Tumorgrad. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen berechnet und mit dem Standardfehler abgebildet. Die gepunktete Linie zeigt eine mittlere Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle ($\log(1)=0$) an. Während die statistische Signifikanz der Abweichung vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Auch das Tumorstadium könnte sich auf die Immunantwort auswirken, da bei einer stärkeren Tumorklast eine größere Menge an Tumorantigenen zu erwarten ist. Des Weiteren könnte das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen die Präsentation von TAA verstärken. Dennoch unterscheiden sich die Daten auch im Hinblick auf das Stadium nicht wesentlich (Abbildung 45).

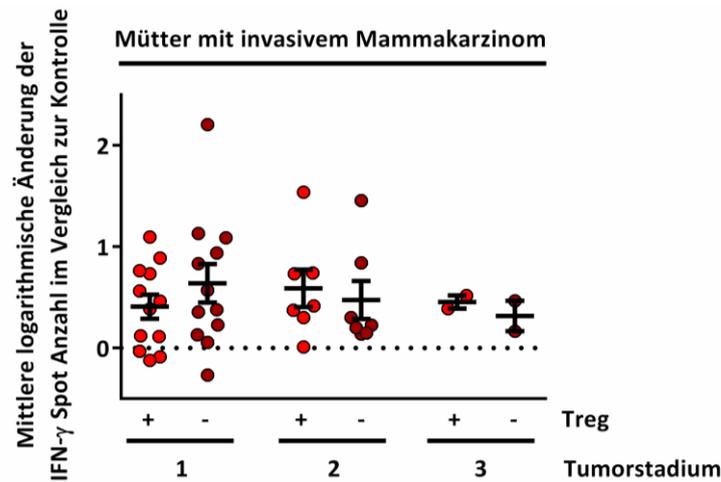


Abbildung 45: Auch das Tumorstadium scheint sich nicht auf die T-Zell-Reaktivität gegen TAA auszuwirken. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von Patienten mit invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELI-Spot-Analysen, aufgeteilt nach dem Tumorstadium. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen berechnet und mit dem Standardfehler abgebildet. Die gepunktete Linie zeigt eine mittlere Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle ($\log(1)=0$) an. Während die statistische Signifikanz der Abweichung vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t -Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen t -Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen der Brust (siehe Abschnitt 4.2.2.3). Aus diesem Grund wäre es möglich, dass das Immunsystem unterschiedlich stark auf die verschiedenen Subgruppen reagiert. Die im ELISpot gemessene Stärke der T-Zell Reaktionen weicht jedoch zwischen den Subgruppen kaum ab (Abbildung 46).

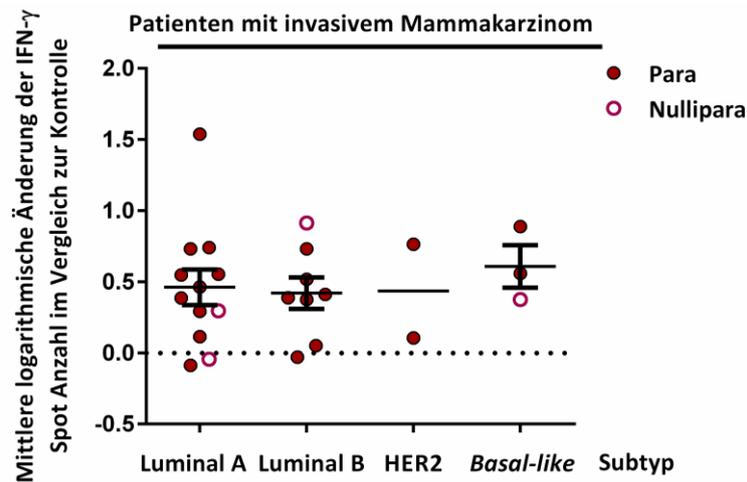


Abbildung 46: Ebenso scheint die T-Zell-Reaktivität gegen TAA nicht vom Subtyp des Mammakarzinoms abzuhängen. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von Patienten mit invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach dem immunohistochemisch ermittelten Tumorsubtyp. Dargestellt ist die mittlere logarithmische Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Pro Spender wurde der Mittelwert aus allen getesteten Antigenen gebildet. Dieser entspricht einem Datenpunkt in der Abbildung. Zudem ist der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet. Die gepunktete Linie zeigt eine mittlere Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle ($\log(1)=0$) an. Während die Signifikanz der Abweichung vor(+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

HER2 ist ein Tumor-assoziiertes Antigen, dessen Expressionsstärke im entnommenen Gewebe von Mammakarzinompatienten routinemäßig analysiert wird. Daher kann die Anti-HER2 Reaktivität der vom Patienten entnommenen T-Zellen ohne weitere Experimente mit der Expression des Antigens in dessen Tumor verglichen werden. Anhand der Ergebnisse in Abbildung 47 wird deutlich, dass HER2 spezifische T-Zellen in Patienten mit HER2 „negativen“ Tumoren genauso vertreten sind wie in Frauen, deren Tumor den Rezeptor stark überexprimiert.

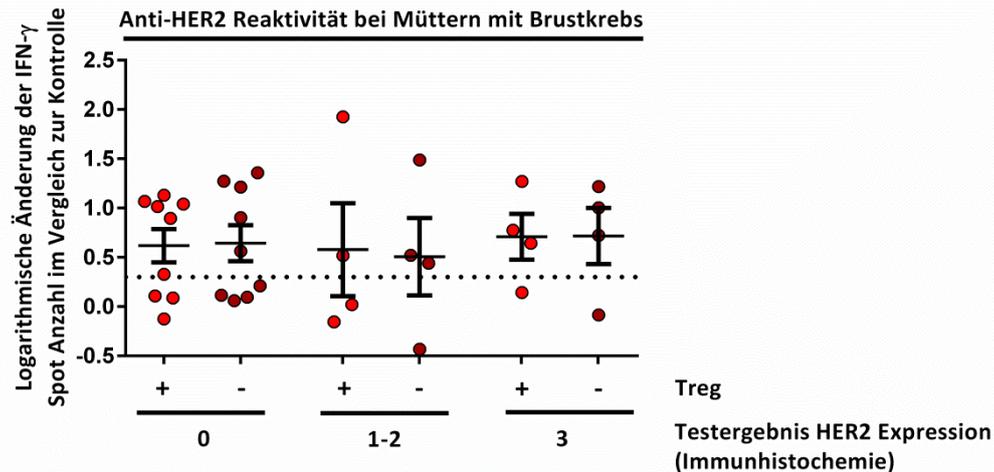


Abbildung 47: In Brustkrebspatienten mit HER2 „negativen“ und HER2 überexprimierenden Tumoren können ähnlich starke Anti-HER2 Reaktionen nachgewiesen werden. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von Müttern mit invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELISpot-Analysen mit HER2 als Testantigen, aufgeteilt nach der immunohistochemisch ermittelten Expressionsstärke des HER2 Rezeptors im Tumor. Dargestellt ist die mittlere logarithmische Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle. Zudem ist der Mittelwert mit Standardfehler abgebildet. Die gepunktete Linie zeigt eine zweifache Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle ($\log(2)=0,301$) an. Oberhalb dieser Linie befinden sich also die positiven Testresultate, sofern im *t*-Test eine signifikante Abweichung berechnet wurde. Während die Signifikanz der Abweichung vor(+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

6.6 Mütter mit Brustkrebs, die nicht gestillt haben, besitzen eine schwächere Anti-Tumor Immunität

Die Anzahl der Lebendgeburten bei gesunden Müttern hat keinen Einfluss auf die Stärke der Anti-TAA Reaktionen (Abbildung 32). Dies ist auch bei Müttern mit Mammakarzinom der Fall (Abbildung 48). Allerdings fällt auf, dass in den Proben von Frauen, die ihr Kind nicht gestillt haben (Abbildung 48 A), die niedrigsten T-Zell Reaktivitäten gemessen wurden.

Weiterhin wird deutlich, dass nach der Depletion regulatorischer T-Zellen in Proben von Nullipara eine signifikant verstärkte Reaktivität gegen TAA resultiert, wenn man die Daten von Patientinnen mit DCIS und invasivem Brustkrebs vereinigt (Abbildung 48). Dieser Unterschied besteht bei Müttern mit Brustkrebs nicht.

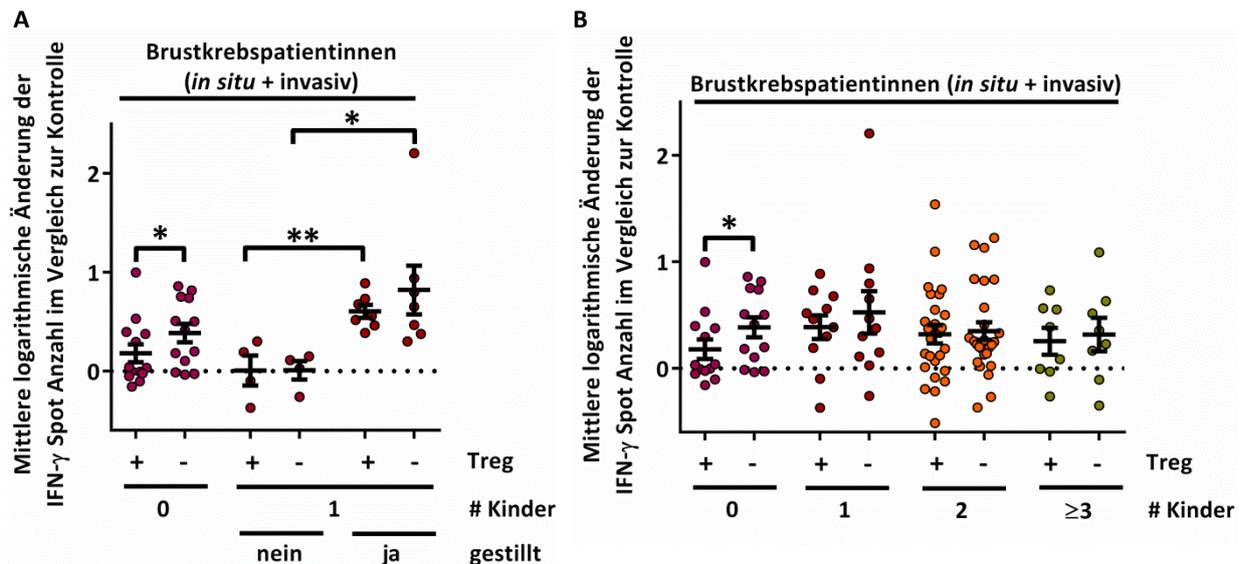


Abbildung 48: Bei Müttern mit Brustkrebs scheint das frühere Stillverhalten Einfluss auf die Anti-Tumor-Reaktivität zu nehmen. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von Frauen mit DCIS und invasivem Brustkrebs durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach der Anzahl der Lebendgeburten (B). In A sind die Ergebnisse nach dem Stillverhalten der Patienten aufgeteilt. Bei den Frauen, die nicht gestillt haben, handelt es sich um drei von vier DCIS Patientinnen und eine von sieben Müttern mit invasivem Karzinom. Pro Patient ist der Mittelwert aus der logarithmischen Änderung der Spotzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt. Für jede Gruppe ist zudem der Mittelwert \pm Standardfehler gezeigt. Während die statistische Signifikanz der Abweichung vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) in denselben Blutproben mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet wurde, erfolgte der Vergleich zwischen den verschiedenen Testgruppen unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

6.7 Besonders bei kinderlosen Brustkrebspatienten werden Anti-Tumor-Reaktionen von TAA-spezifischen Treg unterdrückt

Ob die Suppression durch Treg nur bei einzelnen TAA besonders hervortritt, wird anhand der Abbildung 49 deutlich. Während bei gesunden Frauen die IFN- γ Sekretion nicht verändert ist, nachdem regulatorische T-Zellen depletiert wurden, nimmt die Reaktivität der T-Zellen aus DCIS Patientinnen bei zahlreichen Antigenen zu. Vor allem bei den Nullipara wird nach der Treg Depletion die Immunantwort gegen jedes Antigen deutlich verstärkt. Dieser Effekt ist anhand der Daten für Frauen mit invasivem Karzinom nicht auszumachen.

Die bei Nullipara mit DCIS besonders ausgeprägte Suppression durch Treg spiegelt sich auch in den Ansprechraten auf die Tumor-assoziierten Antigene wider (Abbildung 50). Diese steigt nach der Depletion von Treg um ein Drittel an. Anhand der Grafik wird außerdem ersichtlich, dass T-Zellen von Nullipara mit invasivem Brustkrebs seltener auf TAA ansprechen als die von Müttern, die ebenfalls am invasiven Mammakarzinom erkrankt sind.

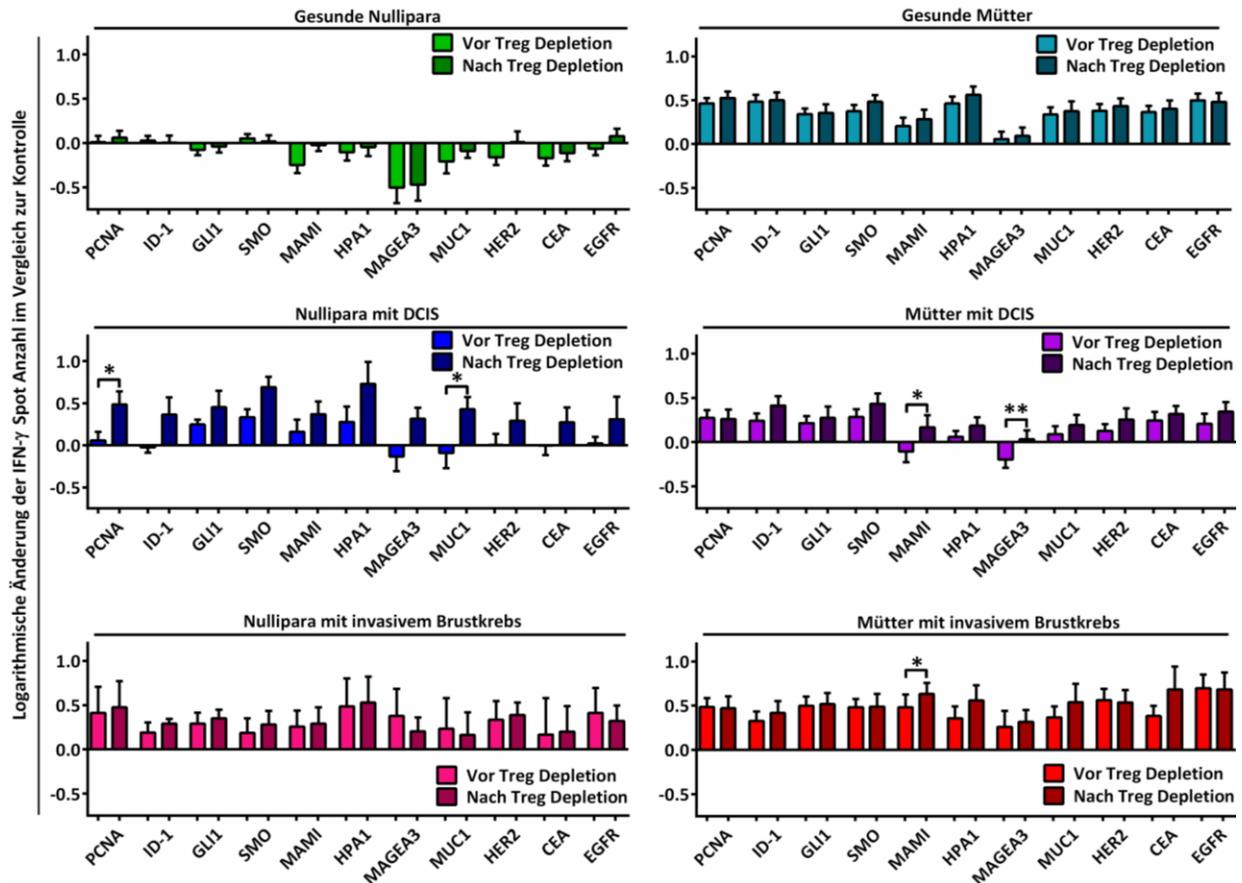


Abbildung 49: Die IFN- γ Sekretion durch TAA-reaktive T-Zellen wird vor allem in Nullipara mit DCIS von Treg unterdrückt. Kumulative Ergebnisse der mit Blutproben von gesunden Spendern, sowie von Patienten mit *in situ* und invasivem Mammakarzinom durchgeführten ELISpot-Analysen, aufgeteilt nach den einzelnen Testantigenen. Die Balken stellen den jeweiligen Mittelwert der logarithmische Änderung der Spot-Anzahl in den Testlöchern im Vergleich zur Negativkontrolle + Standardfehler dar. Jeder Assay wurde vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Abweichung vor und nach Depletion der Treg wurde mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

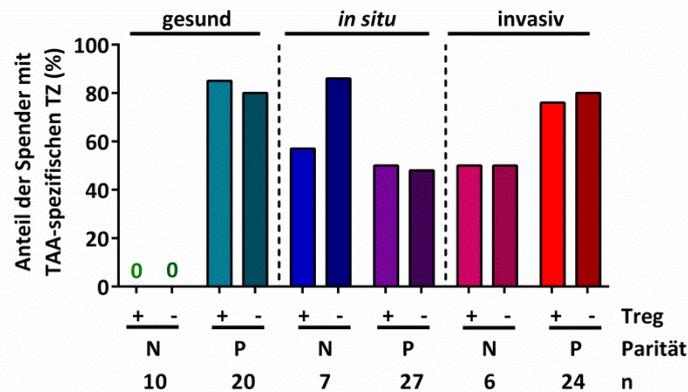


Abbildung 50: Die Kontrolle der TAA-spezifischen T-Zellen von Nullipara mit DCIS durch Treg spiegelt sich auch in der Ansprechrate wider. Dargestellt ist der Anteil von Spendern, der gegen mindestens ein Antigen TAA-reaktive T-Zellen ausweist. Für jede Spendergruppe ist die Ansprechrate vor (+) und nach (-) der Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) aufgetragen. N, Nullipara, P: Para, n: Anzahl der Spender.

Auch mit den Blutproben von den Mammakarzinompatienten wurde parallel der Treg Spezifitätsassay angewendet, um die Antigen-spezifität der regulatorischen T-Zellen zu bestimmen. Der Anteil der Antigene, die pro Patient von Treg erkannt wurden, ist in Abbildung 51 dargestellt. Dort ist zu sehen, dass gesunde Mütter zwar zum größten Teil TAA-spezifische Treg besitzen, jedoch werden von Treg aus Brustkrebspatienten mehr Antigene erkannt.

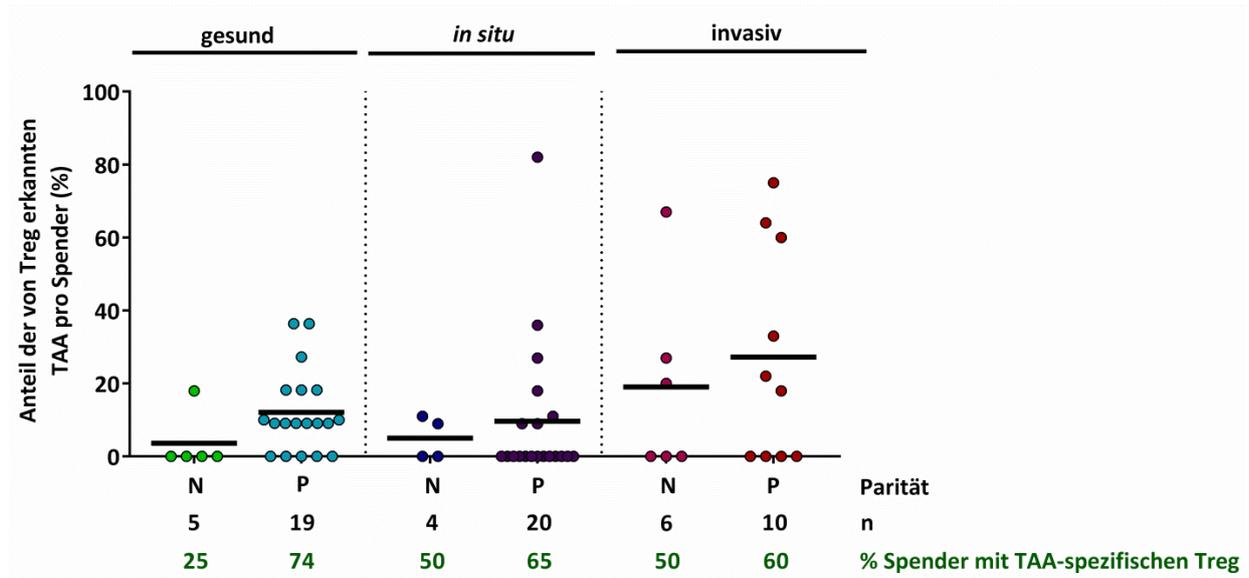


Abbildung 51: Bei Frauen mit invasivem Brustkrebs ist der Anteil der von Treg erkannten Antigene am größten. Kumulative Ergebnisse des Treg Spezifitätsassays mit Blutproben gesunder Spender, Patienten mit präinvasivem (DCIS) und invasivem Mammakarzinom. Für jede Probandin wurde der prozentuale Anteil der positiv getesteten Antigene aufgetragen. Der Verhältnis von Frauen mit und ohne TAA-reaktiven Treg wurde mit Hilfe des Exakten Fisher-Tests verglichen. Der Mittelwert (horizontale Linie) soll nur der Anschaulichkeit dienen. N: Nullipara, P: Para, n: Anzahl der Spender.

Während Treg gesunder Mütter meistens nur für ein bis zwei der elf getesteten Antigene spezifisch sind, reagieren Treg von Para mit invasivem Brustkrebs am häufigsten auf drei oder mehr TAA (Abbildung 52). Mütter mit DCIS besitzen hingegen seltener TAA-reaktive Treg.

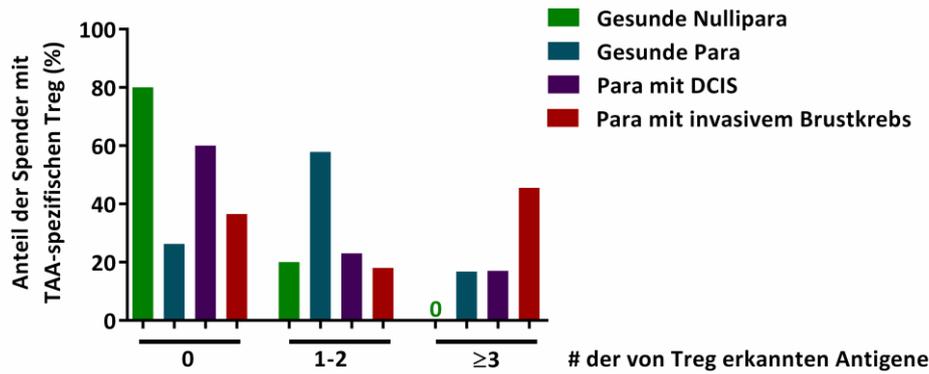


Abbildung 52: Patientinnen mit invasivem Brustkrebs haben Treg, welche für eine große Anzahl an TAA-spezifisch sind. In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil der Spender gezeigt, der eine positive Reaktion regulatorischer T-Zellen (Treg) gegen keines, einem bis zwei oder mindestens drei der getesteten TAA aufweist.

Das am häufigsten von Treg aus Müttern mit invasivem Brustkrebs erkannte Antigen ist Smoothened. Es wurde in zwei Dritteln der Patientinnen positiv getestet. Die zweit- und dritthäufigsten erkannten TAA sind Heparanase 1 und GLI1. GLI1 ist auch das Antigen, wofür die Treg gesunder Mütter am öftesten spezifisch sind. Bei Smoothened und ID-1 handelt es sich hingegen um TAA, die nur selten von Treg gesunder Mütter erkannt werden, aber während der Tumorgenese an Bedeutung gewinnen.

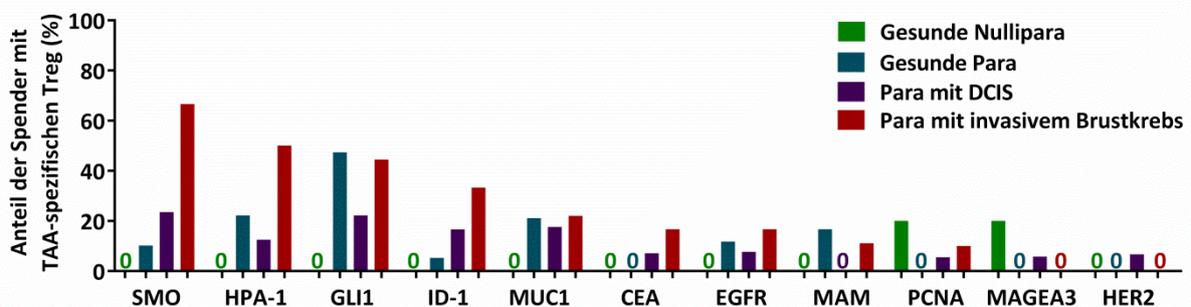


Abbildung 53: Mehr als die Hälfte der Patientinnen mit invasivem Brustkrebs hat Smoothened- und Heparanase-1-spezifische Treg. In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil der Spender gezeigt, der eine positive Reaktion regulatorischer T-Zellen (Treg) gegen die verschiedenen TAA aufweist. SMO: Smoothened, HPA-1: Heparanase 1, GLI1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*, ID-1: *Inhibitor of differentiation 1*, MUC1: Mucin 1, CEA: *Carcinoembryonic antigen*, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*, MAM: Mammaglobin-A, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, ID-1: *Inhibitor of differentiation 1*, MUC1: Mucin 1, CEA: *Carcinoembryonic antigen*, SMO: Smoothened, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*, MAGEA3: *Melanoma-associated antigen A3*, HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*.

Anhand der bislang gezeigten Ergebnisse wurde ersichtlich, dass die im ELISpot gemessene Erhöhung der IFN- γ Sekretion nach der Depletion von Treg nicht zwangsläufig mit einer signifikanten Suppression der Proliferation im Treg Spezifitäts-Assay einhergeht. Um die Zusammenhänge näher betrachten zu können, wurden daher die Ergebnisse beider Assays miteinander korreliert. Hierfür wurde für jede Blutprobe die im ELISpot Assay gemessene Änderung der T-Zell Reaktivität nach Treg Depletion gegen die prozentuale Suppression der Proliferation durch Treg im Treg Spezifitätsassay aufgetragen. Die Resultate sind in Abbildung 54 zu sehen. Während der Einfluss von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf die IFN- γ Sekretion und die Suppression „konventioneller“ T-Zellen von Müttern vier Wochen nach der Geburt ihres ersten Kindes und Para mit DCIS nicht korreliert, ergibt sich eine mäßige Korrelation bei gesunden Müttern lange Zeit nach der Geburt und bei Para mit DCIS. Eine sehr starke und statistisch signifikante Wechselbeziehung kann ausschließlich bei Nullipara mit Brustkrebs beobachtet werden. Die mittlere suppressive Aktivität von Treg ist hingegen bei allen getesteten Probandengruppen ähnlich stark (Abbildung 55).

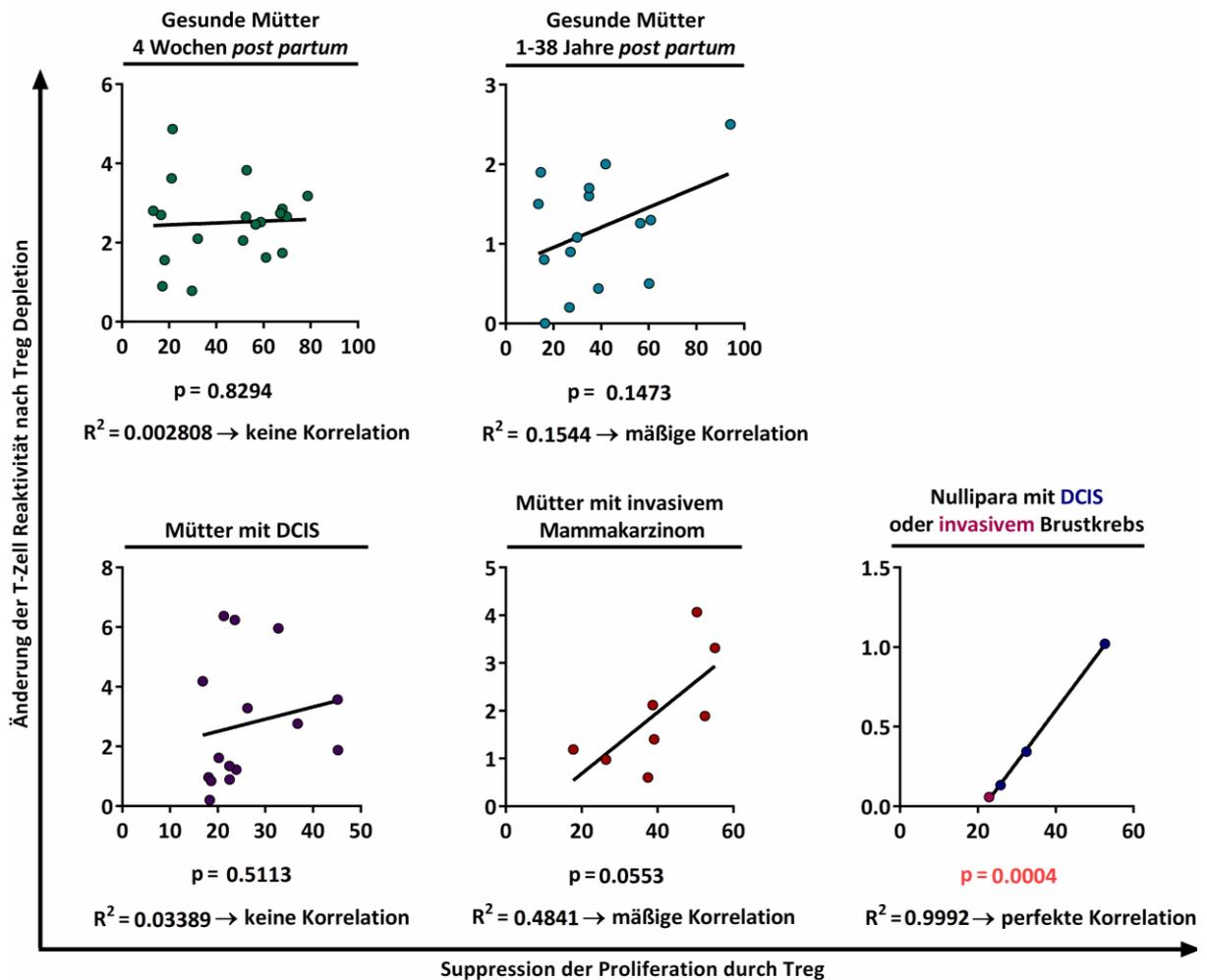


Abbildung 54: Bei Nullipara mit Brustkrebs korreliert die Suppression der IFN- γ Sekretion und der Proliferation von „konventionellen“ T-Zellen durch Treg am stärksten. In diesen Graphen werden nur Spender gezeigt, von denen gleichzeitig positive Testresultate im Treg Spezifitätsassay und Daten aus ELISpot Analysen vorliegen. Dafür wurde für jedes Testantigen die prozentuale Suppression der T-Zell-Proliferation durch regulatorische T-Zellen im Treg Spezifitätsassay gegen die relative Änderung der IFN- γ Spotanzahl nach der Depletion von Treg im ELISpot Assay aufgetragen. Zudem wurden eine lineare Regressionsgerade und deren Korrelationsquotient (R^2) berechnet. Der Wert für R^2 erlaubt eine Aussage darüber, wie sehr die beiden gemessenen Parameter voneinander abhängig sind.

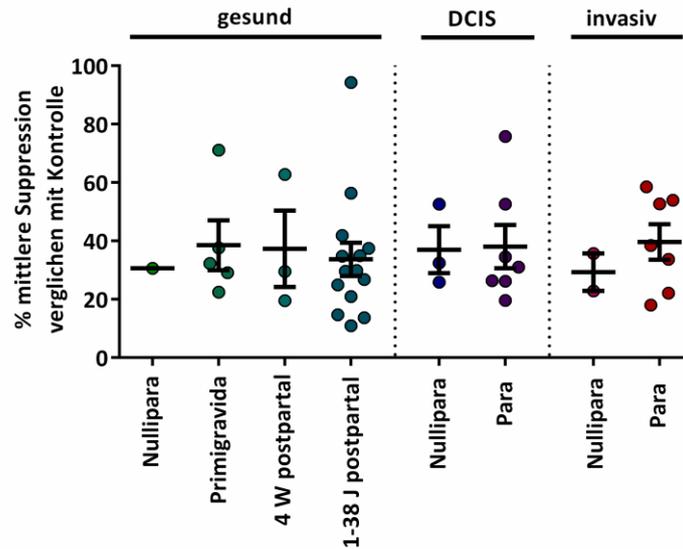


Abbildung 55: Die Suppressionsstärke TAA-spezifischer Treg ist in allen Versuchsgruppen vergleichbar. Aufgezeichnet ist die mittlere prozentuale Suppression der T-Zell Proliferation gegenüber der Negativkontrolle pro Spender. Zudem sind die Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Es sind nur Daten von den Spendern dargestellt, bei denen gegen mindestens ein Antigen ein positiver Test im Treg Spezifitätsassay vorliegt. In der Gruppe Primigravida sind die Ergebnisse aller Frauen während der ersten Schwangerschaft zusammengefasst. W: Wochen, J: Jahre.

Um zu untersuchen, ob sich die suppressive Leistung der Treg mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung verändert, haben wir die Resultate des Treg Assays nach dem Tumorstadium der Patienten aufgeteilt. Wie aus Abbildung 56 ersichtlich wird, unterdrücken Treg von Frauen im ersten Stadium die Proliferation von T-Zellen wesentlich stärker als die von Patienten in Stadium 2 und 3. Es fällt außerdem auf, dass dieser Unterschied bei den Müttern stärker ausgeprägt ist als bei den Nullipara.

Darüber hinaus wollten wir ermitteln, ob die Immuntoleranz durch TAA-spezifische Treg mit dem Alter zunimmt. Deshalb haben wir die Daten von gesunden Müttern im Hinblick auf deren Alter bei der Blutentnahme analysiert (Abbildung 57). Die Treg von Frauen im Alter von über 50 Jahren erkennen tendenziell mehr TAA als die der jüngeren. Der Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant.

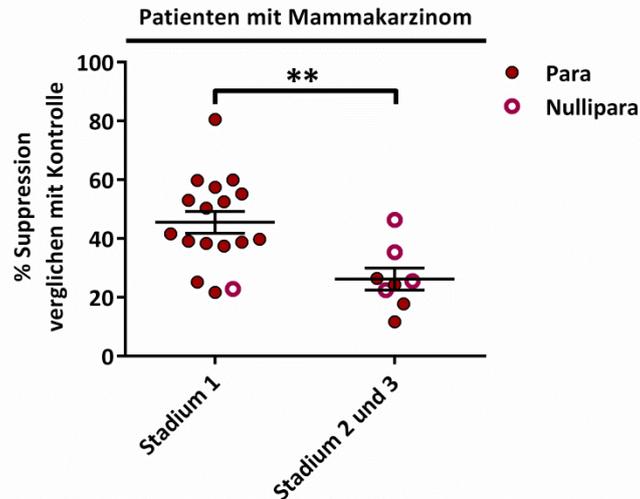


Abbildung 56: Bei Brustkrebspatienten mit fortgeschrittenem Stadium ist die Suppressionsstärke TAA-spezifischer Treg herabgesetzt. Aufgezeichnet ist die prozentuale Suppression der T-Zell Proliferation gegenüber der Negativkontrolle pro Antigen. Zudem sind die Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Es sind nur Daten von den Spendern eingeschlossen, bei denen gegen mindestens ein Antigen ein positiver Test im Treg Spezifitätsassay vorliegt. Zum Vergleich der beiden Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test verwendet. **: $p < 0,01$.

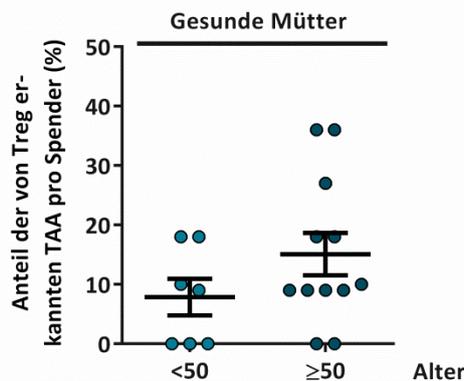


Abbildung 57: Der Anteil der von Treg gesunder Spender erkannten Antigene steigt mit dem Alter leicht an. Kumulative Ergebnisse des Treg Spezifitätsassays mit Blutproben gesunder Mütter, aufgeteilt nach dem Alter der Spender. Für jede Probandin wurde der prozentuale Anteil der positiv getesteten Antigene aufgetragen. Zum Vergleich der beiden Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test verwendet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

6.8 TAA-reaktive T-Zellen von Patienten mit DCIS produzieren große Mengen an TNF- α

Zur Charakterisierung der Anti-Tumor reaktiven T-Zellen, die anhand der ELISpot Analysen quantifiziert wurden, haben wir diese mit Hilfe eines Durchflusszytometers auf mehrere Eigenschaften hin untersucht. Zunächst wurde analysiert, ob sie neben IFN- γ auch IL-2 und TNF- α sezernieren.

Die T-Zellen aus den Blutproben wurden hierfür mit einem Mix aus Polypeptiden der TAA ID-1, Mammaglobin-A, MUC1 und Heparanase1 oder humanem IgG stimuliert. In jeder Probe wurde die Sekretion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α gleichzeitig bestimmt. Um den prozentualen Anteil TAA-spezifischer T-Zellen zu erhalten, wurde die Differenz aus den Zytokin sezernierenden Zellen in der Testprobe und der Negativkontrolle gebildet. Nach der Messung wurden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen separat analysiert.

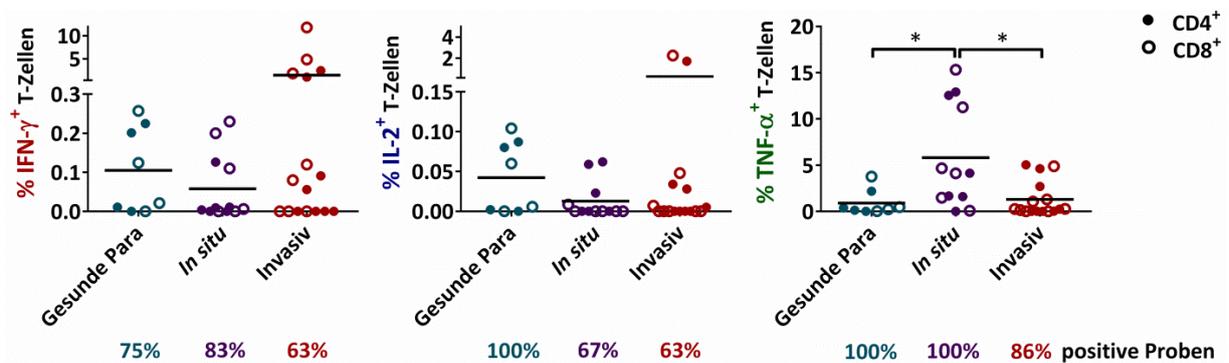


Abbildung 58: Patienten mit *in situ* Karzinom besitzen mehr T-Zellen, die nach der Stimulation mit TAA TNF- α freisetzen. Ergebnisse des Zytokinsekretionssassays. Jeweils $5 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden für 12 Stunden mit $1 \cdot 10^5$ TAA oder Kontrollantigen präsentierenden Dendritischen Zellen kokultiviert. Die nach weiteren 45 Minuten freigesetzten Zytokine wurden anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert. Es wurden Blutproben von vier gesunden Müttern, sechs DCIS Patientinnen und acht Frauen mit invasivem Mammakarzinom analysiert. Wenn entweder in der CD4⁺ oder CD8⁺ Fraktion TAA-spezifische T-Zellen nachgewiesen wurden, wurde die Probe als positiv bezeichnet. Mittelwerte sind als horizontale Linien dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede im Anteil Zytokin positiver Zellen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests berechnet. *: $p < 0,05$.

In Bezug auf die IFN- γ Sekretion sind die durchflusszytometrischen Analysen durchaus mit den Ergebnissen der ELISpot Assays vergleichbar: Die Menge TAA spezifischer T-Zellen ist in Frauen mit invasivem Mammakarzinom am höchsten. Zudem sind sie bei Patienten mit *in situ* Karzinom etwas weniger frequent als in gesunden Müttern (vergleiche Abbildung 39 mit Abbildung 58). Der im Freisetzungssassay ermittelte Anteil IFN- γ positiver Zellen ist dabei ähnlich wie im IFN- γ ELISpot: Werden

in einem Loch mit 50.000 T-Zellen beispielsweise 50 Spots gezählt, entspricht dies 0,1% IFN- γ positiver Zellen.

Interleukin-2 wurde nur in geringen Mengen nachgewiesen. Das Verhältnis IL-2 positiver T-Zellen innerhalb der Testgruppen war dabei ähnlich wie für IFN- γ . Interessanterweise stammten die höchsten Messwerte für IL-2 von der Probe einer Brustkrebspatientin, die keine Kinder hat (Abbildungen 58 und 59). Im Vergleich zu IFN- γ oder IL-2 wurden wesentlich mehr TNF- α sezernierende T-Zellen festgestellt. Auffällig war dabei, dass DCIS Patientinnen signifikant mehr TNF- α positive Zellen besitzen als gesunde Mütter oder Frauen mit invasivem Mammakarzinom. Dabei stammten die höchsten Datenpunkte sowohl von Nullipara als auch von Müttern (Abbildungen 58 und 59).

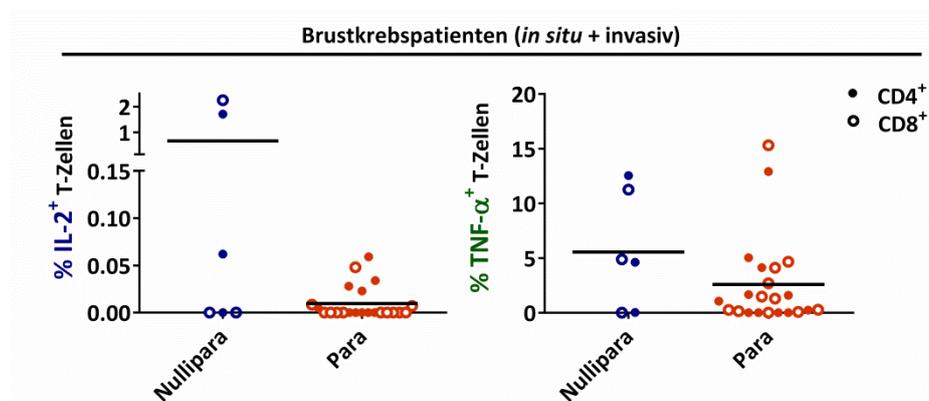


Abbildung 59: Die Frequenz IL-2 und TNF- α freisetzender TAA spezifischer T-Zellen in Brustkrebspatienten ist nicht von der Parität abhängig. Ergebnisse des Zytokinsekretionsassays aufgetrennt nach der Parität der Patientinnen. Unter den 14 Brustkrebspatientinnen sind elf Mütter und drei Nullipara. Eine der Frauen ohne Kinder hatte ein *in situ* und zwei ein invasives Karzinom. Die Signifikanz der Unterschiede im Anteil Zytokin positiver Zellen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

6.9 Polyfunktionelle TAA-spezifische T-Zellen existieren sowohl in gesunden Müttern, als auch in Brustkrebspatientinnen

Polyfunktionelle T-Zellen, also solche die mehrere Zytokine gleichzeitig produzieren, bieten einen besonders guten Langzeitschutz gegen Infektionen und eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Darrah *et al.* 2007, Wilde *et al.* 2012). Daher haben wir untersucht, ob die TAA-spezifischen T-Zellen aus gesunden Müttern und Brustkrebspatienten in der Lage sind IFN- γ , IL-2 und TNF-

α gleichzeitig freizusetzen. Hierfür haben wir analysiert, wie viele von den $\text{IFN-}\gamma^+$ TAA-reaktiven T-Zellen gleichzeitig auch positiv für IL-2 und $\text{TNF-}\alpha$ waren und welcher Anteil aller T-Zellen mit einer Polyzytokinantwort auf TAA reagiert (Abbildung 60). Das Vorkommen von T-Zellen, die alle drei Zytokine sezernieren, konnte in allen Probandengruppen festgestellt werden. Unter den Brustkrebspatientinnen waren Polyzytokinantworten sowohl in Para, als auch in Nullipara nachweisbar. Insgesamt wurden die größten Anteile polyfunktioneller T-Zellen in Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom gemessen.

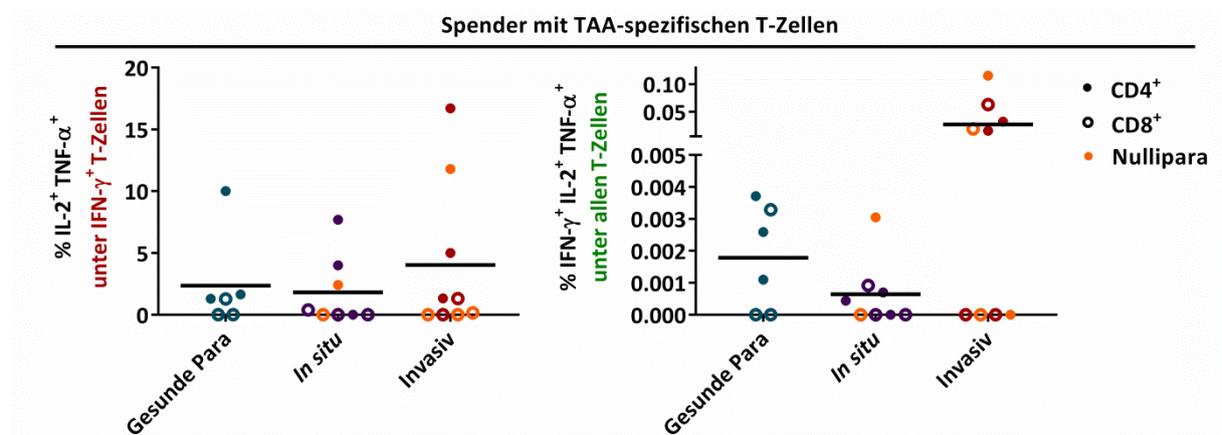


Abbildung 60: Polyzytokinantworten gegen TAA können in allen Probandengruppen detektiert werden. Ergebnisse des Zytokinsekretionsassays mit Beschränkung die auf Proben, die $\text{IFN-}\gamma^+$ TAA-spezifische T-Zellen enthielten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $\text{IFN-}\gamma^+$ IL-2^+ $\text{TNF-}\alpha^+$ T-Zellen unter den $\text{IFN-}\gamma^+$ TAA-spezifischen T-Zellen (links) und unter allen CD4^+ bzw. CD8^+ T-Zellen (rechts) mit Mittelwert. Datenpunkte von Nullipara sind in orange dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede im Anteil dreifach positiver Zellen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

6.10 Anti-Tumor reaktive T-Zellen sind überwiegend vom Effektor-Gedächtnis Subtyp

Im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems wird von T-Zellen ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut. Dieses kann lebenslang bestehen bleiben und führt dazu, dass beim zweiten Kontakt schneller und effizienter reagiert werden kann. Solche Gedächtniszellen unterliegen einem Entwicklungsprozess, wobei manche Typen von Gedächtniszellen langlebiger sind als andere.

Die T-Zellen der Probanden wurden nach der Stimulation mit dem TAA-Mix hinsichtlich ihres Gedächtnis-Phänotyps charakterisiert. Die $\text{IFN-}\gamma$ sezernierenden, und damit antigenspezifischen, T-Zellen erwiesen sich zum größten Teil als Effektor-Gedächtniszellen, während die gesamte T-Zell Po-

pulation des peripheren Blutes überwiegend naive T-Zellen enthält (Abbildungen 61 und 62). Da naive T-Zellen selbst nach 24-stündiger Stimulation mit einer Mischung aus Antikörper-gekoppelten Beads gegen CD3, CD2 und CD28 kein IFN- γ , IL-2 oder TNF- α sezernieren, T_{SCM} jedoch schon, handelt es sich bei den IFN- γ ⁺ CCR7⁺ CD45RO⁻ T-Zellen wahrscheinlich um T_{SCM} (Gattinoni *et al.* 2011).

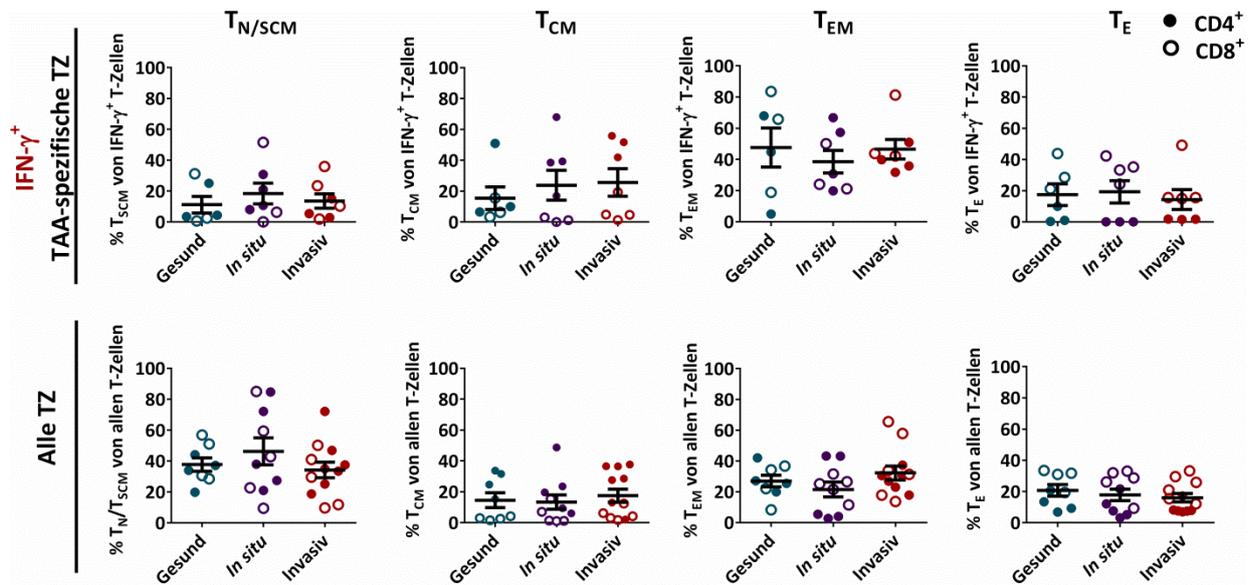


Abbildung 61: Die Mehrzahl der IFN- γ produzierenden TAA-spezifischen T-Zellen ist vom Effektor-Gedächtnis Subtyp. Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ sezernierenden (obere Reihe) bzw. der gesamten T-Zell Population (untere Reihe) hinsichtlich deren Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8, CCR7 und CD45RO. Hierfür wurden Blutproben gesunder Mütter, sowie von Patienten mit präinvasivem (*in situ*) und invasivem Brustkrebs entnommen. Von jeder Population lebender und einzelner CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurde der prozentuale Anteil der naiven (T_N) und Gedächtnis-Stamm-T-Zellen (T_{SCM}, beide CCR7⁺ CD45RO⁻), zentralen (T_{CM}, CCR7⁺ CD45RO⁺) und Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}, CCR7⁻ CD45RO⁺), sowie der terminal differenzierten Effektorzellen (T_E, CCR7⁻ CD45RO⁻) bestimmt. Zudem sind der Mittelwert und der Standardfehler dargestellt. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test verwendet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. TZ: T-Zellen.

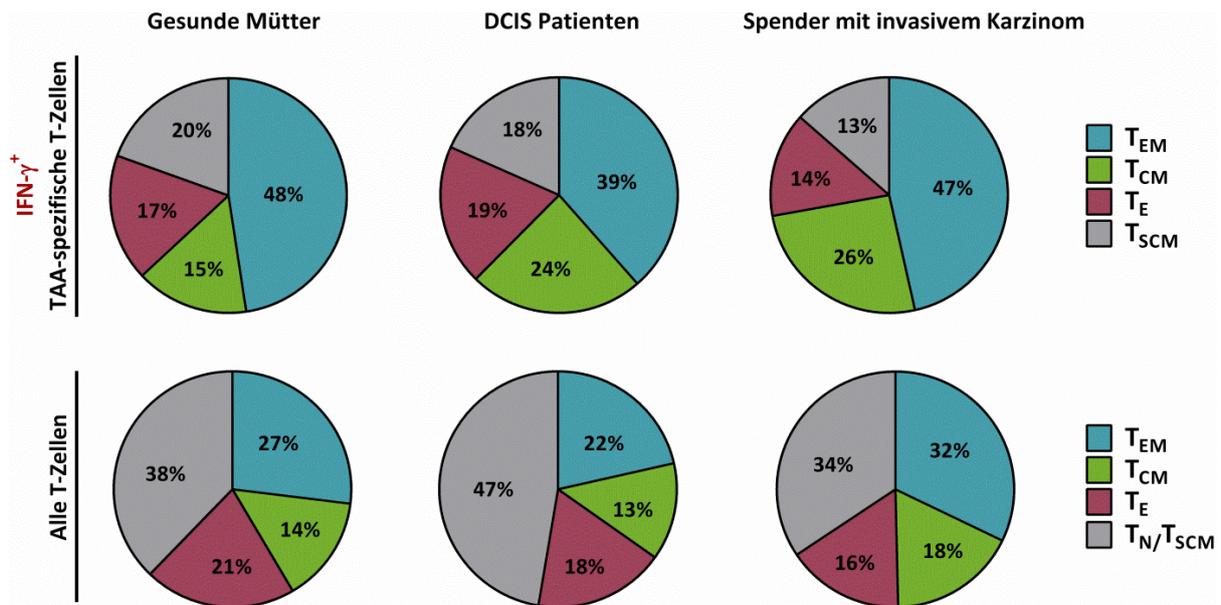


Abbildung 62: Zwischen gesunden Spendern und Mammakarzinompatienten unterscheidet sich die Verteilung der T-Zell-Subtypen innerhalb der IFN- γ -sezernierenden Population kaum. In dieser Grafik sind zur besseren Übersicht die Mittelwerte der Daten aus Abbildung 61 als Kreisdiagramm dargestellt.

Zwischen den Probandengruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der T-Zell Populationen. Vergleicht man jedoch die Verteilung der Subtypen innerhalb der Brustkrebspatienten, fällt auf, dass unter den IFN- γ^+ TAA-spezifischen T-Zellen von Nullipara signifikant mehr Gedächtnis-Stammzellen und weniger Effektor-Gedächtniszellen vertreten sind als bei Müttern (Abbildung 63).

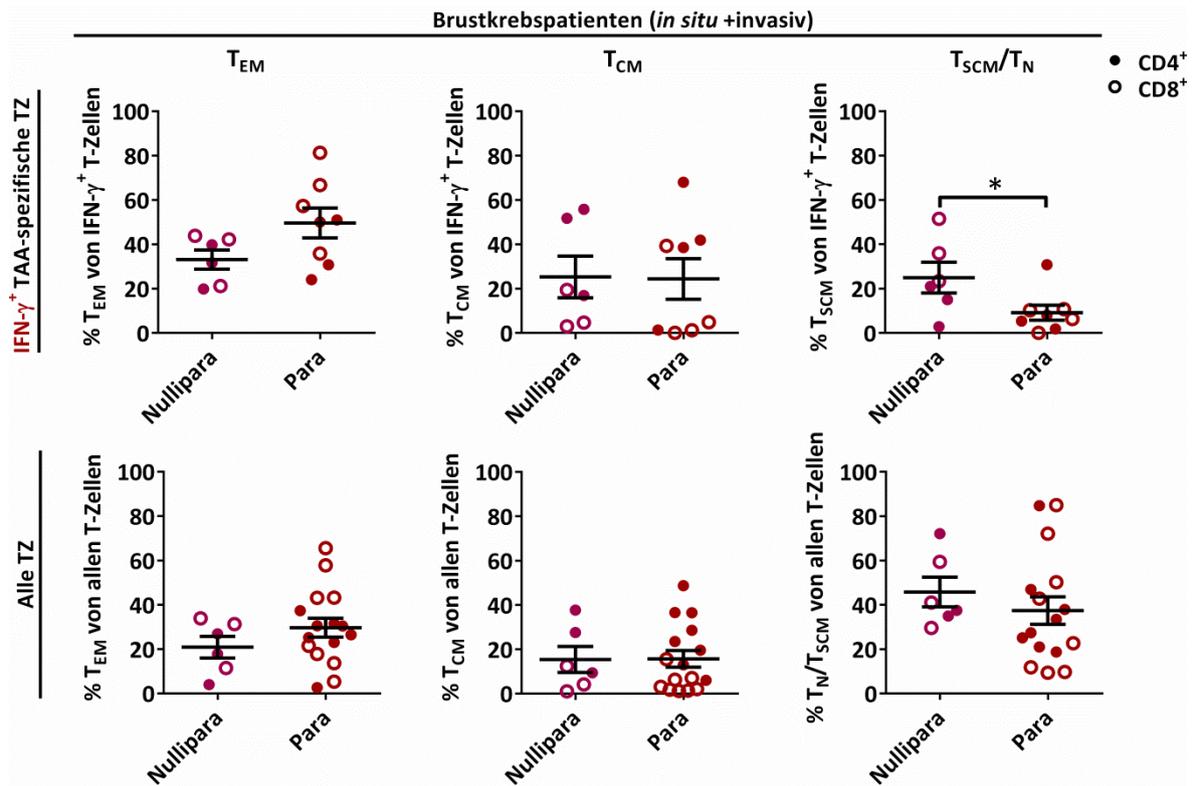


Abbildung 63: Unter den IFN- γ produzierenden T-Zellen aus dem Blut von Brustkrebspatienten sind bei Nullipara mehr Gedächtnis-Stammzellen vorhanden als bei Müttern. In dieser Übersicht sind die Daten aus Abbildung 61 hinsichtlich der Parität der Brustkrebspatienten aufgeteilt. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige *t*-Test verwendet. *: $p < 0,05$.

Auch die TAA-spezifischen T-Zellen, welche TNF- α produzieren, sind mehrheitlich vom Effektor-Gedächtnis-Typ. Unter den antigenspezifischen T-Zellen aus in Patienten mit *in situ* Karzinom wurden, verglichen mit denen gesunder Mütter und von Frauen mit invasivem Mammakarzinom, signifikant weniger Effektor-Gedächtniszellen, dafür aber mehr Gedächtnis-Stammzellen nachgewiesen (Abbildung 64 Abbildung 65). Innerhalb der gesamten T-Zell Population wurden hingegen keine derartigen Unterschiede festgestellt. Wie aus Abbildung 66 hervorgeht, weicht die Verteilung der T-Zell Subtypen zwischen Müttern und Nullipara mit Brustkrebs nur geringfügig ab.

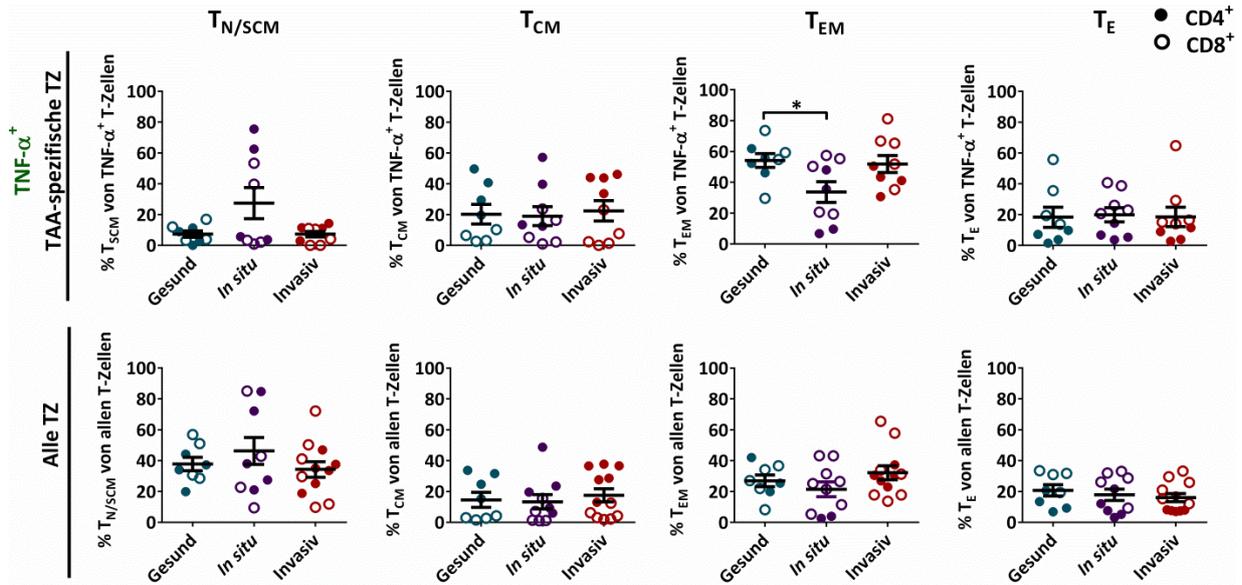


Abbildung 64: Auch die TNF- α produzierenden TAA-spezifischen T-Zellen sind mehrheitlich vom Effektor-Gedächtnis Subtyp. Durchflusszytometrische Analyse der TNF- α sezernierenden (obere Reihe) bzw. der gesamten T-Zell Population (untere Reihe) hinsichtlich deren Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8, CCR7 und CD45RO. Hierfür wurden Blutproben gesunder Mütter, sowie von Patienten mit präinvasivem (*in situ*) und invasivem Brustkrebs entnommen. Von jeder Population lebender und einzelner CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurde der prozentuale Anteil der naiven (T_N) und Gedächtnis-Stamm-T-Zellen (T_{SCM}, beide CCR7⁺ CD45RO⁻), zentralen (T_{CM}, CCR7⁺ CD45RO⁺) und Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}, CCR7⁻ CD45RO⁺), sowie der terminal differenzierten Effektorzellen (T_E, CCR7⁻ CD45RO⁻) bestimmt. Zudem sind der Mittelwert und der Standardfehler dargestellt. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet. *: p < 0,05.

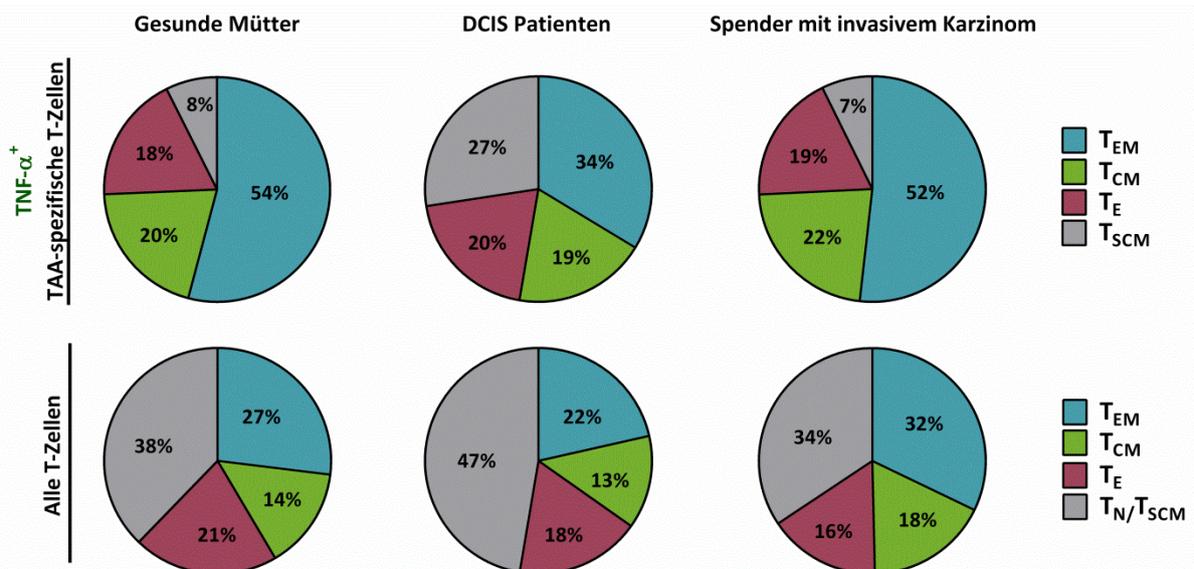


Abbildung 65: Patienten mit DCIS haben im Mittel mehr TNF- α produzierende T-Zellen vom Gedächtnis-Stamm-Zell Typ. In dieser Grafik sind zur besseren Übersicht die Mittelwerte der Daten aus Abbildung 64 als Kreisdiagramm dargestellt.

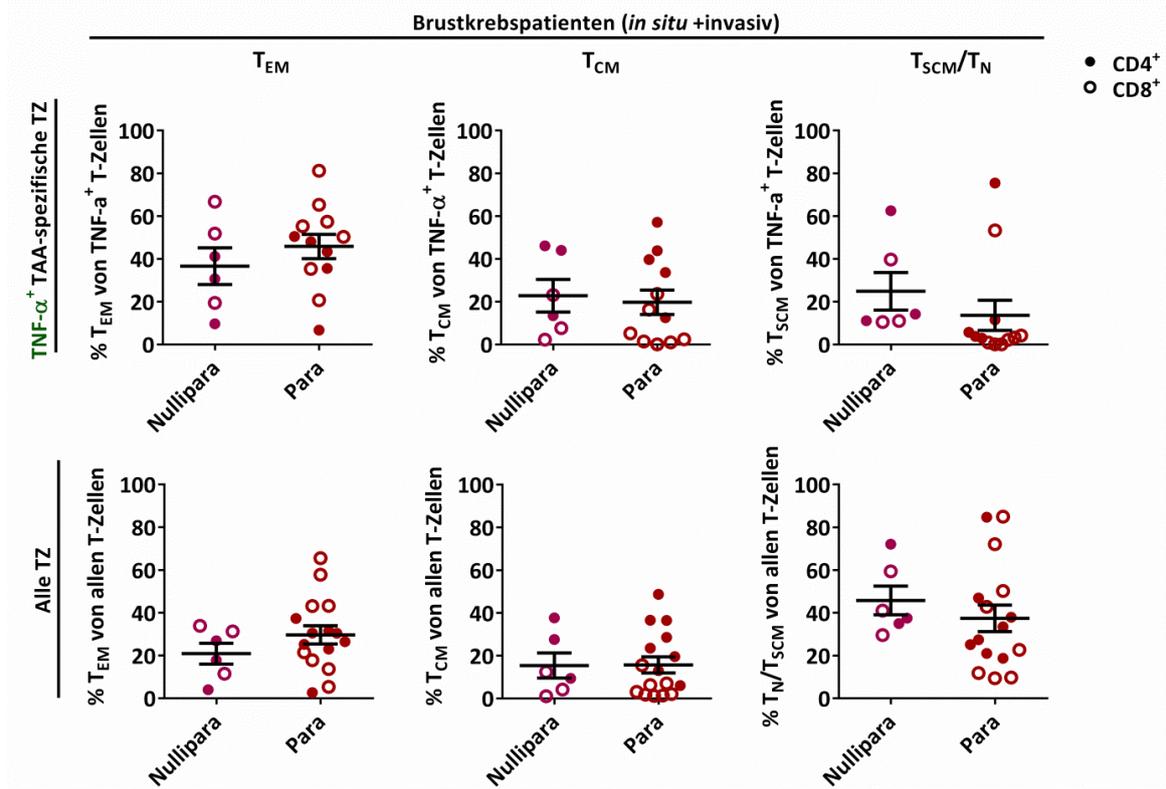


Abbildung 66: Die Verteilung von Subtypen unter den TNF- α produzierenden T-Zellen ist unabhängig von der Parität der Brustkrebspatienten. In dieser Übersicht sind die Daten aus Abbildung 64 in Bezug auf die Parität der Brustkrebspatienten aufgeteilt. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

6.11 TAA-spezifische T-Zellen exprimieren coinhibitorische Rezeptoren

Tumore sind eine beständige Quelle Tumor-assoziierten Antigene. Als Folge einer andauernden Stimulation antigenspezifischer T-Zellen kann es zu deren Erschöpfung kommen, was sich in Funktionseinschränkungen und der Expression von coinhibitorischen Rezeptoren äußert (vergleiche Abschnitt 4.3.1.3). Daher wollten wir mit Hilfe des IFN- γ Freisetzungssassays untersuchen, ob TAA-spezifische T-Zellen im Laufe der Karzinogenese der Brust verstärkt die Rezeptoren PD1, LAG-3 und TIM-3 exprimieren.

In Abbildung 67 ist der prozentuale Anteil der T-Zellen aufgetragen, die eines dieser Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Insgesamt kommen sie deutlich häufiger auf TAA-spezifischen, als auf den übrigen T-Zellen im Blut vor. Dieser Effekt ist bei allen Probandengruppen zu sehen, wobei sich die Gruppen untereinander nicht unterscheiden. Im Mittel exprimieren rund 20% der TAA-spezifischen

T-Zellen PD1, 10-15% sind TIM-3 positiv und etwa ein Zehntel hat LAG-3 Moleküle auf der Oberfläche. Vor allem unter den PD1 positiven Zellen befinden sich überwiegend zytotoxische T-Zellen.

Nur etwa die Hälfte der Proben mit Anti-TAA reaktiven T-Zellen enthält Zellen, die alle drei coinhibitorischen Rezeptoren gleichzeitig aufweisen (Abbildung 68). Derartige TAA-spezifische T-Zellen kommen in allen Probandengruppen vor, sind aber prozentual stärker in Brustkrebspatientinnen zu finden. Im Mittel sind ein Hundertstel, maximal ein Zehntel dieser Zellen positiv für alle drei Marker. Dabei ist das Auftreten PD1⁺ LAG-3⁺ TIM-3⁺ Tumorantigen-reaktiver T-Zellen nicht davon abhängig, ob die Patientin Mutter ist oder nicht (Abbildung 69).

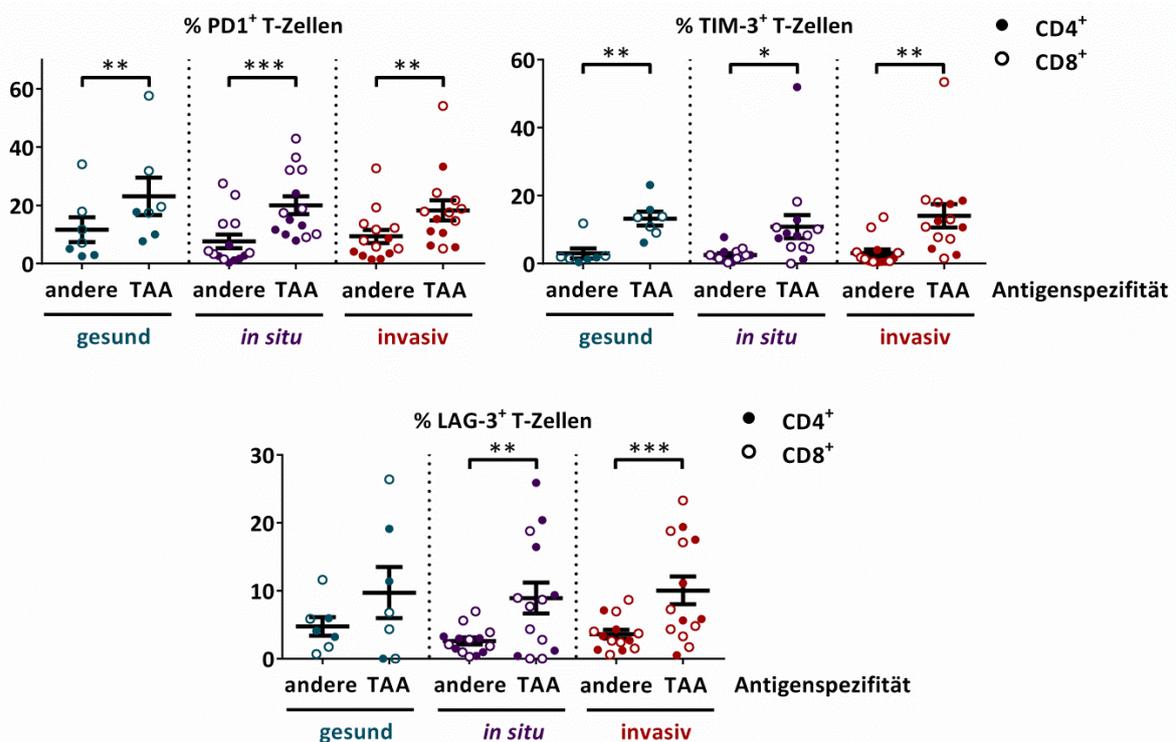


Abbildung 67: Die Expression der einzelnen inhibitorischen Rezeptoren ist bei allen Probandengruppen vergleichbar. Unter den im IFN- γ Freisetzungssassay positiv (TAA-spezifisch) oder negativ (spezifisch für andere Antigene) getesteten T-Zellen wurde der prozentuale Anteil PD1, TIM-3 und LAG-3 positiver CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen bestimmt. Für jede Testgruppe ist der Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Es wurden nur Proben berücksichtigt, in denen TAA-reaktive T-Zellen nachgewiesen wurden: Darunter waren vier aus gesunden Müttern, acht aus DCIS Patientinnen und acht aus Frauen mit invasivem Mammakarzinom. Die Daten für die verschiedenen Testgruppen wurden unter Verwendung des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests verglichen. Die Signifikanz der Unterschiede in den IFN- γ ⁺ und IFN- γ ⁻ Fraktionen der Proben wurde dagegen mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen *t*-Tests berechnet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

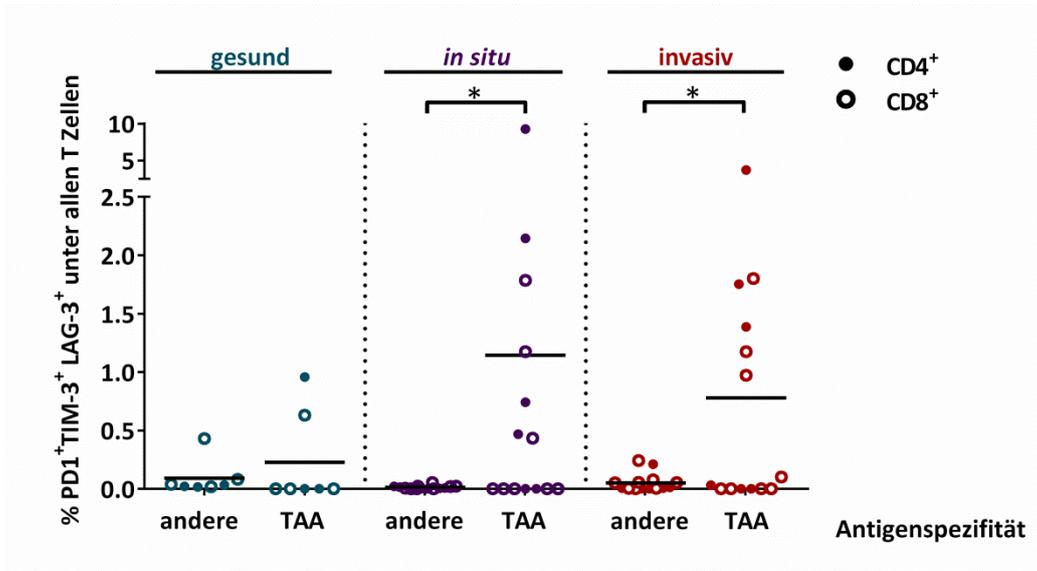


Abbildung 68: Im Blut von einigen Brustkrebspatienten sind mehr PD1⁺ TIM-3⁺ LAG-3⁺ TAA-spezifische T-Zellen als bei gesunden Müttern vorhanden. Unter den im IFN- γ Freisetzungstest positiv (TAA-spezifisch) oder negativ (spezifisch für andere Antigene) getesteten T-Zellen wurde außerdem der prozentuale Anteil der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen bestimmt, die gleichzeitig PD1, TIM-3 und LAG-3 exprimieren. Für jede Testgruppe ist der Mittelwert dargestellt. Es wurden nur Proben berücksichtigt, in denen TAA-reaktive T-Zellen nachgewiesen wurden: Darunter waren vier aus gesunden Müttern, acht aus DCIS Patientinnen und acht aus Frauen mit invasivem Mammakarzinom. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der Mann-Whitney Test verwendet. Gepaarte Analysen erfolgten mit dem Wilcoxon Test. *: $p < 0,05$.

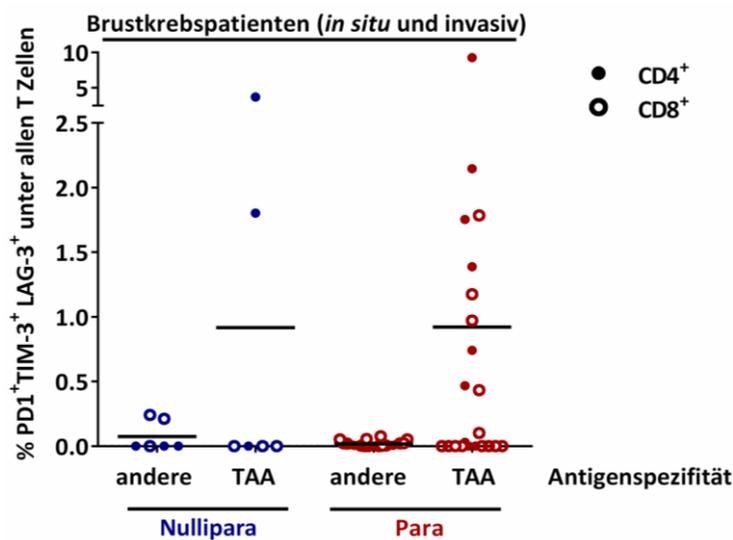


Abbildung 69: PD1⁺ TIM-3⁺ LAG-3⁺ T-Zellen sind sowohl in Nullipara, als auch in Para mit Brustkrebs nachweisbar. Für diesen Graphen wurden die in Abbildung 68 dargestellten Werte für Brustkrebspatientinnen zusammengefasst und nach deren Parität aufgetrennt. Zum Vergleich der Werte zwischen den Testgruppen wurde der Mann-Whitney Test verwendet. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

7. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, wann spontane T-Zellantworten gegen Brustkrebs induziert werden, welche Rolle dabei eine Schwangerschaft spielt, und in welchem Maße sie von TAA-spezifischen regulatorischen T-Zellen unterdrückt werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden TAA-spezifische T-Zellen aus dem peripherem Blut von gesunden Frauen und Brustkrebspatientinnen hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion, ihres Gedächtnisphänotyps und der Anwesenheit coinhibitorischer Rezeptoren charakterisiert, sowie die immunsuppressive Aktivität TAA-spezifischer Treg bestimmt. Ausgehend von den Resultaten können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: 1) Bereits im ersten Schwangerschaftstrimester gesunder Frauen können T-Zellen nachgewiesen werden, die gegen mehrere TAA reagieren. 2) Der größte Anteil gesunder Mütter besitzt sowohl funktionelle TAA-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis- und Effektorzellen, als auch regulatorische T-Zellen, die auch Jahrzehnte nach der Schwangerschaft noch detektiert werden können. 3) Kinderlose Frauen mit Brustkrebs besitzen eine schwächere Anti-Tumor Immunität als Mütter mit Mammakarzinom, die zumindest teilweise durch TAA-spezifische Treg beeinträchtigt wird. Diese Erkenntnisse könnten eine Grundlage für die Entwicklung eines präventiven Impfstoffes bilden, welcher zu einer potenziellen Senkung des Brustkrebsrisikos in kinderlosen Frauen und Müttern ohne prä-existente Anti-Tumor Immunität führen kann.

7.1 Induktion TAA-spezifischer T-Zellen während der Schwangerschaft

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Nullipara ein wesentlich höheres Brustkrebsrisiko aufweisen als Frauen, die jung Kinder geboren haben (Ramazzini 1743, Gilliam 1951, Stocks 1957, Wynder *et al.* 1960, Kelsey *et al.* 1993, Albrechtsen *et al.* 2005). Zu den möglichen Ursachen, warum eine oder mehrere Schwangerschaften der Entstehung von Brustkrebs vorbeugen können, zählen eine Verminderung von krebswachstumsfördernden Östrogen und die Differenzierung von Brustzellen, die dadurch resistenter gegen eine maligne Transformation werden (Russo *et al.* 1982, Bernstein *et al.* 1985, Russo *et al.* 1991, Russo und Russo 1994).

Mit Hilfe von Experimenten an Mäusen und Ratten wurde zudem herausgefunden, dass Lymphozyten von Muttertieren eine erhöhte Toxizität gegenüber Krebszellen aufweisen und auch nach einem Transfer in jungfräuliche Tiere vor einer Entstehung von Brustkrebs schützen können (Baldwin *et al.* 1972, Hellström und Hellström 1975, Chakravarty *et al.* 1991, Chakravarty und Sinha 2000). Die Existenz von Tumor-reaktiven Lymphozyten in Frauen wurde erstmals von Babita Agrawal *et al.* bestätigt

(Agrawal *et al.* 1995, Agrawal *et al.* 1996). Sie und ihre Arbeitsgruppe fanden heraus, dass im ersten Schwangerschaftstrimester CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden, die das Tumor-assoziierte Antigen MUC1 erkennen und in der Lage sind MUC1-positive Tumorzellen abzutöten. Diese Erkenntnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Snijdewint *et al.* 1999).

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass während des ersten Schwangerschaftstrimesters eine Induktion von T-Zellen stattfindet, die neben MUC-1 auch noch gegen eine Vielzahl von anderen TAA reagieren (Abbildung 35). Die Entnahme von Blutproben von Erstgebärenden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während und nach der Schwangerschaft hat außerdem verdeutlicht, dass der zeitliche Verlauf bei der Entwicklung TAA-reaktiver T-Zellen dem nach einer aktiven Immunisierung gegen ein Virus ähnelt (Co *et al.* 2009).

Die für diese Arbeit ausgewählten TAA kommen nicht ausschließlich im Brustkrebsgewebe vor. Im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Literaturrecherchen ergaben, dass für nahezu alle dieser Antigene eine verstärkte Expression während der Schwangerschaft gesunder Frauen nachgewiesen ist. Dabei gibt es zwei mögliche Antigenquellen, die eine Induktion TAA-spezifischer T-Zellen bewirken könnten: Das reifende Brustepithel und die sich verändernde Gebärmutter.

Es liegen Untersuchungen vor, die zeigen, dass die Brustdrüsen schwangerer Frauen vermehrt MUC-1 und Mammaglobin-A produzieren (Arklie *et al.* 1981, J. Burchell *et al.* 1987, Finn *et al.* 1995, M. A. Watson *et al.* 1998). Im Brustepithel tragender Mäuse fand man zudem eine verstärkte Expression der TAA PCNA, ID1, Heparanase 1, HER2 und EGFR (Schroeder und Lee 1998, Zcharia *et al.* 2001, Itahana *et al.* 2008, Sigurdsson *et al.* 2013). Sezerniertes MUC1 und CEA konnten zudem auch im Blut werdender Mütter detektiert werden. Bei den MUC1 Molekülen im Blutserum handelt es sich um verschiedene Glykoformen, die strukturell dem Krebs-assoziierten MUC1 ähneln (Kenemans *et al.* 1992, McGuckin *et al.* 1993, Bon *et al.* 2001). Während der Schwangerschaft entstehen nicht nur MUC1-reaktive T-Zellen. Es wird auch eine humorale Immunantwort induziert (Finn *et al.* 1995, Croce *et al.* 2001). Anhand einer prospektiven Studie wurde deutlich, dass jüngere Frauen mit zirkulierenden MUC1-reaktiven Antikörpern ein geringeres Risiko haben an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Pinheiro *et al.* 2010). Möglicherweise werden T-Zellantworten gegen diese Antigene eingeleitet, indem zu Beginn der Schwangerschaft in die Brust infiltrierende Makrophagen (Kumar *et al.* 1988) und/oder Dendritische Zellen sezernierte TAA, Exosomen oder abgestorbene Epithelzellen aufnehmen, verdauen und die entsprechenden Peptide in den Lymphgeweben an T-Zellen präsentieren. Auch Ergebnisse von Genexpressionsanalysen deuten darauf hin, dass die Differenzierung der Brust während der Schwangerschaft die Immunüberwachung anregt (Balogh *et al.* 2006).

Eine zweite Quelle für TAA ist die Gebärmutter während der Schwangerschaft. Im humanen Endometrium, bzw. der Plazenta, wurde im Zeitraum der Implantation des Embryos eine verstärkte Bildung von ID-1, Mammaglobin-A, Heparanase 1, EGFR und MUC1 nachgewiesen (Meinhardt *et al.* 2005, Shyu *et al.* 2008, Classen-Linke *et al.* 2012, Wirstlein *et al.* 2013, Large *et al.* 2014). Im Fruchtwasser befindet sich zudem über 100 mal mehr CEA als im Blut schwangerer Frauen (Sarandakou *et al.* 2007). Während der frühen Trächtigkeit werden in der murinen Gebärmutterschleimhaut ebenfalls größere Mengen der TAA Heparanase 1 und Mammaglobin-A, sowie Gli1 exprimiert (Matsumoto *et al.* 2002, D'Souza *et al.* 2007, Kubota *et al.* 2008).

Es ist bekannt, dass zwischen Mutter und Fetus ein ständiger Zellaustausch stattfindet (Lo *et al.* 1996). Bis zu 6% der gesamten DNA im maternalen Plasma stammt vom Kind (M. R. Thomas *et al.* 1994, Lo *et al.* 1998). Gleichzeitig werden während einer unkomplizierten Schwangerschaft langlebige Fetus-spezifische T-Zellen aktiviert (van Kampen *et al.* 2001). Um eine Abstoßung des Embryos zu verhindern, werden diese lokal durch Treg, nicht-klassische HLA-Moleküle und eine anti-entzündliche Mikroumgebung unterdrückt (Kamimura *et al.* 1991, Munn 1998, Petroff *et al.* 2005, Martinez *et al.* 2013). Bereits im ersten Trimester gehen embryonale Zellen in die Mutter über (Pertl und Bianchi 1999). Ihre Anzahl steigt dann im Laufe der Schwangerschaft an und nimmt nach der Entbindung wieder ab. Ein Teil der fetalen Zellen bleibt jedoch noch Jahrzehnte nach der Entbindung als Antigenquelle in der Mutter erhalten (Bianchi *et al.* 1996). Auch Immunzellen des Fetus können bereits nach dem ersten Trimester im Blut der werdenden Mutter detektiert werden (Walknowska *et al.* 1969, Schröder und de la Chapelle 1972). Zwei Drittel der Primipara besitzen fetale Lymphozyten, die bis zu 0,2% der Gesamtlymphozyten der Mutter ausmachen können. Insgesamt besitzen 90% aller Mütter Lymphozyten vom Kind, welche mindestens 38 Jahre nach der Entbindung noch im maternalen Blut nachgewiesen werden können (Evans *et al.* 1999). Bereits im Fetus werden Immunantworten gegen ein breites Spektrum an Antigenen initiiert, darunter gegen Erreger, mit denen die Mutter infiziert ist (Hermann *et al.* 2002, Malhotra *et al.* 2008). Dabei entstehen auch FOXP3⁺ CD4⁺ Treg, die spezifisch für maternale Alloantigene sind (Mold *et al.* 2008, Dutta und Burlingham 2011). Die Existenz von DNA und Zellen des Kindes in der Mutter wird als fetaler Mikrochimärismus bezeichnet (Gammill und Nelson 2010). Es tritt bei 70% bis 80% der Mütter auf und ist unabhängig von der Kompatibilität der HLA-Moleküle von Mutter und Kind (Lo *et al.* 1997, Evans *et al.* 1999). Interessanterweise zeigt eine prospektive Studie, dass das Brustkrebsrisiko von Frauen mit Mikrochimärismus im Vergleich zu Frauen ohne nur ein Drittel beträgt und dass erstere im Falle einer Brustkrebserkrankung länger leben (Kamper-Jørgensen 2012, Kamper-Jørgensen *et al.* 2012). Der gleiche Zusammenhang gilt auch für das Risiko an DCIS zu erkranken (Eun *et al.* 2013). Im Vergleich zu Gesunden besitzen Frauen mit

Brustkrebs weniger fetale Zellen (Gadi und Nelson 2007, Gadi *et al.* 2008). Bislang ist unbekannt, ob auch fetale TAA-spezifische T-Zellen existieren, aber es gibt zahlreiche epidemiologische und transplantationsbiologische Beobachtungen, die auf die Existenz eines Transplantat-gegen-Tumor-Effekts hinweisen (Gadi 2009). Das Vorkommen Anti-Tumor reaktiver T-Zellen fetalen Ursprunges könnte man nachweisen, indem im FACS sortierte TAA-reaktive T-Zellen aus Müttern mit Söhnen mittels Polymerase-Kettenreaktion oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf das Vorhandensein eines Y-Chromosoms untersucht werden (E. S. M. Lee *et al.* 2010).

7.2 Der Phänotyp Anti-Tumor reaktiver T-Zellen in gesunden Müttern

In dieser Studie wurden in Müttern sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, die auf eine Stimulation mit TAA mit der Produktion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α reagieren (Abbildung 59). Derartige Tumorantigen-spezifische T_H1 und zytotoxische T-Zellen können Krebszellen direkt abtöten (Schattner *et al.* 1996, R. F. Wang und Rosenberg 1996, W. D. Thomas und Hersey 1998, Echchakir *et al.* 2000). Zudem sind T_H1 Zellen für die Entstehung einer langlebigen Immunität unentbehrlich. Innerhalb eines Tumors fördern sie die Einwanderung antigenpräsentierender und CD8⁺ Zellen und erhöhen die Proliferation, das Überleben und die Anti-Tumor Reaktivität der zytotoxischen T-Zellen (Hung *et al.* 1998, R. Bos und Sherman 2010). TAA-spezifische T-Helferzellen können entweder durch antigenpräsentierende Zellen oder direkt durch Gewebe, die MHC Klasse II Moleküle exprimieren, aktiviert werden (Topalian *et al.* 1994, Perez *et al.* 2002). Ein Vorgang namens Kreuzpräsentation ermöglicht außerdem auch die Präsentation intrazellulärer Antigene durch MHC Klasse II Moleküle (Heath und Carbone 2001, Knutson und Disis 2005).

HLA-DR Moleküle kommen in großer Menge auf den Brustdrüsenepithelien der schwangeren und stillenden Frau vor. Nach dem Stillen nimmt ihre Anzahl wieder ab. Wenn die Brust wieder in einen ruhenden Zustand übergegangen ist, sind keine HLA-DR Moleküle mehr vorhanden (Bartek *et al.* 1987). Im Brustgewebe tragender Ratten wurde während der frühen Schwangerschaft die stärkste Expression von MHC Klasse II Molekülen nachgewiesen (Kumar *et al.* 1988). In Experimenten mit Meer-schweinchen bewirkte auch eine Verabreichung von Prolaktin eine Induktion dieser Moleküle. Gleichzeitig wurde dabei eine Infiltration der Brustdrüsen mit Lymphozyten beobachtet (Klareskog *et al.* 1980). Es ist also möglich, dass die Epithelzellen in der Brustdrüse über MHC Klasse I und II TAA präsentieren und damit vor Ort eine Aktivierung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen stattfindet.

Rund 0,002% der T-Zellen im peripheren Blut von Müttern reagieren auf TAA mit einer Polyzyto-kinantwort (Abbildung 60). Polyfunktionelle T-Zellen ermöglichen einen besonders guten Langzeit-

schutz gegen Infektionen und führen zu einer verstärkten Abtötung von Krebszellen (Darrah *et al.* 2007, Wilde *et al.* 2012). Hochgerechnet befinden sich im gesamten Körper einer Mutter im Mittel bis zu 2 Milliarden polyfunktionelle Anti-Tumor reaktive T-Zellen. Diese Zellzahl entspricht in etwa der Menge, die im Rahmen von erfolgreichen adoptiven T-Zell Therapien gegen metastasierten Hautkrebs transfundiert wurden (S. A. Rosenberg und Dudley 2004) und wäre theoretisch auch ausreichend um Brustkrebs zu bekämpfen.

Die im Rahmen dieser Arbeit in Blutproben gesunder Müttern gemessene Verteilung der T-Zell-Subtypen (Abbildung 61) entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Nicholas Restifo (Gattinoni *et al.* 2011). Diese hat in Blutproben 29 gesunder Spender die Einteilung von T_N , T_{SCM} , T_{CM} , T_{EM} und T_E zusätzlich zu CCR7 und CD45RO noch anhand der Marker CD45RA, CD62L, CD27, CD28, IL7R α und CD95 detailliert untersucht (Gattinoni *et al.* 2011). Unter den hier gemessenen TAA-reaktiven T-Zellen gesunder Mütter befinden sich sowohl Gedächtnis-, als auch Effektorzellen, während die gesamte T-Zell Population des Blutes überwiegend naive Zellen enthält. Der größte Anteil Tumor-spezifischer T-Zellen ist dabei vom Effektor-Gedächtnistyp, die am weitesten differenzierte Form der Gedächtniszellen. Zu den Effektor-Gedächtniszellen zählen sowohl T_{H1} , als auch zytotoxische T-Zellen, die in der Lage sind in Gewebe einzuwandern und dort rasch Effektorfunktionen auszuüben (Sallusto *et al.* 1999).

Anhand von Analysen mit den Markern CCR7 und CD45RO hat eine Studie gezeigt, dass sich die Verteilung der T-Zell Subtypen im peripheren Blut während der Schwangerschaft nicht ändert. Wohl aber nimmt der Anteil der Aktivierungsmarker CD38 (Sandoval-Montes und Santos-Argumedeo 2005) unter den $CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor-Gedächtniszellen im Blut und im Übergang vom Uterus zur Plazenta zu (Loewendorf *et al.* 2014). $CD8^+$ Effektor-Gedächtnis- und Effektorzellen schwangerer Frauen exprimierten zudem auch verstärkt den Aktivierungsmarker HLA-DR (Salgado *et al.* 2002). Demnach ist zu vermuten, dass während der Schwangerschaft alloreaktive, gegen den Embryo gerichtete, T-Lymphozyten aktiviert werden. Diese werden allerdings lokal durch ebenfalls aktivierte Treg unter Kontrolle gehalten (Loewendorf *et al.* 2014). Unbekannt bleibt jedoch, ob und in wieweit diese Anti-Embryo-Immunantwort mit einer Anti-TAA-Immunantwort einhergeht. Aufschluss darüber ergäbe eine longitudinale durchflusszytometrische Untersuchung des Phänotyps TAA-reaktiver T-Zellen im Schwangerschaftsverlauf.

In gesunden Müttern ist es unwahrscheinlich, dass große Mengen an Tumor-assoziierten Antigenen über sehr lange Zeit im Körper verbleiben. Wie in der Einleitung (Kapitel 7.1) beschrieben, versiegen die Quellen für TAA nach der Geburt im Uterus und nach dem Abstillen auch in der Brust, da beide Organe wieder in einen Zustand übergehen, der dem vor der Schwangerschaft ähnelt. Somit ist auch

nicht davon auszugehen, dass unter den TAA-reaktiven T-Zellen Erschöpfungserscheinungen auftreten. Die funktionshemmenden Rezeptoren PD-1, LAG-3 und TIM-3 wurden in wesentlich größeren Mengen auf den T-Zellen gefunden, die nach der Stimulation mit TAA IFN- γ sezernierten (Abbildungen 67 und 68). Wäre ein Großteil der Anti-Tumor reaktiven T-Zellen in einem fortgeschrittenen Erschöpfungsstadium, so würde man mehr PD-1-, LAG-3- und TIM-3- positive Zellen in der IFN- γ negativen Fraktion erwarten, da durch die Funktionseinschränkung kein IFN- γ mehr gebildet werden würde (Wherry 2011). Neben ihrer Rolle in *T cell exhaustion* sind die inhibitorischen Rezeptoren auch Biomarker für aktivierte T-Zellen (Sauce *et al.* 2007). In anderen Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass gerade die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen größere Mengen an PD-1, LAG-3 und TIM-3 exprimieren (Baitsch *et al.* 2012). T-Zellen mit diesem Phänotyp sind in der Lage Tumorzellen abzutöten. Durch *Deep Sequencing* des T-Zell β -Rezeptors PD-1 positiver T-Zellen aus Melanompatienten wurde weiterhin herausgefunden, dass innerhalb dieser Zellen eine oligoklonale Expansion stattgefunden hat. Zusätzlich eignen sich PD-1, LAG-3 und TIM-3 als Biomarker, die es ermöglichen unter den Tumor-infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen solche mit Anti-TAA-Reaktivität zu identifizieren und für adoptive T-Zell Therapien anzureichern (Gros *et al.* 2014).

Zusammengefasst kann man aus den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Phänotypanalysen schließen, dass gesunde Mütter eine große Anzahl hoch funktioneller Brustkrebs-reaktiver T-Zellen besitzen.

7.3 Entstehung eines Langzeitgedächtnisses gegen Brusttumorantigene

In Müttern können Jahrzehnte nach der ersten Geburt noch TAA-spezifische Gedächtnis-T-Zellen detektiert werden (Abbildung 31). Dies ist besonders im Hinblick auf einen möglichen Immunschutz gegen die Entstehung von Brustkrebs wichtig, da dieser meist erst nach der Menopause auftritt. Die Induktion eines langlebigen immunologischen Gedächtnisses wurde auch in einer Studie zur Anwendung eines präventiven MUC1 Impfstoffes bei Probanden beobachtet, denen prämaligne Läsionen des Colons entfernt wurden (Kimura *et al.* 2013). Sogar eine lebenslange zelluläre Immunität infolge einer Impfung ist möglich. So können beispielsweise T-Zell-Antworten gegen *Vaccinia*-Viren noch 75 Jahre nach der Verabreichung des entsprechenden Impfstoffes nachgewiesen werden (Hammarlund *et al.* 2003).

Da die Anzahl der Lebendgeburten einer Frau sich nicht auf die Stärke ihrer Anti-TAA Immunität auswirkt (Abbildung 32), ist anzunehmen, dass eine voll ausgetragene Schwangerschaft ausreicht, um ein effizientes Langzeitgedächtnis auszubilden. Wir haben ebenfalls beobachtet, dass das Alter bei

der Niederkunft die Intensität der Immunreaktion gegen Tumor-assoziierte Antigene nicht beeinflusst (Abbildung 34). Die Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms ist ein Prozess, der Jahrzehnte lang dauern kann (Rosen *et al.* 1980). Möglicherweise könnte ein früh im Leben einsetzender „Impfschutz“ erklären, warum gerade junge Mütter das geringste Lebenszeitrisiko haben an Brustkrebs zu erkranken.

7.4 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Anti-Tumor Immunität gesunder Mütter

Die Immunität gegen Krebs ist ein dynamischer Prozess, der einerseits das Wachstum von Krebszellen verhindert, wenn eine Infiltration TAA-spezifischer Effektor-T-Zellen stattgefunden hat, andererseits aber auch das Fortschreiten einer Tumorerkrankung fördern kann, wenn diese durch regulatorische T-Zellen unterdrückt werden (Blake-Mortimer *et al.* 2004, Gupta *et al.* 2007). CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen, die Effektorfunktionen der gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen und Helfer T-Zellen hemmen, stammen entweder aus dem Thymus (natürliche Treg, nTreg) oder werden in der Peripherie erzeugt (induzierte Treg, iTreg). Da es sich bei Tumor-assoziierten Antigenen um körpereigene Strukturen handelt, ist die Suppression von Anti-TAA Reaktionen durch Treg ein natürlicher Mechanismus zur Verhütung von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi *et al.* 1995).

Werden im Thymus exprimierte Antigene von sich dort entwickelnden T-Zellen erkannt, werden diese entweder abgetötet oder zu nTreg differenziert. Auch die TAA MUC1 und CEA werden im Thymus des Menschen exprimiert (Cloosen *et al.* 2007). Da im Blut von gesunden Menschen und von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen T-Zellen detektiert wurden, die gegen die beiden Antigene reagieren, werden diese im Thymus offenbar nicht vollständig deletiert und daher wahrscheinlich von regulatorischen T-Zellen unterdrückt (Agrawal *et al.* 1996, Schmitz-Winnenthal *et al.* 2005, Sommerfeldt *et al.* 2006).

Die Existenz TAA-spezifischer Treg in Patienten mit invasivem Brustkrebs und deren suppressive Einwirkung auf die Anti-Tumor Immunität wurde von Dr. Yingzi Ge und Dr. Hans-Henning Schmidt belegt (Schmidt *et al.* 2013). Die vorliegende Studie hat zudem ergeben, dass 75% der gesunden Mütter TAA-spezifische Treg mit antiproliferativen Eigenschaften besitzen (Abbildung 38). Vermutlich wird zumindest ein Teil dieser Zellen nach der Schwangerschaft neu induziert oder expandiert, da die Treg von Müttern während und nach der Stillzeit gegen mehr TAA reagieren, als vor und während der Schwangerschaft. Zudem werden vor allem starke Anti-TAA Reaktionen, die nach der Niederkunft auftreten, zunehmend durch Treg abgeschwächt (Abbildungen 35, 36 und 38). Diese Ergebnisse pas-

sen sehr gut zu der Beobachtung, dass vier Wochen nach der Entbindung eine massiv verstärkte Infiltration von IL-10 produzierenden Treg in die weibliche Brustdrüse stattfindet. Generell enthält die laktierende Brustdrüse zahlreiche T-Zellen. Denn allein in einem Milliliter Colostrum, der ersten von der Mutter gebildeten Milch, befinden sich rund $1 \cdot 10^5$ T-Zellen (Parmely und Beer 1977). Diese gelangen durch einen aktiven Transportmechanismus durch das alveolare Epithel in die Milch (Seelig und Beer 1978). Möglicherweise wird also durch die Anlockung regulatorischer T-Zellen in die Brust eine gegen das eigene Gewebe gerichtete T-Zell Reaktion verhindert.

Anhand der Ergebnisse des Treg Spezifitätsassay haben wir außerdem beobachtet, dass die Anzahl der von Treg erkannten TAA in älteren Müttern tendenziell größer ist, als in jüngeren (Abbildung 57). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Tatsache, dass sich Treg in älteren Frauen anreichern (L. Wang *et al.* 2010, Raynor *et al.* 2012, Jagger *et al.* 2014), und sich deswegen auch die Anzahl der TAA-spezifischen Treg mit dem Alter erhöht.

Die antiproliferativen Eigenschaften der Treg gesunder Mütter korrelieren nur mäßig mit einer verminderten IFN- γ Produktion durch TAA-reaktiver Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen (Abbildung 54). Bei CD25⁺ CD4⁺ Treg handelt es sich um eine heterogene Population mit verschiedenen Effektorfunktionen (Duhon *et al.* 2012). Offenbar besitzen die hier untersuchten CD4⁺ CD25⁺ Treg stärkere antiproliferative als anti-inflammatorische Eigenschaften. Möglicherweise beeinträchtigt aber auch das von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen in großen Mengen sezernierte IFN- γ die Treg Aktivität im ELISpot Assay (Nishikawa *et al.* 2005). Dies wäre im Treg Spezifitätsassay nicht der Fall, da während der Treg-Aktivierung keine oder kaum Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen vorhanden sind. Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit wurden in einer Studie erzielt, in welcher die Mechanismen, die zu Entstehung von immunologischer Toleranz gegen TAA führen, erforscht wurden. Am Beispiel von CEA wurde entdeckt, dass in einer Hälfte der Blutproben gesunder Spender T-Helferzellen nicht auf das Antigen reagieren. In der anderen Hälfte der Proben wurde eine Anti-CEA Immunantwort detektiert, die durch die Depletion CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen nicht zunahm (Pickford *et al.* 2007). Stattdessen führte eine Antikörper-vermittelte Neutralisation des von CD25⁻ Treg gebildeten IL-10 zu einer vermehrten Proliferation CEA-spezifischer T_H1 Zellen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Phänotyp und der Effektormechanismen der in dieser Studie untersuchten TAA-spezifischen Treg zu charakterisieren.

7.5 Auswirkungen prä-existenter TAA-spezifischer T-Zellen auf die Anti-Brustkrebs Immunität

Während in gesunden Nullipara keine TAA-reaktiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten, werden diese scheinbar auch durch die Entstehung von Brustkrebs gebildet (Abbildung 39). Dafür spricht auch der erhöhte Anteil von CCR7⁺ CD45RO⁻ T-Zellen unter den TAA-reaktiven T-Zellen der Nullipara (Abbildungen 63 und 65). Bei diesen handelt es sich vermutlich um zentrale T-Gedächtnisstammzellen, die den am wenigsten differenzierten Gedächtniszelltyp darstellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierung naiver TAA-spezifischer T-Zellen in Nullipara zeitlich versetzt, also erst mit der Tumorgenese stattgefunden hat und in Müttern mit Brustkrebs zumindest teilweise bereits früher, nämlich während der Schwangerschaft und vor der Tumorerkrankung.

Die vorliegende Arbeit zeigt außerdem, dass die T-Zellen von Brustkrebspatientinnen ohne Kinder eine schwächere Anti-Tumor-Reaktivität aufweisen als die von Müttern mit Brustkrebs (Abbildungen 39 und 40). Ein Grund hierfür ist die Unterdrückung der IFN- γ Sekretion TAA-spezifischer Effektor T-Zellen durch regulatorische T-Zellen. In Müttern wurde zwar ein antiproliferativer Einfluss von Treg beobachtet, aber nur in Nullipara mit Brustkrebs geht dieser zusätzlich mit einer stark verminderten IFN- γ Sekretion einher. Dabei korrelieren die beiden Wirkmechanismen exakt miteinander (Abbildung 54). Im Vergleich zu Müttern produziert nur etwa die Hälfte der T-Zellen von Nullipara mit Brustkrebs IFN- γ (Abbildung 40). Möglicherweise tritt deshalb der suppressive Effekt von IFN- γ auf Treg nicht so stark auf, wie der, der bei gesunden Müttern vermutet wird. Histologische Untersuchungen zeigen zudem, dass sich Treg im Brustkrebsgewebe anreichern, während die Anzahl CD8⁺ T-Zellen abnimmt (Kim *et al.* 2013). Deshalb könnte gerade im Tumor eine stärkere suppressive Aktivität von Treg erreicht werden.

Ein weitere Ursache für die schwächere Anti-Tumorimmunität in kinderlosen Frauen mit Mammakarzinom könnte der verminderte Anteil TAA-reaktiver Effektor-Gedächtniszellen sein (Abbildungen 63 und 65), da diese die am weitesten differenzierten Gedächtniszellen mit den stärksten Effektorfunktionen sind (Gattinoni *et al.* 2011).

Die stärksten Anti-TAA Reaktionen durch T-Zellen wurden in Proben von Müttern mit invasivem Brustkrebs gemessen (Abbildungen 40 und 43). Die Intensität ist dabei vergleichbar mit der von Immunreaktionen gegen ein *Recall*-Antigen von Grippeviren. Das Ausmaß der T-Zell Immunität entspricht auch den Resultaten von Impfungen von gegen TAA, die in Brustkrebspatienten untersucht wurden (Knutson *et al.* 2001). Die Ansprechrate auf TAA ist hingegen bei Müttern mit invasivem

Brustkrebs meist geringer als bei gesunden. Nur gegen Heparanase 1 und GLI1 wurde gegenüber gesunden Müttern eine erhöhte Ansprechrate gemessen (Abbildung 43). Gleichzeitig werden diese Antigene, neben anderen, aber auch besonders häufig von Treg aus Brustkrebspatienten erkannt (Abbildungen 51 und 53). Anhand dieser Ergebnisse kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die Anwesenheit eines invasiven Brusttumors zu einer Reaktivierung prä-existenter TAA-spezifischer Gedächtnis T-Zellen und Treg führen kann.

Auffällig war die Beobachtung, dass T-Zellen von Müttern mit präinvasivem Brustkrebs schwächere IFN- γ Immunantworten gegen TAA aufweisen als die von gesunden Müttern, aber dafür mehr TNF- α sezernieren (Abbildungen 39, 43 und 50). TNF- α ist ein Zytokin, das einen nekrotischen Zelltod in Tumoren auslösen kann (Nauts *et al.* 1953). Im Gewebe von *in situ* Karzinomen wurde allerdings nicht mehr TNF- α nachgewiesen als in invasiven Brusttumoren (Jin *et al.* 1997, Soria *et al.* 2011). Unter den TNF- α ⁺ TAA-reaktiven T-Zellen von DCIS Patientinnen befanden sich zudem mehr CCR7⁺ CD45RO⁻ Zellen, bei denen es sich vermutlich um Gedächtnis-Stammzellen handelt (Abbildung 63). Diese sind aber wahrscheinlich nicht für die erhöhte TNF- α Produktion verantwortlich, da Gedächtnis-Stammzellen weniger TNF- α produzieren als zentrale und Effektor-Gedächtniszellen (Gattinoni *et al.* 2011). Deren Anwesenheit könnte aber auch darauf hindeuten, dass kürzlich eine Aktivierung TAA-spezifischer T-Zellen stattgefunden hat. Es gibt folglich mehrere Hinweise darauf, dass sich die T-Zell Immunität von Patienten mit DCIS immunologisch von denen mit invasiven Karzinomen unterscheidet. Die Ursache könnte in der lokalen Begrenzung des DCIS gegenüber einem invasiven Karzinom liegen. Vielleicht ermöglichen die Durchbrechung der Basalmembran und die Ausbreitung der Tumorzellen in das umliegende Gewebe neue Interaktionen, die sich dann auf den T-Zell Phänotyp auswirken.

Aus histologischen Untersuchungen geht zudem hervor, dass die Anzahl von Treg im Gewebe im Laufe der Karzinogenese zunimmt. In DCIS sind mehr Treg vorhanden als in gesunden Geweben und in invasiven Karzinomen ist die Treg-Dichte am größten (Lal *et al.* 2013). Es ist anzunehmen dass unter den infiltrierenden Treg auch TAA-spezifische vorkommen. Eventuell ist dies der Grund dafür, dass in zunehmend weniger Frauen mit prä-invasivem und invasivem Brustkrebs TAA-spezifische Treg aus dem peripheren Blut detektiert worden sind (Abbildung 52). Weiterhin haben wir beobachtet, dass Treg aus dem Blut von Frauen mit Mammakarzinomen in höheren Stadien eine geringere suppressive Aktivität aufweisen (Abbildung 56). Da Treg in fortgeschrittenen Tumoren in größerer Anzahl vorhanden sind, als in lokal begrenzten, und sich aktiv in befallenen Lymphknoten und Metastasen ansammeln (Sugihara *et al.* 2009, Krausz *et al.* 2012, Demir *et al.* 2013, Faghieh *et al.* 2014) wäre es

denkbar, dass vor allem die funktionellen TAA-spezifischen Treg aus der Zirkulation in das maligne Gewebe einwandern.

Es gibt zahlreiche Studien, in welchen ein Zusammenhang zwischen der Infiltration von T-Zellen in Brusttumoren und klinischen Parametern untersucht wurde. Aus unseren Anfragen geht jedoch hervor, dass den Autoren nicht bekannt ist, welchen Paritätsstatus die Frauen hatten, die für die Analysen Gewebe spendeten (Mahmoud *et al.* 2011, Denkert 2014). Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob sich das Immuninfiltrat in Brusttumoren von Nullipara von dem in Müttern unterscheidet und inwiefern sich Unterschiede auf den klinischen Verlauf auswirken.

Brustkrebs ist eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen der Brust, die mehrere unterschiedliche Subtypen umfasst, die sich auch hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem Immunsystem unterscheiden können. In einer Studie mit 12.439 Brustkrebspatienten wurde herausgefunden, dass die Anwesenheit intratumoraler zytotoxischer T-Zellen in Östrogenrezeptor (ER) negativen oder ER positiven/HER2 positiven Tumoren mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert war. Dagegen wirkte sich ein CD8⁺ T-Zell Infiltrat in der Patientengruppe mit Östrogenrezeptor positivem Brustkrebs nicht auf die Mortalität aus (Ali *et al.* 2014). Eine andere Untersuchung befasste sich mit der Anti-Tumor Reaktivität von T-Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatienten. Diese war in Patienten mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren signifikant stärker als in solchen mit ER-negativem Brustkrebs. Zudem reagierten die T-Zellen aus Frauen mit Grad 1 bis 2 Karzinomen stärker als die aus Patientinnen mit niedrig differenziertem Brustkrebs (Domschke *et al.* 2009). Derartige Zusammenhänge wurden anhand von T-Zellen aus dem peripheren Blut nicht beobachtet. Weder der Tumorgrad (Abbildung 44), noch der Subtyp (Abbildung 46) beeinflussten die Immunantwort gegen TAA. Das Knochenmark ist ein Reservoir für Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellen und Treg (Feurerer *et al.* 2001, Zou *et al.* 2004, Schmitz-Winnenthal *et al.* 2005). Dabei befinden sich im Knochenmark von Patienten mit Brustkrebs mehr TAA-reaktive T-Zellen als im Blut (Beckhove *et al.* 2004). Möglicherweise besitzen die T-Zellen aus dem Knochenmark andere Eigenschaften als die zirkulierenden T-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

In bis zu einem Drittel der Mammakarzinome wird der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2 verstärkt exprimiert (Ross und Fletcher 1998). Da Patienten mit HER2-positivem Brustkrebs eine schlechtere Prognose haben und zielgerichtete Therapien mit Anti-HER2 Antikörpern angewendet werden können, wird in die Expression des Rezeptors im Gewebe routinemäßig quantifiziert. Wir haben daher untersucht, ob die HER2-Expression mit der Anti-HER2 T-Zell Reaktivität korreliert. Eine Anti-HER2 Immunantwort wurde in der Hälfte der Patienten detektiert, unabhängig davon, ob im Tumor ein HER2 Score von 0 oder 3 ermittelt wurde. Dieser Beobachtung könnten mehrere Ursachen

zu Grunde liegen. Zum einen kann es sein, dass HER2-positive Tumorzellen von T-Zellen abgetötet wurden und das Gewebe deshalb negativ für den Rezeptor ist (Dunn *et al.* 2004). Zweitens bedeutet der *Score* 0, dass bis zu 10% der Tumorzellen HER2 positiv sein können. Diese Menge könnte ausreichen um eine Immunantwort gegen HER2 auszulösen. Drittens bedeutet der Nachweis HER2-spezifischer T-Zellen nicht zwangsläufig, dass diese HER2 exprimierende Krebszellen erfolgreich abtöten. Denn Tumoren sind durch vielfältige Mechanismen in der Lage Immunreaktionen zu unterbinden (Aptsiauri *et al.* 2013). Ein Beispiel hierfür ist die Herunterregulierung von MHC-Molekülen, ohne die T-Zellen nicht aktiviert werden können (Seliger *et al.* 2000). Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Untersuchungen, in denen ebenfalls HER2 spezifische T-Zellen sowohl in Brustkrebspatientinnen mit HER2-positiven, als auch in solchen mit negativen Tumoren nachgewiesen wurden (Disis *et al.* 2000, Rentzsch *et al.* 2003, Muraro *et al.* 2011).

7.6 Klinische Relevanz

Die Durchführung einer geplanten prospektiven Studie mit gesunden Spenderinnen soll klären, ob Frauen mit einer prä-existenden Immunität gegen TAA seltener an Brustkrebs erkranken. Sollte sich in Zukunft ein Zusammenhang herausstellen, wäre die Entwicklung eines präventiven Impfstoffes eine revolutionäre Möglichkeit das Brustkrebsrisiko von Frauen zu senken, die keine Kinder bekommen können oder wollen. Aber nicht nur Nullipara erkranken an Brustkrebs. 15% der in dieser Studie untersuchten Probandinnen wiesen keine Anti-TAA Immunität auf. Sollte sich in Zukunft herausstellen, dass auch unter diesen Frauen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko auftritt, wäre auch für diese Gruppe eine präventive Vakzinierung sinnvoll.

Therapeutische Impfstoffe gegen Brustkrebs werden seit über 20 Jahren erforscht. Peptidvakzine haben sich im Rahmen dieser Studien als nebenwirkungsarm erwiesen. Sie sind kostengünstig und können einfach in großen Mengen hergestellt werden. Allerdings sind Impfstoffe gegen bereits etablierte Tumoren nur wenig effektiv. Sind diese bereits metastasiert, liegt die in klinischen Studien gemessene objektive Ansprechrate bei unter 4% (S. A. Rosenberg und Dudley 2004). Die Anwendung prophylaktischer Impfstoffe wäre vermutlich deutlich wirkungsvoller, da eine prä-existente Immunität Tumoren schon in einem sehr frühen Stadium bekämpfen kann, wenn diese noch keine immunsuppressiven Eigenschaft erlangt haben (Finn und Forni 2002). Die Wirksamkeit von auf TAA basierenden prophylaktischen Impfstoffen gegen Brustkrebs wurde in Tierversuchen bereits bestätigt (Esserman *et al.* 1999, Kass *et al.* 1999, Wei *et al.* 1999, Ben-Hur *et al.* 2000, Soares *et al.* 2001, Xing *et al.* 2001, Jaini *et al.* 2010). In einer klinischen Studie von Olivera J. Finn *et al.* erwies sich eine pro-

phylaktische Impfung gegen MUC1 als effektiv und sicher. Direkt nach der Verabreichung des Vakzins traten in den Probanden, denen in der Vergangenheit prämaligne Läsionen des Colons entfernt wurden, nur sehr leichte Nebenwirkungen auf, darunter Hautrötungen an der Einstichstelle und grippe-ähnliche Beschwerden. Zudem wurde eine Immunantwort gegen MUC1 in fast der Hälfte der Probanden induziert, die in den meisten Fällen für länger als ein Jahr erhalten blieb (S. A. Rosenberg und Dudley 2004).

Der Vorteil von Impfstoffen mit langen synthetischen Peptiden ist, dass diese mehrere T-Zell Epitope besitzen und ihre Effizienz nicht auf einzelne HLA Moleküle beschränkt ist. Durch dendritische Zellen können sowohl Epitope für CD4⁺, als auch für CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden, was in einer verstärkten zytotoxischen Leistung der beiden Zelltypen resultieren kann (Knutson *et al.* 2001, Disis *et al.* 2002). Allerdings besteht bei der Impfung mit langen Peptiden immer die Gefahr, dass auch Treg induziert werden (Welters *et al.* 2008, Perez *et al.* 2013).

Die Anzahl von regulatorischen T-Zellen, die eine Anti-Tumor Immunantwort unterdrücken können, können beispielsweise mit einem Antikörper gegen CD25 verringert werden (Rech *et al.* 2012). Anhand eines Mausmodells wurde gezeigt, dass die transiente Entfernung von Treg ohne Auftreten schwerer Nebenwirkungen zu einer massiven Abtötung von Brustkrebs durch CD4⁺ T-Zellen führen kann (P. D. Bos *et al.* 2013).

Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob TAA-spezifische T-Zellen aus gesunden Müttern im Rahmen einer Stammzelltransplantation auf Andere übertragen werden können. Über 3.000 Transplantationen von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark und Blut gesunder Spender werden in Deutschland pro Jahr durchgeführt, um Patienten mit Leukämien und anderen Erkrankungen zu heilen (Jahresbericht 2013 des Deutschen Registers für Stammzelltransplantationen). Sollten spontane T-Zellantworten gegen Brustkrebsantigene, die in gesunden Müttern induziert werden, eine geringere Inzidenz von Brustkrebs oder anderen Tumoren bewirken, würde eine Stammzelltransplantation auch in anderen Menschen ein geringeres Risiko für die Entwicklung solider Karzinome bewirken, und zwar unabhängig von der Verabreichung eines Impfstoffes.

8. Literaturverzeichnis

- Abul-Hajj, Y. J., Iverson, R. und Kiang, D. T. (1979). "Aromatization of androgens by human breast cancer." *Steroids* 33(2): 205-222.
- Adriance, M. C. und Gendler, S. J. (2004). "Downregulation of Muc1 in MMTV-c-Neu tumors." *Oncogene* 23(3): 697-705.
- Agrawal, B., Reddish, M. A., Krantz, M. J., et al. (1995). "Does Pregnancy Immunize against Breast Cancer?" *Cancer Research* 55(11): 2257-2261.
- Agrawal, B., Reddish, M. A. und Longenecker, B. M. (1996). "In vitro induction of MUC-1 peptide-specific type 1 T lymphocyte and cytotoxic T lymphocyte responses from healthy multiparous donors." *J Immunol* 157(5): 2089-2095.
- Al-Dhaheri, W. S., Hassouna, I., Al-Salam, S., et al. (2008). "Characterization of breast cancer progression in the rat." *Ann N Y Acad Sci* 1138: 121-131.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., et al. (2005). "Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects." *Br J Cancer* 92(1): 167-175.
- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., et al. (2014). "Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients." *Annals of Oncology* 25(8): 1536-1543.
- Allred, D. C. (2010). "Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history." *J Natl Cancer Inst Monogr* 2010(41): 134-138.
- Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. und Betz, A. G. (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." *Nat Immunol* 5(3): 266-271.
- Andrade Filho, P. A., Lopez-Albaitero, A., Gooding, W., et al. (2010). "Novel immunogenic HLA-A*0201-restricted epidermal growth factor receptor-specific T-cell epitope in head and neck cancer patients." *J Immunother* 33(1): 83-91.
- Appay, V., Jandus, C., Voelter, V., et al. (2006). "New Generation Vaccine Induces Effective Melanoma-Specific CD8+ T Cells in the Circulation but Not in the Tumor Site." *The Journal of Immunology* 177(3): 1670-1678.
- Aptsiauri, N., Garcia-Lora, A. M. und Cabrera, T. (2013). *MHC Class I Antigens In Malignant Cells: Immune Escape And Response To Immunotherapy*, Springer.
- Arklie, J., Taylor-Papadimitriou, J., Bodmer, W., et al. (1981). "Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers." *Int J Cancer* 28(1): 23-29.
- Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A. H., et al. (2007). "Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction." *The Journal of Immunology* 178(4): 2572-2578.

-
- Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., *et al.* (1999). "A Direct Estimate of the Human $\alpha\beta$ T Cell Receptor Diversity." *Science* 286(5441): 958-961.
- Aubry, J., Cohen-Kaminsky, S. und Berrih-Aknin, S. (1990). "Differential expression of carcinoembryonic antigens and non cross-reacting antigens in the human thymus. Analysis on frozen sections and cultured epithelial cells using monoclonal antibodies." *Thymus* 15(2): 107-123.
- Ayyoub, M., Scarlata, C. M., Hamai, A., *et al.* (2014). "Expression of MAGE-A3/6 in Primary Breast Cancer is Associated With Hormone Receptor Negative Status, High Histologic Grade, and Poor Survival." *J Immunother* 37(2): 73-76.
- Baitsch, L., Legat, A., Barba, L., *et al.* (2012). "Extended Co-Expression of Inhibitory Receptors by Human CD8 T-Cells Depending on Differentiation, Antigen-Specificity and Anatomical Localization." *PLoS ONE* 7(2): e30852.
- Baldwin, R. W., Glaves, D. und Vose, B. M. (1972). "Embryonic antigen expression in chemically induced rat hepatomas and sarcomas." *International Journal of Cancer* 10(2): 233-243.
- Balogh, G. A., Heulings, R., Mailo, D. A., *et al.* (2006). "Genomic signature induced by pregnancy in the human breast." *Int J Oncol* 28(2): 399-410.
- Banerjee, S., Reis-Filho, J. S., Ashley, S., *et al.* (2006). "Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy." *Journal of Clinical Pathology* 59(7): 729-735.
- Bartek, J., Petrek, M., Vojtesek, B., *et al.* (1987). "HLA-DR antigens on differentiating human mammary gland epithelium and breast tumours." *Br J Cancer* 56(6): 727-733.
- Baselga, J. und Swain, S. M. (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." *Nat Rev Cancer* 9(7): 463-475.
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., *et al.* (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." *J Clin Oncol* 24(34): 5373-5380.
- Beauchemin, N. und Arabzadeh, A. (2013). "Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis." *Cancer and Metastasis Reviews* 32(3-4): 643-671.
- Beckhove, P., Feuerer, M., Dolenc, M., *et al.* (2004). "Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors." *The Journal of Clinical Investigation* 114(1): 67-76.
- Beckhove, P., Warta, R., Lemke, B., *et al.* (2010). "Rapid T cell-based identification of human tumor tissue antigens by automated two-dimensional protein fractionation." *The Journal of Clinical Investigation* 120(6): 2230-2242.
- Belkaid, Y. und Tarbell, K. (2009). "Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions." *Annual Review of Immunology* 27(1): 551-589.
- Ben-Hur, H., Kossoy, G., Sandler, B., *et al.* (2000). "Vaccination with soluble low-molecular weight tumor-associated proteins suppresses chemically-induced mammary tumorigenesis in rats." *In Vivo* 14(4): 551-554.
-

- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., *et al.* "The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins." *Cell* 61(1): 49-59.
- Benigni, F., Zimmermann, V. S., Hugues, S., *et al.* (2005). "Phenotype and Homing of CD4 Tumor-Specific T Cells Is Modulated by Tumor Bulk." *The Journal of Immunology* 175(2): 739-748.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., *et al.* (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* 27(1): 20-21.
- Berlier, W., Cremel, M., Hamzeh, H., *et al.* (2006). "Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV." *Human Reproduction* 21(5): 1135-1142.
- Bernstein, L., Pike, M. C., Ross, R. K., *et al.* (1985). "Estrogen and sex hormone-binding globulin levels in nulliparous and parous women." *J Natl Cancer Inst* 74(4): 741-745.
- Bertotto, A., Gerli, R., Fabietti, G., *et al.* (1990). "Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells." *European Journal of Immunology* 20(8): 1877-1880.
- Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., *et al.* (1996). "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(2): 705-708.
- Bianchini, G. und Gianni, L. (2014). "The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer." *The Lancet Oncology* 15(2): e58-e68.
- Blake-Mortimer, J. S., Sephton, S. E., Carlson, R. W., *et al.* (2004). "Cytotoxic T Lymphocyte Count and Survival Time in Women with Metastatic Breast Cancer." *The Breast Journal* 10(3): 195-199.
- Bland, K. I., Menck, H. R., Scott-Conner, C. E., *et al.* (1998). "The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States." *Cancer* 83(6): 1262-1273.
- Blixt, O., Bueti, D., Burford, B., *et al.* (2011). "Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis." *Breast Cancer Research* 13(2): R25.
- Bloom, H. J. und Richardson, W. W. (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." *Br J Cancer* 11(3): 359-377.
- Bluestone, J. A. und Abbas, A. K. (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* 3(3): 253-257.
- Bocker, W., Schweikhart, G., Pollow, K., *et al.* (1985). "Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) in 120 mammary carcinomas and its correlation with tumor type, grading, staging plasma-CEA, and biochemical receptor status." *Pathol Res Pract* 180(5): 490-497.
- Bon, G. G., Kenemans, P., Verstraeten, A. A., *et al.* (2001). "Maternal serum Ca125 and Ca15-3 antigen levels in normal and pathological pregnancy." *Fetal Diagn Ther* 16(3): 166-172.

- Bonertz, A., Weitz, J., Pietsch, D. H., *et al.* (2009). "Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma." *J Clin Invest* 119(11): 3311-3321.
- Bos, P. D., Plitas, G., Rudra, D., *et al.* (2013). "Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy." *J Exp Med* 210(11): 2435-2466.
- Bos, R. und Sherman, L. A. (2010). "CD4+ T-Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and Cytolytic Function of CD8+ T Lymphocytes." *Cancer Research* 70(21): 8368-8377.
- Brandtzaeg, P. (2010). "The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands." *The Journal of Pediatrics* 156(2): S8-S15.
- Brawn, R. J. (1970). "Possible association of embryonal antigen(S) with several primary 3-methylcholanthrene-induced murine sarcomas." *International Journal of Cancer* 6(2): 245-249.
- Brayman, M., Thathiah, A. und Carson, D. (2004). "MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia." *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(1): 4.
- Brignone, C., Grygar, C., Marcu, M., *et al.* (2007). "A Soluble Form of Lymphocyte Activation Gene-3 (IMP321) Induces Activation of a Large Range of Human Effector Cytotoxic Cells." *The Journal of Immunology* 179(6): 4202-4211.
- Brignone, C., Gutierrez, M., Mefti, F., *et al.* (2010). "First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity." *Journal of Translational Medicine* 8(1): 71.
- Briscoe, J. und Therond, P. (2005). "Hedgehog signaling: from the Drosophila cuticle to anti-cancer drugs." *Dev Cell* 8(2): 143-151.
- Briscoe, J. und Therond, P. (2013). "The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(7): 416-429.
- Brisken, C. (2013). "Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight." *Nat Rev Cancer* 13(6): 385-396.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., *et al.* (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* 27(1): 68-73.
- Bulmer, J. N., Morrison, L., Longfellow, M., *et al.* (1991). "Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies." *Hum Reprod* 6(6): 791-798.
- Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., *et al.* (1987). "Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin." *Cancer Res* 47(20): 5476-5482.
- Burchell, J., Wang, D. und Taylor-Papadimitriou, J. (1984). "Detection of the tumour-associated antigens recognized by the monoclonal antibodies HMFG-1 and 2 in serum from patients with breast cancer." *Int J Cancer* 34(6): 763-768.

-
- Burchell, J. M., Mungul, A. und Taylor-Papadimitriou, J. (2001). "O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(3): 355-364.
- Caballero, O. L., Shousha, S., Zhao, Q., *et al.* (2014). "Expression of Cancer/Testis genes in ductal carcinoma in situ and benign lesions of the breast." *Oncoscience* 1(1): 14-20.
- Cameron, B. J., Gerry, A. B., Dukes, J., *et al.* (2013). "Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells." *Sci Transl Med* 5(197): 197ra103.
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., *et al.* (2007). "The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes." *Clinical Cancer Research* 13(8): 2329-2334.
- Caserta, S., Borger, J. G. und Zamoyska, R. (2012). "Central and Effector Memory CD4 and CD8 T-Cell Responses to Tumor-Associated Antigens." 32(2): 97-126.
- Chakravarty, P. K., Ghosh, S. K. und Sinha, D. K. (1991). "Pregnancy-Induced Cytotoxicity of Splenocytes against Mammary Tumor Cells in Rats." *Oncology* 48(5): 425-430.
- Chakravarty, P. K. und Sinha, D. K. (2000). "Pregnancy induced mammary tumor specific effector cells are present long after parturition in a breast cancer model in rats." *Cancer Letters* 154(1): 1-7.
- Challier, J., Bruniquel, D., Sewell, A. K., *et al.* (2013). "Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8+ T-cell priming capacity." *Immunology* 138(4): 402-410.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., *et al.* (2009). "Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future." *Br J Pharmacol* 157(2): 220-233.
- Chandradasa, K. D. und Barnes, R. M. R. (1979). "Immunological resistance to growth of tumours in syngeneic multiparous mice." *European Journal of Cancer (1965)* 15(5): 671-677.
- Chang-Claude, J., Dunning, A., Schnitzbauer, U., *et al.* (2003). "The patched polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk." *Int J Cancer* 103(6): 779-783.
- Chang, E., Lee, E., Yoo, C., *et al.* (2005). "Cellular localization of MUC1 in Benign and Malignant Breast Lesions with the Histological Correlation and the Prognostic Significance." *J Breast Cancer* 8(4): 150-156.
- Chaux, P., Vantomme, V., Coulie, P., *et al.* (1998). "Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer." *International Journal of Cancer* 77(4): 538-542.
- Chen, T., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., *et al.* (2013). "Self-Specific Memory Regulatory T Cells Protect Embryos at Implantation in Mice." *The Journal of Immunology* 191(5): 2273-2281.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., *et al.* (2003). "Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3." *The Journal of Experimental Medicine* 198(12): 1875-1886.
-

Chia, S. K., Speers, C. H., D'Yachkova, Y., *et al.* (2007). "The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer." *Cancer* 110(5): 973-979.

Classen-Linke, I., Moss, S., Groting, K., *et al.* (2012). "Mammaglobin 1: not only a breast-specific and tumour-specific marker, but also a hormone-responsive endometrial protein." *Histopathology* 61(5): 955-965.

Clavel-Chapelon, F. und Group, E. N. (2002). "Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women." *Cancer Causes Control* 13(9): 831-838.

Cloosen, S., Arnold, J., Thio, M., *et al.* (2007). "Expression of Tumor-Associated Differentiation Antigens, MUC1 Glycoforms and CEA, in Human Thymic Epithelial Cells: Implications for Self-Tolerance and Tumor Therapy." *Cancer Research* 67(8): 3919-3926.

Co, M. D. T., Kilpatrick, E. D. und Rothman, A. L. (2009). "Dynamics of the CD8 T-cell response following yellow fever virus 17D immunization." *Immunology* 128(1pt2): e718-e727.

Coleman, R. E., Body, J. J., Aapro, M., *et al.* (2014). "Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines." *Annals of Oncology*.

Coleman, R. E. und Rubens, R. D. (1987). "The clinical course of bone metastases from breast cancer." *Br J Cancer* 55(1): 61-66.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, I. (2002). "Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease." *The Lancet* 360(9328): 187-195.

Collins, L. C., Tamimi, R. M., Baer, H. J., *et al.* (2005). "Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy." *Cancer* 103(9): 1778-1784.

Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., *et al.* (2014). "Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 14(2): 135-146.

Criscitello, C. (2012). "Tumor-Associated Antigens in Breast Cancer." *Breast Care* 7(4): 262-266.

Criscitello, C. und Curigliano, G. (2013). "Immunotherapeutics for breast cancer." *Curr Opin Oncol* 25(6): 602-608.

Croce, M. V., Isla-Larrain, M. T., Capafons, A., *et al.* (2001). "Humoral immune response induced by the protein core of MUC1 mucin in pregnant and healthy women." *Breast Cancer Res Treat* 69(1): 1-11.

Croce, M. V., Isla-Larrain, M. T., Rua, C. E., *et al.* (2003). "Patterns of MUC1 Tissue Expression Defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51(6): 781-788.

Crompton, T., Outram, S. V. und Hager-Theodorides, A. L. (2007). "Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation." *Nat Rev Immunol* 7(9): 726-735.

- Curotto de Lafaille, M. und Lafaille, J. (2004). "The role of regulatory T cells in allergy." *Springer Seminars in Immunopathology* 25(3-4): 295-310.
- Cutuli, B., Cohen-Solal-Le Nir, C., De Lafontan, B., *et al.* (2001). "Ductal carcinoma in situ of the breast results of conservative and radical treatments in 716 patients." *European Journal of Cancer* 37(18): 2365-2372.
- D'Souza, S. S., Daikoku, T., Farach-Carson, M. C., *et al.* (2007). "Heparanase expression and function during early pregnancy in mice." *Biol Reprod* 77(3): 433-441.
- Dadmarz, R., Sgagias, M., Rosenberg, S., *et al.* (1995). "CD4+ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restricted fashion." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 40(1): 1-9.
- Darasse-Jèze, G., Klatzmann, D., Charlotte, F., *et al.* (2006). "CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice." *Immunology Letters* 102(1): 106-109.
- Darrah, P. A., Patel, D. T., De Luca, P. M., *et al.* (2007). "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*." *Nat Med* 13(7): 843-850.
- De Candia, P., Benera, R. und Solit, D. B. (2004). A Role for Id Proteins in Mammary Gland Physiology and Tumorigenesis. *Advances in Cancer Research*, Academic Press. Volume 92: 81-94.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., *et al.* (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." *European Journal of Immunology* 34(9): 2480-2488.
- De Potter, C. R., Beghin, C., Praet, M. M., *et al.* (1988). "CEA and HMFG in Hyperplastic and Malignant Lesions of the Breast." *Pathology - Research and Practice* 183(3): 271-276.
- Demir, L., Yigit, S., Ellidokuz, H., *et al.* (2013). "Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs." *Clinical & Experimental Metastasis* 30(8): 1047-1062.
- Denkert, C. (2014). "The immunogenicity of breast cancer—molecular subtypes matter." *Annals of Oncology* 25(8): 1453-1455.
- Desprez, P.-Y., Lin, C. Q., Thomasset, N., *et al.* (1998). "A Novel Pathway for Mammary Epithelial Cell Invasion Induced by the Helix-Loop-Helix Protein Id-1." *Molecular and Cellular Biology* 18(8): 4577-4588.
- Dhodapkar, M. V., Young, J. W., Chapman, P. B., *et al.* (2000). "Paucity of functional T-cell memory to melanoma antigens in healthy donors and melanoma patients." *Clin Cancer Res* 6(12): 4831-4838.
- Di Magliano, M. P. und Hebrok, M. (2003). "Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance." *Nat Rev Cancer* 3(12): 903-911.
- Diaz, L. K., Wiley, E. L. und Morrow, M. (2001). "Expression of epithelial mucins Muc1, Muc2, and Muc3 in ductal carcinoma in situ of the breast." *Breast J* 7(1): 40-45.
- Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., *et al.* (2002). "Generation of T-Cell Immunity to the HER-2/neu Protein After Active Immunization With HER-2/neu Peptide-Based Vaccines." *Journal of Clinical Oncology* 20(11): 2624-2632.

Disis, M. L., Knutson, K. L., Schiffman, K., *et al.* (2000). "Pre-existent immunity to the HER2/neu oncogenic protein in patients with HER2/neu overexpressing breast and ovarian cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 62: 245–252.

Do, S. I., Kim, K., Kim, D. H., *et al.* (2013). "Associations between the Expression of Mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and Clinicopathologic Parameters of Human Breast Ductal Carcinomas." *J Breast Cancer* 16(2): 152-158.

Domschke, C., Schuetz, F., Ge, Y., *et al.* (2009). "Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis." *Cancer Res* 69(21): 8420-8428.

Dong, D.-D., Yie, S.-m., Li, K., *et al.* (2012). "Importance of HLA-G expression and tumor infiltrating lymphocytes in molecular subtypes of breast cancer." *Human Immunology* 73(10): 998-1004.

Dorgan, J. F., Baer, D. J., Albert, P. S., *et al.* (2001). "Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* 93(9): 710-715.

Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 4(1): 11-22.

Duhen, T., Duhen, R., Lanzavecchia, A., *et al.* (2012). "Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells." *Blood* 119(19): 4430-4440.

Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004). "The Three Es of Cancer Immunoediting." *Annual Review of Immunology* 22(1): 329-360.

Dutta, P. und Burlingham, W. J. (2011). "Microchimerism: tolerance vs. sensitization." *Current Opinion in Organ Transplantation* 16(4): 359-365.

Echchakir, H., Bagot, M., Dorothee, G., *et al.* (2000). "Cutaneous T Cell Lymphoma Reactive CD4+ Cytotoxic T Lymphocyte Clones Display a Th1 Cytokine Profile and Use a Fas-Independent Pathway for Specific Tumor Cell Lysis." 115(1): 74-80.

Edorh, A., Leroux, A., N'Sossani, B., *et al.* (1999). "Detection by immunohistochemistry of c-erbB2 oncoprotein in breast carcinomas and benign mammary lesions." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(6): 831-840.

Elston, C. W. und Ellis, I. O. (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19(5): 403-410.

Enninga, E. A. L., Holtan, S. G., Creedon, D. J., *et al.* (2014). "Immunomodulatory Effects of Sex Hormones: Requirements for Pregnancy and Relevance in Melanoma." *Mayo Clinic Proceedings* 89(4): 520-535.

Ercan, S., Kaymaz, O., Yucel, N., *et al.* (2012). "Serum concentrations of CA 125, CA 15-3, CA 19-9 and CEA in normal pregnancy: a longitudinal study." *Arch Gynecol Obstet* 285(3): 579-584.

Esserman, L. J., Lopez, T., Montes, R., *et al.* (1999). "Vaccination with the extracellular domain of p185 neu prevents mammary tumor development in neu transgenic mice." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 47(6): 337-342.

- Eun, J. K., Guthrie, K. A., Zirpoli, G., *et al.* (2013). "In Situ Breast Cancer and Microchimerism." *Sci Rep* 3.
- Evans, P. C., Lambert, N., Maloney, S., *et al.* (1999). "Long-Term Fetal Microchimerism in Peripheral Blood Mononuclear Cell Subsets in Healthy Women and Women With Scleroderma." *Blood* 93(6): 2033-2037.
- Faghih, Z., Erfani, N., Haghshenas, M. R., *et al.* (2014). "Immune profiles of CD4+ lymphocyte subsets in breast cancer tumor draining lymph nodes." *Immunology Letters* 158(1–2): 57-65.
- Fagnart, O. C., Cambiaso, C. L., Lejeune, M. D., *et al.* (1985). "Prognostic value of concentration of pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP1) in serum of patients with breast cancer." *Int J Cancer* 36(5): 541-544.
- Fauquembergue, E., Toutirais, O., Tougeron, D., *et al.* (2010). "HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy." *J Immunother* 33(4): 402-413.
- Feigelson, H. S. und Henderson, B. E. (1996). "Estrogens and breast cancer." *Carcinogenesis* 17(11): 2279-2284.
- Ferguson, D. J. (1985). "Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the normal breast." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 407(4): 369-378.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., *et al.* (2013). "GLOBOCAN 2012: Cancer Incidence and Mortality Worldwide." Abgerufen am 04.08.2014 von <http://globocan.iarc.fr>.
- Feurerer, M., Beckhove, P., Bai, L., *et al.* (2001). "Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow." *Nat Med* 7(4): 452-458.
- Fiaschi, M., Rozell, B., Bergstrom, A., *et al.* (2009). "Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1." *Cancer Res* 69(11): 4810-4817.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* 3(6): 453-458.
- Finn, O. J. und Forni, G. (2002). "Prophylactic cancer vaccines." *Current Opinion in Immunology* 14(2): 172-177.
- Finn, O. J., Jerome, K. R., Henderson, R. A., *et al.* (1995). "MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines." *Immunol Rev* 145: 61-89.
- Fleming, T. P. und Watson, M. A. (1999). Mammaglobin, a secreted mammary-specific breast cancer protein.
- Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., *et al.* (2003). "Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 95(19): 1482-1485.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., *et al.* (2000). "Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 192(7): 1027-1034.

- Gadi, V. K. (2009). "Fetal microchimerism and cancer." *Cancer Letters* 276(1): 8-13.
- Gadi, V. K., Malone, K. E., Guthrie, K. A., et al. (2008). "Case-Control Study of Fetal Microchimerism and Breast Cancer." *PLoS ONE* 3(3): e1706.
- Gadi, V. K. und Nelson, J. L. (2007). "Fetal Microchimerism in Women with Breast Cancer." *Cancer Research* 67(19): 9035-9038.
- Galvis-Jimenez, J. M., Curtidor, H., Patarroyo, M. A., et al. (2013). "Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection." *Cancer Biol Ther* 14(4): 327-332.
- Gameiro, S. R., Jammeh, M. L. und Hodge, J. W. (2013). "Cancer vaccines targeting carcinoembryonic antigen: state-of-the-art and future promise." *Expert Rev Vaccines* 12(6): 617-629.
- Gammill, H. S. und Nelson, J. L. (2010). "Naturally acquired microchimerism." *The International journal of developmental biology* 54(2-3): 531-543.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., et al. (2011). "A human memory T cell subset with stem cell-like properties." *Nat Med* 17(10): 1290-1297.
- Ge, Y., Domschke, C., Stoiber, N., et al. (2012). "Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61(3): 353-362.
- GEKID. (2013). "Atlas der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland." Abgerufen am 04.09.2014 von http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C50&Year_from=2000&Year_to=2011&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on.
- Gendler, S. J. und Spicer, A. P. (1995). "Epithelial Mucin Genes." *Annual Review of Physiology* 57(1): 607-634.
- Gilliam, A. G. (1951). "Fertility and cancer of the breast and of the uterine cervix; comparisons between rates of pregnancy in women with cancer at these and other sites." *J Natl Cancer Inst* 12(2): 287-304.
- Gjorevski, N. und Nelson, C. M. (2011). "Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(9): 581-593.
- Golden, E. B., Frances, D., Pellicciotta, I., et al. (2014). "Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death." *Oncoimmunology* 3: e28518.
- Goldman, A. S. und Goldblum, R. M. (1997). "Transfer of maternal leukocytes to the infant by human milk." *Curr Top Microbiol Immunol* 222: 205-213.
- Gotzsche, P. C. und Jorgensen, K. J. (2013). "Screening for breast cancer with mammography." *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD001877.
- Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Blair, S. L., et al. (2014). "Breast Cancer Version 3.2014." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 12(4): 542-590.

-
- Grann, V. R., Troxel, A. B., Zojwalla, N. J., *et al.* (2005). "Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma." *Cancer* 103(11): 2241-2251.
- Grigoriadis, A., Caballero, O. L., Hoek, K. S., *et al.* (2009). "CT-X antigen expression in human breast cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(32): 13493-13498.
- Grodin, J. M., Siiteri, P. K. und MacDonald, P. C. (1973). "Source of estrogen production in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* 36(2): 207-214.
- Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., *et al.* (2014). "PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors." *The Journal of Clinical Investigation* 124(5): 2246-2259.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., *et al.* (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* 21(4): 589-601.
- Guckel, B., Rentzsch, C., Nastke, M. D., *et al.* (2006). "Pre-existing T-cell immunity against mucin-1 in breast cancer patients and healthy volunteers." *J Cancer Res Clin Oncol* 132(4): 265-274.
- Guerin, L. R., Moldenhauer, L. M., Prins, J. R., *et al.* (2011). "Seminal Fluid Regulates Accumulation of FOXP3+ Regulatory T Cells in the Preimplantation Mouse Uterus Through Expanding the FOXP3+ Cell Pool and CCL19-Mediated Recruitment." *Biology of Reproduction* 85(2): 397-408.
- Gupta, S., Joshi, K., Wig, J. D., *et al.* (2007). "Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis." *Acta Oncol* 46(6): 792-797.
- Gusterson, B. A., Machin, L. G., Gullick, W. J., *et al.* (1988). "c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease." *Br J Cancer* 58(4): 453-457.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., *et al.* (2003). "Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination." *Nat Med* 9(9): 1131-1137.
- Hammarström, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." *Seminars in Cancer Biology* 9(2): 67-81.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Hannemann, J., Velds, A., Halfwerk, J., *et al.* (2006). "Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling." *Breast Cancer Research* 8(5): R61.
- Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., *et al.* (1998). "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling." *The Journal of Immunology* 161(8): 4058-4065.
- Harao, M., Mittendorf, E. und Radvanyi, L. (2015). "Peptide-Based Vaccination and Induction of CD8+ T-Cell Responses Against Tumor Antigens in Breast Cancer." *BioDrugs* 29(1): 15-30.
- Haricharan, S., Dong, J., Hein, S., *et al.* (2013). "Mechanism and preclinical prevention of increased breast cancer risk caused by pregnancy." *Elife* 2: e00996.
-

- Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Schaid, D. J., *et al.* (2001). "Efficacy of Bilateral Prophylactic Mastectomy in BRCA1 and BRCA2 Gene Mutation Carriers." *Journal of the National Cancer Institute* 93(21): 1633-1637.
- Hattrup, C. L. und Gendler, S. J. (2008). "Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins." *Annual Review of Physiology* 70(1): 431-457.
- Hayes, D. F., Zurawski, V. R. und Kufe, D. W. (1986). "Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer." *Journal of Clinical Oncology* 4(10): 1542-1550.
- Heath, W. R. und Carbone, F. R. (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." *Annual Review of Immunology* 19(1): 47-64.
- Hellström, I. und Hellström, K. E. (1975). "Cytotoxic effect of lymphocytes from pregnant mice on cultivated tumor cells. I. Specificity, nature of effector cells and blocking by serum." *International Journal of Cancer* 15(1): 1-16.
- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., *et al.* (2002). *Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response.*
- Holtan, S. G. und Creedon, D. J. (2011). "Mother knows best: lessons from fetomaternal tolerance applied to cancer immunity." *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 1533-1540.
- Holtan, S. G., Creedon, D. J., Haluska, P., *et al.* (2009). "Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents." *Mayo Clinic Proceedings* 84(11): 985-1000.
- Horn, T., Grab, J., Schusdziarra, J., *et al.* (2013). "Antitumor T cell responses in bladder cancer are directed against a limited set of antigens and are modulated by regulatory T cells and routine treatment approaches." *Int J Cancer* 133(9): 2145-2156.
- Howard, B. A. und Gusterson, B. A. (2000). "Human breast development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2): 119-137.
- Humphrey, L. L., Helfand, M., Chan, B. K., *et al.* (2002). "Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force." *Ann Intern Med* 137(5 Part 1): 347-360.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., *et al.* (1998). "The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response." *The Journal of Experimental Medicine* 188(12): 2357-2368.
- Hussein, Y. M., Gharib, A. F., Etewa, R. L., *et al.* (2011). "The melanoma-associated antigen-A3, -A4 genes: relation to the risk and clinicopathological parameters in breast cancer patients." *Mol Cell Biochem* 351(1-2): 261-268.
- Hynes, N. E. und Lane, H. A. (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* 5(5): 341-354.
- Hynes, N. E. und Watson, C. J. (2010). "Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(8): a003186.

- Iero, M., Squarcina, P., Romero, P., *et al.* (2007). "Low TCR avidity and lack of tumor cell recognition in CD8+ T cells primed with the CEA-analogue CAP1-6D peptide." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56(12): 1979-1991.
- Igney, F. H. und Krammer, P. H. (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *Journal of Leukocyte Biology* 71(6): 907-920.
- Ilias Basha, H., Tiriveedhi, V., Fleming, T. P., *et al.* (2011). "Identification of immunodominant HLA-B7-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes derived from mammaglobin-A expressed on human breast cancers." *Breast Cancer Research and Treatment* 127(1): 81-89.
- Imamichi, H., Natarajan, V., Adelsberger, J. W., *et al.* (2014). "Lifespan of effector memory CD4+ T cells determined by replication-incompetent integrated HIV-1 provirus." *AIDS* 28(8): 1091-1099 1010.1097/QAD.0000000000000223.
- Inokuma, M., dela Rosa, C., Schmitt, C., *et al.* (2007). "Functional T cell responses to tumor antigens in breast cancer patients have a distinct phenotype and cytokine signature." *J Immunol* 179(4): 2627-2633.
- Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., *et al.* (2005). "Galectin-9 as a Prognostic Factor with Antimetastatic Potential in Breast Cancer." *Clinical Cancer Research* 11(8): 2962-2968.
- Isla Larrain, M. T., Rabassa, M. E., Lacunza, E., *et al.* (2014). "IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis." *Tumor Biology* 35(7): 6511-6519.
- Itahana, Y., Piens, M., Fong, S., *et al.* (2008). "Expression of Id and ITF-2 genes in the mammary gland during pregnancy." *Biochem Biophys Res Commun* 372(4): 826-830.
- Jagger, A., Shimojima, Y., Goronzy, J. J., *et al.* (2014). "Regulatory T Cells and the Immune Aging Process: A Mini-Review." *Gerontology* 60(2): 130-137.
- Jain, R., Rawat, A., Verma, B., *et al.* (2013). "Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Targeting Major Histocompatibility Complex Class I–Her2 Peptide Complexes." *Journal of the National Cancer Institute* 105(3): 202-218.
- Jaini, R., Kesaraju, P., Johnson, J. M., *et al.* (2010). "An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination." *Nat Med* 16(7): 799-803.
- Jaramillo, A., Majumder, K., Manna, P. P., *et al.* (2002). "Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer." *Int J Cancer* 102(5): 499-506.
- Jaramillo, A., Narayanan, K., Campbell, L. G., *et al.* (2004). "Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8+ cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 88(1): 29-41.
- Jasper, M. J., Tremellen, K. P. und Robertson, S. A. (2006). "Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue." *Molecular Human Reproduction* 12(5): 301-308.

-
- Jin, L., Yuan, R. Q., Fuchs, A., *et al.* (1997). "Expression of interleukin-1 β in human breast carcinoma." *Cancer* 80(3): 421-434.
- Joshi, K., Monaghan, P. und Neville, A. M. (1985). "Ultrastructural identification of Ia positive dendritic cells in the lactating rat mammary gland." *Virchows Archiv A* 406(1): 17-25.
- Juch, H., Blaschitz, A., Dohr, G., *et al.* (2012). "HLA class I expression in the human placenta." *Wien Med Wochenschr* 162(9-10): 196-200.
- Jungbluth, A. A., Silva, W. A., Jr., Iversen, K., *et al.* (2007). "Expression of cancer-testis (CT) antigens in placenta." *Cancer Immun* 7: 15.
- Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M., *et al.* (1991). "Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta." *Acta Med Okayama* 45(3): 135-139.
- Kamper-Jørgensen, M. (2012). "Microchimerism and survival after breast and colon cancer diagnosis." *Chimerism* 3(3): 72-73.
- Kamper-Jørgensen, M., Biggar, R. J., Tjønneland, A., *et al.* (2012). "Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer." *European Journal of Cancer* 48(14): 2227-2235.
- Kaneko, K., Ishigami, S., Kijima, Y., *et al.* (2011). "Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer." *BMC Cancer* 11: 454.
- Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., *et al.* (2002). "Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation." *Endocrinology* 143(6): 2119-2138.
- Kass, E., Schlom, J., Thompson, J., *et al.* (1999). "Induction of Protective Host Immunity to Carcinoembryonic Antigen (CEA), a Self-Antigen in CEA Transgenic Mice, by Immunizing with a Recombinant Vaccinia-CEA Virus." *Cancer Research* 59(3): 676-683.
- Keeney, S. E., Schmalstieg, F. C., Palkowetz, K. H., *et al.* (1993). "Activated neutrophils and neutrophil activators in human milk: increased expression of CD11b and decreased expression of L-selectin." *Journal of Leukocyte Biology* 54(2): 97-104.
- Kelsey, J. L., Gammon, M. D. und John, E. M. (1993). "Reproductive factors and breast cancer." *Epidemiol Rev* 15(1): 36-47.
- Kenemans, P., Bon, G. G., Kessler, A. C., *et al.* (1992). "Multicenter technical and clinical evaluation of a fully automated enzyme immunoassay for CA 125." *Clinical Chemistry* 38(8): 1466-1471.
- Kerlikowske, K., Grady, D., Rubin, S. M., *et al.* (1995). "Efficacy of screening mammography. A meta-analysis." *JAMA* 273(2): 149-154.
- Kim, S. T., Jeong, H., Woo, O. H., *et al.* (2013). "Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer." *American Journal of Clinical Oncology* 36(3): 224-231.
- Kimura, T., McKolanis, J. R., Dzubinski, L. A., *et al.* (2013). "MUC1 Vaccine for Individuals with Advanced Adenoma of the Colon: A Cancer Immunoprevention Feasibility Study." *Cancer Prevention Research* 6(1): 18-26.
-

King, M., Wieand, S., Hale, K., *et al.* (2001). "Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in *brca1* and *brca2*: National surgical adjuvant breast and bowel project (nsabp-p1) breast cancer prevention trial." *JAMA* 286(18): 2251-2256.

Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., *et al.* (1987). "Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma." *Science* 236(4797): 70-73.

Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1997). "Gatekeepers and caretakers." *Nature* 386(6627): 761-763.

Klareskog, L., Forsum, U. und Peterson, P. A. (1980). "Hormonal regulation of the expression of Ia antigens on mammary gland epithelium." *European Journal of Immunology* 10(12): 958-963.

Klatzmann, D. (2014). "Regulatory T cells in pregnancy: historical perspective, state of the art and burning questions." *Frontiers in Immunology* 5.

Kmieciak, M., Gowda, M., Graham, L., *et al.* (2009). "Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function." *Journal of Translational Medicine* 7(1): 89.

Knuth, A., Wölfel, T., Klehmann, E., *et al.* (1989). "Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(8): 2804-2808.

Knutson, K. L. und Disis, M. L. (2005). "Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54(8): 721-728.

Knutson, K. L., Schiffman, K. und Disis, M. L. (2001). "Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients." *The Journal of Clinical Investigation* 107(4): 477-484.

Kobayashi, S., Sugiura, H., Ando, Y., *et al.* (2012). "Reproductive history and breast cancer risk." *Breast Cancer* 19(4): 302-308.

Koski, G. K., Koldovsky, U., Xu, S., *et al.* (2012). "A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized anti-HER-2/neu responses in women with early breast cancer." *J Immunother* 35(1): 54-65.

Krausz, L. T., Fischer-Fodor, E., Major, Z. Z., *et al.* (2012). "GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes." *Int J Immunopathol Pharmacol* 25(1): 59-66.

Kubota, K., Yamauchi, N., Matsumoto, K., *et al.* (2008). "Expression of hedgehog family genes in the rat uterus during early pregnancy." *J Reprod Dev* 54(5): 340-345.

Kulkarni, S. (2011). "Management of DCIS--a work in progress." *Oncology (Williston Park)* 25(9): 857, 860-851.

Kumai, T., Matsuda, Y., Oikawa, K., *et al.* (2013). "EGFR inhibitors augment antitumour helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy." *Br J Cancer* 109(8): 2155-2166.

- Kumar, S. N., Thomas, B. V. und Seelig Jr, L. L. (1988). "Immunohistochemical analysis of the stage-specific expression of Ia antigens in the rat mammary gland during pregnancy and lactation." *Journal of Reproductive Immunology* 13(2): 159-173.
- Kurian, A. W. und Carlson, R. W. (2010). "Principles of Breast Cancer Therapy". *Breast cancer epidemiology*. C. I. Li. New York, Springer,,: 371-388.
- Lal, A., Chan, L., DeVries, S., et al. (2013). "FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast." *Breast Cancer Research and Treatment* 139(2): 381-390.
- Large, M. J., Wetendorf, M., Lanz, R. B., et al. (2014). "The epidermal growth factor receptor critically regulates endometrial function during early pregnancy." *PLoS Genet* 10(6): e1004451.
- Le, X.-F., Claret, F.-X., Lammayot, A., et al. (2003). "The Role of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 in Anti-HER2 Antibody-induced G1 Cell Cycle Arrest and Tumor Growth Inhibition." *Journal of Biological Chemistry* 278(26): 23441-23450.
- Lebeau, A., Unholzer, A., Amann, G., et al. (2003). "EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast." *Breast Cancer Res Treat* 79(2): 187-198.
- Lee, E. S. M., Bou-Gharios, G., Seppanen, E., et al. (2010). "Fetal stem cell microchimerism: natural-born healers or killers?" *Molecular Human Reproduction* 16(11): 869-878.
- Lee, J. S., Park, S., Park, J. M., et al. (2013). "Elevated levels of serum tumor markers CA 15-3 and CEA are prognostic factors for diagnosis of metastatic breast cancers." *Breast Cancer Res Treat* 141(3): 477-484.
- LeMaout, J., Krawice-Radanne, I., Dausset, J., et al. (2004). "HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18): 7064-7069.
- Lerret, N. M., Rogozinska, M., Jaramillo, A., et al. (2012). "Adoptive transfer of Mammaglobin-A epitope specific CD8 T cells combined with a single low dose of total body irradiation eradicates breast tumors." *PLoS One* 7(7): e41240.
- Li, C. I., Anderson, B. O., Daling, J. R., et al. (2003). "Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma." *JAMA* 289(11): 1421-1424.
- Li, C. I. und Daling, J. R. (2007). "Changes in Breast Cancer Incidence Rates in the United States by Histologic Subtype and Race/Ethnicity, 1995 to 2004." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16(12): 2773-2780.
- Li, C. I., Daling, J. R. und Malone, K. E. (2003). "Incidence of Invasive Breast Cancer by Hormone Receptor Status From 1992 to 1998." *Journal of Clinical Oncology* 21(1): 28-34.
- Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., et al. (2000). "A Role for Id-1 in the Aggressive Phenotype and Steroid Hormone Response of Human Breast Cancer Cells." *Cancer Research* 60(5): 1332-1340.
- Liu, E., Thor, A., He, M., et al. (1992). "The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in situ carcinomas of the breast." *Oncogene* 7(5): 1027-1032.

-
- Liu, X., Yi, C., Wen, Y., *et al.* (2014). "Interactions between MUC1 and p120 Catenin Regulate Dynamic Features of Cell Adhesion, Motility, and Metastasis." *Cancer Research* 74(5): 1609-1620.
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., *et al.* (1997). "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum." *The Lancet* 350(9076): 485-487.
- Lo, Y. M., Lo, E. S., Watson, N., *et al.* (1996). *Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications.*
- Lo, Y. M., Tein, M. S. C., Lau, T. K., *et al.* (1998). "Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis." *The American Journal of Human Genetics* 62(4): 768-775.
- Loewendorf, A. I., Nguyen, T. A., Yesayan, M. N., *et al.* (2014). "Normal Human Pregnancy Results in Maternal Immune Activation in the Periphery and at the Uteroplacental Interface." *PLoS ONE* 9(5): e96723.
- Lupu, R., Cardillo, M., Harris, L., *et al.* (1995). "Interaction between erbB- receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance." *Seminars in Cancer Biology* 6(3): 135-145.
- Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., *et al.* (1999). "Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts." *Nature* 401(6754): 670-677.
- Lynge, E., Ponti, A., James, T., *et al.* (2014). "Variation in detection of ductal carcinoma in situ during screening mammography: A survey within the International Cancer Screening Network." *European Journal of Cancer* 50(1): 185-192.
- Magkou, C., Nakopoulou, L., Zoubouli, C., *et al.* (2008). "Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas." *Breast Cancer Res* 10(3): R49.
- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., *et al.* (2011). "Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer." *J Clin Oncol* 29(15): 1949-1955.
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., *et al.* (2013). "The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets." *European Journal of Immunology* 43(11): 2797-2809.
- Malhotra, I., Wamachi, A. N., Mungai, P. L., *et al.* (2008). "Fine Specificity of Neonatal Lymphocytes to an Abundant Malaria Blood-Stage Antigen: Epitope Mapping of Plasmodium falciparum MSP133." *The Journal of Immunology* 180(5): 3383-3390.
- Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M. J., *et al.* (2010). "Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7176-7186.
- Martinez, F. F., Cervi, L., Knubel, C. P., *et al.* (2013). "The Role of Pregnancy-Specific Glycoprotein 1a (PSG1a) in Regulating the Innate and Adaptive Immune Response." *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 383-394.
- Martinson, H. A., Jindal, S., Durand-Rougely, C., *et al.* (2014). "Wound healing-like immune program facilitates postpartum mammary gland involution and tumor progression." *International Journal of Cancer*: n/a-n/a.
-

- Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S. K., *et al.* (2002). "Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus." *Dev Biol* 245(2): 280-290.
- Maxhimer, J. B., Pesce, C. E., Stewart, R. A., *et al.* (2005). "Ductal carcinoma in situ of the breast and heparanase-1 expression: a molecular explanation for more aggressive subtypes." *J Am Coll Surg* 200(3): 328-335.
- Maxhimer, J. B., Quiros, R. M., Stewart, R. A., *et al.* (2002). "Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer." *Surgery* 132(2): 326-333.
- McGuckin, M. A., Ramm, L. E., Joy, G. J., *et al.* (1993). "Circulating tumour-associated mucin concentrations, determined by the CASA assay, in healthy women." *Clin Chim Acta* 214(2): 139-151.
- Mehla, K. und Singh, P. K. (2014). "MUC1: A novel metabolic master regulator." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1845(2): 126-135.
- Meinhardt, G., Husslein, P. und Knofler, M. (2005). "Tissue-specific and ubiquitous basic helix-loop-helix transcription factors in human placental trophoblasts." *Placenta* 26(7): 527-539.
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., *et al.* (2004). "Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy." *Clinical Cancer Research* 10(24): 8152-8162.
- Michels, K. B., Xue, F., Colditz, G. A., *et al.* (2007). "Induced and spontaneous abortion and incidence of breast cancer among young women: a prospective cohort study." *Arch Intern Med* 167(8): 814-820.
- Miller, K. D., Diéras, V., Harbeck, N., *et al.* (2014). "Phase IIa Trial of Trastuzumab Emtansine With Pertuzumab for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive, Locally Advanced, or Metastatic Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 32(14): 1437-1444.
- Mittendorf, E. A., Clifton, G. T., Holmes, J. P., *et al.* (2012). "Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients." *Cancer* 118(10): 2594-2602.
- Mold, J. E., Michaëlsson, J., Burt, T. D., *et al.* (2008). "Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero." *Science* 322(5907): 1562-1565.
- Moldenhauer, L. M., Diener, K. R., Thring, D. M., *et al.* (2009). "Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy." *The Journal of Immunology* 182(12): 8080-8093.
- Moller, P., Mattfeldt, T., Gross, C., *et al.* (1989). "Expression of HLA-A, -B, -C, -DR, -DP, -DQ, and of HLA-D-associated invariant chain (Ii) in non-neoplastic mammary epithelium, fibroadenoma, adenoma, and carcinoma of the breast." *Am J Pathol* 135(1): 73-83.
- Mor, G. (2008). "Inflammation and Pregnancy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1127(1): 121-128.
- Moraes, R. C., Zhang, X., Harrington, N., *et al.* (2007). "Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia." *Development* 134(6): 1231-1242.

-
- Morgan, R. A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., *et al.* (2013). "Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy." *J Immunother* 36(2): 133-151.
- Mueller, U. W., Hawes, C. S., Wright, A. E., *et al.* (1990). "Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women." *Lancet* 336(8709): 197-200.
- Muenst, S., Schaerli, A. R., Gao, F., *et al.* (2014). "Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 146(1): 15-24.
- Munn, D. H. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* 281: 1191-1193.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., *et al.* (1998). "Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism." *Science* 281(5380): 1191-1193.
- Muraro, E., Martorelli, D., Turchet, E., *et al.* (2011). "A different immunologic profile characterizes patients with HER-2-overexpressing and HER-2-negative locally advanced breast cancer: implications for immune-based therapies." *Breast Cancer Research* 13(6): R117.
- Murphy, K. M. (2011). *Janeway's Immunobiology*, Taylor & Francis Group.
- Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F. M., *et al.* (2003). "Natural T cell immunity against cancer." *Clin Cancer Res* 9(12): 4296-4303.
- Nalawade, Y. (2009). *Evaluation of breast calcifications*.
- Nauts, H. C., Fowler, G. A. und Bogatko, F. H. (1953). "A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study." *Acta Med Scand Suppl* 276: 1-103.
- NCI. (2014). "Breast Cancer Prevention (PDQ®)." Abgerufen am 09.09.2014 von http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032652/#CDR0000257994_13.
- Neethling, F. A., Ramakrishna, V., Keler, T., *et al.* (2008). "Assessing vaccine potency using TCRmimic antibodies." *Vaccine* 26(25): 3092-3102.
- Neumann, A., Horzer, H., Hillen, N., *et al.* (2013). "Identification of HLA ligands and T-cell epitopes for immunotherapy of lung cancer." *Cancer Immunol Immunother* 62(9): 1485-1497.
- Nicolas Diaz-Chico, B., German Rodriguez, F., Gonzalez, A., *et al.* (2007). "Androgens and androgen receptors in breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 105(1-5): 1-15.
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>.
- Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., *et al.* (2005). "IFN- γ Controls the Generation/Activation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Antitumor Immune Response." *The Journal of Immunology* 175(7): 4433-4440.
- Nozoe, T., Mori, E., Iguchi, T., *et al.* (2011). "Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer." *Breast Cancer* 18(1): 37-41.
-

-
- Nutsch, K. M. und Hsieh, C.-S. (2012). "T cell tolerance and immunity to commensal bacteria." *Current Opinion in Immunology* 24(4): 385-391.
- O'Brien, J., Lyons, T., Monks, J., et al. (2010). "Alternatively activated macrophages and collagen remodeling characterize the postpartum involuting mammary gland across species." *Am J Pathol* 176(3): 1241-1255.
- Oikawa, S., Imajo, S., Noguchi, T., et al. (1987). "The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 144(2): 634-642.
- Oksenberg, J. R., Persitz, E. und Brautbar, C. (1985). "Cellular immunity in human milk." *Am J Reprod Immunol Microbiol* 8(4): 125-129.
- Oldford, S. A., Robb, J. D., Codner, D., et al. (2006). "Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients." *International Immunology* 18(11): 1591-1602.
- Otte, M., Zafrakas, M., Riethdorf, L., et al. (2001). "MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer." *Cancer Res* 61(18): 6682-6687.
- Page, D. B., Naidoo, J. und McArthur, H. L. (2014). "Emerging immunotherapy strategies in breast cancer." *Immunotherapy* 6(2): 195-209.
- Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W., et al. (1995). "Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy." *Cancer* 76(7): 1197-1200.
- Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W., et al. (1982). "Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only." *Cancer* 49(4): 751-758.
- Park, S., Jiang, Z., Mortenson, E. D., et al. (2010). "The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity." *Cancer Cell* 18(2): 160-170.
- Parmely, M. J. und Beer, A. E. (1977). "Colostrum Cell-Mediated Immunity and the Concept of a Common Secretory Immune System." *Journal of Dairy Science* 60(4): 655-665.
- Pegram, M. D., Finn, R. S., Arzoo, K., et al. (1997). "The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells." *Oncogene* 15(5): 537-547.
- Perelson, A. S. und Wiegel, F. W. (2009). "Scaling aspects of lymphocyte trafficking." *Journal of Theoretical Biology* 257(1): 9-16.
- Perez, S. A., Anastasopoulou, E. A., Tzonis, P., et al. (2013). "AE37 peptide vaccination in prostate cancer: a 4-year immunological assessment updates on a phase I trial." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62(10): 1599-1608.
- Perez, S. A., Sotiropoulou, P. A., Sotiriadou, N. N., et al. (2002). "HER-2/neu-derived peptide 884-899 is expressed by human breast, colorectal and pancreatic adenocarcinomas and is recognized by in-vitro-induced specific CD4+ T cell clones." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 50(11): 615-624.
-

-
- Persson, J., Beyer, I., Yumul, R., *et al.* (2011). "Immuno-Therapy with Anti-CTLA4 Antibodies in Tolerized and Non-Tolerized Mouse Tumor Models." *PLoS ONE* 6(7): e22303.
- Pertl, B. und Bianchi, D. W. (1999). "First trimester prenatal diagnosis: Fetal cells in the maternal circulation." *Seminars in Perinatology* 23(5): 393-402.
- Peterson, J. A., Patton, S. und Hamosh, M. (1998). "Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections." *Biol Neonate* 74(2): 143-162.
- Petroff, M. G., Kharatyan, E., Torry, D. S., *et al.* (2005). "The Immunomodulatory Proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 Are Differentially Expressed across Gestation in the Human Placenta." *The American Journal of Pathology* 167(2): 465-473.
- Phipps, A. I. und Li, C. I. (2010). "Breast Cancer Biology and Clinical Characteristics". *Breast cancer epidemiology*. C. I. Li. New York, Springer,: 21-46.
- Pickford, W. J., Watson, A. J. und Barker, R. N. (2007). "Different forms of helper tolerance to carcinoembryonic antigen: ignorance and regulation." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4528-4537.
- Pinder, S. E., Murray, S., Ellis, I. O., *et al.* (1998). "The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy." *Cancer* 83(8): 1529-1539.
- Pinheiro, S. P., Hankinson, S. E., Tworoger, S. S., *et al.* (2010). "Anti-MUC1 Antibodies and Ovarian Cancer Risk: Prospective Data from the Nurses' Health Studies." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19(6): 1595-1601.
- Poschke, I., De Boniface, J., Mao, Y., *et al.* (2012). "Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients." *International Journal of Cancer* 131(7): 1611-1620.
- Priestman, T. (2012). "Cancer Chemotherapy in Clinical Practice". London, Springer London,.
- Pukazhendhi, G. und Gluck, S. (2014). "Circulating tumor cells in breast cancer." *J Carcinog* 13: 8.
- Ramazzini, B. (1743). *De morbis artificum diatriba*, Apud J. Corona.
- <http://www.syfpeithi.de/>. "A Database Of MHC Ligands And Peptide Motifs."
- Raynor, J., Lages, C. S., Shehata, H., *et al.* (2012). "Homeostasis and function of regulatory T cells in aging." *Current Opinion in Immunology* 24(4): 482-487.
- Rech, A. J., Mick, R., Martin, S., *et al.* (2012). "CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients." *Sci Transl Med* 4(134): 134ra162.
- Reichman, M. E., Judd, J. T., Longcope, C., *et al.* (1993). "Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women." *J Natl Cancer Inst* 85(9): 722-727.
- Remes Lenicov, F., Rodriguez Rodrigues, C., Sabatté, J., *et al.* (2012). "Semen Promotes the Differentiation of Tolerogenic Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 189(10): 4777-4786.
-

- Rentzsch, C., Kayser, S., Stumm, S., *et al.* (2003). "Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells." *Clin Cancer Res* 9(12): 4376-4386.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E. und Rosenberg, S. A. (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* 12(4): 269-281.
- Riley, J. K. (2008). "Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance." *Immunol Invest* 37(5): 395-426.
- Riordan, J. (2005). *Breastfeeding and human lactation*, Jones and Bartlett.
- Riou, G., Mathieu, M. C., Barrois, M., *et al.* (2001). "c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast-cancer patients." *Int J Cancer* 95(4): 266-270.
- Robertson, S. A., Prins, J. R., Sharkey, D. J., *et al.* (2013). "Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation." *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 315-330.
- Robson, A., Harris, L. K., Innes, B. A., *et al.* (2012). "Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy." *The FASEB Journal* 26(12): 4876-4885.
- Rolland, P. H., Jacquemier, J. und Martin, P. M. (1980). "Histological differentiation in human breast cancer is related to steroid receptors and stromal elastosis." *Cancer Chemother Pharmacol* 5(2): 73-77.
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., *et al.* (2005). "Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 353(16): 1673-1684.
- Rosen, P. P., Braun, D. W., Jr. und Kinne, D. E. (1980). "The clinical significance of pre-invasive breast carcinoma." *Cancer* 46(4 Suppl): 919-925.
- Rosenberg, J., Chia, Y. L. und Plevritis, S. (2005). "The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the U.S. SEER database." *Breast Cancer Research and Treatment* 89(1): 47-54.
- Rosenberg, S. A. (2011). "Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer[mdash]what clinicians need to know." *Nat Rev Clin Oncol* 8(10): 577-585.
- Rosenberg, S. A. und Dudley, M. E. (2004). "Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(suppl 2): 14639-14645.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., *et al.* (2011). "Proliferating Cell Nuclear Antigen Is a Novel Inhibitory Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44." *The Journal of Immunology* 187(11): 5693-5702.
- Roses, R. E., Paulson, E. C., Sharma, A., *et al.* (2009). "HER-2/neu overexpression as a predictor for the transition from in situ to invasive breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(5): 1386-1389.

- Ross, J. S. und Fletcher, J. A. (1998). "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." *Stem Cells* 16(6): 413-428.
- Roulois, D., Gregoire, M. und Fonteneau, J.-F. (2013). "MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge." *BioMed Research International* 2013: 10.
- Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L., et al. (2012). "Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen." *Nature* 490(7418): 102-106.
- Russo, I. H., Koszalka, M. und Russo, J. (1991). "Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis." *Br J Cancer* 64(3): 481-484.
- Russo, I. H. und Russo, J. (2011). "Pregnancy-induced changes in breast cancer risk." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16(3): 221-233.
- Russo, J. und Russo, I. H. (1994). "Toward a physiological approach to breast cancer prevention." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 3(4): 353-364.
- Russo, J., Tay, L. K. und Russo, I. H. (1982). "Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis." *Breast Cancer Res Treat* 2(1): 5-73.
- Saadatmand, S., de Kruijf, E. M., Sajet, A., et al. (2013). "Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer." *British Journal of Surgery* 100(2): 252-260.
- Sabbaj, S., Edwards, B. H., Ghosh, M. K., et al. (2002). "Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T Cells in Human Breast Milk." *Journal of Virology* 76(15): 7365-7373.
- Sabbaj, S., Ghosh, M. K., Edwards, B. H., et al. (2005). "Breast Milk-Derived Antigen-Specific CD8+ T Cells: An Extralymphoid Effector Memory Cell Population in Humans." *The Journal of Immunology* 174(5): 2951-2956.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* 6(4): 345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *The Journal of Immunology* 155(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunological Reviews* 182(1): 18-32.
- Salgado, F. J., Lojo, J., Fernandez-Alonso, C. M., et al. (2002). "Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells." *Immunol Cell Biol* 80(2): 138-147.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature*.
- Sandoval-Montes, C. und Santos-Argumedo, L. (2005). "CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines." *Journal of Leukocyte Biology* 77(4): 513-521.

-
- Sarandakou, A., Protonotariou, E. und Rizos, D. (2007). "Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy." *Crit Rev Clin Lab Sci* 44(2): 151-178.
- Sauce, D., Almeida, J. R., Larsen, M., et al. (2007). "PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status." *AIDS* 21(15): 2005-2013.
- Schatten, H. (2013). "Cell and Molecular Biology of Breast Cancer : edited by Heide Schatten". Humana Press, Totowa, NJ ;s.l.
- Schattner, E., Mascarenhas, J., Bishop, J., et al. (1996). *CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells*.
- Schedin, P. (2006). "Pregnancy-associated breast cancer and metastasis." *Nat Rev Cancer* 6(4): 281-291.
- Schmidt, H. H., Ge, Y., Hartmann, F. J., et al. (2013). "HLA Class II tetramers reveal tissue-specific regulatory T cells that suppress T-cell responses in breast carcinoma patients." *Oncoimmunology* 2(6): e24962.
- Schmitz-Winnenthal, F. H., Volk, C., Z'graggen, K., et al. (2005). "High Frequencies of Functional Tumor-Reactive T Cells in Bone Marrow and Blood of Pancreatic Cancer Patients." *Cancer Research* 65(21): 10079-10087.
- Schnitt, S. J. (2010). "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy." *Mod Pathol* 23(S2): S60-S64.
- Schoppmann, S. F., Schindl, M., Bayer, G., et al. (2003). "Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer." *International Journal of Cancer* 104(6): 677-682.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. und Smyth, M. J. (2011). "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion." *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Schröder, J. und de la Chapelle, A. (1972). *Fetal Lymphocytes in the Maternal Blood*.
- Schroeder, J. A. und Lee, D. C. (1998). "Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland." *Cell Growth Differ* 9(6): 451-464.
- Schroeder, J. A., Thompson, M. C., Gardner, M. M., et al. (2001). "Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland." *Journal of Biological Chemistry* 276(16): 13057-13064.
- Schuler, P., Boeckers, P., Engers, R., et al. (2011). "EGFR-specific T cell frequencies correlate with EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma." *Journal of Translational Medicine* 9(1): 168.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D. und Old, L. J. (2012). "Antibody therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 12(4): 278-287.
- Seelig, L. L. (1980). "Dynamics of Leukocytes in Rat Mammary Epithelium During Pregnancy and Lactation." *Biology of Reproduction* 22(5): 1211-1217.
-

-
- Seelig, L. L. und Beer, A. E. (1978). "Transepithelial Migration of Leukocytes in the Mammary Gland of Lactating Rats." *Biology of Reproduction* 18(5): 736-744.
- Seliger, B., Maeurer, M. J. und Ferrone, S. (2000). "Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth." *Immunology Today* 21(9): 455-464.
- Shakhar, K., Valdimarsdottir, H. B. und Bovbjerg, D. H. (2007). "Heightened Risk of Breast Cancer Following Pregnancy: Could Lasting Systemic Immune Alterations Contribute?" *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16(6): 1082-1086.
- Shao, M.-M., Zhang, F., Meng, G., et al. (2011). "Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein overexpression in basal-like carcinoma of the breast." *Histopathology* 59(2): 264-273.
- Sharma, A., Koldovsky, U., Xu, S., et al. (2012). "HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ." *Cancer* 118(17): 4354-4362.
- Shevach, E. M. (2000). "Regulatory T Cells in Autoimmunity*." *Annual Review of Immunology* 18(1): 423-449.
- Shin, D. H., Jang, S. H., Kang, B. C., et al. (2011). "Constitutive overexpression of Id-1 in mammary glands of transgenic mice results in precocious and increased formation of terminal end buds, enhanced alveologenesis, delayed involution." *J Cell Physiol* 226(5): 1340-1352.
- Shrestha, P., Yamada, K., Wada, T., et al. (1992). "Proliferating cell nuclear antigen in breast lesions: correlation of c-erbB-2 oncoprotein and EGF receptor and its clinicopathological significance in breast cancer." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(3): 193-202.
- Shyu, M.-K., Lin, M.-C., Liu, C.-H., et al. (2008). "MUC1 Expression Is Increased During Human Placental Development and Suppresses Trophoblast-Like Cell Invasion In Vitro." *Biology of Reproduction* 79(2): 233-239.
- Sigurdsson, V., Ingthorsson, S., Hilmarsdottir, B., et al. (2013). "Expression and functional role of sprouty-2 in breast morphogenesis." *PLoS One* 8(4): e60798.
- Simpson, A. J. G., Caballero, O. L., Jungbluth, A., et al. (2005). "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." *Nat Rev Cancer* 5(8): 615-625.
- Singh, P. K. und Hollingsworth, M. A. "Cell surface-associated mucins in signal transduction." *Trends in Cell Biology* 16(9): 467-476.
- Singletery, S. E. und Connolly, J. L. (2006). "Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual." *CA Cancer J Clin* 56(1): 37-47; quiz 50-31.
- Siziopikou, K. P., Anderson, S. J., Cobleigh, M. A., et al. (2013). "Preliminary results of centralized HER2 testing in ductal carcinoma in situ (DCIS): NSABP B-43." *Breast Cancer Res Treat* 142(2): 415-421.
- Smith, C. W. und Goldman, A. S. (1968). "The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions." *Pediatr Res* 2(2): 103-109.

Smith, I., Procter, M., Gelber, R. D., *et al.* (2007). "2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial." *The Lancet* 369(9555): 29-36.

Snijdewint, F. G. M., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A. H., *et al.* (1999). "Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 48(1): 47-55.

Soares, M. M., Mehta, V. und Finn, O. J. (2001). "Three Different Vaccines Based on the 140-Amino Acid MUC1 Peptide with Seven Tandemly Repeated Tumor-Specific Epitopes Elicit Distinct Immune Effector Mechanisms in Wild-Type Versus MUC1-Transgenic Mice with Different Potential for Tumor Rejection." *The Journal of Immunology* 166(11): 6555-6563.

Sommerfeldt, N., Schütz, F., Sohn, C., *et al.* (2006). "The shaping of a polyvalent and highly individual T-cell repertoire in the bone marrow of breast cancer patients." *Cancer Res* 66(16): 8258-8265.

Sørensen, A. L., Reis, C. A., Tarp, M. A., *et al.* (2006). "Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance." *Glycobiology* 16(2): 96-107.

Soria, G., Ofri-Shahak, M., Haas, I., *et al.* (2011). "Inflammatory mediators in breast cancer: Coordinated expression of TNFalpha & IL-1beta with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition." *BMC Cancer* 11(1): 130.

Sørli, T. (2004). "Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities." *European Journal of Cancer* 40(18): 2667-2675.

Souzaki, M., Kubo, M., Kai, M., *et al.* (2011). "Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer." *Cancer Sci* 102(2): 373-381.

Soysal, S. D., Muenst, S., Kan-Mitchell, J., *et al.* (2014). "Identification and translational validation of novel mammaglobin-A CD8 T cell epitopes." *Breast Cancer Research and Treatment*: 1-11.

Sporn, M. B. und Todaro, G. J. (1980). "Autocrine Secretion and Malignant Transformation of Cells." *New England Journal of Medicine* 303(15): 878-880.

Stackievicz, R., Paran, H., Bernheim, J., *et al.* (2010). "Prognostic significance of HER-2/neu expression in patients with ductal carcinoma in situ." *Isr Med Assoc J* 12(5): 290-295.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., *et al.* (2011). "Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(17): 7142-7147.

Stammzelltransplantation, D. R. f. (2013). Jahresbericht 2013.

Stebbing, J., Thiyagarajan, A., Surendrakumar, V., *et al.* (2011). "Epidermal growth factor receptor status in early stage breast cancer is associated with cellular proliferation but not cross-talk." *Journal of Clinical Pathology* 64(9): 829-831.

Stern, D. F. (2003). "ErbBs in mammary development." *Experimental Cell Research* 284(1): 89-98.

Stocks, P. (1957). "The epidemiology of carcinoma of the breast." *Practitioner* 179(1071): 233-240.

-
- Sugihara, A. Q., Rolle, C. E. und Lesniak, M. S. (2009). "Regulatory T cells actively infiltrate metastatic brain tumors." *Int J Oncol* 34(6): 1533-1540.
- Suo, Z., Bjaamer, A., Ottestad, L., *et al.* (2001). "Expression of EGFR family and steroid hormone receptors in ductal carcinoma in situ of the breast." *Ultrastruct Pathol* 25(5): 349-356.
- Tafari, A., Alferink, J., Möller, P., *et al.* (1995). "T Cell Awareness of Paternal Alloantigens During Pregnancy." *Science* 270(5236): 630-633.
- Taylor, D. S., Pearce, C. L., Hovanessian-Larsen, L. J., *et al.* (2009). "Progesterone and estrogen receptors in pregnant and premenopausal non-pregnant normal human breast." *Breast Cancer Research and Treatment* 118(1): 161-168.
- http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/.
- Tchoupa, A., Schuhmacher, T. und Hauck, C. (2014). "Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria." *Cell Communication and Signaling* 12(1): 27.
- Terry, G., Ho, L., Londesborough, P., *et al.* (2006). "The expression of FHIT, PCNA and EGFR in benign and malignant breast lesions." *Br J Cancer* 96(1): 110-117.
- Thike, A. A., Cheok, P. Y., Jara-Lazaro, A. R., *et al.* (2009). "Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer." *Mod Pathol* 23(1): 123-133.
- Thomas, M. R., Williamson, R., Craft, I., *et al.* (1994). "Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy." *The Lancet* 343(8894): 413-414.
- Thomas, P. A. (2010). *Breast Cancer and its Precursor Lesions: Making Sense and Making It Early*, Humana Press.
- Thomas, W. D. und Hersey, P. (1998). "TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells." *The Journal of Immunology* 161(5): 2195-2200.
- Thorsteinsson, L., O'Dowd, G. M., Harrington, P. M., *et al.* (1998). "The complement regulatory proteins CD46 and CD59, but not CD55, are highly expressed by glandular epithelium of human breast and colorectal tumour tissues." *APMIS* 106(9): 869-878.
- Tilburgs, T., Roelen, D. L., van der Mast, B. J., *et al.* (2008). "Evidence for a Selective Migration of Fetus-Specific CD4+CD25bright Regulatory T Cells from the Peripheral Blood to the Decidua in Human Pregnancy." *The Journal of Immunology* 180(8): 5737-5745.
- Tilburgs, T. und Strominger, J. L. (2013). "CD8+ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity." *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 395-407.
- Tiriveedhi, V., Sarma, N. J., Subramanian, V., *et al.* (2012). "Identification of HLA-A24-restricted CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes derived from mammaglobin-A, a human breast cancer-associated antigen." *Hum Immunol* 73(1): 11-16.
-

Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M. A., *et al.* (1994). "Melanoma-specific CD4+ T lymphocytes recognize human melanoma antigens processed and presented by epstein-barr virus-transformed B cells." *International Journal of Cancer* 58(1): 69-79.

Tot, T. (2010). *Breast Cancer: A Lobar Disease*, Springer.

Troyer, K. und Lee, D. (2001). "Regulation of Mouse Mammary Gland Development and Tumorigenesis by the ERBB Signaling Network." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6(1): 7-21.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., *et al.* (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* 309(5967): 418-425.

van Baren, N., Bonnet, M.-C., Dréno, B., *et al.* (2005). "Tumoral and Immunologic Response After Vaccination of Melanoma Patients With an ALVAC Virus Encoding MAGE Antigens Recognized by T Cells." *Journal of Clinical Oncology* 23(35): 9008-9021.

Van Bockstal, M., Lambein, K., Denys, H., *et al.* (2014). "Histopathological characterization of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast according to HER2 amplification status and molecular subtype." *Virchows Arch* 465(3): 275-289.

van Kampen, C. A., Versteeg-van der Voort Maarschalk, M. F. J., Langerak-Langerak, J., *et al.* (2001). "Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens." *Human Immunology* 62(3): 201-207.

Vassilaros, S., Tsibanis, A., Tsikkinis, A., *et al.* (2013). "Up to 15-year clinical follow-up of a pilot Phase III immunotherapy study in stage II breast cancer patients using oxidized mannan–MUC1." *Immunotherapy* 5(11): 1177-1182.

Vermeulen, J. F., van der Wall, E., Witkamp, A. J., *et al.* (2013). "Analysis of expression of membrane-bound tumor markers in ductal carcinoma in situ of the breast: paving the way for molecular imaging." *Cell Oncol (Dordr)* 36(4): 333-340.

Vignali, D. A. A., Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-532.

Vlodavsky, I., Beckhove, P., Lerner, I., *et al.* (2012). "Significance of Heparanase in Cancer and Inflammation." *Cancer Microenvironment* 5(2): 115-132.

von Mensdorff-Pouilly, S., Gourevitch, M. M., Kenemans, P., *et al.* (1996). "Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours." *Eur J Cancer* 32A(8): 1325-1331.

Waitz, R., Solomon, S. B., Petre, E. N., *et al.* (2012). "Potent Induction of Tumor Immunity by Combining Tumor Cryoablation with Anti–CTLA-4 Therapy." *Cancer Research* 72(2): 430-439.

Waldmann, H., Adams, E., Fairchild, P., *et al.* (2006). "Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue." *Immunological Reviews* 212(1): 301-313.

Walker, K. J., Price-Thomas, J. M., Candlish, W., *et al.* (1991). "Influence of the antioestrogen tamoxifen on normal breast tissue." *Br J Cancer* 64(4): 764-768.

-
- Walker, N. I., Bennett, R. E. und Kerr, J. F. (1989). "Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats." *Am J Anat* 185(1): 19-32.
- Walknowska, J., Conte, F. A. und Grumbach, M. M. (1969). "Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer." *The Lancet* 293(7606): 1119-1122.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I. H., et al. (2007). "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." *European Journal of Immunology* 37(1): 129-138.
- Wang, L., Xie, Y., Zhu, L. J., et al. (2010). "An association between immunosenescence and CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: a systematic review." *Biomed Environ Sci* 23(4): 327-332.
- Wang, R. F. und Rosenberg, S. A. (1996). "Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy." *Journal of Leukocyte Biology* 60(3): 296-309.
- Wang, S. C. (2014). "PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target?" *Trends Pharmacol Sci* 35(4): 178-186.
- Wang, W. J., Liu, F.-J., Qu, H.-M., et al. (2013). "Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage." *Journal of Reproductive Immunology* 99(1): 39-45.
- Warren, R. L., Freeman, J. D., Zeng, T., et al. (2011). "Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes." *Genome Research* 21(5): 790-797.
- Watson, C. J. (2006). "Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ." *Breast Cancer Res* 8(2): 203.
- Watson, D. L. (1980). "Immunological functions of the mammary gland and its secretion--comparative review." *Aust J Biol Sci* 33(4): 403-422.
- Watson, M. A., Darrow, C., Zimonjic, D. B., et al. (1998). "Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13." *Oncogene* 16(6): 817-824.
- Watson, M. A., Dintzis, S., Darrow, C. M., et al. (1999). "Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer." *Cancer Res* 59(13): 3028-3031.
- Watson, M. A. und Fleming, T. P. (1996). "Mammaglobin, a Mammary-specific Member of the Uteroglobin Gene Family, Is Overexpressed in Human Breast Cancer." *Cancer Research* 56(4): 860-865.
- Wei, W.-Z., Shi, W.-P., Galy, A., et al. (1999). "Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA." *International Journal of Cancer* 81(5): 748-754.
- Welters, M. J. P., Kenter, G. G., Piersma, S. J., et al. (2008). "Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine." *Clinical Cancer Research* 14(1): 178-187.
-

- Westermann, J. und Pabst, R. (1990). "Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system?" *Immunology Today* 11(0): 406-410.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nat Immunol* 12(6): 492-499.
- Whitwell, H. L., Hughes, H. P., Moore, M., *et al.* (1984). "Expression of major histocompatibility antigens and leucocyte infiltration in benign and malignant human breast disease." *Br J Cancer* 49(2): 161-172.
- Wilde, S., Sommermeyer, D., Leisegang, M., *et al.* (2012). "Human Antitumor CD8+ T Cells Producing Th1 Polycytokines Show Superior Antigen Sensitivity and Tumor Recognition." *The Journal of Immunology* 189(2): 598-605.
- Wilsdorf-Köhler, H., Streller, B. und Stabenow, R. (2011). "Brustkrebs: Fakten und Wissenswertes" - Ausgabe 2, Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen.
- Wirstlein, P. K., Mikolajczyk, M. und Skrzypczak, J. (2013). "Correlation of the expression of heparanase and heparin-binding EGF-like growth factor in the implantation window of nonconceptual cycle endometrium." *Folia Histochem Cytobiol* 51(2): 127-134.
- Wirt, D. P., Adkins, L. T., Palkowetz, K. H., *et al.* (1992). "Activated and memory T lymphocytes in human milk." *Cytometry* 13(3): 282-290.
- Wohlfahrt, J. und Melbye, M. (2001). "Age at any birth is associated with breast cancer risk." *Epidemiology* 12(1): 68-73.
- World Cancer Research Fund. und American Institute for Cancer Research. (2007). "Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer a global perspective". Washington, D.C., American Institute for Cancer Research,: xxv, 517 p.
- Writing Group for the Women's Health Initiative, I. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial." *JAMA* 288(3): 321-333.
- Wynder, E. L., Bross, I. J. und Hirayama, T. (1960). "A study of the epidemiology of cancer of the breast." *Cancer* 13: 559-601.
- Xing, P. X., Poulos, G. und McKenzie, I. F. C. (2001). "Breast Cancer in Mice: Effect of Murine Muc-1 Immunization on Tumor Incidence in C3H/HeOuj Mice." *Journal of Immunotherapy* 24(1): 10-18.
- Xu, C., Mao, D., Holers, V. M., *et al.* (2000). "A Critical Role for Murine Complement Regulator Crry in Fetomaternal Tolerance." *Science* 287(5452): 498-501.
- Xu, W., Li, H. Z., Liu, J. J., *et al.* (2011). "Identification of HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from proliferating cell nuclear antigen." *Tumour Biol* 32(1): 63-69.
- Yang, H. Y., Liu, H. L., Ke, J., *et al.* (2010). "Expression and prognostic value of Id protein family in human breast carcinoma." *Oncol Rep* 23(2): 321-328.

- Yang, X. R., Sherman, M. E., Rimm, D. L., *et al.* (2007). "Differences in Risk Factors for Breast Cancer Molecular Subtypes in a Population-Based Study." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16(3): 439-443.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001). "Untangling the ErbB signalling network." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 127-137.
- Yeo, B., Turner, N. C. und Jones, A. (2014). "An update on the medical management of breast cancer." *BMJ* 348: g3608.
- Yokota, Y. und Mori, S. (2002). "Role of Id family proteins in growth control." *Journal of Cellular Physiology* 190(1): 21-28.
- Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., *et al.* (2004). "Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior." *FASEB J* 18(2): 252-263.
- Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., *et al.* (2001). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(3): 311-322.
- Zhao, J. A., Chen, J. J., Ju, Y. C., *et al.* (2011). "The effect of childbirth on carcinogenesis of DMBA-induced breast cancer in female SD rats." *Chin J Cancer* 30(11): 779-785.
- Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., *et al.* (2005). "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." *Nat Immunol* 6(12): 1245-1252.
- Zou, L., Barnett, B., Safah, H., *et al.* (2004). "Bone Marrow Is a Reservoir for CD4+CD25+ Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12/CXCR4 Signals." *Cancer Research* 64(22): 8451-8455.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
³H	Tritium
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
A	<i>Area</i> , Fläche
act	<i>Activator</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i> , Antigenpräsentierende Zellen; Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BRCA	<i>Breast Cancer</i> (Tumorsuppressorgen)
CCR	CC Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
Cy	Cyanin
d	<i>Day</i> , Tag
DCIS	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzym-gekoppelter Immunadsorptions-Test
EMA	Ethidiumbromidmonoazid
ER	<i>Estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
FACS	<i>Flourescence activated cell sorter</i> , fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
F_c	<i>Fragment crystallisable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Schwerebeschleunigung [m/s ²]
g	Gramm
GLI	<i>Glioma-associated oncogene homolog</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPA	Heparanase
HR	Hormonrezeptor
ID	<i>Inhibitor of differentiation</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMP	Influenza Matrixprotein
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
Ki	Kiel

l	Liter
LAG	Lymphozyten-Aktivierungsgen
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MAGE	<i>Melanoma-associated antigen</i>
MAM	Mammaglobin-A
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MUC	Mucin
n	Anzahl
N	Nullipara (Frauen ohne Geburt)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n. s.	nicht signifikant
p	<i>probability</i> (Signifikanzwert)
P	Para (Frauen mit Kindern)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PD	<i>Programmed cell death</i>
PE	Phycoerythrin
PR	Progesteronrezeptor
PSG	<i>Pregnancy-specific glycoproteins</i>
PTCH	Patched
Rep	Repressor

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)</i>
SEB	<i>Staphylococcus Enterotoxin B</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
TAA	Tumor-assoziierte(s) Antigen(e)
TAP	<i>Transporter associated with antigen presentation</i>
T_{CM}	<i>Central memory T cells</i> , Zentrale Gedächtnis T-Zellen
Tcon	„ <i>Conventional</i> “ T cells, „Konventionelle“ T-Zellen
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
T_E	Effektor T-Zellen
T_{EM}	<i>Effector memory T cells</i> , Effektor-Gedächtnis T-Zellen
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T_H	T-Helferzellen
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TIM	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3</i>
TM	Trimenon
T_N	Naïve T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
T_{scM}	<i>T memory stem cells</i> , Gedächtnis-Stamm-T-Zellen
TZ	T-Zellen
U	<i>Unit</i> , Einheit
W	<i>Width</i> , Breite

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Philipp Beckhove für die Möglichkeit, dieses spannende Thema zu bearbeiten, die guten Arbeitsbedingungen in seinem Labor und die zahlreichen guten Ideen, die das Projekt vorangebracht haben.

Vielmals bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Viktor Umansky und Prof. Dr. Knut Schäkel, den Mitgliedern meines *thesis advisory committees*, für ihr wissenschaftliches Feedback und wertvolle Ratschläge.

Für die Bereitstellung der Blutproben danke ich den Mitarbeitern der Universitäts-Frauenklinik in Heidelberg, insbesondere Dr. Mark Boudewijns, PD. Dr. Christoph Domschke und Prof. Dr. Florian Schütz.

Joanna Foerster möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Entnahme der Patientenproben und ihre äußerst gewissenhafte Dokumentation von Daten ganz herzlich danken.

Mariana Bucur danke ich für ihre Unterstützung während meiner Einarbeitungszeit. Sie hat mich in die Geheimnisse des perfekten ELISpots eingewiesen und konnte bei Fragen immer helfen. Am hilfreichsten war aber immer ihre ansteckende gute Laune.

Bei meinen Kolleginnen und Freundinnen Dr. Jasmin Quandt und Dr. Maria Xydia möchte ich aufrichtig für ihre wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen von komplexen FACS-Experimenten und rund um die T-Zell-Forschung bedanken.

Dr. Hans-Henning Schmidt danke ich insbesondere für die Einweisung in die Arbeiten im Radionuklidlabor und seinen wissenschaftlichen Rat.

Dr. Maria Pritsch möchte ich sehr für ihre Ratschläge zu statistischen Analysen danken.

Ich danke Tillmann Michels vielmals für seine kompetente Hilfe bei technischen Problemen.

Bei Michael Bartoschek bedanke ich mich für die niveauvollen nicht-wissenschaftlichen Konversationen.

Vielen Dank an Dr. Thomas Horn für seine Hilfe bei der Erstellung des Studienprotokolls für die Ethikkommission.

Der gesamten Arbeitsgruppe, Mustafa Akhisaroglu, Silke Bärreiter, Michael Bartoschek, Noemi Bender, Andreas Bonertz, Paranchai Boonsawat, Mariana Bucur, Chih-Yeh Chen, Bianca Dornseiff, Diane Egger-Adam, Natalie Erbe-Hoffmann, Yingzi Ge, Elvira Hallauer, Christina Hartl, Felix Hartmann, Florian Heigwer, Alina Henrich, Thomas Horn, Simone Jünger, Sandrina Kastner, Nisit Khandelwal, Felix Klug, Christiane Kreutzer, Weronika Kurowski, Christina Mäder, Jasmin Mangei, Luisa Mayer, Till Michels, Lora Nacheva, Sina Nittel, Lukas Nögel, Mine Özcan, Jörn Pezoldt, Christina Pfirschke, Mudita Pincha, Lilli Podola, Hridayesh Prakash, Maria Pritsch, Jasmin Quandt, Anchana Rathinasamy, Mohamed Sallam, Miriam Schimmelmann, Christoph Schlude, Hans-Henning Schmidt, Ralph Schulz, Heiko Smetak, Antonio Sorrentino, Tobias Speck, Slava Stamova, Claudia Sterzik-Luksch, Serpil Tanri-verdi-Akhisaroglu, Ludmila Umansky, Valentina Volpin, Max Wendel, Irmtraut Williams, Jan Winter und Maria Xydia, danke ich für die enge Zusammenarbeit und ein freundschaftliches Arbeitsklima.

Sebastian Hörner möchte ich für motivierende Worte und ein offenes Ohr aufrichtig danken.

Meinen Eltern danke ich vom Herzen dafür, dass sie mir immer zur Seite stehen. Dem Einsatz meiner lieben Mutter ist es außerdem zu verdanken, dass ausreichend gesunde Mütter für diese Arbeit Blut gespendet haben.

Vielen Dank an alle, die für diese Studie Blut gespendet haben!