

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Nora Sommerfeldt

aus München

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Thema

**Immunogenität und Expression verschiedener Tumor-  
assoziierter Antigene bei Brustkrebspatientinnen**

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirmacher

Prof. Dr. Günther Hämmerling

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens  
hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten  
vor unseren Augen erstreckt.

(Sir Isaac Newton)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Immunsystem</b> .....	<b>6</b>
3.1.1	T Zell vermittelte Immunität.....	7
3.1.2	Antigenerkennung von T Zellen .....	7
3.1.3	Primäre Aktivierung von T Zellen .....	8
3.1.4	Das immunologische Gedächtnis .....	9
<b>3.2</b>	<b>Das Mamakarzinom</b> .....	<b>9</b>
<b>3.3</b>	<b>Tumor-assoziierte Antigene</b> .....	<b>10</b>
3.3.1	Mutierte Antigene .....	10
3.3.2	Keimzell Antigene .....	10
3.3.3	Gewebsspezifische Differenzierungs-Antigene .....	11
3.3.4	Überexprimierte Antigene .....	11
3.3.5	Nicht Malignitäts-assoziierte Antigene .....	12
<b>3.4</b>	<b>Tumor-Immuninteraktionen</b> .....	<b>13</b>
<b>3.5</b>	<b>Immuntherapien bei Krebserkrankungen</b> .....	<b>13</b>
<b>3.6</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Software</b> .....	<b>16</b>
<b>4.3</b>	<b>Datenbanken</b> .....	<b>16</b>
<b>4.4</b>	<b>Gebrauchsmaterialien</b> .....	<b>16</b>
<b>4.5</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>16</b>
<b>4.6</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>18</b>

<b>4.7</b>	<b>Lösungen und Reagenzien.....</b>	<b>19</b>
<b>4.8</b>	<b>Immunologische Materialien.....</b>	<b>19</b>
4.8.1	Medien und Mediensupplemente.....	19
4.8.2	Zytokine.....	20
4.8.3	Antikörper und Farbstoffe .....	20
4.8.4	Dynalbeads® .....	20
<b>4.9</b>	<b>Molekularbiologische Materialien.....</b>	<b>21</b>
4.9.1	Molekularbiologische Reagenzien .....	21
4.9.2	Kits .....	21
4.9.3	TagMan® Assay on Demand Primer Paare .....	21
4.9.4	Primer.....	22
4.9.5	Farbstoffe .....	22
<b>4.10</b>	<b>Proben und Zelllinien.....</b>	<b>22</b>
<b>4.11</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1</b>	<b>Peptide.....</b>	<b>24</b>
5.1.1	Identifikation der Peptide aus TAA.....	24
5.1.2	Lösen der Peptide .....	24
<b>5.2</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>24</b>
5.2.1	Kultivieren von Suspensions-Zelllinien .....	24
5.2.2	Kultivieren von adhärennten Zelllinien.....	25
5.2.3	Generieren von dendritischen Zellen und T Zellen.....	25
5.2.3.1	Isolation von mononukleären Zellen.....	25
5.2.3.2	Generieren von dendritischen Zellen aus Monozyten .....	26
5.2.3.3	Generieren von dendritischen Zellen aus CD34+ Vorläuferzellen .....	26
5.2.3.4	Ausreifen von dendritischen Zellen mittels Zytokin-Cocktail .....	26
5.2.3.5	Kultivieren von T Zellen .....	26
5.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
5.2.5	Bestimmen von Zellzahl und Vitalität.....	27
<b>5.3</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>27</b>
5.3.1	FACS Färbung .....	27
5.3.1.1	FACS Messung und Analyse.....	28
5.3.1.2	HLA-A201 Färbung.....	28
5.3.1.3	Prinzip der Stabilisierung von Oberflächen MHC durch Peptidbindung .....	28

5.3.1.4	Tetramer Färbung .....	29
5.3.2	Fluoreszenzfärbung .....	30
5.3.3	ELISpot Analyse.....	30
5.3.3.1	Aufreinigen von dendritischen Zellen mittels Dynabeads.....	31
5.3.3.2	Beladen der dendritischen Zellen mit Proteinen .....	31
5.3.3.3	Aufreinigen von T Zellen mittels Dynabeads .....	31
5.3.3.4	Beschichten der ELISpot Platte .....	32
5.3.3.5	IFN- $\gamma$ Sekretion .....	32
5.3.3.6	Entwickeln und Messen der ELISpot Platte.....	33
5.3.3.7	Auswerten der IFN- $\gamma$ ELISpot Analyse.....	33
5.3.4	Doppelstimulationen.....	34
5.3.4.1	Doppelstimulation in einer ELISpot Analyse.....	35
5.3.4.2	Chromium release Assay.....	35
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>36</b>
5.4.1	Isolation von total RNA aus Gewebe und Tumorzelllinien.....	36
5.4.2	Bestimmung der RNA Qualität mit dem Bioanalyser 2100 .....	37
5.4.3	Bestimmung der Quantität von Nukleinsäuren .....	38
5.4.4	cDNA Synthese von total RNA .....	38
5.4.5	Polymerase Ketten Reaktion .....	38
5.4.5.1	Durchführung der PCR .....	39
5.4.5.2	Agarose Gelelektrophorese .....	39
5.4.6	Real Time PCR .....	40
5.4.6.1	Durchführung der Real Time PCR.....	40
5.4.6.2	Eichgeraden.....	41
5.4.6.3	Berechnung der Linearität der Eichgeraden .....	42
5.4.6.4	RT-PCR mit cDNA aus Tumorgewebe .....	43
5.4.6.5	Auswertung der RT-PCR nach der relativen $\Delta\Delta$ Act Methode .....	43
5.4.7	Mikroarray .....	44
5.4.7.1	Gewinnung der cDNA Gene Fragmente.....	44
5.4.7.2	Spotting der DNA Slides .....	45
5.4.7.3	In-vitro Transkription (MessageAmp <sup>TM</sup> aRNA Kit) .....	45
5.4.7.4	Markieren der aRNA .....	46
5.4.7.5	Hybridisieren der cDNA auf die gespotteten Slides.....	46
5.4.7.6	Auswerten der cDNA Mikroarrays .....	47
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
6.1	<b>Peptide aus Tumor-assoziierten Antigenen .....</b>	<b>48</b>
6.2	<b>Ermittlung der Peptidbindung an den MHC-Komplex .....</b>	<b>51</b>

<b>6.3</b>	<b>Peptid ELISpot mit aufgereinigten Zellpopulationen .....</b>	<b>54</b>
<b>6.4</b>	<b>Vergleich von Antigenpräsentierenden Zellen.....</b>	<b>55</b>
6.4.1	Vergleich der Aktivierung von TC durch reife und unreife DC .....	56
6.4.2	Vergleich der Aktivierung von TC durch DC und T2 Zellen .....	56
6.4.3	Vergleich der Aktivierung von TC durch K562/A*0201 Zellen und DC .....	58
6.4.4	Zusätzliche Stimulation durch anti-CD28 von K562/A*0201.....	58
<b>6.5</b>	<b>Beispiel einer ELISpot Analyse der KMTC eines Patienten.....</b>	<b>59</b>
<b>6.6</b>	<b>Immunogenität aller getesteten TAA.....</b>	<b>60</b>
6.6.1	Prozentuale Reaktivitäten aller Peptide aus TAA .....	62
6.6.2	Anzahl der spezifischen Zellen im Vergleich .....	63
<b>6.7</b>	<b>Auswahl von TAA zur Charakterisierung des Patienten-eigenen Memory T Zell Repertoires.....</b>	<b>66</b>
<b>6.8</b>	<b>Untersuchungen der Reaktivität gegenüber ausgewählten TAA .....</b>	<b>68</b>
6.8.1	Untersuchungen zu Lactadherin .....	68
6.8.2	Untersuchungen zum Carcino-Embryonalen Antigen.....	69
6.8.3	Untersuchungen zum epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 .....	70
6.8.3.1	Immunhistologische Her2/neu Bestimmung im Tumorgewebe .....	71
6.8.4	Untersuchungen zum Natrium / Jod Symporter.....	72
6.8.5	Untersuchungen zu Heparanase .....	73
6.8.5.1	Immunogenität in Abhängigkeit vom Tumorstadium .....	74
6.8.5.2	Reaktivität in Bezug auf Insulin als alleiniger Hintergrundkontrolle .....	74
6.8.6	Untersuchungen zum Melanom assoziierten Antigen-2 .....	75
6.8.7	Untersuchungen zu Mucin-1 .....	76
6.8.7.1	Serumkonzentrationen von CA15.3 bei Patienten.....	77
6.8.8	Untersuchungen zum Spermium Protein .....	77
6.8.9	Untersuchungen zum Prostata spezifischen Antigen .....	78
6.8.10	Untersuchungen zu p53 .....	79
6.8.10.1	Immunhistologie von p53+ Tumorzellen im Tumorgewebe .....	80
<b>6.9</b>	<b>Untersuchungen der Reaktivität gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen .</b>	<b>81</b>
<b>6.10</b>	<b>Untersuchungen der Reaktivität gegenüber „nicht Tumor-relevanten“ TAA .....</b>	<b>82</b>
6.10.1	Untersuchungen zum B Zell Lymphom Protein-2 .....	82
6.10.1.1	Immunhistologische Untersuchung von Bcl-2 im Tumorgewebe.....	83
6.10.1.2	Tumorstadium abhängige Reaktivität .....	84
6.10.2	Untersuchungen zu Cyclin-D1 .....	84
6.10.3	Untersuchungen zum epithelialen Zelladhäsionsmolekül.....	85
6.10.4	Untersuchungen zum G Antigen.....	86

6.10.5	Untersuchungen zum Hepatozyten Wachstumsfaktor.....	86
6.10.6	Untersuchungen zu Kasein.....	87
6.10.7	Untersuchungen zum Tumor-Testes-Antigen-2.....	88
6.10.8	Untersuchungen zu p21ras.....	89
<b>6.11</b>	<b>Charakterisierung von Heparanase als neues TAA.....</b>	<b>90</b>
6.11.1	Induktion von Heparanase spezifischer Immun-Reaktivität bei gesunden Spendern .....	90
6.11.2	Untersuchungen zum Heparanase spezifischen Memory Pool bei Patienten.....	91
6.11.3	Nachweis von Heparanase Peptiden auf Tumorzellen.....	93
<b>6.12</b>	<b>Expression von TAA im Tumorgewebe .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>96</b>
<b>7.1</b>	<b>Etablieren des immunologischen Testsystems .....</b>	<b>96</b>
<b>7.2</b>	<b>Vergleich verschiedener Stimulatorzellen.....</b>	<b>98</b>
<b>7.3</b>	<b>Spezifische T Zellen aus dem Knochenmark .....</b>	<b>99</b>
7.3.1	Unterschiede in der Reaktivität von T Zellen aus Patienten und gesunden Spendern ..	100
7.3.2	T Zell Repertoire von Brustkrebspatienten .....	101
<b>7.4</b>	<b>Auswahl von Tumor-abhängigen Antigenen.....</b>	<b>101</b>
<b>7.5</b>	<b>Zusammenfassende Beurteilung der ausgewählten Antigene.....</b>	<b>103</b>
7.5.1	Lactadherin .....	103
7.5.2	Carzino-Embryonales Antigen .....	103
7.5.3	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor-2 .....	104
7.5.4	Humaner Natrium / Jod Symporter .....	105
7.5.5	Heparanase.....	105
7.5.5.1	Heparanase als neues TAA.....	107
7.5.6	Melanom-assoziertes-Antigen-2 .....	108
7.5.7	Mucin-1 .....	108
7.5.8	Spermium Protein .....	109
7.5.9	Prostata spezifisches Antigen.....	110
7.5.10	P53.....	111
<b>7.6</b>	<b>Nicht Malignitäts-assozierte Antigene .....</b>	<b>112</b>
<b>7.7</b>	<b>Zusammenfassende Beurteilung der „nicht relevanten“ TAA .....</b>	<b>112</b>
7.7.1	B Zell Lymphom Protein-2 .....	112
7.7.2	Cyclin-D1.....	113
7.7.3	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül.....	113

7.7.4	G Antigen .....	114
7.7.5	Hepatozyten Wachstumsfaktor .....	114
7.7.6	Kasein .....	115
7.7.7	Tumor-Testis-Antigen-2 .....	115
7.7.8	P21ras .....	116
<b>7.8</b>	<b>Expression der TAA im Tumorgewebe von Brustkrebspatienten.....</b>	<b>116</b>
<b>7.9</b>	<b>Entwicklung einer Dendriten Vaccine .....</b>	<b>117</b>
<b>7.10</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>125</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>133</b>
	<b>Zusammenfassende Darstellung aller ELISpot Analysen aus gesunden Spendern.....</b>	<b>133</b>
	<b>Zusammenfassende Darstellung aller ELISpot Analysen aus Brustkrebspatienten .....</b>	<b>135</b>
	<b>Expressionsanalyse der TAA mRNA im Tumorgewebe mittels Real-Time PCR .....</b>	<b>138</b>
	<b>Zusammenstellung der Daten aus der Universitäts-Frauenklinik.....</b>	<b>139</b>
	<b>Aufstellung aller verwendeten Bakterien-Klone für den Mikroarray.....</b>	<b>140</b>
	<b>Faktor der differentiellen Expression der TAA gemessen mittels Mikroarray .....</b>	<b>141</b>

# 1 Zusammenfassung

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Brustkrebspatienten ein natürlich entstandenes anti-tumorales Memory T Zell Repertoire aufweisen, das im Knochenmark angereichert ist. Auch konnte nachgewiesen werden, dass spezifische Memory T Zellen bei der Tumor-Abstoßung eine wichtige Rolle spielen. Die Feinspezifität des anti-tumoralen Memory T Zell Repertoires bei Brustkrebspatienten ist nicht bekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit bestimmt werden. Hierzu wurden Knochenmarkproben von Brustkrebspatienten (n = 51) gegenüber einer großen Bandbreite unterschiedlicher Tumor exprimierter Antigene anhand einer, für Memory T Zell Antworten adaptierten, IFN- $\gamma$  ELISpot Analyse untersucht. Neben bekannten Peptiden (n = 13) wurden auch neu definierte Peptide (n = 16) aus beschriebenen und aus bisher nicht als Tumor-assoziiert beschriebenen Antigenen verwendet.

Bei 68% der Patienten konnte eine spezifische Immun-Reaktivität gegen Tumor-assoziierte Antigene nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass jedes der getesteten Antigene zu einer Reaktivität führte, wobei es deutliche Unterschiede in der relativen Häufigkeit dieser Reaktivität gab. Bei gesunden Spendern wurden deutlich weniger Memory T Zellen mit spezifischer Reaktivität gegenüber den gleichen Antigenen gefunden. Die Frequenzen der spezifischen T Zellen bei Patienten erwiesen sich als signifikant höher als bei gesunden Spendern. Immun-Reaktivitäten gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen zeigten dagegen bezüglich der Anzahl spezifischer T Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern. Ferner konnte kein Hinweis auf eine Assoziation zwischen der Expression der Antigene im Tumorgewebe und der Immun-Reaktivität von Knochenmark T Zellen gefunden werden.

Heparanase, eine bisher nicht als Tumor-assoziiertes Antigen beschriebene endo- $\beta$ -D-Glukuronidase, die eine besondere Bedeutung für die Invasivität von Tumoren hat, erwies sich als besonders immunogen. Über Heparanase-Peptid Tetramer Analysen konnten in allen untersuchten Patienten mehr Heparanase spezifische T Zellen als bei gesunden Spendern identifiziert werden. Spezifisch aktivierte Knochenmark T Zellen von Brustkrebspatienten waren in der Lage Heparanase transfizierte Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren.

Ein Vergleich der Reaktivitäten von normalen Spendern und Brustkrebspatienten legte den Schluss nahe, dass die Immun-Reaktivität gegenüber zehn bestimmten Antigenen wahrscheinlich durch den eigenen Tumor induziert wurde. 50% dieser, für das anti-tumorale Memory besonders wichtigen Antigene, wurden durch in dieser Arbeit neu definierte HLA-A2 restringierte Peptide repräsentiert.

## 2 Abstract

Earlier studies showed that breast cancer patients have a naturally developed anti-tumour memory T cell repertoire which is enriched in the bone marrow. Moreover, it was shown that specific memory T cells play an important role in tumour progression. A more detailed specification of this anti-tumour memory T cell repertoire in breast cancer patients is not known and should be examined in the work presented here. Therefore, bone marrow samples of breast cancer patients (n = 51) were tested against a large variety of different tumour expressed antigens with the help of an IFN- $\gamma$  ELISpot assay, which is adapted to memory T cell reactivities. Apart from known peptides (n = 13), newly defined peptides (n = 16) of known and of such not yet described tumour associated antigens, were also used.

A specific immune reactivity against tumour associated antigens was detected in 68% of all patients. Moreover, it turned out, that every tested antigen led to a reactivity. However, it showed distinct differences in the relative frequency of this reactivities. Healthy donors clearly had less memory T cells with a specific reactivity against the same antigens. The frequencies of the specific T cells in patients turned out to be significantly higher than in healthy donors. Immune reactivities against non-malignancy associated antigens did not show a significant difference between patients and healthy donors according to the number of specific T cells. Moreover, one could not find any reference to an association between the expression of the antigens in the tumour tissue and the immune reactivity of bone marrow T cells.

Heparanase, an endo- $\beta$ -D-glucuronidase not yet described as a tumour associated antigen, with a special meaning for the invasiveness of tumours, showed to be very immunogenic. With the help of heparanase peptide tetramer analyses, more heparanase specific T cells were identified in all examined patients than in healthy donors. Specifically activated bone marrow T cells of breast cancer patients were able to recognize and kill heparanase transfected tumour cells specifically.

Comparing the reactions of normal donors and breast cancer patients allows the suggestion, that the immune reactivity against ten defined antigens was possibly induced by the own tumour. 50% of the antigens, which are very important for the anti-tumour reactivities, were represented by newly defined HLA-A2 restricted peptides.

### 3 Einleitung

Brustkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen bei Frauen. Die Suche nach effektiven und möglichst nebenwirkungsfreien Therapien bei Krebserkrankungen ist ein zentrales Thema der Krebsforschung. In der Regel wird der Tumor operativ entfernt und im Anschluss werden durch radioaktive Bestrahlung und Chemotherapie eventuell verbliebene Zellen eliminiert. Auch immuntherapeutische Ansätze beruhen auf der Idee, verbliebene Tumorzellen durch eine spezifische Aktivierung des Immunsystems abzutöten. Durch eine Immuntherapie könnten systemische Nebenwirkungen, wie z.B. die Zerstörung von gesundem Gewebe, teilweise vermieden werden. Eine Form der Immuntherapie stellt die Vakzinierung mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen (DV) dar. Hierbei besteht die Vakzine aus dendritischen Zellen (DC), die mit Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) in Form von restringierten Peptiden, für das *human leukocyte antigen* (HLA), beladen werden. Klinische Studien mit dieser Form der Vakzine führten bei Patienten mit verschiedenen Tumoren basierend auf unterschiedlichen TAA zu einer Induktion TAA spezifischer T Zellen [Liu, 2004; Matsuda, 2004; Rosenberg, 1998; Thurner, 1999]. Bei Brustkrebspatienten konnte mittels DV eine Immunität gegenüber dem epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 (Her2/neu) [Disis, 2002] und dem Mucin-1 (MUC-1) [Brossart, 2000] induziert werden. Um die Vakzine zu verbessern und in Bezug auf den jeweiligen Patienten oder die Art des Tumors individuell besser anzupassen, ist es notwendig, den Tumor in Bezug auf seine TAA gut zu charakterisieren, und die Immunogenität verschiedener TAA zu vergleichen. Unter Immunogenität versteht man dabei die Fähigkeit des TAA das Immunsystem zu einer spezifischen Reaktivität gegen den Tumor zu Aktivieren. Diese Reaktivität lässt sich z.B. wie oben beschreiben über eine Vakzinierung mit Peptid-beladenen DC oder in Modellen z.B. über eine Immunisierung mit abgetöteten Tumorzellen induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die nicht immunisiert worden sind, eine spontan entstandene Immunität gegenüber dem eigenen Tumor existiert [Feurerer, 2001a]. Das Ergebnis dieser spontanen Immunität war die Entstehung tumorspezifischer Memory T Zellen in Patienten. Diese spontan entstandene Reaktivität gegenüber dem Tumor konnte gegenüber einer Brustkrebs Tumorzelllinie (MCF-7) gezeigt werden. Diese exprimiert eine nicht näher charakterisierte Mischung verschiedener TAA. Die Feinspezifität, auf welche dieser TAA die Immun-Reaktivität zurückzuführen ist, wurde bisher nicht näher charakterisiert. Eine Möglichkeit das immunogene Potential gegenüber einzelnen TAA zu untersuchen, ist die Detektion TAA spezifischer Memory T Zellen. Dabei wird die natürlich durch den Tumor induzierte Immun-Reaktivität von Memory T Zellen spezifisch für TAA charakterisiert. Dies lässt sich mittels einer sehr sensitiven „enzyme-linked

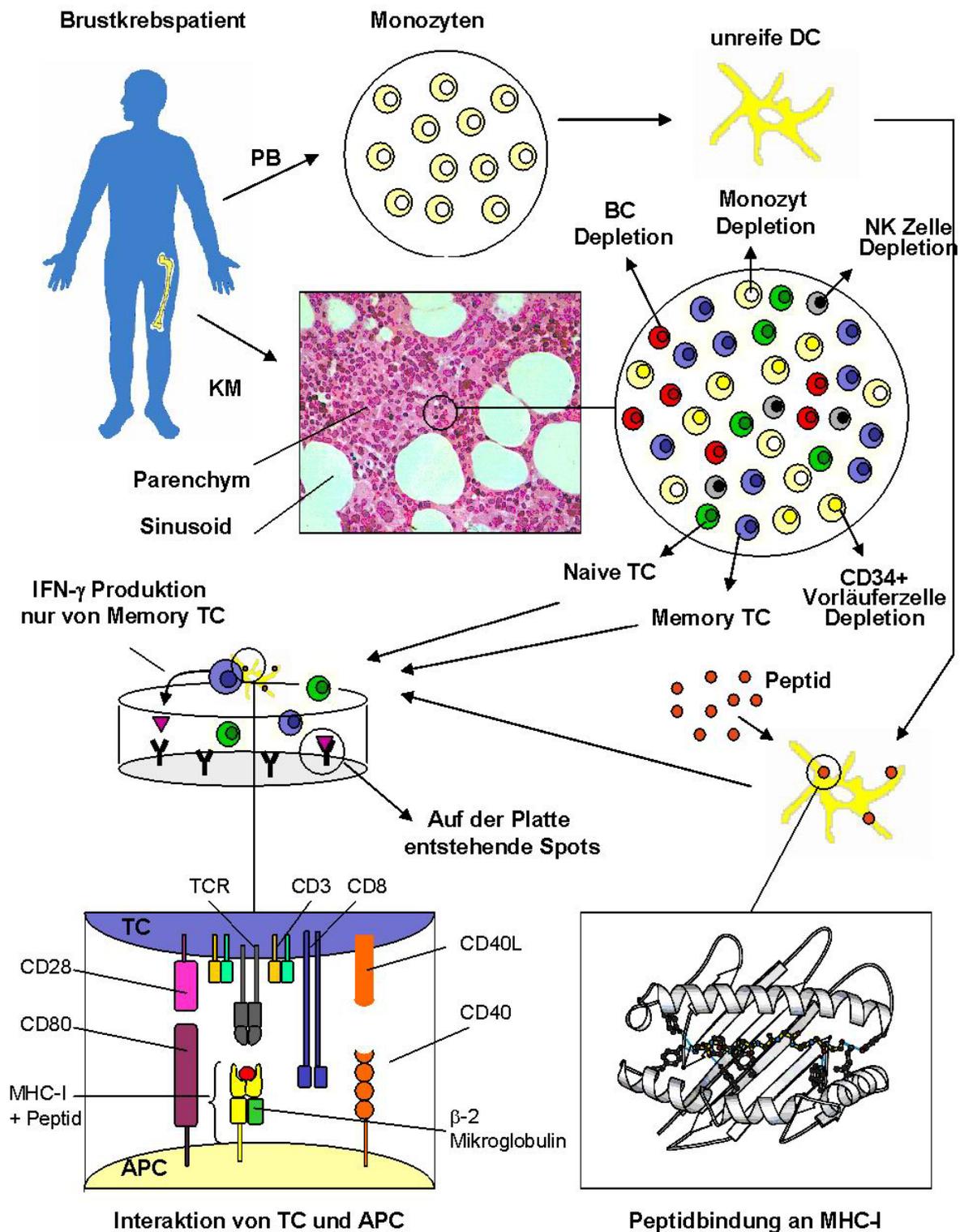
*immunoabsorbend spot*“ Analyse (ELISpot Analyse) überprüfen, indem die Anzahl der aktivierten Memory T Zellen nach einer kurzen Stimulationszeit bestimmt wird [Scheibenbogen, 1997].

Es wurden in der Literatur viele Gene beschrieben, die eine differenzielle Genexpression im Brusttumorgewebe zeigen. Aufgrund eines Unterschiedes zwischen gesundem und malignem Brustgewebe können sie sich als TAA eignen. Um die Reaktivität von T Zellen gegenüber TAA zu untersuchen lassen sich, stellvertretend für ein TAA, Peptide aus den Aminosäuresequenzen (ASS) der TAA verwenden. Untersuchungen über TAA spezifische T Zell Reaktivitäten bei Brustkrebspatienten lagen nur gegenüber sehr wenigen Peptiden vor, wie z.B. aus dem TAA Laktadherin (BA46), B-Zelllymphom Protein 2 (Bcl-2), Carzino-Embryonalen Antigen (CEA), epithelialen Zelladhäsionsmolekül (Ep-CAM), Her2/neu und MUC-1 [Carmon, 2002; Andersen, 2004; Nagorsen, 2003; Disis, 2002; Brossart, 1999].

In dieser Arbeit wurden neben diesen bereits bekannten TAA auch Antigene die in der Literatur noch nicht als TAA beschreiben worden sind, untersucht. Diese „neuen“ Antigene, Heparanase (Hpa), der humaner Natrium / Jod Symporter (hNIS), Kasein und das Spermium Protein (PH20) zeichnen sich durch eine spezifische Expression in Brustgewebe oder in Brusttumorgewebe aus [Vlodavsky, 1999; Tazebay, 2000; Ginger, 1999; Beech, 2002]. Es ist denkbar, das eine individuelle Zusammensetzung der T Zell Spezifitäten (Repertoire) gegenüber TAA sowohl für einen bestimmten Tumor, als auch für jeden Patienten besteht. Die in dieser Arbeit untersuchten TAA werden im Folgenden (3.3) vorgestellt.

Es lagen keine vergleichenden Untersuchungen über die Reaktivität von T Zellen gegenüber unterschiedlichen TAA bei Brustkrebspatienten vor. Daher konnte bisher nicht geklärt werden, ob sich die Reaktivität einzelner Patienten gegenüber verschiedene TAA richtet. Somit ist ebenfalls unklar ob sich die Immunität der T Zellen gegen wenige dominante, oder sehr viele, individuell unterschiedliche, TAA richtet. Die Beantwortung dieser Fragen könnte für die Verbesserung einer DV wichtig sein.

Untersuchungen über die Reaktivität gegenüber Peptiden aus TAA wurden in der Literatur mit T Zellen aus dem peripheren Blut (PB) von Patienten durchgeführt. Nur zu den beiden Peptiden Her2/neu p369 und zu MUC-1 p12 [Feurerer, 2001a] lagen Untersuchungen mit T Zellen aus dem Knochenmark (KM) vor. Es konnte gezeigt werden, dass im KM von Brustkrebspatienten, ohne eine vorangegangene Aktivierung der Zellen, eine deutlich größere Anzahl an spontan entstandene Memory T Zellen spezifisch für TAA vorlagen [Feurerer, 2001a]. Diese spontan entstandenen Memory T Zellen lassen sich zur Analyse von „relevanten“ TAA heranziehen.



**Abbildung 1:** Darstellung des Versuchsaufbaus zum Testen der natürlich durch den Tumor entstandenen Peptid-spezifischen Memory TC Reaktivität; Entnahme von PB und KM aus Brustkrebspatienten; Generierung von DC aus Monozyten; Peptid-Beladung der DC mit Detailsicht der Peptidbindung an MHC-I; Aufreinigung der KMTC; Interaktion von Peptid-beladenen DC und TC in einer Kurzzeit ELISpot Analyse; Interaktion von CD8+ TC und APC über TCR / MHC-I, CD28 / CD80 und CD40 / CD40L; bei Aktivierung einer Peptid-spezifischen Memory Zelle schüttet diese IFN- $\gamma$  aus.

In Abb.1 ist schematisch der Versuchsaufbau dargestellt, mit dem die Reaktivität der T Zellen in der vorliegenden Arbeit getestet worden ist. Den Patienten wurde PB und KM entnommen. Aus den Monozyten des PB wurden DC generiert, die mit Peptiden beladen in die Kurzzeit IFN- $\gamma$  ELISpot Analyse eingesetzt wurden. Aus dem KM der Patienten wurden T Zellen isoliert, die zu den Peptid-beladenen DC in die Analyse gegeben wurden. Nur Memory T Zellen spezifisch für das angebotene Peptid sind in der Lage in dieser kurzen Zeit (40 Stunden) IFN- $\gamma$  zu sezernieren. Die Zahl der aktivierten T Zellen kann im Anschluss quantitativ bestimmt werden. Zusätzlich ist eine detaillierte schematische Darstellung der Interaktion der T Zelle mit der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und der Peptidbindung an MHC-I dargestellt.

### 3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes System des menschlichen Körpers, das dazu dient, den Körper vor Krankheitserregern zu schützen. Man unterscheidet zwischen einer angeborenen „innate“ und einer erworbenen „adaptive“ Immunantwort. In der frühen Phase nach einer Infektion reagiert der Organismus durch natürliche Immunabwehrmechanismen auf unspezifische Reize wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide, um pathogene Substanzen zu beseitigen. In einer späteren Phase nach der Infektion, der adaptiven Immunantwort, entwickeln sich pathogenspezifische Lymphozyten, die speziell diesen Krankheitserreger eliminieren können. Von diesen spezifischen Lymphozyten bleibt nach erfolgreicher Abwehr der Infektion ein kleiner Teil bestehen, die so genannten Memory Zellen. Sie bilden das immunologische Gedächtnis. Dieses dient dazu, bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger mit einer schnellen, spezifischen Antwort reagieren zu können.

Bei der adaptiven Immunität unterscheidet man zwischen der humoralen, von B-Lymphozyten (B Zellen) vermittelten, und der zellulären, von T-Lymphozyten (T Zellen) vermittelten, Immunantwort. Unter einer humoralen Immunität versteht man die Ausschüttung von pathogenspezifischen Antikörpern durch B-Lymphozyten. Diese können an die Pathogene binden um diese damit unschädlich zu machen oder aber z.B. für Makrophagen zu markieren, damit sie phagozytiert werden können. Bei einer zellulären Immunantwort erkennen T-Lymphozyten direkt die infizierten Zellen. Dabei kann man zwischen zytotoxischen CD8+ T Zellen und CD4+ T-Helfer Zellen unterscheiden.

### 3.1.1 T Zell vermittelte Immunität

Vorläuferzellen der T Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus um dort auszureifen. Dazu müssen sie im Thymus zuerst eine positive Selektion, d.h. eine Bindungsfähigkeit an körpereigene, für die Präsentation von Antigenen zuständigen Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC Komplexen), durchlaufen. Im Anschluss folgt eine negative Selektion. Dabei werden die Zellen mit körpereigenen Proteinfragmenten über MHC konfrontiert. Zeigen sie für keine der körpereigenen Substanzen eine hohe Bindungsaffinität, so werden sie als naive T Zellen aus dem Thymus entlassen. Diese naiven T Zellen zirkulieren durch periphere lymphatische Organe auf der Suche nach dem für sie spezifischen Antigen. In diesen peripheren lymphatischen Organen wird, wenn das entsprechende Antigen vorliegt, eine Immunantwort ausgelöst.

Die zwei Hauptklassen von T Zellen werden auf Grund ihrer verschiedenen Effektorfunktion unterschieden. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T Zellen (CTL) töten Zielzellen, die Pathogene in ihrem Inneren tragen. CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen (TH-Zellen) aktivieren andere Leukozyten und lösen so eine Immunantwort aus. Bei den TH-Zellen unterscheidet man zwischen TH1-Zellen, die Makrophagen zur Eliminierung der von den Makrophagen selbst phagozytierten Pathogene stimulieren und TH2-Zellen, die B-Zellen zur Proliferation und zur Sezernierung von Antikörpern aktivieren.

### 3.1.2 Antigenerkennung von T Zellen

Die Antigenerkennung während einer adaptiven Immunantwort setzt sich zusammen aus der spezifischen Erkennung des Antigens durch einen Rezeptor auf der Oberfläche von T Zellen (TCR) und der Präsentation des Antigens über den MHC Komplex auf der APC.

Es existieren in jedem Menschen bis zu  $10^{18}$  verschiedene TCR, wodurch fast alle Peptide, die durch den Abbau eines beliebigen Proteins aus einem beliebigen Pathogen entstehen, erkannt werden können. Der TCR besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die jeweils aus einer konstanten und einer variablen Region bestehen. Die enorme Vielfalt entsteht dadurch, dass die variable Region jeder Kette aus unterschiedlich kombinierten Segmenten zusammengesetzt wird. Jede variable Region trägt im Zentrum eine hypervariable Region, in der Punktmutationen die Zahl an möglichen TCR Spezifitäten noch erhöhen.

Die Präsentation der Antigene geschieht über membrangebundene Glykoproteine, so genannte MHC-Komplexe. Pathogene können im Inneren der Zelle in verschiedenen Kompartimenten vorliegen. So befinden sich Proteine viralen Ursprungs in der Regel im

Zytosol, Pathogene wie Bakterien werden z.B. über Phagozytose von Makrophagen aufgenommen und befinden sich dadurch in Vesikeln innerhalb der Zelle. Es gibt zwei unterschiedliche MHC Komplexe: MHC-I und MHC-II. Sie unterscheiden sich durch die Herkunft der Peptide, mit denen sie beladen werden, und dem T Zelltyp, der sie erkennt. Jeder Mensch besitzt pro Komplex zwei Allele: je eines von Vater und Mutter. Für manche humane MHC Komplexe sind mehr als 400 verschiedene Allele bekannt. Proteine, die im Zytosol der Zelle synthetisiert werden, werden von Proteasomen in Peptide geschnitten und über den *transporter associated with antigen processing* (TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht. Dort werden sie in die Peptidtasche der MHC-I Komplexe gebunden und der Peptid-MHC Komplex wird an die Zelloberfläche gebracht. Bestimmte Allele des MHC-I werden als *human leukocyte antigen-A* (HLA-A) Typus bezeichnet. In der menschlichen Bevölkerung gibt es etwa 200 verschiedene HLA-A Allele. Dabei tragen etwa 40% der mitteleuropäischen Bevölkerung den HLA-A201 Locus als eines ihrer Allele. MHC-I Komplexe werden spezifisch von CD8+ T Zellen über den entsprechenden TCR erkannt.

Proteine, die sich in Vesikeln innerhalb der Zellen befinden, oder von außen z.B. über Phagozytose in diese hineingelangen, werden von Proteasen in Peptide geschnitten. Die Peptide enthaltenden Vesikel fusionieren mit Vesikeln, die MHC-II Komplexe enthalten. Die Peptide binden an die Peptidbindungstasche des MHC-II Komplexes und dieser wird dann an der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert. Die MHC-II Komplexe werden von CD4+ T Zellen und deren spezifischem TCR erkannt.

Erkennt eine T Zelle auf einer Zelle im Körper den für ihren TCR entsprechenden MHC-Peptid-Komplex, so kann diese Zelle, je nach Spezifität, verschieden reagieren. CD4+ TH-Zellen aktivieren zytotoxische T Zellen, B Zellen und Makrophagen. CD8+ T Zellen schütten bei Aktivierung Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aus, das u. a. die Reifung von T Zellen fördert und ihre Proliferation unterstützt. Auch können sie z.B. direkt über eine Perforin oder Granzym Ausschüttung die antigentragende Zelle lysieren. Diese direkte lytische Funktion der CD8+ T Zellen kann man sich für Immuntherapien bei Krebserkrankungen zunutze machen, indem man versucht, tumorspezifische CD8+ T Zellen zu aktivieren.

### 3.1.3 Primäre Aktivierung von T Zellen

Die meisten Zellen des Körpers besitzen auf ihrer Zelloberfläche MHC Komplexe, die mit Abbauprodukten von Proteinen aus dem Zellinneren beladen werden und somit Antigen präsentieren können. Eine primäre Aktivierung von T Zellen ist jedoch nur möglich, wenn die naiven T Zellen ihr Antigen auf einer professionellen APC, einer DC, erkennen und durch

zusätzliche kostimulatorische Signale, wie z.B. die „*cluster of differentiation*“ (CD) -40, CD80 und CD86 aktiviert werden. Die naive T Zelle beginnt zu proliferieren und bildet einen für ihr Antigen spezifischen Klon. Diese „Effektor“ T Zellen bekämpfen das für sie spezifische Pathogen. Ist die Infektion vorüber, überleben ein paar dieser T Zellen als Memory T Zellen. Besitzt die Zelle, die der naiven T Zelle das entsprechende Antigen präsentiert keine kostimulatorischen Signale, so stirbt die T Zelle ab oder wird anergisch, d.h. inaktiv.

Die primäre Aktivierung der naiven T Zellen findet vor allem in den peripheren lymphatischen Organen statt. Bei einer Infektion nehmen DC Antigene in der Peripherie auf und wandern in die peripheren lymphatischen Organe und können dort eine adaptive Immunantwort induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass auch im Knochenmark eine primäre Aktivierung von naiven Zellen möglich ist [Feurerer, 2003].

### **3.1.4 Das immunologische Gedächtnis**

Memory T Zellen bilden das immunologische Gedächtnis, charakteristisch für die adaptive Immunantwort. Sie überleben nach einer erfolgreichen Bekämpfung einer Infektion und können, bei einer erneuten Stimulation über ihren TCR ohne zusätzliche Kostimulation oder aufgrund einer sehr geringen Antigenpräsenz, proliferieren und somit schnell und effektiv ein Pathogen, das wiederholt auftritt, bekämpfen [Zinkernagel, 1996]. Diese Memory Zellen können nicht nur durch eine Infektion mit Pathogenen, sondern auch durch die Existenz eines Tumors spontan entstehen [Feurerer, 2001a].

## **3.2 Das Mamakarzinom**

Ein Tumor entsteht durch vielfältige Faktoren, wie z.B. eine familiäre genetische Disposition, Umwelteinflüsse und die Lebensweise und Ernährung des Betroffenen. Tumorzellen sind entartete körpereigene Zellen, die sich durch ein unkontrolliertes Wachstum auszeichnen. Somit gehen die meisten Tumore vermutlich auf eine einzige entartete Zelle zurück, die es geschafft hat, sich im Körper zu etablieren.

Der häufigste Tumor bei Frauen, der Brusttumor, ist in der Regel ein Karzinom. Unter einem Karzinom versteht man im Allgemeinen ein malignes, entartetes, epitheliales Gewebe. Brusttumore lassen sich in der Regel gut operativ entfernen. Es besteht jedoch das Risiko, dass einzelne Tumorzellen aus dem Tumor ausgewandert sind und an anderer Stelle im Körper auswachsen können.

### 3.3 Tumor-assoziierte Antigene

Durch genetische Veränderungen, die zu einer Überexpression oder Mutation von Antigenen führen, können aus normalen Zellen Tumorzellen werden. Die so genannten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) unterscheiden normale Zellen von Tumorzellen. TAA können in folgende Kategorien eingeteilt werden: 1) *mutierte Antigene*, wie z.B. p21ras, p53, Caspase-8 oder  $\beta$ -Catenin, die individuell exprimiert werden können; 2) *Keimzell Antigene*, wie z.B. GAGE, LAGE oder MAGE, die in gesundem Gewebe ausschließlich in den Testes exprimiert werden; 3) *Gewebsspezifische-Differenzierungs Antigene*, wie z.B. Melan-A, hNIS, Kasein, PSA oder gp100, die ausschließlich von differenzierten Zellen eines Gewebetyps exprimiert werden; 4) *überexprimierte Antigene*, wie z.B. BA46, Bcl-2, Cyclin-D1, Ep-CAM, Her2/neu, HGF, Hpa, MUC-1, CEA oder PH20, deren Expression in Tumorzellen höher ist als in normalen Zellen; 5) *modifizierte Antigene*, wie z.B. MUC-1, mit abnormaler posttranslationaler Modifizierung und 6) *virale Antigene*, wie z.B. HPV Typ 16, E6 und E7, die z.B. beim Cervixkarzinom exprimiert werden.

Es sind in der Literatur viele Tumor-assoziierte Genprodukte bekannt, aber nur wenige entsprechende HLA-A201 restringierte Peptide dieser Antigene [Schirle, 2000]. Von einigen der Antigene, die für Brustkrebstumoren als differenziell reguliert gelten, wurden für diese Arbeit T Zell Epitope in Form von HLA-A201 restringierten Peptiden herausgesucht.

#### 3.3.1 Mutierte Antigene

P21ras (p21) inhibiert die Aktivität von Cyclin Kinasen und inhibiert damit die Proliferation von Zellen [Xiong, 1993].

Stress, der auf eine Zelle wirkt, kann zu einem p53 induzierten „Selbstmord“ der Zelle führen. Daher besitzt p53 die Fähigkeit einen programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren, der auch als ein Anti-Tumor-Effekt wirken kann. P53 ist das am häufigsten mutierte TAA in Tumorzellen, wodurch oftmals eine defekte Zelle erst zur Tumorzelle werden kann [Ferbeyre, 2002]. Ein interessantes Ziel für Immuntherapien ist p53 auch, weil dieses Antigen in bis zu 50% aller Tumore überexprimiert ist [Yu, 1997].

#### 3.3.2 Keimzell Antigene

Es gibt eine Reihe von Antigenen wie das Melanom-assoziierte-Antigen-2 (MAGE-2), das Tumor-Testes-Antigen-2 (LAGE-1) und das G-Antigen (GAGE), die normalerweise nur in

Keimzellen (Testis) exprimiert werden. Diese Antigene sind jedoch im Brusttumorgewebe ebenfalls zu finden. So zeigen Brusttumore eine Überexpression von MAGE-2 [Visseren, 1997], GAGE [Van den Eynde, 1995] und LAGE-1 [Mashino, 2001].

### 3.3.3 Gewebsspezifische Differenzierungs-Antigene

Abhängig vom Natriumgradienten transportiert der humane Natrium / Jod Symporter (hNIS) aktiv Jod in das Schilddrüsengewebe. In der milchproduzierenden (laktierenden) Brust und bei 80% der Brusttumoren konnte eine Expression von hNIS im Gewebe gezeigt werden. [Tazebay, 2000].

Bei Kasein handelt es sich um einen Hauptbestandteil der Milch, der von Brustgewebezellen synthetisiert wird. Es ist ein Protein, das noch nicht als TAA beschrieben wurde, aber sehr spezifisch für Brustgewebe ist [Ginger, 1999].

Das prostataspezifische Antigen (PSA), eine extrazelluläre Serin-Protease, wird in gesundem Gewebe ausschließlich von Epithelzellen der Prostata gebildet, ist aber in 30% der untersuchten Brusttumoren exprimiert [Mannello, 2001].

### 3.3.4 Überexprimierte Antigene

Lactadherin (BA46), ein Protein aus den Milchfettglobuli, ist an der Adhäsion an die Integrine  $\alpha v \beta 3$  und  $\alpha v \beta 5$  beteiligt. Interaktionen mit Integrinen führen u. a. zu Proliferation, einer erhöhten Zellmobilität und einem anti-apoptotische Effekt [Hynes, 2002]. Somit könnte BA46 am malignen Prozess im Tumor beteiligt sein [Carmon, 2002].

Das B Zell Lymphom Protein-2 (Bcl-2) inhibiert die p53 induzierte Apoptose von Zellen, wodurch eine Überexpression in Tumorzellen zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapien führt [Andersen, 2004].

Bei 30 - 50% der Brustkrebspatienten wurden erhöhte Serumkonzentrationen des Carzino-Embryonalen Antigens (CEA) gefunden [Cheung, 2000]. CEA ist ein Glykoprotein, das während der Embryonalentwicklung in Organen des Verdauungstraktes exprimiert wird und im gesunden Gewebe Erwachsener nicht mehr vorkommt [Arlen, 2000].

Cyclin-D1 ist ein Gen, welches die Zell-Zyklus-Progression von der G1- in die S-Phase unterstützt. Es ist daher mit für das abnorme Tumorzellwachstum verantwortlich. Es ist in

30 - 50% primärer Brusttumoren überexprimiert. Ein erhöhter Level tritt relativ früh in der Onkogenese auf [Fu, 2004].

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (Ep-CAM) ist ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Glykoprotein und in 90% der Brusttumore exprimiert [Nagorsen, 2003].

Der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (Her2/neu) ist in vielen epithelialen Tumoren überexprimiert [Real, 2004]. Es handelt sich um ein Protoonkogen, welches an Signaltransduktion und Zellproliferation beteiligt ist.

Der Hepatocyten Wachstumsfaktor (HGF) stimuliert Tumorzell-Interaktionen, Adhäsion an die Matrix, Migration, Invasion und Angiogenese. HGF wird im Brusttumorgewebe signifikant stärker exprimiert als in gesundem Brustgewebe [Parr, 2004].

Heparanase (Hpa), eine endo- $\beta$ -D-Glukuronidase, die Heparansulfat Proteoglykan, einen der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (ECM), zerschneidet. Bei der ECM handelt es sich um ein nicht-zelluläres Material zwischen Gewebezellen bestehend aus einer komplexen Mischung von Zellen abgesonderter Moleküle. Durch die Expression und Sezernierung von Heparanase gelingt es Tumorzellen aus dem Gewebeverband des Tumors auszuwandern [Vlodavsky, 2002].

Mucin-1 (MUC-1), ein stark glykosiliertes Typ-1 Transmembran-Glykoprotein mit einer extrazellulären Domäne, ist in vielen hämatologischen und epithelialen Tumoren überexprimiert [Brossart, 1999].

Das Spermium-Protein (PH20), welches Hyaluronidase Aktivität aufweist, besitzt, die Fähigkeit die Hyaluronsäure, ebenfalls ein Bestandteil der ECM, zu zerschneiden [Beech, 2002].

### 3.3.5 Nicht Malignitäts-assoziierte Antigene

Kollagen und Keratin sind Stoffklassen, die nicht als Tumorantigene bezeichnet werden können. Kollagen-IV (Coll-IV) ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran (BM). Kollagenasen sind an Zelladhäsion und Migration beteiligt. Bei Brusttumoren ist Kollagen-IV in 22 - 42% exprimiert [Ioachim, 2002]. Kollagen Typ  $\alpha$ -I (Coll- $\alpha$ I) wird in 38% der Brusttumorgewebe deutlich stärker exprimiert als in gesundem Gewebe [Jensen, 2002].

Keratin 18 (Krt18) ist ein Bestandteil des Zytoskeletts von proliferierenden Zellen und wird während des Zelltodes von Tumorzellen ausgeschieden [Kramer, 2004]. Ein rückfallfreies

Überleben des Patienten korreliert mit der Expression von Krt18 im Tumorgewebe [Abt El-Rehim, 2004].

### 3.4 Tumor-Immuninteraktionen

In einem wachsenden Tumor verändern sich die Zellen entsprechend einem „Evolutiondruck“ den unter anderem das Immunsystem ausübt. So versucht der Tumor z.B. mittels fehlender oder verringerter Expression von MHC Komplexen, fehlender Adhäsionsmoleküle oder eines auf Immunzellen inaktivierend wirkenden Zytokinmilieus, vom Immunsystem unerkant zu bleiben. Dennoch gibt es im Körper tumorspezifische Zellen, die, wenn sie die negativen inhibitorischen Einflüsse des Tumors überwinden, Tumorzellen beseitigen können.

Spezifische T Zellen für TAA, die keine genetischen oder posttranslationalen Veränderungen aufweisen, entkommen der negativen Selektion im Thymus, wenn sie nur eine schwache Bindungsfähigkeit für den entsprechenden MHC-Antigen Komplex aufweisen. Derartige TAA sind daher in der Regel nur schwach immunogen. Werden die T Zellen, die eine Spezifität für ein auch in gesundem Gewebe exprimiertes TAA aufweisen, ex-vivo oder über DC mit dem entsprechenden Antigen in vivo aktiviert, sind sie trotz der geringen Bindungsaffinität an das TAA Epitop in der Lage, Tumorzellen, die dieses Epitop tragen, zu eliminieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sich im Knochenmark von Patienten mehr tumorspezifische T Zellen befinden als im peripheren Blut. Dies kann eventuell dadurch erklärt werden, dass sich bei Tumorpatienten oftmals aus dem Tumor abgewanderte Zellen im Knochenmark befinden. Diese können allerdings einen, vom Immunsystem kontrollierten Ruhezustand oder „*dormancy state*“ aufweisen [Feuerer, 2001a und 2001b]. Da eine primäre Aktivierung von naiven T Zellen auch im Knochenmark ablaufen kann, können hier tumorspezifische Effektor und Memory T Zellen entstehen.

### 3.5 Immuntherapien bei Krebserkrankungen

Eine Möglichkeit der Immuntherapie besteht in einer Vakzinierung mit Peptid-beladenen DC. Dazu werden autologe DC mit TAA in Form von Peptiden beladen und den Patienten subkutan injiziert [Parmiani, 2002]. Die DC sollen in Lymphknoten wandern um dort das Antigen mit dem sie beladen wurden den T Zellen zu präsentieren. Dadurch kann eine Aktivierung TAA spezifischer Zellen erreicht werden [Parmiani, 2002]. Bereits durchgeführte

DV Studien mit Her2/neu und p53 führten zu einer Induktion TAA spezifischer T Zellen und zu keiner Schädigung des normalen Gewebes, welches ebenfalls geringe Expressionswerte dieser TAA aufwies [Eisenbach, 2000]. Es ist daher möglich das Immunsystem spezifisch gegen TAA zu aktivieren, ohne ein erhöhtes Risiko von Nebenwirkungen einzugehen. In den meisten klinischen Studien an unterschiedlichen Tumoren und mit verschiedenen TAA zeigte sich eine erhöhte Reaktivität des Immunsystems nach einer Vakzinierung. Es konnte jedoch nur in 2,6% der Patienten tatsächlich eine klinisch relevante Verbesserung festgestellt werden [Rosenberg, 2004]. Somit wird deutlich, dass die Vakzinierungs-Strategien verbessert werden sollten.

### 3.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Memory T Zell Repertoire im Knochenmark von Brustkrebspatienten auf seine Feinspezifität in Bezug auf verschiedene TAA zu analysieren. Dazu wurde die Reaktivität der KMTC sowohl gegenüber bekannten als auch gegenüber neu definierten Peptiden untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob es individuelle Unterschiede in der Feinspezifität des tumorspezifischen T Zell Memory Repertoires von Brustkrebspatienten gegen Peptide aus TAA gibt. Dabei wurden T Zellen aus dem Knochenmark verwendet, da dort eine höhere Anzahl tumorspezifischer T Zellen als im Blut vorliegt.

In dieser Arbeit sollte vergleichend die Reaktivität von KMTC gegenüber verschiedenen TAA untersucht werden. Wichtig dabei war die Frage, ob eine T Zell Immun-Reaktivität gegenüber wenigen dominanten TAA, oder aber gegenüber einer, für jeden Patienten individuellen Mischung aus TAA vorliegt.

Um die Effektivität einer Vakzinierung mit Peptid-beladenen DC sicherzustellen, ist es notwendig, dass die entsprechenden TAA auch auf den Tumorzellen der Patienten zu finden sind, damit T Zellen die Tumorzellen erkennen können. Daher sollte hier untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Immunogenität und der Expression der einzelnen TAA vorliegt.

Es sollte darüber hinaus versucht werden, neu definierte Peptide einzelner, besonders immunogener TAA an einer größeren Gruppe von Brustkrebspatienten näher zu charakterisieren und zu überprüfen ob sie „*in vivo*“ prozessiert und präsentiert werden.

## 4 Material

### 4.1 Geräte

ABI PRISM® 7900 HT	Applied Biosystems
Axon 4000B Scanner	Axon Instruments Inc.
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Brutschrank, Nuare US Autoflow	Fisher Scientific
Durchflußzytometer FACScan	Becton Dickinson
ELISpot-Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss
Eppendorff-Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss
$\gamma$ -Counter	Packard
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr
Gefrierschrank, -70°C Bio Freeze®	Forma Scientific
Gelelektrophorese Technik	Pharmacia
Heizblock	Neolab
Homogenisator Ultra-Turrax®	IKA-Werke
Horizontalschüttler	IKA Labortechnik
Kühlschrank	Liebherr
Laborzentrifuge, Minifuge	Heraeus
Magnetheizrührer	Heidolph
Mikroskop Diavert	Leitz
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
MPC-L Magnet	Dynal
Nano-Drop - Spectrophotometer	Kisker
OmniGrid - Spotting Roboter	Gene Machines
PCR Maschine	Biozym
pH-Meßgerät	WTW
Sterilwerkbank, SterilGARD Hood	Baker
Ultraschallbad	Elma
UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
Vortex Reax 2000	Heidolph

Waage	Sartorius
Wasserbad klein	Julabo
Wasserbad groß	Julabo

#### 4.2 Software

Bio Sizing VA.02.10	Agilent
Cell Quest	BD Bioscience
Exel	Microsoft
FlowJo	TreeStar
GenePix Pro 4.0	Axon Instruments
GraphPadPrism	GraphPad Software Inc.
KS ELISpot	Zeiss
SDS 2.1.1	Applied Biosystems

#### 4.3 Datenbanken

NCBI	<a href="http://www.pubmed.de">www.pubmed.de</a>
SYFPEITHY	<a href="http://www.uni-tuebingen.de">www.uni-tuebingen.de</a>

#### 4.4 Gebrauchsmaterialien

Glasgeräte	Schott
Glaspipetten	Hirschmann
Hybridisierungskammern	Corning
Multikanalpipette	Rainin
Neubauer Zählkammer (0,100 mm Tiefe)	Brand
Pipetten 2-1000 µl automatisch	Gilson
Pipetboy	Brand

#### 4.5 Verbrauchsmaterialien

γ-Counter Rörchen aus Polystyrol	Greiner
Deckgläschen rechteckig	Langenbrink
Deckgläschen rund	Langenbrink

Einfrierröhrchen 1ml	Nalgene
ELISpot Platten	Millipore
ELISpot-Klebefolien	Millipore
Save-lock-Röhrchen 0,5; 1,5 und 2ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen aus Polystyrol	Greiner
Filterpipettenspitzen (0-10, 10-200, 200-1000µl)	Fischer Scientific
Fixogum	Patex
Glasobjektträger (76 x 26 mm, Mattrand)	R. Langenbrinck
Glaspasteurpipetten (150 mm)	Fischer Scientific
Microspin™ G50 Säulen	Amershem Bioscience
optische Folien	Applied Biosystems
Parafilm	Neolab
Pipettenspitzen (0-10, 10-200, 200-1000µl)	Starlab
QMT Epoxy Slides	Quantifal
Röhrchen 5ml	Greiner
Leucosep® Tubes 50ml	Greiner
Sterilfilter 0,22µm	Millipore
Wachsplättchen	Vogel HIST-COMP®
YM-30 Colums	Millipore
Zellkulturflaschen 25, 75 und 150cm <sup>2</sup>	Biochrom
Zellkulturschalen 6x15mm und 100x20mm	Biochrom
Zellschaber 24cm	Biochrom
Zellsieb 40µm	Falcon BD
Zentrifugenröhrchen 15 und 50ml	Biochrom
6-, 24-, 48- und 96-Well Flachbodenplatten nicht beschichtet	Falcon BD
6- und 12-Well Flachbodenplatten	Biochrom
24-, 48- und 96-Well Flachbodenplatten	Greiner
96-Well Rundbodenplatte	Biochrom
384 Well Flachbodenplatten für RT-PCR	Applied Biosystems
384 Well Flachbodenplatten	Steinbrenner

#### 4.6 Chemikalien

Agar	Beckton Dickinson
Agarose	Invitrogen
Ammoniumacetat	Sigma
Ammoniumchlorid	Merk
Betain	Sigma
Bicarbonat	Merk
Carbonat	Merk
Chloroform	Merck
DMSO	Merck
EDTA	Biochrom
Essigsäure	Riedl-de Haën
Ethanol, absolut	Riedl-de Haën
Ethidium Bromid	Sigma
Ficoll 400	Serva
Glyzeringelatine	Merck
Isopropanol	Riedl-de Haën
Kaliumchlorid	Fluka
Natriumazetat	Merk
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merk
Natriumchromat	Merk
Natriumcitrat	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natronlauge, 10 N	Riedl-de Haën
Magnesiumchlorid	Fluka
Paraformaldehyd	Fluka
Polyvinylpyrrolidon	Merk
Propidium Jodid	Sigma
SDS	Sigma
Tris	Merk
Tris-HCl	Sigma

#### 4.7 Lösungen und Reagenzien

AP Color Reagenz A	BioRad
AP Color Reagenz B	BioRad
25x AP Color Entwicklungspuffer	BioRad
Biocoll Trennlösung	Biochrom
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche
DIG-EASY Puffer	Roche Diagnostics
Endobulin	Baxter
Nuclease freies Wasser	Quiagen
PBS-Pulver	Invitrogen
peqGold RNAPure	peqLab
RNAse freies Wasser	Invitrogen
Saponin	Sigma
TagMan® 2x Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Tetanus Toxoid	Calbiochem
Triton-X 100	Fluka
Trypsin-EDTA	Biochrom
Tween 20	Gerbu
Ziegenserum	Sigma

#### 4.8 Immunologische Materialien

##### 4.8.1 Medien und Mediensupplemente

Ampizillin	Invitrogen
DMEM-Pulver	Invitrogen
FKS	Biochrom
Geneticin (G418)	Invitrogen
HEPES	Biochrom
Humanes AB-Serum, männlich	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Pan™ Biotech
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen
X-VIVO20	BioWhittaker

### 4.8.2 Zytokine

rekombinantes GM-CSF	ESSEXPHARMA
rekombinantes humanes IL-1- $\beta$	PromoCell
rekombinantes humanes IL-2	PromoCell
rekombinantes humanes IL-4	PromoCell
rekombinantes humanes IL-6	PromoCell
Prostaglandin	Pharmacia
TNF- $\alpha$	PromoCell

### 4.8.3 Antikörper und Farbstoffe

anti-human CD28	Beckton Dickinson
anti-human IFN- $\gamma$ mAK 1-D1K	Mabtech
anti-human IFN- $\gamma$ mAK 7-B6-1-Biotin	Mabtech
DAPI (bisBENZIMIDE)	Hoechst
Maus anti-human CD8 mAK (FITC, PE)	BD Pharmingen
Maus anti-human CD56 mAK	Beckman Coulter
Maus anti-human HLA-A201, Isotyp IgG2b; Klon BB7.2	(Hybridom Überstand)
Maus anti-human Heparanase (hp130)	Prof. Vlodaysky (Israel)
Streptavidin-ALP-PQ	Mabtech
Tetramer Hpa p8	Beckman Coulter
Tetramer Hpa p16	Beckman Coulter
Tetramer HIV gag	Proimmune
Trypanblau-Pulver	Serva
Ziege anti-Maus ALEXA 488	MoBi Tec
Ziege anti-Maus IgG FITC	Dianova

### 4.8.4 Dynalbeads®

Pan IgG Beads	Dynal Biotech
CD3 (pan T) Beads	Dynal Biotech
CD15 (pan myeloisch) Beads	Dynal Biotech
CD19 (pan B) Beads	Dynal Biotech

## 4.9 Molekularbiologische Materialien

### 4.9.1 Molekularbiologische Reagenzien

Cot1 DNA	Invitrogen
10mM dNTP Mix	Pharmacia, Amersham
25mM dNTP`s	Roche
0,1M DTT	Invitrogen
First Strand Puffer	Invitrogen
Hexamer Primer	Amersham Pharmacia Biotech
Oligo(dt) <sub>12-18</sub>	Invitrogen
RNAse H	Invitrogen
RNA 6000 Ladder	Ambion
RNAse OUT	Invitrogen
RNAsin	Promega
Superscript-II	Invitrogen
Superscript-III	Invitrogen
(Platinum) Tag Polymerase	Invitrogen
100bp Marker	Invitrogen

### 4.9.2 Kits

MessageAmp™ aRNA Kit	Ambion
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent

### 4.9.3 TagMan® Assay on Demand Primer Paare

BA46:	Hs00170712_m1	Applied Biosystems
GAPDH:	Hs99999905_m1	Applied Biosystems
Ep-CAM:	Hs00158980_m1	Applied Biosystems
Her2/neu:	Hs00170433_m1	Applied Biosystems
Heparanase:	Hs00180737_m1	Applied Biosystems
hNIS:	Hs00166567_m1	Applied Biosystems
MUC:	Hs00410317_m1	Applied Biosystems
PH20:	Hs00162139_m1	Applied Biosystems

#### 4.9.4 Primer

Heparanase Invitrogen  
 Forward Primer : 5` - TTC GAT CCC AAG AAG GAA TCA AC - 3`  
 Reverse Primer : 5` - GTA GTG ATG CCA TGT AAC TGA ATC - 3`

M 13 MWG Biotech  
 U (forward) Primer: 5` - CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3`  
 R (reverse) Primer: 5` - TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3`

#### 4.9.5 Farbstoffe

Cy3 - dCTP Amersham Pharmacia  
 Cy5 - dCTP Amersham Pharmacia  
 6 x Loading Dye Solution MBI Fermentas

#### 4.10 Proben und Zelllinien

16 Buffy Coats Blutspendezentrale Heidelberg  
 Total RNA Referenz BD Clontech™  
 18 gesunde Spender (PB & KM) Universitäts Frauenklinik  
 gesund total RNA Pool BioCat  
 Bakterien-Klone, Mikroarray RZPD  
 K562/A\*0201 Prof. Herr (Würzburg)  
 MCF-7mock Prof. Vlodaysky (Israel)  
 MCF-7hpa Prof. Vlodaysky (Israel)  
 51 Patienten Proben (PB & KM) Universitäts Frauenklinik  
 29 Tumorgewebe Universitäts Frauenklinik  
 T2 Tumorzellen Tumorbank DKFZ

#### 4.11 Puffer und Lösungen

Coating Puffer: für 1 Liter in sterilem Wasser: 2,93g Bicarbonat,  
1,59g Carbonat, 1ml Natriumazid (10%)

100x Denhardt's Reagenz: 2g Ficoll 400, 2g Polyvinylpyrrolidon, 2g BSA  
(Fraktion 5), in 100ml sterilem Wasser

---

FACS Puffer:	PBS, 1% FKS
Hybridisierungs Puffer:	2x DIG-EASY Puffer, 10x Denhardt's Reagenz, Cot1 DNA (2ng/ $\mu$ l)
10x PCR Puffer:	100mM Tris-HCl, 500mM KCl, in sterilem Wasser pH 9,0
20x SSC:	300mM NaCl, 30mM Natriumcitrat; pH 7,0
50x TAE Puffer:	2M Tris, 0,25M Natriumacetat, 0,05M EDTA, pH 7,8
Waschpuffer:	PBS, 0,25% Tween

## 5 Methoden

### 5.1 Peptide

#### 5.1.1 Identifikation der Peptide aus TAA

In der Homepage des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (unter [www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)) wurden ASS für Brusttumor relevante TAA herausgesucht. Mit Hilfe der „SYFPEITHY“ Datenbank (unter [www.uni-tuebingen.de](http://www.uni-tuebingen.de)) konnten aus diesen ASS HLA-A201 restringierte nonamer Peptide, mit hoher theoretischer Bindungsaffinität, identifiziert werden. Die Proteinsynthese Einrichtung (Abteilung V270) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) synthetisierte diese Peptide. Bereits beschriebene HLA-A201 restringierte Peptide aus TAA wurden ebenfalls synthetisiert (s. Tab.1).

#### 5.1.2 Lösen der Peptide

Das in Pulverform vorliegende Peptid löste man mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser und 10% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO). Dazu musste dem Pulver zuerst das DMSO und im Anschluss nach und nach das Wasser zugegeben werden. Fiel das Peptid unter der Zugabe des Wassers wieder aus, konnte dies im Ultraschallbad zerstäubt werden.

### 5.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte zur Kultivierung und Expansion von Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultur der Zellen fand in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und 98% Luftfeuchtigkeit statt. Die Zentrifugationen betragen, wenn nicht anders angegeben, 5min bei 1.400UpM und Raumtemperatur (RT). Durch Zentrifugation und anschließendem Lösen des Sedimentes in frischem Medium konnten Zellen „gewaschen“ werden. Die Zugabe von 2mM Glutamin, 100 U/ml Penizillin, 100 ng/ml Streptomycin und 10mM Hepes ergänzte die Standard Medien RPMI und DMEM.

#### 5.2.1 Kultivieren von Suspensions-Zelllinien

Die in Suspension wachsenden Tumorzelllinien T2 und K562/A\*0201 mussten jeden zweiten bis dritten Tag, je nach Zelldichte, ausgedünnt werden. Dazu nahm man 90% der

Zellsuspension ab und ersetzte sie durch frisches Medium. Um die Zelllinien zu expandieren ist die Zellsuspension zentrifugiert worden, und wurde im Anschluss in einer größeren Menge neuem Medium aufgenommen. Das dazu verwendete Medium war RPMI mit 10% fötalem Kälberserum (FKS). K562/A\*0201 Zellen bekamen zusätzlich 1 mg/ml Geneticin (G418), da es sich um eine, mit einem Vektor, transfizierte Zelllinie handelte [Britten, 2002]. Dieser Vektor trägt sowohl das Gen für den HLA-A201 Komplex als auch das Gen Neomycin. Dieses Gen führt zu einer Resistenz gegen das Eukaryoten Antibiotikum G418.

## 5.2.2 Kultivieren von adhärennten Zelllinien

Bei den Tumorzelllinien MCF-7hpa und MCF-7mock handelt es sich ebenfalls um transfizierte Zelllinien. MCF-7 Zellen sind entweder mit einem leeren Vektor (mock) oder mit einem Vektor (hpa), der das Gen der Heparanase trägt, transfiziert worden [Vlodavsky, 1999]. Die adhärennt wachsenden Tumorzelllinien mussten jeden zweiten bis dritten Tag, je nach Dichte, ausgedünnt werden. Dazu wurde das Medium entnommen und die adhärennten Zellen einmal vorsichtig mit „*phosphate buffered saline*“ (PBS) gespült. Durch die Zugabe von 2 – 5 ml 0,05% Trypsin-EDTA konnten die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, und nach 2 - 5min Inkubation im Brutschrank, durch mechanisches Klopfen entfernt werden. Die Reaktion des Trypsin-EDTA wurde mit mindestens dem gleichen Volumen FKS abgestoppt. Nach einmaligem waschen konnten die Zellen in DMEM 10% FKS, je nach vorhandener und benötigter Zellzahl in einem Verhältnis von 1 : 2 bis 1 : 8, in Zellkulturflaschen aufgenommen werden. Die Zugabe von 350µg/ml G418 stellte sicher, dass nur Zellen wuchsen die den Vektor trugen.

## 5.2.3 Generieren von dendritischen Zellen und T Zellen

### 5.2.3.1 Isolation von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen aus PB (PBMC) und KM (KMMC) konnten mittels Ficoll Dichtegradienten isoliert werden. Dazu wurden 15ml Biocoll-Lösung (Dichte: 1,077 g/cm<sup>3</sup>) in ein Zentrifugenröhrchen mit Filterscheibe gegeben. Durch Zentrifugation der Röhrchen für 1min bei 1.000UpM konnte die Biocoll-Lösung unter die Filterscheibe gebracht werden. Nach der Zugabe von 15ml RPMI Medium und 20ml PB oder KM folgte eine Zentrifugation für 20min bei RT, 2.000UpM ohne Bremse. In der durch die Zentrifugation entstandenen Interphase befanden sich die mononukleären Zellen. Diese konnten vorsichtig mit einer

Pasteurpipette entnommen und zweimal in RPMI Medium gewaschen werden. Von dem sich oberhalb der Interphase befindlichem Plasma (1 : 1 Verdünnung durch RPMI Medium) wurden 5 – 15 ml entnommen um es, während der Kultur der autologen Zellen, dem Medium zuzugeben.

#### **5.2.3.2 Generieren von dendritischen Zellen aus Monozyten**

PBMC oder KMMC wurden in 10ml X-VIVO20 Medium aufgenommen. Nach 2 Stunden (h), in denen unter anderem die Monozyten an den Boden der Kulturschale adhärirten, konnte das Medium mit den nicht adhärenen Zellen vorsichtig abgenommen werden. Unter Zugabe von X-VIVO20 Medium, 1.000 U/ml IL-4, 560 U/ml GM-CSF und 1% autologem Plasma fand die Kultivierung der adhärenen Zellen für sieben Tage (d) statt. Dabei musste alle zwei bis drei Tage das Medium ausgetauscht werden.

#### **5.2.3.3 Generieren von dendritischen Zellen aus CD34+ Vorläuferzellen**

KMMC wurden in 3ml X-VIVO20 Medium aufgenommen. Aus dieser Zellsuspension, und den darin enthaltenen CD34+ Vorläuferzellen, konnten, durch eine 14d Kultur, DC generiert werden. Dazu setzte man aus 1/3 der Zellsuspension eine Kultur in X-VIVO20 Medium mit 1.000 U/ml IL-4, 560 U/ml GM-CSF und 1% autologem Plasma an. Ein Mediumwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt.

#### **5.2.3.4 Ausreifen von dendritischen Zellen mittels Zytokin-Cocktail**

DC wurden nach sieben Tagen Kultur aufgereinigt (s. 5.2.3.2), und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in X-VIVO20 Medium aufgenommen. Durch Zugabe von 1.000 U/ml IL-4, 560 U/ml GM-CSF, 260 U/ml IL-6, 1 µg/ml Prostaglandin, 1800 U/ml IL-1β und 400 U/ml Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) konnten die DC über Nacht im Brutschrank ausgereift werden.

#### **5.2.3.5 Kultivieren von T Zellen**

Die sich nach der Adhärenz (s. 5.2.3.2) im Überstand befindlichen Zellen, oder die verbliebenen 2/3 Zellsuspension (s. 5.2.3.3) wurden in RPMI Medium, 8% humanem

AB Serum (Serum aus Spendern der Blutgruppe AB), 100 U/ml IL-2, 60 U/ml IL-4 und 1% autologem Plasma kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt.

#### 5.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum einfrieren von Zellen wurde die Zellsuspension zweimal mit dem entsprechenden Kultivierungs-Medium gewaschen. Im Anschluss konnten  $2 \times 10^5$  –  $5 \times 10^7$  Zellen in Medium mit 50% FKS und 10% DMSO bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Abkühlgeschwindigkeit betrug  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Für humanen DC und TC verwendete man eine Konzentration von 80% AB Serum und 10% DMSO in X-VIVO20 Medium.

Aufgetaut werden konnten Zellen über eine schnellst mögliche Zugabe von, auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmtem, Kultivierungs-Medium. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen mussten die Zellen nach dem auftauen zweimal gewaschen werden.

#### 5.2.5 Bestimmen von Zellzahl und Vitalität

Anzahl und Vitalität der Zellen konnten in einer Neubauer-Zählkammer mittels einer Trypanblau Färbung bestimmt werden. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und tote Zellen erscheinen dunkelblau. Der Verdünnungsfaktor von Zellsuspension und Trypanblau betrug 1 : 1, 1 : 10 oder 1 : 100, je nach Dichte der Zellsuspension. Es wurden immer mindestens zwei der vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei die Anzahl der Zellen anschließend über folgende Formel errechnet werden konnte:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Gesamtzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 5.3 Immunologische Methoden

#### 5.3.1 FACS Färbung

Bei einer „*fluorescence-activated cell sorter*“ (FACS) Färbung werden Oberflächenproteine von Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Es ist möglich mehrere

Oberflächenproteine mit den gleichen oder verschiedenen Farbstoffen zu markieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in einem FACSScan über einen Laser angeregt und deren Intensität gemessen. So ist es möglich Zellpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression von Oberflächenproteinen zu differenzieren.

Alle Arbeits- und Inkubationsschritte wurden auf Eis und alle Zentrifugationen für 3min bei 1200UpM und 4°C durchgeführt. Die Arbeitsschritte mit fluoreszierenden Antikörpern fanden im Dunkeln statt. Zwischen den Inkubationen musste jeweils zweimal mit 400µl FACS-Puffer gewaschen werden, indem die Zellsuspension abzentrifugiert und das Sediment in frischem FACS-Puffer aufgenommen wurde.

#### **5.3.1.1 FACS Messung und Analyse**

Die Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung auf der Zelloberfläche konnte mit Hilfe eines FACSScan und der Software CellQuest gemessen werden. Die Auswertung erfolgte durch die Analysesoftware FlowJo.

#### **5.3.1.2 HLA-A201 Färbung**

Mindestens  $2 \times 10^5$  humane PBMC oder T2 Zellen wurden in ein FACS Röhrchen überführt und zweimal mit 400µl FACS-Puffer gewaschen. Unspezifischen Bindungsstellen konnten mit 2,5 µg/µl Immunglobulin-G (Endobulin) in PBS für 20min blockiert werden. Danach folgte eine Inkubation für 20min mit 70µl Erstantikörper, BB7.2 Immunglobulin (IgG) 2b, um die HLA-A201 Oberflächenmoleküle zu markieren. Im Anschluss wurde an den Erstantikörper ein monoklonaler Antikörper (mAK), Ziege-anti-Maus IgG Fluoresceinisothiocyanat (FITC), gekoppelt. Dazu verwendete man eine Verdünnung von 1 : 100 des Zweitantikörpers und eine Inkubation von 20min. Zur Messung am FACSScan wurden die Zellen, je nach Zellzahl, in 50 – 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

#### **5.3.1.3 Prinzip der Stabilisierung von Oberflächen MHC durch Peptidbindung**

MHC-I Komplexe werden im Inneren der Zelle gebildet und im ER mit Peptiden beladen. Die Bindung des Peptides an den Komplex führt zu einer Stabilisierung des Komplexes auf der Zelloberfläche. Der beladene Komplex wird an die Oberfläche gebracht und zerfällt nach einiger Zeit. T2 Zellen haben keinen TAP, der die Peptide ins innere des ER bringt. T2 Zellen

tragen auf ihrer Oberfläche nicht beladene, und damit sehr instabile MHC-I Komplexe. Diese Komplexe können von außen mit Peptid beladen, und so stabilisiert werden. Die Stärke der Stabilisierung ist abhängig von der Stärke der Peptidbindung. Je mehr MHC-I Komplexe auf der Oberfläche einer Zelle, desto stärker die Fluoreszenz. Daher kann indirekt über eine Verstärkung der Fluoreszenz die Stärke der Peptidbindung gemessen werden.

Um eine unspezifische Bindung von Serum Bestandteilen, aus dem FKS, an den HLA-A201 Komplex zu vermeiden, mussten T2 Zellen über Nacht in Serum freiem X-VIVO20 Medium kultiviert werden. Am nächsten Tag wurden mindestens  $2 \times 10^5$  Zellen, mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml, mit Peptid (25 µg/ml) für 15h im Brutschrank inkubiert. Die Stabilisierung des MHC-I Komplexes auf der Oberfläche der Zellen konnte mittels einer HLA-A201 FACS Färbung (s. 5.3.1.2) bestimmt werden.

Die indirekte Stärke der Peptidbindung (FI) eines Peptides ergibt sich wie folgt, wobei die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der T2 Zellen, die nicht mit Peptid beladen wurden, als Hintergrund diente:

$$FI = \frac{\text{MFI Peptid} - \text{MFI Hintergrund}}{\text{MFI Hintergrund}}$$

#### 5.3.1.4 Tetramer Färbung

Tetramere bestehen aus vier gekoppelten HLA-A201 Molekülen beladen mit einem beliebigen HLA-A201 restringiertem Peptid und dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE). Die hier verwendeten Tetramere trugen die Heparanase Peptide Hpa p8, Hpa p16 und als negativ Kontrolle HIVgag, ein Peptid aus der ASS des „*human immunodeficient virus*“ (HIV).

$10^6$  T Zellen aus PB (PBTC) oder KM (KMTC) wurden in FACS Röhren überführt und zweimal gewaschen. Unspezifischen Bindungsstellen konnten mit Endobulin (2,5 µg/µl) in PBS für 20min blockiert werden. Für die drei Farben Analyse wurde zunächst mit anti-human CD8 FITC in einer 1 : 10 Verdünnung in PBS für 15min gefärbt. Dann folgte eine Inkubation für 45min mit dem 1 : 50 in PBS verdünnten Tetramer. Die Zellen konnten anschließend in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACSScan gemessen werden. Die Zugabe von Propidium Jodid (1 : 1000) erfolgte direkt vor der Messung um toten Zellen zu differenzieren.

### 5.3.2 Fluoreszenzfärbung

In den adhärent wachsenden Tumorzelllinien MCF-7hpa und MCF-7mock sollte die Expression der Heparanase mittels Fluoreszenzfärbung dargestellt werden. Runde Deckgläschen wurden in eine 12 Well Platte gegeben und mit 70% Ethanol sterilisiert. Nach zweimaligem waschen mit DMEM 10% FKS konnten  $1 \times 10^5$  Zellen je Well in 1ml DMEM 10% FKS zugegeben werden, die über Nacht an den Deckgläschen anwuchsen.

Für den ersten Teil der Färbung verwendete man jeweils 500µl pro Lösung, wobei diese direkt in die 12 Well Platte gegeben werden konnten. Die jeweils zwei Waschschrte zwischen den Inkubationen fanden für 5min in 500µl PBS statt. Die Zellen konnten mit 4% Paraformaldehyd bei RT für 20min fixiert werden. Anschließend wurde mit Ammoniumchlorid (50mM) für 10min bei RT inkubiert um Radikale abzufangen. Mit Ziegenserum (5% in PBS) : Saponin (10% in PBS) / 100 : 1 für 15min bei RT konnten anschließend unspezifische Bindungsstellen blockiert werden.

Für die anschließende Antikörperfärbung wurden die Deckgläschen bei den Inkubationen mit der zellbehafteten Seite nach unten in einen 120µl großen Tropfen der Antikörperlösung auf Parafilm gelegt. Zum dreimaligen waschen, zwischen den Färbungen, mit je 300-500 µl PBS für 5min mussten die Deckgläschen umgedreht werden. Inkubationen fanden für 30min bei RT im Dunkeln statt. Der Erstantikörper, ein Maus-anti-Heparanase mAK (hp130), wurde in einer Verdünnung von 1 : 75 eingesetzt, der Zweitantikörper, Ziegen-anti-Maus ALEXA 488, in einer 1 : 250 fachen Verdünnung. Die Zellkerne konnten mit bisBENZIMIDEN (DAPI) (1 : 1000) für 1 – 2 min gefärbt werden. Gründliches wachen nach der DAPI Färbung für dreimal 10min mit PBS war notwendig um die Färbung auf die Zellkerne zu beschränken. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit Glyceringelatine auf Glasslides konserviert.

### 5.3.3 ELISpot Analyse

Bei der IFN- $\gamma$  ELISpot Analyse wird von Zellen ausgeschüttetes IFN- $\gamma$  mittels Antikörpern an eine Membran gebunden und kann mittels Zweit-, Drittantikörper und anschließender Substratreaktion auf dieser sichtbar gemacht werden. Daher kann man mit Hilfe der Kurzzeit IFN- $\gamma$  ELISpot Analyse, mit einer Inkubation von 20h oder 40h, eine antigenspezifische Aktivierung von Memory T Zellen auf einzelzell Ebene nachweisen.

### 5.3.3.1 Aufreinigen von dendritischen Zellen mittels Dynabeads

Um Verunreinigungen durch andere mononukleäre Zellen wie T Zellen (TC) und B Zellen (BC) zu umgehen sollten unreife DC mittels Dynabead Magnet Separation, unter Verwendung einer Konzentration von mindestens 4 Beads pro zu entfernende Zelle, über einen MPC-L Magneten aufgereinigt werden. Die DC Aufreinigung gelang mittels anti-human CD3 (pan TC) und anti-human CD19 (pan BC) Dynabeads. Die Beads wurden über dem Magneten zweimal mit X-VIVO20 Medium gewaschen um in der Lösung befindliches Natriumazid zu entfernen. Danach konnten die Beads zusammen mit den DC in 1ml X-VIVO20 für 30min bei 4°C auf einem Schüttler gerollt werden. Dann wurden über dem Magneten, die durch die Bindung der Beads magnetischen Zellen, von den nicht magnetischen DC im Überstand getrennt.

### 5.3.3.2 Beladen der dendritischen Zellen mit Proteinen

Damit DC Fragmente definierter Proteine in ihren MCH-I Komplexen auf ihrer Oberfläche präsentieren, müssen die DC das entsprechende Protein phagozytieren und prozessieren. Dazu musste die doppelte Menge, der für die ELISpot Analyse benötigten DC, eingesetzt werden, da über die Adhärenz einiger DC diese für den Einsatz in einer ELISpot Analyse verloren gingen. Es wurden DC in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  / ml in X-VIVO20 über Nacht mit Tetanus Toxoid (TT) oder Endobulin (End) in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert.

Sollen in der ELISpot Analyse Reaktivitäten gegenüber Peptiden gemessen werden, so ist es nicht notwendig die DC vorher zu beladen. Peptide können von außen an den HLA-A201 Komplex der DC binden und können somit gleichzeitig mit den zu untersuchenden Zellen in den Test eingesetzt werden.

### 5.3.3.3 Aufreinigen von T Zellen mittels Dynabeads

Um Verunreinigungen durch andere mononukleäre Zellen, wie natürliche Killer Zellen (NK), BC oder DC, zu entfernen sollten die TC über Dynabeads aufgereinigt werden. Zur Aufreinigung konnten die genannten Zelltypen über anti-human CD56 (pan NK), anti-human CD19 (pan BC) und anti-human CD15 (pan myeloisch) Dynabeads aus der Zellsuspension entfernt werden. Die Beads wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt wie bei der DC Aufreinigung (s. 5.3.3.1).

Der anti-human CD56 Antikörper musste an magnetische Pan-Maus-IgG Beads gekoppelt werden, da er nicht direkt an Beads gekoppelt zu erwerben war. Dazu wurden die Pan-Maus-IgG Beads über einem MPC-L Magneten zweimal mit RPMI Medium gewaschen, um das, in der Lösung befindliche, Natriumazid zu entfernen, und anschließend mit  $4\mu\text{g} / 100\mu\text{l}$  Beads anti-human CD56 Antikörper bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler für 30min inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit RPMI konnten die CD56 Beads mit den, ebenfalls zweimal gewaschenen, CD19 und CD15 Beads gemischt werden. Die mit RPMI 3% AB gewaschene T Zellkultur (s. 5.2.3.5) wurde nun mit den Beads in einem Volumen von 1 – 2 ml RPMI 3% AB für 30min auf einem Schüttler bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerollt. Über dem Magneten fand nun die Trennung der, jetzt durch die Bindung der Beads magnetischen Zellen, von den nicht magnetischen TC im Überstand statt.

#### 5.3.3.4 Beschichten der ELISpot Platte

Eine 96-Loch ELISpot Platte wurde mit anti-human IFN- $\gamma$  mAB 1-D1K in Coating-Puffer ( $150\mu\text{l} / 10\text{ml}$ ) bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht oder im Brutschrank für 3h beschichtet. Bei Versuchen mit zusätzlicher Kostimulation, mit anti-CD28 Antikörper, musste mit anti-human IFN- $\gamma$  mAB 1-D1K ( $300\mu\text{l} / 10\text{ml}$  Coating-Puffer) und  $1\mu\text{l/ml}$  anti-CD28 Antikörper über Nacht beschichtet werden.

Durch viermaliges waschen der Platte mit Waschpuffer ( $200\mu\text{l/Well}$ ) konnte verbleibender Antikörper entfernt werden. Um unspezifische Signale zu verhindern blockierte man die Platte für eine Stunde im Brutschrank mit RPMI 5% AB. Nach erneutem viermaligen waschen mit Waschpuffer wurde, um das restliche Tween, aus dem Waschpuffer, zu entfernen die Platte für 10min bei RT mit RPMI 3% AB inkubiert.

#### 5.3.3.5 IFN- $\gamma$ Sekretion

Zur IFN- $\gamma$  Sekretion wurden gereinigte Effektorzellen (hier TC) und gereinigte Stimulatorzellen (hier DC, T2 oder K562/A\*0201) in einem Verhältnis von 10 : 1 mit  $10\mu\text{g/ml}$  Peptid in einem Endvolumen von  $200\mu\text{l}$  für 20h oder 40h im Brutschrank inkubiert. Zur Messung von Reaktivitäten gegen Proteine konnten gereinigte TC und mit Protein beschichteten DC in  $200\mu\text{l}$  Medium für 20h oder 40h im Brutschrank inkubiert werden.

### 5.3.3.6 Entwickeln und Messen der ELISpot Platte

Nach Ablauf der 20h oder 40h konnte der Überstand in der Platte verworfen werden. Die Platte wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen, und anschließend verbleibende Zellen mit destilliertem Wasser lysiert.

Die Markierung des produzierten, an die Platte gebundene, IFN- $\gamma$  geschah über einen zweiten, Biotin gebundenen anti-human-IFN- $\gamma$  mAB 7-B6-1-Biotin (2h im Brutschrank), und einen dritten Streptavidin-ALP-PQ Antikörpers (1,5h im Brutschrank). Zwischen den verschiedenen Inkubationen wurde die Platte jeweils viermal mit Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss konnte das produzierte IFN- $\gamma$  mittels einer Substratreaktion, (für 100 Wells: 10ml steriles Wasser, 400 $\mu$ l AP Color Entwicklungspuffer und je 100 $\mu$ l AP Color Reagenz A & B) für 15 – 60 min bei RT im Dunkeln, sichtbar gemacht werden. Nach Entfernung des Substrates, durch dreimaliges waschen mit destilliertem Wasser, mussten die Membranen über Nacht bei RT trocknen. Am nächsten Tag konnten sie dann auf eine Klebefolie gebracht werden.

Ausgezählt wurden die Spots mit Hilfe eines Axioplan Lichtmikroskopes und der Software KS ELISpot (Durchmesser ( $\mu$ m): 20 – 303; Sättigung: 25 – 50; Form: 45 – 100; Kontrast: 2,7 – 50,5; Neigung: 35 – 70; Farbton: 60 – 81).

### 5.3.3.7 Auswerten der IFN- $\gamma$ ELISpot Analyse

Jede Bestimmung eines Peptides fand in einem Dreifach-Ansatz (Triplikate) statt. Spotzahlen der Triplikate mit Insulin p34 und / oder HIVgag galten als unspezifischer Hintergrund. Ein Ergebnis galt als signifikant positiv, wenn die Zahl der Spots gemessen bei einem Tumorantigen sich signifikant ( $p < 0,05$ ) zum Hintergrund unterschied. Der p-Wert wurde mittels Excel-Software über den Zweistichproben T-Test mit unterschiedlicher Varianz berechnet.

Einzelne Werte aus Triplikaten mit mehr als 30 Spots, die größer waren als das Doppelte des Mittelwertes der beiden anderen, oder kleiner als die Hälfte des Mittelwertes der beiden anderen, wurden nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der untersuchten Peptide bezog sich auf einen Hintergrund bestehend aus Insulin p34 und HIVgag ( $n = 6$ ). Betraf bei einer der beiden Hintergrundkontrollen der Mittelwert der Spots mehr als das Doppelte der anderen wurde diese nicht berücksichtigt.

Positive Werte bei denen das zu testende Peptid im Mittel Spotzahlen <10 zeigte konnten nicht berücksichtigt werden.

Die Kalkulation der Frequenzen erfolgte folgendermaßen:

$$X = \frac{\text{MW Probe} - \text{MW Kontrolle}}{\text{Anzahl der T Zellen / Well}}$$

(X = aus wie vielen Zellen eine Zelle spezifisch reagiert hat)

Bezogen auf  $10^6$  T Zellen ergab sich:

$$\text{Frequenz} = \frac{1.000.000}{X}$$

Für die Berechnung der Signifikanz der Anzahl Peptid-spezifischer Zellen bei Patienten gegenüber gesunden Spendern wurden alle Frequenzen der Patienten gegen alle Frequenzen der gesunden Spender, gegen ein bestimmtes Peptid, mittels T-Test mit zwei unterschiedlichen Varianzen berechnet. Dabei galten p-Werte <0,05 als signifikant.

#### 5.3.4 Doppelstimulationen

Nach einer Antigen Erkennung reagieren spezifische Zellen mit einer schnellen Proliferation und einer Ausschüttung von Effektormolekülen. Durch diese schnelle Proliferation erhöht sich die Zahl der für ein Antigen spezifischen Effektorzellen innerhalb der ersten Tage nach der Antigenerkennung. Diesen Effekt versucht man in Doppelstimulations-Versuchen zu nutzen. Bei einer Doppelstimulation werden Effektorzellen, z.B. TC, für einige Tage mit Stimulatorzellen, z.B. DC, und dem zu testenden Antigen kokultiviert. Durch die Proliferation der Effektorzellen kommt es bei einer erneuten Stimulation mit dem gleichen Antigen zu einer stärkeren Reaktion. Diese zweite Stimulation kann in Form von IFN- $\gamma$  Ausschüttung, in einer ELISpot Analyse, oder in Form einer spezifischen Lyse, in einem *Chromium release* Assay, gemessen werden.

#### 5.3.4.1 Doppelstimulation in einer ELISpot Analyse

Aufgereinigte TC und DC im Verhältnis von 10 : 1 wurden mit 10 µg/ml Peptid in RPMI 3% AB mit 20 U/ml IL-2 kultiviert. Nach 7d konnten die TC in dieser Mischkultur ausgezählt und als Effektorzellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  / Well in die ELISpot Analyse eingesetzt werden. Als Stimulatorzellen, für die zweite Aktivierung, verwendete man DC mit 10 µg/ml Peptid in einem Verhältnis von TC : DC / 10 : 1 (s. 5.3.3).

#### 5.3.4.2 Chromium release Assay

Bei dem *Chromium release Assay* handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, um spezifische zytotoxische Aktivität von CD8+ TC nachzuweisen. Zellen lagern unter Zugabe von Natriumchromat radioaktives  $^{51}\text{Chrom}$  in Zellproteine ein und sind somit radioaktiv markiert. Werden diese Zielzellen von Effektorzellen lysiert, so wird das  $^{51}\text{Chom}$  freigesetzt. Über die Menge der ausgeschütteten Radioaktivität, die in einem  $\gamma$ -Counter bestimmt werden kann, können die lysierten Zellen prozentual berechnet werden.

Die erste Stimulation der TC fand während einer Kultur von aufgereinigten TC, DC (Verhältnis 10 : 1) und 10 µg/ml Peptid für 7d in RPMI 3% AB und 20 U/ml IL-2 statt.

Für den *Chromium release assay* mussten  $1 \times 10^6$  Zielzellen, pro Ansatz, für 90min mit 200µCi bei 37°C chromiert werden und im Anschluss dreimal mit DMEM 10% FKS gewaschen werden um das überschüssige Chrom zu entfernen. Die TC wurden in der Mischkultur ausgezählt und in Triplikaten in vier je halberenden Verdünnungsschritten, ausgehend von  $1,5 \times 10^5$  / Well, in eine 96 Well Rundboden-Platte titriert. Anschließend konnten die Zielzellen, in einer Konzentration von  $3 \times 10^3$  / Well, dazugegeben werden. Die Volumen mussten so kalkuliert werden, dass sich am Ende 200µl in jedem Well befanden. Es ergaben sich Verhältnisse von Effektorzellen zu Zielzellen von 50 : 1, 25 : 1, 12,5 : 1 und 6 : 1.

Zusätzlich wurde bei jedem Ansatz die spontane Lyse, als Hintergrundwert, und die maximal Lyse, als maximal mögliche radioaktive Ausschüttung, gemessen. Für die spontane Lyse kam die gleiche Anzahl markierter Zellen, ebenfalls in einem Triplikat, in 200µl Medium in Wells. Für die maximale Lyse benötigte man nur die Hälfte der in den Proben eingesetzten markierten Zellen, die direkt in Counter Röhren pipetiert werden konnten.

Nach einer kurzen Zentrifugation von 3min bei 500UpM, damit sich die Zellen im Zentrum des Rundbodens treffen konnten, fand eine Inkubation von 4h im Brutschrank statt. Nach einer weiteren Zentrifugation von 3min bei 1000UpM wurden 100µl Überstand (die Hälfte des

gesamten Volumens) vorsichtig in Counter Röhren überführt und diese mit Wachs verschlossen. Die Menge an freigesetztem  $^{51}\text{Chrom}$  konnte in einem  $\gamma$ -Counter gemessen werden. Dabei wurde ein Programm gewählt, bei dem jedes Röhren 50sec lang gemessen wurde.

Für die Kalkulation der prozentualen Lyse verwendet man folgende Formel:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse}}{\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse}} \times 100$$

#### 5.4 Molekularbiologische Methoden

Die Durchführung aller Arbeitsschritte fand, wenn nicht anders angegeben, auf Eis und mit Filterpipettenspitzen statt.

##### 5.4.1 Isolation von total RNA aus Gewebe und Tumorzelllinien

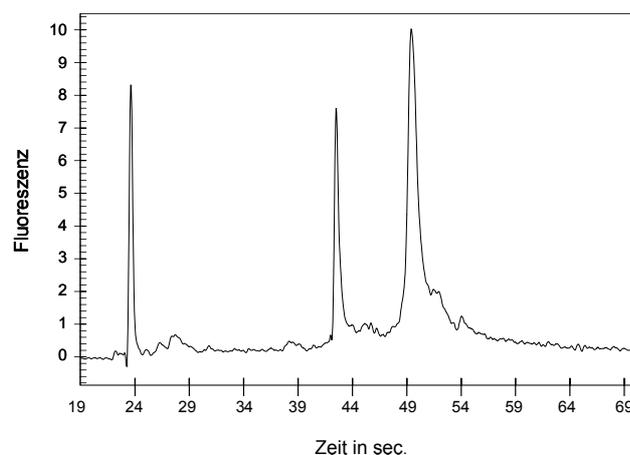
Durch schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konnten Tumor Gewebestücken aus primär operierten Brustkrebspatienten konserviert werden. Das gefrorene Gewebe (maximale Größe 1,5cm Durchmesser) wurde mittels eines Homogenisators in 1ml peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup> Reagenz zerkleinert. Zellen lysierten direkt durch die Zugabe von 1ml peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup> Reagenz. Durch eine kurze Zentrifugation konnten grobe Gewebestücke aus dem entstandenen Homogenat entfernt werden. Nachdem das Homogenat für 5min bei RT stehen gelassen wurde, konnte 0,2ml Chloroform, pro eingesetztem ml peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup>, zugegeben werden. Nach kräftigem schütteln für 15sec fand eine erneute Inkubation für 3 – 10min bei RT statt. Nach der anschließenden Zentrifugation für 5min bei 12.000UpM befand sich in der entstandenen, oberen wässrigen Phase die Ribonukleinsäure (RNA). Die wässrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben. In der folgenden Inkubation, 5 -15 min bei RT, fiel die RNA aus. Anschließend wurde für 10min bei 12.000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Isopropanol Überstand konnte vorsichtig abgezogen werden, und das RNA Sediment zweimal mit der doppelten Menge 75% Ethanol, wie das der wässrigen Phase, durch schütteln und anschließende Zentrifugation gewaschen werden. Das erneute lösen der RNA

fand, nachdem das restliche Ethanol verdampft war, in 10 – 200µl RNase freiem Wasser über Nacht statt. Gelagert werden konnte die total RNA Lösung bei -80°C.

#### 5.4.2 Bestimmung der RNA Qualität mit dem Bioanalyzer 2100

Die RNA Qualität konnte mittels eines Agilent RNA 6000 Nano Assay bestimmt werden. Das Prinzip der Analyse beruht auf der Gelelektrophoresetechnik (s. 5.4.5.2). Der Agilent RNA 6000 Nano Assay Chip besteht aus einem mit Gel gefüllten Glas-Mikrokanalsystem das die Auftrennung von bis zu 12 Proben gleichzeitig ermöglicht.

In die mit einem schwarzen „G“ gekennzeichnete Vertiefung wurden 9µl der mit Farbstoff vorbereiteten RNA-Gel-Matrix (130µl gefilterte Gel-Matrix mit 1µl RNA Farbstoff) gegeben. Der Chip wurde in die dafür vorgesehene Chip-Priming-Station gegeben und mittels Druckluft aus einer integrierten Spritze die Gelmatrix in das Mikrokanalsystem gepresst. Nach 30sec konnte die Chip-Priming-Station wieder geöffnet werden und beide mit „G“ gekennzeichneten Vertiefungen mit je 9µl RNA-Gel-Matrix als Reserve gefüllt und in die restlichen Vertiefungen je 5µl RNA-Nano-Marker gegeben werden. Die Denaturierung des RNA 6000 Größenstandart und der zu testenden RNA fand in einem Heizblock bei 70°C für 4min statt. 1µl RNA des Größenstandart und der Proben wurde auf den Chip geladen. Im Anschluss musste der Chip für 1min kräftig geschüttelt werden und konnte dann über den Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies gemessen werden.



**Abbildung 2:** Qualität der isolierten RNA aus Tumorgewebe; dargestellte RNA zeigt eine gute Qualität, da beide Peaks deutlich zu erkennen sind. Der linke Peak zeigt Abbauprodukte in Form sehr kleiner RNA Fragmente.

Bei einer intakten RNA lassen sich beide Peaks (28S und 18S) der ribosomalen RNA deutlich erkennen (Abb.2). Nur diese qualitativ hochwertige RNA kann für Genexpressionsanalysen verwendet werden. Je kleiner die beiden Peaks erscheinen und je weiter sie nach links verschoben sind, desto stärker ist die RNA degradiert.

#### **5.4.3 Bestimmung der Quantität von Nukleinsäuren**

Die quantitative Bestimmung der Nukleinsäurelösungen erfolgte photometrisch mittels eines Nano-Drop Spektrophotometers. Dazu wurde zuerst mit 1µl RNase freiem Wasser geeicht und dann je 1µl der zu bestimmenden Lösung zur Messung auf die Messoberfläche gegeben. An einem angeschlossenen Computer konnte die Konzentration abgelesen werden. Die Messungen fanden bei einer Wellenlänge von 260nm statt.

#### **5.4.4 cDNA Synthese von total RNA**

Die total RNA konnte mittels SuperScript-II in copy Desoxy-Ribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurden 2µg total RNA und 1µl oligo (dt)<sub>12-18</sub> in einem Volumen von 20µl für 10min auf 70°C denaturiert und nach Zugabe von 4µl 5x First-Strand Puffer, 2µl 0,1 M DTT und 1µl 10mM dNTP Mix die Lösung für 2min bei 42°C erwärmt. Die Synthese der cDNA fand nach der Zugabe von 1µl SuperScript-II bei 42°C für 50min statt. Im Anschluss konnte die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 15min inaktiviert werden. Durch Zugabe von 1µl RNase OUT wurde die eingesetzte RNA während einer Inkubationszeit von 20min bei 37°C abgebaut.

Die gewonnene cDNA war bereit für den Einsatz in einer Reversentranskriptase Polymerase-Kettenreaktionen (PCR). Vor dem Einsatz in einer Real-Time PCR (RT-PCR) musste sie jedoch nochmals über MicroSpin™ G50 Säulen gereinigt werden.

#### **5.4.5 Polymerase Ketten Reaktion**

Bei einer PCR können definierte Bereiche aus Nukleinsäuren selektiv vervielfältigt werden. Dazu wird ein Primerpaar benötigt, welches sich spezifisch an den Anfang der entsprechenden Sequenz in einem cDNA Gemisch anlagert. Dieser kann dann durch eine Polymerase kopiert werden. Nach Trennung der doppelsträngigen cDNA durch Hitze in Einzelstränge können sich Primer an beiden Einzelsträngen gegenläufig anlagern. In

Gegenwart von thermostabiler DNA-Polymerase (Tag) und dNTPs synthetisieren sie die komplementäre Sequenz so, dass je ein neuer Doppelstrang entsteht. Während jedem Zyklus wird auf diesem Weg der gewollte Bereich der cDNA verdoppelt.

#### 5.4.5.1 Durchführung der PCR

2µg cDNA gewonnen aus MCF-7hpa und MCF-7mock Zellen wurden mit 5µl 10x PCR Puffer, 1µl dNTP-Mix (10mM), je 2,5µl 3' und 5' Heparanase Primer (25µM) und 2,5µl Tag Polymerase versetzt und im Anschluss die PCR dieser Proben, in einer PCR-Maschine, mit folgendem Programm durchgeführt:

1)	4min	94°C	Denaturierung der DNA	} 26 Zyklen
2)	45sec	94°C	Subsequent Denaturierung	
3)	1min	60°C	Anlagern der Primer	
4)	1min	72°C	Polymerisation	
5)	10min	70°C	Elongation	
6)	10min	4°C	abkühlen und lagern	

#### 5.4.5.2 Agarose Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese ist eine größenabhängige Auftrennung von geladenen Molekülen möglich. Negativ geladene Nukleinsäuren wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in Richtung des positiven Pols. Die Wandergeschwindigkeit ist Abhängig von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels.

Für die Herstellung eines Gels wurden 1,5% Agarose in 1 x TAE Puffer durch kurzes aufkochen in einer Mikrowelle gelöst, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die vorgesehene Kammer gegossen. Nach dem Auspolimerisieren des Gels konnten die zuvor eingesetzten Kämmen vorsichtig entfernt werden. In die entstandenen Taschen wurden 12µl der aufzutrennenden Proben gegeben. Diese besteht aus 10µl PCR Produkt oder 1µg 100bp Marker und 2µl 6x Loading-Dye. In die jeweils erste Tasche einer Reihe kam der 100bp Marker, um nach der Auftrennung eine Größenrelation der Fragmente zu bekommen. Durch die Zugabe des Ethidiumbromid konnte die RNA angefärbt und die Bande des PCR Produktes direkt auf einem UV-Flächenstrahler (254nm) sichtbar gemacht werden.

### 5.4.6 Real Time PCR

Anhand von mRNA kann bestimmt werden, welche Genprodukte in den Zellen vor der Entnahme aktiv waren. Dazu wird mRNA ohne Vervielfältigung in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA repräsentiert die Quantität der aktuell im Gewebe synthetisierten Genprodukte. Ist die gewünschte cDNA in der getesteten Probe vorhanden so kann diese von spezifischen Primern synthetisiert werden. Dabei lagert sich neben dem Primer noch eine Sonde an die entsprechende Sequenz an. Diese Sonde besteht aus einem Reporter Farbstoff und einem Quencher, der, solange er in unmittelbarer Nähe des Reporters ist, die Fluoreszenz des Farbstoffes unterdrückt. Wird die komplementäre cDNA Sequenz von der Taq Polymerase synthetisiert, so spaltet sie Reporter und Quencher von der cDNA ab. Durch die räumliche Trennung von Quencher und Reporter kann die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt werden und der Farbstoff beginnt zu leuchten. Dieser Vorgang wiederholt sich bei jedem Zyklus. Anhand der Stärke des Farbstoffes kann indirekt auf die Menge der synthetisierten DNA geschlossen werden. Die Stärke der Fluoreszenz wird über den gesamten Zeitraum der PCR bestimmt, wodurch eine genaue Quantifizierung möglich ist.

Je mehr Genprodukt in der Probe vorhanden ist desto, desto schneller steigt die Kurve des amplifizierten DNA Produktes an und desto kleiner ist der ct-Wert. Jede Verdopplung der cDNA Menge des entsprechenden Genes entspricht einem ct-Wert.

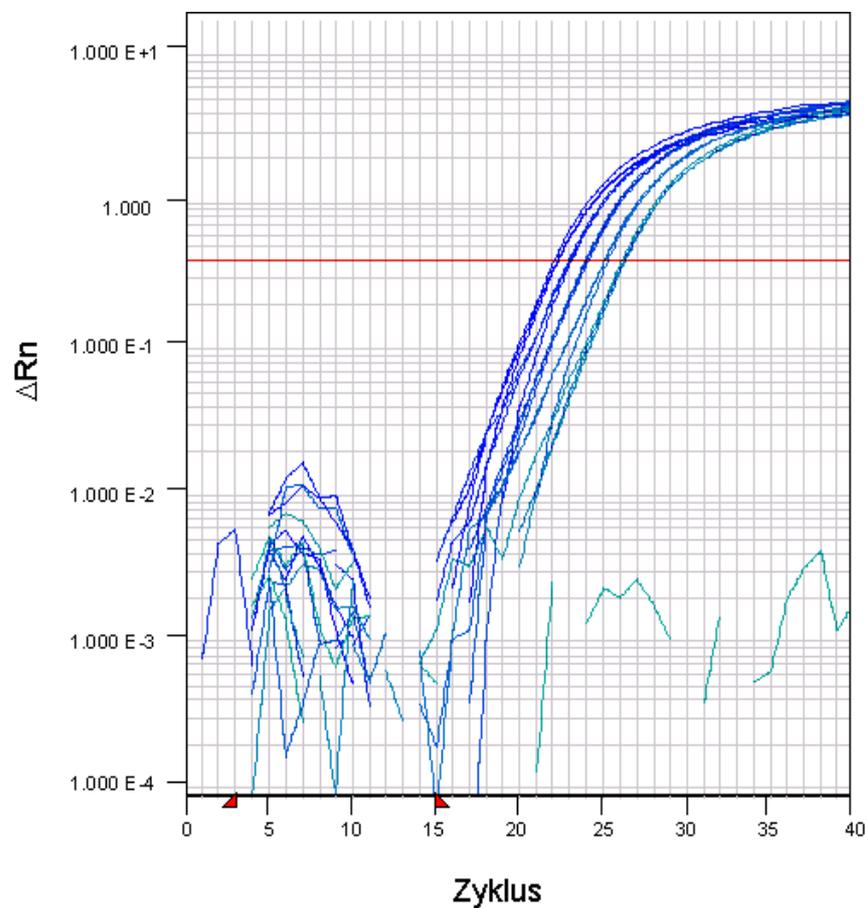
#### 5.4.6.1 Durchführung der Real Time PCR

Die RT-PCR Analysen fanden mit „Assay on Demand“ Primerpaaren statt. In eine 384 Well Platte wurden 5µl TagMan<sup>®</sup> Master Mix, 4,5µl cDNA Lösung und 0,5µl „Assay on Demand“ gegeben. Jede Gruppe war als Triplikat angesetzt. Die Platte klebte man mit einer optischen Folie zu und zentrifugierte sie anschließend bei 1.000UpM für 1min damit sich die gesamte Flüssigkeit im Boden der Platte sammelte. Die PCR wurde in einer ABI PRISM 7900 durchgeführt und mittels Bio Sizing VA.02.10 Software gemessen. Das verwendete Programm war auf folgende Inkubationsschritte eingestellt:

1)	2min	50°C	Aktivierung des Enzyms	} 40 Zyklen
2)	15min	95°C	Denaturierung der DNA	
3)	15sec	95°C	Denaturierung der DNA	
4)	1min	60°C	Polymerisation	

### 5.4.6.2 Eichgeraden

Um die Funktionalität der Primerpaare zu kontrollieren und um die Menge der einzusetzenden Tumor cDNA zu ermitteln, musste für jedes Primerpaar eine Eichgerade erstellt werden. Um sicher zu gehen, dass die für die Primer benötigte cDNA auch in der Probe enthalten ist, wurde eine cDNA verwendet, die aus einer Universal Referenz RNA umgeschrieben wurde. Dabei handelt es sich um eine RNA Mischung verschiedener Tumorzelllinien. Die hier dargestellte Eichgeraden für das Referenz-Gen Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase (GAPDH), für 4.000pg bis 250pg cDNA, wurde in halbierenden Schritten titriert (Abb.3).



**Abbildung 3:** Titration der Clontec cDNA mit Primern spezifisch für GAPDH; der Mittelwert des Triplikates für 4.000pg cDNA lag bei  $ct = 22,16$ , die jeweils halbierten Konzentrationen (2000, 1000, 500, 250pg) lagen jeweils etwa einen  $ct$ -Wert höher.

### 5.4.6.3 Berechnung der Linearität der Eichgeraden

Für die Berechnungen konnte stets der Mittelwert aus dem Triplikate verwendet werden. Unterschied sich ein Wert des Triplikates um  $>0,5$  ct so wurde dieser in die Berechnung nicht mit einbezogen. Die „Schwelle“ die die Höhe der ct-Werte bestimmt lag im exponentiellen Anstieg aller Kurven.

In Abb.4 ist der Bezug der ct-Werte ( $\log_{10}$  auf X-Achse) auf die Anzahl der PCR Zyklen (Y-Achse) dargestellt. Verbindet man diese Messpunkte mittels einer Geraden so ist eine lineare Abhängigkeit der Messwerte gegeben wenn  $R^2 > 0,80$ . Bei 1,0 würden alle Werte genau auf einer Geraden liegen und damit bei jeder Verdoppelung der cDNA Menge der ct-Wert um exakt 1,0 ansteigen.

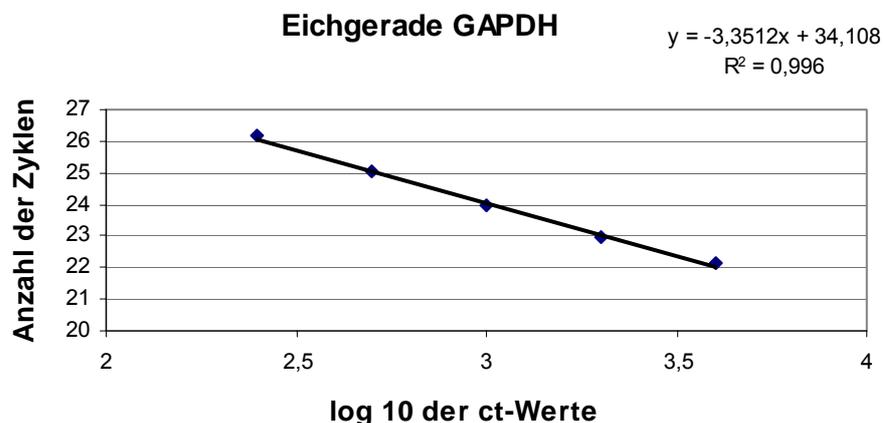


Abbildung 4:  $\log_{10}$  der Mittelwerte aus den Triplikaten aus der Titration von GAPDH, gegen die Zahl der Zyklen dargestellt;  $R^2 = 0,996$  und ergibt somit eine Gerade mit linearer Abhängigkeit der Messpunkte.

Für die anderen verwendeten Primerpaare ergab sich:

BA46	$R^2 = 0,9976$
Ep-Cam	$R^2 = 0,9731$
Her2/neu	$R^2 = 0,9913$
Heparanase	$R^2 = 0,9945$
hNIS	$R^2 = 0,9794$
MUC-1	$R^2 = 0,9826$
PH20	$R^2 = 0,9849$

#### 5.4.6.4 RT-PCR mit cDNA aus Tumorgewebe

Die Eichgeraden lagen bei den eingesetzten cDNA Mengen in einem linearen Bereich, PH20, Hpa und hNIS erreichten den Schwellenwert für 4.000pg erst bei sehr hohen ct-Werten >29,7. Daher wurde für die Tests mit Proben aus Patiententumoren und dem Tumorpool (TP) 8.000pg cDNA eingesetzt.

#### 5.4.6.5 Auswertung der RT-PCR nach der relativen $\Delta\Delta\text{ct}$ Methode

Der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) konnten aus den gemessenen Triplikaten errechnet werden.

Der  $\Delta\text{ct}$  Wert errechnet sich:  $\Delta\text{ct} = \text{MW TAA} - \text{MW GAPDH}$

Der  $\Delta\text{ct}$  Standard Fehler errechnet sich:

$$\Delta\text{ct std Fehler} = \sqrt{(\text{STABW TAA})^2 + (\text{STABW GAPDH})^2}$$

Der  $\Delta\Delta\text{ct}$  Wert stellte einen Wert bezogen auf eine gewählte Probe dar, in diesem Fall der Pool aus gesunden Spendern (GK). Somit ergab sich:

$$\text{GK} = 0,00$$

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct Patient} - \Delta\text{ct GK}$$

Diese  $\Delta\Delta\text{ct}$  Werte wurden normalisiert:  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$

### 5.4.7 Mikroarray

Bei einem Mikroarray handelt es sich um einen Glasslide auf den cDNA Fragmente definierter Gene aufgetragen werden. An diese cDNA kann eine komplementäre Nukleinsäuresequenz binden. Mittels eines Mikroarrays kann untersucht werden, ob in unterschiedlichen Gewebeproben ein bestimmtes Gen stärker oder schwächer exprimiert wird. Dazu wird aus Gewebe gewonnene cDNA mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Diese beiden unterschiedlich markierten Proben werden gemischt auf den Mikroarray hybridisiert. Je nach dem wie stark in entweder der einen oder der anderen aRNA die Sequenz eines bestimmtes Gens vorhanden ist erscheint der „Spot“ in einer Mischfarbe aus rot und grün. Dabei handelt es sich um die Messung von Falschfarben, die unterschiede in den Grautönen werden anhand der Pixeldichte errechnet und im Anschluss als eine Mischfarbe aus grün und rot dargestellt.

#### 5.4.7.1 Gewinnung der cDNA Gene Fragmente

Klone spezifisch für verschiedene TAA wurden gewählt und bei dem Deutschen Ressourcen Zentrum für Genomforschung (RZPD) bestellt. Bei diesen Klonen handelte es sich um Escherichia-Coli Bakterien die, mit einem cDNA Plasmid transfiziert, einen Ausschnitt des zu untersuchenden Gens und eine Ampicillin Resistenz tragen.

Die Bakterienklone konnten in 384 Well Platten mit 100µl LB-Medium und 20µg/ml Ampicillin über Nacht wachsen. Zum Amplifizieren der cDNA Fragmente wurden je 2µl der Bakterien-Medium Suspension aus den 384 Platten in 96er Platten überführt, zu 100µl Mastermix (10µl 10x PCR Puffer, 6µl 25mM MgCl, 0,2µl 25mM dNTP, 0,1µlM 13 U Primer, 0,1µl M 13 R Primer, 6U Tag Polymerase, 1µl Triton-X 100, und nuclease freies Wasser) gegeben und mit folgendem PCR Programm amplifiziert:

1)	3min	95°C	Denaturierung der DNA	} 35 Zyklen
2)	30sec	95°C	Denaturierung der DNA	
3)	30sec	57°C	Anlagern der Primer	
4)	2min	72°C	Polymerisation	
5)	10min	72°C	Elongation	
6)	for ever	4°C	Abkühlen und Lagern	

Die PCR wurden für jeden Klon doppelt angesetzt und das Ergebnis wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft. Die Gelelektrophorese erfolgte mittels eines 1,5% Agarose Gel mit Ethidiumbromid und 5µl PCR Produkt mit 7µl 0,6x Loading-Dye (s. 5.4.5.2).

Nachdem für alle Klone eine Bande, und damit ein PCR-Produkt vorhanden war, konnten die PCR Produkte gefällt werden. Dazu wurden 100µl Isopropanol zu 100µl PCR Produkt gegeben, gemischt und bei 4.000UpM für 45min bei 4°C zentrifugiert. Die DNA bildete das Sediment am Boden der Wells und musste mit 100µl 75% Ethanol gewaschen und anschließend in 12µl 3x SSC mit 1,5x Betain aufgenommen werden. Betain sorgt für eine geringere Verdampfung und die Erhaltung des denaturierten Zustandes der DNA während der Lagerung. Die Platten, fertig zum Spotten, können bei -80°C aufbewahrt werden.

#### **5.4.7.2 Spotting der DNA Slides**

Die synthetisierte cDNA der Klone wurden von J. Schneider (DKFZ, Abteilung Molekulare Genomanalyse) mittels eines OmniGrid Spotting Roboters auf Epoxysilan beschichtete Glasslides aufgetragen und diese dann nachbehandelt [Schneider, 2004]. Dabei wurde jeder Klon zweimal an möglichst weit auseinander liegenden Positionen auf den Slide aufgetragen.

#### **5.4.7.3 In-vitro Transkription (MessageAmp™ aRNA Kit)**

Mittels Mastermix-I (2µl 10x First Strand Puffer, 1µl RNase Inhibitor, 4µl dNTP Mix, 1µl Reverse Transkriptase) konnte die, in der total RNA (s. 5.4.1) enthaltene, mRNA während eine Inkubationszeit von 2h bei 42°C in Einzelstrang cDNA umgeschrieben werden. Um aus der einzelstrang cDNA eine doppelstrang cDNA zu synthetisieren wurden die Proben nach Zugabe von Mastermix-II (63µl Nuclease freies Wasser, 10µl 10x Second Strand Puffer, 4µl dNTP Mix, 2µl DNA Polymerase, 1µl RNase H) für 2h bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Die gewonnene cDNA musste im nächsten Schritt aufgereinigt werden, indem sie an einen Filter gebunden und dann mit 20µl 50°C warmem nucleasefreiem Wasser von diesem wieder gelöst wurde. Über die Zugabe von Mastermix-III (4µl T7 ATP Soln, 4µl T7 CTP Soln, 4µl T7 GTP Soln, 4µl UTP Soln, 4µl T7 10x Reaktionspuffer, 4µl T7 Enzyme Mix) konnte die synthetisierte cDNA innerhalb von 14h bei 37°C im Wasserbad in antisense RNA (aRNA) transkribiert werden. Im Anschluss wurde noch, um die DNA aus der Probe zu entfernen, mit 2µl DNase-I für 30min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der aRNA geschah im Anschluss, indem sie zuerst mit Ethanol versetzt, an einen Filter gebunden und dann mit 100µl 50°C warmem nuklease freiem Wasser von diesem wieder gelöst wurde. Um die Proben zu

konzentrieren wurde die aRNA mit 5M Ammoniumacetat und 100% Ethanol gefällt und im Anschluss in 20µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

#### 5.4.7.4 Markieren der aRNA

Unter Einbau eines Farbstoffes gelang es die aRNA in cDNA umzuschreiben, wobei der Pool aus gesundem Gewebe rot, mit Cyanin5 gekoppelten dCTP (Cy5), und die Brusttumor Proben und der Brusttumor Pool grün, mit Cyanin3 gekoppelten dCTP (Cy3), markiert wurden. Dazu wurden 2µg aRNA und 1µl Random Hexamer Primer mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 5,75µl gebracht. Durch Erhitzen der Proben für 10min auf 70°C fand deren Denaturierung statt. Nach Zugabe von 6,75µl Mastermix (2,5µl 5x RT-Puffer, 1,25µl 0,1M DTT, 1µl 5mM dGAT, 0,5µl 3mM dCTP, 0,5µl RNAsin, 0,5µl Cy3 oder Cy5, 0,5µl Superscript-III) wurden die Proben für 1h bei 42°C inkubiert. Im Anschluss konnte mit 1,25µl EDTA und 5µl Natronlauge, für 10min bei 65°C, die aRNA hydrolysiert werden. Zum Schluss neutralisierte man die Proben noch mit 1µl Essigsäure.

#### 5.4.7.5 Hybridisieren der cDNA auf die gespotteten Slides

Unter einer Hybridisierung versteht man die Basen-komplémentäre Bindung farbmarkierter aRNA an die cDNA auf den Glasslides. Vor der Hybridisierung mussten je 19,75µl der Cy3 und Cy5 markierten Proben gemischt werden. Aus diesen gemischten Proben wurde die cDNA mittels YM-30 Säulchen aufgereinigt um verbleibende Reste aus der Markierungs-Reaktion zu entfernen. Nach der Aufreinigung erhielt man 16µl cDNA, denen 16µl 2x Hybridisierungs Puffer zugegeben wurde. Die gespotteten Slides wurden vor der Hybridisierung mit Druckluft abgepusht und die Deckgläschen in Isopropanol gereinigt und mit Druckluft getrocknet um Staub zu entfernen.

Nach der Denaturierung der Proben, für 2min bei 65°C, wurden die Proben auf das untere Drittel des gespotteten Slides gegeben. Ein Deckgläschen wurde, unter Vermeidung von Luftblasen, auf die Slides gelegt und je oben und unten einem Tropfen Fixogum-Kleber fixiert. Die Hybridisierungskammern wurden in beiden Vertiefungen mit 15µl 1x DIG-EASY Puffer befüllt und die Slides eingelegt. Die Hybridisierung fand über Nacht in einem Wasserbad bei 37°C statt.

Am nächsten Tag wurden die Slides gewaschen um die nicht gebundene DNA zu entfernen. Dazu kamen die Slides in ein Glasschiffchen mit 1 x SSC / 0,1% SDS und dieses für 15min in ein Wasserbad bei 25°C. Dabei lösten sich die Deckgläschen und der Kleber von den

Slides. Dann wurden die Slides zweimal 10min in 1x SSC / 0,1% SDS Puffer und einmal 10min in 0,1x SSC / 0,1% SDS gewaschen. Die Waschschriffe fanden ebenfalls in einem Schiffchen im Wasserbad bei 25°C statt. Im Anschluss wurden die Slides der Reihe nach in 70% Ethanol, 95% Ethanol und 100% Isopropanol fixiert und mit Druckluft getrocknet.

#### 5.4.7.6 Auswerten der cDNA Mikroarrays

Die Slides wurden an einem Axon 4000B Scanner eingescannt. Mittels GenePix Pro 4.0 Software wurde für jeden Spot ein Farbwert zwischen 0,0 und 65.000 für Grün und Rot ermittelt. Diese Messwerte konnten von A. Bunes (DKFZ, Abteilung Molekulare Genomanalyse) normalisiert und berechnet werden [Bunes, 2004]. Zum normalisieren wurden 768 Klone verwendet, die H. Sültmann (DKFZ, Abteilung Molekulare Genomanalyse) im Rahmen eines anderen Projektes ausgewählt hatte. Von diesen Klonen wurde nicht erwartet, dass sie in Brustgewebe differenziell exprimiert werden.

Für jeden Messpunkt ergab sich eine relative Farbzusammensetzung (log-ratio) die bei gleicher Intensität von Grün und Rot bei 0,00 lag. Bei Werten >0,00 lag der Wert wenn der grüne Farbstoff (Probe) stärker und bei <0,00 wenn der rote Farbstoff (Referenz) stärker war. Für jeden Patienten ergaben sich so sechs (je drei Slides pro Patient und jeder Klon zweimal pro Slide) log-Werte für jeden Klon.

Gene werden als differenziell exprimiert betrachtet, wenn der Faktor der Differenziellen Expression größer als zwei ist. Ein zweifacher Unterschied besteht ab einer log-ratio Differenz zweier Messwerte von 0,7. Der Lineare Faktor der differenziellen Expression kann mittels e-Funktion errechnet werden:

$$\text{Faktor der differenziellen Expression} = e^{\text{Differenz der log-ratio}}$$

## 6 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die Feinspezifität des natürlich bei Patienten vorliegenden Memory T Zell Repertoires gegenüber unterschiedlichen TAA und deren Expression im Tumorgewebe zu charakterisieren. Es folgt eine Beschreibung der verwendeten Peptide aus TAA, die Beschreibung der Optimierung der verwendeten Analyseverfahren und ein Vergleich verschiedener Stimulatorzellen als APC in der ELISpot Analyse. Im Folgenden werden die Reaktivitäten von Patienten und gesunden Spendern gegenüber allen hier untersuchten TAA zusammenfassend dargestellt. Aufgrund dieser Analysen wurden einige TAA ausgewählt, die zu einer Tumor-abhängigen Reaktivität bei Patienten führten, da gegenüber diesen TAA Reaktivitäten bei gesunden Spendern nicht nachweisbar oder deutlich schwächer waren. Es folgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser ausgewählten TAA. Im Anschluss werden die Ergebnisse der ausgewählten, der nicht Malignitäts-assoziierten und der übrigen untersuchten TAA im Einzelnen dargestellt. Am Ende dieser Arbeit steht eine nähere Charakterisierung der bisher nicht als TAA beschriebenen Heparanase. Eine detaillierte Aufstellung der Expressionsanalysen der untersuchten TAA in Brusttumorgewebe ist im Anhang zu finden.

### 6.1 Peptide aus Tumor-assoziierten Antigenen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Tumor-assoziierte Antigene ermittelt die in Brusttumorgewebe überexprimiert werden. HLA-A201 restringierte Peptide aus der Aminosäuresequenz (ASS) einiger dieser Tumorantigene waren in der Literatur beschrieben (Tab.1A). Beschriebene Peptide zweier nicht Malignitäts-assoziierten Antigene, Kollagen und Keratin, wurden untersucht um zu überprüfen, ob TAA tatsächlich eine stärkere Immunogenität aufweisen als andere autologe Antigene (Tab.1B). Ein bekanntes Peptid aus der Sequenz des Influenza Matrix Proteins (IMP) wurde als Positivkontrolle eingesetzt und das bekannte HIVgag Peptid als Hintergrundkontrolle (Tab.1B).

Andere Brustkrebsrelevante TAA aus deren ASS noch keine Peptide beschrieben waren, wurden über die Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (unter [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) ermittelt. Über die Homepage der Universität Tübingen mit Hilfe der „SYFPEITHY“ Datenbank (unter [www.uni-tuebingen.de](http://www.uni-tuebingen.de), Fakultät für Immunologie) wurden aus diesen ASS HLA-A201 restringierte Peptide ermittelt (Tab. 2A).

**Tabelle 1:** In der Literatur beschriebene Peptide mit Angabe der Position (p) der ersten AS; der Peptidsequenz; der theoretischen Bindungskapazität; dem Literaturverweis der Erstbeschreibung; **A)** Tumor-assoziierte Antigene; **B)** nicht Malignitäts-assoziierte Antigene und Kontrollen; BA46 (Lactadherin), Bcl-2 (B Zell Lymphom Protein-2), CEA (Carzino-Embryonales Antigen), Her2/neu (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor-2), MAGE-2 (Melanom-assoziiertes-Antigen-2), MUC-1 (Mucin-1), PSA (Prostata spezifisches Antigen), Coll-IV (Kollagen-IV), HIV (*human immunodeficient virus*), IMP (Influenza Matrix Protein), Krt18 (Keratin 18).

## A

TAA	Position der ersten AS in der Proteinsequenz	Peptid Sequenz	Theoretische Bindungs-Kapazität	Literatur
BA46	p131	NLLRRMWVT	16	Carmon, 2002
	p97	GLQHWVPEL	28	Carmon, 2002
	p194	NLFETPVEA	21	Carmon, 2002
Bcl-2	p218	KTLLSLALV	23	Andersen, 2004
CEA	p694	GVLVGVALI	23	Schirle, 2000
Cyclin-D1	p101	LLGATCMFV	22	Sadovnikova, 1998
Her2/neu	p369	KIFGSLAFL	28	Fisk, 1995
MAGE-2	p112	KMVELVHFL	27	Visseren, 1997
MUC-1	p12	LLLLTVLTV	31	Brossart, 1999
PSA	p141	FLTPKKLQCV	26	Correale, 1998
p53	p149	STPPPGRV	19	Theobald, 1995; Yu, 1997

## B

Nicht Malignitäts-assoziierte Antigene & Kontrollen	Position der ersten AS in der Proteinsequenz	Peptid Sequenz	Theoretische Bindungs-Kapazität	Literatur
Coll-IV	p18	SLWGQPAEA	23	Barnea, 2002
HIV	gag	SLYNTVATL	31	Van der Burg, 1995
IMP	p58	GILGFVFTL	30	Gotch, 1988
Krt18	p365	ALLNIKVKL	28	Weinschenk, 2002

**Tabelle 2:** Neu definierte HLA-A201 Peptide; NCBI Kennung der Proteinsequenz; der Position (p) der ersten AS; der theoretischen Bindungskapazität; **A**) Tumor-assoziierte Antigene; **B**) nicht Malignitäts-assoziierte Antigene und Kontrollen; CEA (Carzino-Embryonales Antigen), Ep-CAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül), GAGE (G Antigen), HGF (Hepatozyten Wachstumsfaktor), hNIS (humaner Natrium / Jod Symporter), Hpa (Heparanase), Kasein ( $\alpha$  Kasein I), LAGE-1 (Tumor-Testes-Antigen-2), MAGE-2 (Melanom-assoziiertes-Antigen-2), PH20 (Spermium Protein 20), p21 (p21ras).

**A**

<b>TAA</b>	<b>NCBI Nummer der Protein-Sequenz</b>	<b>Position der ersten AS in der Proteinsequenz</b>	<b>Peptid Sequenz</b>	<b>Theoretische Bindungs-Kapazität</b>
CEA	XP_009171	p106	S L L F Q N I T L	25
Ep-CAM	NP_002345	p260	S M Q G L K A G V	26
GAGE	NP_001459	p125	L M N N C F L N L	22
HGF	XP_052260	p589	V L D D F V S T I	27
hNIS	Q92911	p445	V L A G L G A G L	29
Hpa	NP_006656	p8	A L P P P L M L L	29
		p16	L L L G P L G P L	31
		p183	D L I F G L N A L	28
Kasein	XP_050352	p7	G M S L L R T V L	20
LAGE-1	O75638	p167	D L R T P K H K V	23
MAGE-2	P43356	p108	A I S R K M V E L	25
PH20	S40465	p119	S L Q D H L D K A	23
		p323	Y T F G E T V A L	24
p21	CAA26593	p34	Y M R T G E G F L	22
p53	XP_008679	p24	K L L P E N N V L	26

**B**

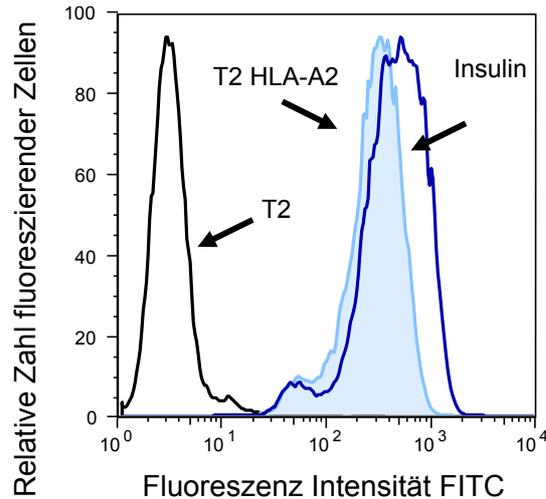
<b>Nicht Malignitäts-assoziierte Antigene &amp; Kontrollen</b>	<b>NCBI Nummer der Protein-Sequenz</b>	<b>Position der ersten AS in der Proteinsequenz</b>	<b>Peptid Sequenz</b>	<b>Theoretische Bindungs-Kapazität</b>
Coll- $\alpha$ I	AAB59373	p253	R G L P G T A G L	21
Insulin	AAH05255	p34	H L V E A L Y L V	27

Dabei wurden Peptide mit einer möglichst hohen theoretischen Bindungsaffinität an den HLA-A201 Komplex gewählt (Tab.2A). Die theoretische Bindungsaffinität kann für HLA-A201 ein Maximum von 36 erreichen. Sie wird kalkuliert, indem jeder Aminosäure (AS) aus der Peptidsequenz ein Wert zwischen +10 und -3 zugeteilt wird, in Abhängigkeit davon, welche AS auf welcher Position in der Peptidsequenz liegt [Rammensee, 1999]. Zusätzlich wurden von CEA, MAGE-2 und p53 je ein weiteres neues, noch nicht beschriebenes Peptid ausgewählt (Tab.2A). Das Peptid aus der ASS des Kollagen- $\alpha$ I, einem nicht Malignitäts-assoziierten Antigen, war zuvor noch nicht beschrieben und konnte ebenfalls über das oben genannte Verfahren ermittelt werden (Tab.2B). Insulin p34, ebenfalls ein neu definiertes Peptid, wurde zusätzlich zu HIVgag als Hintergrundkontrolle verwendet (Tab.2B).

## 6.2 Ermittlung der Peptidbindung an den MHC-Komplex

T2 Tumorzellen tragen HLA-A201 Komplexe auf ihrer Oberfläche, können diese aber nicht mit autologen Peptiden beladen, da ihnen TAP fehlt, der die durch Proteasomen prozessierten Proteinfragmente in das Innere des ER transportiert. Nicht-Peptid gebundene MHC Komplexe zerfallen schneller und lösen sich von der Zelloberfläche ab. Belädt man T2 Zellen extrazellulär mit Peptiden, so können diese an den HLA-A201 Komplex binden und ihn stabilisieren. Dadurch nimmt die Anzahl der Komplexe auf der Oberfläche zu. Je stabiler diese Bindung ist, desto größer die Anzahl an HLA-A201 Komplexen an der Oberfläche.

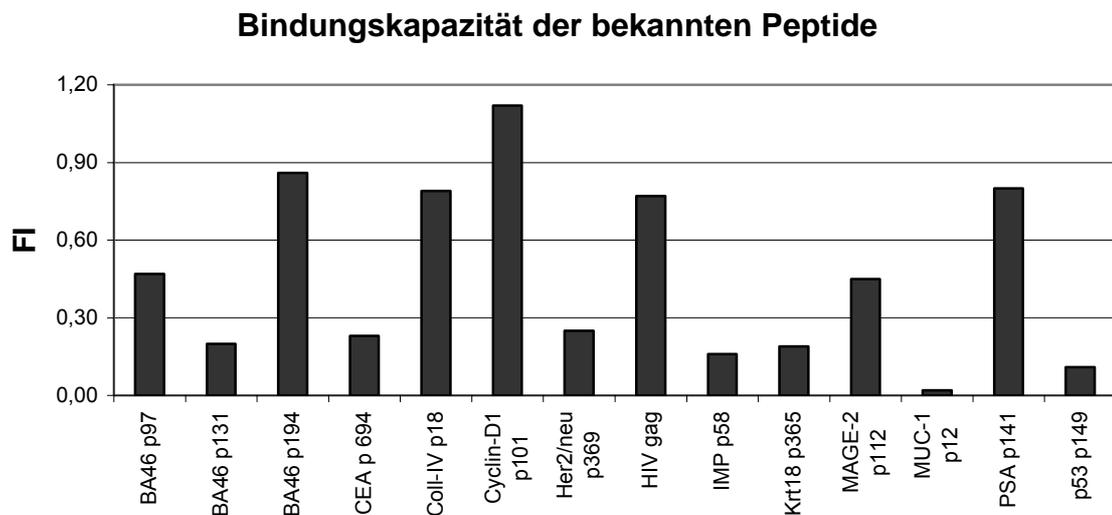
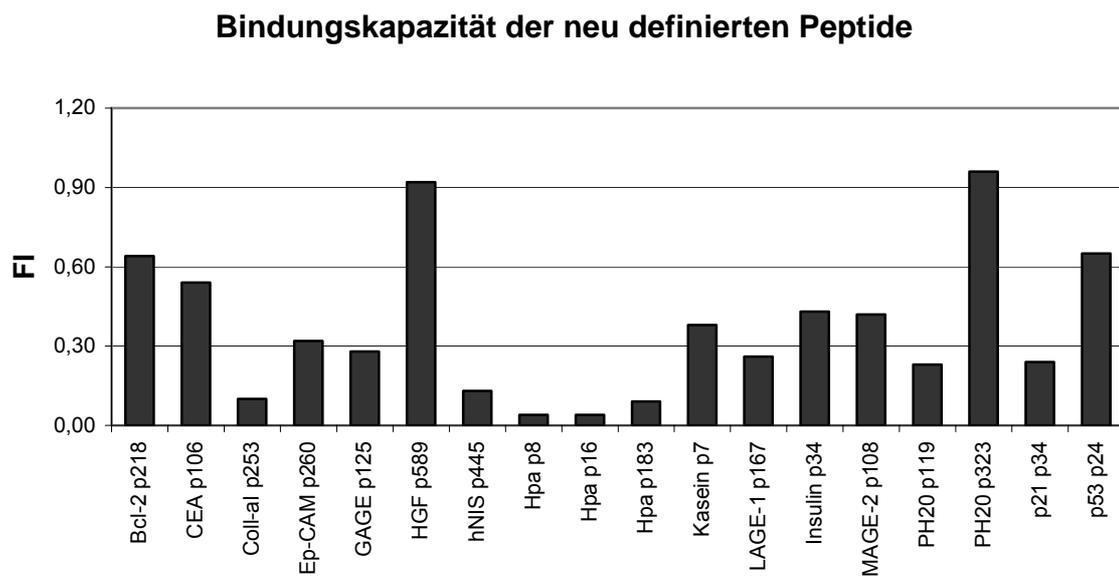
Mittels FACS Färbung konnten die HLA-A201 Komplexe auf der Oberfläche der T2 Zellen angefärbt werden. Je mehr Komplexe sich auf der Oberfläche befanden, desto stärker wurde die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) auf der X-Achse. In Abb.5 ist die Stabilisierung des HLA-A201 Komplexes durch die Bindung von Insulin p34 an MHC-I anhand eines Histogrammes dargestellt. Die MFI der angefärbten HLA-A201 Komplexe auf T2 Zellen erhöht sich durch die Peptidbindung von Insulin p34 um 171 Einheiten.



**Abbildung 5:** Analyse der Peptidbindung an MHC-I von Insulin p34; X-Achse: logarithmische Fluoreszenz Intensität von FITC; Y-Achse: relative Anzahl fluoreszierender Zellen; gemessen wurden 30.000 Zellen; schwarze Linie: T2 Zellen ungefärbt (MFI 3,55), hellblaue Linie, gefüllt: T2 Zellen ohne Peptid, HLA-A201 gefärbt (MFI 337), dunkelblaue Linie: T2 Zellen mit Insulin p34 Peptid, HLA-A201 gefärbt (MFI 508).

Alle in den Tab.1 und Tab.2 aufgelisteten Peptide führten zu einer Stabilisierung des HLA-A201 Komplexes auf T2 Zellen. In Abb.6 ist die relative Bindungskapazität (FI) aller Peptide dargestellt. Die FI ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen dem MFI-Mittelwert der gemessenen Proben gegenüber dem MFI-Mittelwert gemessen bei T2 Zellen ohne Peptid. Bei einer FI  $>0,60$  kann von einer starken Bindung des Peptides an den HLA-A201 Komplex gesprochen werden, FI Werte zwischen 0,30 und 0,60 gelten als mittlere Bindungskapazität und Peptide mit FI Werten  $<0,30$  zeigen eine schwache Bindung [Sun, 2000]. Das zuvor im Einzelnen dargestellte Insulin p34 zeigte nach dieser Definition eine mittlere Bindungskapazität.

Bei den in der Literatur bereits bekannten Peptiden gab es sehr unterschiedliche Bindungskapazitäten. So zeigten BA46 p194, Coll-IV p18, Cyclin-D1 p101, HIVgag und PSA p141 eine starke Bindung an HLA-A201, BA46 p97 und MAGE-2 p112 eine mittlere Bindungskapazität und BA46 p131, CEA p694, Her2/neu p369, Krt18 p365, MUC-1 p12 und p53 p149 eine schwache Bindung. Bei den neu definierten Peptiden zeigten Bcl-2 p218, HGF p589, PH20 p323 und p53 p24 eine starke Bindung, Kasein p7, CEA p106, Ep-CAM p260, Insulin p34 und MAGE-2 p108 eine mittlere Bindung und Coll- $\alpha$  p253, GAGE p125, hNIS p445, Hpa p8, Hpa p16, Hpa p183, LAGE-1 p167, PH20 p119 und p21 p34 eine schwache Bindung.

**A****B**

**Abbildung 6:** relative Fluoreszenz Intensität (FI) aller untersuchten Peptide; eine starke Bindung des Peptides ergibt sich wenn  $FI > 0,6$ ; eine mittlere Bindungskapazität bei  $FI 0,3 - 0,6$ ; eine schwache Bindung des Peptides an den HLA-A201 Komplex bei  $FI < 0,3$ ; **A)** FI der bekannten Peptide; **B)** FI der neu definierten Peptide.

MUC-1 p12 zeigte von allen hier gemessenen Peptiden die schwächste Bindungskapazität ( $FI = 0,02$ ). Die niedrigsten Werte bei den neu definierten Peptiden hatten Hpa p8 und Hpa p16 mit einer FI von 0,04. Den höchsten Wert bei den in der Literatur beschriebenen Peptiden zeigte Cyclin-D1 p101 mit  $FI = 1,12$ . Bei den neuen Peptiden lag der höchste Wert bei  $FI = 0,96$  für PH20 p323. Die FI Werte der neuen Peptide lagen somit in dem gleichen

Bereich wie die der bereits beschriebenen Peptide. Die neu ausgewählten Peptide zeigten alle eine theoretische Bindungskapazität  $>16$ . Diese theoretische Bindungskapazität korrelierte hier nicht mit den Ergebnissen der Bindungsanalyse. So zeigte MUC-1 p12 eine theoretische Bindungskapazität von 31, Cyclin-D1 p101 nur von 22. Die FI von MUC-1 p12 war dagegen niedriger, als die von Cyclin-D1 p101. Alle hier getesteten Peptide wiesen eine, wenn auch zum Teil sehr schwache Bindungskapazität an den HLA-A201 Komplex auf und konnten daher für immunologische Tests eingesetzt werden.

### 6.3 Peptid ELISpot mit aufgereinigten Zellpopulationen

Die ELISpot Analyse bietet die Möglichkeit, die spezifische Aktivierung von einzelnen T Zellen zu messen, da ausgeschüttetes IFN- $\gamma$  an eine Membran gebunden wird und dort angefärbt werden kann [Schmittl, 1997]. Um eine spezifische Aktivierung durch einzelne TAA zu messen, können Peptide aus der ASS von TAA in der ELISpot Analyse eingesetzt werden [Scheibenbogen, 1997]. Dabei wird in den meisten Fällen die PBMC Population mit Peptid beladen und die IFN- $\gamma$  Sekretion dieser gemischten Zellpopulation gemessen [Andersen, 2004; Griffioen, 2001]. In einer gemischten PBMC Population befindet sich je nach Spender eine unterschiedliche Anzahl von T Zellen und es kann nicht nachvollzogen werden welche Zellen das Peptid präsentiert haben. Eine gemischte PBMC Population beinhaltet T Zellen, die in einer ELISpot Analyse spezifisch zu einer IFN- $\gamma$  Produktion angeregt werden können, sowie NK Zellen die durch unspezifische Aktivierung IFN- $\gamma$  sezernieren können. Auch können in einer PBMC Population verschiedene Zelltypen, wie BC, NK Zellen oder DC, als APC fungieren. Durch eine Aufreinigung der T Zellen und der APC für eine ELISpot Analyse können reproduzierbarere Bedingungen geschaffen werden und die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Spendern kann erhöht werden. Auch ist es bei einem Einsatz einer aufgereinigten T Zell Population möglich die Anzahl der spezifisch aktivierten T Zellen zu bestimmen [Scheibenbogen, 2000].

Aufgereinigte DC und TC Populationen wurden in unserem Labor in der ELISpot Analyse zur Identifizierung von spezifischen T Zellen gegenüber Zell-Lysat oder Proteinen mit Erfolg eingesetzt [Feurerer, 2001a]. Um die Effektivität von Peptid ELISpot Analysen mit aufgereinigten Zellpopulationen, in Abhängigkeit von DC als Stimulatorzellen, zu untersuchen, wurden Peptide und Proteine vergleichend eingesetzt. Dabei wurde je eine Positivkontrolle eingesetzt, als Protein Tetanus Toxoid (TT) und als Peptid ein Fragment aus dem Influenza Matrix Protein (IMP), gegen das in der Regel ein T Zell Memory besteht. Als Hintergrundkontrollen wurden als Protein Endobulin (End) und als Peptid HIVgag eingesetzt,

gegenüber denen kein T Zell Memory zu erwarten ist. Im Fall von Endobulin handelt es sich um ein humanes Immunglobulin und im Fall von HIV um ein virales Antigen, gegen welches noch keine klonale Expansion von T Zellen stattgefunden hat, vorausgesetzt natürlich, dass der Spender nicht HIV infiziert war (Abb.7).

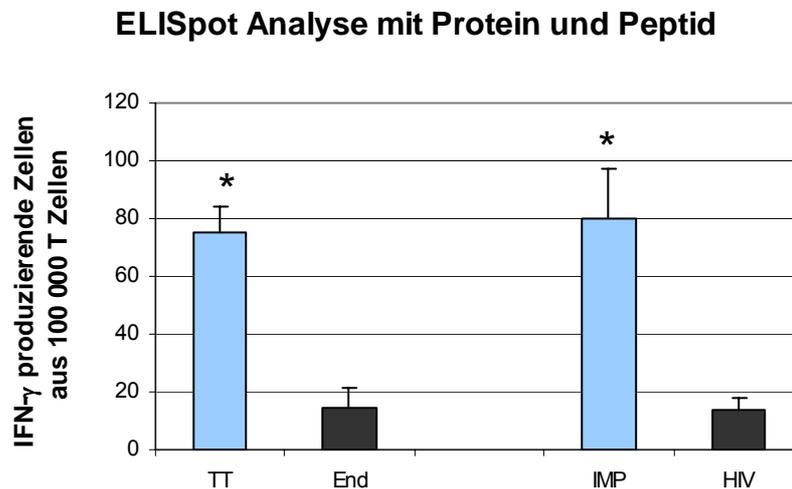


Abbildung 7: Peptide und Proteine im Vergleich in einer ELISpot Analyse mit aufgereinigten Zellpopulationen aus Buffy Coat 1; IMP ( $p = 0,02$ ) und TT ( $p < 0,01$ ) sind im Vergleich zu beiden negativ Kontrollen signifikant positiv (\*) ( $p < 0,05$ ).

In zwei von drei Tests mit aufgereinigten DC und TC aus Buffy Coats war die IFN- $\gamma$  Produktion gegen IMP im Bezug auf das HIVgag Peptid signifikant erhöht. Die Stärke der IFN- $\gamma$  Produktion nach IMP Stimulation war in jedem Fall vergleichbar mit der Reaktion gegen Tetanus Toxoid. In einer ELISpot Analyse mit aufgereinigten Zellen führten DC, die mit IMP Peptid beladen wurden zu einer vergleichbaren T Zell Aktivierung wie mit Protein beladene DC. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Peptid ELISpot Analyse mit aufgereinigten Zellpopulationen zur Identifizierung Peptid-spezifischer T Zellen verwendet werden kann.

#### 6.4 Vergleich von Antigenpräsentierenden Zellen

Reaktivitäten von T Zellen gegenüber einzelnen Peptiden können relativ schwach sein, da nur wenige T Zellen von einem Peptid aktiviert werden. Um Unterschiede in Reaktivitäten gegenüber verschiedenen Peptiden messen zu können ist es daher wichtig eine optimale Stimulation durch die Peptid-präsentierenden Zellen zu erreichen.

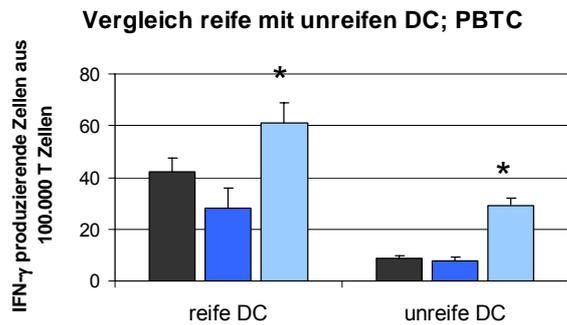
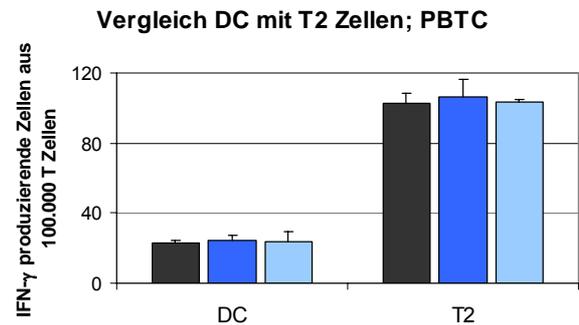
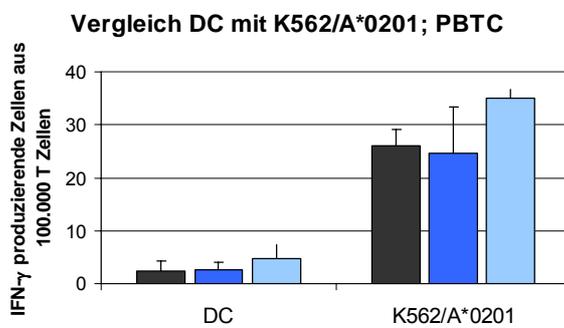
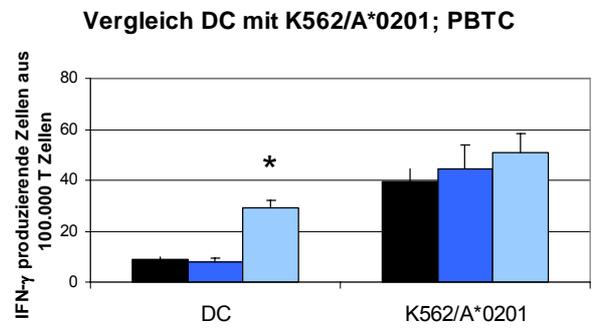
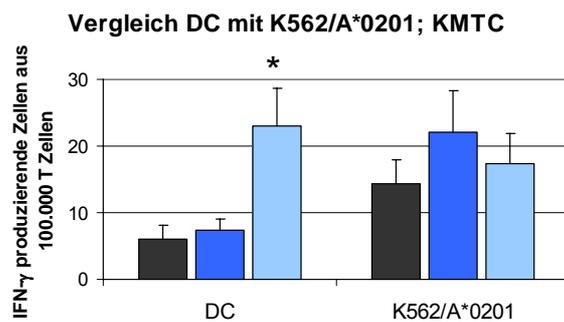
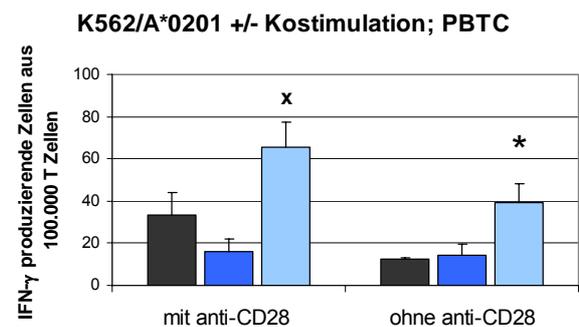
#### 6.4.1 Vergleich der Aktivierung von TC durch reife und unreife DC

Nach einer Kulturzeit von 7 bzw 14 Tagen, unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF, bilden sich aus Monozyten oder CD34+ Vorläuferzellen unreife DC. Belädt man diese DC mit Lysaten, so reifen sie durch den Prozess der Antigen-Phagozytose und Antigen-Präsentation aus und regulieren kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche hoch [Basu, 2000]. Belädt man die MHC-I Komplexe der DC extrazellulär mit Peptiden, so fehlt der Stimulus zur Reifung. Dies kann man mit Hilfe eines Zytokin-Cocktails, bestehend aus IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, GM-CSF, Prostaglandin und TNF- $\alpha$ , induzieren. Vergleicht man nun reife und unreife DC in ihrer Fähigkeit T Zellen zur antigenspezifischen IFN- $\gamma$  Produktion in der ELISpot Analyse anzuregen, so zeigte sich bei drei gesunden Spendern kein Unterschied in der Stärke der Aktivierung der T Zellen. In zwei Fällen zeigte sich eine etwas stärkere IFN- $\gamma$  Produktion der T Zellen mit reifen DC (Abb.8A). Die Spezifität der Antwort wurde jedoch nicht verstärkt nachdem die Reaktivität gegenüber HIV und Insulin Peptid gepulsten DC ebenso anstieg.

Während der Zeit in der die DC ausreifen, adherierten einige der Zellen an den Boden des Kulturgefäßes, wodurch sich die Anzahl der für die ELISpot Analyse zur Verfügung stehenden DC verringerte. Da das Ausreifen der DC nicht zu einer spezifischeren Reaktion geführt hat, war es für Peptid ELISpot Analysen über natürlich existierende Memory Reaktivitäten nicht notwendig die DC unter Verwendung eines Zytokin-Cocktails auszureifen.

#### 6.4.2 Vergleich der Aktivierung von TC durch DC und T2 Zellen

Die Anzahl der DC, die man aus den mononukleären Zellen von ca. 40ml PB oder KM der gesunden Spender und Patienten erhielt lag meist zwischen 100.000 und 500.000. Obwohl in ELISpot Analysen ein Verhältnis von 10 : 1 / TC : DC eingesetzt wurde, limitierte meist die Zahl der DC die Anzahl der Peptide, die pro Spender getestet werden konnten. Mit einer Tumorzelllinie anstelle von DC könnte die Anzahl der zu testenden Peptide vergrößert werden. Eine Tumorzelllinie, die in der Literatur [Griffioen, 2001; Sun, 2000] bereits als APC im ELISpot Analysen eingesetzt wurde, ist die HLA-A201+ TAP defiziente Tumorzelllinie T2.

**A****B****C****D****E****F**

**Abbildung 8:** Vergleich von APC in der ELISpot Analyse; schwarzer Balken: HIVgag; blauer Balken: Insulin p34; hellblauer Balken: IMP; \*) signifikant positiv ( $p < 0,05$ ) in Bezug auf Insulin und HIV; x) signifikant positiv ( $p < 0,05$ ) gegenüber Insulin; **A)** PBTC aus Buffy Coat 13, Vergleich von reifen und unreifen DC; **B)** PBTC aus Buffy Coat 8, Vergleich von DC und T2 Zellen; **C)** PBTC von Buffy Coat 14, Vergleich von DC und K562/A\*0201; **D)** PBTC von Buffy Coat 13, Vergleich von DC und K562/A\*0201; **E)** KMTc aus P17, Vergleich von DC und K562/A\*0201; **F)** Stimulation von PBTC aus Buffy Coat 11 mit K562/A\*0201 mit und ohne kostimulatorisches Signal.

Wie in Abb.8B dargestellt, führte eine Peptid Präsentation von T2 Zellen in 3 von 3 Buffy Coats zu einer deutlich höheren Zahl an Spots in der ELISpot Analyse in allen Gruppen. In 2 von 3 ELISpot Analysen mit PBTC aus Buffy Coats und in 2 von 3 Analysen mit Patienten KMTc führte die Stimulation mit T2 Zellen zu einer Spotzahl >300. Bei einer hohen Dichte an Spots kann die KS ELISpot Software die Spots nicht zuverlässig zählen. Aufgrund des häufigen Auftretens sehr hoher Spotzahlen, die nicht mehr ausgewertet werden konnten, eigneten sich T2 Zellen nicht als Stimulatorzellen in Peptid ELISpot Analysen.

#### **6.4.3 Vergleich der Aktivierung von TC durch K562/A\*0201 Zellen und DC**

Die HLA-A201 transfizierte Zelllinie K562/A\*0201 kann als APC in ELISpot Analysen verwendet werden [Britten, 2002]. In den ELISpot Analysen mit PBTC aus Buffy Coats, lagen die Spotzahlen in den Gruppen mit K562/A\*0201 als APC zwischen 30 und 150 Spots höher als in den Gruppen mit DC, jedoch nie in einem Bereich, in dem sie nicht mehr zuverlässig gezählt werden konnten (Abb.8C). Bei 4 von 5 Buffy Coats zeigte sich in den Gruppen beider Stimulatorzellen keine signifikant positive IFN- $\gamma$  Produktion nach einer Stimulation mit IMP. PBTC aus dem einzigen Buffy Coat der zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber IMP führte, zeigte dies nur, wenn das Peptid über DC präsentiert wurde (Abb.8D). Der Vergleich von DC und K562/A\*0201 für eine Aktivierung von KMTc von Patienten zeigte in zwei Fällen eine signifikant positive IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit IMP, jedoch konnte eine positive Reaktion nur in einem Fall auch bei einer Präsentation des Peptides durch K562/A\*0201 gezeigt werden (Abb.8E). Aufgrund der selteneren positiven Reaktionen und aufgrund des höheren Hintergrunds verglichen mit DC, schienen K562/A\*0201 Zellen in ELISpot Analysen keinen Vorteil gegenüber autologen DC zu bringen.

#### **6.4.4 Zusätzliche Stimulation durch anti-CD28 von K562/A\*0201**

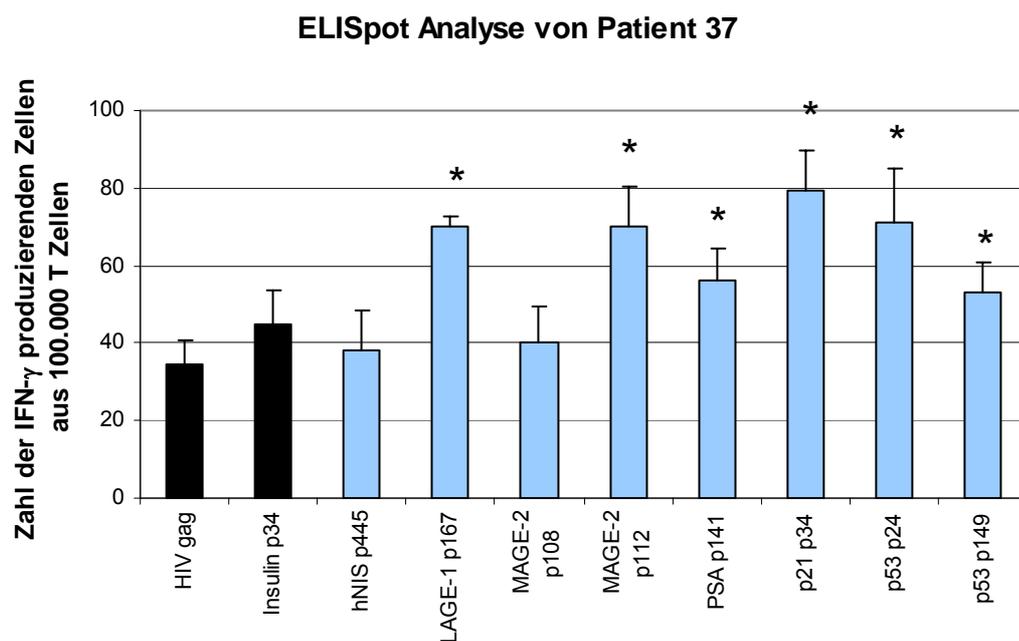
K562/A\*0201 Zellen fehlen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche [Britten, 2002]. Um DC in ELISpot Analysen eventuell doch durch K562/A\*0201 Zellen ersetzen zu können wurde zusätzlich zu dem IFN- $\gamma$  Antikörper ein kostimulatorisches Signal, ein anti-human CD28 Antikörper, auf die Membran der ELISpot Platte gebunden. Durch diese Kostimulation wurde in 2 der 4 Tests die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden T Zellen erhöht. Dieses konnte sowohl in der Gruppe der mit IMP beladenen K562/A\*0201 Zellen als auch in den mit Kontrollpeptid beladenen Gruppen beobachtet werden (Abb.8F). In den anderen zwei Tests ergab die Kostimulation keine Veränderung der Spotzahl.

Zusätzliche Kostimulation führte demnach nicht zu einer reproduzierbaren Verbesserung der in der ELISpot Analyse gemessenen Antwort.

Der Vergleich der unterschiedlichen APC als Stimulatorzellen in Peptid ELISpot Analysen für die Untersuchung von Memory T Zell Reaktivitäten zeigte, das sich autologe DC am besten als Stimulatorzellen eignen und es war nicht notwendig die DC mit Hilfe eines Zytokin-Cocktails auszureifen.

### 6.5 Beispiel einer ELISpot Analyse der KMTC eines Patienten

Natürlich vorhandene Reaktivitäten von Memory KMTC gegenüber TAA konnten mittels ELISpot Analyse von Brustkrebspatienten (P) und gesunden Spendern (GS) untersucht werden. Dazu wurden aufgereinigte autologe DC und aufgereinigte KMTC in definierter Zahl eingesetzt (Abb.9).



**Abbildung 9:** ELISpot Analyse mit KMTC und DC von P37 mit Peptiden aus TAA; schwarz: Hintergrundkontrolle; hellblau: TAA; \*)  $p < 0,05$  in Bezug auf die zusammengenommene Kontrolle Insulin p34 und HIVgag ( $n = 6$ ).

In den Untersuchungen wurden immer beide Hintergrundkontrollen, Insulin p34 und HIVgag, gemessen. Um die Unterschiedlichkeit beider Kontrollen mit einzubeziehen wurden die Triplikat Werte beider Kontrollen zusammengenommen ( $n = 6$ ) und so die Spezifität der

Reaktion gegenüber den Peptiden aus TAA ermittelt. Bei je einem Patienten war die Spot Zahl gegenüber Insulin p34 oder HIVgag mehr als doppelt so hoch als in der anderen Kontrolle und wurde daher nicht berücksichtigt. In Abb.9 ist ein Ausschnitt aus der ELISpot Analyse von Patient P37 gezeigt. Als signifikant erhöht gewertet wurde eine IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber einem TAA bei einem p-Wert  $<0,05$ . Die p-Werte der hier dargestellten Peptide und die sich daraus ergebende positive oder negative Bewertung sind in Tab.3 dargestellt.

Tabelle 3: T-Test Berechnung zu Abb.9; Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate Bestimmungen je Peptid; die Standardabweichungen (STABWN); der p-Wert, der mittels Zweistichproben T-Test mit unterschiedlicher Varianz berechnet wurde. Reaktion gegen ein Peptid aus einem TAA wurde als positiv gewertet wenn  $p < 0,05$  (blaue Zahlen).

Peptid	Mittelwert (n = 3)	Standard Abweichung	p-Wert gegen Insulin & HIV (n = 6)
HIVgag	34,33	7,77	
Insulin p34	44,67	11,06	
hNIS p445	38,00	13,08	0,44
LAGE-1 p167	70,33	3,06	<b>&lt; 0,01</b>
MAGE-2 p108	40,33	11,02	0,46
MAGE-2 p112	70,33	12,50	<b>0,01</b>
PSA p141	56,00	10,44	<b>0,04</b>
p21 p34	79,33	12,66	<b>0,01</b>
p53 p24	71,33	16,56	<b>0,03</b>
p53 p149	53,33	9,02	<b>0,05</b>

## 6.6 Immunogenität aller getesteten TAA

Es wurden die Reaktivitäten der KMTC von 41 Patientinnen und 13 gesunden Spendern in ELISpot Analysen gegen verschiedene TAA und gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen getestet. In Tab.4 ist die Anzahl der getesteten TAA pro Spender dargestellt. Dabei wurden mehrere Peptide eines TAA zusammengenommen, und das TAA als positiv gewertet, wenn gegenüber mindestens einem Peptid eine positive Reaktivität gemessen werden konnte. In dieser Tabelle wurden Reaktivitäten gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen nicht berücksichtigt. Es zeigte sich, dass es sehr starke individuelle Unterschiede zwischen den Patienten, als auch zwischen den gesunden Spendern gab. Die

KMTC reagierten je nach Spender gegen unterschiedliche TAA aber auch gegen unterschiedlich viele TAA.

Tabelle 4: Tabelle aller getesteten TAA aller Patienten und gesunden Spender; ein TAA galt als gemessen wenn mindestens eines der Peptide aus der ASS eines TAA eingesetzt wurde; als positiv, wenn mindestens eines der Peptide zu einer signifikant erhöhten ( $p < 0,05$ ) IFN- $\gamma$  Produktion führte.

Patient	Zahl getesteter TAA	positive TAA	% positive TAA	gesunder Spender	Zahl getesteter TAA	positive TAA	% positive TAA
1	2	0	0	1	4	0	0
2	2	0	0	2	5	1	20
3	4	2	50	3	3	1	33
4	4	0	0	4	1	1	100
5	4	1	25	5	8	2	25
6	3	1	33	6	15	2	13
7	3	0	0	7	9	2	22
8	4	0	0	8	14	6	43
9	9	0	0	9	11	8	72
10	5	1	20	10	11	0	0
11	5	0	0	11	6	0	0
12	8	4	50	12	5	0	0
13	8	2	25	13	13	1	8
14	5	2	40				
15	7	1	14				
16	12	0	0				
17	14	6	43				
18	14	0	0				
19	1	0	0				
20	15	1	7				
21	10	1	10				
22	5	1	20				
23	3	2	67				
24	2	2	100				
25	5	1	20				
26	5	2	40				
27	8	5	63				
28	5	1	20				
29	2	2	100				
30	3	3	100				
31	7	0	0				
32	1	0	0				
33	12	9	75				
34	7	1	14				
35	9	5	56				
36	14	13	93				
37	14	10	71				
38	5	0	0				
39	4	2	50				
40	15	5	33				
41	4	1	25				
<b>Summe</b>	<b>269</b>	<b>87</b>			<b>105</b>	<b>24</b>	
<b>%</b>		<b>32</b>	<b>30,8</b>			<b>23</b>	<b>25,9</b>

Im Ganzen reagierten 28 von 41 (68%) der Patienten gegen mindestens eines der getesteten TAA. Die restlichen 13 Patienten zeigten gegenüber keinem der getesteten TAA eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion bezogen auf die Hintergrundkontrollen. Bei den gesunden Spendern waren es 9 aus 13 (69%) die gegenüber mindestens einem der getesteten TAA mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Ausschüttung reagierten. Damit unterschieden sich Patienten und gesunde Spender nicht in der Häufigkeit in der eine positive Reaktion gegen mindestens ein TAA ausgelöst wurde. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund der limitierten Zellzahl nicht jedes TAA bei jedem Spender getestet werden konnte.

Ein Vergleich der Anzahl, der gesamt gemessenen Triplikate aller Spender, zeigte, dass 32% der TAA Triplikate, gemessen mit KMTC von Patienten und 23% der TAA Triplikate, gemessen mit KMTC von gesunden Spendern, zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion führten. Im Mittel zeigte sich bei Patienten eine Reaktivität gegenüber 31% der je Patient gemessenen TAA und eine Reaktivität von 26% der je gesundem Spender getesteten TAA. Gegenüber allen hier untersuchten TAA zusammengenommen war demnach kein Unterschied in der Häufigkeit einer Reaktivität der KMTC von Patienten und gesunden Spendern festzustellen.

### **6.6.1 Prozentuale Reaktivitäten aller Peptide aus TAA**

Im Folgenden wurde die Reaktivität der KMTC von gesunden Spendern und Patienten gegenüber allen hier getesteten Peptiden verglichen. Dazu wurden die Prozentwerte der positiv reagierenden Proben von Patienten und gesunden Spendern verglichen (Abb.10). Bei acht Peptiden (BA46 p131, CEA p106, GAGE, Her2/neu, Hpa p183, MUC-1, PH20 p119 und p53 p24) reagierte keiner der getesteten gesunden Spender. Gegenüber zwölf Peptiden reagierten die Patienten häufiger als die gesunden Spender (BA46 p97, BA46 p194, Bcl-2, Kasein, Cyclin-D1, hNIS, Hpa p16, MAGE-2 p112, PH20 p323, PSA, p21 und p53 p149). In einem Fall (LAGE-1) reagierten beide Gruppen zu 25%. Bei fünf Peptiden reagierten die gesunden Spender häufiger als die Patienten (CEA p694, Ep-CAM, HGF, Hpa p8, MAGE-2 p108). Zusammengefasst zeigte sich gegenüber fünf Peptiden bei gesunden Spendern häufiger eine Reaktivität als bei Patienten. Bei Patienten trat gegenüber 20 Peptiden häufiger eine Reaktivität als bei gesunden Spendern auf.

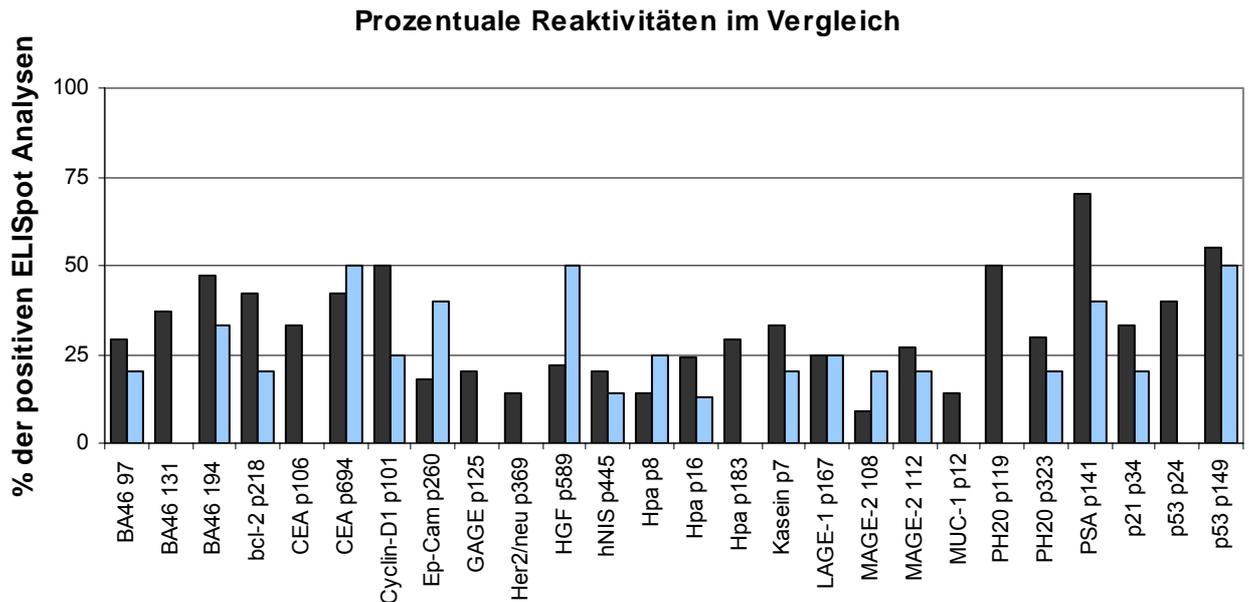
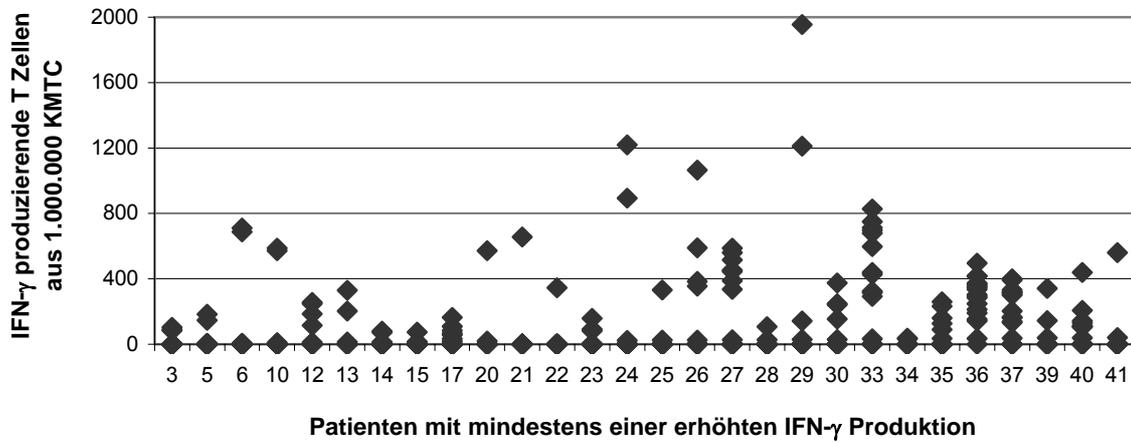
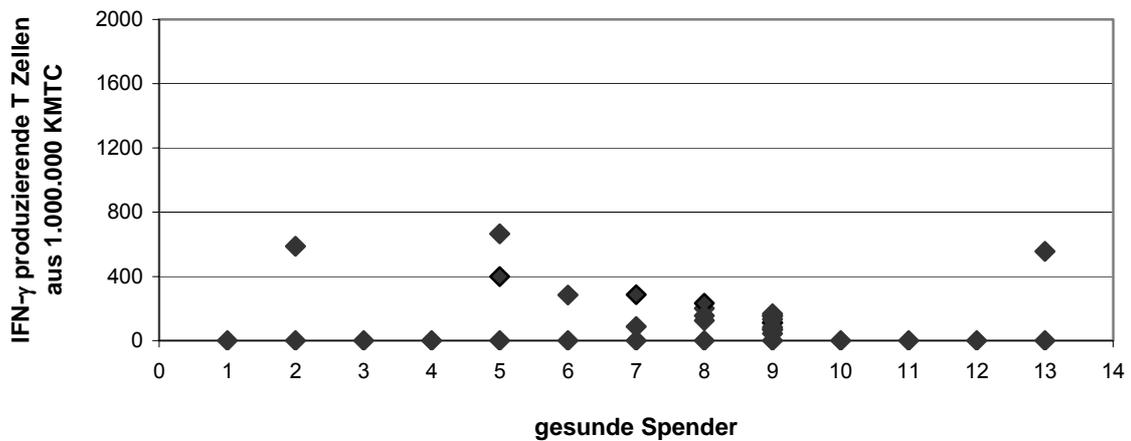


Abbildung 10: Häufigkeit der positiv reagierenden Spender aus den ELISpot Analysen; schwarz: Reaktivitäten bei Patienten, hellblau: Reaktivitäten bei gesunden Spendern.

PSA welches mit 70% die höchste Reaktivität bei Patienten auslöste, indem es eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion auslöste, führte auch in 40% der getesteten gesunden Spender zu einer erhöhten Reaktivität. MUC-1 und Her2/neu, die bereits in therapeutischen Ansätzen verwendet wurden [Disis, 2002; Brossart, 2000], zeigten nur in 14% eine positive Reaktivität, allerdings keine Reaktivität bei gesunden Spendern.

### 6.6.2 Anzahl der spezifischen Zellen im Vergleich

Die Anzahl der Peptid-spezifischen KMTC wurde durch die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen nach Aktivierung mit einem Peptid ermittelt. In Abb.11A sind die Patienten dargestellt, die gegenüber mindestens einem der getesteten Peptide aus der ASS der TAA eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion zeigten. In Abb.11B sind die Frequenzen der TAA spezifischen KMTC aller gesunden Spender dargestellt. Die Detektionsschwelle der Peptid-spezifischen Zellen lag bei 10 spezifischen Zellen aus 1.000.000. Frequenzen <10 lagen somit unterhalb der Detektionsschwelle und sind auf der Y-Achse mit 0 dargestellt.

**A****Anzahl TAA peptidspezifischer T Zellen bei Patienten****B****Anzahl TAA peptidspezifischer T Zellen bei gesunden Spendern**

**Abbildung 11:** Frequenzen der TAA spezifischen KMTC von Patienten und gesunden Spendern; Frequenzen unterhalb der Detektionsschwelle sind auf der Y-Achse mit 0 eingezeichnet; **A)** Patienten mit mindestens einer signifikant positiven Reaktion in der ELISpot Analyse (n = 28/41); **B)** Frequenzen der KMTC aus gesunden Spendern (n = 13/13).

Bei den meisten Patienten lagen die Frequenzen zwischen 10 und 400 spezifischen Zellen aus 1.000.000 KMTC. Es zeigte sich, dass sich die Frequenzen bei den Patienten untereinander nicht unterschieden. Bei jedem der hier dargestellten Patienten gab es neben positiven Reaktivitäten auch TAA die im Vergleich zu den Hintergrundkontrollen zu keiner signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion führten. Bei nur vier Patienten konnten Frequenzen mit

mehr als 800 spezifischen Zellen aus 1.000.000 KMTC gemessen werden. Wie die Patienten auch zeigten die meisten gesunden Spender Frequenzen zwischen 10 und 400 TAA spezifische T Zellen. Jedoch wies keiner der gesunden Spender, im Unterschied zu den Patienten, eine Anzahl spezifischer Zellen >800 auf.

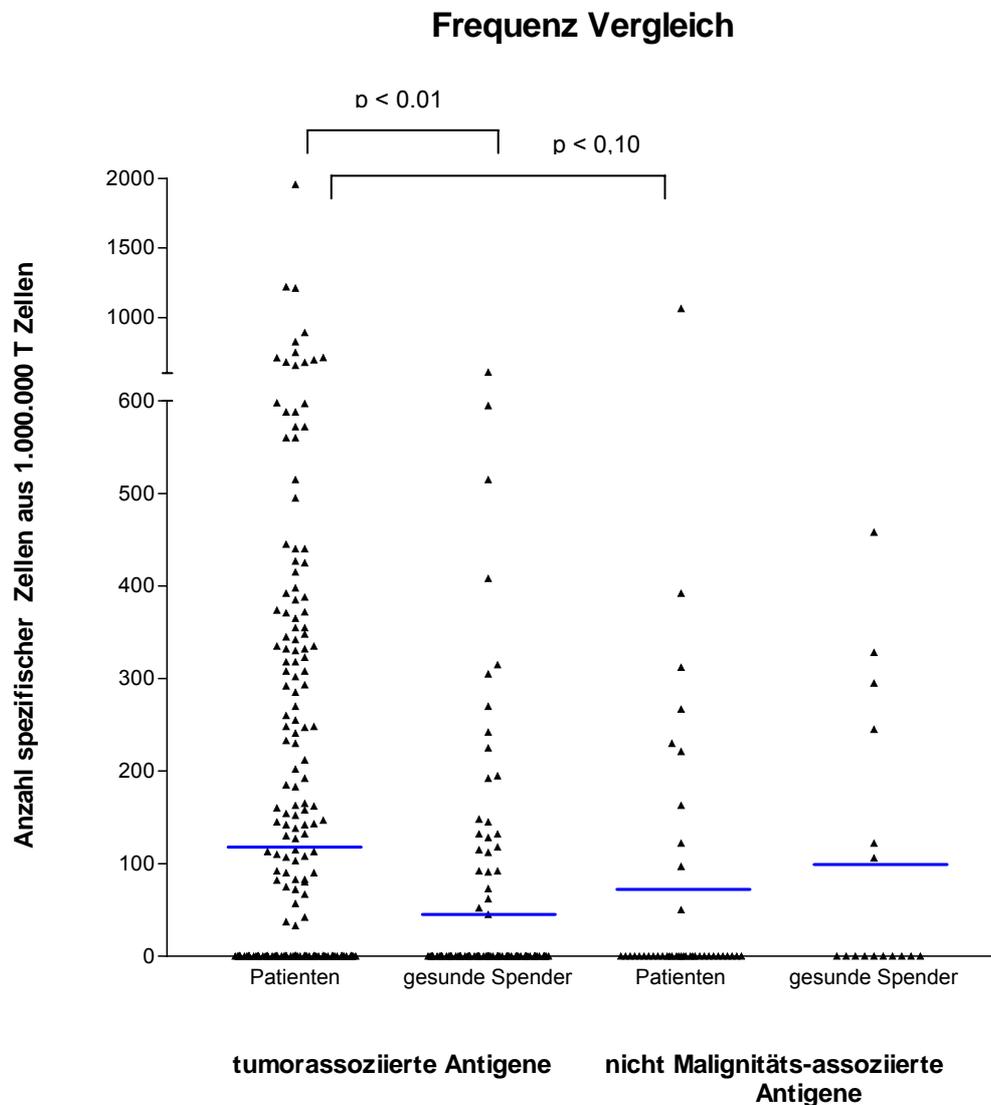


Abbildung 12: Zusammenfassung aller gemessenen Frequenzen; blaue Linie: MW je Gruppe; TAA: MW für Patienten bei 116 (n = 308), für gesunde Spender bei 43 (n = 127); nicht Malignitäts-assoziierte Antigene: MW für Patienten bei 71 (n = 41), für gesunde Spender bei 97 (n = 16); Klammern: signifikanter Unterschied zwischen den markierten Gruppen.

In Abb.12 sind nun alle gemessenen Frequenzen dargestellt. Die errechneten Mittelwerte aller Frequenzen ergaben bei Patienten einen Mittelwert von 116 aus 1.000.000, bei gesunden Spendern war der Mittelwert 43. Für die nicht Malignitäts-assoziierten Antigene zeigte sich eine mittlere Frequenz bei Patienten von 71 und bei gesunden Spendern von 97

spezifischen Zellen aus 1.000.000. Damit wiesen T Zellen von Patienten eine signifikant größere Immun-Reaktivität gegenüber TAA auf als T Zellen von gesunden Spendern ( $p = 4,74 \times 10^{-6}$ ). Für nicht Malignitäts-assoziierte Antigene zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Reaktivität der T Zellen von Patienten und gesunden Spendern ( $p = 0,29$ ). Es zeigte sich jedoch ein „niedrig signifikanter“ Unterschied ( $p = 0,08$ ) in der Reaktivität von KMTC von Patienten gegenüber TAA und nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen. Es war somit ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern, und zwischen TAA und nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen zu erkennen. Diese Unterschiede wiesen auf eine Induktion der Reaktivität durch den Tumor hin.

### **6.7 Auswahl von TAA zur Charakterisierung des Patienten-eigenen Memory T Zell Repertoires**

Offensichtlich gibt es deutliche Unterschiede in der Reaktivität der KMTC von Patienten und gesunden Spendern gegenüber verschiedenen TAA. So zeigte sich gegenüber manchen TAA eine deutlich stärkere Reaktivität bei Patienten verglichen mit gesunden Spendern. Gegenüber manchen TAA lag eine vergleichbare oder eine stärkere Reaktivität bei gesunden Spendern vor. Die Reaktivität der Memory T Zellen gegenüber TAA sollte jedoch nur dann tumorinduziert sein, wenn sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität bei Patienten und gesunden Spendern zeigt. Im Hinblick darauf wurden aus allen, hier untersuchten Peptiden, zwölf Peptide aus zehn TAA (BA46 p97; BA46 p131; CEA p106; Her2/neu p369; hNIS p445; Hpa p16; Hpa p183; MAGE-2 p112; MUC-1 p12; PH20 P119; PSA p141 und p53 p24) ausgewählt (s. 6.8; 6.10). Die Hälfte dieser ausgewählten Peptide konnte in dieser Arbeit neu definiert werden.

KMTC von 41 Patienten und 13 gesunden Spendern wurden auf ihre Reaktivität gegenüber dieser Auswahl von TAA getestet (Tab.5). Es reagierten etwas weniger Patienten (59%) gegenüber mindestens einem der ausgewählten TAA verglichen mit der Reaktivität gegenüber allen hier getesteten TAA (69%). Jedoch zeigten deutlich weniger gesunde Spender eine Reaktivität gegenüber mindestens einem der ausgewählten TAA (23%) verglichen mit der Reaktivität gegenüber mindestens einem aller getesteten TAA (69%).

Ein Vergleich der Anzahl aller gemessenen Triplikate mit ausgewählten TAA zeigte, dass 31% bei Patienten und 10% bei gesunden Spendern, zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion führten. Im Mittel zeigte sich bei Patienten eine Reaktivität gegenüber 28% der je Patienten gemessenen TAA und eine Reaktivität von 9% der je gesundem Spender getesteten TAA. Gegenüber dieser TAA Auswahl war somit ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität der

KMTC von Patienten und gesunden Spendern festzustellen ohne eine deutlich geringere gesamt Reaktivität bei Patienten.

Tabelle 5: Tabelle der ausgewählten Peptide aus TAA aller Patienten und gesunden Spender; ein TAA galt als gemessen wenn mindestens eines der Peptide aus der ASS des TAA eingesetzt wurde; als positiv, wenn mindestens eines der Peptide zu einer signifikant erhöhten ( $p < 0,05$ ) IFN- $\gamma$  Produktion führte.

Patient	Zahl ge- testeter TAA	positive TAA	% positive TAA	gesunder Spender	Zahl ge- testeter TAA	positive TAA	% positive TAA
1	2	0	0	1	4	0	0
2	2	0	0	2	4	0	0
3	3	2	67	3	3	1	33
4	3	0	0	4	1	0	0
5	3	1	33	5	6	0	0
6	3	1	33	6	8	0	0
7	3	0	0	7	6	0	0
8	4	0	0	8	8	3	38
9	5	0	0	9	5	2	40
10	5	1	20	10	3	0	0
11	5	0	0	11	2	0	0
12	5	4	80	12	2	0	0
13	5	1	20	13	8	0	0
14	5	2	40				
15	5	1	20				
16	6	0	0				
17	6	2	33				
18	7	0	0				
19	1	0	0				
20	7	1	14				
21	6	1	16				
22	5	1	20				
23	3	2	67				
24	1	0	0				
25	2	0	0				
26	2	1	50				
27	5	4	80				
28	2	0	0				
29	2	1	50				
30	1	1	100				
31	4	0	0				
32	1	0	0				
33	6	5	83				
34	3	0	0				
35	3	1	33				
36	7	6	86				
37	7	5	71				
38	1	0	0				
39	3	2	67				
40	7	3	43				
41	3	1	33				
<b>Summe</b>	<b>159</b>	<b>50</b>			<b>60</b>	<b>6</b>	
<b>%</b>		<b>31</b>	<b>28,3</b>			<b>10</b>	<b>8,5%</b>

## 6.8 Untersuchungen der Reaktivität gegenüber ausgewählten TAA

Anhand von Peptid ELISpot Analysen wurde die Reaktivität bei Patienten und gesunden Spendern gegenüber TAA untersucht. Nach der zusammenfassenden Darstellung aller Reaktivitäten folgt jetzt die Darstellung der Reaktivitäten gegenüber den als Tumor-relevant ausgewählten TAA im Einzelnen.

### 6.8.1 Untersuchungen zu Lactadherin

BA46, ein Protein aus den Milch-Fett Globuli wurde anhand von Peptiden aus der ASS in ELISpot Analysen auf seine aktivierende Wirkung auf KMTC hin untersucht. Für die immunologischen Tests wurden Peptide verwendet die an den Positionen p97, p131 und p194 in der Proteinsequenz beginnen [Carmon, 2002].

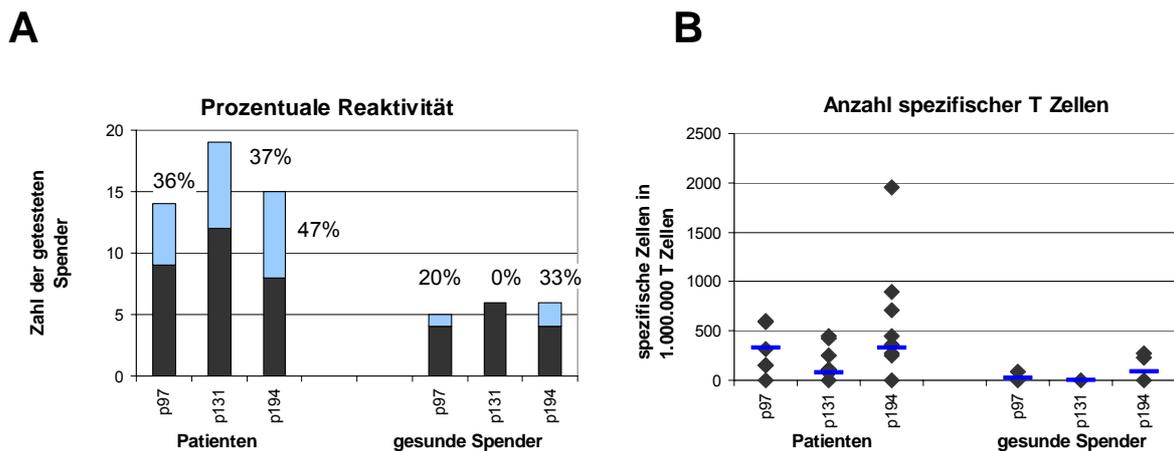


Abbildung 13: ELISpot Analysen mit Peptiden aus dem TAA BA46, p97, p131 und p194; p97 an 14 Patienten und 5 gesunden Spendern; p131 an 19 Patienten und 6 gesunden Spendern und p194 an 15 Patienten und 6 gesunden Spendern. **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

26 Patienten wurden auf ihre Reaktivität gegenüber mindestens einem der BA46 Peptide untersucht. Davon reagierten elf (42%) mit einer signifikant positiven IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber mindestens einem der Peptide. Betrachtete man die Peptide im Einzelnen (Abb.13A), so zeigte sich eine unterschiedliche Reaktivität, die durch verschiedene Patientenzustände kam. Für BA46 p97 zeigte sich bei 5 von 14 (36%) eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion mit Patienten KMTC, für BA46 p131 bei 7 von 19 (37%) und für BA46 p194 bei 7 von 15

(47%). KMTC von sechs gesunden Spendern wurden auch auf ihre Reaktivität gegenüber BA46 Peptiden getestet. Zwei (33%) zeigten eine signifikant positive IFN- $\gamma$  Produktion. Im Einzelnen betrachtet führte p97 bei 1 von 5 (20%), und p194 bei 2 von 6 (33%) gesunden Spendern zu einer positiven Reaktion (Abb.13A). Es zeigte sich also, dass die Reaktivitäten der Patienten sowohl auf alle drei Peptide gemeinsam, als auch auf die Peptide im Einzelnen bezogen, über denen der gesunden Spender lagen.

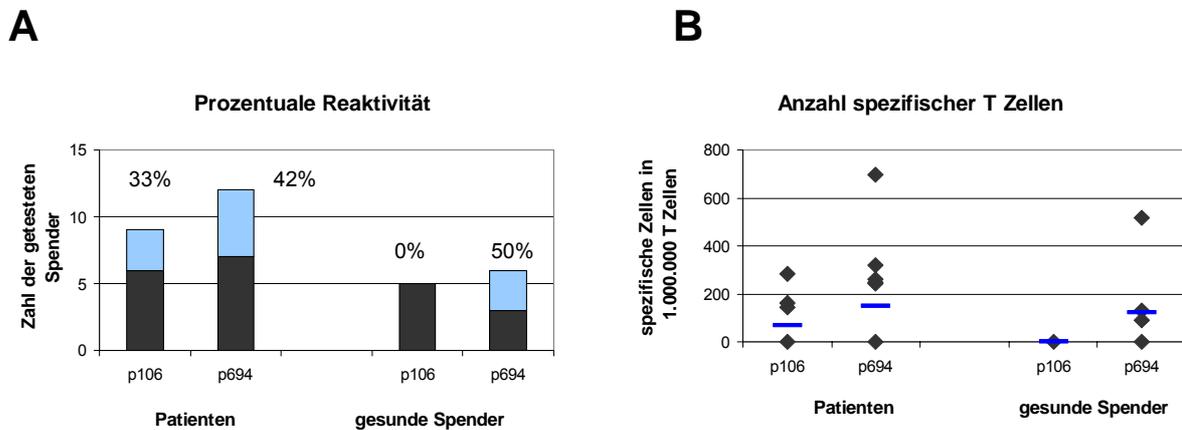
Die Frequenzen die sich aus den ELISpot Analysen ergaben führten, bei einem Patienten (P29) zu 1.955 aus 1.000.000 spezifischen T Zellen für p194. Mittelt man die Frequenzen je Peptid, so zeigte sich, dass bei den Patienten höhere Werte zu finden waren (Abb.13B). Die Anzahl der spezifischen KMTC der Patienten war bei p97 ( $p = 0,04$ ) und p131 ( $p = 0,01$ ) signifikant größer als bei den gesunden Spendern. Für p194 wies sich, mit einem p-Wert von  $p = 0,06$  eine „niedrig signifikant“ größere Anzahl an spezifischen KMTC bei den Patienten auf. Es lag demnach nicht nur eine häufigere Reaktivität von KMTC bei Patienten als bei gesunden Spendern vor, die Reaktivität bei Patienten wurde auch im Mittel durch eine größere Zahl an spezifischen Zellen ausgelöst.

BA46 führte zu einer starken Tumor-spezifischen Reaktivität bei Patienten. Diese zeigte sich sowohl darin, dass die Anzahl der Patienten, die spezifische KMTC aufwiesen, größer war als bei gesunden Spendern, als auch in der signifikant höheren Frequenz im Vergleich zu gesunden Spendern. Gegen die Peptide p97 und p131 lag bei Patienten eine signifikant stärkere natürliche Memory Reaktivität verglichen mit gesunden Spendern vor. Damit könnte BA46 ein Tumor-relevantes TAA sein.

### 6.8.2 Untersuchungen zum Carcino-Embryonalen Antigen

Aus der ASS des Carcino-Embryonalen Antigens wurden zwei Peptide untersucht, ein in der Literatur beschriebenes, p694 [Schirle, 2000] und ein neu definiertes, p106. Bei den ELISpot Analysen mit KMTC von Patienten zeigte sich, dass das neue Peptid p106 in 3 von 9 Fällen (33%) zu einem positiven Ergebnis führte und das bereits bekannte Peptid in 5 von 12 (42%) Fällen (Abb.14A). P106 führte in keinem von fünf gesunden Spendern zu einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion, p694 dagegen in 3 von 6 gesunden Spendern (Abb.14A). Damit wies p106 einen deutlichen Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern auf, p694 jedoch nicht. Es wurden 18 Patienten auf mindestens eines der Peptide getestet und 6 (33%) zeigten gegenüber mindestens einem der Peptide eine positive Reaktivität. Patienten, die auf ihre Reaktivität gegenüber beiden CEA Peptiden getestet wurden, wiesen gegenüber beiden Peptiden stets die gleiche Reaktivität auf, zweimal positiv und einmal negativ. Die

Frequenzen der reaktiven T Zellen lagen für p106 im Mittel bei den Patienten signifikant höher, als bei den gesunden Spendern ( $p = 0,05$ ). Für p694 traf dies nicht zu ( $p = 0,41$ ) (Abb.14B).

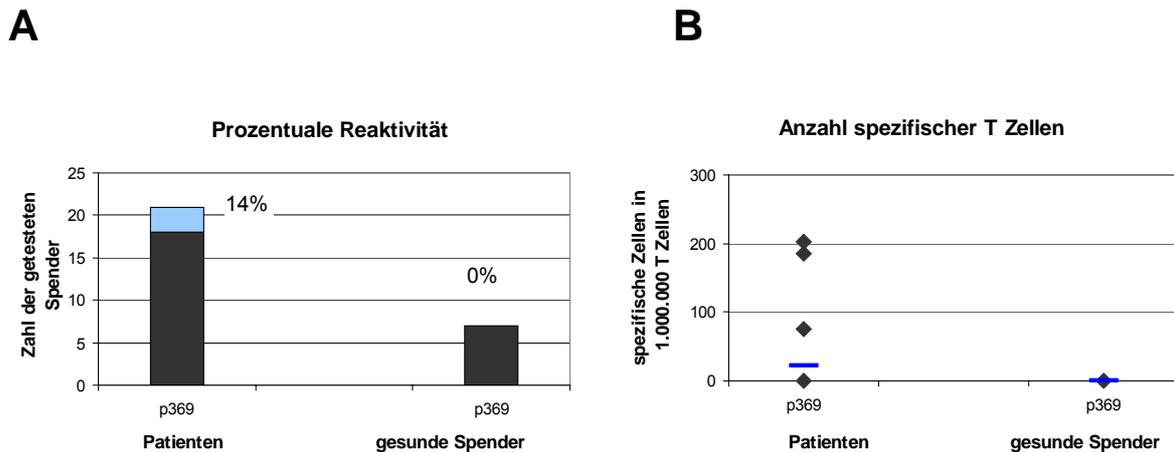


**Abbildung 14:** ELISpot Analysen der Peptide p106 und p694 aus dem TAA CEA; p106 an 9 Patienten und 5 gesunden Spendern, p694 an 12 Patienten und 6 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

CEA Peptide führten zu einer starken Reaktivität von Memory T Zellen bei Patienten und gesunden Spendern. Einen deutlichen Unterschied in der Reaktivität zeigte sich jedoch nur für das neu definierte Peptid p106. Aufgrund der starken Tumor-abhängigen Reaktivität von p106 wurde CEA als Tumor-relevantes TAA ausgewählt. Von diesem Peptid ist nicht bekannt ob es in vivo prozessiert und präsentiert werden kann.

### 6.8.3 Untersuchungen zum epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor-2

Her2/neu p369 ist ein beschriebenes Peptid [Fisk, 1995] das bereits in vielen immunologischen Ansätzen verwendet wurde. Die hier untersuchten KMTTC von 21 Patienten reagierten nur in drei Fällen (14%) mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion. Trotz der geringen Reaktivität zeigte sich ein klarer Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern, da bei gesunden Spendern keine spezifischen Memory T Zellen gemessen werden konnten (Abb.15A).



**Abbildung 15:** ELISpot Analysen vom Peptid p369 aus dem TAA Her2/neu an 21 Patienten und 7 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Frequenzen lagen, wie bei den meisten anderen untersuchten TAA, in einem Bereich unter 400 spezifischen Zellen aus 1.000.000 T Zellen. Dabei war die Zahl Peptid-spezifischer Memory T Zellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant höher ( $p = 0,05$ ) (Abb.15B). Daher wurde Her2/neu als Tumor-relevantes TAA ausgewählt.

### 6.8.3.1 Immunhistologische Her2/neu Bestimmung im Tumorgewebe

Im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg wurde semiquantitativ, mittels immunhistologischen Färbungen, die Her2/neu Expression im Tumorgewebe bestimmt. Die vorgenommene Einteilung bestand aus 0, 1+, 2+ und 3+, wobei Patienten ohne nachweisbare Expression (0) als negativ gewertet wurden. Von 35 der 41 untersuchten Patienten waren die Her2/neu Daten aus der Klinik erhältlich. Davon wiesen 29 Patienten keine Her2/neu Expression, fünf eine starke (3+) und einer eine mit 2+ eingestufte Expression auf. In 6 von 35 (17%) der Patienten ließ sich demnach Her2/neu im Tumorgewebe nachweisen.

Vergleicht man die immunhistologische Färbung aus der Pathologie mit den Ergebnissen der ELISpot Analyse, so zeigte sich ein ähnliches Bild. 17% der 19 Patienten, von denen beide Werte vorlagen, wiesen eine Färbung und 14% eine Immun-Reaktivität auf. Es konnte somit kein Zusammenhang zwischen Expression im Tumorgewebe und Immun-Reaktivität festgestellt werden.

### 6.8.4 Untersuchungen zum Natrium / Jod Symporter

KMTC von 20 Patienten wurden mit dem neu definierten Peptid p445 aus der Sequenz des hNIS stimuliert. Vier der Patienten (20%) und einer der gesunden Spender (14%) reagierten mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion. Es zeigte sich also eine etwas häufigere Reaktivität bei Patienten (Abb.16A). Die Frequenzen der Patienten lagen zwischen 142 und 827 spezifischen KMTC aus 1.000.000 Zellen. Die Frequenz des positiv gemessenen gesunden Spenders lag bei 195 aus 1.000.000 (Abb.16B) Zellen. Im Mittel wiesen die Patienten keine signifikant größere Anzahl an spezifischen Zellen auf als die gesunden Spender ( $p = 0,14$ ).

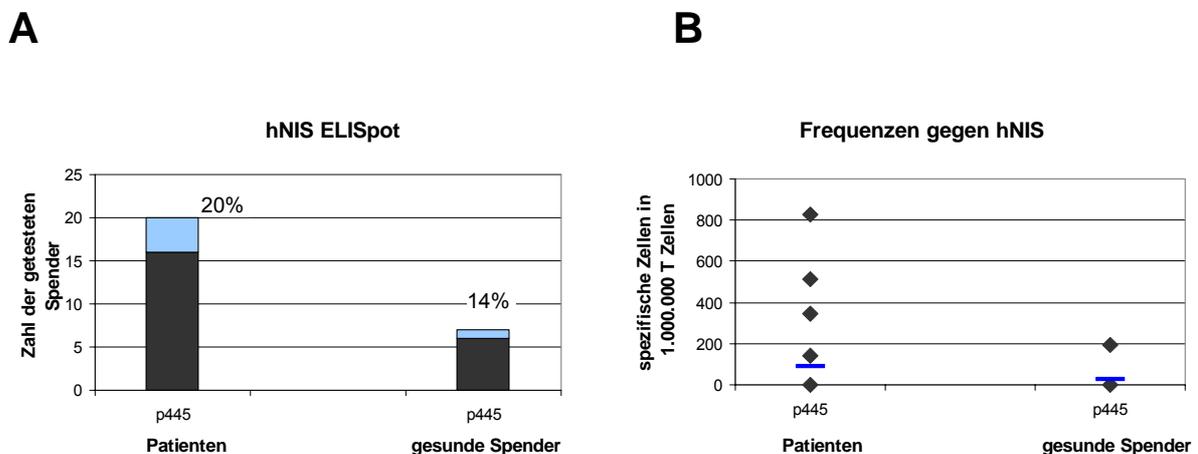
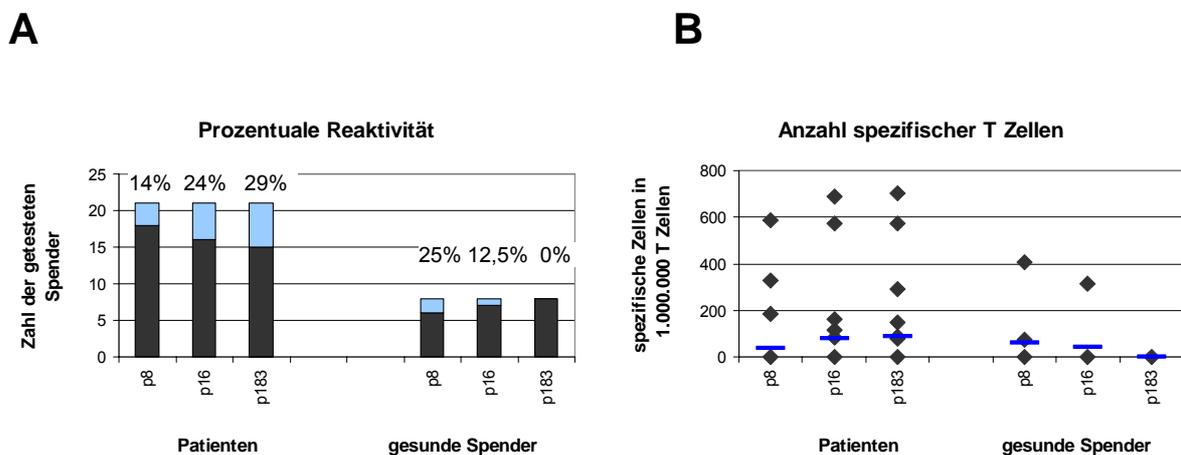


Abbildung 16: ELISpot Analysen mit Peptid p445 aus dem TAA hNIS an 20 Patienten und 7 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Immunogenität von hNIS schien nicht signifikant vom Tumor-abhängig zu sein, da sich kein deutlicher Unterschied in der Reaktivität zwischen Patienten und gesunden Spendern zeigte. Es konnte allerdings in der Mehrzahl der Tumorproben hNIS nachgewiesen werden (s. Anhang). Da das Antigen nur in der lactierenden Brust, der Schilddrüse und in Tumorgewebe exprimiert wird [Tazebay, 2000], wurde hNIS in die TAA Auswahl mit einbezogen. Ein Nachweis über die Prozessierung und Präsentation in vivo ist von diesem Peptid noch nicht erbracht.

### 6.8.5 Untersuchungen zu Heparanase

Aus der Sequenz des Enzyms Heparanase wurden drei noch nicht in der Literatur beschriebene Peptide, p8, p16 und p183, untersucht. Die KMTC von 10 aus 21 (43%) getesteten Patienten reagierten gegenüber mindestens einem der drei Peptide mit einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion. Im Einzelnen betrachtet reagierten drei der 21 getesteten Patienten auf p8, fünf auf p16 und sechs auf p183 (Abb.17A). Daraus ergab sich prozentual für p8 = 14%, p16 = 24% und p183 = 29%. Bei acht getesteten gesunden Spendern reagierten drei gegenüber mindestens einem Hpa Peptid (37,5%), jedoch keiner gegen p183. Eine Reaktivität der Memory T Zellen trat bei 2 der 8 getesteten gesunden Spender gegen p8 (25%) und bei 1 der 8 gegen p16 (12,5%) auf.



**Abbildung 17:** ELISpot Analysen mit den Peptiden p8, p16 und p183 aus dem TAA Hpa; p8 an 21 Patienten und 8 gesunden Spendern; p16 an 21 Patienten und 8 gesunden Spendern und p183 an 21 Patienten und 8 gesunden Spendern; **A**) schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B**) Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Frequenzen zeigten nur für p183 eine signifikant größere Anzahl an spezifischen Zellen bei Patienten mit  $p = 0,02$  (Abb.17B). Die  $p$ -Werte für die anderen Peptide lagen bei  $p = 0,45$  (p8) und  $p = 0,26$  (p16). Reagierte ein Patient mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Ausschüttung gegenüber mindestens zwei der drei Hpa Peptide, so war die Zahl der spezifischen KMTC gegenüber diesen Peptiden sehr ähnlich. So reagiert z.B. P3 gegen p16 mit 83 und gegen p183 mit 90 spezifischen Zellen aus 1.000.000 KMTC, P6 gegen p16 mit 687 und gegen p183 mit 710 spezifischen Zellen aus 1.000.000 KMTC. Das könnte bedeuten, dass Heparanase zu einer generellen Immun-Reaktivität führt, aber nicht von jedem Tumor alle drei Peptide präsentiert werden.

Heparanase Peptide führten zu einer starken Reaktivität von Memory T Zellen bei Patienten. Die Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen war jedoch nur gegenüber p183 bei Patienten signifikant größer als bei gesunden Spendern. Aufgrund der starken Tumor-abhängigen Reaktivität von p183 wurde Hpa als Tumor-relevantes TAA ausgewählt.

#### 6.8.5.1 Immunogenität in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die Heparanase Expression führt bei Tumorzellen zu einem höheren metastasierenden Potential [Hulett, 1999; Vlodaysky, 1999]. Die Patienten, die auf eine Memory Antwort gegenüber Heparanase Peptide untersucht worden sind, trugen zu 55% einen Tumor im Stadium-II, die anderen wiesen Tumorstadium-I auf. Von den neun Patienten die gegenüber mindestens einem der Peptide in der ELISpot Analyse positiv gemessen wurden (von dem zehnten positiven Patienten ist das Stadium nicht bekannt) wiesen zwei Drittel Stadium-II auf. Es könnte daher für die Immun-Reaktivität eine Rolle spielen, wie weit der Tumor entwickelt war, und ob bereits eine Infiltration von Tumorzellen in drainierende Lymphknoten stattgefunden hat (bei Tumorstadium-II).

#### 6.8.5.2 Reaktivität in Bezug auf Insulin als alleiniger Hintergrundkontrolle

Wertete man die ELISpot Analysen mit Hpa Peptiden nur in Bezug auf Insulin p34 aus, so änderte sich der Mittelwert der Kontrolle leicht und es ergaben sich kleine Änderungen in der Zahl der Patienten mit signifikant erhöhter IFN- $\gamma$  Produktion. In Bezug auf Insulin p34 alleine und gegen Insulin p34 und HIVgag zusammengenommen zeigten 9 der insgesamt 21 getesteten Patienten (43%) eine signifikant positive IFN- $\gamma$  Produktion. Für die Peptide im Einzelnen betrachtet ergab sich, mit Patienten KMTC, nur für p16 ein Unterschied. Bei den gesunden Spendern reagierte bezogen auf Insulin p34 alleine nur ein Spender, in Bezug auf die zusammengefasste Hintergrundkontrolle reagierten drei der gesunden Spender auf mindestens eines der Peptide. Im Einzelnen zeigte sich folgendes:

##### In Bezug auf Insulin p34 (n = 3)

###### Patienten:

Hpa8	3 / 21	(14%)
Hpa16	8 / 21	(38%)
Hpa183	6 / 21	(28,5%)

##### In Bezug auf HIV und Insulin p34 (n=6)

###### Patienten:

Hpa8	3 / 21	(14%)
Hpa16	5 / 21	(24%)
Hpa183	6 / 21	(28,5%)

gesunde Spender:

Hpa8 1 / 8 (12,5%)  
 Hpa16 0 / 8 (0%)  
 Hpa183 0 / 8 (0%)

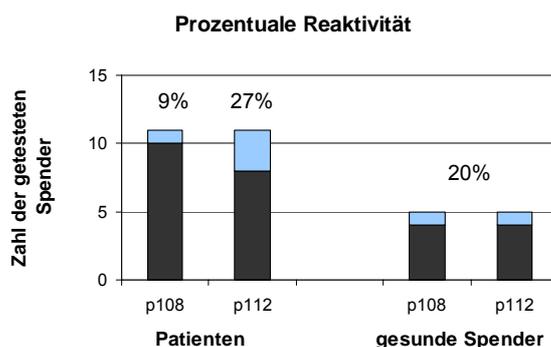
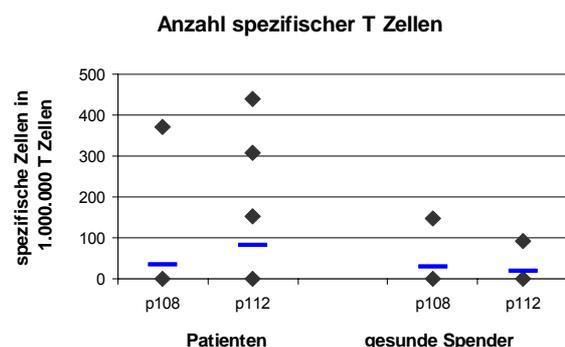
gesunde Spender:

Hpa8 2 / 8 (25%)  
 Hpa16 1 / 8 (12,5%)  
 Hpa183 0 / 8 (0%)

Wurden die ELISpot Analysen ausschließlich gegen Insulin kalkuliert, ergab sich auch gegenüber p16 eine deutlich stärkere Reaktivität der Memory T Zellen bei Patienten verglichen mit gesunden Spendern (p8 von  $p = 0,12$ , p16 von  $p = 0,01$  und für p183 von  $p = 0,04$ ). Für die Auswahl Tumor-abhängiger TAA wurde daher neben p183 auch p16 aus der ASS der Hpa verwendet.

**6.8.6 Untersuchungen zum Melanom assoziierten Antigen-2**

Von den beiden getesteten Peptiden war eines, p112, bereits in der Literatur beschrieben [Visseren, 1997], das andere, p108, wurde neu definiert. Insgesamt wurden KMTC von 18 Patienten und acht gesunden Spendern auf ihre Reaktivität gegenüber mindestens einem der MAGE-2 Peptide getestet.

**A****B**

**Abbildung 18:** ELISpot Analysen mit den Peptiden p108 und p112 aus dem TAA MAGE-2; an je 11 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

3 von 18 Patienten und 1 von 8 gesunden Spendern reagierten mit einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion gegen mindestens eines der MAGE-2 Peptide. Es konnten nicht alle Patienten und Spender auf ihre Reaktivität gegenüber beiden Peptiden getestet werden. So zeigte 1 von 11 (9%) Patienten gegenüber p108 und 3 von 11 (27%) gegenüber p112 eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion (Abb.18A). Die erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion bei gesunden Spendern war für beide Peptide auf den gleichen Spender zurückzuführen. Die Frequenzen bei den Patienten lagen für p108 ähnlich, für p112 über den Frequenzen der gesunden Spender, wobei sich in keinem der beiden Fälle ein signifikanter Unterschied zeigte (p108,  $p = 0,46$ ; p112,  $p = 0,11$ ) (Abb.18B).

MAGE-2 wurde trotz der scheinbar nicht Tumor-abhängigen Reaktivität der Memory T Zellen bei Patienten in die Auswahl relevanter TAA mit einbezogen. Die Auswahl erfolgte, da ein verwandtes TAA, MAGE-3, bereits erfolgreich in peptidbasierenden Vakzinen eingesetzt wurde [Turner, 1999] und MAGE-2 in vielen Brusttumoren überexprimiert wurde (s. Anhang). Aufgrund der häufigeren Reaktivität von Memory T Zellen von Patienten gegenüber dem bereits bekannte Peptid p112 wurde dieses ausgewählt.

### 6.8.7 Untersuchungen zu Mucin-1

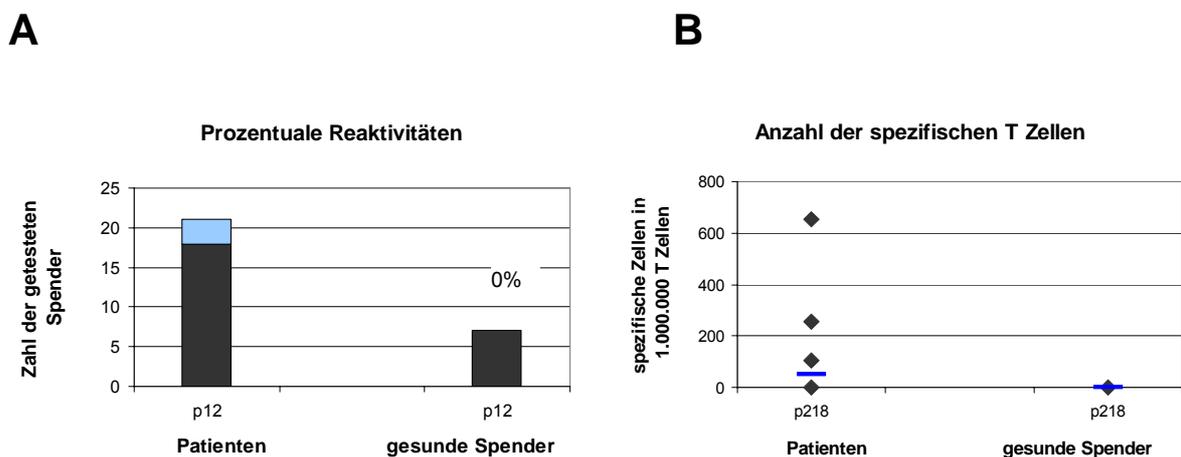


Abbildung 19: ELISpot Analysen mit dem Peptid p12 aus dem TAA MUC-1 an je 21 Patienten und 7 gesunden Spendern; **A**) schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B**) Frequenzen Peptid-spezifischer KMTc; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

In ELISpot Analysen wurde das bekannte Peptid p12 [Brossart, 1999] aus dem TAA MUC-1 an 21 Patienten und sieben gesunden Spendern untersucht (Abb.19A). KMTc von drei Patienten (14%) zeigten eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion. Bei keinem der gesunden Spender ließ sich eine Reaktivität nachweisen. So wiesen die seltenen Reaktivitäten der Patienten trotzdem einen Unterschied zu den Reaktivitäten bei gesunden Spendern auf. Die Anzahl der MUC-1 spezifischen Zellen war bei Patienten „niedrig signifikant“ höher als bei gesunden Spendern mit einem p-Wert von  $p = 0,07$  (Abb.19B).

Aufgrund der häufigen starken Überexpression von MUC-1 im Tumorgewebe (s. Anhang) und der Tatsache, das MUC-1 bereits in einer Phase I/II Studie eingesetzt worden ist [Brossart, 2000], wurde MUC-1 mit in die Auswahl Tumor-relevanter TAA einbezogen.

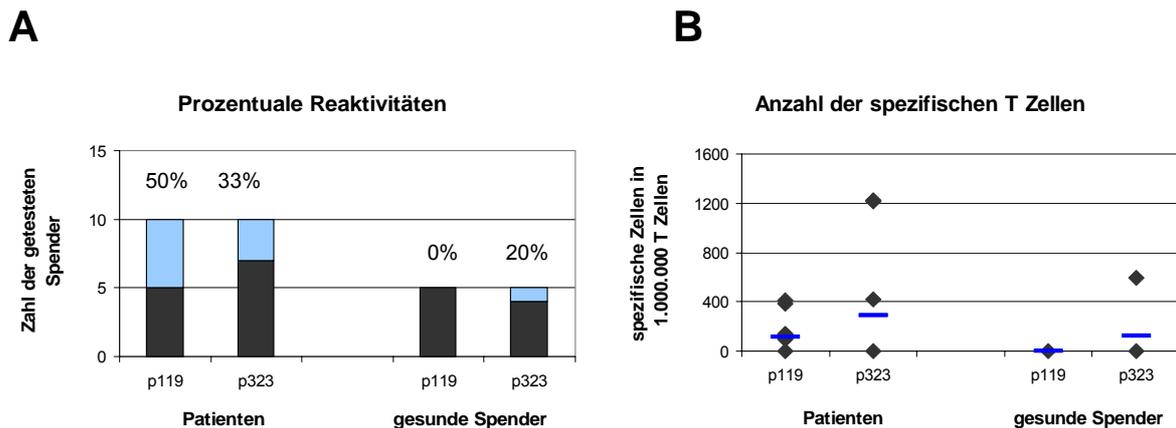
#### **6.8.7.1 Serumkonzentrationen von CA15.3 bei Patienten**

Epithelzellen sezernieren den extrazellulären Teil des MUC-1 Proteins, der spezifisch von dem Antikörper CA15.3 im Serum detektiert werden kann [Cheung, 2000]. Von 33 der hier untersuchten Patienten lag die Serumkonzentration, bestimmt im Pathologischen Institut der Universität Heidelberg, vor. Eine Konzentration von  $>25\mu\text{g/l}$  galt als erhöht, was in 10 der Patienten (30%) der Fall war. 2 der 3 der Patienten die eine Immun-Reaktivität gegenüber MUC-1 p12 gezeigt haben, wiesen erhöhte Serumkonzentrationen von CA15.3 auf, wohingegen 11 der 15 Patienten ohne messbare Immun-Reaktivität eine Serumkonzentration im normalen Bereich zeigten. Eine vergleichbare Tendenz wurde auch in einer anderen Studie aus unserem Labor an 80 Brustkrebspatienten beobachtet (unveröffentlichte Daten). Das lässt auf einen Zusammenhang zwischen der Immun-Reaktivität und der Serumkonzentration von MUC-1 schließen, obwohl sich die Messungen aus dieser Arbeit auf zwei unterschiedliche Bereiche des Proteins beziehen. CA15.3 bindet an den extrazellulären Teil von MUC-1, das Peptid p12 kommt aus der intrazellulären Signalsequenz [Brossart, 1999].

#### **6.8.8 Untersuchungen zum Spermium Protein**

Aus dem TAA PH20 wurden zwei neu definierte Peptide p119 und p323 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, KMTc von Patienten und gesunden Spendern in ELISpot Analysen zu aktivieren. Es sind 12 Patienten getestet worden, wobei sechs (50%) gegenüber mindestens einem der PH20 Peptide eine signifikant positive Reaktivitäten aufwiesen. Von diesen 12 Patienten wurden acht auf beide PH20 Peptide getestet. Die KMTc von zwei Patienten

wiesen gegenüber beiden Peptiden ein positives Ergebnis in der ELISpot Analyse, vier Patienten gegenüber beiden Peptiden ein negatives Ergebnis und zwei nur gegenüber p119 ein positives Ergebnis. Betrachtet man die Peptide im Einzelnen, reagierten die KMTC der Patienten in 5 von 10 (50%) bei Stimulation mit p119 und in 3 von 10 (33%) Fällen mit p323 (Abb.20A). Von den fünf gesunden Spendern wurde nur bei einem eine signifikant stärkere IFN- $\gamma$  Produktion gegen p323 induziert.



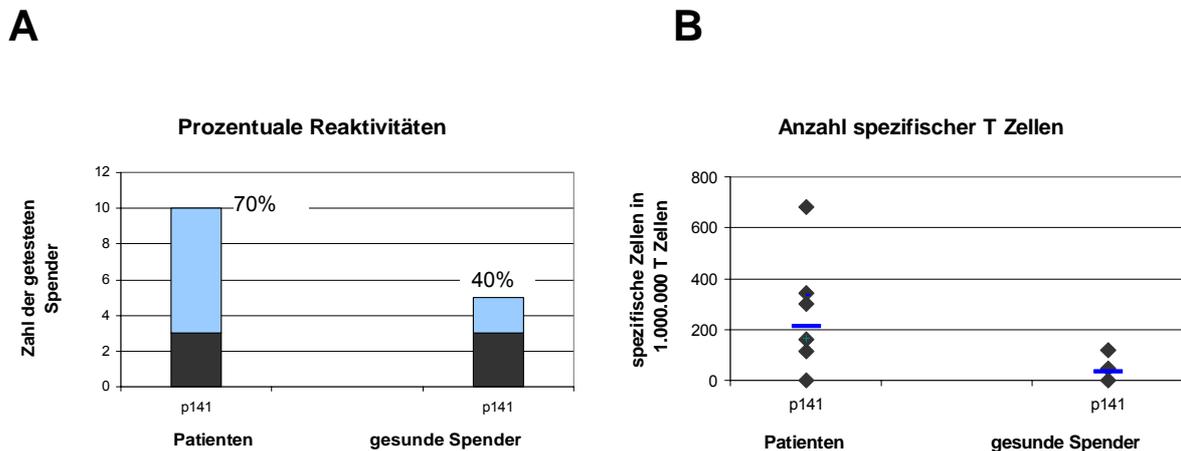
**Abbildung 20:** ELISpot Analysen mit den Peptiden p119 und p323 aus dem TAA PH20 an je 10 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Anzahl der Peptid-spezifischen KMTC war in den verschiedenen Proben sehr unterschiedlich und reichte von 92 bis 1.220 aus 1.000.000 Zellen (Abb.20B). Damit zeigte sich im Mittel für p119 eine signifikant erhöhte Anzahl Peptid-spezifischer Zellen bei Patienten verglichen mit gesunden Spendern ( $p = 0,02$ ), nicht jedoch für p323 ( $p = 0,21$ ). Aufgrund der starken Reaktivität bei Patienten wurde PH20 als relevantes TAA ausgewählt, wobei p119 in die Auswahl aufgenommen wurde. Von beiden neu definierten Peptiden aus dem TAA PH20 ist nicht bekannt, ob sie in vivo prozessiert und präsentiert werden können.

### 6.8.9 Untersuchungen zum Prostata spezifischen Antigen

KMTC von 7 der 10 (70%) getesteten Patienten und 2 der 5 (40%) gesunden Spender reagierten mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion auf eine Stimulation (Abb.21A) mit dem in der Literatur beschriebenen Peptid p141 aus dem TAA PSA [Correale, 1998]. Die Reaktivitäten, die bei Patienten gemessen werden konnten, waren die häufigsten aller hier

untersuchten TAA. Die Anzahl der spezifischen Zellen war bei Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant erhöht und ergab einen p-Wert von  $p = 0,02$  (Abb.21B). Damit war ein klarer Unterschied in der Reaktivität der Memory T Zellen von Patienten und gesunden Spendern zu erkennen.



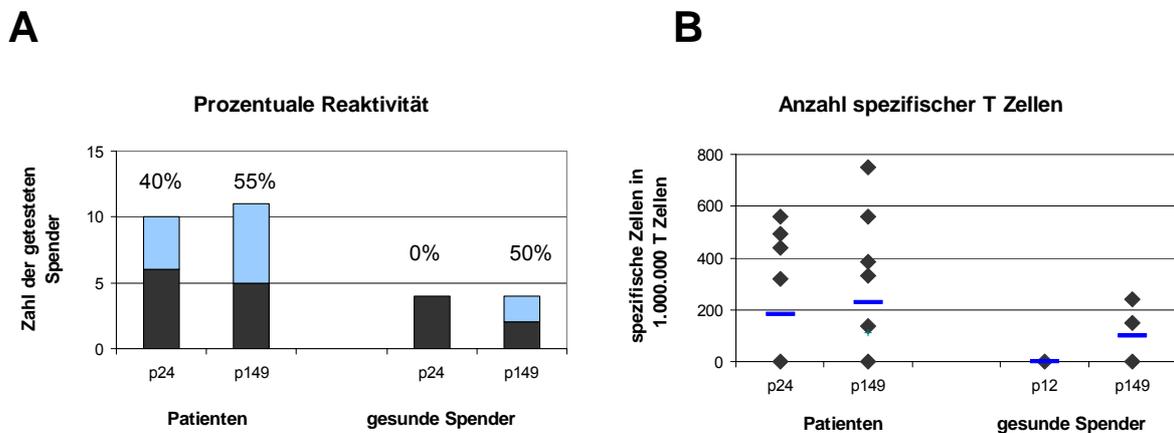
**Abbildung 21:** ELISpot Analysen mit dem Peptid p141 aus dem TAA PSA; an 10 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

PSA p141 wurde aufgrund der hohen Reaktivität, aufgrund der Anreicherungen Peptid-spezifischer Zellen bei Patienten und der häufigen Expression im Tumorgewebe (s. Anhang) als Tumor-relevantes TAA ausgewählt.

#### 6.8.10 Untersuchungen zu p53

Aus dem TAA p53 wurde ein bekanntes Peptid, p149 [Theobald, 1995], und ein neu definiertes Peptid, p24, untersucht. Bei den Tests mit KMTC von Patienten zeigte sich, dass 8 von 18 (44%) gegen mindestens eines der Peptide eine signifikant erhöhte Reaktivität in der ELISpot Analyse aufwiesen (Abb.22A). Drei der Patienten wurden gegenüber beiden Peptiden getestet. Zwei reagierten gegenüber beiden positiv, einer nur gegenüber p24. Das neue Peptid p24 führte in 4 von 10 Fällen (40%), also seltener als das bereits bekannte Peptid in 6 von 11 (55%), zu einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion. P24 löste jedoch in keinem der gesunden Spender eine IFN- $\gamma$  Produktion aus, p149 dagegen in 50%. Daher

zeigte sich nur gegenüber p24 ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität der KMTC von Patienten und gesunden Spendern.



**Abbildung 22:** ELISpot Analysen mit den Peptiden p24 und p149 aus dem TAA p53; für p24 an 10 Patienten und 4 gesunden Spendern, für p149 an 11 Patienten und 4 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund p >0,05, blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund p <0,05, % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen war in den Patientenproben verschieden und reichte von 138 bis 750 spezifischen Zellen aus 1.000.000 T Zellen. Die beiden positiven Reaktionen gegenüber p149 der gesunden Spender waren auf etwas niedrigere Frequenzen von 148 und 242 spezifischen Zellen aus 1.000.000 zurückzuführen (Abb.22B). Vergleicht man die Anzahl der spezifischen Zellen aller Patienten gegenüber allen gesunden Spendern, so ergab sich ein p-Wert für p24 von p = 0,04 und für p149 von p = 0,15. Damit war nur gegenüber p24 ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Peptid-spezifischen T Zellen zu erkennen. Aufgrund der starken Präsenz von p53 in vielen Tumoren wurde dieses TAA ausgewählt. Dabei wurde das hier neu definierte Peptid p24 aufgrund der fehlenden Reaktivität bei gesunden Spendern verwandt. Ein Nachweis über eine tatsächliche Existenz dieses Peptides in vivo ist noch nicht erbracht worden.

#### 6.8.10.1 Immunhistologie von p53+ Tumorzellen im Tumorgewebe

In der Pathologie der Universitätsklinik Heidelberg wurde bei 34 Patienten der prozentuale Anteil von p53+ Tumorzellen im Tumorgewebe histologisch bestimmt. Dabei galten nur Proben mit einem prozentualen Anteil p53+ Tumorzellen >50% als klinisch erhöht. Bei 29

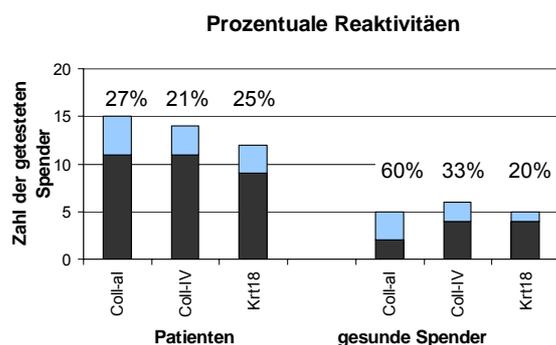
Patienten wurde kein erhöhter Wert für p53+ Tumorzellen gefunden. Nur in 5 Fällen (15%) wurde ein erhöhter Anteil p53+ Tumorzellen gefunden. Dabei wies je eine Probe 60%, 70% und ca. 100% und zwei Proben 80% p53+ Zellen auf. In 14 Fällen lag der Befund der Pathologie und eine ELISpot Analyse vor. Es zeigte sich dass:

p53+ Tumorzellen < 50%;	ELISpot Analyse +	6 x
p53+ Tumorzellen < 50%;	ELISpot Analyse -	7 x
p53+ Tumorzellen > 50%;	ELISpot Analyse +	1 x
p53+ Tumorzellen > 50%;	ELISpot Analyse -	0 x

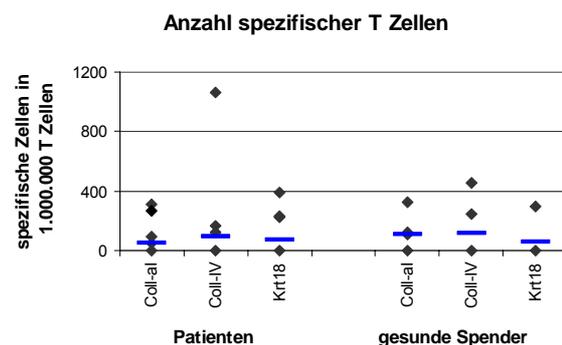
Kein erhöhter Anteil p53+ Tumorzellen wurden bei 13 der 14 (93%) Patienten gefunden, von denen eine ELISpot Analyse vorlag. Nur ein Patient wies einen erhöhten Anteil p53+ Tumorzellen und eine Immun-Reaktivität auf. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl p53+ Tumorzellen im Tumorgewebe und der Immun-Reaktivität gefunden werden.

## 6.9 Untersuchungen der Reaktivität gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen

### A



### B



**Abbildung 23:** ELISpot Analysen mit Peptiden aus autologen Antigenen; für Coll- $\alpha$ 1 an 15 Patienten und 5 gesunden Spendern, für Coll-IV an 14 Patienten und 6 gesunden Spendern; für Krt18 an 12 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTc; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Zusätzlich zu den Peptiden aus TAA wurden auch Peptide aus nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen untersucht. Kollagen - IV p18 (Coll-IV) [Barnea, 2002], Keratin18 p365 (Krt18) [Weinschenk, 2002] und ein neu definiertes Peptid, p253, aus dem Antigen Kollagen -  $\alpha$  (Coll- $\alpha$ ) wurden auf ihre Fähigkeit hin charakterisiert, KMTC von Patienten und gesunden Spendern in ELISpot Analysen zu aktivieren (Abb.23A). Gegen beide Kollagen Peptide reagierten die gesunden Spender öfter als die Patienten (Abb.23A). Bei dem Peptid aus der ASS des Keratin18 zeigten 25% der Patienten und 20% der gesunden Spender erhöhte Reaktivitäten in der ELISpot Analyse (Abb.23A). Die Patienten wiesen für keines der drei Peptide eine signifikant größere Anzahl an spezifischen Memory T Zellen auf. Mit einer Ausnahme, P26, der 1065 Coll-IV spezifische Zellen aus 1.000.000 Zellen zeigte, lagen die Frequenzen bei den Patienten nicht höher als bei den gesunden Spendern (Abb.23B). Peptide aus nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen wiesen eine deutlich schwächere Immunogenität auf, als die hier untersuchten TAA. Dies weist auf einen Unterschied zwischen TAA und nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen hin.

## **6.10 Untersuchungen der Reaktivität gegenüber „nicht Tumor-relevanten“ TAA**

Anhand von Peptid ELISpot Analysen der KMTC von Patienten und gesunden Spender wurde die Reaktivität gegenüber TAA untersucht. Folgende TAA zeigten hier keine eindeutig Tumor-abhängige Reaktivität und wurden daher nicht in die zuvor vorgestellte Auswahl einbezogen.

### **6.10.1 Untersuchungen zum B Zell Lymphom Protein-2**

Aus der Sequenz des TAA Bcl-2 wurde das in der Literatur beschriebene Peptid p218 [Andersen, 2004] bei fünf gesunden Spendern und zwölf Patienten untersucht. Dabei führte die Stimulation mit p218 bei gesunden Spendern in 1 von 5 (20%) Fällen zu einer signifikant erhöhten Reaktivität bezogen auf die Hintergrundkontrolle, bei Patienten in 5 von 12 (40%) Fällen (Abb.24A).

Bei den Frequenzen gab es bei Patienten und gesunden Spendern jeweils einen der eine Anzahl an Peptid-spezifischen KMTC von etwa 600 aus 1.000.000 aufwies. Die Frequenzen bei den anderen Patienten lagen zwischen 30 und 130 aus 1.000.000. Der Mittelwert der Frequenzen lag bei den gesunden Spendern mit 122 spezifischen T Zellen in 1.000.000 etwas höher als der Mittelwert der gemessenen spezifischen T Zellen bei Patienten mit 81 (Abb.24B). Aufgrund der geringeren Anzahl Peptid-spezifischer Memory T Zellen bei

Patienten als bei gesunden Spendern wurde das TAA Bcl-2 nicht als Tumor-relevant ausgewählt.

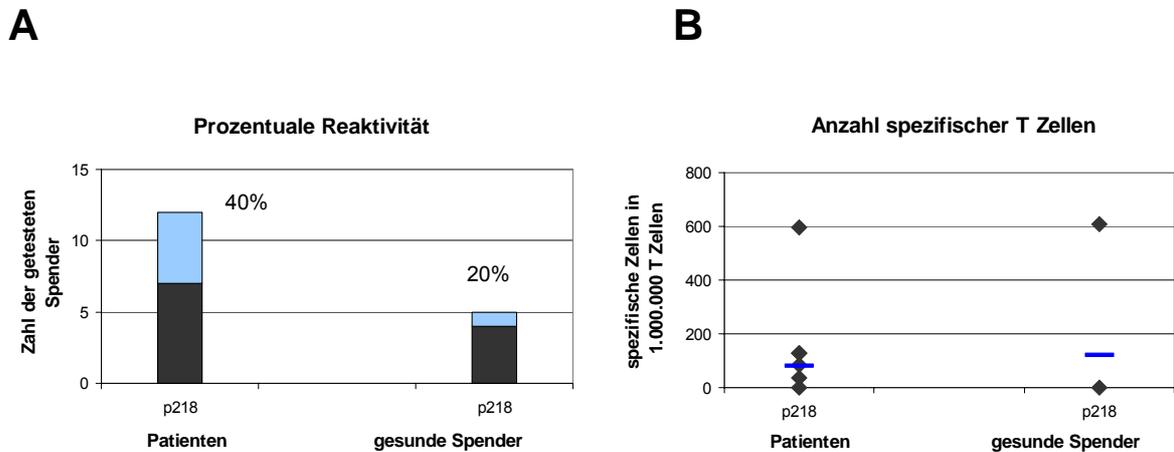


Abbildung 24: ELISpot Analysen mit dem Peptid p218 aus dem TAA Bcl-2 an 12 Patienten und 5 gesunden Spendern. **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

### 6.10.1.1 Immunhistologische Untersuchung von Bcl-2 im Tumorgewebe

Tumorgewebeproben der hier untersuchten Patienten wurden vom Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg mittels Immunhistologie auf eine Bcl-2 Expression untersucht. Bcl-2 wurde semiquantitativ bestimmt und zwischen 0, 1+, 2+ und 3+ bewertet. Proben die als 1+, 2+ oder 3+ eingestuft wurden, wurden als positiv gewertet. Von 34 der untersuchten 41 Patienten waren Daten zu Bcl-2 Expression erhältlich. 22 (65%) dieser Patienten zeigten positive histologische Bcl-2 Befunde.

Von zehn dieser Patienten lagen Daten aus ELISpot Analysen vor:

histologischer Befund +;	ELISpot Analyse +	:	2 Patienten
histologischer Befund +;	ELISpot Analyse -	:	6 Patienten
histologischer Befund -;	ELISpot Analyse +	:	1 Patient
histologischer Befund -;	ELISpot Analyse -	:	1 Patient

80% der Patienten von denen Ergebnisse aus beiden Tests vorlagen, wiesen einen positiven histologischen Befund auf, 30% zeigten eine signifikant positive IFN- $\gamma$  Produktion in der

ELISpot Analyse. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen der Immun-Reaktivität und dem histologischen Befund festgestellt werden.

### 6.10.1.2 Tumorstadium abhängige Reaktivität

Die Tumore der Patienten, die eine Immun-Reaktivität gegenüber Bcl-2 gezeigt haben, befanden sich in zwei Fällen in Stadium-I und in einem Fall in Stadium-III. Tumore der Patienten, die keine Reaktivität aufwiesen, wurden in drei Fällen Stadium-I und in vier Fällen Stadium-II zugeordnet (von den anderen war die Stadium-Klassifikation nicht bekannt). In der Literatur wurde beschrieben, dass in den PBMC von Brustkrebspatienten in frühen Stadien keine oder nur eine sehr schwache Reaktivität gegenüber den verschiedenen getesteten Peptiden nachgewiesen werden konnte [Andersen, 2004]. Die hier untersuchten Patienten waren alle primär operiert worden, ohne vorangegangene Chemotherapie. Im Unterschied zu Andersen [2004] der nur Bcl-2 Peptid-spezifische Zellen bei Patienten nach Chemotherapie fand, konnten hier im KM auch Reaktivitäten bei Patienten ohne vorhergegangene Chemotherapie nachgewiesen werden.

### 6.10.2 Untersuchungen zu Cyclin-D1

Das beschriebene Peptid p101 aus dem TAA Cyclin-D1 [Sadovnikova; 1998] wurde auf seine Fähigkeit getestet, KMTC von Patienten und gesunden Spendern zu aktivieren.

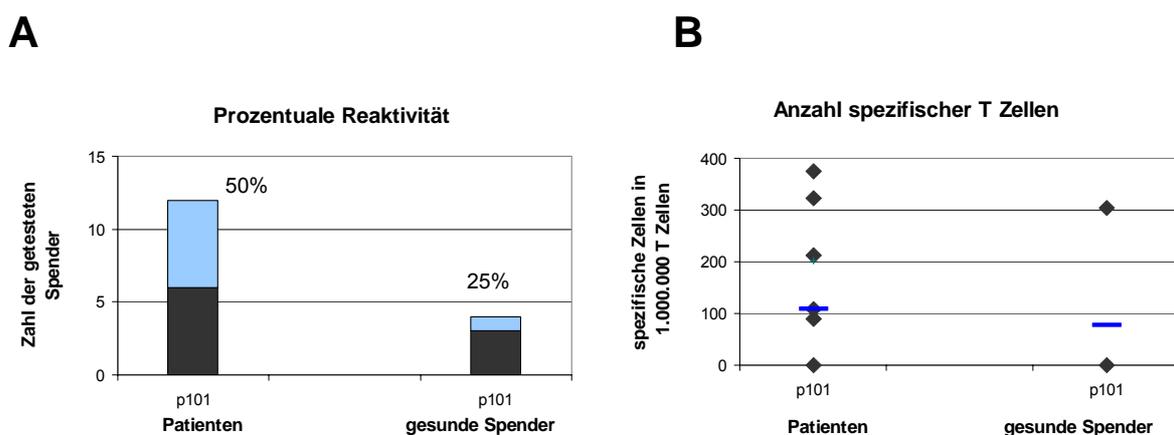
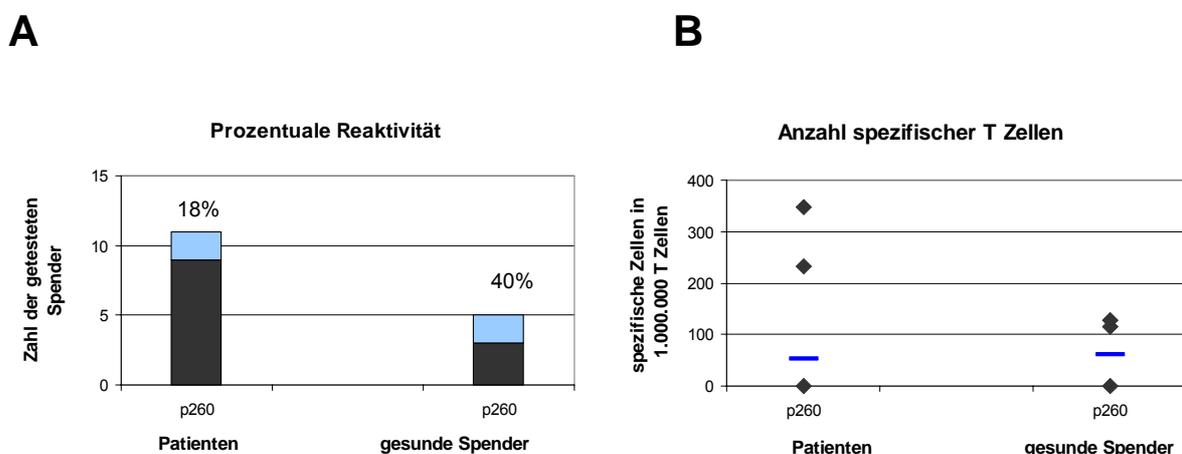


Abbildung 25: ELISpot Analysen vom Peptid p101 aus dem TAA Cyclin-D1 an 12 Patienten und 4 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

ELISpot Analysen bei 6 von 12 (50%) Patienten und bei 1 von 4 (25%) gesunden Spendern führten zu einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Abb.16A). Damit zeigte sich gegenüber p101 eine relativ starke Reaktivität. Die Anzahl der Peptid-spezifischen Memory T Zellen war bei Patienten nicht signifikant größer als bei gesunden Spendern mit einem p-Wert von 0,36 (Abb.25B). Das TAA Cyclin-D1 wurde nicht als Tumor-relevant ausgewählt, da die gemessenen Reaktivitäten bei Patienten möglicherweise nicht auf eine signifikant größere Anzahl Memory T Zellen zurückzuführen war. Diese Entscheidung beruhte jedoch auf der sehr kleinen Anzahl von getesteten Spendern.

### 6.10.3 Untersuchungen zum epithelialen Zelladhäsionsmolekül

Reaktivitäten gegenüber einem neu definierten Peptid aus der Sequenz des Ep-CAM wurden untersucht. 18% (2 von 11) der Patienten und 40% (2 von 5) der gesunden Spender zeigten eine erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung in ELISpot Analysen (Abb.26A). Damit war die Häufigkeit der Reaktivität der hier untersuchten KMTC von gesunden Spendern mehr als doppelt so hoch wie bei Brustkrebspatienten.



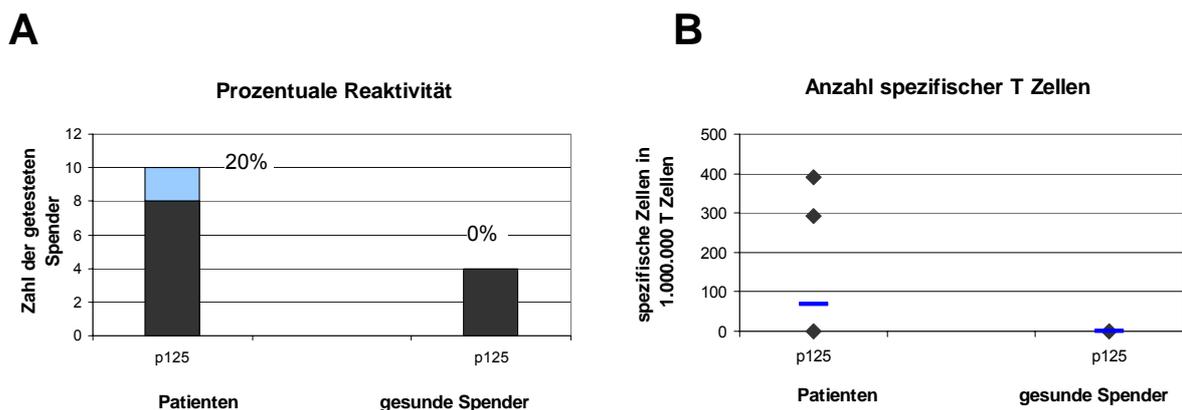
**Abbildung 26:** ELISpot Analysen vom Peptid p260 aus dem TAA Ep-CAM an 11 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund p >0,05, blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund p <0,05, % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Die Frequenzen der Peptid-spezifischen KMTC lagen im Mittel bei gesunden Spendern bei 61 und bei den Patienten bei 53 (Abb.26B). Im Vergleich zeigte sich jedoch das die einzelnen Reaktivitäten bei Patienten auf eine größere Anzahl Peptid-spezifischer Zellen

zurückzuführen war. Das TAA Ep-CAM wurde aufgrund der häufigeren Reaktivität von KMTC bei gesunden Spendern verglichen mit der Reaktivität bei Patienten nicht ausgewählt.

#### 6.10.4 Untersuchungen zum G Antigen

Bei den ELISpot Analysen mit dem neu definierten Peptid p125 aus dem TAA GAGE zeigte sich ein Unterschied in der Reaktivität von gesunden Spendern und Patienten. Von den getesteten KMTC Proben von Patienten zeigten 2 von 10 (20%) eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit p125, aber keiner der vier getesteten gesunden Spender (Abb.27A). Die Anzahl der spezifischen KMTC von Patienten und gesunden Spendern zeigte einen „niedrig signifikanten“ Unterschied mit einem p-Wert von 0,09 (Abb.27B). Da GAGE nur in 9% der Brustkrebstumoren exprimiert wird [Van den Eynde, 1995] und hier nur sehr wenige Spender untersucht werden konnten, wurde GAGE nicht ausgewählt.

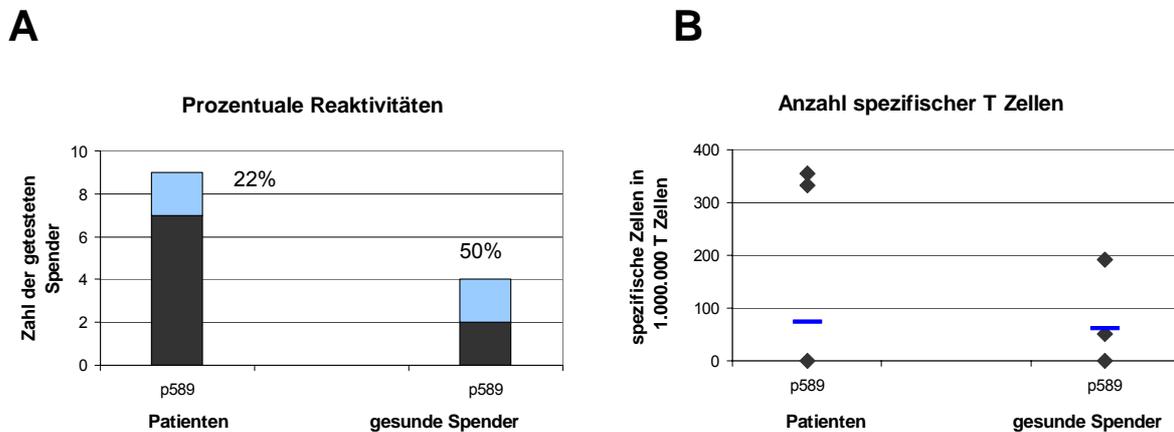


**Abbildung 27:** ELISpot Analysen vom Peptid p125 aus dem TAA GAGE an 10 Patienten und 4 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund p > 0,05, blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund p < 0,05, % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

#### 6.10.5 Untersuchungen zum Hepatozyten Wachstumsfaktor

DC, die mit einem neu definierten Peptid, p589, aus der Frequenz des HGF beladen waren, führten bei KMTC aus 2 von 9 Patienten (22%) und 2 von 4 gesunden Spendern (50%) zu einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Abb.28A). Prozentual gesehen zeigte sich somit eine stärkere Reaktivität bei gesunden Spendern. Die Frequenzen der Peptid-spezifischen T Zellen lagen für Patienten über den der gesunden Spender. Im Mittel jedoch zeigten

gesunde Spender (61 aus 1.000.000) und Patienten (74,11 aus 1.000.000) gleich viele spezifische Zellen (Abb.28B). Auch war die Anzahl der spezifischen T Zellen bei den positiv reagierenden Patienten größer als bei gesunden Spendern mit spezifischer Reaktivität.

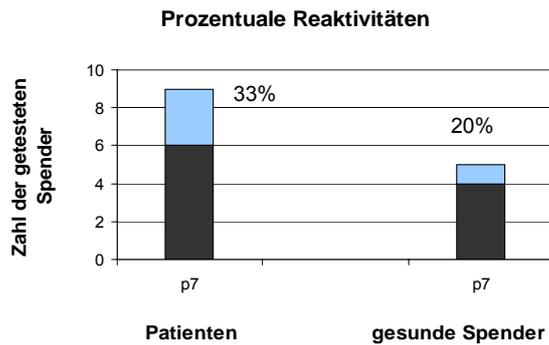
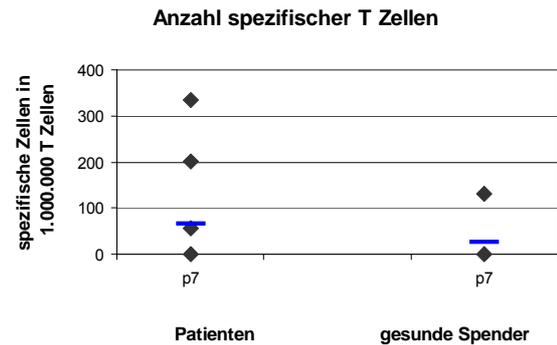


**Abbildung 28:** ELISpot Analysen vom Peptid p589 aus dem TAA HGF an 9 Patienten und 4 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTZ; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Für das TAA HGF konnten nur sehr wenige Proben untersucht werden. Aufgrund dieser Analysen konnte kein deutlicher Unterschied in der Reaktivität bei Patienten und gesunden Spendern nachgewiesen werden. Daher wurde das TAA HGF nicht ausgewählt.

### 6.10.6 Untersuchungen zu Kasein

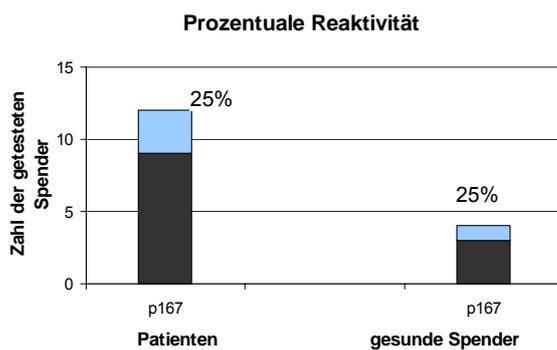
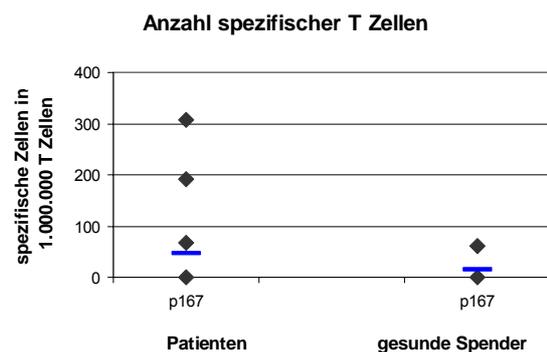
Das neu definierte Peptid p7 aus dem TAA Kasein wurde in ELISpot Analysen untersucht. Es reagierten 3 von 9 (33%) der getesteten Patienten und 1 von 5 (20%) der gesunden Spender mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion, verglichen mit der Hintergrundkontrolle (Abb.29A). Somit reagierten die Patienten etwas häufiger gegen das Kasein Peptid p7. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen, die zu dieser Reaktivität führten ( $p = 0,21$ ) (Abb.29B). Aufgrund der geringen Anzahl von untersuchten Spendern und der Tatsache, dass hier kein Unterschied in der Anzahl der spezifischen Memory T Zellen bei Patienten und gesunden Spendern gemessen werden konnte, wurde Kasein nicht ausgewählt.

**A****B**

**Abbildung 29:** ELISpot Analysen mit dem Peptid p7 aus dem TAA Kasein an 9 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blauer Balken: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

### 6.10.7 Untersuchungen zum Tumor-Testes-Antigen-2

Aus dem TAA LAGE-1 ist ein neu definiertes Peptid p167 in ELISpot Analysen auf seine Fähigkeit KMTC von Patienten und gesunden Spendern zur IFN- $\gamma$  Produktion zu aktivieren, getestet worden.

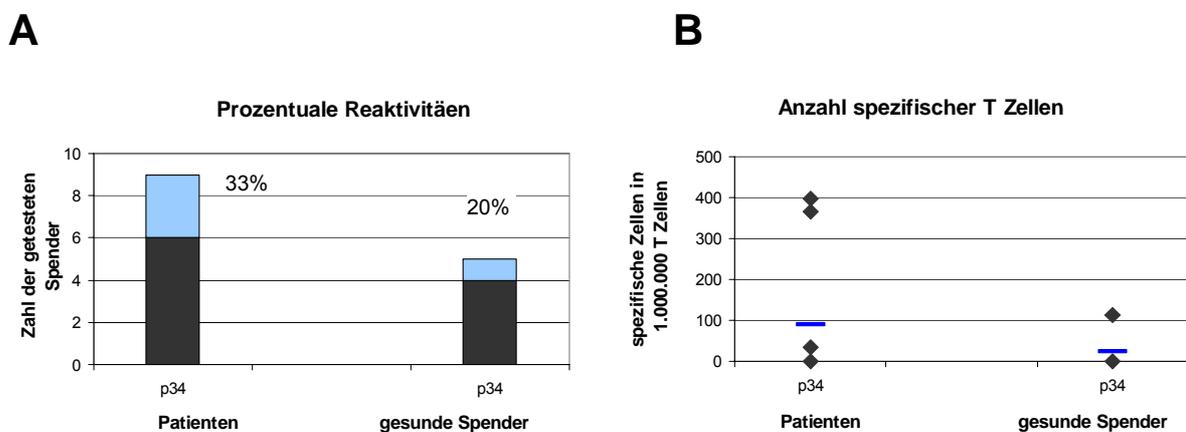
**A****B**

**Abbildung 30:** ELISpot Analysen mit dem Peptid p167 aus dem TAA LAGE-1 an 12 Patienten und vier gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber den Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

KMTC von 3 der 12 getesteten Patienten (25%) und 1 der 4 (25%) gesunden Spender reagierten mit einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Abb.30A). Damit zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit der Reaktivität. Die gemessenen Frequenzen lagen bei den Patienten, die eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion aufwiesen, etwas höher als bei den gesunden Spendern. Im Mittel zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Peptid-spezifischer Memory T Zellen für Patienten und gesunde Spender ( $p = 0,17$ ) (Abb.30B). Da das TAA LAGE-1 nur in 3,1% der Tumorgewebeproben von Brustkrebspatienten exprimiert wurde [Mashino, 2001], und sich kein deutlicher Unterschied in der Reaktivität gegenüber LAGE-1 bei Patienten und gesunden Spendern zeigte, wurde LAGE-1 nicht ausgewählt.

### 6.10.8 Untersuchungen zu p21ras

Inhibition von Cyclin Kinasen durch eine Überexpression von p21ras führt zur Inhibierung der Proliferation von Körperzellen [Xiong, 1993]. Durch häufige Mutationen des p21, verhindern Tumorzellen diese p21 induzierte Inhibition der Proliferation. Die häufigsten Mutationen treten in Form von Punktmutationen an den Positionen 12, 13 und 61 auf [Escobar, 1999].



**Abbildung 31:** ELISpot Analysen mit dem Peptid p34 aus dem TAA p21; an 9 Patienten und 5 gesunden Spendern; **A)** schwarz: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p > 0,05$ , blau: IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber dem Hintergrund  $p < 0,05$ , % = Anteil der positiven Spender; **B)** Frequenzen Peptid-spezifischer KMTC; Werte unterhalb der Detektionsschwelle werden als 0,00 dargestellt, blaue Linie: Mittelwert aller getesteten Spender je Peptid.

Das hier verwendete Peptid beginnt bei Position p34 und liegt damit in einem Bereich, der nicht diesen häufigen Punktmutationen unterliegt. Die KMTC von fünf gesunden Spendern und neun Patienten wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch das neu definierte Peptid p34 aus dem TAA p21 getestet. Die gesunden Spender reagierten zu 20%, die Patienten zu 33% mit

einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Abb.31A). Die Zahl der spezifischen Zellen lag bei zwei der Patienten deutlich über der der gesunden Spender (Abb.31B). Dies führte allerdings im Mittel nicht zu einer signifikant größeren Anzahl Peptid-spezifischer Zellen bei Patienten ( $p = 0,15$ ).

Da eine Reaktivität gegenüber dem TAA p21 nur an wenigen Patienten untersucht werden konnte, und kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Peptid-spezifischer Memory T Zellen bei Patienten und gesunden Spendern vorlag, wurde p21 nicht ausgewählt.

### **6.11 Charakterisierung von Heparanase als neues TAA**

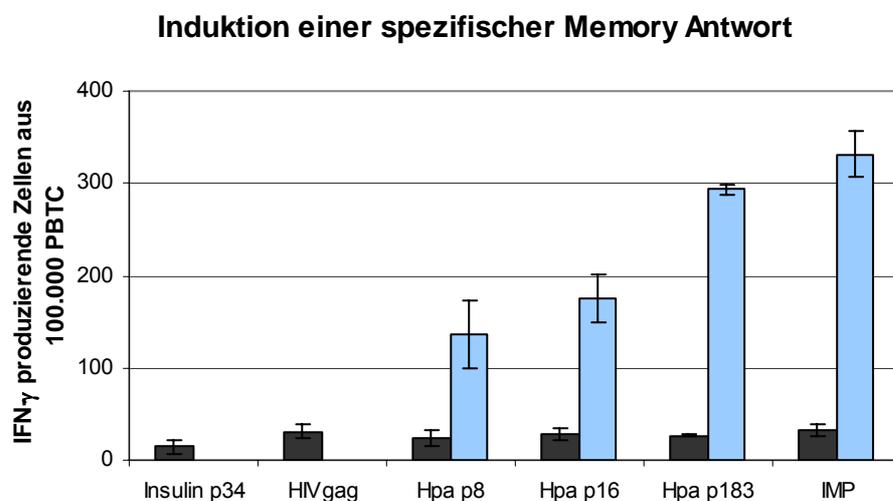
In dieser Arbeit wurde Heparanase als neues potentielles TAA charakterisiert. Untersuchungen über die Reaktivität natürlich entstandener Memory T Zellen bei Brustkrebspatienten zeigten, dass die neu definierten Peptide p8, p16 und p183 aus der ASS der Heparanase, verglichen mit anderen TAA, häufig zu einer Aktivierung spezifischer T Zellen führten (s. 6.8.5). Da sich bei gesunden Spendern deutlich seltener Reaktivitäten gegenüber Hpa Peptiden zeigten, könnte Hpa ein neues Tumor-relevantes TAA darstellen.

Anhand von histologischen Schnitten aus Tumorgewebe konnte gezeigt werden, dass Heparanase im Brusttumor überexprimiert wird [Vlodavsky, 1999]. Es gab in der Literatur jedoch keine Untersuchungen, ob im PB oder im KM von Patienten oder gesunden Spendern CD8+ T Zellen spezifisch für Peptide aus der Sequenz der Heparanase vorliegen. Um herauszufinden ob Hpa Peptide als mögliche neue T Zell Targets für eine DV geeignet sind, wurden weitere Untersuchungen über die Spezifität und das Vorkommen von Hpa spezifischen Memory T Zellen in vivo vorgenommen.

#### **6.11.1 Induktion von Heparanase spezifischer Immun-Reaktivität bei gesunden Spendern**

Um die spezifische Antwort in Form einer IFN- $\gamma$  Produktion, in ELISpot Analysen nach einer Stimulation mit Heparanase Peptiden zu verstärken, wurden T Zellen aus Buffy Coats aufgereinigt und vergleichend ein oder zweimal mit dem gleichen Peptid in Gegenwart von DC stimuliert und auf ihre Aktivierung gegen Hpa Peptide untersucht. Dabei zeigte sich in drei von sechs Fällen, nach zwei Stimulationen, eine höhere IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber allen drei Heparanase Peptiden, als nach nur einer Stimulation. Als Beispiel ist in Abb.32 die Analyse mit PBTC aus Buffy Coat 16 dargestellt. In dem dargestellten Fall wies keines der

Peptide nach einer Stimulation eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion verglichen mit der Hintergrundkontrolle auf. Nach einer zweiten Stimulation stieg die mittlere Spot Zahl / Well bei p8 von 23 auf 136, bei p16 von 29 auf 175, bei p183 von 27 auf 294 und bei IMP von 33 auf 332 an. Es war somit möglich in PBTC von gesunden Spendern eine Hpa Peptid spezifische IFN- $\gamma$  Produktion zu induzieren. Da Peptid-spezifische Antworten durch eine zweite Stimulation mit dem gleichen Peptid, verstärkt werden konnten, konnte die Aktivierbarkeit Hpa spezifischer T Zellen in der ELISpot Analyse nachgewiesen werden.



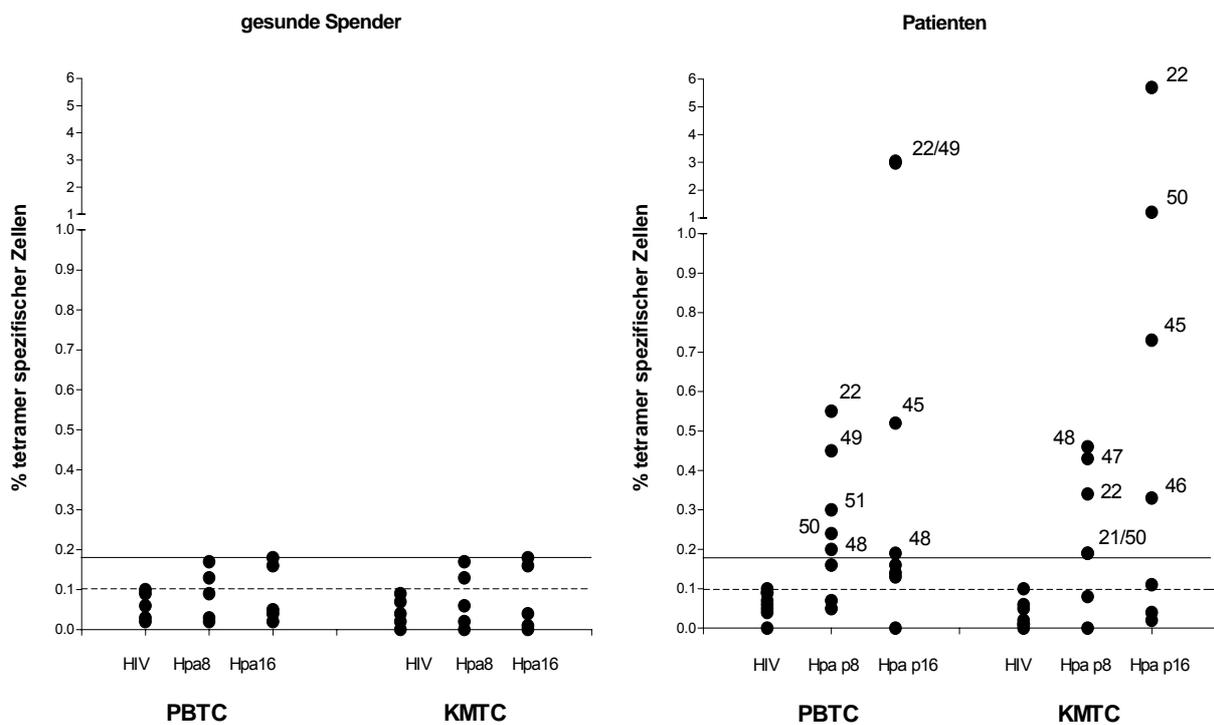
**Abbildung 32:** ELISpot Analyse mit einfacher (schwarz) und doppelter (blau) Stimulation der PBTC mit dem gleichen Peptid; Insulin p34 und HIVgag als Hintergrundkontrolle; IMP als Positivkontrolle; eine einfache Stimulation führte in gesunden Spendern nicht zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion; die Doppelstimulation führt zu einer Induktion einer spezifischen Memory Antwort gegenüber p8, p16, p183 und IMP.

### 6.11.2 Untersuchungen zum Heparanase spezifischen Memory Pool bei Patienten

Mit Hilfe von Tetrameren lassen T Zellen die einen spezifischen TCR für einen bestimmten Peptid-MHC-Komplex tragen anfärben, wie z.B. Heparanase spezifische T Zellen. Tetramere sind Komplexe bestehend aus vier MHC Molekülen, die mit einem beliebigen Peptid beladen sind. Diese Tetramere sind Fluoreszenz gekoppelt und können spezifisch an einen entsprechenden TCR binden.

PBTC und KMTC von neun Patienten (8x PBTC, 7x KMTC) und fünf gesunden Spendern (PBTC und KMTC) wurden mit Heparanase-Tetrameren gefärbt. In Abb.33 ist eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen zu sehen, wobei der prozentuale Anteil Tetramer

positiver T Zellen aus CD8+ T Zellen dargestellt wurde. Eine unspezifische Bindung des Tetramers an tote Zellen konnte mittels Propidium Jodid Färbung ausgeschlossen werden. Mittels eines Tetramers beladen mit HIVgag konnte die Höhe der unspezifischen Bindung an CD8+ Zellen detektiert werden. Diese überschritt nie 0,1% (in Abb.33 als gestrichelte Linie dargestellt). Bei gesunden Spendern lagen die höchsten gemessenen Werte für Heparanase spezifische Zellen bei 0,18%. Auf dieser Höhe ist in Abb.33 die zweite Schwelle als durchgezogene Linie eingezeichnet. Jeder der Patienten (siehe Nummern in Abb.33) dessen Zellen auf das Vorhandensein von Heparanase-Tetramer spezifischen Zellen untersucht wurden, zeigte in mindestens einem Fall, entweder für p8 oder p16, oder in PBTC oder KMTC, einen Wert der größer als 0,18% war. Damit ließen sich in allen getesteten Patienten Heparanase-Tetramer spezifische Zellen mit einem höheren prozentualen Anteil als bei gesunden Spendern nachweisen.

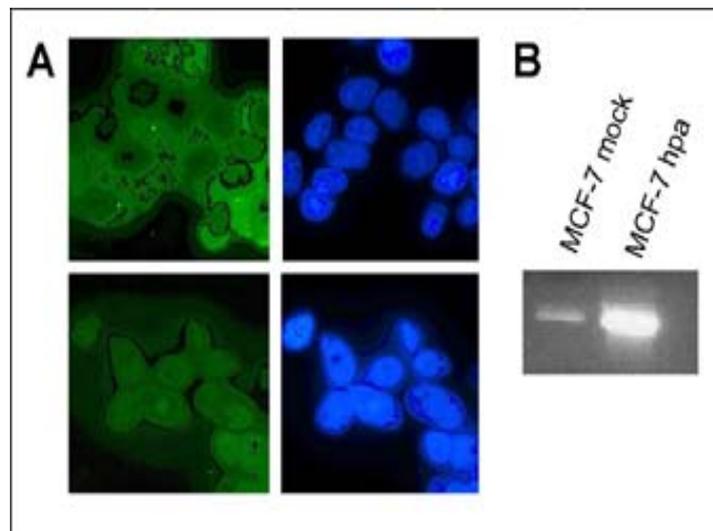


**Abbildung 33:** Tetramer Färbung Hpa spezifischer T Zellen aus gesunden Spendern und Patienten. Prozentualer Anteil der Tetramer spezifischen CD8+ T Zellen ist dargestellt; untere Schwelle: maximaler Anteil unspezifischer Reaktion gemessen mit HIVgag Tetramer bei 0,1%; obere Schwelle: maximaler Anteil CD8+ Tetramer spezifischer Zellen bei gesunden Spendern bei 0,18; die Nummern bezeichnen die Nummer der getesteten Patienten.

Das Vorhandensein von Heparanase Peptid-spezifischen T Zellen bei jedem hier getesteten Patienten weist auf eine starke Immunogenität dieses TAA hin. Dieser vorhandene Heparanase spezifische T Zell Pool scheint, aufgrund seines Fehlens bei gesunden Spendern, Tumor-induziert zu sein.

### 6.11.3 Nachweis von Heparanase Peptiden auf Tumorzellen

Um die Existenz der hier verwendeten Hpa Peptide in vivo zu belegen wurden zunächst Zelllinien benötigt, die sich nur durch die Expression von Heparanase unterscheiden. Die Tumorzelllinie MCF-7 wurde mit einem Vektor (hpa), der die Sequenz der Heparanase in sich trug, und mit einem leeren Vektor (mock), transfiziert [Vlodavsky, 1999].



**Abbildung 34:** Nachweis über die Hpa Expression in MCF-7hpa und MCF-7mock Zellen; **A)** oben: MCF-7hpa; unten: MCF-7mock; links: hp130 + Alexa 448; rechts: DAPI; **B)** die spezifische Bande für Heparanase in MCF-7hpa und MCF-7mock Zellen.

Die Expression von Heparanase in den Zellen, die mit dem Heparanase tragenden Vektor transfiziert wurden, war deutlich stärker, als in den Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden. Dies konnte mittels Fluoreszenzfärbung (Abb.34A) und PCR (Abb.34B) nachgewiesen werden. Durch eine DAPI Färbung waren die Zellkerne der gefärbten Zellen zu erkennen. Damit wird im Vergleich mit dem jeweils linken Photo die Existenz von Heparanase im Zytoplasma der MCF-7hpa Zellen im Vergleich zu den MCF-7mock Zellen verdeutlicht. Durch diesen deutlichen Unterschied in der Expression ließen sich diese beiden Zelllinien für Tests über die Heparanase spezifische Zytotoxizität einsetzen.

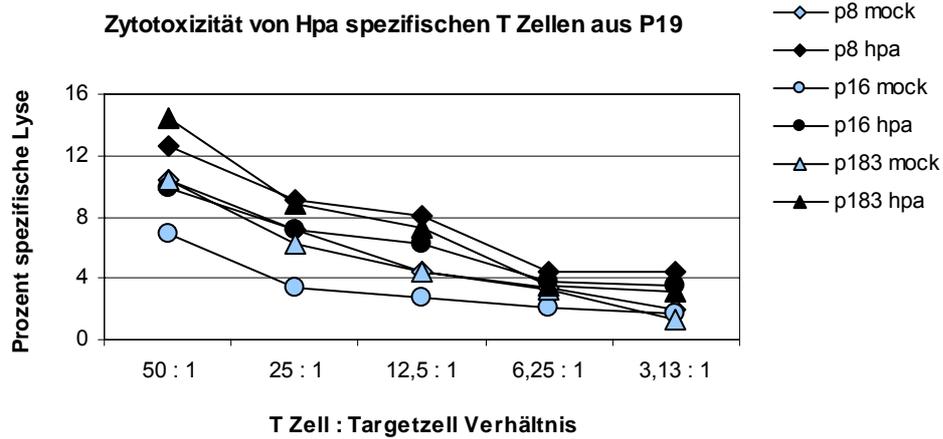
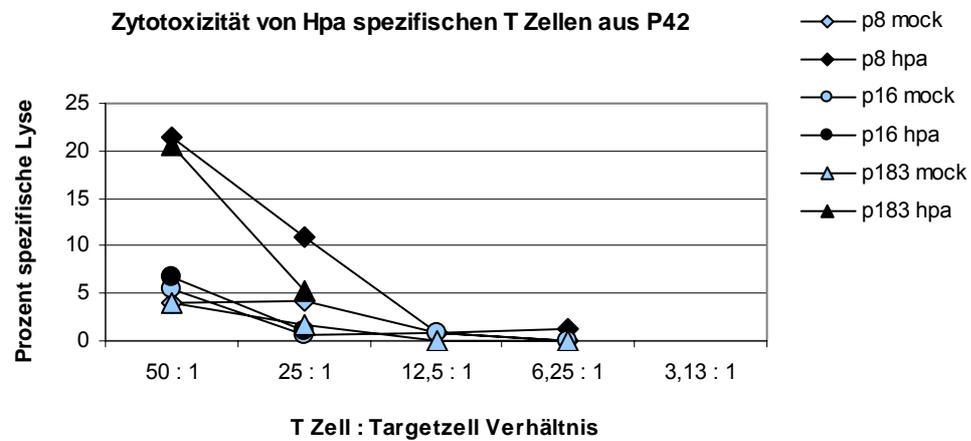
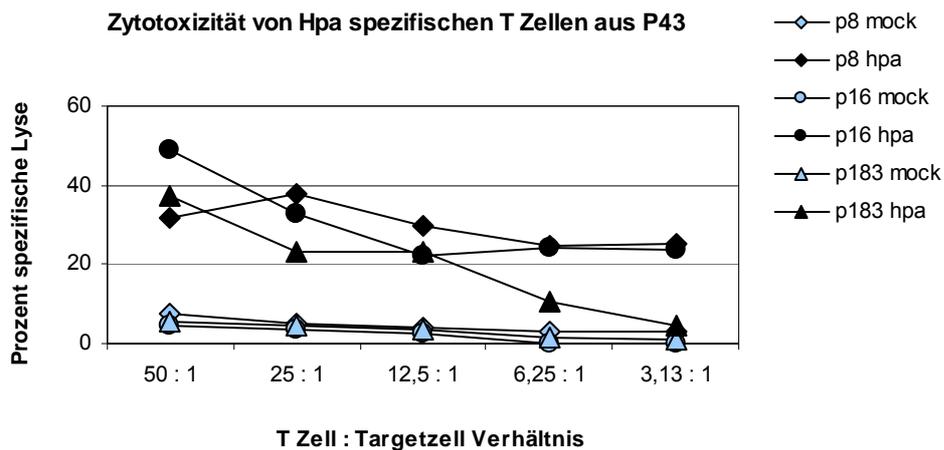
**A****B****C**

Abbildung 35: Zytotoxizität gegenüber MCF-7hpa und MCF-7mock Zellen; p8: KMTc vorstimuliert gegen Hpa p8 (Raute); KMTc vorstimuliert gegen Hpa p16 (Kreis); KMTc vorstimuliert gegen Hpa p183 (Dreieck); hellblaue Symbole: vorstimulierte KMTc getestet gegenüber MCF-7mock Zellen; schwarze Symbole: vorstimulierte KMTc getestet gegenüber MCF-7hpa Zellen; **A**) P19; STABWN <2; **B**) P42; STABWN <5; **C**) P43; STABWN <10.

Ob die hier definierten Peptide der Heparanase in vivo durch den Abbau der ASS durch das Proteasom tatsächlich entstehen und auf der Zelloberfläche den T Zellen präsentiert werden, kann anhand des *Chromium Release Assays* untersucht werden. Auch kann anhand dieser Analyse untersucht werden, ob spezifische T Zellen eine direkt lytische Funktion gegenüber der Tumorzelllinie besitzen. KMTc von Patienten wurden für 7d mit je einem der drei Peptide aus der Sequenz der Heparanase aktiviert und im Anschluss auf ihre lytische Aktivität gegenüber MCF-7hpa und MCF-7mock Zellen getestet (Abb.35). Eine stärkere Lyse der MCF-7hpa Zellen im Vergleich zu den MCF-7mock Zellen war bei 3 von 5 Patienten zu messen. Bei Patient P19 und P43 zeigte sich unabhängig mit welchem der drei Peptide die KMTc voraktiviert wurden eine spezifische Lyse der MCF-7hpa Zellen (Abb.35A; C). Bei P42 trat eine stärkere Lyse der MCF-7hpa Zellen nur auf, wenn die KMTc gegenüber p8 oder p183 vorstimuliert worden sind. Die gegen p16 vorstimulierten KMTc wiesen keine spezifische Lyse der MCF-7hpa Zellen auf (Abb.35B). Damit zeigt sich, dass in jedem Patienten ein individuelles Repertoire Peptid-spezifischer T Zellen gegenüber einem TAA besteht. Dies könnte bedeuten, dass eine Immunität bei den Patienten nur gegenüber tatsächlich individuell durch den Tumor präsentierten Epitopen induziert wird.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die hier untersuchten Peptide aus der ASS der Heparanase in vivo prozessiert und präsentiert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass im Memory Pool von Patienten CTL, spezifisch für diese Peptide, existieren. Heparanase stellt daher ein neues, interessantes TAA für eine Vakzinierung mit Peptiden bei Brustkrebspatienten dar.

## 6.12 Expression von TAA im Tumorgewebe

Tumorproben aus Brustkrebspatienten wurden auf die mRNA Expression von TAA getestet. Einem Tumorpool bestehend aus 20 Tumorproben und neun nicht im Pool enthaltene Einzel Proben (P3, P4, P8, P10, P15, P24, P29, P30 und P40) wurden mittels der RT-PCR Technik untersucht. Diese wurden gegenüber GAPDH normalisiert und gegenüber einer Referenz bestehend aus 10 Proben aus gesundem Brustgewebe betrachtet (s. Anhang). Dieselben Proben, außer P40, wurden auf einen eigens gespotteten Mikroarray mit verschiedenen TAA gegenüber der gesunden Referenz hybridisiert (s. Anhang). Die Expression der TAA gemessen in der RT-PCR und dem Mikroarray stimmte nicht überein. Auch konnte aufgrund der geringen Zahl kein Zusammenhang entdeckt werden zwischen der Immun-Reaktivität gegenüber einem bestimmten TAA und der Expression desselben TAA in der Tumorprobe des gleichen Patienten.

## 7 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob das Repertoire tumorspezifischer Memory T Zellen in Brustkrebspatienten starke Unterschiede aufweist. Auch sollte untersucht werden, ob sich die TAA in der Häufigkeit, in der sie eine Immun-Reaktivität in Patienten auslösen, unterscheiden und ob diese Reaktivität tumorspezifisch induziert ist. Weiter sollte untersucht werden, ob die Immun-Reaktivität mit der Expression der TAA im Tumorgewebe korreliert. Dazu wurden KMTC aus vielen Brustkrebspatienten auf ihre Reaktivität gegenüber mehreren TAA in einer Kurzzeit ELISpot Analyse, die für Memory T Zellen entwickelt worden war, getestet.

Aufgrund der geringen Zellzahlen war es nicht möglich, jedes TAA in jedem Spender zu testen. Daher konnten einige Antigene nur in einer verhältnismäßig kleinen Anzahl von Patienten und gesunden Spendern untersucht werden. Für einen Vergleich zwischen Expression und Immunogenität lagen ebenfalls zum Teil sehr geringe Patientenzahlen vor, zum Teil aufgrund des Fehlens von Tumorgewebe, oder aufgrund der fehlenden Analyse der Immun-Reaktivität. Damit konnte für viele TAA keine generelle Aussage über eine etwaige Korrelation getroffen werden.

### 7.1 Etablieren des immunologischen Testsystems

Als TAA eignen sich generell alle im Tumor differenziell exprimierten Proteine. Daher wurden für diese Arbeit nicht nur bereits bekannte Peptide aus TAA verwendet, sondern auch neu definierte Peptide aus TAA, die bei Brustkrebspatienten als überexprimiert beschrieben wurden. Ebenso wurden Peptide aus Antigenen, die sehr spezifisch im Brustgewebe synthetisiert werden, und gegenüber denen bisher keine Reaktivität von T Zellen beschrieben wurde, ausgesucht [Andersen, 2004; Ginger, 1999; Nagorsen, 2003; Van den Eynde, 1995; Parr, 2004; Tazebay, 2000; Vlodaysky, 2002; Mashino, 2001; Beech, 2002; Gimmi, 1996].

Damit Peptide von spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen erkannt werden können, müssen sie die Fähigkeit besitzen, an den MHC-Komplex auf der Zelloberfläche von APC zu binden. Von allen hier verwendeten Peptiden konnte gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit besitzen, an den HLA-A201 Komplex auf der Oberfläche von Zellen zu binden. Damit erfüllen sie alle die Grundvoraussetzung für weitere immunologische Untersuchungen.

Durch den Abbau der von der Zelle synthetisierten Proteine im Zytoplasma durch Proteasomen entstehen Peptide. Diese Peptide werden über den TAP-Transporter in das ER befördert und dort an MHC-I Komplexe gebunden. Diese MHC-I Komplexe werden an die Oberfläche transportiert und können dort die Fragmente der in der Zelle prozessierten Proteine T Zellen präsentieren. Proteasomen können ASS nicht an jeder beliebigen Stelle zerschneiden. Daher entstehen nicht alle theoretisch denkbaren Peptide einer ASS in vivo. Auch können nicht alle entstehenden Peptide an jeden beliebigen MHC-Komplex binden. Von den bereits in der Literatur beschriebenen Peptiden war bekannt, dass sie tatsächlich beim Abbau der ASS entstehen und über HLA-A201 präsentiert werden können. Von den in dieser Arbeit neu definierten Peptiden war nicht bekannt, ob sie in vivo tatsächlich entstehen und über HLA-A201 präsentiert werden können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Brustkrebspatienten gegenüber wenigen, individuell unterschiedlichen Peptiden aus TAA, ein T Zell Memory zeigen, oder ob es Peptide gibt, die in vielen Patienten zu einer Aktivierung spezifischer T Zellen führen. Dazu wurde eine Analyse benötigt, die es erlaubt, möglichst viele Peptide zu untersuchen. Peptide können, wie Lysate oder Proteine, in ELISpot Analysen eingesetzt werden [Schmittl, 1997]. In den meisten Ansätzen wird das Peptid jedoch zu der PBMC Population in den Ansatz gegeben. Da in dieser gemischten Zellpopulation nicht nur zytotoxische CD8+ T Zellen die Fähigkeit haben IFN- $\gamma$  zu sezernieren, sondern NK Zellen ebenfalls, ist aus einer gemischten Population die genaue Anzahl spezifischer T Zellen nicht abzuleiten. Durch eine Aufreinigung der Zellpopulationen kann dies erreicht werden [Scheibenbogen, 2000].

In dieser Arbeit konnten Reaktivitäten von aufgereinigten Zellpopulationen gegenüber Proteinen und Peptiden in ELISpot Analysen direkt miteinander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass mit aufgereinigten T Zellen und aufgereinigten autologen DC eine IFN- $\gamma$  Produktion gegen TAA erreicht werden kann, die mit einer Memory Reaktion gegen das IMP Peptid des Influenza Virus oder gegen Tetanus Toxoid vergleichbar ist.

In den ELISpot Analysen wurden zwei unterschiedliche Hintergrundkontrollen eingesetzt. Zum einen das bereits bekannte Peptid HIVgag gegen das keine spezifischen Memory T Zell Reaktivitäten existieren sollte, da alle Spender HIV negativ waren. Bei dem zweiten Peptid handelte es sich um eine Sequenz aus dem humanen Insulin (Insulin p34). Gegenüber diesem autologen Peptid sollten ebenfalls keine Memory T Zellen existieren. Die Reaktivitäten gegenüber beiden Kontroll Peptiden waren in der Regel vergleichbar, wie in der exemplarisch dargestellten ELISpot Analyse von Patient P37 zu sehen ist. Eventuell auftretende unspezifische Reaktivitäten gegenüber einem der beiden Peptide wurde

versucht auszugleichen, indem die Werte beider Hintergrundkontrollen als Referenz für die Ermittlung der Signifikanz verwendet wurden.

## 7.2 Vergleich verschiedener Stimulatorzellen

T Zell Antworten gegenüber einzelnen Peptiden können schwächer ausfallen als gegenüber kompletten Proteinen, da die Antwort z.B. von CD8+ T Zellen mit einer Spezifität für ein gegebenes Epitop limitiert ist. Bei Analysen von Reaktivitäten gegenüber Lysaten werden sehr viele unterschiedliche Epitope den T Zellen präsentiert, wodurch eine spezifische Aktivierung vieler unterschiedlicher T Zellen möglich ist. Aufgrund der geringen Anzahl CD8+ spezifischer T Zellen gegenüber einem einzelnen Peptid ist es daher wichtig, die Stimulation dieser wenigen spezifischen T Zellen zu optimieren.

In dieser Arbeit wurde daher getestet, ob sich die Effektivität der Stimulation durch Peptid-beladene DC verstärken ließ, wenn anstelle „ unreifer“ DC „ reife“ DC verwendet wurden. Reife DC weisen mehr kostimulatorische Signale auf als „ unreife“ DC. Es zeigte sich, dass DC beladen mit IMP Peptid mit beiden DC zu einer ähnlich erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion von T Zellen führten. In Ansätzen mit „ reifen“ DC zeigte sich zwar eine höhere Spotzahl, diese war aber auch bei den Hintergrundkontrollen zu sehen. Daher führten „ reife“ DC zwar zu einer Verstärkung der Peptid-spezifischen Reaktivität, nicht jedoch zu einem größeren Unterschied zwischen Test-Gruppen und Hintergrundkontrollen. Somit war es nicht notwendig, für die hier vorgenommenen Memory Analysen die verwendeten DC auszureifen.

Die Anzahl der generierten DC je Spender limitierte die Anzahl testbarer Peptide. Eine Tumorzelllinie als Stimulatorzellen könnte die Zahl der zu testenden Peptide je Spender erhöhen, da Tumorzellen beliebig zu expandieren sind. Daher wurde die Fähigkeit, T Zellen zu einer Peptid-spezifischen IFN- $\gamma$  Produktion anzuregen von T2 Tumorzellen, einer humanen lymphoiden Zelllinie die einen nicht funktionsfähigen TAP enthält, mit DC verglichen. T2 Tumorzellen wurden bereits von anderen Gruppen in ELISpot Analysen eingesetzt [Griffioen, 2001; Sun, 2000]. T2 Zellen führten, wie auch bereits in der Literatur beschrieben [Britten, 2002] zu einem sehr hohen unspezifischen Hintergrund, sodass die Spots zum Teil nicht mehr zählbar waren. Daher konnten DC in den hier durchgeführten Analysen nicht durch T2 Zellen ersetzt werden.

Die Zelllinie K562, aus Zellen einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie entwickelt, exprimiert weder MHC-I, MHC-II, CD80 oder CD86 Oberflächenmoleküle [Britten, 2002]. In der Gruppe von Prof. Herr wurden die K562 Zellen mit dem Gen des HLA-A201 Komplexes transfiziert. Diese konnten dann in ELISpot Analysen als Stimulatorzellen verwendet werden

[Britten, 2002]. In eigenen Versuchen mit PBTC aus Buffy Coats und KMTC aus Patienten zeigte sich jedoch, dass mit K562/A\*0201 Zellen, auch wenn eine zusätzliche Kostimulation mit anti-human CD28 Antikörper vorgenommen wurde, nicht die gleiche Sensitivität der Analyse wie mit DC als APC erreicht werden konnte. Daher stellten für die hier durchgeführten Analysen autologe DC die zuverlässigsten APC dar.

Ein Vergleich der hier generierten Ergebnisse zur Immunogenität einzelner TAA mit Daten aus der Literatur war schwierig, da kein einheitliches Protokoll für ELISpot Analysen verwendet wurde. So wurden in anderen Arbeiten z.B. nicht aufgereinigte PBMC verwendet [Arlen, 2000; Nagorsen, 2003; Andersen, 2004]. Oft wurde die Reaktivität auf eine Kontrollgruppe aus PBMC ohne Kontrollpeptid bezogen [Andersen, 2004]. Auch galten unterschiedliche Signifikanzniveaus, z.B. p-Wert  $<0,06$  als erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion [Arlen, 2000]. In anderen Fällen wurde die Spot Zahl der Kontrolle abgezogen. Wenn der Mittelwert der verbleibenden Spotzahl  $\pm 1/2$  Standardabweichung  $>25$  war [Andersen, 2004] galt die IFN- $\gamma$  Produktion als erhöht. In einer anderen Studie galten Patienten mit einer spezifischen Spotzahl größer 1 aus 200 als positiv [Arlen, 2000]. In dieser Arbeit wurden Reaktivitäten nur dann gegenüber Peptiden als signifikant erhöht gewertet, wenn der p-Wert  $<0,05$  in Bezug auf eine kombinierte Hintergrundkontrolle aus Insulin p34 und HIVgag war.

### 7.3 Spezifische T Zellen aus dem Knochenmark

Bisherige Untersuchungen zum TAA spezifischen Memory Pool von Brustkrebspatienten wurden, mit Ausnahme einer Untersuchung zu Her2/neu und MUC-1 [Feurerer, 2001a], immer anhand von T Zellen aus dem peripheren Blut vorgenommen. Da gezeigt werden konnte, dass im Knochenmark von Patienten mehr tumorspezifische T Zellen vorliegen können [Feurerer, 2001b], wurde in dieser Arbeit der tumorspezifische T Zell Memory Pool von Brustkrebspatienten im Knochenmark untersucht. Damit die Reaktivitäten bei gesunden Spendern mit den Reaktivitäten bei Patienten möglichst gut zu vergleichen waren, wurden auch die Analysen der gesunden Spender mit T Zellen aus dem Knochenmark durchgeführt. Eine vergleichbare Analyse von Immun-Reaktivitäten gegenüber einer großen Bandbreite unterschiedlicher TAA von KMTC von Patienten wie auch von gesunden Spendern liegen in der Literatur bisher nicht vor.

### 7.3.1 Unterschiede in der Reaktivität von T Zellen aus Patienten und gesunden Spendern

Anhand der hier untersuchten Spender ließ sich eine signifikant ( $p < 0,01$ ) stärkere Reaktivität von KMTC aus Patienten gegenüber KMTC aus gesunden Spendern gegenüber TAA darstellen. Dieser Unterschied zeigte sich nicht bei einem Vergleich der Reaktivität gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen. Auch erwies sich die Anzahl TAA spezifischer T Zellen bei Patienten, verglichen mit der Anzahl spezifischer T Zellen gegen nicht Malignitäts-assoziierte Antigene, als „niedrig signifikant“ ( $p = 0,09$ ) größer. Damit könnte tatsächlich eine Induktion der Immun-Reaktivität durch den Tumor vorliegen. Die in diese Untersuchung einbezogenen gesunden Spender waren, wie die Patientinnen, weiblich und bereits nach der Pubertät. Gemessene Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Spendern sollten daher nicht auf geschlechtsbezogene Unterschiede in beiden Gruppen zurückgeführt werden.

Die gemessenen Reaktivitäten waren jedoch nicht gegenüber allen TAA gleich stark. In einigen Fällen, wie z.B. bei Kasein, LAGE oder p21 zeigte sich bei Patienten und gesunden Spendern eine vergleichbar häufige Reaktivität. Diese kann daher nicht durch die Immunogenität des bei Patienten existierenden Tumors entstanden sein. Eine unspezifische Reaktivität von KMTC aus gesunden Spendern kann jedoch ausgeschlossen werden, da auch für diese Untersuchungen die gleiche Hintergrundkontrolle, DC beladen mit Insulin p34 und HIVgag Peptid, verwendet wurde. Auch handelte es sich bei den Reaktivitäten bei gesunden Spendern ebenso um Memory T Zell Antworten, da in der hier verwendeten Kurzzeit Analyse ausschließlich Memory Antworten abgefragt wurden.

Eine Unterscheidung zwischen tumorspezifischer Reaktivität und autoimmuner Reaktivität ist sehr schwer, da es sich bei vielen der hier untersuchten Tumor-assoziierten Antigenen um autologe Antigene handelt, die sowohl in gesunden Spendern als auch in Patienten exprimiert werden. In der Regel weisen die Antigene nur Unterschiede in der Expressionsstärke auf. Reaktivitäten gegen TAA, die bei gesunden Spendern gemessen wurden, sind ebenfalls Antigen spezifische Reaktivitäten, da auch hier ausschließlich Memory Immun-Reaktivitäten gemessen worden sind. Diese spezifischen Reaktivitäten gegenüber TAA in gesunden Spendern könnten auf zufällig entstandenen Autoimmun-Reaktionen gegenüber diesem Antigen basieren. Das Immunsystem kann autoreaktive Zellen nicht zu 100% eliminieren. Memory Reaktivitäten gegenüber TAA bei gesunden Spendern könnten durch andere vorangegangene Krankheiten, z.B. Entzündungen im Gewebe entstanden sein. Durch eine permanente Existenz der Antigene mit geringen Konzentrationen im Gewebe könnte dann dieses antigenspezifische Memory bestehen

bleiben. Eine andere Möglichkeit wäre eine Kreuzreaktivität, wenn T Zellen spezifisch für virale oder bakterielle Epitope ebenfalls eine Spezifität gegenüber TAA Epitopen aufweisen [Pittet, 2002].

### **7.3.2 T Zell Repertoire von Brustkrebspatienten**

Wie gezeigt werden konnte, war das tumorspezifische T Zell Repertoire aus dem Knochenmark von Brustkrebspatienten individuell unterschiedlich. Die Patienten reagierten alle gegen unterschiedliche TAA und auch gegen unterschiedlich viele TAA. 68% der Patienten reagierten gegenüber mindestens einem der zufällig ausgewählten TAA. Bei 13 von 41 Patienten (32%) wurde gegenüber keinem der getesteten TAA eine spezifische T Zell Antwort gemessen. Dies könnte darauf beruhen, dass der Tumor dieser Patienten keine Immunogenität aufwies, oder aber darauf, dass „die falschen“ TAA getestet wurden. Es war nicht möglich alle TAA in allen Patienten zu testen, sondern in jedem Patienten wurde nur eine zufällige Auswahl (Tab. s. Anhang) untersucht. Patienten, in denen eine spezifische T Zell Reaktivität zu finden war, reagierten gegenüber unterschiedlichen Peptiden. So zeigte sich für jeden getesteten Patienten ein individuelles Muster des natürlich existierenden tumorspezifischen T Zell Repertoires. Allerdings führten manche TAA in deutlich mehr Patienten zu einer Reaktivität als andere. Damit erwiesen sich einige TAA als „bessere Antigene“ als andere. Auch kann die Qualität der TAA daran gemessen werden, ob auch in gesunden Spendern eine T Zell Reaktivität auftritt. Tumor-relevante Antigene sind dabei nur Antigene, die einen klaren Unterschied in der Reaktivität von KMTC aus Patienten und gesunden Spendern zeigten. Im Folgenden werden nun alle TAA im Einzelnen besprochen (7.5; 7.7).

### **7.4 Auswahl von Tumor-abhängigen Antigenen**

Generell kann man zwischen „individuellen“ Tumor-assoziierten Antigenen, die in Patienten durch unterschiedliche Mutationen entstehen können, und „gemeinsamen“ Tumor-assoziierten Antigenen unterscheiden. Gegenüber individuellen im Tumor veränderten Epitopen aus Antigenen können stärkere Immun-Reaktivitäten bestehen, da T Zellen spezifisch für diese Epitope nicht bei der selektiven Depletion im Thymus entfernt werden. Diese Antigene sind daher individual Tumor-spezifisch. Da sie bei jedem Patienten individuell entstehen sind sie schwer zu identifizieren [Gilboa, 1999]. In dieser Arbeit wurden ausschließlich „gemeinsame“ Antigene, das bedeutet Antigene aus der „Wildtyp“ Sequenz,

die allen Patienten gemeinsam ist, verwendet. Der Vorteil dieser Antigene ist, dass sie nicht für jeden Patienten individuell identifiziert werden müssen. Der Nachteil besteht in einer relativ geringen Affinität der spezifischen T Zellen gegenüber diesen autologen Antigenen. T Zellen mit einer starken Affinität gegenüber diesen Antigenen werden in der Regel im Thymus eliminiert.

In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Immunogenität verschiedener TAA und in der Reaktivität des T Zell Repertoires bei Patienten gibt. Damit wäre es für eine optimal dem Patienten angepasste DV sinnvoll, die Reaktivität des T Zell Repertoires jedes einzelnen Patienten zu überprüfen. Aufgrund limitierender Zellzahlen ist eine Überprüfung aller bekannten TAA nicht möglich. Jedoch wäre es möglich die natürlich existierende individuelle Reaktivität jedes Patienten gegenüber einer Auswahl an TAA zu testen. Dafür ist es notwendig eine Auswahl Tumor-relevanter Antigene zu finden, gegen die häufig eine Immun-Reaktivität auftritt und die im Tumorgewebe exprimiert werden.

Von den in dieser Arbeit untersuchten TAA wurden zehn als Brusttumor-relevant ausgewählt (BA46, CEA, Her2/neu, hNIS, Hpa, MAGE-2, MUC-1, PH20, PSA und p53). Dabei spielte der Unterschied in der Häufigkeit der Immun-Reaktivität bei Patienten und gesunden Spendern, der Unterschied in der Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen bei Patienten und gesunden Spendern, die Gewebespezifität des Antigens und die Häufigkeit der Expression im Brusttumorgewebe eine Rolle.

Die übrigen acht untersuchten TAA (Bcl-2, Cyclin-D1, Ep-CAM, GAGE, HGF, Kasein, LAGE-1 und p21) wurden nicht ausgewählt. Außer Ep-CAM und HGF zeigte sich auch bei diesen Antigenen eine häufigere Immun-Reaktivität in Patienten verglichen zu gesunden Spendern. Jedoch erwies sich die Anzahl der spezifischen T Zellen gegenüber allen acht TAA bei Patienten als nicht signifikant größer als bei gesunden Spendern. Gegen Ep-CAM und HGF zeigte sich eine häufigere Immun-Reaktivität bei gesunden Spendern als bei Patienten.

Die hier getroffene Auswahl an Antigenen sollte aufgrund der zum Teil geringen Spenderzahlen als vorläufiger Vorschlag betrachtet werden. Auch könnten sich durch weitere Untersuchungen manche der nicht ausgewählten TAA doch als interessante TAA für Brusttumorkranken erweisen. Auch wäre es möglich, dass bei Patienten mit anderen Tumoren Antigene, die hier nicht ausgewählt wurden, sich als relevante TAA erweisen.

## 7.5 Zusammenfassende Beurteilung der ausgewählten Antigene

### 7.5.1 Lactadherin

BA46 spezifische T Zell Reaktivitäten waren für alle drei zuvor beschriebenen Peptide [Carmon, 2002], bei Patienten (p97 36%; p131 37%; p194 47%) häufiger als bei gesunden Spendern (p97 20%; p131 0%, p194 33%) zu finden. Auch zeigte sich gegenüber p97 und p131 eine signifikant ( $p = 0,01$ ) größere Anzahl an Peptid-spezifischen T Zellen bei Patienten. Aufgrund der stärkeren Immun-Reaktivität in Patienten verglichen mit gesunden Spendern erwies sich BA46 als Tumor-abhängiges TAA.

Es konnte gezeigt werden, dass das murine MFGE8 und das humane BA46, die eine 76% Übereinstimmung der cDNA und eine 57% Übereinstimmung in der Proteinsequenz [Carmon, 2002] aufweisen, an Integrine auf apoptotischen Zellen binden können. MFGE8 bindet an das  $\alpha_v\beta_3$  Integrin, wodurch Makrophagen zur Phagozytose dieser apoptotischen Zellen aktiviert werden können [Hanayama, 2002]. BA46 kann an das  $\alpha_v\beta_5$  Integrin apoptotischer Zellen binden und somit DC zu Opsonisierung dieser toten Zellen aktivieren [Akakura, 2003]. Aktivierte Phagozyten können über kostimulatorische Moleküle und Zytokinausschüttung zu einer primären Aktivierung von T Zellen beitragen. Es ist anzunehmen, dass diese Phagozyten BA46 Peptide in ihren MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche präsentieren, da BA46 Moleküle, gebunden an die apoptotischen Zellen, mit aufgenommen wurden. Auf diesem Wege könnten BA46 spezifische T Zellen indirekt von einem BA46 sezernierenden Tumor induziert werden. So könnte die starke Immun-Reaktivität gegen BA46 erklärt werden.

### 7.5.2 Carzino-Embryonales Antigen

CEA ist ein Glykoprotein, das während der Embryonalentwicklung in Organen des Verdauungstraktes exprimiert wird. Da es nicht bei gesundem Gewebe von Erwachsenen, aber in vielen Tumoren exprimiert wird, ist CEA ein geeignetes Ziel für Immuntherapien [Arlen, 2000]. Hier konnte gegenüber beiden untersuchten Peptiden, dem neu definierten p106 und dem bereits beschriebenen p694 [Schirle, 2000] eine Reaktivität von KMTC aus Brustkrebspatienten nachgewiesen werden. Gegenüber p694 zeigten 42% eine Immun-Reaktivität, gegenüber p106 33%. Die Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen war jedoch im Mittel nur für p106 bei Patienten gegenüber gesunden Spendern signifikant erhöht ( $p = 0,05$ ). Somit zeigte sich gegenüber dem hier neu definierten Peptid p106 eine stärker Tumor-

abhängige Immun-Reaktivität bei Patienten als gegenüber dem bereits bekannten Peptid p694.

In der Literatur wurde in PBMC aus keinem von 20 untersuchten Brustkrebspatienten, jedoch aus 12% der untersuchten Colonkarzinompatienten eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion gegenüber CEA p571 beschrieben [Nagorsen, 2003]. Dass in dieser Arbeit gegenüber p106 und p694 Reaktivitäten gemessen werden konnten, könnte an der Peptidwahl oder an der sensitiveren Analyse-Methode mit aufgereinigten Zellpopulationen liegen. Eine andere Ursache könnte in der höheren Reaktivität der hier verwendeten KMTC bestehen.

CEA Peptide wurden bereits in DV eingesetzt. Es entwickelte sich bei 4 von 7 Patienten mit Gastrointestinaltumoren [Matsuda, 2004] und bei 7 von 10 Patienten mit Colonkarzinom [Liu, 2004] eine erhöhte spezifische CTL Antwort durch eine Vakzinierung mit CEA, ohne dabei zu starken Nebenwirkungen zu führen. Damit scheinen Peptide aus dem TAA CEA geeignete Kandidaten für den Einsatz in einer DV zu sein. In Brustkrebspatienten scheint aufgrund der stärkeren Tumorspezifität das Peptid p106 geeigneter zu sein als das bereits beschriebene p694. Jedoch sollte zuvor ein Nachweis über die tatsächliche Existenz von p106 in vivo und dessen Präsentation auf MHC-Komplexen erbracht werden.

### 7.5.3 Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor-2

Her2/neu ist eines der am besten untersuchten TAA in Brustkrebspatienten. Das hier verwendete Peptid p369 wurde bereits zuvor beschrieben [Fisk, 1995]. In den hier untersuchten Proben zeigte sich eine deutliche Tumorspezifität des p369 Peptides, da keiner der gesunden Spender eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung in der ELISpot Analyse zeigte. Die Anzahl der Patienten mit spezifischen Zellen im Knochenmark war mit 14% allerdings gering. Trotzdem wiesen die Patienten im Mittel eine signifikant größere Anzahl Peptid-spezifischer Zellen ( $p = 0,05$ ) verglichen mit gesunden Spendern auf. In der Literatur wurde nur von 5% Brustkrebspatienten mit natürlich vorkommenden spezifischen T Zellen im PB berichtet [Disis, 2002]. Der Unterschied in der Reaktivität könnte an der generell stärkeren Reaktivität der hier verwendeten KMTC liegen.

Das Peptid p369 aus dem TAA Her2/neu wurde bereits für Vakzinierungen eingesetzt. In ihnen konnten spezifische T Zellen bei 50% bzw. 90% der Patienten induziert werden, ohne Nebenwirkungen auszulösen [Brossart, 2000; Disis, 2002]. Die Existenz von Her2/neu p369 spezifischen T Zellen im KM von Brustkrebspatienten konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden [Feurerer, 2001a]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich Her2/neu für den Einsatz

in DV eignet. Jedoch sollte aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, die eine spezifische Reaktivität gegenüber p369 aufweisen, dieses Peptid in Kombination mit andern TAA verwendet werden.

#### **7.5.4 Humaner Natrium / Jod Symporter**

Das hNIS sorgt in der Schilddrüse und der laktierenden Brust für den aktiven Jod Transport, angeschlossen an den Natrium Gradienten, mit einer 2 : 1 / Natrium : Jod Stöchiometrie. Es zeigte sich in immunhistologischen Färbungen, dass über 80% der untersuchten Brusttumor Proben hNIS exprimierten [Tazebay, 2000]. In Tumoren der Schilddrüse, die in gesundem Zustand hNIS exprimiert, wiesen eine geringere oder einen totalen Verlust der hNIS Expression auf [Filetti, 1999]. Der hNIS wurde in der Literatur zuvor nicht als TAA beschrieben, und es lagen auch keine Untersuchungen über eine Immun-Reaktivität gegenüber hNIS vor. Das neu definierte Peptid p445 löste eine spezifische Reaktivität aus, die allerdings bei einer vergleichbaren Anzahl von Patienten (20%) und gesunden Spendern (14%) auftrat. Die Anzahl spezifischer T Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern ( $p = 0,14$ ).

Aufgrund der Gewebespezifität erscheint hNIS trotz der geringen Immunogenität dennoch als ein geeignetes TAA für eine Therapie von Brusttumoren. Zuvor sollte jedoch sichergestellt werden, dass hNIS p445 in vivo prozessiert und präsentiert wird.

#### **7.5.5 Heparanase**

Damit Tumorzellen aus der Tumormasse auswandern können, wodurch die Bildung von Metastasen unterstützt wird, müssen sie die Fähigkeit besitzen, Makromoleküle der BM und anderer ECM, die als physikalische Barrieren dienen, zu degradieren. Die Hauptkomponenten der ECM sind Proteine, u. a. Kollagene, Laminin und Fibronectin, sowie Glykosaminoglykane, zum größten Teil Heparansulfat Proteoglykan (HSPG). HSPG besteht aus einem Protein, an das kovalent Heparansulfat Seitenketten gebunden sind, die mit verschiedenen in der ECM eingebetteten Molekülen, wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen, in Kontakt stehen. ECM degradierende Enzyme sind z.B. Serin Proteasen, Cystein Proteasen, Matrix Metalloproteasen und Heparanase [Vlodavsky, 2001]. Heparanase wurde parallel von zwei Gruppen aus humaner Plazenta [Vlodavsky, 1999] oder aus aktivierten Maus T Lymphomzellen und aus metastasierendem Adenokarzinom der Ratte [Hulett, 1999] identifiziert und sequenziert. Heparanase zeigt keinen Gen-

Polymorphismus. Daher dürfte dieses Enzym die relevante Heparansulfat-endo-Glukuronidase in Säugetieren darstellen. Sie zerschneidet die linearen Heparansulfat Polymere zwischen den  $\beta$ 1-4 Bindungen der D-Glukosamine unter Einbau von Wasser [Vlodavsky, 2001]. Durch die Freisetzung der in die ECM eingebetteten Moleküle spielt die Degradierung des HSPG nicht nur für Invasion und Metastasierung, sondern auch für die Angiogenese eine wichtige Rolle.

Aufgrund der pro-invasiven und pro-metastasierenden und Angiogenese fördernden Funktion der Heparanase exprimieren vielen epitheliale Tumore, z.B. Brust-, Kolon-, Lunge-, Prostata-, Ovarial- und Pankreastumore, vor allem metastasierende Formen, Heparanase [Hulett, 1999; Vlodavsky, 2002]. Aufgrund ihres Monomorphismus und aufgrund der Expression in metastasierenden Zellen stellt Heparanase ein ideales Target für Immuntherapien dar. In der Literatur liegen bisher keine Studien über Memory T Zellen mit Spezifität für Heparanase Peptide vor. Es wurden hier drei Peptide aus der Sequenz der Heparanase neu definiert. Zwei der drei untersuchten Peptide führten zu einer Reaktivität bei Patienten (p8 14%; p16 24%; p183 29%) die stärker war als die bei gesunden Spendern (p8 25%; p16 13%; p183 0%). Eine signifikant größere Anzahl an Peptid-spezifischen Zellen bei Patienten verglichen zu gesunden Spendern zeigte sich nur gegen p183 ( $p = 0,02$ ). Bei einer Kalkulation der ELISpot Analysen ausschließlich gegenüber der Hintergrundkontrolle Insulin p34 zeigte sich diese Signifikanz auch für p16 ( $p = 0,01$ ).

Eine Überexpression von Heparanase kann zu einem höheren metastasierenden Potential von Tumorzellen führen [Marchetti, 2001; Vlodavsky, 1999; Hulett, 1999]. Bei den hier untersuchten Patienten zeigte sich, dass eventuell ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der Immun-Reaktivität gegenüber Heparanase bestehen könnte. Die Tumore der hier untersuchten Patienten wurden in 55% der Fälle Tumorstadium-II zugewiesen, die übrigen zeigten Tumorstadium-I. Jedoch wiesen 66% der Patienten, die eine Immun-Reaktivität aufwiesen, Tumore des Stadium-II auf. Tumore in Stadium-I weisen, im Gegensatz zu Tumoren mit Stadium-II, keine Invasion von Tumorzellen in die drainierenden Lymphknoten auf. Eine Immun-Reaktivität könnte u. U. eine Dissemination von Tumorzellen aus dem Primärtumor voraussetzen. Diese Hypothese sollte jedoch an einer größeren Anzahl von Patienten überprüft werden.

Die hohe Immunogenität der Heparanase und ein eventueller Zusammenhang zwischen Immun-Reaktivität und Tumorstadium lässt sich unter Umständen über die Funktion eines der entstehenden Enzym-Produkte erklären. Das entstehende Heparansulfat kann an DC binden und führt zur phänotypischen Ausreifung von DC. Das kann zu einer primären Aktivierung von T Zellen führen [Kodaira, 2000]. Damit könnte der metastasierende Tumor

das Immunsystem in Gegenwart von Heparanase am Ort des freigesetzten Heparansulfates aktivieren, wodurch eine Tumor-abhängige Induktion von Heparanase spezifischen T Zellen erklärt werden könnte.

#### 7.5.5.1 Heparanase als neues TAA

Aufgrund der beobachteten starken Immunogenität des neuen TAA wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Qualität der Heparanase als TAA genauer zu definieren. Tetramer Färbungen von PBTC und KMTC von Patienten und gesunden Spendern mit Hpa spezifischen Tetrameren zeigten, dass in jedem untersuchten Patienten mehr spezifische Zellen angefärbt werden konnten als bei gesunden Spendern. Dies belegt die Existenz von T Zellen mit einem TCR spezifisch für Hpa Peptide im natürlich vorkommenden Memory T Zell Repertoire von Patienten. Die Anzahl der spezifischen Zellen, die hier gemessen wurden, lag zwischen 0,0% und 5,7% der CD8+ T Zellen. Damit zeigte sich gegenüber Heparanase eine größere Anzahl an spezifischen Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut von Brustkrebspatienten, als gegenüber Her2/neu (maximal 2,1%) und MUC-1 (maximal 0,09%) [Feuerer, 2001a].

In ELISpot Analysen, bei denen PBTC aus Buffy Coats zweimal mit dem gleichen Hpa Peptid stimuliert worden waren, ließ sich die Frequenz der spezifisch gegenüber Hpa reagierenden T Zellen erhöhen. Dies zeigte, dass die mit KMTC aus Patienten gemessenen Reaktionen in ELISpot Analysen gegenüber Hpa Peptiden wahrscheinlich nicht auf Kreuzreaktionen zurückzuführen sind, sondern tatsächlich auf T Zellen mit einer Spezifität für Heparanase.

Da die Peptidsequenzen theoretisch ermittelt wurden, war nicht bekannt, ob Heparanase in lebenden Zellen vom Proteasom so geschnitten wird, dass die hier definierten Peptidsequenzen entstehen. Um zu überprüfen, ob diese Peptidsequenzen in vivo präsentiert werden, wurden zunächst Zelllinien benötigt, die sich nur in der Expression der Heparanase unterscheiden. Wie über PCR und Fluoreszenzfärbung zu erkennen war, traf dies auf die beiden transfizierten MCF-7 Zelllinien, MCF-7mock und MCF-7hpa zu. Im *Chromium release Assay* konnte gezeigt werden, dass mit Hpa Peptid spezifisch voraktivierte T Zellen in der Lage waren, MCF-7hpa Zellen deutlich stärker zu lysieren als MCF-7mock Zellen. Dies bedeutet, dass die Peptide, für die diese T Zellen spezifisch sind, in vivo von den MCF-7hpa Zellen synthetisiert und präsentiert werden. Aufgrund der fehlenden Hpa Expression in den MCF-7mock Zellen können die Hpa Peptid-spezifischen T Zellen diese

nicht in dem Maße erkennen und lysieren. Zusätzlich zeigt dies, dass sich unter den spezifischen T Zellen auch CTL befinden.

Damit zeigte sich, dass Heparanase ein interessantes neues TAA ist, und dass die hier verwendeten Peptide in vivo tatsächlich entstehen und auf der Zelloberfläche von Tumorzellen präsentiert werden können.

### **7.5.6 Melanom-assoziiertes-Antigen-2**

MAGE-2 ist das bekannteste Antigen aus der Gruppe von Testis Antigenen, die in Tumorgewebe exprimiert werden, und stellt das wohl auch am besten untersuchte Testis Antigen dar. Gegenüber beiden Peptiden, einem neu definierten p106 und dem bekannten p112 [Visseren, 1997] wurde eine Reaktivität von Memory T Zellen beobachtet. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion bei Patienten gegen p112 häufiger als gegen p108 (p108 9%; p112 27%). Diese Reaktivität scheint jedoch nicht tumorinduziert zu sein, da die Anzahl der spezifischen Zellen bei Patienten nicht signifikant größer war als bei gesunden Spendern (p108 p = 0,46; p112 p = 0,11).

Peptide aus dem TAA MAGE-3 wurden bereits erfolgreich in DV eingesetzt. Dabei zeigte sich eine signifikante CTL Induktion in 8 von 11 Melanom Patienten und bei manchen Patienten sogar ein Rückgang von Metastasen [Thurner, 1999], was einer anderen Beobachtung widerspricht [Griffioen, 2001]. Peptide aus dem TAA MAGE-2 könnten daher ebenfalls geeignete Kandidaten für den Einsatz in einer DV darstellen. Das bereits bekannte Peptid p112 erwies sich als geeigneter für eine DV in Brustkrebspatienten. Eventuell sollte jedoch nach einem weiteren Peptid gesucht werden, das häufiger zu einer Reaktivität von T Zellen führt.

### **7.5.7 Mucin-1**

MUC-1 ist ein Antigen das sowohl in gesundem Gewebe exprimiert wird als auch von vielen epithelialen Tumoren überexprimiert wird. Das für die Untersuchungen in ELISpot Analysen verwendete Peptid p12 kommt aus dem intrazellulären Bereich der Signalsequenz des transmembranen Glykoproteins [Brossart, 1999] und stellt wohl eines der am besten untersuchten TAA bei Brustkrebspatienten dar. MUC-1 zeigte in Bezug auf seine Reaktivität eine Tumorspezifität auf, da es in keinem der untersuchten gesunden Spender zu einer spezifischen IFN- $\gamma$  Produktion in der ELISpot Analyse geführt hat. Eine Immun-Reaktivität

war jedoch, genauso wie bei Her2/neu, nur bei 14% der Patienten zu finden. Aufgrund der niedrigen Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen zeigte sich nur ein „niedrig“ signifikanter Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern ( $p = 0,07$ ).

Bei CA15.3 handelt es sich um einen diagnostischen Antikörper, der in der Klinik als Tumormarker verwendet wird. Er erkennt den von den Zellen abgelösten, extrazellulären Teil von MUC-1 im Serum [Cheung, 2000]. In den hier untersuchten Patienten ist eventuell ein Zusammenhang zwischen CA15.3 Konzentration und Immun-Reaktivität zu finden. So zeigte sich, dass zwei Drittel der Patienten, die in der ELISpot Analyse eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion aufwiesen, auch einen positiven CA15.3 Wert hatten. Patienten ohne Reaktivität gegenüber MUC-1 p12 wiesen zu 64% einen negativen CA15.3 Wert auf. Dieser Zusammenhang wurde auch in einer anderen Studie an 80 weiteren Brustkrebspatienten beobachtet (nicht veröffentlichte Untersuchungen). Daher scheint eine direkte Korrelation zwischen CA15.3 Konzentration und Immun-Reaktivität zu bestehen.

MUC-1 p12 beladene DC wurden in einer Phase I/II Studie, bei Brustkrebspatienten eingesetzt und führten zu einer Induktion von Peptid-spezifischen T Zellen, ohne Nebenwirkungen zu induzieren [Brossart, 2000]. Die Existenz von MUC-1 spezifischen CTL im KM von Brustkrebspatienten konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden [Feuerer, 2001a]. Für eine DV sollte jedoch, wie bei Her2/neu über eine Kombination mit anderen TAA nachgedacht werden, da nur 14% der untersuchten Patienten eine spontane Memory T Zell Immun-Reaktivität zeigten.

### 7.5.8 Spermium Protein

PH20 weist eine Hyaluronidase-Funktion auf und ist, wie Heparanase, ein ECM degradierendes Enzym [Beech, 2002]. Es wurde bisher in der Literatur nicht als TAA beschrieben. Die hier neu definierten Peptide p119 und p323 führten sehr häufig zu einer Reaktivität von KMTC bei Patienten (p119 50%; p323 33%) verglichen zu KMTC bei gesunden Spendern (p119 0%; p323 20%). Diese beruhte jedoch nur für p119 bei Patienten auf einem signifikanten Unterschied in der Anzahl der spezifischen T Zellen ( $p = 0,02$ ).

Die hohe Reaktivität des Immunsystems gegenüber PH20 lässt sich, wie auch bei Heparanase, über die Funktion eines der entstehenden Produkte durch das Zerschneiden der ECM erklären. Hyaluronidase, und damit auch PH20, zerschneiden die in der ECM vorliegende Hyaluronsäure. Die Hyaluronsäure, ein Glycosaminoglykan bestehend aus linearen Polysacchariden, ist ein Hauptbestandteil der ECM. Durch das Zerschneiden der

Hyaluronsäure entstehenden nieder molekulare Oligosaccharide, die über eine Bindung an den Toll-like Rezeptor-4 DC und Makrophagen aktivieren können [Termeer, 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass auf diesem Weg aktivierten DC, in Abhängigkeit der Expression von Toll-like Rezeptor-4, in die Milz wandern und dort zu einer primären Aktivierung von spezifischen T Zellen führen können [Termeer, 2002]. So könnte der metastasierende Tumor, wie auch bei Heparanase, selbst das Immunsystem aktivieren und tumorspezifische T Zellen induzieren.

PH20 könnte aufgrund der starken Immunogenität ein interessantes TAA für die Therapie von Brusttumoren darstellen. Dabei könnte p119 das geeignetere Peptid darstellen. Vor einem Einsatz in einer DV sollten jedoch nähere Untersuchungen über die Funktionalität PH20 spezifischer T Zellen und über die Prozessierung und Präsentation der Peptide in vivo unternommen werden.

#### **7.5.9 Prostata spezifisches Antigen**

PSA ist eine Kallikrein-ähnliche Serin Protease, die eine Rolle in der Auflösung der Gel-Struktur der Samenflüssigkeit durch Proteolyse von z.B. Fibronectin spielt. In Gesunden ist PSA ausschließlich in der Prostata, in der Samenflüssigkeit und zu geringen Konzentrationen im Blut zu finden. Eine erhöhte Serum-Konzentration von PSA ist der beste erhältliche Tumormarker für Screening und Diagnose für das Prostatakarzinom. PSA galt lange Zeit als ausschließlich in Tumoren der Prostata überexprimiert bis gezeigt werden konnte, dass es auch, wenn auch zu geringeren Konzentrationen, von verschiedenen anderen Tumoren exprimiert und sezerniert wird [Mannello, 2001]. Das hier verwendete Peptid p141 wurde für die Therapie von Prostatakarzinom beschrieben [Correale, 1998].

In den hier untersuchten Brustkrebspatienten zeigte sich die häufigste in dieser Arbeit gemessene Immun-Reaktivität von KMTC, denn es reagierten 70% der Patienten und 40% der gesunden Spender mit einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion. Trotz der häufigen Reaktivität bei gesunden Spendern zeigte sich doch im Mittel eine signifikant größere Anzahl spezifischer T Zellen bei Patienten ( $p = 0,02$ ). Über die Expression von PSA in gesundem Gewebe gibt es widersprüchliche Angaben. So ist PSA in einer Arbeit wie in malignem Brustgewebe auch in gesundem Brustgewebe zu 30% exprimiert [Yu, 1996]. In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass eine PSA Expression in gesundem Brustgewebe fehlt [Zaviacic, 1999]. Eine Expression auch in gesundem Brustgewebe könnte die hier beobachtete Reaktivität von KMTC auch bei gesunden Spendern erklären.

PSA könnte aufgrund der starken Gewebespezifität und der signifikant größeren Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen in Patienten auch in Brustkrebspatienten ein geeigneter Kandidat für eine DV sein.

### 7.5.10 P53

Eines der bekanntesten und von vielen verschiedenen Tumoren (Brustkrebs zu 40%) überexprimiertes TAA ist p53. Jedoch tritt p53 in der Regel in Tumorzellen in mutierter Form auf. Diese Mutationen sind sehr vielfältig und verhindern die normale Funktion von p53, insbesondere die Induktion von Apoptose. Somit stellt p53 ein TAA dar, das als Antigen in einer Therapie sehr vieler Tumorerkrankungen eingesetzt werden könnte. Peptidsequenzen sollten jedoch aufgrund der Vielfältigkeit der Mutationen aus der p53 Wildtyp-Sequenz gewählt werden [Theobald, 1995]. Hier wurden zwei Peptide aus der Wildtyp-ASS auf ihre Fähigkeit getestet, KMTc zu einer IFN- $\gamma$  Produktion anzuregen. Dabei wurde mit p24 ein neu definiertes und mit p149 ein bereits in der Literatur beschriebenes Peptid ausgewählt [Theobald, 1995; Yu, 1997].

Das bekannte Peptid p149 führte bei Patienten (55%) nicht häufiger zu einer Reaktivität als bei gesunden Spendern (50%). Noch zeigte sich bei Patienten eine signifikant erhöhte Anzahl spezifischer Zellen ( $p = 0,15$ ). Gegen p24 zeigte sich bei keinem der gesunden Spender, jedoch in 40% der Patienten eine Reaktivität. Diese beruhte auf einer signifikant größeren Anzahl spezifischer T Zellen ( $p = 0,04$ ). Damit zeigte das neu definierte Peptid eine deutlich stärkere Tumorspezifität als das bekannte p149. Wenn für das neu definierte Peptid p24 nachgewiesen werden kann, dass es in vivo prozessiert und präsentiert wird, könnte p24 aus der Sequenz des p53 ein sehr geeignetes Peptid für Therapien in Brustkrebspatienten darstellen.

Patienten wiesen gegen die hier ausgewählten TAA, gegen mindestens eines der verwendeten Peptide, eine häufigere Immun-Reaktivität im Vergleich zu gesunden Spendern auf. Diese war in den meisten Fällen auf eine signifikant größere Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen zurückzuführen. Daher schient es sich bei dieser Auswahl um Brusttumor relevante TAA zu handeln. Gegen die TAA hNIS und MAGE lag weder eine signifikant größere Anzahl Peptid-spezifischer Zellen vor, noch eine deutlich häufigere Immun-Reaktivität. Diese wurden aufgrund ihrer häufigen Expression im Brusttumorgewebe und aufgrund ihrer starken Gewebespezifität in diese Auswahl mit einbezogen.

## 7.6 Nicht Malignitäts-assoziierte Antigene

Kollagen Typ-I und Typ-IV sind wichtige Bestandteile der ECM. Erhöhte Kollagen Expression in der ECM des Tumorgewebes korreliert positiv mit der Tumorgöße und mit einer schlechten Prognose [Jensen, 2002; Joachim, 2002]. Keratin18 wird von Karzinom Zelllinien während des Zelltodes ausgeschüttet. Normale gesunde Zellen der Brust sind negativ für Keratin 18 [Kramer, 2004]. Trotzdem gelten diese Antigene nicht als TAA. KMTC aus Brustkrebspatienten und gesunden Spendern wurden auf ihre Reaktivität gegenüber diesen nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen überprüft, um zu untersuchen, ob die gegenüber TAA auftretende Reaktivität tumorspezifisch induziert ist.

Zwei Kollagen Peptide und ein Keratin Peptid zeigten bei Patienten eine schwächere oder ähnlich häufige Reaktivität wie bei gesunden Spendern. Die Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen war für beide Kollagen Peptide bei gesunden Spendern im Mittel größer als bei Patienten. Gegen Keratin wiesen Patienten eine etwas häufigere Reaktivität jedoch keine signifikant ( $p = 0,43$ ) erhöhte Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen verglichen mit gesunden Spendern auf. Damit kann die gemessene Reaktivität gegenüber diesen Antigenen nicht Tumor-induziert sein.

Alle drei Peptide zusammengefasst zeigte sich bei Patienten gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen keine signifikant größere Zahl spezifischer Memory T Zellen als bei gesunden Spendern ( $p = 0,29$ ). Dies unterscheidet diese nicht Malignitäts-assoziierten Antigene deutlich von den hier untersuchten TAA. Bei allen hier untersuchten TAA lag eine stärker Tumor-spezifische Immun-Reaktivität als bei nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen vor. Die Reaktivitäten bei Patienten und gesunden Spendern gegenüber diesen nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen könnten genau wie die Reaktivitäten der gesunden Spender gegenüber TAA entstanden sein (s 7.3.1). Auch bei den gemessenen Reaktivitäten gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen handelt es sich um antigen-spezifische Memory Reaktivitäten.

## 7.7 Zusammenfassende Beurteilung der „nicht relevanten“ TAA

### 7.7.1 B Zell Lymphom Protein-2

Bcl-2 inhibiert die p53 induzierte Apoptose von Zellen und wirkt damit anti-apoptotisch [Andersen, 2004]. Die hier untersuchten Patienten zeigten zwar eine häufigere Reaktivität (40%) gegenüber Bcl-2 p218 als die untersuchten gesunden Spender (20%), allerdings lag im Mittel die Anzahl Peptid-spezifischer T Zellen im Mittel bei gesunden Spendern höher als

bei Patienten. Da ausschließlich Memory T Zell Antworten gemessen wurden, ist die gemessene Reaktivität Bcl-2 p218 spezifisch. Sie scheint jedoch nicht durch den Tumor induziert, sondern aufgrund anderer Mechanismen entstanden zu sein (s. 7.3.1).

Eine Überexpression von Bcl-2 führt in Tumorzellen zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapien [Andersen, 2004]. Eine erhöhte Bcl-2 Expression kann bei Patienten im Spätstadium, nach Chemotherapie, vorliegen. In einer Studie im peripheren Blut von acht Brustkrebspatienten konnte keine Immun-Reaktivität gegenüber p218 gefunden werden [Andersen, 2004]. Dies und der Befund, dass hier kein signifikanter Unterschied in der Immun-Reaktivität von Patienten und gesunden Spendern gegenüber Bcl-2 gefunden werden konnte, könnte Bcl-2 als TAA für T Zell aktivierende Therapien in Frage stellen.

### **7.7.2 Cyclin-D1**

Cyclin-D1 unterstützt die Progression von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus. Über Reaktivitäten von T Zellen gegen Cyclin-D1 lagen in der Literatur keine Untersuchungen vor. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Reaktivität gegenüber p101 bei 50% der Patienten jedoch von allen Patienten im Mittel keine signifikant größere Anzahl an spezifischen T Zellen verglichen mit gesunden Spendern ( $p = 0,36$ ). Die hier gemessenen Reaktivitäten wurden auf Untersuchungen von KMTC aus nur vier gesunden Spendern bezogen. Daher sollten mit Cyclin-D1 p101 noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bevor entschieden werden kann, ob die Immun-Reaktivitäten durch die Existenz eines Tumors induziert wurden.

### **7.7.3 Epitheliales Zelladhäsionsmolekül**

Hier konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivität gegenüber Ep-CAM p260 in 18% der untersuchten Brustkrebspatienten und in 40% der untersuchten gesunden Spender bestand. Es konnte sich ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Peptid-spezifischen Zellen bei gesunden Spendern (61) im Mittel etwas höher lag als bei Patienten (53). Betrachtet man jedoch die Frequenzen im Einzelnen, so weisen Patienten eine größere Anzahl peptidspezifischer T Zellen auf. Es sollten zusätzliche Untersuchungen über Peptid-spezifische Reaktivitäten gegen p260 durchgeführt werden, um festzustellen, ob die Reaktivität der Memory T Zellen tumorspezifisch induziert wurde, oder wie bei Reaktivitäten gegenüber nicht Malignitäts-assoziierten Antigenen, durch andere Mechanismen hervorgerufen wurde (s. 7.3.1). In der Literatur wurde beschrieben, dass gegen das Peptid

p263 in keinem von 20 untersuchten Brustkrebspatienten eine Reaktivität der T Zellen gemessen werden konnte [Nagorsen, 2003]. Dass hier Reaktivitäten gemessen werden konnten, könnte an der Verwendung eines neu definierten Peptides liegen oder aber an der sensitiveren Analyse Methode, indem aufgereinigte Zellpopulationen eingesetzt wurden. Ein weiterer Grund für die stärkere Reaktivität könnte in der Verwendung von KMTC liegen, da diese eine erhöhte Anzahl an tumorspezifischen T Zellen aufweisen.

#### **7.7.4 G Antigen**

GAGE ist ein Testis Antigen, das in gesundem Gewebe ausschließlich in den Testes exprimiert wird. Von diesen Antigenen ist bekannt, dass sie von Tumorzellen ebenfalls exprimiert werden können. Die GAGE Familie besteht, soweit bekannt, aus sechs Genen (GAGE 1 - 6), die zu großen Teilen aus konservierten, identischen Sequenzen bestehen. Das neu definierte Peptid p125 stammt aus einer konservierten Region der Sequenz, die für GAGE 1 - 6 identisch ist [Van den Eynde, 1995]. Das Peptid p125 aus dem TAA GAGE zeigte eine signifikant erhöhte Aktivierung der KMTC bei 20% der Patienten, aber bei keinem der getesteten gesunden Spender. GAGE p125 ist das einzige der hier untersuchten Peptide der Testis Antigene, das in keinem gesunden Spender zu einer spezifischen Reaktivität führte. Der Unterschied ( $p = 0,09$ ) zwischen Reaktionen bei Patienten und gesunden Spendern war allerdings nur „niedrig signifikant“. Damit zeigte sich gegen GAGE p125 verglichen zu den anderen hier untersuchten Testis Antigenen die stärkste Tumor-abhängige Reaktivität.

Aufgrund der starken Tumor-abhängigen Reaktivität könnte GAGE ein geeignetes TAA für DV darstellen. Da allerdings bei nur 9% der Brusttumore eine Expression gezeigt werden konnte [Van den Eynde, 1995], wurde GAGE hier nicht in die Auswahl Brustkrebs-relevanter TAA einbezogen. In anderen Tumoren, wie z.B. dem Melanom (36%) oder Kopf- und Halstumoren (24%) wurde von einer deutlich häufigeren Expression berichtet [Van den Eynde, 1995]. Somit könnte das TAA GAGE für Therapien dieser Tumoren besser geeignet sein. Es sollte jedoch zuvor geklärt werden, ob das hier neu definierte Peptid in vivo prozessiert und präsentiert werden kann.

#### **7.7.5 Hepatozyten Wachstumsfaktor**

Der HGF ist ein pleiotropes Zytokin, das das Überleben und die Proliferation vieler Zelltypen unterstützt [Pollard, 2001]. Untersuchungen, ob spezifische Memory T Zellen gegen HGF

existieren, sind in der Literatur nicht zu finden. Hier wurden Patienten und gesunde Spender auf das Vorhandensein von HGF p589 spezifischen T Zellen im Knochenmark untersucht. Dabei zeigte sich, dass gesunde Spender häufiger (50%) eine Reaktivität aufwiesen als Patienten (22%). Betrachtet man die Frequenzen im Einzelnen, so sind sie in Patienten jedoch größer als bei gesunden Spender. Die Reaktivitäten könnten nicht spezifisch durch den Tumor induziert zu sein, sondern durch andere Mechanismen entstanden zu sein (s. 7.3.1). Da allerdings nur vier gesunde Spender und neun Patienten getestet wurden, sind die erhobenen Daten nicht ausreichend für eine abschließende Beurteilung über die Qualität des HGF als TAA.

### 7.7.6 Kasein

Kasein  $\alpha$ -1 ist eines von vier Kasein Proteinen, die nach milchbildendem Hormonstimulus von Brustgewebe sezerniert werden und die einen großen Bestandteil der Milcheiweisse ausmachen. Kasein liegt in der Milch in Form von makromolekularen Aggregaten kombiniert mit Mineralien, hauptsächlich Kalzium, vor [Ginger, 1999]. Kasein ist, wie auch BA46, ein spezifisch nur von Zellen im Brustgewebe synthetisiertes Protein. Es wurde in der Literatur bisher nicht als TAA beschrieben. In dieser Arbeit wurde die Reaktivität von KMTC aus Brustkrebspatienten gegen ein neu definiertes Peptid aus der Sequenz des Kasein  $\alpha$ -1 p7 untersucht. Es zeigte sich bei Patienten (33%) nur eine etwas häufigere Reaktivität als bei gesunden Spendern (20%). Diese Reaktivität war jedoch im Mittel nicht auf eine signifikant größere Anzahl Peptid-spezifischer Zellen bei Patienten zurückzuführen ( $p = 0,21$ ). Die Reaktivität scheint daher nicht spezifisch durch den Tumor induziert zu sein. Die vorliegenden Untersuchungen basieren nur auf einer geringen Anzahl von Spendern, daher kann eine generelle Aussage über die Qualität von Kasein als TAA nicht getroffen werden.

### 7.7.7 Tumor-Testis-Antigen-2

LAGE-1, auch ein Tumor-Testis Antigen, ist in normalem Gewebe nur in den Testes, bei Tumoren aber in vielen verschiedenen Typen, z.B. Brusttumor, Colonkarzinom und Ösophagus Karzinom, exprimiert [Mashino, 2001]. LAGE ist als TAA beschrieben, jedoch waren in der Literatur keine Angaben über eine T Zell basierte Reaktivität gegenüber LAGE zu finden. Die Untersuchungen zu dem hier neu definierten Peptid p167 zeigten eine gleich starke Reaktivität bei Patienten und gesunden Spendern (25%). Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl spezifischer Zellen ( $p = 0,17$ ). LAGE-1 weist mit 3,1%

eine deutlich schwächere Präsenz im Brusttumor auf als andere bekannte Testis Antigene. Daher stellt LAGE wohl keinen geeigneten Kandidaten für nähere Untersuchungen im Hinblick auf eine DV dar.

### 7.7.8 P21ras

Über das bekannte TAA p21ras waren in der Literatur keine Untersuchungen über eine Reaktivität von T Zellen, gegenüber Peptiden aus der Wildtyp-ASS, zu finden. Bei den hier untersuchten Spendern lag gegen das neu definierte Peptid p34 keine tumorspezifische Immun-Reaktivität vor, da bei 33% der Patienten und bei 20% der gesunden Spender eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion gemessen wurde. Die Anzahl Peptid-spezifischer Zellen war bei Patienten nicht signifikant größer ( $p = 0,15$ ) als bei gesunden Spendern. Aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen Patienten und gesunden Spendern, und aufgrund der wenigen untersuchten Proben sollten noch zusätzliche Tests mit Peptiden aus der Sequenz des p21 unternommen werden, bevor über die Qualität von p21ras als TAA bei Brustkrebspatienten entschieden werden kann.

## 7.8 Expression der TAA im Tumorgewebe von Brustkrebspatienten

TAA, die in einer DV eingesetzt werden sollen, müssen auch von Tumorzellen exprimiert werden, damit die spezifischen T Zellen die Tumorzellen erkennen und beseitigen können. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Expression und spontan entstandener Immun-Reaktivität herauszufinden, wurden Tumorgewebeproben auf ihren mRNA Gehalt von TAA, mithilfe zwei unterschiedlicher Methoden, der Real-Time PCR und einem Mikroarray, untersucht. Es konnten leider nur Tumorproben von neun Patienten und ein Tumorpool bestehend aus 20 Gewebeproben untersucht werden. Aufgrund dieser geringen Anzahl konnte keine generelle Aussage über einen Zusammenhang zwischen Immun-Reaktivität und Expression getroffen werden.

Für die hier untersuchten Proben konnte keine Übereinstimmung der Expressionsanalysen aus Mikroarray und Real-Time-PCR gefunden werden. Dies könnte darauf beruhen, dass die in den Analysen eingesetzten Proben unterschiedlich vorbehandelt wurden. Die mRNA wurde in beiden Fällen in cDNA umgeschrieben, jedoch für die Mikroarray Analysen zusätzlich, aufgrund der benötigten Menge, amplifiziert. Eine Amplifikation kann zu einer Verringerung der Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Proben führen [Schneider, 2004]. Auch wurde bei Mikroarray Analysen gegenüber einem Pool aus vielen verschiedenen

Genen normalisiert, bei den RT-PCR Untersuchungen nur gegenüber GAPDH. Unterschiede könnten auch dadurch entstanden sein, dass die verwendeten Klone auf dem Mikroarray und die Primer der RT-PCR sich nicht auf den gleichen Abschnitt der Sequenz des jeweiligen Antigens beziehen. Auch könnten Kreuzhybridisierungen auftreten, wenn ein anderes Gen einer Genfamilie eine große Sequenzhomologie aufweist. Die hier durchgeführte Analyse beruhte auf einer sehr kleinen Anzahl an Proben, wodurch einzelne Abweichungen, die in einem größeren Pool bei einer statistischen Auswertung nicht ins Gewicht fallen würden zu erklären sind.

Es zeigte sich für keines der untersuchten TAA ein Zusammenhang zwischen Expression und Immun-Reaktivität. Die Immun-Reaktivität entsteht gegenüber einem in der Zelle synthetisierten Protein, die Expression wird auf mRNA Ebene bestimmt. Eine Immun-Reaktivität könnte daher gegenüber Antigenen bestehen, die im Gewebe nicht mehr synthetisiert werden, und daher bei Expressionsanalysen nicht nachzuweisen sind. Auf der anderen Seite könnte aber auch die mRNA mancher Antigene in Tumorzellen vorliegen, ohne dass diese in das entsprechende Protein translatiert wird.

### **7.9 Entwicklung einer Dendriten Vaccine**

Reaktivitäten gegenüber natürlich vorkommenden TAA beruhen auf Peptid-spezifischen T Zellen mit einer niedrigen Affinität für den Peptid-MHC-Komplex, da T Zellen mit hoch affinen TCR gegenüber diesen autologen Antigenen im Thymus eliminiert werden. Gegenüber TAA, die Patienten-individuelle Veränderungen aufweisen, z.B. durch Mutationen bei wie p53, könnten stärker affine T Zellen existieren [Gilboa, 1999]. Da es jedoch sehr schwierig ist, für jeden Patienten individuelle Veränderungen der TAA zu identifizieren, ist es zum jetzigen Zeitpunkt kaum möglich Therapien auf diesen individuellen Peptiden aus TAA basierend durchzuführen. Eine Ausnahme bildet eine anti-Idiotyp Vakzinierung bei Patienten mit bestimmten Lymphomen. In diesem Fall lässt sich das individuelle TAA in Form eines Immunglobulin Idiotyps leicht identifizieren, da es auf allen Lymphomzellen zu finden ist. So lässt sich mit einem spezifischen anti-Idiotyp Antikörper eine Immun-Antwort induzieren, die zu einem klinisch messbaren Erfolg führt [Weng, 2004].

Eine weitere Möglichkeit „individuelle“ TAA bei einer Vakzinierung mit einzubeziehen stellt eine Vakzinierung mit Tumorzelllinien oder Lysaten aus autologen Tumorzellen dar. Dabei werden alle im Tumor enthaltenen TAA, individualspezifische, gemeinsame und bisher nicht bekannte, mit einbezogen. Der Vorteil besteht darin, dass es nicht notwendig ist, für jeden Patienten seine individuellen TAA zu identifizieren. Der Nachteil besteht in einer nicht

genauer charakterisierten Mischung aus TAA und anderen autologen Antigenen. Diese Form der Vakzine führte in Phase-III Studien bei Colonkarzinompatienten [Vermorken, 1999] und bei Renalkarzinompatienten [Jocham, 2004] zu einer klinisch messbaren Überlebensverbesserung.

Vakzinierungen mit DC, die mit nur einem TAA beladen wurden, führten zu einer Induktion spezifischer T Zellen, jedoch kaum zu einem klinischen Erfolg [Lewis, 2004; Rosenberg, 2004]. Daher ist es notwendig, die Vakzinierungs-Strategien zu verbessern. Eine Möglichkeit besteht darin, bei einer Vakzinierung eine Mischung aus vielen, bei Patienten gemeinsam auftretenden TAA, zu verwenden [Gilboa, 1999]. Eine Kombination mehrerer TAA erhöht die Anzahl der Patienten, die für eine Therapie in Frage kommen. So zeigt sich z.B. bei einer Betrachtung der Testis Antigene MAGE, BAGE und GAGE, dass in 51% der untersuchten Melanom Patienten mindestens eines der Gene überexprimiert wurde. Somit kämen mit einer Kombination dieser drei TAA mehr Patienten für eine Vakzinierung in Frage als wenn nur eines dieser TAA verwendet wird [Van den Eynde, 1995].

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Reaktivität gegen verschiedene TAA in Patienten vorlagen. Damit wäre eine individuell dem Patienten angepasste DV sinnvoll. Dazu müsste die Reaktivität jedes Patienten gegenüber allen TAA getestet werden. Aufgrund limitierender Zellzahlen ist dies jedoch nicht möglich. Um jedoch die Reaktivitäten gegenüber den Tumor-relevanten TAA bestimmen zu können, könnte auf eine Auswahl von TAA, wie die hier getroffene, zurückgegriffen werden.

In dieser Arbeit wurden Peptide verwendet, um die Feinspezifität des Memory T Zell Repertoires zu bestimmen. Derartige Peptide ließen sich gut in den hier verwendeten Analysen einsetzen. Es war nicht möglich, alle hier untersuchten TAA als gesamtes Protein zu erwerben. Anhand von Peptiden kann jedoch nicht das ganze gegenüber einem TAA vorliegende Memory T Zell Repertoire bestimmt werden. Für ein Screening auszuwählender TAA wäre es sinnvoll die DC mit den TAA als ganzes zu beladen. Damit würde man eine Reaktivität gegenüber allen natürlich auftretenden Epitopen der TAA bestimmen können und die Zusammensetzung der Epitope wäre physiologischer. Ferner wäre dann eine Vakzinierung nicht nur auf Patienten mit dem HLA-A201 Allel limitiert. Ein weiterer entscheidender Vorteil einer Vakzinierung mit den gesamten Proteinen der TAA liegt in einer zusätzlichen Aktivierung von CD4+ TH-Zellen. DC können nicht nur MHC-I restringierte Peptide aus der ASS der TAA auf ihrer Oberfläche dem Immunsystem präsentieren sondern auch MHC-II restringierte Peptide [Gilboa, 1999; Hanson, 2004]. Da gezeigt werden konnte, dass spezifische CD4+ T Zellen zu einem verbesserten Langzeit CD8+ Memory und einer verbesserten Tumorabstoßung [Hu, 2000] führen, könnte durch die Verwendung der

gesamten ASS der TAA auf diesem Weg eine CD8+ T Zell Immun-Reaktivität durch eine CD4+ T Zell Antwort verbessert werden.

### 7.10 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass in Brustkrebspatienten ein individuelles T Zell Repertoire gegenüber sehr verschiedenen TAA vorliegt. Ob dieses unterschiedliche Repertoire auf eine unterschiedliche Expression der jeweiligen TAA im Tumorgewebe zurückzuführen ist, konnte leider aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Proben nicht festgestellt werden. Auch zeigte sich ein Unterschied in der Häufigkeit, mit der einzelne TAA zu einer Reaktivität von KMTC bei Brustkrebspatienten führten. Es gelang zwölf Peptide aus zehn TAA zu identifizieren, die zusammengenommen, in der Mehrzahl der getesteten Patienten, aber kaum bei gesunden Spendern zu einer Immun-Reaktivität führten. Von diesen zwölf Peptiden wurden 50% in dieser Arbeit neu definiert und es befinden sich drei zuvor noch nicht als TAA beschriebene Antigene unter ihnen. Bei CEA und p53 zeigte sogar das hier neu definierte Peptid, verglichen zu den bereits bekannten, eine größere Tumor-abhängige Immun-Reaktivität.

Heparanase konnte als neues, viel versprechendes TAA identifiziert werden und die Existenz der hier neu definierten Peptide aus der ASS der Heparanase konnte auf einer Brusttumor-Zelllinie durch Zytotoxizitätstests nachgewiesen werden. Ferner wiesen alle mittels Tetramer Analysen untersuchte Patienten Heparanase spezifische T Zellen auf.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AB	humane AB Blutgruppe
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASS	Aminosäuresequenz
BA46	Lactadherin
BC	B Lymphozyten, B Zellen
Bcl-2	B Zell Lymphom Protein-2
BM	Basalmembran
bp	Basen Paare
CCND1	Cyclin-D1
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
CEA	Carzino-embryonales Antigen
Coll-IV	Kollagen Typ IV
Coll- $\alpha$ 1	Kollagen Typ $\alpha$ 1
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTAG2	<i>Cancer Testis Antigen-2</i>
CTL	zytotoxische T Lymphozyten
Cy3	Cyanin-3-gekoppelte dCTP
Cy5	Cyanin-5-gekoppelte dCTP
DAPI	bisBENZIMIDE
DC	dendritische Zellen
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DV	Vakzinierung mit Peptid beladenen dendritischen Zellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
End	Immunglobulin G; Endobulin

Ep-CAM	epitheliales Zelladhäsions Molekül
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERBB2	Her2/neu
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FI	relative Stärke der Peptidbindung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälber Serum
GAGE	G Antigen
GAP1IP4BP	p21ras
GAPDH	Glycerinaldehyd Phosphatdehydrogenase
GK	Pool aus RNA gesunder Spender
GM-CSF	<i>granulocyte and monocyte colony stimulating factor</i>
GS	gesunder Spender
G418	Geneticin
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethansulfonsäure
Her2/neu	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIV	<i>human immunodeficient virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
hNIS	humaner Natrium / Jod Symporter
Hpa	Heparanase
HPSE	Heparanase
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMP	Influenza Matrix Protein
KLK3	Kallikrein 3
KM	Knochenmark
KMMC	Knochenmark mononukleäre Zellen
KMTC	Knochenmark T Zellen
Krt18	Keratin 18
L	Ligand

LAGE-1	Tumor-Testes-Antigen-2
log-ratio	relative Farbzusammensetzung
M	mol
MAGE-2	Melanom assoziiertes Antigen-2
mAK	monoklonaler Antikörper
MFGE8	Milch Fett Globuli 8
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	milli Molar
mock	leerer Vektor
MUC-1	Mucin-1
MW	Mittelwert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killer Zellen
nm	nano Meter
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
P	Patient
p	Position der ersten Aminosäure in der Protein Sequenz
PB	peripheres Blut
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBTC	periphere Blut T Zellen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	R-Phycoerythrin
pg	Piko gramm
PH20	Spermium Protein
PSA	Prostata spezifisches Antigen
p21	p21ras
Repertoire	Zusammensetzung der T Zell Spezifität

RNA	Ribonukleinsäure
aRNA	antisense RNA
mRNA	<i>messenger</i> RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
RZPD	Deutsches Ressourcen Zentrum für Genomforschung
sec	Sekunden
STABW	Standardabweichung
STABWN	Standardabweichung
std	Standart
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TACSTD1	<i>tumor-associated calcium signal transducer 1</i>
Tag	thermostabile DNA Polymerase
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TC	T Lymphozyten, T Zellen
TCR	T Zell Rezeptor
Testis Antigen	Keimzell Antigen
TGF- $\beta$	Tumor-Wachstumsfaktor $\beta$
TH-Zellen	T-Helfer Zellen
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TP	Tumorpool
TP53	Tumorprotein 53
TT	Tetanus Toxoid
U	Einheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius

Aminosäuren:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin

---

H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## 9 Literaturverzeichnis

- Abd El-Rehim, D. M., Pinder, S. E., Paish, C. E., Bell, J., Blamey, R. W., Robertson, J. F., Nicholson, R. I. & Ellis, I. O. (2004).** Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* **203**, 661-671.
- Akakura, S., Sukhwinder, S., Matthew, S., Akakura, R., Kim, J-I., Albert, M. L. & Birge, R. B. (2003).** The opsonin MFG-E8 is a ligand for the  $\alpha v\beta 5$  integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Reseach* **292**, 403-416.
- Andersen, M. H., Svane, I. M., Kvistborg, P., Nielsen, O. J., Balslev, E., Reker, S., Becker, J. C. & Thor, S. P. (2004).** Immunogenicity of Bcl-2 in cancer patients. *Blood*, prepublished online.
- Arlen, P., Tsang, K. Y., Marshall, J. L., Chen, A., Steinberg, S. M., Poole, D., Hand, P. H., Schlom, J. & Hamilton, J. M. (2000).** The use of a rapid ELISPOT assay to analyze peptide-specific immune responses in carcinoma patients to peptide vs. recombinant poxvirus vaccines. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 517-529.
- Barnea, E., Beer, I., Patoka, R., Ziv, T., Kessler, O., Tzehoval, E., Eisenbach, L., Zavazava, N. & Admon, A. (2002).** Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur J Immunol* **32**, 213-222.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. & Srivastava, P. K. (2000).** Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **12**, 1539-1546.
- Beech, D. J., Madan, A. K. & Deng, N. (2002).** Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. *J Surg Res* **103**, 203-207.
- Britten, C. M., Meyer, R. G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T. & Herr, W. (2002).** The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods* **259**, 95-110.
- Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G. & other authors (1999).** Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* **93**, 4309-4317.
- Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L. & Brugger, W. (2000).** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* **96**, 3102-3108.

- Buness, A., Huber, W., Steiner, K., Sultmann, H. & Poustka, A. (2004).**arrayMagic: two-colour cDNA microarray quality control and preprocessing. *Bioinformatics*.
- Carmon, L., Bobilev-Priel, I., Brenner, B. & other authors (2002).**Characterization of novel breast carcinoma-associated BA46-derived peptides in HLA-A2.1/D(b)-beta2m transgenic mice. *J Clin Invest* **110**, 453-462.
- Cheung, K. L., Graves, C. R. & Robertson, J. F. (2000).**Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev* **26**, 91-102.
- Correale, P., Walmsley, K., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J. & Tsang, K. Y. (1998).**Generation of human cytolytic T lymphocyte lines directed against prostate-specific antigen (PSA) employing a PSA oligopeptide. *J Immunol* **161**, 3186-3194.
- Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L. & Schiffman, K. (2002).**Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* **20**, 2624-2632.
- Eisenbach, L., Bar-Haim, E. & El-Shami, K. (2000).**Antitumor vaccination using peptide based vaccines. *Immunol Lett* **74**, 27-34.
- Escobar, P., Yu, A., Terskikh, N., Holmes, N., Corradin, G., Mach, J.-P. & Healy, F. (1999).**Induction in transgenic mice of HLA-A2.1-restricted cytotoxic T cells specific for a peptide sequence from a mutated p21ras protein. *Clin Exp Immunol* **116**, 214-219.
- Ferbeyre, G. & Lowe, S. W. (2002).**The price of tumour suppression? *Nature* **415**, 26-27.
- Feurerer, M., Beckhove, P., Bai, L. & other authors (2001).**Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* **7**, 452-458.
- Feurerer, M., Rocha, M., Bai, L., Umansky, V., Solomayer, E. F., Bastert, G., Diel, I. J. & Schirmacher, V. (2001).**Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* **92**, 96-105.
- Feurerer, M., Beckhove, P., Garbi, N., Mahnke, Y., Limmer, A., Hommel, M., Hämmerling, G. J., Kyweski, B., Hamann, A., Umansky, V. & Schirmacher, V. (2003).**Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* **9**, 1151-1157.
- Filetti, S., Bidart, J. M., Arturi, F., Caillou, B., Russo, D. & Schlumberger, M. (1999).**Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* **141**, 443-457.

- Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T. & Ioannides, C. G. (1995).** Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* **181**, 2109-2117.
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. & Pestell, R. G. (2004).** Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5439-5447.
- Gimmi, C. D., Morrison, B. W., Mainprice, B. A. & other authors (1996).** Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nat Med* **2**, 1367-1370.
- Ginger, M. R. & Grigor, M. R. (1999).** Comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **124**, 133-145.
- Gilboa, E. (1999).** The making of a Tumor Rejection Antigen. *Immunity* **11**, 263-270.
- Gotch, F., McMichael, A. & Rothbard, J. (1988).** Recognition of influenza A matrix protein by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes. Use of analogues to orientate the matrix peptide in the HLA-A2 binding site. *J Exp Med* **168**, 2045-2057.
- Griffioen, M., Borghi, M., Schrier, P. I. & Osanto, S. (2001).** Detection and quantification of CD8(+) T cells specific for HLA-A\*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN-gamma-ELISPOT assay. *Int J Cancer* **93**, 549-555.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (2002).** Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182-187.
- Hanson, H. L., Kang, S. S., Norian, L. A., Matsui, K., O'Mara, L. A. & Allen, P. M. (2004).** CD4-directed peptide vaccination augments an antitumor response, but efficacy is limited by the number of CD8+ T cell precursors. *J of Immunology* **172**, 4215-4224.
- Hu, H.-M., Winter, H., Urba, W. J. & Fox, B. A. (2004).** Divergent roles for CD4+ T cells in the priming and effector / memory phases of adoptive immunotherapy. *J of Immunology* **165**, 4246-4253.
- Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J. & Parish, C. R. (1999).** Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* **5**, 803-809.
- Hynes, R. O. (2002).** Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., Tsanou, H., Arvanitis, D. L., Agnantis, N. J. & Pavlidis, N. (2002).** Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer* **38**, 2362-2370.

- Jensen, B. V., Johansen, J. S., Skovsgaard, T., Brandt, J. & Teisner, B. (2002).** Extracellular matrix building marked by the N-terminal propeptide of procollagen type I reflect aggressiveness of recurrent breast cancer. *Int J Cancer* **98**, 582-589.
- Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J. & Doehn, C. (2004).** Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised trial. *Lancet* **363**, 594-599.
- Kodaira, Y., Nair, S. K., Wrenshall, L. E., Gilboa, E. & Platt, J. L. (2000).** Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. *J Immunol* **165**, 1599-1604.
- Kramer, G., Erdal, H., Mertens, H. J. & other authors (2004).** Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* **64**, 1751-1756.
- Lewis, J. J. (2004).** Therapeutic cancer vaccines: Using unique antigens. *PNAS* **101**, 14653-14656.
- Liu, K. J., Wang, C. C., Chen, L. T. & other authors (2004).** Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides. *Clin Cancer Res* **10**, 2645-2651.
- Mannello, F. & Gazzanelli, G. (2001).** Prostate-specific antigen (PSA/hK3): a further player in the field of breast cancer diagnostics? *Breast Cancer Res* **3**, 238-243.
- Marchetti, D. & Nicolson, G. L. (2001).** Human heparanase: a molecular determinant of brain metastasis. *Adv Enzyme Regul* **41**, 343-359.
- Mashino, K., Sadanaga, N., Tanaka, F., Yamaguchi, H., Nagashima, H., Inoue, H., Sugimachi, K. & Mori, M. (2001).** Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer* **85**, 713-720.
- Matsuda, K., Tsunoda, T., Tanaka, H., Umamo, Y., Tanimura, H., Nukaya, I., Takesako, K. & Yamaue, H. (2004).** Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 609-616.
- Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Schaller, G., Leigh, B., Schmittel, A., Letsch, A., Thiel, E. & Keilholz, U. (2003).** Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. *Int J Cancer* **105**, 221-225.

- Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M. & Anichini, A. (2002).**Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* **94**, 805-818.
- Parr, C., Watkins, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. (2004).**The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 202-211.
- Pittet, M. J., Zippelius, A., Valmori, D., Speiser, D. E., Cerottini, J-C. & Romero, P. (2002).**Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends in Immunology* **23**, 325-328.
- Pollard J. W. (2001).**Tumour-stromal interactions; Transforming growth factor- $\beta$  isoforms and hepatocyte growth factor / scatter factor in mammary gland ductual morphogenesis. *Breast Cancer Research* **3**, 230-237.
- Rammensee, H-G., Bachmann, J., Emmerich, N. P. N., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. (1999).**SYPFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**. 213-219.
- Real, P. J., Cao, Y., Wang, R., Nikolovska-Coleska, Z., Sanz-Ortiz, J., Wang, S. & Fernandez-Luna, J. L. (2004).**Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* **64**, 7947-7953.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J. & other authors (1998).**Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* **4**, 321-327.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. (2004).**Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**, 909-915.
- Sadovnikova, E., Jopling, L. A., Soo, K. S. & Stauss, H. J. (1998).**Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* **28**, 193-200.
- Scheibenbogen, C., Lee, K. H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H. G. & Keilholz, U. (1997).**A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin Cancer Res* **3**, 221-226.
- Scheibenbogen, C., Romero, P., Rivoltini, L., Herr, W., Schmittel, A., Cerottini, J. C., Woelfel, T., Eggermont, A. M. & Keilholz, U. (2000).**Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN $\gamma$ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods* **244**, 81-89.

- Schirle, M., Keilholz, W., Weber, B., Gouttefangeas, C., Dumrese, T., Becker, H. D., Stevanovic, S. & Rammensee, H. G. (2000).** Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur J Immunol* **30**, 2216-2225.
- Schmittel, A., Keilholz, U. & Scheibenbogen, C. (1997).** Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. *J Immunol Methods* **210**, 167-174.
- Schneider, J., Buness, A., Huber, W., Volz, J., Kioschis, P., Hafner, M., Poustka, A. & Sultmann, H. (2004).** Systematic analysis of T7 RNA polymerase based in vitro linear RNA amplification for use in microarray experiments. *BMC Genomics* **5**, 29.
- Sun, Y., Song, M., Stevanovic, S., Jankowiak, C., Paschen, A., Rammensee, H. G. & Schadendorf, D. (2000).** Identification of a new HLA-A(\*0201)-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int J Cancer* **87**, 399-404.
- Tazebay, U. H., Wapnir, I. L., Levy, O. & other authors (2000).** The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* **6**, 871-878.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J. & other authors (2002).** Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111.
- Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J. & Sherman, L. A. (1995).** Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11993-11997.
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C. & other authors (1999).** Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-1678.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De, B. O., Gaugler, B., Lucas, S. & Boon, T. (1995).** A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* **182**, 689-698.
- Van der Burg, S. H., Klein, M. R., Van de Velde, C. J., Kast, W. M., Miedema, F. & Melief, C. J. (1995).** Induction of a primary human cytotoxic T-lymphocyte response against a novel conserved epitope in a functional sequence of HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* **9(2)**, 121-127.
- Vermorcken, J. B., Claessen, A. M. E., van Tinteren, H., Gall, H. E., Ezinga, R., Meijer, S., Scheper, R. J., Meijer, C. J. M., Bloemena, E., Ransom, J. H., Hanna, M. G. & Pinedo, H. M. (1999).** Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* **353**, 345-350.

- Visseren, M. J., van der Burg, S. H., van, d., V, Brandt, R. M., Schrier, P. I., van der, B. P., Boon, T., Melief, C. J. & Kast, W. M. (1997).** Identification of HLA-A\*0201-restricted CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product. *Int J Cancer* **73**, 125-130.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M. & other authors (1999).** Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* **5**, 793-802.
- Vlodavsky, I. & Friedmann, Y. (2001).** Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* **108**, 341-347.
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T. & Friedmann, Y. (2002).** Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol* **12**, 121-129.
- Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M. & other authors (2002).** Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* **62**, 5818-5827.
- Weng, W-K., Czerwinski, D., Timmerman, J., Hsu, F. J. & Levy, R. (2004).** Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J Clin Oncology* **22**, 4717-4724.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993).** p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
- Yu, H., Diamandis, E. P., Levesque, M., Giai, M., Roagna, R., Ponzone, R., Sismondi, P., Monne, M. & Croce, C. M. (1996).** Prostate specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* **40**, 171-178.
- Yu, Z., Liu, X., McCarty, T. M., Diamond, D. J. & Ellenhorn, J. D. (1997).** The use of transgenic mice to generate high affinity p53 specific cytolytic T cells. *J Surg Res* **69**, 337-343.
- Zaviacic, M., Ablin, R. J., Ruzickova, M., Stvrtina, S., Danihel, L., Zaviacic, T., Pohlodek, K. & Holoman, K. (1999).** The normal female and the male breast epithelium does not express prostate-specific antigen. Preliminary immunohistochemical observations of autopsy breast tissues. *Gen Physiol Biophys* **18 Suppl 1**, 41-44.
- Zinkernagel, R., Bachmann, M., Kündig, T., Oehen, S., Pirchet, H., Hengartner, H. (1996).** On immunological memory. *Annu Rev Immunol* **14**, 333-367.

## Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. V. Schirrmacher für die Ermöglichung dieser Arbeit und für die vielen anregenden Diskussionen bedanken.

Prof. G. Hämmerling danke ich für seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich möchte mich besonders herzlich bei Dr. P. Beckhove für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die vielen Besprechungen, Diskussionen und Anregungen haben einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. F. Schütz gehört mein herzlicher Dank für die Kooperation, die es mir ermöglichte periphere Blut und Knochenmark Proben von Patienten und gesunden Spender zu untersuchen.

Ich möchte mich bei M. Bucur für die Einführung in die verschiedenen Labortechniken bedanken, und dafür, dass sie mich mit großer Hilfsbereitschaft stets unterstützt hat.

Bei J. Förster möchte ich mich für die stete Bereitschaft bedanken die Proben aus der Klinik entgegenzunehmen.

Herzlichen Dank an J. Schneider, und H. Sültman, die mir durch tatkräftige Unterstützung die Expressionsanalysen der Gewebeproben ermöglichten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

## Anhang

### Zusammenfassende Darstellung aller ELISpot Analysen aus gesunden Spendern

ELISpot Analysen; gesunde Spender Teil I: Aufgelistet sind die p-Werte aller gesunden Spender gegenüber BA46, Bcl-2; CEA, Cyclin-D1, Ep-CAM und Her2/neu; TAA Triplikate gegenüber Insulin p43 und HIVgag berechnet; leeres Feld: nicht getestet; x: p >0,1; blaue Zahlen: p <0,05.

GS	BA46 97	BA46 131	BA46 194	Bcl-2	CEA 106	CEA 694	Cyclin -D1	Ep-CAM	GAGE	Her2/neu
1										x
2				0,01						0,06
3		x	0,10							
4										
5	x	x	x			x	0,00			x
6	x	x	x	x		x	x		x	x
7	x	x	0,05			x	x			x
8	0,05	x	0,03	x		0,05	0,07	0,01		x
9	x			x	0,09	0,04	0,05	0,01	0,07	
10				x	x			x	x	
11					x			x		
12					x			x		
13	x	x	x		x	0,01			x	x

ELISpot Analysen; gesunde Spender Teil II: Aufgelistet sind die p-Werte aller gesunden Spender gegenüber HGF, hNIS, Hpa, Kasein, LAGE-1, MAGE-2 und MUC-1; Triplikate gegenüber Insulin p43 und HIVgag berechnet; leeres Feld: nicht getestet; x: p >0,1; blaue Zahlen: p <0,05.

GS	HGF	hNIS	Hpa 8	Hpa 16	Hpa 183	Kasein	LAGE	MAGE 108	MAGE 112	MUC-1
1		x	x	x	x					x
2		x	x	x	x					x
3		x	0,07	0,01	x					
4			0,02	x	x					
5		x	x	x	x					x
6	0,01	x	x	x	x		x		x	x
7		x	0,03	0,08	x				0,06	x
8		0,00	x	0,10	x	0,09			x	x
9	0,00					0,01	0,03	0,00	0,01	
10	x					x	x	x		
11						x		x		
12								x		
13	x					x	x	x	x	x

Ergebnisse aller ELISpot Analysen; gesunde Spender Teil III: Aufgelistet sind die p-Werte aller gesunden Spender gegenüber PH20, PSA, p21, p53, Coll und Krt; Triplikate gegenüber Insulin p43 und HIVgag berechnet; leeres Feld: nicht getestet; x: p >0,1; blaue Zahlen: p <0,05.

GS	PH20 119	PH20 323	PSA	p21	p53 24	p53 149	Coll αI	Coll IV	KRT18
1							0,04		
2							x		
3									
4									
5	x	0,00						x	x
6	x	x	x			0,05		x	0,00
7						x		x	x
8	x	0,06	0,03			0,03	0,00	0,00	x
9	0,08	0,08	0,01	0,02		0,03	0,05	x	x
10			x	x	x	x	x		
11				x	x				
12				x	x				
13	x	x	x	x	x			0,01	

### Zusammenfassende Darstellung aller ELISpot Analysen aus Brustkrebspatienten

ELISpot Analysen; Patienten Teil I: Aufgelistet sind die p-Werte aller Patienten gegenüber BA46, Bcl-2, CEA, Cyclin-D1, Ep-CAM, GAGE und Her2/neu; Triplikate gegenüber Insulin p34 und HIVgag berechnet; leeres Feld: nicht getestet; x:  $p > 0,1$ ; blaue Zahlen:  $p < 0,05$ .

P	BA46 97	BA46 131	BA461 94	Bcl-2	CEA 106	CEA 694	Cyclin -D1	Ep- CAM	GAGE	Her2/ neu
1										x
2										x
3								x		0,08
4								x		x
5								x		x
6										x
7										x
8										x
9		x		0,06					0,06	0,07
10		0,06								x
11		x								x
12		0,04		0,08						0,04
13		x		x						0,03
14		0,01								x
15		x		x						0,04
16		x		x					x	x
17		0,04		0,01				0,10	x	x
18		x		x	x			x	x	x
19										
20		x		x	x			x	x	x
21					x			x		x
22	x	x	x							x
23	0,02	0,00	x							
24		x	0,02							
25	x		x			0,09	x			
26	0,02		0,01			x	x			
27	0,00	0,00	0,02			x	x			
28	x		x			0,07	0,05			
29	0,09		0,00							
30	0,02		0,02			0,00	0,04			
31	x		x			x	x			
32	x		x							
33	0,04	0,01	0,01	0,04		0,00	0,04			
34				0,01		x	0,07			
35				0,01		0,04	0,03	0,00		
36	x	0,09	0,07		0,01	0,04	0,01	0,00	0,00	
37	0,09	x	x		0,01	0,03	0,07	0,06	0,01	
38					x				x	
39					0,05					
40	0,07	0,03	0,03	0,01	x	x	0,05	x	x	
41					x				x	



ELISpot Analysen; Patienten Teil III: Aufgelistet sind die p-Werte aller gesunden Spender gegenüber PH20, PSA, p21, p53, Coll und Krt; Triplikate gegenüber Insulin p43 und HIVgag berechnet; leeres Feld: nicht getestet; x: p >0,1; blaue Zahlen: p <0,05.

P	PH20 119	PH20 323	PSA	p21	p53 24	p53 149	Coll αI	Coll IV	KRT18
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9							x		
10							x		
11							x		
12							0,00		
13							x		
14							0,03		
15							x		
16				x	x		x		
17				0,04	x		0,04		
18				x	x		x		
19									
20				x	x		x		
21				x	x		x		
22							x		
23	0,02								
24		0,02							
25						0,02		x	x
26						0,02		0,00	0,10
27	0,04	x	0,00			0,02		x	x
28						x		x	x
29	0,05	0,00						x	
30								0,10	0,03
31	x		x			x		x	x
32								x	
33	x	x	0,03			0,00	0,02	0,06	0,03
34	x	0,10	0,09			x		x	x
35	x	0,10	0,05			x		0,01	x
36	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,08		0,05	0,03
37	0,01	x	0,04	0,01	0,03	0,05		x	0,10
38				x					
39		x	0,00		x				
40	x	x	0,02	0,08	0,01	0,04	x	x	0,07
41			x		0,04				

### Expressionsanalyse der TAA mRNA im Tumorgewebe mittels Real-Time PCR

Tabelle: P: Patientennummer; TP: Tumorpool (bestehend aus 20 Tumorproben); Messwerte sind normalisiert auf GAPDH; die Expressionsstärke ist relativ zur Expression eines Pools aus gesundem Brustgewebe (von 10 Proben) dargestellt (Expression = 1,00); Die Expressionsstärke wurde über die  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode errechnet; uD: Expression unterhalb der Detektionsschwelle; angegeben sind die Mittelwerte aus einer Triplikatbestimmung.

	<b>BA46</b>	<b>Ep-CAM</b>	<b>Her2/neu</b>	<b>hNIS</b>	<b>Hpa</b>	<b>MUC-1</b>	<b>PH20</b>
P3	0,46	2,48	3,66	14,23	1,33	5,93	uD
P4	0,30	5,25	5,79	0,80	1,61	5,03	uD
P8	0,23	0,42	0,82	1,68	0,28	5,70	uD
P10	0,78	0,93	1,94	uD	uD	14,60	uD
P15	0,28	5,94	1,73	3,10	1,50	0,06	uD
P24	0,35	5,54	22,54	15,81	0,42	5,78	uD
P29	0,15	0,59	2,54	3,96	0,43	0,07	uD
P30	1,44	2,12	1,35	0,23	0,04	0,00	uD
P40	0,68	3,68	1,44	uD	0,98	12,87	uD
TP	0,30	1,50	7,91	1,10	0,48	1,12	uD

### Zusammenstellung der Daten aus der Universitäts-Frauenklinik

Ergebnisse der Tumorklassifikation: leeres Feld: nicht bestimmt; Bcl-2 und Her2/neu: Immunhistologische Färbung und semiquantitative Bestimmung, CEA: Serumkonzentration in µg / l; p53: Immunhistologische Färbung, angaben % positiver Tumorzellen; CA15.3: Serumkonzentration in U/ml; blaue Werte: im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht; von P17, P39 und P40 lagen keine Daten vor.

P	Tumor-Stadium	Bcl-2	CEA	Her2/neu	p53	CA15.3
1	III	2+	37,7	0	5%	28
2			1,6			25
3	II	2+	1,1	0	0	28
4	II	0		0	0	
5	II	1+	1,7	0	0	6
6	II	0	1,8	3+	70%	23
7	I	3+	1,3	0	0	13
8	II	0	2,2	0	80%	7
9	I	2+	1,1	0	0	21
10	II	3+	1,8	0		12
11	I		0,9	0	0	12
12	II	1+	2,8	0	0	20
13	II	3+	2,3	0	< 5%	16
14	I	0		0	0	
15	II	2+	0,8	0	60%	30
16	II	1+	0,5	0	0	17
18	I	0	1,1	0	0	9
19	II	2+	0,8	0	0	15
20	I	3+	1,1	0	0	25
21	I	0	3,2	0	5%	33
22	I	1+	1,3	0	5%	20
23	III	0	1,2	0	100%	26
24	I	2+		0	0	
25	III	0	1,9	0	0	62
26	I	2+	1,9	0	0	15
27	I	0	1,9	3+	0	10
28	I	3+	1,2	0	0	18
29	I					
30	I	0	2,1	0	0	8
31	I					
32	I	3+	1,5	0	0	18
33	I	2+	1,9	0	0	31
34	I	0	1,1	3+	0	17
35	III	1+	1,4	2+	0	6
36	I	0	1,1	3+	80%	12
37	I	0	2,8	3+	5%	34
38	III	2+	1,2	0	0	20
41	I	3+	1,1	0	0	17,4

### Aufstellung aller verwendeten Bakterien-Klone für den Mikroarray

Liste aller auf dem Mikroarray befindlichen Klone: mit Angabe des TAA, des Gen Namens (aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information*) und der Identifikationsnummer der Klone aus der Datenbank des Deutschen Ressourcen Zentrum für Genomforschung (RZPD-ID).

TAA	Gen Bezeichnung	RZPD-ID	TAA	Gen Bezeichnung	RZPD-ID
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998M2171	<b>Krt18</b>	Krt18	IMAGp998M1556
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998M1471	<b>Krt18</b>	Krt18	IMAGp998F0823
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998P0485	<b>LAGE-1</b>	CTAG2	IMAGp998B1610573
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998C1396	<b>LAGE-1</b>	CTAG2	IMAGp998O0612010
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998N0189	<b>LAGE-1</b>	CTAG2	IMAGp998G0212018
<b>BA46</b>	MFGE8	IMAGp998I23118	<b>LAGE-1</b>	CTAG2	IMAGp998L0212006
<b>Bcl-2</b>	bcl-2	IMAGp998F11469	<b>MAGE-2</b>	MAGE	IMAGp998B0177
<b>Bcl-2</b>	bcl-2	IMAGp998C03223	<b>MAGE-2</b>	MAGE	IMAGp998I17271
<b>Bcl-2</b>	bcl-2	IMAGp998J04538	<b>MAGE-2</b>	MAGE	IMAGp998M09671
<b>Bcl-2</b>	bcl-2	IMAGp998K19582	<b>MAGE-2</b>	MAGE	IMAGp998B082482
<b>Bcl-2</b>	bcl-2	IMAGp998F23566	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998N2488
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998L13736	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998O14123
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998N0193	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998G14128
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998N0783	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998A23241
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998J21100	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998L05246
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998L21153	<b>MUC-1</b>	MUC-1	IMAGp998I10235
<b>Cyclin-D1</b>	CCND1	IMAGp998K21198	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998L112103
<b>Ep-CAM</b>	TACSTD1	IMAGp998G204960	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998M0433
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998D12841	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998E1594
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998K2134	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998M0995
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998I01209	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998F09123
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998C17223	<b>PSA</b>	KLK3	IMAGp998B04134
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998M04553	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998P04256
<b>Her2/neu</b>	ERBB2	IMAGp998F04673	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998I08519
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998A18869	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998C05623
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998H10226	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998C08658
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998N0477	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998A091928
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998C14140	<b>p21ras</b>	GAP1IP4BP	IMAGp998E232728
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998M11185	<b>p53</b>	TP53	IMAGp998M11478
<b>HGF</b>	HGF	IMAGp998K24174	<b>p53</b>	TP53	IMAGp998C0576
<b>Heparanase</b>	HPSE	IMAGp998A05561	<b>p53</b>	TP53	IMAGp998I242297
<b>Heparanase</b>	HPSE	IMAGp998B16561	<b>p53</b>	TP53	IMAGp998J022687
<b>Heparanase</b>	HPSE	IMAGp998M03567	<b>p53</b>	TP53	IMAGp998O135821
<b>Heparanase</b>	HPSE	IMAGp998D031169			
<b>Heparanase</b>	HPSE	IMAGp998I241746			

### Faktor der differentiellen Expression der TAA gemessen mittels Mikroarray

Tabelle 1: Faktor der differentiellen Expression der TAA BA46, Bcl-2, Cyclin-D1, Ep-CAM und Her2/neu für alle untersuchten Tumorgewebeproben und dem Tumorpool (bestehend aus 20 Proben); hybridisiert gegen eine Referenz bestehend aus einem Pool aus 10 gesunden Brustgewebeproben; bei einem Faktor >2 wird von einer differentiellen Expression verglichen mit der gesunden Referenz ausgegangen (blau dargestellt).

TAA	RZPD ID	P3	P4	P8	P10	P15	P24	P29	P30	TP
BA46	IMAGp998M2171	<2	<2	<2	<2	-2,5	<2	<2	2,3	<2
	IMAGp998M1471	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998P0485	<2	<2	<2	<2	<2	<2	-2,2	<2	<2
	IMAGp998C1396	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998N0189	<2	<2	<2	<2	-2,5	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998I23118	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Bcl-2	IMAGp998F11469	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998C03223	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998J04538	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998K19582	<2	<2	<2	2,5	<2	<2	2,2	<2	<2
	IMAGp998F23566	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Cyclin-D1	IMAGp998L13736	<2	2,0	<2	<2	<2	2,4	6,7	<2	<2
	IMAGp998N0193	<2	<2	2,1	2,1	<2	<2	3,9	<2	<2
	IMAGp998N0783	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998J21100	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998L21153	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998K21198	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Ep-CAM	IMAGp998G204960	2,0	<2	<2	2,6	<2	<2	<2	<2	<2
Her2/neu	IMAGp998D12841	2,3	<2	<2	5,1	<2	2,9	3,4	<2	3,8
	IMAGp998K2134	2,5	<2	<2	3,5	<2	2,5	3,6	<2	2,8
	IMAGp998I01209	<2	<2	<2	3,8	<2	<2	2,7	<2	2,6
	IMAGp998C17223	<2	<2	<2	2,7	<2	<2	2,1	<2	<2
	IMAGp998M04553	<2	<2	<2	3,2	<2	3,8	2,4	<2	3,6
	IMAGp998F04673	<2	<2	<2	2,9	<2	3,3	2,3	<2	3,5

**Tabelle II:** Faktor der differentiellen Expression der TAA HGF, Hpa, Krt, LAGE-1, MAGE-2 und MUC-1 für alle untersuchten Tumorgewebeproben und dem Tumorpool (bestehend aus 20 Proben); hybridisiert gegen eine Referenz bestehend aus einem Pool aus 10 gesunden Brustgewebeproben; bei einem Faktor >2 wird von einer differentiellen Expression verglichen mit der gesunden Referenz ausgegangen (blau dargestellt).

TAA	RZPD ID	P3	P4	P8	P10	P15	P24	P29	P30	TP
HGF	IMAGp998A18869	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998H10226	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998N0477	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998C14140	4,2	2,6	4,4	3,0	2,7	2,4	<2	<2	2,1
	IMAGp998M11185	<2	2,5	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998K24174	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Hpa	IMAGp998A05561	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998B16561	<2	<2	<2	2,8	<2	<2	2,2	<2	<2
	IMAGp998M03567	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998D031169	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998I241746	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Krt18	IMAGp998M1556	5,3	3,6	4,3	3,9	2,8	3,6	8,1	<2	4,1
	IMAGp998F0823	2,1	3,3	2,9	<2	2,8	2,5	2,4	<2	2,1
LAGE-1	IMAGp998B1610573	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998O0612010	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998G0212018	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998L0212006	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
MAGE-2	IMAGp998I17271	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998M09671	<2	<2	<2	2,1	<2	2,7	<2	2,4	<2
	IMAGp998B082482	<2	<2	<2	2,2	<2	3,4	<2	2,6	<2
	IMAGp998B0177	<2	<2	<2	<2	<2	2,2	<2	<2	<2
MUC-1	IMAGp998N2488	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998O14123	14,4	6,6	9,1	8,2	6,9	4,8	2,5	<2	4,3
	IMAGp998G14128	7,7	3,3	5,9	5,7	4,2	3,3	2,2	<2	2,9
	IMAGp998A23241	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	IMAGp998L05246	3,8	2,4	4,4	3,5	2,9	2,3	<2	<2	2,5
	IMAGp998I10235	4,5	3,8	3,2	2,5	2,7	2,4	<2	<2	<2

