

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut**

Heparinisiertes Vollblut durften wir freundlicherweise nach Aufklärung und Einwilligung von HLA-A\*0201-positiven Patienten mit KRK und MK, sowie von gesunden HLA-A\*0201-positiven Personen gewinnen. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin oder der Universitätsklinik Heidelberg in Behandlung. Zur Analyse der spontanen T-Zell-Antworten wurden nur Patienten ohne vorangegangene Immuntherapie (Antikörper, Vakzinierung, Zytokine, adoptive T-Zell-Therapie, Stammzell-Transplantation) untersucht. Es wurde darauf geachtet, daß Vortherapien wie primäre Tumorresektion, Strahlen- und Chemotherapie mindestens einen Monat zurücklagen. Bei einigen Patienten konnten Blutabnahmen zu späteren Zeitpunkten nach Immuntherapien erfolgen (siehe Tab. 3.8 Ergebnisteil). Als gesunde Kontrollpersonen dienten Blutspender der Blutbank unserer Klinik des Uniklinikums Benjamin Franklin, Berlin. Die mononuklearen Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden durch die Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aus dem heparinisierten Blut isoliert und anschließend gewaschen und bei -80°C eingefroren. (siehe Abschnitt 2.2.1).

#### **2.1.2 Kulturmedium**

Für die Kultivierung der Lymphozyten wurde IMDM (Basal Iscove's Medium, Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland) versetzt mit 10% humanem AB-Serum (PAA, Linz, Österreich), 1mmol L-Glutamin (2%), 100U/l Penicillin und 100mg/l Streptomycin (1%) (alle Seromed Biochrom) verwendet. Im Folgenden wird dieses Medium als "Standardmedium" bezeichnet.

#### **2.1.3 Einfriermedium**

Als Einfriermedium der Lymphozyten diente ebenfalls IMDM (50%), das mit humanem AB-Serum (40%) und DMSO (10%) (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt wurde.

#### **2.1.4 Phosphatpuffer**

Als Phosphatpuffer diente PBS-Dulbecco ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium (Dulbecco's phosphate buffered saline; Seromed Biochrom).

#### **2.1.5 Dichtegradient**

Zur Lymphozyten-Isolierung wurde Ficoll-Hypaque-Lösung mit der Dichte 1,077 verwendet (Biocoll; Seromed Biochrom).

#### **2.1.6 Antikörper zur HLA-A\*0201-Bestimmung**

Zur Testung auf HLA-A\*0201-Positivität der Kontrollpersonen, der MK-Patienten und der KRK-Patienten diente BB7.2, ein monoklonaler Maus-anti-human-IgG-Antikörper gegen HLA-A\*0201, der freundlicherweise als Medienüberstand von Prof. H. G. Rammensee, Tübingen, zur Verfügung gestellt wurde.

FITC (Fluorescein-Isothiocyanate)-markierte monoklonale Ziege-anti-Maus-IgG- und -IgM-Antikörper [GAM-FITC – IgG oder – IgM] [F(ab)<sub>2</sub> Fragment # 115-096-044] von der Firma Dianova, Hamburg, Deutschland wurden als sekundäre Antikörper verwendet.

#### **2.1.7 Peptide und PWM**

Die Peptide wurden unter Verwendung eines Peptide-Synthesizer-Biosystems (Foster City, CA, USA) entsprechend der veröffentlichten Standard-Protokolle hergestellt. Sie enthielten alle ein HLA-A\*0201-Bindungsmotiv und bestanden aus folgenden Sequenzen: Ep-CAM p263-271 (GLKAGVIAV) [ATV-Nr.: 9262] (Ras et al. 1997), her-2/neu p654-662 (IISAVVGIL) [ATV-Nr.: 0257] (Peoples et al. 1995a; Peiper et al. 1997), CEA p571-579 (YLSGANLNL, CAP-1) [ATV-Nr.: 0462] (Tsang et al. 1995) und das Influenza Matrix-Protein p58-66 (GILGFVFTL) (Bednarek et al. 1991).

Bei den vier MK-Patientinnen, die das Medikament Herceptin® erhalten haben, sowie bei der Kontrollgruppe wurden zusätzlich, sofern genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, die T-Zell-Antworten gegen zwei weitere her-2/neu-Peptide getestet: her-2/neu 9 mer an Aminosäureposition 369-377 (KIFGSLAFL) (Fisk et al. 1995) und her-2/neu 17 mer (p883-899) mit der Sequenz KVPIKWMALESILRRRF (Kobayashi et al. 2000).

Die Peptide wurden mittels reverser HPLC (high performance liquid chromatography) gereinigt und mithilfe der Massenspektrometrie überprüft. Anschließend wurden sie in DMSO in einer Konzentration von 5mg/ml gelöst und weiter mit PBS verdünnt, so daß sie in einer Endkonzentration von 10µg/ml eingesetzt werden konnten.

Alle verwendeten Peptide wurden freundlicherweise von Prof. H. G. Rammensee (Universität Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Als Positivkontrolle diente auf 1µg/ml verdünntes PWM (Pokeweed Mitogen) von Sigma, Diesenhofen, Deutschland)

### **2.1.8 Antikörper für den ELISPOT-Assay**

Die Antikörper für den Elispot wurden von der Firma PharMingen (Hamburg, Deutschland) bezogen. Als erster Antikörper diente der monoklonale Maus-anti-human-IFN- $\gamma$ -Antikörper sowohl der Charge: M0 51477 als auch der Charge: M0 58859.

Als zweiter Antikörper wurde der monoklonale biotinylierte Maus-anti-human-IFN- $\gamma$ -Antikörper des Lot M0 30694 eingesetzt.

Die Antikörper-Chargen wurden zuvor in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet, wobei Anzahl, Größe und Farbintensität der im ELISPOT erhaltenen Spots als Kriterien für die Ermittlung der optimalen Konzentration dienten.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung von mononuklearen Zellen aus heparinisiertem Vollblut**

Heparinisiertes Vollblut wurde 1:2 mit sterilem PBS verdünnt und davon 35ml vorsichtig auf 15ml Ficoll geschichtet. Durch eine 30-minütige Ficoll-Dichte-Gradient-Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse wurden die PBMC vom Restblut isoliert: Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden der Zentrifugen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht), während die Population der mononuklearen Zellen (MNC) als weiße Interphase an der Grenze zwischen der PBS-Plasma-Phase (oben) und der Ficoll-Hypaque-Phase (unten) verbleibt. Die MNC-haltige Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen.

Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer (Sigma, Diesenhofen, Deutschland) wurden die MNC in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml (1 Mio. Zellen pro ml) in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO; Merck) aufgenommen. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit je 1ml/Tube auf spezielle Einfrier-Tubes (Nunc, Dänemark) verteilt und in Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden) langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  gekühlt, um schließlich bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zum Anfärben der MNC wurden zu  $50\mu\text{l}$  der Zelllösung ebenfalls  $50\mu\text{l}$  einer 1:2-verdünnten Trypanblau–PBS-Mischung (Firma Sigma, bzw. Seromed Biochrom) dazugegeben. Eine kleinere Menge davon wurde dann in die Neubauer-Kammer (Sigma) übertragen und die Zellen innerhalb der 16 Quadrate (= 4 Großquadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt.

Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von  $0,1\mu\text{l}$  pro Großquadrat:

Gesamtzellzahl der Ausgangslösung =  $0,25 \times \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen}$ .

### **2.2.3 Zellen auftauen**

Der Inhalt eines Tubes (1ml Zelllösung mit  $1 \times 10^6$  MNC) wurde zum Auftauen in 25ml  $30-37^\circ\text{C}$  warmes RPMI-Medium (Seromed Biochrom), zugesetzt mit 10% FCS, 2% Glutamin und 1% Penicillin/Streptokinase, aufgenommen und anschließend bei 2000 rpm 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Das Zell-Sediment (ca.  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Individuum) wurde dann mit 4ml Standardmedium in ein Röhrchen mit lockerem Deckel überführt. Die Aufbewahrung erfolgte über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Am folgenden Tag wurde eine erneute Zellzählung in der Neubauerkammer vorgenommen.

### **2.2.4 HLA-A2-Bestimmung mittels Durchflußzytometrie**

Pro Spender bzw. Patient wurden zwei FACS-Röhrchen angelegt, so daß eines der Röhrchen als Negativkontrolle mitgeführt werden konnte. Die aufgetauten und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$ ,

unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubierten MNC der Spender/Patienten wurden 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Jedes Sediment wurde dann in 1ml Standardmedium aufgenommen und auf zwei FACS-Röhrchen verteilt. Diese wurden nun mit 2ml PBS + 2% Alphaglobulin aufgefüllt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Absättigung von freien Fc-Rezeptoren und soll die unspezifische Antikörperbindung minimieren. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C, wurden jeweils einem Röhrchen jeden Spenders 10µl des monoklonalen Maus-anti-human-IgG-Antikörpers BB7.2 gegen HLA-A2 (ATCC) hinzugefügt und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das zweite Röhrchen wurde jeweils als Negativkontrolle ohne Antikörper belassen und ebenfalls 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit PBS und Alphaglobulin und erneuter Zentrifugation erfolgte die Färbung, indem alle Proben 15 Minuten mit je 5µl GAM-FITC – IgG - IgM [FITC-markierte monoklonale Ziege-anti-Maus-IgG–IgM-Antikörper] auf Eis und unter Lichtverschluß inkubiert wurden. Nach erneutem Auffüllen mit 3ml PBS + Alphaglobulin und einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C erfolgte das Fixieren der Färbung mit 100µl PBS + 1% Formaldehyd je Röhrchen.

Die Erhebung der Daten erfolgte mittels des FACS-Calibur von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland. Im Inneren des FACS-Geräts werden die Zellen durch eine Kapillare gepreßt, so daß ein Strom einzelner Zellen entsteht, der dann von einem Laserstrahl erfaßt wird. Photodetektoren (Photomultiplier) messen die Lichtstreuung (die ein Maß für die Zellgröße und die Granularität einer Zelle darstellt) und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, während ein Computer diese Informationen analysiert.

Die anschließende Auswertung der erhobenen Daten wurde unter Verwendung der CellQuest Software von Becton Dickinson, Heidelberg, durchgeführt.

Um nur spezifische Fluoreszenz-Intensitäten zu messen, wurden die Eigenfluoreszenzen der Zellen und die unspezifischen Bindungen (Negativkontrollen) von den Meßergebnissen subtrahiert.

### **2.2.5 IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay**

Die antigeninduzierte Zytokin-Sekretion von aktivierten T-Zellen kann genutzt werden, um antigenreaktive T-Zellen auf Einzelzellniveau zu identifizieren und zu quantifizieren. Wir

wählten hierfür den IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay, der mit hoher Sensitivität und Spezifität eine etablierte Test-Methode zum Nachweis spezifischer T-Zellen darstellt. Die Arbeitsschritte unterteilen sich in fünf Abschnitte, die an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden.

### **Durchführung**

Eine Nitrocellulose-Platte mit 96 Vertiefungen (Millititer, Milipore, Bredford, MA) wurde unter sterilen Bedingungen für einige Minuten mit 100 $\mu$ l PBS/Vertiefung benetzt. Anschließend wurden 50 $\mu$ l des Maus-anti-human-IFN- $\gamma$ -Antikörpers pro Vertiefung in einer Konzentration von 30 $\mu$ g/ml dazugegeben und die Platte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Nach Dekantieren des Antikörpers von der Platte werden die Vertiefungen mit je 100 $\mu$ l Iscove's-Medium (IMDM) und 10% humanem AB-Serum für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> blockiert. Dies soll die unspezifische Antikörper-Bindung minimieren.

Die aus Heparin-Vollblut isolierten und über Nacht im Brutschrank inkubierten PBMC wurden nun bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /1,2 ml mit je 200 $\mu$ l Zelllösung pro Vertiefung auf die ELISPOT-Platte pipettiert. Dies entspricht  $1,67 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung, bzw. ca. 1 Mio. Zellen in sechs Vertiefungen. Diese Konzentration hat sich in vorherigen Studien als optimal erwiesen.

Anschließend wurden die Peptide (Ep-CAM, her-2/neu, CEA, Influenza-Matrix-Protein) hinzugegeben, wobei sechs Vertiefungen für jedes Peptid verwendet wurden. Bei einer Peptidkonzentration von 10 $\mu$ g/ml wurden 20 $\mu$ l in jede Vertiefung pipettiert.

Des Weiteren wurde als Negativkontrolle in je sechs Vertiefungen pro Spender kein Antigen hinzugefügt. Zur Erstellung einer Positivkontrolle diente ein starkes Mitogen, PWM (pokeweed mitogen), von dem 2 $\mu$ l bei einer Konzentration von 1 $\mu$ g/ml in je eine Vertiefung jeden Spenders pipettiert wurden.

Die Platte wurde dann in Frischhaltefolie verpackt und über Nacht (20–24h) bei 37°C, unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Nach diesem Schritt muß nicht mehr hochsteril gearbeitet werden. Die Platte wurde nun sechs mal mit 200 $\mu$ l/Vertiefung PBS + 0,05% Tween-20 (Sigma, Diesenhofen, Deutschland) zum Herauslösen von Zellbestandteilen gewaschen und gut ausgeklopft. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 4°C mit 50 $\mu$ l/Vertiefung eines biotinylierten Maus-anti-

human-IFN- $\gamma$ -Antikörpers in einer Konzentration von 0,312 $\mu$ g/ml in PBS. Diese Konzentration hat sich bei vorangegangenen Optimierungsexperimenten als die Günstigste herausgestellt.

### **Entwicklung**

Nach viermaligem Waschen der Platte mit 200 $\mu$ l PBS/Vertiefung wurden 100 $\mu$ l/Vertiefung Streptavidin-Alkaline-Phosphatase (1:1000 in PBS verdünnt; BioRad, München) hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschgang der Platte mit PBS wurden ihr 100 $\mu$ l/Vertiefung des farblosen BCIP/NBT-Substrats (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue-tetrazolium, BioRad, München) hinzugefügt. Das Enzym (alkalische Phosphatase) konvertiert nun das farblose Substrat in ein farbiges Substrat. Die sich einstellende grau-blaue Farbreaktion wurde nach ca. sieben Minuten unter kaltem Leitungswasser gestoppt.

### **Auswertung der Ergebnisse**

Nachdem die Platte über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß getrocknet wurde, wurde die Anzahl der farbigen Spots mithilfe des automatisierten, computergesteuerten Lesegeräts "ELISPOT-Reader" (AID, Herford, Deutschland) gezählt. Die Summe der ermittelten Anzahl von Spots in sechs Vertiefungen (ein Peptid) spiegelt den Anteil an reaktiven IFN- $\gamma$ -produzierenden zytotoxischen T-Zellen bezogen auf  $1 \times 10^6$  eingesetzte MNC wider. Die gemessene spontane IFN- $\gamma$ -Freisetzung (Negativkontrollen) wird als Hintergrund von der Gesamtzahl an Spots abgezogen.

### **2.3 Statistische Analysen**

Eine T-Zell-Antwort wurde dann als positiv betrachtet, wenn nach Subtraktion der Negativkontrolle mindestens 10 T-Zellen pro  $1 \times 10^6$  PBMC (entsprechend 6 Plattenvertiefungen) als Reaktion auf den Antigenkontakt IFN- $\gamma$  sezernierten. Außerdem mußte dieser Wert im Vergleich zur Negativkontrolle im einseitigen student's t-Test signifikant erhöht sein. Bei einem Testergebnis von  $p \leq 0.05$  wurde dies als positive T-Zell-Antwort gegen das entsprechende TAA-Epitop gewertet. Aufgrund der wiederholten Testungen sind diese Ergebnisse als deskriptiv zu betrachten.

Um herauszufinden, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl an positiven T-Zell-Antworten zwischen KRK-Patienten und MK-Patienten gab, wurden die Daten mit dem  $\chi^2$ -Test analysiert.