

## 1. Einleitung

### 1.1 Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem

Es gilt heutzutage als nachgewiesen, dass bei Patienten, die unter malignen Tumorerkrankungen leiden, das Tumorwachstum der Kontrolle des Immunsystems unterliegt. 1970 formulierte Burnet das Konzept der immunologischen Überwachung, in dem er die Schlüsselrolle der T-Zellen in der Kontrolle und Elimination der neu entstehenden, entarteten Zellen postulierte (Burnet, 1970). Gegen dieses Konzept sprach zunächst die identische Inzidenz der spontanen Karzinome bei Thymus-defizienten Mäusen (die wesentlich reduzierte Zahl der T-Zellen aufweisen) im Vergleich mit syngenen, immunkompetenten Mäusen vom Wildtyp (Stutman, 1979). Die Anhänger der Hypothese von Burnet wiesen dagegen auf die nach Entfernung des Thymus kompensatorisch erhöhte Zahl der NK-Zellen und vor allem auf die Anwesenheit der verbliebenen  $\alpha\beta$ -T-Zellen bei diesen Mäusen hin (Ikehara et al., 1984). Das Model von Stutman war somit immunkompromittiert, jedoch nicht immundefizient.

Das gehäufte Auftreten der Malignome bei Patienten nach Transplantationen und bei solchen, die unter angeborenen oder erworbenen Defekten des Immunsystems litten, schien ein eindeutiger Beweis für das Konzept der Immunüberwachung darzustellen (Penn, 1988). Die bald gewonnene Erkenntnis, dass die immunsuprimierten Patienten lediglich Neoplasien viraler Genese - wie Lymphome oder Kaposi Sarkome - häufiger entwickelten (bei unveränderter Inzidenz der epithelialen Neoplasien) schränkte das Konzept jedoch für mehrere Jahre auf die Virus-induzierten Tumoren ein (List, 1987).

In den neunziger Jahren erschienen Publikationen, die zur Renaissance der Hypothese von Burnet beitrugen. In einem Mausmodell wurde nachgewiesen, dass die Blockade des Interferon- $\gamma$ , eines (wie es schon damals vermutet wurde) wesentlichen Effektorzytokins der antitumoralen Antwort des Immunsystems, durch die monoklonale Antikörper zum schnelleren Wachstum der transplantierten Fibrosarkome führt (Dighe et al., 1994). Durch genetischen Knock-out einer Untereinheit des Interferon- $\gamma$ -Rezeptors erreichte man eine 10-20-mal höhere Sensivität der Mäuse auf chemische Tumorinduktion (Kaplan et al., 1998). Der genetische Ausfall eines anderen Effektors der zytotoxischen T-Zellen und der NK-Zellen, des Perforins, führte ebenfalls zu häufiger Entstehung der Lymphome und Bronchialkarzinome bei den Mäusen (Street et al., 2002).

Der definitive Beweis für das Konzept der Immunüberwachung erschien erst 2001. Shankaran berichtete über eine erhöhte Inzidenz der spontanen und chemisch induzierten Tumoren bei RAG2-Gen- (das Gen ist erforderlich für das Rearrangement der Antigenrezeptoren und somit für die Ausreifung der T- und B-Zellen) und STAT1- (das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Signalen nach Bindung an den IFN- $\gamma$  Rezeptor spielt) -defizienten Mäusen (Shankaran et al., 2001). Es handelte sich dabei um Adenokarzinome des Intestinaltraktes und der Brustdrüse (nur bei der kombinierten RAG2/STAT1 Defizienz), die im Alter von 12-15 Monaten sich entwickelt hatten; die immunkompetenten Kontrollmäusen blieben dagegen gesund.

Diese Studie brachte noch eine weitere wesentliche Erkenntnis. Die Methylchloranthen (MCA)-induzierten Sarkome (sowohl die, die in der immundefizienten Maus gewachsen waren als auch die, die in einer Wildtypmaus entstünden) waren nach der Transplantation in eine andere, RAG2-defiziente Maus nicht immunogen. Identisch verhielten sich die Tumoren aus der Wildtypmaus nach Transplantation in eine syngene, gesunde Maus (sie wurden nicht abgestoßen und zeigten Progress). Wesentlich immunogener waren dagegen die Neoplasien, die in einer **immundefizienten** Maus entstanden waren und in eine **immunkompetente** Wildtypmaus transplantiert wurden (40% wurden abgestoßen). Somit sind die Tumoren, die aus einem immunkompromittierten, lymphozytenlosen Modell stammen, wesentlich immunogener als die, die sich in der Anwesenheit des Immunsystems entwickeln. An Hand dieser Beobachtung suggerierten die Autoren der Studie, dass nur in der Anfangsphase der Tumorentwicklung das Immunsystem eine protektive Rolle spielt, später aber zu einer Selektion der besonders malignen Klonen beiträgt, die sich durch Schutzmechanismen („escape“) der Überwachung entziehen. 2004 wurde vorgeschlagen, in Anbetracht der komplexen Interaktionen den Termin „Immunüberwachung“ (immunosurveillance) durch „Immunprägung“ (immunoediting) zu ersetzen (Dunn, 2004).

Zum anderen, parallel stattgefundenem Fortschritt der Tumorimmunologie, gehörte die Entdeckung der tumorassoziierten Antigene. Schon in den fünfziger Jahren konnte man sehen, dass das zwischen zwei allogenen Mäusen transplantierte Tumorgewebe abgestoßen wurde, wohingegen im syngenen Empfänger der Tumor weiterwuchs (Prehn, 1957). Obwohl die Ergebnisse initial falsch interpretiert wurden, da die Immunantwort sich gegen die MHC-Moleküle richtete, entstand eine Hypothese, dass in den Tumoren neue Antigene entstehen, die auch immunogen wirken und das Ziel einer spezifischen Therapie werden könnten (Klein, 1960).

1991 wurde das erste Epitop, das durch die T-Zellen erkannt wird, identifiziert – MAGE1 beim malignen Melanom (van der Bruggen, 1991). Die nachfolgende Suche mit Hilfe der modernen Methoden wie cDNA-Expressionsklonierung führte zu Charakterisierung von über 70 tumorassoziierten Antigenen, die Immunogenität aufweisen (Boon, 1996).

## 1.2 Effektorzellen der immunologischen Tumorabwehr

An den komplexen Interaktionen zwischen den malignen Erkrankungen und dem Immunsystem sind sowohl Mechanismen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität beteiligt.

Als Effektorzellen der **angeborenen** Immunität fungieren:

- a) **NK – Zellen:** Sie ergänzen sich mit den zytolytischen  $CD8^+$  T Lymphozyten (s.u.), indem die MHC I-negative Zellen, die der adaptiven Immunantwort entfliehen, von ihnen spontan mittels Perforin lysiert werden (Whiteside und Herberman, 1995). Nach einer in vitro Stimulation mit IL-2 wandeln sie sich in die Lymphokin-Aktivierten Killer Zellen (LAK), die ähnlich den großen granulierten Lymphozyten aussehen und eine tumorlytische Aktivität aufweisen (Rosenberg, 1986).
- b) **(CD8-)  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen:** Diese kleine (5% aller peripherer Lymphozyten), vor allem intraepithelial und in der Haut lokalisierte Subpopulation, hat eine hohe Affinität zu den Hitzeschockproteinen (die besonders in der initialen Phase des Tumorwachstums auf den Zelloberflächen exprimiert werden). Die  $\gamma\delta$ -knockout Mäuse weisen eine erhöhte Inzidenz der kutanen Malignome auf (Girardi, 2001).
- c) **NKT-Zellen (natural killer T cells):** Ebenfalls nicht MHC-restriktierten T-Zellen, die die über das CD1 Molekül präsentierte Lipide mit ihrem in der Varianz eingeschränkten TCR erkennen. Sie stimulieren TH1 und TH2 Helfer-Zellen mittels IL-4 und Interferon- $\gamma$  und bilden somit eine Brücke zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Godfrey, 2000).
- d) **Makrophagen:** Ihre Rolle ist umstritten, einerseits sind sie zu der Phagozytose der Tumorzellen fähig und setzen Zytokine frei, die in bestimmten Tiermodellen das Tumorwachstum inhibieren. Andererseits tragen dieselben Zytokine in anderen Modellen zu einer entzündungsbedingten, malignen Transformation der gesunden Zellen (Jakobisiak, 2003).

Die **CD8<sup>+</sup> T-Zellen** sind Schlüsselfiguren der **adaptiven** Immunantwort (Smyth, 2001). Es werden heute zwei Aktivierungswege diskutiert:

a) Konzept der Kreuzpräsentation („cross priming“) mit Beteiligung der **CD8<sup>+</sup> αβ TCR<sup>+</sup>-Zellen**. Dieses Modell propagiert folgende Kaskade: die transformierte Zelle sendet Destruktionssignale in Form von Zytokinen oder Hitzeschockproteinen, die die Aufnahme und Zersetzung dieser Zelle durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) fordern (Ochsenbein, 2001). Die Bestandteile der malignen Zellen werden in den MHC Klasse-I-Weg eingeschleust: im Proteasom gespalten, ATP-abhängig über den TAP-Transportsystem in das zytoplasmatische Retikulum gebracht, mit dem MHC-Molekül verbunden und schließlich präsentiert. Die Präsentation für die Effektorzellen findet in den lymphatischen Organen statt. Die Interaktion wird beeinflusst durch die Affinität des Peptids zu der MHC-Allele und durch die Affinität des TCRs zu dem Epitop. Spezifische Interaktion des TCRs mit dem Antigen auf der Oberfläche der APC und zusätzliche Kostimulation zwischen CD80 der APC und CD28 bzw. NKG2D der CD8<sup>+</sup> Zelle bewirken die Aktivierung eines naiven Lymphozyten, seine klonale Expansion (durch Synthese der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-Familie), Proliferation und schließlich Transformation in eine zytotoxische T-Zelle (CTL). Diese ist fähig im peripheren Gewebe die malignen Zellen zu lysieren.

Dieses Modell wird durch die makroskopisch sichtbare Infiltration des Tumorgewebes durch hochpotente APC - dendritische Zellen (DCs) unterstützt (Tsuge, 2000). Diese Infiltration ist zwar klein im Vergleich zu Präsenz anderer immunologischen Zellen, im gesunden Gewebe ist sie jedoch absolut nicht nachweisbar. Es ist auch gelungen nachzuweisen, dass sich die T-Zellen tatsächlich um die DCs herum sammeln (McDermott, 2002).

b) Die **direkte** Erkennung der mit Hilfe der MHC-Peptide präsentierten Epitope durch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde ebenfalls untersucht (Quatan, 2004). Mit ihren durch somatische Rekombination entstandenen Rezeptoren würden sie die 9-10 Aminosäuren lange Tumorpeptide **ohne** Beteiligung der APC erkennen (das Konzept des „direct priming“). In dem Fall stelle die Tumorzelle selbst die antigenpräsentierende Komponente dar, der Prozess der Antigenerkennung würde ebenfalls im lymphatischen Gewebe stattfinden. Diesem Weg wurde lange Zeit eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, da die MHC Expression auf den malignen Zellen variabel und meistens reduziert ist (Rees, 1999). Die auf diesem Modell basierende Versuche des Transfers der für Kostimulatoren, Zytokine oder MHC-Moleküle kodierenden Gene, in die für die Impfung der Patienten vorgesehenen Tumorzellen (um auf

diese Weise die in-vivo Interaktionen zu verstärken) brachten ebenfalls keine zufriedenstellende Resultate (Ostrand-Rosenberg, 1999). Trotz dieser Misserfolge stellt das Konzept des „direct priming“ nach wie vor ein versprechendes Modell für viele immuntherapeutische Ansätze (Ward, 2002)

Als Effektormechanismen der CTLs dienen die Sekretion von Perforin, Interferon- $\gamma$ , TNF und GM-CSF sowie die freigesetzten, enzymatischen Proteasen - Granzyme (Barth, 1991). Perforin bildet in der Membran der Zielzelle unselektive Kanäle, die zum Tod durch osmotische Umverteilung führen, die Granzyme induzieren in den Tumorzellen die Caspasen und leiten somit die Apoptose ein - ein Effekt, der auch durch TNF- $\alpha$  auslösbar ist. Das IFN- $\gamma$  aktiviert die NK-Zellen, fordert die Antigenprozessierung, die Expression von den beladenen MHC-Molekülen und den Kostimulatoren auf APC (Street, 2001). Ein anderer Mechanismus ist die Expression des FasL, eines Liganden, der ebenfalls die Apoptose der Zielzelle auslöst.

Seit einigen Jahren besteht die Überzeugung, dass die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ebenfalls in der Tumorummunologie eine Rolle spielen, indem sie bei dem „cross-priming“ die DC unterstützen oder gar ersetzen (Greenberg, 1991; Ossendorp, 1998). Die von ihnen erkannten Epitope müssen in den MHC II Molekülen, deren Expression in verschiedenen Neoplasien sehr variiert, präsentiert werden. Während MHC II Moleküle im gesunden Mammagewebe gar nicht exprimiert werden, weisen 50% der Mammakarzinome die Präsenz dieser Moleküle auf (Concha, 1995) und diese ist mit Prognose der Patienten assoziiert. Solche indirekte Hinweise auf Beteiligung der T-Helfer Zellen in der Tumorabwehr und geringe Modifikationen der Strategien der Antigensuche ergaben konsequent seit 1994 ca. 30 Epitope, die durch die CD4<sup>+</sup> Zellen in der Tasche des MHC II Komplexes erkannt werden (Renkvist, 2001). Diese Epitope sind meistens Bestandteile der bereits zuvor identifizierten Tumorantigene. Bisher wurde jedoch nicht über immuntherapeutische Konsequenzen dieser Entdeckungen berichtet.

### **1.3 Tumorantigene**

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Fragmente von Tumorproteinen, die als Ziel der Effektorzellen im Prozess der Immunüberwachung der transformierten Zellen dienen. Sie befinden sich sowohl auf der Zellmembran als auch im Plasma oder im Zellkern. Fast alle bisher identifizierten TAA werden in der Tasche der MHC I -Moleküle präsentiert und sind

somit potentiell der zytotoxischen Antwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgesetzt (Van den Eynde und van der Bruggen, 1997). Die Existenz der TAA stellt die Basis für viele immuntherapeutische Ansätze, deren Ziel ist, durch Potenzierung der natürlich vorkommenden Immunantwort ein für das Wachstum oder Überleben der Tumorzellen essentielles Protein zu zerstören. Neben diesem Kriterium ist ein modellhaftes, ideales TAA für den Malignom spezifisch (in gesunden Zellen nicht nachweisbar), enthält Aminosäuresequenzen, die mittels MHC-Komplexe gebunden und präsentiert werden, sowie durch die T-Zellen in dem MHC-restriktierten Modus erkennbar sind. Seine Expression soll im Laufe des Zellzyklus nicht einer Herunterregulierung unterliegen. Idealerweise induziert es auch eine spontane, hochfrequente, zelluläre Immunantwort (Vonderheide, 2002).

Dennoch sind die meisten Tumorantigene nicht Malignom-spezifisch und werden bereits in gesunden Geweben exprimiert. Nach der Transformation kann es jedoch zur Steigerung bzw. Minderung des Expressionsgrades oder zur biochemischen Strukturänderungen des Antigens kommen. Trotz der methodologischen Fortschritten ist die Anzahl der bisher identifizierten und molekular charakterisierten TAA niedrig. Darüber hinaus entstehen auf Grund der genetischen Heterogenität der Tumore bei vielen Patienten die so genannten privaten Tumorantigene, die Individuum spezifisch sind. Je nach Expressionsmuster lassen sich die TAA in vier Gruppen unterteilen (Rosenberg, 2001):

1. **Differenzierungsantigene:** dabei handelt sich um Antigene, die für das Gewebe, aus dem sich die Malignome entwickeln, spezifisch sind. Die meisten von ihnen wurden in Melanomen und normalen Melanozyten gefunden. Die bekannten Vertreter sind Tyrosinase und Gp100 (Brichard, 1993).
2. **Überexprimierte Antigene** entstehen durch verstärkte Expression der auch im gesunden Gewebe vorhandenen Proteine sowie durch ihre posttranslationelle Modifikationen. Sie weisen keine Tumorspezifität auf. Zu ihnen gehören die in Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten TAA: hTERT - katalytische Untereinheit der in Tumoren überexprimierten Telomerase und Muzin- ein durch alternierende Glykosylierung verändertes Molekül (Vonderheide, 1999; Jerome, 1991).
3. **Cancer/Testes Antigene** werden nur in Tumoren (unterschiedlicher Histologie) und in den Spermatoozyten sowie Plazenta exprimiert. Sie entstehen durch Reaktivierung stiller Gene, die nach Abschluss der Entwicklung nicht mehr transkribiert werden. Ihre Funktion ist unklar. Sie eignen sich besonders als Ziele der adoptiven (auf dem Transfer der spezifischen T-Zellen basierenden) oder Vakzinen-basierten Immuntherapie, da die Antigene im Hodengewebe

immunprivilegiert sind (es findet dort keine MHC I und II Moleküle Expression statt) und somit nicht mitangegriffen wären. Zu dieser Gruppe gehört das hochimmunogene NY-ESO-1, präsent auf Mamma-, Prostata-, Ovarialkarzinomen sowie auf Melanomen (Jager, 1998).

4. **Tumor-spezifische Antigene** sind nur im Tumorgewebe vorhanden. Diese Proteine resultieren aus Punktmutationen (z.B. des Onkogens RAS oder des Tumorsuppressorgens p53) oder Translokationen (Fusionsprotein bcr-abl in chronisch myeloischen Leukämie).

### 1.3.1 Tumorantigen Muzin, kodiert durch das Gen MUC1

Muzine sind polymorphe, hochmolekulare Glykoproteine, deren Glykosylierungsgrad 50 bis 90 % beträgt. Sie sind auf den sekretorischen, epithelialen Geweben der Mamma, des Kolons und des Pankreas lokalisiert und dienen dem antibakteriellen und antichemischen Schutz der epithelialen Oberfläche (Gendler, 2001). Sie werden ausschließlich an der apikalen Zelloberfläche exprimiert und reichen direkt ins Lumen hinein. Bis heute wurden 11 Unterklassen identifiziert, 5 davon (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7) bilden ein extrazelluläres Gel in der unmittelbaren Nähe der Zellmembran ohne in dieser Membran verankert zu sein, die anderen 6 (MUC1, MUC 4, MUC11, MUC 12, MUC13) besitzen jeweils eine transmembranäre und zytoplasmatische Domäne (Perez-Vilar und Hill, 1999).

Muzin, kodiert durch das Gen MUC1, ist durch eine hydrophobe Region in der Nähe des carboxyterminalen Endes an die Zellmembran angeheftet. Die besonders interessante, extrazelluläre Domäne (bestehend aus 1000 bis 2200 Aminosäuren) ist charakterisiert durch das Vorkommen von Wiederholungssequenzen - „Tandem repeats“ (Lancaster, 1990). Bei der nordeuropäischen Bevölkerung besteht die Domäne aus 25-125 Wiederholungssequenzen, die sich wiederum aus 20 Aminosäuren zusammensetzen. Die Sequenz eines der „Tandem Repeats“ lautet: PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA. Die Zahl der Repeats beim Menschen unterliegt dem genetischen Polymorphismus, dagegen besitzt die Maus immer 16 Wiederholungssequenzen (Vos, 1991). Die Höhe der Domäne beträgt 200-500 nm und sie reicht damit weit über den 10 nm hohen Kohlenhydratsaum an der Außenfläche der Zellmembran (Glykokalyx) hinaus (Bramwell, 1986) . Die zytoplasmatische Domäne ist dagegen kurz und besteht aus 72 AS.

Der Grad und die Art der Glykosylierung von Muzin sind entscheidend für die Funktion und Antigenität des Moleküls. Bei Muzin dominiert die O-Glykosydische Bindung zwischen den Hydroxylgruppen der Aminosäuren und N-Acetylgalaktosamin (Hanisch, 1990). Die Tandem Repeat (TR) Domäne ist reich an Serin und Threonin. Innerhalb eines TR gibt es 5

Möglichkeiten für die O-Glykosylierung: 2 am Serin und 3 Threonin, normalerweise werden jedoch 2 AS innerhalb eines Repeats dafür ausgenutzt. Bei der Anheftung des N-Acetylgalaktosamins fungiert die N-Acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc) als Enzym. Anschließend wird Galaktose „angeheftet“ – es entsteht die erste Kernstruktur (**core1**), die die Basis für weitere Kettenverlängerungen darstellt. Im gesunden Gewebe erfolgt dann die alternative Addition der Galaktose und des N-Acetylglucosamins (GlcNAc), so ergeben sich Ketten die gerade oder verzweigt sein können (**core2**). Entscheidend für den Kettenabbruch ist die Anheftung der Neuraminsäure durch die Sialtransferase (Überblick in Taylor-Papadimitriou, 2002)

Das MUC1-Muzin, welches auf dem neoplastischen Gewebe vorhanden ist, unterscheidet sich erheblich von dem auf gesunden Zellen. Der Grad der Expression ist wesentlich höher - bis zu fünfzigfach beim Mammakarzinom (Strous, 1992), innerhalb eines Tandem Repeats werden mehr Stellen glykosyliert (Burchell, 2001). So sind in den gesunden epithelialen Zellen durchschnittlich 50% der potentiellen Stellen glykosyliert, dagegen weist die Brustzelllinie T47D eine fast vollständige Glykosylierung auf (Muller, 1999). Die Länge und der Aufbau der Glykosylierungskette von Muzin auf den transformierten Zellen sind ebenfalls unterschiedlich. Bei beibehaltener Aminosäuresequenz, erfolgt eine Betonung der core1-Expression, bedingt durch die Verstärkung der terminalen Sialinierung, was zu einem schnellen Abbruch der Kettenelongation führt. Dieses Phänomen wurde festgestellt, als man beobachtete, dass die gegen core1-Proteine gerichteten Antikörper in verstärktem Maß mit den Zellen des Mammakarzinoms reagieren, obwohl die AS-Sequenz identisch mit der der Muzine auf gesunden Zellen ist (Girling, 1989). Als biochemische Grundlage für den Abbruch gelten der bis zu zehnfache Anstieg der Aktivität der Sialtransferase und die reduzierte Aktivität der GLcNAc-Transferase beim Mammakarzinom (Burchell, 1999).

Die oben beschriebene, aberrante Glykosylierung führt zu einer Demaskierung der Epitope, die bisher den Immunzellen nicht zugänglich waren. Bei Adenokarzinomen, wo die Drüsenstruktur verloren geht, ist MUC1 nicht nur an der apikalen Oberfläche zu finden, es durchsetzt das ganze neoplastische Gewebe, was ebenfalls die immunologischen Interaktionen erleichtert (Taylor-Papadimitriou, 2002). Andererseits gibt es Berichte, dass die Überexprimierung des neoplastischen Muzins einen Schutz vor immunologischen Mechanismen darstellt (Argwal, 1998).

### 1.3.2 Tumorantigen Telomerase (hTERT)

Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, welches die RNA-abhängige Verlängerung der DNA der sich an den Enden der Chromosomen befindenden Telomere sichert. Damit wird die Zelle vor dem Altern geschützt und die kontinuierliche Zellteilung sowie die genetische Stabilität werden gewährleistet (Blackburn, 1991). Gesunde Zellen besitzen eine beinahe undetektierbare Aktivität dieses Enzyms, wodurch die DNA-Polymerase nicht vollständig replizieren kann und sich mit jeder Zellteilung die Chromosomen verkürzen. Nach dem Erreichen einer kritischen Chromosomenlänge wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Mokbel, 2000). Eine erhöhte Aktivität der Telomerase in gesunden Geweben findet sich lediglich in schnell proliferierenden epidermalen Zellen, Lymphozyten und Stammzellen, wohingegen diese Aktivität in 85% der soliden Tumore erhöht ist (Kim, 1994). Auf diese Weise sichert sich die Mehrheit der Tumorzellen die Immortalität und das ist einer der notwendigen Schritte in der Karzinogenese.

Ausführlich untersucht wurde die Aktivität des Enzyms bei Mammakarzinompatienten. Sie ist nur bei 14% der Patienten mit benignen Läsionen der Brustdrüse erhöht, dagegen weisen 75% der Patienten im Stadium *carcinoma in situ* und 94% der Patienten mit invasiven Karzinomen einen Aktivitätsanstieg auf (Shay, 1997; Yashima, 1998). Die gesteigerte Aktivität korreliert mit der Größe des Tumors und mit dem Lymphknotenbefall, hinsichtlich der Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Patienten sind gegensätzliche Daten vorhanden (Hoos, 1998).

Telomerase besteht aus einer katalytischen Untereinheit (hTERT), die benutzt wird um auf der Basis der RNA-Komponente (hTR) die TTAGGG Sequenz am Ende der Chromosomen *de novo* zu synthetisieren (Überblick in Kirkpatrick, 2003). Zu dem enzymatischen Komplex gehört auch eine Proteinkomponente (hTEP1). Die Überlegungen, die katalytische Untereinheit des Enzyms als mögliches therapeutisches Angriffsziel zu benutzen, kamen mit der Erkenntnis, dass die Menge der in den Zellen nachweisbaren hTERT-mRNA mit der Aktivität des Enzyms korreliert, die der anderen beiden Komponente dagegen nicht (Counter, 1998). Damit stellte sich diese Einheit als für die Funktionalität des Enzyms unabdingbar und am ehesten als therapeutisches Ziel verwendbar heraus. Die Inhibition des Enzyms würde demzufolge in einer progressiven Verkürzung der Telomere resultieren und besonders betroffen davon wären die malignen Zellen, wo die Telomere kürzer sind als bei den erst vor der Teilungssequenz stehenden Stammzellen.

## 1.4 Immunantwort gegen Tumorantigene

Seit der Entdeckung der Tumor-assoziierten Antigene und nachfolgender Entwicklung der Assays, die das Immunmonitoring ermöglichen, beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Quantifizierung sowohl der spontanen als auch der therapeutisch modifizierten Immunantwort gegen diese Antigene. Spontan auftretende CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten beim malignen Melanom, Leukämien und verschiedenen Adenokarzinomen gefunden werden (Überblick in Nagorsen, 2003 a). Bisher wurde nur ein Bruchstück der Interaktionen erfasst, da von den bekannten Tumorantigenen jeweils nur einige Epitope analysiert wurden. Nach dem Zusammenstellen der Ergebnisse wurde festgestellt, dass einige Neoplasien eine deutlich höhere Antigenität und Immunogenität aufweisen als andere (Nagorsen, 2003 b).

Als besonders hohe Antigenität erzeugender Tumor stellte sich das maligne Melanom heraus. Beispielweise entwickeln bis zu 75% der Patienten spezifische CD8<sup>+</sup> Zellen gegen MART-1 Antigen, mit einer Frequenz bis zu 2% im peripheren Blut und 3,5 %, wenn die T-Zellen aus einem - Lymphknotenkonglomerat extrahiert werden (Pittet, 1999). Für einige Melanomantigene sind Frequenzen bis zu 5% beschrieben, ein Ergebnis, dass bei anderen Tumoren bei weitem nicht erreicht wird.

Bei der Mehrzahl der Patienten mit Oropharynxkarzinomen wurde eine Frequenz der p53-spezifischen CTLs von bis zu 0,1 % gefunden (Hoffmann, 2002). Interessanterweise gab es bei dieser Studie ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Grad der Exprimierung des Antigens und der Frequenz. Bei den hämatologischen Malignomen wurde eine Frequenz von bis zu 0,7% gegen das TAA Proteinase 3, dagegen keine gegen bcr-abl-Fusionsprotein bei der chronisch myeloischen Leukämie gefunden (Scheibenbogen, 2002). Des Weiteren wurde die Existenz der tumorreaktiven T-Zellen für verschiedene Adenokarzinome nachgewiesen. So hat man beispielsweise bei 49 Patienten, die unter Kolorektalenkarzinomen litten, die Immunantwort gegen Antigene CEA, her-2/neu und EpCam mittels IFN $\gamma$ -ELISPOT Assay quantifiziert. Bei 12 Patienten bewegten sich die Frequenzen der gegen diese Antigene gerichteten, Interferon- $\gamma$  sezernierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Bereich zwischen 0,003 bis 0,007 %, was für die Autoren der Studie ausreichend für den Beweis der aktiven funktionellen Immunantwort war (Nagorsen, 2003 b).

Es ist unklar, ob die präsente Immunantwort den Erkrankungsverlauf bei den Patienten beeinflusst. Nachgewiesen ist, dass die fortgeschrittenen Erkrankungen, in metastasiertem Stadium, höhere Frequenzen der T-Zellen und höhere Antikörpertiter induzieren. Es wird

daher angenommen, dass erst die Penetration der malignen Zellen in die lymphatischen Organe eine Reaktion seitens des Immunsystems induziert (Nagorsen, 2003a).

#### **1.4.1 Immunologische Besonderheiten des Mammakarzinoms**

Die Sonderstellung des Mammakarzinoms ergab sich aus mehreren, über Jahre beobachteten, klinisch-experimentellen Zusammenhängen. Dazu gehören beispielsweise: positiver Einfluss der frühen ersten Schwangerschaft (und somit Exposition zu den fetalen Antigenen, die mit Tumoren geteilt werden), immunologische Reaktion auf die in die Haut implantierten Karzinomzellen (einer der ersten immuntherapeutischen Ansätzen) und gehäufte Inzidenz bei immunsupprimierten Patienten. Weiterhin hat man beobachtet, dass viele Patienten jahrelang überleben, obwohl sie bei der Diagnosestellung disseminierte Erkrankung aufweisen. In vielen Fällen ist eine Bestimmung der primären Lokalisation des Tumors nicht möglich, offensichtlich wurde er durch immunologische Abwehr zerstört. Beim Mammakarzinom wurde schon seit langem eine lymphoide Infiltration beobachtet und als Zeichen der aktiven Immunabwehr gesehen (Vose und Moore, 1985).

Das Mammakarzinom wird von den Lymphozyten in 17 % der Fälle infiltriert (Menard, 1997). Bei Frauen unter 40 korreliert die Präsenz der Infiltration mit der verlängerten Überlebenszeit, dagegen berichtete eine andere Studie, in die 644 Frauen eingeschlossen wurden, über eine schlechtere Prognose bei den Patientinnen, die diese Infiltration aufwiesen (Rosen, 1989). Diese Unterschiede resultieren wahrscheinlich aus der Heterogenität des Mammakarzinoms. Die makroskopischen Methoden, die in diesen Studien benutzt wurden, erlaubten keine Analyse des Aktivierungsstatus und des Phänotyps des lymphozytären Infiltrats. Mit der Zeit stellte sich heraus, dass die Mehrheit der Zellen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> positiv ist und weniger als 10% von ihnen aktiviert sind (Bell, 1999). Die modernen Assays ermöglichten die Charakterisierung der Reaktionen auf bestimmte tumorassoziierte Antigene und deren Epitope. Beim Mammakarzinom wurde bisher nach Immunantworten gegen her-2/neu, CEA, Ep-CAM und MUC1 gesucht (Peoples, 1995; Feuerer, 2001). Das Ergebnis war abhängig von der gewählten Methode – so konnten mittels des funktionellen ELISPOT-Tests keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen her-2/neu gefunden werden, wohingegen mittels der strukturellen Assays eine Frequenz von bis zu 1% detektiert wurde. (Feuerer, 2001).

Da sich die Mehrzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten gegen unbekannte TAA richtet, spiegelt eine Quantifizierung für einige wenige bekannte Antigene kein wahres

immunogenes Potential eines Tumors wider. Interessanterweise wurden auch im Knochenmark brustkrebsreaktive (gegen her-2/neu und MUC1) CD3<sup>+</sup> Zellen gefunden, deren sowohl Frequenz als auch Funktionalität wesentlich größer waren als von den T-Zellen im peripheren Blut (Feurerer, 2001). Diese Entdeckung implizierte, dass der Körper im Knochenmark seit Geburt ein Repertoire an Gedächtniszellen besitzt, welche spezifische Tumorepitope erkennen und die eine protektive Rolle gegen Tumorentwicklung spielen könnten.

#### **1.4.2 Immunantwort gegen Muzin**

Die Art und Weise, auf welche das TAA MUC1-Muzin von dem Immunsystem erkannt wird, wurde seit Ende der achtziger Jahre extensiv studiert. Mit Hilfe verschiedener Methoden untersuchte man Epitope, die sowohl aus der Tandem-Repeat-Domäne als auch aus der Signalsequenz des Moleküls stammen (Jerome, 1991). Um die gewonnenen Erkenntnisse therapeutisch auszunutzen, war es wichtig zu bestimmen mit welchen HLA-Typen die immunologisch aktiven Epitope assoziiert sind und ob die spezifischen Lymphozyten, neben Erkennung und Bindung, fähig sind, ihre Effektorfunktionen auszuüben. Die Forschung erbrachte interessante Ergebnisse heraus, aus denen neue tumorimmunologische Modelle hervorgegangen sind.

Es wurde nachgewiesen, dass die immunogenen Epitope, die in der TR-Domäne lokalisiert sind, sowohl direkt, unter Umgehung des klassischen Präsentationsweges (Barnd, 1989) als auch über den HLA-abhängigen Weg erkannt werden (Brossart, 1999). Barnd beobachtete, dass die aus den Lymphknoten der Pankreaskarzinompatienten isolierten, MUC1-reaktiven T-Zellen fähig waren die Mammakarzinomzellen zu lysieren. Die Lyse konnte mittels eines gegen MHC-Moleküle gerichteten Antikörpers nicht verhindert werden, dagegen wurde sie durch Antikörper gegen TCR und CD3 negativ beeinflusst. Basierend auf diesen Erkenntnissen entstand die Hypothese des unkonventionellen „cross-linkings“, einer direkten Erkennung der Epitope durch die T-Lymphozyten, die durch andere Gruppen bestätigt wurde. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass diese T-Zellen lediglich die verkürzte, tumor-spezifische Form des Muzins erkennen (Jerome, 1991). Dieses Phänomen basierte darauf, dass das infolge der veränderten Glykosylierung nicht mehr durch die verzweigte Struktur maskierte Muzin, zahlreiche Interaktionen mit dem T-Zell-Rezeptor entwickeln würde. Für diesen Erkennungsweg wurde mit Hilfe des Limiting Dilution Assays

sehr niedrige Frequenz der T-Zellen im peripheren Blut der Patienten gemessen (McKolanis, 2000).

1999 identifizierte Brossart zwei Epitope mit hoher Bindungstendenz zu HLA-A2. Eines von diesen Epitopen, das Peptid **STAPPVHNV** (MUC-1<sub>950-958</sub>) ist ein Bestandteil des letzten TRs und unterscheidet sich von der ehemals als konservativ betrachteten Teilsequenz **STAPPAHGV** des Tandem Repeats. Die Anwesenheit von V in Position 6 und N in Position 8 steigern die Bindungsfähigkeit zum HLA-A2. Die dendritischen Zellen der Patienten wurden mit dem Peptid gepulst und anschließend mit den PBMC konfrontiert. Auf diese Weise stimulierte CTLs waren fähig *in-vitro* die Zelllinien von Mamma- und Pankreaskarzinom zu lysieren, was im Chromium Release Assay nachgewiesen wurde. Die Antikörper gegen TCR, CD8 und HLA-A2 hemmten diese Lyse, somit war das über HLA-A2 präsentierte Peptid STAPPVHNV eindeutig für die Induktion, Proliferation und Auslösung der *in-vitro* Lyse verantwortlich (Brossart, 1999).

Das immunologische Verhalten dieses Epitops *in-vivo* wurde bisher wenig untersucht. Die basalen Frequenzen der gegen MUC-1<sub>950-958</sub> gerichteten CTLs sind nur bei ein paar Patienten, in Rahmen einer 2000 durchgeführten Vakzinierungsstudie, bestimmt worden und betragen maximal bis 0,2% (Brossart, 2000). Feuerer analysierte 2001 mit dem Tetramer-Test die Reaktivität der CD8<sup>+</sup> Zellen gegen MUC1 (allerdings gegen das HLA-A2 assoziierte Epitop LLLLTVLTV) - 14 Patienten zeigten Frequenzen zwischen 0,0 – 0,9%. Die gesunden Probanden und HLA A2- Patienten wiesen die Frequenz zwischen 0,0-0,3% auf. Auch die aus dem Knochenmark stammenden, im Kapitel 1.4.1 bereits erwähnten T-Zellen, zeigten ähnliche Aktivität und haben sich als funktionell effizienter als die aus dem peripheren Blut erwiesen.

### 1.4.3 Immunantwort gegen Telomerase

Die katalytische Untereinheit der Telomerase (**hTERT**) wurde 1999 von Vonderheide als ein von den CTL erkanntes Tumorantigen identifiziert. Es existieren mehrere Epitope, die von T-Zellen in unterschiedlicher HLA-Restriktion erkannt werden (Überblick in Vonderheide, 2002).

**Tab. 1.4 Telomerase – Epitope (nach Vonderheide, 2002)**

Epitop	Sequenz	Restriktion
<b>I540</b>	<b>ILAKFLHWL</b>	<b>HLA-A2</b>
R572	RLFFYRKSV	HLA-A2
D988	DLQVNSLQTV	HLA-A2
K973	KLFGVLRK	HLA-A3

Für das immunogene Peptid **I540** (ILAKFLHWL), dessen Antigenität einer von Gegenständen dieser Dissertation ist, wurde eine auf natürlichem Weg stattfindende Prozessierung und Präsentation sowie eine HLA-A2 Restriktion nachgewiesen (Vonderheide, 1999). Mit diesem Peptid, gebunden an dendritischen Zellen, wurden PBMCs, sowohl von gesunden Probanden als auch von Patienten, stimuliert. Es ist gelungen eine von Osteosarkom stammende, primär hTERT-negative Tumorzelllinie, die mit dem hTERT Gen tragenden Virus infiziert wurde und es auch tatsächlich exprimierte, mittels dieser PBMCs zu lysieren. Dagegen blockierten die monoklonale Antikörper gegen HLA-A2 diese Lyse. Diese Ergebnisse bestätigte Minev in einer parallel erschienenen Publikation (Minev, 1999). Mittels reiner Peptidstimulation (ohne Unterstützung der APCs) der PBMCs von Prostatakarzinompatienten induzierte er CTLs, die gegenüber den Zelllinien des Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinoms lysefähig waren.

Obwohl diese Fähigkeit von anderen Gruppen angezweifelt wurde (Speiser, 2002) und auf die Präsenz der Zellen der nicht-spezifischen Immunantwort in den von Vonderheide und Minev benutzten PBMCs zurückgeführt wurde (für einen Beweis antigenspezifischer Lyse sind tatsächlich CTL- Klone am besten geeignet), konnte Telomerase als universelles TAA mit immuntherapeutischem Potential Annerkennung gewinnen. Vonderheide evaluierte anschließend die native, basale Immunantwort gegen das Epitop I540 bei 8 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen (Vonderheide, 2001). Er bekam Frequenzen zwischen 0 und 0,02 % der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (im Verhältnis zu der ganzen Population der CD8<sup>+</sup> Zellen) heraus. Als Messmethode fungierte das Tetramer Assay, das Ergebnis lag also an der Grenze des Sensitivitätslimits (s.1.5.1). Interessanterweise wiesen 10 gesunde Probanden Frequenzen im gleichen Bereich auf. Das Elispot Assay konnte I540-spezifische CTLs bei keinem der Patienten nachweisen.

In weiteren Experimenten ist es gelungen, durch 3-4 fache Peptidstimulation den Anteil der spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen auf 1-3% der Population **sowohl** bei Patienten **als auch** bei gesunden Probanden zu expandieren. Obwohl die basale Immunantwort gegen I540 nicht nachweisbar war, ließ sie sich *ex-vivo* verstärken, was wiederum bewies, dass die spezifischen Zellen aus dem T-Zellen Repertoire in Rahmen der negativen Selektion nicht entfernt wurden. Funktionell waren die expandierten T-Zellen fähig, die erwähnte HLA A2+ Osteosarkomzelllinie *in-vitro* zu lysieren, während die untransfizierte HLA A2- Linie unbeeinträchtigt war (Vonderheide, 2001).

Die Notwendigkeit der vielfachen Stimulation um die spezifischen CTLs zu generieren unterstützte die oben erwähnten Ergebnisse, welche zeigten, wie niedrig die Ausgangsfrequenzen bei den Tumorpatienten sind. Die mehrfach nachgewiesene, effiziente Effektorfunktion dieser CTLs war dagegen überraschend, da in den meisten Fällen, unabhängig von der Tumorart, die tumorspezifischen Zellen anergisch oder tolerant gegenüber den Antigenen sind. 2004 erschienen die Ergebnisse einer Vakzinierungsstudie, bei welcher 7 Patienten mit Mamma- und Prostatakarzinom mit I540-beladenen, dendritischen Zellen immunisiert wurden (Vonderheide, 2004). Vor der Vakzinierung betrug die native, mittels des Tetramer-Tests gemessene Frequenz der I540-spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen erneut maximal bis zu 0,03%. Durch die Impfung stieg diese Frequenz auf bis zu 0,58% und die expandierten Zellen behielten ihre lytische Aktivität gegenüber Telomerase.

Sehr enttäuschende, im Widerspruch zu der vorherigen Resultaten stehende Ergebnisse, brachte dagegen eine weitere Vakzinierungsstudie, in die 13 Patienten mit Nieren- und Kolonkarzinom sowie Melanom eingeschlossen wurden (Parkhurst, 2004). Bei dieser Studie wurde zuerst **keine** Präsenz der nativen Immunantwort gegen das I540-Peptid festgestellt. Obwohl sich die Anzahl der I540-Peptid-spezifischen Zellen, durch die subkutane Immunisierung mit dem genannten Peptid bei 7 von 13 Patienten deutlich anheben ließ, zeigten diese CTLs diesmal keinerlei lytische Aktivitäten gegenüber der hTERT-exprimierenden Tumorzelllinien. Das Resümee dieser Studie war, dass möglicherweise durch eine Störung der Prozessierung im Proteasom und somit durch den Mangel an HLA-A2 Präsentation des Epitops, die peptid-reaktiven Zellen keine Funktion erfüllen können. Die Immunisierung gelingt, die Patienten profitieren davon nicht.

### 1.5. Assays zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort

Unabdingbar für das Erfassen der Fähigkeit einer T-Zelle, das Tumorantigen zu erkennen (z.B. in Rahmen einer Vakzinierungsstudie oder der adoptiven Therapie mit T-Zellen) sowie für das Bestimmen des immunogenen Potentials einer Tumorzelle, ist das so genannte Immunmonitoring. Mittels verschiedener Strategien kann die zelluläre Immunantwort überwacht werden. Die dazu entwickelten Assays basieren entweder auf den **strukturellen** oder den **funktionellen** Eigenschaften einer T-Zelle und sollen möglichst kombiniert angewendet werden, da es erhebliche Diskrepanzen zwischen der Anzahl der Tumorepitopebindenden Zellen und ihrer tatsächlichen Funktionalität bestehen. Bei einem komplexen Immunmonitoring sind somit folgende Fragenstellungen zu klären (Übersicht in Yee and Greenberg, 2002):

- (a) Seitens der T-Zelle: Anzahl, Reaktivität, Funktionalität und Migrationsfähigkeit in die Tumorumgebung
- (b) Seitens der Tumorzelle: Präsentation der Tumorepitope, Grad der Expression des Tumorantigens und Anwesenheit der Faktoren, die den Erkennungsvorgang verhindern

Die Fragestellung nach der ausreichenden **Anzahl** der T-Zellen lässt sich am besten mit Hilfe der strukturellen Assays klären, die als Ergebnis die Frequenz der gewünschten, Epitop-spezifischen Population der CTLs unter allen T-Zellen liefern. Besonders dafür geeignet und seit einigen Jahren deutlich favorisiert ist das Tetramer Assay (Details s.u.). Die ebenfalls angewandte PCR-Analyse des T-Zell Rezeptors (TCR) ist zwar sehr sensitiv, verlangt aber eine detaillierte Kenntnis der Sequenz des Rezeptors. Die bisher beobachteten, spontan induzierten Frequenzen liegen in einem Bereich, der die Unterscheidung zwischen spezifischen und nicht spezifischen Immunantworten (Hintergrund) schwierig macht (außer beim malignen Melanom, siehe 1.4). Anders sieht es aus bei der Messung der Frequenzen, die mittels therapeutischer Ansätze moduliert wurden. Durch bisherige Immunisierungsstrategien gelang es, bei einigen Patienten eine Frequenz bis zu 5% zu induzieren, eine adoptive Infusion der MART1-spezifischen CD8<sup>+</sup> Klone erlaubte eine Frequenz von 1.5% im peripheren Blut zu erreichen (Überblick in Nagorsen, 2003a). Mit Hilfe moderner Assays ist die Quantifizierung solchen hohen Frequenzen unproblematisch.

Der Aspekt der **funktionellen Aktivität** ist essentiell im Hinblick auf die klinischen Erfolge. Oft sind jedoch die T-Zellen zwar strukturell geeignet an das Antigen zu binden, bleiben jedoch danach anerg und setzen keine Effektorzytokine frei. Mit Hilfe der Messung der Sekretion des Interferon- $\gamma$ , durch den zytometrischen Nachweis des Aktivierungsmarkers CD69 oder durch die Beurteilung der Fähigkeit, Tumorzellen zu lysieren, lässt sich die Funktionalität ermitteln. Auch hier ist die Anwendung der PCR möglich, um beispielsweise die mRNA, die für die Effektorzytokine kodiert, zu quantifizieren. Um die funktionellen Assays durchführen zu können, benötigt man Stimulantien, z.B. Tumorpeptide, die die Sekretion der Zytokine in Gang setzen.

Die Fähigkeit den Tumor zu erreichen und zu infiltrieren kann mittels des Transfers radioaktiv markierter T-Zellen beurteilt werden oder durch die Analyse der Zellsuspensionen aus den speziell dafür durchgeführten Biopsien mit Hilfe des Tetramer Assays erfolgen.

### 1.5.1 Tetramer Assay

Im Jahr 1996 veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Altman den ersten Artikel, der die Tetramer Technologie beschrieb (Altman, 1996). Die löslichen Komplexe aus MHC und Peptiden (Monomere) werden an das Biotin gebunden und anschließend mit dem Streptavidin, das 4 Bindungsstellen für das Biotin besitzt, verbunden. Die tetramerische Struktur wird benutzt, weil sich sie die monomere Form als schwach TCR-bindend erwies. Das Streptavidin wird mit einem Farbstoff (FITC, PE, etc.) markiert. Unter der Inkubation mit T-Zellen erfolgt die Bindung des TCR an zwei bis drei der vier Komplexe eines Tetramers, die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Als Auswertungsergebnis liegt die Frequenz der gewünschten, antigen-spezifischen Subpopulation der T-Zellen vor (in der tumorimmunologischen Forschung meistens CD8<sup>+</sup>), unter allen gemessenen T-Zellen dieser Subpopulation. Es wird lediglich die Spezifität des TCRs bestimmt aber die Methode lässt sich mit anderen Assays kombinieren, die zusätzliche Informationen über funktionelle Vorgänge liefern können. Die Methode ist nicht destruktiv, die „positiven“ Zellen können mittels Sortierfunktion im Durchflusszytometer gesammelt und weiteren Analysen unterzogen werden (in einer Zellkultur), insbesondere kann eine oberflächliche und intrazelluläre Phänotypisierung angeschlossen werden. Die Angaben über die Sensivität des Assays variieren zw. 1:10000 und 1:50000 (Keilholz, 2002). Die Methode verlangt die Kenntnis des Epitops des analysierten Antigens sowie die Informationen über seine MHC Restriktion. Wegen der geringen Sensivität sowie der zu erwartenden niedrigen Frequenz der

gegen Tumorantigene gerichteten CD8<sup>+</sup> Zellen ist die Färbung von mindestens 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> PBMCs nötig. Zu den anderen Nachteilen gehört die Instabilität des MHC-Peptid Komplexes, da es keine kovalente Bindungen enthält (Xu, 2002). Ein großer Vorteil besteht in der Erfassung aller an der Immunantwort beteiligten T-Zellen, auch solcher deren Funktion z.B. auf Grund der „immune escape“ Mechanismen der Tumorzellen beeinträchtigt ist und die mit bisherigen Methoden nicht detektierbar waren.

### 1.5.2 Limiting Dilution Assay (LDA)

Diese Methode beruht auf einer Verteilung der unterschiedlichen Mengen an Lymphozyten und deren Stimulation mit Antigenen bei der Anwesenheit der entsprechenden Zytokine (Überblick in Keilholz, 2002). Anschließend wird mit Hilfe des Cr-51 Chrom-Freisetzung-Assays die Lymphozytenfunktion getestet. Dort werden die CTLs mit den Zielzellen gemischt, die vorher mit radioaktivem Chrom markiert wurden. Normalerweise ist die spontane Freisetzung des Chroms langsam, eine schnelle Freisetzung (gemessen nach 4-6 Stunden im Überstand) beweist die Membranperforation und Lyse. Diese Technik verlangt, dass die Lymphozyten in der Kultur 7-14 Tage lang proliferieren, überleben und die Funktionsfähigkeit behalten. Die oft notwendige Kryokonservierung erschwert dieses. Daraus resultiert eine 10-100-mal niedrigere Sensivität im Vergleich zum Tetramer Assay. Außerdem ist der Test auf *in-vitro* Messungen limitiert und sehr arbeitsaufwendig. Diese negativen Faktoren führten zur Entwicklung neuerer Assays, so dass das LDA immer seltener benutzt wird.

### 1.5.3 ELISPOT Assay

Bei diesem Assay werden die spezifischen Zellen an Hand der Freisetzung der Zytokine beurteilt (Überblick in Yee und Greenberg, 2002). PBMCs werden in den Mikrowellplatten, die mit dem gegen Zytokine gerichteten Antikörpern bedeckt sind, mit dem entsprechenden Peptid oder mit antigen-präsentierenden Zellen stimuliert. Nach der Entfernung der Zellen wird ein weiterer, mit einem Farbstoff markierter Antikörper zur Quantifizierung des Ausmaßes der Sekretion benutzt. Visuell erkennt man Stellen („spots“) auf der Platte, deren Zahl geteilt durch die Ausgangsmenge der Zellen die gewünschte Frequenz liefert. Dieses Assay verlangt im Vergleich zu LDA keine Proliferation der T-Zellen. Die Stimulationsmethode determiniert, ob die Antwort gegen ein bestimmtes Epitop oder ganze

Tumorzellen untersucht wird. Ein Nachteil ist, dass die naiven Lymphozyten nicht erfasst werden, da sie eine längere Stimulation brauchen um Effektorfunktionen auszuüben. Die Sensivität des Assays beträgt 1:50 000, damit ist es für die Suche nach niedrigen Frequenzen geeignet.

#### **1.5.4 Interferon-gamma Assay**

Dieser funktionelle Test erlaubt es, die Freisetzung des IFN-gamma aus den Lymphozyten, nach Stimulation mit dem zu untersuchenden Peptid, zu quantifizieren. Nach einer sechsständigen Stimulation werden die Zellen mit 2 Antikörpern gefärbt: der erste (Catch reagent) bindet an die Oberfläche des Lymphozyts und ist fähig mit dem zweiten „Arm“ das freigesetzte IFN-gamma zu „fangen“, der zweite Arm (Detection antibody) bindet an das „gefangene“ Zytokin und ermöglicht durch den mit ihm konjugierten Fluoreszenzfarbstoff die durchflusszytometrische Auswertung (Information des Produzenten). Kurze Stimulationszeit, dem ELISPOT vergleichbare Sensitivität und Nicht-Deaktivität sind die Hauptvorteile dieser Methode.

#### **1.5.5 Andere Methoden**

Zu den wichtigsten anderen Methoden gehört die PCR-Analyse der Gene, die für die Zytokinexpression verantwortlich sind (Kamulla, 1999). Nach der Stimulation der Lymphozyten wird die mRNA aus deren Kernen extrahiert. Die nachfolgende, PCR-gestützte quantitative Erfassung der mRNA-Menge gibt Auskunft über die Funktionalität der T-Zellen. Ebenfalls mit Hilfe der PCR ist eine Struktur-basierte Suche nach den epitopspezifischen T-Zellrezeptoren möglich, die Sequenz des Rezeptors muss jedoch bekannt sein. Da die Sensivität der PCR-Analysen bis zu  $1/10^6$  beträgt, sind sie besonders dann einsetzbar wenn die Menge des untersuchten Materials limitiert ist.

## 1.6 Aufgabenstellung

Für jede Vakzinierungsstudie, die die Expansion spezifischer T-Zellen gegen definierte Epitope anstrebt, ist die Kenntnis über die bereits vorhandene, endogene Immunantwort notwendig. Darauf basierend kann der Erfolg einer Vakzinierung beurteilt werden. Die bisher analysierten spontanen Immunantworten bei Mammakarzinompatienten zeichnen sich durch eine große Variationsbreite aus. Die Patientenkollektive, bei denen die Immunantwort gemessen wurde, waren klein. Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Ausmaß der vorhandenen zellulären Immunantwort gegen zwei Epitope, die von zwei verschiedenen Tumorassoziierten Antigenen, der Telomerase-Reverse Transkriptase und dem Muzin stammen, zu quantifizieren. Mittels des Tetramer-Assays soll die Fähigkeit der T-Zellen, die im peripheren Blut der Mammakarzinompatienten zirkulieren, die Tumorepitope zu binden, quantitativ beurteilt werden. Die resultierenden Frequenzen werden mit den im Blut von gesunden Probanden vorhandenen Frequenzen sowie mit den Frequenzen bei Patienten mit anderen Karzinomen verglichen. Anschließend soll durch die Bestimmung des Ausmaßes der Sekretion der Effektorzytokine (mittels Interferon- $\gamma$ -Assays) die Funktionalität der T-Zellen quantifiziert werden. Ob ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Frequenzen und dem klinischen Zustand der Patienten existiert, wird evaluiert. Eine eventuelle Beeinflussung der Immunantwort durch die Therapie, der die Patienten unterzogen wurden, wird ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Interaktionen zwischen dem Immunsystem und Tumorantigenen beim Mammakarzinom leisten sowie Vakzinierungsstudien vorbereiten helfen. Es soll auch geprüft werden, ob die genannten Methoden geeignet sind, die Immunantwort bei Probanden zu erfassen.