

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik – Großhadern  
Direktor: Prof. Dr. med. C. Stief  
und dem Labor für Tumormimmunologie des LIFE-Zentrums Klinikum der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

Analyse der T-Zell-Antwort bei Patienten mit  
hormonrefraktärem Prostatakarzinom vor und nach  
allogener Tumorzellvakzinierung

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Michael Friedrich Osthoff  
aus Marktredwitz

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Stief

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat

Prof. Dr. Rolf Harzmann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. H. Pohla

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DAS PROSTATAKARZINOM.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie.....	1
1.1.3	Klinische Symptomatik und Diagnosestellung.....	2
1.1.4	Therapieoptionen.....	3
<b>1.2</b>	<b>DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Immunosurveillance.....	4
1.2.2	Aufbau und Funktionsweise des Immunsystems.....	5
1.2.3	Aufbau des T-Zell-Rezeptors.....	6
1.2.4	Antigenerkennung durch T-Lymphozyten.....	8
<b>1.3</b>	<b>DIE ANTITUMORVAKZINIERUNG.....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Zielsetzung der Antitumorvakzinierung.....	11
1.3.2	Eigenschaften von Antitumorvakzinen.....	12
1.3.3	Antitumorvakzinierungsstrategien beim Prostatakarzinom.....	14
<b>1.4</b>	<b>DIE ÜBERWACHUNG DER IMMUNANTWORT IM RAHMEN DER ANTITUMORVAKZINIERUNG.....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp.....	15
1.4.2	Methoden der <i>In-vitro</i> -Analyse.....	16
<b>1.5</b>	<b>ZYKINBASIERTE GENTHERAPIE BEIM PROSTATAKARZINOM.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>CHEMIKALIEN.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>ZELLKULTUR.....</b>	<b>23</b>
2.3.1	Verbrauchsmedien, Zusätze und andere Reagenzien.....	23
2.3.2	Medien.....	23
<b>2.4</b>	<b>BLUT- UND SERUMPROBEN.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>GEWEBEPROBEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>ZELLINIEN.....</b>	<b>26</b>

<b>2.7</b>	<b>ANTIKÖRPER .....</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>PEPTIDE .....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>REAGENZSYSTEME .....</b>	<b>28</b>
2.9.1	Reagenziensysteme für das <i>Bio-Plex</i> <sup>®</sup> -Gerät .....	28
2.9.2	Reagenziensysteme für den Cytometric Bead Array .....	28
2.9.3	Reagenziensysteme für den IFN- $\gamma$ -ELISPOT .....	28
<b>2.10</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGIE .....</b>	<b>29</b>
2.10.1	Oligonukleotide.....	29
2.10.2	Enzyme .....	32
2.10.3	Reagenziensysteme .....	32
2.10.4	Sonstige Reagenzien .....	32
<b>2.11</b>	<b>PERSONEN- UND HERSTELLERVERZEICHNIS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>ALLGEMEINE METHODEN DER ZELLKULTUR .....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	36
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl .....	36
3.1.3	Einfrieren von Zellen.....	36
3.1.4	Auftauen von Zellen.....	37
3.1.5	Kultivierung und Passagierung adhärenter Tumorzellen.....	37
3.1.6	Isolierung und Kultivierung von gewebeinfiltrierenden Lymphozyten .....	37
3.1.7	Stimulation von PBMC/TIL mit der Vakzinezelllinie.....	38
<b>3.2</b>	<b>SIMULTANE MESSUNG MULTIPLER ZYTOKINE (<i>MULTIPLEXING</i>) .....</b>	<b>38</b>
3.2.1	Vorbereitung.....	38
3.2.2	Prinzip der Zytokinmessung mit dem <i>Bio-Plex</i> <sup>®</sup> -Gerät .....	39
3.2.2.1	Durchführung.....	40
3.2.2.2	Auswertung.....	40
3.2.3	Prinzip der Zytokinmessung mit Hilfe des <i>CBA Kit</i> .....	41
<b>3.3</b>	<b>METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE.....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
3.3.2	RNA-Isolierung aus Zellen.....	42
3.3.2.1	<i>TriReagent</i> Methode .....	42
3.3.2.2	<i>RNeasy Kit</i> .....	43
3.3.3	Reverse Transkription .....	43
3.3.3.1	<i>Superscript</i> System.....	43
3.3.3.2	<i>AMV</i> Reverse Transkriptase System .....	44

3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
3.3.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR mit Hilfe des <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> -Gerätes.....	46
3.3.5.1	Prinzip .....	46
3.3.5.2	Durchführung.....	46
3.3.5.3	Auswertung.....	48
3.3.6	Gelelektrophorese .....	49
3.3.7	DNA-Sequenzanalyse .....	49
<b>3.4</b>	<b>ELISPOT .....</b>	<b>50</b>
3.4.1	Prinzip .....	51
3.4.2	Durchführung.....	51
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>TCR-REPERTOIRE-ANALYSEN.....</b>	<b>53</b>
4.1.1	Amplifikation von TCR mittels familienspezifischer Primer.....	53
4.1.2	TCR-Repertoire von PBL.....	54
4.1.3	TCR-Repertoire von PBL nach <i>In-vitro</i> -Stimulation mit der allogenen Prostatakarzinomvakzine .....	55
4.1.4	TCR-Repertoire der TIL des Patienten 109 .....	60
4.1.5	TCR-Repertoire am Vakzinierungsort der Patienten 113, 182 und 184 .....	64
<b>4.2</b>	<b>SEQUENZIERUNG DOMINANTER TCR .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DES TCR-REPERTOIRES PERIPHERER T-LYMPHOZYTEN IM VERLAUF DER VAKZINIERUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>4.4</b>	<b>ANALYSE DES ZYTKINMILIEUS AM ORT DER VAKZINIERUNG.....</b>	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>MULTIPLEXE ZYTKINBESTIMMUNGEN IM SERUM DER PATIENTEN.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6</b>	<b>DETEKTION PEPTID-SPEZIFISCHER, IFN-<math>\gamma</math>-PRODUZIERENDER T-ZELLEN .....</b>	<b>75</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>TCR-REPERTOIRE-ANALYSEN NACH MLTC-EXPERIMENTEN MIT DER VAKZINEZELLINIE .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2</b>	<b>TCR-REPERTOIRE VON TIL DES PATIENTEN 109 .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3</b>	<b>TCR-REPERTOIRE AM VAKZINIERUNGORT .....</b>	<b>87</b>
<b>5.4</b>	<b>ANALYSE DOMINANTER TCR UND MOLEKULARES <i>TRACKING</i> WÄHREND DER VAKZINIERUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>5.5</b>	<b>ANALYSE DES ZYTKINMILIEUS AM ORT DER VAKZINIERUNG.....</b>	<b>92</b>
<b>5.6</b>	<b>MULTIPLEXE ZYTKINBESTIMMUNGEN IM SERUM DER PATIENTEN.....</b>	<b>96</b>

<b>5.7</b>	<b><i>IMMUNE MONITORING</i> MIT HILFE DES ELISPOT-ASSAYS .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>132</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>133</b>
<b>11.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>135</b>
<b>11.1</b>	<b>STUDIENDESIGN.....</b>	<b>136</b>
<b>11.2</b>	<b>VAKZINEPRÄPARATION UND – APPLIKATION .....</b>	<b>138</b>
<b>11.3</b>	<b><i>MONITORING</i> .....</b>	<b>139</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom (PCa) ist der häufigste maligne Tumor des Mannes in Europa und Nordamerika. Bezüglich der Mortalität nimmt diese Tumorentität Platz zwei hinter dem Bronchialkarzinom ein (Jemal et al., 2003), ab einem Alter von 80 Jahren ist es sogar die häufigste durch Malignome bedingte Todesursache in Deutschland (Breul et al., 2003). Einer von sechs Männern wird während seines Lebens am PCa erkranken und einer von dreißig Männern wird daran sterben (Jemal et al., 2003). Autopsiestudien belegen jedoch, dass die Inzidenz in Wirklichkeit noch deutlich höher liegt. Bei 29 % aller Männer im Alter von 30-40 Jahren und bei 64 % im Alter von 60-70 Jahren konnte histologisch ein Adenokarzinom der Prostata diagnostiziert werden (Sakr et al., 1994). Dies bedeutet aber auch, dass ein Teil der Karzinome niemals manifest werden wird (sog. latente Karzinome). Als Folge verbesserter und vermehrt angewandter diagnostischer Maßnahmen und steigender Lebenserwartung hat sich deshalb die Inzidenz des PCa in den letzten 30 Jahren nahezu verdoppelt (Potosky et al., 1995).

### 1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des PCa ist nach wie vor ungeklärt, eine multifaktorielle Genese ist wahrscheinlich. Als Risikoparameter konnten bisher u.a. genetische Faktoren, Alter, ethnischer Ursprung, Ernährung und Lebensweise identifiziert werden. Das Vorhandensein genetischer Prädispositionsfaktoren kann aus den Ergebnissen mehrerer Zwillings- und Verwandtschaftsstudien geschlossen werden (Page et al., 1997; Gronberg et al., 1994; Steinberg et al., 1990; Lichtenstein et al., 2000). Steinberg et al. (1990) etwa konnten für einen Verwandten ersten Grades ein deutlich erhöhtes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken feststellen, wenn bereits ein oder mehrere Familienangehörige daran erkrankt waren. Eine skandinavische Zwillingsstudie (Lichtenstein et al., 2000) kommt sogar zu dem Schluss, dass 42 % aller Prostatakarzinomerkrankungen erblich bedingt sind. Bei der Suche nach sog. „*susceptibility*“ Genen (Kandidatengenen) konnten bislang insgesamt sieben Genorte identifiziert werden (Nelson et al., 2003). Außerdem wird diskutiert, dass ein Gen auf dem X-Chromosom für einen Teil der erst im Alter auftretenden, vererbaren Prostatakarzinome verantwortlich ist (Monroe et al., 1995).

Die Inzidenz des PCa variiert zum Teil sehr stark zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen: die niedrigste Rate ist in Asien, die höchste Rate in Skandinavien und bei Afro-

Amerikanern in Nordamerika zu beobachten (Gronberg, 2003). Dabei dürfte die unterschiedliche Ernährung eine nicht unerhebliche Rolle spielen: Phytoöstrogene, die v.a. in Sojabohnen vorhanden sind (einem Grundnahrungsmittel von Asiaten), konnten einen protektiven Effekt bei der Entstehung des PCa zeigen (Strom et al., 1999; Bylund et al., 2000), wohingegen eine westliche Diät, charakterisiert durch einen hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren und den Konsum von Tierfett und rotem Fleisch, mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist (Giovannucci et al., 1993; Gann et al., 1994). Chronische oder rezidivierende Entzündungen der Prostata, z.B. im Rahmen sexuell übertragbarer Erkrankungen, scheinen ebenso zur Entstehung des PCa beizutragen (Hayes et al., 2000; Dennis et al., 2002).

### **1.1.3 Klinische Symptomatik und Diagnosestellung**

Im Anfangsstadium ist das PCa häufig symptomlos. Beschwerden treten oft erst bei weit fortgeschrittenem Tumorwachstum bzw. Metastasierung auf. Die Diagnose in einem frühen Stadium ist durch die Einführung von Vorsorgemaßnahmen wie der digital rektalen Untersuchung und v.a. durch die Bestimmung des sog. PSA-Wertes (prostataspezifisches Antigen) ermöglicht worden. Das prostataspezifische Antigen stellt eine Serinprotease dar, die für die Verflüssigung des Ejakulates verantwortlich ist. Ein erhöhter Wert im Blut lässt sich bei Adenokarzinomen der Prostata, aber auch bei Prostatahyperplasie und Infektionen bzw. Manipulationen im Urogenitalbereich messen. Die Verwendung dieses Tests als Screeningmaßnahme ist jedoch zuletzt wieder in Frage gestellt worden (Frankel et al., 2003; Stamey et al., 2004; Hoffmann, 2003), u.a. weil nur etwa 16 % der dadurch entdeckten PCa einen relevanten Einfluss auf die Lebenserwartung des Patienten haben werden, eine Vielzahl von Männern im Umkehrschluss aber durch die Diagnosestellung eines malignen Tumorleidens unnötigen Behandlungsrisiken ausgesetzt wird (McGregor et al., 1998). Zudem konnte bisher kein Überlebensvorteil durch ein PSA-Screening dokumentiert werden (Concato et al., 2006).

Die endgültige Diagnose wird mit Hilfe des transrektalen Ultraschalls sowie der Prostatastanzbiopsie gestellt. Aufgrund der bevorzugten Metastasierung in die Knochen kommt der Skelettszintigraphie mit Technetium-99m markierten Phosphatverbindungen eine besondere Rolle bei der Früherkennung von Fernmetastasen und damit bei der Prävention von Metastasen bedingten Komplikationen (z.B. Frakturen) zu.

Die Behandlung des PCa orientiert sich an der klinischen und histologischen Einteilung. Mit Hilfe der TNM-Klassifikation (Tumor, Noduli, Metastasen) erfolgt eine Einordnung der Tumorausdehnung. Die Einteilung nach Gleason wird bei der Beschreibung der histologischen Differenzierung (dem sog. Grading) angewandt. Der sog. Gleason-Score

stellt einen wichtigen Prognosefaktor dar und wird deshalb in die Therapieentscheidung mit einbezogen (McNeal et al., 1990).

### 1.1.4 Therapieoptionen

Zur Behandlung des frühen, lokal begrenzten PCa stehen zur Zeit vier Therapieoptionen zur Auswahl, die radikale Prostatektomie, die Radiatio (perkutan oder *in situ*), seltener die Hormontherapie oder das Einnehmen einer abwartenden Haltung („*wait and see*“ oder „*watchful waiting*“). Bei der Auswahl eines therapeutischen Vorgehens spielen unterschiedliche Gesichtspunkte wie Alter und Lebenserwartung des Patienten, Komorbiditäten, persönliche Therapiepräferenzen, Grading, zu erwartende Nebenwirkungen etc. eine Rolle (Jani & Hellmann, 2003). Dabei beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate im frühen Stadium 75-90 % (Brill et al., 2001).

Bei lokal fortgeschrittenem bzw. metastasiertem PCa ist die Prognose deutlich schlechter. Hier kommt neben lokalen Verfahren zusätzlich die chirurgische oder pharmakologische Hormonablation zum Zuge. Allerdings werden die Tumorzellen im Verlauf zunehmend hormonrefraktär. Dies führt zu einer Progression der Erkrankung, im Mittel 14-30 Monate nach Beginn der antiandrogenen Behandlung (Goktas & Crawford, 1999). Für diese Patienten stehen bisher nur palliative Maßnahmen wie die Behandlung von Schmerzen und Tumorkomplikationen zur Verfügung. Eine zytotoxische Chemotherapie mit konventionellen Medikamenten konnte lange keinen Überlebensvorteil zeigen (Sternberg 2001), erst durch die Verwendung von Docetaxel-basierten Chemotherapien konnte zuletzt eine Lebensverlängerung um durchschnittlich drei Monate erreicht werden (Tannock et al., 2004; Petrylak et al., 2004). Derzeit ist allerdings keine Standardtherapie für asymptomatische Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom (*hormone-refractory prostate cancer*, HRPC) verfügbar. Die molekularbiologischen Erkenntnisse von der Progression des PCa haben bei der Behandlung des HRPC jedoch zu einer Vielzahl neuer Therapiekonzepte bzw. Substanzen im Rahmen alt bewährter Therapieansätze geführt. Beim PCa mit überwiegend osteoblastischer Metastasierung konnte z.B. eine Reduktion skelettaler Komplikationen durch Gabe von Bisphosphonaten (z.B. Zoledronsäure) gegenüber Placebo nachgewiesen werden. (Saad, 2002). Weitere gezielte Manipulationen des Tumors auf molekularer Ebene sind z.B. über den Eingriff in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren mit dem Ziel der Zelltodauslösung, mit Wachstumsfaktoringhibitoren und mit Rezeptorantagonisten möglich. Phase I/II Studien mit EGFR-Antikörpern (*epidermal growth factor receptor*) oder EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren konnten in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika die Umsetzbarkeit dieses Ansatzes belegen (Barton et al., 2001; Soulié et al., 2002). Neben Wachstumsfaktoren spielen v.a. Angiogenesefaktoren eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung von Tumoren. So ist es

nicht verwunderlich, dass auch auf diesem Gebiet eine Reihe von Studien mit antiangiogenetischen Substanzen (z.B. Thalidomid, VEGF(*vascular endothelial growth factor*)-Antikörpern) am PCa mit ermutigenden Ergebnissen durchgeführt wurden. (Melnyk et al., 1999; Chatta, 2004). Ein weiterer viel versprechender Ansatz ist die gezielte Auslösung von Apoptose. Exisulind konnte als erster Vertreter dieser neuen Klasse von apoptoseauslösenden Medikamenten bereits Erfolge bei Patienten mit steigendem PSA-Wert verzeichnen (Goluboff et al., 2001).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Therapieverfahren, in denen eine direkte Manipulation der Tumorzelle angestrebt wird, konzentriert man sich bei dem später im Detail vorgestellten Ansatz der Antitumorvakzinierung auf die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems mit dem Ziel der Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen.

## 1.2 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes und in Teilen hochspezialisiertes, anpassungsfähiges System, dessen Hauptaufgabe im Schutz des Organismus vor Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten besteht.

### 1.2.1 Immunosurveillance

Das Konzept der „*immunosurveillance*“, das in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts von M. Burnet propagiert wurde, weitet die Funktion des Immunsystems auf die Erkennung und Zerstörung maligne transformierter Zellen aus (Burnet, 1967 und 1970). Trotz kontroverser Diskussion gewinnt dieses Konzept in letzter Zeit wieder an Bedeutung (Dunn et al., 2002) und es wird als bewiesen angesehen, dass dem Immunsystem eine wichtige Rolle in der Tumorkontrolle zukommt und es in der Lage ist, spezifische, gegen maligne Tumoren gerichtete Antworten zu induzieren (Schendel et al., 1997). Dafür sprechen u.a. folgende Erkenntnisse:

- Immunsupprimierte Individuen haben ein erhöhtes Risiko (v.a. virusinduzierte) Malignome auszubilden (Weiss, 1999; Penn, 2000).
- Tiere, denen bestimmte immunmodulierende Stoffe wie z.B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) fehlen, entwickeln häufiger maligne Tumore (Übersicht bei Smyth et al., 2001).
- Zytotoxische T-Lymphozyten von Patienten mit Malignomen zerstören autologe und HLA (*human leukocyte antigen*)-identische Tumorzellen *in vitro* (Mukherji et al., 1990).
- Eine Vielzahl sog. Immuntherapien konnte in Tiermodellen und beim Menschen objektive Antitumorreaktionen erzielen, v.a. beim Nierenzellkarzinom und beim Melanom (Rosenberg et al., 1998; Fisher et al., 2000; Dudley et al., 2002; Kaufmann et al., 2004).

## 1.2.2 Aufbau und Funktionsweise des Immunsystems

Zur Wahrnehmung seiner Aufgaben verfügt das Immunsystem über zwei Komponenten, die im Zusammenspiel eine effektive Antwort gegen Erreger und/oder Tumorzellen formulieren.

Der angeborene Bestandteil umfasst v.a. die Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem und stellt die erste, antigenunspezifische Verteidigungslinie des Organismus dar.

Die erworbene (spezifische) Immunantwort basiert auf der klonalen Selektion von B- und/oder T-Lymphozyten, die hochvariable antigenspezifische Rezeptoren besitzen, welche es ihnen ermöglichen jedes Antigen zu identifizieren. Neben den zwei bereits genannten (Antigenspezifität und Rezeptordiversität) besitzt das adaptive Immunsystem zwei weitere wichtige Eigenschaften: das Antigengedächtnis und die Toleranz gegenüber körpereigenen bzw. ungefährlichen Strukturen. Bei der Überwachung und Bekämpfung maligne entarteter Zellen spielen B-Lymphozyten und ihre Antikörperproduktion eine untergeordnete Rolle. Eine effektive Immunantwort gegen Tumore basiert im Wesentlichen auf zytotoxischen T-Lymphozyten (Song et al., 2000; Winter et al., 2003).

T-Lymphozyten können aufgrund morphologischer und funktioneller Eigenschaften in zwei Kategorien unterteilt werden: CD4-positive T-Helferzellen (*cluster of differentiation*, CD) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen. CD4-positive T-Helferzellen koordinieren die Antwort des Immunsystems, indem sie abhängig vom Ort des zu bekämpfenden Pathogens unterschiedliche Effektorzellen aktivieren. CD8-positive zytotoxische T-Zellen zerstören nach Aktivierung durch ein als fremd erkanntes Antigen spezifisch diejenigen Zellen, die intrazelluläre Pathogene auf der Oberfläche präsentieren. Diese spezifische Antigenerkennung wird durch die Expression einer 1985 identifizierten, hochvariablen Struktur auf T-Lymphozyten ermöglicht: dem T-Zell-Rezeptor (TCR) (Acuto & Reinherz, 1985).

Zusätzlich wurden in den letzten Jahren noch weitere T-Zell-Subpopulationen identifiziert, u. a. die regulatorischen T-Zellen. Unter diesem Begriff werden verschiedene T-Zell-Subtypen zusammengefasst, die aktivierende Vorgänge des Immunsystems unterdrücken. Am ausführlichsten wurden bisher die sog. natürlichen regulatorischen T-Zellen (abgekürzt T<sub>reg</sub>) untersucht, CD4- und CD25-positive T-Zellen, die etwa 10% aller CD4-positiven T-Zellen ausmachen und erstmalig von Sakaguchi et al. 1995 beschrieben wurden. Phänotypisch unterscheiden sie sich von konventionellen T-Zellen v. a. durch die Expression von Foxp3 (*forkhead box transcription factor*), einem Transkriptionsfaktor, der für die Konversion in regulatorische T-Zellen essentiell ist (Fontenot et al., 2003). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen und in der Kontrolle exzessiver immunologischer Reaktionen auf Fremdanigene. Die

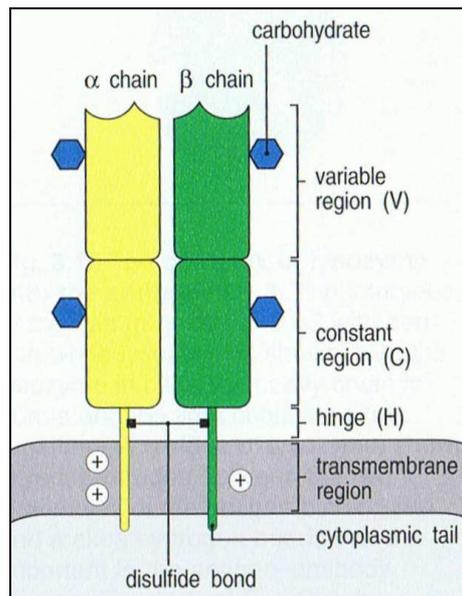
Eliminierung dieser Zellen in Mäusen führt dementsprechend zur Entwicklung von autoimmunologischen Organreaktionen (Sakaguchi et al., 1995). Pathophysiologisch scheinen sie zudem eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Tumorerkrankungen zu spielen. So führt eine Depletion dieser Zellen im Tiermodell zu einer effizienteren Tumorkontrolle bzw. zu einem langsameren Tumorstadium (Onizuka et al., 1999). Umgekehrt konnte man eine gesteigerte Zahl von  $T_{reg}$  im Blut von Krebspatienten und unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumorgewebe identifizieren (Übersichtsartikel von Zou, 2006). Die Bedeutung der  $T_{reg}$  für die lokale Krebskontrolle wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass eine Akkumulation von  $T_{reg}$  im Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen invers mit der Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert (Curiel et al., 2004). Neben der Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF- $\beta$  (*transforming-growth factor-beta*) scheint eine direkte Interaktion mit zytotoxischen bzw. Antigen-präsentierenden Zellen für die immunsupprimierende Wirkung der  $T_{reg}$  verantwortlich zu sein (Übersichtsartikel von Rouse, 2007).

### 1.2.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptors

T-Zell-Rezeptoren ähneln strukturell den Immunglobulinen der B-Lymphozyten, sind im Gegensatz zu diesen aber immer membrangebunden und aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten aufgebaut. Dabei besteht die überwiegende Mehrzahl der Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, nur eine Minderheit von T-Zellen exprimieren einen  $\gamma\delta$ -TCR. Die Funktion letzterer ist bis heute nicht vollständig verstanden (Kapp et al., 2004). Jede Polypeptidkette besteht aus einer N-terminalen variablen Kette mit drei besonders polymorphen (sog. hypervariablen) Anteilen, den CDR-Domänen (*complementarity determining region*), und einer konstanten Domäne mit konservierter Sequenz. Auf Letztere folgt eine kurze Brückenregion, welche die Polypeptidketten mit der Transmembranregion verbindet (Abbildung 1.1).

Ein hohes Maß an Variabilität wird ähnlich wie bei den Immunglobulinen durch die Mechanismen der somatischen Rekombination von Gensegmenten, die ungenaue Verknüpfung derselben und die N-Addition erreicht. Einzig die somatische Hypermutation ist der Generierung von Antikörpern vorbehalten. In den Vorläuferzellen der T-Lymphozyten sind die TCR-Gensegmente noch in einer nicht funktionsfähigen Keimbahnkonformation angeordnet:

Die  $TCR\alpha$ -Kette wird beim Menschen aus Gensegmenten auf Chromosom 14 zusammengesetzt, dabei existieren ca. 70-80  $V\alpha$  (*variable*), ein  $C\alpha$  (*constant*) und 61  $J\alpha$  (*joining*) Gensegmente.

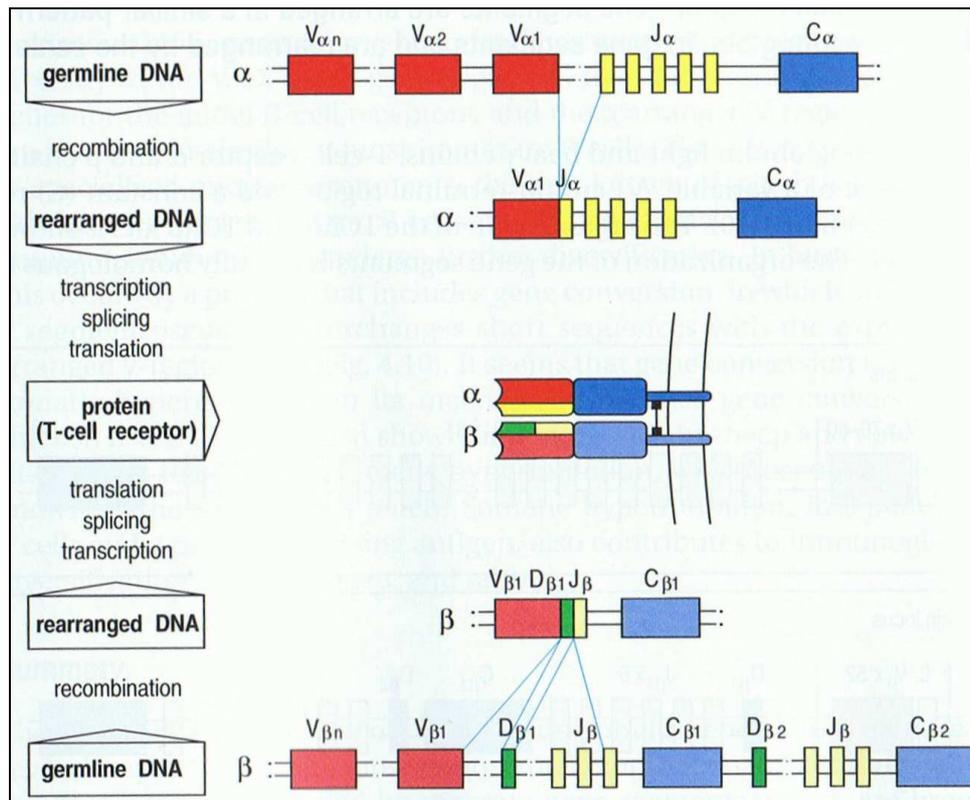


**Abbildung 1.1:** Aufbau des TCR $\alpha\beta$  (Janeway et al., 2005)

Eine davon abweichende Gliederung weist der TCR $\beta$ -Lokus auf Chromosom 7 auf. Auf 52 V $\beta$ -Segmente folgen zwei Cluster mit jeweils einem D $\beta$  (*diversity*)-, sechs bzw. sieben J $\beta$ - und einem C $\beta$ -Gensegment.

Die V-Gensegmente können bei Sequenzhomologien >75 % in sog. Gensegmentfamilien zusammengefasst werden (Arden et al., 1995; <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTindex/>). Während der Reifung der T-Zellen im Thymus findet die Rearrangierung dieser Segmente zu einem funktionsfähigen TCR statt. Dabei erfolgt eine rein zufällige Auswahl und Verknüpfung eines V- und eines J-Segments, beim TCR $\beta$  zusätzlich eines oder zweier D-Segmente, zu einem Gen. Die Verbindung mit dem konstanten Segment erfolgt erst durch Spleißen des primären RNA-Transkriptes (Abbildung 1.2). Das wahllose Einfügen von Nukleotiden an den Verknüpfungspunkten der Gensegmente, sog. N-Addition, und die Variation der Verknüpfungspunkte erhöht die Diversität der TCRen. Es entsteht ein TCR-Repertoire mit bis zu  $10^{18}$  verschiedenen Spezifitäten, das prinzipiell in der Lage ist, alle auftretenden Antigene zu erkennen.

Dabei konzentriert sich die Diversität auf die bereits oben erwähnten sog. hypervariablen Bereiche CDR1-3 innerhalb der variablen Kette. Die CDR1- und CDR2-Regionen werden durch die unterschiedlichen V-Segmente kodiert. Die CDR3-Region zeichnet sich aufgrund der Lage im Bereich der Verknüpfung der V, (D) und J-Gensegmente durch die größte Sequenzvielfalt aus. Diese Region ist daher für die Antigenerkennung prädestiniert. Bestätigt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass verschiedene T-Zellen, die spezifisch ein identisches Peptid erkennen, konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der CDR3-Region enthalten (Hedrick et al., 1988; Jorgensen et al., 1992).

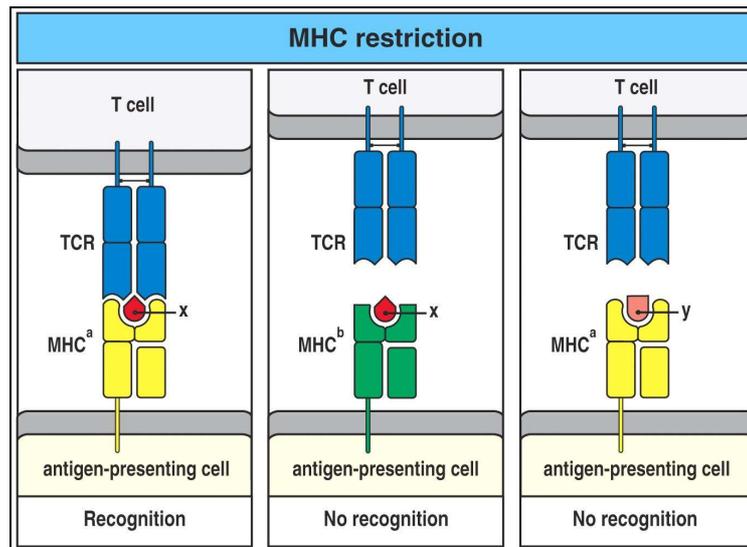


**Abbildung 1.2:** Bildung eines funktionellen TCR durch Rearrangierung der Gensegmente (Janeway et al., 2005)

### 1.2.4 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten

T-Zellen können nur dann Antigene erkennen, wenn sie über Moleküle des sog. Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) an der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Dabei unterscheidet man zwei Gruppen: MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC-Klasse-II-Moleküle fast ausschließlich auf sog. professionell Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen etc.) und auf aktivierten T-Zellen vertreten sind. Bis auf zwei Ausnahmen ( $\beta_2$ -Mikroglobulin auf Chromosom 15, invariante Kette auf Chromosom 5) sind alle Gene für beide MHC-Molekülgruppen beim Menschen auf Chromosom 6 lokalisiert, in enger Nachbarschaft zu Genen mit grundlegenden immunologischen Funktionen wie z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Komplementfaktoren. Sie wurden erstmals auf Leukozyten aufgrund ihrer signifikanten Beeinflussung der Immunantwort auf transplantiertes Gewebe identifiziert und werden deshalb beim Menschen als HLA-Gene (*human leukocyte antigen*) bezeichnet. Durch das Vorhandensein mehrerer Gene und eines ausgeprägten Polymorphismus der einzelnen Gene entsteht eine große Vielfalt an MHC-Molekülen, die von einem Individuum exprimiert werden und dessen Zellen charakterisieren. Der Polymorphismus beeinflusst die Antigenbindungsspezifität der MHC-

Moleküle und die Spezifität der bindenden TCR wie Zinkernagel und Doherty (1974) zeigen konnten. Die Erkennung von Antigenen durch T-Zellen ist MHC-restringiert, d.h. ein antigenspezifischer TCR erkennt ein Antigen nur unter der Voraussetzung, dass dieses auf dem passenden MHC-Molekül präsentiert wird (Abbildung 1.3). Die Spezifität des TCR wird demnach definiert durch das Antigen und das MHC-Molekül, das selbiges präsentiert. Der MHC/Peptid-Komplex wird dabei von den weniger variablen CDR1- und CDR2-Schleifen beider TCR-Ketten kontaktiert, während die hochvariablen CDR3-Regionen v.a. das spezifische Antigenepitop erkennen.



**Abbildung 1.3:** Bedeutung der MHC-Restriktion im Zusammenhang mit der Antigenerkennung durch T-Zellen (Janeway et al., 2005): Eine Aktivierung der T-Zelle erfolgt nur bei passendem Antigen (x) und passendem MHC-Molekül (MHC<sup>a</sup>)

MHC-I-Moleküle präsentieren 8-10 Aminosäuren lange, prozessierte zytosolische Peptide (wie z.B. virale oder tumorassoziierte Zellproteine), die im endoplasmatischen Retikulum auf die MHC-Moleküle geladen werden. Sie geben dadurch wichtige intrazelluläre Eigenschaften aller kernhaltigen Zellen preis und ermöglichen so eine Kontrolle der Zellen durch das Immunsystem. Auf MHC-II-Molekülen hingegen werden entweder von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommene, extrazelluläre Peptide oder Proteinbestandteile sich intrazellulär vermehrender Organismen präsentiert.

Entsprechend dieser Unterschiede in der Antigenpräsentation aktivieren die beiden MHC-Klassen distinkte T-Zellsubpopulationen. CD8-positive T-Zellen, sog. zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL), binden zumeist an MHC-I und lysieren die entsprechende Zelle bei Präsentation eines fremden Antigens (Norment AM et al., 1988). Durch die Präsentation extrazellulärer Antigene auf MHC-II-Molekülen werden CD4-positive Zellen, sog. T-Helferzellen aktiviert, die entsprechend ihres sezernierten Zytokinmusters in zumindest T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen eingeteilt werden können. T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren v.a. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Interleukin-2 (IL-2) und IL-12 und induzieren die

zellvermittelte Immunantwort, indem sie Makrophagen aktivieren, sowie die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen und die Produktion von opsonierenden Antikörpern (Immunglobulin G, IgG) durch B-Zellen anregen. Eine humorale Immunantwort wird durch T<sub>H</sub>2-Zellen getriggert, die durch Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 die Proliferation von B-Zellen- und Eosinophilen aktivieren und die Produktion von neutralisierenden Antikörpern (IgM, IgE, IgA) induzieren.

In diesem Zusammenhang versteht man unter klonaler Selektion, dass nur diejenigen T-Lymphozyten aktiviert werden, die einen Antigen- und MHC-spezifischen TCR besitzen. Die anschließende klonale Expansion einzelner Lymphozyten mit definiertem TCR führt zu einer Veränderung des nachweisbaren TCR-Repertoires im Sinne einer Einschränkung (Plasilova et al., 2003). Dieses wird als Indiz für eine Antigen-getriebene Selektion spezifischer T-Zellen angesehen.

Allerdings haben Tumorzellen bestimmte Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben der „*immunosurveillance*“ durch T-Zellen zu entkommen. Dazu gehören eine geringere Immunogenität durch verminderte oder fehlende Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und Fremdartigenen, die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, sowie der Verlust bestimmter tumorassoziierter Antigene durch Mutation. Zudem konnte eine Tumor-induzierte Expansion von regulatorischen T-Zellen als weiterer „*immune escape*“ Mechanismus in verschiedenen Tiermodellen demonstriert werden (Übersichtartikel von Colombo et Piconese, 2007).

Die Entwicklung von Antitumorstoffen konzentriert sich deshalb darauf, die Toleranz des Immunsystems gegenüber Tumorzellen und deren Antigenen zu brechen. Bei der Behandlung der sog. „*minimal residual disease*“ nach Operation, Chemotherapie bzw. Bestrahlung könnte dieser Therapieform eine große Bedeutung zukommen.

### **1.3 Die Antitumorstoffung**

Im Jahr 1796 beobachtete Edward Jenner, dass ein 8-jähriger Junge immun gegenüber der Pockenerkrankung geworden war, nachdem er ihm aus einer Kuhpocke gewonnene Flüssigkeit inokuliert hatte. Louis Pasteur bewies erstmals 1881, dass eine Verabreichung attenuierter Choleraerreger vor einer Cholerainfektion schützt. Diese beiden Erkenntnisse markierten den Beginn der antiinfektiösen Impfung wie wir sie heute kennen. Vakzinierung bedeutet in diesem Zusammenhang die präventive Induktion eines lang persistierenden immunologischen Gedächtnisses, das zu einer gezielten Zerstörung infektiöser Eindringlinge führt (Bocchia et al., 2000).

### 1.3.1 Zielsetzung der Antitumorvakzinierung

Die Übertragung dieses Konzepts von Infektions- auf Tumorerkrankungen markiert den Beginn der Antitumorvakzinierung. Paul Ehrlich und später Macfarlane Burnet (in seinem Konzept der „*immunosurveillance*“) gingen davon aus, dass es Aufgabe des Immunsystems ist, maligne transformierte Zellen zu erkennen und zu zerstören.

In den letzten Jahren wurde diese Sichtweise dahingehend erweitert, dass das Immunsystem maligne transformierte Zellen nicht nur im Sinne der „*immunosurveillance*“ überwachen und ggf. zerstören kann, sondern auch deren immunologischen Phänotyp so formen kann, dass Toleranz und Anergie gegenüber bestimmten Tumoren entstehen (sog. „*immunoediting*“, Dunn et al., 2002).

Anders als bei der Abwehr der meisten Infektionserreger nehmen die T-Zellen in diesem Konzept die zentrale Rolle ein (Greenberg, 1991). Wie Krebszellen es schaffen, sich dieser Kontrolle zu entziehen, ist bis heute Gegenstand der Forschung. Neben der Sekretion von immunsupprimierenden Zytokinen (Mocellin et al., 2001) ist v.a. die verminderte Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen für den sog. „*tumor immune escape*“ verantwortlich. Beim Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass der Expressionsverlust von MHC-I-Molekülen umso ausgeprägter ist, je weiter fortgeschritten die Tumorerkrankung ist (Blades et al., 1995). Auch die Beeinflussung der Prozessierung und der anschließenden Präsentation von sog. tumorassoziierten Antigenen auf MHC-I-Molekülen kann ein „*immune escape*“ bewirken (Yang et al., 2003). Schließlich verhindert eine Herabregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. B7.1 = CD80) auf Tumorzellen die Aktivierung der T-Zellen trotz Interaktion mit tumoreigenen MHC-I-Molekülen (Schwartz, 1992). Als weiterer wichtiger Mechanismus konnte zuletzt die Proliferation bzw. *de novo* Induktion immunsuppressiver T<sub>reg</sub> durch Tumorzellen identifiziert werden, dabei scheint TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle zu spielen (Übersichtsartikel von Colombo et Piconese, 2007). Sowohl die Prävalenz dieser T-Zellen im Tumor im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe als auch die Frequenz dieser T-Zellen im peripheren Blut ist bei Prostatakarzinompatienten signifikant im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht (Miller et al., 2006).

Das Konzept der aktiven Immuntherapie von Tumoren stützt sich auf die Hypothese, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen zu zerstören, vorausgesetzt, dass jene spezifische Antigene besitzen, die vom Immunsystem als fremd oder gefährlich erkannt werden können. Tatsächlich handelt es sich jedoch bei vielen Tumorantigenen um Selbstantigene, gegen die eine periphere oder zentrale Toleranz besteht. Insbesondere gilt dieses für T-Zellen mit hoher Affinität zu diesen Selbstantigenen, zu denen vermutlich auch die meisten der Prostata-assoziierten Antigene zählen. Das Ziel aller bisherigen

Antitumor-Vakzinierungsstrategien ist es deshalb, eine Erkennung dieser tumorassoziierten Antigene durch das Immunsystem zu erreichen, die Toleranz gegenüber Tumorzellen zu durchbrechen und die Zerstörung derselbigen damit zu ermöglichen.

Dabei unterscheidet sich die Antitumorvakzinierung in zwei fundamentalen Gesichtspunkten von der Impfung gegen infektiöse Erreger:

- Sie wird bisher nur therapeutisch und nicht prophylaktisch angewandt.
- Sie zielt auf die Generierung einer T-Zell-Antwort gegen Tumorantigene und nicht auf die Produktion von spezifischen Antikörpern ab.

### **1.3.2 Eigenschaften von Antitumorvakzinen**

Beim Design von Antitumorvakzinen sind bisher verschiedene Ansätze zum Zuge gekommen:

- die Verabreichung autologer oder allogener Tumorzellen, die durch gentechnische Veränderung bestimmte Zytokine sezernieren können oder kostimulatorische Oberflächenmoleküle exprimieren (Übersicht bei Frankenberger et al., 2005a).
- die direkte Impfung mit tumorassoziierten Antigenen in Form von Proteinen, Peptiden, rekombinanter DNA oder Viren
- die Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die als professionelle Tumorantigen-präsentierende Zellen fungieren, nachdem sie mit Peptiden beladen oder mit tumorspezifischer DNA oder RNA transfiziert wurden

Dabei stellten gentechnisch veränderte Tumorzellen in den frühen 90ziger Jahren die ersten Antitumorvakzinen dar. Sie zeichnen sich im Wesentlichen durch zwei Eigenschaften aus: sie enthalten im günstigsten Fall das gesamte Antigenrepertoire der Tumorgattung, das von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden kann. Außerdem können sie gentechnisch so manipuliert werden, dass sie bestimmte Zytokine sezernieren, die einen Einfluss auf die zum Vakzineort rekrutierten Leukozyten haben (Bocchia et al., 2000), bzw. kostimulatorische Oberflächenmoleküle exprimieren. Als Beispiel sei hier zum einen IL-2 aufgeführt, das von Tumorzellen sezerniert als Wachstums- und Aktivierungsfaktor auf zytotoxische T-Zellen wirkt und damit das Vorhandensein von CD4-Zellen, den eigentlichen IL-2-sezernierenden Zellen, entbehrlich macht (Fearon et al., 1990). Zum anderen könnten ohne die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Tumorzellen keine T-Zellen aus dem naiven T-Zell-Repertoire aktiviert werden (Frankenberger et al., 2005a).

Die Verwendung autologer Tumorzellen begründete sich auf der Theorie, dass tumorassoziierte Antigene nur auf autologen MHC-I-Molekülen direkt den CTL präsentiert werden können. Die Herstellung von gentechnisch veränderten autologen

Tumorzellvakzinen ist allerdings sehr arbeits- und kostenintensiv. Beim Prostatakarzinom kommt erschwerend hinzu, dass man bis heute kaum Erfolg darin hatte, primäre Prostatakarzinomzellen *in vitro* zu kultivieren und zu vermehren (Peehl & Stamey, 1986). Allogene Tumorzelllinien haben im Vergleich dazu den Vorteil, dass sie meist genauestens charakterisiert sind, in großen Mengen vorhanden sind und nur einmalig für alle Patienten einer Studie gentechnisch verändert werden müssen. Die Entdeckung, dass Tumorantigene aber fast ausschließlich von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden und dass allogene Tumorantigene von diesen autologen, antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und so prozessiert werden, dass sie von autologen CTL erkannt werden können (sog. „*cross priming*“) (Huang et al., 1994), hat zu einer vermehrten Nutzung allogener Tumorzellvakzinen geführt. Zusätzlich sollte eine direkte Aktivierung tumorspezifischer CTL über autologe HLA-Moleküle auf den Vakzinezellen (z.B. HLA-A\*02), die ein der Vakzinezelle und dem Tumor gemeinsames Antigen präsentieren, möglich sein (Schendel et al., 2000).

Der Begriff tumorassoziierte Antigene (TAA) beschreibt Antigene, die auf Tumorzellen gefunden werden, aber auch von einer geringen Zahl körpereigener Zellen exprimiert werden können, so dass eine Toleranz des Immunsystems gegenüber diesen Antigenen besteht (Houghton, 1994; erste Beschreibung eines TAA von van der Bruggen et al., 1991).

Das Konzept der direkten Vakzinierung mit TAA sieht die Auswahl geeigneter Peptide vor, die MHC-I-restringierte CTL induzieren, welche in der Lage sind Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Nach beispielsweise intradermaler Injektion binden diese Peptide an freie MHC-I-Moleküle auf dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), die in die Lymphknoten wandern und dort eine antigenspezifische T-Zell-Aktivierung herbeiführen (Scheibenbogen et al., 2003). Mit Hilfe dieses Ansatzes wäre es möglich, eine äußerst gezielte Immunantwort gegen bestimmte Antigene zu erhalten, welche wiederum sehr genau verfolgt und quantifiziert werden könnte.

Da die Antigene an sich meist wenig immunogen sind, ist der Erfolg v.a. von der weiteren Zusammensetzung der Vakzine abhängig. In diesem Zusammenhang scheint neben der Zugabe spezifischer Adjuvantien wie Zytokine oder CpG-Oligonukleotide die rekombinante Insertion von TAA in bestimmte Viren ein vielversprechender Ansatz zu sein.

Zahlreiche Studien in den letzten Jahren haben gezeigt, dass DC eine zentrale Stellung in der Interaktion und Regulation aller B- und T-Zell-Antworten einnehmen (Banchereau & Steinman, 1998). Die beiden bisher genannten Strategien haben deshalb v. a. eine Verbesserung des Antigentransfers in die DC zum Ziel. Bei dem Vakzinierungsansatz mit

dendritischen Zellen versucht man hingegen die relative Unsicherheit mit der diese Antigentransfers in DC behaftet sind zu umgehen. Dabei werden DC zumeist aus dem Blut des Spenders mit Hilfe bestimmter Zytokincocktails generiert und mit bestimmten Antigenen, RNA oder Tumorzelllysaten beladen. Sie prozessieren dabei die Antigene selbständig und präsentieren diese auf dazu passenden HLA-Molekülen.

### **1.3.3 Antitumorvakzinierungsstrategien beim Prostatakarzinom**

Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom eignet sich hervorragend für die Überprüfung der Sicherheit und Effektivität von Antitumorvakzinierungsstrategien, weil

- es eine sehr häufige Erkrankung darstellt, bei der bisher keine geeignete kurative Therapiemaßnahme zur Verfügung steht.
- das Prostatakarzinom mehrere gewebespezifische Proteine wie z.B. PSA sezerniert bzw. wie das prostataspezifische Membranantigen (*prostate-specific membrane antigen*, PSMA) exprimiert, die als Tumorantigene bei der Vakzinierung berücksichtigt werden können.
- die Gefahr der Autoimmunität als Nebenwirkung einer Vakzinierung nicht gefürchtet werden muss, da das Prostatagewebe entbehrlich ist.
- die Prostata für diagnostische Maßnahmen leicht zugänglich ist und mit dem PSA-Wert ein einfach zu bestimmender klinischer Verlaufsparemeter vorhanden ist (Brill et al., 2001).

In der GeMCRIS-Datenbank des National Institute of Health (NIH Genetic Modification Clinical Research Information System, [http://www.gemcris.od.nih.gov/Contents/GC\\_HOME.asp](http://www.gemcris.od.nih.gov/Contents/GC_HOME.asp)), in der klinische Studien registriert sind, die sich genetischer Modifikation von Zellen als Therapieansatz bedienen, waren 2006 über 75 Vakzinierungsstudien beim Prostatakarzinom erfasst. Davon untersuchen mehr als zehn Studien Impfungen mit modifizierten allogenen bzw. autologen Tumorzellen, mehr als 20 Studien Impfungen mit tumorassoziierten Antigenen mittels unterschiedlicher Vektoren und mehr als sechs Studien Impfungen mit dendritischen Zellen. Im Vergleich dazu war im Deutschen Register für somatische Gentransferstudien (DeReG, [www.dereg.de](http://www.dereg.de)) zur gleichen Zeit nur eine Vakzinierungsstudie beim Prostatakarzinom erfasst. Es handelt sich dabei um die im Anhang ausführlich beschriebene Zytokin-Gentherapiestudie, in deren Rahmen die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden.

## 1.4 Die Überwachung der Immunantwort im Rahmen der Antitumorvakzinierung

Für die Beurteilung der Effektivität und für die Weiterentwicklung von Vakzinen ist die Korrelation der erzielten spezifischen Immunantwort und des zu beobachtenden klinischen Verlaufs von großer Bedeutung. Allerdings ist dies bis heute nicht sicher gelungen (Bocchia et al., 2000; Coulie & van der Bruggen, 2003). Insbesondere für die Bewertung, ob das Ausbleiben eines klinischen Ansprechens auf eine fehlende Induktion einer adäquaten T-Zell-vermittelten Immunantwort oder auf eine Resistenz des Tumors gegen den Angriff des Immunsystems zurückzuführen ist, sind Testsysteme zur Analyse der Immunantwort absolut notwendig. Im Gegensatz zu prophylaktischen Impfungen gegen bestimmte infektiöse Pathogene, für die seit Jahrzehnten einfache und verlässliche Methoden der Erfolgsbeurteilung *in vivo* (Antikörpertiter) zur Verfügung stehen, konnte bisher noch kein *in vitro* Testsystem entwickelt werden, das die Antitumoraktivität von T-Zellen *in vivo* akkurat widerspiegeln kann.

Nach Coulie und van der Bruggen (2003) müssen zwei Kriterien erfüllt sein, um von einer eindeutigen T-Zell-Antwort gegen die Vakzine sprechen zu können:

1. die Zahl der gefundenen T-Zellen sollte nach der Vakzinierung zunehmen bzw. es sollten Hinweise auf eine klonale Amplifikation vorliegen
2. die gefundenen T-Zellen sollten die Tumorantigene der Vakzine klar erkennen können. Dabei müssen eine Erkennung von immunogenen Adjuvantien oder Verunreinigungen der Vakzine und eine „bystander“-Aktivierung ausgeschlossen sein.

### 1.4.1 Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp

Die älteste Methode der Quantifizierung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort und gleichzeitig die einzige Analyse selbiger *in vivo* ist die Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp („*delayed type hypersensitivity*“-Reaktion, Typ IV nach Coombs und Gell). Dabei werden kleine Antigenmengen intradermal injiziert. Als unmittelbare Folge entsteht eine Entzündungsreaktion, die an Hand des Indurationdurchmessers nach 48-72 Stunden (Std.) quantifiziert werden kann. Wie Studien von Thurner et al. (1999) und Morse et al. (1999) zeigen, ist die Beurteilung einer definitiven antigenvermittelten Immunantwort schwierig, da einerseits Vakzinezusatzstoffe eine Reaktion auslösen können und andererseits bei Patienten ohne sichtbare Reaktion trotzdem infiltrierende T-Zellen nachweisbar sein können. Nichts desto trotz kann man diesen Test auf jeden Fall zur initialen Einschätzung einer Immunantwort verwenden. Zusätzlich hat man die Möglichkeit antigenspezifische T-Zellen aus Hautbiopsien an der Reaktionsstelle zu isolieren und zu analysieren (Waanders et al., 1997).

### 1.4.2 Methoden der *In-vitro*-Analyse

Testsysteme zur *In-vitro*-Analyse der Immunantwort beinhalten die Verwendung von Peptid-MHC-Tetrameren, den ELISPOT, lymphoproliferative und zytotoxische Assays oder den Nachweis von Zytokinen als Aktivierungsmarker mittels Durchflusszytometrie.

Die Verwendung löslicher Komplexe aus jeweils mindestens vier rekombinanten MHC-I- oder MHC-II-Molekülen und Peptiden, sog. Tetramere, erlaubt die Quantifizierung von CD8- und CD4-positiven Zellen, die ein spezifisches Antigen über ihren TCR erkennen. (Altman et al., 1996; Kwock et al., 2002). Dabei können die T-Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert und analysiert werden. Allerdings ist eine qualitative Aussage über die Funktion der antigenspezifischen T-Zellen nicht möglich. Einige Autoren konnten nachweisen, dass die so gewonnenen T-Zellen zwar tumorspezifische Antigene erkennen, aber funktionell nicht reaktiv sind (Lee et al., 1999; Monsurro et al., 2002).

Um die funktionelle Aktivität von T-Zellen zu bestimmen, ist die Messung von sezernierten Zytokinen oder zytotoxischen Molekülen (z.B. Granzym, Perforin) mit Hilfe des ELISPOT-Ansatzes (*enzyme-linked immunospot assay*) von Bedeutung. Dabei werden mononukleäre Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) bzw. T-Zellen für kurze Zeit mit einem bestimmten Antigen inkubiert und die im Verlauf freigesetzten Zytokine mittels einer ELISA- (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ähnlichen Reaktion nachgewiesen. Mit dieser Methode kann die Funktionalität von T-Zellen erfasst werden. Eine Antigenpezifität der zu beobachtenden Reaktion kann aber nicht mit Sicherheit postuliert werden, da die Zytokinausschüttung antigenspezifischer T-Zellen auch zu einer Aktivierung unbeteiligter Lymphozyten führen kann. Die Methode des „*cytokine capture*“-Assays erlaubt, dass zytokinsezernierende T-Zellen direkt mit Hilfe von Hybridantikörpern identifiziert und charakterisiert werden können (Manz et al., 1995; Brosterhus et al., 1999; Becker et al., 2001).

Die Einführung der Mehrfarben-Durchflußzytometrie erlaubt neuerdings die simultane phänotypische und quantitativ funktionelle Analyse Tumorantigen-spezifischer T-Lymphozyten. Diese kombinierte Methode ist allerdings sehr aufwendig, schwierig zu standardisieren und teuer.

Die Eingangs beschriebenen Mechanismen der somatischen Rekombination und N-Addition führen zu einem höchst vielfältigen TCR-Repertoire, dessen Expression in T-Lymphozyten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) unter Verwendung geeigneter V-Gensegmentfamilien-spezifischer Primer im Blut und in Gewebeproben nachgewiesen werden kann. Im Verlauf einer antigengetriebenen Stimulation von T-Zellen kommt es zu einer Selektion und Proliferation weniger T-Zellen mit der Folge einer Einschränkung des nachweisbaren TCR-Repertoires (Maryanski et al., 1996; McHeyzer-Williams & Davis, 1995). Einige Autoren konnten eine Verwendung nur

einzelner V-Gensegmentfamilien bei infiltrierenden T-Zellen unterschiedlicher Tumore feststellen (Nitta et al., 1990; Matsutani et al., 2004; Pilch et al., 2002). Anhand zahlreicher Experimente wurden drei Kriterien entwickelt, die für die spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort auf antigene Stimuli kennzeichnend sind (Maryanski et al., 1996; McHeyzer-Williams & Davis, 1995): erstens das Vorliegen eines eingeschränkten V- und J-Gensegmentgebrauch, zweitens eine Beschränkung der CDR3-Schleifenlänge und drittens die Konservierung bestimmter Aminosäuren innerhalb der CDR3-Region.

Jantzer & Schendel (1998) konnten bei einem Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigen, dass dessen tumorinfiltrierende Lymphozyten autologe Tumorzellen spezifisch und MHC-restringiert lysierten und sich aus einer oligoklonalen Population zusammensetzten, die zum Großteil zwei variable TCR-Ketten ( $V\alpha 20$ ,  $V\beta 22$ ) mit äußerst homologer CDR3-Region exprimierten. Bei der Stimulation HLA-A\*0201-positiver, naiver Lymphozyten eines Normalspenders mit einer gentechnisch modifizierten Nierenzellkarzinomlinie (RCC26) des Patienten konnten zytotoxische T-Lymphozyten mit dem charakteristischen  $V\alpha 20/V\beta 22$ -TCR und verwandter CDR3-Schleife induziert werden, welche bei HLA-A\*0201-negativen Spendern nicht nachweisbar waren (Schendel et al., 2000).

Die Rekrutierung und Expansion einer T-Zell-Population mit eingeschränktem TCR-Repertoire und HLA-A\*0201-restringierter Antitumoraktivität wie bei dieser Nierenzellkarzinomlinie gezeigt, sollte die Verwendung tumorspezifischer, homologer TCR-Sequenzen als Verlaufsparemeter bei der Beurteilung einer tumorspezifischen Immunantwort im Rahmen einer allogenen Vakzinierungsstrategie ermöglichen. Dazu würde mittels quantitativer PCR (sog. *Real-time-PCR*) die Frequenz der diesen charakteristischen TCR tragenden T-Zellen im Blut oder Biopsiematerial der Patienten im Verlauf der Vakzinierungen bestimmt werden können. Durch die sensitive Methode der PCR sollte es trotz allogener Reaktion auf die Vakzinezelle möglich sein, die Frequenz tumorspezifischer T-Zellen abzuschätzen.

Beim PCa gibt es aktuell noch keinen Nachweis tumorreaktiver T-Zellen mit einer spezifischen homologen TCR-Sequenz für eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, das gleiche gilt für *in vitro* Stimulationen von T-Zellen mit PCa-Zelllinien oder –vakzinezellen. Erschwerend kommt hinzu, dass für die bisher etablierten Tumorzelllinien weder autologe, lymphoblastoide, EBV-transformierte B-Zelllinien (sog. B-LCL), Gewebe- bzw. Tumor-infiltrierende Lymphozyten-Zelllinien (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) noch autologe Zelllinien aus gesundem Prostatagewebe zur Verfügung stehen, so dass eine Differenzierung der allogenen von der tumorspezifischen MHC-restringierten Immunantwort schwierig ist.

## 1.5 Zytokinbasierte Gentherapie beim Prostatakarzinom

Die Experimente dieser Arbeit wurden im Rahmen einer durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten klinischen Phase I/II-Studie über den Einsatz einer zytokinbasierten Gentherapie beim Prostatakarzinom durchgeführt. Unter der Leitung von Prof. Dr. B. Gänsbacher, Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, wurde eine allogene, gentechnisch modifizierte Tumorzellvakzine in einer klinischen Phase I/II-Studie an Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom (Stadium IV, mittleres Überleben 8-10 Monate) getestet. Als Vakzinezelle wurde die LNCaP-Zelllinie verwendet, eine Zelllinie, die aus der Lymphknotenmetastase eines PCa-Patienten (Horoszewicz et al., 1983) stammt, androgenempfindlich ist und die Peptide PSA, PAP (*Prostatic acid phosphatase*), PSMA (*Prostate specific membrane antigen*) und PSCA (*Prostate stem cell antigen*) exprimiert (Lu et. Celis, 2002; Kiessling et al., 2002). Zu Studienzwecken wurde diese Zelllinie mit den Genen für IL-2 und IFN- $\gamma$  transfiziert. IFN- $\gamma$  ermöglicht eine deutliche Steigerung der MHC-I-Expression, induziert Gene, die an der Antigenprozessierung und –präsentation auf MHC-I-Moleküle beteiligt sind (Restifo et al., 1993), und steigert die Produktion von PSA. Auch die Expression von HLA-A\*02, welches das am besten untersuchte MHC-I-Molekül ist, konnte durch die Transfektion von IFN- $\gamma$  gesteigert werden. Ungefähr 40-50 % der kaukasischen Bevölkerung exprimieren dieses HLA-Gen, fast 95 % davon den Subtyp HLA-A\*0201. IL-2 wirkt proliferativ und antiapoptotisch und erhöht somit die Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten am Vakzineort (Fearon et al., 1990). Diese unter „good manufacturing practice“-Bedingungen (GMP) in einem von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannten Labor in den USA produzierten Vakzinezellen wurden nach Bestrahlung mit 150 Gy den ebenfalls HLA-A\*0201-positiven Patienten in einer Dosis von  $7,5 \times 10^6$  bzw.  $1,5 \times 10^7$  Zellen intradermal injiziert. Die Vakzinierungen wurden vorerst an den Tagen 1, 15, 29 und 92 durchgeführt, bei Ansprechen, gemessen an einer Stabilisierung oder Abfalls des PSA, erfolgten weitere Applikationen im Abstand von 90 Tagen. Eine ausführliche Übersicht der Studie mit Ein- und Ausschlusskriterien und Zeitplan ist im Anhang dargestellt.

Die Ziele der Studie sind die Evaluierung der Sicherheit bzw. Toxizität dieses Ansatzes (Phase I) und der klinischen Effektivität bezüglich der Tumorprogression (Phase II). Da aufgrund der fortgeschrittenen Erkrankung klinisch-radiologisch erfassbare Tumorregressionen nicht unbedingt zu erwarten sind, erfolgen neben Verlaufskontrollen des PSA-Wertes eine Untersuchung und Überwachung der immunologischen Antwort durch Auswertung der Hautreaktion, immunhistologische Analyse der lokalen Infiltration an der Vakzinierungsstelle und Analyse der Zytokinsekretion durch Lymphozyten im Blut und an der Impfstelle.

## 1.6 Zielsetzung

Für diese Genvakzinestudie sollten Techniken zur Überwachung des Immunsystems der Patienten (sog. *immune monitoring*) etabliert werden. Hauptschwerpunkt dabei war die Charakterisierung von TCR-Sequenzen Vakzinezellen-spezifischer T-Zellen. Bisher konnten für diese Vakzinzelllinie keine tumorreaktiven T-Zellen mit spezifischen, homologen TCR-Sequenzen für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten nachgewiesen werden. Eine Überwachung tumorspezifischer T-Zellen an Hand ihrer tumorantigenspezifischen TCR-Sequenzen war daher nicht möglich.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Können aus einem naiven T-Zellrepertoire tumorspezifische T-Zellen durch *In vitro*- Stimulation mit der Vakzinzelllinie induziert werden, die charakteristische TCR mit homologen Transkripten aufweisen?
2. Wie setzt sich das TCR-Repertoire von T-Zellen an der Vakzinierungsstelle nach 48-72 Stunden bzw. –falls vorhanden- im Primärtumor des Patienten zusammen ?
3. Ist die Überwachung einer tumorspezifischen Immunantwort auf die Vakzinierung mit der transfizierten LNCaP-Zelllinie durch TCR-Analysen im Blut von Studienpatienten möglich, wenn es gelingt, einen charakteristischen, vakzinespezifischen TCR mit stark konservierter CDR3-Sequenz im Rahmen der beiden vorangegangenen Fragestellungen zu identifizieren?
4. Welches Zytokinmuster findet sich bei infiltrierenden Lymphozyten an der Injektionsstelle?
5. Ist eine Veränderung des Zytokinmusters im Serum während der Vakzinierung mit Hilfe multiplexer Zytokinbestimmung nachweisbar ?
6. Lässt sich das Ausmaß der Immunantwort nach Vakzinierung durch IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Analysen quantifizieren ?

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsanlage <i>Gammacell 40</i>	Atomic Energy
Didestilliergerät <i>Easypure RF</i>	Barnstead
Luminometer <i>Bio-Plex</i> <sup>®</sup>	Bio-Rad
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i> <sup>®</sup>	Becton Dickinson
ELISPOT-Reader System ELR03	AID Autoimmun Diagnostika
Einfrierbox	Nalgene
Elektrophoresekammern, horizontal	Invitrogen
Gefrierschrank, -20 °C <i>Premium</i>	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C <i>HFU86</i>	Heraeus
Geldokumentationssystem, <i>Multi Imager</i> <sup>®</sup>	Bio-Rad
Heizblock <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf
Inkubationsschrank	Heraeus
Kühlschränke, 4 °C	Liebherr
Mehrkanalpipetten 25-200 µl	Dunn Labortechnik
Mikropipette 0,1-2 µl	Eppendorf
Mikropipetten	Gilson
2-10 µl, 2-20µl, 20-100 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	
Mikroskop <i>DMLS</i>	Leica
Mikrowelle <i>Micromat</i>	AEG
Multipipetten, <i>Multipette plus</i>	Eppendorf
Neubauerzählkammer	Brand
Pipettierhilfe <i>Pipetus-Akku</i>	Hirschmann
Photometer <i>Gene Quant II</i>	Amersham Biosciences
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim
Temperaturzyklusautomaten	
<i>LightCycler</i> <sup>®</sup>	Roche
<i>PTC200</i>	MJ Research
Vortexer <i>VF2</i>	IKA Labortechnik

## MATERIAL

---

### Waagen

Präzisionswaage *BP2100* Sartorius

Analysenwaage *MCI* Sartorius

Wasserbad *SUB* Julabo

### Zentrifugen

Kühlzentrifuge *5417R* Eppendorf

Kühlzentrifuge *Multifuge3 S-R* Heraeus

Zentrifugenadapter Roche

für den *LightCycler*<sup>®</sup>

### Verbrauchsmaterial

### Hersteller

<i>Bio-Plex MCV-Plate (96-well)</i>	Bio-Rad
Einfrierröhrchen	Nunc
Einweg-Pasteurpipetten, steril	Peske OHG
Einwegpipetten, steril (2,5,10, 25 ml)	Falcon
Handschuhe <i>Sempermed Nitril</i>	Semperit
Kapillaren für den <i>LightCycler</i> <sup>™</sup>	Roche
Mabtech precoated plates (Batch #120)	Mabtech
Multipipettenspitzen <i>Combitips Plus</i>	Eppendorf
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner
Pipettenspitzen, gestopft (2,5, 10, 200, 1000 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,2 ml) <i>Softstrips</i>	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Starlab
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) <i>Safelock</i>	Eppendorf
Skalpelle Nr. 20	Feather
Spritzen <i>Perfusion 50</i>	Godan
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Falcon
Zellkulturplatten (6-well, 24-well, 48-well)	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon

## 2.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 1 %	Bio-Rad
Ethylendiamino-tetra-Acetat (EDTA)	Invitrogen
Glycerin	Merck
Isopropanol	Merck
PBS (Phosphat-gepufferte Saline, pH 7,4) 10 x	Universitätsapotheke
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck
Trypanblau 0,4 %	Sigma

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Verbrauchsmedien, Zusätze und andere Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<i>AB-Serum</i> (Lot: 011021)	Cambrex
<i>FACS-Flow</i>	Becton Dickinson
<i>FACS-Rinse</i>	Becton Dickinson
<i>FACS-Safe</i>	Becton Dickinson
Ficoll	Biochrom
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Geneticin (G418-Sulfat)	Pan Biotech GmbH
Heparin 25000 IE	Essex Pharma
HEPES-Puffer 10mM	Invitrogen
Humanserum (Gemisch aus 30 Spendern)	H. Pohla, eigene Herstellung
IL-2, rekombinant, human ( <i>Proleukin</i> )	Cetus
Iscove´s modified DMEM	Invitrogen
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
MEM (100 x), nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Invitrogen
P/S- Fungizone (100x)	Cambrex
RPMI 1640	Invitrogen
Trypsin-EDTA in PBS (10 x)	Invitrogen

### 2.3.2 Medien

*RPMI III*

RPMI 1640

2 mM L-Glutamin

1 x Penicillin/Streptomycin

1 mM Natriumpyruvat

*Komplettmedium für T-Zellen*

15 % Humanserum in RPMI III

*Medium für gewebeinfiltrierende Zellen (TIL-Medium)*

Iscove´s modified DMEM

## MATERIAL

---

2mM L-Glutamin  
1x MEM  
0,1mM HEPES  
0,1x P/S-Fungizone  
15% Humanserum

### *Tumorzellmedium*

RPMI 1640  
2 mM L-Glutamin  
1 mM Natriumpyruvat  
1x MEM  
10% FCS

### *Selektionsmedium für LNCaP/IL-2/IFN $\gamma$*

RPMI 1640  
2 mM L-Glutamin  
1 mM Natriumpyruvat  
1x MEM  
10% FCS  
0,6 mg/ml G418

### *ELISPOT-Medium 1 (blocking)*

RPMI III  
10% AB-Serum

### *ELISPOT-Medium 2 (Stimulation)*

RMPIII  
10% AB-Serum  
20 U IL-2/ml

### *Einfrriermedium*

20 % DMSO in RPMI III

## 2.4 Blut- und Serumproben

Die in *Tabelle 2.1* aufgeführten heparinisierten Vollblut- und Serumproben wurden von freiwilligen Spendern zur Verfügung gestellt bzw. wurden Patienten der Studie am Tag 0, 3, 17 und 94 abgenommen. Alle Spender bzw. Patienten waren auf Vorliegen des HLA-A0201-Allels positiv getestet worden. Entsprechend den Einschlusskriterien wiesen alle Studienpatienten sowie Spender # 56 ein HRPC auf.

Spender <sup>1</sup>	Alter <sup>2</sup>	Probenart <sup>3</sup>	Typ <sup>4</sup>	Tumorstadium <sup>5</sup>
Studienpatienten				
P105	63	VB, S	TP	TxNxM1
P108	64	VB, S	TP	pT3pN0M0
P109	63	VB, S	TP	pT3pN0M0
P113	61	VB, S	TP	pT3pN0M0
P118	74	VB, S	TP	TxNxM1
P125	73	VB, S	TP	cT3NxM0
P182	56	VB, S	TP	pT3apN1M0
P184	64	VB, S	TP	cT3NxM1
# 56	77	VB	TP	pT4N1M1
Normalspender				
# 148	28	VB	NS	
# 168	24	VB	NS	
# 195	48	VB	NS	
# 287	40	VB	NS	

**Tabelle 2.1:** Verwendete Blut- und Serumproben

<sup>1</sup> Patientennummern wurden der Datenbank der Studie „Einsatz einer Zytokin-Gentherapie beim Prostatakarzinom“ bzw. bei Normalspendern aus der Spenderdatenbank des Labors für Tumormimmunologie übernommen.

<sup>2</sup> Alter der Spender zum Zeitpunkt des Studienbeginns.

<sup>3</sup> Probenart: VB = Vollblut, S = Serum

<sup>4</sup> Spendertyp: TP= Tumorpatient, NS= Normalspender.

<sup>5</sup> Tumorstadium entsprechend der sog. TNM-Klassifikation

## 2.5 Gewebeproben

Patient Nr. <sup>1</sup>	Art der Gewebeprobe	Zeitpunkt	Vakzinedosis
P109	Lokalrezidiv-Resektat	Vor 4. Vakzinierung	6.5 x 10 <sup>6</sup> Zellen
P113	Hautbiopsie	48h nach 9. Vakzinierung	15 x 10 <sup>6</sup> Zellen
P182	Hautbiopsie	7 Tage nach 3. Vakzinierung	15 x 10 <sup>6</sup> Zellen
P184	Hautbiopsie	7 Tage nach 3. Vakzinierung	15 x 10 <sup>6</sup> Zellen

**Tabelle 2.2** Verwendete Gewebeproben

<sup>1</sup> Die Patientennummern wurden der Datenbank der Studie „Einsatz einer Zytokin-Gentherapie beim Prostatakarzinom“ entnommen

Die in *Tabelle 2.1* und *Tabelle 2.2* aufgeführten Blut- und Gewebeproben wurden von der urologischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar (Direktor Prof. Dr. med. Hartung), Technische Universität München, zur Verfügung gestellt. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen der Patienten durch laufende Nummern ersetzt.

## 2.6 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft und Kultivierung und die für diese Arbeit wichtigen Charakteristika sind in *Tabelle 2.3* aufgeführt.

Zelllinie	Wachstum <sup>1</sup>	Charakteristika	Medium <sup>2</sup>	Literatur	Quelle
LNCaP	Adhärent (F)	Zelllinie einer Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinompatienten	TM	(75)	ATCC
LNCaP/IL-2/IFN $\gamma$	Adhärent (F)	IFN $\gamma$ - und IL-2- Transfektante von LNCaP; Einsatz als Vakzine in o.g. Studie	SM	–	Prof. Dr. B. Gänsbacher

**Tabelle 2.3** Verwendete Zelllinien. ATCC= American Type Culture Collection

<sup>1</sup> Wachstum und Kultivierung der Zelllinie. F= Zellkulturflaschen

<sup>2</sup> Verwendete Medien sind unter 2.3.2 beschrieben. SM= Selektionsmedium, M=Tumorzellmedium

## 2.7 Antikörper

Der *removab*<sup>®</sup>-Antikörper der Firma TRION Research GmbH stellt einen intakten bispezifischen Antikörper dar, der sich aus einer CD3-spezifischen und einer Ep-CAM-spezifischen (*epithelial cell adhesion molecule*, Ep-CAM) Kette zusammensetzt. Ein Arm erkennt das auf Tumorzellen vorkommende Antigen EpCam, der andere Arm bindet über den CD3-Rezeptor an T-Lymphozyten. Durch Bindung von Fc-Rezeptor-tragenden Zellen, z.B. Makrophagen, an die konstante Kette des Antikörpers entsteht ein Komplex aus

Tumorzelle, T-Zelle und Makrophage, der eine gezielte Aktivierung der daran beteiligten Abwehrzellen ermöglicht (siehe Abbildung 2.1).

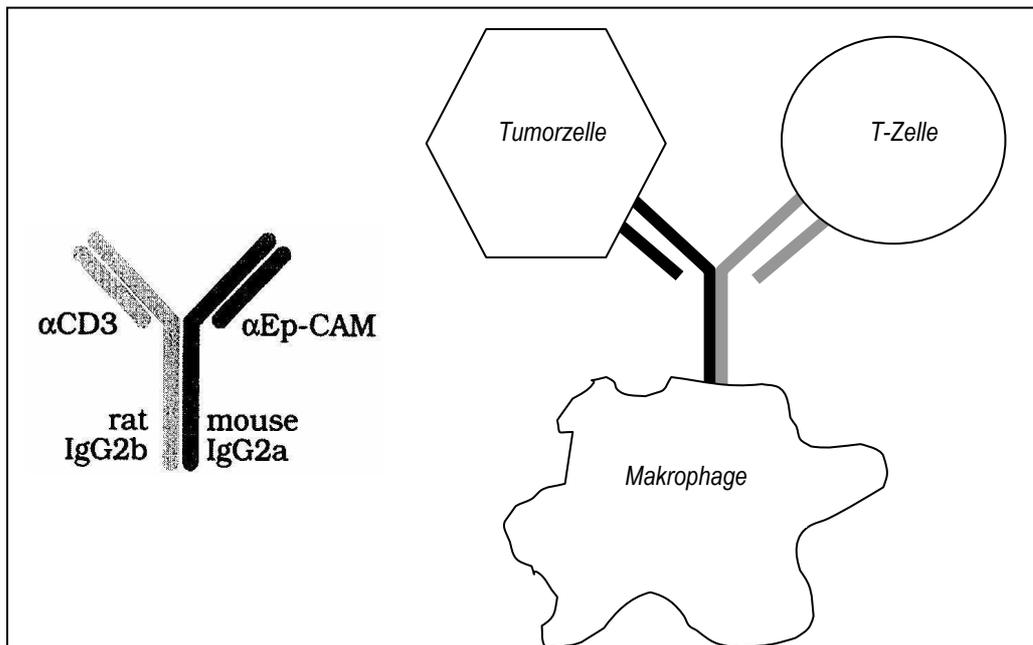


Abbildung 2.1: Aufbau und Funktion von *removab*<sup>®</sup> nach Zeidler et al., 1999

## 2.8 Peptide

Die im Rahmen des ELISPOT eingesetzten Peptide wurden im Genzentrum der LMU-München von Dr. Thomas Fröhlich hergestellt. Es handelt sich um aus der Literatur bekannte Peptide mit HLA-A\*0201 Bindungsmotiv oder um Sequenzen, die über ein Epitop-Vorhersageprogramm ausgesucht worden sind ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

- PSMA-P2 (*prostate specific membrane antigen*), Sequenz AS 711-719: ALFDIESKV. (Salgaller et al., 1998)
- PSCA-P4 (*prostate stem cell antigen*), Sequenz AS 14-22: ALQPGTALL. (Dannull et al., 2000)
- Ep-2H (entspricht Ep-CAM), Sequenz AS 184-192: ILYENNVIV, heteroklitisch V statt T zur besseren Bindung. (Trojan et al., 2001)
- PSA 1, 2, 3 (*prostate specific antigen*), Oligopeptid enthält die Epitope PSA-1, PSA-2 und PSA-3, Sequenz AS 141-163: FLTPKKLQCVDLHISNDVCAQV. (Correale et al. 1998)
- STEAP-3 (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*), Sequenz AS 262-270: LLLGTIHAL. (Machlenkin et al. 2005)
- PSGR-1 (*prostate specific G-protein-coupled receptor*), Sequenz AS 202-210: ILLVMGVDV.
- PRAME-P4 (*preferentially expressed antigen in melanoma*), Sequenz AS 425-433: SLLQHLIGL. (Kessler et al., 2001)

Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO (40µg/µl) gelöst und 1:10 in RPMI III (4µg/µl) verdünnt.

Als interne Kontrolle für den ELISPOT-Assay wurde der sog. CEF Peptidpool eingesetzt (PANATecs GmbH, Tübingen): CMVpp65 (NLVPMVATV), EBV-BMLF1 (GLCTLVAML), EBV-LMP-2 (CLGGLTMV), Influenza M1 Protein (GILGFVFTL) und Influenza RNA Polymerase PA (FMYSDFHFI).

## 2.9 Reagenziensysteme

### 2.9.1 Reagenziensysteme für das *Bio-Plex*<sup>®</sup>-Gerät

*Bio-Plex Cytokine Reagent Kit* (Bio-Rad, Katalognummer 171-304001)

*Bio-Plex Human Cytokines 17-Plex* (Bio-Rad, Katalognummer 171-A11171)

(G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, MCP1/MCAF, MIP-1β, TNF-α)

*Bio-Plex Calibration Kit* (Bio-Rad, Katalognummer 171-203060)

*Bio-Plex Human Serum Diluent Kit* (Bio-Rad, Katalognummer 171-305001)

### 2.9.2 Reagenziensysteme für den Cytometric Bead Array

Human Th1/Th2 Cytokine CBA (BD, Katalognummer 550749)

(IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α, IFN-γ)

### 2.9.3 Reagenziensysteme für den IFN-γ-ELISPOT

IFN-γ precoated plates, Batch #120 (Fa. Mabtech, Schweden)

Detektionsreagenzien (Fa. Mabtech, Schweden):

- IFN-γ mAb 7-B6-1 biotinyliert: biotinylierter Antikörper gegen IFN-γ; 1,5µg/ml verdünnt in PBS + 0,5% FCS
- Streptavidin-ALP: alkalische Phosphatase konjugiert mit Streptavidin; 1:1000 verdünnt in PBS + 0,5% FCS
- BCIP/NBT-plus: Substrat für alkalische Phosphatase; Hydrolyse von BCIP und Reduktion von NBT führt zu einem violetten Produkt; vor Verwendung durch 0,45µm-Filter filtriert

PBS-Tween: Tween 20 0.05% (Sigma) in 1x PBS

## 2.10 Molekularbiologie

### 2.10.1 Oligonukleotide

Alle aufgeführten *Primer* wurden im Genzentrum, Martinsried (G.J. Arnold) hergestellt.

A. *Primer* für Standard-PCR:

- T-Zellrezeptor V $\alpha$ - Gensegment- familienspezifische Oligonukleotide:

Name	5' → 3' Sequenz
panV $\alpha$ 1	AGA GCC CAG TCT GTG ASC CAG
panV $\alpha$ 1.1	AGA GCC CAG TCR GTG ACC CAG
panV $\alpha$ 2	GTT TGG AGC CAA CRG AAG GAG
V $\alpha$ 3	GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA
panV $\alpha$ 4	TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC
V $\alpha$ 5	GGC CCT GAA CAT TCA GGA
V $\alpha$ 6 neu	GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A
panV $\alpha$ 7	ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG
panV $\alpha$ 8	TGT GGC TGC AGC TGG ACT
V $\alpha$ 9	ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA
V $\alpha$ 10	ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT
V $\alpha$ 11	AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT
V $\alpha$ 12	CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT
V $\alpha$ 13	GAG CCA ATT CCA CGC TGC G
V $\alpha$ 14	CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC
V $\alpha$ 14.1	CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC
V $\alpha$ 15	GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC
V $\alpha$ 16	TCA GCG GAA GAT CAG GTC AAC
V $\alpha$ 17	GCT TAT GAG AAC ACT GCG T
V $\alpha$ 18	GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT
V $\alpha$ 19	AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA
V $\alpha$ 20	CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA
V $\alpha$ 21	GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT
V $\alpha$ 22	TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC
V $\alpha$ 23	TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC
V $\alpha$ 24 neu	GAA CTG CAC TCT TCA ATG C

## MATERIAL

V $\alpha$ 25	ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA
V $\alpha$ 26	AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA
V $\alpha$ 27	ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG
V $\alpha$ 28	CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT
V $\alpha$ 29	AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA
V $\alpha$ 30	GAG GGA GAG AGT AGC AGT
V $\alpha$ 31 neu	TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A
V $\alpha$ 32	CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA
3'C $\alpha$	GGT GAA TAG GCA GAC AGA CTT GTC ACT GGA

- T-Zellrezeptor V $\beta$ - Gensegment- familienspezifische Oligonukleotide:

Name	5' → 3' Sequenz
V $\beta$ 1	GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC
V $\beta$ 2	TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT
V $\beta$ 3	GTC TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC
V $\beta$ 4	ACA TAT GAG AGT GGA TTT GTC ATT
V $\beta$ 5.1	ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG AAA C
V $\beta$ 5.2	TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG
V $\beta$ 5.2T	TTC CCT AAT TAT AGC TCT GAG CTG
V $\beta$ 6/1 neu	GCC CAG AGT TTC TGA CTT ACT TC
V $\beta$ 6.2	ACT CTG ASG ATC CAG CGC ACA
V $\beta$ 6.3	ACT CTG AAG ATC CAG CGC ACA
V $\beta$ 7	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C
V $\beta$ 8	ATT TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG
V $\beta$ 8.S3	GCT TAC TTC CGC AAC CGG GCT CCT
V $\beta$ 9 neu	CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT
V $\beta$ 10	CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT
V $\beta$ 11	TCA ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG
V $\beta$ 12	AAA GGA GAA GTC TCA GAT
V $\beta$ 12.S3	GCA GCT GCT GAT ATT ACA GAT
V $\beta$ 13.1	CAA GGA GAA GTC CCC AAT
V $\beta$ 13.2	GGT GAG GGT ACA ACT GCC
V $\beta$ 13 neu	TCG ACA AGA CCC AGG CAT GG
V $\beta$ 13.S5	ATA CTG CAG GTA CCA CTG GCA

MATERIAL

Vβ14	GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT
Vβ15	AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT
Vβ16	AAA GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC
Vβ17	CAG ATA GTA AAT GAC TTT CAG
Vβ18	GAT GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA
Vβ19	CAA TGC CCC AAG AAC GCA CCC TGC
Vβ20	AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC
Vβ21	AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC
Vβ22/3	CTC AGA GAA GTC TGA AAT ATT CG
Vβ23 neu	GCA GGG TCC AGG TCA GGA CCC CCA
Vβ24 neu	ATC CAG GAG GCC GAA CAC TTC T
Vβ25	TGT AGC CTT GAG ATC CAG GCT A
3' Cβ	GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TC

Folgende *Primer* wurden als Gemisch im Verhältnis 1:1 verwendet:

Vβ5.2 und Vβ5.2T; Vβ6/2 und Vβ6/3

- Oligonukleotide zur Synthese der internen Kontrolle:

Name	5' → 3' Sequenz
P-5'αST	CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT
P-3'αST	CTT GCC TCT GCC GTG AAT GT
P-5'βST	AAG CAG AGA TCT CCC ACA C
P-3'βST	GAG GTA AAG CCA CAG TTG CT

B. *Primer* für quantitative Amplifikation am LightCycler:

5'-α-Enolase	GTT AGC AAG AAA CTG AAC GTC ACA
3'-α-Enolase	TGA AGG ACT TGT ACA GGT CAG
Jα8	AAA GCC TGT GAT TAG CGT
Jα31	ATT GTT ATT CCG GGC AGC
Jα 44	GCC GGT GCC TTC GTC TCT CAC
Dβ2.1 Jβ 2.2	CTC CCC GTT TCC GCT AGC TTG
Dβ1.1 Jβ1.5	CTG ATT GTT CCC TGT CTT GAG

C. *Primer für reverse Transkription*

Name	5' → 3' Sequenz
P-C $\alpha$ ST	AAG CAG AGA TCT CCC ACA C
P-C $\beta$ ST	GAG GTA AAG CCA CAG TTG CT

### 2.10.2 Enzyme

Reverse Transkriptase

*Superscript II* 200 U/ $\mu$ l, (Invitrogen)

*AMV Reverse Transcriptase* (Roche)

Polymerasen

*Taq DNA Polymerase*, (Amersham Biosciences)

*LightCycler<sup>®</sup> FastStart Enzyme*,

aus *LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR<sup>®</sup> Green I* Reagenziensystem (Roche)

### 2.10.3 Reagenziensysteme

RNA-Isolierung

*RNeasy Mini Kit* (Quiagen)

*TriReagent* (Ambion)

Reverse Transkription

*1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche)

DNA-Reinigung

*QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen)

### 2.10.4 Sonstige Reagenzien

RNA-Isolierung

Hefe t-RNA

DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1 % DEPC; Inkubation über Nacht bei 37 °C, unter Rühren, danach zweimalige Autoklavierung)

Reverse Transkription

dNTP-Mix 10 mM (Invitrogen)

Ribonuklease-Inhibitor *RNasin Ribonuclease Inhibitor* (Promega)

0,1 M DTT (Invitrogen)

5 x 1<sup>st</sup> strand buffer (Invitrogen)

H<sub>2</sub>O PCR-grade (Roche)

### PCR

10 x PCR Puffer (Amersham Biosciences)

dNTP-Mix 10mM (Invitrogen)

### Quantitative PCR am LightCycler<sup>®</sup>

LightCycler<sup>®</sup> FastStart Reaction Mix (Roche)

MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) 25 mM (Roche)

H<sub>2</sub>O PCR-grade (Roche)

### DNA-Agarosegelelektrophorese

ReadyLoad 100 bp und 1000bp DNA ladder Fragmentlängenstandard (Invitrogen)

Agarose (Invitrogen)

1 x TAE-Puffer: 10 x TAE-Puffer (Invitrogen) in A. dest.

6x Auftragspuffer: 0,5% Bromphenolblau, 30% Glycerin in 1 x TAE

## 2.11 Personen- und Herstellerverzeichnis

<b>Person/Hersteller</b>	<b>Institut/Sitz</b>
AEG	Nürnberg
Autoimmun Diagnostika GmbH	Strassberg
Ambion	Austin, Texas, USA
Amersham Biosciences	Piscataway, NJ, USA
Arnold, Günther J.	Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
ATCC	Rockville, Maryland, USA
Atomic Energy of Canada Ltd.	Ottawa, Ontario
Barnstead	Dubuque, Iowa, USA
Beckmann Coulter/ Immunotech	Palo Alto, Kalifornien, USA
Becton Dickinson Biosciences	Jersey City, New Jersey, USA
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Richmond, Kalifornien, USA
Biozol	Eching
Biozym	Hess. Oldendorf
Cambrex	East Rutherford, New Jersey, USA
Cetus	Emeryville, Kalifornien, USA

## MATERIAL

---

Difco Laboratories	Detroit, Michigan, USA
Dunn Labortechnik	Asbach
Eppendorf	Hamburg
Essex Pharma	München
Falcon	Oxnard, Kalifornien, USA
Fröhlich, Thomas	Genzentrum der LMU München
Gänsbacher, Bernd	Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität, München
Greiner	Nürtingen
Heraeus	Hanau
Hirschmann	Unterhaching
IKA Labortechnik	Staufen
Invitrogen/ Life Technologies	Karlsruhe
Julabo	Seelbach
Leica	Wetzlar
Liebherr	Biberach an der Riss
Mabtech	Nacka, Schweden
Menzel-Gläser	Braunschweig
Merck	Darmstadt
Messer Griesheim	Krefeld
Millipore	Bedford, Massachusetts, USA
Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach
MJ Research	Watertown, Massachusetts, USA
Nalgene	Rochester, New York, USA
NEN	Allston, Massachusetts, USA
Nunc	Naperville, USA
Pohla, Heike	Klinische Kooperationsgruppe „Immuntherapien urologischer Tumoren“, Labor für Tumorimmunologie der LMU, München
Quiagen	Chatsworth, Kalifornien, USA
Promega	Madison, Wisconsin, USA
R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
Roche	Mannheim
Sartorius	Göttingen
Schleicher und Schüll	Dassel
Semperit	Wien, Österreich

## MATERIAL

---

Sequiserve	Vaterstetten
Sigma	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Ahrensburg
TPP	Trasadingen, Schweiz
TRION Research GmbH	Martinsried
Wilex	München
WTW	Weilheim

## 3. Methoden

### 3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

#### 3.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Alle Arbeiten mit Blutproben bzw. isolierten vitalen Zellen wurden an einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Lösungen vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Die Isolierung von PBMCs erfolgte aus heparinisiertem venösen Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde das Blut unmittelbar nach der Blutentnahme im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und in 30 ml Portionen über 15 ml Ficoll-Lösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach anschließender Zentrifugation von 25 min bei 2000 U/min (840 g) ohne Bremse sanken die dichteren Erythrozyten als Pellet zu Boden, während sich die PBMCs in der Interphase zwischen Ficoll (mittlere Schicht) und Blutplasma (oberste Schicht) ansammelten und somit leicht mit einer sterilen Pipette in ein neues Gefäß überführt und zweimal in PBS gewaschen werden konnten. Hierfür wurde die Suspension bei 1900 U/min 12 min lang zentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen und das Zellpellet nach Aufschütteln in PBS oder RPMI III resuspendiert.

Die mit dieser Methode gewonnenen Zellen wurden schließlich gezählt und für spätere Versuche eingefroren bzw. sofort weiterverarbeitet.

#### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden 20 µl der Zellsuspension mit demselben Volumen Trypanblau vermischt. Dieser Farbstoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während tote Zellen dunkelblau gefärbt werden. Nach Auftragen des Gemisches auf die Zählkammer, konnten die lebenden Zellen in allen vier Großquadranten des Hämazytometers ausgezählt und der Mittelwert M gebildet werden. Die Zellzahl pro ml Suspension kann mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = M \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

#### 3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff muss dem Medium ein Gefrierschutzmittel zugesetzt werden, das die Zerstörung der Zellen durch Kristallisation

des intrazellulären Wassers verhindert. Dimethylsulfoxid (DMSO) kann zwar die Kristallbildung verhindern, allerdings muss der Einfriervorgang zügig und auf Eis durchgeführt werden, da DMSO auf stoffwechselaktive Zellen toxisch wirkt.

Die einzufrierenden Zellen wurden nach Zentrifugation in kaltem FCS resuspendiert. Anschließend wurde die gleiche Menge an kaltem *Einfriermedium* langsam hinzuge tropft und 1 ml-Aliquots zunächst bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Frühestens 24 Stunden später wurden die Ampullen zur Langzeitlagerung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ °C}$ ) überführt.

### **3.1.4 Auftauen von Zellen**

Aus dem Stickstofftank entnommene Ampullen wurden durch vorsichtiges Schütteln bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad soweit aufgetaut, bis nur noch ein erbsengroßes Eisstück zu sehen war. Die Zellen wurden jeweils in ein mit 2 ml RPMI III gefülltes Zentrifugenröhrchen transferiert, in das nach einer Minute weitere 8 ml RPMI III getropft wurden. Nachdem die Röhrchen sofort bei 540 g für 5 min zentrifugiert wurden, schloss sich die erneute Zählung der Zellen und ein weiterer Waschschrift (8 min bei 540 g) an, bevor die Zellen abhängig von ihrer weiteren Verwendung im dafür notwendigen Medium resuspendiert wurden.

### **3.1.5 Kultivierung und Passagierung adhärenter Tumorzellen**

Die Kultivierung der LNCaP Zelllinien erfolgte in einer mittelgroßen Kulturflasche ( $75\text{ cm}^2$  Adhärenzfläche) mit 10 ml Selektionsmedium bzw. in einer kleinen Kulturflasche ( $25\text{ cm}^2$  Fläche) mit 7 ml Medium. Alle 3-4 Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ausgetauscht.

Bei  $>80\%$  Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen auf zwei neue Kulturflaschen verteilt. Hiefür wurde das gesamte Medium vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit PBS ab gespült, um Reste des FCS zu entfernen, welches das zur Ablösung notwendige Trypsin inhibieren würde. Anschließend ließ man  $10\text{ }\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Zellfläche Trypsin-EDTA (1x) für zwei bis fünf Minuten auf die adhären ten Zellen einwirken, bevor die Reaktion durch Zugabe von Selektionsmedium unterbrochen wurde. Die Suspension wurde auf die neuen Kulturflaschen verteilt und mit frischem Medium ergänzt.

### **3.1.6 Isolierung und Kultivierung von gewebeinfiltrierenden Lymphozyten**

Gewebeinfiltrierende Lymphozyten wurden durch die Methode des „Auswanderns“ aus Haut- und Tumorproben gewonnen. Die aus dem Klinikum rechts der Isar erhaltenen Gewebeproben wurden zerkleinert, auf die Löcher einer 24-Loch-Platte verteilt und mit TIL-Medium unter Zusatz von 50-100 U/ml IL-2 kultiviert. Um ein Austrocknen der Löcher

und Kontaminationen zu vermeiden wurden die randständigen Löcher (*wells*) der Platte mit PBS gefüllt. Teilweise wurde zur Unterstützung der Auswanderung aus Tumorgewebe einmalig 20 ng bispezifischer Antikörper (*removab*<sup>®</sup>) zugegeben.

Je nach Bedarf wurde alle zwei bis vier Tage ein 50 %iger Mediumwechsel durchgeführt. Bei dichtem Zellrasen wurden die Zellen mit einer Pipette im Medium resuspendiert und auf zwei *wells* verteilt oder für weitere Versuche geerntet.

### 3.1.7 Stimulation von PBMC/TIL mit der Vakzinezelllinie

Für die tumorzellspezifische Stimulation von PBMC mit der Vakzinezelllinie wurden  $3,5 \times 10^4$  Tumorzellen pro *well* in einer 24-*well*-Platte ausgesät und im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Bestrahlung mit 100 Gy am darauffolgenden Tag wurden pro *well*  $5,0 \times 10^5$  PBMC des Spenders bzw. ebenso viele TIL der Gewebeprobe von P109 in Kompletmedium mit bzw. ohne 20 ng bispezifischem Antikörper aufgenommen und anschließend auf die bestrahlten Tumorzellen pipettiert. Am nächsten Tag wurden pro *well* 75 U IL-2 pro ml Medium hinzugefügt und die Zellansätze für sieben bis zwölf Tage inkubiert.

Im Anschluss an diese Primärstimulation (*Priming*) wurde die gemischte Lymphozyten-/Tumorzell-Kultur (*mixed lymphocyte tumor culture*, MLTC) in gleicher Weise nach unterschiedlichen Zeitintervallen von sieben bis vierzehn Tagen mehrere Male restimuliert. Ein Teil der Zellen wurde jeweils vor erneuter Restimulation gezählt und eingefroren bzw. für Experimente eingesetzt.

## 3.2 Simultane Messung multipler Zytokine (*Multiplexing*)

### 3.2.1 Vorbereitung

Die simultane Messung mehrerer Zytokine (*Multiplexing*) erfolgte im Zellkulturüberstand und in Patientensera. Dabei kamen zwei unterschiedliche Systeme zum Einsatz: das *Bio-Plex-System*<sup>®</sup> von Biorad und der *Cytometric Bead Array*<sup>®</sup> von BD Biosciences.

Die Vorteile des *Multiplexing* gegenüber einem konventionellen ELISA sind folgende:

- es wird nur eine sehr kleine Probe des zu untersuchenden Materials benötigt
- durch die gleichzeitige Durchführung von mehreren Zytokinmessungen ist eine nicht unerhebliche Zeitersparnis zu erreichen. (Übersicht bei Morgan et al., 2004)

Nach unterschiedlich langer Kultivierung (durchschnittlich 14-40 Tage) der Hautbiospiestückchen konnten genügend Lymphozyten geerntet werden, um sie für die Zytokinbestimmung erneut für 24 bzw. 48 Std. mit der Vakzinezelle sowie der parentalen LNCaP-Linie zu stimulieren.

Dazu wurden je 20.000 Vakzinezellen (VZ) in zwei *wells* einer 48-Loch-Platte ausgesät und mit 100 Gy bestrahlt. Am nächsten Tag wurden jeweils 185.000 TIL in 0.6 ml TIL-Medium nach folgendem Schema dazugegeben:

Well	1	2	3	4
	VZ + TIL	VZ alleine	TIL alleine	Medium alleine

Nach 24 und 48 Std. wurden 100 µl des Überstandes pro *well* abgenommen und zur Zytokinmessung weggefroren.

Für die Zytokinbestimmung im Serum wurden Serumproben von den Patienten P105, 108, 109, 113, 118 und 125 aus dem Klinikum Rechts der Isar zur Verfügung gestellt.

### 3.2.2 Prinzip der Zytokinmessung mit dem *Bio-Plex*<sup>®</sup>-Gerät

Die simultane Bestimmung mehrerer Zytokine wurde mit Hilfe des *Bio-Plex*<sup>®</sup>-Gerätes durchgeführt.

Bei dieser Methode werden kleine fluoreszierende Kügelchen eingesetzt, die an definierte Antikörper gegen bestimmte Zytokine gebunden sind. Die Unterscheidung der Antikörper und damit der Zytokine ist sichergestellt, indem die Kügelchen in jeweils verschiedenen Verhältnissen mit roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sind (siehe Abbildung 3.1)

Die im ersten Schritt an die Antikörper gebundenen Zytokine werden anschließend an einem anderen Epitop mit einem Biotin-markierten Detektionsantikörper markiert und können somit über die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Avidin an Biotin photometrisch quantifiziert werden. Durch simultane Messung von Standardkonzentrationen jedes Zytokins erhält man Standardkurven, die die Angabe von absoluten Werten ermöglichen.

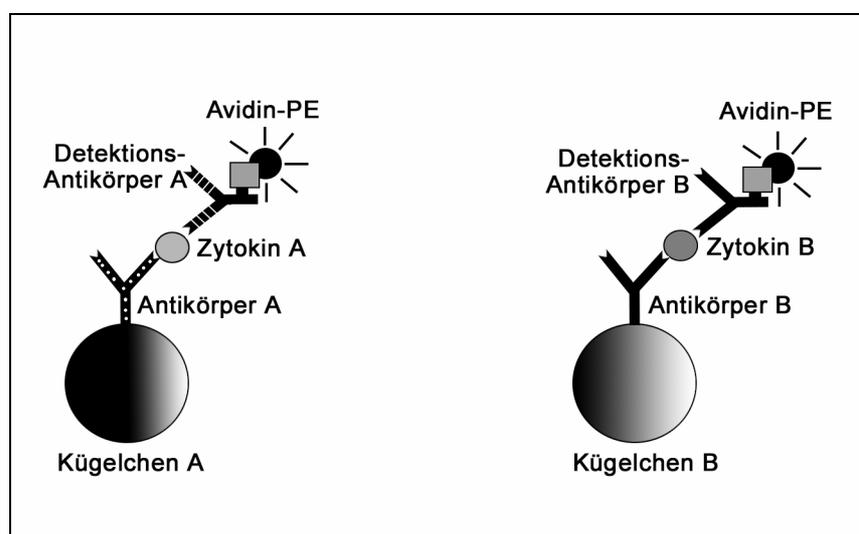


Abbildung 3.1: Prinzip des *Bio-Plex*<sup>®</sup>-Zytokin-Assays.

### 3.2.2.1 Durchführung

Die Durchführung erfolgte mittels des Reagenziensystems der Firma Bio-Rad (siehe 2.9.1).

Zuerst wurden lyophilisierte Zytokinstandards (je 25 ng) in jeweils 50 µl A. dest. resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe von 16000, 4000, 1000, 250, 62,5, 15,6, 3,9 und 0,9 pg/ml durch Zugabe von RPMI III zu den Standards erstellt.

Für die Mischung der verschiedenen Kügelchen wurde ein Bedarf von 2 µl pro Kügelchen und Probe errechnet. Nach Verdünnung dieses Ansatzes mit *Assay Buffer A* stand für jede Probe 50 µl Lösung zur Verfügung.

Anschließend wurde eine 96-*well-Bio-Plex-MCV*-Platte mit 100 µl *Assay Diluent A* pro *well* gewaschen und die Flüssigkeit mit Hilfe eines Vakuum-Absaugegerätes durch die Filter am Plattenboden abgesaugt. 50 µl der gemischten Kügelchen wurden daraufhin in die benötigten *wells* pipettiert. Die Größe der Kügelchen ist so gewählt worden, dass sie bei den folgenden Wasch- und Absaugschritten nicht durch die Filter rutschen, sondern in der Platte bleiben. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl *Wash Buffer A* wurden jeweils 50 µl der Standardverdünnungen bzw. der Zellkulturüberstände/Serumproben aufgetragen. Als Kontrollen wurden jeweils Zellkulturmedium ohne Zellen bzw. *Serumdiluent* eingesetzt. Anschließend wurde die mit Klebefolie bedeckte und Aluminiumfolie umwickelte Platte 30 min lang bei 300 U/min und Raumtemperatur auf einem Schüttler geschwenkt. Währenddessen wurden die verschiedenen Detektionsantikörper gemischt und 1:50 in *AB-Diluent* verdünnt. Im Anschluss an drei Waschvorgänge mit *Wash Buffer A* wurde pro *well* ein Volumen von 25 µl des Antikörpergemisches aufgetragen. Nach erneuter Vermischung auf dem Schüttler und dreimaliger Waschung wurden in jedes *well* 50 µl der inzwischen in *AB-Diluent* auf 1:100 verdünnten Streptavidin-PE-Moleküle pipettiert. Die Platten wurden erneut abgeklebt, umwickelt und 10 min lang geschüttelt, bevor sie wiederum dreimal gewaschen wurden. In einem letzten Schritt wurden jeweils 125 µl *Assay Buffer A* zugegeben und die Platten zum Schutz vor Licht erneut mit Aluminiumfolie umwickelt.

Unmittelbar vor der Messung erfolgte die Kalibrierung des *Bio-Plex*<sup>®</sup>-Geräts mithilfe des *Bio-Plex Calibrite Kit* und die Lokalisationsangabe der Standards auf der Platte. Die Messung aller Proben wird daraufhin automatisiert vom Gerät durchgeführt.

### 3.2.2.2 Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der jeweiligen Zytokine wurden von der Software automatisch berechnet. Dabei war es jedoch möglich den Bereich der Kurven durch das Streichen einzelner Proben zu verringern, wenn diese bei zu hoher oder zu geringer

Konzentration vom Gerät nicht korrekt gemessen werden konnten. Die so generierten Standardkurven wurden zur Berechnung der jeweiligen Zytokinkonzentrationen in den einzelnen Proben verwendet. Dabei wurden nur solche Proben als auswertbar betrachtet, deren Konzentrationen im Bereich der gemessenen und berechneten Standards lagen.

### **3.2.3 Prinzip der Zytokinmessung mit Hilfe des *CBA Kit***

Das Prinzip dieser Methode ähnelt sehr dem vorher beschriebenen System: auch hier binden fluoreszierende Kügelchen mit Hilfe spezieller Antikörper unterschiedliche Zytokine und auch hier wird die Unterscheidung der jeweiligen Zytokine bei gleichzeitiger Messung über eine Variation der Fluoreszenzintensität der Kügelchen ermöglicht. Ebenso wird die Quantifizierung durch den Vergleich mit Standardverdünnungen vorgenommen. Die Messung findet allerdings in einem auch für Zellen verwendbaren Durchflusszytometer statt.

Zur Messung der Zytokine im Kulturüberstand der aus der Hautbiopsie von P113 ausgewanderten und mit der Vakzinezelle stimulierten Lymphozyten wurde das *Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit* von BD verwendet. Es erlaubt die simultane Messung von insgesamt 6 Zytokinen (IL-2, -4, -5, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und wurde analog dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zusammengefasst wurde dabei in einem ersten Schritt die für die Quantifizierung notwendige Verdünnungsreihe mit Hilfe des *Assay Diluent* hergestellt. Pro Ansatz wurden anschließend je 10  $\mu$ l der verschiedenen Zytokinbindenden Kügelchen vermischt und davon je 50  $\mu$ l auf die Reaktionsgefäße verteilt. Es erfolgte die Zugabe von je 50  $\mu$ l des detektierenden Antikörperreagens (*PE Detection Reagent*) und je 50  $\mu$ l der Standardverdünnungen bzw. der Kulturüberstände von Patient P113. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei Raumtemperatur und einmaligem Waschen konnten die Proben in einem Durchflusszytometer nach entsprechender Kalibrierung unter Zuhilfenahme der mitgelieferten *Setup Beads* und Positivkontrollen analysiert werden.

Bei den Analysen der Zellen aus den späteren Hautbiopsien der Patienten P182 und 184 und der Sera wurde der später kommerziell erhältliche *Bio-Plex*-Assay eingesetzt, mit dem 17 Zytokine simultan gemessen werden konnten.

## **3.3 Methoden der Molekularbiologie**

### **3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte verdünnter Lösungen bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) am Photometer gemessen.

Die Methode gründet sich auf der Proportionalität von Konzentration und Extinktion einer Lösung, dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Allgemein errechnet sich die Nukleinsäurekonzentration aus dem Produkt der gemessenen Extinktion (OD) bei 260 nm, der Verdünnung und einem spezifischen Faktor: Nukleinsäurekonzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor}$

Die als „Faktor“ bezeichnete Größe hat den Wert 26  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  für RNA und 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  für dsDNA. Um die Reinheit einer Probe bewerten zu können, bestimmt man zusätzlich die Konzentration der Proteine in der Probe bei 280 nm und anschließend den Quotienten aus  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$ , der für reine RNA 2,0 und für reine DNA 1,8 beträgt. Von einer qualitativ guten Isolierung kann man ab einem Wert von 1,5 sprechen.

### 3.3.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus vitalen Zellen kamen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: Bei einer Präparation aus weniger als  $1 \times 10^6$  Zellen wurde das *TriReagent* System der Firma Biozol benutzt, andernfalls das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen. Die so gewonnene RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung (siehe 3.3.1) bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Arbeit mit RNA wurden gesonderte Pipetten, Pipettenspitzen, und Reaktionsgefäße verwendet. Wässrige Lösungen wurden 12 Std. lang mit 0,1 %igem DEPC inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert.

#### 3.3.2.1 TriReagent Methode

Mit Hilfe des *TriReagent*-Reagens, das Phenol und Guanidin-Iso-Thiocyanat enthält, ist eine Auftrennung der Zellbestandteile in RNA, DNA und Proteine möglich.

In PBS gelöste Zellen wurden sedimentiert, die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 0,2 ml *TriReagent* durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Da für diese Methode weniger als  $1 \times 10^6$  Zellen zur Verfügung standen, wurden zur Verbesserung der RNA-Sedimentation zusätzlich 2  $\mu\text{l}$  Hefe tRNA (Konzentration: 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) als Trägermatrix zugegeben. Durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  Chloroform, nachfolgendem Vortexen für 15 sec, 5-10minütiger Lagerung auf Eis und Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  kommt es zur Separation der RNA von Proteinen und DNA, die sich in der Interphase bzw. roten organischen Phase ansammeln. Die obere, farblose Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNA durch nachfolgende Schritte präzipitiert. Dazu wurde nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol die Probe gut gemischt, 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin erneut bei 12.000 g zentrifugiert (8 min). Nach vorsichtigem Absaugen des Überstands wurde das weißliche RNA-Pellet durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  75 %igem Ethanol von Salzen gereinigt, die

nachfolgende reverse Transkriptionsreaktion stören könnten. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei 12.000 g für 5 min wurden 30 µl DEPC-Wasser zugegeben und das Reaktionsgefäß bei 60 °C 10 min lang inkubiert, um das RNA-Präzipitat wieder in Lösung zu bringen.

### 3.3.2.2 RNeasy Kit

Die RNA-Isolierung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Eluierung der RNA aus den Säulen erfolgte mit 30 µl des mitgelieferten RNase-freien Wassers.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Auch hier kamen zwei unterschiedliche Systeme zur Anwendung: für die Standard-PCR wurden ausschließlich spezifische Oligonukleotide als *Primer* und das Enzym *Superscript II* benutzt, für die *Real-time* Quantifizierung am *LightCycler* hingegen *Random Primer* p(dN)<sub>6</sub> und das Enzym *AMV* von Roche.

Wenn nicht anders angegeben wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt.

Die gewonnene cDNA wurde bis zum Verbrauch bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.3.1 Superscript System

Der Vorteil eines spezifischen *Primings* besteht in der Möglichkeit aus einer Population von mRNA-Molekülen nur bestimmte mRNAs in cDNA kopieren zu können, mit der Folge einer spezifischeren Amplifikation in der anschließenden PCR. Allerdings wird in Kauf genommen, dass nur ein cDNA-Fragment entsteht.

Im ersten Schritt, der Zerstörung der Tertiärstruktur der RNA mit nachfolgendem *Primer-Annealing*, wurden 2 µl des TCRα- (CαST) bzw. TCRβ-spezifischen *Primer* (CβST) mit 2 µg RNA in einem 10 µl-Reaktionsvolumen bei 70 °C 10 min lang inkubiert. Nachfolgend wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

1 µl *RNase-Inhibitor* (Promega)

14 µl *5x Puffer*

3,5 µl *DTT* (0,1M)

3,5 µl *dNTP-Mix* (Konzentration der Desoxynukleotide jeweils 10 mM)

2,8 µl *Superscript II*

33,2 µl *DEPC-H<sub>2</sub>O*

Die reverse Transkriptionsreaktion erfolgte in einem *Thermozykler* bei 42 °C für 70 min mit anschließender Enzyminaktivierung bei 95 °C für 5 min.

### 3.3.3.2 AMV Reverse Transkriptase System

Die reverse Transkription wurde mit sog. *Random Primer* p(dN)<sub>6</sub> entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Diese *Primer* binden an unspezifischen Orten entlang des RNA-Stranges.

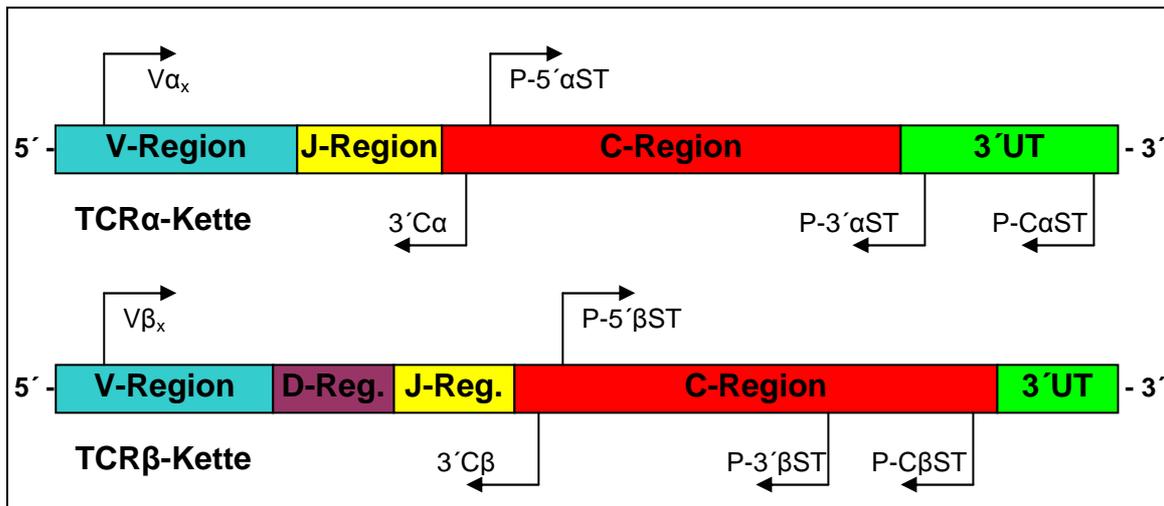
Durch Inkubation bei 25 °C für 10 min kommt es zu einer Bindung der *Primer* an die RNA. Die eigentliche cDNA-Synthese findet während der anschließenden 60 min bei 42 °C statt. Eine Denaturierung des Enzyms wurde durch 5-minütige Inkubation bei 99 °C erreicht.

### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das TCR-Repertoire wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durch die selektive Amplifikation von spezifischen TCR-Nukleinsäuresequenzen untersucht. Dabei repräsentieren die 5'-*Primer* 32 bzw. 25 Familien der variablen Region der TCR- $\alpha$ - bzw. TCR- $\beta$ -Kette des Menschen. Die Familien V $\alpha$ 1, 2, 4, 7, 8, 14 und V $\beta$ 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 19, 21 werden jeweils in zwei oder mehrere Unterfamilien aufgeteilt (Nomenklatur aus Arden et al., 1995).

Bei der Auswahl der 5'-*Primer* wurde darauf geachtet, dass diese jeweils nur in einer der 34 V $\alpha$ - bzw. 32 V $\beta$ -Familien/Unterfamilien spezifisch binden. Durch die Bindung des 3'-*Primer* im 5'-Bereich der konstanten Region der TCR-Ketten wurde eine Amplifikation von DNA-Fragmente der rearrangierten V $\alpha$ - bzw. V $\beta$ -Ketten erreicht, die Teile der V- und C-Region und die sich dazwischen befindlichen D- und J-Regionen enthalten (siehe Abbildung 3.2) (Nomenklatur für D- und J-Regionen entsprechend Koop et al., 1994 bzw. Toyonaga et al., 1985). Dieser Bereich enthält außerdem die CDR-3-Region, die für die Antigenbindungsstelle des TCR kodiert.

Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz, der alle Reagenzien inkl. aller *Primer* ohne cDNA enthielt. Ein Nukleinsäurefragment aus der konstanten Kette der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -TCR-Kette, das von allen T-Zellen exprimiert wird, wurde als interne positive Kontrolle gewählt und eine Koamplifikation dieses Fragments durchgeführt. Abweichungen der Proben untereinander bezüglich der eingesetzten cDNA-Menge, der Amplifikationseffizienz und der Auftragsmenge auf das Gel konnten damit aufgedeckt werden.



**Abbildung 3.2:** schematische Darstellung der Primerbindungsstelle  
*Primer* für Amplifikation der V-, (D)-, J-spezifischen Sequenzen: 3'Ca bzw. 3'Cb = 3' *Primer*,  
 Va<sub>x</sub> bzw. Vβ<sub>x</sub> = V-Gensegment-familienspezifischer 5' *Primer*,  
*Primer* für die Amplifikation der internen Kontrolle: P-5'αST bzw. P-5'βST = 5' *Primer*,  
 P-3'αST bzw. P-3'βST = 3' *Primer*  
*Primer* für die reverse Transkription: P-CαST bzw. P-CβST

Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Reagenzien auf Eis zur angegebenen Endkonzentration pipettiert (angegeben für TCRα):

- |                     |   |
|---------------------|---|
| 1,5 µl cDNS         | 1x PCR-Puffer                                     |
| 0,8 µl dNTP (10 mM) | 2,8 µl P-3' und 5'αST (interne Kontrolle)(2,5 pM) |
| 4,0 µl 3'TCa (5 pM) | 6,0 µl V-familienspezifischer Primer (2,5 pM)     |
| 2 U Taq-Polymerase  | 17,7 µl H <sub>2</sub> O                          |

Zur Durchführung mehrerer Ansätze mit der gleichen DNA-Probe wurden zuerst alle o.g. Komponenten bis auf die V-familienspezifischen *Primer* in einem sog. *Mastermix* (Hauptansatz) gemischt und dann auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die Amplifikation gewählt:

Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C
Amplifikation (35 Zyklen)	30 Sek. bei 95 °C (DNA-Denaturierung)
	1 min bei 56°C (Primerbindung, sog. „ <i>Annealing</i> “)
	1 min 72 °C (Synthese des Doppelstrangs)
Endpolymerisation	10 min bei 72 °C

Die Proben wurden anschließend auf einem Agarosegel auf die Anwesenheit der spezifischen TCR-Fragmente überprüft (siehe unter 3.3.6).

### 3.3.5 Quantitative *real-time* PCR mit Hilfe des *LightCycler*<sup>®</sup>-Gerätes

#### 3.3.5.1 Prinzip

Um eine genaue Aussage über die Zunahme der Expression von bestimmten TCR unter Vakzinierung machen zu können, ist eine quantitative Bestimmung der Expression notwendig. Dies gelingt mit den herkömmlichen oben beschriebenen PCR-Systemen nur semiquantitativ anhand der Analyse der Fluoreszenz der Proben in der Gelelektrophorese.

Mit Hilfe des *LightCycler*<sup>®</sup>-Gerätes ist hingegen eine quantitative Bestimmung von spezifischen Nukleotid-Sequenzen in einer Probe möglich.

Erreicht wird dies durch indirekte Messung der Menge an doppelsträngiger DNA während jedes Amplifikationsschrittes. Hierzu wird während jedes Amplifikationsschrittes ein nur in doppelsträngige DNA interkalierender Farbstoff durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt und die Intensität des emittierten Lichts von einer Photozelle gemessen. Da die Lichtemission des Farbstoffes (SYBR<sup>®</sup> Green I Dye) nur in gebundenem Zustand erfolgt, ist die Intensität des emittierten Lichts proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffs und somit der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA. Während der Amplifikationszyklen kann somit bei Vorhandensein einer größeren Zahl von Ausgangskopien ein rasanterer Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden und eine erhöhte Expression des DNA-Fragments abgeleitet werden.

Zur Gewährleistung der Spezifität (z.B. zur Unterscheidung von *Primer*-Dimeren) wird im Anschluss an die Amplifikation eine Analyse der Schmelzkurven vorgenommen. Dabei werden die Proben solange erhitzt bis sie vollständig denaturiert sind und keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden kann. Kurz nach Erreichen der sog. Schmelztemperatur des Produkts (definiert als die Temperatur, bei der 50 % der DNA als Doppelstrang vorliegt) kommt es zu einem raschen Abfall der Fluoreszenz. Unspezifische Amplifikationsprodukte denaturieren schon bei einer niedrigeren Temperatur. Durch Analyse der Schmelzkurven können die einzelnen Fragmente unterschieden und mit der Ausgangssequenz verglichen werden.

#### 3.3.5.2 Durchführung

Die quantitative PCR wurde mit dem Enzym- und Farbstoffsystem *FastStart DNA Master SYBR<sup>®</sup> Green 1* durchgeführt. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch (10 x) aus Puffer, Farbstoff, Nukleotiden, MgCl<sub>2</sub> (10 mM) und Polymerase mit Hilfe zweier definierter Lösungen hergestellt. Die genaue Zusammensetzung beider Lösungen wurde vom Hersteller nicht bekannt gegeben. In vorgekühlten Zentrifugen-Adaptoren wurden

## METHODEN

---

spezifische Primer, Proben-cDNA, H<sub>2</sub>O und das Reaktionsgemisch (RM) in Kapillaren folgendermaßen gemischt:

$\alpha$ -Enolase	Endkonzentration
2 $\mu$ l RM	1 x
0,5 $\mu$ l 5'-Primer	15 pmol
0,5 $\mu$ l 3'-Primer	15 pmol
3,2 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub>	5 mM
2,0 $\mu$ l cDNA	
H <sub>2</sub> O	Ad 20 $\mu$ l

TCR	Endkonzentration
2 $\mu$ l RM	1 x
3 $\mu$ l 5'-V-Primer	7,5 pmol
1 $\mu$ l 3'-J-Primer	10 pmol
2, $\mu$ l MgCl <sub>2</sub>	4 mM
1,0 $\mu$ l cDNA	
H <sub>2</sub> O	Ad 20 $\mu$ l

Die Kapillaren wurden mit beigefügten Deckeln verschlossen und mitsamt der Adaptoren kurz zur Mischung der Reagenzien zentrifugiert.

Die Amplifikation der Sequenzen erfolgte unter folgenden Bedingungen:

### Initiale Denaturierung:

Programmtyp:	regular
Zyklen:	1
Zieltemperatur:	95 °C
Inkubationszeit:	10 min
Temperaturanstieg (°C / Sek.):	20
Fluoreszenzmessung:	keine

### Amplifikation:

Programmtyp:	quantification		
Zyklen:	40		
Zieltemperaturen:	95 °C	60 °C	72 °C
Inkubationszeiten:	keine	10 Sek.	25 Sek.
Temperaturanstiege (°C / Sek.):	20	20	20
Fluoreszenzmessung:	keine	keine	am Ende

### Schmelzkurvenanalyse:

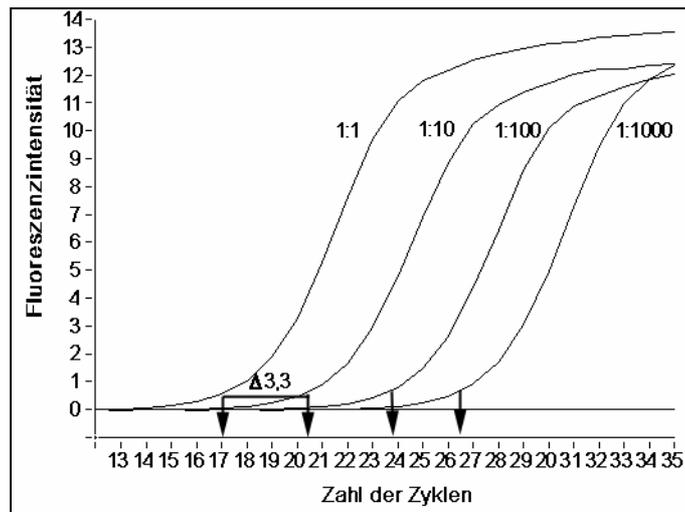
Programmtyp:	melting curve		
Zyklen:	1		
Zieltemperaturen:	95 °C	58 °C	95 °C
Inkubationszeiten:	keine	10 Sek.	keine
Temperaturanstiege (°C / Sek.):	20	20	0,2
Fluoreszenzmessung:	keine	keine	kontinuierlich

Kühlung des Gerätes:

Programmtyp:	regular
Zyklen:	1
Zieltemperatur:	40 °C
Inkubationszeit:	60 Sek.
Temperaturanstieg (°C / Sek.):	20
Fluoreszenzmessung:	keine

3.3.5.3 Auswertung

Die Proben wurden mit der *LightCycler® Data Analysis* Software ausgewertet. Dabei wurde für jede Probe ein Kreuzungspunkt (*crossing point*) definiert, der einen bestimmten PCR-Zyklus markiert. Eine Differenz von n Zyklen zwischen zwei Kreuzungspunkten bedeutet dann einen  $2^n$ -fachen Unterschied zwischen beiden Proben, da sich die Amplifikate in jedem Zyklus verdoppeln. Die Kreuzungspunkte wurden über den Second Derivative Maximum-Algorithmus automatisch von der Software errechnet. Dabei wird der Kreuzungspunkt als erster Wendepunkt der Fluoreszenzkurve definiert (entspricht bei Kurvendiskussionen dem ersten Maximum der zweiten Ableitung). Bei einer höheren Anzahl von Ausgangskopien wird dieser Punkt schneller erreicht als bei einer sehr niedrigen Kopienzahl innerhalb einer Probe. Ein höherer Kreuzungspunkt bedeutet deshalb eine geringere Expression des untersuchten Proteins. Über diesen Punkt konnten die Proben relativ zueinander verglichen werden. In *Abbildung 3.3* ist dieses Prinzip der Auswertung anhand eines Beispiels dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Auswertung über den *Second Derivative Maximum*-Algorithmus. Markiert sind die berechneten Kreuzungspunkte am ersten Umkehrpunkt. Sie lagen bei Zyklus 17, 20.3, 26.7 bzw. 26.5 der verschieden stark verdünnten Proben. Daraus ergab sich die Differenz  $\Delta$  von 3,3 Zyklen zwischen der Probe 1:1 und 1:10. Das entspricht einem 9,8-fachen ( $2^{3,3}$ ) Unterschied zwischen beiden Proben.

Diese Analysemethode wurde zur Auswertung der Ergebnisse gewählt, da sie völlig automatisch abläuft und von mathematischen Kriterien abhängt, die nicht durch willkürliche Einstellungen verändert werden können. Die Differenz  $\Delta$  zwischen den Kreuzungspunkten zweier Proben gibt demnach einen Aufschluss über deren Unterschied in der Expression der jeweiligen Gene.

Die Expression des Haushaltsgens  $\alpha$ -Enolase diente bei allen Analysen als relativer Vergleich zwischen den einzelnen Proben, da angenommen wird, dass dieses Gen von jeder Zelle unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus in gleicher Menge exprimiert wird. Die Anzahl von  $\alpha$ -Enolase-Fragmenten zwischen verschiedenen Proben kann daher als relativer Vergleichswert für die Menge der eingesetzten cDNA gelten. Entsprechend wurde jeweils eine erneute Konzentrationsmessung und ggf. Anpassung der Probenkonzentration vorgenommen.

### **3.3.6 Gelelektrophorese**

Die Nukleinsäuren wurden nach der PCR über ein 2.4 %iges Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wurde die in 1 x TAE angesetzte Agarosesuspension in einem Mikrowellen-Gerät bis zur Auflösung der Schlieren aufgekocht. Nach anschließender Abkühlung auf etwa 50-60 °C wurden 2  $\mu$ l 1 %iges Ethidiumbromid auf 100 ml Volumen zugegeben und die Agaroselösung noch warm auf einen Gelträger gegossen. Nach Erstarrung wurde der Gelträger in die mit Laufpuffer (1xTAE) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. 13  $\mu$ l der Nukleinsäureproben wurden anschließend zusammen mit 2  $\mu$ l des Auftragspuffers in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proben wurde ein definierter Fragmentlängenstandard (1 kb bzw. 100 bp Leiter) aufgetragen.

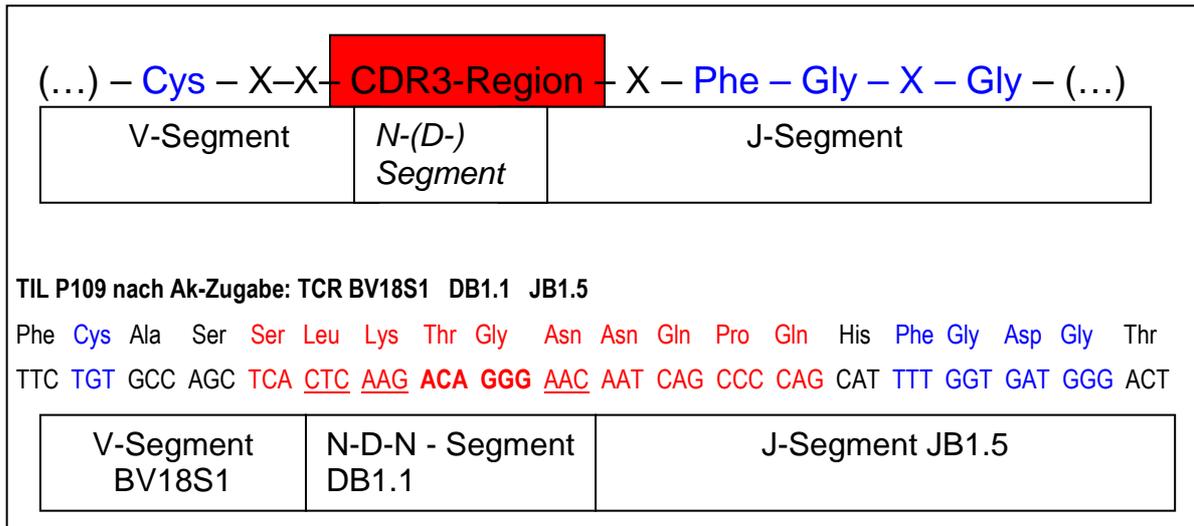
Die Auftrennung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld erfolgte über 90-120 min bei einer maximalen Spannung von 90 Volt. Dabei wanderten die unterschiedlich großen DNS-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode.

Durch das Interkalieren von Ethidiumbromid in DNA-Doppelstränge und dessen Fluoreszenz bei 300 nm konnten die einzelnen Fragmente als Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert werden.

### **3.3.7 DNA-Sequenzanalyse**

Durch Sequenzierung der mittels PCR gewonnen Amplifikate kann die Basenabfolge aller beteiligten TCR-Regionen ermittelt werden.

In Abbildung 3.4 ist schematisch der Sequenzaufbau der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette dargestellt: sie setzen sich aus der V-Region, N-Additionen und der J-Region zusammen, bei der  $\beta$ -Kette ist zusätzlich noch eine D-Region eingefügt.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung der Sequenz der CDR-3- und angrenzenden Regionen am Beispiel der Aminosäuren- und Basensequenz des V $\beta$ 18-Amplifikats der Biopsie von P109  
**Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen; **Fettdruck:** D-Segment  
 Nomenklatur nach Arden et al, 1995; Koop et al., 1994; Toyonaga et al., 1985

Allen V-Genen ist ein konserviertes Cystein an Position 90 gemeinsam, die V-Region der  $\beta$ -Ketten enthält zusätzlich zwei konservierte Serine an Position 92 und 93. Das J-Segment enthält eine konservierte Core-Sequenz, Phenylalanin-Glycin-X-Glycin (X = beliebige Aminosäure). Die CDR3-Schleife beginnt *per definitionem* an der dritten Aminosäure im Anschluss an das konservierte Cystein der V-Gensegmente (Position 93) und endet eine Aminosäure vor dem konservierten Core-Segment der J-Region. Sie setzt sich aus keimbahnkodierten Aminosäuren der V-, J- und bei der  $\beta$ -Kette der D-Region und aus zufällig eingefügten N-Additionen zusammen (insgesamt 5-10 Aminosäuren). Für die klonale Spezifität sind neben gleicher V-, D-, und J-Abschnitte v.a. eine Übereinstimmung in den durch N-Addition eingefügten Basen entscheidend.

Zur Sequenzierung wurden die betreffenden Banden aus dem Agarosegel unter UV-Licht vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine Extraktion der DNA aus dem Gel mittels des *QIAquick Extraction Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zur sich anschließenden Sequenzierung wurden die Gel-Eluat mit den zugehörigen Primern an die Firma *Sequise* in Martinsried geschickt.

### 3.4 ELISPOT

Der ELISPOT-Assay ermöglicht die *ex vivo* Detektion und Quantifizierung antigen- bzw. tumorspezifischer, Zytokin-produzierender T-Zellen. Er eignet sich dadurch u.a. zur Überwachung der Immunantwort im Rahmen von Vakzinierungsstudien.

### 3.4.1 Prinzip

T-Zellen sezernieren als Folge einer Antigenerkennung eine Reihe von Zytokinen.

Über die Quantifizierung z.B. der IFN- $\gamma$ -Produktion von PBMC nach Stimulation mit Tumorantigenen kann eine Aussage über die Frequenz spezifischer T-Zellen auf Einzelzellebene getroffen werden und damit über die Tumorreaktivität der einzelnen T-Zelle. Im Rahmen der Detektion antigenspezifischer T-Zellen hat die Erfassung der IFN- $\gamma$ -Sekretion den Vorteil, dass eine spontane IFN- $\gamma$ -Freisetzung durch naive PBMC meist nicht stattfindet (Schmittel et al., 1997).

Im ersten Schritt des Assays werden 96-*well*-Mikrotiterplatten mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein bestimmtes Zytokin (z.B. IFN- $\gamma$ ) beschichtet. Anschließend werden in diesen *wells* PBMC zusammen mit bestimmten Antigenen über 6-48 Std. inkubiert. Als Reaktion auf die Antigenerkennung werden Zytokine von T-Zellen freigesetzt, die durch den Antikörper am Ort der Entstehung gebunden werden. Nach Entfernung der Zellen können die gebundenen Zytokine in einer zweiten Reaktion mit Hilfe eines Biotin-gekoppelten Antikörpers und einer korrespondierenden Enzym/Substrat-Reaktion sichtbar gemacht werden. Das Resultat besteht aus einer Reihe von farbigen Punkten (*spots*) auf der Mikrotiterplatte, die Zytokin-sezernierende, reaktive T-Zellen repräsentieren und mit Hilfe eines Mikroskops bzw. eines Computer-gestützten Systems ausgezählt werden können. Ein Vergleich der Spotfrequenz mit den pro *well* eingesetzten Zellen erlaubt eine Aussage über die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen.

Die Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Sensitivität (ca. 1:100.000 Zellen) und dem geringen Bedarf an Zellmaterial. Nachteilig wirkt sich aus, dass die eingesetzten Zellen nach Stimulation meist nicht mehr verwendet werden können. Zudem muss man bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen, dass nicht notwendigerweise alle *spots* mit antigenspezifischen T-Zellen korrespondieren, da die Stimulation antigenspezifischer Zellen auch zu einer Aktivierung unbeteiligter Lymphozyten führen kann (sog. *bystander activation*) (Coulie & van der Bruggen, 2003).

### 3.4.2 Durchführung

Für den ELISPOT-Assay wurden bereits mit Antikörper gegen IFN- $\gamma$  beschichtete (sog. *precoated plates*) Mikrotiterplatten der Firma *Mabtech* verwendet. Vor dem Ansetzen der Stimulation wurden die Platten viermal mit sterilem PBS gewaschen, 60 Min. lang bei 37 °C mit *ELISPOT-Medium 1* inkubiert und anschließend erneut mit sterilem PBS gewaschen. Pro *well* wurden 100.000 Patienten-PBMCs mit jeweils einem der unter 2.8 genannten Peptide (verdünnt mit RPMI III auf Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml) in 150  $\mu$ l *ELISPOT-Medium 2* über 24 Std. inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit *PBS-Tween* erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l des zweiten biotinylierten, IFN- $\gamma$ -spezifischen Antikörpers

(IFN- $\gamma$  mAb 7-B6-1, verdünnt in FCS und PBS) und eine Inkubation bei 37 °C über zwei Stunden. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase (Streptavidin-ALP, 1:1000 verdünnt in PBS) nach erneutem Waschen entsteht ein Enzymgekoppelter Antikörper, dessen Bindung an IFN- $\gamma$  in einem letzten Schritt durch fünfminütige Inkubation mit 100  $\mu$ l des Farbstoffsubstrats BCIP/NBT-plus bei Raumtemperatur sichtbar gemacht werden kann (BCIP bewirkt zusätzlich eine Stabilisierung der *spots*). Im Anschluss wurden die Platten mit entionisiertem Wasser gründlich gewaschen, luftgetrocknet und bis zur Analyse im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISPOT-Reader System ELR03, einem computergestützten, automatisierten Analysesystem der Fa. AID Autoimmun Diagnostika. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe der oben aufgeführten Peptide. In Abbildung 3.5 ist das Prinzip des ELISPOT schematisch dargestellt.

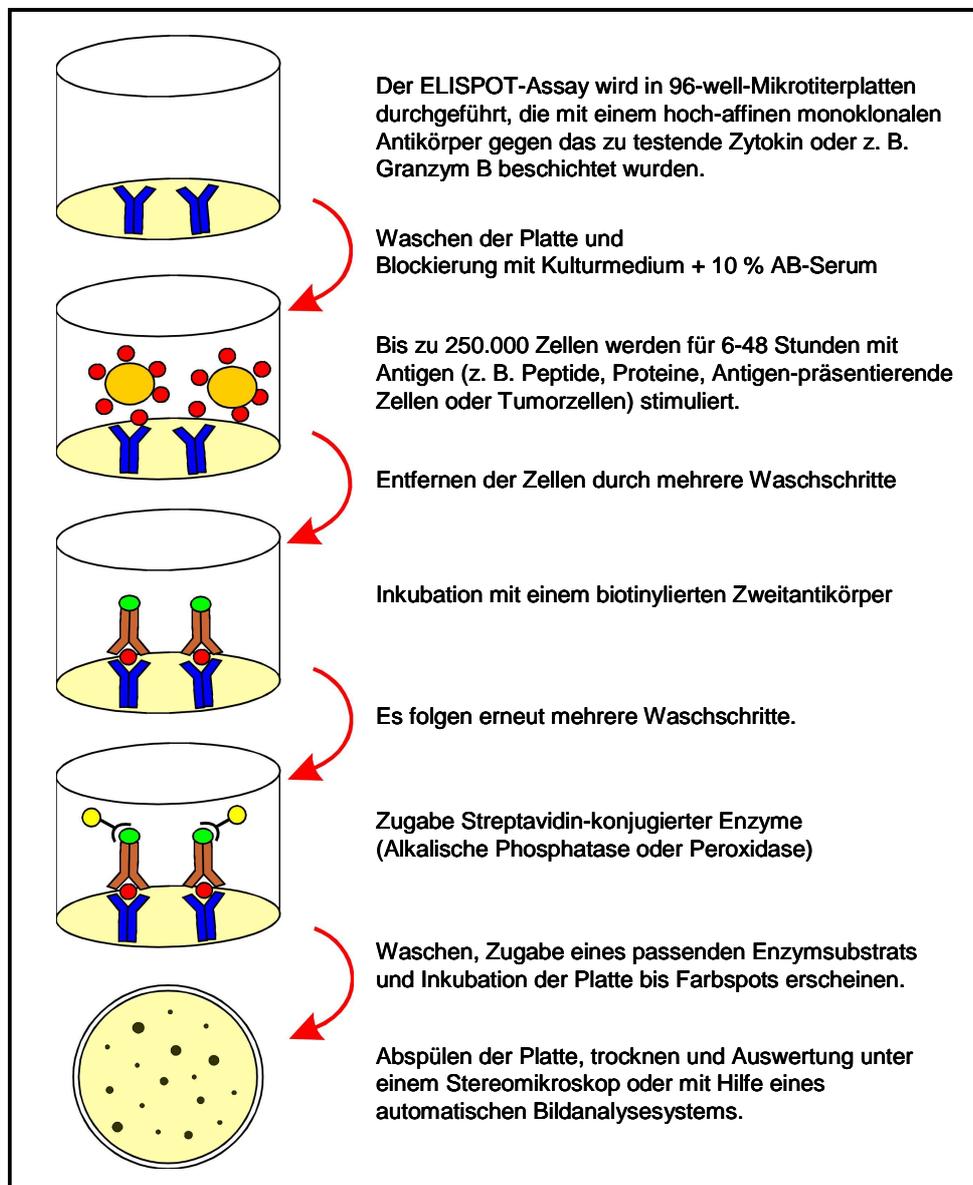


Abbildung 3.5: Prinzip des ELISPOT-Assays

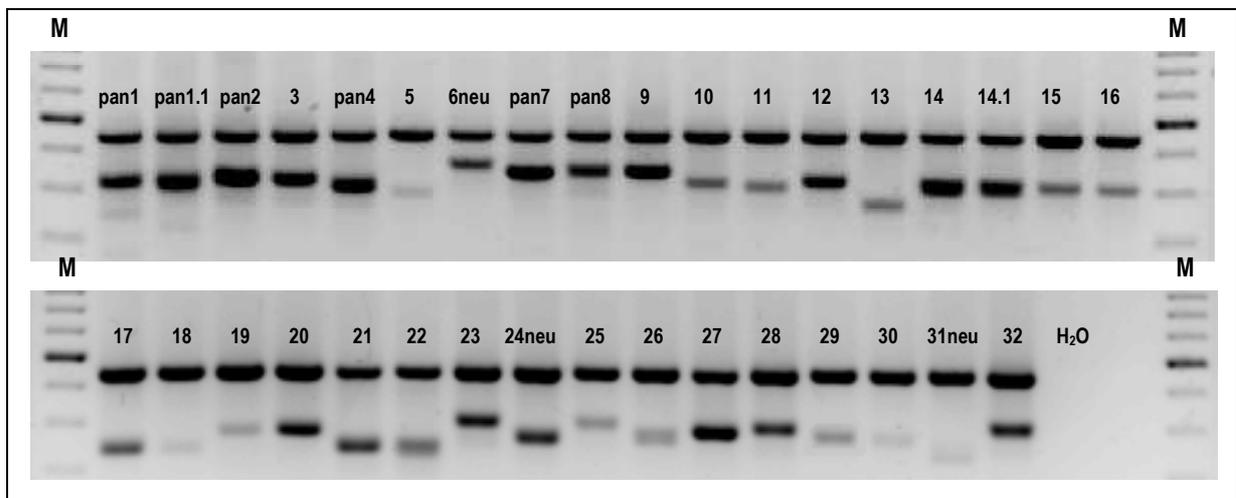
## 4. Ergebnisse

Diese Arbeit fokuzierte sich auf verschiedene Techniken des sog. *immune monitoring* im Rahmen einer zytokinbasierten Genvakzinestudie beim Prostatakarzinom. Dazu wurde das TCR-Repertoire von PBMC nach *in vitro* Stimulation mit der Tumorzellvakine und von T-Zellen an der Vakzinierungsstelle analysiert mit dem Ziel der Identifizierung eines charakteristischen, vakzinespezifischen TCR. Parallel dazu wurde das Ausmaß der Immunantwort auf die Vakzinierung an Hand des Zytokinmusters im Serum der Patienten und an Hand der Reaktivität der T-Zellen der Patienten gegenüber potentiellen HLA-A\*0201 Peptidliganden untersucht.

### 4.1 TCR-Repertoire-Analysen

#### 4.1.1 Amplifikation von TCR mittels familienspezifischer Primer

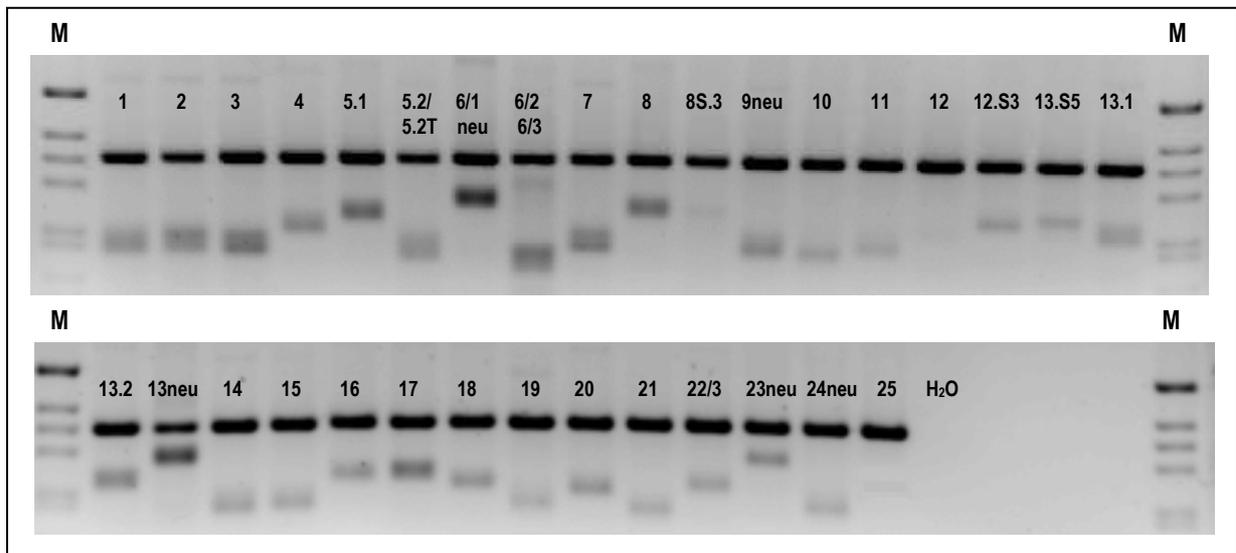
Die erfolgreiche Amplifikation von TCR mittels familienspezifischer TCR-Primer wurde anhand einer PBL-Mischung dreier gesunder Spender (#168, #195 und #148) überprüft. Dabei wurden 34 V $\alpha$ - und 32 V $\beta$ -spezifische Primer verwendet (siehe unter 2.8.1)



**Abbildung 4.1:** TCR $\alpha$ -Repertoire einer PBL-Mischung (Spender #168, #195 und #148), M = DNA-Längenstandard

Abbildung 4.1 und 4.2 zeigen die erfolgreiche Amplifikation aller ausgewählten V $\alpha$  und V $\beta$ - Gensegmentfamilien mittels PCR. Als interne positive Kontrolle diente jeweils ein koamplifiziertes Fragment aus der konstanten Region der TCR $\alpha$ - bzw. - $\beta$ -Kette, das zudem zur Abschätzung der Expressionsstärke der variablen Familien herangezogen werden konnte. Mit Hilfe eines DNA-Längenstandards ließ sich die Anzahl der Basenpaare der amplifizierten Produkte ermitteln, die mit den berechneten und in der Literatur beschriebenen übereinstimmten, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um spezifische Amplifikationsprodukte handeln musste. Bei den folgenden

PCR-Experimenten wurde die Korrektheit des amplifizierten Produkts in gleicher Weise überprüft.



**Abbildung 4.2:** TCR $\beta$ -Repertoire einer PBL-Mischung (Spender #168, #195 und #148)

In beiden Abbildungen sind sowohl für die Kontrollfragmente als auch für die V-Gensegmentfamilien unterschiedlich starke Bandenintensitäten zu beobachten, obwohl in jede Geltasche das gleiche Volumen an PCR-Produkt eingefüllt wurde. Durch den Quotienten aus dem Integral der mittels Densitometer gemessenen Intensität der einzelnen Gensegmentfamilien und der jeweiligen Kontrollfragmente (Diplomarbeit Janzer P.) kann die relative Bandenintensität für jede einzelne variable TCR-Kette berechnet werden. Damit ist eine genauere Bewertung der Expression der jeweiligen Rezeptoren zu erreichen. Da bei den folgenden Experimenten nur eine grobe Einschätzung des Expressionverhalten der einzelnen variablen Gensegmentfamilien notwendig war, wurde auf die Bestimmung der relativen Bandenintensität mittels Densitometrie verzichtet.

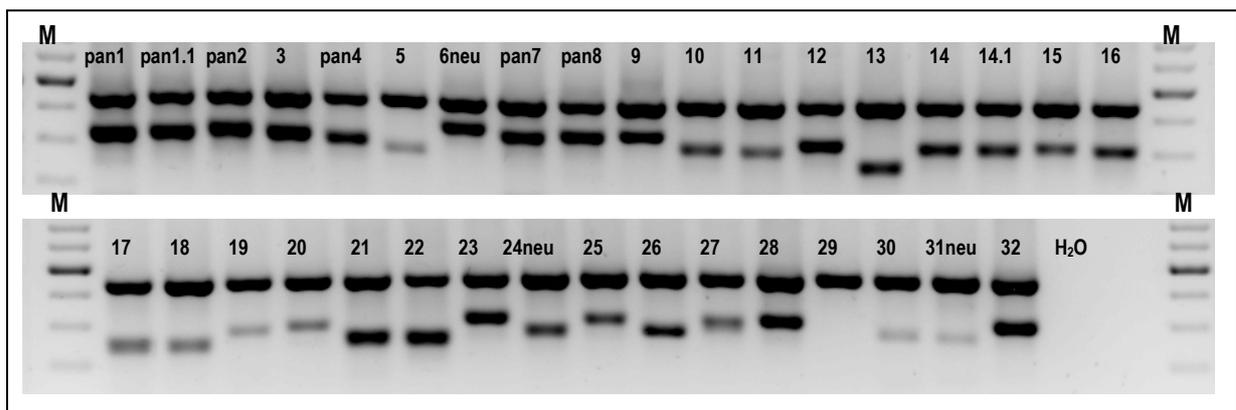
Auffällig waren die bei Verwendung der V $\beta$ -Gensegment-spezifischen Primern wiederholt zu beobachtenden Doppelbanden. Die zweite Bande entsteht dabei v.a. durch Anreicherung von Einzelsträngen infolge einer unausgewogenen Primerkonzentration. Im Folgenden konnte dieses Phänomen allerdings auch durch die Verwendung unterschiedlicher Primerkonzentrationen nicht beseitigt werden.

#### 4.1.2 TCR-Repertoire von PBL

Das TCR-Repertoire der PBL von Patienten bzw. gesunden Spendern stellt die individuelle Ausgangssituation vor *in vitro* Stimulation bzw. *in vivo* Kontakt mit dem Tumor oder der Vakzinezelle dar. Eine Veränderung der TCR-Zusammensetzung oder der Expressionsstärke im Laufe der Stimulierungen muss immer vor dem Hintergrund der Ausgangswerte interpretiert werden. Eine sehr starke oder sehr schwache Darstellung

einzelner Banden auf dem Agarosegel hat *per se* eine nur bedingte Aussagekraft, ist sie doch zum Teil durch die angewandte Methodik mitbedingt. Beispielsweise können optimale Amplifikationsbedingungen nur für einen Teil der variablen Gensegmentfamilien erreicht werden, da nur ein einziges PCR-Reaktionsprogramm für alle Familien zur Anwendung kommt. Erst ein Vergleich mit dem Ausgangsrepertoire erlaubt Rückschlüsse über eine Expressionsveränderung.

Eine TCR-Analyse von PBL aller Spender und Patienten wurde als Interpretationsgrundlage durchgeführt. Exemplarisch ist das TCR $\alpha$ - Repertoire der PBL von Spender #287 in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Kontrollfragmente zeigen dabei untereinander nur geringe Abweichungen. Dagegen sind v.a. bei der  $\alpha$ -Kette deutliche Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen variablen Gensegmentfamilien zu beobachten. Es konnten für fast alle verwendeten Primer spezifische Amplifikate nachgewiesen werden (Ausnahme: V $\alpha$ 29). Dies spiegelt die hohe Diversität der im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten wider. Die TCR-Analysen der übrigen Spender- und Patienten-PBL (#56, P105, P108, P109, P113, P118, P125, P182, P184) fielen ähnlich aus, es konnten jeweils fast alle Gensegmentfamilien amplifiziert werden.



**Abbildung 4.3:** TCR $\alpha$ -Repertoire der PBL von Spender #287

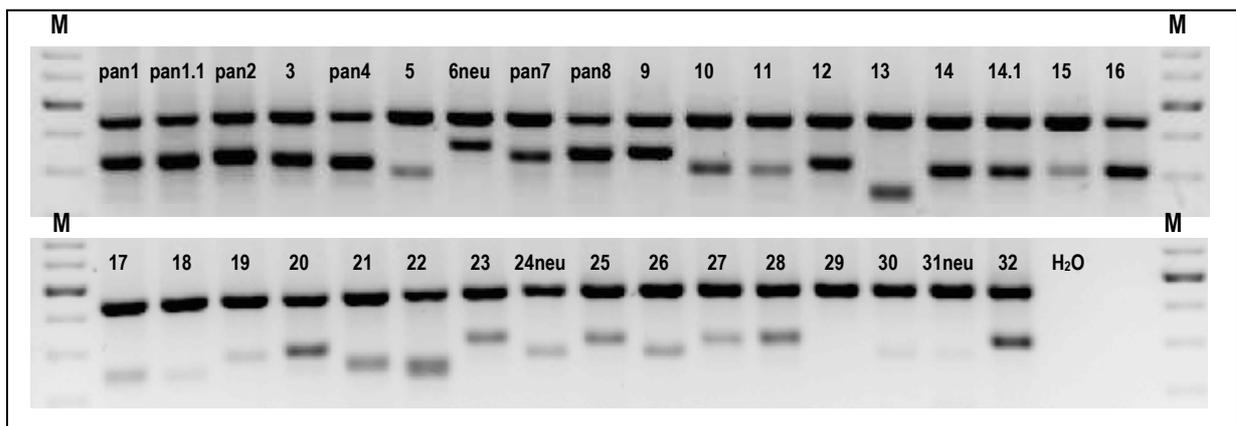
#### 4.1.3 TCR-Repertoire von PBL nach *In-vitro*-Stimulation mit der allogenen Prostatakarzinomvakzine

Die Erkennung allogener HLA-Moleküle bzw. tumorassoziiertes Peptide auf autologen HLA-Molekülen durch T-Zellen führt in einer naiven T-Zellpopulation zu einer Expansion weniger spezifischer T-Zellklone mit definierten TCR. Dies sollte sich in einer Änderung des Expressionsverhalten einiger V-Gensegmentfamilien innerhalb des TCR-Repertoires manifestieren. Da auf einer T-Zelle immer nur ein TCR-Typ exprimiert wird, kann über das TCR-Repertoire auf die Klonalität der Zellpopulation geschlossen werden. Die Entwicklung des Repertoires sollte mit fortschreitender Stimulationszahl verfolgt werden.

## ERGEBNISSE

Hierzu wurden Spender-PBL *in vitro* wie unter 3.1.8 beschrieben mehrmals mit der bestrahlten Vakzinezelllinie stimuliert und das TCR-Repertoire nach jeder Stimulation analysiert. Um tumorspezifische Reaktionen vor allogenen Hintergrund zu ermöglichen wurden zwei Spender ausgewählt, die in Übereinstimmung mit der Vakzinezelllinie HLA-A\*0201-positiv waren. Ein Spender (#56) war zum Zeitpunkt der PBL-Gewinnung an einem metastasierten, hormonrefraktären Prostatakarzinom erkrankt.

Bei den Stimulationen zeigte sich nach anfänglich expansivem Wachstum regelmäßig ein Absterben der T-Zellen nach dem 4. Stimulationszyklus, so dass für Analyse bzw. Restimulationen nicht genügend Zellen zur Verfügung standen. Aufgrund dieser Wachstumsschwierigkeiten wurde zur Unterstützung bei jeder Stimulation der bispezifische, gegen Ep-CAM und CD3 gerichtete Antikörper *removab*<sup>®</sup> hinzugegeben, wodurch eine stärkere Expansion zu erreichen war, die mehr als 10 Restimulationen ermöglichte. Allerdings konnte bei den folgenden TCR-Repertoireanalysen keine Einschränkung bzw. Expressionsveränderung mehr beobachtet werden (Abbildung 4.4).

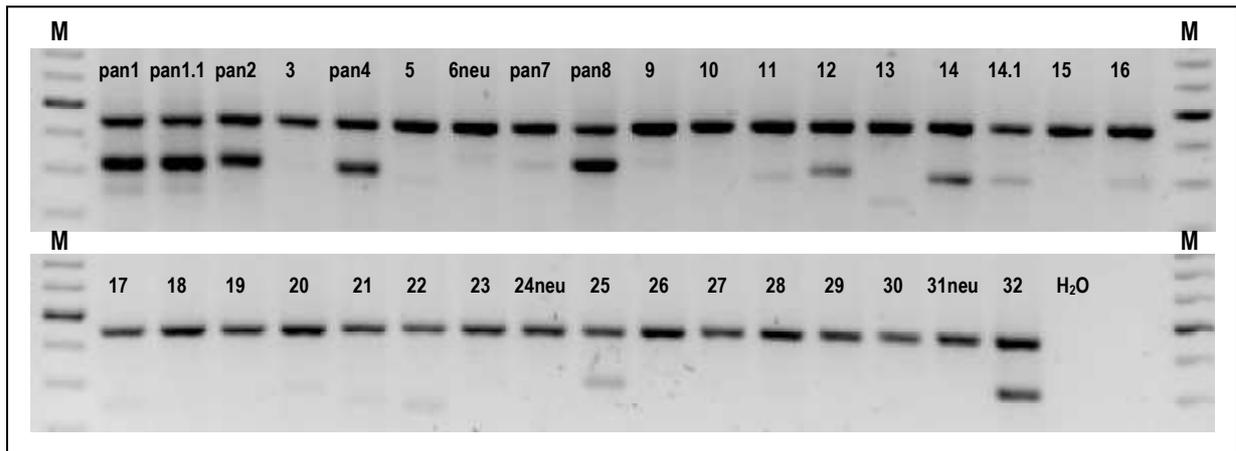


**Abbildung 4.4:** TCR $\alpha$ -Repertoire der PBL von Spender #287 nach acht Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$  unter Zugabe von *removab*<sup>®</sup>

Bei den folgenden Experimenten mit Spender-PBL wurde daher auf die Zugabe des Antikörpers verzichtet.

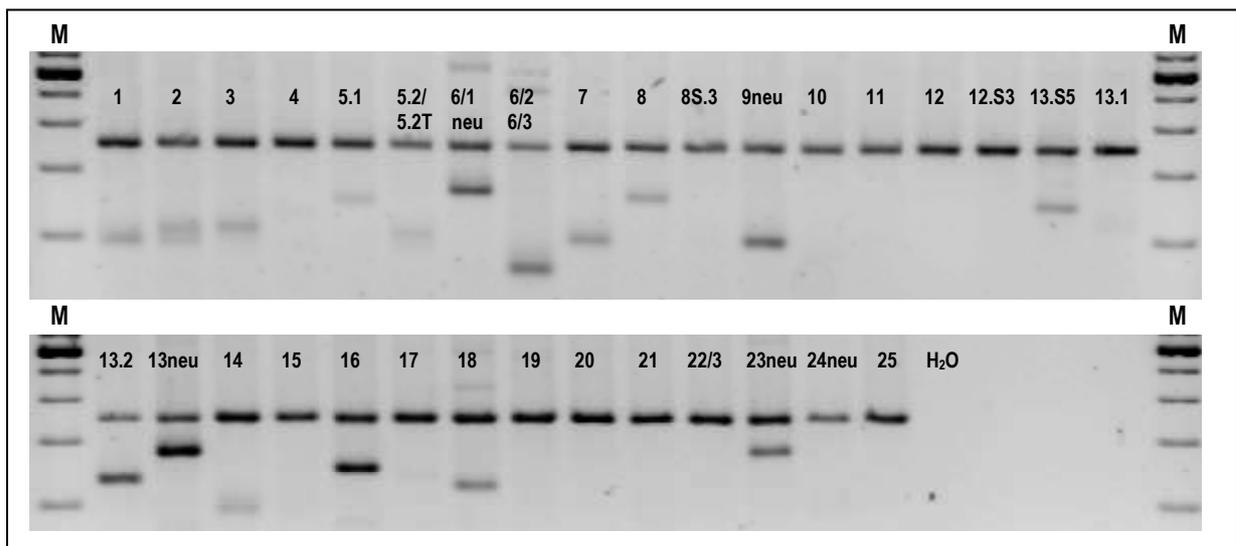
In Abbildung 4.5 ist das Elektrophoreseergebnis für die  $\alpha$ -Kette nach fünf Stimulationen der PBL des Spenders #287 mit der Vakzinezelllinie ohne Antikörperzugabe dargestellt.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.5:** TCR $\alpha$ -Repertoire der PBL von Spender #278 nach fünf Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

Im Vergleich zu dem Ausgangsbefund vor Stimulation sind einige V $\alpha$ -spezifischen Banden nur noch sehr schwach zu erkennen bzw. fehlen vollständig (z.B. V $\alpha$ 15, 27, 28, 30). Ein ähnliches Bild ergab die Analyse der V $\beta$ -Kette desselben Ansatzes (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6:** TCR $\beta$ -Repertoire der PBL von Spender #287 nach fünf Stimulationen mit LNCaP/IL2-/IFN- $\gamma$

Da in jedem Ansatz ein Kontrollfragment von vergleichbarer Intensität amplifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass sich unter den in der Kultur verbleibenden Zellen keine oder nur noch sehr wenige T-Lymphozyten befanden, welche die nicht amplifizierten Gensegmente für das Rearrangement ihres TCRs benutzten.

In Tabelle 4.1 ist eine vergleichende Analyse des V $\alpha$ - und V $\beta$ -Gensegment-Repertoires zwischen den nativen PBL von Spender #278 und den T-Zellen nach fünf Stimulationen gezeigt.

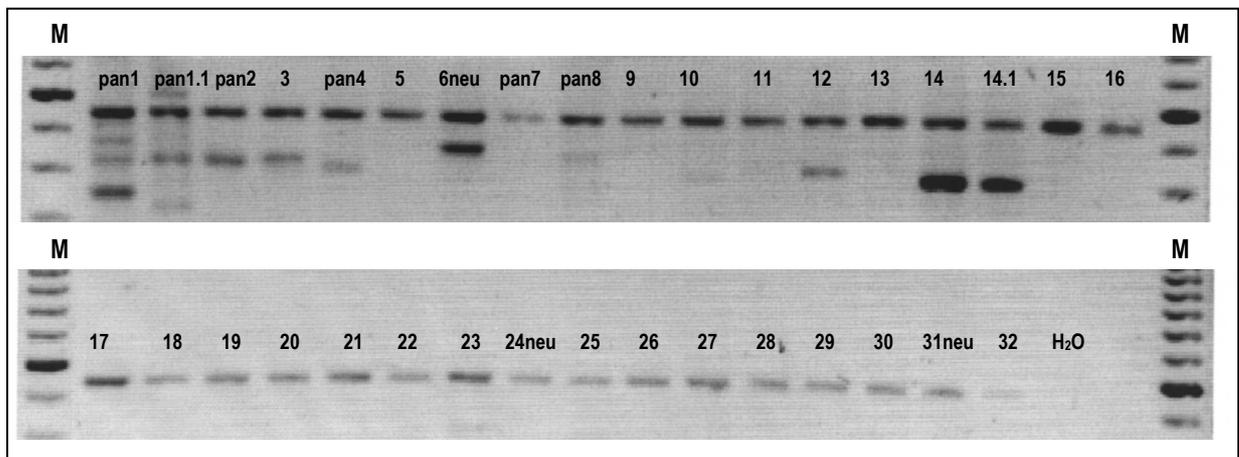
## ERGEBNISSE

Veränderung der Bandenintensität	unverändert	Zunahme	Abnahme	nicht mehr nachweisbar
V $\alpha$ -Amplifikate	pan1, pan1.1., pan2, pan4, pan8, 29, 32	–	5,6neu,pan7,9,11,12,13, 14,14.1,16,17,20, 21,22,25	3,10,15,18,19,23,24neu, 26, 27,28,30, 31neu
V $\beta$ -Amplifikate	6/1neu,6/2/6/3,13.2, 13neu, 23neu,25	9neu,16,18	1,2,3,4,5.1,5.2/5.2T,7,8, 13.S5,13.1,14,17,	8S.3,10,11,12,12.S3,15, 19, 20,21,22/3,24neu,

**Tabelle 4.1:** Veränderung der Bandenintensitäten der V $\alpha$ - bzw. V $\beta$ -Amplifikate nach fünf Stimulationen im Vergleich zum Ausgangsrepertoire von Spender #278 vor Stimulationsbeginn

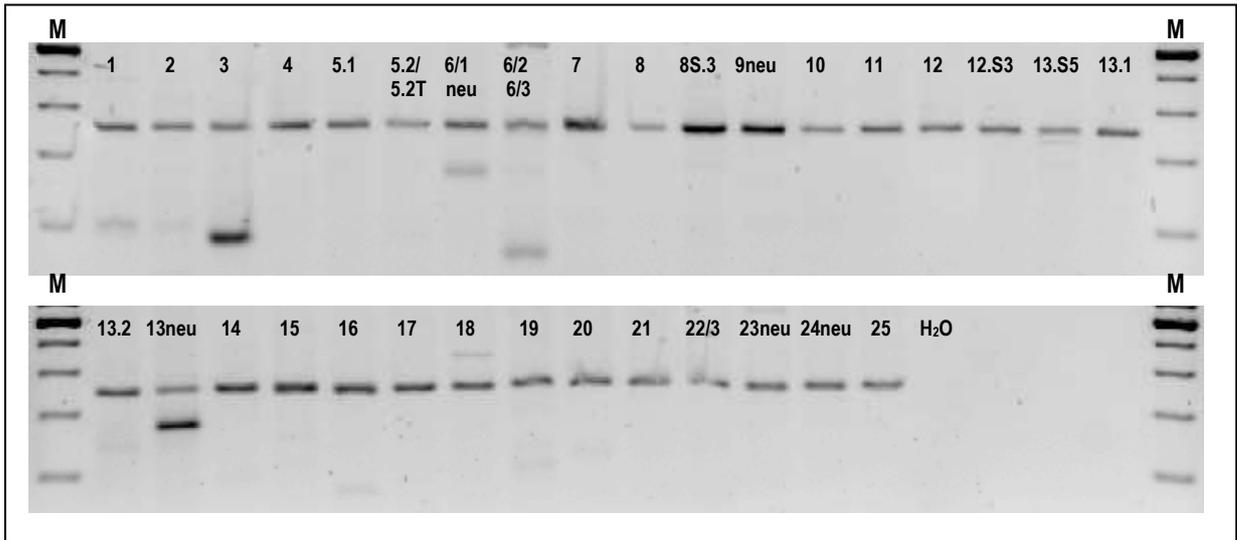
Ohne densitometrische Auswertung zeigten die noch nachweisbaren V $\alpha$ -Familien im Verlauf eine unveränderte bzw. abnehmende Bandenintensität nach fünf Stimulationen im Unterschied zur Ausgangssituation. Bei den V $\beta$ -Ketten 9neu, 16 und 18 waren bei gleichbleibenden Kontrollbanden im Verlauf eine Zunahme der V $\beta$ -spezifischen Bandenintensität zu erkennen. Zusammenfassend ließ sich eine insgesamt restringierte TCR-Expression und damit eine restringierte T-Zell-Population nach mehrfacher Stimulationen mit der Vakzinezelle beobachten.

Eine ähnlich deutliche Einschränkung des TCR-Repertoires ließ sich auch bei Verwendung der PBL von Patient #56 zeigen: Abbildungen 4.7 und 4.8 nach vier Stimulationen mit der Vakzinezelle.



**Abbildung 4.7:** TCR $\alpha$ -Repertoire PBL Patient #56 nach vier Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.8:** TCRβ-Repertoire PBL Patient #56 nach vier Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN-γ

Auffallend sind die deutlich verstärkten Banden der TCR 6neu, Vα14 und 14.1 im Vergleich zur Elektrophorese vor Stimulation. Ein Vergleich der Intensität der verbliebenen Vβ-Banden mit der Ausgangssituation ist aufgrund der insgesamt schwächeren Expression der Kontrollbanden (geringere cDNA-Menge) nach vier Stimulationen ohne densitometrische Auswertung schwierig. Eine Gegenüberstellung des Expressionsverhaltens der nativen PBL und der Lymphozyten nach vier Stimulationen ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Nach mehrfacher Stimulation hat sich eine Population von T-Zellen herausgebildet, die sich durch die Expression einiger weniger TCR auszeichnet.

Veränderung der Bandenintensität	unverändert	Zunahme	Abnahme	nicht mehr nachweisbar
Vα-Amplifikate	12	6neu, 14, 14.1	pan1, pan1.1, pan2, 3 pan4, pan8, 10, 11, 17, 23, 25	5, pan7, 9, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24neu, 26, 27, 28, 29, 30, 31neu, 32
Vβ-Amplifikate	6/1neu, 6/2/6/31 3neu	3	1, 2, 3, 13.2, 15, 16, 19, 20 25	4, 5, 1, 5.2/5.2T, 7, 8, 8S.3, 9neu, 10, 11, 12, 12.S3, 13.S5, 13.1, 14, 18, 21, 22/3, 24neu,

**Tabelle 4.2:** Veränderung der Bandenintensitäten der Vα- bzw. Vβ-Amplifikate nach vier Stimulationen im Vergleich zum Ausgangsrepertoire von Patient #56 vor Stimulationsbeginn

Folgende V-familien-spezifischen Gensegmente konnten sowohl in der verbleibenden T-Zellpopulation von Patient #56 als auch in der von Spender #278 nach vier bzw. fünf Stimulationen gut sichtbar nachgewiesen werden:

Vα pan1, pan1.1, 2, pan4, 12, 14, 14.1

Vβ 1, 3, 6/1neu, 6/2/6/3, 13neu

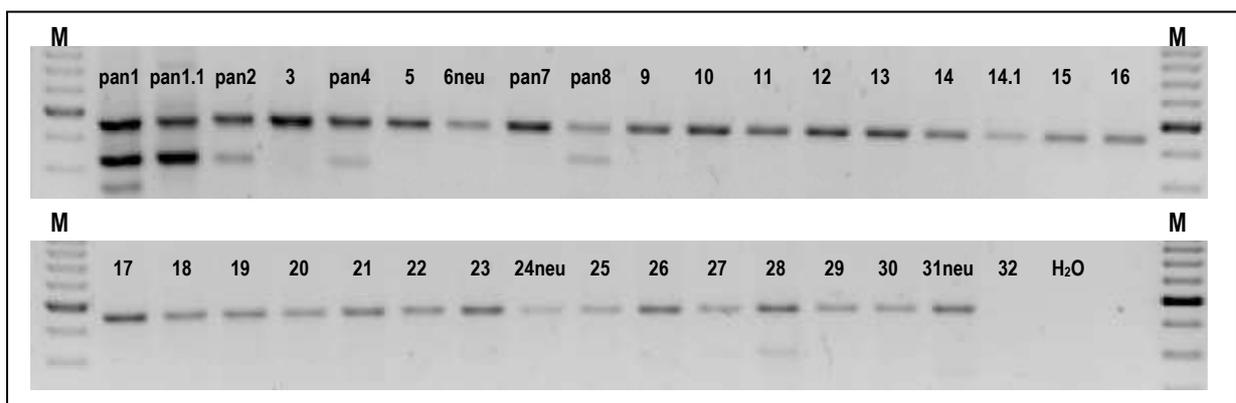
Zusammenfassend konnte bereits durch vier bzw. fünf Stimulationen eine deutliche Einengung des TCR-Repertoires bei beiden Spendern erreicht werden. Zudem haben sich einige wenige dominante Banden herauskristallisiert. Um das Vorhandensein von hoch konservierten CDR-3-Sequenzen bzw. die Zusammensetzung der TCRs im Bereich der J-Segmente beurteilen zu können, wurden ausgewählte dominante Amplifikate einer Sequenzierung unterzogen (siehe unter 4.2).

#### 4.1.4 TCR-Repertoire der TIL des Patienten 109

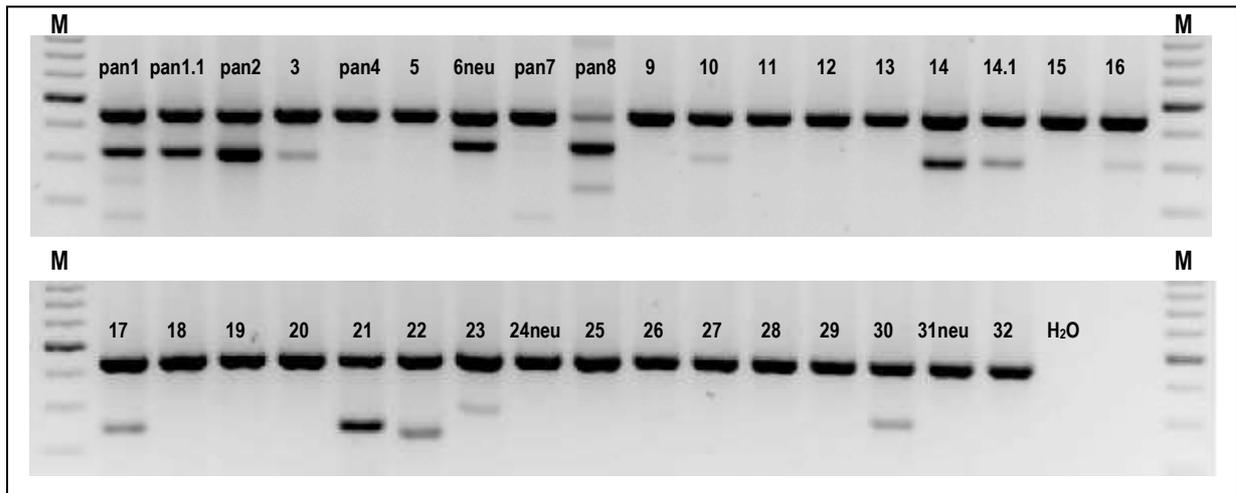
Die Gegenwart tumorinfiltrierender Lymphozyten im Tumorgewebe impliziert eine spezifische *in situ* Antwort des Immunsystems gegen maligne entartete Zellen. Die Lymphozyten sollten sich in der Theorie in ihrem TCR-Repertoire deutlich von dem der Lymphozyten aus dem peripheren Blut unterscheiden.

Laut Studienprotokoll wurde bei Patient P109 nach drei Vakzinierungen eine Teilresektion des lokalen Prostatakarzinomrezidivs durchgeführt. Gewebeprobe des Resektats wurden unter Zugabe von IL-2 allein bzw. von IL-2 und bispezifischem Antikörper *removab*<sup>®</sup> kultiviert und ausgewanderte Lymphozyten bezüglich des TCR-Repertoires charakterisiert. Die Zugabe des Antikörpers musste erfolgen, da die T-Lymphozyten auch mit IL-2 nur unzureichend in der Lage waren zu proliferieren und aus dem Tumorgewebe auszuwandern.

In Abbildung 4.9 ist das Ergebnis der V $\alpha$ -spezifischen PCR von ausgewanderten TIL ohne Zugabe von *removab*<sup>®</sup>, in Abbildung 3.10 unter Zugabe vom bispezifischen Antikörper dargestellt. Die Bandenintensität war grundsätzlich schwächer, da sich weniger TIL expandieren ließen und dementsprechend die RNA-Menge geringer ausfiel.



**Abbildung 4.9:** TCR $\alpha$ -Repertoire der TIL von Patient P109 nach Kultur (d35) ohne Zusatz von *removab*<sup>®</sup>

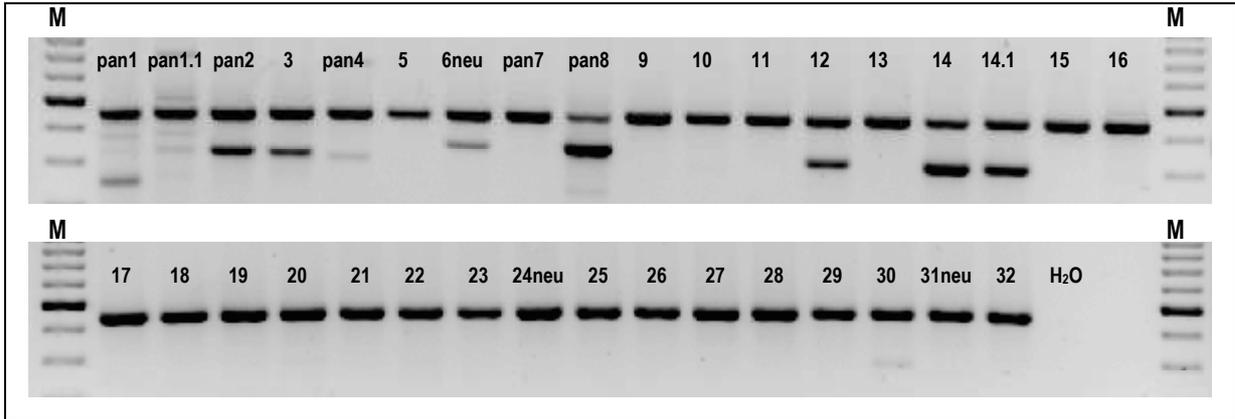


**Abbildung 4.10:** TCR $\alpha$ -Repertoire der TIL Patient P109 nach Kultur (d35) unter Zusatz von *removab*<sup>®</sup>

Bei beiden ist eine klare Einschränkung des Repertoires auf die Expression einiger weniger V $\alpha$ -Gensegmentfamilien zu erkennen, allerdings fällt auch bei diesem Experiment die Restriktion ohne Zugabe von Antikörper noch deutlicher aus: so konnten ohne Antikörper nur sechs V $\alpha$ -Gensegmente amplifiziert werden im Vergleich zu fünfzehn V $\alpha$ -spezifischen Banden bei Zugabe von Antikörper. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass aufgrund der geringeren Zellausbeute bei Kultur ohne *removab*<sup>®</sup> auch sehr viel weniger RNA bzw. cDNA zur Verfügung stand. Deshalb wäre es theoretisch möglich, dass zusätzliche V $\alpha$ -Gensegmente nicht in genügender Menge amplifiziert werden konnten. Ferner fällt auf, dass die bisher stets deutlich exprimierten V $\alpha$ -Familien 14 und 14.1 bei der Kultur ohne Antikörper fehlten. Eine Wiederholung unter Verwendung einer größeren cDNA-Menge war leider aufgrund des beschränkt vorhandenen Zellmaterials nicht möglich.

Die mit Hilfe des bispezifischen Antikörpers ausgewanderten Lymphozyten wurden in einem zweiten Schritt einer mehrmaligen Stimulationen mit der Vakzinezelllinie unterzogen und die Veränderungen des TCR-Repertoires analysiert. Nach insgesamt acht Stimulationen war es zu einer weiteren Einschränkung der nachgewiesenen V $\alpha$ -Familien gekommen (Abbildung 4.11).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.11:** TCR $\alpha$ -Repertoire der TIL Patient P109 nach acht Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

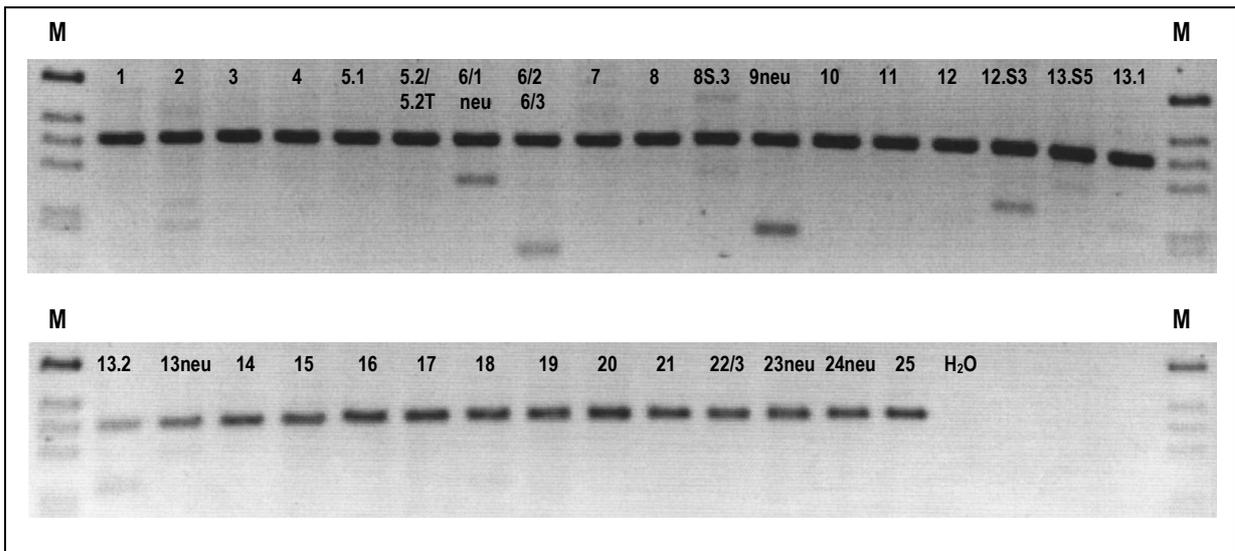
Zuletzt waren im Wesentlichen nur noch die V $\alpha$ -Familien pan2, 3, pan4, 6neu, pan8, 12, 14, 14.1 und 30 nachweisbar. Bemerkenswerterweise nahm die Expression von zwei Familien (V $\alpha$ pan4 und 12) im Verlauf der Stimulationen zu, die vor Stimulation visuell nur zu erahnen waren.

Einzig V $\alpha$ pan2 und pan8 waren bei allen Amplifikationen nachweisbar (Tabelle 4.3)

TIL P109	Nachweisbare V $\alpha$ -Amplifikate
ohne Antikörper (d 35)	pan1, pan1.1, pan2, pan4, pan8, 28
mit Antikörper (d 35)	pan1, pan1.1, pan2, 3, 6neu, pan8, 10, 14, 14.1, 17, 21, 22, 23, 30
nach acht Stimulationen	pan2, 3, pan4, 6neu, pan8, 12, 14, 14.1, 30

**Tabelle 4.3:** Vergleich der nachweisbaren V $\alpha$ -Amplifikate der TIL des P109 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Die stark exprimierte Amplifikate wurden rot markiert.

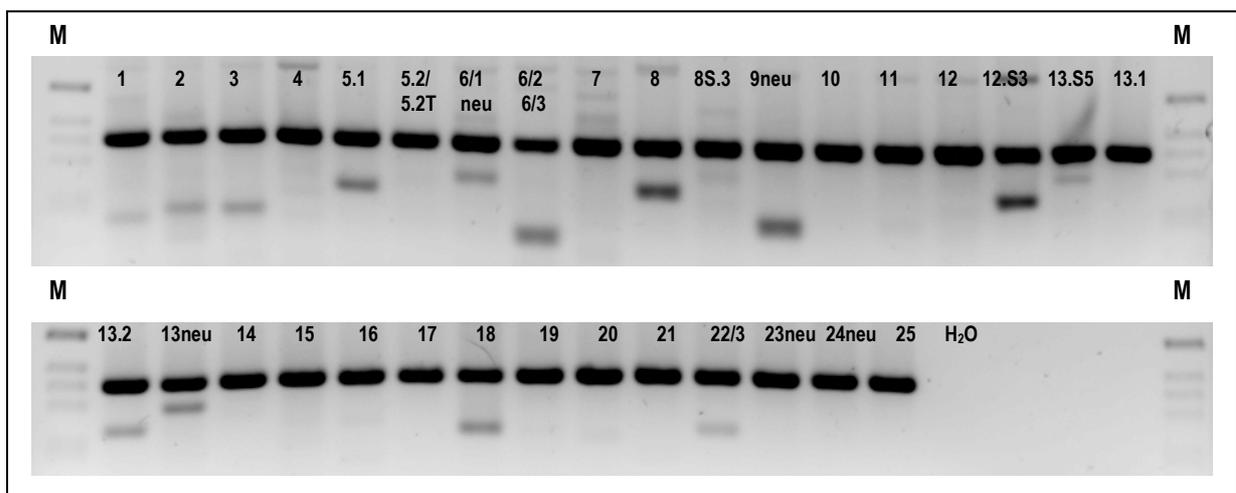
Die Analyse der V $\beta$ -Gensegmentexpression der ausgewanderten Lymphozyten ist vergleichbar mit der oben dargestellten V $\alpha$ -Expression. Am deutlichsten fiel erneut die Einschränkung des TCR-Repertoires ohne Zusatz von Antikörper aus (Abbildung 4.12).



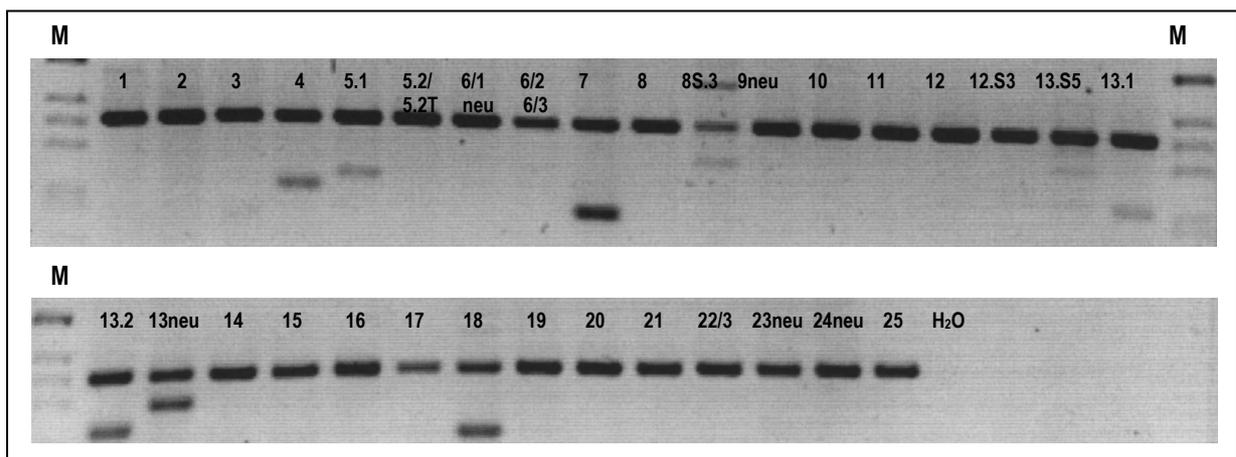
**Abbildung 4.12:** TCR $\beta$ -Repertoire TIL Patient P109 nach Kultur (d35) ohne Zusatz von removab<sup>®</sup>

## ERGEBNISSE

Eine relevante Expression ist nur für die Familien 2, 6/1neu, 6.2/6.3, 8.S3, 9neu, 12S3, 13S.5, 13.1, 13.2, und 18 zu erkennen. Bei Zugabe von *removab*<sup>®</sup> können neben den bereits genannten noch fünf weitere V $\beta$ -Familien nachgewiesen werden (Abbildung 4.13). Im Verlauf der Stimulationen gegen die Vakzinezelllinie ist eine Veränderung des Expressionsmusters zu beobachten. Eine Zunahme der Expression ist bei den Familien V $\beta$ 13.2, 13neu und 18 festzustellen, alle anderen vor den Stimulationen vorhandenen V $\beta$ -Familien zeigen eine abnehmende Bandenintensität bzw. sind nicht mehr nachweisbar. Drei V $\beta$ -Ketten (4, 7, 13.1), die anfangs nicht zu erkennen waren, sind nach acht Stimulationen hinzugekommen, wobei v.a. für V $\beta$ 7 eine im Verlauf deutlich zunehmende Bandenintensität zu beobachten war. (Tabelle 4.4 und Abbildung 4.14)



**Abbildung 4.13:** TCR $\beta$ -Repertoire TIL Patient P109 nach 35-tägiger Kultur unter Zusatz von *removab*<sup>®</sup>



**Abbildung 4.14:** TCR $\beta$ -Repertoire TIL Patient P109 nach acht Stimulationen mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

TIL P109	Nachweisbare V $\beta$ -Amplifikate
ohne Antikörper (d 35)	2 <span style="color: red;">6/1neu, 6/2/6/3,</span> 8.S3, <span style="color: red;">9neu, 12.S3,</span> 13.S5, 13.1, 13.2, 13neu,
mit Antikörper (d 35)	1, 2, 3, <span style="color: red;">5.1, 6/1neu, 6/2/6/3,</span> <span style="color: red;">8,</span> 8.S3, <span style="color: red;">9neu, 12.S3,</span> 13.S5, <span style="color: red;">13.2, 13neu, 18,</span> 22/3
nach acht Stimulationen	<span style="color: red;">4, 5.1,</span> <span style="color: red;">7,</span> 8.S3, 13.S5, 13.1, <span style="color: red;">13.2, 13neu, 18</span>

**Tabelle 4.4:** Vergleich der nachweisbaren V $\beta$ -Amplifikate der TIL des Patient P109 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Die stark exprimierten Amplifikate wurden rot markiert.

Der V $\alpha$ - und V $\beta$ -Gensegmentgebrauch der aus dem Rezidiv des Patienten P109 ausgewanderten Lymphozyten ist deutlich restringierter als in den PBL desselben Patienten. Eine weitere Veränderung des TCR-Repertoires dieser Lymphozyten ist durch Kontakt mit der Vakzinezelllinie zu erreichen, wobei die Expression der TCR im Laufe der Stimulationen in eine Phase relativ konstanter TCR-Expression mündet.

Eine weitere Prostatakarzinomgewebeprobe konnte von Patient P184 gewonnen werden, allerdings konnte eine Auswanderung bzw. Expansion tumorinfiltrierender T-Zellen nicht erreicht werden. Eine Analyse des TCR-Repertoires war somit nicht möglich.

#### 4.1.5 TCR-Repertoire am Vakzinierungsort der Patienten 113, 182 und 184

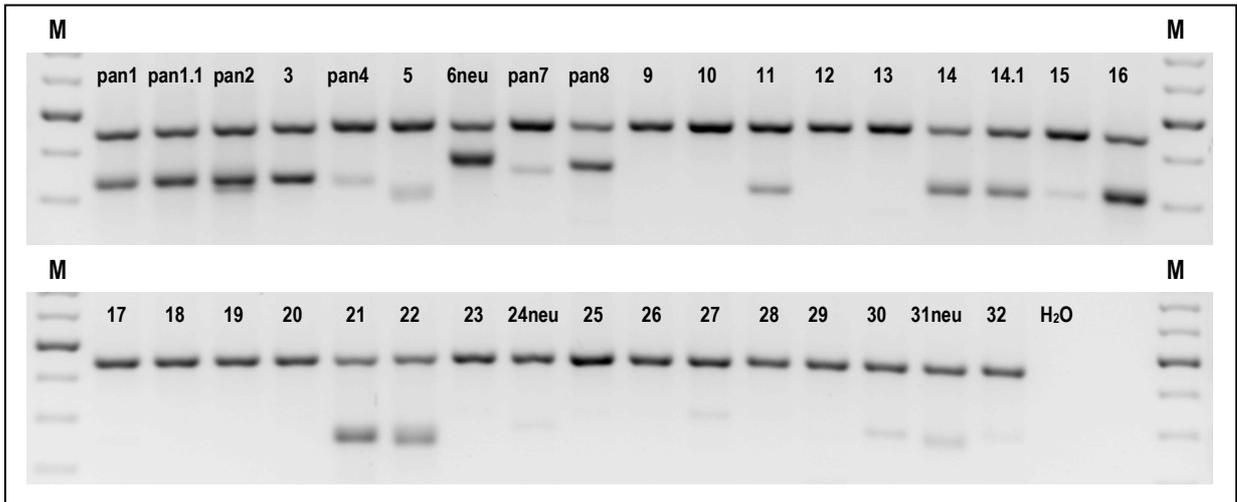
Durch die Injektion gentechnisch modifizierter Tumorzellen in die Haut wird eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp induziert. Antigen-präsentierende Zellen nehmen Zellbestandteile auf, prozessieren diese und präsentieren schließlich u.a. tumorassoziierte Antigene für T-Lymphozyten. Neben einer ersten Einschätzung der T-Zell-abhängigen Immunantwort könnten aus Biopsien der Vakzinierungsstelle antigenspezifische T-Zellen isoliert werden und bezüglich ihres TCR-Repertoires analysiert werden.

Hautgewebeproben von P182 und P184, die sieben Tage nach der 3. Vakzinierung entnommen worden waren, wurden für insgesamt 24 Tage unter Zugabe von IL-2 kultiviert. Das TCR-Repertoire der ausgewanderten Lymphozyten wurde analysiert. Bei beiden zeigte sich eine polyklonale Amplifikation aller gensegmentspezifischen Familien ohne deutlichen Expressionsunterschied im Vergleich zu den Lymphozyten aus dem peripheren Blut.

Bei Patient P113, der eine ausgesprochen starke lokale Hautreaktion auf die Vakzinierung zeigte, konnte eine Hautgewebeprobe nach der 9. Vakzinierung analysiert werden. Nach 24 Tagen Kultivierung standen leider noch nicht genügend Lymphozyten für eine Repertoireanalyse zur Verfügung. Stattdessen wurden diese Zellen zur Analyse des Zytokinmilieus mittels CBA verwendet (siehe unter 1.8, Material und Methoden). Dabei wurde eine einmalige Stimulation mit der Vakzinezelllinie durchgeführt. Nach Abnahme

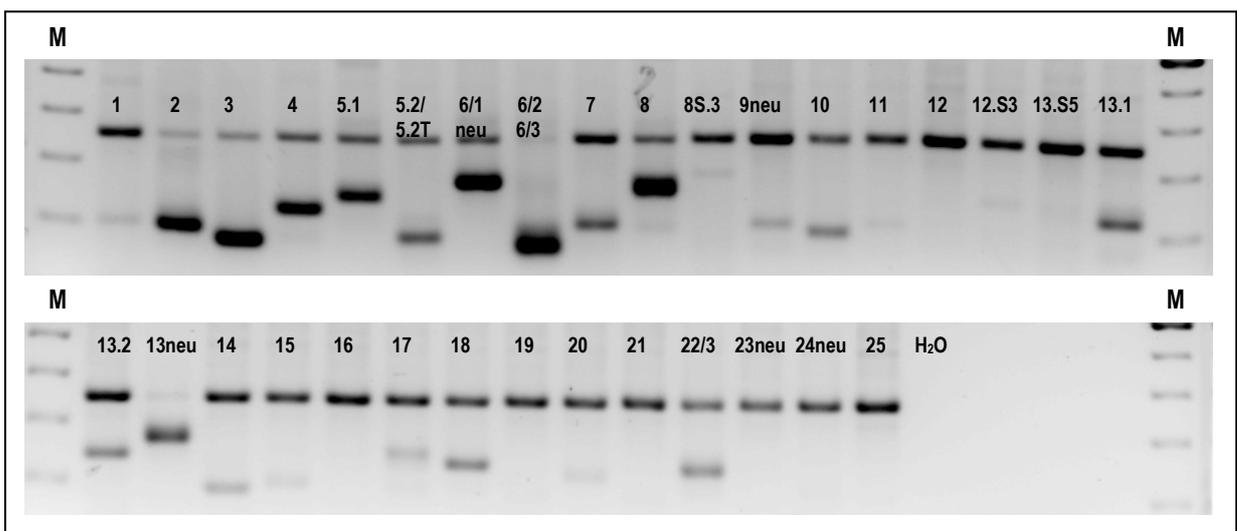
## ERGEBNISSE

des Überstandes für die Zytokinanalyse wurden die Lymphozyten neun weitere Tage kultiviert und expandiert. Anschließend standen genügend Zellen für eine TCR-Repertoireanalyse zur Verfügung, deren Ergebnis in Abbildung 4.15 bzw. 4.16 dargestellt ist. Im Gegensatz zu den analysierten T-Lymphozyten der Patienten P182 und P184 konnte man bei P113 ein eingeschränktes Repertoire für V $\alpha$ - und V $\beta$ -Ketten beobachten.



**Abbildung 4.15:** TCR $\alpha$ -Repertoire kutaner T-Zellen von Patient P113 nach einmaliger Stimulation mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

Durch erneute Stimulation mit den Vakzinezellen *in vitro*, konnte ein eindeutig eingeschränktes TCR-Repertoire beobachtet werden. Die Frage, ob ausgewanderte Lymphozyten nach neun Vakzinierungen *per se* schon ein eingeschränktes Repertoire gezeigt hätten, ließ sich aufgrund unzureichend zur Verfügung stehender Lymphozyten nicht klären.



**Abbildung 4.16:** TCR $\beta$ -Repertoire kutaner T-Zellen von Patient P113 nach einmaliger Stimulation mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

## 4.2 Sequenzierung dominanter TCR

Weder für die Vakzinezelle noch für die beim Prostatakarzinom bekannten überexprimierten Antigene sind spezifische TCR-Sequenzen bekannt, die eine Überwachung der vakzinespezifischen Immunantwort an Hand der Frequenzbestimmung homologer Sequenzen erlauben. Auf der Suche nach einem dominanten T-Zellklon wurden einzelne Amplifikate des eingeschränkten TCR-Repertoires sequenziert und die erhaltenen Basenabfolgen durch Vergleich mit publizierten genomischen TCR V-, D-, J- und C-Sequenzen identifiziert.

Beim Vergleich aller untersuchten V $\alpha$ -Amplifikate (pan1, pan1.1, pan2, 3, pan4, 6neu, pan8, 11, 12, 14 u. 14.1) der TIL von P109, der hautinfiltrierenden Lymphozyten von P113 und der *in vitro* stimulierten PBL von Spender #287 bzw. Patient #56 konnte keine gemeinsame dominante Sequenz gefunden werden. Exemplarisch sind die den Primer V $\alpha$ 14 erhaltenen Sequenzen in Abbildung 4.17 dargestellt, die sich eindeutig in ihrer CDR3-Sequenz unterscheiden

### **Hautbiopsie P113**

#### **TCR ADV14S1 JA43**

TTC TGT GCT TAT AGC CAC TAC AAT AAC AAT GAC ATG CGC TTT GGA GCA GGG ACC

### **TIL P109 nach acht Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFN $\gamma$**

#### **TCR ADV14S1 JA8**

TTC TGT GCT TCA ACG CTA ATC ACA GGC TTT CAG AAA CTT GTA TTT GGA ACT GGC ACC

### **PBL #56 nach vier Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFN $\gamma$**

#### **TCR ADV14S2A3T JA43**

TTC TGT GCT TTT TAC GAC AAT GAC ATG CGC TTT GGA GCA GGG ACC

### **PBL #287 nach fünf Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFN $\gamma$**

#### **TCR ADV14S2A3T JA45**

TTC TGT GCT TTC ATG GCC TAT TCA GGA GGA GGT GCT GAC GGA CTC ACC TTT GGC AAA GGG  
ACT

**Abbildung 4.17:** Sequenzen verschiedener V $\alpha$ 14-Amplifikate. **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen;

Bei der Betrachtung der TIL von P109 konnte zwar eine Übereinstimmung der Amplifikatsequenzen von V $\alpha$ 3, pan4, 12 und 14 unabhängig von der Stimulationszahl gefunden werden. Von diesen V $\alpha$ -Segmenten ließ sich einzig V $\alpha$ pan4 bei den TIL vor Stimulation nachweisen, die Sequenzen der CDR-3-Regionen unterschieden sich allerdings deutlich (Abbildung 4.18). Das gleiche galt auch für alle anderen vor und nach Beginn der Stimulationen nachweisbaren Rezeptoren (V $\alpha$ pan1, 2 und 8).

**TIL P109 nach 35-tägiger Kultur ohne Zusatz von removab<sup>®</sup>**

TCR AV20S1 JA5

TAC TGC CTC GTG GGI GAC GGG GAC ACG GGC AGG AGA GCA CTT ACT TTT GGG ACT GGA ACA

**TIL P109 nach vier Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFNy**

TCR AV20S1 JA20

TAC TGC CTC GTG GGC GTC TCC TAA GGA TAC AAG CTC AGC TTT GGA GCC GGA ACC

**TIL P109 nach acht Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFNy**

TCR AV20S1 JA20

TAC TGC CTC GTG GGC GTC TCC TAA GGA TAC AAG CTC AGC TTT GGA GCC GGA ACC

**Abbildung 4.18:** Sequenzen verschiedener Vqpan4-Amplifikate der TIL von Patient P109 zu verschiedenen Zeitpunkten. **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen;

Auch für die untersuchten V $\beta$ -Amplifikate (3, 5.1, 6.1neu, 6/2/6/3, 7, 9neu, 10, 12.S3, 13.1, 13.2, 13neu, 18, 23neu) konnte keine übereinstimmende Sequenz gefunden werden, exemplarisch V $\beta$ 13.2 in Abbildung 4.19. Unter Verwendung dieser V $\beta$ -Gensegmentfamilie waren bei Zugabe von removab<sup>®</sup> zur Kultur der TIL von Patient 109 divergierende J- und D-Regionen bei übereinstimmender V-Region im Vergleich zur Kultur ohne removab<sup>®</sup> zu beobachten.

**Hautbiopsie P113**

TCR BV13S2A2PT DB2.1 JB2.2

TTC TGT GCC AGC AGC TCG CAC GGA GCG AAC ACC GGG GAG CTG TTT TTT GGA GAA GGC TCT

**TIL P109 nach 35-tägiger Kultur ohne Zusatz von removab<sup>®</sup>**

TCR BV13S2A3PT DB1.1 JB1.1

TTC TGT GCC AGC AGG CCC GGG GGC GCG AAC ACT GAA GCT TTC TTT GGA CAA GGC ACC

**TIL P109 nach 35-tägiger Kultur unter Zusatz von removab<sup>®</sup>**

TCR BV13S2A3PT DB2.1 JB2.1

TTC TGT GCC AGC AGA CCC CGG ACT AGC GGA AGA TTC AAT GAG CAG TTC TTC GGG CCA GGG  
ACA

**TIL P109 nach acht Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFNy**

TCR BV13S2A3PT DB2.1 JB2.1

TTC TGT GCC AGC AGA CCC CGG ACT AGC GGA AGA TTC AAT GAG CAG TTC TTC GGG CCA GGG  
ACA

**PBL #287 nach fünf Stimulationen mit LNCaP/II-2/IFNy**

TCR BV13S2A3PT DB2.1 JB2.1

TTC TGT GCC AGC AGA GGA CTA GCT CCC AAT GAG CAG TTC TTC GGG CCA GGG ACA

**Abbildung 4.19:** Sequenzen verschiedener V $\beta$ 13.2-Amplifikate. **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen; **Fettdruck:** D-Segment

Im Gegensatz zu den V $\alpha$ -Amplifikaten ließ sich in den TIL von Patient 109 jedoch ein präferenzierter Gebrauch zweier Gensegmente unabhängig vom Stimulationszeitpunkt bzw. Antikörperzusatz nachweisen: Die mit Hilfe der Primer V $\beta$ 9neu und V $\beta$ 18 gewonnenen Amplifikate stimmten jeweils exakt in den einzelnen Segmenten überein:

<b>TCR</b>	<b>BV18S1</b>	<b>DB1.1</b>	<b>JB1.5</b>	<b>(Primer: V<math>\beta</math>18)</b>															
TTC	TGT	GCC	AGC	TCA	<u>CTC</u>	<u>AAG</u>	<u>ACA</u>	<u>GGG</u>	<u>AAC</u>	AAT	CAG	CCC	CAG	CAT	TTT	GGT	GAT	GGG	ACT
<b>TCR</b>	<b>BV9S1A1T</b>	<b>DB2.1</b>	<b>JB2.2</b>	<b>(Primer: V<math>\beta</math>9neu)</b>															
TTC	TGT	GCC	AGC	AGC	CAA	<u>GCT</u>	<u>AGC</u>	<u>GGA</u>	<u>AAC</u>	GGG	GAG	CTG	TTT	TTT	GGA	GAA	GGC	TCT	

**Abbildung 4.20:** Sequenzen der V $\beta$ 18- und V $\beta$ 9neu-Amplifikate der TIL des Patient P109, unabhängig vom Stimulationszeitpunkt bzw. Antikörperzusatz. **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen; **Fettdruck:** D-Segment

Mit Hilfe des V $\beta$ 9neu-Primers ließen sich allerdings nur in den TIL vor Stimulation mit der Vakzinezelle relevante Expressionen von V $\beta$ 9-Gensegmenten auf dem Gel erkennen, während für den V $\beta$ 18-Primer bei allen Reaktionsansätzen dominante Amplifikate sichtbar waren.

Unter den TIL von P109 konnten an Hand der  $\beta$ -Kette demnach zwei dominante Zellklone mit konservierter CDR-3-Region (V $\beta$ 9S1A1T-D $\beta$ 2.1-J $\beta$ 2.2 bzw. V $\beta$ 18S1-D $\beta$ 1.1-J $\beta$ 1.5) identifiziert werden.

### 4.3 Charakterisierung des TCR-Repertoires peripherer T-Lymphozyten im Verlauf der Vakzinierung

Aus Blutproben der Studienpatienten zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnene PBL wurden mittels RT-PCR hinsichtlich ihres TCR-Repertoires untersucht. Eine signifikante Veränderung desselben konnte im Laufe der Studie an Hand der Bandenintensität auf dem Agarosegel nicht beobachtet werden.

Durch den Nachweis eines präferenziellen Gebrauchs zweier  $\beta$ -Ketten bei den TIL von P109 konnten zumindest bei diesem Patienten jene Gensegmente mit Hilfe der Methode der Real-time-PCR als molekulare Marker der vakzinespezifischen Immunantwort getestet werden. Zusätzlich wurden die Frequenzen vier weiterer charakteristischer  $\alpha$ -Ketten analysiert.

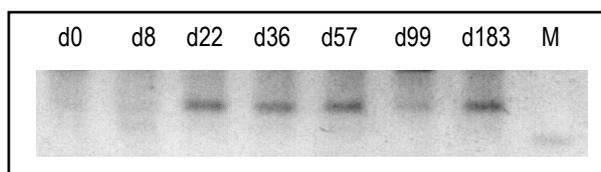
Neben den vorhandenen 5'-Primern wurde das Design der 3' Primer so ausgewählt, dass eine Amplifikation vom Ende des V-Segment über die variable Region bis zum Anfang des J-Segment möglich wurde. Diejenigen Primerprodukte, die in der Gelelektrophorese die homogensten Banden zeigten, wurden erneut sequenziert und eine Übereinstimmung der Amplifikatsequenz mit der zu erwartenden Sequenz überprüft.

## ERGEBNISSE

Bei Patient 109 wurden die Frequenzen der TCR-Segmente V $\alpha$ 14S1/J $\alpha$ 8, V $\beta$ 9S1A1T/D $\beta$ 2.1/J $\beta$ 2.2 und V $\beta$ 18S1/D $\beta$ 1.1/J $\beta$ 1.5 im Laufe der Vakzinierung untersucht. Die beiden letzteren waren bei allen TCR-Repertoires vor bzw. nach Stimulation nachweisbar, das Segment V $\alpha$ 14S1/J $\alpha$ 8 mit zugehöriger CDR3-Sequenz war im Verlauf der bei P109 durchgeführten Experimente mit der Vakzinezelle präferenziell verwendet worden.

Bei der Verwendung der Primer V $\beta$ 9neu und D $\beta$ 2.1/J $\beta$ 2.2 wurden bei Patient 109 sehr breite Schmelzkurven beobachtet, die zu erwartenden zusätzlich amplifizierten Produkte bestätigten sich in der Gelelektrophorese. Bezüglich des  $\beta$ -Ketten-Amplifikats waren am Tag 0, 8 und 99 nur sehr schwache Banden zu erkennen. Aufgrund differierender Schmelztemperaturen konnten die *crossing points* dieser drei Proben nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Am Tag 22, 36, 57 und 183 unterschieden sich bei passender Schmelztemperatur sowohl die *crossing points* als auch die Bandenintensitäten nur unwesentlich:

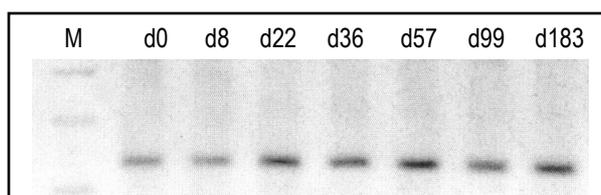
Studienzeitpunkt	d22	d36	d57	d183
<i>Crossing points</i>	28.71	28.92	29.05	28.80



**Abbildung 4.21** : *Crossing points* (oben) und Gelelektrophorese der zu verschiedenen Studienzeitpunkten mittels Real-time-PCR unter Verwendung der V $\beta$ 9neu- und D $\beta$ 2.1/J $\beta$ 2.2-Primer gewonnenen TCR-Amplifikate von Patient P109

Mit Hilfe der V $\beta$ 18- und D $\beta$ 1.1/J $\beta$ 1.5-Primer lies sich zwar in allen Proben ein spezifisches Produkt amplifizieren (schmale Schmelzkurven mit korrekter Temperatur), die *crossing points* unterschieden sich aber auch hier nur marginal voneinander, eine echte Zunahme der Expression konnte nicht festgestellt werden.

Studienzeitpunkt	d0	d8	d22	d36	d57	d99	d183
<i>Crossing points</i>	24.85	26.89	25.21	25.65	25.81	23.79	25.78



**Abbildung 4.22**: *Crossing points* und Gelelektrophorese der zu verschiedenen Studienzeitpunkten mittels Real-time-PCR unter Verwendung der V $\beta$ 18- und D $\beta$ 1.1/J $\beta$ 1.5-Primer gewonnenen TCR-Amplifikate von Patient P109

## ERGEBNISSE

Trotz mehrfacher Modifikationen der Bedingungen konnte bei Verwendung der Primer Va14 und Ja8 bei Patient 109 zu den meisten Zeitpunkten kein spezifisches Produkt amplifiziert werden.

Für das molekulare Tracking wurden bei Patient 113 die Gensegmente Va14S1/Ja43, Va11S1/Ja31 und Va16S1/Ja44 ausgewählt. Die Amplifikate Va11S1/Ja31 und Va16S1/Ja44 waren nur bei diesem Patienten in relevanter Expression aufgetaucht. Das Va14S1/Ja43-Segment konnte in allen Experimenten außer bei den tumorinfiltrierenden T-Zellen von P109 (ohne Zugabe von Antikörper) in deutlicher Intensität nachgewiesen werden, ein vakzinespezifischer Stimulus könnte dafür verantwortlich sein.

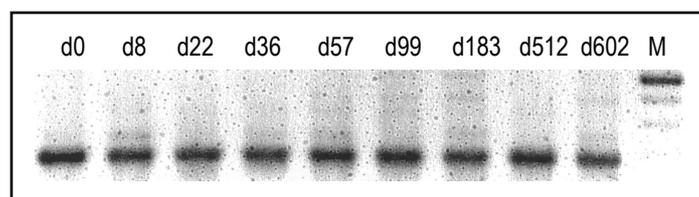
Bei Verwendung der Primer Va14.1 und Ja43 gelang es bei Patient 113 ähnlich wie bei der Amplifikation des Va14S1-Segment bei P109 auch nach Modifikationen (u.a. DNA-Verdau der mRNA-Proben) nicht in allen Proben das gewünschte Segment zu amplifizieren, in den verbleibenden Proben (d22, 57, 99, 183 und 602) zeigte sich ein leichter Expressionsanstieg von Tag 22 bis Tag183, am Tag 602 war dann allerdings eine geringere Expression festzustellen.

Studienzeitpunkt	d22	d57	d99	d183	d602
Crossing points	36.59	35.79	35.25	34.80	35.92

**Tabelle 4.5:** Crossing points der zu verschiedenen Studienzeitpunkten mittels Real-time-PCR unter Verwendung der Va14.1- und Ja43-Primer gewonnenen TCR-Amplifikate von Patient P113

Das Gensegment Va16S1/Ja44 konnte in allen Proben einwandfrei amplifiziert werden, eine Steigerung der Expression konnte im Laufe der Vakzinierung nicht beobachtet werden.

Studienzeitpunkt	d0	d8	d22	d36	d57	d99	d183	d512	d602
Crossing points	27.25	27.42	27.47	28.39	27.74	27.08	27.13	27.84	27.12



**Abbildung 4.23:** Crossing points und Gelelektrophorese der zu verschiedenen Studienzeitpunkten mittels Real-time-PCR unter Verwendung der Va16- und Ja44-Primer gewonnenen TCR-Amplifikate von Patient P113

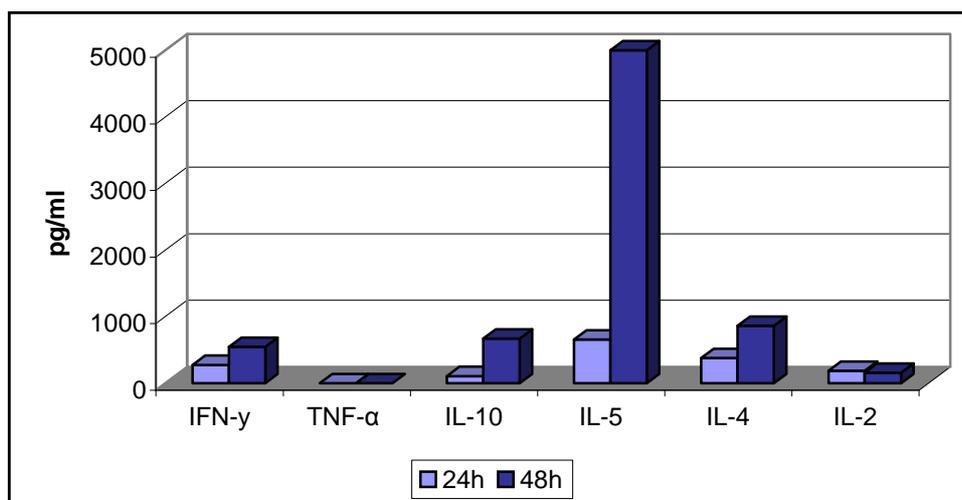
Das Gensegment Va11S1/Ja31 war nach Tag 36 praktisch nicht mehr nachweisbar ohne dass vorher eine Reduktion in der Expression stattgefunden hatte.

#### 4.4 Analyse des Zytokinmilieus am Ort der Vakzinierung

Das Zytokinmilieu an der Vakzinierungsstelle gibt erste Aufschlüsse über die Art der immunologischen Reaktion vor Ort, beispielsweise über die Qualität der T-Helferzell-Antwort.

Hautbiopsiematerial stand lediglich von drei Patienten zur Verfügung, so dass hier eine Zytokinanalyse aus dem Überstand der kultivierten Hautbiopsiezellen durchgeführt werden konnte (Patienten P113, P182, P184).

Nach kurzer Kultivierung (27 Tage) der Hautbiopsie-Probe von Patient P113 wurde das Zytokinmuster der ausgewanderten Lymphozyten nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelllinie mittels CBA untersucht. Im Überstand konnte bereits nach 24 Stunden eine große Menge IL-5 nachgewiesen werden, die sich nach 48 Stunden sogar noch verzehnfachte. Daneben konnte eine moderate IL-4-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -Sekretion und eine geringe IL-2-Menge dokumentiert werden. TNF- $\alpha$  wurde von diesen Zellen nicht produziert (Abbildung 4.24).



**Abbildung 4.24:** Zytokinanalyse der Hautbiopsie Patient P113 nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelle. Die Hautbiopsie wurde 48 Stunden nach der 9. Vakzinierung entnommen.

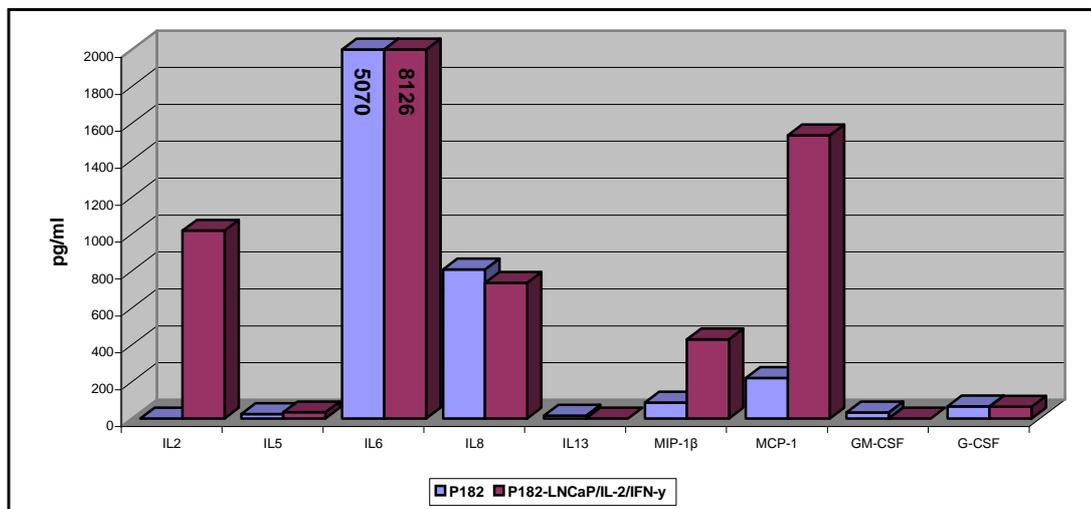
Bei den Patienten P182 und P184 wurden am Tag 7 nach der 3. Vakzinierung (d36) Hautproben der Impfstelle entnommen und das Zytokinmilieu im Überstand nach Kultivierung und Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelllinie analysiert. Durch Verwendung des mittlerweile im Handel verfügbaren Bioplex-Assay konnten sogar simultan 17 Zytokine untersucht werden.

Folgende Zytokine konnten bei beiden Patienten nicht bzw. in nicht nennenswerter Menge nachgewiesen werden: IL-1 $\beta$ , IL-7, IL12, IL-17, TNF- $\alpha$ .

Bei Patient P182 ließen sich nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelle v.a. IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1 $\beta$  und MCP-1 nachweisen, IL-4, IL-5 und IL-10 waren kaum bzw. gar nicht

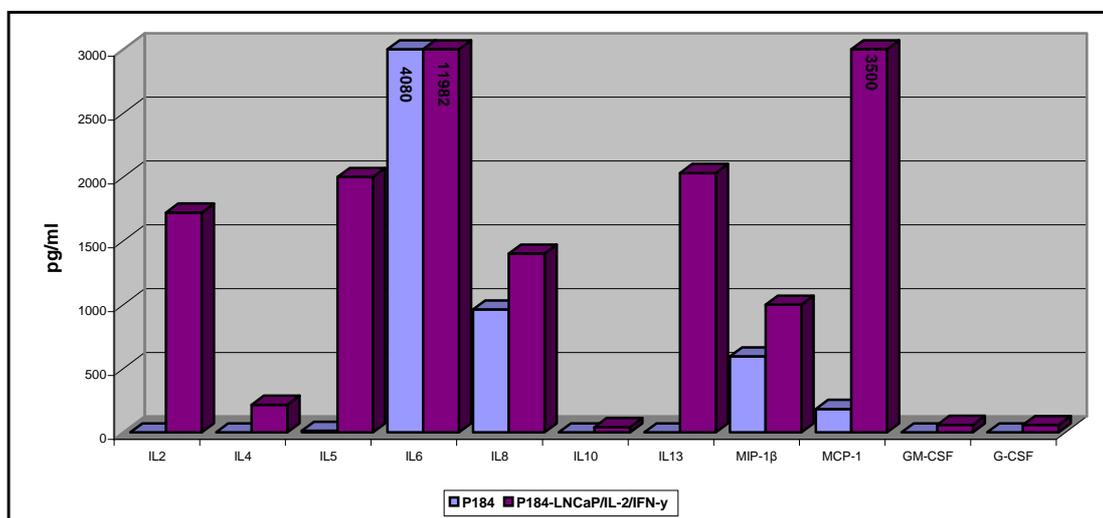
## ERGEBNISSE

nachweisbar. Für IL-2, IL-6, MIP-1 $\beta$  und MCP-1 konnten deutlich höhere Werte im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle gemessen werden (Abbildung 4.25)



**Abbildung 4.25:** Zytokinanalyse der Hautbiopsie Patient P182 nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelllinie. Die Hintergrundwerte für die Vakzinezelllinie wurden abgezogen.

Bei Patient P184 konnte eine beträchtliche Menge an IL-5 im Überstand der mit der Vakzinezelle bzw. der nicht transfizierten LNCaP-Linie stimulierten ausgewanderten Biopsiezellen nachgewiesen werden. Daneben konnte eine im Vergleich zu P182 signifikant höhere Sekretion von IL-4, IL-10 und IL-13 gemessen werden (Abbildung 4.26).



**Abbildung 4.26:** Zytokinanalyse der Hautbiopsie Patient P184 nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelllinie. Die Hintergrundwerte für die Vakzinezelllinie wurden abgezogen.

## 4.5 Multiplexe Zytokinbestimmungen im Serum der Patienten

Mit Hilfe des sog. Multiplexing-Ansatzes wurden ebenfalls zahlreiche Zytokine im Serum der Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Studie untersucht. Diese Methode hat zwei wesentliche Vorteile im Vergleich zu einem ELISA. Es können gleichzeitig eine Vielzahl von Zytokinen in einer kleinen Ausgangsprobe gemessen werden. Es wurde untersucht, ob sich die Zytokinkonstellation im Serum bzw. die Werte der einzelnen Zytokine als Reaktion auf die Vakzinierung verändern. Da ein dominierendes TH1-Profil *in situ* bzw. im Serum für eine erfolgreiche Tumorabwehr notwendig zu sein scheint (Übersicht bei Nishimura et al., 2000), sind vor allem Veränderungen des T-Helferzell-Profiles und von TH1-assoziierten Zytokinen, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 im Laufe der Vakzinierung von Interesse.

Es konnten Analysen von insgesamt 17 Zytokinen bei den ersten 6 Studienpatienten zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Vor Beginn der Vakzinierung (Tag 0), jeweils zwei Tage nach den ersten beiden (Tag 3 und Tag 17) und der letzten Vakzinierung (Tag 94)) durchgeführt werden.

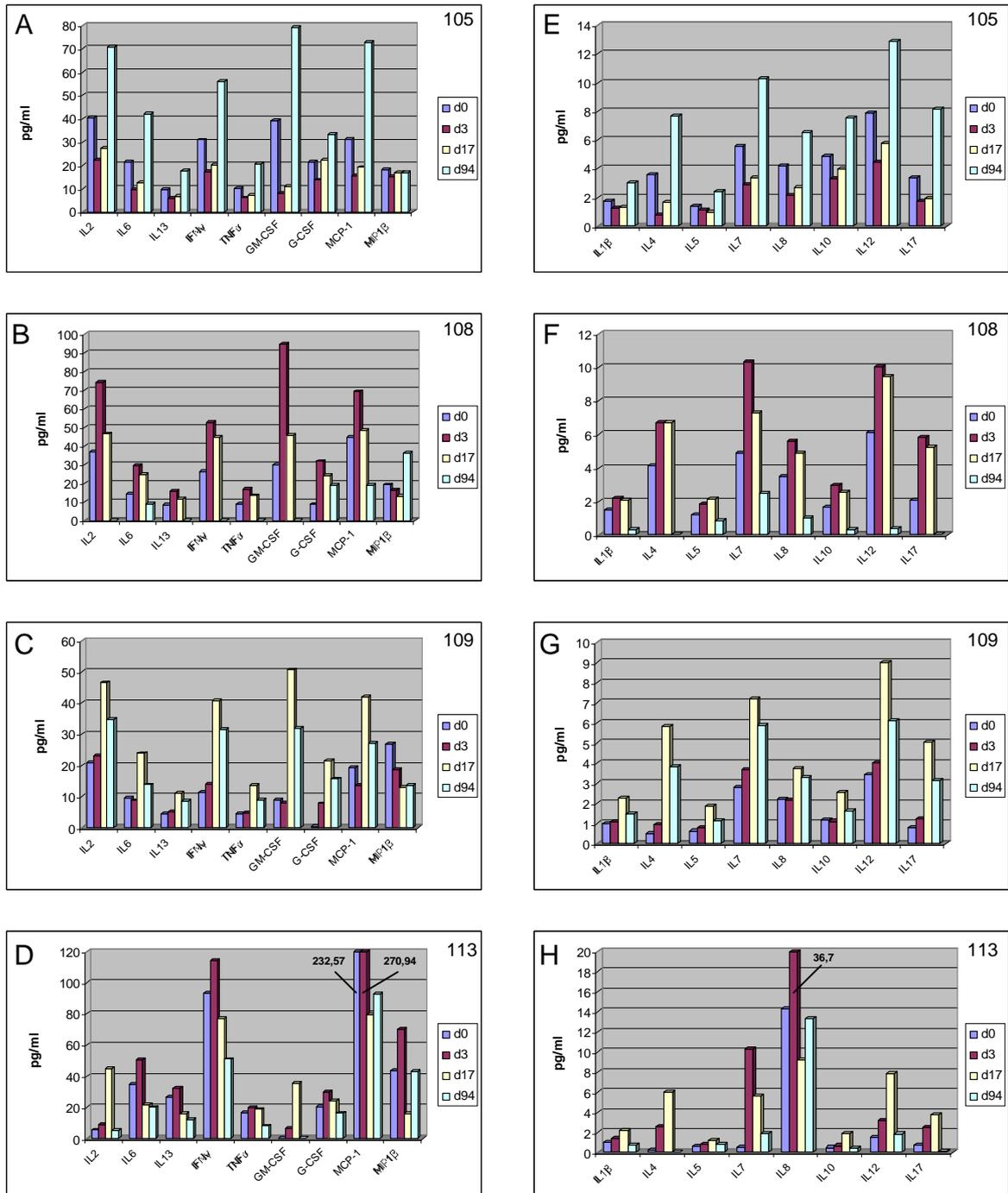
Die absoluten Zytokinwerte waren durchschnittlich bei den Patienten P113 und P125 am höchsten und bei den Patienten P109 und v. a. P118 am niedrigsten. Die Werte für IL-4 (<7 pg/ml, Ausnahme Patient P125 <32 pg/ml), IL-5 (<4 pg/ml) und IL-10 (<3 pg/ml) waren durchgehend sehr niedrig, wohingegen die Zytokine IL-2 (6-74 pg/ml), TNF- $\alpha$  (4-22 pg/ml) und insbesondere IFN- $\gamma$  (11-202 pg/ml) weitaus höhere Werte aufwiesen. IL-6 war bei allen Patienten im mittleren Konzentrationsbereich zu beobachten.

Der Verlauf der Zytokinwerte während der Vakzinierung stellte sich im Vergleich der Patienten meist unterschiedlich dar, ein kontinuierlicher Anstieg konnte übereinstimmend bei keinem Patienten beobachtet werden (siehe Abbildungen 4.27 und 4.28).

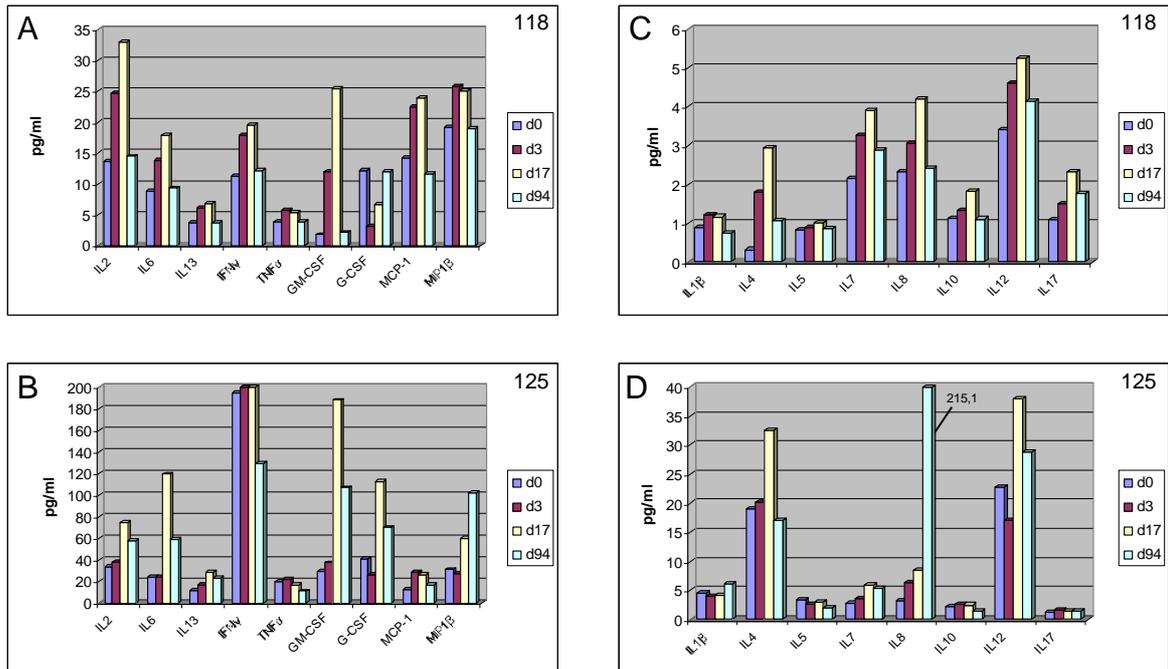
Bei Patient P105 konnte nach vorübergehendem Abfall die höchsten Werte am Tag 94 gemessen werden. Patient P108 zeigte einen starken Abfall der Zytokinkonzentration nach Tag 3 bis auf fast nicht mehr messbare Werte am Tag 94. Die Patienten P109, P118 und P125 wiesen die höchsten Werte am Tag 17 auf, Patient P113 bereits am Tag 3.

Die Patienten P113 und P125 unterschieden sich von den übrigen generell durch eine höhere maximale Zytokinsekretion und wiesen im Detail die höchsten Werte für IFN- $\gamma$  und in geringerem Maße auch für TNF- $\alpha$  auf.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.27:** Zytokinanalyse im Serum der Patienten 105, 108, 109 und 113 mit Hilfe des Multiplexing-Ansatzes zu verschiedenen Zeitpunkten während der Vakzinierung. In den Diagrammen A-D sind die Zytokine mit absoluten Werten überwiegend >15 pg/ml dargestellt (IL-2, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, MCP-1, MP1- $\beta$ ), in den Diagrammen E-H die Zytokine mit absoluten Werten <15 pg/ml (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17).

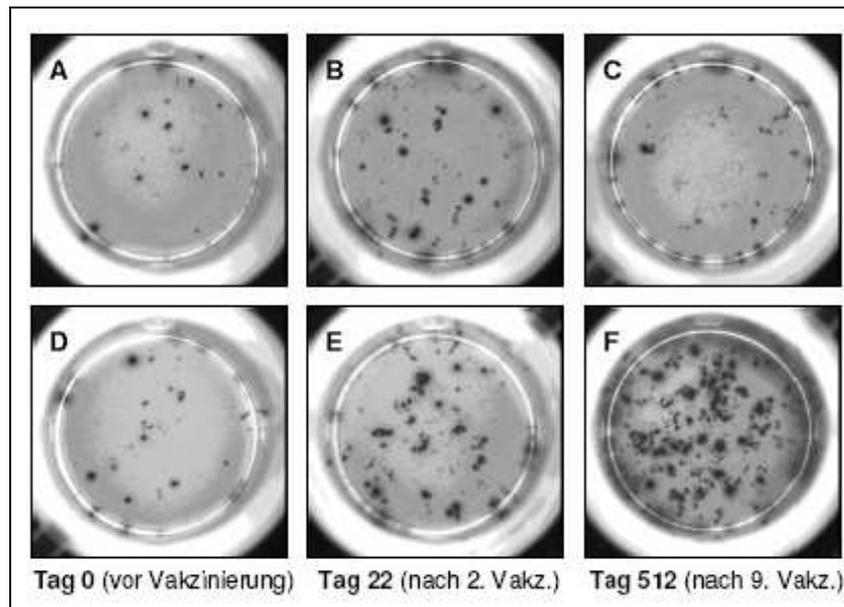


**Abbildung 4.28:** Zytokinanalyse im Serum der Patienten 118 und P125 mit Hilfe des Multiplexing-Ansatzes zu verschiedenen Zeitpunkten während der Vakzinierung. In den Diagrammen A-B sind die Zytokine mit absoluten Werten überwiegend > 15pg/ml dargestellt (IL-2, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, MCP-1, MP1- $\beta$ ), in den Diagrammen C-D die Zytokine mit absoluten Werten < 15pg/ml (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17).

## 4.6 Detektion Peptid-spezifischer, IFN- $\gamma$ -produzierender T-Zellen

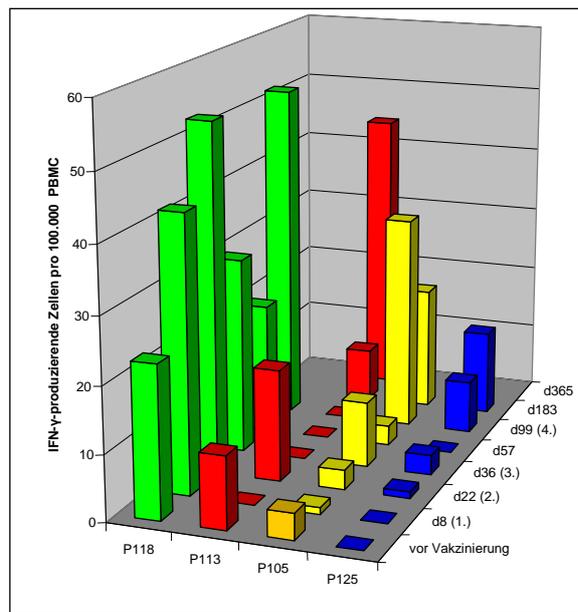
Ein direkter ex vivo Nachweis von aktivierten Antigen-spezifischen T-Zellen ist mit Hilfe des ELISPOT-Assay möglich. Hierzu werden mit Hilfe einer Peptid-Stimulation aktivierte, Antigen-erkennende T-Zellen beispielsweise an Hand ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion erfasst. Dabei ist allerdings die Kenntnis tumorassoziierter Peptide notwendig, die eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort auslösen können. Für die Detektion Peptid-spezifischer T-Zellen im Blut der Studienpatienten wurden sieben Peptide ausgewählt, die mögliche Ziele einer gegen das PCa gerichteten Immunantwort darstellen. Die den an den Tagen 0 (vor Vakzinierung), 8 (nach 1. Vakzinierung), 22 (nach 2. Vakzinierung), 36 (nach 3. Vakzinierung), 57, 99 (nach 4. Vakzinierung) und 183 gewonnenen Patienten-PBMC der Phase I (Patienten P105, P108, P109, P113, P118, P125) wurden wie unter 3.4.2 beschrieben mit jeweils einem Peptid inkubiert und anschließend die IFN- $\gamma$ -Sekretion analysiert. Außerdem wurden bei Stabilisierung des PSA-Wertes zusätzlich PBMCs etwa vierteljährlich analysiert. Als interne Kontrolle für den ELISPOT diente ein CMV/EBV/Flu Peptidpool bestehend aus fünf HLA-A\*0201-bindenden Peptiden. Die PBMC aller Patienten zeigten eine Reaktivität gegen diesen Peptidpool zu mindestens einem Vakzinezeitpunkt.

Bei allen Studienteilnehmern ließen sich Peptid-spezifische T-Zellen in unterschiedlicher, aber insgesamt sehr niedriger Frequenz gegen alle zum Einsatz gekommenen Peptide nachweisen (< 100 spots / 100.000 PBMC). Die stärkste T-Zell-Aktivierung konnte gegen die Peptide PSGR-1 und STEAP-3 beobachtet werden (exemplarisch ist in Abbildung 4.28 der IFN- $\gamma$ -ELISPOT von Patient P113 vor bzw. nach Inkubation mit PSGR-1 dargestellt).



**Abbildung 4.28:** Reaktivität der peripheren T-Zellen des Patienten 113 gegenüber PSGR-1 im IFN- $\gamma$ -ELISPOT. A-C ohne Peptidzugabe, D-F nach Zugabe von PSGR-1. Jeder Spot repräsentiert eine IFN- $\gamma$ -produzierende Zelle.

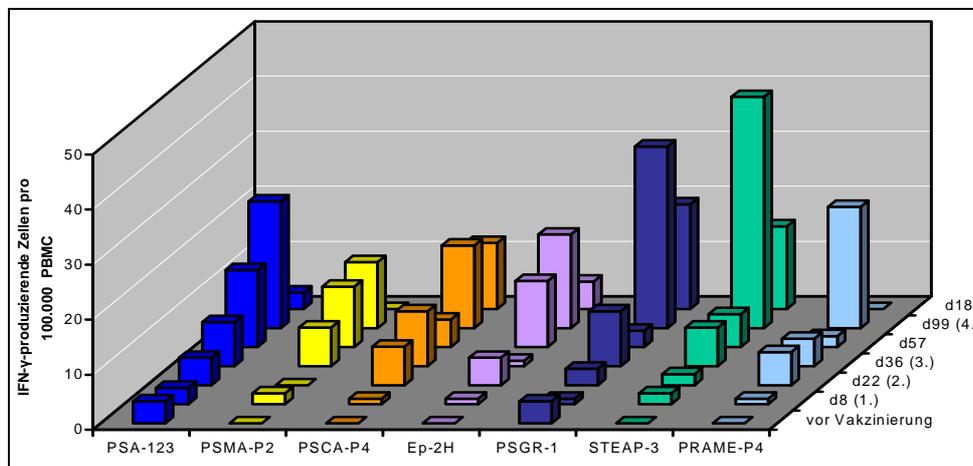
Zwischen der dritten (Tag 36) und der vierten Vakzinierung (Tag 99) war bei fast allen Peptiden ein Rückgang der zu Beginn der Vakzinierung erzielten Reaktivität bei allen Patienten zu messen. Bei vier von sechs Patienten konnte im Verlauf der Vakzinierung eine mehr als zweifache Steigerung der Peptid-spezifischen T-Zellen im ELISPOT im Vergleich zur Situation vor Beginn der Vakzinierung beobachtet werden (Patienten P105, P113, P118 und P125), wobei die Reaktionen auf die jeweiligen Peptide teilweise unterschiedlich ausfielen. In Abbildung 4.29 ist exemplarisch die Zahl der PSGR-1-reaktiven T-Zellen dieser vier Patienten dargestellt.



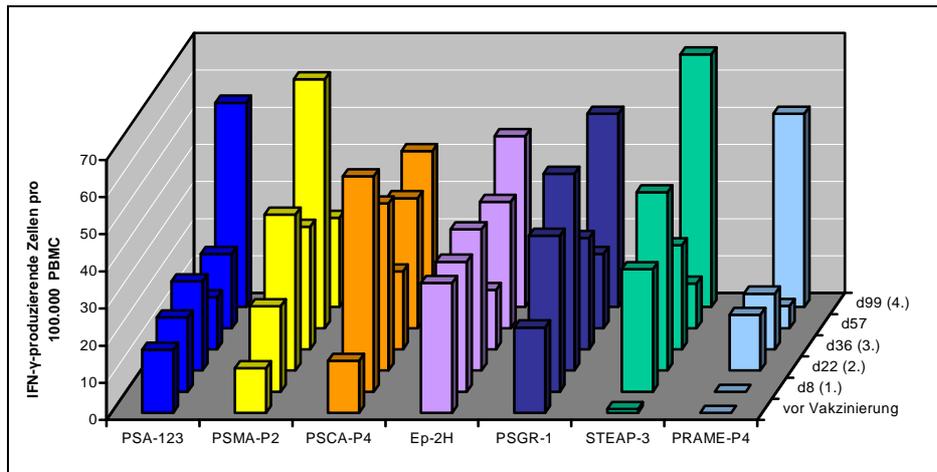
**Abbildung 4.29** : IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC der Patienten P105, 113, 118 und 125 nach Stimulation mit PSGR-1 zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Therapie. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

Bei drei Patienten (P108, P109 und P118) war schon vor Beginn der Vakzinierung eine relevante Reaktion gegen die meisten Peptide zu beobachten.

Zwei Patienten (P105 und P118, Abbildung 4.30 u. 4.31) zeigten im Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der verschiedenen Peptid-spezifischen T-Zellen, wobei allerdings bei Patient P105 die Frequenzzunahme nur bis zum Tag 99 anhielt und anschließend ein deutlicher Frequenzabfall zu beobachten war. Bei Patient P118 konnten schon vor Beginn der Vakzinierung eine relevante Anzahl Peptid-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden, die nach einem vorübergehenden Abfall um Tag 36 bzw. 57 im Verlauf noch deutlich zunahm. Am Tag 99 war bei praktisch allen Peptiden die höchste Frequenz zu beobachten.

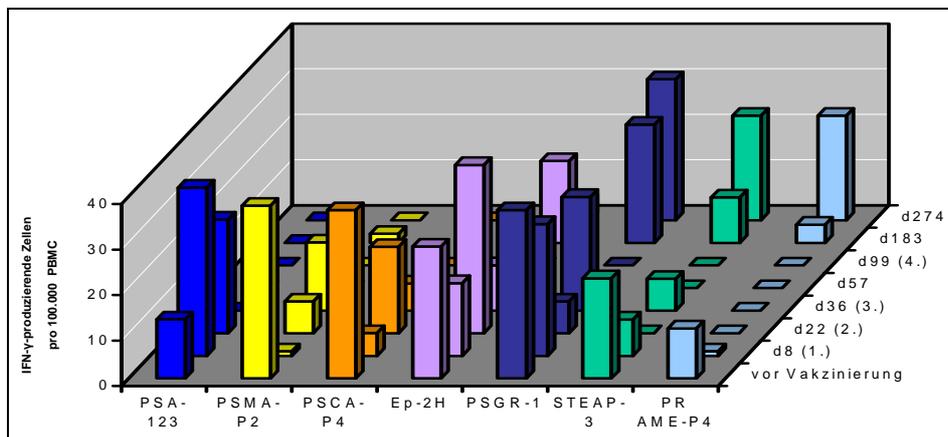


**Abbildung 4.30**: IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC von Patient P105 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.



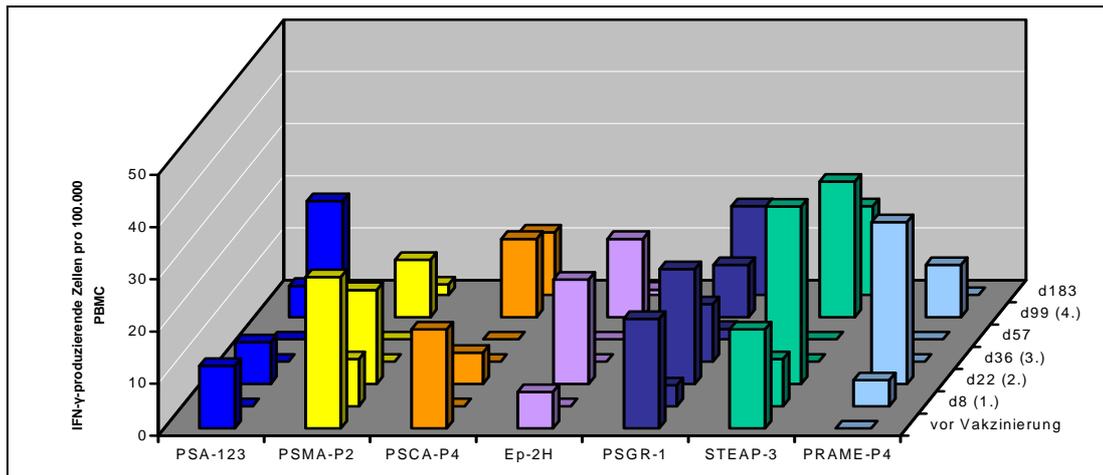
**Abbildung 4.31:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC von Patient P118 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

Die Patienten P108 und P109 (Abbildung 4.32 und 4.33) zeigten beide ein sehr uneinheitliches Muster der unterschiedlichen Peptid-spezifischen T-Zellen, teilweise mit den höchsten Werten vor Beginn der Vakzinierung. Bei Patient P108 fiel die Frequenz der spezifischen T-Zellen zum Ende hin teilweise stark ab mit Ausnahme der Peptide PSGR-1, STEAP-3 und PRAME-P4, bei denen ab Tag 183 ein deutlicher Anstieg beobachtet werden konnte. Bei Patient P109 fallen an den Tagen 36 und 57 vorübergehend minimale Frequenzen für alle Peptide auf.



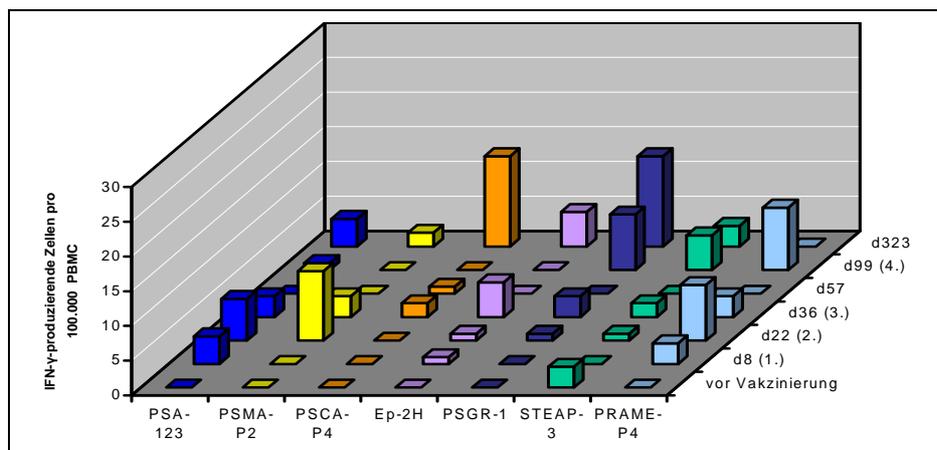
**Abbildung 4.32:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMCs von Patient P108 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 4.33:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMCs von Patient P109 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

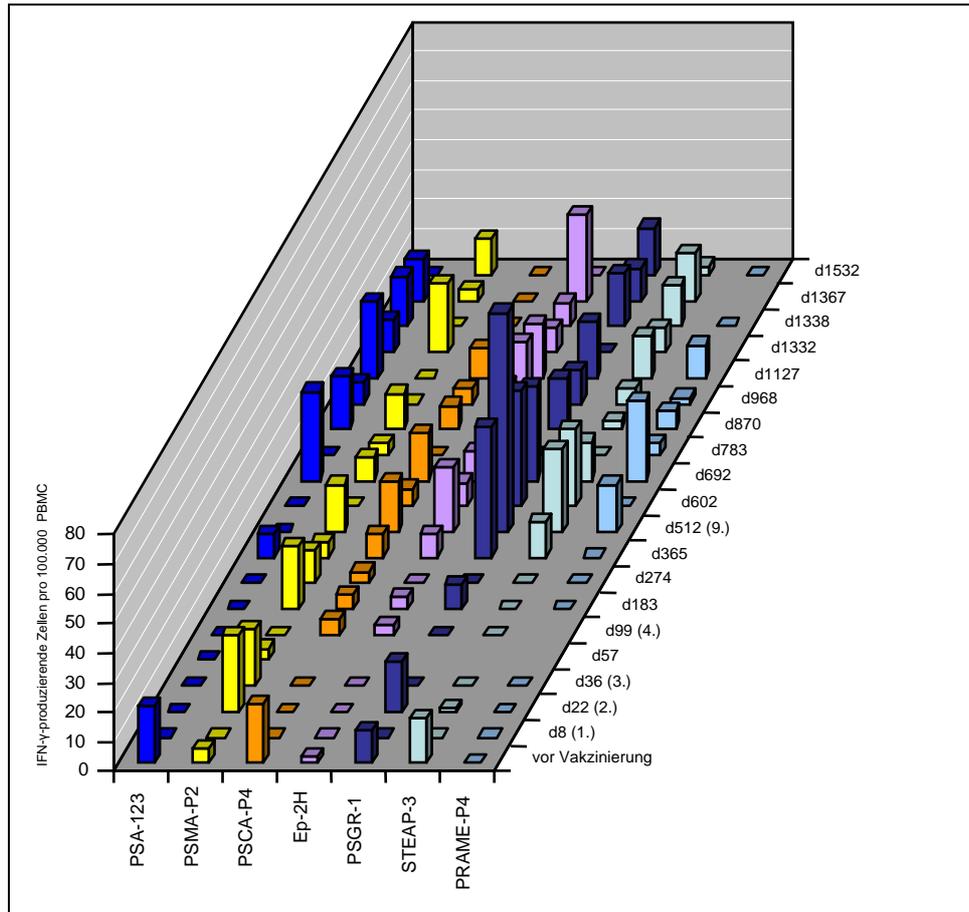
Im ELISPOT von Studienteilnehmer 125, der ein Ansprechen im Sinne eines PSA-Abfalls zeigte, wurden die niedrigsten Frequenzen gemessen, oftmals konnten fast keine IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt ist allerdings ein Trend zu einer größeren Anzahl Peptid-spezifischer T-Zellen zum Ende der Messungen hin zu beobachten (Abbildung 4.34).



**Abbildung 4.34:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC von Patient P125 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

Auch bei Patient P113, der einen spät beginnenden aber lang anhaltenden PSA-Abfall zeigte, konnten gerade zu Beginn meist nur sehr wenige Peptid-spezifische Zellen nachgewiesen werden. Erst zwischen Tag 365 und Tag 692 war dann v. a. bei Inkubation mit den Peptiden STEAP-3 und PSGR-1, im Verlauf auch bei den Antigenen PSA und Ep-2H eine sehr große Anzahl von Spots sichtbar, im Sinne einer positiven immunologischen Reaktion (Abbildung 4.35).

# ERGEBNISSE



**Abbildung 4.35:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMCs von Patient P113 nach Peptidstimulation. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen.

## 5. Diskussion

Trotz intensiver Forschung existieren gegenwärtig noch keine befriedigenden konventionellen Behandlungsmethoden für das hormonrefraktäre Prostatakarzinom. Aus diesem Grund haben neuartige Ansätze große Aufmerksamkeit erlangt, wie z.B. immunmodulierende Therapien. Ausgehend von einer Interaktion der Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems versucht man dieses dahingehend zu modulieren, dass die postulierte Toleranz gegenüber dem Karzinom aufgehoben wird. Folgende Befunde rechtfertigen den Einsatz dieser Methoden beim Prostatakarzinom:

- Es existieren einige Organ-spezifische Moleküle auf Prostatakarzinomzellen (z.B. PSA, PSMA), die als Ziel einer immunmodulierenden Therapie fungieren können (Harris et al., 1999).
- Vergleichbar mit anderen soliden Tumoren ist auch das Prostatakarzinom durch eine Infiltration von Lymphozyten gekennzeichnet, deren Dichte mit der Prognose des Patienten korreliert (Vesalainen et al., 1994). Eine Kontrolle des Tumorwachstums wird wahrscheinlich über die Erkennung tumorassoziierter Antigene auf den Krebszellen und anschließender *in situ* Proliferation von Lymphozyten erreicht. Fehlende TIL sind dabei mit einem erhöhten Risiko für eine Tumorprogression assoziiert.
- Die Verwendung von gentechnisch-modifizierten, immunmodulierenden Tumorzellvakzinen im sog. Dunning Rattenmodell des Prostatakarzinoms konnte eine potente Immunantwort gegen den Tumor hervorrufen (Vieweg et al., 1994).

Bezüglich der unterschiedlichen immuntherapeutischen Methoden liegt ein besonderer Schwerpunkt auf Antitumor-Vakzinierungsstrategien. Mehrere hundert unterschiedliche Vakzinierungsstudien wurden bisher abgeschlossen bzw. befinden sich in Durchführung. Ein klinisch signifikanter Erfolg konnte bisher bei einer überwiegenden Zahl von Patienten nicht erzielt werden (Rosenberg et al., 2004). Für die Evaluierung der Effektivität der Vakzinierung wird daher in den meisten Studien eine Analyse sog. Surrogat-Parameter durchgeführt. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Reaktion der T-Zellen auf die Vakzinierung, da diesen die zentrale Rolle in der Kontrolle bzw. Eliminierung von Tumorzellen zugeschrieben wird (Knuth et al., 1984; Greenberg, 1991).

Nach Coulie & van der Bruggen (2003) müssen zwei Kriterien für eine vakzinespezifische T-Zell-Antwort erfüllt sein. Es muss Hinweise für eine klonale Amplifikation bzw. Vermehrung von vakzinespezifischen T-Zellen geben, und diese T-Zellen müssen eindeutig die tumorassozierten Antigene der Vakzine erkennen. Darüber hinaus ist eine Aussage über die Funktionalität der spezifischen T-Zellen wünschenswert.

Zur Erfüllung dieser Kriterien wird aufgrund der niedrigen Frequenz vakzinespezifischer T-Zellen im Blut eine Kombination mehrerer Methoden als notwendig angesehen.

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojekts „Einsatz einer Zytokin-Gentherapie beim Prostatakarzinom“ erstellt. Das Ziel dieser Arbeit war eine genauere Charakterisierung vakzinespezifischer T-Zellen, insbesondere auf Ebene des TCR. Dazu wurde zunächst das T-Zellrepertoire von *in vitro* mit der Vakzinezelle stimulierten PBMC zweier Spender analysiert. Ebenso wurden TIL eines Tumorrezidivs bzw. Lymphozyten an der Vakzinierungsstelle hinsichtlich ihres TCR-Repertoires charakterisiert. Zur Überwachung einer vakzinespezifischen Immunantwort wurden bei zwei Patienten quantitative TCR-Analysen im Verlauf der Vakzinierung ausgewertet. Eine Analyse des Zytokinmusters im Serum bzw. am Vakzinierungsort der Patienten sollte Aufschluss über die Art der T-Zell-Aktivierung geben. ELISPOT-Untersuchungen wurden schließlich zum Nachweis funktioneller, Tumorantigen- bzw. Gewebe-assoziiertes T-Zellen durchgeführt.

## **5.1 TCR-Repertoire-Analysen nach MLTC-Experimenten mit der Vakzinezelllinie**

Die Interaktion des TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex auf Tumorzellen ist die Voraussetzung für eine immunologische Reaktion von T-Zellen. Ähnlich den Antikörpern der B-Zellen existieren Millionen verschiedene TCR, die sich aus unterschiedlichen V-, D- und J-Segmenten zusammensetzen. Eine Population von T-Zellen kann über die Verwendung der verschiedenen TCR, dem TCR-Repertoire, näher charakterisiert werden. Die Analyse von TCR-Repertoires begründet sich in der Annahme, dass maligne Zellen über auf MHC-I-Molekülen präsentierten, tumorassoziierten Antigenen eine oligoklonale T-Zell-Antwort auslösen, die sich in einem eingeschränkten Gebrauch der variablen Gensegmente der TCR ausdrückt. Nach Maryanski et al. (1996) sind für eine Antigen-getriebene Selektion von TCR ein limitierter J- bzw. D-Segmentgebrauch, eine Einschränkung der CDR3-Länge und eine Konservierung bestimmter Aminosäuren in der CDR3-Region kennzeichnend.

Als Methode der Wahl hat sich dabei die Amplifikation ausgewählter variabler Gensegmentfamilien mit anschließender Analyse der CDR3-Region herausgestellt (Panzara et al., 1992), welche entscheidend für die Erkennung antigener Peptide ist (Jorgensen et al., 1992; Schendel et al., 2000; Jantzer & Schendel, 1998).

Aufgrund des engen Kontakts von TIL mit den Tumorzellen wurden in Folge eine Vielzahl von Primärtumoren bzw. Metastasen auf das Vorhandensein klonaler T-Zellpopulationen untersucht (Übersicht bei Sensi & Parmiani, 1995). Unabhängig von der Tumorentität exprimierten die TIL gewöhnlich dominante TCR-Sequenzen. Beim Melanom konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Antitumor-Antwort von den TIL mit dominanter TCR-

Expression ausgeht. Bisher sind nur wenige Daten zum TCR-Repertoire von Prostatakarzinom-infiltrierenden TIL publiziert worden.

Die durch die Antigenerkennung ausgelöste Selektion und anschließende klonale Expansion von T-Zellen *in vivo* am Ort des Tumors kann *in vitro* mit Hilfe sog. MLTC-Experimenten nachgeahmt werden (Anichini et al., 1993). Bei Vorarbeiten zu einer allogenen Vakzinestudie zum Nierenzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass nach mehrmaliger *In-vitro*-Stimulation in MLTC-Ansätzen die Detektion individueller TCR-Sequenzen durch direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate in einer Population naiver PBL von allogenen HLA-A\*0201 positiven Spendern möglich ist (Jantzer & Schendel, 1998). Bisher gibt es allerdings keine Daten über das TCR-Repertoire bei Kontakt von PBMC mit der Tumorzellvakzine LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$  *in vitro*. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden deshalb *In-vitro*-Stimulationen von Spender-PBL mit der Vakzinezelle durchgeführt und das TCR-Repertoire der T-Zellen untersucht.

Bei beiden Spender-PBL zeigte sich bereits nach wenigen Stimulationszyklen eine deutliche Restriktion des TCR-Repertoires, mehr als 75% der TCR waren nicht mehr bzw. nur noch schwach nachweisbar. Dieses deutet auf eine oligoklonale Antwort bei beiden Spender-PBL hin und ist als Hinweis auf die Existenz eines beschränkten immundominanten Antigenmusters auf der Vakzinezelle zu sehen. Es wurden v.a. die großen variablen TCR-Gensegmentfamilien präferentiell selektioniert. Die Unterschiede in der Auswahl der variablen Gensegmente erklärt sich zum Teil dadurch, dass die Spender mit hoher Wahrscheinlichkeit bis auf den HLA-A\*0201-Lokus nicht haploidentisch waren, so dass unterschiedliche TCR-MHC-Molekül-Interaktionen zustande gekommen sind. Selbst bei Vorhandensein des gleichen MHC-Peptid-Komplexes ist die Expansion identischer T-Zell-Klone mit identischen variablen Gensegmenten insbesondere bei unterschiedlichen Individuen nicht unbedingt die Regel, da der gleiche Komplex von T-Zellen mit unterschiedlichen CDR3-Regionen erkannt werden kann (Hafler et al., 1996). Es konnten insgesamt 12 übereinstimmende variable Gensegmente identifiziert werden:

V $\alpha$  pan1, pan1.1, 2, pan4, 12, 14,14.1

V $\beta$  1, 3, 6/1neu, 6/2/6/3, 13neu

Da die Proliferation der PBL nach drei bis vier Stimulationszyklen jeweils stark abnahm, war eine Aussage über eine zunehmende Restriktion des Repertoires im Zuge weiterer Stimulationen nicht möglich. Die vorhandene Literatur zur Herstellung und Charakterisierung einer PCa-reaktiven T-Zelllinie aus PBMC ist im Vergleich zum Melanom spärlich (Housseau et al., 1999 und 2002) und verdeutlicht die Schwierigkeit der Durchführung von extensiven immunologischen *In-vitro*-Studien und der Identifizierung von immunologischen Effektoren beim PCa.

Aufgrund des bei beiden Spendern eingeschränkten TCR-Repertoires könnte man von gewebe- oder tumorreaktiven T-Zellen ausgehen. Inwieweit diese *in vivo* für die Tumorlyse von Bedeutung sind, lässt sich anhand von MLTC nicht abschätzen. Eine allogene Reaktion ist nicht ausgeschlossen, die teilweise haploidentischen Spender- und Vakzinezellen und die Möglichkeit des *cross-primings* ermöglichen allerdings eine präferentielle autologe Antwort (Huang et al., 1994). Da weder eine zur LNCaP-Vakzine autologe EBV-transformierte, lymphoblastoide B-Zelllinie noch eine autologe Zelllinie aus gesundem Prostataepithel existiert, ist die Differenzierung einer allo-MHC-restringierten von einer autologen MHC-restringierten tumorspezifischen Immunantwort nicht möglich.

Da bei den durchgeführten MLTC-Experimenten bis zum Schluss eine abnehmende Zahl von amplifizierbaren, variablen Gensegmentfamilien zu beobachten war, ist eine weitere Einschränkung des Repertoires bei fortgesetzten Stimulationen mit der Vakzinezelllinie zu erwarten. Durch die Zugabe des bispezifischen, gegen CD3 und Ep-CAM gerichteten Antikörpers *removab*<sup>®</sup> war zwar die gewünschte stärkere Proliferation der PBL auch nach mehr als vier Restimulationen zu erzielen, allerdings ohne Einschränkung bzw. wesentliche Expressionsveränderung im TCR-Repertoire. Dieses ist am ehesten auf eine Antigen-unabhängige, polyklonale Stimulierung und Aktivierung von T-Zellen durch den CD3-Arm des Antikörpers zurückzuführen (Keilholz et al., 2002). Eine dominante Expansion tumorspezifischer T-Zellen wird dadurch wahrscheinlich maskiert. Eine selektive Analyse dieser T-Zellen im Kontext eines dominierenden polyklonalen Hintergrundes ist neuerdings mit Hilfe der MHC/Peptid-Tetramer-Technologie möglich (Altman et al., 1996): Mit Hilfe der sog. Durchflusszytometrie können bei diesem Ansatz Peptid-/MHC-spezifische T-Zellen aus einer Zellmischung (Detektionsgrenze 1:8000 – 1:10000 (Keilholz et al., 2002)) sortiert werden und deren TCR-Repertoire im Anschluss untersucht werden.

Durch Stimulierung von HLA-A\*0201 positiven Spender-PBL mit der Vakzinezelle konnte reproduzierbar eine Einschränkung des TCR-Repertoires erreicht werden, welche auf eine klonale Selektion von T-Zellen als Reaktion auf Tumorzell-Antigene hindeuten könnte.

## 5.2 TCR-Repertoire von TIL des Patienten 109

Bei soliden Tumoren ist häufig eine Infiltration durch T-Zellen zu beobachten. Die Analyse dieser sog. TIL dient der Identifizierung von spezifischen T-Zell-Klonen, die ein gemeinsames Tumorantigen erkennen, ausgehend von der Hypothese, dass es durch eine Tumorantigen-Stimulation zu einer Immunantwort *in situ* kommt, die von oligoklonalen T-Zellen mit einem limitierten TCR-Repertoire dominiert wird. Durch die Identifizierung von spezifischen Tumorantigenen ist eine gezielte Vakzinierung und durch

die Identifizierung von spezifischen TCR-Genen eine gezielte Überwachung der Immunantwort im Zuge der Vakzinierung möglich.

Bislang konnten klonale Expansionen von TIL mit eingeschränktem TCR-Repertoire bei zahlreichen Tumoren gefunden werden (Sensi & Parmiani, 1995; Schendel et al., 1993). Dabei wurden ein bis drei TCR-V $\alpha$ -Gensegment- und TCR-V $\beta$ -Gensegment-Regionen präferentiell exprimiert, allerdings wurde ein differentes Muster interindividuell beobachtet. Zum TCR-Repertoire von TIL beim Prostatakarzinom existierten bislang kaum Daten. Mercader et al. (2001) untersuchten die Frequenzen von variablen TCR-Gensegmentfamilien von PCa-infiltrierenden TIL im Vergleich zu PBL, allerdings konnten Frequenzen von nur drei V $\beta$ -Familien untersucht werden.

Bei Patient P109 gelang die Kultivierung und Analyse von TIL aus einem unter Vakzinetherapie entstandenen lokalen Prostatakarzinomrezidiv. Im Vergleich zu den PBL des Patienten fand sich *in situ* ein deutlich restringiertes TCR-Repertoire mit Nachweis von nur sechs V $\alpha$ - und zehn V $\beta$ -Gensegmentfamilien. Dieses lässt darauf schließen, dass auch beim Prostatakarzinom die Immunantwort *in situ* von oligoklonalen T-Zellen dominiert wird. Bei Zuhilfenahme des bispezifischen Antikörpers *removab*<sup>®</sup> zur Expansion der wenigen TIL war die Einschränkung des TCR-Repertoires weniger deutlich. Wahrscheinlich wird auch bei den TIL durch eine Antikörperzugabe die polyklonale Expression unspezifischer T-Zellen gefördert.

Diese Daten stehen im Widerspruch zu der Arbeit von Ebelt et al. (2007), die das TCR-Repertoire von PCa-infiltrierenden TIL mit den infiltrierenden Lymphozyten in gesundem Prostatagewebe verglichen hatten. Es zeigten sich in beiden Gruppen durchweg polyklonale TCR-Repertoires und damit keine Hinweise auf eine klonale Selektion von tumorreaktiven Lymphozyten im untersuchten Prostatakarzinomgewebe. Unterschiede im Tumorstadium und Krankheitsverlauf der untersuchten Tumorpatienten bzw. in der Methodik könnten für die widersprüchlichen Daten verantwortlich sein. Die Tumorproben von Ebelt et al. stammten alle von kurativ operierten Patienten, bei denen keine weitere Therapie notwendig war. Damit ist im Gegensatz zu Patient 109 von einer geringeren Tumormasse zum Zeitpunkt der Untersuchung auszugehen. Bei Patient 109 bestand zudem ein weit fortgeschrittenes Tumorleiden und er stand unter einer Immuntherapie, was bedeuten könnte, dass ein intensiverer Kontakt des Tumors mit dem Immunsystem vorliegt. Die für das TCR-Repertoire verwendete RNA wurde in den Experimenten von Ebelt et al. nicht wie bei Patient 109 aus unter IL-2-Gabe ausgewanderten Lymphozyten gewonnen, sondern direkt aus den Kryoschnitten des Prostatakarzinomgewebes extrahiert. Ein Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das TCR-Repertoire der TIL von Patient 109 wäre ebenfalls denkbar.

## DISKUSSION

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse im Kontext der unter 5.1 diskutierten Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei im Gegensatz zu den MLTC-Experimenten mit der Vakzinezelle um ein autologes Szenario handelt. Sollte es unter den verbliebenen TCR-Familien einen charakteristischen TCR mit stark konservierter CDR3-Region geben, so ist dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen ein bestimmtes Tumorantigen auf HLA-Klasse-I-Molekülen des Prostatakarzinom von P109 gerichtet, eine Allospezifität ist demnach ausgeschlossen.

Die mit Hilfe von *removab*<sup>®</sup> expandierten TIL wurden im Folgenden MLTC-Experimenten mit der Vakzinezelle unterzogen und die Veränderungen des TCR-Repertoires analysiert. Dabei waren eine weitere Restriktion des Repertoires im Laufe der Stimulationen, aber auch eine veränderte Zusammensetzung zu beobachten. Sowohl bei den V $\alpha$ - als auch bei den V $\beta$ -Familien konnte eine Expressionszunahme von einigen variablen Gensegmenten verfolgt werden, die bei den ursprünglichen TIL nicht oder nur sehr schwach nachweisbar waren (Tabelle 5.1).

TIL P109	Nachweisbare V $\alpha$ -Amplifikate
ohne Antikörper (d 35)	pan1, pan1.1, pan2, pan4, pan8, 28
mit Antikörper (d 35)	pan1, pan1.1, pan2, 3, 6neu, pan8, 10, 14, 14.1, 17, 21, 22, 23, 30
nach acht Stimulationen	pan2, 3, pan4, 6neu, pan8, 12, 14, 14.1, 30

TIL P109	Nachweisbare V $\beta$ -Amplifikate
ohne Antikörper (d 35)	2 6/1neu, 6/2/6/3, 8.S3, 9neu, 12.S3, 13.S5, 13.1, 13.2, 13neu,
mit Antikörper (d 35)	1, 2, 3, 5.1, 6/1neu, 6/2/6/3, 8, 8.S3, 9neu, 12.S3, 13.S5, 13.2, 13neu, 18, 22/3
nach acht Stimulationen	4, 5.1, 7, 8.S3, 13.S5, 13.1, 13.2, 13neu, 18

**Tabelle 5.1:** Vergleich der nachweisbaren V $\alpha$ /V $\beta$ -Amplifikate der TIL des Patient P109 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Rot markiert wurden die stark exprimierten Amplifikate.

Denkbar wäre neben einer Reaktion auf allogene Oberflächenantigene die Erkennung tumorassoziierter Peptide auf der Vakzinezelle, die auf den autologen Prostatakarzinomzellen des Patienten fehlten. Gleichzeitig ist das Vorhandensein von gemeinsamen, dominant exprimierten variablen Gensegmenten als Indiz für übereinstimmende Antigene auf der Vakzinezelle und den PCa-Zellen des Patient P109 zu werten. Möglich ist allerdings auch eine Veränderung des Repertoires als Folge der langen Kultivierungsdauer unter IL-2 (Belldegrun et al., 1989).

Zusammenfassend erscheint auch beim PCa ein T-Zell-Pool von limitierter Spezifität an der Tumorantwort *in situ* beteiligt zu sein.

### 5.3 TCR-Repertoire am Vakzinierungsort

Beim Melanom konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der variablen Gensegmentfamilien der TIL als Reaktion auf eine Vakzinierungsstrategie verändert und die nach Vakzinierung untersuchten Tumorbiopsien oft dominante T-Zellklone enthalten (Sensi et al., 1998). Die Vakzine-induzierte Immunstimulation führt somit zu einer Selektion von T-Zellklonen mit hoher Avidität und verstärkter Tumorreaktivität innerhalb einer polyklonalen Population (Valmori et al., 2002). In Analogie zu Untersuchungen an TIL kann die TCR-Repertoire-Analyse an der Vakzinierungsstelle Aufschluss über induzierte T-Zell-Antworten geben, die potenziell zytotoxisch für den Tumor sind.

Bei zwei nach der 3. Vakzinierung entnommenen Hautbiopsien am Vakzinierungsort (Patienten P182 und P184) zeigten sich mit Hilfe der RT-PCR allerdings keine Repertoireunterschiede im Vergleich zu den PBL der Patienten, eine eindeutige Mehrexpression einzelner variabler Gensegmentfamilien konnte mit dieser Methode nicht beobachtet werden. Die Expression multipler Antigene durch die für die Vakzinierung verwendete Tumorzelllinie induziert wahrscheinlich eine Selektion zahlreicher zytotoxischer T-Lymphozyten mit einer divergierenden Spezifität. In der Literatur wird die Identifizierung von klonalen T-Zellexpansionen alleine unter Zuhilfenahme der semiquantitativen PCR nur selten beschrieben (Weidmann et al., 1993; Ferradini et al., 1993; Schendel et al., 1993). Meist stellen sich die untersuchten TCR-Repertoires von TIL bzw. von T-Zellen am Vakzinierungsort als ebenso pleomorph dar wie die von autologen PBL. Es sind daher weitere Schritte notwendig, wie etwa die Verteilungsanalyse der CDR3-Länge mittels fluoreszierender Primer (sog. *CDR3-Spectratyping* bzw. *Immunoscope* (Pannetier et al., 1995)) oder Peptid/MHC-Tetramer basierte Ansätze. Eine weiterführende TCR-Analyse der infiltrierenden T-Zellen an den Vakzinestellen dieser Patienten war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Bei Patient P113, der eine sehr ausgeprägte lokale Hautreaktion auf die Vakzinierungen zeigte, standen leider *ex vivo* nicht genügend ausgewanderte Lymphozyten für eine weitere TCR-Repertoire-Analyse zur Verfügung. Das restringierte Repertoire (Tabelle 5.2) nach einmaliger Stimulation mit der Vakzinezelllinie kann daher nur eine eingeschränkte Aussage über evtl. vorhandene klonale T-Zellexpansionen im Bereich der ausgeprägten Hautreaktion machen, bestätigt aber die schon bei den Spender-PBL zu beobachtende oligoklonale Antwort auf die Vakzinezelle als Ausdruck einer reaktiven spezifischen Antitumorantwort.

P113	
V $\alpha$ -Amplifikate	pan1, pan1.1, pan2, 3, 6neu, pan8, 11, 14, 14.1, 16, 21, 22
V $\beta$ -Amplifikate	2, 3, 4, 5.1, 5.2/5.2T, 6/1neu, 6/2/6/3, 7, 8, 10, 13.S1, 13.2, 13neu, 18, 22/3

**Tabelle 5.2:** Dargestellt sind die deutlich exprimierten V $\alpha$ /V $\beta$ -Amplifikate der kutanen T-Zellen von Patient P113 nach einmaliger Stimulation mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$

## 5.4 Analyse dominanter TCR und molekulares *Tracking* während der Vakzinierung

Aufgrund der bisher klinisch kaum zu quantifizierenden Effekte von Antitumor-Vakzinierungen ist die Entwicklung von verlässlichen immunologischen *Monitoring*-Methoden ein zentrales Ziel der aktuellen Tumorforschung. Die Identifizierung und Verlaufskontrolle einer definierten Antitumor-T-Zellantwort *ex vivo* sollte zu verbesserten therapeutischen Strategien gegen Tumoren führen.

Frankenberger et al. (2005) beschreiben einen TIL-Klon bei einem Nierenzellkarzinom-Patienten, dessen hoch konservierter TCR auch von allogenen PBMC nach Stimulation mit der Nierenzellkarzinom-Zelllinie (RCC-26 Zelllinie) des besagten Patienten exprimiert wird. Mit Hilfe quantitativer PCR-Methoden (sog. *real-time* Ansatz) sollte eine Identifizierung und Verlaufskontrolle dieses hoch konservierten TCR und damit des zugehörigen T-Zell-Klons im peripheren Blut während einer Vakzinierung mit der RCC-26 Zelllinie möglich sein.

Bei den mit der LNCaP-Vakzinezelllinie stimulierten HLA-A\*0201 positiven Spender-PBL (#56 und #278), den hautinfiltrierenden Lymphozyten von Patient P113 und den TIL von P109 konnte eine Einschränkung des TCR-Repertoires beobachtet werden, was möglicherweise auf eine klonale Selektion von T-Zellen als Reaktion auf Tumorantigene hindeutet. Ein Ziel dieser Arbeit war es, T-Zell-Klone anhand ihres spezifischen TCR zu identifizieren und ihre Reaktion auf die Vakzine im peripheren Blut zu verfolgen.

Die dominierenden Banden wurden entsprechend dem obigen Ansatz sequenziert. Dabei konnten teilweise dominante Sequenzen mit eindeutiger CDR3-Region gefunden werden, die auf eine klonale Expansion hindeuten. Bei den untersuchten V $\alpha$ -Amplifikaten konnten keine bei allen Spendern übereinstimmenden dominanten Sequenzen gefunden werden. Bei teilweise identischen variablen Gensegmentfamilien unterschieden sich jeweils die J-Segmente und damit die CDR3-Regionen. In einer unspezifischen entzündlichen Zellpopulation wäre auf jeden Fall eine weitaus größere Diversität als die beobachtete zu erwarten gewesen. Aufgrund der differentiellen HLA-Merkmale der Spender bzw. Patienten könnte eine Erkennung unterschiedlicher MHC/Antigenkomplexe dafür verantwortlich sein. Allerdings sind auch bei HLA-A2-restringierten CTL-Klonen verschiedener Patienten, die alle spezifisch dasselbe Melanom-Antigen erkennen und demnach homologe CDR3-Sequenzen aufweisen sollten, keine vollständige Übereinstimmung im Gebrauch der variablen Gensegmente und der CDR3-Region zu beobachten (Sensi et al., 1995). Vorstellbar wäre eine Erkennung überlappender Anteile desselben Antigens präsentiert von demselben HLA-Molekül und daher eine Verwendung einiger weniger TCR V-Regionen. Diese Annahme wurde durch Arbeiten beim Ovarialkarzinom bestätigt

(Peoples et al., 1994). Beim Prostatakarzinom sind bislang nur wenige Daten über tumorspezifische T-Zellen mit charakteristischem homologen TCR bekannt (Housseau et al., 2002). Ein Vergleich der hier erzielten Sequenzen der Patienten P113 und P109 mit existierenden Daten ist daher nicht möglich.

Auch bei der Sequenzierung der V $\beta$ -Amplifikate konnten dominante Sequenzen gefunden werden, die auf eine klonale Expansion hindeuten. Eine unter den Patienten bzw. Spendern übereinstimmende Sequenz konnte nicht identifiziert werden. Der Nachweis zweier identischer CDR3-Sequenzen für die mit den Primern V $\beta$ 18 und V $\beta$ 9neu amplifizierten Produkte sowohl in den ursprünglichen TIL von P109 als auch in den TIL nach Stimulation mit der Vakzinezelle spricht für zwei dominante T-Zellklone in dieser Population. Für den Klon V $\beta$ 9S1A1T-D $\beta$ 2.1-J $\beta$ 2.2 konnte nur in den ursprünglichen TIL mittels PCR eine deutliche Expression beobachtet werden, dieser Klon spielte für die Immunantwort auf die Vakzinezelle in den nachfolgenden Stimulationsexperimenten eine untergeordnete Rolle, verdeutlicht durch den Expressionsverlust im Laufe der Stimulationen. Der V $\beta$ 18-Klon hingegen könnte aufgrund der durchweg starken Expression gemeinsame Antigene auf den PCa-Zellen von P109 und der Vakzinezelllinie erkennen.

Das TIL-Infiltrat beim PCa besteht demnach bei zumindest einem Patienten aus oligoklonalen T-Zellverbänden. Gleichzeitig lassen sich durch die Vakzinezelllinie oligoklonale Expansionen von T-Zellen *in vitro* erreichen. Weitere Experimente in der Arbeitsgruppe werden Aufklärung darüber geben, ob diese Klone auch eine funktionelle Tumorspezifität aufweisen.

In Arbeiten beim Nierenzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass nach mehrmaliger *In-vitro*-Stimulation mit einer genmodifizierten Nierenzellkarzinom-Zelllinie in MLTC-Ansätzen die Detektion homologer TCR-Sequenzen durch direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate in einer Population von Gedächtniszellen wie auch *de novo* in naiven PBL von allogenen HLA-A\*0201 positiven Spendern möglich ist. Die Verwendung J-Region-spezifischer Primer und die Hybridisierung homologer CDR3-Regionen mit verschiedenen Oligonukleotiden war nicht notwendig (Jantzer & Schendel, 1998). Der Nachweis von homologen TCR-Sequenzen, die mit einer spezifischen Immunantwort assoziiert sind, erlaubt die Verwendung dieser tumorspezifischen TCR-Sequenzen als geeigneten Marker, um den Verlauf einer tumorspezifischen Immunantwort während Vakzinierungsstudien verfolgen zu können.

Da für die meisten Studienpatienten keine charakteristischen TCR-Sequenzen zur Verfügung standen, wurde jeweils eine komplette TCR-Analyse der PBL zu verschiedenen Studienzeitpunkten durchgeführt.

Das TCR-Repertoire der Studienpatienten zeigte an Hand der mittels RT-PCR gewonnenen Expressionsnachweise im Laufe der Vakzinierung keine signifikanten Veränderungen. Aufgrund des kaum eingeschränkten Repertoires war zu erwarten, dass für das Rearrangement diverse V- und J-Segmente verwendet worden waren. Eine Sequenzierung würde eine kaum lesbare Mischsequenz aller vorhandenen Gensegmente ergeben und wurde daher nicht durchgeführt. Dieses verdeutlicht die Schwierigkeit tumorspezifische T-Zellklone anhand der Frequenz spezifischer TCR-Sequenzen mit Hilfe eines semiquantitativen Reaktionssystems und familienspezifischer Primer vor dem zahlenmäßig weit überlegenen polyklonalen Hintergrund des peripheren Blutes nachweisen zu können. Weidmann et al. (1993) konnten in einem Vakzinierungsexperiment beim familiären Nierenzellkarzinom während der Therapie vorübergehend eine moderate Einschränkung des TCR- $\beta$ -Repertoires der PBMC des Patienten beobachten, allerdings lag hier durch den systemischen Einsatz von IL-2 ein weitaus größerer Immunstimulus vor als bei dem hier verwendeten Vakzinierungsprotokoll. Auch bei einer Melanomstudie (Waanders et al., 1997) konnte ein aus einer Biopsie vom Vakzinierungsort isolierter T-Zellklon mit charakteristischem TCR nicht im Blut identifiziert werden. Die Expansion dieses Zellklones *in vivo* war für eine Detektion im peripheren Blut nicht ausreichend.

Es sind daher eine sensitivere Quantifizierung und CDR3-spezifische TCR-Primer notwendig. Mit Hilfe der *Real-time*-PCR ist bei Kenntnis eines CDR3-spezifischen TCR-Primers eine sensitive Verlaufskontrolle der Frequenzen tumorspezifischer T-Zellen möglich. Durch die vorangegangenen *In-vitro*-Experimente standen für zwei Studienpatienten (Patienten P109 und P113) die Sequenzen mehrerer dominanter CDR3-Regionen zur Verfügung (Abbildungen 5.1 und 5.2). Bei beiden Patienten konnten im Blut die ausgewählten TCR-Segmente im Verlauf der Vakzinierung zu den meisten Zeitpunkten nachgewiesen werden, allerdings in insgesamt nicht relevant veränderter Frequenz.

#### **TIL P109**

**TCR BV18S1 DB1.1 JB1.5 (Primer: V $\beta$ 18)**

TTC TGT GCC AGC TCA CTC AAG ACA **GGG** AAC AAT CAG CCC CAG CAT TTT GGT GAT GGG ACT

**TCR BV9S1A1T DB2.1 JB2.2 (Primer: V $\beta$ 9neu)**

TTC TGT GCC AGC AGC CAA GCT **AGC** **GGA** AAC GGG GAG CTG TTT TTT GGA GAA GGC TCT

**Abbildung 5.1:** Sequenzen der mittels *Real-time*-PCR untersuchten V $\beta$ -Amplifikate der TIL des Patient P109. **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen; **Fettdruck:** D-Segment.

**Hautbiopsie P113****TCR AV11S1 JA31 (Primer V $\alpha$ 11)**TAC TGT GCT GCC CGG AAT AAC AAT GCC AGA CTC ATG TTT GGA GAT GGA ACT**TCR ADV14S1 JA43 (Primer V $\alpha$ 14.1)**TTC TGT GCT TAT AGC CAC TAC AAT AAC AAT GAC ATG CGC TTT GGA GCA GGG ACC**TCR AV16S1 JA44 (Primer V $\alpha$ 16)**TTC TGT GCT GTG AGA GAC GAA GGC ACC GGC ACT GCC AGT AAA CTC ACC TTT GGG ACT GGA  
ACA

**Abbildung 5.2:** Sequenzen der mittels *Real-time*-PCR untersuchten V $\alpha$ -Amplifikate der kutanen T-Zellen von Patient P113 nach einmaliger Stimulation mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$ . **Blaue Markierung:** konserviertes Cystein bzw. J-Core-Sequenz; **Rote Markierung:** CDR3-Region; **Unterstrichen:** N-Additionen.

Einzig bei Verwendung der Primer V $\alpha$ 14.1/J $\alpha$ 43 zeigte sich bei Patient P113 ein geringer kontinuierlicher Anstieg der Expression bis Tag 183 mit einem anschließenden Abfall am Tag 602. Letzterer könnte mit einer im Verlauf der Tumorerkrankung entstehenden progressiven Immunsuppression vereinbar sein. Ein ähnlicher Verlauf ist für die IFN- $\gamma$ -Antwort von PBL auf Vakzinelysate bei PCa-Patienten beschrieben, die wie Patient P113 auf eine allogene PCa-Vakzine angesprochen hatten (Michael et al., 2005). Da Patient P113 auf die Vakzine im Sinne einer partiellen Remission reagiert hatte, kann eine fehlende Frequenzänderung der untersuchten TCR-Sequenzen auf eine nicht relevante funktionelle Kapazität dieser T-Zellklone im Rahmen der Immunantwort gegen die Vakzinezelle bzw. den Primärtumor hindeuten. Allerdings ist selbst beim Melanom, dem nach heutigem Kenntnisstand weitaus immunogeneren Tumor, im Laufe der Vakzinierung nur eine minimale bzw. keine TCR-Expressionsveränderung bei PBL zu beobachten, selbst für TCR-Familien, die lokal im Tumor während der Vakzinierung bzw. an der Vakzinierungsstelle deutlich zugenommen haben (Sensi et al., 1997; Waanders et al., 1997). Eine fehlende Repertoireveränderung im Blut könnte demnach auch auf eine selektive Rekrutierung von tumorspezifischen PBL aus dem Blut und anschließende lokale *in situ* Expansion hinweisen, eine Veränderung der Frequenz tumorspezifischer CDR3-Regionen im Blut wird dadurch verhindert. Eine weitere Erklärung wäre das Phänomen des sog. *epitope spreading*: der initiale Angriff der Tumorzellen durch Vakzine-induzierte und damit Vakzine-spezifische T-Zellen induziert nachfolgende T-Effektorzellen mit anderweitigen Spezifitäten, so dass die Frequenz der Vakzine-spezifischen TCR-Sequenzen abnimmt (Disis et al., 2002; Weber J et al., 2003). Zudem könnten für die *in vitro* dominierenden T-Zell-Klone die geeigneten Antigen- bzw. Zytokinbedingungen *in vivo* gefehlt haben.

Eine alternative Verlaufskontrolle der T-Zellantwort im Laufe einer Vakzinierung an Hand ausgewählter TCR-Frequenzen ist mit Hilfe der MHC/Peptid-Tetramer-Technologie und

des *Immunoscope*-Ansatzes beschrieben (Lim et al., 2002; Valmori et al., 2002; Rufer, 2005). Dabei werden Peptid-spezifische T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren von den PBL getrennt, um anschliessend mittels Analyse der CDR3-Region genauer charakterisiert werden zu können. Dabei ist allerdings die Kenntnis von spezifischen Tumorantigenen notwendig.

## 5.5 Analyse des Zytokinmilieus am Ort der Vakzinierung

Das Immunsystem kommt an der Vakzinierungsstelle zum ersten Mal mit der Tumorzelle in Berührung. Eine Analyse dieser Reaktion vor Ort kann erste Aufschlüsse über die Qualität der immunologischen Antwort gegen die Tumorzellen geben, beispielsweise über die Art der T-Helferzell-Antwort. Anhand von Tierstudien, präklinischen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein TH1-Profil, d.h. eine Dominanz der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , für eine effektive Tumorantwort notwendig ist (Lucey et al., 1996; Nishimura et al., 2000; Song et al., 2000; Hu et al., 1998; Schuler-Thurner et al., 2002; Winter et al., 2003; Tatsumi, Gambotto et al., 2002; Chang et al., 2003). Die Beobachtungen, dass beim Melanom und Nierenzellkarzinom eine progrediente Tumorerkrankung durch ein TH2-Profil gekennzeichnet ist (Tatsumi, Kierstead et al., 2002) und dass immuntherapeutische Ansätze, die einen Wechsel des dominierenden Zytokinmusters von einer TH2- auf eine TH1-Antwort bewirken, eine effektive Antitumor-Antwort hervorrufen können (Hu et al., 1998), unterstreichen dieses zusätzlich. Die Verwendung einer mit den Genen für IL-2 und IFN- $\gamma$  transduzierten Tumorzelllinie in der LNCaP-Prostatakarzinomstudie ist u.a. durch diese Ergebnisse begründet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Zytokinmuster am Ort der Vakzinierung bei drei Studienpatienten untersucht werden, bei Patient P113 im Anschluss an die 9. Vakzinierung, bei den Patienten P182 und P184 nach der dritten Vakzineapplikation. Patient P113 zeigte eine partielle Remission mit Abfall des PSA-Wertes unter den Ausgangswert zu Beginn der Studie, zudem eine ausgeprägte lokale Hautreaktion an der Vakzinierungsstelle (Abbildung 5.3).

Bei Patient P113 ergab die CBA-Analyse der Überstände von den ausgewanderten Lymphozyten nach Kurzzeitstimulation mit der Vakzinezelllinie einen überwiegenden Nachweis von IL-4, IL-5 und IL-10 bei geringem bzw. fehlendem Nachweis von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ . Dieses würde für eine dominante TH2-Antwort am Ort der Vakzinierung sprechen. IL-4 bewirkt eine B-Zell-Aktivierung mit dominanter Sekretion von IgE- und IgG-Antikörpern, zudem ist es für die Rekrutierung von Eosinophilen aus dem Blut verantwortlich (Schleimer et al., 1992), IL-10 inhibiert die Aktivierung von Makro-



**Abbildung 5.3:** Hautreaktion Patient P113 jeweils 48h nach Vakzinierung; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bernd Gänsbacher und Dr. Thomas Brill, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

phagen und TH1-Zellen und bewirkt eine verstärkte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. In der histologischen Aufarbeitung der Hautbiopsie konnten in Korrelation zu den deutlich erhöhten IL-5-Werten überproportional viele eosinophile Granulozyten gefunden werden. Bei der Analyse der T-Zellen nahmen die CD4-Zellen gegenüber den CD8 Zellen im Verlauf der Vakzinierungen bis zu einer Ratio von 4:1 zu (Daten des Instituts für Pathologie, Prof. Dr. F. Fend, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München).

Die Zytokinanalyse der Hautbiopsie von Patient P184 mittels *BioPlex*-Kit zeigte ein ähnliches Muster mit Vorherrschen der TH2-Antwort-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 im Vergleich zu IL-2 und TNF- $\alpha$ . Deutlich erhöhte Werte von IL-6 und MCP-1 untermauern das Überwiegen von TH2-Zellen. Beide Moleküle werden unter anderem von Keratinozyten als Reaktion auf eine Entzündung sezerniert und fördern eine Differenzierung von CD4-positiven T-Zellen zu TH2-Zellen. IL-6 scheint eine wichtige Rolle bei Differenzierung und Wachstum des PCa zu spielen (Okamoto et al., 1997). Es wurden erhöhte IL-6-Werte im Serum und in Gewebeproben bei Patienten mit hormonrefraktärem PCa im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten mit lokalisiertem PCa beschrieben (Hobisch et al., 2000). Der IL-6-Spiegel im Serum korreliert außerdem mit der Tumorlast bzw. mit dem Vorhandensein von Metastasen (Drachenberg et al., 1999; Adler et al., 1999).

Bei Patient P182 hingegen waren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 im Überstand kaum bzw. gar nicht nachweisbar. Ein eindeutig TH1-assoziiertes Muster ließ sich aber auch hier aufgrund des gleichwertigen Nachweises von MCP-1, IL-6 und IL-2 nicht festlegen. Zur genaueren Charakterisierung müsste hier eine kombinierte Analyse der Oberflächenmarker und intrazellulär angereicherten Zytokine in einer Multiparameter-Durchflusszytometrie durchgeführt werden, was jedoch aufgrund der geringen Zellzahl nicht möglich war.

Interessanterweise hatten die Patienten P113 und P184 auf die Vakzine angesprochen, dokumentiert durch einen >50%igen PSA-Abfall (siehe Abbildung 5.6 bzw. persönliche Mitteilung durch Dr. T. Brill), trotz des Vorliegens eines an sich für die Tumorabwehr ungünstigeren TH2-Profiles an der Vakzinierungsstelle. Die PSA-Werte von Patient P182, der zumindest keine Dominanz der TH2-assoziierten Zytokine zeigte, waren während der Studie nur vorübergehend über sechs Wochen stabil geblieben, bevor es zur Progredienz der Erkrankung kam. Diese Ergebnisse stehen in scheinbarem Widerspruch zu den anfangs genannten Daten, die eine notwendige Dominanz der TH1-Anwort für eine erfolgreiche Tumorabwehr postulieren.

Die Rolle der TH2-Antwort im Rahmen der Tumorabwehr soll im Folgenden näher beleuchtet werden. In Übereinstimmung mit den histologischen Daten von Patient P113 konnten auch Simons et al. (1999) nach Vakzinierung mit einer GM-CSF- (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) transduzierten autologen Prostatakarzinomzelllinie eine massive Akkumulation von Eosinophilen mit Zeichen der Aktivierung und Degranulation am Ort der Vakzinierung feststellen, die im Verlauf der Studie sogar noch zunahm. Ähnliche Reaktionen finden sich auch bei einer Studie mit GM-CSF-transduzierten autologen Nierenzellkarzinomzellen (Simons et al., 1997). Zytokinanalysen liegen bei diesen Studien zwar nicht vor, allerdings könnte aufgrund der Eosinophilie vergleichbar zu den Daten der Patienten P113 und P184 eine Erhöhung von IL-5 vorliegen. Soiffer et al. (1998) fanden nach Vakzinierung mit einer autologen GM-CSF-sezernierenden Melanomzelllinie neben reichlich Eosinophilen an der Vakzinierungsstelle zudem eine Eosinophilie im peripheren Blut und eine Beteiligung von Eosinophilen an der Zerstörung der Tumervaskularisierung in Biopsien von Metastasen. Im Überstand der gegen die Vakzinezelllinie stimulierten PBMC induzierte die Vakzinierung bei neun von zehn Patienten beträchtliche Spiegel von IL-5 bei vernachlässigbarer Veränderung der IFN- $\gamma$ -Werte. In einer allogenen Vakzinierungsstudie beim Prostatakarzinom konnte im Rahmen der Quantifizierung der intrazellulären Zytokinantwort im Blut der Studienpatienten neben einem Anstieg von IL-2 und IFN- $\gamma$  auch eine nicht unerhebliche Menge an IL-4 gemessen werden und dies bei Patienten, die *in vitro* eine starke T-Zellproliferation als Reaktion auf die Vakzine zeigten (Eaton et al., 2002). In einer weiteren allogenen Prostatakarzinom-Vakzinierungsstudie (Michael et al., 2005) konnte in der Zytokinanalyse von PBMC nach Stimulation mit Vakzinelysat keine eindeutige Polarisation in Richtung TH1- oder TH2-Profil festgestellt werden, die auf die Vakzine ansprechenden Patienten unterschieden sich von den Therapieversagern anfangs nur durch ein erhöhtes Level aller gemessenen Zytokine. Eine polarisierte Sichtweise, die zwingend eine uniforme TH1-T-Zellantwort in allen Bereichen als Voraussetzung für eine

effektive Antitumor-Reaktion ansieht, wird deshalb den tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* nicht gerecht: Hung et al. (1998) konnten bei Mäusen zeigen, dass eine GM-CSF-transduzierte Tumorzellvakzine tumorspezifische CD4-Zellen am Ort des Tumors so aktivieren kann, dass diese gleichzeitig eine TH1- und TH2-Antwort induzieren. Bei IL-4-defizienten Mäusen war die durch die Vakzine zu erreichende protektive Immunität im Vergleich zu den Wildtypmäusen um 50% reduziert. Die Biopsie im Bereich der s.c. injizierten Tumorzellen zeigte nach Vakzinierung eine prominente Infiltration mit Eosinophilen. Deren Bedeutung für die Antitumor-Antwort wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass bei IL-5-defizienten Mäusen ein Fehlen der Eosinophilen auch mit einem Verlust der systemischen Tumorimmunität nach Vakzinierung verbunden war.

Bei TIL im Bereich von Melanommetastasen konnte nach Vakzinierung in Bezug auf die sezernierten Zytokine ein deutlicher Nachweis von IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  und auch in beträchtlichem Maße IL-10 gezeigt werden, also einem undifferenzierten T-Helferzellprofil entsprechend (Soiffer et al., 1998). Von IL-10, einem TH2-assoziierten Zytokin ist bekannt, dass es die Expression von TH1-assoziierten Zytokinen herabregulieren und die immunsupprimierende Aktivität von TGF- $\beta$ , welcher unter anderem von Tumorzellen sezerniert wird, steigern kann (Cottrez & Groux, 2001). Gleichzeitig kann IL-10 aber auch die Tumorabwehr unter gewissen Umständen fördern und durch Aktivierung von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen Lymphozyten zu einer aktiven Tumorantwort beitragen (Adris et al., 1999; Huang et al., 1999; Groux et al., 1999; Mocellin, Panelli et al., 2003). Ein gemischtes T-Helferzell-Profil nach Vakzinierung ließ sich auch in Metastasen in mehreren Studien nachweisen (Berd et al., 1994 und 1997; Lattime et al., 1995; Sensi et al., 1997; Murphy et al., 1993;).

In Kontrast zu der bisherigen TH1-zentrierten Ansicht zeigen die genannten Studien, dass eine gleichzeitige und koordinierte Expression beider Zytokinprofile durch TH1- und TH2-Zellen zu zahlreichen lymphozytären Effektormechanismen führen kann, die gemeinsam in eine potente Antitumor-Antwort münden. Das Verhältnis der beteiligten TH1- und TH2-Zytokine zueinander dürfte eine entscheidende Rolle spielen. Darüber hinaus muss das in einem Kompartiment vorherrschende Profil, z.B. im peripheren Blut, nicht zwingend einen Einfluss auf die Funktionalität des Immunsystems und die Polarisation zugunsten eines T-Helferzell-Profils innerhalb des Tumors bzw. an der Vakzinierungsstelle haben, eine Übereinstimmung ist nicht Bedingung (Soiffer et al., 1998; Mocellin, Rossi et al., 2003). Das im peripheren Blut von Patient P113 dominierende TH1-Zytokinmuster (siehe Kapitel 5.6) stellt ein gutes Beispiel für die genannte Hypothese dar.

In diesem Sinne könnte man das bei den Patienten P113 und P184 vorherrschende TH2-Muster am Ort der Vakzinierung auch als notwendig für eine erfolgreiche Induktion einer Immunantwort durch die angewandte Vakzine erachten im Vergleich zum

undifferenzierten Profil von Patient P182. Zusammenfassend sollte man besser von einer dualen TH1/TH2-Antwort sprechen.

Nicht ausgeschlossen sind bei der Betrachtung der Zytokinresultate an der Vakzinierungsstelle Kultivierungsartefakte, d.h. Veränderungen im Zytokinmuster, die auf die Kultivierung der Hautbiopsien über mehrere Wochen zurückzuführen sind (Belldegrun et al., 1989). Die für diese Arbeit untersuchten Hautbiopsien wurden vor Analyse der Zytokine zwischen 14 und 40 Tagen kultiviert. Murine Studien haben zudem gezeigt, dass abhängig von der gewählten Vakzinierungsstrategie unterschiedliche TH-Profile zustande kommen können (Galea-Lauri et al., 2004). Das beobachtete Zytokinmuster ist daher im Kontext der angewandten Vakzine zu sehen.

Interessant wäre bei beiden Patienten der Vergleich mit dem Zytokinprofil im peripheren Blut bzw. im Primärtumor, um weitere Aufschlüsse über die Funktion der TH2-Antwort am Ort der Vakzine und evtl. differierende Profile zu erlangen.

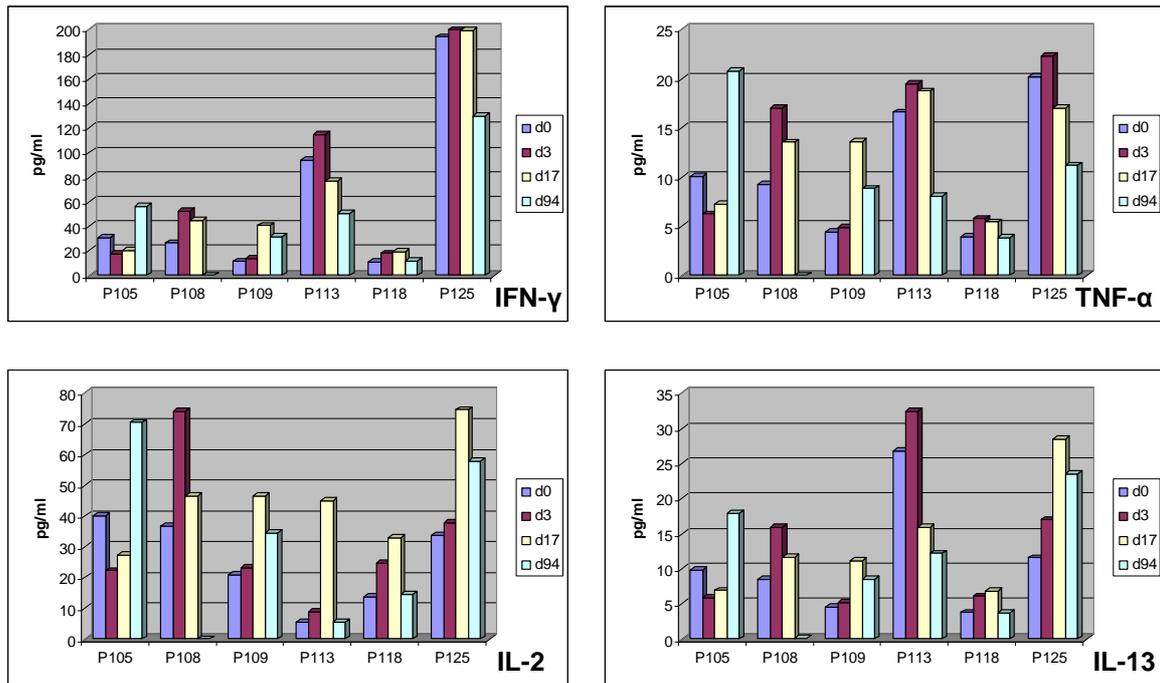
### **5.6 Multiplexe Zytokinbestimmungen im Serum der Patienten**

Für die Quantifizierung der durch die Vakzinierung induzierten Immunantwort sind zumeist zeit- und arbeitsaufwendige Ansätze notwendig. Die Analyse der Immunantwort stützt sich u.a. auf die genauere Charakterisierung des durch die Vakzine induzierten T-Helferzell-Profiles. Es wird postuliert, dass die Induktion einer dominanten TH1-Antwort mit Sekretion der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Tumorabwehr fördern kann (Fallarino et al., 2000; Surman et al., 2000), wohingegen ein TH2-assoziiertes Muster mit Nachweis von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 diesen Prozess behindern kann (Nakagomi et al., 1995; Zippelius et al., 2004). Mit Hilfe des sog. Multiplex-Ansatzes ist es möglich, eine Vielzahl von Zytokinen im Serum schnell und in einer einzigen, kleinen Serumprobe nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Zytokinprofil im Serum von sechs Studienpatienten zu vier Zeitpunkten analysiert werden. Es wurde durchgehend ein dominierendes TH1-Muster gefunden mit höheren Werten von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu kaum nachweisbaren Konzentrationen von IL-4 und IL-5. Patienten bei denen durch die Vakzinierung eine partielle Remission im Sinne eines PSA-Abfalls erzielt wurde (P 113 und P 125), zeichneten sich durch ein generell gesteigertes Zytokinsekretionsniveau und erhöhte Konzentrationen für die TH1-assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aus (Abbildung 5.4). Andererseits war gleichzeitig die Konzentration von IL-13, einem TH2-assoziierten Zytokin bei diesen beiden Patienten am höchsten.

Mit Ausnahme von Patient P105 waren die Zytokinwerte zum letzten Zeitpunkt (Tag 94) wieder rückläufig. Dieses könnte auf die durch die fortschreitende Erkrankung bedingte

## DISKUSSION



**Abbildung 5.4:** Serumkonzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-13 zu verschiedenen Vakzinierungszeitpunkten bei den Studienpatienten P105-P125. Die Werte wurden mittels des Multiplexing-Ansatzes in den Patientensera ermittelt.

zunehmende Beeinträchtigung des Immunsystems zurückzuführen sein.

Die IL-10-Werte waren generell sehr niedrig, die höchsten Konzentrationen konnten gegen Ende der Studie bei Patient P105 (7.55 pg/ml) gemessen werden. Interessanterweise war auch im ELISPOT (siehe Abbildung 4.29 im Kapitel Ergebnisse) zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Rückgang der Peptid-spezifischen T-Zellen zu beobachten, parallel zu einer Progredienz der Tumorerkrankung. Möglicherweise sind beide Beobachtungen als Korrelat einer fortschreitenden Immunsuppression zu interpretieren. IL-6 war bei allen Patienten im mittleren Konzentrationsbereich zu beobachten. Dieses korreliert mit der Beobachtung von erhöhten IL-6-Serumwerten bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Drachenberg et al. 1999). Bouraoui et al. (2008) fanden zudem eine Assoziation zwischen steigenden PSA-Werten und steigenden Serumwerten der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in Prostatakarzinompatienten mit progredienter Erkrankung.

Bezüglich des Zytokinmusters beim PCa ist aus der Literatur bekannt, dass bei Patienten mit hormonrefraktärem PCa in Korrelation mit der Höhe des PSA-Wertes signifikant erhöhte Serumwerte von IL-4, IL-6 und IL-10 im Vergleich zu Patienten mit hormonsensitivem PCa nachweisbar sind, wohingegen kein Unterschied bei den TH1-Zytokinen IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  gefunden werden konnte (Wise GJ et al. 2000). Bezüglich des Serum-TNF- $\alpha$ -Wertes gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Michalaki V et al. (2004)

konnten signifikant erhöhte Werte bei Patienten mit hormonefraktärem PCa im Vergleich zu lokalisierten Stadien nachweisen, wohingegen Wise GJ et al. (2000) keinen signifikanten Unterschied finden konnten. In diesem Zusammenhang sind v.a. die niedrigen IL-4-Serumwerte (< 8 pg/ml) bei den Studienpatienten erstaunlich, da auch Lee et al. (2008) erhöhte IL-4-Serumwerte in Patienten mit HRPC diskutieren. Lediglich bei Patient P125 konnten erhöhte Werte für IL-4 im Serum zwischen 15-32 pg/ml beobachtet werden.

In der Literatur sind beim Prostatakarzinom bisher keine Studien beschrieben, die diese Multiplex-Zytokinanalysen Ansatz im Rahmen des *immune monitoring* verwendeten. Gitlitz et al. (2003) analysierten beim metastasierten Nierenzellkarzinom mit Hilfe eines PCR-Ansatzes die Zytokinexpression von PBMC im Laufe der Vakzinierung. Es konnte keine Veränderung des Zytokinmusters beobachtet werden. Zumeist wird bei Zytokinanalysen von PBMC zur besseren Beurteilung ein Stimulationszyklus vorangeschaltet. So wurde in einer Studie an Prostata- und Nierenzellkarzinompatienten eine zunehmende TH1-Zytokinantwort nach Stimulation von PBMC mit einer Vakzine (allogene Tumorslysat beladene dendritische Zellen) im Vergleich zur Stimulation mit dem Vakzineadjuvans bei 7 von 16 Patienten beobachtet. Zudem konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  gemessen werden, eine Korrelation mit dem PSA-Verlauf wurde nicht beschrieben (Pandha et al., 2004). Miller et al. (2005) fanden hingegen trotz Stimulation der peripheren T-Zellen mit PSA-beladenen dendritischen Zellen nur bei einem von sechs Patienten einen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur Patientenprobe vor Vakzinierung, gleichzeitig aber bei fünf von sechs Patienten auch eine signifikante Menge von IL-6 und selten auch von IL-4, so dass keine klare Dominanz festgelegt werden konnte.

Michael et al. (2005) schließlich konnten bei einer allogenen Vakzinierungsstudie (drei allogene PCa-Zelllinien) nach unspezifischer *In-vitro*-Stimulation mit Ionomycin keinen auf den ersten Blick erkennbaren Trend in Richtung eines TH1- oder TH2-Profiles feststellen. Nach Stimulation mit unterschiedlichen Dosierungen eines Vakzinelysats konnte eine IFN- $\gamma$ -Antwort in Abhängigkeit von der Dosierung des Lysats vorübergehend festgestellt werden. Zu Beginn konnte ein Ansprechen auf die Vakzine an Hand steigender TH1- und TH2-Zytokinwerten vorhergesagt werden, was einem insgesamt erhöhten Zytokinsekretionsniveaus ähnlich wie bei den hier vorgestellten Multiplex-Ergebnissen entspricht. Aufgrund der Datenflut bei Verwendung von Multiplex-Ansätzen sind unter Umständen neue Methoden der Informationsverarbeitung notwendig, um den klinischen Verlauf an Hand von Zytokinprofilen genauer vorhersagen zu können. Michael et al. (2005) wandten deshalb zum ersten Mal eine sog. *artificial neural network* Analyse für die Interpretation der Zytokindaten an. Es handelt sich dabei um einen Multiparameter-Ansatz mit

verbesserter Erkennung von Mustern, welcher konventionellen statistischen Methoden überlegen zu sein scheint (DiRusso et al., 2002; Dreiseitl & Ohno-Machado, 2002). Damit konnte die mittels quantitativer PCR bestimmten Werte von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als die für den klinischen Verlauf einflussreichsten Variablen identifiziert werden. Obwohl auf den ersten Blick kein dominantes T-Helferzell-Muster zu erkennen war, unterstreicht dieser Ansatz, dass für eine erfolgreiche Reaktion auf die Vakzinierung eine Modifikation der Immunantwort in Richtung TH1-Profil notwendig erscheint.

Eine Validierung dieses Ansatzes in Studien mit höheren Fallzahlen ist allerdings notwendig, um ihn als Standard im Rahmen des *immune monitoring* verwenden zu können. Auch für die gesamte Auswertung aller Patientendaten, der hier beschriebenen Genvakzinestudie ist eine derartige Netzwerkanalyse geplant.

### **5.7 Immune monitoring mit Hilfe des ELISPOT-Assays**

Die Wirksamkeit einer Antitumor-Vakzinierung kann am besten an Hand des klinischen Erfolgs bzw. an einfach zu messenden Laborparametern und an der radiologisch bestimmbarer Größe des Tumors abgeschätzt werden. Aufgrund des bisher überwiegenden Einsatzes von Vakzinen bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Krebsleiden ist ein Einfluss auf den klinischen Verlauf selten zu beobachten. Um trotzdem einen Effekt auf das Immunsystem nachweisen zu können, sind sensitive Methoden notwendig, die die Aktivität einzelner Aspekte des Immunsystems im Detail beleuchten. Der sog. ELISPOT-Assay ist dabei in der Lage, Antigen-aktivierte und damit tumorspezifische T-Zellen an Hand ihrer Zytokinproduktion auf Einzelzellebene zu quantifizieren (Clay et al., 2001).

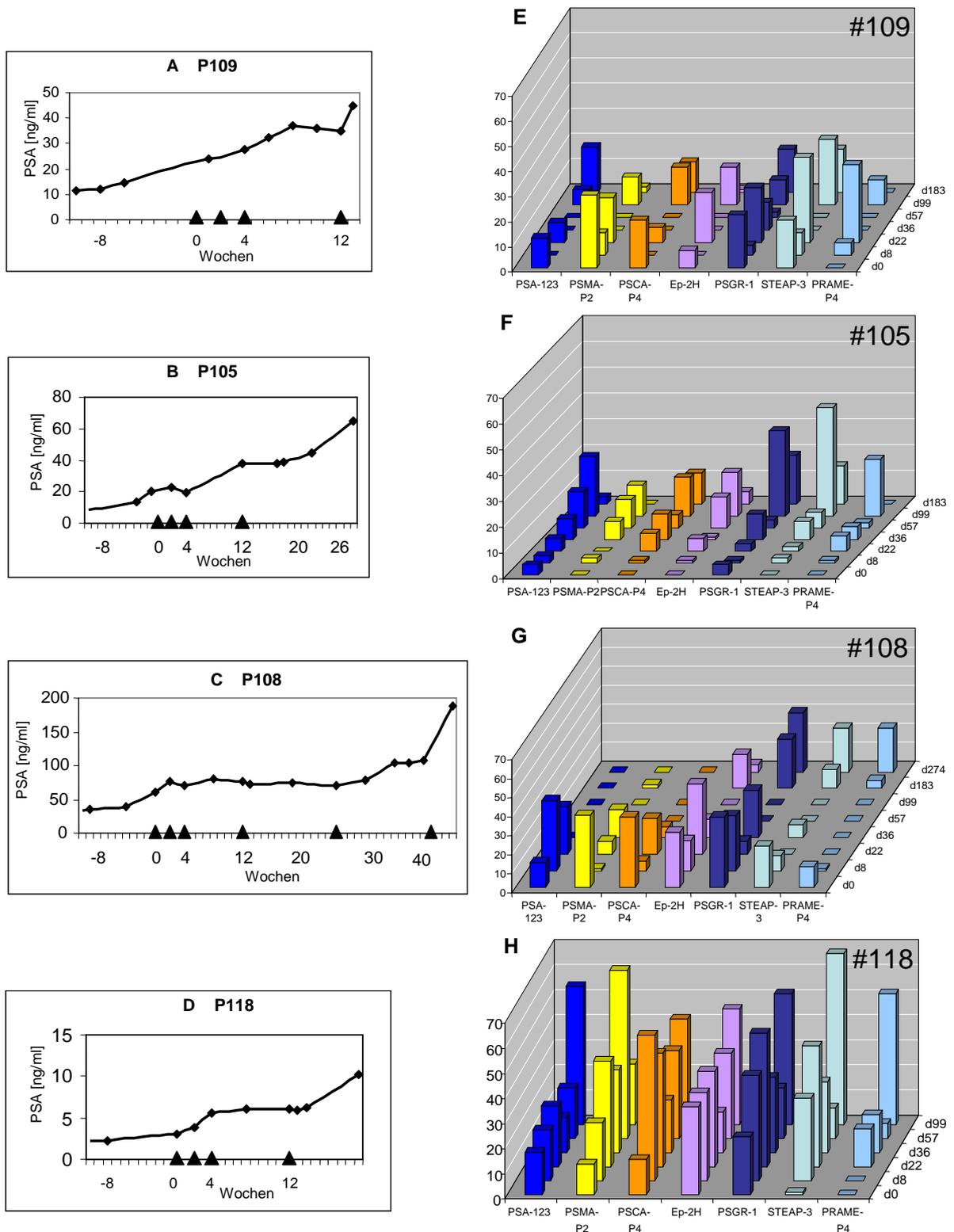
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T-Zell-Antwort der Phase-I-Patienten mittels ELISPOT untersucht. Gewöhnlich wird dabei die IFN- $\gamma$ -Sekretion als Aktivitätsmarker verwendet, da unstimulierte PBMC meist keine relevante IFN- $\gamma$ -Sekretion aufweisen (Schmittel et al., 1997). Dieser Assay stellte in multiplen Vakzinierungsstudien einen wichtigen Bestandteil des *immune monitoring* dar, wobei es überwiegend gelang, Antigen- bzw. tumorspezifische Vakzine-induzierte CTL zu identifizieren. In einigen Studien beim Melanom konnte sogar eine Korrelation zwischen der im ELISPOT nachgewiesenen Immunantwort und dem klinischen Verlauf gefunden werden (Reynolds et al., 1997; Banchereau et al., 2001; Belli et al., 2002). Auch im Rahmen von Vakzinierungsstrategien beim Prostatakarzinom konnte der ELISPOT-Assay erfolgreich eingesetzt werden (Mu et al., 2005; Arlen et al., 2006; Gulley et al., 2002; Eder et al., 2000; Barrou et al., 2004; Pandha et al., 2004; Salgaller et al., 1998; Fuessel et al., 2006; Miller et al., 2005; Rini et al., 2006; Meidenbauer et al., 2000; Waeckerle-Men et al., 2006).

Für die Untersuchung der T-Zellantwort der Phase-I-Studienpatienten wurde zunächst ein *Ex-vivo*-Ansatz gewählt mit ausschließlicher Inkubation der zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen PBMC mit den Peptiden ohne vorherige *In-vitro*-Stimulationen oder Verwendung spezieller Antigen-präsentierender Zellen. Der initiale Angriff Vakzine-spezifischer T-Zellen auf die Tumorzellen kann zur Offenlegung weiterer Tumorantigene führen, die im Verlauf Effektorzellen mit anderer Spezifität induzieren können. Dieser Mechanismus des sog. *epitope spreading* kann zu einem reduzierten Nachweis von durch die Vakzine induzierten T-Zellen im Blut im Laufe der Vakzinierung trotz objektiven Ansprechens führen. Dies konnte in einigen Studien beobachtet werden (Arlen et al., 2006; Disis et al., 2002; Weber et al., 2003). Da zudem bei der Vakzinierung mit einer Zelllinie nie alle Tumorantigene bekannt sind, wurden zunächst sieben verschiedene Peptide mit HLA-A2 Bindungsmotiv für das ELISPOT-Monitoring ausgewählt, die Epitope einiger beim PCa überexprimierter Antigene darstellen könnten. Die ausgewählten Antigene PSMA, PSCA, STEAP und EpCam sind dabei auf der Zelloberfläche, die Antigene PSGR und PRAME v.a. intrazellulär exprimiert, PSA wird sezerniert.

Im IFN- $\gamma$ -ELISPOT konnte bei allen sechs Studienpatienten eine Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung gegen die verwendeten Peptide nachgewiesen werden. Die Abbildungen 5.5 und 5.6 zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der ELISPOT-Analysen im Vergleich zu den PSA-Verläufen der jeweiligen Patienten.

Die Frequenzen unterschieden sich dabei sowohl in Bezug auf die Patienten als auch in Bezug auf die diversen Peptide, waren aber insgesamt betrachtet im niedrigen Frequenzbereich (bis zu 1/1351 PBMC). Die stärkste T-Zell-Aktivierung konnte gegen die Peptide PSGR-1 und STEAP-3 beobachtet werden. Die größte Anzahl antigenspezifischer T-Zellen konnte bei Patient P118 nachgewiesen werden. Bei vier von sechs Patienten konnte im Verlauf der Vakzinierung eine positive immunologische Reaktion an Hand einer mehr als zweifachen Steigerung der Peptid-spezifischen T-Zellen im ELISPOT im Vergleich zur Anzahl vor Beginn der Vakzinierung festgestellt werden (Patienten P105, P113, P118 und P125), wobei die Reaktion auf die jeweiligen Peptide teilweise sehr unterschiedlich ausfiel und bei Patient P113 erst sehr spät auftrat.

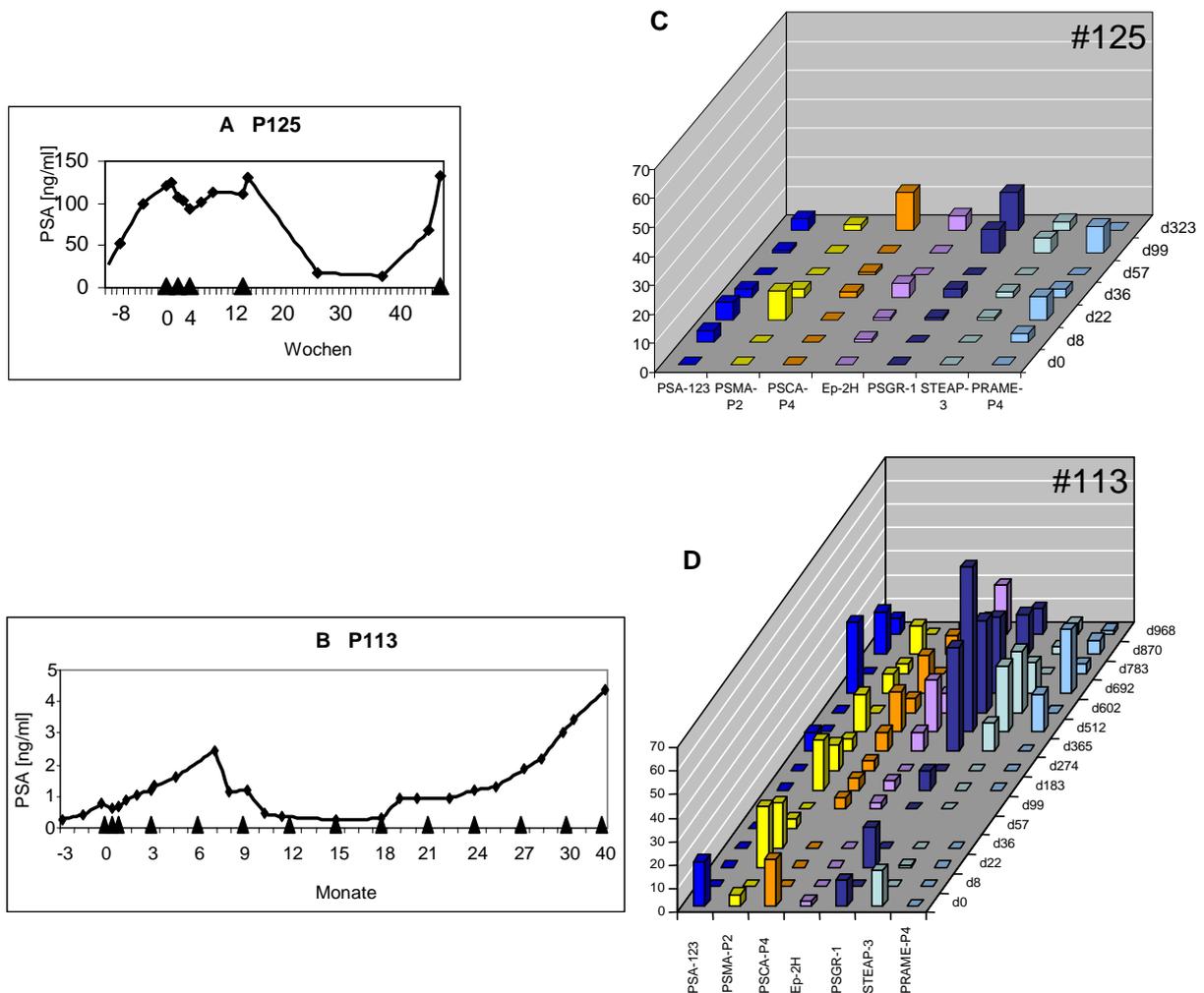
Bei den verbliebenen zwei Patienten (P108 und P109) konnte eine eindeutige Peptid-spezifische, Vakzine-induzierte Antwort nicht identifiziert werden, da die Frequenzen der meisten Peptide im Verlauf abfielen, die höchsten Frequenzen also vor Beginn der Vakzinierung nachzuweisen waren. Eine mögliche Korrelation zwischen der Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen im ELISPOT und dem PSA-Verlauf konnte bei drei Patienten (P113, P118 und P125) beobachtet werden, wobei die Patienten P113 und P125 einen >50%igen PSA-Abfall im Sinne einer partiellen Remission und Patient P118 einen PSA-Verlauf im Sinne einer vorübergehenden Stabilisierung zeigten.



**Abbildung 5.5:** PSA- und IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Daten der Patienten mit kurzzeitiger Stabilisierung des PSA-Wertes (P108 und P118) bzw. ohne Ansprechen (P105 und 109) auf die Vakzinierung.

**A bis D:** PSA-Verläufe der Patienten P105, 108, 109 und 118 zu verschiedenen Studienzeitpunkten. Die Vakzinierungstermine wurden durch Dreiecke dargestellt. Diese Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bernd Gänsbacher und Dr. Thomas Brill, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

**E bis H:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC von Patient P113 und P115 nach Peptidstimulation zu verschiedenen Studienzeitpunkten. X-Achse: Peptide. Y-Achse: IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen pro 100.000 PBMC. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen. Z-Achse: Studienzeitpunkt.



**Abbildung 5.6:** PSA- und IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Daten der Patienten mit partieller Remission des PSA-Wertes nach Vakzinierung mit der LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$  Vakzine.

**A und B:** PSA-Verläufe der Patienten P113 und 125 zu verschiedenen Studienzeitpunkten. Die Vakzinierungstermine wurden durch Dreiecke dargestellt. Diese Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bernd Gänsbacher und Dr. Thomas Brill, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

**C und D:** IFN- $\gamma$ -ELISPOT der PBMC von Patient P113 und P115 nach Peptidstimulation zu verschiedenen Studienzeitpunkten. *X-Achse:* Peptide. *Y-Achse:* IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen pro 100.000 PBMC. Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist bereits abgezogen. *Z-Achse:* Studienzeitpunkt.

Interessanterweise war die Frequenz der reaktiven T-Zellen bei den Patienten mit dem besten Ansprechen (P125 und P113) teilweise sehr gering. Bei Patient P113 ist erst ab Tag 365 ein plötzlicher Frequenzanstieg v.a. der STEAP-3 und PSGR-1 reaktiven T-Zellen zu erkennen. Parallel dazu ist ein bereits vor Tag 365 begonnener Rückgang des PSA-Wertes auf den bis dahin niedrigsten Stand seit Vakzinierungsbeginn zu beobachten. Dieser Verlauf könnte auf ein *epitope spreading* oder auf ein Abwandern der spezifischen T-Zellen in das Gewebe hindeuten. Patient P125 zeigte insgesamt die niedrigsten Reaktivitäten gegen die genannten Peptide.

Patient P105 war während der Vakzinierungsphase trotz zu Beginn steigender Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen progredient. Dieses könnte auf eine bei grosser Tumorlast

nicht ausreichende durch die Vakzine induzierte Immunität hindeuten. Der gegen Ende der Studienphase (Tag 183) zu beobachtende deutliche Abfall der Spot-Frequenz könnte eine progrediente tumorassoziierte Immunsuppression widerspiegeln.

Eine interessante Beobachtung stellt die Tatsache dar, dass bis auf eine Ausnahme (Patient P113) die geringste Anzahl reaktiver T-Zellen im ELISPOT während einer Phase der PSA-Stabilisierung bzw. eines PSA-Abfalls zu beobachten waren und eine erhöhte Frequenz reaktiver T-Zellen kurz vor einem PSA-Anstieg, wie beispielsweise bei Patient P108. Dieses könnte tatsächlich bedeuten, dass die meisten reaktiven T-Zellen zum Zeitpunkt des klinischen Ansprechens die Peripherie verlassen haben und zum Ort des Geschehens (des Tumors) gewandert sind.

Folgende auf die oben genannten ELISPOT-Daten bezogenen Aussagen werden durch andere publizierte Vakzinierungsstudien beim PCa bestätigt:

1. Mit Hilfe des ELISPOT-Assays konnten beim hormonrefraktären PCa Vakzine-induzierte, Peptid-spezifische T-Zellen in niedriger Zahl identifiziert werden, deren Frequenz im Laufe der Vakzinierung bei einem Teil der Patienten zunimmt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in vorangegangenen Vakzinierungsstudien erzielt (Mu et al., 2005; Arlen et al., 2006; Gulley et al., 2002; Pandha et al., 2004; Salgaller et al., 1998; Fuessel et al., 2006; Miller et al., 2005). Eder et al. (2000) etwa konnten nach Vakzinierung mit einem PSA-exprimierenden Vaccinia-Virus einen mehr als 2-fachen Anstieg der PSA-spezifischen T-Zellen im ELISPOT bei fünf von sieben Patienten nachweisen, meist schon nach der ersten Vakzinierung. Waekerle-Men et al. (2006) konnten bei drei von sechs Patienten unterschiedlich ausgeprägte T-Zell-Reaktionen im ELISPOT gegen vier verschiedene Peptide (PSCA, PSMA, PSA, PAP) nachweisen, wobei sich die Frequenz meist im Bereich von 1/20.000 bis 1/2857 PBMC bewegte.
2. Es konnte eine Korrelation des klinischen Verlaufs und der mittels ELISPOT gemessenen T-Zell-Antwort bei einem Teil der Patienten beobachtet werden. Im Rahmen einer Vakzinierung mit mRNA-transfizierten dendritischen Zellen entwickelten zehn von elf Patienten, die eine spezifische T-Zell-Antwort im ELISPOT aufwiesen, einen stabilen Krankheitsverlauf während der Studienphase (Mu et al., 2005). Hingegen konnten nur bei zwei von acht Patienten mit progredientem Verlauf spezifische T-Zellen beobachtet werden. Waekerle et al. (2006) konnten ebenfalls eine Korrelation eines stabilen PSA-Verlaufs nach Vakzinierung mit einer zunehmenden Zahl Peptid-reaktiver T-Zellen im ELISPOT feststellen. Auch Fuessel et al. (2006) konnten bei drei von vier Patienten mit PSA-Stabilisierung eine T-Zell-Antwort im ELISPOT nachweisen.

3. Die gemessenen T-Zellfrequenzen im ELISPOT unterschieden sich im Hinblick auf die ausgewählten Peptide teilweise deutlich (Arlen et al., 2006). Fuessel et al. (2006) fanden nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die mit fünf verschiedenen Peptiden beladen worden waren, eine fehlende Reaktion der CD8-positiven T-Zellen aller Patienten gegen die zwei Peptidantigene PSA und Trp-p8 und eine sehr unterschiedliche Reaktion gegenüber den übrigen drei Peptidantigenen PSMA, Prostein und Survivin. Ein stark variierendes Antigen-Expressionsprofil der Prostatakarzinomzellen könnte dafür verantwortlich sein (Nwosu et al., 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden in der Vakzinierungsstudie von Arlen et al. (2006) gemacht.
4. Teilweise konnten schon vor Vakzinierung Peptid-reaktive T-Zellen beobachtet werden (wie bei den Patienten P108 und P109). Dieses könnte auf eine Immunantwort gegen Peptide hinweisen, die spontan im Verlauf der Erkrankung entstanden sind. Auch Barrou et al. (2004) fanden bei sieben von 24 Patienten PSA-reaktive T-Zellen im ELISPOT bereits vor Beginn der Vakzinierungsstudie, ebenso Eder et al. (2000).
5. Die Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen kann im Verlauf in Bezug auf die unterschiedlichen Peptide stark variieren. Der Mechanismus des *epitope spreading* bzw. ein Abwandern der spezifischen T-Zellen in die Peripherie könnte dafür verantwortlich sein. Auch bei Arlen et al. (2006) und Barrou et al. (2004) war eine starke Variation der Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen gegen vier verschiedene Peptide (PSA, PSMA, PAP, MUC-1) im Verlauf zu beobachten.
6. Ohne vorangegangene *In-vitro*-Stimulationen konnten meist nur niedrige Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen beobachtet werden. Waekerle-Men et al. (2006) konnten durch Injektion von Peptid-beladenen, autologen dendritischen Zellen einen Anstieg der Spotzahl auf maximal 1/5000 bis 1/3333 PBMC bei Inkubation der PBMC ausschließlich mit Peptiden beobachten. Meidenbauer et al. (2000) konnten ohne *In-vitro*-Stimulierung sogar nur bei zwei von zehn Patienten PSA-reaktive CD4- oder CD8-positive T-Zellen identifizieren (1/20.000 bis 1/2700 Zellen), wohingegen nach zwei Stimulationszyklen mit PSA-beladenen dendritischen Zellen bei acht von zehn Patienten reaktive T-Zellen mit einer weitaus höheren Frequenz (1/2000 bis 1/133 PBMC) beobachtet werden konnten. In Kontrast zu bakteriellen oder viralen Antigenen sind Tumorantigene meist nur schwach immunogen, so dass möglicherweise niedrige Vakzine-induzierte Amplifikationen spezifischer T-Zellen *ex vivo* nicht gemessen werden können (Coulie & van der Bruggen, 2003). Daher wird teilweise dem ELISPOT eine Stimulation der PBMC mit spezifischen Antigenen vorgeschaltet (Karanikas et al., 1997; Pass et al., 1998; Wang et al., 1999; Miller et al., 2005; Meidenbauer et al., 2000; Rosenberg et al., 1998). Allerdings ist eine Verfälschung des Ergebnisses durch

Generierung von Peptid-spezifischen T-Zellen als Folge der Stimulation (primäre Sensibilisierung) und damit eine Überschätzung der Immunantwort möglich (Pass et al., 1998). Bei dem hier gewählten Ansatz wurde eine Antigenpräsentation durch die in den PBMC enthaltenen Monozyten vorausgesetzt. Aufgrund der bei Tumorpatienten zu beobachtenden Dysregulation im Sinne einer Verschiebung zu einer TH2-dominierten Antwort stellen autologe PBMC unter Umständen grundsätzlich keine idealen antigenpräsentierenden Zellen dar (Pellegrini et al., 1996; Arlen et al., 2000). Auch das in Tumorpatienten erhöhte Vorkommen immunsupprimierender Monozytenpopulationen und regulatorischer T-Zellen bzw. deren erhöhte supprimierende Funktionalität (Yokokawa et al., 2008; Kuniwa et al., 2008) könnte einen Grund für eine niedrige Frequenz Tumorantigen-spezifischer T-Zellen in den Assays darstellen (Übersichtsartikel von Zou, 2006 und von Miller & PISA, 2007). Desweiteren konnte eine verminderte IFN- $\gamma$ -Sekretion stimulierter PBMC von Tumorpatienten (Stimulation z.B. mit dem Flu Peptid) im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden (Arlen et al., 2000; Sato et al., 1998). Möglicherweise lassen sich mit Hilfe antigenpräsentierender Zelllinien wie C1R-A2 oder autologen dendritischen Zellen die genannten Schwächen umgehen und deutlichere Reaktionen im ELISPOT nachweisen. C1R-A2 stellt eine humane Plasma-Leukämie-Zelllinie dar, die durch Transfektion das Epitop HLA-A\*0201 exprimiert (Hogan et al., 1988). Eine Alloreaktivität gegen die Zelllinie konnte in ELISPOT-Analysen nicht beobachtet werden. Beim Prostatakarzinom konnten einige Studien unter Verwendung dieser Zelllinie positive Resultate im ELISPOT erzielen (Arlen et al., 2006; Gulley et al. 2002; Eder et al., 2000). In der Studie von Pandha et al. (2004) wurden autologe dendritische Zellen, die mit einem allogenen Tumorzelllysate beladen worden waren, erfolgreich als antigenpräsentierende Zellen verwendet.

Die optimale Strategie ist hier sicherlich noch nicht gefunden. Trotzdem hat sich der ELISPOT-Assay im Rahmen des *immune monitoring* bei Vakzinierungsstudien bewährt, auch wenn eine Korrelation der ELISPOT-Daten mit dem Tumorsprechen bisher schwierig ist.

Zusammenfassend hat der Vakzinierungsansatz beim Prostatakarzinom die Erwartungen bisher noch nicht erfüllen können, obschon in einigen Studien tumorspezifische T-Zellen induziert werden konnten. Eine effektive Antitumorantwort wird wahrscheinlich auch in Zukunft nicht alleine durch eine Vakzinierungsstrategie erreicht werden können (Harzstark & Ryan, 2008). Einen Ausweg könnten multimodale Ansätze mit Kombination von z.B. Standard-Chemotherapie, Vakzinierung und Inhibierung regulatorischer T-Zellen darstellen.

## 6. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom stellt das am häufigsten diagnostizierte Malignom des Mannes in Europa und Nordamerika dar. Patienten mit metastasiertem PCa haben dabei eine schlechte Prognose mit einem mittleren Überleben von ein bis drei Jahren. Dies hat zu einer Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten wie der Antitumorvakzinierung geführt.

Im Rahmen des Forschungsprojekts „Einsatz einer Zytokin-Gentherapie beim Prostatakarzinom“ wurde die hier vorliegende Arbeit erstellt, mit dem Ziel der genaueren Charakterisierung vakzinespezifischer T-Zellen, insbesondere auf Ebene des TCR.

Zunächst konnte in MLTC-Experimenten mit Spender-PBL und der Vakzinezelllinie ein *in vitro* deutlich eingeschränktes TCR-Repertoire nachgewiesen werden. Dieses deutet auf eine klonale Selektion tumorreaktiver T-Zellen hin und ist als Hinweis auf die Existenz eines beschränkten immundominanten Antigenmusters auf der Vakzinezelle zu sehen, eine allogene Reaktion ist allerdings nicht ausgeschlossen.

Daten zum TCR-Repertoire von TIL beim PCa existierten bislang kaum. Beim Studienpatienten 109 gelang die Kultivierung und Analyse von TIL eines lokalen PCa-Rezidivs. Es konnte ein stark restringiertes TCR-Repertoire dokumentiert werden. Dieses ist in der Literatur bisher der erste Nachweis einer oligoklonalen Selektion tumorreaktiver Lymphozyten im PCa-Gewebe und unterstreicht, dass auch beim PCa ein T-Zell-Pool von limitierter Spezifität an der Tumorantwort *in situ* beteiligt zu sein scheint. Nach Stimulation der TIL mit der Vakzinezelle kam es im Verlauf zu einer weiteren Restriktion, zudem zu einer veränderten Zusammensetzung des TCR-Repertoires. Letzteres ist neben der Möglichkeit einer allogenen Reaktion als Indiz für das Vorhandensein unterschiedlicher tumorassoziierter Antigene auf der Vakzinezelle bzw. den Tumorzellen von Patient 109 zu werten.

Bei Studienpatient 113 konnte ein eingeschränktes TCR-Repertoire in den aus der Hautbiopsie ausgewanderten Lymphozyten nach einmaliger Stimulation mit der Vakzinezelllinie nachgewiesen werden.

Die Sequenzierung aller dominanten Banden bei den Spender-PBL, den TIL von Patient 109 und den Lymphozyten an der Vakzinierungsstelle von Patient 113 ergab zwar übereinstimmende variable Gensegmente jedoch mit unterschiedlichen CDR3-Regionen. Eine unter allen Spendern bzw. Patienten übereinstimmende Sequenz konnte nicht identifiziert werden. Bei Patient 109 konnten zwei identische Sequenzen sowohl in den ursprünglichen TIL als auch nach Stimulation mit der Vakzinezelllinie identifiziert werden.

Für die Patienten 109 und 113 konnten dominante CDR3-Regionen charakterisiert werden und deren Expression im Verlaufe der Vakzinierung in den PBMC mit Hilfe der

*real-time* PCR untersucht werden. Es zeigte sich allerdings auch mit dieser Methode keine signifikante Frequenzänderung der Expression im Verlauf der Vakzinierung.

Neben den bereits genannten TCR-Untersuchungen wurden im Rahmen des *Immune monitoring* bei den Studienpatienten Analysen des Zytokinmilieus am Ort der Vakzinierung und im Serum und ELISPOT-Analysen durchgeführt. Das Zytokinmuster am Ort der Vakzinierung konnte bei den Patienten 113, 182 und 184 untersucht werden. Bei den Patienten 113 und 184 konnte ein dominierendes TH2-Zytokinprofil nachgewiesen werden mit überwiegender Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-10 bei geringer bzw. fehlender Sezernierung von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Untermauert werden diese Daten durch den gleichzeitigen Nachweis von vielen eosinophilen Granulozyten in der histologischen Aufarbeitung der Hautbiopsie von Patient 113. Bei Patient 182 ergab sich kein eindeutiges Profil. Sowohl Patient 113 als auch Patient 184 hatten auf die Vakzinierung mit einem Abfall des PSA-Wertes angesprochen. Eine Dominanz der TH1-Zytokine wäre möglicherweise zu erwarten gewesen. In der Literatur sind allerdings einige Vakzinierungsstudien beim PCa beschrieben, die in ähnlicher Weise entweder eine Akkumulation von Eosinophilen am Vakzinierungsort bzw. im peripheren Blut oder einen signifikanten Nachweis von IL-4 bzw. IL-5 nach Stimulation von PBMC gegen die Vakzinezelllinie fanden. Aus Vakzinierungsstudien bei der Maus ist zudem bekannt, dass aktivierte CD4-Zellen am Ort des Tumors gleichzeitig eine TH1- und TH2-Antwort induzieren können und auch letztere für die Wirkung der Vakzine von Bedeutung ist. Das in einem Kompartiment vorherrschende Profil, z.B. hier am Vakzinierungsort scheint nicht zwingend einen Einfluss auf die Funktionalität des Immunsystems und die Polarisation zugunsten eines T-Helferzell-Profiles innerhalb des Tumors zu haben. Eine duale Antwort ist wahrscheinlich notwendig.

Die durchgeführten Zytokinanalysen im Serum der ersten sechs Studienpatienten weisen analog dieser These für Patient 113 höhere Werte für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf im Vergleich zu vernachlässigbaren Konzentrationen von IL-4 und IL-5. Patienten mit verlängerter PSA-Verdopplungszeit zeichneten sich durch ein generell erhöhtes Zytokinsekretionsniveau und erhöhte Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Serum aus. Es existierten bislang keine Serumzytokindaten aus anderen Vakzinestudien beim Prostatakarzinom.

Im Unterschied zur Zytokinanalyse im Serum ist der ELISPOT-Assay seit einiger Zeit ein fester Bestandteil des *Immune monitoring* bei Vakzinierungsstudien. Bei allen sechs untersuchten Studienpatienten konnte eine Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung gegen die getesteten Peptide PSMA-P2, PSCA-P4, STEAP-3, Ep-2H, PSGR-1, PRAME-P4, PSA-123 nachgewiesen werden, mit Nachweis der höchsten Frequenzen bei Verwendung

von PSGR-1 und STEAP-3. Vier Patienten zeigten im Verlauf der Vakzinierung eine mehr als zweifache Steigerung der Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen, darunter die Patienten, die einen über 50 %igen Abfall des PSA-Wertes aufwiesen. Die geringste Anzahl reaktiver T-Zellen wurde häufig während einer Phase der PSA-Stabilisierung bzw. eines PSA-Abfalls beobachtet und im Gegensatz dazu erhöhte Frequenzen kurz vor einem PSA-Anstieg. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass die meisten tumorreaktiven T-Zellen zum Zeitpunkt des klinischen Ansprechens die Peripherie verlassen haben und ins Gewebe abgewandert sind.

Für zukünftige Studien wird zunehmend die Multiparameter-Durchflußzytometrie von Bedeutung sein, mit der eine Kombination phänotypischer und funktioneller Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen möglich sein wird. Funktionell aktive, MHC/Peptid-Multimer-bindende T-Zellen können so heraussortiert und ihr spezifischer TCR analysiert werden. Desweiteren stellt die Anwendung von sog. *artificial neural networks* einen neuen vielversprechenden Ansatz bei der Interpretation derartiger komplexer *Immune monitoring*-Analysen im Kontext des klinischen Verlaufs dar. Eine effektive Antitumorantwort bei hormonrefraktären Prostatakarzinompatienten wird allerdings wahrscheinlich auch in Zukunft nicht alleine durch eine Vakzinierungsstrategie erreicht werden können. Einen Ausweg könnten multimodale Ansätze mit Kombination von z.B. Standard-Chemotherapie, Vakzinierung und Inhibierung regulatorischer T-Zellen darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Acuto O, Reinherz EL.**  
The human T-cell receptor. Structure and function.  
N Engl J Med. 1985 Apr 25;312(17):1100-11. Review.
2. **Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC.**  
Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma.  
J Urol. 1999 Jan;161(1):182-7
3. **Adris S, Klein S, Jasnis M, Chuluyan E, Ledda M, Bravo A, Carbone C, Chernajovsky Y, Podhajcer O.**  
IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response.  
Gene Ther. 1999 Oct;6(10):1705-12.
4. **Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM.**  
Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.  
Science. 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Erratum in: Science 1998 Jun 19;280(5371):1821.
5. **Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G.**  
Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients.  
J Exp Med. 1993 Apr 1;177(4):989-98.
6. **Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW.**  
Human T-cell receptor variable gene segment families.  
Immunogenetics. 1995;42(6):455-500. Review.
7. **Arlen P, Tsang KY, Marshall JL, Chen A, Steinberg SM, Poole D, Hand PH, Schlom J, Hamilton JM.**  
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. 2000 Dec;49(10):517-29.
8. **Arlen PM, Gulley JL, Parker C, Skarupa L, Pazdur M, Panicali D, Beetham P, Tsang KY, Grosenbach DW, Feldman J, Steinberg SM, Jones E, Chen C, Marte J, Schlom J, Dahut W.**  
A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer.  
Clin Cancer Res. 2006 Feb 15;12(4):1260-9.
9. **Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J.**  
Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine.  
Cancer Res. 2001 Sep 1;61(17):6451-8.

10. **Banchereau J, Steinman RM.**  
Dendritic cells and the control of immunity.  
Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
11. **Barrou B, Benoit G, Ouldakaci M, Cussenot O, Salcedo M, Agrawal S, Massicard S, Bercovici N, Ericson ML, Thiounn N.**  
Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA.  
Cancer Immunol Immunother. 2004 May;53(5):453-60. Epub 2004 Feb 4.
12. **Barton J, Blackledge G, Wakeling A.**  
Growth factors and their receptors: new targets for prostate cancer therapy.  
Urology. 2001 Aug;58(2 Suppl 1):114-22. Review.
13. **Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schüler T, Assenmacher M, Schendel DJ, Blankenstein T.**  
Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay.  
Nat Med. 2001 Oct;7(10):1159-62.
14. **Belldegrun A, Kasid A, Uppenkamp M, Topalian SL, Rosenberg SA.**  
Human tumor infiltrating lymphocytes. Analysis of lymphokine mRNA expression and relevance to cancer immunotherapy.  
J Immunol. 1989 Jun 15;142(12):4520-6.
15. **Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchiano A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmiani G.**  
Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings.  
J Clin Oncol. 2002 Oct 15;20(20):4169-80. Erratum in: J Clin Oncol 2002 Dec 1;20(23):4610.
16. **Berd D, Maguire HC Jr, Mastrangelo MJ, Murphy G.**  
Activation markers on T cells infiltrating melanoma metastases after therapy with dinitrophenyl-conjugated vaccine.  
Cancer Immunol Immunother. 1994 Sep;39(3):141-7.
17. **Berd D, Maguire HC Jr, Schuchter LM, Hamilton R, Hauck WW, Sato T, Mastrangelo MJ.**  
Autologous hapten-modified melanoma vaccine as postsurgical adjuvant treatment after resection of nodal metastases.  
J Clin Oncol. 1997 Jun;15(6):2359-70.
18. **Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJ, Stern PL.**  
Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy.  
Urology. 1995 Nov;46(5):681-6; discussion 686-7.
19. **Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, De Vincentiis A, Di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S.**  
Antitumor vaccination: where we stand.  
Haematologica. 2000 Nov;85(11):1172-206.

20. **Bouraoui Y, Ricote M, García-Tuñón I, Rodriguez-Berriguete G, Touffehi M, Rais NB, Fraile B, Paniagua R, Oueslati R, Royuela M.**  
Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer.  
Cancer Detect Prev. 2008;32(1):23-32. Epub 2008 Apr 9.
21. **Breul J, Zimmermann F, Dettmar P, Paul R.**  
Prostatakarzinom in Manual Urogenitale Tumore. 2003  
<http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/uro/homepage.html>
22. **Brill T, Barba M, Breul J, Gansbacher B. s**  
Gentherapie des Prostatakarzinom.  
Internist. 2001 Oct;42(10):1328-36, 1339-40, 1342-5.
23. **Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, Manz RA, Miltenyi S, Radbruch A, Assenmacher M, Schmitz J.**  
Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion.  
Eur J Immunol. 1999 Dec;29(12):4053-9.
24. **Burnet FM.**  
Immunological aspects of malignant disease.  
Lancet. 1967 Jun 3;1(7501):1171-4.
25. **Burnet FM.**  
The concept of immunological surveillance.  
Prog Exp Tumor Res. 1970;13:1-27. Review.
26. **Bylund A, Zhang JX, Bergh A, Damber JE, Widmark A, Johansson A, Adlercreutz H, Aman P, Shepherd MJ, Hallmans G.**  
Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice.  
Prostate. 2000 Mar 1;42(4):304-14
27. **Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG.**  
Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer.  
J Clin Oncol. 2003 Mar 1;21(5):884-90.
28. **Chatta G.**  
Randomized phase II trial of docetaxel plus thalidomide in androgen-independent prostate cancer Dahut WL, Gulley JL, Arlen PM, Liu Y, Fedenko KM, Steinberg SM, Wright JJ, Parnes H, Chen CC, Jones E, Parker CE, Linehan WM, Figg WD, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD. J Clin Oncol 2004;22:2532-9.  
Urol Oncol. 2004 Nov-Dec;22(6):502-3.
29. **Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA.**  
Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer.  
Clin Cancer Res. 2001 May;7(5):1127-35. Review.
30. **Colombo MP, Piconese S.**  
Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy.  
Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):880-7. Review.

31. **Concato J, Wells CK, Horwitz RI, Penson D, Fincke G, Berlowitz DR, Froehlich G, Blake D, Vickers MA, Gehr GA, Raheb NH, Sullivan G, Peduzzi P.**  
The effectiveness of screening for prostate cancer: a nested case-control study.  
Arch Intern Med. 2006 Jan 9;166(1):38-43.
32. **Correale P, Walmsley K, Zaremba S, Zhu M, Schlom J, Tsang KY.**  
Generation of human cytolytic T lymphocyte lines directed against prostate-specific antigen (PSA) employing a PSA oligopeptide peptide.  
J Immunol. 1998 Sep 15;161(6):3186-94.
33. **Cottrez F, Groux H.**  
Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10.  
J Immunol. 2001 Jul 15;167(2):773-8.
34. **Coulie PG, van der Bruggen P.**  
T-cell responses of vaccinated cancer patients.  
Curr Opin Immunol. 2003 Apr;15(2):131-7. Review.
35. **Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W.**  
Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.  
Nat Med. 2004 Sep;10(9):942-9. Epub 2004 Aug 22.
36. **Dannull J, Diener PA, Prikler L, Furstenberger G, Cerny T, Schmid U, Ackermann DK, Groettrup M.**  
Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer.  
Cancer Res. 2000 Oct 1; 60(19):5522-8.
37. **Dennis LK, Dawson DV.**  
Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer.  
Epidemiology. 2002 Jan;13(1):72-9.
38. **DiRusso SM, Chahine AA, Sullivan T, Risucci D, Nealon P, Cuff S, Savino J, Slim M.**  
Development of a model for prediction of survival in pediatric trauma patients: comparison of artificial neural networks and logistic regression.  
J Pediatr Surg. 2002 Jul;37(7):1098-104; discussion 1098-104.
39. **Disis ML, Gooley TA, Rinn K, Davis D, Piepkorn M, Cheever MA, Knutson KL, Schiffman K.**  
Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines.  
J Clin Oncol. 2002 Jun 1;20(11):2624-32.
40. **Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP.**  
Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer.  
Prostate. 1999 Oct 1;41(2):127-33.
41. **Dreiseitl S, Ohno-Machado L.**  
Logistic regression and artificial neural network classification models: a methodology review.  
J Biomed Inform. 2002 Oct-Dec;35(5-6):352-9. Review.

42. **Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hübicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA.**  
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.  
Science. 2002 Oct 25;298(5594):850-4. Epub 2002 Sep 19.
43. **Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD.**  
Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.  
Nat Immunol. 2002 Nov;3(11):991-8.
44. **Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M, Kirby RS.**  
Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer.  
BJU Int. 2002 Jan;89(1):19-26.
45. **Ebelt K, Babaryka G, Figel AM, Pohla H, Buchner A, Stief CG, Eisenmenger W, Kirchner T, Schendel DJ, Noessner E.**  
Dominance of CD4(+) lymphocytic infiltrates with disturbed effector cell characteristics in the tumor microenvironment of prostate carcinoma.  
Prostate. 2008 Jan 1;68(1):1-10.
46. **Eder JP, Kantoff PW, Roper K, Xu GX, Bublej GJ, Boyden J, Gritz L, Mazzara G, Oh WK, Arlen P, Tsang KY, Panicali D, Schlom J, Kufe DW.**  
A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer.  
Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1632-8.
47. **Fallarino F, Grohmann U, Bianchi R, Vacca C, Fioretti MC, Puccetti P.**  
Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T cell-dependent tumor eradication in vivo.  
J Immunol. 2000 Nov 15;165(10):5495-501.
48. **Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P.**  
Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response.  
Cell. 1990 Feb 9;60(3):397-403.
49. **Ferradini L, Mackensen A, Genevee C, Bosq J, Duvillard P, Avril MF, Hercend T.**  
Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion.  
J Clin Invest. 1993 Mar;91(3):1183-90.
50. **Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G.**  
Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma.  
Cancer J Sci Am. 2000 Feb;6 Suppl 1:S55-7.
51. **Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY.**  
Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.  
Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):330-6. Epub 2003 Mar 3.

- 
52. **Frankel S, Smith GD, Donovan J, Neal D.**  
Screening for prostate cancer.  
Lancet. 2003 Mar 29;361(9363):1122-8.
53. **Frankenberger B, Regn S, Geiger C, Noessner E, Falk CS, Pohla H, Javorovic M, Silberzahn T, Wilde S, Buchner A, Siebels M, Oberneder R, Willimsky G, Pezzutto A, Blankenstein T, Schendel DK.**  
Cell-based vaccines for renal cell carcinoma: genetically engineered tumor cells and monocyte-derived dendritic cells.  
World J Urol. 2005a Jul;23(3):166-74. Epub 2005 Jul 5.
54. **Frankenberger B, Pohla H, Noessner E, Willimsky G, Papier B, Pezzutto A, Kopp J, Oberneder R, Blankenstein T, Schendel DJ.**  
Influence of CD80, interleukin-2, and interleukin-7 expression in human renal cell carcinoma on the expansion, function, and survival of tumor-specific CTLs.  
Clin Cancer Res. 2005b Mar 1;11(5):1733-42.
55. **Fuessel S, Meye A, Schmitz M, Zastrow S, Linne C, Richter K, Lobel B, Hakenberg OW, Hoelig K, Rieber EP, Wirth MP.**  
Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial.  
Prostate. 2006 Jun 1;66(8):811-21.
56. **Galea-Lauri J, Wells JW, Darling D, Harrison P, Farzaneh F.**  
Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination.  
Cancer Immunol Immunother. 2004 Nov;53(11):963-77. Epub 2004 May 14.
57. **Gann PH, Hennekens CH, Sacks FM, Grodstein F, Giovannucci EL, Stampfer MJ.**  
Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer.  
J Natl Cancer Inst. 1994 Feb 16;86(4):281-6. Erratum in: J Natl Cancer Inst 1994 May 4;86(9):728.
58. **Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC.**  
A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer.  
J Natl Cancer Inst. 1993 Oct 6;85(19):1571-9.
59. **Gitlitz BJ, Beldegrun AS, Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Hinkel A, Mulders P, Moldawer N, Tso CL, Figlin RA.**  
A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma.  
J Immunother. 2003 Sep-Oct;26(5):412-9.
60. **Goktas S, Crawford ED.**  
Optimal hormonal therapy for advanced prostatic carcinoma.  
Semin Oncol. 1999 Apr;26(2):162-73.
61. **Goluboff ET, Prager D, Rukstalis D, Giantonio B, Madorsky M, Barken I, Weinstein IB, Partin AW, Olsson CA; UCLA Oncology Research Network.**  
Safety and efficacy of exisulind for treatment of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy.  
J Urol. 2001 Sep;166(3):882-6.

- 
62. **Greenberg PD.**  
Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.  
Adv Immunol. 1991;49:281-355.
63. **Gronberg H.**  
Prostate cancer epidemiology.  
Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):859-64.
64. **Gronberg H, Damber L, Damber JE.**  
Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population.  
J Urol. 1994 Nov;152(5 Pt 1):1484-7; discussion 1487-9.
65. **Groux H, Cottrez F, Rouleau M, Mauze S, Antonenko S, Hurst S, McNeil T, Bigler M, Roncarolo MG, Coffman RL.**  
A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells.  
J Immunol. 1999 Feb 1;162(3):1723-9.
66. **Gulley J, Chen AP, Dahut W, Arlen PM, Bastian A, Steinberg SM, Tsang K, Panicali D, Poole D, Schlom J, Michael Hamilton J.**  
Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer.  
Prostate. 2002 Oct 1;53(2):109-17.
67. **Hafler DA, Saadeh MG, Kuchroo VK, Milford E, Steinman L.**  
TCR usage in human and experimental demyelinating disease.  
Immunol Today. 1996 Apr;17(4):152-9. Review.
68. **Harris DT, Matyas GR, Gomella LG, Talor E, Winship MD, Spitler LE, Mastrangelo MJ.**  
Immunologic approaches to the treatment of prostate cancer.  
Semin Oncol. 1999 Aug;26(4):439-47. Review.
69. **Harzstark AL, Ryan CJ.**  
Therapies in development for castrate-resistant prostate cancer.  
Expert Rev Anticancer Ther. 2008 Feb;8(2):259-68. Review.
70. **Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Liff J, Schwartz AG, Hoover RN, Fraumeni JF Jr.**  
Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer.  
Br J Cancer. 2000 Feb;82(3):718-25.
71. **Hedrick SM, Engel I, McElligott DL, Fink PJ, Hsu ML, Hansburg D, Matis LA.**  
Selection of amino acid sequences in the beta chain of the T cell antigen receptor.  
Science. 1988 Mar 25;239(4847):1541-4.
72. **Hobisch A, Rogatsch H, Hittmair A, Fuchs D, Bartsch G Jr, Klocker H, Bartsch G, Culig Z.**  
Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue.  
J Pathol. 2000 Jul;191(3):239-44.
73. **Hoffman RM.**  
An argument against routine prostate cancer screening.  
Arch Intern Med. 2003 Mar 24;163(6):663-5; discussion 665-6.

74. **Hogan KT, Shimojo N, Walk SF, Engelhard VH, Maloy WL, Coligan JE, Biddison WE.**  
Mutations in the alpha 2 helix of HLA-A2 affect presentation but do not inhibit binding of influenza virus matrix peptide.  
J Exp Med. 1988 Aug 1;168(2):725-36.
75. **Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP.**  
LNCaP model of human prostatic carcinoma.  
Cancer Res. 1983 Apr;43(4):1809-18.
76. **Houghton AN.**  
Cancer antigens: immune recognition of self and altered self.  
J Exp Med. 1994 Jul 1;180(1):1-4.
77. **Housseau F, Bright RK, Simonis T, Nishimura MI, Topalian SL.**  
Recognition of a shared human prostate cancer-associated antigen by nonclassical MHC-restricted CD8+ T cells.  
J Immunol. 1999 Dec 1;163(11):6330-7.
78. **Housseau F, Langer DA, Oberholtzer SD, Moorthy A, Levitsky HI, Pardoll DM, Topalian SL.**  
Tumor-specific CD8+ T lymphocytes derived from the peripheral blood of prostate cancer patients by in vitro stimulation with autologous tumor cell lines.  
Int J Cancer. 2002 Mar 1;98(1):57-62.
79. **Hu HM, Urba WJ, Fox BA.**  
Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile.  
J Immunol. 1998 Sep 15;161(6):3033-41.
80. **Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H.**  
Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens.  
Science. 1994 May 13;264(5161):961-5
81. **Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M.**  
Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience.  
J Interferon Cytokine Res. 1999 Jul;19(7):697-703.
82. **Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H.**  
The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response.  
J Exp Med. 1998 Dec 21;188(12):2357-68.
83. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ.**  
Immunobiology: the immune system in health and disease.  
Garland Science Publishing, USA, 2005.
84. **Jani AB, Hellman S.**  
Early prostate cancer: clinical decision-making.  
Lancet. 2003 Mar 22;361(9362):1045-53.

- 
85. **Jantzer P, Schendel DJ.**  
Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo.  
Cancer Res. 1998 Jul 15;58(14):3078-86.
86. **Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ.**  
Cancer Statistics 2003.  
CA Cancer J Clin. 2003 Jan-Feb;53(1):5-26
87. **Jorgensen JL, Esser U, Fazekas de St Groth B, Reay PA, Davis MM.**  
Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics.  
Nature. 1992 Jan 16;355(6357):224-30.
88. **Kapp JA, Kapp LM, McKenna KC.**  
Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance.  
Immunol Res. 2004;29(1-3):93-102. Review.
89. **Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, Ong CS, Apostolopoulos V, Vaughan H, Xing PX, Jamieson G, Pietersz G, Tait B, Broadbent R, Thynne G, McKenzie IF.**  
Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein.  
J Clin Invest. 1997 Dec 1;100(11):2783-92.
90. **Kaufman HL, Wang W, Manola J, DiPaola RS, Ko YJ, Sweeney C, Whiteside TL, Schlom J, Wilding G, Weiner LM.**  
Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group.  
J Clin Oncol. 2004 Jun 1;22(11):2122-32.
91. **Keilholz U, Weber J, Finke JH, Gabrilovich DI, Kast WM, Disis ML, Kirkwood JM, Scheibenbogen C, Schlom J, Maino VC, Lyerly HK, Lee PP, Storkus W, Marincola F, Worobec A, Atkins MB.**  
Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy.  
J Immunother. 2002 Mar-Apr;25(2):97-138. Review.
92. **Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veelen PA, Klosterman-Joosten AM, Vissers DC, ten Bosch GJ, Kester MG, Sijts A, Wouter Drijhout J, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ.**  
Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis.  
J Exp Med. 2001 Jan 1; 193(1):73-88.
93. **Kiessling A, Schmitz M, Stevanovic S, Weigle B, Hölig K, Füssel M, Füssel S, Meyer A, Wirth MP, Rieber EP.**  
Prostate stem cell antigen: Identification of immunogenic peptides and assessment of reactive CD8+ T cells in prostate cancer patients.  
Int J Cancer. 2002 Dec 1;102(4):390-7.
94. **Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, Thompson TC, Old LJ, Wang RF.**  
CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer.  
Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):6947-58.

95. **Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ.**  
T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Jun;81(11):3511-5.
96. **Koop BF, Rowen L, Wang K, Kuo CL, Seto D, Lenstra JA, Howard S, Shan W, Deshpande P, Hood L.**  
The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA.  
Genomics. 1994 Feb;19(3):478-93.
97. **Kwok WW, Ptacek NA, Liu AW, Buckner JH.**  
Use of class II tetramers for identification of CD4+ T cells.  
J Immunol Methods. 2002 Oct 1;268(1):71-81. Review.
98. **Lattime EC, Mastrangelo MJ, Bagasra O, Li W, Berd D.**  
Expression of cytokine mRNA in human melanoma tissues.  
Cancer Immunol Immunother. 1995 Sep;41(3):151-6.
99. **Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM.**  
Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.  
Nat Med. 1999 Jun;5(6):677-85.
100. **Lee SO, Pinder E, Chun JY, Lou W, Sun M, Gao AC.**  
Interleukin-4 stimulates androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells.  
Prostate. 2008 Jan 1;68(1):85-91.
101. **Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K.**  
Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland.  
N Engl J Med. 2000 Jul 13;343(2):78-85.
102. **Lim A, Baron V, Ferradini L, Bonneville M, Kourilsky P, Pannetier C.**  
Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8+ T cell immune responses.  
J Immunol Methods. 2002 Mar 1;261(1-2):177-94.
103. **Lu J, Celis E.**  
Recognition of prostate tumor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for prostate-specific membrane antigen.  
Cancer Res. 2002 Oct 15;62(20):5807-12
104. **Lucey DR, Clerici M, Shearer GM.**  
Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases.  
Clin Microbiol Rev. 1996 Oct;9(4):532-62. Review

- 
105. **Machlenkin A, Paz A, Bar Haim E, Goldberger O, Finkel E, Tirosh B, Volovitz I, Vadai E, Lugassy G, Cytron S, Lemonnier F, Tzevoval E, Eisenbach L.**  
Human CTL epitopes prostatic acid phosphatase-3 and six-transmembrane epithelial antigen of prostate-3 as candidates for prostate cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6435-42.
106. **Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A.**  
Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):1921-5.
107. **Maryanski JL, Jongeneel CV, Bucher P, Casanova JL, Walker PR.**  
Single-cell PCR analysis of TCR repertoires selected by antigen in vivo: a high magnitude CD8 response is comprised of very few clones. *Immunity.* 1996 Jan;4(1):47-55.
108. **Matsutani T, Shiiba K, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Ochi T, Itoh T, Musha H, Mizoi T, Sasaki I.**  
Evidence for existence of oligoclonal tumor-infiltrating lymphocytes and predominant production of T helper 1/T cytotoxic 1 type cytokines in gastric and colorectal tumors. *Int J Oncol.* 2004 Jul;25(1):133-41.
109. **McGregor M, Hanley JA, Boivin JF, McLean RG.**  
Screening for prostate cancer: estimating the magnitude of over-detection. *CMAJ.* 1998 Dec 1;159(11):1368-72.
110. **McHeyzer-Williams MG, Davis MM.**  
Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science.* 1995 Apr 7;268(5207):106-11.
111. **McNeal JE, Villers AA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA.**  
Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 1990 Sep 15;66(6):1225-33.
112. **Meidenbauer N, Harris DT, Spitler LE, Whiteside TL.**  
Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer. *Prostate.* 2000 May 1;43(2):88-100.
113. **Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Shuman M.**  
Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol.* 1999 Mar;161(3):960-3.
114. **Mercader M, Bodner BK, Moser MT, Kwon PS, Park ES, Manecke RG, Ellis TM, Wojcik EM, Yang D, Flanigan RC, Waters WB, Kast WM, Kwon ED.**  
T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14565-70.
115. **Michael A, Ball G, Quatan N, Wushishi F, Russell N, Whelan J, Chakraborty P, Leader D, Whelan M, Pandha H.**  
Delayed disease progression after allogeneic cell vaccination in hormone-resistant prostate cancer and correlation with immunologic variables. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4469-78.

116. **Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J.**  
Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer.  
Br J Cancer. 2004 Jun 14;90(12):2312-6. Erratum in: Br J Cancer. 2004 Sep 13;91(6):1227.
117. **Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P.**  
CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients.  
J Immunol. 2006 Nov 15;177(10):7398-405.
118. **Miller AM, Ozenci V, Kiessling R, Pisa P.**  
Immune monitoring in a phase 1 trial of a PSA DNA vaccine in patients with hormone-refractory prostate cancer.  
J Immunother. 2005 Jul-Aug;28(4):389-95.
119. **Miller AM, Pisa P.**  
Tumor escape mechanisms in prostate cancer.  
Cancer Immunol Immunother. 2007 Jan;56(1):81-7. Epub 2005 Dec 16. Review.
120. **Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM.**  
The dual role of IL-10.  
Trends Immunol. 2003 Jan;24(1):36-43. Review.
121. **Mocellin S, Rossi CR, Nitti D, Lise M, Marincola FM.**  
Dissecting tumor responsiveness to immunotherapy: the experience of peptide-based melanoma vaccines.  
Biochim Biophys Acta. 2003 Dec 5;1653(2):61-71. Review.
122. **Mocellin S, Wang E, Marincola FM.**  
Cytokines and immune response in the tumor microenvironment.  
J Immunother. 2001 Sep-Oct;24(5):392-407
123. **Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, Coetzee GA, Wilkens LR, Ross RK, Henderson BE.**  
Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk.  
Nat Med. 1995 Aug;1(8):827-9.
124. **Monsurro V, Nagorsen D, Wang E, Provenzano M, Dudley ME, Rosenberg SA, Marincola FM.**  
Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells.  
J Immunol. 2002 Jun 1;168(11):5933-42.
125. **Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A.**  
Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology.  
Clin Immunol. 2004 Mar;110(3):252-66.
126. **Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lyerly HK.**  
A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen.  
Clin Cancer Res. 1999 Jun;5(6):1331-8.

127. **Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Dueland S, Hauser M, Hammerstad H, Waehre H, Raabe N, Gaudernack G.**  
Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients.  
Br J Cancer. 2005 Oct 3;93(7):749-56.
128. **Mukherji B, Chakraborty NG, Sivanandham M.**  
T-cell clones that react against autologous human tumors.  
Immunol Rev. 1990 Aug;116:33-62. Review.
129. **Murphy GF, Radu A, Kaminer M, Berd D.**  
Autologous melanoma vaccine induces inflammatory responses in melanoma metastases: relevance to immunologic regression and immunotherapy.  
J Invest Dermatol. 1993 Mar;100(3):335S-341S.
130. **Nakagomi H, Pisa P, Pisa EK, Yamamoto Y, Halapi E, Backlin K, Juhlin C, Kiessling R.**  
Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma.  
Int J Cancer. 1995 Nov 3;63(3):366-71.
131. **Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB.**  
Prostate cancer.  
N Engl J Med. 2003 Jul 24;349(4):366-81
132. **NIH Genetic Modification Clinical Research Information System (GeMCRIS).**  
[http://www.gemcris.od.nih.gov/Contents/GC\\_HOME.asp](http://www.gemcris.od.nih.gov/Contents/GC_HOME.asp)
133. **Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S.**  
The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology.  
Cancer Chemother Pharmacol. 2000;46 Suppl:S52-61.
134. **Nitta T, Oksenberg JR, Rao NA, Steinman L.**  
Predominant expression of T cell receptor V alpha 7 in tumor-infiltrating lymphocytes of uveal melanoma.  
Science. 1990 Aug 10;249(4969):672-4.
135. **Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR.**  
Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules.  
Nature. 1988 Nov 3;336(6194):79-81.
136. **Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R.**  
Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease.  
Hum Mol Genet. 2001 Oct 1;10(20):2313-8. Review.
137. **Okamoto M, Lee C, Oyasu R.**  
Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro.  
Cancer Res. 1997 Jan 1;57(1):141-6.
138. **Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E.**  
Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody.  
Cancer Res. 1999 Jul 1;59(13):3128-33.

139. **Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P.**  
Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins.  
Prostate. 1997 Dec 1;33(4):240-5.
140. **Pandha HS, John RJ, Hutchinson J, James N, Whelan M, Corbishley C, Dalglish AG.**  
Dendritic cell immunotherapy for urological cancers using cryopreserved allogeneic tumour lysate-pulsed cells: a phase I/II study.  
BJU Int. 2004 Aug;94(3):412-8.
141. **Pannetier C, Even J, Kourilsky P.**  
T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples.  
Immunol Today. 1995 Apr;16(4):176-81. Review.
142. **Panzara MA, Oksenberg JR, Steinman L.**  
The polymerase chain reaction for detection of T-cell antigen receptor expression.  
Curr Opin Immunol. 1992 Apr;4(2):205-10. Review.
143. **Pass HA, Schwarz SL, Wunderlich JR, Rosenberg SA.**  
Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay.  
Cancer J Sci Am. 1998 Sep-Oct;4(5):316-23.
144. **Peehl DM, Stamey TA.**  
Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cells.  
In Vitro Cell Dev Biol. 1986 Feb;22(2):82-90.
145. **Pellegrini P, Berghella AM, Del Beato T, Cicia S, Adorno D, Casciani CU**  
Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression.  
Cancer Immunol Immunother. 1996 Jan;42(1):1-8.
146. **Penn I.**  
Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression.  
Drug Saf. 2000 Aug;23(2):101-13. Review.
147. **Peoples GE, Yoshino I, Douville CC, Andrews JV, Goedegebuure PS, Eberlein TJ.**  
TCR V beta 3+ and V beta 6+ CTL recognize tumor-associated antigens related to HER2/neu expression in HLA-A2+ ovarian cancers.  
J Immunol. 1994 May 15;152(10):4993-9.
148. **Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED.**  
Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer.  
N Engl J Med. 2004 Oct 7;351(15):1513-20.
149. **Pilch H, Hohn H, Neukirch C, Freitag K, Knapstein PG, Tanner B, Maeurer MJ.**  
Antigen-driven T-cell selection in patients with cervical cancer as evidenced by T-cell receptor analysis and recognition of autologous tumor.  
Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Mar;9(2):267-78.

150. **Plasilova M, Risitano A, Maciejewski JP.**  
Application of the molecular analysis of the T-cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic diseases.  
Hematology. 2003 Jun;8(3):173-81. Review.
151. **Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS.**  
The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer.  
JAMA. 1995 Feb 15;273(7):548-52.
152. **Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bunnick JR.**  
Identification of human cancers deficient in antigen processing.  
J Exp Med. 1993 Feb 1;177(2):265-72.
153. **Reynolds SR, Oratz R, Shapiro RL, Hao P, Yun Z, Fotino M, Vukmanovic S, Bystryn JC.**  
Stimulation of CD8+ T cell responses to MAGE-3 and Melan A/MART-1 by immunization to a polyvalent melanoma vaccine.  
Int J Cancer. 1997 Sep 17;72(6):972-6.
154. **Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ.**  
Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy.  
Cancer. 2006 Jul 1;107(1):67-74.
155. **Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP.**  
Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines.  
Nat Med. 2004 Sep;10(9):909-15.
156. **Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE.**  
Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma.  
Nat Med. 1998 Mar;4(3):321-7.
157. **Rouse BT.**  
Regulatory T cells in health and disease.  
J Intern Med. 2007 Jul;262(1):78-95. Review.
158. **Rufer N.**  
Molecular tracking of antigen-specific T-cell clones during immune responses.  
Curr Opin Immunol. 2005 Aug;17(4):441-7. Review.
159. **Saad F.**  
Zoledronic acid significantly reduces pathologic fractures in patients with advanced-stage prostate cancer metastatic to bone.  
Clin Prostate Cancer. 2002 Dec;1(3):145-52. Review
160. **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M**  
Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.  
J Immunol. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

- 
161. **Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP.**  
High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases.  
In Vivo. 1994 May-Jun;8(3):439-43
162. **Salgaller ML, Lodge PA, McLean JG, Tjoa BA, Loftus DJ, Ragde H, Kenny GM, Rogers M, Boynton AL, Murphy GP.**  
Report of immune monitoring of prostate cancer patients undergoing T-cell therapy using dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific peptides from prostate-specific membrane antigen (PSMA).  
Prostate. 1998 May;35(2):144-51
163. **Sato M, Goto S, Kaneko R, Ito M, Sato S, Takeuchi S.**  
Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients.  
Anticancer Res. 1998 Sep-Oct;18(5D):3951-5.
164. **Scheibenbogen C, Letsch A, Schmittel A, Asemissen AM, Thiel E, Keilholz U.**  
Rational peptide-based tumour vaccine development and T cell monitoring.  
Semin Cancer Biol. 2003 Dec;13(6):423-9.
165. **Schendel DJ, Frankenberger B, Jantzer P, Cayeux S, Nobetaner E, Willimsky G, Maget B, Pohla H, Blankenstein T.**  
Expression of B7.1 (CD80) in a renal cell carcinoma line allows expansion of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes in the presence of an alloresponse.  
Gene Ther. 2000 Dec;7(23):2007-14.
166. **Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, Segurado OG.**  
Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines.  
J Immunol. 1993 Oct 15;151(8):4209-20.
167. **Schendel DJ, Oberneder R, Falk CS, Jantzer P, Kressenstein S, Maget B, Hofstetter A, Riethmuller G, Nossner E.**  
Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy.  
J Mol Med. 1997 Jun;75(6):400-13. Review.
168. **Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, McIntyre BW, et al.**  
IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1.  
J Immunol. 1992 Feb 15;148(4):1086-92.
169. **Schmittel A, Keilholz U, Scheibenbogen C.**  
Evaluation of the interferon-gamma-ELISPOT-Assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood.  
J Immunol Methods 1997; 210:167-74

- 
170. **Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G.**  
Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells.  
J Exp Med. 2002 May 20;195(10):1279-88. Erratum in: J Exp Med. 2003 Feb 3;197(3):395.
171. **Schwartz RH.**  
Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.  
Cell. 1992 Dec 24;71(7):1065-8
172. **Sensi M, Farina C, Maccalli C, Lupetti R, Nicolini G, Anichini A, Parmiani G, Berd D.**  
Clonal expansion of T lymphocytes in human melanoma metastases after treatment with a hapten-modified autologous tumor vaccine.  
J Clin Invest. 1997 Feb 15;99(4):710-7.
173. **Sensi M, Farina C, Maccalli C, Anichini A, Berd D, Parmiani G.**  
Intralesional selection of T cell clonotypes in the immune response to melanoma antigens occurring during vaccination.  
J Immunother. 1998 May;21(3):198-204.
174. **Sensi M, Parmiani G.**  
Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses.  
Immunol Today. 1995 Dec;16(12):588-95. Review.
175. **Sensi M, Traversari C, Radrizzani M, Salvi S, Maccalli C, Mortarini R, Rivoltini L, Farina C, Nicolini G, Wolfel T, et al.**  
Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell-receptor variable-region gene usage in HLA-A2-restricted recognition of the melanoma antigen Melan-A/MART-1.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6;92(12):5674-8.
176. **Simons JW, Jaffee EM, Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA, Lazenby AJ, Cohen LK, Finn CC, Clift SM, Hauda KM, Beck LA, Leiferman KM, Owens AH Jr, Piantadosi S, Dranoff G, Mulligan RC, Pardoll DM, Marshall FF.**  
Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer.  
Cancer Res. 1997 Apr 15;57(8):1537-46.
177. **Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG.**  
Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer.  
Cancer Res. 1999 Oct 15;59(20):5160-8.
178. **Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA.**  
A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.  
Nat Immunol. 2001 Apr;2(4):293-9. Review.

- 
179. **Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G.**  
Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13141-6.
180. **Song K, Chang Y, Prud'homme GJ.**  
Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer.  
Gene Ther. 2000 Mar;7(6):481-92.
181. **Soulié P, Trump D, Wilding G, Small E, Dasgupta A.**  
ZD1839 an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TK1), is well tolerated in combination with mitoxantrone and prednisone in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC).  
Ann Oncol 2002 Oct, 13 (Suppl 5), 90, Abstract 328O
182. **Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J.**  
The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years?  
J Urol. 2004 Oct;172(4 Pt 1):1297-301.
183. **Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC.**  
Family history and the risk of prostate cancer.  
Prostate. 1990;17(4):337-47.
184. **Sternberg CN.**  
Systemic treatment and new developments in advanced prostate cancer.  
Eur J Cancer. 2001 Oct;37 Suppl 7:S147-57.
185. **Strom SS, Yamamura Y, Duphorne CM, Spitz MR, Babaian RJ, Pillow PC, Hursting SD.**  
Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database.  
Nutr Cancer. 1999;33(1):20-5.
186. **Surman DR, Dudley ME, Overwijk WW, Restifo NP.**  
Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen.  
J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):562-5.
187. **Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators.**  
Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer.  
N Engl J Med. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
188. **Tatsumi T, Gambotto A, Robbins PD, Storkus WJ.**  
Interleukin 18 gene transfer expands the repertoire of antitumor Th1-type immunity elicited by dendritic cell-based vaccines in association with enhanced therapeutic efficacy.  
Cancer Res. 2002 Oct 15;62(20):5853-8.

- 
189. **Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM, Kwok WW, Storkus WJ.** Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma.  
J Exp Med. 2002 Sep 2;196(5):619-28.
190. **Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G.** 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. 1999 Dec 6;190(11):1669-78.
191. **Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW.** Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Dec;82(24):8624-8.
192. **Trojan A, Witzens M, Schultze JL, Vonderheide RH, Harig S, Krackhardt AM, Stahel RA, Gribben JG.** Generation of cytotoxic T lymphocytes against native and altered peptides of human leukocyte antigen-A\*0201 restricted epitopes from the human epithelial cell adhesion molecule.  
Cancer Res. 2001 Jun 15; 61 (12): 4761-5.
193. **Valmori D, Dutoit V, Schnuriger V, Quiquerez AL, Pittet MJ, Guillaume P, Rubio-Godoy V, Walker PR, Rimoldi D, Lienard D, Cerottini JC, Romero P, Dietrich PY.** Vaccination with a Melan-A peptide selects an oligoclonal T cell population with increased functional avidity and tumor reactivity.  
J Immunol. 2002 Apr 15;168(8):4231-40.
194. **van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T.** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.  
Science. 1991 Dec 13;254(5038):1643-7
195. **Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjanen K.** Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma.  
Eur J Cancer. 1994;30A(12):1797-803.
196. **Vieweg J, Rosenthal FM, Bannerji R, Heston WD, Fair WR, Gansbacher B, Gilboa E.** Immunotherapy of prostate cancer in the Dunning rat model: use of cytokine gene modified tumor vaccines.  
Cancer Res. 1994 Apr 1;54(7):1760-5.

197. **Waanders GA, Rimoldi D, Lienard D, Carrel S, Lejeune F, Dietrich PY, Cerottini JC, Romero P.**  
Melanoma-reactive human cytotoxic T lymphocytes derived from skin biopsies of delayed-type hypersensitivity reactions induced by injection of an autologous melanoma cell line.  
Clin Cancer Res. 1997 May;3(5):685-96.
198. **Waeckerle-Men Y, Uetz-von Allmen E, Fopp M, von Moos R, Bohme C, Schmid HP, Ackermann D, Cerny T, Ludewig B, Groettrup M, Gillessen S.**  
Dendritic cell-based multi-epitope immunotherapy of hormone-refractory prostate carcinoma.  
Cancer Immunol Immunother. 2006 Dec;55(12):1524-33. Epub 2006 Apr 13.
199. **Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, Spears L, Jeffery G, Marty V, Groshen S, Weber J.**  
Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma.  
Clin Cancer Res. 1999 Oct;5(10):2756-65.
200. **Weber J, Sondak VK, Scotland R, Phillip R, Wang F, Rubio V, Stuge TB, Groshen SG, Gee C, Jeffery GG, Sian S, Lee PP.**  
Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multipeptide vaccine for resected Stage II melanoma.  
Cancer. 2003 Jan 1;97(1):186-200.
201. **Weidmann E, Logan TF, Yasumura S, Kirkwood JM, Trucco M, Whiteside TL.**  
Evidence for oligoclonal T-cell response in a metastasis of renal cell carcinoma responding to vaccination with autologous tumor cells and transfer of in vitro-sensitized vaccine-draining lymph node lymphocytes.  
Cancer Res. 1993 Oct 15;53(20):4745-9.
202. **Weiss RA.**  
Viruses, cancer and AIDS.  
FEMS Immunol Med Microbiol. 1999 Dec;26(3-4):227-32. Review.
203. **Winter H, Hu HM, Poehlein CH, Huntzicker E, Osterholzer JJ, Bashy J, Lashley D, Lowe B, Yamada J, Alvord G, Urba WJ, Fox BA.**  
Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies.  
Immunology. 2003 Mar;108(3):409-19.
204. **Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D.**  
Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer.  
J Urol. 2000 Sep;164(3 Pt 1):722-5.
205. **Yang T, McNally BA, Ferrone S, Liu Y, Zheng P.**  
A single-nucleotide deletion leads to rapid degradation of TAP-1 mRNA in a melanoma cell line.  
J Biol Chem. 2003 Apr 25;278(17):15291-6. Epub 2003 Feb 11.
206. **Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY.**  
Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer.  
Clin Cancer Res. 2008 Feb 15;14(4):1032-40.

207. **Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H.**  
Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing.  
J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1246-52.
208. **Zinkernagel RM, Doherty PC.**  
Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.  
Nature. 1974 Apr 19;248(450):701-2.
209. **Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V, Bioley G, Lienard D, Lejeune F, Rimoldi D, Guillaume P, Meidenbauer N, Mackensen A, Rufer N, Lubenow N, Speiser D, Cerottini JC, Romero P, Pittet MJ.**  
Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance.  
Cancer Res. 2004 Apr 15;64(8):2865-73
210. **Zou W.**  
Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.  
Nat Rev Immunol. 2006 Apr;6(4):295-307. Review.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDR	<i>Complementarity determining region</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-tri-Phosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamino-tetra-Acetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
Ep-CAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner ( <i>fluorescence activated cell scanner</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	Granulozyten-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-stimulierender Faktor
GMP	<i>Good-manufacturing practice</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen ( <i>human leukocyte antigen</i> )
HRPC	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom ( <i>hormone-refractory prostate cancer</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LAK-Zellen	Lymphokinaktivierte Killerzellen
MCAF	<i>Macrophage chemotactic and activating factor</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
min	Minute
MIP-1 $\beta$	<i>Monocyte chemotactic protein-1<math>\beta</math></i>
MLTC	<i>Mixed lymphocyte tumor culture</i>
RNA	Ribonukleinsäure

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PAP	Prostata-spezifische saure Phosphatase ( <i>prostatic acid phosphatase</i> )
PBMC	Mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PRAME	<i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSCA	<i>Prostate stem cell antigen</i>
PSGR	<i>Prostate specific G-protein-coupled receptor</i>
PSMA	<i>Prostate-specific membrane antigen</i>
STEAP	<i>six-transmembrane epithelial antigen of the prostate</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorische T-Zelle
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heike Pohla, Labor für Tumorummunologie des LIFE-Zentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Vergabe des interessanten Themas, die Unterstützung und Anteilnahme an den Fortschritten der Doktorarbeit. Sie hatte für alle Probleme jederzeit ein offenes Ohr.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Stief möchte ich sehr herzlich für die Betreuung dieser Arbeit auf Seiten der Hochschule danken. Mir ist bewusst, dass dies für ihn viel zusätzliche Arbeit bedeutet und ich freue mich sehr, dass er seine Zusage für meine Betreuung trotzdem sofort gegeben hat.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher und Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend vom Klinikum rechts der Isar für Patientenmaterial und für zusätzliche Informationen zur Genvakzinestudie (PSA-Verläufe, immunhistologische Daten) danken.

Frau Prof. Dolores J. Schendel und Herrn Dr. med. vet. Thomas Brill danke ich außerdem für ein letztes kritisches Durchlesen dieser Arbeit.

Bei Frau Birgit Stadlbauer bedanke ich mich ganz herzlich für die vorbildliche Einarbeitung und die Unterstützung bei den Experimenten, insbesondere bei der Durchführung des ELISPOTs und der Multiplex-Zytokinanalysen.

Herrn Dr. Horst Lindhofer (TRION Research GmbH) danke ich für den trifunktionellen bispezifischen Antikörper *removab*®.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Rainer Riesenberg bedanke ich mich für die Organisation des Dienstags stattfindenden Badmintonmatches. Es war immer eine willkommene Abwechslung.

Meiner Frau danke ich für ihre unermüdliche Motivation und Unterstützung und v. a. gegen Ende der Arbeit für ihr aufgebrachtes Verständnis und ihre Geduld.

## 10. Lebenslauf

### **■ Persönliche Daten**

Name: Michael Friedrich Osthoff  
geboren am/in: 31.10.1976 in Marktredwitz  
Religion: römisch-katholisch  
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Mirjam Osthoff  
zwei Kinder, Salome und Leah  
Eltern: Christine Osthoff, Studienrätin  
Dr. med. Friedrich Osthoff, Arzt für Orthopädie

### **■ Schulbildung**

1983 – 1987 Besuch der Grundschule Reinhausen in Regensburg  
1987 – 1996 Besuch des Werner-von-Siemens-Gymnasium Regensburg  
1996 Abschluss Abitur, Note 1.0

### **■ Wehrdienst**

1996-1997 12-monatiger Wehrdienst in der Sportförderkompanie Neubiberg bei München

### **■ Studium**

10/1997-11/2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Gesamtnote 1.33  
5/2001 *United States Medical Liscensing Examination Step 1*  
12/2003 *United States Medical Liscensing Examination Step 2*  
1997-2003 Bayerisches Hochbegabtenstipendium

■ **Praktisches Jahr**

1. Tertial                    *Neurologie*  
Städtisches Krankenhaus München-Harlaching
2. Tertial                    *Nephrologie/Gastroenterologie*  
Mount Sinai Hospital, New York, NY, U.S.A.  
*Hämatologie/Kardiologie*  
Duke University Hospital, Durham, NC, U.S.A.
3. Tertial                    *Chirurgie*  
St. Claraspital, Basel, Schweiz

■ **Beruflicher Werdegang**

- 01-09/2004                Arzt im Praktikum in der Abteilung Innere Medizin der Medizinischen  
Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Universität München
- 10/2004-09/2005        Assistenzarzt in der Abteilung Innere Medizin der Medizinischen  
Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Universität München
- Seit 10/2005             Assistenzarzt in der Abteilung Innere Medizin des Universitätsspital  
Basel

## 11. Anhang

### **Phase I/II clinical study: cytokine gene therapy approach to prostate carcinoma**

Die Experimente dieser Arbeit wurden im Rahmen einer durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten klinischen Phase I/II-Studie über den Einsatz einer zytokinbasierten Gentherapie beim Prostatakarzinom durchgeführt (BMBF DLR 01 GE 9625/4):

“Phase I/II study of immunization with MHC class I matched allogeneic human prostatic carcinoma cells engineered to secrete Interleukin-2 and Interferon- $\gamma$ .”

Verantwortlicher Leiter: Prof. Dr. B. Gänsbacher, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Kooperation: Prof. Dr. R. Hartung, Prof. Dr. J. Breul, Urologische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Prof. Dr. F. Fend, Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Prof. Dr. D. J. Schendel, Institut für Molekulare Immunologie, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

Dr. H. Pohla, Klinische Kooperationsgruppe „Immuntherapien urologischer Tumoren“, Labor für Tumormunologie der Universität München

In dieser klinischen Phase I/II Studie wurde der Einsatz einer genmodifizierten, allogenen PCa-Vakzine an HLA-A\*02-positiven Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom (Stadium IV) getestet. Zum Einsatz kam die mit IL-2 und IFN- $\gamma$  retroviral transfizierte LNCaP-Zelllinie (LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$ ), welche ursprünglich aus der Lymphknotenmetastase eines PCa-Patienten etabliert worden war (75). IFN- $\gamma$  ermöglicht eine deutliche Steigerung der MHC-I-Expression auf den HLA-Moleküle nur schwach exprimierenden Tumorzellen, induziert Gene, die an der Antigenprozessierung und –präsentation auf MHC-I-Moleküle beteiligt sind (76) und steigert die Produktion von PSA. IL-2 wirkt proliferativ und anti-apoptotisch und erhöht die Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten am

Vakzineort (52). In Übereinstimmung mit 40-50 % der westkaukasischen Bevölkerung exprimieren die transfizierten Vakzinezellen das HLA-A\*02-Gen bzw. den Subtyp HLA-A\*0201.

## 11.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive, nicht-kontrollierte, nicht-randomisierte Interventionsstudie. Phase I der Studie bestand aus zwei Teilen: die ersten drei Patienten wurden viermal mit jeweils  $7,5 \times 10^6$  Vakzinezellen geimpft. Trat 60 Tage nach Applikation der dritten Injektion bei Patient Nr. 3 keine Toxizität Grad 3 oder 4 auf (entsprechend den Common Toxicity Criteria, Version 2.0, des National Cancer Institute, 1999), so wurden drei weiteren Studienteilnehmern im zweiten Teil der Phase I die doppelte Zelldosis ( $15 \times 10^6$  Zellen) pro Impfung verabreicht. Endpunkte dieser Phase waren die Bewertung der Toxizität und der Sicherheit bzw. Durchführbarkeit der Studie. In der sich anschließenden Phase II wurden insgesamt 24 Patienten eingeschlossen und mindestens viermal mit  $15 \times 10^6$  Vakzinezellen geimpft. Neben der Sicherheit und Toxizität lag das Hauptaugenmerk dieses Studienabschnitts auf der Beurteilung der klinischen Effektivität der Vakzine (z.B. an Hand des PSA-Verlaufs) und der Reaktion des Immunsystems.

### Einschlusskriterien:

- Diagnose eines progredienten, histologisch gesicherten, hormonrefraktären Prostatakarzinoms. Als Progredienz wurde dabei ein konsekutiver dreimaliger PSA-Anstieg trotz eines Serum-Testosteronspiegels von  $< 50$  ng/dl gewertet.
- Karnofsky-Index  $\geq 70\%$
- Vorhandensein adäquater Organfunktionen, definiert als:
  1. Leukozyten  $> 3.000/\text{mm}^3$ , Lymphozyten  $> 1.000/\text{mm}^3$ , Thrombozyten  $> 100.000/\text{mm}^3$ , Hämoglobin  $\geq 9$  g/dl
  2. Bilirubin  $< 2,0$  mg/dl oder GOT  $<$  doppelter oberer Normwert
  3. Kreatinin  $\leq 2,0$  mg/dl oder Kreatininclearance  $\geq 40$  ml/min
- Serum-Testosteron  $< 50$  ng/dl
- kein Anhalt für eine aktive Infektion, die eine antibiotische Therapie notwendig macht
- Unterschriebene Einverständniserklärung
- Alter  $\geq 18$  Jahre
- keine Chemotherapie oder Bestrahlung in den letzten vier Wochen vor Studieneinschluss
- HLA\*0201-positiv

Die Gabe von GnRH-Agonisten wurde bei Patienten, die sich keiner chirurgischen Orchiektomie unterzogen haben, fortgesetzt. Gewebeproben aus der Haut an der

Vakzinierungsstelle bzw. eine Biopsie zugänglicher Tumorlokalisationen (z. B. Lymphknoten, retroperitoneale oder pelvine Tumore, Knochenmetastasen, Prostataraumforderungen) wurden im Einverständnis mit den betroffenen Patienten entnommen.

### Ausschlusskriterien:

- ernsthaft interferierende Erkrankung, v. a. signifikante kardiale oder pulmonale Erkrankung (z. B. Herzinsuffizienz NYHA III/IV)
- mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von weniger als 12 Wochen
- symptomatischer ZNS-Befall durch Primärtumor
- vorangegangene autologe oder allogene Tumorstabilisierung
- gleichzeitige Durchführung einer Bestrahlung, Chemotherapie, Steroidtherapie (Applikation nur in lebensbedrohlichen Umständen erlaubt) oder einer anderen Immuntherapie.
- Überempfindlichkeit gegenüber IFN- $\gamma$  oder eines anderen Bestandteils der Vakzine
- HIV-positiv

Vor Behandlungsbeginn wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: Anamnese, körperliche Untersuchung, Gewicht, Größe, Blutbild, Serumchemie-Screening (Bilirubin, GOT, Lactatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, Harnstoff und Kreatinin), Serumtestosteron, PSA, saure Phosphatase, Knochenszintigraphie innerhalb vier Wochen vor Studieneinschluss, EKG, Röntgen des Thorax, CT oder MRT des Abdomen und Becken bzw. von Regionen mit messbarer Tumormasse, HIV-Test, immunologische Untersuchungen (u.a. auf Antikörper gegen den Transfektionsvirus MoMuLV und die LNCaP-Zelllinie)

Folgende Umstände führten bei einem Teilnehmer zum Abbruch der Studie: Toxizität 4. Grades, ernsthafte anderweitige Erkrankung, Progredienz des Tumorleidens nach sechs Wochen, Entscheidung des Patienten für einen Abbruch der Studie, Entscheidung des verantwortlichen Studienleiters für den Ausschluss eines Patienten aufgrund veränderter, inakzeptabler Umstände den Patienten betreffend.

In Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer zweidimensional messbaren Tumormasse wurden für die Beurteilung der therapeutischen Effektivität der Vakzine die in den Tabellen 11.1 und 11.2 dargestellten Kriterien festgelegt:

Komplette Remission (CR)	Klinisch, laborchemisch und radiologisch kein Hinweis auf einen Tumor über mindestens vier Wochen
Partielle Remission (PR)	>50%ige Reduktion der addierten Durchmesser aller Tumorkläsionen über mindestens vier Wochen; es dürfen keine neuen Kläsionen auftreten bzw. ein Wachstum bestehender Kläsionen zu beobachten sein
Minimale Remission (MR)	25-49%ige Reduktion der addierten Durchmesser aller Tumorkläsionen für mindestens vier Wochen.
Keine Remission	<25%ige Reduktion oder Zunahme der Tumormaße über mindestens drei Monate
Progression	>50%ige Zunahme der addierten Durchmesser aller Tumorkläsionen oder Auftreten neuer Kläsionen

**Tabelle 11.1:** Beurteilung der Vakzineeffektivität an Hand der zweidimensional erfassbaren Tumormast

Komplette Remission (CR)	PSA-Normalisierung, gemessen bei drei aufeinanderfolgenden Blutabnahmen
Partielle Remission (PR)	≥ 80 %ige Reduktion des PSA-Wertes, gemessen bei drei aufeinanderfolgenden Blutabnahmen
Stabilisierung	Patienten, die über mindestens 90 Tage weder die Kriterien für eine PR noch für eine Progression erfüllen
Progression	Drei aufeinanderfolgende Erhöhungen des PSA-Wertes (jeweils im Abstand von zwei Wochen) auf eine Konzentration, die mehr als 50% oberhalb des Ausgangswertes liegt

**Tabelle 11.2:** Beurteilung der Vakzineeffektivität an Hand des PSA-Wertes

## 11.2 Vakzinepräparation und – applikation

Die Vakzine wurde unter GMP-Bedingungen in einem von der FDA anerkannten Labor in den USA produziert, in einer Dosis von  $20 \times 10^6$  Zellen eingefroren, nach München transportiert und in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert. Nach dem Auftauen wurde die für die Injektion benötigte Zellzahl in sterilem PBS in einer 1 ml Spritze aufgezogen, welche anschließend in einem Linearbeschleuniger mit 150 Gy bestrahlt wurde. Die Injektion wurde intradermal am Unterarm oder Oberschenkel an den Tagen 1, 15, 29 und 92 durchgeführt, bei objektivem Ansprechen (an Hand der oben dargestellten Kriterien) erfolgten weitere Applikationen im Abstand von 90 Tagen über maximal ein Jahr bzw. bis zur Progression.

### **11.3 Monitoring**

Zur Überwachung der Toxizität und Evaluation des klinischen Verlaufs während der Studie wurden in regelmäßigen Abständen klinische, laborchemische (u.a. Blutbild, Kreatinin, PSA) und radiologische Untersuchungen (u.a. Computertomographie betroffener Organe, Knochenszintigraphie) durchgeführt.

Zur Beurteilung der Immunantwort wurden den Studienteilnehmern an den Tagen 0, 8, 22, 36, 57 und 99 Blutproben entnommen, bei objektivem Ansprechen zusätzlich vierteljährlich. Die sofort isolierten PBMC wurden in Stickstofftanks, Serumproben bei einer Temperatur von -20°C bis zur Verwendung gelagert. Mit Hilfe von IFN- $\gamma$ -ELISPOT-, Serumzytokin- bzw. Tetramerananalysen wurde die Reaktion des Immunsystems und speziell der Lymphozyten im Blut auf die Vakzinierung analysiert.

Mittlerweile wurde die Studie mit 30 eingeschlossenen Patienten abgeschlossen und befindet sich in der Evaluierung.