

Aus der II. Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

**AKTIVIERUNG HTERT-SPEZIFISCHER T-LYMPHOZYTEN BEI PATIENTEN MIT
NICHT-KLEINZELIGEM LUNGENKARZINOM**

INAUGURALDISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

vorgelegt von
DOMINIQUE WELLNITZ
aus Hamburg

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gahn, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.04.2013

Gez.: Prof. Dr. Johann Oltmann Schröder, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	3
2. MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1 Gewinnung von Lymphozyten und Monozyten aus peripherem Blut.....	9
2.2 Zellzahlbestimmung	10
2.3 Herstellung von Dendritischen Zellen	10
2.4 Reifung und Pulsierung der Dendritischen Zellen mit CMV- und hTERT-Peptiden sowie SEA.....	10
2.5 Kryokonservierung der Zellen.....	11
2.6 Depletion der regulatorischen T-Zellen (T _{reg})	12
2.7 Aktivierung CMV- und hTERT-spezifischer T-Lymphozyten	13
2.8 Durchflusszytometrie	14
2.9 Separierung von CD137 ⁺ T-Zellen.....	16
2.10 Expansion von CD137 ⁺ T-Zellen.....	17
2.11 Analyse CD137 ⁺ T-Zellen im Chromfreisetzungstest.....	18
3. ERGEBNISSE	21
3.1 Ausreifung Dendritischer Zellen	21
3.2 Depletion regulatorischer T-Zellen	23
3.3 Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen	24
3.3.1 CMV-spezifische, intrazelluläre IFN γ -Produktion	24
3.3.2 CMV-spezifische Zytotoxizität	25
3.4 Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellen	26
3.4.1 Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellen bei den gesunden Spendern 1-4	26
3.4.2 hTERT-spezifische T-Zellreaktion bei den Patienten 1, 2, 3, 4, 5 und 6.....	29
3.4.3 Separation von CD137 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten bei dem Patienten 5.....	34
3.4.4 Zytotoxizitätsuntersuchung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bei den Patienten 5 und 6.....	35
4. DISKUSSION	37
4.1 Pulsierung und Ausreifung der DC.....	37
4.2 Depletion regulatorischer T-Lymphozyten.....	38

4.3 Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten	39
4.4 Zytotoxizität separierter CD137 ⁺ T-Lymphozyten.....	45
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. LITERATURVERZEICHNIS	49
7. VERÖFFENTLICHUNG.....	62
8. DANKSAGUNG	63
9. LEBENSLAUF.....	64

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	
Ak	Antikörper	
APC	Antigen präsentierende Zelle	
CD	Cluster of differentiation	Lymphozyten-Differenzierungsantigen
CMV	Cytomegalovirus	Zytomegalievirus
Cpm	counts per minute	Anzahl pro Minute
CTL	Cytotoxic T-lymphocytes	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	desoxyribonucleinacid	Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose	
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	Äthylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting	Durchflusszytometer
FCS	fetal calf serum	fetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate	grüner Fluoreszenzfarbstoff
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor	Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	hour	Stunde
Histo	Histologie	
HLA	human leukocyte antigen	Leukozytenantigen
hTERT	humane telomerase reverse transcriptase	
IFN γ	Interferon-gamma	
IL	Interleukin	
l	Liter	
Lz	Lymphozyten	
MACS	magnetic activated cell sorting	magnetische Zellseparation
mg	Milligramm	
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex

Min	Minute	
ml	Milliliter	
Neg	negativ	
NK	Natürliche Killerzelle	
NSCLC	non-small cell lung cancer	
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin	roter Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein	blauer Fluoreszenzfarbstoff
PG	Prostaglandin	
pp65	Phosphoprotein der Molmasse 65 kDa	
py	pack year	Packungsjahr
RNA	ribonucleinacid	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur	
SEA	staphylococcal enterotoxin A	Staphylokokken Enterotoxin A
Sec	Sekunde	
TAA	tumor-associated antigen	Tumorassoziertes Antigen
Tab.	Tabelle	
TLR	Toll-like Rezeptor	
TNF	Tumor-necrosis-factor	
TNM	Tumor-Node-Metastasen-Klassifikation	
U	Unit	
µg	Mikrogramm	
µl	Mikroliter	

1. Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen sind nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Weltweit ist das Lungenkarzinom die am häufigsten zum Tode führende Tumorerkrankung (Becker 2010). In Deutschland ist es bei beiden Geschlechtern die dritthäufigste Krebserkrankung und hat bei Frauen eine stark steigende Tendenz.

Das Lungenkarzinom wird in zwei Gruppen unterteilt. Das Kleinzellige Lungenkarzinom (Small Cell Lung Cancer= SCLC), das einen Anteil von 20% hat und das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer= NSCLC) (Bolonaki et al. 2006), das einen Anteil von 80% an allen Lungenkarzinomen hat. Zu den NSCLC gehören das Plattenepithel-, das Adeno- und das Großzellige Lungenkarzinom.

Die aktuelle Therapie des NSCLC erfolgt stadienadaptiert (Heigener et al. 2007). Im Stadium I wird meist eine operative Therapie vorgenommen. Im Stadium II wird eine Operation in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie durchgeführt. Im Stadium III wird eine multimodale Therapie bestehend aus Radio- und Chemotherapie eingesetzt, eventuell in Kombination mit einer Operation (Martins, R. G. 2005). Ein palliativer Ansatz in Form einer Chemotherapie ist für das Stadium IV vorgesehen. Die Chemotherapie ist meist zusammengesetzt aus Platinderivaten mit z. B. Taxanen oder Vinorelbinen. Die mittlere Überlebenszeit mit alleiniger Chemotherapie liegt nur bei 10 Monaten (Bonomi et al. 2000). Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Erlotinib, die allerdings nur bei der Untergruppe der Patienten mit EGFR-Mutationen die Überlebenszeit verlängern (Santarpia et al. 2011) oder Bevacizumab aus der Gruppe der monoklonalen Antikörper, welche über die Bindung an den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Gefäßneubildung hemmen (Martins, R. G. 2005) sind neue Therapieansätze. Jedoch verbessern diese Therapieansätze die Prognose der Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC nur begrenzt, weshalb neue Therapieansätze untersucht werden müssen.

Einen neuen Therapieansatz stellt die zelluläre Immuntherapie dar. Tumorzellen exprimieren Antigene (Tumorassoziierte Antigene= TAA), die Zielstrukturen für das eigene Immunsystem

enthalten (Van der Bruggen et al. 2002). Um das Immunsystem gegen das Antigen zu aktivieren, reicht es nicht aus, dass das Antigen von Tumorzellen präsentiert wird, es muss von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Dendritischen Zellen (DC) spielen als die effizientesten APC (Banchereau et Palucka 2005, Sheng et al. 2005) eine entscheidende Rolle im System der zellulären Abwehr (Steinman et al. 1991). Ex vivo kann das Antigen auf DC präsentiert werden, indem die DC mit Peptiden und Proteinen pulsiert oder mit Plasmiden, DNA sowie RNA transfiziert werden (Huo et al. 2006), um eine Aktivierung von T-Lymphozyten zu erzeugen. Die TAA werden in DC von Proteasomen in kleine Peptide zerlegt, im Endoplasmatischen Retikulum auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) geladen und auf der Zellmembran den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert (Vonderheide 2008). Dies führt zur Aktivierung der CTL und Ausschüttung von Zytokinen, die zur Lyse der Zellen führt, die das Antigen präsentieren.

Die DC sorgen für eine Aktivierung der T-Helferzellen, zytotoxischen T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen und bewirken dadurch einen bestmöglichen Antitumoreffekt. Es wurden aus Monozyten stammende DC genutzt, die zusätzlich zur Induktion der T-Lymphozyten auch die Antikörperproduktion von B-Zellen regulieren (Lopez-Bravo et Ardavin 2008). Die DC müssen ausgereift sein, um eine bessere T-Zellaktivierung zu erzielen (Turner et al. 1999). Der Antitumoreffekt wird effektiver durch reife DC als durch unreife DC vermittelt (De Vries et al. 2002, Jonuleit et al. 2001). Hierbei haben Studien gezeigt, dass sich nicht vollständig gereifte DC gegenüber vollständig ausgereiften DC am besten eignen (Aloysius et al. 2009). Die Reifung lässt sich über eine vermehrte Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86 erkennen und kann über unterschiedliche Wege erfolgen. Der bekannteste, der „Goldstandard“, ist der Zytokincocktail aus IL-4, GM-CSF, IL-6, IL-1-beta, PGE₂ und TNF-alpha (Jonuleit et al. 1997, Jonuleit et al. 2001) mit dem die DC inkubiert werden. Alternativ können die DC mit Liganden des Toll-like Rezeptors (TLR) 7 und 8 (TLR7/8L), sowie löslichen Liganden des CD40 (sCD40L) kultiviert werden (Xu et al. 2006).

Ein TAA in der Immuntherapie maligner Tumore ist die humane Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) (Vonderheide 2002). Es handelt sich hierbei um ein 1132 Aminosäuren langes Protein, an dem sich ein RNA-Anteil befindet (Liu et al. 2010). Dieses Protein sorgt für eine ständige Resynthese der Chromosomenenden und bewirkt, dass Zellen im Zellzyklus

nicht in Apoptose gehen, sondern weiterleben. Die Telomerase ist jedoch in der Regel nicht in gesunden Körperzellen exprimiert (Kim et al. 1994), weshalb Körperzellen nach jedem Zyklus ein Stück der Chromosomenenden verlieren und sterblich sind. hTERT wird nur in Keimbahn-, Embryonal- und Stammzellen gefunden, vor allem aber in mehr als 85% aller Tumorzellen (Huo et al. 2006). Die Expression der Telomerase in malignen Zellen korreliert mit dem Tumorwachstum und deren Entwicklung (Hahn, Counter et al. 1999). Hierbei ließ sich durch die Inhibition der Telomerase sogar eine Minderung oder Beendigung des Tumorwachstums und ein Übergang in den Zelltod nachweisen (Hahn et al. 1999; Herbert et al. 1999). Diese Tatsachen machen hTERT zu einem interessanten Ziel in der Immuntherapie von Tumorpatienten (Shay et Wright 2006; Harley 2008).

Um eine hTERT-spezifische Antwort der T-Lymphozyten zu aktivieren, muss das hTERT-Protein, wie alle TAA, in Peptide zerlegt und auf der Zelloberfläche als Antigen im MHC Typ I präsentiert werden (Lev et al. 2002). Diese Präsentation kann von der Tumorzelle selbst oder auf APC erfolgen. Ein Komplex von Tumorzell-MHC und Peptid mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Lymphozyten führt über die Freisetzung von Zytokinen, schließlich zur Zellzerstörung (Vonderheide 2002).

Das zuerst untersuchte hTERT-Epitop ist das HLA-A2 p540 gewesen, das bei Patienten mit Melanomen entdeckt worden ist (Vonderheide et al. 1999). Es wurden weitere 25 hTERT-Epitope entdeckt, wovon 22 im MHC I und 3 im MHC II präsentiert werden. hTERT wird nicht nur über MHC I sondern auch über MHC II präsentiert (Brunsvig et al. 2006; Schroers et al. 2002 und 2003; Vonderheide 2008), welches T-Helfer Zellen aktiviert und damit die Antwort der CTL unterstützt. Mit den hTERT-Peptiden für HLA-A2, A3, A24 und DR werden 75% der Patienten abgedeckt und mit den später entdeckten Peptiden für HLA-A1 (Schreurs et al. 2005) weitere 15%. Bis heute wurden Epitope für HLA-A1, -A2, -A3, -A24, -B7 und DR 1, 4, 7, 11, 15 gefunden (Adotevi et al. 2006; Arai et al. 2001; Brunsvig et al. 2006; Cortez-Gonzalez et al. 2006; Kokhaei et al. 2007; Minev et al. 2000; Mizukoshi et al. 2006; Scardino et al. 2002; Schreurs et al. 2005; Schroers et al. 2002; Schroers et al. 2003; Thorn et al. 2007; Vonderheide et al. 1999; Vonderheide et al. 2001). Damit sind bei 90% der Krebspatienten immunogene hTERT-Epitope bekannt.

In ex vivo Versuchen konnten bei 8 von 17 Patientinnen mit Mammakarzinom hTERT-spezifische CTL aktiviert werden, wobei bei gesunden Spendern nur in 38% der Fälle T-Lymphozyten aktiviert werden konnten (Amarnath et al. 2004). In einer Studie mit 27

Myelompatienten wurde bei 2 Patienten nach einer ex vivo Stimulation mit hTERT-Peptiden eine Aktivierung spezifischer CTL gefunden (Maecker et al. 2005).

In der Therapie maligner Erkrankungen haben Vakzinierungsstudien in den letzten Jahren zugenommen. Sie lassen sich einteilen in Peptid- / Protein- / Tumorzell- / DNA- oder rekombinante Virusvakzinierungen, mit denen in vitro oder in vivo DC mit Tumorantigenen pulsiert werden können (Berzofsky et al. 2004). Bei den Vakzinierungen kann ein Einsatz von Polypeptiden erfolgen, da auf Grund der Expression von unterschiedlichen TAA auf den Tumorzellen T-Lymphozyten gegen mehrere Epitope aktiviert werden können (Parmiani et al. 2002).

In der ersten Vakzinierungsstudie mit autologen, ex vivo mit hTERT-Peptid pulsierten DC ließen sich bei vier von sieben Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinom spezifische CTL aktivieren (Vonderheide et al. 2004). In einer anderen Studie bei 19 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde nach subcutaner Injektion von hTERT-Peptiden und Zugabe von GM-CSF bei 68% der Patientinnen eine spezifische Immunantwort erreicht. Hierbei produzierten die CTL Interferon-gamma (IFN γ) und lysierten ex vivo den Tumor (Domchek et al. 2007). Bei 14 anderen Patienten mit metastasierten Nieren- und Colonkarzinomen, sowie Melanomen konnte dies nicht beobachtet werden (Parkhurst et al. 2004). Es folgte nach der Vakzinierung, die jedoch ohne GM-CSF durchgeführt worden war, zwar eine hTERT-spezifische Immunantwort bei 50% der Patienten, jedoch ließ sich ex vivo keine spezifische Tumorlyse nachweisen. Weitere hTERT-spezifische CTL Antworten waren bei Patienten mit Prostatakarzinomen und Melanomen zu beobachten (Wenandy et al. 2008).

Vakzinierungen mit DC, die mit hTERT-Peptiden beladen waren, wurden in klinischen Phase I/II- Studien bei 10 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen durchgeführt. Diese führten bei zwei Patienten zu einer Rückbildung der Metastasen, bei einem Weiteren zu einer Stabilisierung (Märten et al. 2006). Die Injektion von hoch- und niedrigaffinen hTERT-Peptiden ergab bei 95% der Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eine hTERT-spezifische Immunantwort, jedoch ohne eine klinische Verbesserung (Mavroudis et al. 2007).

Bei Patienten mit Prostatakarzinom wurden nach Vakzinierungen mit B-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid beladen waren, dosisabhängige Immunantworten gefunden (Cortez-Gonzalez et Zanetti 2007). In weiteren Ansätzen, die DC mit hTERT-mRNA transfiziert hatten,

wurden Immunantworten bei 95% der 20 Patienten gefunden (Su et al. 2005). In einem weiteren Vakzinierungsversuch mit HLA-Klasse II restringierten hTERT-Peptiden und GM-CSF konnten bei 48 untersuchten Pankreaskarzinompatienten bei 63% der Patienten eine CTL-Aktivierung erreicht werden. Bei Patienten mit positiver Immunantwort war die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöht (Bernhardt et al. 2006).

Subcutane Vakzinierungen bei Patienten mit NSCLC erfolgten mit Peptidkombinationen hoch und niedrigaffiner hTERT-Peptide bei 22 Patienten. Eine Immunantwort fand sich bei 76% der Patienten, die mit einer Überlebensdauer von ca. 30 Monaten verbunden war. Im Gegensatz dazu betrug die Überlebensdauer bei nicht-ansprechenden Patienten nur 4 Monate (Bolonaki et al. 2007). Eine andere Vakzinierungsstudie, die bei 26 Patienten mit einer Kombination aus MHC I und II restringierten hTERT-Peptiden sowie GM-CSF durchgeführt worden war, erbrachte eine Immunantwort bei 46% der Patienten und eine Remission bei einem Patienten (Brunsvig et al. 2006).

Diese zellulären Immunantworten waren mit klinischem Ansprechen verbunden, aber nur bei einem Teil der Patienten zu beobachten. Hieraus leitet sich die Forderung ab, effektivere Ansätze zur Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellantworten zu finden, um bei mehr Patienten eine zelluläre Immuntherapie erfolgreich durchführen zu können.

Deshalb war Gegenstand der vorliegenden Arbeit die Optimierung der Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bei Patienten mit NSCLC. Dazu wurde die immunstimulatorische Kompetenz von DC, die mit dem Zytokincocktail ausgereift waren, mit DC verglichen, die mit TLR7/8L und sCD40L ausgereift waren.

2. Material und Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Versuchsabläufe wurden gleichermaßen an NSCLC-Patienten sowie gesunden Spendern unter sterilen Bedingungen (Microflow Safety Cabinet Modell 51424/5, Nunc) durchgeführt.

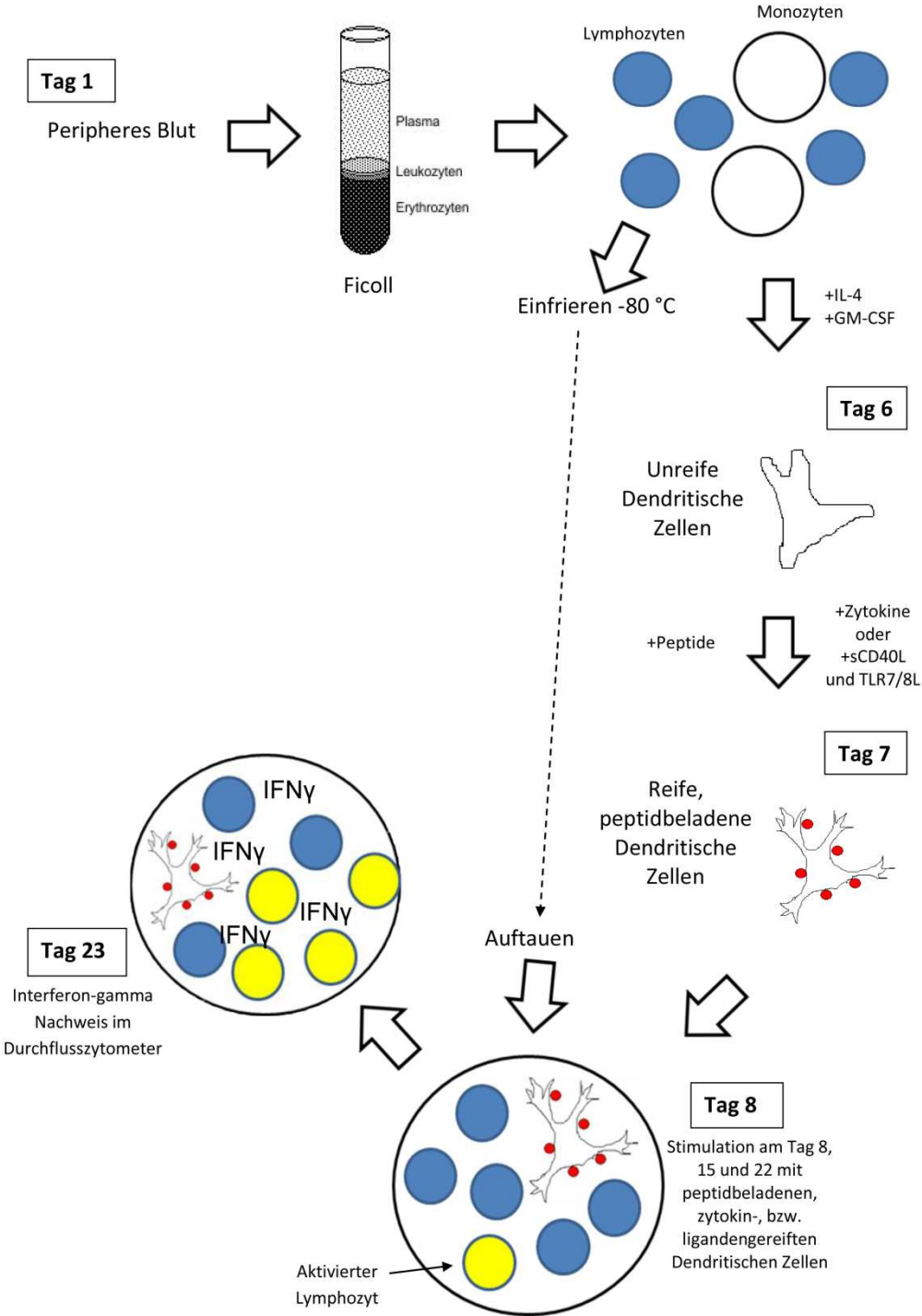


Abb. 1: Versuchsablaufschemata

2.1 Gewinnung von Lymphozyten und Monozyten aus peripherem Blut

Die PBMC wurden aus dem peripheren Blut von Patienten mit Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinom (Patient 1, 2, 3, 4, 5, 6) (Tab. 1) sowie bei den gesunden Probanden 1-5 gewonnen. Die Blutentnahmen fanden zwischen den Chemotherapiezyklen statt.

Patient	m/w	Geb. jahr	Histo.	TNM	ED	Nikotin	Therapie	Verlauf
1.	M	1935	Platten-epithel	T3 N2 MX	08/08	Ja	1. 3 Zyklen Carboplatin/Taxol 2. 2 Zyklen Gemcitabine/Vinorelbin	1. Progress 2. Progress
2.	W	1937	Großz.	T4 N3 M1	12/08	Nein	1. Carboplatin/Paclitaxel 2. 4 Zyklen Carboplatin/Docetaxel 3. Carboplatin/Gemcitabine 4. Erlotinib	1. Abbruch allergische Reaktion 2. Abbruch allergische Reaktion 3. Partielle Remission 4. Progress
3.	M	1948	Platten-epithel	T4 N3 M0	02/09	Ja	1. 4 Zyklen Carboplatin/Paclitaxel 2. 4 Zyklen Gemcitabin/Navelbine 3. Strahlentherapie	1. Progress 2. Progress
4.	M	1953	Adeno	T3 N0 M0	02/08	Nein	1. Thorakotomie 2. 6 Zyklen Carboplatin/Vinorelbine 3. 6 Zyklen Pemetrexed	1. kein Tumornachweis 2. kein Tumornachweis 3. Progress
5.	M	1934	Platten-epithel	T4 N3 M0	02/08	Nein	1. 6 Zyklen Carboplatin/Paclitaxel 2. Erlotinib	1. Partielle Remission 2. Therapieabbruch wegen AZ Verschlechterung
6.	M	1940	Platten-epithel	T3 N3 M0	05/09	80 py	1. 6 Zyklen Carboplatin/Vinorelbine 2. Strahlentherapie	1. Teilremission

Tab. 1: Übersicht der Patienten

Zur Gewinnung der PBMC wurde peripheres, heparinisertes Blut in einem sterilen 50 ml Röhrchen (Sarstedt) im 1:1 Verhältnis mit PBS (Biochrom AG) verdünnt. Diese Suspension wurde in einem weiteren 50 ml Röhrchen auf 12,5 ml Ficoll (Biochrom AG) geschichtet (Abb. 1) und anschließend bei 1600 U/Min 20 Minuten ohne Bremse bei RT zentrifugiert (Labofuge 400, Heraeus instruments). Es entstand ein Dichtegradient, von dem die mittlere, weißliche Schicht, welche Lymphozyten und Monozyten enthält, mit sterilen, 3,5 ml Transferpipetten (Sarstedt) abpipettiert wurde. Der abgenommene Interphasering wurde in ein 50 ml Röhrchen gegeben und zentrifugiert (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min). Danach wurde der trübe Überstand abgenommen und die Zellen in PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation und Abnahme des Überstandes, bis dieser klar war. Die resultierenden Zellen waren weitgehend frei von Thrombozyten und Erythrozyten.

2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 1 ml Medium suspendiert. Hiervon wurden 10 µl abgenommen und in dem Verhältnis 1:1, 1:10, 1:50 oder 1:100 mit Trypanblau (Biochrom AG) in einem Eppendorfgefäß (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml, Sarstedt) gemischt, so dass sich 100 Zellen in allen Quadranten zusammen zählen ließen. Dann wurde die Neubauer Zählkammer *Improved bright-line, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²* (Marienfeld) vorbereitet, indem das Deckglas mit Wasser auf dem Objektträger fixiert wurde. 10 µl des Trypanblau-Zellgemisches wurden unter das Deckglas gegeben und es folgte das Zählen der Zellen in allen vier Quadranten unter dem Mikroskop. In der Trypanblaufärbung sind tote Zellen durch eine dunkelblaue Färbung und lebende Zellen durch eine helle Blaufärbung gekennzeichnet worden. Die Zellzahl wurde mit der Formel: gezählte Zellen x Konstante x Verdünnung / Quadrantenanzahl = Zellzahl/µl (Konstante = 10; Quadrantenanzahl = 4) berechnet.

2.3 Herstellung von Dendritischen Zellen

Die PBMC, höchstens 5×10^7 , wurden mit 10 ml Cellgro *Dendritic Cell Medium* (Cellgenix) in eine 75 cm² Kulturflasche (Sarstedt) gegeben und für 2 h bei 37°C in einem Brutschrank *Hera Cell* (Heraeus instruments) in 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 h wurde die Kulturflasche mit 10 ml PBS gespült, um die nicht adhärenen Zellen herauszulösen. Diese wurden nach der Bestimmung der Zellzahl kryokonserviert.

Die in der Flasche verbliebenen monozytären, adhärenen Zellen wurden in 10 ml Cellgro mit 400 U/ml IL-4 (R&D-Systems) und 800 U/ml GM-CSF (R&D-Systems) bei 37°C und 5% CO₂ 6 Tage kultiviert. Am Tag 3 und 5 wurde erneut die oben angegebene Menge IL-4 und GM-CSF hinzugegeben. Am Tag 6 wurden alle Zellen aus der Flasche durch mehrmaliges Waschen mit PBS gelöst und die Zellzahl bestimmt. Es folgte die Kryokonservierung der Zellen.

2.4 Reifung und Pulsierung der Dendritischen Zellen mit CMV- und hTERT-Peptiden sowie SEA

Die Dendritischen Zellen wurden aufgetaut und 10^6 Zellen in 1 ml Cellgro in einer 24-Well-Platte mit flachem Boden (Nunc) aufgenommen.

In der Positivkontrollen wurden ausgereifte DC mit 20 µg/ml Staphylococcus aureus Enterotoxin A (SEA) (Sigma) pulsiert.

Zur Aktivierung CMV- oder hTERT-spezifischer T-Zellen wurde zu den Dendritischen Zellen, die mit Zytokinen ausgereift werden sollten, 20 µg/ml CMV-Peptidmix *PepTivator-CMV pp65* (Miltenyi Biotec) oder 30 µg/ml HLA-restringierte hTERT-Peptide *hTERT-derived T cell epitopes HLA-A1: p325; HLA-A2: p540, p865, p988; HLA-A3: p325; HLA-A24: p461; HLA-DR1, 7, 15: p672 und HLA-DR4, 11, 15: p766* (Eurogentec) gegeben. Der CMV-Peptidmix besteht aus überlappenden Peptiden, welche das gesamte humane CMV-pp65-Protein überspannen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 2 h. Daraufhin wurden 400 IE/ml IL-4 (R&D-Systems), 1000 IE/ml GM-CSF (R&D-Systems), 1000 IE/ml IL-6 (R&D-Systems), 10 ng/ml IL-1-beta (R&D-Systems), 1 µg/ml PGE₂ (Sigma-Aldrich) und 10 ng/ml TNF-alpha (R&D-Systems) zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert (Abb. 1). Die Zytokine wurden durch auf- und abpipettieren im Medium resuspendiert.

Die DC, die mit TLR7/8-Ligand CL097 (InvivoGen) und sCD40-Ligand (Miltenyi Biotec) behandelt wurden, wurden bei 37°C und 5% CO₂ zuerst mit 1 µg/ml TLR7/8L und nach 2 h mit 1 µg/ml sCD40L inkubiert (Abb. 1). Die Inkubation wurde über weitere 20 h fortgesetzt. Anschließend erfolgt die Pulsierung der Zellen je nach Experiment mit je 30 µg/ml HLA-restringierten hTERT-Peptiden oder mit je 20 µg/ml CMV-Peptidmix. Dieses inkubierte nach kräftigem Mischen weitere 2 h bis zu der Zugabe von nicht adhärenenten Zellen.

2.5 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen im Einfriermedium, bestehend aus 25 ml RPMI (Invitrogen), 5 ml DMSO (Appli Chem), 20 ml Humanalbumin (20%) (Biotest Pharma GmbH), aufgenommen. Zellen können in diesem Medium bei -80°C über ca. ein Jahr kryokonserviert werden. Bei längeren Zeiträumen sollte die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C erfolgen, da es sonst zu Einschränkungen der Zellvitalität kommen kann.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium/10⁷ Zellen gelöst und dann wurde je 1 ml des Gemisches in ein zuvor beschriftetes Einfrierröhrchen *Cryo Tube TM Vials* (Nunc) gegeben. Diese Röhrchen wurden dann schnellstmöglich in den -80°C Gefrierschrank (Hera freeze) überführt.

Beim Auftauen wurden entsprechend der Anzahl der Einfrierröhrchen, sterile Röhrchen (Sarstedt) mit 10 ml PBS vorbereitet und die Zellen aus dem Gefrierschrank kurz in ein warmes Wasserbad mit 37°C gegeben. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml PBS gelöst und zentrifugiert (1600 U/Min, RT, 5 Min, mit Bremse). Um das Einfriermedium vollständig zu entfernen, wurde der Überstand abgenommen und zu dem Pellet 10 ml RPMI gegeben und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in Medium aufgenommen.

2.6 Depletion der regulatorischen T-Zellen (T_{reg})

Vor der Stimulation mit Dendritischen Zellen wurden die $CD4^+/CD25^+$ regulatorischen T-Zellen von den nicht adhärenen, lymphozytären Zellen nach dem Auftauen sortiert und entfernt.

Um eine Verklumpung der Zellen zu vermeiden, erfolgte vor der Sortierung die Behandlung mit DNase *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), die die von den defekten Zellen freigesetzte DNA zerlegt und dadurch die Klumpenbildung verringert. Hierfür wurden die Zellen in 5,5 ml eines Gemisches aus 4 ml RPMI (Invitrogen), 500 μ l L-Glutamin (Biochrom AG) und 1 ml FCS (Biochrom AG) gegeben. Dann wurde 1 ml Puffer, welcher der DNase beiliegt, sowie 110 μ l DNase zugesetzt. Dieses inkubierte 10 Min bei Raumtemperatur und wurde anschließend mit PBS gewaschen.

Um die Sortierung der Lymphozyten zu erleichtern, wurden die nicht adhärenen lymphozytären Zellen in 90 μ l/ 10^7 Zellen Spezialpuffer gegeben. Der Spezialpuffer bestand aus 1 ml 2 mM EDTA (Sigma), 249 ml PBS (Biochrom AG) sowie 1,25 ml Humanalbumin (20%) (Biotest Pharma GmbH) und wurde bei pH 7,4 eingestellt. Dann wurden 10 μ l/ 10^7 Zellen CD25 MicroBeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und diese für 15 Min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Es folgte das Auffüllen mit 1 ml/ 10^7 Zellen Spezialpuffer. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zentrifugiert (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min), der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 500 μ l Spezialpuffer resuspendiert. Bevor sie über eine LS Säule *Separation Columns LS* (Miltenyi Biotec) gegeben wurden, musste diese an den Magneten gehängt und mit 3 ml Spezialpuffer gespült werden. Anschließend wurde das Zellgemisch über die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml Spezialpuffer gewaschen. Um eine Verstopfung der Säule zu vermeiden, wurde der Säule ein steriler Filter *Pre-Separation Filters*

(Miltenyi Biotec) aufgesetzt. Die im Auffangbehälter gesammelten Zellen waren die Zellen, in denen die T_{reg} depletiert sein sollten. Die mit MicroBeads markierten T_{reg} sollten in der Säule am Magneten hängen geblieben sein. Nach abschließender Zellzahlbestimmung folgte die Aufnahme von 10^7 Zellen in 1 ml OpTimizer-Medium. OpTimizer-Medium wird hergestellt durch Mischung von 40 ml OpTimizer T-Cell Expansion SFM (GIBCO), 1040 μ l Supplement (GIBCO), 400 μ l L-Glutamin (Biochrom AG) und 400 μ l Pen/Strep (Biochrom AG).

2.7 Aktivierung CMV- und hTERT-spezifischer T-Lymphozyten

Für die erste T-Zell-Stimulation wurden am Tag 8 1×10^6 ausgereifte, peptidbeladene DC aus der *Well*-Platte genommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und nach Zentrifugation (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min) und Abnahme des Überstandes in 1 ml OpTimizer-Medium aufgenommen. Dieser Milliliter wurde mit 1 ml OpTimizer-Medium und 1×10^7 nicht adhärenente Zellen zusammen in ein Loch der 24-*Well*-Platte gegeben, so dass die beiden Zellgruppen im Verhältnis 1:10 aufeinander treffen konnten (Abb. 1).

Die *Well*-Platte wurde im Brutschrank inkubiert und an jedem zweiten Tag erfolgte eine Farb- und mikroskopische Kontrolle des Mediums und der Zellen. Wenn das Medium gelb war, wurde 1 ml des Mediums abgenommen und 1 ml OpTimizer-Medium dazugegeben.

Für die Restimulation wurden an Tag 14 adhärenente Zellen aufgetaut, gereift und in einem Loch der 24-*Well*-Platte mit HLA-restringierten CMV- oder hTERT-Peptiden beladen. 1×10^6 dieser Zellen wurden an Tag 15 in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben, zentrifugiert (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min) und in 1 ml OpTimizer-Medium resuspendiert. Am selben Tag wurden auch die nicht adhärenenten Zellen aus der *Well*-Platte genommen, zentrifugiert (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min), 1×10^7 Zellen/ml in 1 ml OpTimizer-Medium resuspendiert und je 1 ml mit 1×10^7 nicht adhärenente Zellen in jedes Loch zu 1×10^6 adhärenenten, peptidbeladenen DC gegeben. Am Tag 18 wurden 20 Units/ml (0,2 μ g/ml) IL-2 (R&D-Systems) hinzugegeben.

Vor der letzten Restimulation am Tag 22, 24h vor der Analyse mit dem Durchflusszytometer wurde die Probe geteilt. Die eine Hälfte der nicht adhärenenten stimulierten Zellen wurde mit gepulsten DC als Zielzellen inkubiert und die andere Hälfte, als Negativkontrolle, mit ungepulsten DC. Hierbei wurden jeweils DC genommen, die mit Zytokinen oder mit TLR7/8L und sCD40L gereift worden waren.

Für die Positivkontrolle wurden SEA-beladene DC mit T-Lymphozyten für 24 h in Kultur genommen und anschließend im Durchflusszytometer die intrazelluläre IFN γ -Produktion gemessen.

2.8 Durchflusszytometrie

In dem Durchflusszytometer *BD FACS Canto* (BD) wurden die Streuungseigenschaften des Lichtes aufgezeichnet, die entstehen, wenn Zellen durch einen Laserstrahl gelenkt werden. Mit Antikörpern, die gegen intra- oder extrazelluläre Antigene gerichtet sind, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zellcharakteristika untersucht. Dies waren auf der Oberfläche exprimierte Reifungs- und Aktivierungsmarker sowie intrazellulär freigesetzte Botenstoffe.

Alle Abbildungen im Ergebnisteil basieren auf den Daten durchflusszytometrischer Messungen und wurden mit Hilfe der Analysesoftware *FACSDiva Software Version 6* (BD) erstellt. Es ließen sich bei jeder Zelle sechs Eigenschaften darstellen und pro Abbildung jeweils zwei. Zuerst wurde die Größe der Zellen im *Forward Scatter* (FSC) und die Granularität im *Side Scatter* (SSC) erfasst. Die weiteren vier Eigenschaften ließen sich über deren Antigene mit fluoreszenz-markierten Antikörpern kenntlich machen.

Für die Überprüfung einer erfolgreichen Ausreifung der DC wurde eine extrazelluläre Färbung angefertigt, in der die Expression von Reifungsmarkern auf der Oberfläche gemessen wurde. Drei verschiedene Zellpopulationen wurden untersucht: DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren, DC, die mit TLR7/8L und sCD40L ausgereift worden waren und DC, die nicht ausgereift waren. Jeweils 1×10^6 DC wurden in 100 μ l PBS im FACS Röhrrchen *5 ml Flow Cytometer* (Sarstedt) aufgenommen und 10 μ l CD80 FITC (BD Biosciences), 10 μ l CD83 PC5 (BD Biosciences) oder 10 μ l CD86 PE (BD Biosciences) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 Min bei 5°C wurden die Proben mit 300 μ l PBS aufgefüllt und im Durchflusszytometer analysiert.

Zur Messung der intrazellulären IFN γ -Produktion wurden sieben Proben vorbereitet (Tab. 2): Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid stimuliert wurden, die Negativkontrolle sowie die SEA-Positivkontrolle, jeweils mit DC, die mit Zytokinen und mit DC, die mit TLR7/8L und sCD40L ausgereift worden waren, untersucht. Die Probe 7 war die Färbekontrolle mit Zellen aus der Probe der hTERT-peptidstimulierten Lymphozyten.

Bei Neueinstellung des Durchflusszytometers wurden die Zellen für die Kompensation neu gefärbt. Dazu wurden Zellen der Positivkontrollen mit SEA je mit einem Antikörper (Tab. 2) gefärbt, um bei diesem Antikörper die Streueigenschaften des Lichtes in andere Kanäle von anderen Antikörpern zu beurteilen und zu kompensieren.

Proben		Kompensation
1. Lz+ DC hTERT Zytokine	CD8 APC H7: 4 µl (BD Biosciences)	1. Kein Ak
2. Lz+ DC hTERT TLR7/8L und sCD40L	CD4 PerCPCy5.5: 20 µl (BD Biosciences)	2. CD8 FITC: 10 µl (Becton Dickinson)
3. Lz+ DC Zytokine (Negativkontrolle)	CD3 APC: 1 µl (Becton Dickinson) IFN gamma FITC: 20 µl (Miltenyi Biotec)	3. CD4 PerCPCy5.5: 10 µl (BD Biosciences)
4. Lz + DC TLR7/8L und sCD40L (Negativkontrolle)		4. CD3 APC: 0,5 µl (Becton Dickinson)
5. Lz + DC SEA Zytokine (Positivkontrolle)		5. CD8 APC H7: 2 µl (BD Biosciences)
6. Lz + DC SEA TLR7/8L und sCD40L (Positivkontrolle)		
7. Lz (Färbekontrolle)	Ungefärbt	

Tab. 2: Proben und Antikörper der intrazellulären IFN γ -Produktion sowie Kompensationen in der FACS-Analyse

Für die Messung von Interferon-gamma (IFN γ) wurde 2 h nach der dritten Restimulation 1 µl/ml Brefeldin A (Sigma Aldrich) zur Inhibition der IFN γ -Produktion zu den restimulierten T-Lymphozyten in die 24-Well-Platte gegeben. Spätestens 10 h später erfolgte die Zellzahlbestimmung und Färbung.

Es wurden jeweils 10⁶ nicht adhärenente Zellen in 100 µl PBS und für die Kompensation 5 x 10⁵ nicht adhärenente Zellen in 50 µl PBS in Eppendorfgefäßen eingesetzt. Die Gefäße wurden mit 1 ml PBS aufgefüllt und bei 1600 U/Min, 20°C, 5 Min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 500 µl PBS und 500 µl Inside fix *Inside Stain Kit* (Miltenyi Biotec) zum Fixieren der Zellen, zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden alle Proben

20 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation und die Abnahme des Überstandes. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Inside Perm *Inside Stain Kit* (Miltenyi Biotec), welches die Zellwand perforiert und permeabilisiert, so dass intrazelluläre Botenstoffe markiert werden konnten. Nach einer Zentrifugation (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 90 µl Inside Perm resuspendiert und die Antikörper (Tab. 2), die zuvor titriert worden waren, in der dabei getesteten optimalen Menge hinzugegeben.

Nach dem Vortexen wurden die Antikörper 15 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und daraufhin mit 1 ml Inside Perm gewaschen. Nach einer Zentrifugation (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min) wurde das Pellet in 400 µl PBS in einem beschrifteten FACS Röhrrchen *5 ml Flow Cytometer* (Sarstedt) aufgenommen und innerhalb von 12 h gemessen.

Für die extrazelluläre Färbung der CD137 Separation wurden die sieben Proben genommen, von denen je 10^6 Zellen in 100 µl PBS und 5×10^5 Zellen für die Kompensation in 50 µl gegeben wurden. Es wurden die gleichen Antikörpermengen wie bei der intrazellulären IFN γ -Färbung hinzugegeben, jedoch in der Kompensation im 2. Röhrrchen 10 µl CD8 PE (Becton Dickinson) und in den Proberöhrrchen 1. bis 6. kein IFN γ , sondern 20 µl CD137 PE (BD Biosciences) gefärbt. Es erfolgte nach gründlichem Vortexen eine Inkubation von 15 Min bei 4°C und anschließendes Waschen mit 1 ml PBS. Die Zellen wurden in 400 µl PBS in FACS Röhrrchen geben und innerhalb von 12 h gemessen.

Zur Überprüfung der Depletion regulatorischer T-Zellen wurden vier Zellgruppen untersucht: Lymphozyten vor Depletion, Zellen, bei denen die T_{reg} zweimalig depletiert worden waren und aussortierte T_{reg}, sowie eine Färbekontrolle ohne CD25 Antikörper. Je 10^6 Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und 0,5 µl CD3 APC (Becton Dickinson), 20 µl CD4 PerCPCy5.5 (BD Biosciences) und 10 µl CD25 PE (Becton Dickinson) hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend in 400 µl BD CellFIX (BD Biosciences) aufgenommen und eine Woche bei +4°C gelagert.

2.9 Separierung von CD137⁺ T-Zellen

Die Aktivierung von T-Lymphozyten sorgt für eine verstärkte Expression des Oberflächenmarkers CD137. Über eine Separation mit diesem Oberflächenmarker können

somit aktivierte T-Lymphozyten von nicht aktivierten T-Lymphozyten getrennt werden. 1×10^7 CD137⁺ Lymphozyten wurden in 40 μ l Spezialpuffer aufgenommen. Der Spezialpuffer wird durch Mischung von 1 ml 2 mM EDTA (Sigma), 249 ml PBS (Biochrom AG) sowie 1,25 ml Humanalbumin (20%) (Biotest Pharma GmbH) hergestellt und ein pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurden 10 μ l CD137 PE Antikörper (BD Biosciences) zu 10^7 Zellen gegeben. Nach Mischen wurden die Zellen anschließend 10 Min bei +4°C inkubiert. Danach wurde 1 ml PBS/ 10^7 Zellen zugegeben und die Zellen gewaschen. Es erfolgte eine Zugabe von 80 μ l Spezialpuffer/ 10^7 Zellen und 20 μ l Anti CD137 PE MicroBeads/ 10^7 Zellen (Miltenyi Biotec). Nach gründlichem Vortexen wurde dies erneut bei +4°C für 15 Min inkubiert. Gefolgt von einem erneuten Waschvorgang mit 1 ml Spezialpuffer/ 10^7 Zellen wurden die Zellen in 500 μ l Spezialpuffer resuspendiert. Vor der Verwendung wurde die LS Säule *Separation Columns LS* (Miltenyi Biotec) an dem Magneten fixiert und mit 3 ml Spezialpuffer gespült. Das Zellgemisch wurde dann über die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml Spezialpuffer durchgespült, die Zellen im Auffangbehälter waren die CD137⁻ Zellen. Um die CD137⁺ Zellen zu erhalten, wurde die Säule aus dem Magnet entfernt, 5 ml Spezialpuffer zugegeben und mit einem Stempel in einen neuen Auffangbehälter durchgedrückt. Dieser Auffangbehälter enthielt die separierten CD137⁺ Zellen, die erneut gezählt und in OpTimizer-Medium aufgenommen wurden.

Für eine Überprüfung der erfolgreichen Separation mittels Durchflusszytometer entstanden vier Proben. Eine Probe vor der Separation, eine Probe, in der die CD137⁺ Zellen aussortiert waren, eine Probe mit den aussortierten CD137⁺ Lymphozyten, sowie eine Färbekontrolle ohne Zugabe des Antikörpers CD137.

2.10 Expansion von CD137⁺ T-Zellen

Zur Expansion der T-Zellen wurden die Dynabeads *Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28* (Invitrogen/Dynal) zuerst in dem mitgelieferten Gefäß durch gründliches Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde das für die Expansion der vorhandenen T-Zellzahl vom Hersteller empfohlene Volumen Beads abgenommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Zu dem Volumen wurde 1 ml Spezialpuffer gegeben und das Gemisch nach dem Vortexen ca. 2 Min an den Magneten gehalten, um die magnetischen Dynabeads zu konzentrieren. Die Lösung im Überstand, in der die Dynabeads geliefert wurden, ist verworfen worden.

Anschließend wurden die T-Zellen in 1 ml OpTimizer-Medium gelöst und zu den Dynabeads gegeben. Es folgte die Zugabe von 20 U/ml IL-2 und die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Jeden Tag wurde die Zellgröße und Zellzahl mikroskopisch untersucht und zweimal wöchentlich erfolgte eine Zellzahlbestimmung. Hierbei sollten die Zellen aufgewirbelt werden, so dass sich die Dynabeads neu verteilten. Wenn das Medium gelb wurde, wurde im Ruhezustand ein Teil des alten Mediums entfernt und mit neuem aufgefüllt, welches zusätzlich mit IL-2 versetzt war.

2.11 Analyse CD137⁺ T-Zellen im Chromfreisetzungstest

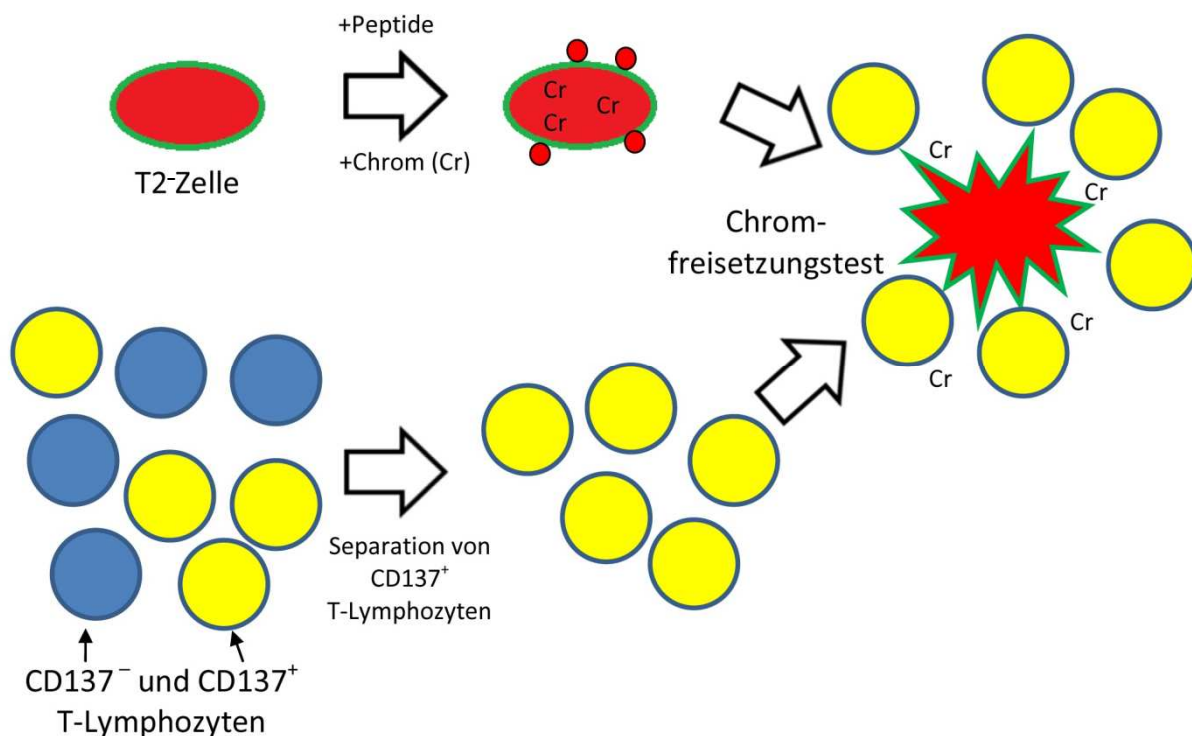


Abb. 2: Chromfreisetzungstest mit vorheriger Separation von CD137⁺ T-Lymphozyten

Im Chromfreisetzungstest wurde die Radioaktivität gemessen, die aus chrombeladenen T2-Zellen, die mit hTERT- oder CMV-Peptid gepulst waren, nach Zerstörung durch T-Lymphozyten freigesetzt wurde. Die T-Zellen waren mit DC, die mit hTERT- oder CMV-Peptid gepulst waren, zuvor über drei Wochen stimuliert worden.

Zu Beginn wurden 2 Löcher einer 24-Well-Platte mit je 1 ml R10 und 1×10^6 T2- Zellen (ATCC) befüllt. R10 besteht aus 500 ml RPMI (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG), 50 ml FCS (Biochrom AG) und 5 ml Pen/Strep (Biochrom AG). Die T2-Zellen wurden zuvor im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in dem T2-Medium gelagert, das aus 40 ml RPMI, 4,4 ml FCS, 0,4 ml Pen/Strep und 0,4 ml L-Glutamin besteht. Zu diesen Zielzellen wurde in ein Loch 20 µg/ml HLA-A2-restringiertes hTERT-Peptid gegeben, die Zielzellen im anderen Loch blieben unbeladen. Anstelle des hTERT-Peptides wurden bei CMV⁺ Spendern 20 µg/ml des CMV-Peptidmix eingesetzt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, anschließend aus der Well-Platte genommen und jeweils in 15 ml Röhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation (1600 U/Min, RT, mit Bremse, 5 Min) mit darauffolgender Abnahme des Überstandes. Im Radioaktivitätslabor wurden 100 µl Chrom *Natrium chromate* [Cr51] (Hartmann) zu dem Pellet gegeben und dieses 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dann wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 10 ml reines R10 hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis das überschüssige Chrom entfernt und die Zellen gewaschen waren. Es wurden erneut 10 ml R10 zugegeben, so dass sich in 50 µl 5000 chrom- und peptidbeladene T2-Zellen befanden.

Während der Inkubationszeit der T2-Zellen wurde parallel eine 96-Well-Platte mit Rundboden (Nunc) vorbereitet. Die Positiv- und Negativkontrollen sowie der experimentelle Ansatz wurden in je drei Ansätzen vorbereitet. Diese Ansätze wurden jeweils mit Peptid beladenen und unbeladenen T2-Zellen durchgeführt. In der Positivkontrolle, welche die maximale Chromfreisetzung zeigen sollte, wurden 5×10^3 T2-Zellen in 100 µl R10 mit 100 µl Triton X-100 Detergent (Merck) in ein Loch der 96-Well-Platte gegeben. In der Negativkontrolle, welche die basale Chromfreisetzung zeigt, wurden 5×10^3 T2-Zellen in 200 µl R10 aufgenommen. In den Ansätzen mit den Patientenzellen wurden 5×10^3 T2-Zellen in 150 µl R10 mit der höchstmöglichen Anzahl von T-Lymphozyten in 50 µl R10 zusammen gegeben, so dass das Verhältnis von Lymphozyten zu T2-Zellen mindestens 10:1 betrug. Die Well-Platte wurde für 3 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dann 5 Min bei 1600 U/Min und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 25 µl der Überstände in eine 96-Well-Platte pipettiert. Diese für den Beta-Counter *Micro Beta TriLux* (Perkin Elmer) vorgesehene 96-Well-Platte (Perkin Elmer) war zuvor vorbereitet worden, indem in 18 Löcher je 150 µl Optiphase (Perkin Elmer) gegeben worden war. Die Well-Platte wurde mit einer Plastikfolie abgeklebt und für 15 Min auf einen Schüttler (Witeg) mit 900 RPM gestellt.

Abschließend wurde im Beta-Counter in jedem Loch eine Minute die Radioaktivität der Chrommenge gemessen und der Mittelwert der jeweils dreifachen Ansätze gebildet.

3. Ergebnisse

3.1 Ausreifung Dendritischer Zellen

Beim gesunden Spender 5 wurde nach Kultivierung der DC mit Zytokinen, bzw. sCD40L und TLR7/8L die Expression der Oberflächenmarker CD80, 86 und 83 gemessen, jeweils im Vergleich zu einer DC-Population ohne Ausreifung (Tab. 3 und Abb. 3). Die Untersuchung wurde an dem gesunden Spender 5 vorgenommen, um die Ausreifung exemplarisch darzustellen.

Bei dem Oberflächenmarker CD80 wurde ein Anstieg der mittleren Fluoreszenz von 4,71 relativen Einheiten (rE) auf 8,61 rE nach Ausreifung der DC mit Zytokinen gemessen. 13,3 rE konnten bei den DC nach Ausreifung mit sCD40L und TLR7/8L gemessen werden (Abb. 3 A, D und G). Der Oberflächenmarker CD86 wies bei den mit Zytokinen ausgereiften DC 17,4 rE auf, bei den nicht ausgereiften DC 2,22 rE und bei den DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, einen Anstieg der mittleren Fluoreszenz auf 9,61 rE (Abb. 3 B, E und H). Die mittlere Fluoreszenz von CD83 stieg von 0,37 rE bei den nicht ausgereiften DC auf 4,06 rE bei den DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren und auf 1,06 rE bei den DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren (Abb. 3 C, F und I).

Ausreifungsart der Dendritischen Zellen	CD80 [rE]	CD86 [rE]	CD83 [rE]
Nicht ausgereift	4,71	2,22	0,37
Ausgereift mit Zytokinen	8,61	17,4	4,06
Ausgereift mit sCD40L und TLR7/8L	13,3	9,61	1,06

Tab. 3: Expression von Ausreifungsmarkern und kostimulatorischen Molekülen auf DC

Die Tabelle zeigt die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD83 bei nicht ausgereiften DC, sowie bei DC, die mit Zytokinen oder mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift wurden. Die Angaben sind mittlere Fluoreszenzen in relativen Einheiten [rE].

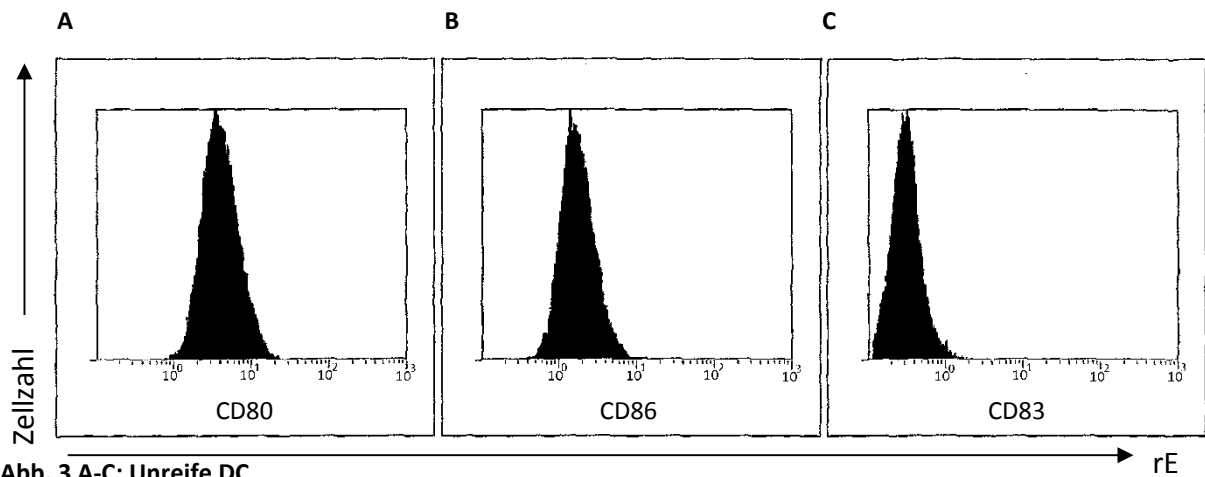


Abb. 3 A-C: Unreife DC

Bei der DC ohne Ausreifung ergibt sich für den Reifungsmarker CD80 (A) eine mittlere Fluoreszenz von 4,71 rE, für CD86 (B) eine von 2,22 rE und für CD83 (C) ergibt sich eine mittlere Fluoreszenz von 0,37 rE.

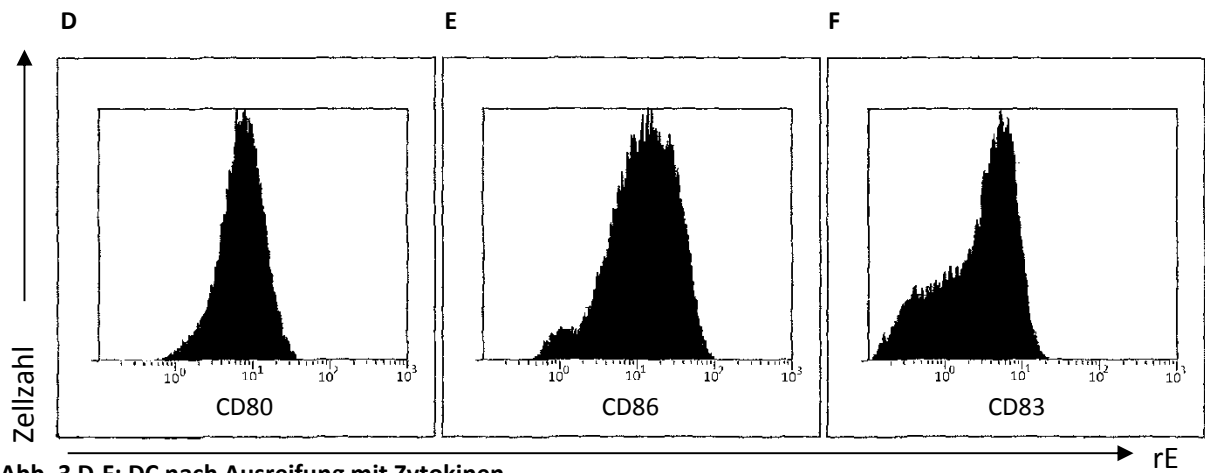


Abb. 3 D-F: DC nach Ausreifung mit Zytokinen

Bei der Ausreifung der DC mit den Zytokinen IL1-beta, IL-4, IL-6, PGE₂, GM-CSF und TNF-alpha ergibt sich für CD80 (D) eine mittlere Fluoreszenz von 8,61 rE, für CD86 (E) eine von 17,4 rE und für CD83 (F) eine mittlere Fluoreszenz von 4,06 rE.

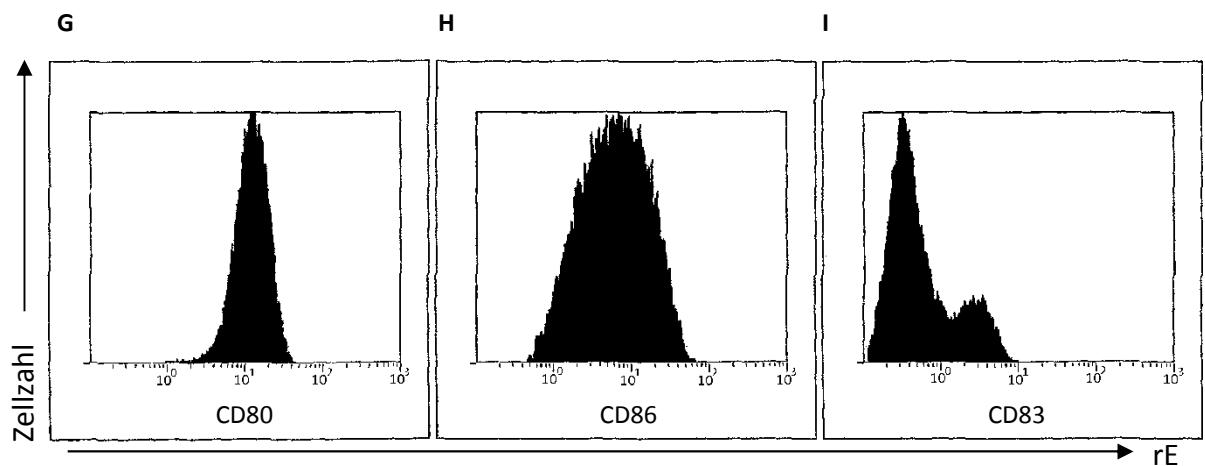


Abb. 3 G-I: DC nach Ausreifung mit sCD40L und TLR7/8L

Bei Ausreifung der DC mit sCD40L und TLR7/8L ergibt sich für den Reifungsmarker CD80 (G) eine mittlere Fluoreszenz von 13,3 rE, für CD86 (H) eine von 9,61 rE und für CD83 (I) eine mittlere Fluoreszenz von 1,06 rE.

3.2 Depletion regulatorischer T-Zellen

Bei dem gesunden Spender 4 waren vor der Depletion von allen $CD3^+$ Zellen 7,4% $CD4^+/CD25^+$ (Abb. 4A) und nach zweifacher Depletion 1,7% $CD4^+/CD25^+$ (Abb. 4B). Die Proben mit den aussortierten $CD4^+/CD25^+$ Zellen wiesen nach dem ersten Sortieren 39,9% $CD4^+/CD25^+$ Zellen auf (Abb. 4C) und nach dem zweiten Sortieren 12,1% $CD4^+/CD25^+$ Zellen (Abb. 4D).

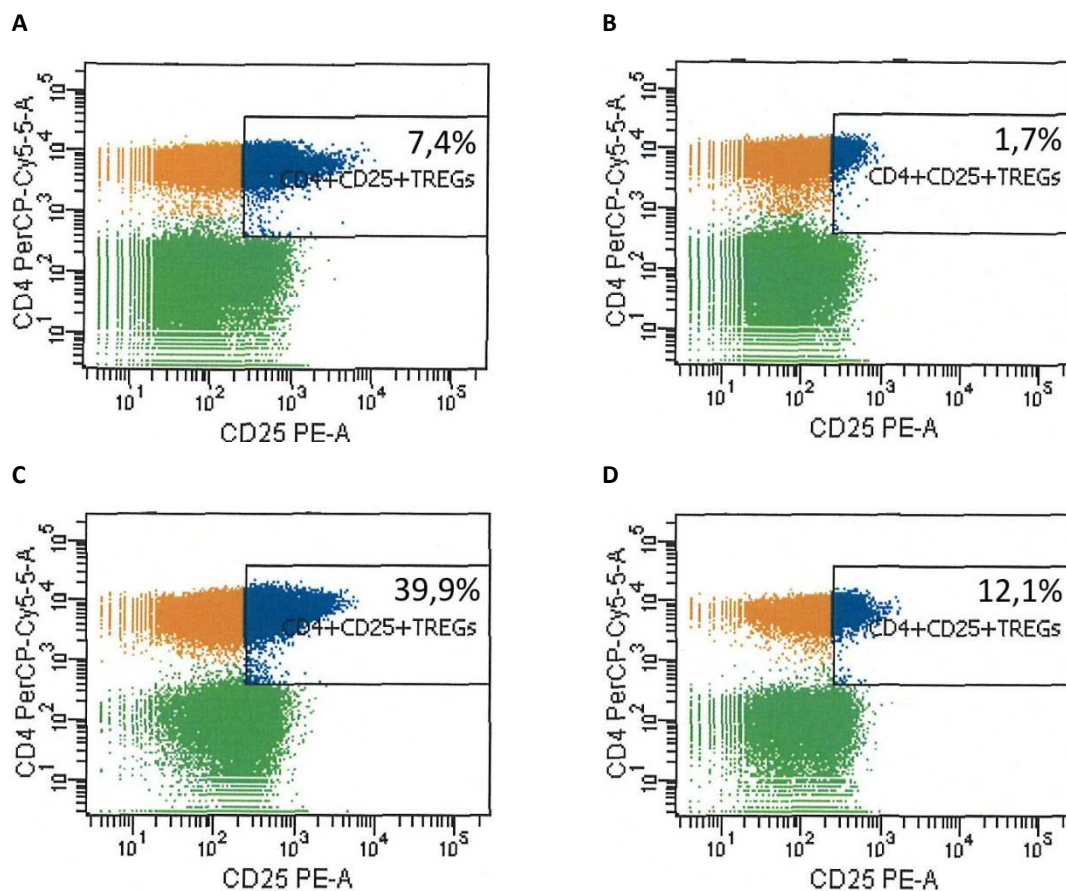


Abb. 4: Depletion der T_{reg}

Gezeigt sind die $CD3^+$ Zellen, wobei in grün die $CD4^-$ Zellen kenntlich gemacht sind, in orange die $CD4^+$ Zellen und in blau die $CD4^+/CD25^+$ Zellen.

Vor der T_{reg} Depletion sind 7,4% der $CD3^+$ Zellen $CD4^+/CD25^+$ (A). Nach der zweifachen Depletion sind 1,7% der $CD3^+$ Zellen $CD4^+/CD25^+$ (B). Nach der einfachen Depletion sind in der Probe der aussortierten T_{reg} 39,9% der $CD3^+$ Zellen $CD4^+/CD25^+$ (C). Nach der zweiten Depletion sind in der Probe der aussortierten T_{reg} 12,1% der $CD3^+$ Zellen $CD4^+/CD25^+$ (D).

3.3 Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen

3.3.1 CMV-spezifische, intrazelluläre IFN γ -Produktion

In der Positivkontrolle wurde bei dem gesunden Spender 5 nach Stimulation mit SEA nach 24 h 10,2% IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen gemessen (Abb. 5).

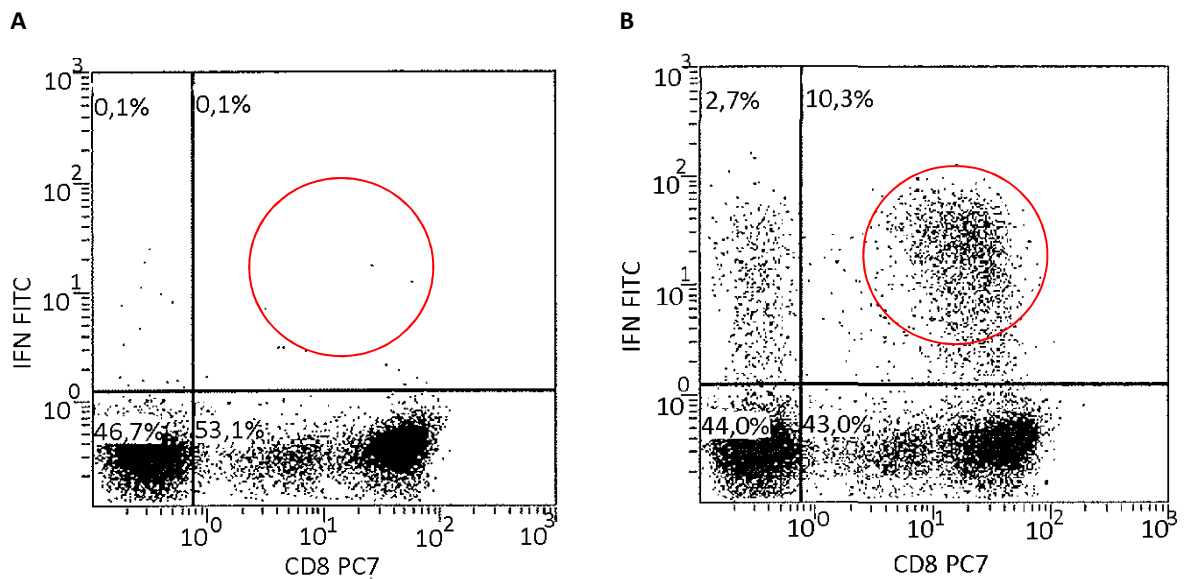


Abb. 5: Stimulation mit SEA und IFN γ -Messung

Vor der Stimulation mit SEA wird intrazelluläres IFN γ von 0,1% (roter Kreis) der CD8⁺ Zellen produziert (A). Nach der SEA-Stimulation von 10,3% (roter Kreis) der CD8⁺ Zellen (B).

Nach einmaliger Stimulation mit DC, die mit dem CMV-Peptidmix pulsiert worden waren und einwöchiger Zellkultivierung wurde bei diesem Spender bei 4,9% der CD8⁺ Zellen eine intrazelluläre IFN γ -Produktion gemessen (Abb. 6).

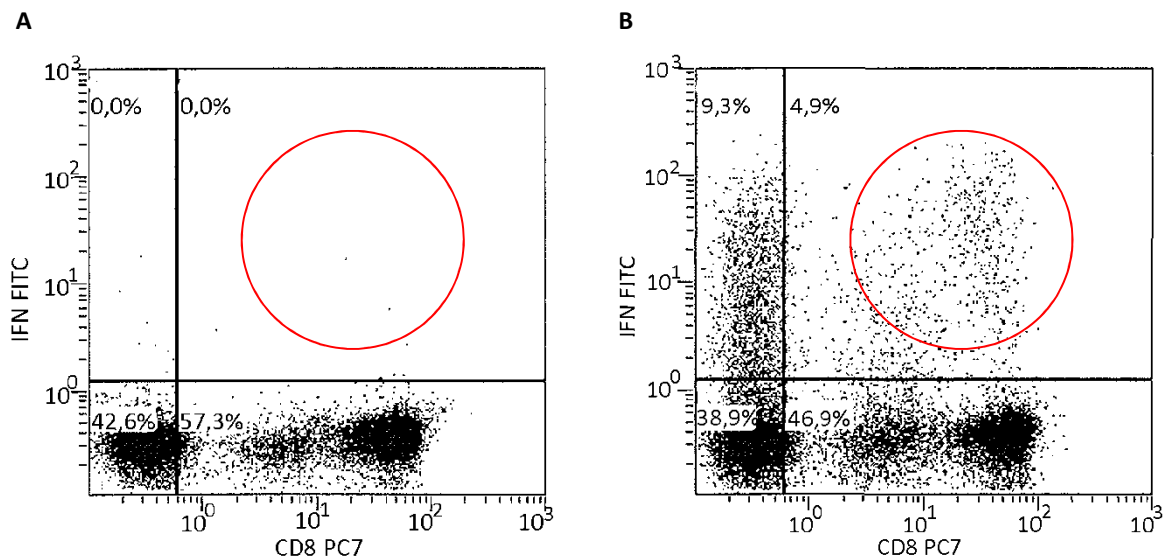


Abb. 6: Intrazelluläre IFN γ -Produktion (roter Kreis) von CD8⁺ Lymphozyten

Nach Stimulation (B) mit DC, die mit CMV-Peptidmix pulsiert worden waren, zeigten 4,9% der CD8⁺ Zellen eine intrazelluläre IFN γ -Produktion. Vor der Stimulation (A) waren es 0% der CD8⁺ Lymphozyten.

3.3.2 CMV-spezifische Zytotoxizität

Bei dem gesunden Spender 5 wurde die Zytotoxizität der Lymphozyten untersucht, die zweimal mit DC stimuliert waren, die mit dem CMV-Peptidmix beladen und mit Zytokinen gereift worden waren. Anschließend wurden die CD137⁺ Zellen separiert. Die Zellzahl der CD137⁺ T-Lymphozyten betrug $1,6 \times 10^6$ und es folgte eine Expansion der Zellen, die nach einer Woche eine Zellzahl von $1,3 \times 10^6$ T-Lymphozyten ergab. Diese CD137⁺ T-Lymphozyten wurden im Zytotoxizitäts-*assay* eingesetzt.

Bei unbeladenen T2-Zellen wurde in der Positivkontrolle eine maximale Chromfreisetzung von 5738,3 cpm registriert. Die Negativkontrolle ergab ohne Zugabe von Lymphozyten bei den unbeladenen T2-Zellen 520,3 cpm. Bei einem Verhältnis von einer unbeladenen T2-Zelle zu 10 CD137⁺ T-Lymphozyten (1:10) wurden 1127,3 cpm gemessen. Dies entspricht einer Lyse von 11,63% der T2-Zellen. Bei unbeladenen T2-Zellen im Verhältnis 1:20 wurden 1502 cpm und eine Lyse von 18,81% gemessen. Im Verhältnis 1:40 registrierte der Betacounter 1724 cpm bei unbeladenen T2-Zellen, welches einer Lyse von 23,07% entspricht.

In der Positivkontrolle mit CMV-Peptidmix beladenen T2-Zellen wurde eine maximale Chromfreisetzung von 5433cpm gemessen. Die Negativkontrolle ergab ohne Zugabe von Lymphozyten bei den CMV-peptidmixbeladenen T2-Zellen 595,33 cpm. Bei CMV-peptidmixbeladenen T2-Zellen wurde im Verhältnis 1:10 1141 cpm registriert, was eine Lyse

von 11,28% zeigt. Bei CMV-peptidmixbeladenen T2-Zellen im Verhältnis 1:20 zeigten sich 1662 cpm und eine Lyse von 22,05%. 2157 cpm wurden bei CMV-peptidmixbeladenen T2-Zellen im Verhältnis 1:40 registriert, welches einer Lyse von 32,28% entspricht (Abb. 7). Aus diesen Daten resultiert eine CMV-spezifische Lyse von 0% im Verhältnis 1:10, die auf 3,2% im Verhältnis 1:20 und auf 9,2% im Verhältnis 1:40 ansteigt.

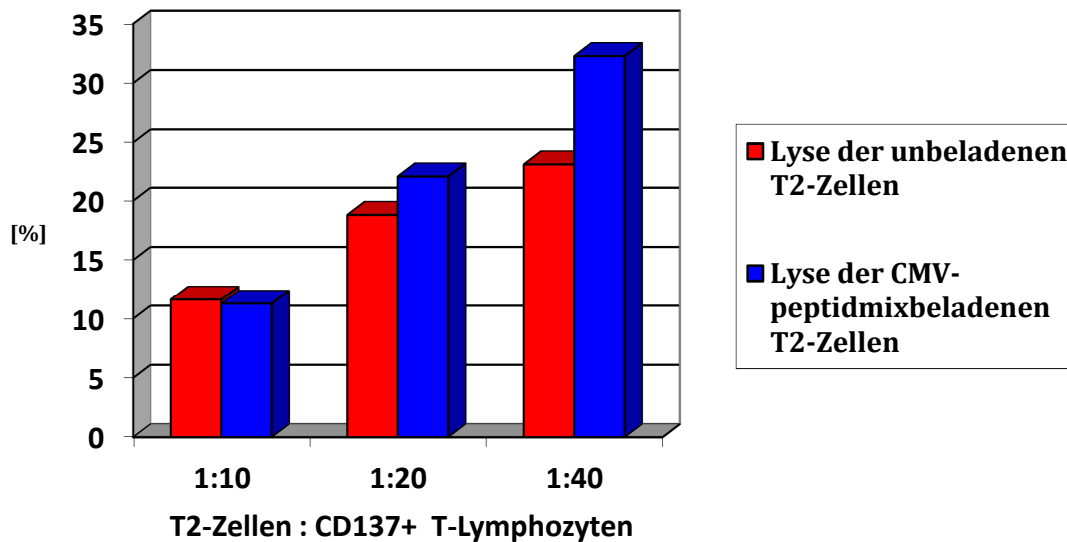


Abb. 7: Zytotoxizitätsuntersuchung bei dem gesunden Spender 5 mit dem CMV-Peptidmix
Lyse CMV-peptidmixbeladener T2-Zellen, nach Zugabe von CD137⁺ T-Lymphozyten, die mit CMV-peptidpulsierten DC aktiviert worden waren.

3.4 Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellen

3.4.1 Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellen bei den gesunden Spendern 1-4

Nach Depletion der T_{reg} und Stimulation der Lymphozyten mit DC, die mit HLA-restringierten hTERT-Peptiden beladen waren, wurde die intrazelluläre Produktion von IFN γ in den Lymphozyten gemessen. Bei den vier untersuchten gesunden Spendern zeigten 0 bis 0,4% der CD8⁺ T-Lymphozyten sowie 0 bis 0,3% der CD4⁺ T-Lymphozyten eine IFN γ -Produktion (Tab. 3).

Gesunder Spender	HLA-Typ	Peptide	IFN ⁺ CD8 ⁺ Lz, Stimulation mit Zytokin-gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD8 ⁺ Lz, Stimulation mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD4 ⁺ Lz, Stimulation mit Zytokin-gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD4 ⁺ Lz, Stimulation mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC [%]
4	A2	p540 p865 p988	0,1	0,4	0,3	0,4
1	A2	p540 p865 p988	0,1	0,1	0,1	0,0
3	A2	p540 p865 p988	0,0	0,1	0,3	0,0
	A24	p461	0,0	0,1	0,1	0,2
2	A2	P540 P865 P988	0,0	0,0	0,0	0,0

Tab. 3: Intrazelluläre Produktion von IFN γ in Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-Peptid beladenen DC bei gesunden Spendern

Bei dem gesunden Spender 4 war mit 0,4% IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen die höchste Zahl aktivierter T-Lymphozyten detektierbar. Diese Lymphozyten waren mit hTERT-Peptid p540, p865 und p988 beladenen DC stimuliert worden, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren (Abb. 8E). Die IFN γ -Produktion der CD8⁺ Lymphozyten desselben Spenders nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren, betrug 0,1%. (Abb. 8B). Die IFN γ -Produktion der CD4⁺ Zellen lag nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen gereift worden waren, bei 0,3% (Abb. 9B) und nach Stimulation mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC bei 0,4% (Abb. 9E).

Bei dem gesunden Spender 1 konnte nach Stimulation mit DC, die mit den hTERT-Peptiden p540, p865 sowie p988 pulsiert und mit Zytokinen ausgereift worden waren, bei 0,1 % der CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Lymphozyten intrazelluläres IFN γ nachgewiesen werden. Nach Ausreifung mit sCD40L und TLR7/8L waren 0,1% der CD8⁺ Zellen und keine der CD4⁺ Zellen IFN γ ⁺.

Der gesunde Spender 3 wies nach Stimulation mit DC, welche mit Zytokinen ausgereift und hTERT-Peptid p540, p865, p988 sowie p461 pulsiert worden waren, keine IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten auf. Die CD4⁺ T-Lymphozyten waren nach Stimulation mit DC, die mit

Zytokinen ausgereift und mit hTERT-Peptid p540, p865 sowie p988 pulsiert worden waren, zu 0,3% IFN γ ⁺. Bei gleicher Ausreifung und Pulsierung der DC mit dem hTERT-Peptid p461 konnten 0,1% IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten registriert werden. Nach Stimulation mit DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift und mit hTERT-Peptid p540, p865, p988 sowie p461 pulsiert worden waren, zeigten die CD8⁺ T-Lymphozyten eine IFN γ -Produktion von 0,1%. Von den CD4⁺ T-Lymphozyten produzierten 0,2% IFN γ nach Stimulation mit DC, die mit dem hTERT-Peptid p461 pulsiert und mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren. Es wurde kein IFN γ von den CD4⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit den hTERT-Peptiden p540, p865 sowie p988 pulsiert und mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren, produziert.

Keine IFN γ -Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten konnte bei dem gesunden Spender 2 gemessen werden.

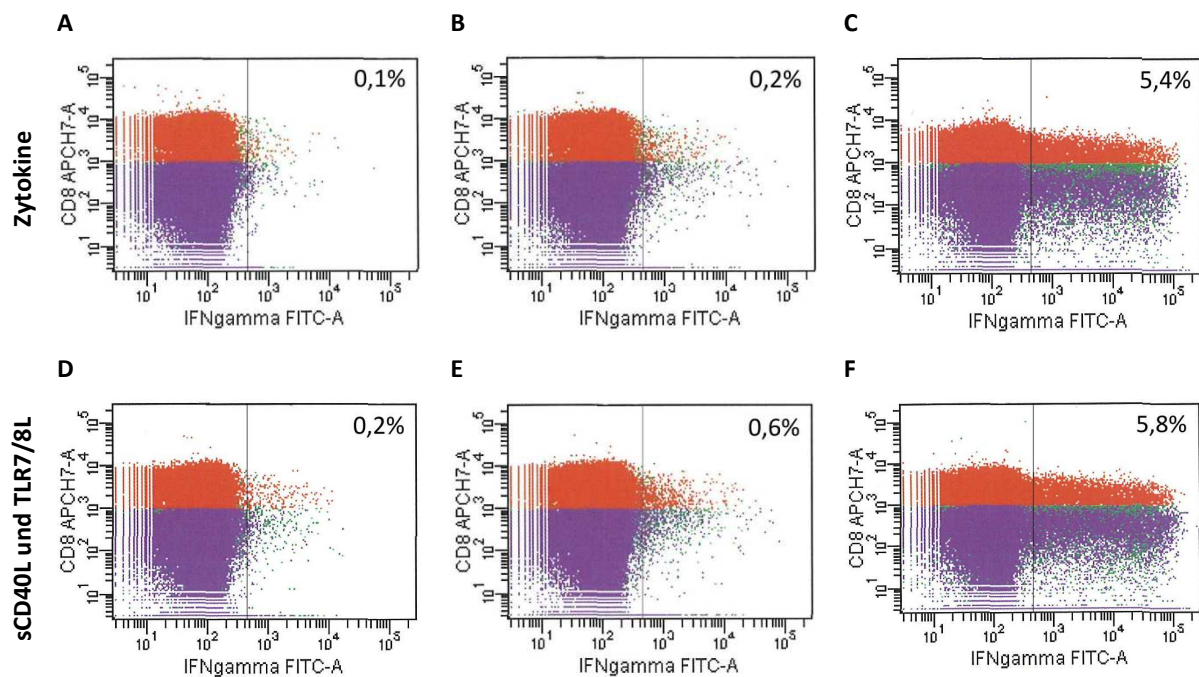


Abb. 8: Gesunder Spender 4: IFN γ -Produktion der CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD8⁻ Zellen (violett) und die CD8⁺ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 0,1% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,2% der Zellen IFN γ (B). Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 5,4%.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 0,2% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,6% der Zellen IFN γ (E). Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 5,8%.

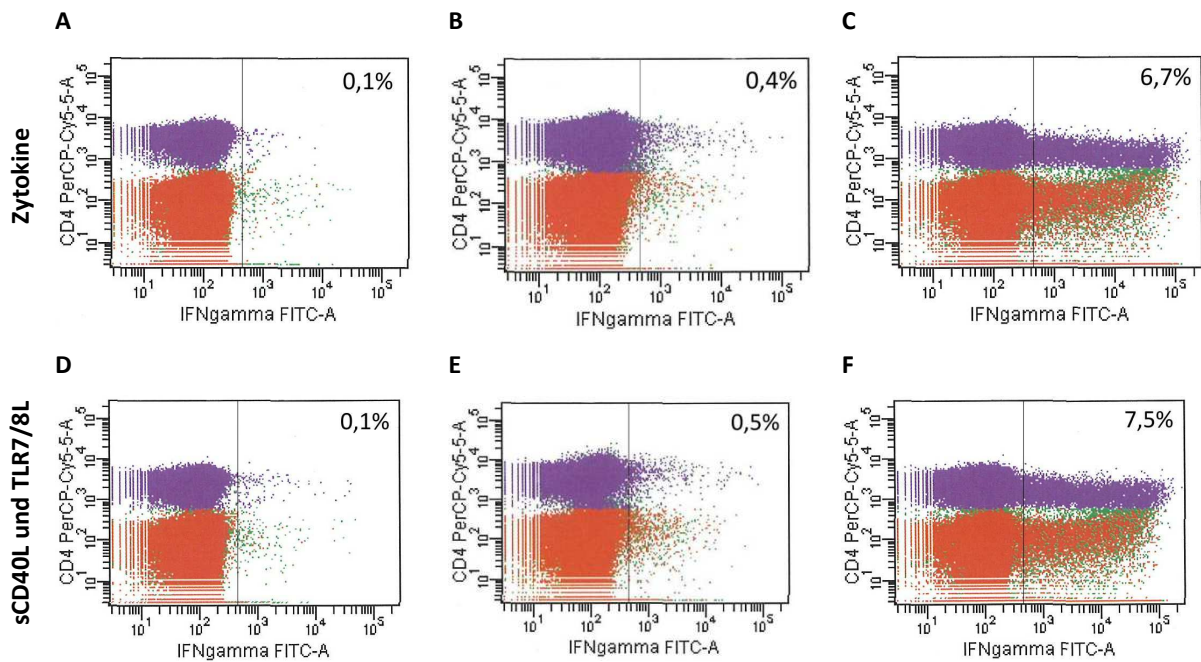


Abb. 9: Gesunder Spender 4: IFN γ -Produktion der CD4 $^+$ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD4 $^+$ Zellen (violett) und die CD4 $^-$ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 0,1% der CD4 $^+$ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,4% der Zellen IFN γ (B). Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 6,7%.

Bei den CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 0,1% der CD4 $^+$ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,5% der Zellen IFN γ (E). Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 7,5%.

3.4.2 hTERT-spezifische T-Zellreaktion bei den Patienten 1, 2, 3, 4, 5 und 6

Nach Stimulation der Lymphozyten mit DC, die mit HLA-restringierten hTERT-Peptiden pulsiert und mit Zytokinen oder sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren, wurde bei sechs Patienten die hTERT-spezifische, intrazelluläre IFN γ -Produktion gemessen. Zwischen 0 und 1,3% der CD8 $^+$ T-Lymphozyten und zwischen 0 und 1,4% der CD4 $^+$ T-Lymphozyten zeigten eine IFN γ -Produktion (Tab. 4).

Patient	HLA-Typ	Peptide	IFN ⁺ CD8 ⁺ Lz, Stimulation mit Zytokin-gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD8 ⁺ Lz, Stimulation mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD4 ⁺ Lz, Stimulation mit Zytokin-gereiften DC [%]	IFN ⁺ CD4 ⁺ Lz, Stimulation mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC [%]
5	A2 A24	p540 p865 p988 p461	1,3	0,3	1,4	0,1
4	A2 DR7	p540 p865 p988 p672	0,7	0,1	0,1	0,1
2	A1 DR7	p325 p672	0,0	0,1	0,0	0,0
6	A1 A24 DR1	p325 p461 p672	0,1	0,0	0,1	0,0
1	A2 DR1 DR15	p540 p865 p988 p672 p766	0,0	0,0	0,0	0,0
3	A2 A3	p540 p865 p988 p973	0,0	0,0	0,0	0,0

Tab. 4: Intrazelluläre Produktion von IFN γ in Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-peptidbeladenen DC bei NSCLC Patienten

Bei Patient 5 waren nach Stimulation mit DC, die mit den HLA-A2 und -A24 restringierten hTERT-Peptiden p540, p865, p988, sowie p461 beladen und mit Zytokinen ausgereift worden waren, 1,3% der CD8⁺ Lymphozyten IFN⁺ (Abb. 10B) und 1,4% der CD4⁺ Lymphozyten (Abb. 11B). Nach Ausreifung der DC mit sCD40L und TLR7/8L waren es 0,3% der CD8⁺ Zellen (Abb. 10E) und 0,0% der CD4⁺ Zellen. (Abb. 11E).

Bei Patient 4 ließ sich nach Stimulation mit DC, die mit den hTERT-Peptiden p540, p865, p988 sowie p672 pulsiert und mit Zytokinen ausgereift worden waren, bei 0,7% der CD8⁺

Zellen (Abb. 12B) und 0,1% der CD4⁺ Zellen (Abb. 13B) intrazelluläres IFN γ nachweisen. Nach Ausreifung mit sCD40L und TLR7/8L waren 0,1% der CD8⁺ (Abb. 12E) und 0,1% der CD4⁺ Zellen (Abb. 13E) positiv für IFN γ .

Bei Patient 2 kam es nach Stimulation mit DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift und mit den hTERT-Peptiden p325 und p672 pulsiert worden waren, zu einer IFN γ -Produktion bei 0,1% der CD8⁺ T-Lymphozyten. Die restlichen untersuchten Lymphozyten dieses Patienten wiesen keine IFN γ -Produktion auf.

Bei dem Patienten 6 konnte nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen ausgereift und mit den hTERT-Peptiden p325, p461 sowie p672 pulsiert worden waren, eine IFN γ -Produktion bei 0,1% der CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die übrigen Lymphozyten dieses Patienten, die mit sCD40L und TLR7/8L gereiften, hTERT-peptidpulsierten DC stimuliert worden waren, wiesen keine IFN γ -Produktion auf. Bei den Patienten 1 und 3 wurde nach Stimulation mit DC, die mit den hTERT-Peptiden p540, p865, p988, p672 sowie 766 (Patient 1) und p540, p865, p988 sowie p973 (Patient 3) pulsiert worden waren, in allen Proben keine Aktivierung gemessen.

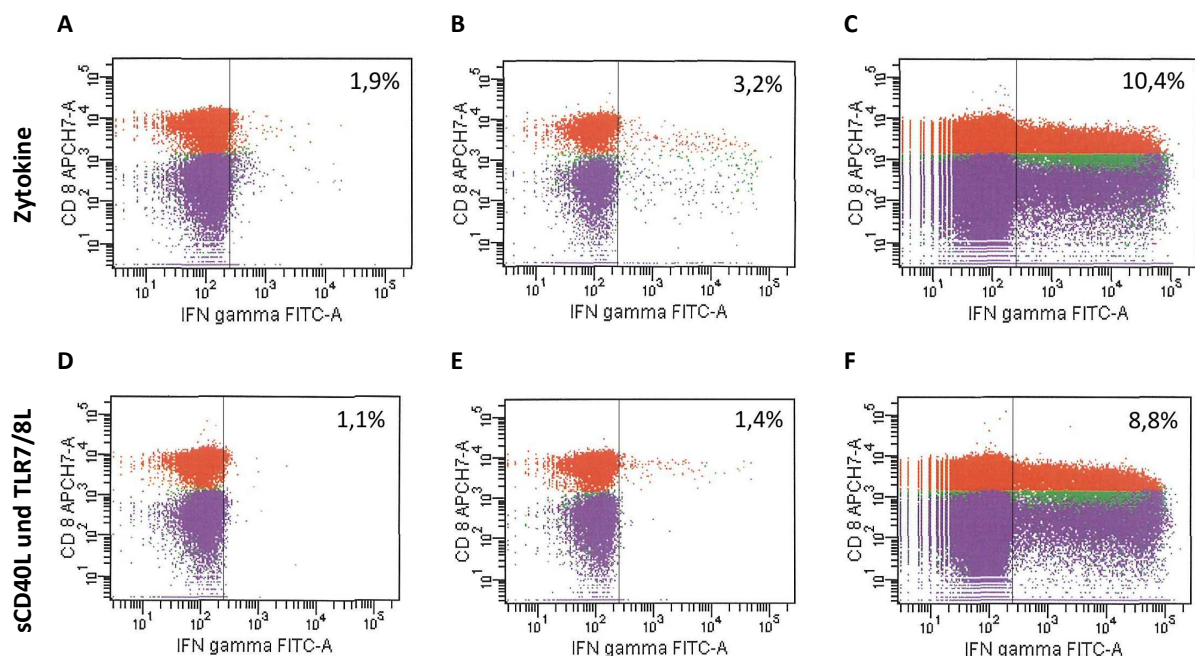


Abb. 10: Patient 5: IFN γ -Produktion der CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD 8- Zellen (violett) und die CD 8+ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 1,9% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p461) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 3,2% der Zellen IFN γ (B). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 1,3%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 10,4%.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 1,1% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p461) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 1,4% der Zellen IFN γ (E). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,3%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 8,8%.

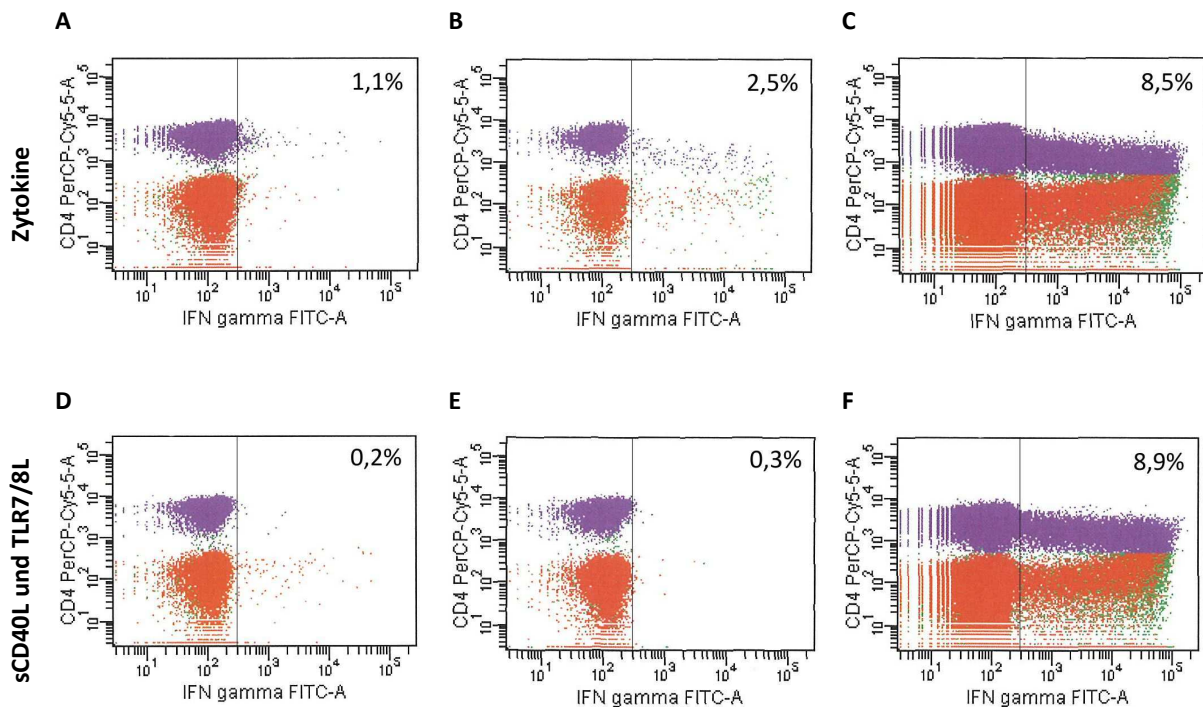


Abb. 11: Patient 5: IFN γ -Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD4⁺ Zellen (violett) und die CD4⁻ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD4⁺ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 1,1% der CD4⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p461) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 2,5% der Zellen IFN γ (B). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 1,4%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 8,5%.

Bei den CD4⁺ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 0,2% der CD4⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p461) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,3% der Zellen IFN γ (E). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,1%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 8,9%.

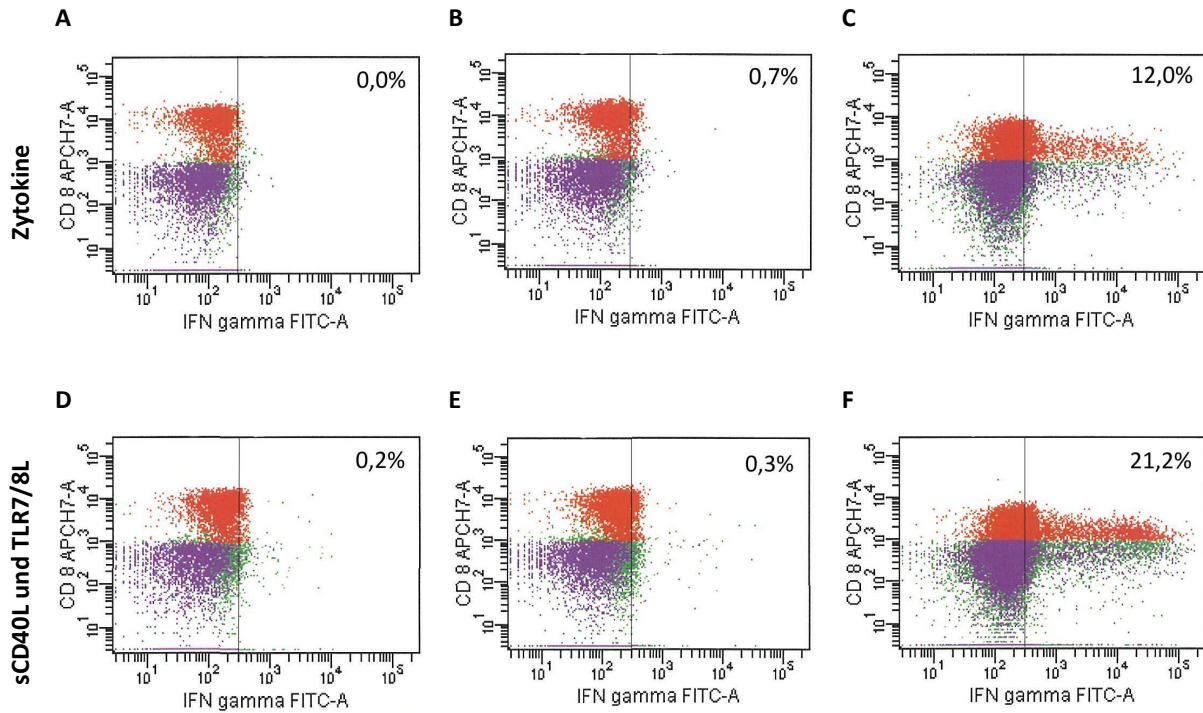


Abb. 12: Patient 4: IFN γ -Produktion der CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD8⁻ Zellen (violett) und die CD8⁺ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 0,0% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p672) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,7% der Zellen IFN γ (B). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,7%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 12,0%.

Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 0,2% der CD8⁺ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p672) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,3% der Zellen IFN γ (E). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,1%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 21,2%.

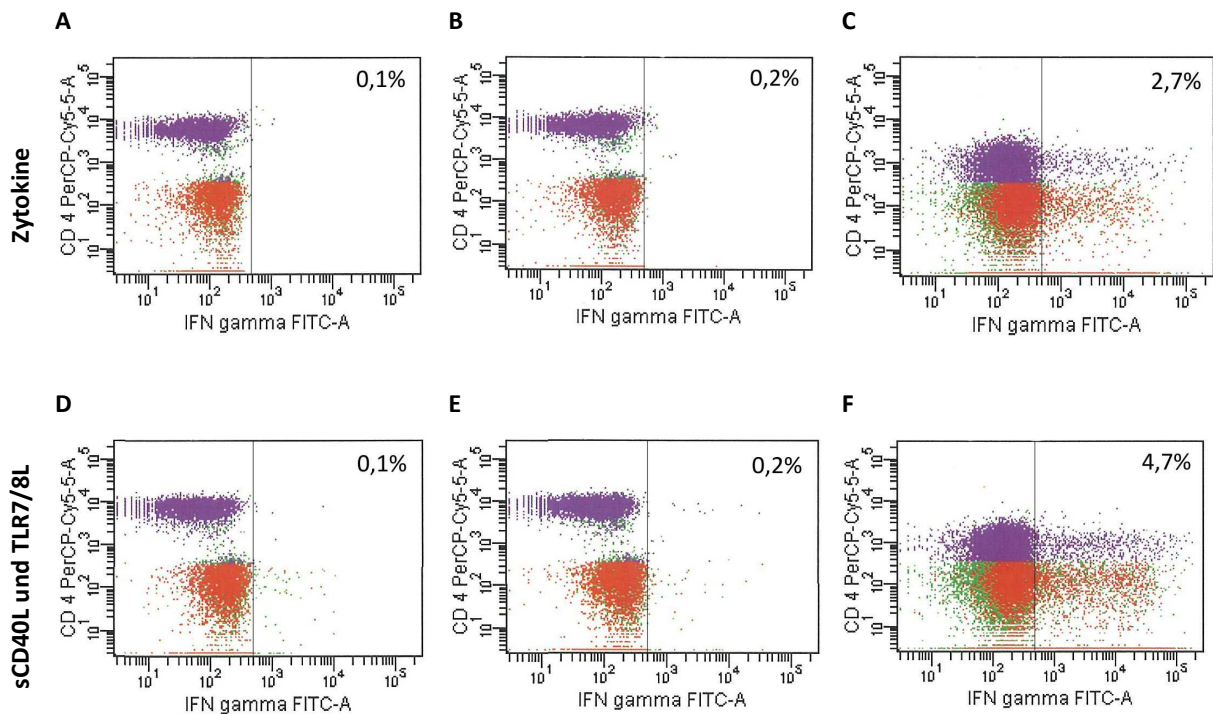


Abb. 13: Patient 4: IFN γ -Produktion der CD4 $^+$ T-Lymphozyten nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen (A, B und C) oder mit sCD40L und TLR7/8L (D, E und F) ausgereift worden waren

In den Abbildungen sind die CD4 $^+$ Zellen (violett) und die CD4 $^-$ Zellen (rot), sowie auf der waagerechten Achse das IFN γ dargestellt.

Bei den CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit Zytokinen ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (A) von 0,1% der CD4 $^+$ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p672) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,2% der Zellen IFN γ (B). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,1%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (C) lag bei 2,7%.

Bei den CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren, wurde in der Negativkontrolle (D) von 0,1% der CD4 $^+$ T-Lymphozyten IFN γ produziert. CD4 $^+$ T-Lymphozyten, die mit hTERT-Peptid (p540, p865, p988 und p672) beladenen DC stimuliert worden waren, produzierten in 0,2% der Zellen IFN γ (E). Aus der Differenz errechnet sich eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0,1%. Die IFN γ -Produktion in der Positivkontrolle mit SEA (F) lag bei 4,7%.

3.4.3 Separation von CD137 $^+$ CD8 $^+$ T-Lymphozyten bei dem Patienten 5

24 h nach der Stimulation nicht adhärenter Zellen mit zytokingereiften, hTERT-Peptid (p988, p540, p865 und p461) pulsierten DC waren 14,0% der CD3 $^+$ Lymphozyten des Patienten 5 CD8 $^+$ /CD137 $^+$. In der Negativfraktion waren nach der MACS-Separation mit den CD137 Antikörpern nur noch 10,6% der Lymphozyten CD8 $^+$ /CD137 $^+$. In der Positivfraktion der MACS-sortierten Lymphozyten waren 94,9% der CD8 $^+$ Zellen positiv für CD137 (Abb. 14).

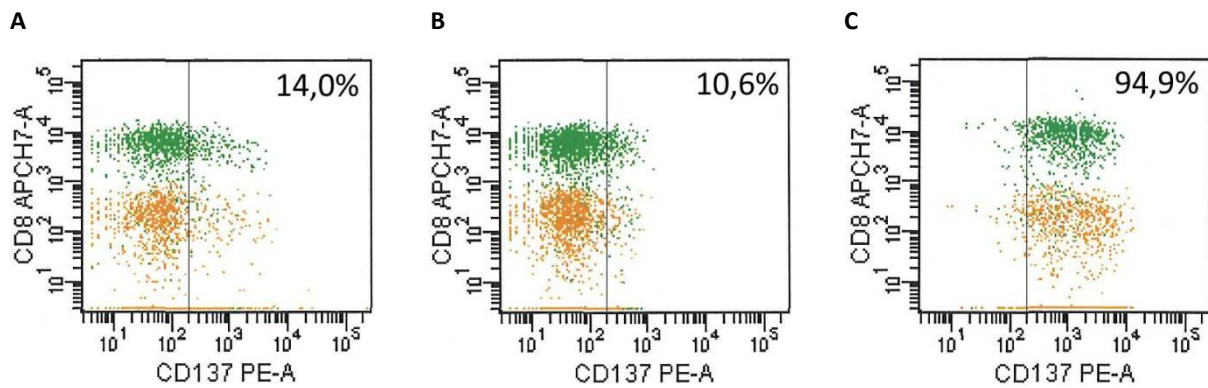


Abb. 14: Separation CD137⁺ T-Lymphozyten

Die Abbildungen zeigen die CD8⁻ Zellen (orange) und die CD8⁺ Zellen (grün), sowie in der waagerechten Achse CD137.

Vor der Separation sind 14,0% der CD3⁺ Zellen CD8⁺/CD137⁺ T-Lymphozyten (A). Nach der Separation sind nur noch 10,6% der CD3⁺ Zellen CD8⁺/CD137⁺ T-Lymphozyten (B). Bei den separierten CD3⁺ Lymphozyten sind 94,9% CD8⁺/CD137⁺ Zellen (C).

3.4.4 Zytotoxizitätsuntersuchung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bei den Patienten 5 und 6

Bei dem Patienten 5 wurde nach einer dreifachen Stimulation der Lymphozyten mit DC, die mit hTERT-Peptid (p988, p540, p865 und p461) beladen waren, eine Separierung CD137⁺ T-Lymphozyten durchgeführt und diese Zellen auf ihre Fähigkeit, hTERT-peptidbeladene T2-Zellen zu zerstören, im Chromfreisetzungstest untersucht. In der Positivkontrolle wurde bei unbeladenen T2-Zellen 7847 cpm und bei den hTERT-peptidbeladenen T2-Zellen 9402 cpm gemessen. Die Negativkontrolle wies bei den unbeladenen T2-Zellen 542 cpm und bei den hTERT-peptidbeladenen T2-Zellen 505 cpm auf. Bei den Patientenzellen, die zuvor dreimal mit hTERT-peptidpulsierten DC, die mit Zytokinen gereift worden waren, stimuliert worden waren, ließen sich bei den ungepulsten T2-Zellen 461 cpm und bei den hTERT-peptidgepulsten T2-Zellen 475 cpm registrieren. Alle Ergebnisse wurden jeweils aus dem Mittelwert von drei Proben gebildet, für die jeweils die gleichen Versuchsbedingungen galten. Bei den Patientenzellen wurde ein Verhältnis von 16 CD137⁺ Zellen zu einer T2-Zelle genutzt. Hieraus ergibt sich eine Lyse der ungepulsten, sowie der gepulsten T2-Zellen von 0%.

Bei T-Lymphozyten, die zuvor mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC stimuliert worden waren, kam es durch die Chromfreisetzung bei ungepulsten T2-Zellen zu 549 cpm und bei

hTERT-peptidgepulsten T2-Zellen zu 477 cpm. Auch hier handelte es sich je um den Mittelwert aus drei Proben und einem Verhältnis von einer T2-Zelle zu 13 CD137⁺ T-Lymphozyten. Eine Lyse von 0,5% ließ sich bei den ungeladenen T2-Zellen nachweisen, bei den hTERT-peptidgepulsten T2-Zellen betrug die Lyse 0% (Abb. 15).

Bei dem Patienten 6 erfolgte der Zytotoxizitätsversuch wie bei dem Patienten 5 nach dreiwöchiger Zellkultur, jedoch ohne vorherige CD137-Separierung und nur mit T-Lymphozyten, die zuvor dreimalig mit hTERT-Peptid pulsierten DC stimuliert wurden, welche mit Zytokinen gereift worden waren. Für die Stimulation mit den DC und die Beladung der T2-Zellen wurden folgende hTERT-Peptide benutzt: p325, p461 und p672. Die Positivkontrolle bei unbeladenen T2-Zellen ergab 1480 cpm und bei hTERT-peptidbeladenen T2-Zellen 1480 cpm. Bei ungeladenen T2-Zellen ergaben sich in der Negativkontrolle 168 cpm und bei gepulsten T2-Zellen 150 cpm. Zusammen mit Patientenzellen konnten bei ungeladenen T2-Zellen 309 cpm für die Chromfreisetzung und bei hTERT-peptidgepulsten T2-Zellen 152 cpm registriert werden. Die T2-Zellen waren mit den T-Lymphozyten im Verhältnis 1:40 eingesetzt worden. Hieraus ergab sich eine Lyse der unbeladenen T2-Zellen von 10,75% und der hTERT-peptidbeladenen von 0,7% (Abb. 15).

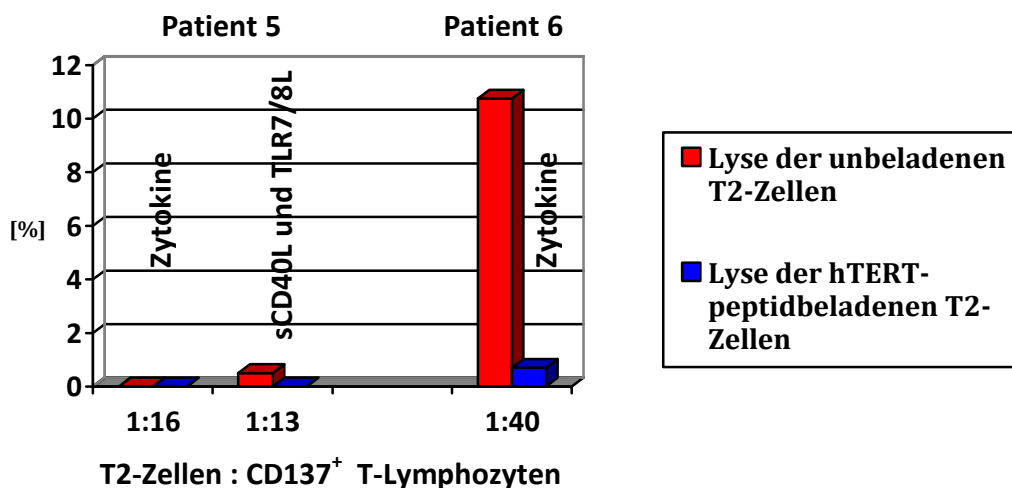


Abb. 15: Zytotoxizitätsuntersuchung bei den Patienten 5 und 6

Bei beiden Patienten konnte keine Lyse von T2-Zellen, die mit hTERT-Peptiden beladen waren, gemessen werden.

4. Diskussion

4.1 Pulsierung und Ausreifung der DC

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausreifung von DC exemplarisch bei dem gesunden Spender 5 untersucht. Hierbei wurde die Expressionsstärke der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 auf den DC gemessen, welche phänotypische Charakteristika reifer DC sind. Die älteste und am häufigsten verwendete Methode für die Ausreifung von DC, der Goldstandard, ist der Zytokincocktail (Jonuleit et al. 1997, Jonuleit et al. 2001). Die mit dem Zytokincocktail gereiften DC exprimierten CD83 und CD86 mit einer hohen Fluoreszenz. Die Expression von CD80 nahm nur leicht zu. Unter den mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression des Reifungsmarker CD86 auf den DC, bei CD83 und CD80 aber nur eine leicht vermehrte Expression. Die Expression der Oberflächenmarker ist nur ein Indiz für die Ausreifung der DC. Einzelne DC können im Durchflusszytometer zwar als Zelle identifiziert werden, es kann jedoch nicht beurteilt werden, inwieweit die DC funktionell ausgereift sind.

Die Ausreifung der DC mit sCD40L und TLR7/8L wird für die Aktivierung von T-Lymphozyten als effektive Kombination beschrieben (Xu et al. 2006). In dieser Studie wird der Ligand sCD40L zusammen mit einem Ligand für TLR 7 und 8 genutzt, um eine Aktivierung der DC zu erreichen. Dieses sorgt für eine verstärkte IL-12 Produktion und damit eine bessere Aktivierung CD8⁺ T-Lymphozyten (Xu et al. 2003).

Alternativ können DC zusätzlich zu IL-4 und GM-CSF mit Zytokinen wie TNF- α , IFN- α oder der Kombination aus beiden ausgereift werden (Aloysius et al. 2009). Hierbei stellte sich die Kombination als beste Ausreifungsmethode heraus (Satthaporn et al. 2008), welches begründet wurde mit der höchsten Expression immunregulatorischer Proteine wie IL-10 sowie IL-12 und der erhöhten Expression der Oberflächenmarker CD80 sowie CD40 als Zeichen der erfolgreichen Ausreifung. Bei der Reifung und Aktivierung der DC erfolgte, wie in einigen anderen Studien, eine Zugabe von GM-CSF und IL-4 jeden zweiten Tag in den ersten sechs Tagen (Gilboa 2007, Figdor et al. 2004, Banchereau et Steinman 1998). Eine andere Studie über die Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bei gesunden Spendern berichtet über eine Ausreifung der DC in fünf Tagen (Filaci et al. 2006).

Zelllinien anstelle von patienteneigenen DC können verwendet werden mit dem Vorteil der unbegrenzten Anzahl von DC, welche eine Alternative zu der begrenzten Zellzahl von Patienten darstellt. In einer Studie (Santegoets et al. 2006) wurden DC mit verschiedenen TAA, unter anderem auch hTERT, getestet. Die Antigene konnten auf den Zelllinien stabil und kontrolliert präsentiert werden und es ließ sich kein funktioneller Unterschied zu monozytären DC feststellen.

Unterschiede lassen sich in der Anzahl der Tage für die Ausreifung erkennen sowie den Zugaben verschiedener Zytokine, wie IL-4, GM-CSF, TNF- α , IFN- α und deren Kombinationen für eine erfolgreiche Ausreifung der DC.

Der Zeitpunkt der Beladung von DC mit Antigenen und die Herkunft sowie Qualität des Antigens sind relevante Faktoren für die Generierung der DC als potente Immunstimulatoren (Banchereau et Palucka 2005). Die Pulsierung, das heißt die Beladung der DC mit dem für den Spender geeigneten, HLA-restringierten hTERT-Peptid wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Menge von 30 μg durchgeführt. Die Menge des hTERT-Peptides variierte in anderen Studien von 25 μg (Schmidt et al. 2006) bis 40 μg (Aloysius et al. 2009), wobei auch diese Menge zu einem klinischen Ansprechen bei 4 von 16 Prostatapatienten nach Vakzinierung führte (Aloysius et al. 2009). In allen Studien wurden die Peptide in DMSO gelöst. Dieses hat eine zytotoxische Wirkung (Brown et al. 1963), welches als Grund für eine schlechtere Aktivierung der T-Lymphozyten im Folgenden in Frage kommt.

4.2 Depletion regulatorischer T-Lymphozyten

Hohe Anzahlen von T_{reg} haben im Tiermodell die tumorspezifische Immunantwort der T-Lymphozyten gehemmt (Sharma et al. 2006).

In vitro-Studien, welche DC mit der Ausreifung nach dem Goldstandard nutzen, können eine Erhöhung der Expression von CD4⁺/CD25⁺ T-Lymphozyten zur Folge haben. Dies wurde in einer Studie mit Melanompatienten beschrieben (Banerjee et al. 2006) und stellte sich, auf Grund der inhibitorischen Wirkung der regulatorischen T-Lymphozyten, als Problem bei der Aktivierung spezifischer T-Zellen dar. In einer Studie (Asemisen et al. 2006) gelang die Aktivierung von T-Lymphozyten gegen den Transkriptionsfaktor WT1 erst nach der Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten und 29,3% der T-Lymphozyten waren spezifisch für WT-1.

Um die inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung TAA-spezifischer T-Lymphozyten zu vermindern, wurden in der vorliegenden Arbeit die T_{reg} der nicht adhärenen Zellen depletiert (Trzonkowski et al. 2006). In den Untersuchungen wurden bei dem gesunden Spender 4 die $CD4^+/CD25^+$ Zellen von 7,4% vor Depletion auf 1,7% nach zweifacher Depletion reduziert.

Nach gelungenen Depletionen der $CD4^+/CD25^+$ T-Helfer Zellen in vitro liegen die ersten Versuche in vivo vor. Es wurde versucht, die Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten mit einem zusammengesetzten Protein, aus IL-2 und Diphtherie-Toxin, zu reduzieren. Ein Erfolg war bei 14 Patienten mit metastasiertem Melanom oder Nierenzellkarzinom nach dieser Behandlung nicht zu beobachten (Attia et al. 2005). Alternativ kann die Anzahl der T_{reg} und deren inhibitorische Wirkung durch eine geringe orale Dosis Cyclophosphamid vermindert werden (Lutsiak et al. 2005). Klinische Studien bei 8 Tumorpatienten (6 Patienten mit Prostatakarzinom, 1 Patient mit Colorektalkarzinom und 1 Patient mit Oropharynxkarzinom) nach hTERT-Vakzinierungen haben gezeigt, dass es bei 4 Patienten mit Prostatakarzinom, die eine T_{reg} Anzahl unter 0,5% hatten, zu einer Tumorregression gekommen ist (Aloysius et al. 2009). In diesen Studien korrelierten geringe T_{reg} Zahlen mit einer Tumorregression.

In der vorliegenden Studie waren die hohen Zellverluste ein Problem der Depletion regulatorischer T-Lymphozyten, verursacht durch starke Verklumpung der T-Lymphozyten. Die Klumpenbildung wurde stets nach dem Auftauen der nicht adhärenen Zellen aus der Kryokonservierung beobachtet. Ursache war, dass auch Granulozyten mit eingefroren waren, die dabei beschädigt wurden, ihre DNA freisetzen und durch Verklebung der Zellen zu einer Aggregatbildung führten (Brinkmann et al. 2004). Diese Klumpenbildung konnte durch Zugabe von DNase reduziert, jedoch nicht vollständig verhindert werden. Andere Gruppen haben gezeigt, dass durch den Einsatz der DNase keine Veränderungen der Zellvitalität, Expression der Oberflächenmarker, Lymphozytenproliferation oder Induktion von Zytokinen ausgelöst werden (Garcia-Pineros et al. 2006).

4.3 Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aktivierung hTERT-spezifischer T-Zellen bei gesunden Spendern sowie bei den Patienten mit NSCLC eine dreimalige Stimulation mit hTERT-peptidbeladenen DC vorgenommen (Vonderheide et al. 2001, Märten et al. 2006). Für eine

bessere Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten wurde zusätzlich ab dem zehnten Tag nach der Stimulation der T-Lymphozyten mit den hTERT-peptidbeladenen DC 20 U/ml IL-2 hinzugegeben.

Bei drei von vier gesunden Spendern konnte eine IFN γ -Produktion der CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit dem hTERT-Peptid gemessen werden. Die IFN γ -Produktion war bei den CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit sCD40L und TLR7/8L gereiften DC stimuliert worden waren, bei drei Spendern positiv und betrug 0,1 bis 0,4%. Sie war bei zwei Spendern nur bei den CD8⁺ T-Lymphozyten positiv, die mit zytokingereiften DC stimuliert worden waren.

Im Vergleich ließ sich bei einer anderen Studie (Filaci et al. 2006) mit 10 gesunden Spendern nach einer fünffachen Stimulation keine hTERT-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten in vitro bei gesunden Spendern nachweisen. Im Gegensatz dazu wies eine weitere Untersuchung (Vonderheide et al. 2001) nach einer dreifachen Stimulation bei allen zehn gesunden Spendern bis 0,3% hTERT-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten nach.

In der vorliegenden Arbeit war ein besseres Ansprechen der hTERT-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten gesunder Spender auf DC, welche mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift wurden, zu beobachten. Eine verbesserte Aktivierung von T-Lymphozyten durch die Stimulation mit DC, welche mit sCD40L und TLR7/8L gereift wurden, wurde auch durch eine andere Studie festgestellt (Xu et al. 2006). Dies kann möglicherweise erklärt werden durch die mit sCD40L und TLR7/8L gesteigerte Produktion des Zytokins IL-12, welches natürlicherweise von DC produziert wird und für eine stärkere Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten sowie Verbesserung der Antigen sensitivität sorgt (Xu et al. 2003).

Unklar ist, warum hTERT-spezifische T-Lymphozyten überhaupt aktiviert werden konnten, obwohl die gesunden Spender zuvor noch nie Kontakt mit dem Tumor-Peptid hatten. hTERT ist ein Autoantigen, das nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf anderen gesunden körpereigenen Zellen, wie den hämatopoetischen Stammzellen, Keimzellen, Embryonalzellen, Epithelzellen der Epidermis oder der Darmkrypten exprimiert wird (Huo et al. 2006, Wahn et Meyerson 2001, Shay et Wright 2002). Eine Ursache könnten die unterschiedlichen Isoformen des Antigens sein (NCBI 2011), weshalb in vitro eine neue Antwort der T-Lymphozyten erzeugt wird. Dies könnte dadurch bestätigt werden, dass in vitro aktivierte hTERT-spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten nur Tumorzellen angreifen, nicht jedoch Körperzellen (Scardio et al. 2002, Hernandez et al. 2002). Auch

hämatopoetische Stammzellen werden in vitro durch hTERT-spezifische T-Lymphozyten nicht lysiert (Vonderheide et al. 1999, Minev et al. 2000).

Bei vier von sechs NSCLC Patienten konnte bei 0,1 bis 1,3% der CD8⁺ T-Lymphozyten eine IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem hTERT-Peptid festgestellt werden. Nach der Stimulation mit DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren, zeigten die CD8⁺ T-Zellen von drei Patienten eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion bis 1,3%. Bei DC, die mit sCD40L und TLR7/8L gereift worden waren, wurde bei drei Patienten eine IFN γ -Produktion von bis zu 0,7% der CD8⁺ T-Lymphozyten gemessen.

Bei anderen Studien ließen sich spontan im Elispot hTERT-spezifische T-Lymphozyten bei 18 von 31 (54%) nicht therapierter Patienten mit NSCLC nachweisen (Fabre et al. 2009). Erst nach der sechsten Vakzinierung in vivo ließen sich im Elispot bei 87,5% der Patienten mit NSCLC (Bolonaki et al. 2008) hTERT-spezifische T-Lymphozyten in einer anderen Untersuchung nachweisen. Vor der Vakzinierung waren keine hTERT-spezifischen T-Lymphozyten zu finden und nach der Vakzinierung 0,1% hTERT-spezifische T-Lymphozyten.

hTERT-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten lassen sich auch über die Selektion mittels Tetrameren finden (Altmann et al. 1996). Tetramere sind fluoreszenzmarkiert und bestehen aus vier HLA-I Molekülen mit daran gebundenen Antigenen. Bei der Übereinstimmung des Antigens mit dem für das Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor auf den T-Lymphozyten, bildet sich ein Komplex, der im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann. Bei einer Studie an 27 Myelompatienten (Maecker et al. 2005) ließen sich nach einmaliger ex vivo hTERT-Peptid Stimulation von T-Lymphozyten über eine Tetrameranalyse bei zwei Patienten 0,3 bis 0,5% hTERT-spezifische T-Lymphozyten erkennen. Über 0,15% bis 4,12% hTERT-spezifische T-Lymphozyten wurden nach bis zu fünf in vitro Stimulationen in einer Studie mit Zellen einer humanen AML Zelllinie (MUTZ-3) berichtet (Santegoets et al. 2006). In einer weiteren Studie (Vonderheide et al. 2001) wurde nach dreifacher Stimulation bei 6 von 8 Patienten (3 mit Malignem Melanom, 2 mit Prostatakarzinom, 1 mit Lungenkarzinom, 1 mit Blasenkarzinom und 1 mit Non-Hodgkin Lymphom) 1 bis 2% hTERT-spezifische T-Lymphozyten in der Tetrameranalyse nachgewiesen, ohne Stimulation konnten keine hTERT-spezifischen T-Lymphozyten registriert werden. Bei Patienten mit CML konnte bei 82% der Patienten natürlich vorkommende hTERT-spezifische T-Lymphozyten gefunden werden (Gannage et al. 2005). In einer anderen Studie konnten ohne spezifische Stimulation bei 90%

der Patienten mit verschiedenen Karzinomen zwischen 0,1 und 1,4% (Filaci et al. 2006) hTERT-spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dieser Prozentsatz hTERT-spezifischer IFN γ ⁺ T-Lymphozyten ist dem der vorliegenden Arbeit nach dreifacher Stimulation ähnlich. 0,71% spontan auftretende hTERT-spezifische T-Lymphozyten bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinomen bestätigen weiter das Auftreten der spezifischen T-Lymphozyten (Mizukoshi et al. 2006). In dieser Arbeit wurden 10 U/ml IL-2 zwei Tage nach Stimulation der T-Lymphozyten zugegeben, für eine bessere Aktivierung der T-Lymphozyten.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich feststellen, dass sich bei den CD8⁺ T-Lymphozyten durch die Ausreifung der DC mit Zytokinen höhere IFN γ -Produktionen ergaben als nach DC Ausreifung mit sCD40L und TLR7/8L. Die Ausreifung der DC mit Zytokinen ist daher in dieser Studie als die bessere Methode zur Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten bei NSCLC Patienten zu beurteilen.

In Immuntherapien durch Vakzinierungen ließen sich in manchen Studien nur klinische Ansprechraten von bis zu 10% nachweisen (Rosenberg et al. 2004, Ribas 2006). Auch wenn eine tumorspezifische T-Zell-Antwort ausgelöst wird, muss sie keinen Schutz vor einer Progression darstellen (Filaci et al. 2006). Dies ist möglicherweise auf lokale Abwehrreaktionen des Tumors zurückzuführen. Es lassen sich eine Reihe von Inhibitionsmechanismen des Tumors beschreiben (Drake et al. 2006). Ein Schutzmechanismus des Tumors ist die geringe Expression von MHC Molekülen, Antigenen, β 2 Mikroglobulinen oder von Transportern zur Präsentation der Antigene. Folge ist, dass der Tumor nicht von den aktivierten T-Lymphozyten erkannt werden kann (Marincola et al. 2000).

Die unterschiedlichen Aktivierungen der CD8⁺ T-Lymphozyten bei den Patienten lassen sich auf diverse Ursachen zurückführen. Eine mögliche Ursache könnte die individuell, unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors darstellen. Bei den T-Zell-Rezeptoren kommen in spezifischen variablen Regionen Mutationen vor (Kiecke et al. 1999), welche mit höherer oder niedriger Affinität zu den DC einhergehen können. Das Alter der Patienten, sowie die unter den Patienten variierenden Therapien bis zum Untersuchungszeitpunkt haben Einfluss auf das Immunsystem (Dimeo et al. 1997) und wirken sich dadurch auf die voneinander abweichende Aktivierungsfähigkeit der T-

Lymphozyten aus. Eine Studie (Goronzy et al. 2001) bestätigte, dass bei Patienten über 65 Jahre mit einer vermehrten Anzahl von CD8⁺ Zellen ohne Expression von CD28 eine schlechtere Aktivierung der T-Lymphozyten nachzuweisen war. Hierbei ist der Oberflächenmarker CD28 der T-Lymphozyten ein für die Aktivierung von T-Lymphozyten wichtiges kostimulatorisches Signal für die Interleukinproduktion. Weiter supprimieren Chemotherapien das Immunsystem (Dimeo et al. 1997) und dadurch die T-Lymphozytenantwort. In einer Studie (Bolonaki et al. 2008) wurde gezeigt, dass ein größerer klinischer Erfolg bei einer früh eintretenden Immunantwort und einer geringen Tumorlast entsteht. Es könnte auch schon in der fetalen Entwicklung ein Abwehrmechanismen entstanden sein, so dass das Antigen nicht als fremd erkannt wird und keine Immunantwort dagegen gebildet wird. Dies geschieht, indem der Tumor das hTERT-Antigen exprimiert, welches schon sehr frühzeitig auf Körperzellen exprimiert und somit als körpereigen erkannt wird (Liu et al. 2010). Die geringe Aktivierungen der T-Lymphozyten kann daher an der schwachen Immunogenität des hTERT-Peptides liegen, da es als Selbstantigen erkannt wird (Huo et al. 2006). Eine bedeutende Rolle für die Aktivierung von T-Lymphozyten spielt auch die Expression von CD152 (CTLA4) auf aktivierten T-Lymphozyten, welche die Interaktionen mit der Zielzelle unterdrückt (Schneider et al. 2006). Mit der Anzahl der Stimulationen der T-Lymphozyten bei gesunden Spendern sowie bei Patienten steigt der Prozentsatz spezifischer T-Lymphozyten. Es konnten zum Beispiel nach fünf hTERT-spezifischen Stimulationen bis 4,12% hTERT-spezifische T-Lymphozyten (Santegoets et al. 2006) aktiviert werden im Gegensatz dazu jedoch auch keine hTERT-spezifischen T-Lymphozyten (Filiaci et al. 2006) nach fünf hTERT-spezifischen Stimulationen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis lieferte die Untersuchung der IFN γ -Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten. Diese betrug in dieser Studie 0,1 bis 0,4%. Hierbei waren die CD4⁺ T-Lymphozyten von drei der vier gesunden Spender nach Stimulation mit dem hTERT-Peptid IFN γ ⁺. Es konnte eine IFN γ -Produktion der T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften DC bei drei Spendern und bei den sCD40L und TLR7/8L gereiften DC bei zwei der vier Spender festgestellt werden. Hieraus ergibt sich, dass die mit Zytokinen ausgereiften DC sich in dieser Arbeit besser zur Aktivierung hTERT-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten bei gesunden Spendern eignen.

In den Untersuchungen der sechs Patienten mit NSCLC konnte bei drei Patienten nach Stimulation mit hTERT-Peptiden eine IFN γ -Produktion von 0,1 bis 1,4% der CD4⁺ T-Lymphozyten gemessen werden. Nach der Stimulation mit DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren, zeigten drei Patienten eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion von 0 bis 1,4% der CD4⁺ Zellen. Bei zwei Patienten konnte nach Stimulation mit DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren, bei 0,1% der T-Lymphozyten eine IFN γ -Produktion gemessen werden. Die Ausreifung der DC mit Zytokinen erscheint in dieser Untersuchung für die Stimulation von CD4⁺ T-Lymphozyten bei Patienten mit NSCLC geeigneter.

Die IFN γ -Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten lässt sich theoretisch nur durch eine Präsentation der vorliegenden DR-Peptide (p766, p672) im MHC II Molekül auslösen (Schroers et al. 2002, 2003). Es ließ sich allerdings bei den Patienten 1 und 2 unter Verwendung der HLA-Klasse II DR-Peptide keine IFN γ -Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten erzeugen. Hingegen ließ sich bei dem Patienten 4 mit dem DR-Peptid eine hTERT-spezifische IFN γ -Produktion bei 0,1% der Lymphozyten aktivieren, sowohl nach Stimulation mit DC, die mit Zytokinen, als auch nach Stimulation mit DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift waren. Bei dem Patienten 5 ließ sich eine IFN γ -Produktion bei 1,4% der CD4⁺ T-Lymphozyten nachweisen. Die DC waren jedoch nicht mit DR-Peptiden beladen worden. Ebenso wurden bei den gesunden Spendern nur HLA-A2 und -A24 restringierte hTERT-Peptide genutzt, welche nur über MHC I präsentiert werden und daher nur CD8⁺ T-Lymphozyten ansprechen sollten (Schroers et al. 2002, 2003). Eine mögliche Erklärung liegt in der Präsentation von Peptiden, die normalerweise nur auf HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, auf HLA-Klasse II-Molekülen (Chicz et al. 1993). Eine Aktivierung über umliegende, aktivierte CD8⁺ Zellen (Bystander-Effekt) könnte auch die Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten erklären (Zhou et al. 2011). Studien zeigen, dass die CD4⁺ T-Zellantwort nicht für die primäre CD8⁺ T-Zellantwort, sondern für die T-Gedächtniszellantwort wichtig ist (Castellino et Germain 2006), welches die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellantwort verdeutlicht.

Es konnte in weiteren Vakzinierungs-Studien mit hTERT festgestellt werden, dass es in vivo zu keinen toxischen Reaktionen an gesunden Zellen, wie Keimzellen, Körperzellen oder B-Lymphozyten gekommen ist (Vonderheide et al. 2004, Vonderheide et al. 2001, Minev et al. 2000, Schroers et al. 2002). Weiterhin konnten auch in klinischen Studien nach Vakzinierung mit hTERT-Peptiden keine Laborveränderungen, histologischen Veränderungen des

Knochenmarks oder Reduzierungen der Immunglobuline festgestellt werden (Vonderheide et al. 2004). Die hTERT-Vakzinierungstherapie wurde als gut verträglich beschrieben (Märten et al. 2006). Ebenso wurde in anderen Untersuchungen (Bolonaki et al. 2007) nach der Gabe des hTERT-Peptides HLA-A2 p572 nur eine Grad I Toxizität mit lokalen Hautreaktionen, leichter Anämie, Fieber und Thrombozytopenie bei 16 von 22 Patienten festgestellt. Ein Patient entwickelte allerdings eine Toxizität zweiten Grades. In anderen Studien wurden ebenfalls nur leichte Nebenwirkungen nach hTERT-Vakzinierungen beschrieben, z. B. lokale Hautreaktionen, grippeähnliche Symptome, leichtes Fieber, Schüttelfrost, Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Brunsvig et al. 2006, Bernhardt et al. 2006).

Für eine weitere Verbesserung der Aktivierung hTERT-spezifischen T-Lymphozyten kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Durch das Zufügen von Adjuvantien, wie den CpG Oligonukleotiden ließen sich die Entzündungssignale verstärken (Parmiani et al. 2002). Als Adjuvantien könnten auch Zytokine wie GM-CSF, IL-2, IL-12 oder Chemokine zusätzlich gegeben werden (Xu et al. 2003, Domcheck et al. 2006). Ein weiterer Ansatz ist die Gabe von Antikörpern gegen CD40, CD80, CD134 und CD137 (Melero et al. 2007), die die unterdrückende Antwort des Immunsystems antagonisieren, bzw. die Aktivierung der Immunantwort bewirken. Es wurde auch beobachtet, dass neben der zellulären Immunantwort gegen hTERT, bei Patienten anti-hTERT-spezifische Auto-Antikörper vorhanden sind, die in einer weiteren Immuntherapie mit berücksichtigt werden könnten (Masutomi et al. 2002).

4.4 Zytotoxizität separierter CD137⁺ T-Lymphozyten

Der Oberflächenmarker CD137 kann für die Erkennung, Selektion und Expansion von aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten (Wolfl et al. 2007) und CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Wehler et al. 2008) eingesetzt werden.

In den Zytotoxizitätsversuchen (Brunner et al. 1968, Henkart, P. A. 1997) dieser Arbeit ließ sich bei steigendem Verhältnis von T2-Zellen zu CD137⁺ T-Lymphozyten (1:10, 1:20, 1:40) eine steigende, CMV-spezifische Lyse messen. Die stärkste Lyse von 9,21% bei CMV-peptidmixbeladenen T2-Zellen ließ sich im Verhältnis 1:40 messen. Bei 1:20 waren es lediglich 3,24% Lyse und im kleinsten Verhältnis bei 1:10 war keine Lyse messbar. Im CMV-Zytotoxizitätsversuch ließ sich die Abhängigkeit von T2-Zelle zu spezifischen T-Lymphozyten

gut darstellen, denn größere Zellzahlen von CD137⁺ Zellen zu geringeren T2-Zellzahlen führten zu einer stärkeren Lyse.

In den Zytotoxizitätsversuchen bei den Patienten 5 und 6 wurde keine Lyse der hTERT-peptidbeladenen T2-Zellen durch die hTERT-spezifischen T-Lymphozyten gemessen. Möglicherweise ist die Ursache das geringe Verhältnis zwischen T2-Zellen und CD137⁺ T-Lymphozyten, die nur eine Inkubation von Effektor- und Zielzellen im Verhältnis 1:13, bzw. 1:40 mit unseparierten T-Zellen, ermöglichte. Dieses könnte durch eine Expansion der T-Lymphozyten behoben werden, was in dieser Arbeit nicht gelang. Im Gegensatz zu dieser Studie konnte in einer anderen Studie (Filaci et al. 2006) die ex vivo Expansion der hTERT p540-spezifischen T-Lymphozyten erfolgreich durchgeführt werden. Denkbar wäre eine initiale Isolation von hTERT-spezifischen T-Zellen, gefolgt von einer Expansion. Die präzise Selektion der hTERT-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten könnte mit Tetramere gelingen (Brunsvig et al. 2006, Wenandy et al. 2008). Die Funktionalität der selektierten T-Lymphozyten könnte dann im weiteren Versuch, dem Zytotoxizitätstest, untersucht werden. Die geringen Zellzahlen bei den Patienten lassen sich dadurch erklären, dass sich während der Versuchsdurchführungen alle Patienten in Therapie befanden und damit die Zellzahlen reduziert waren (Dimeo et al. 1997). In einer anderen Studie war bei einem Verhältnisse von 1:40 zwischen Tumorzellen und hTERT-spezifischen T-Lymphozyten eine Lyse von 40% zu beobachten. hTERT-peptidbeladene T2-Zellen wurden nicht lysiert, sondern nur Tumorzellen, die hTERT überexprimierten (Su et al. 2002). Nach einer Vakzinierung von Nierenzellkarzinompatienten konnte eine Lyse von bis zu 90% hTERT-peptidbeladenen T2-Zellen oder HLA-identer, allogener Nierenkarzinomzellen durch hTERT-spezifische T-Lymphozyten im Zytotoxizitätsversuch nachgewiesen werden (Maerten et al. 2006). Hierbei lag ein Verhältnis von einer hTERT-peptidbeladenen T2-Zelle zu 80 hTERT-spezifischen T-Lymphozyten vor.

Als Alternative zu dem Zytotoxizitätsversuch mit Chrom ⁵¹ ist die Färbung mit dem Marker CD107 beschrieben (Betts et al. 2003). Vorteile sind, dass kein radioaktives Material verwendet werden muss und nur eine geringere Anzahl von Effektorzellen benötigt wird, da jede Zelle einzeln erfasst wird (Mittendorf et al. 2005). Ein Problem im Zytotoxizitätsversuch ist der Verlust der Vitalität der Zellen und deren Weiterverwendbarkeit, welches bei der Verwendung von CD107 ausbleibt. Bei der Degranulation der T-Lymphozyten nach Aktivierung wird CD107 mit einem spezifischen Antikörper markiert, welches innerhalb der

Membran zytotoxischer Granula der T-Lymphozyten sitzt und durch die Degranulation auf die Zelloberfläche gelangt. CD107 ist kennzeichnend für spezifisch lysierende Zellen. Dieses wurde mit HER2/neu auf T2-Zellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom gezeigt (Mittendorf et al. 2005) und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu dem Chromfreisetzungstest.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung des fortgeschrittenen Lungenkarzinoms ist immer noch mit einer begrenzten Überlebensdauer nach den aktuellen Chemo-, Radio- und Antikörpertherapien assoziiert. Möglicherweise enthält die zelluläre Immuntherapie Verbesserungsmöglichkeiten.

Die humane Telomerase Reverse Transcriptase ist ein Antigen, das auf mehr als 85% aller Tumorzellen exprimiert wird und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden kann.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, inwieweit sich die T-Lymphozyten von Patienten mit Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinom gegen das hTERT-Peptid, präsentiert auf Dendritischen Zellen, am besten spezifisch aktivieren lassen.

Für diese Arbeit wurden bei sechs Patienten Dendritische Zellen mit HLA-restringierten hTERT-Peptiden beladen. Diese peptidbeladenen Dendritischen Zellen wurden mit unterschiedlichen Reifungsfaktoren, mit Zytokinen oder mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift und zur Aktivierung von Lymphozyten eingesetzt. Die Aktivierung wurde anhand der intrazellulären IFN γ -Produktion der CD8⁺ T-Lymphozyten durchflusszytometrisch gemessen. Bei vier von sechs Patienten wurden 0,1 bis 1,3% IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen gefunden und bei drei von sechs Patienten 0,1 bis 1,4% IFN γ ⁺ CD4⁺ Zellen. Die DC, die mit Zytokinen ausgereift worden waren, aktivierten bei drei Patienten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Es ließen sich bei den Patienten 0,1 bis 1,3% IFN⁺ CD8⁺ Zellen und 0,1 bis 1,4% IFN⁺ CD4⁺ Zellen nachweisen. Die DC, die mit sCD40L und TLR7/8L ausgereift worden waren, aktivierten ebenfalls bei drei bzw. zwei Patienten die CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten. Es ließen sich jedoch nur 0,1 bis 0,3% IFN⁺ CD8⁺ Zellen, sowie 0,1 % IFN⁺ CD4⁺ Zellen nachweisen.

Im anschließenden Zytotoxizitätsversuch wurde die Funktionalität der hTERT-spezifischen T-Lymphozyten untersucht. In diesen Untersuchungen ließ sich bei keinem der zwei untersuchten Patienten eine hTERT-spezifische Lyse nachweisen.

6. Literaturverzeichnis

Adotevi, O., Mollier, K., Neuveut, C., Cardinaud, S., Boulanger, E., Mignen, B., Fridman, W. H., Zanetti, M., Charneau, P., Tartour, E., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P. (2006) Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses, *Clin. Cancer Res.* 12, 3158-3167

Aloysius, M. M., Mc Kechnie, A. J., Robins, R. A., Verma, C., Eremin, J. M., Fazaneh, F., Habib, N. A., Bhalla, J., Hardwick, N. R., Satthaporn, S., Sreenivasan, T., El-Sheemy, M., Eremin, O. (2009) Generation in vivo peptide-specific cytotoxic T cells and presence of regulatory T cells during vaccination with hTERT (class I and II) peptide-pulsed DCs, *J. Transl. Med.* 19, 7-18

Altman, J. D., Moss, P. A. H., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., Davis, M. M. (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science* 274, 94-96

Amarnath, S. M. P., Dyer, C. E., Ramesh, A., Iwuagwu, O., Drew, P. J., Greenman, J. (2004) In vitro quantification of the cytotoxic T lymphocyte response against human telomerase reverse transcriptase in breast cancer, *Int. J. Oncol.* 25, 211-217

Arai, J., Yasukawa, M., Ohminami, H., Kakimoto, M., Hasegawa, A., Fujita, S. (2001) Identification of human telomerase reverse transcriptase- derived peptides that induce HLA-A-24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes, *Blood* 97, 2903-2907

Asemissen, A.M., Keilholz, U., Tenzer, S., Müller, M., Walter, S., Stevanovic, S., Schild, H., Letsch, A., Thiel, E., Rammensee, H.G., Scheibenbogen, C. (2006): Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1., *Clin. Cancer Res.* 24, 7476-7482

Attia, P., Maker, A. V., Haworth, L. R., Rogers-Freezer, L., Rosenberg, S. A. (2005) Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma, *J. Immunother.* 28, 582-592

Ayyoub, M., Migliaccion, M., Guillaume, F., Lienard, D., Cerottini, J. C., Romero, P., Levy, F., Speiser, D. E., Valmori, D. (2001) Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-

specific CD8+ T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing, *Eur. J. Immunol.* 31, 2642-2651

Banchereau, J., Palucka, A. K. (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 5, 296-306

Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392, 245-252

Banerjee, D. K., Dhodapkar, M. V., Matayeva, E., Steinman, R. M., Dhodapkar, K. M. (2006) expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients, *Blood* Vol. 108, No. 8, 2655-2661

Becker, N. (2010) Epidemiologie des Bronchialkarzinoms, *Radiologe* 8, 654-661

Begley, J., Ribas, A. (2008) Target therapies to improve tumor immunotherapy, *Clinical Cancer Research* 14, 4385-4391

Bernhardt, S. I., Gjertsen, M. K., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J. A., Meo, M., Buanes, T., Gaudernack, G. (2006) Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study, *Br. J. Cancer* 95, 1474-1482

Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. D., Morris, J. C. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer, *J. Clin. Invest.* 113, 1515-1525

Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douck, D. C., Roederer, M., Koup, R. A. (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation, *J. Immunol. Methods* 281, 65-78

Bolonaki, I., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Aggouraki, D., Konsolakis, G., Vagia, A., Christophylakis, C., Nikoloudi, I., Magganas, E., Galanis, A., Cordopatis, P., Kosmatopoulos, K., Georgoulis, V., Mavroudis, D. (2007) Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide, *J. Clin. Oncol.* 25, 2727-2734

Bonomi, P., Kim, K., Fairclough, D., Cella, D., Kugler, J., Rowinsky, E., Jiroutek, M., Johnson, D. (2000) Comparison of survival and quality of life in advanced non-small cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposid with cisplatin: results of an Eastern Cooperative Oncology Group trial, *J. Clin. Oncol.* 18, 623-631

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C, Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303, 1532-1535

Brown, V. K., Robinson, J., Stevenson, D. E. (1963) A note on the toxicity and solvent properties of dimethyl sulphoxide, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 15, 688-692

Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B. (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by iso-antibody and by drugs, *Immunology* 14, 181-196

Brunsvig, P. F., Aamdal, S., Gjertsen, M. K., Kvalheim, G., Markowski-Grimrud, C. J., Sve, I., Dyrhaug, M., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J. A., Gaudernack, G. (2006) Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1553-1564

Castellino, F., Germain, R. N. (2006) Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where and how, *Annual Review of Immunology* Vol. 24, 519-540

Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S., Strominger, J. L. (1993) Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles, *J. Exp. Med.* 178, 27-47

Cortez-Gonzalez, X., Zanetti, M. (2007) Telomerase immunity from bench to bedside: round one, *J. Transl. Med* 5, 12

Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi, O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2006) Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT, *Int. Immunol.* 18, 1707-1718

De Vries, I. J., Krooshoop, D. J., Scharenborg, N. M., Lesterhuis, W.J., Diepstra, J.H., Van Muijen, G.N., Strijk, S.P., Ruers, T.J., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Aderna, G.J., Punt, C.J., Figdor, C.G. (2003) Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients determined by their maturation state, *Cancer Res.* 63, 12-17

Dimeo, F., Fetscher, S., Lange, W., Mertelsmann, R., Keul, J. (1997) Effects of aerobic exercise on the physical performance and incidence of treatment-related complication after high-dose chemotherapy, *Blood* 90 (9), 3390-3394

Domcheck, S. M., Fox, K. M., Recio, A., Schuchter, L. M., Davidson, R., Demichele, A., Mick, R., Feldman, M., Vonderheide, R. H. (2006) Immunological and clinical outcomes following telomerase peptide vaccination in patients with metastatic breast cancer, *Proc. AACR* 4003a

Domchek, S. M., Recio, A., Mick, R., Clark, C. E., Carpenter, E. I., Fox, K. R., DeMichele, A., Schuchter, L. M., Leibowitz, M. S., Wexel, M. H., Vance, B. A., Beatty, G. I., Veloso, E., Feldman, M. D., Vonderheide, R. H. (2007) Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance, *Cancer Res.* 67, 10546-10555

Drake, C. G., Jaffee, E., Pardoll, D. M. (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors, *Adv. Immunol.* 90, 51-81

Fabre, E., Medioni, J., Dosset, M., Tartour, E., Oudard, S., Riquet, M., Adotevi, O. (2009) T-lymphocyte responses to the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), *J. Clin. Onc., ASCO Annual Meeting* Vol 27, Abstract 3061

Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., Melief, C. J. M. (2004) Dendritic cell immunotherapy: mapping the way, *Nature Medicine* 10, 475-480

Filaci, G., Fravega, M., Setti, M., Traverso, P., Millo, E., Fenoglio, D., Negriri, S., Ferrera, F., Romagnoli, A., Basso, M., Contini, P., Rizzi, M., Ghio, M., Benatti, U., Damonte, G., Ravetti, J. L., Carmignani, G., Zanetti, M., Indiveri, F. (2006) Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in cancer patients, *Blood* 107, 1505-1512

Gannage, M., Abel, M., Michallet, A. S., Delluc, S., Lambert, M., Giraudier, S., Kratzer, R., Niedermann, G., Saveanu, L., Guilhot, F., Camoin, L., Varet, B., Buzyn, A., Caillat-Zucman, S.

(2005) Ex vivo characterization of multiepitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy, *J. Immunol.* 174, 8210-8218

Garcia-Pineros, A. J., Hildesheim, A., Williams, M., Trivett, M., Strobl, S., Pinto, L. A. (2006) DNase treatment following thawing of cryopreserved PBMC is a procedure suitable for lymphocyte functional studies, *J. of Immunol. Methods* 313, 209-213

Gilboa, E. (2007) DC-based cancer vaccines, *J. Clin. Invest.* 117, 1195-1203

Goronzy, J.J., Fulbright, J.W., Crowson, C.S., Poland, G.A., O'Fallon, W.M., Weyand, C.M. (2001) Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals, *J. Virol.* 75, 12182-12187

Hahn, W. C., Meyerson, M. (2001) Telomerase activation, cellular immortalization and cancer, *Ann. Med.* 33, 123-129

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., Weinberg, R. A. (1999) Creation of human tumor cells defined genetic elements, *Nature* 400, 464-468

Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., Weinberg, R. A. (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells, *Nat. Med.* 5, 1164-1170

Harley, C. B. (2008) Telomerase and cancer therapeutics, *Nat. Rev. Cancer* 8, 167-179

Heigener, D. F., Reck, M., Gatzemeier, U. (2007) Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom – Diagnostik und stadienadaptierte Therapie, *Medizinische Klinik* 102, 981-988

Henkart, P. A. (1997) Introduction: CTL effector functions, *Seminars in Immunology* 9, 85-86

Herbert, B., Pitts, A. E., Baker, S. I., Hamilton, S. E., Wright, W. E., Shay, J. W., Corey, D. R. (1999) Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14276-14281

Hernandez, J., Garcia-Pons, F., Lone, Y. C., Firat, H., Schmidt, J. D., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2002) Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 12275-12280

Huo, L. F. , Tang, J W., Huang, J. J., Huang, P. T., Huang, C. F., Kung, H. F., Lin, M. C. (2006) Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase, *Cell. Mol. Immunol.* 3, 1-11

Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tueting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kademir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., Enk, A. H. (2001) A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T cell responses in humans following intranodal injection, *Int. J. Cancer* 93, 243-251

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A. H. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions, *Eur. J. Immunol.* 27, 3135-3142

Kieke, M. C., Shusta, E.V., Boder, E.T., Teyton, L., Wittrup, K. D., Kranz, D. M. (1999) Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library, *PNAS* 96 (10), 5651-5656

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C.B., West, M. D., Ho, P. I., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 266, 2011-2015

Kokhaei, P., Palma, M., Hansson, L., Osterborg, A., Mellstedt, H., Choudhury, A. (2007) Telomerase (hTERT 611-626) serves as a tumor antigen in B-cell chronic lymphocytic leukemia and generates spontaneously antileukemic, cytotoxic T-cells, *Exp. Hematol.* 35, 297-304

Lev, A., Denkberg, G., Cohen, C. J., Tzukerman, M., Skorecki, K. I., Chames, P., Hoogenboom, H. R., Reiter, Y. (2002) Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T-cell epitopes of the telomerase catalytic subunit, *Cancer Res.* 62, 3184-3194

Liu, J. P., Chen, W., Schwarzer, A. P., Li, H. (2010) Telomerase in cancer immunotherapy, *Biochim. Biophys. Acta.*, 35-42

Lopez-Bravo, M., Ardavin, C. (2008) In vitro induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells, *Immunity.* 29, 343-351

Lutsiak, M. E. C., Semnani, R. T., De Pascalis, R., Kashmiri, S. V. S., Schlom, J. Sabzevari, H. (2005) Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide, *Blood* 105, 2862-2868

Maecker, B., Sherr, D. H., Vonderheide, R. H., von Bergwelt-Baildon, M. S., Hirano, N., Anderson, K. S., Xia, Z., Butler, M. O., Wucherpfennig, K. W., O'Hara, C., Cole, G., Kwak, S. S., Ramstedt, U., Tomlinson, A. J., Chicz, R. M., Nadler, L. M., Schultze, J. L. (2003) The shared tumor-associated antigen cytochrome P450 1B1 is recognized by specific cytotoxic T cells, *Blood* Vol. 102, 3287-3294

Maecker, B., von Bergwelt-Baildon, M. S., Anderson, K. S., Vonderheide, R. H., Anderson, K. C., Nadler, L. M., Schultze, J. L. (2005) Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumour antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients, *Clin. Exp. Immunol.* 141, 558-562

Maerten, A., Sievers, E., Albers, P., Müller, S., Franchy, C., von Ruecker, A., Strunk, H., Schild, H. H., Schmiedel, A., Sommer, T., Sauerbruch, T., Schmidt-Wolf, I. G. (2006) Telomerase-pulsed dendritic cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Ger. Med. Sci.* 4, Doc 02

Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., Ferrone, S. (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, *Adv. Immunol.* 74, 181-273

Martins, R. G. (2005) Treatment of locally advanced non-small cell lung cancer with combination of chemotherapy and radiation, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 26, 273-277.

Masutomi, K., Kaneko, S., Yasukawa, M., Arai, K., Murakami, S., Kobayashi, K. (2002) Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma, *Oncogene* Vol. 21, 5946-5950

Mavroudis, D., Bolonakis, I., Cornet, S., Myllaki, G., Kanellou, P., Kotsakis, A., Galanis, A., Nikoloudi, I., Spyropoulou, M., Menez, J., Miconnet, I., Niniraki, M., Cordopatis, P., Kosmatopoulos, K., Georgoulas, V. (2006) A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies, *Oncology* 70, 306-314

Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M., Chen, L. (2007) Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 7, 95-106

Minev, B., Hipp, J., Firat, H., Schmidt, J. D., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2000) Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4796-4801

Mittendorf, E. A., Storrer, C. E., Shriver, C. D., Ponniah, S., Peoples, G. E. (2005) Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides, *Breast Cancer Res. Treat.* 92, 85-93

Mizukoshi, E., Nakamolo, Y., Marukawa, Y., Arai, K., Yamashita, T., Tsuji, H., Kuzushima, K., Takiguchi, M., Keneko, S. (2006) Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 43, 1284-1294

Morandi, F., Chiesa, S., Bocca, P., Millo, E., Salis, A., Solari, M., Pistoia, V., Prigione, I. (2006) Tumor mRNA-transfected dendritic cells stimulate the generation of CTL that recognize neuroblastoma-associated antigens and kill tumor cells: immunotherapeutic implications, *Neoplasia* Vol. 8, 833-842

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2011) Gene: TERT telomerase reverse transcriptase ID 7015

Parkhurst, M. R., Riley, J. P., Igarashi, T., Li, Y., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A. (2004) Immunization peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase, *Clin. Cancer Res.* 10, 4688-4698

Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., Anichini, A. (2002) Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?, *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 805-818

Prigione, I., Corrias, M. V., Airolidi, I., Raffaghello, L. Moraldi, F. Bocca, P., Cocco, C., Ferrone, S., Pistoia, V. (2004) Immunogenicity of human neuroblastoma, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 69-80

Ribas, A. (2006) Update on immunotherapy for melanoma, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 4, 687-694

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Restifo, N. P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines, *Nat. Med.* 10, 909-915

Santarpia, M., Altavilla, G., Salazar, M. F., Magri, I., Pettineo, G., Benecchi, S., Rosell, R. (2011) Tyrosine kinase inhibitors for non-small-cell lung cancer: finding patients who will be responsive, *Expert. Rev. Respir. Med.* 5, 413-424

Santegoets, S. J. A. M., Schreurs, M. W. J., Masterson, A. J., Liu, Y. P., Goletz, S., Baumeister, H., Kueter, E. W. M., Lougheed, S. M., van den Eertwegh, A. J. M., Scheper, R. J., Hooijberg, E., de Gruijl, T. D. (2006) In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line, *Canc. Immunol. Immunother* Vol. 55, 1480-1490

Satthaporn, S., Aloysius, M. M., Robins, R. A., Verma, C., Chuthapisith, S., Mc Kechnie, A., J., El-Sheemy, M., Vassanasiri, W., Valerio, D., Clark, D., Jibril, J. A., Eremin, O. (2008) Ex vivo recovery and activation of dysfunctional, anergic, monocyte-derived dendritic cells from patients with operable breast cancer: critical role of IFN-alpha, *BMC Immunol.* 9, 32

Scardino, A., Gross, D. A., Alves, P., Schultze, J. L., Graff-Dubois, S., Faure, O., Tourdot, S., Chouaib, S., Nadler, L. M., Lemonnier, F. A., Vonderheide R. H., Cardoso, A. A.,

Kosmatopoulos, K. (2002) HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy, *J. Immunol.* 168, 5900-5906

Schmidt, J., Ryschich, E., Sievers, E., Schmidt-Wolf, I.G.H., Büchler, M.W., Märten, A. (2006): Telomerase-specific T-cells kill pancreatic tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer* 106, 759-764

Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B. H., Rush, C., Brewer, J. M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., Rudd, C.E. (2006) Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4, *Science* 313, 1972-1975

Schreurs, M. W., Kueter, E. W., Scholten, K. B., Kramer, D., Meijer, C. J., Hoojberg, E. (2005) Identification of a potential human telomerase reverse transcriptase-derived, HLA-A1-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope, *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 703-712

Schroers, R., Huang, X. F., Hammer, J., Zhang, J., Chen, S. Y. (2002) Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells, *Cancer Res.* 62, 2600-2605

Schroers, R., Shen, L., Rollins, L., Rooney, C. M., Slawin, K., Sonderstrup, G., Huang, X. F., Chen, S. Y. (2003) Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes, *Clin. Cancer Res.* 9, 4743-4755

Sharma, S., Dominguez, A. L., Lustgarten, J. (2006) High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals, *J Immunol* 177, 8348-8355

Shay, J. W., Wright, W. E. (2002) Telomerase: a target for cancer therapeutics, *Cancer Cell* Vol. 2, 257-265

Shay, J. W., Wright, W. E. (2006) Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 577-584

Sheng, K. C., Pietersz, G. A., Wright, M. D., Apostolopoulos, V. (2005) Dendritic cells: activation and maturation—applications for cancer immunotherapy, *Curr. Med. Chem.* 12, 1783-1800

Steinmann, R. M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296

Su, Z., Dannull, J., Yang, B. K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E., Vieweg, J. (2005) Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer, *J. Immunol.* 174, 3798-3807

Su, Z., Vieweg, J., Weizer, A. Z., Dahm, P., Yancey, D., Turaga, V., Higgins, J., Boczkowski, D., Gilboa, E., Dannull, J. (2002) Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product, *Canc. Res.* 62, 5041-5048

Thorn, M., Wang, M., Klopper, H., Schmidt, E. G., Fomsgaard, A., Wenandy, L., Berntsen, A., Brunak, S., Buus, S., Cleasson, M. H. (2007) Identification of a new hTERT-derived HLA-A*0201 restricted, naturally processed CTL epitope, *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1755-1763

Turner, B., Röder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kämpgen, E., Bender, A., Schuler, G. (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application, *J. Immunol. Methods* 223, 1-15

Trzonkowski, P., Szmit, E., Myliwski, J., Myliwski, A. (2006) CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence, *Clinical Immunology* 119, 307-316

Van der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stoobant, V., Panichelli, C., Schultz, E.S., Chapiro, J., Van den Eynde, B.J., Brasseur, F., Boon, T. (2002): Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells, *Immunol. Rev.* 188, 51-64

Vonderheide, R. H. (2002) Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy, *Oncogene* 21, 674-679

Vonderheide, R. H. (2008) Prospects and challenges of building a cancer vaccine targeting telomerase, *Biochimie* 90, 173-180

Vonderheide, R. H., Anderson, K. S., Hahn, W. C., Butler, M. O., Schultze, J. L., Nadler, L. M. (2001) Characterization of HLA- A3- restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase, *Clin. Cancer Res.* 7, 3343-3348

Vonderheide, R. H., Domcheck, S. M., Schultze, J. L., George, D. J., Hoar, K. M., Chen, D. Y., Stephans, K. F., Masutomi, K., Loda, M., Xia, Z., Anderson, K. S., Hahn, W. C., Nadler, L. M. (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes, *Clin. Cancer Res.* 10, 828-839

Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., Nadler, L. M. (1999) The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes, *Immunity* 10, 673-679

Vonderheide, R. H., Schultze, J. L., Anderson, K. S., Maecker, B., Butler, M. O., Xia, Z., Kuroda, M. J., von Bergwerlt-Baildon, M. S., Bedor, M. M., Hoar, K. M., Schnipper, D. R., Brooks, M. W., Letvin, N. L., Stephans, K. F., Wucherpennig, K. W., Hahn, W. C., Nadler, L. M. (2001) Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals, *Canc. Res.* 61, 8366-8370

Wehler, T.C., Karg, M., Distler, E., Konur, A., Nonn, M., Meyer, R.G., Huber, C., Hartwig, U.F., Herr, W. (2008) Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4+ and CD8+ T cells based on antigen-triggered CD137 expression, *J. Immunol. Methods* 339, 23-37

Wenandy, L., Sorensen, R. B., Sengelov, L., Svane, I. M., thor Straten, P., Andersen, M. H. (2008) The immunogenicity of the hTERT 540-548 peptide in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14, 4-7

Wofl, M., Kuball, J., Ho, W.Y., Nguyen, H., Manley, T., Bleakley, M., Greenberg, P.D. (2007) Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities, *Blood* 110, 201-210

Xu, S., Koldovsky, U., Xu, M., Wang, D., Fitzpatrick, E., Son, G., Koski, G., Czerniecki, B. J. (2006) High-avidity antitumor t-cell generation by toll receptor 8-primed, myeloid-derived dendritic cells is mediated by IL-12 production, *Surgery*. 140, 170-178

Xu, S., Koski, G.K., Faries, M., Bedrosian, I., Mick, R., Maeurer, M., Cheever, M.A., Cohen, P.A., Czerniecki, B.J. (2003) Rapid high efficiency sensitization of CD8+ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism, *J. Immunol.* 171, 2251-2261

Zhou, G., Ding, Z.-C., Fu, J., Levitsky H. I. (2011) Presentation of acquired peptide-MHC class II ligands by CD4+ regulatory T cells or helper cells differentially regulates antigen-specific CD4+ T cell response, *J. Immunol.* 186, 2148-2155

7. Veröffentlichung

Gahn, B., Woester, K., Wellnitz, D., Staudinger, M., Boettcher, S., Gramatzki, M., Kneba, M.; Department of Medicine, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; Section of Stem Cell Transplantation and Immunotherapy, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (2010) Improved activation of specific T-lymphocyte responses to the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), J. Clin. Oncol. 28, Abstract No: e13114

8. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei dem Leiter des wissenschaftlichen Labors der II. Medizinischen Klinik Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba bedanken, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer PD Dr. Benedikt Gahn, dem von der ersten Stunde an kein Weg zu weit und keine fachliche Erläuterung auch noch so komplexer Fragestellungen zu viel gewesen ist. Der mir während der Laborarbeit bis zum Niederschreiben der Ergebnisse immer und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ausgesprochener Dank gilt den NSCLC-Patienten, die sich mit Blutspenden für die Studie zur Verfügung gestellt haben und erst dadurch das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichten.

Ich danke ebenso Dr. Matthias Staudinger für die Einarbeitung in die wissenschaftlichen Labortätigkeiten und die unerschöpfliche Geduld und Bereitschaft auf Fragen einzugehen.

Ein Dank gilt auch Dr. Sebastian Böttcher für die Hilfe bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse sowie seinen Assistentinnen, die mich in den anfänglichen Schwierigkeiten bei der Durchführung von Messungen an dem Durchflusszytometer unterstützten.

Nicht versäumen will ich, mich bei den Medizinisch Technischen Assistenten des Mildred-Scheel-Hauses und des wissenschaftlichen Labors des II. Medizinischen Klinik für die organisatorischen Hilfen und die moralische Unterstützung zu bedanken, vor allem bei der Labormedizinerin Dr. Anja Knorr-Spahr.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern ohne die mein Studium und das Promovieren nicht möglich gewesen wären. Zusammen mit meiner Schwester und meinen Freunden standen sie mir in jeder Hinsicht zur Seite.

