

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

**AKTIVIERUNG hTERT-SPEZIFISCHER T-LYMPHOZYTEN MIT  
ZYTOKIN- ODER LIGANDENGEREIFTEN DENDRITISCHEN ZELLEN  
BEI GESUNDEN PROBANDEN UND PATIENTEN MIT  
NICHT-KLEINZELIGEM LUNGENKARZINOM**

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

vorgelegt von  
**KATRIN WÖSTER**  
aus Eckernförde

Kiel, im Jahre 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. Gahn, Klinik für Innere Medizin II mit den  
Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dohrmann, Klinik für Allgemeine  
Chirurgie und Thoraxchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2013

zum Druck genehmigt, Kiel, den 26. Juni 2013

gez.: Prof. Dr. Dr. Kneba

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Klinische Bedeutung der zellulären Immuntherapie beim Lungenkarzinom	1
1.2	Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen	1
1.3	In vitro Aktivierung von T-Lymphozyten	2
1.4	Die antigene Funktion des Enzyms <i>Humane Telomerase Reverse Transkriptase</i>	4
1.5	Aufgabenstellung	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Patienten und gesunde Probanden	7
2.2	Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	7
2.3	Gewinnung dendritischer Zellen	8
2.4	Kryokonservierung von Zellen	8
2.5	Beladung dendritischer Zellen mit CMV-Antigen	9
2.6	Beladung dendritischer Zellen mit hTERT-Peptiden	9
2.7	Ausreifung dendritischer Zellen mit Zytokinen oder Liganden	12
2.8	Depletion regulatorischer T-Lymphozyten	12
2.9	Aktivierung CMV- bzw. hTERT-spezifischer T-Lymphozyten	13
2.10	Durchflusszytometrie	15
2.11	Kompensation und Isotyp-Kontrollen	17
2.12	Untersuchung der Ausreifung dendritischer Zellen	18
2.13	FACS-Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten	18
2.14	Messung der intrazellulären IFN- $\gamma$ -Produktion	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten	21
3.1.1	Proband I	21
3.1.2	Proband II	22
3.2	Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten	23
3.3	Proband IV: Optimierung der hTERT-Peptidmenge zum Beladen dendritischer Zellen	26

3.4	Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten mit zytokin- bzw. ligandengereiften DC bei gesunden Probanden	27
3.4.1	Proband III	27
3.4.2	Proband V	31
3.5	Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten mit zytokin- bzw. ligandengereiften DC bei Patienten mit NSCLC	34
3.5.1	Patient A	34
3.5.2	Patient B	37
3.5.3	Patient C	39
3.5.4	Patient D	42
3.5.5	Patient E	45
3.5.6	Zusammenfassung der Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bei Patienten mit NSCLC	47
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1	Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten	48
4.2	Depletion regulatorischer T-Lymphozyten	49
4.3	Optimierung der hTERT-Peptidmenge zum Beladen der DC	49
4.4	Vergleich von Zytokin- und Ligandenreifung der DC	50
4.5	Relevanz der SEB-Kontrolle	51
4.6	Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten	52
4.7	Anwendungsmöglichkeiten der verbesserten Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten	55
4.8	Autoimmunität	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>66</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	66
7.2	Verzeichnis der Oberflächenantigene	67
7.3	Zustimmung der Ethikkommission	68
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>71</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Klinische Bedeutung der zellulären Immuntherapie beim Lungenkarzinom**

Jährlich erkranken weltweit über eine Million Menschen am Lungenkarzinom, es ist der Tumor mit der höchsten Mortalität (Parkin et al., 2002). Das Lungenkarzinom wird unterteilt in das kleinzellige (SCLC) und das nicht-kleinzellige (NSCLC). Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom unterscheidet sich die Therapie und die Prognose in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Im Stadium I wird eine potentiell kurative Operation und im Stadium II eine Operation mit adjuvanter Chemotherapie angestrebt. Im Stadium IIIA hängt das Vorgehen von der Lokalisation der befallenen Lymphknoten ab, Therapiemöglichkeiten bestehen in neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie, Operation und Radiatio. Die Therapie im Stadium IIIB und IV ist auf einen palliativen Anspruch begrenzt (Heigener et al., 2007).

Einen innovativen Therapieansatz bieten T-Lymphozyten, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch gegen antigene Strukturen der malignen Zellen gerichtet ist. Vakzinierungsstudien, in denen dieser Mechanismus genutzt wird, zeigen einen deutlichen Trend zur Verlängerung der Überlebenszeit bei den Patienten, die eine tumorspezifische T-Zell-Antwort aktivieren können. Allerdings ist die Zahl der Patienten, die eine solche T-Zellantwort aktivieren, begrenzt (Brunsvig et al., 2006; Bolonaki et al., 2007).

### **1.2 Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen**

Ein wichtiges Element im Prozess der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten ist die Präsentation des Antigens an die T-Zellen. Zu den potentesten antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Körpers gehören die dendritischen Zellen (DC). Diese sind große, granulierte Zellen, deren Morphologie von einer Vielzahl baumartig verzweigter Zytoplasmaausläufer geprägt ist. An den Ausläufern werden den T-Lymphozyten Antigene, gebunden an HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle, präsentiert. Die DC stammen von myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab, die sich zu monozytären Zellen entwickeln und schließlich als unreife DC ins Gewebe einwandern. Dort nehmen sie Antigene auf, reifen durch einen pathogenen Stimulus aus und wandern in lymphatische Gewebe, z.B. Lymphknoten, wo sie naiven T-Lymphozyten die prozessierten Antigene präsentieren. T-Zellen, die

lymphatisches Gewebe durchwandern, binden über Adhäsionsmoleküle an die DC. Wenn ihr T-Zell-Rezeptor mit einem der HLA-Peptid-Komplexe kompatibel ist, verstärkt sich die Bindung und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 aktivieren die T-Zelle. Dies wiederum bewirkt auf dem T-Lymphozyten die Expression weiterer Proteine, die das kostimulatorische Signal erhalten oder modifizieren. Dadurch wird klonale Vermehrung und Differenzierung zu Effektorzellen auslöst.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren reife DC notwendig, die immunogene Aminosäuresequenzen des Telomerase-Proteins präsentieren und damit T-Lymphozyten aktivieren konnten. Dafür wurden Monozyten aus dem peripheren Blut gewonnen und zu unreifen DC kultiviert (Romani et al., 1994). Diese unreifen DC wurden mit den Peptiden des Tumorantigens *humane Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT) beladen und ausgereift. Es gibt verschiedene Methoden, um in vitro eine Ausreifung der DC zu bewirken. Ihnen gemeinsam ist, dass sie den Stimulus durch ein Pathogen, das in vivo zur Ausreifung führt, imitieren. Zum einen können die unreifen DC für einen Tag in einem Cocktail aus den proinflammatorischen Zytokinen Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) kultiviert werden (Jonuleit et al., 1997). Eine zweite Möglichkeit besteht darin, als Reifungsstimulus Liganden der Toll-like Rezeptoren 7 und 8 (TLR-7/8) und des CD40-Oberflächenmoleküls zu den DC hinzu zu geben (Xu et al., 2006). Die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 erkennen in vivo Einzelstrang-DNA. Durch Bindung eines Liganden wird in den DC die Bildung von Zytokinen und Chemokinen angeregt und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 werden exprimiert. Der CD40-Ligand ist ein Molekül, das sich normalerweise auf aktivierten T-Zellen befindet und ebenfalls die Expression von CD80 und CD86 anregt.

### **1.3 In vitro Aktivierung von T-Lymphozyten**

Naive T-Lymphozyten, deren Antigen nicht präsentiert wird, können viele Jahre existieren ohne sich zu teilen. Wenn ihnen jedoch ein auf ihren T-Zell-Rezeptor passendes Antigen auf DC präsentiert wird und sie durch kostimulatorische Signale aktiviert werden, proliferieren sie und die Tochterzellen nehmen ihre Funktion als Effektorzellen wahr. Die Proliferation und Differenzierung wird autokrin durch das

Zytokin Interleukin-2 (IL-2) gesteuert (Smith, 1984). Dieses wird von aktivierten Zellen gebildet und sezerniert. Da ruhende T-Lymphozyten einen IL-2-Rezeptor mit sehr niedriger Affinität exprimieren, reagieren sie nicht auf IL-2 in geringer Konzentration, wohl aber aktivierte T-Zellen, deren IL-2-Rezeptor eine höhere Affinität hat (Cerdan et al., 1995). Die höhere Affinität wird durch die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) bewirkt, die nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. So proliferieren besonders Zellen, deren T-Zell-Rezeptor auf das präsentierte Antigen passt.

Nach vier bis fünf Tagen ist die Entwicklung der Effektorzellen abgeschlossen.  $CD4^+$  Zellen differenzieren entweder zu T-Helfer-1-Zellen ( $T_H-1$ ) oder zu T-Helfer-2-Zellen ( $T_H-2$ ). Erstgenannte bewirken eine überwiegend zellvermittelte Immunantwort, während letztgenannte eine humorale Immunität hervorrufen.  $CD8^+$  Zellen differenzieren zu zytotoxischen Zellen, die mit Hilfe lytischer Granula Zielzellen zerstören. Wenn ihr T-Zell-Rezeptor das passende Antigen erkennt, wird der Inhalt der Granula ausgeschüttet und die Zelle, die das Antigen auf der Oberfläche trägt, wird lysiert. Ein weiterer Vorgang, der durch die Antigenpräsentation auf DC ausgelöst wird, ist die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Dazu sind sowohl CTL als auch  $T_H-1$ -Zellen fähig. Die Produktion von IFN- $\gamma$  von aktivierten T-Lymphozyten ist durchflusszytometrisch nachweisbar (Andersson et al., 1988; Andersson et al., 1990). Eine Aktivierung von T-Lymphozyten gegen körpereigene Antigene, z.B. Tumorantigene, ist schwieriger als eine Aktivierung gegen ein virales Fremdanigen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der IFN- $\gamma$ -Nachweis zunächst mit dem pp65-Antigen des Zytomegalievirus (CMV) etabliert.

Superantigene wie Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) können eine große Anzahl T-Lymphozyten polyklonal aktivieren (Greaves et al., 1974). Sie verbinden T-Zellrezeptoren mit MHC-Klasse-II-Molekülen unter Umgehung der spezifischen Peptid-Bindungsstellen (White et al., 1989). Diese Eigenschaft kann für die Positivkontrolle der IFN- $\gamma$ -Färbung genutzt werden.

Eine weitere Population ist die der regulatorischen T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ), die die Oberflächenmarker CD4 und CD25 tragen. Die Aufgabe dieser Zellen besteht darin, Toleranz gegen Selbst-Antigene zu erhalten, indem sie T-Zellen deletieren, deren T-Zell-Rezeptor auf körpereigene Antigene passt. In malignem Lungengewebe finden sich diese Zellen in größerer Zahl als in gesundem (Woo et al., 2002; Esendagli et al., 2008). T-Lymphozyten aus malignem Lungengewebe exprimieren vermindert die

$\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors und zeigen ex vivo nur eine geringe Proliferation und Zytokinproduktion. Als Ursache dafür wird die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine wie Transforming Growth Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) durch die regulatorischen T-Zellen diskutiert (Woo et al., 2001).

#### **1.4 Die antigene Funktion des Enzyms *Humane Telomerase Reverse Transkriptase***

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, das sich aus der Proteinstruktur Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und einer RNA-Vorlage zusammensetzt (Greider et al., 1987). Bei jeder Zellteilung werden die Chromosomen verkürzt, was zu Zellalterung und schließlich zur Apoptose, dem geregelten Zelltod, führt. Die Telomerase verhindert diesen Prozess. Die humane Telomerase Reverse Transkriptase, hTERT, synthetisiert nach der Replikation der DNA auf der Grundlage der RNA-Vorlage DNA-Sequenzen mit der sich wiederholenden Sequenz TTAGGG (Podlevsky et al., 2007). Diese wird an die 3'-Enden der Chromosomenstränge angefügt.

hTERT wird nur von wenigen Zellen des Menschen physiologisch exprimiert, Telomeraseaktivität wurde nur in langlebigen oder stark proliferativen Zellen, zum Beispiel in hämatopoetischen und epithelialen Vorläuferzellen und Keimzellen in Hoden und Ovar, nachgewiesen (Kim et al., 1994; Uchida et al., 1999; Tahara et al., 1999). Anders verhält es sich bei malignen Tumoren. Mehr als 85 % der Karzinomzellen exprimieren hTERT (Kim et al., 1994). Dadurch ist ein unbegrenztes, exponentielles Wachstum dieser Zellen möglich. Mutiert die Telomerase jedoch oder wird sie gehemmt, unterliegen vorher immortale Tumorzellen nach mehreren Teilungen der Apoptose (Hahn et al., 1999; Herbert et al., 1999). Auch von Zellen des NSCLC wird hTERT exprimiert. Kumaki et al. fanden in 93 % der untersuchten Tumorzellen eine erhöhte Telomeraseaktivität, Fujita et al. fanden hTERT-mRNA im Zytoplasma von 100 % der untersuchten NSCLC-Proben, nicht jedoch im restlichen, gesunden Lungengewebe (Kumaki et al., 2001; Fujita et al., 2003).

Kernhaltige Zellen präsentieren Teile der von ihnen gebildeten Proteine als Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren, gebunden an HLA-Klasse-I-Moleküle, auf ihrer Oberfläche. Diese HLA-Peptid-Komplexe können von peptidspezifischen



zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden und eine spezifische Aktivierung von CTL hervorrufen.

Bisher sind mehr als 20 HLA-bindende hTERT-Peptide bekannt (Vonderheide, 2008). Damit ist hTERT eine potentielle Zielstruktur für eine zelluläre Immuntherapie des NSCLC. Sechs HLA-bindende hTERT-Peptide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Peptide p540, p865 und p988 werden auf der Zelloberfläche an HLA-A2 (Klasse I) gebunden exprimiert, p461 an HLA-A24 (Klasse I) und p672 und p766 an verschiedene HLA-DR-Moleküle (Klasse II). p540 war das erste immunogene Antigen der humanen Telomerase, das intensiv untersucht wurde. Vonderheide et al. gelang es, in vitro CTL gegen dieses Peptid zu aktivieren, die HLA-A2<sup>+</sup> Zelllinien mit Telomeraseaktivität lysierten. Zelllinien ohne Telomeraseaktivität oder ohne HLA-A2 konnten nicht durch die CTL zerstört werden (Vonderheide et al., 2001).

Weniger immunogen als p540 scheint das Peptid p865 zu sein. Während p540 bei neun von zehn gesunden Probanden und bei drei von vier Patienten mit Prostatakarzinom eine CTL-Antwort in vitro und Lyse hervorrufen konnte, gelang dies mit p865 nur bei sieben von zehn gesunden Probanden. Auch im Mausmodell rief p540 eine stärkere Immunantwort als p865 hervor (Minev et al., 2000).

p988 wurde als niedrig-affin an HLA-A2 bindendes Epitop charakterisiert und konnte bei Ersatz der ersten Aminosäure Asparaginsäure durch Tyrosin eine starke Immunantwort hervorrufen. CTL gegen dieses Peptid, generiert in der HLA-A\*0201 transgenen Maus, erkannten endogenes Telomeraseprotein der Maus und verlängerten signifikant die Lebenszeit der tumortragenden Mäuse (Gross et al., 2004).

In einer Studie von Arai et al. konnte die hTERT-Peptidsequenz p461 identifiziert werden. Es gelang bei zwei gesunden Probanden, in vitro CTL gegen p461 zu aktivieren. Diese CTL lysierten HLA-A24<sup>+</sup>, hTERT<sup>+</sup> Leukämiezellen (Arai et al., 2001).

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) exprimieren nach Endozytose und Prozessierung von Telomerase-positiven Zellen auch längere hTERT-Peptidfragmente auf ihrer Oberfläche, gebunden an HLA-Klasse-II-Moleküle. Diese Peptide können auch von T-Helfer-Zellen erkannt werden. Auf der Suche nach antigenen hTERT-Epitopen, die an HLA-Klasse-II-Moleküle binden, gelang es Schroers et al., zwei Epitope zu identifizieren, die auf mehreren HLA-DR-Molekülen präsentiert werden können. Es handelte sich dabei um p766, das an HLA-DR-4, -11, und -15 bindet, und p672, das an HLA-DR-1, -7 und -15 bindet. Beide Peptide waren

in der Lage, spezifische T-Zell-Aktivierung hervorzurufen (Schroers et al., 2002, Schroers et al., 2003). Die Möglichkeit der Bindung an verschiedene HLA-DR-Moleküle erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen eines Patienten das Peptid präsentieren können.

### **1.5 Aufgabenstellung**

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Lymphozyten in vitro hTERT-spezifisch aktiviert. Dafür wurden die T-Lymphozyten nach Depletion der regulatorischen T-Zellen mehrmals mit reifen, peptidbeladenen DC stimuliert. Die Ausreifung der DC erfolgte entweder durch Zugabe der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1- $\beta$  und PGE<sub>2</sub> oder durch einen Agonisten der Oberflächenmoleküle TLR 7 und 8 sowie CD40-Ligand. Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, welche DC – mit Zytokincocktail oder Liganden ausgereift – einen stärkeren Stimulus zur Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten bieten. Als Nachweis für die Aktivierung wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung gemessen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und gesunde Probanden

Die Untersuchungen wurden mit Zellen fünf gesunder Spender sowie fünf männlicher Patienten mit NSCLC durchgeführt (Tabelle 1). Der HLA-Typ der Probanden I bis V wurde im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bestimmt (Tabelle 3). Ebenso wurde der CMV-Status der Probanden I und II untersucht. Beide gesunden Spender waren CMV<sup>+</sup>. Das HLA-Muster sowohl der Klasse I als auch der Klasse II der Patienten wurde vom Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bestimmt (Tabelle 3).

Pat	Alter	Tumorstadium	Vorthherapie
A	68 J	IV T2 N2 M1	08-09/2009: Carboplatin/Docetaxel
B	60 J	IIIB T4 N3 M0	2/2009-3/2009: Carboplatin/Paclitaxel
C	55 J	IIB T3 N0 M0	Bilobektomie und Lymphadenektomie 04-10/2008: Carboplatin/Vinorelbine
D	74 J	IV T2 N2 M1	10/2007-02/2008: Carboplatin/Paclitaxel 08-12/2008: Erlotinib
E	73 J	mind. IIIA T3 N2 MX	09-11/2009: Carboplatin/Docetaxel

**Tabelle 1: Alter, Tumorstadium und Therapie der untersuchten Patienten**

### 2.2 Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripherem Blut

Zur Gewinnung monozytärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) der Patienten wurde periphervenöses Blut in Heparin-Röhrchen entnommen und unter einer sterilen Werkbank (Hera safe, Heraeus) im Verhältnis 1:1 (1 Teil Blut, 1 Teil PBS) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Gibco, Invitrogen) verdünnt. Leukozyten-Konzentrate von gesunden Spendern wurden im Verhältnis 1:2 (1 Teil Konzentrat, 2 Teile PBS) verdünnt. Je 25 ml der Verdünnung wurde im 50 ml-*Falcon*-Reagenzröhrchen (Sarstedt) über 20 ml Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB) geschichtet und mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 850 g für 20 Minuten (Multifuge 3 S-R, Heraeus) aufgetrennt (Noble et al., 1967). Der monozytäre Interphasering zwischen Plasma und Ficoll-Paque wurde mit einer sterilen Pipette

abgesaugt und in einem Reagenzröhrchen gesammelt (Abbildung 1). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dafür wurden die Zellen für 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Reagenzröhrchen mit PBS aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand klar und damit frei von Plasma, Ficoll-Paque und Thrombozyten war.

### **2.3 Gewinnung dendritischer Zellen**

Die gewonnenen PBMC wurden an Tag 1 gezählt und anschließend mittels Plastikadhärenz separiert. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^7$  bis  $2 \times 10^8$  Zellen in 10 ml CellGro<sup>®</sup>DC (CellGenix) aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (250 ml, BD Bioscience) für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heracell 240, Heraeus) inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden dann durch dreimaliges vorsichtiges Abwaschen entfernt, die regulatorischen T-Lymphozyten wurden depletiert und die verbleibenden Zellen kryokonserviert. Zur Gewinnung unreifer DC wurden die adhärenenten Zellen für fünf Tage in 10 ml CellGro<sup>®</sup>DC mit 800 IE/ml GM-CSF (R&D Systems) und 500 IE/ml IL-4 (R&D Systems) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (Abbildung 1). Ein Mediaumaustausch mit frischem CellGro<sup>®</sup>DC, GM-CSF und IL-4 wurde an Tag 3 und 5 vorgenommen. Dafür wurden die Zellen im alten Medium in ein 15 ml-*Falcon*-Reagenzröhrchen (Sarstedt) hinein gefüllt, die Zellen für 5 Minuten bei 550 g auf den Boden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium suspendiert. Die Suspension wurde zurück in die Zellkulturflasche gegeben.

### **2.4 Kryokonservierung von Zellen**

Wenn DC oder T-Lymphozyten nicht sofort verwendet werden konnten und über einen längeren Zeitraum konserviert werden mussten, wurden diese eingefroren und konnten zu einem gewünschten Zeitpunkt aufgetaut und erneut in Kultur genommen werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen gezählt und maximal  $10^7$  Zellen in 1 ml Einfriermedium suspendiert. 10 ml Einfriermedium setzte sich zusammen aus 5 ml RPMI (Gibco, Invitrogen), 4 ml Humanem Serum Albumin (20%, Baxter) und 1 ml DMSO. In einem 1 ml fassenden Kryoröhrchen (Nunc) wurde die Zellsuspension in

einem Kryocontainer (Nalgene) um 1 °C pro Minute auf -80 °C gekühlt und nach mindestens 48 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen in 10 ml PBS mit Zimmertemperatur gelöst, 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand zügig abgenommen. Anschließend wurde mit 5 ml RPMI oder CellGro<sup>®</sup>DC gewaschen, danach erneut 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde dann in dem zur Kultivierung erforderlichen Medium gelöst.

## 2.5 Beladung dendritischer Zellen mit CMV-Antigen

Zum Beladen der DC mit CMV-Antigen wurden an Tag 6 nach Gewinnung der PBMC jeweils  $3 \times 10^6$  DC in 1 ml CellGro mit 800 IE GM-CSF und 500 IE IL-4 in eine 24-Loch-Platte (Sarstedt) aufgenommen. Hinzugegeben wurde entweder 20 µl rekombinantes humanes CMV-pp65-Protein (Miltenyi), 10 µg CMV-Peptid mit der Aminosäuresequenz NLVPMVATV (metabion) oder 10 µl PepTivator (Miltenyi), ein Mix aus überlappenden Peptiden, die das gesamte humane CMV-pp65-Protein überspannen (Tabelle 3). Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Stunden inkubiert (Abbildung 1).

## 2.6 Beladung dendritischer Zellen mit hTERT-Peptiden

Zur Beladung der DC mit Fragmenten des hTERT-Proteins an Tag 6 nach Gewinnung der PBMC wurden sechs verschiedene Peptide (metabion) verwendet (Tabelle 2).

Name	Aminosäure-Sequenz	HLA-Restriktion
p540	ILAKFLHWL	HLA-A2 (Klasse I)
p865	RLVDDFLLV	HLA-A2 (Klasse I)
p988	DLQVNSLQTV	HLA-A2 (Klasse I)
p461	VYHFVRACL	HLA-A24 (Klasse I)
p672	RPGLLGASVLGLDDI	HLA-DR1, -7, -15 (Klasse II)
p766	LTDLQPYMRQFVAHL	HLA-DR4, -11, -15 (Klasse II)

**Tabelle 2: Aminosäuresequenz und HLA-Restriktion der verwendeten hTERT-Peptide.**

Die DC der gesunden Spender III bis V wurden mit einer Dreier-Kombination, bestehend aus den drei HLA-A2-Peptiden (1.) oder dem HLA-A24- mit den beiden HLA-DR-Peptiden (2.), beladen, bei Patientenproben wurden die Peptide passend zum individuellen HLA-Typ kombiniert (Tabelle 3). Die Beladung wurde in einer 24-Loch-Platte durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden  $3 \times 10^6$  unreife DC in 1 ml CellGro mit 800 IE GM-CSF und 500 IE IL-4 aufgenommen. Hinzugefügt wurden je 30 µg Peptid (bei Patient C und D je 25 µg), gelöst in 3 µl (2,5 µl) reinem Dimethylsulfoxid (DMSO, WAK-Chemie Medical). Bei einer Kombination aus drei (Proband III-V, Patient A, B und E) bzw. vier (Patient C und D) verschiedenen Peptiden wurde also insgesamt 90 bzw. 100 µg Peptid in 9 bzw. 10 µl DMSO zu den Zellen in das Medium gegeben. Die DMSO-Konzentration lag bei maximal 1 %. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Stunden inkubiert. Bei Patient IV wurden ebenfalls  $3 \times 10^6$  unreife DC mit hTERT-Peptid-Kombinationen (Tabelle 3) beladen, allerdings wurde mit unterschiedlichen Peptidmengen beladen. Für den ersten Ansatz wurde 10 µg jeden Peptids, für den zweiten Ansatz 30 µg jeden Peptids und für den dritten Ansatz 40 µg jeden Peptids verwendet. Zu jedem Ansatz wurden drei verschiedene Peptide gegeben, sodass die DC insgesamt mit 30, 90 oder 120 µg Peptid beladen wurden.

<b>Proband/Patient</b>	<b>HLA-Typ</b>	<b>DC-Beladung</b>
Proband I	A2	1. CMV-Peptid (NLVPMVATV) 2. pp65-Protein 3. CMV-Peptidmix
Proband II	A2	1. CMV-Peptid (NLVPMVATV) 2. pp65-Protein
Proband III-V	A2, A24	1. p540 (A2), p865 (A2), p988 (A2) 2. p461 (A24), p672 (DR1, 7, 15), p766 (DR4, 11, 15)
Patient A	A24, DR7, DR15	1. p461 (A24), p672 (DR 1, 7, 15), p766 (DR 4, 11, 15)
Patient B und E	A2	1. p540 (A2), p865 (A2), p988 (A2)
Patient C	A2, DR7	1. p540 (A2), p865 (A2), p988 (A2), p672 (DR 1, 7, 15)
Patient D	A2, A24	1. p540 (A2), p865 (A2), p988 (A2), p461 (A24)

**Tabelle 3: Individuelle hTERT-Peptid-Kombination, mit der die DC der gesunden Probanden und Patienten beladen wurden.**

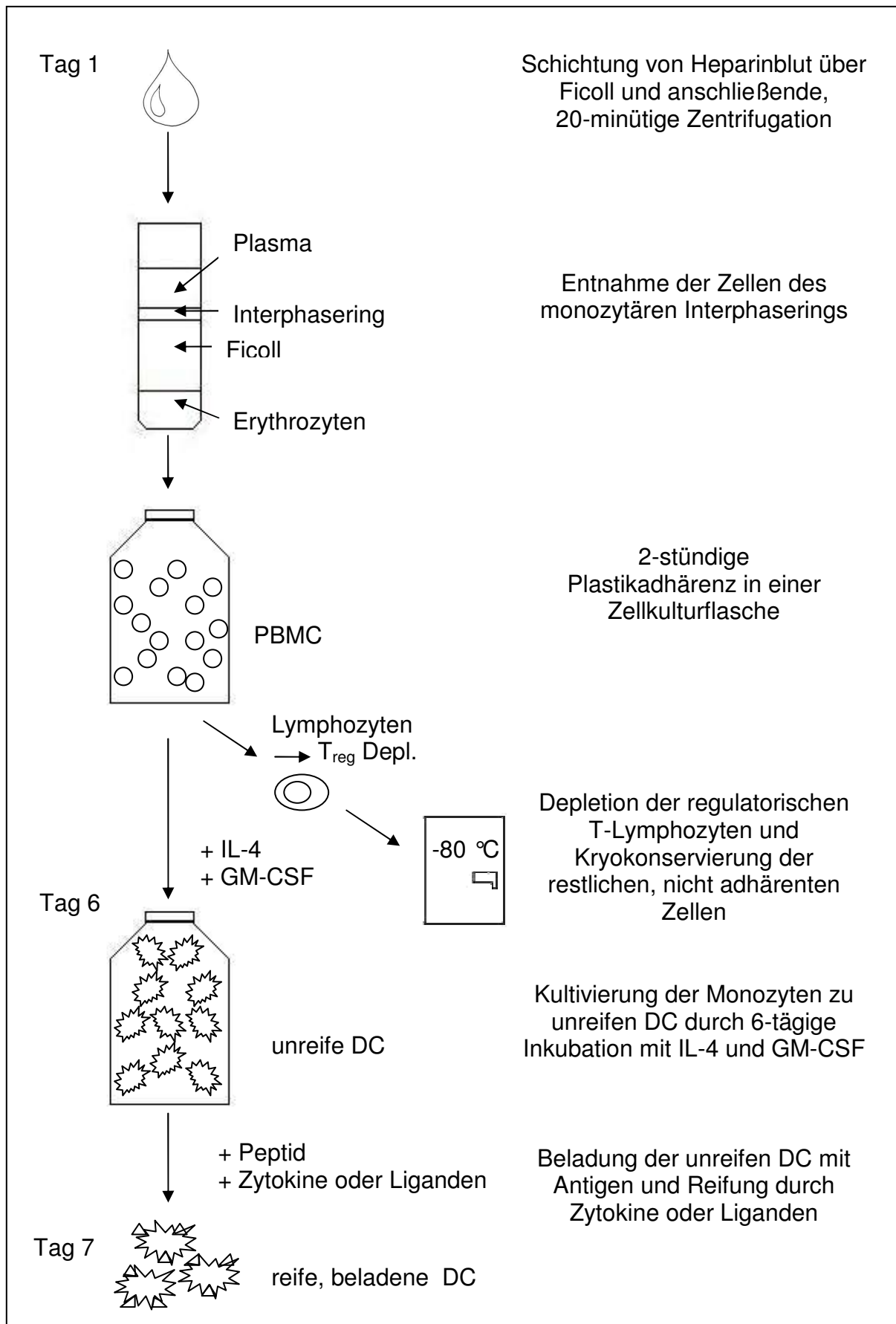


Abbildung 1: Gewinnung von reifen, peptidbeladenen, dendritischen Zellen und T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten.

## 2.7 Ausreifung dendritischer Zellen mit Zytokinen oder Liganden

Nach der Zugabe der Antigene und zweistündiger Inkubation wurden die DC ausgereift. Bei Proband I, II und IV wurde dafür der Zytokincocktail genutzt, bei Proband III, V und den Patienten A bis E wurden für einen Teil der Untersuchungen die Zytokine, für den anderen Teil der Untersuchungen die Rezeptoragonisten zum Ausreifen genutzt. Neben den beladenen, reifen DC (je  $3 \times 10^6$  DC in 1 ml Medium) für die Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten wurden auch unbeladene, reife DC für die Negativ- und die Positivkontrolle benötigt. Dafür wurden auf einer 24-Loch-Platte  $2 \times 10^6$  DC in 1 ml Medium mit 800 IE GM-CSF und 500 IE IL-4 aufgenommen. Antigen wurde nicht hinzu gegeben. Um diese Zellen auszureifen, wurde mit ihnen ebenso verfahren wie mit den beladenen DC.

Zu den DC, die mit Zytokinen ausgereift wurden, wurde TNF- $\alpha$  (1000 IE/ml, R&D Systems), IL-1 $\beta$  (2000 IE/ml, R&D Systems), IL-6 (1000 IE/ml, R&D Systems) und PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich) hinzugegeben. Darin wurden die Zellen für 22 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu den DC, die mit Liganden ausgereift wurden, wurde der TLR-7/8-Agonist CL097, ein Derivat des R848 (1  $\mu$ g/ml, InvivoGen), und zwei Stunden nach diesem der lösliche Ligand des CD40-Oberflächenmarkers, CD154 (1  $\mu$ g/ml, Miltenyi), hinzugegeben. Die Inkubationszeit nach Zugabe des CD40-Liganden betrug 20 Stunden. Nach der Ausreifung wurden jeweils  $10^6$  beladene oder unbeladene, reife DC in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, kryokonserviert und zur Stimulation der T-Lymphozyten wieder aufgetaut.

## 2.8 Depletion regulatorischer T-Lymphozyten

Nach zweistündiger Plastikadhärenz an Tag 1 der DC-Reifung waren die T-Lymphozyten ein Teil der nicht-adhärenenten PBMC. Die regulatorischen T-Lymphozyten wurden mit magnetischer Zell-Separation (MACS) depletiert. Dazu wurden je  $10^7$  Zellen in 90  $\mu$ l PBS aufgenommen und 10  $\mu$ l CD25-*Mikrobeads* (Miltenyi) hinzu gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei 5 °C wurden die nicht gebundenen *Mikrobeads* aus der Suspension heraus gewaschen. Dazu wurde 1 ml PBS zu je  $10^7$  Zellen hinzugegeben, die Zellen wurden 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert und über eine zuvor mit 3 ml PBS gespülte Depletionssäule (MACS Separation Column LD, Miltenyi) gegeben, die in einem



starken Magnetfeld befestigt war. Die unten an der Säule abtropfende Flüssigkeit mit den nicht gebundenen CD25<sup>-</sup> Zellen wurde in einem Reagenzröhrchen aufgefangen. Nachdem die Zellsuspension durchgelaufen war, wurde dreimal je 3 ml PBS auf die Säule gegeben, um weitere, nicht gebundene CD25<sup>-</sup> Zellen aus der Säule herauszuspülen. Die T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten wurden gezählt und je 10<sup>7</sup> in einem Einfrierröhrchen kryokonserviert.

## **2.9 Aktivierung CMV- bzw. hTERT-spezifischer T-Lymphozyten**

Die zur Aktivierung CMV- bzw. hTERT-spezifischer T-Lymphozyten durchgeführten Schritte sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Je 10<sup>7</sup> nicht adhärente Zellen wurden nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten in 2 ml T-Zell-Medium in eine 24-Loch-Platte gegeben. An Tag 1, Tag 8 und Tag 15 der T-Zell-Aktivierung wurde zunächst 500 µl Medium vorsichtig aus dem Überstand abgenommen. Die Zellen, die sich am Boden der Platte gesammelt hatten, durften dabei nicht aufgewirbelt werden, damit sie nicht mit dem Überstand zusammen entfernt wurden. Anschließend wurden jeweils 10<sup>6</sup> peptidbeladene, reife DC aufgetaut, in 500 µl T-Zell-Medium suspendiert und zu den T-Lymphozyten dazu gegeben.

Das Medium bestand aus RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) mit 5 % inaktiviertem humanem AB-Serum (Invitrogen), 50 µg/ml Gentamicin (Gibco, Invitrogen), und 25 IE/ml Heparin (Heparin-Natrium-25000-Injektionslösung, Ratiopharm). Ein vollständiger Mediaustausch wurde alle zwei bis drei Tage vorgenommen. Dafür wurden die Zellen im alten Medium in ein Reagenzröhrchen hinein gefüllt, die Zellen wurden 5 Minuten bei 550 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde in frischem T-Zell-Medium suspendiert. Ab Tag 10 wurde zusätzlich IL-2 (20 IE/µl Medium, R&D Systems) zum Medium hinzugegeben.

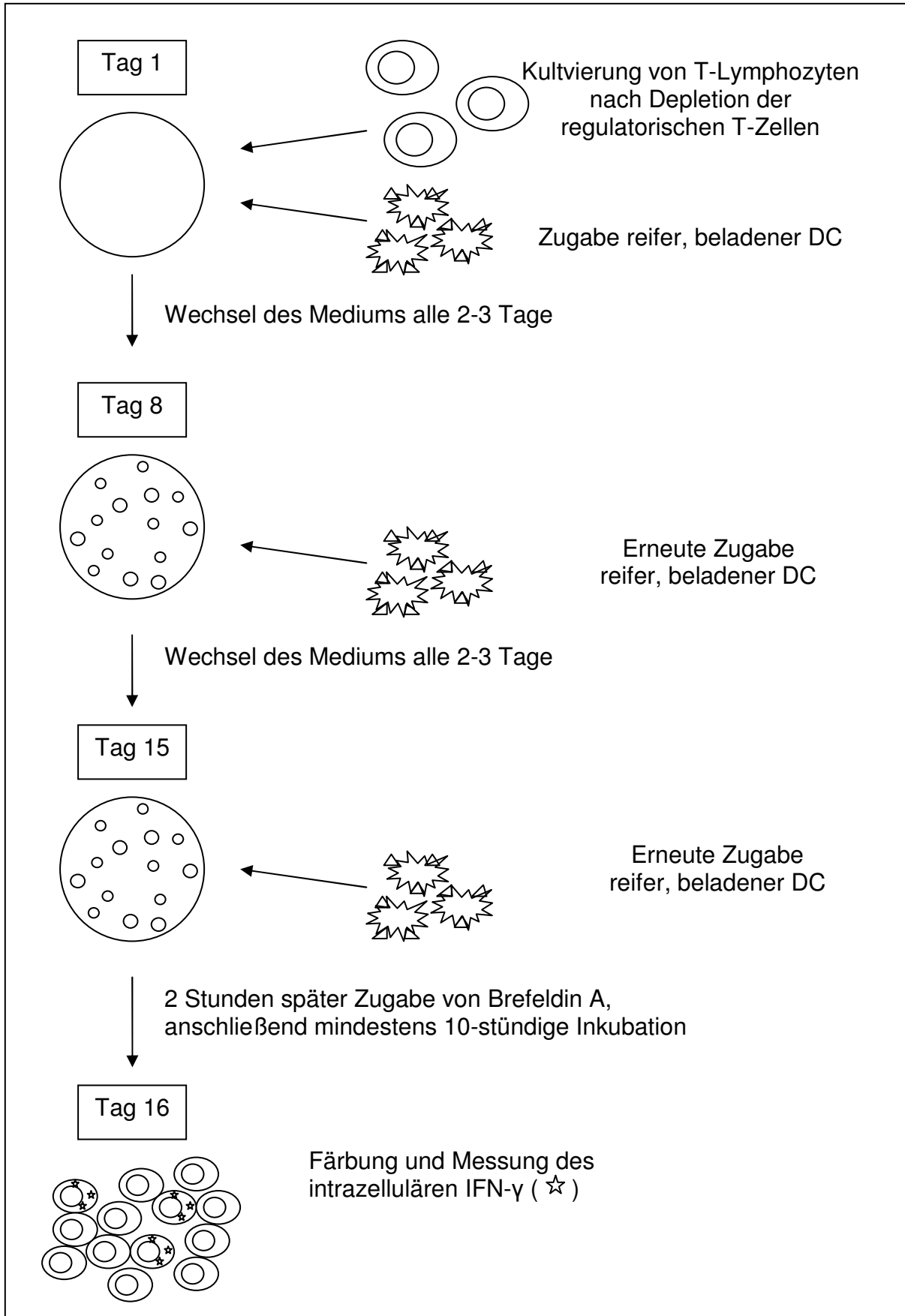
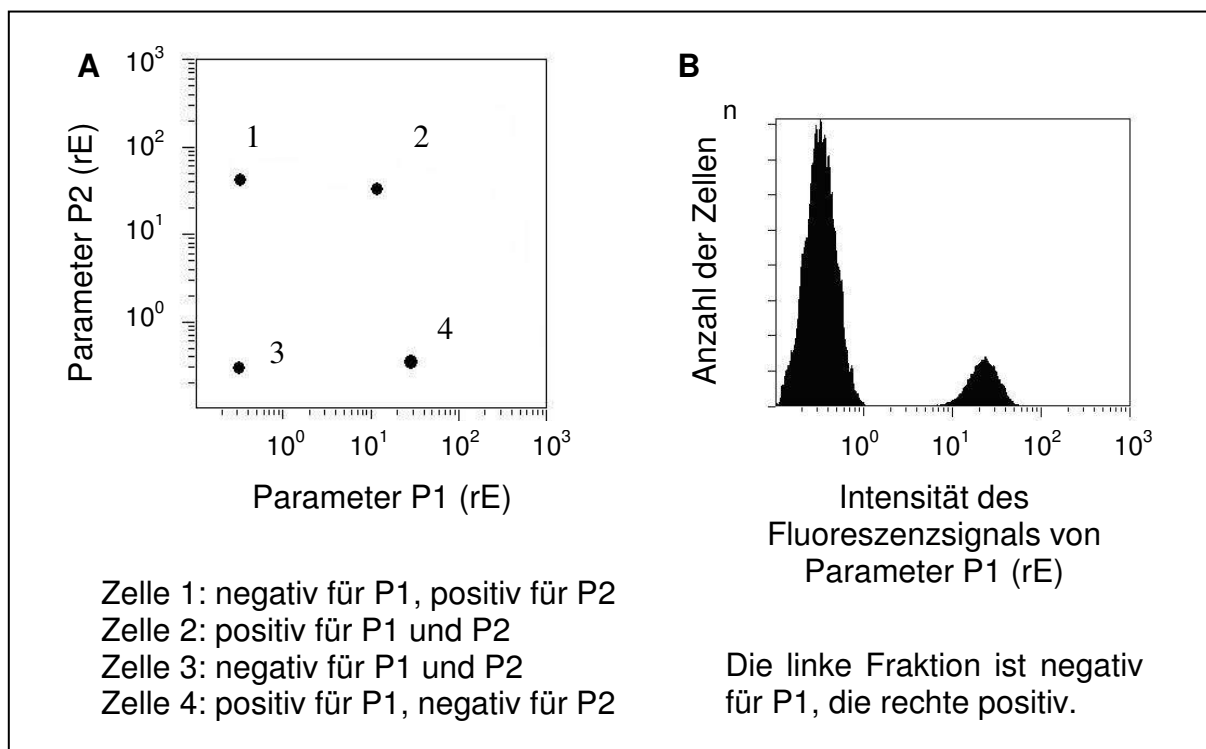


Abbildung 2: Schema der der Aktivierung peptidspezifischer T-Lymphozyten.

## 2.10 Durchflusszytometrie

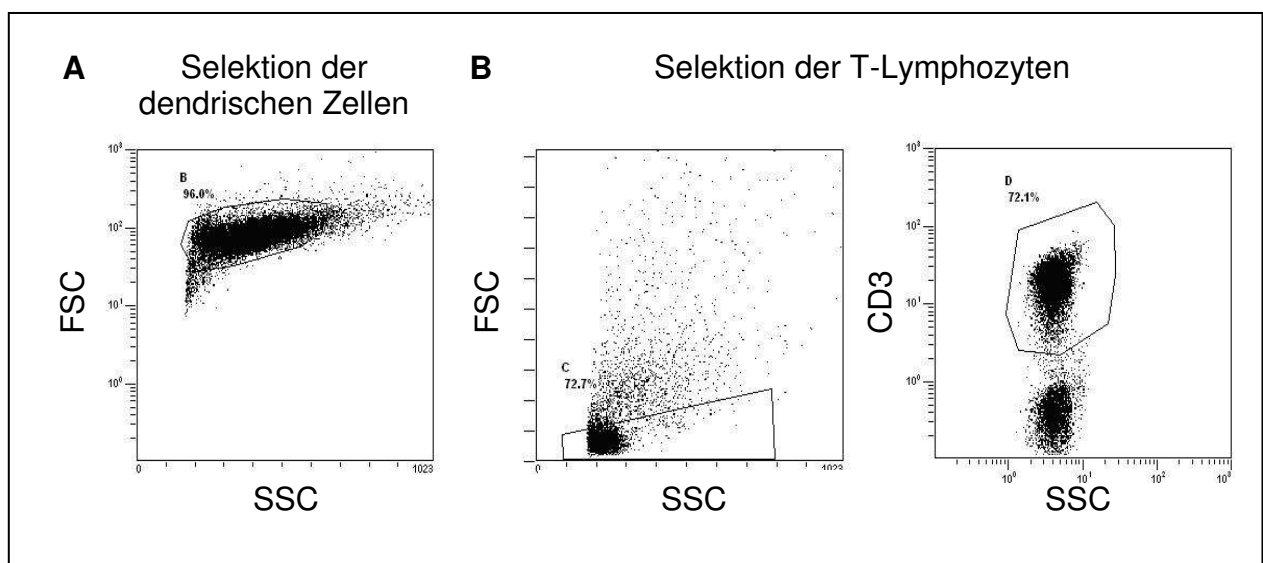
Alle Abbildungen im Ergebnisteil basieren auf den Daten durchflusszytometrischer Messungen und wurden mit Hilfe des Analyseprogramms *CXP Software* (Beckman Coulter) erstellt. Es konnten bei jeder Zelle sechs Parameter untersucht werden: die Größe der Zellen im *Forward Scatter* (FSC), die Granularität der Zellen im *Side Scatter* (SSC) und bis zu vier Antigene, die zuvor mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert worden waren.



**Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung eines *Dot Plot* und eines *Histogram Plot*.** A: *Dot Plot*. Jeder Punkt entspricht einer Zelle mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität der Parameter P1 und P2. Die Skala der Fluoreszenzintensität ist logarithmisch und reicht von 0 bis 1000. Je mehr fluoreszenzmarkierte Antigene auf der Zelle exprimiert sind, desto höher die Intensität des Fluoreszenzsignals (in relativen Einheiten, rE) und desto weiter außen liegt der Punkt. B: *Histogram Plot*. Die linke Kurve zeigt Zellen ohne, die rechte mit P1 auf der Oberfläche. Die Anzahl der Zellen, die negativ für P1 sind, ist größer als die Anzahl der P1-positiven Zellen.

In dieser Arbeit wurden zwei Arten der Darstellung verwendet, der *Dot Plot* und der *Histogram Plot* (Abbildung 3). Im *Dot Plot* entsprach jeder Punkt einer Zelle. Dieser wurde in einem Koordinatenfeld mit X- und Y-Achse abgebildet. Auf jeder Achse wurde einer der sechs oben genannten Parameter aufgetragen. Die Fluoreszenzintensitäten dieser Parameter auf der Zelle bestimmten die Lage des Punktes. Je mehr fluoreszierende Antikörper auf der Zelle gebunden waren, desto stärker war das Signal und desto weiter außen lag der Punkt. Im *Histogram Plot* wurde nur einer

der sechs oben genannten Parameter dargestellt. Dessen Fluoreszenzintensität wurde auf die X-Achse aufgetragen. Je mehr Antigen exprimiert wurde, desto stärker war die Intensität des Fluoreszenzsignals und desto weiter rechts wurde das Signal dieser Zelle aufgetragen. Die Y-Achse zeigte die Anzahl der Zellen an, die eine bestimmte Fluoreszenzintensität aufgewiesen hat. Je höher die Kurve an einer Stelle war, desto mehr Zellen zeigten genau diese Fluoreszenzintensität eines gemessenen Parameters. Die Skalen, auf der die Parameter aufgetragen wurden, waren entweder logarithmisch von 0 bis 1000 oder linear, die Fluoreszenzintensität wurde in relativen Einheiten (rE) angegeben.



**Abbildung 4: Selektion der dendritischen Zellen (A) und der T-Lymphozyten (B).** Dendritische Zellen sind groß (hoher Wert im FSC) und granuliert (hoher Wert im SSC). Sie sind in Gate B ausgewählt. T-Lymphozyten sind klein (niedriger Wert im FSC) und sehr wenig granuliert (niedriger Wert im SSC). Bei Aktivierung werden sie etwas größer und granulierter (Ausläufer des Gates nach rechts). Alle potentiellen T-Zellen sind in Gate C eingefasst. In der rechten Abbildung sind nur Zellen dargestellt, die in Gate C waren. Alle kleinen, wenig granulierten Zellen mit CD3 auf der Oberfläche sind T-Lymphozyten und in Gate D selektiert.

Alle Zellen, die für eine Auswertung nicht relevant waren, wurden ausgeschlossen. Dies geschah, indem ein Gate um die relevante Zellpopulation gelegt wurde. Für diese Selektion gab es zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum einen konnten die Zellen anhand ihrer Größe (angezeigt im *Forward Scatter*) und Granularität (angezeigt im *Side Scatter*) ausgewählt werden, zum anderen anhand ihrer Oberflächenantigene. In Abbildung 4A ist beispielhaft gezeigt, wie die Population der DC gewählt wurde. Dafür wurden im *Dot Plot* mit dem *Forward Scatter* (FSC, logarithmische Skala) als Y-Parameter und dem *Side Scatter* (SSC, lineare Skala)

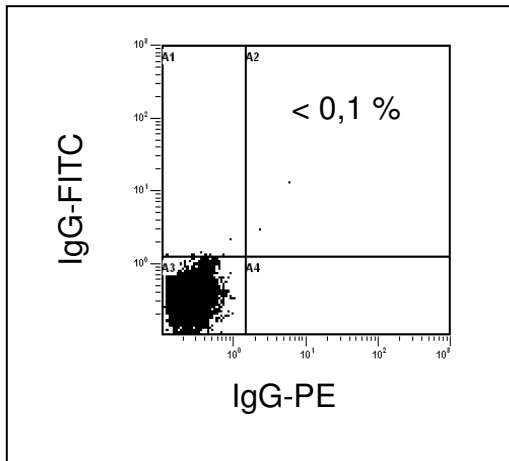
als X-Parameter die großen, granulierten Zellen ausgewählt. Die Ausreifung der DC wurde immer als *Histogram Plot* dargestellt. Die X-Achsen-Parameter waren CD83 (Ausreifungsmarker), CD80 oder CD86 (kostimulatorische Moleküle), die Skala war logarithmisch. Die graue Kurve zeigte die Fluoreszenzintensität der unreifen DC, die darüberegelegte, schwarze Kurve bildete die Fluoreszenzintensität der DC nach Ausreifung ab.

Abbildung 4B zeigt, wie T-Lymphozyten selektiert wurden. Zunächst wurden im *Dot Plot* mit dem FSC (lineare Skala) als Y-Parameter und dem SSC (lineare Skala) als X-Parameter die kleinen und nicht bzw. wenig granulierten Zellen ausgewählt, dann wurden in einem zweiten *Dot Plot* alle Zellen, die nicht den T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD3 aufwiesen, ausgeschlossen.

Die IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Lymphozyten, die als Merkmal für Aktivierung nach dreimaliger Stimulation durch DC gemessen wurde, wurde immer als *Dot Plot* dargestellt (siehe z. B. Abbildung 6). Der X-Achsen-Parameter war CD8, der Y-Achsen-Parameter IFN- $\gamma$ . Beide Skalen waren logarithmisch. Über die Abbildung wurde ein Quadrantenkreuz gelegt, das die CD8<sup>+</sup> von der CD8<sup>-</sup> Population sowie die IFN- $\gamma$  produzierenden von den nicht IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen trennte. Die Lage des Quadrantenkreuzes wurde in der Negativkontrolle jedes Versuches festgelegt und dann für alle anderen Abbildungen beibehalten. Die Zahlen unter den *Dot Plots* gaben an, wieviel Prozent der CD8<sup>-</sup> Zellen IFN- $\gamma$  produzierten (oben links) bzw. wie viel Prozent der CD8<sup>+</sup> Zellen IFN- $\gamma$  produzierten (oben rechts). Die antigenspezifische Aktivierung wurde errechnet, indem die Prozentwerte der Negativkontrolle von den Prozentwerten der Probe subtrahiert wurden.

## **2.11 Kompensation und Isotyp-Kontrollen**

Um eine Verfälschung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen durch Eigenfluoreszenz der Zellen und unspezifische Bindung auszuschließen, wurden täglich im Rahmen der Routinediagnostik Kompensation und Amplifikation eingestellt. Zusätzlich wurde bei der intrazellulären Zytokinfärbung eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Dafür wurde eine Probe mit Anti-IgG-Antikörpern anstelle der IFN- $\gamma$ - und der Oberflächenmolekül-Antikörper angefärbt. Abbildung 5 zeigt beispielhaft an Zellen des Patienten A, dass weniger als 0,1 % der gefärbten Zellen IgG<sup>+</sup> sind.



**Abbildung 5: Isotypkontrolle für die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Färbung der T-Lymphozyten bei Patient A.** Nach Einstellung von Kompensation und Amplifikation sind weniger als 0,1 % der Zellen IgG<sup>+</sup>.

## 2.12 Untersuchung der Ausreifung dendritischer Zellen

Zur Analyse der Ausreifung der DC wurde die Expression des Reifungsmarkers CD83 sowie der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 im Durchflusszytometer (FC 500, Beckman Coulter) vor und nach Zugabe der Zytokine bzw. Liganden untersucht.

Für die Färbung wurden  $10^5$  unreife und  $10^5$  reife DC in je ein 1,5 ml-Sicherheitsverschluss-Gefäß (Eppendorf) gefüllt, bei 320 g für 5 Minuten (Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Je 8  $\mu$ l Anti-CD80-FITC (Fluoreszein Isothiocyanat), Anti-CD86-PE (Phycoerythrin), Anti-CD45-ECD (Energy Coupled Dye) und Anti-CD83-PE-Cy5 (Phycoerythrin-Zyanid5, alle Beckman Coulter) wurde hinzugegeben und die Suspension gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 5 °C wurden beide Proben mit je 1 ml PBS gewaschen und bei 320 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in je 300  $\mu$ l PBS mit 1 % Paraformaldehyd (Sigma Aldrich) resuspendiert und in ein Messröhrchen (Sarstedt) überführt.

## 2.13 FACS-Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten

Für die durchflusszytometrische Messung von CD25 auf der Oberfläche der T-Lymphozyten wurden je  $10^5$  Zellen vor und nach der Depletion abgenommen und

in ein Messröhrchen gefüllt. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und mit jeweils 8 µl Anti-CD25-FITC, Anti-CD4-PE, Anti-CD45-ECD und Anti-CD3-PE-Cy5 (Beckman Coulter) für 20 Minuten bei 5 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden anschließend mit 3 ml PBS abgewaschen, die Suspension bei 320 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für die Messung im Durchflusszytometer wurde jedes Zellpellet in etwa 300 µl PBS resuspendiert.

#### **2.14 Messung der intrazellulären IFN-γ-Produktion**

An Tag 15 der T-Zell-Aktivierung wurde zwei Stunden nach der dritten Stimulation der T-Lymphozyten mit DC der Sekretionshemmer Brefeldin A (Sigma Aldrich) in einer Konzentration von 1 µl/ml Medium hinzugefügt. Nach mindestens 10 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die zu Boden gesunkenen Zellen im Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml-Sicherheitsverschluss-Gefäß gefüllt. Alle Gefäße wurden bei 320 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 µl PBS gelöst und nach Zugabe von je 8 µl extrazellulären Antikörpern (Anti-CD8-PE, Anti-CD45-ECD und Anti-CD3-PE-Cy5, Beckman Coulter) für 20 Minuten bei 5 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden anschließend abgewaschen durch Zugabe von 1 ml PBS, 5 Minuten Zentrifugation bei 320 g und Abnahme des Überstands. Dann wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und es wurde 500 µl *Inside Fix* (Miltenyi) zugegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen darin für 20 Minuten inkubiert, dann mit 1 ml PBS gewaschen, 5 Minuten bei 320 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Ein zweiter Waschschrift wurde anschließend mit 1 ml *Inside Perm* (Miltenyi) durchgeführt, dann wurden die Zellen wiederum bei 320 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgte eine Resuspension in 90 µl *Inside Perm* und die Zugabe von je 8 µl der Antikörper Anti-IFN-γ-FITC (Miltenyi) und Anti-CD3-PE-Cy5 (Beckman Coulter). Die Zellen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml *Inside Perm* mit anschließendem Zentrifugieren bei 320 g für 5 Minuten und Abnehmen des Überstands. Für die durchflusszytometrische Messung wurde jedes Pellet in 0,5 ml PBS resuspendiert.

Für die Negativkontrolle bei den Versuchen mit hTERT als Antigen wurden vor der Stimulation an Tag 15  $2 \times 10^6$  Zellen aus dem Pool der über 15 Tage gezüchteten

T-Lymphozyten herausgenommen. Diese wurden statt mit peptidbeladenen DC mit  $2 \times 10^5$  unbeladenen, reifen DC in 200  $\mu$ l T-Zell-Medium in einer 96-Loch-Platte (Sarstedt) inkubiert. Ebenso wie bei den normal stimulierten T-Zellen wurde zwei Stunden nach der dritten Stimulation Brefeldin A hinzu gegeben und nach mindestens zehn Stunden Inkubation die Färbung für die Durchflusszytometrie durchgeführt.

Für die Negativkontrolle bei den Versuchen mit CMV als Antigen wurden  $10^7$  T-Lymphozyten über 15 Tage kultiviert und an Tag 1, 8 und 15 unbeladene, reife DC hinzu gegeben. Auch hier wurde zwei Stunden nach der dritten Stimulation Brefeldin A hinzu gegeben und nach mindestens zehn Stunden Inkubation die Färbung für die Durchflusszytometrie durchgeführt.

Für die Positivkontrolle wurden an Tag 15  $10^6$  nicht beladene, zytokingereifte DC und  $10^7$  nicht stimulierte T-Lymphozyten in 2 ml T-Zell-Medium in einer 24-Loch-Platte aufgenommen und 1  $\mu$ g/ml Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB, Sigma Aldrich) hinzugefügt. Nach zwei Stunden wurde die Sekretionshemmung mit Brefeldin A durchgeführt und eine mindestens zehnstündige Inkubation abgeschlossen. Die Hälfte dieser Zellen wurde mit Antikörpern gegen IFN- $\gamma$ , CD8, CD45 und CD3 gefärbt, mit der anderen Hälfte wurde die Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Dafür wurden diese Zellen mit Fluoreszenzantikörpern (FITC, PE, ECD, PE-Cy5) gefärbt, die gegen Immunglobulin G (IgG) gerichtet sind.

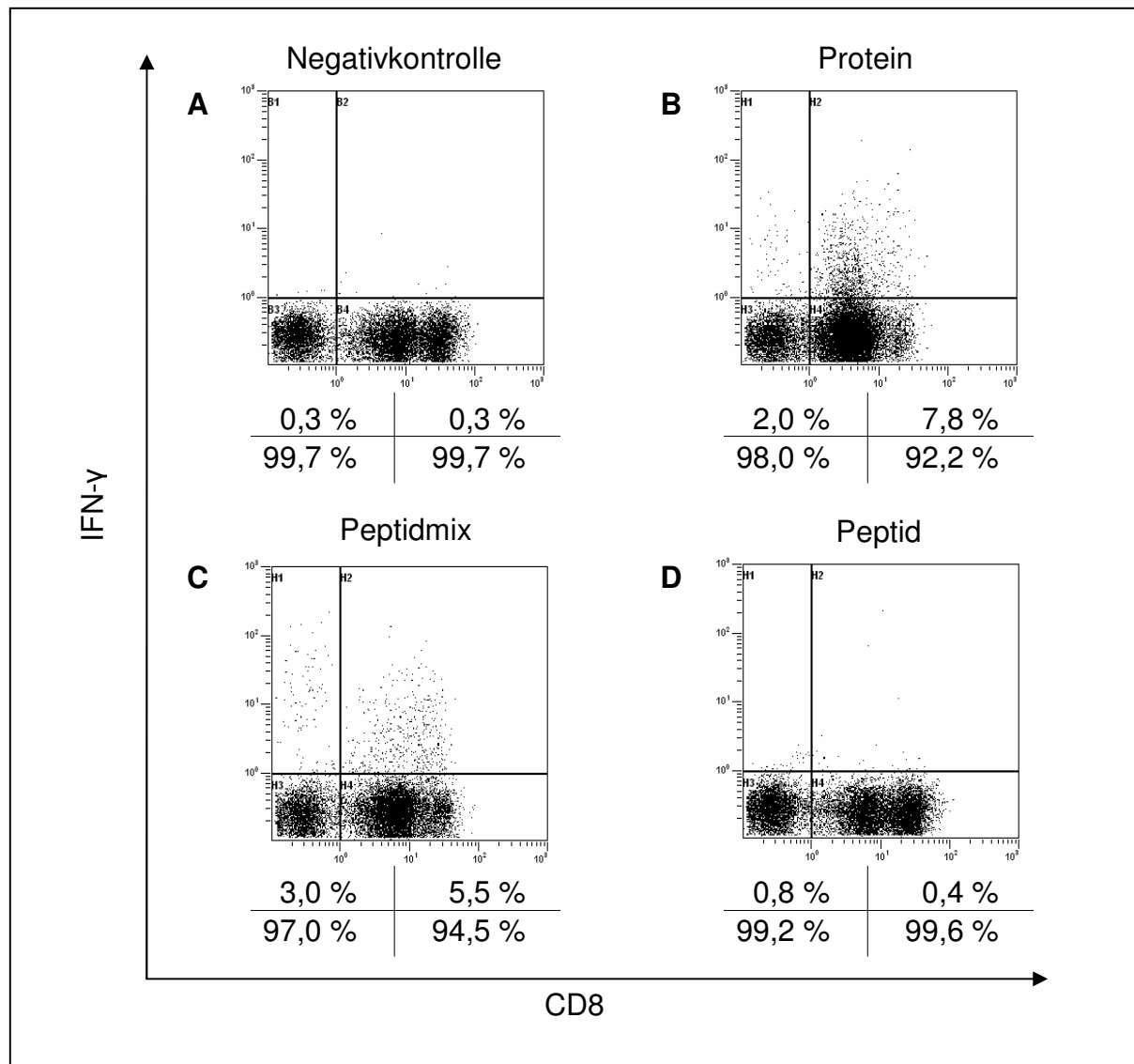


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten

##### 3.1.1 Proband I

In diesem Versuch waren die DC mit CMV-Peptid NLVPMVATV, CMV-pp65-Protein oder dem CMV-Peptidmix beladen und mit Zytokinen ausgereift worden. In der Negativkontrolle lag der Anteil IFN- $\gamma^+$  CD8 $^-$  T-Lymphozyten bei 0,3 % und der Anteil IFN- $\gamma^+$  CD8 $^+$  T-Zellen ebenfalls bei 0,3 % (Abbildung 6A). Die SEB-Positivkontrolle zeigte eine Aktivierung von 2,8 % der CD8 $^-$  und 2,8 % der CD8 $^+$  T-Zellen (ohne Abbildung).

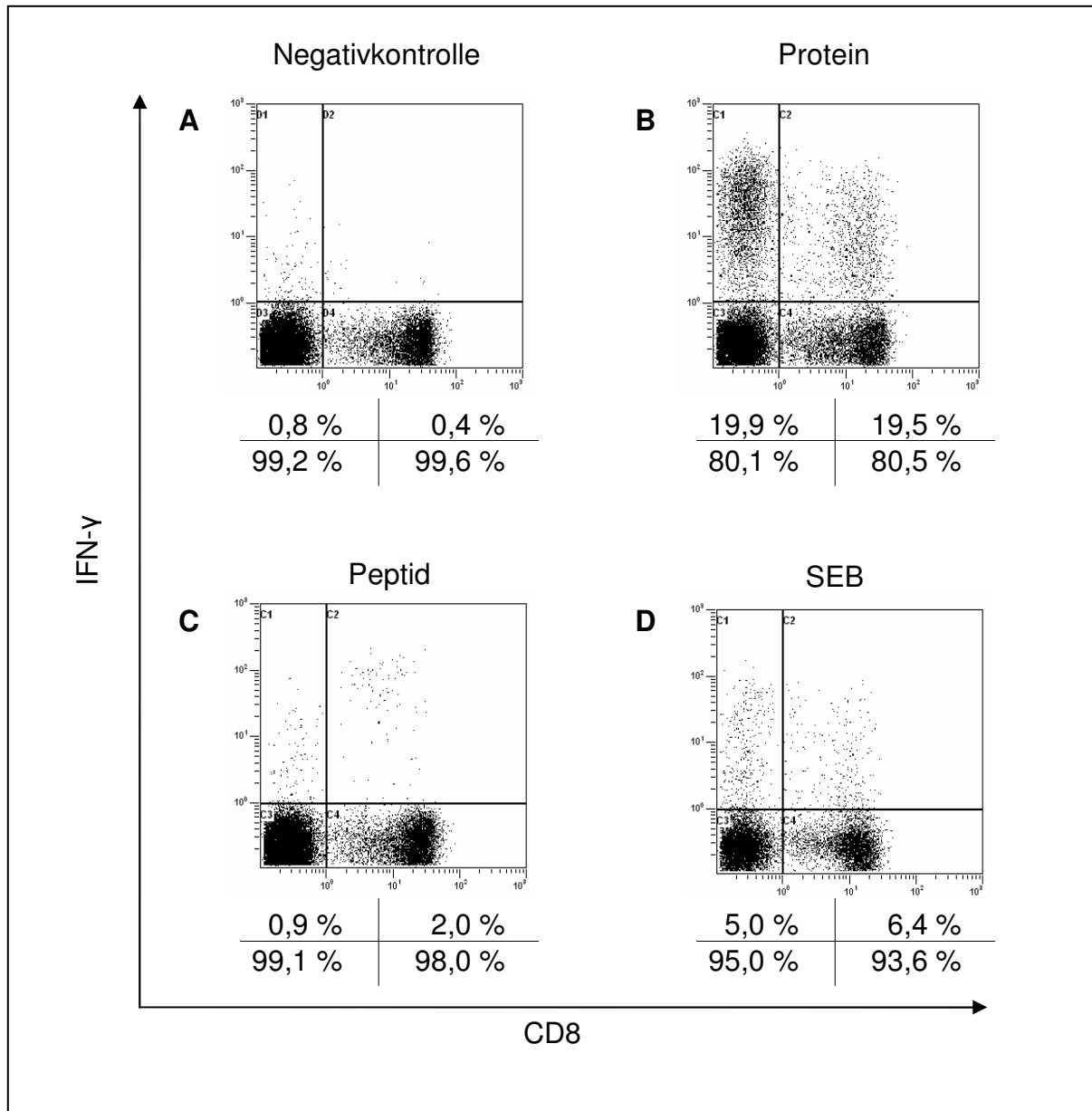


**Abbildung 6: Aktivierung von T-Lymphozyten bei Proband I.** IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften DC. (A) Negativkontrolle. (B) Stimulation mit CMV-pp65-proteinbeladenen DC. (C) Stimulation mit CMV-peptidmixbeladenen DC. (D) Stimulation mit CMV-NLVPMVATV-peptidbeladenen DC.

Nach Stimulation der T-Lymphozyten mit DC, die mit CMV-pp65-Protein bzw. CMV-Peptidmix beladen worden waren, zeigte sich eine IFN- $\gamma$ -Produktion sowohl bei CD8<sup>-</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Anteil der CMV-spezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Stimulation mit CMV-proteinbeladenen DC betrug nach Abzug der Negativkontrolle 1,7 % der CD8<sup>-</sup> und 7,5 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6B). Nach Stimulation mit CMV-peptidmixbeladenen DC betrug der Anteil der spezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen 2,7 % der CD8<sup>-</sup> und 5,2 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6C). Nach Stimulation der Lymphozyten mit DC, die mit dem CMV-Peptid NLVPMVATV beladen worden waren, betrug die Anzahl spezifisch aktivierter Lymphozyten 0,5 % der CD8<sup>-</sup> und 0,1 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6D).

### **3.1.2 Proband II**

Bei Proband II zeigte die SEB-Positivkontrolle eine Aktivierung von 5,0 % der CD8<sup>-</sup> und 6,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 7D). In der Negativkontrolle wurde eine IFN- $\gamma$ -Produktion bei 0,8 % der CD8<sup>-</sup> Zellen und 0,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen (Abbildung 7A). Nach Stimulation mit DC, die mit dem CMV-pp65-Protein beladen worden waren, betrug die spezifische Aktivierung 19,1 % der CD8<sup>-</sup> und 19,1 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 7B). Bei Stimulation mit DC, die mit dem CMV-Peptid NLVPMVATV beladen worden waren, waren 1,6 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten CMV-spezifisch aktiviert, der Anteil CMV-spezifisch aktivierter CD8<sup>-</sup> T-Zellen betrug 0,1 % (Abbildung 7C).

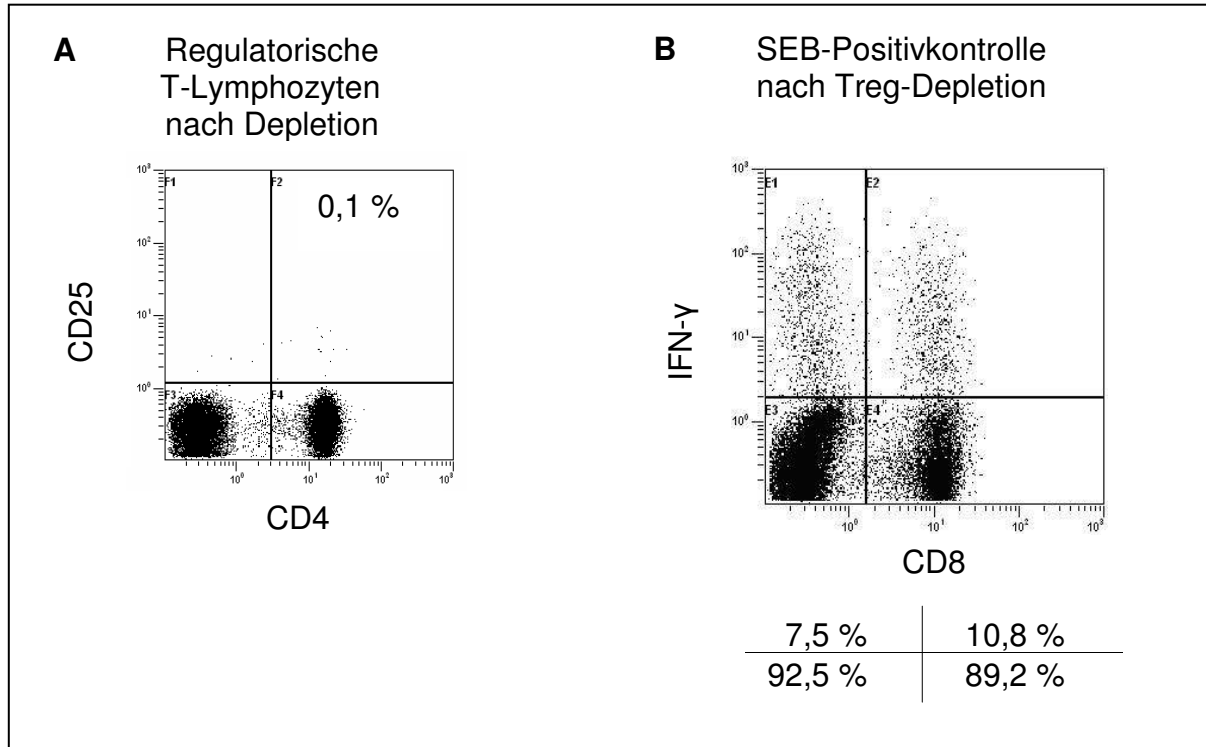


**Abbildung 7: Aktivierung von T-Lymphozyten bei Proband II.** IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Lymphozyten nach dreimaliger Stimulation mit zytokingereiften DC. (A) Negativkontrolle. (B) Stimulation mit CMV-pp65-proteinbeladenen DC. (C) Stimulation mit CMV-NLVPMTV-peptidbeladenen DC. (D) Positivkontrolle mit SEB.

### 3.2 Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten

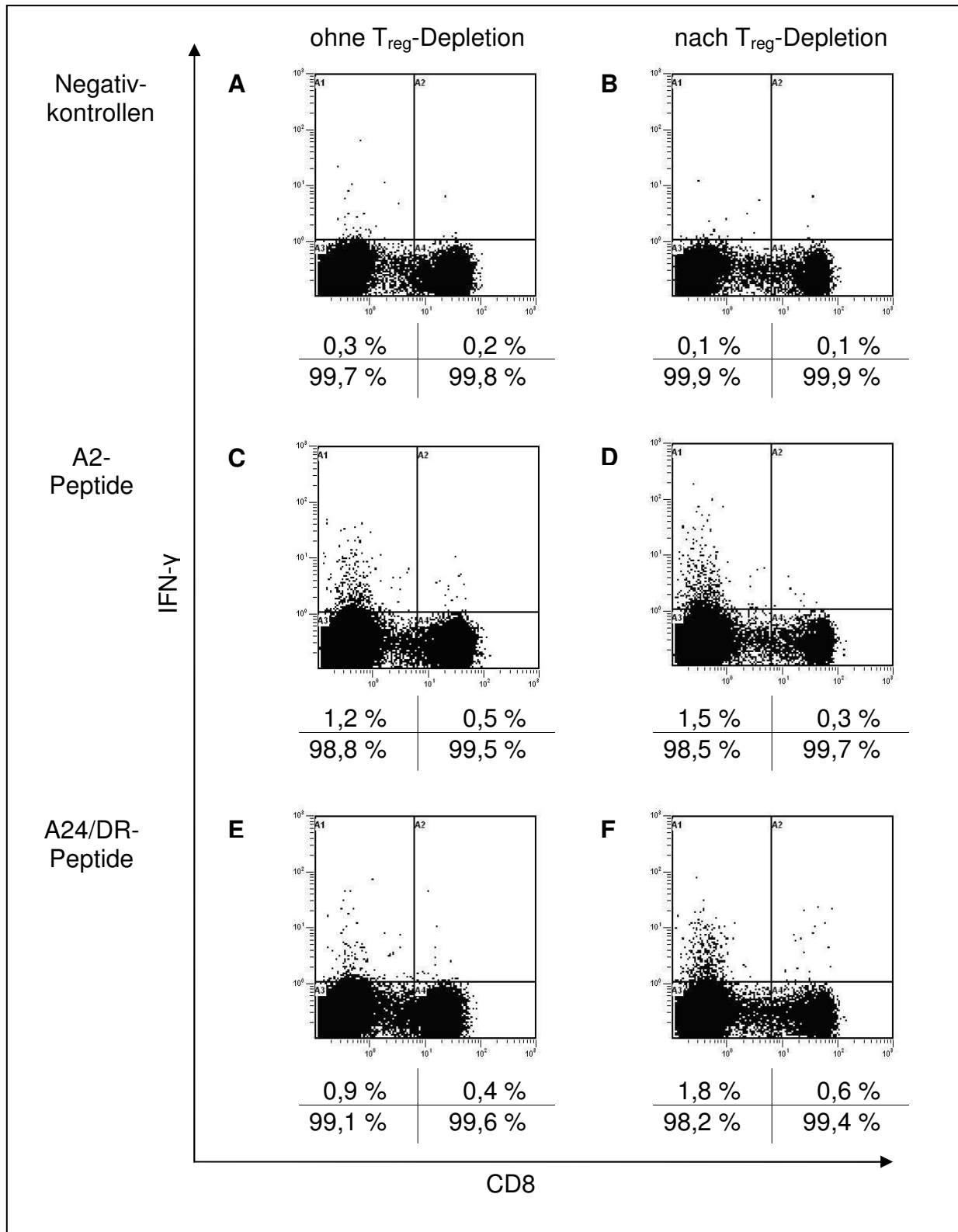
Bei Proband III wurde die Effektivität der Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten untersucht. Ohne Depletion enthielt die Kultur 2,7 % T<sub>reg</sub>-Lymphozyten (ohne Abbildung). Die depletierten T-Lymphozyten enthielten 0,1 % T<sub>reg</sub>-Zellen (Abbildung 8A). Darauf folgte die Stimulation der T-Zellen mit DC, die mit hTERT-HLA-A2- (p540, p865 und p988) bzw. HLA-A24- und HLA-DR-Peptiden (p461, p672 und p766) beladen und mit Zytokinen ausgereift worden waren. In der

SEB-Positivkontrolle, die mit depletierten T-Lymphozyten durchgeführt wurde, betrug der Anteil  $\text{IFN-}\gamma^+$  T-Lymphozyten 7,5 % der  $\text{CD8}^-$  und 10,8 % der  $\text{CD8}^+$  Zellen (Abbildung 8B).



**Abbildung 8: Proband III: (A) Regulatorische T-Lymphozyten nach Depletion.** Bei Proband III sind nach Depletion der  $\text{CD25}^+$  Zellen noch 0,1 % der T-Lymphozyten  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  regulatorische T-Zellen. **(B) SEB-Positivkontrolle.**  $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion durch T-Lymphozyten nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten.

Ohne Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten wurde in der Negativkontrolle eine unspezifische Aktivierung von 0,3 % der  $\text{CD8}^-$  und 0,2 % der  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten gemessen (Abbildung 9A). Bei Stimulation mit HLA-A2-peptidbeladenen DC betrug die hTERT-spezifische Aktivierung nach Abzug der Negativkontrolle 0,9 % der  $\text{CD8}^-$  und 0,3 % der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen (Abbildung 9C). Bei Stimulation mit HLA-A24/DR-peptidbeladenen DC betrug der Anteil hTERT-spezifischer,  $\text{IFN-}\gamma^+$   $\text{CD8}^-$  T-Lymphozyten 0,6 % und der Anteil  $\text{IFN-}\gamma^+$   $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten 0,2 % (Abbildung 9E).



**Abbildung 9: Aktivierung von T-Lymphozyten ohne und mit Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten bei Proband III.** (A, C, E) IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten ohne T<sub>reg</sub>-Depletion. (B, D, F) IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten nach T<sub>reg</sub>-Depletion. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2-peptidbeladenen (p540, p865, p988), zytokingereiften DC. (E, F) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladenen (p461, p672, p766), zytokingereiften DC.

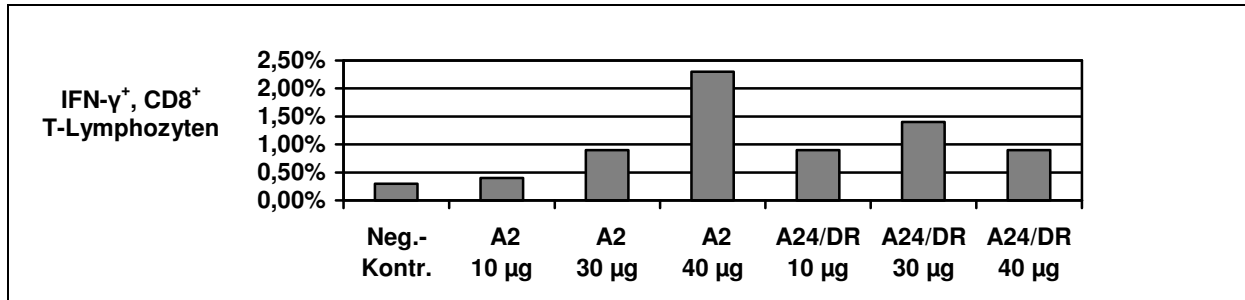
Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten betrug die unspezifische Aktivierung 0,1 % der CD8<sup>-</sup> und 0,1 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 9B). Bei Stimulation mit HLA-A2-peptidbeladenen DC wurde eine hTERT-spezifische Aktivierung von 1,4 % der CD8<sup>-</sup> und 0,2 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gemessen (Abbildung 9D). Waren die T-Zellen mit HLA-A24- und HLA-DR-peptidbeladenen DC stimuliert worden, waren 1,7 % der CD8<sup>-</sup> und 0,5 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten hTERT-spezifisch aktiviert (Abbildung 9F). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bei allen weiteren Versuchen die regulatorischen T-Lymphozyten depletiert.

### **3.3 Proband IV: Optimierung der hTERT-Peptidmenge zum Beladen dendritischer Zellen**

Die DC des gesunden Probanden IV waren mit unterschiedlichen Mengen der hTERT-HLA-A2- (p540, p865 und p988) bzw. -HLA-A24- und -DR-Peptide (p461, p672 und p766) beladen und mit Zytokinen ausgereift worden. In der Negativkontrolle wurde eine unspezifische Aktivierung von 0,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen (Abbildung 10).

Der Anteil der hTERT-spezifischen CD8<sup>+</sup> CTL nach Depletion der regulatorischen T-Zellen und Stimulation mit DC, die mit je 10 µg, 30 µg bzw. 40 µg hTERT-HLA-A2-Peptiden beladen worden waren, betrug 0,1 %, 0,6 % bzw. 2,0 % (Abbildung 10). Bei Stimulation mit DC, die mit je 10 µg, 30 µg bzw. 40 µg HLA-A24- und -DR-Peptiden beladen worden waren, waren 0,6 %, 1,1 % bzw. 0,6 % der T-Lymphozyten IFN-γ<sup>+</sup> (Abbildung 10).

Mit zunehmender Peptidmenge, mit der die DC beladen worden waren, war ein größerer Anteil an spezifischen IFN-γ<sup>+</sup> T-Zellen nachzuweisen. Eine Ausnahme bestand bei CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die mit DC stimuliert wurden, die mit je 40 µg HLA-A24/DR-Peptiden beladenen worden waren. Hier wurden weniger T-Lymphozyten spezifisch aktiviert als bei Stimulation mit DC, die mit je 30 µg Peptid beladen worden waren. Auf der Grundlage dieser Daten wurden in den Untersuchungen die DC mit je 30 µg Peptid beladen.



**Abbildung 10: Aktivierung von T-Lymphozyten bei Proband IV.** Anteil der IFN- $\gamma^+$ , CD8 $^+$  T-Zellen nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten und Stimulation mit zytokingereiften DC, die mit je 10, 30 bzw. 40  $\mu$ g hTERT-Peptid („A2“: p540, p865 und p988; „A24/DR“: p461, p672 und p766) beladen worden waren. Als Negativkontrolle („Neg.-Kontr.“) wurden DC eingesetzt, die nicht mit Peptiden beladen worden waren.

### 3.4 Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten mit zytokin- bzw. ligandengereiften DC bei gesunden Probanden

In diesen Versuchen wurde untersucht, ob sich durch den Austausch des Zytokincocktails gegen bestimmte Rezeptor-Liganden bei der Ausreifung der DC eine stärkere Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten erzielen lässt.

#### 3.4.1 Proband III

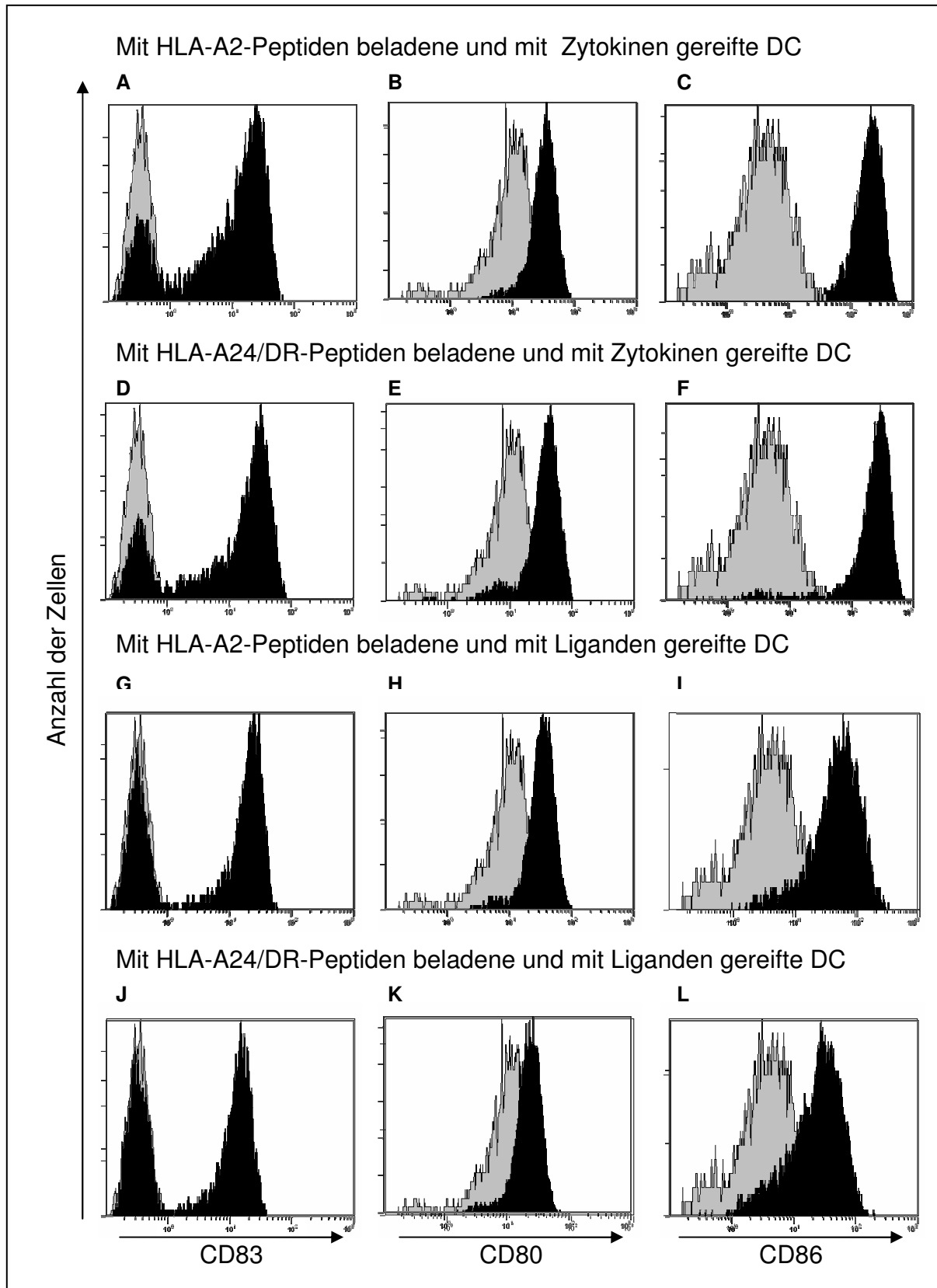
Auf den DC wurde die Expression des Reifungsmarkers CD83 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 vor und nach der Ausreifung durch Zytokine oder Liganden gemessen. Die DC des Probanden III wurden entweder mit p540 (HLA-A2), p865 (HLA-A2) und p988 (HLA-A2) oder mit p461 (HLA-A24), p672 (HLA-DR1, 7, 15) und p766 (HLA-DR4, 11, 15) beladen. Die unterschiedliche Peptidbeladung hatte keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmoleküle, die Ausreifung von HLA-A2-peptidbeladenen DC (Abbildung 11A-C und G-I) unterscheidet sich nicht von der Ausreifung HLA-A24/DR-peptidbeladenen DC (Abbildung 11D-F und J-L).

Die Expression von CD83, CD80 und CD86 nach Zytokinreifung unterscheidet sich jedoch von der Expression dieser Marker nach Ligandenreifung. Eine Expression von CD83 zeigten mehr als 75 % der zytokingereiften DC (Abbildung 11A und D), aber nur 60 % der ligandengereiften DC (Abbildung 11G und J). Unabhängig von der Methode der Ausreifung lag das Maximum der Kurve nach Ausreifung bei einer Fluoreszenzintensität von etwa 25 relativen Einheiten (rE). Eine Expression von CD80 zeigten unabhängig von der Methode der Ausreifung mehr als 90 % der reifen DC, das Maximum der Kurve verschob sich von 10 rE vor Ausreifung auf 40 rE nach

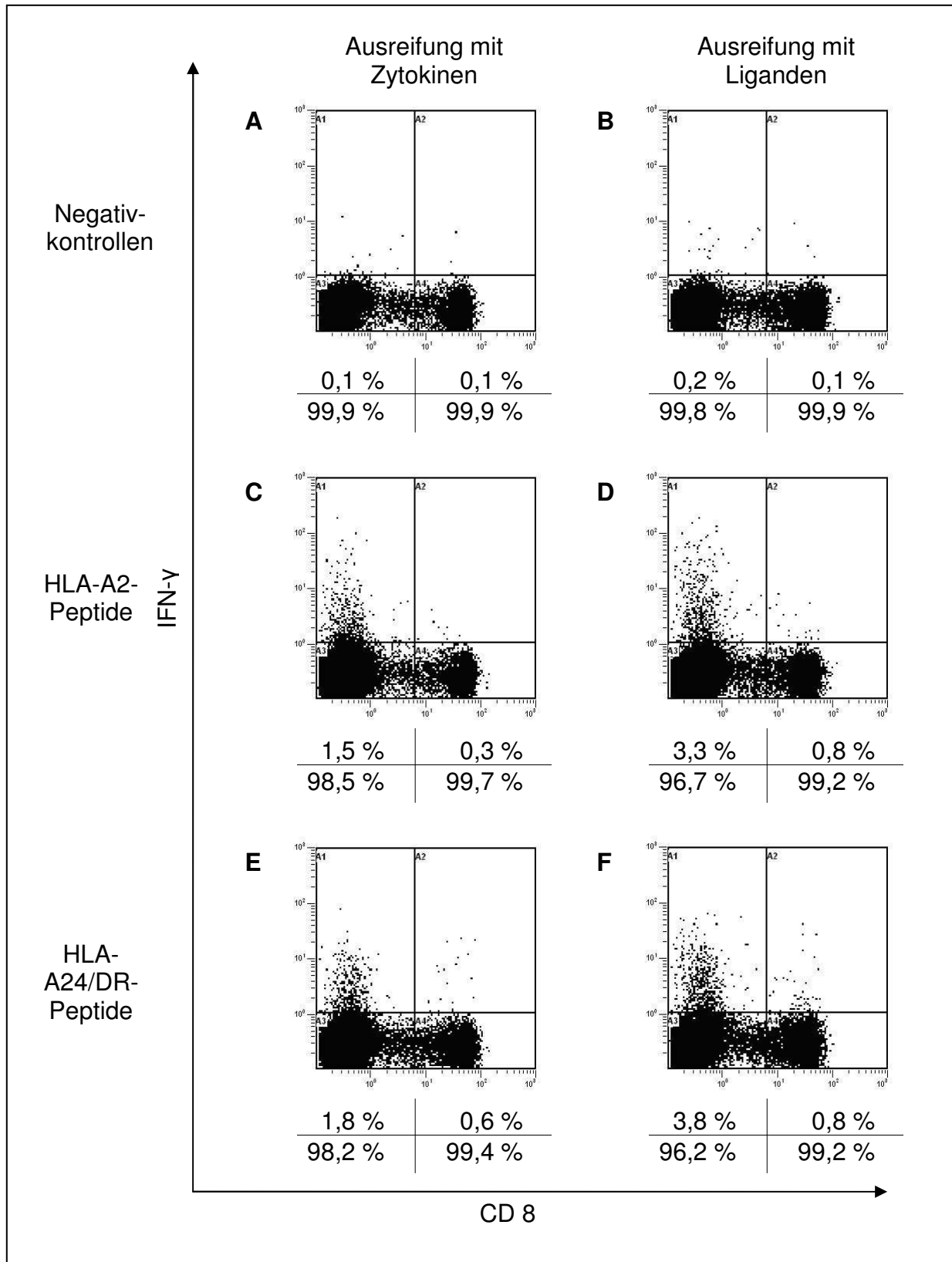
Ausreifung (Abbildung 11B, E, H, K). Eine Expression von CD86 zeigten mehr als 90 % der zytokingereiften DC (Abbildung 11C und F), aber nur 75 % der ligandengereiften DC (Abbildung 11I und L), das Maximum der Kurve verschob sich von 3 rE auf 250 rE nach Zytokinreifung und auf 70 rE nach Ligandenreifung. Diese Daten zeigen eine höhere Expression der Ausreifungsmarker nach Zytokinreifung.

Vor Beginn der Kultur waren die regulatorischen T-Zellen depletiert worden. Nach der Depletion betrug die Restfrequenz dieser Zellen 0,1 % (Abbildung 8A). Abbildung 12 zeigt die IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Lymphozyten, die mit zytokingereiften DC (A, C und E) bzw. mit ligandengereiften DC (B, D und F) stimuliert worden waren. Bei Stimulation mit zytokingereiften, HLA-A2-peptidbeladenen DC wurden 1,4 % CD8<sup>-</sup> und 0,2 % CD8<sup>+</sup>, hTERT-spezifische, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten gemessen (Abbildung 12C), bei Stimulation mit ligandengereiften, HLA-A2-peptidbeladenen DC 3,1 % CD8<sup>-</sup> bzw. 0,7 % CD8<sup>+</sup> (Abbildung 12D). Bei Stimulation mit HLA-A24/DR-Peptid beladenen, zytokingereiften DC waren 1,7 % der CD8<sup>-</sup> und 0,5 % der CD8<sup>+</sup> Zellen hTERT-spezifisch aktiviert (Abbildung 12E). Bei Stimulation mit HLA-A24/DR-Peptid beladenen, ligandengereiften DC betrug der Anteil der hTERT-spezifisch aktivierten CD8<sup>-</sup> Zellen 3,6 % und der CD8<sup>+</sup> Zellen 0,7 % (Abbildung 12F).





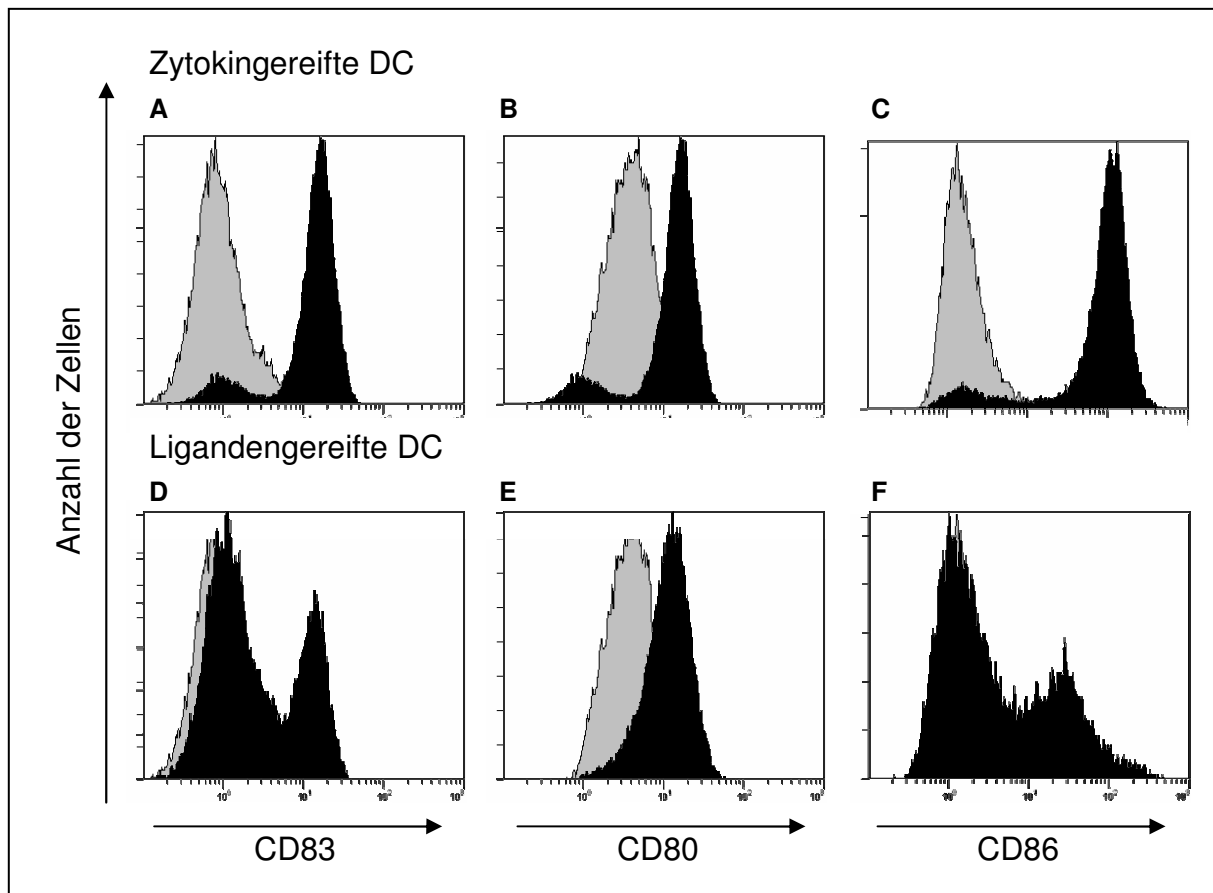
**Abbildung 11: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D, G, J), CD80 (B, E, H, K) und CD86 (C, F, I, L) auf den dendritischen Zellen des Probanden III.** (1) zytokingereifte, hTERT-HLA-A2-peptidbeladene DC. (2) zytokingereifte, hTERT-A24/DR-peptidbeladene DC. (3) ligandengereifte, hTERT-HLA-A2-peptidbeladene DC. (4) ligandengereifte hTERT-A24/DR-peptidbeladene DC. Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.



**Abbildung 12: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereifen (linke Spalte) oder ligandengereifen (rechte Spalte) DC bei Proband III. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2-peptidbeladenen (p540, p865, p988) DC. (E, F) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladenen (p461, p672, p766) DC.**

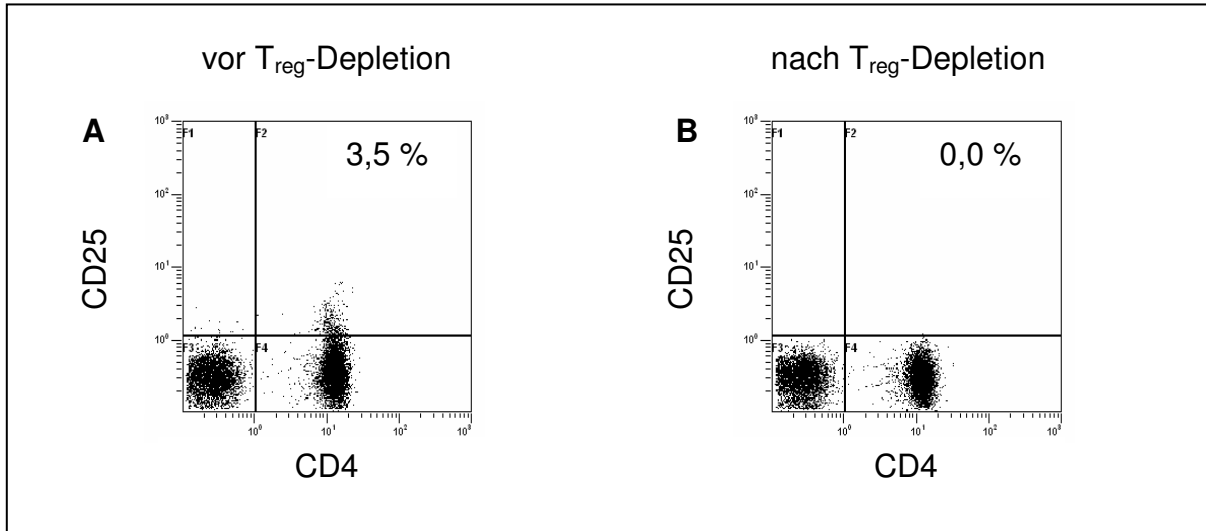
### 3.4.2 Proband V

Zunächst wurde die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 auf den DC vor und nach Hinzugabe von Zytokinen bzw. Liganden untersucht. Die Expression von CD83 war nach Inkubation im Zytokincocktail auf 80 % der DC messbar (Abbildung 13A), nach Inkubation mit Liganden nur auf 34 % der DC (Abbildung 13D). Das Maximum der Kurve verschob sich unabhängig von der angewandten Ausreifungsmethode von 0,8 rE vor auf 15 rE nach Ausreifung. Die Expression von CD80 betrug sowohl bei Inkubation mit Zytokinen als auch mit Liganden vor Ausreifung 5 rE, nach Ausreifung stieg sie auf 20 rE (Abbildung 13B und E). Eine Expression von CD86 zeigte sich nach Ausreifung auf 87 % der zytokingereiften (Abbildung 13C) und auf 35 % der ligandengereiften DC (Abbildung 13F). Das Maximum der Kurve lag vor Ausreifung bei 1,5 rE, nach Zytokinreifung bei 100 rE und nach Ligandenreifung bei 30 rE.

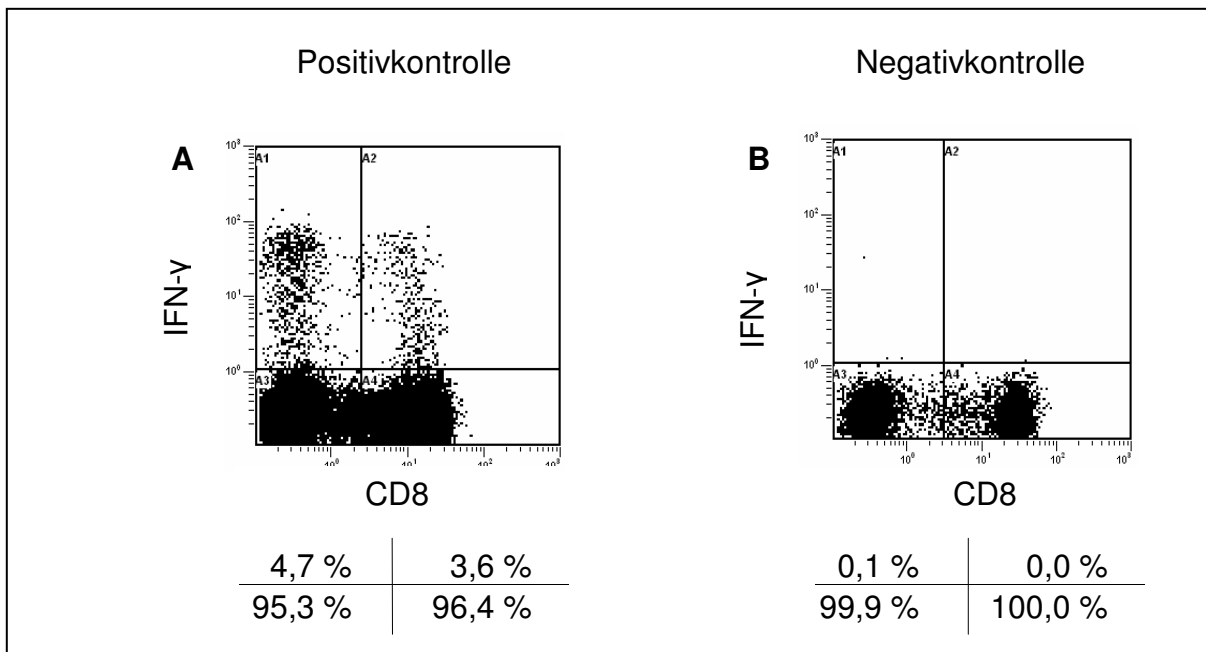


**Abbildung 13: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Probanden V.** (1) zytokingereifte, hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladene DC. (2) ligandengereifte, hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladene DC. Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.

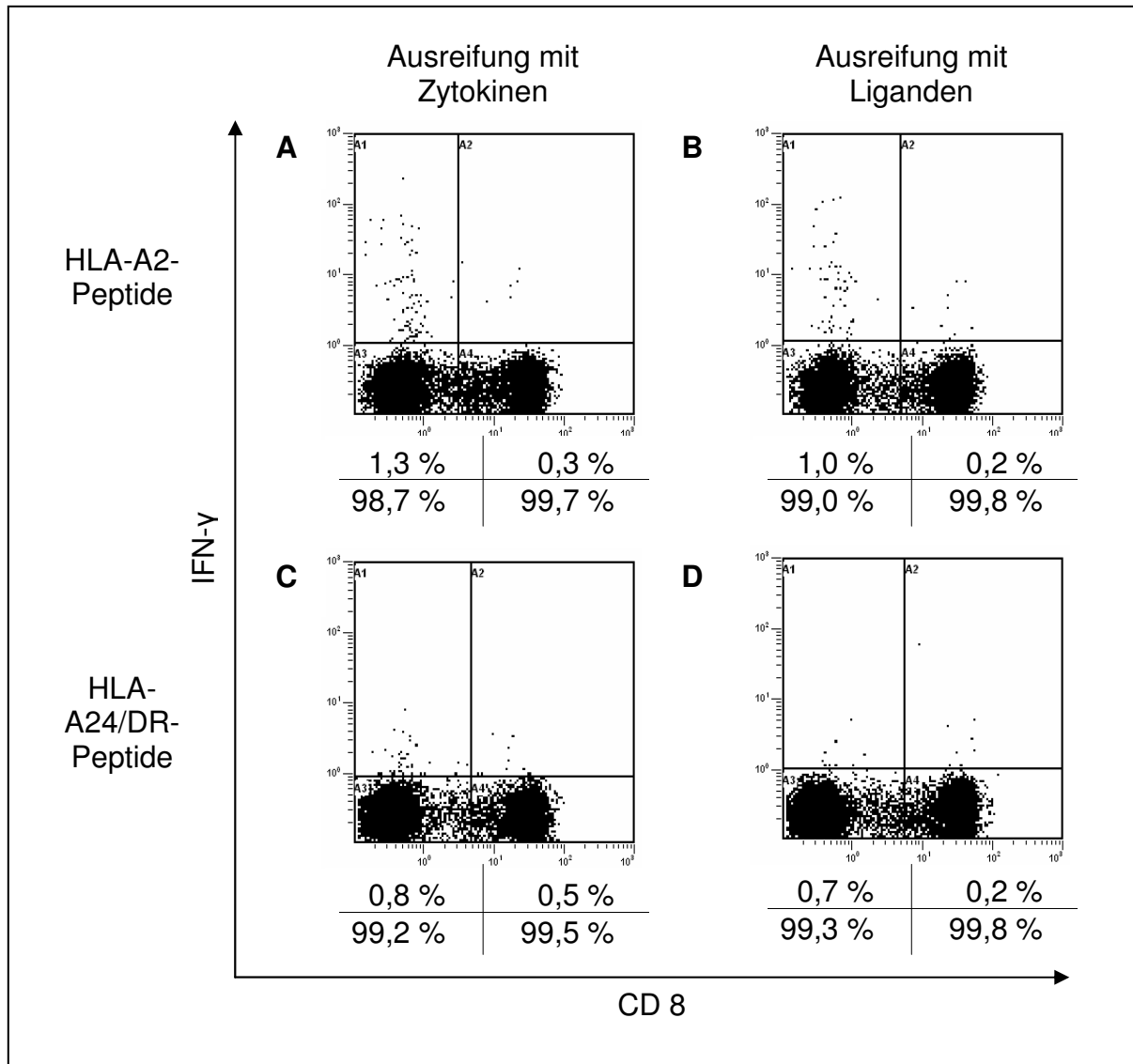
Die regulatorischen T-Lymphozyten waren vor Beginn der Zellkultur von 3,5 % auf 0 % depletiert worden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Regulatorische T-Lymphozyten vor (A) und nach (B) Depletion bei Proband V.** Vor Depletion der CD25<sup>+</sup> Zellen sind 3,5 % der T-Lymphozyten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen. Nach der Depletion sind keine regulatorischen T-Lymphozyten mehr enthalten.



**Abbildung 15: SEB-Positivkontrolle (A) und Negativkontrolle (B) bei Proband V.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 4,7 % der CD8<sup>-</sup> und 3,6 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. In den Negativkontrollen sind 0,1 % der CD8<sup>-</sup> und 0,0 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.



**Abbildung 16: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften (A, C) oder ligandengereiften (B, D) DC bei Proband V. (A, B) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2-peptidbeladenen (p540, p865, p988) DC. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladenen (p461, p672, p766) DC.**

Nach Stimulation der T-Lymphozyten mit SEB zeigte sich in der Positivkontrolle eine IFN- $\gamma$ -Produktion bei 4,7 % der CD8<sup>-</sup> T-Zellen und 3,6 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 15A). In den Negativkontrollen zeigte sich eine Aktivierung von 0,1 % der CD8<sup>-</sup> T-Lymphozyten und keine Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 15B).

Bei Proband V waren bei Stimulation mit HLA-A2-peptidbeladenen (p540, p865 und p988), zytokingereiften DC 1,2 % der CD8<sup>-</sup> und 0,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten hTERT-spezifisch aktiviert (Abbildung 16A). Bei Beladung der DC mit HLA-A2-Peptiden (p540, p865 und p988) und Ligandenreifung wurden 0,9 % bzw. 0,2 % IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, hTERT-spezifische Zellen gemessen (Abbildung 16B). Bei Beladung der DC mit HLA-A24/DR-Peptiden (p461, p672 und p766) und Zytokinreifung betrug der

Anteil hTERT-spezifischer, IFN- $\gamma^+$  T-Lymphozyten 0,7 % der CD8 $^-$  bzw. 0,5 % der CD8 $^+$  Zellen (Abbildung 16C) und bei Ligandenreifung 0,6 % bzw. 0,2 % (Abbildung 16D).

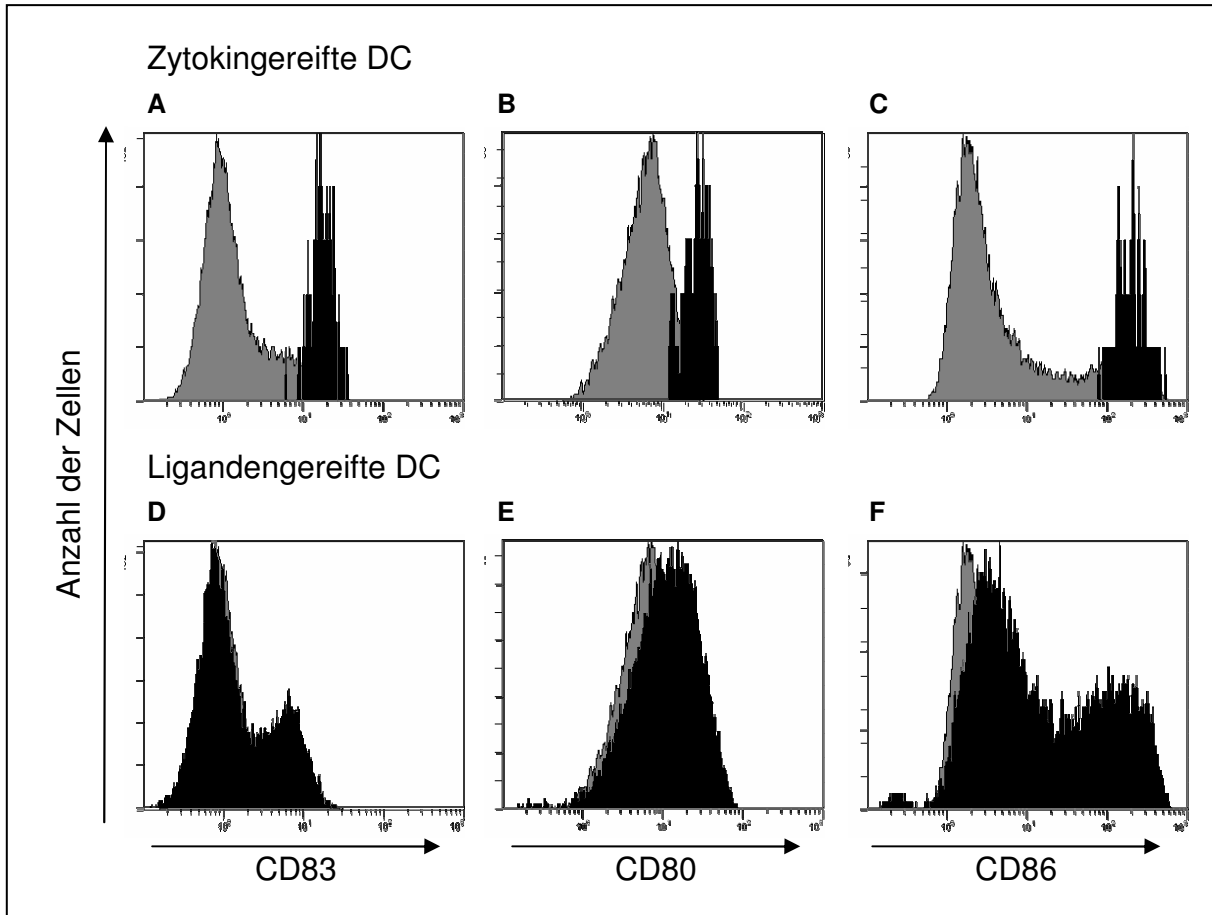
### **3.5 Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten mit zytokin- bzw. ligandengereiften DC bei Patienten mit NSCLC**

#### **3.5.1 Patient A**

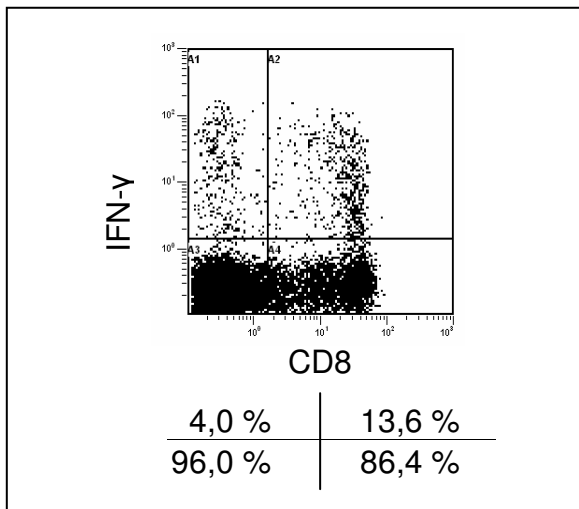
Das HLA-Muster des Patienten A enthielt die Moleküle HLA-A24, -DR7 und -DR15. Die DC waren daher mit den Peptiden p461, p766 und p672 beladen und anschließend entweder mit Liganden oder mit Zytokinen ausgereift worden.

CD83 wurde nach Inkubation der DC im Zytokincocktail auf allen Zellen vermehrt exprimiert, das Maximum der Kurve verschob sich nach Ausreifung auf 20 rE (Abbildung 17A), nach Ausreifung mit Liganden erreichte ein Teil der Zellen eine Fluoreszenzintensität von 9 rE, zwei Drittel der Zellen zeigte jedoch keine vermehrte Expression von CD83 (Abbildung 17D). Das Maximum der Expression von CD80 betrug auf unreifen Zellen 10 rE, auf ligandengereiften DC etwa 15 rE (Abbildung 17E) und auf zytokingereiften DC etwa 30 rE (Abbildung 17B). CD86 war nach der Reifung auf allen zytokingereiften, aber nur auf 40 % der ligandengereiften Zellen hochreguliert (Abbildung 17C und F). Die ligandengereiften DC zeigten eine sehr variable Expression von CD86, die zytokingereiften DC zeigten eine einheitliche Vermehrung von CD86 auf der Zelloberfläche um zwei Zehnerpotenzen.

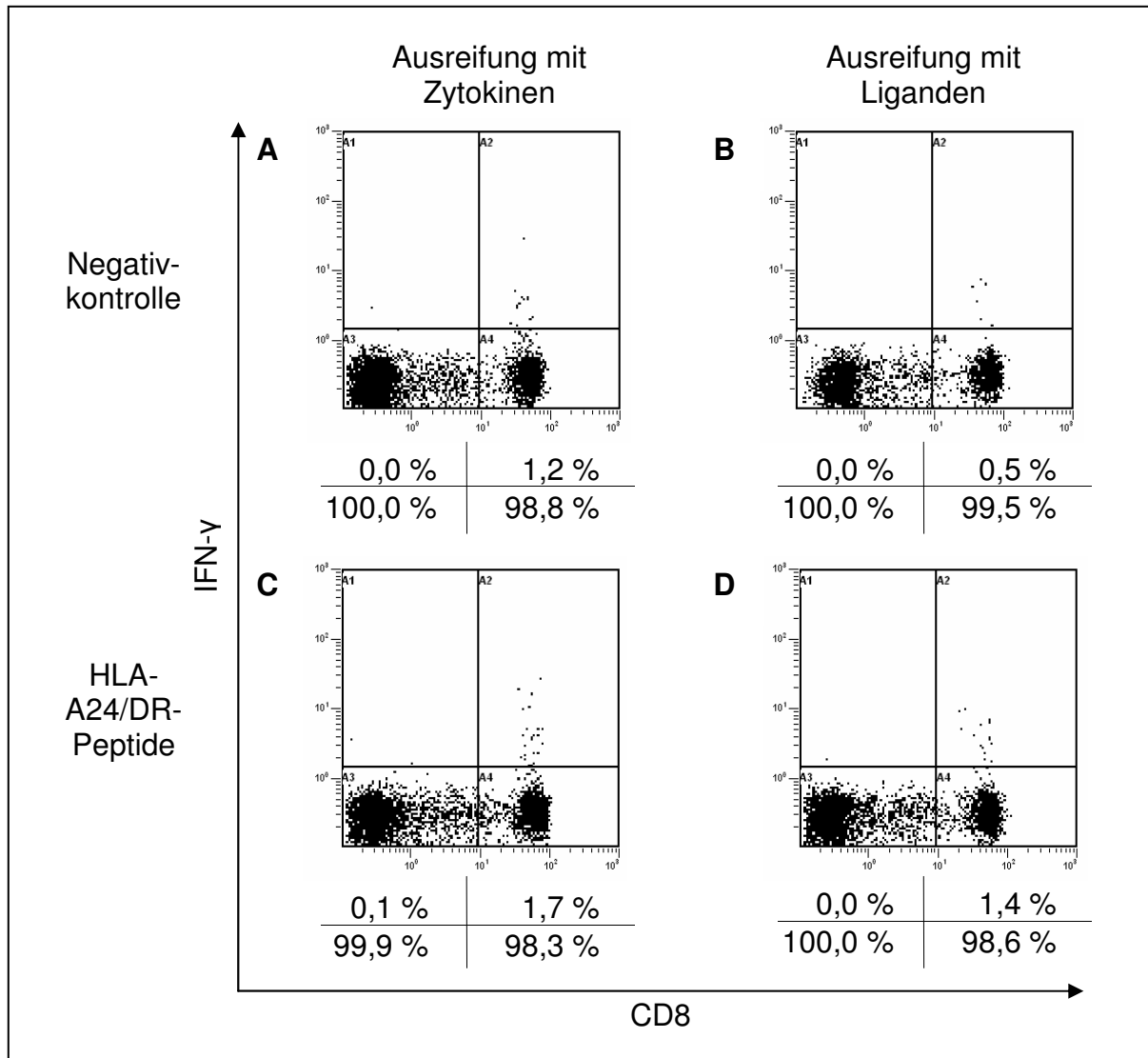
Die regulatorischen T-Lymphozyten waren vor Beginn der Kultur durch Depletion auf 0,1 % der T-Zellen reduziert worden. In der IFN- $\gamma$ -Messung zeigte sich in beiden Negativkontrollen eine unspezifische Aktivierung von CD8 $^+$  Zellen (Abbildung 19A und B). Diese betrug bei Hinzugabe von unbeladenen, zytokingereiften DC 1,2 %, bei Hinzugabe von unbeladenen, ligandengereiften DC 0,5 %. Daraus ergab sich eine hTERT-spezifische Aktivierung von 0,5 % der CD8 $^+$  T-Lymphozyten bei Stimulation mit hTERT-peptidbeladenen, zytokingereiften DC und 0,9 % bei Stimulation mit ligandengereiften DC (Abbildung 19C und D). Bei diesem Patienten waren in keinem Ansatz IFN- $\gamma^+$  CD8 $^-$  T-Zellen vorhanden. Die SEB-Positivkontrolle zeigte eine Aktivierung von 4 % der CD8 $^-$  und 13,6 % der CD8 $^+$  T-Lymphozyten (Abbildung 18).



**Abbildung 17: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Patienten A.** hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladene DC nach Ausreifung mit Zytokinen (A-C) und Liganden (D-F). Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.



**Abbildung 18: SEB-Positivkontrolle bei Patient A.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 4,0 % der CD8<sup>-</sup> und 13,6 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

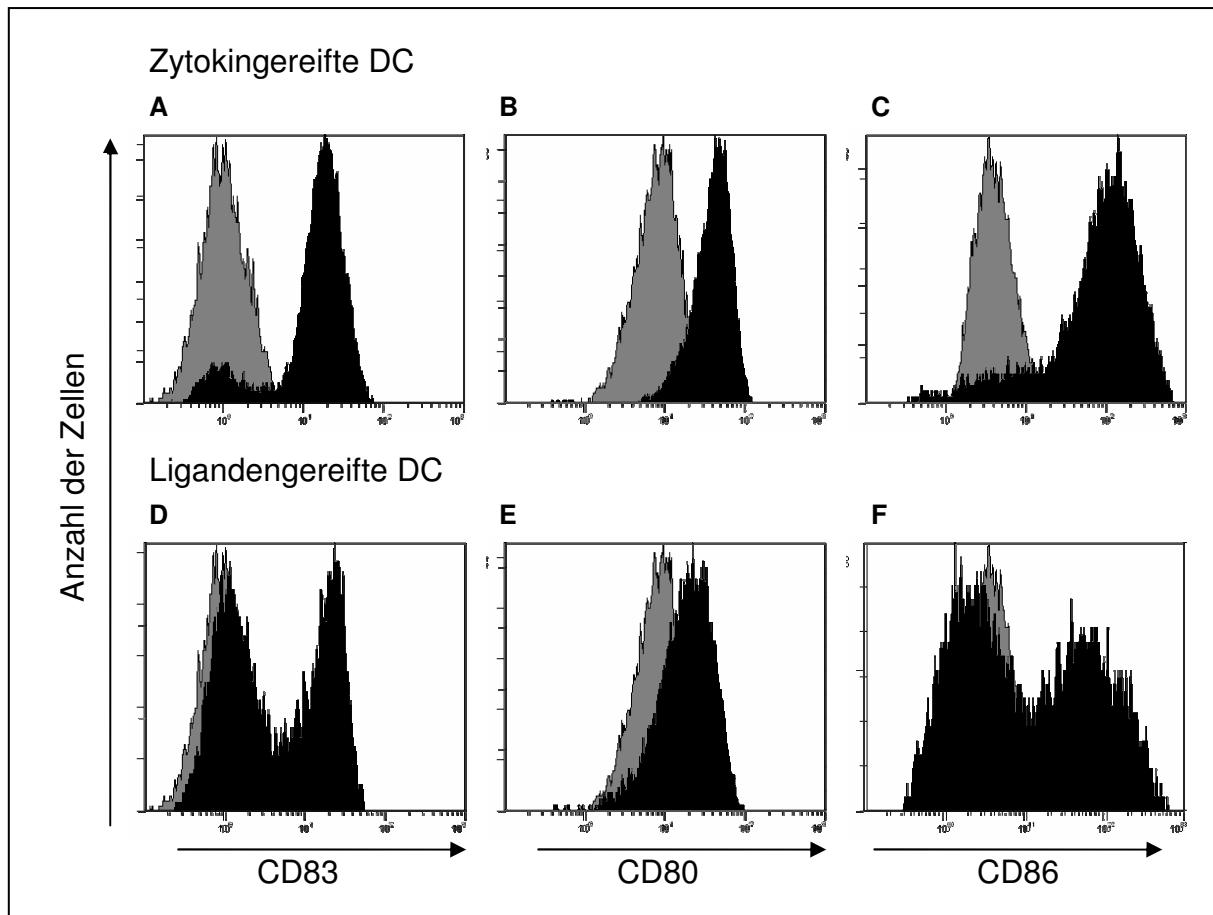


**Abbildung 19: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften (A, C) oder ligandengereiften (B, D) DC bei Patient A. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A24/DR-peptidbeladenen (p461, p672, p766), zytokin- oder ligandengereiften DC.**



### 3.5.2 Patient B

Das HLA-Muster des Patienten B enthielt das Molekül HLA-A2. Die DC waren daher mit den Peptiden p540, p988 und p865 beladen und anschließend entweder mit Liganden oder mit Zytokinen ausgereift worden.



**Abbildung 20: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Patienten B.** hTERT-HLA-A2-peptidbeladene DC nach Ausreifung mit Zytokinen (A-C) bzw. Liganden (D-F). Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.

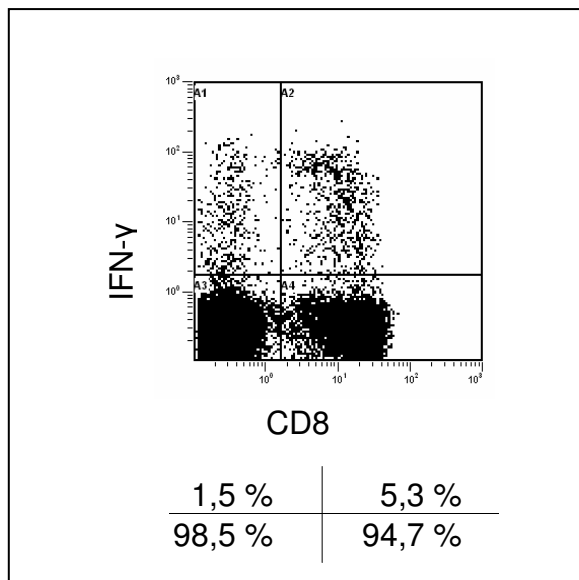
CD83 wurde nach Ausreifung auf 82 % der zytokingereiften DC exprimiert. Das Maximum der Kurve stieg von 0,9 rE vor auf 20 rE nach Ausreifung (Abbildung 20A). Nach Inkubation mit den Liganden exprimierte die Hälfte der DC CD83, die Kurve zeigte ebenfalls ein Maximum bei 20 rE nach Ausreifung (Abbildung 20D). Die Expression von CD80 war auf allen Zellen nach Ausreifung verstärkt, das Maximum der Kurve verschob sich von 9 rE vor der Ausreifung auf 50 rE nach Zytokinreifung (Abbildung 20B) und auf 25 rE nach Ligandenreifung (Abbildung 20E). CD86 wurde auf 85 % der zytokingereiften DC vermehrt exprimiert (Abbildung 20C), jedoch nur

auf der Hälfte der ligandengereiften (Abbildung 20F). Es bestand eine breite Streuung in der Expression dieses Oberflächenmarkers nach der Ausreifung der DC mit Liganden von kleiner 1 rE bis 500 rE.

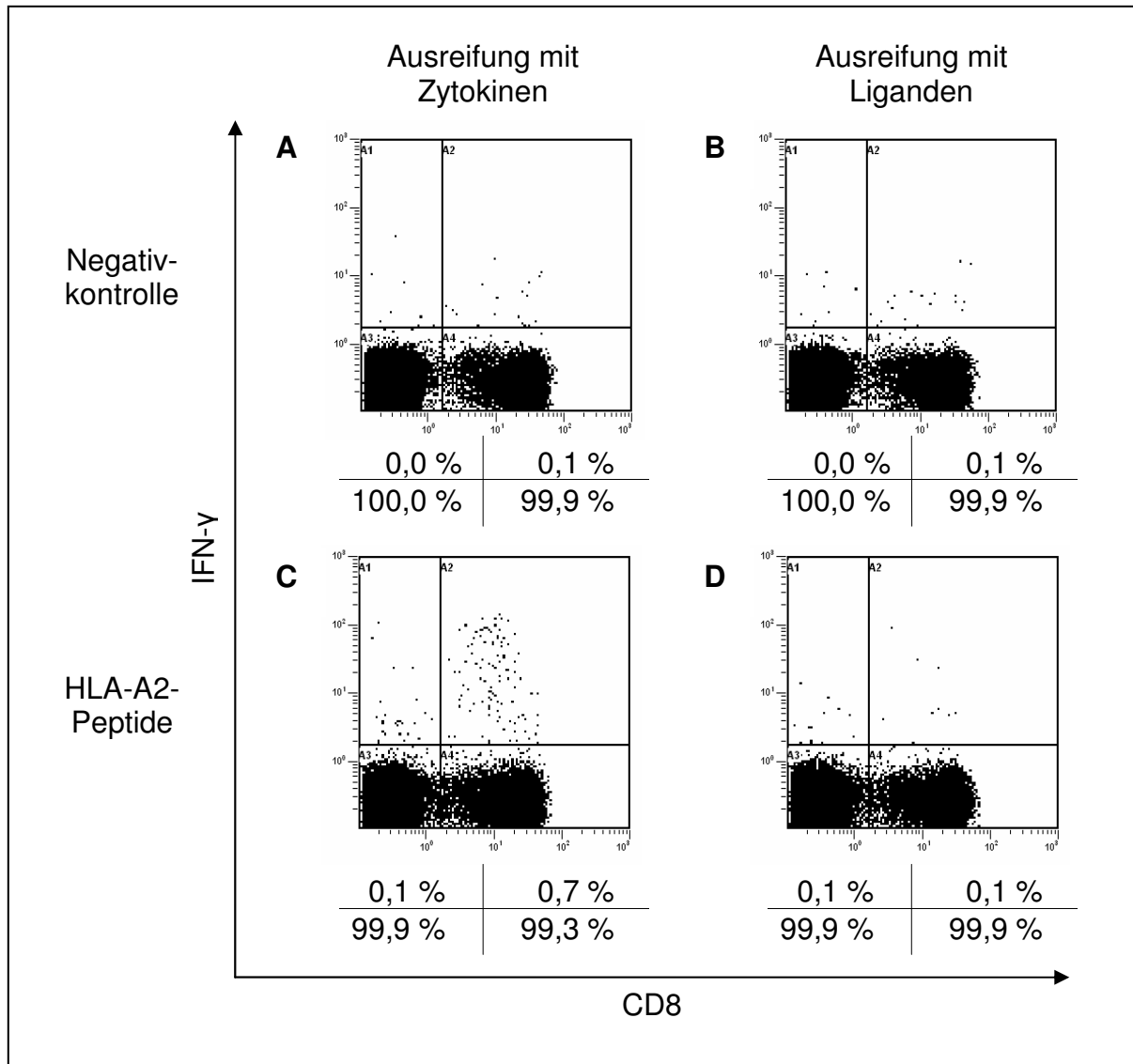
Die regulatorischen T-Lymphozyten waren vor Beginn der Zellkultur entfernt worden. Die Frequenz dieser Zellen wurde von 1,3 % vor Depletion auf 0,2 % nach Depletion gesenkt.

Schon während der Kultivierung war mikroskopisch eine Abnahme der Zellzahl der T-Lymphozyten, die mit ligandengereiften DC stimuliert wurden, sichtbar. Die Zahl der T-Lymphozyten, die mit zytokingereiften DC stimuliert worden waren, nahm ab Tag 8 zu.

In der SEB-Positivkontrolle waren 1,5 % der CD8<sup>-</sup> und 5,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktiviert und produzierten IFN- $\gamma$  (Abbildung 21). In den Negativkontrollen befanden sich keine IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> und 0,1 % IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 22A und B). Nach Stimulation mit zytokingereiften, peptidbeladenen DC waren 0,1 % der CD8<sup>-</sup> und 0,6 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hTERT-spezifisch aktiviert und produzierten IFN- $\gamma$  (Abbildung 22C). Bei Stimulation mit ligandengereiften, peptidbeladenen DC war lediglich bei CD8<sup>-</sup> T-Lymphozyten eine spezifische Aktivierung erkennbar, diese betrug 0,1 % (Abbildung 22D).



**Abbildung 21: SEB-Positivkontrolle bei Patient B.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 1,5 % der CD8<sup>-</sup> und 5,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.



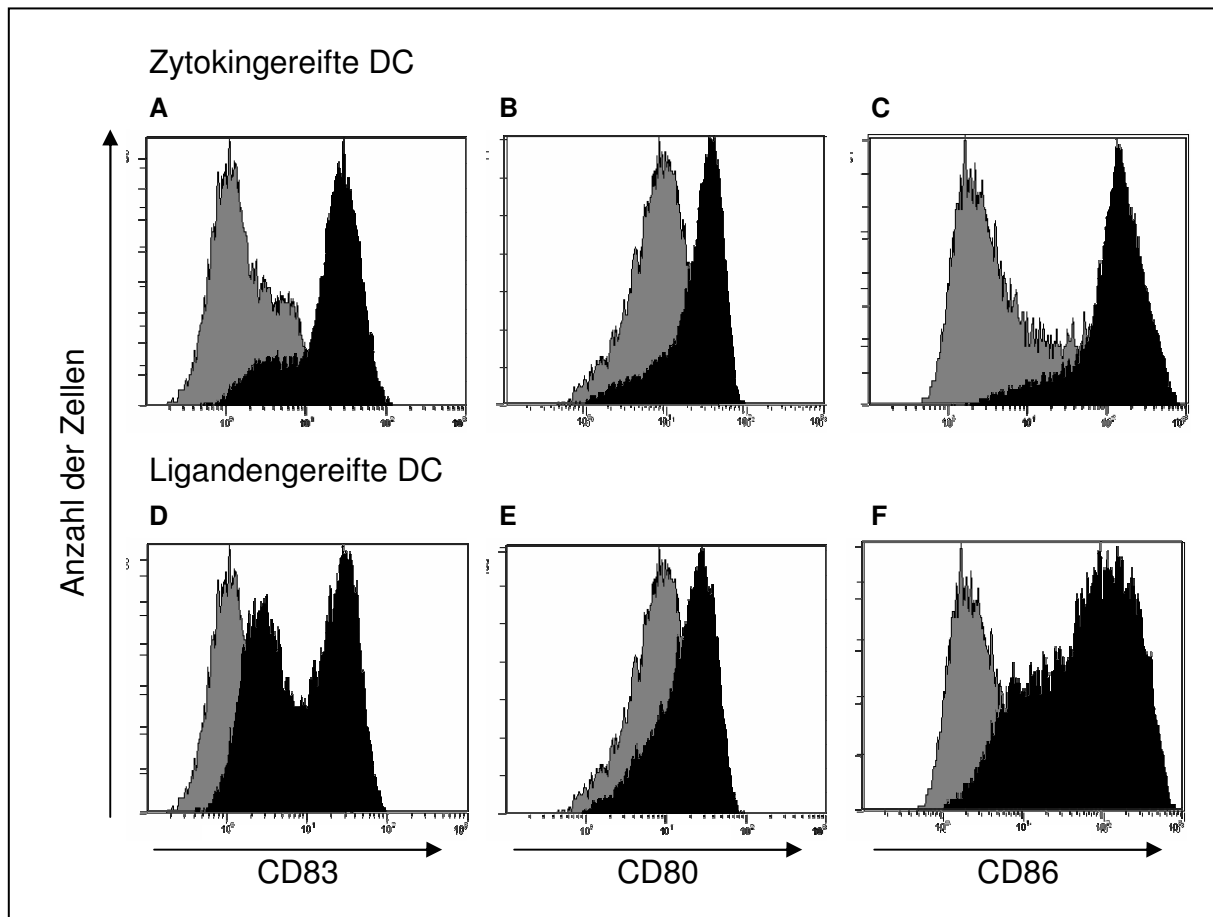
**Abbildung 22: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften (A, C) oder ligandengereiften (B, D) DC bei Patient B. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2-peptidbeladenen (p540, p865, p988), zytokin- oder ligandengereiften DC.**

### 3.5.3 Patient C

Das HLA-Muster des Patienten C enthielt die Moleküle HLA-A2 und -DR7. Die DC waren daher mit den Peptiden p540, p865, p988 und p672 beladen und anschließend mit Liganden oder mit Zytokinen ausgereift worden.

Nach Zugabe der Zytokine oder der Liganden zeigte sich eine verstärkte Expression des Reifungsmarkers CD83. Eine Fluoreszenzintensität größer 10 rE erreichten bei Zytokinreifung 80 % der DC (Abbildung 23A), bei Ligandenreifung 50 % der DC (Abbildung 23D). Bei der Expression des Oberflächenmoleküls CD80 verschob sich das Maximum der Kurve von 8 rE vor der Ausreifung auf 40 rE nach Zytokinreifung

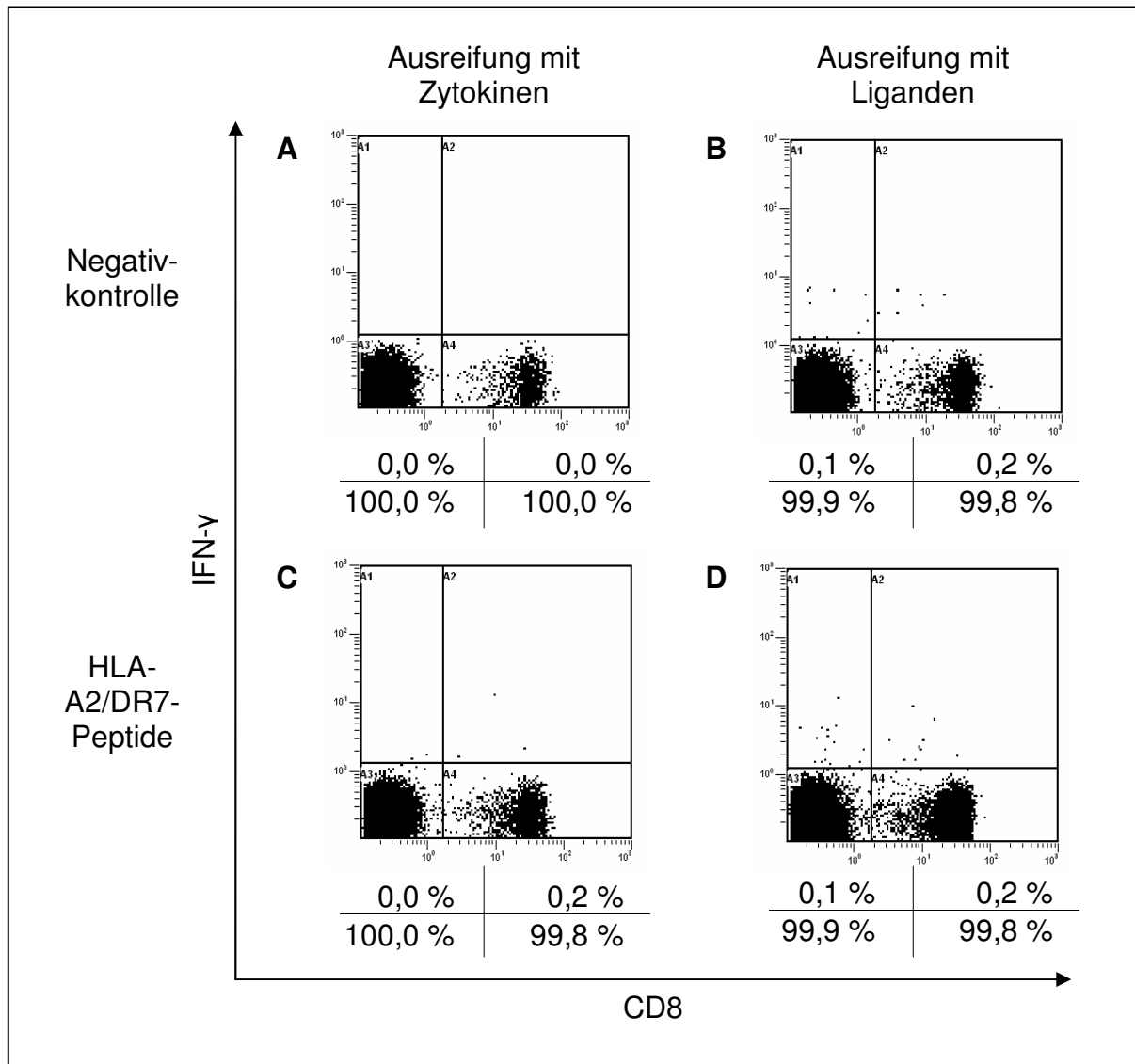
(Abbildung 23B) und auf 20 rE nach Ligandenreifung (Abbildung 23E). Bei CD86 zeigte sich eine Verschiebung des Maximums der Kurve von 2 rE vor der Ausreifung auf 150 rE nach Zytokinreifung der DC (Abbildung 23C). Nach Inkubation mit den Liganden erreichte das Maximum der Kurve ebenfalls 150 rE, die Fluoreszenzintensität von CD86 war jedoch weiter gestreut (Abbildung 23F).



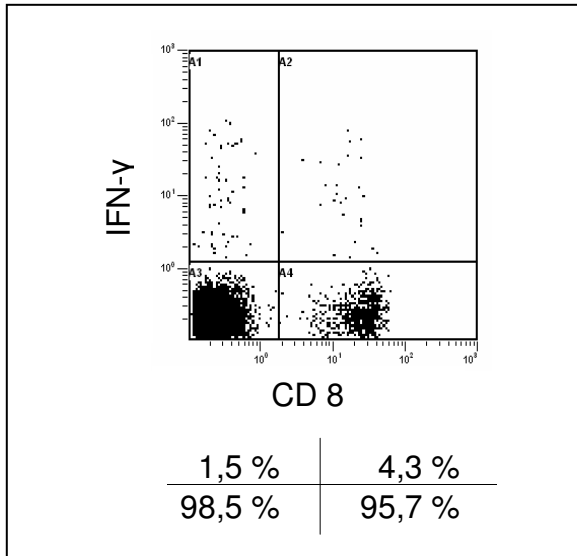
**Abbildung 23: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Patienten C.** hTERT-HLA-A2/DR7-peptidbeladene DC nach Ausreifung mit Zytokinen (A-C) und Liganden (D-F). Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.

Während der Kultivierung war aufgefallen, dass die Zellzahl konstant abnahm, der Boden der Platte blieb jedoch weitgehend bedeckt. Es war unter dem Mikroskop zu keiner Zeit eine Zunahme der Zelldichte zu erkennen. In der Negativkontrolle zeigte sich nach Stimulation mit zytokingereiften DC keine Aktivierung von T-Lymphozyten (Abbildung 24A). Nach Stimulation mit ligandengereiften DC waren 0,1 % der CD8<sup>-</sup> und 0,2 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen unspezifisch aktiviert (Abbildung 24B). Bei Stimulation mit peptidbeladenen, zytokingereiften DC betrug der Anteil der hTERT-spezifisch

aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten 0,2 %, bei den CD8<sup>-</sup> Zellen war keine Aktivierung erkennbar (Abbildung 24C). Nach Stimulation mit ligandengereiften DC waren 0,1 % der CD8<sup>-</sup> und 0,2 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, dies entsprach der in der Negativkontrolle gemessenen unspezifischen Aktivierung (Abbildung 24D). In der Positivkontrolle waren 1,5 % der CD8<sup>-</sup> und 4,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Abbildung 25).



**Abbildung 24: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften (A, C) oder ligandengereiften (B, D) DC bei Patient C. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2/DR7-peptidbeladenen (p540, p865, p988, p672), zytokin- oder ligandengereiften DC.**

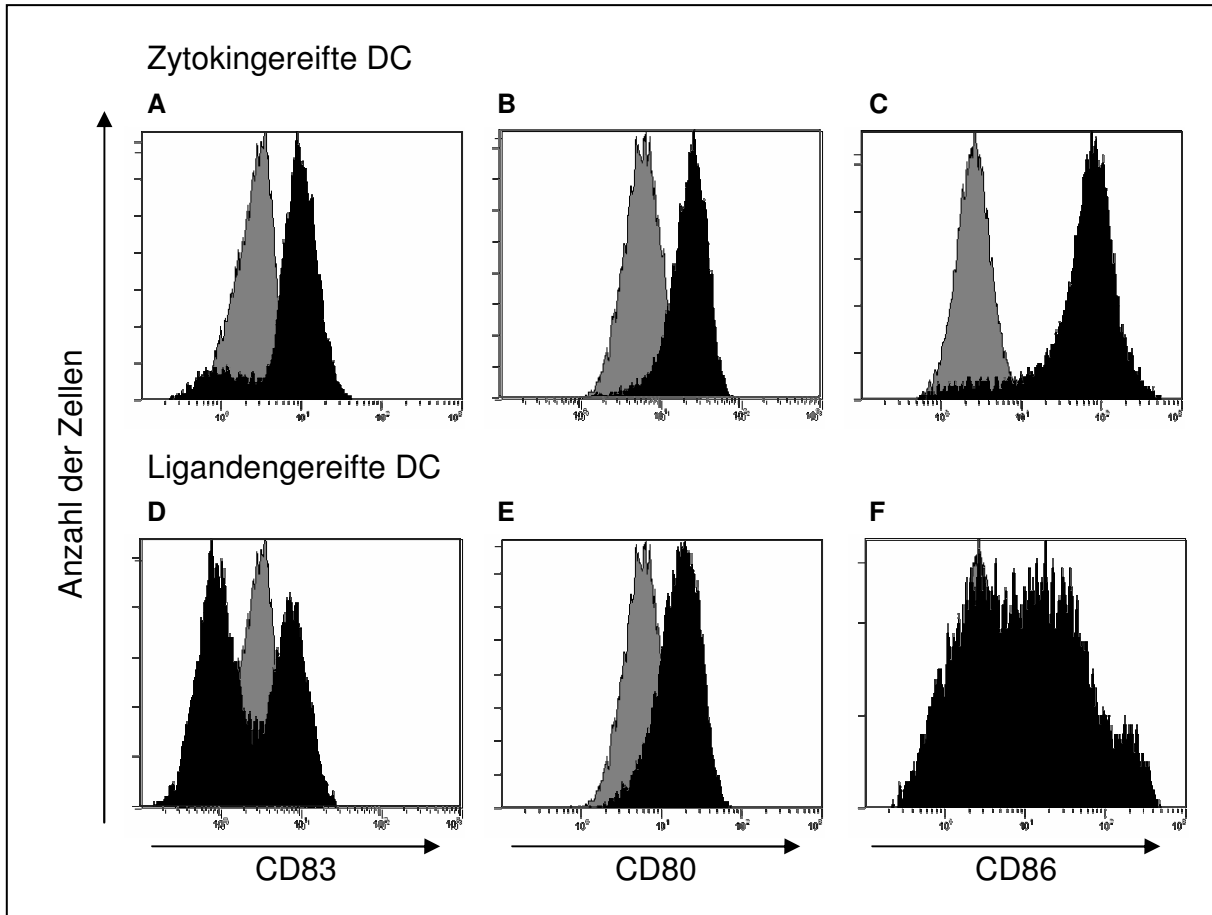


**Abbildung 25: SEB-Positivkontrolle bei Patient C.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 1,5 % der CD8<sup>-</sup> und 4,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

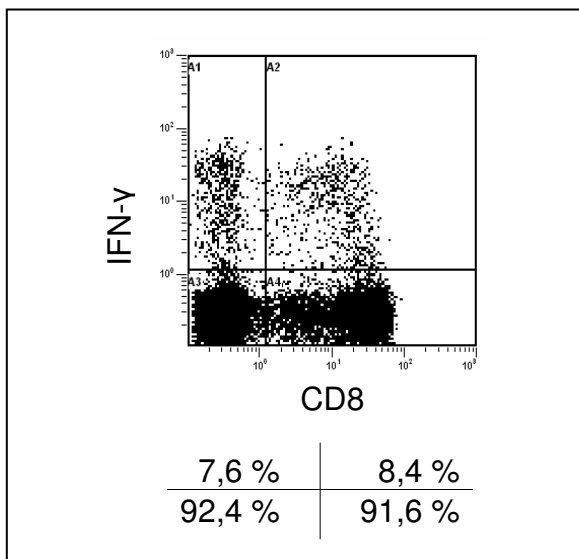
### 3.5.4 Patient D

Das HLA-Muster des Patienten D enthielt die Moleküle HLA-A2 und -A24. Die DC waren daher mit den Peptiden p540, p865, p988 und p461 beladen und anschließend mit Liganden oder mit Zytokinen ausgereift worden.

Auch bei diesem Patienten bewirkte die Ausreifung mit Zytokinen eine stärkere Expression der Oberflächenmoleküle als die Ausreifung mit Liganden (Abbildung 26). CD83 zeigte auf 84 % der DC nach Ausreifung mit Zytokinen eine Fluoreszenzintensität größer 3 rE (Abbildung 26A), bei Ausreifung mit Liganden zeigten nur 34 % der DC eine Fluoreszenzintensität größer 3 rE (Abbildung 26D). Bei der Expression des Oberflächenmoleküls CD80 verschob sich das Maximum der Kurve von 5 rE vor der Ausreifung auf 25 rE nach Zytokinreifung (Abbildung 26B) und auf 20 rE nach Ligandenreifung (Abbildung 26E). Für CD86 lag das Maximum der Kurve vor Ausreifung bei 3 rE, nach Reifung mit Zytokinen bei 100 rE (Abbildung 26C). Die Kurve der ligandengereiften DC war breitbasig und flach, ein Maximum war nicht erkennbar (Abbildung 26F). Die Werte der Fluoreszenzintensität von CD86 nach Ligandenreifung waren weit gestreut und reichten von 0,2 rE bis 500 rE.

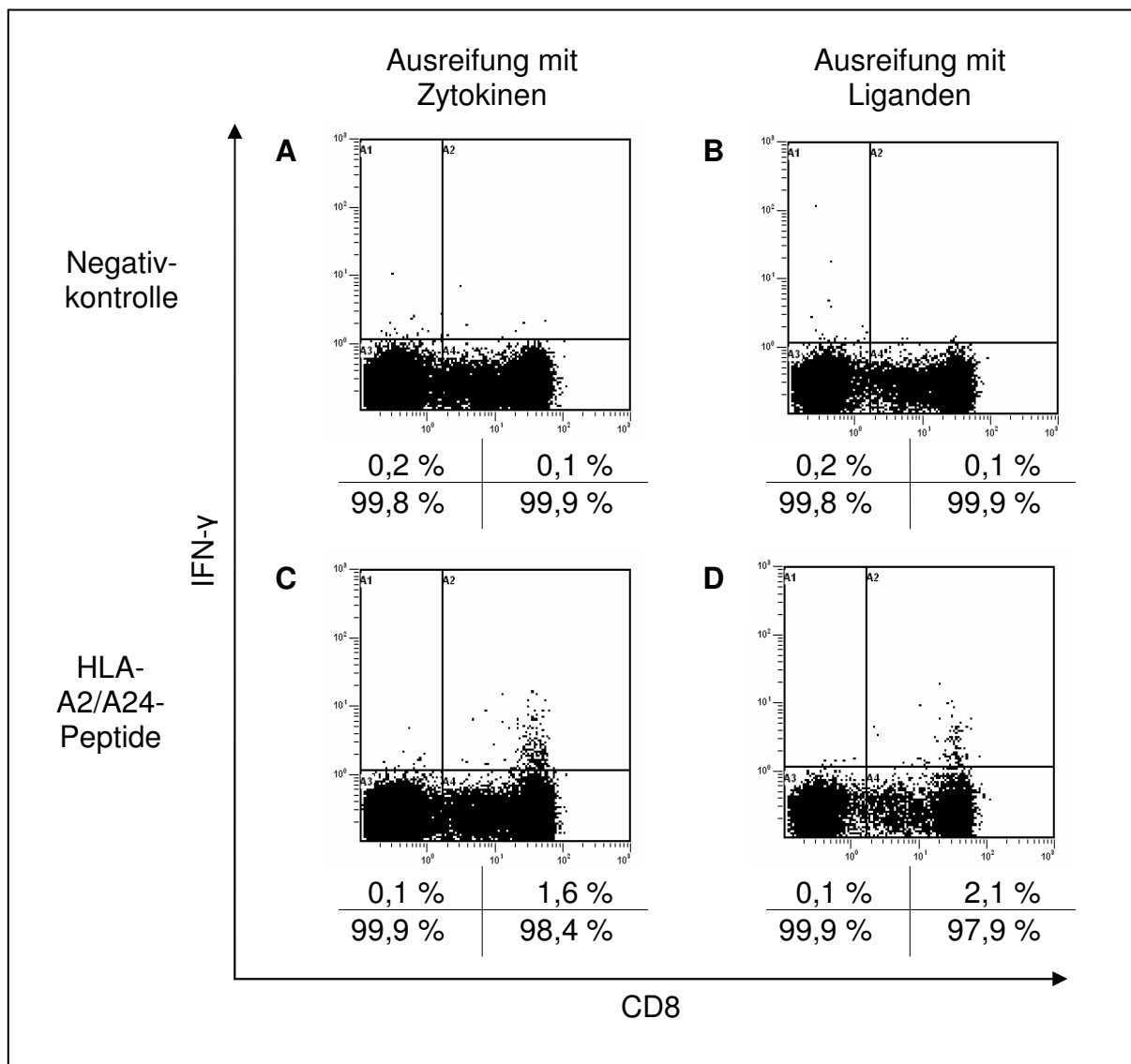


**Abbildung 26: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Patienten D.** hTERT-HLA-A2/A24-peptidbeladene DC nach Ausreifung mit Zytokinen (A-C) und Liganden (D-F). Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.



**Abbildung 27: SEB-Positivkontrolle bei Patient D.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 7,6 % der CD8<sup>-</sup> und 8,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

Nach Depletion der regulatorischen T-Zellen betrug die Anzahl unspezifisch aktivierter T-Lymphozyten in den Negativkontrollen 0,2 % der CD8<sup>-</sup> und 0,1 % der CD8<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 28A und B). Die hTERT-spezifische Aktivierung betrug nach Stimulation mit peptidbeladenen, zytokingereiften DC 1,5 % und nach Stimulation mit peptidbeladenen, ligandengereiften DC 2,0 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 28C und D). Die SEB-Kontrolle zeigte eine Aktivierung von 7,6 % der CD8<sup>-</sup> und 8,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 27).



**Abbildung 28: Aktivierung von T<sub>reg</sub>-depletierten T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokingereiften (A, C) oder ligandengereiften (B, D) DC bei Patient D. (A, B) Negativkontrollen. (C, D) T-Lymphozyten nach Stimulation mit hTERT-HLA-A2/A24-peptidbeladenen (p540, p865, p988, p461), zytokin- oder ligandengereiften DC.**

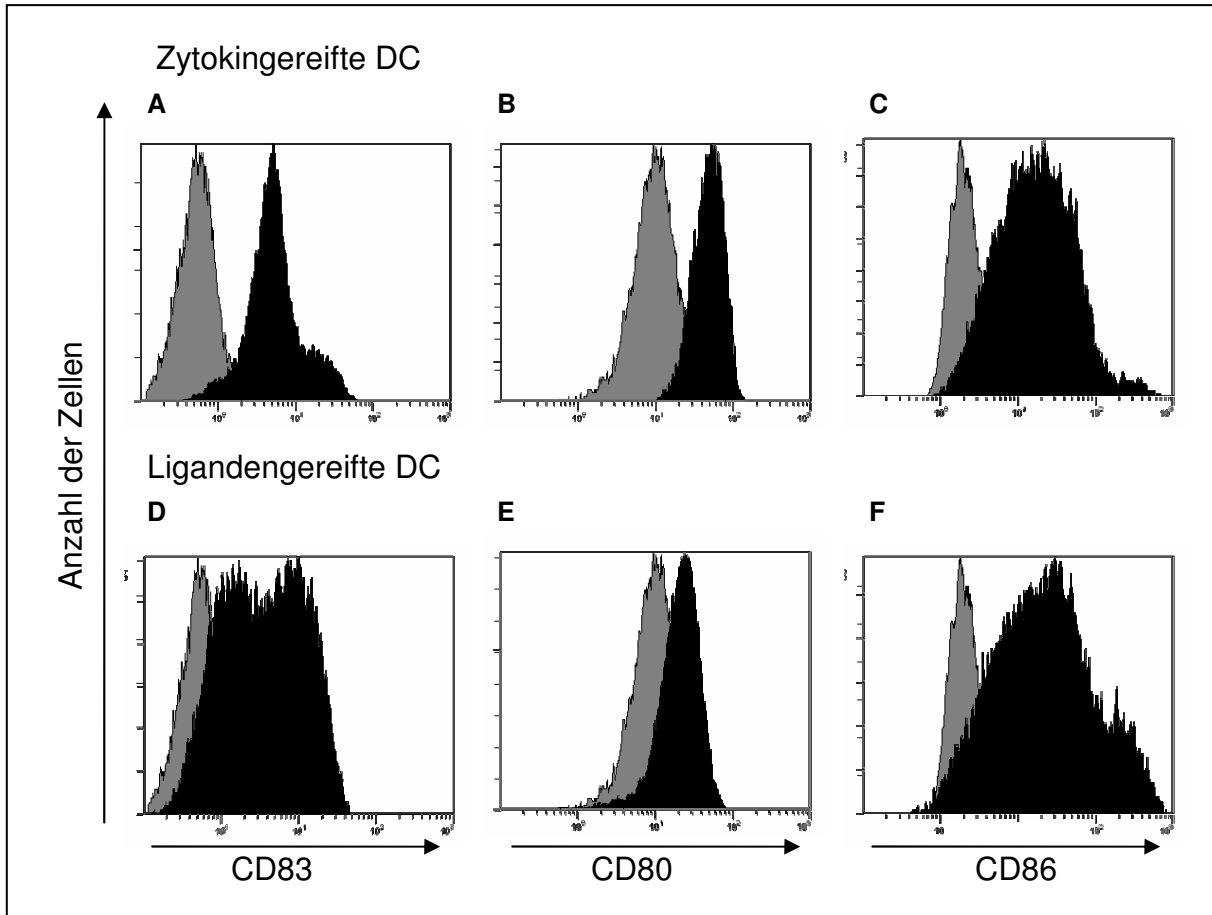


### 3.5.5 Patient E

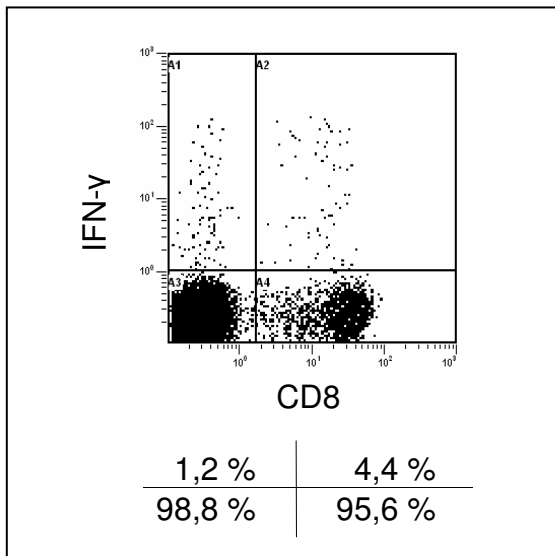
Das HLA-Muster des Patienten E enthielt das Molekül HLA-A2. Die DC waren daher mit den Peptiden p540, p865 und p988 beladen und anschließend mit Liganden oder mit Zytokinen ausgereift worden.

Eine Fluoreszenzintensität des CD83-Moleküls von größer 2 rE erreichten bei Zytokinreifung 91 % der DC (Abbildung 29A), bei Ligandenreifung nur 41 % der DC (Abbildung 29D). Der Wert, bei dem das Maximum der Kurve lag, verschob sich von 0,5 rE vor Ausreifung auf 6 rE bei Zytokinreifung. Bei Ligandenreifung war kein eindeutiges Maximum sichtbar. Die Expression von CD80 war unabhängig von der Methode der Ausreifung auf allen DC erhöht (Abbildung 29B und E). Das Maximum der Kurve verschob sich von 10 rE vor Ausreifung auf 50 rE nach Zytokinreifung und auf 25 rE nach Ligandenreifung. Die Fluoreszenzintensität von CD86 zeigte auf 87 % der zytokingereiften DC (Abbildung 29C) und auf 83 % der ligandengereiften DC (Abbildung 29F) einen Wert größer 3 rE. Die Werte der Fluoreszenzintensität nach Ausreifung sind breit gestreut und lagen zwischen 0,8 rE und 700 rE nach Zytokinreifung und zwischen 0,4 rE und 800 rE nach Ligandenreifung.

Nach vollständiger Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten waren die T-Zellen kultiviert und regelmäßig stimuliert worden. Bereits ab Tag 5 der Kultur war mikroskopisch eine Verringerung der Zelldichte aufgefallen. Der Boden eines Lochs einer 96-Loch-Platte war am letzten Tag nicht mehr vollständig bedeckt. Bei den Messungen konnten nur noch etwa 2000 T-Lymphozyten pro Ansatz im Durchflusszytometer bewertet werden. Eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch die wiederholte Stimulation mit peptidbeladenen DC war dabei nicht erkennbar (ohne Abbildung). Die SEB-Probe zeigte eine Aktivierung von 1,2 % der CD8<sup>-</sup> und 4,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 30).



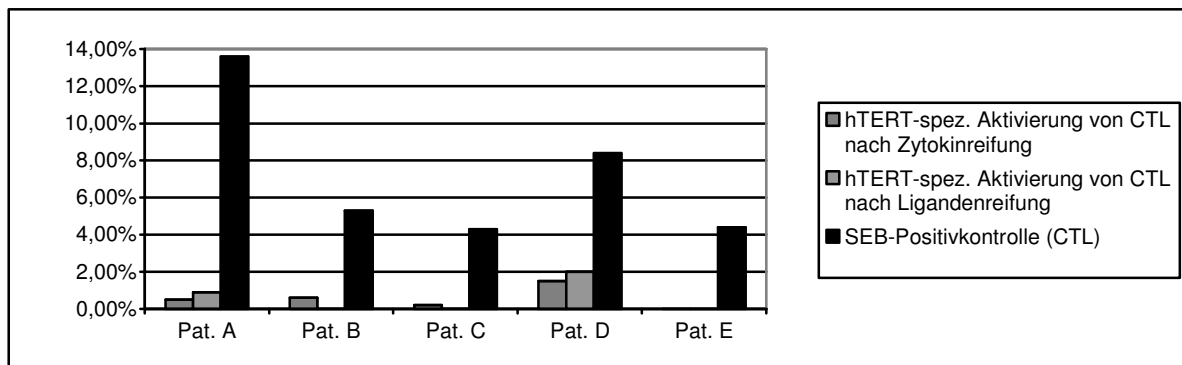
**Abbildung 29: Expression der Oberflächenmoleküle CD83 (A, D), CD80 (B, E) und CD86 (C, F) auf den dendritischen Zellen des Patienten E.** hTERT-HLA-A2-peptidbeladene DC nach Ausreifung mit Zytokinen (A-C) und Liganden (D-F). Graue Kurven zeigen die Intensität des jeweiligen Fluoreszenzsignals vor Ausreifung, schwarze Kurven zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals nach Ausreifung.



**Abbildung 30: SEB-Positivkontrolle bei Patient E.** Nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten sind in der SEB-Kontrolle 1,2 % der CD8<sup>-</sup> und 4,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

### 3.5.6 Zusammenfassung der Aktivierung von T-Lymphozyten bei Patienten mit NSCLC

Eine Übersicht über die Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten sowie die Aktivierung der Zellen durch SEB (Positivkontrolle) zeigt Abbildung 31. Die unspezifische Aktivierung von CTL durch SEB bei Patient A liegt bei 13,6 %, die hTERT-spezifische Aktivierung durch zytokin- bzw. ligandengereifte DC liegt bei 0,5 bzw. 0,9 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Bei Patient B wurde durch SEB eine unspezifische Aktivierung von 5,3 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erreicht, 0,6 % konnten durch zytokingereifte DC hTERT-spezifisch aktiviert werden. Bei Patient C konnte durch zytokingereifte DC eine hTERT-spezifische Aktivierung von 0,2 % erreicht werden, durch SEB eine unspezifische Aktivierung von 4,3 %. Bei Patient D wurden 8,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen unspezifisch durch SEB und 1,5 bzw. 2,0 % hTERT-spezifisch durch zytokin- bzw. ligandengereifte DC aktiviert. Eine hTERT-spezifische Aktivierung konnte bei Patient E nicht nachgewiesen werden, die unspezifische Aktivierung durch SEB lag bei 4,4 %.



**Abbildung 31: Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit zytokin- bzw. ligandengereiften DC und SEB-Positivkontrolle bei den Patienten A bis E.** Dunkelgrau dargestellt ist die hTERT-spezifische Aktivierung von CTL nach Zytokinreifung, hellgrau die hTERT-spezifische Aktivierung nach Ligandenreifung und schwarz die unspezifische Aktivierung durch SEB.

## 4 Diskussion

### 4.1 Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten

Der Nachweis einer antigenspezifischen Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit durch intrazelluläre Färbung des Zytokins IFN- $\gamma$  geführt. Um diese Methode im Labor zu etablieren, wurde als Antigen zunächst nicht hTERT verwendet, sondern das stark immunogene pp65, ein Antigen des Zytomegalievirus (CMV). Die DC wurden mit dem vollständigen pp65-Protein, einem Peptidmix oder dem Einzelpeptid NLVPMVATV beladen.

Es wurde bei zwei CMV<sup>+</sup>, gesunden Probanden versucht, CMV-spezifische T-Lymphozyten zu aktivieren. Mit dem CMV-Peptidmix konnten bei Proband I 2,7 % CD8<sup>-</sup> und 5,2 % CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch aktiviert werden. Bei Stimulation mit CMV-proteinbeladenen DC wurden bei beiden Spendern erfolgreich T-Lymphozyten aktiviert, bei Proband II war der Anteil spezifischer IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten mit 19,1 % der CD8<sup>-</sup> und 19,1 % der CD8<sup>+</sup> Zellen höher als bei Proband I.

Bei Beladung der DC mit dem CMV-NLVPMVATV-Peptid konnte bei Proband I nur 0,1 % CMV-spezifische CTL nachgewiesen werden. Bei Proband II gelang es, 1,6 % CMV-spezifische CTL zu aktivieren. Im Vergleich zu den T-Lymphozyten, die durch protein- oder peptidmixbeladene DC stimuliert wurden, ist die Anzahl spezifisch aktivierter Zellen gering.

Ursache ist, dass bei Verwendung nur einer einzelnen immunogenen Sequenz nur die Subpopulation der T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor für das Peptid NLVPMVATV aktiviert wird. Die starke Aktivierung von T-Lymphozyten mit CMV-Protein und -Peptidmix ist darauf zurück zu führen, dass in diesen Substanzen viele unterschiedliche Antigene enthalten sind. Das bedeutet, dass T-Lymphozyten mit unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren aktiviert und mehrere Klone gebildet werden können. Um diese Aussage zu verifizieren, könnten zum Beispiel bei den aktivierten T-Lymphozyten DNA-Sequenzierungen des Genortes für den T-Zell-Rezeptor durchgeführt werden.

## **4.2 Depletion regulatorischer T-Lymphozyten**

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen mit hTERT wurden die CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, regulatorischen T-Lymphozyten (T<sub>reg</sub>) depletiert. Die Restfrequenz dieser Zellen in den Kulturen betrug zwischen 0,0 % und 0,2 %. Beim gesunden Probanden III gelang es, durch die T<sub>reg</sub>-Depletion bis zu 1,1 % mehr hTERT-spezifische T-Helfer-Zellen und bis 0,3 % mehr CTL als ohne T<sub>reg</sub>-Depletion zu aktivieren.

Regulatorische T-Lymphozyten haben die Aufgabe, eine Aktivierung des Immunsystems gegen körpereigene Antigene, zu denen auch hTERT gehört, zu verhindern. Nishikawa et al. haben gezeigt, dass eine de novo Immunantwort durch T-Helfer-Zellen gegen das körpereigene Tumorantigen NY-ESO-1 erst nach Depletion der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen erfolgte (Nishikawa et al., 2005). Auch bei Asemissen et al. gelang die Aktivierung von T-Lymphozyten gegen den Transkriptionsfaktor WT1 erst nach Depletion der regulatorischen T-Zellen (Asemissen et al., 2006). Der Prozentsatz der aktivierten Lymphozyten war in zwei Versuchen mit 26,6 % bzw. 29,3 % nach Depletion zehnmal höher als bei Stimulation unfraktionierter PBMC (0,4 bzw. <3 %). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei allen weiteren Versuchen die Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten durchgeführt.

## **4.3 Optimierung der hTERT-Peptidmenge zum Beladen der DC**

Um die optimale Menge des hTERT-Peptids zum Beladen der DC zu bestimmen, wurde die T-Zell-Aktivierung durch DC untersucht, die mit unterschiedlichen Mengen Peptid beladen worden waren. Die Peptide waren in reinem DMSO gelöst, das zytotoxisch wirkt. Es musste eine Peptid-Konzentration gefunden werden, die geeignet war, CTL zu stimulieren, ohne dass durch das enthaltene DMSO ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen eintrat. Der Versuch ergab eine positive Korrelation zwischen der zum Beladen genutzten Peptidmenge und der Stimulationspotenz der DC. Je mehr Peptid zum Beladen verwendet worden war, desto größer war der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen. Nach Beladung der DC mit jeweils 40  $\mu$ g der HLA-A24- und DR-Peptide konnten jedoch weniger T-Lymphozyten aktiviert werden als nach Beladung mit je 30  $\mu$ g der Peptide. Eine Erklärung hierfür könnte die zytotoxische Wirkung des DMSO sein, dessen Konzentration in diesem Versuch 1,2 % betrug.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die Menge hTERT-Peptid, mit der die DC beladen worden sind. Eine Arbeitsgruppe inkubierte die DC in Medium mit 40 µg/ml Peptid (Aloysius et al., 2009). In einer weiteren Studie wurde eine Peptidmenge von 25 µg/ml Medium verwendet (Schmidt et al., 2006).

Auf Grund unserer Ergebnisse und den Protokollen der anderen Arbeitsgruppen wurden zu den DC der Probanden III und V sowie der Patienten A, B und E, die mit drei verschiedenen Peptiden beladen wurden, je 30 µg jeden Peptids hinzugegeben und zu den DC der Patienten C und D, die aufgrund des HLA-Typs der Patienten mit vier verschiedenen Peptiden beladen wurden, je 25 µg. Damit betrug die DMSO-Konzentration in allen Versuchen maximal 1 %.

#### **4.4 Vergleich von Zytokin- und Ligandenreifung der DC**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch unterschiedliche Ausreifung von DC eine stärkere Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten erreicht werden kann. Bei Proband III und den Patienten A und D wurde eine stärkere Aktivierung durch ligandengereifte DC erreicht, bei Proband V und Patient B und C durch zytokingereifte DC. Bei Patient E wurde gar keine Aktivierung erreicht.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Expression des Ausreifungsmarkers CD83 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den DC bieten eine mögliche Erklärung. Die gemessenen Oberflächenmarker sind wichtig für den Signalaustausch mit T-Lymphozyten, durch den diese Zellen aktiviert werden. Nur bei Reifung der DC mit Zytokinen wurde auf allen Zellen eine vermehrte Expression der drei untersuchten Oberflächenmoleküle gefunden. Die Hinzugabe von Liganden führte nur bei einem Teil der DC zu einer phänotypischen Ausreifung, viele Zellen zeigten jedoch eine kaum vermehrte Expression des Reifungsmarkers und der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle. Diese mangelhafte Expression auf ligandengereiften DC zeigte sich in unterschiedlicher Ausprägung bei allen untersuchten Individuen.

Trotz geringerer phänotypischer Reife der ligandengereiften DC war bei den T-Zellen beider gesunder Probanden und der Patienten A und D eine IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit ligandengereiften DC messbar. Dies spricht dafür, dass die Stärke der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle nicht das einzige Kriterium für

Funktionalität ist. Sie geben zwar Hinweise, dass eine Ausreifung stattgefunden hat, zeigen jedoch nicht, wie gut die DC T-Lymphozyten aktivieren können.

Ein weiterer, wichtiger Ausreifungsmarker für DC ist das Zytokin Interleukin-12 (IL-12). Dieses Zytokin bewirkt eine verbesserte Antigenavidität und eine verstärkte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Tumorzellen (Xu et al., 2003). Bei der Untersuchung der IL-12-Produktion durch ligandengereifte DC fiel auf, dass durch die sequenzielle Bindung von TLR-7/8-Agonist und CD40-Ligand an Rezeptoren der DC diese nicht nur ausreifen, sondern auch große Mengen an IL-12 produzieren (Xu et al., 2006). Zusätzlich reagierten T-Lymphozyten, die mit ligandengereiften, antigenbeladenen DC stimuliert wurden, auf Zielzellen, die mit dem gleichen Antigen beladen waren, mit IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Aktivierungspotenzial von DC bei Ausreifung mit Liganden trotz schwächerer Expression von CD83, CD80 und CD86 möglicherweise verstärkt ist. Die Produktion von IL-12 wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht, so dass diese Aussage nicht verifiziert werden kann.

#### **4.5 Relevanz der SEB-Kontrolle**

Die Positiv-Kontrolle, bei der die T-Lymphozyten mit dem Superantigen SEB stimuliert werden, zeigt, dass die untersuchten Zellen INF- $\gamma$  produzieren können. Der Aktivierungsweg unterscheidet sich jedoch von der Aktivierung durch HLA-gebundene Peptide. Somit kann nur eine Aussage über die Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu produzieren, gemacht werden, jedoch nicht über Funktion des HLA-abhängigen Aktivierungswegs.

Betrachtet man das Ausmaß der unspezifischen Aktivierung durch SEB und das Ausmaß der Aktivierung der Lymphozyten durch hTERT-Peptide, ist ein Trend zu erkennen. Bei den Patienten, bei denen die Produktion von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit SEB-beladenen DC hoch ist, konnte auch eine hohe Anzahl hTERT-spezifisch aktivierter T-Lymphozyten gemessen werden. Patient A hat mit 13,6 % der CD8<sup>+</sup> Zellen die stärkste Produktion von IFN- $\gamma$  nach Inkubation mit SEB, hier findet sich die zweitstärkste hTERT-spezifische Aktivierung (1,4 % bei Ligandenreifung, 0,9 % bei Zytokinreifung). Patient D hat mit 8,4 % die zweitstärkste Produktion von IFN- $\gamma$  nach Inkubation der T-Zellen mit SEB, bei diesem Patienten lassen sich auch die meisten T-Lymphozyten hTERT-spezifisch aktivieren (1,5 bzw. 2 %). Bei Patient C und E ist

die Produktion von IFN- $\gamma$  nach SEB-Exposition mit 4,3 % bzw. 4,4 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nur minimal unterschiedlich und vergleichsweise schwach. Bei Patient C konnte bei Stimulation mit hTERT-beladenen, zytokingereiften DC eine hTERT-spezifische Aktivierung von lediglich 0,2 % der Zellen gemessen werden. Bei Patient E zeigte sich keine hTERT-spezifische Aktivierung. Es zeigte sich also bei den Zellen der beiden Patienten mit der geringsten Produktion von IFN- $\gamma$  auch nur schwache bzw. keine hTERT-spezifische Aktivierung. Bei Patient B beträgt der Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen nach Inkubation mit SEB 5,3 % und ist damit höher als bei Patient C und E, aber niedriger als bei Patient A und D. Auch die hTERT-spezifische Aktivierung liegt mit 0,6 % zwischen dem Ergebnis der Patienten C und E bzw. A und D.

Als Ursache für die mangelnde Fähigkeit einer T-Lymphozyten, IFN- $\gamma$  zu produzieren, kommen mehrere Faktoren in Betracht. Das Immunsystem unterliegt einem Alterungsvorgang (Vallejo, 2005). Dazu zählt auch der allmähliche Verlust von CD28 auf T-Lymphozyten. Dieser Oberflächenmarker ist notwendig, um T-Zellen zu aktivieren. Goronzy et al. untersuchten Patienten ab 65 Jahren und zeigten, dass ein vermehrtes Vorliegen von CD8<sup>+</sup> Zellen ohne CD28 eine mangelnde T-Zell-Antwort zur Folge hat (Goronzy et al., 2001). Das individuelle Alter und damit verbunden das Ansprechen des Immunsystems der untersuchten Patienten ist ein möglicher Ansatz, die unterschiedliche Aktivierbarkeit zu erklären. Allerdings kann dieser Ansatz nicht die alleinige Erklärung bieten. Dies zeigt sich daran, dass der nominell älteste Patient D die stärkste hTERT-spezifische Aktivierung aufwies, während beim jüngsten Patienten C nur eine schwache IFN- $\gamma$ -Produktion messbar war. Bei Patient C könnte die Tumorprogression Ursache für die verminderte Aktivierbarkeit sein. Der Patient verstarb kurze Zeit nach dem Einschluss in die Untersuchungen.

#### **4.6 Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten**

In der vorliegenden Arbeit wurden nach dreimaliger Stimulation bis zu 0,7 % hTERT-spezifische T-Lymphozyten bei Gesunden und bis zu 2,1 % bei Patienten mit NSCLC aktiviert. Diese Ergebnisse ähneln den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Gegen das hTERT-Peptid p540 gelang es, durch wiederholte Stimulation bei fünf von sieben gesunden Probanden CTL zu aktivieren, die verschiedene Tumorzelllinien mit Telomeraseaktivität lysieren konnten (Vonderheide et al., 1999). Bei Gesunden



sowie bei Patienten war es möglich, nach dreimaliger Stimulation mit DC und aktivierten B-Lymphozyten mehr als 0,5 % und nach viermaliger Stimulation 1-3 % hTERT-spezifische CTL zu aktivieren (Vonderheide et al., 2001). Bei fünf von sechs untersuchten Tumorpatienten konnte im Chrom-Freisetzungsversuch eine Lyse von telomeraseaktiven Tumorzelllinien durch die CTL nachgewiesen werden. Dupont et al. wiesen mit Tetrameranalyse nach viermaliger Stimulation mit artifiziellen APC in vitro bei drei Gesunden 1,5 % bis 7,9 % hTERT-p865- oder p540-spezifische CTL nach (Dupont et al., 2005). Diese Lymphozyten lysierten hTERT-beladene T2-Zellen. Auch Minev et al. nutzten die Peptide p540 und p865 (Minev et al., 2000). Ihnen gelang es bei neun (p540) bzw. sieben (p865) von zehn gesunden Probanden und bei drei von vier Patienten mit Prostatakarzinom eine Immunantwort zu induzieren. Die CTL wurden dreimal mit bestrahlten, autologen, peptidbeladenen PBMC stimuliert und zeigten Lyse von hTERT-beladenen Zielzellen.

Bei dem Patienten E konnten keine hTERT-spezifischen Zellen aktiviert werden. Auch bei Vonderheide et al. wird beschrieben, dass es bei einem Patienten nicht gelungen ist, funktionell aktive CTL gegen das hTERT-Peptid p540 zu aktivieren. Eine mögliche Erklärung wird mit der vorangegangenen hochdosierten Steroidtherapie dieses Patienten geboten. Auch bei Minev et al. gab es einen Patienten, bei dem keine hTERT-spezifischen T-Zellen aktiviert werden konnten. Möglicherweise ist bei einigen Patienten und gesunden Spendern ein stärkerer Stimulus nötig, um hTERT-spezifische Zellen zu generieren. Dieser könnte durch die artifiziellen APC, die von Dupont et al. genutzt wurden, gegeben sein. Im Unterschied zu den in unserer Arbeit genutzten peptidbeladenen DC sind die von Dupont genutzten APC gentechnisch modifizierte Fibroblasten. Diese präsentieren auf ihrer Zelloberfläche das gewünschte Antigen nach retroviralem Gentransfer. Eventuell ist der Einsatz artifizieller APC eine Möglichkeit, CTL bei Patienten zu gewinnen, bei denen die Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten mit DC nicht gelungen ist. Möglicherweise könnte auch eine stärkere Aktivierung von T-Lymphozyten erreicht werden, wenn die DC mit dem gesamten hTERT-Protein oder einem Peptidmix, wie er in der vorliegenden Arbeit zur Aktivierung CMV-spezifischer Zellen genutzt wurde, verwendet werden würde.

Das Peptid p988 wurde von uns in der nativen Form genutzt, während vergleichbare Versuche in der Literatur nur mit p988Y zu finden sind (Gross et al., 2004). Das Y weist darauf hin, dass die erste Aminosäure zu Tyrosin verändert wurde. Durch diese

Änderung kann mit einem niedrig immunogenen Peptid eine robuste CTL-Antwort erzeugt werden (Tourdot et al., 2000). Möglicherweise hat dieses Peptid in der nativen Form nicht zu der im Durchflusszytometer gemessenen Immunantwort beigetragen und die IFN- $\gamma$ -Produktion wurde nur durch p540- und p865-spezifische CTL hervorgerufen.

Durch die Peptide p672 und p766, die beide von mehreren HLA-DR-Molekülen präsentiert werden, können hTERT-spezifische T-Helfer-Zellen aktiviert werden (Schroers et al., 2003). Eine solche Immunantwort konnte in unseren Versuchen bei den beiden Patienten mit passendem HLA-DR-Molekül jedoch nicht hervorgerufen werden. Patient A, bei dem die DC mit den Peptiden p461, p672 und p766 beladen wurden, zeigte nur eine IFN- $\gamma$ -Produktion durch CTL. Die Aktivierung wurde möglicherweise allein durch das HLA-A24-restringierte p461, das auf Grund seiner Länge ausschließlich CTL aktivieren kann, hervorgerufen.

Bei den gesunden Probanden III und V konnte eine Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> Zellen, möglicherweise T-Helfer-Zellen, gesehen werden. Diese war jedoch auch bei Stimulation durch DC, die mit HLA-A2-restringierten Peptiden beladen waren, vorhanden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die HLA-A2-Peptide, die auf Grund ihrer geringen Länge normalerweise nur auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und damit nur eine CTL-Antwort hervorrufen können, auch auf Klasse-II-Molekülen präsentiert wurden. Dafür kommt insbesondere das Peptid p988 in Frage, das aus 10 Aminosäuren besteht, also ein Decamer ist. Chicz et al. beschreiben, dass es einige wenige Decamere gibt, die auch von HLA-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden (Chicz et al., 1993). Eine weitere mögliche Erklärung für die IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Helfer-Zellen wäre, dass es sich dabei um einen *Bystander-Effekt* handelt. Das bedeutet, dass die T-Helfer-Zellen nicht durch die Antigenpräsentation auf den DC aktiviert werden, sondern durch den Kontakt zu den umliegenden, aktivierten Zellen. Ungeklärt bleibt, warum dieser Effekt bei allen gesunden Probanden, aber bei keinem Patienten aufgetreten ist. Um einen *Bystander-Effekt* von einer hTERT-spezifischen Aktivierung zu unterscheiden, könnten Tetramere genutzt werden (Altman et al., 1996). Tetramere bestehen aus vier HLA-Molekülen mit daran gebundenem Antigen. Der Komplex ist fluoreszenzmarkiert. Hat eine T-Zelle einen für dieses Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor, so bindet dieser an das Tetramer und wird im Durchflusszytometer erkannt. Diese Methode ist in der aktuellen Forschung an gesunden Individuen und

Tumorpatienten etabliert (Dupont et al., 2005; Maecker et al., 2005; Mizukoshi et al., 2006; Schreurs et al., 2005). Der Nachteil dieser Methode ist, dass keine Aussage über die Funktionalität der Zelle gemacht werden kann.

Für die Effizienz einer Immuntherapie kann es von Vorteil sein, wenn im Patienten bereits vor der Therapie CTL gegen das Antigen vorhanden sind. Bisher wurden lediglich zwei Patienten mit NSCLC in derartige Untersuchungen eingeschlossen (Filaci et al., 2006, Vonderheide et al., 2001). Dabei konnten keine hTERT-spezifischen Zellen gefunden werden. Auch bei 27 Patienten mit Multiplem Myelom und bei 20 gesunden Probanden konnten mit Tetramer-Analyse vor Immuntherapie keine hTERT-spezifischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Maecker et al., 2005). Bei Patienten mit anderen Tumorerkrankungen konnten im Gegensatz dazu hTERT-spezifische Zellen gefunden werden. Filaci et al. legten Ergebnisse vor, die zeigen, dass im Blut von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, Prostata-, Mamma-, Magen- oder Leberkarzinom bei 21 von 22 Patienten bis zu 1,4 % hTERT-p540-spezifische T-Lymphozyten zirkulieren (Filaci et al., 2006). Auch bei Patienten mit CML konnten bei 82 % der Patienten CTL gegen hTERT-p540 gefunden werden (Gannage et al., 2005).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der Literatur bei einem Teil der Tumorpatienten hTERT-spezifische T-Lymphozyten, die im Blut kursieren, nachgewiesen werden konnten. In vitro lassen sich in der vorliegenden Arbeit ebenso wie in der Literatur bei einem Großteil der Patienten hTERT-spezifische T-Zellen aktivieren.

#### **4.7 Anwendungsmöglichkeiten der verbesserten Aktivierung von hTERT-spezifischen T-Lymphozyten**

Mit der in der vorliegenden Arbeit genutzten Methode ist es möglich, tumorspezifische CTL zu aktivieren. Weiterführende Untersuchungen könnten abschließend klären, ob zytokin- oder ligandengereifte DC eine intensivere tumorspezifische T-Zell-Antwort hervorrufen. Es müsste geklärt werden, ob die aktivierten T-Lymphozyten Tumorzell-Lyse hervorrufen können. Goldstandard für die Untersuchung der Zytolyse ist der Chrom-Freisetzungsversuch (Brunner et al., 1968). Dieser basiert auf der Internalisierung und Bindung von radioaktivem <sup>51</sup>Chrom durch Zielzellen. Durch T-Zell-vermittelte Zytolyse der Zielzellen gelangt es in den

Überstand des Zellkulturmediums und kann dort nachgewiesen werden. Für den Chrom-Freisetzungsversuch müssen vitale, hTERT-spezifische T-Lymphozyten in ausreichender Zahl vorhanden sein.

Nach der Permeabilisierung der T-Lymphozyten für den in dieser Arbeit verwendeten intrazellulären Nachweis von IFN- $\gamma$  sind die Zellen nicht mehr vital. Für den Chrom-Freisetzungsversuch sowie die spätere klinische Anwendung könnte man diskutieren, einen Nachweis für die hTERT-spezifische Aktivierung zu verwenden, für den die Zellen ihre Vitalität nicht einbüßen. In Frage kämen Tetramer-Färbung oder der Nachweis von CD137 auf der Zelloberfläche. Dieses Molekül gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und ist geeignet für Erkennung, Selektion und Expansion von CTL (Wolfl et al., 2007). Auch für die Erkennung und Selektion aktivierter T-Helfer-Zellen ist CD137 geeignet (Wehler et al., 2008).

Bisher wurden zwei klinische Studien mit Aktivierung hTERT-spezifischer T-Lymphozyten an Patienten mit NSCLC durchgeführt. Eine norwegische Arbeitsgruppe versuchte 2006 durch Vakzinierung mit zwei hTERT-Peptiden bei Patienten mit NSCLC eine Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen (Brunsvig et al., 2006). 26 Patienten mit Lungenkarzinom wurden in die Studie eingeschlossen. Die Vakzinen GV1001, ein 16 Aminosäuren langes synthetisches hTERT-Peptid, und HR2822, das bereits beschriebene p540-Peptid, wurden mehrfach intradermal appliziert und eine T-Zell-Antwort vor Beginn der Behandlung und im Verlauf beurteilt. Bei 11 von 24 bewertbaren Patienten konnte eine Immunantwort gegen GV1001 entdeckt werden, gegen HR2822 lediglich bei zwei Patienten. Ein Patient mit hoch affinen und aktiven, GV1001-spezifischen T-Helfer-Zellen zeigte eine komplette Remission.

Eine weitere Studie wurde mit dem minimal modifizierten Peptid p572Y und dem nativen p572 durchgeführt (Bolonaki et al., 2007). Untersucht wurden 22 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die subkutane Injektionen des Impfstoffs erhielten. Bei 16 von 21 Patienten konnten nach der zweiten Vakzinierung hTERT-spezifische CTL nachgewiesen werden. Die Zeit bis zum Progress und das Gesamtüberleben war bei Patienten, die eine Immunantwort entwickelt haben, signifikant länger als bei *Non-Respondern*. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Immuntherapie bei einzelnen Patienten erfolgreich sein kann. Weitere Studien müssen jedoch folgen, um die Zahl der *Responder* zu erhöhen. Möglicherweise können bessere Adjuvantien eine stärkere Aktivierung erreichen. Eine Rolle könnten

dabei die von uns untersuchten Liganden spielen, wenn sie die Funktion der DC verbessern.

Weitere klinische Studien wurden bereits an Patienten mit anderen Malignomen durchgeführt. Domchek et al. führten ihre Vakzinierungsstudie mit p540, GM-CSF und dem Adjuvans Montanide bei Patientinnen mit Mammakarzinom durch (Domchek et al., 2007). 13 von 19 Patientinnen zeigten eine Immunantwort nach den Injektionen, in vitro wurde nachgewiesen, dass die hTERT-spezifischen T-Zellen nach Antigenkontakt IFN- $\gamma$  produzierten und Tumorzellen lysierten. Die Immunantwort korrelierte mit dem Überleben der Patientinnen. Durch Tumorbiopsie konnten außerdem bei drei von sechs Untersuchten nach den Injektionen bis zu 12,7 % tumorinfiltrierende Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch bei Patienten mit Pankreastumor zeigten Vakzinierungen mit GV1001 Erfolg (Bernhardt et al., 2006). In dieser Studie korrelierte die Aktivierung einer hTERT-spezifischen Immunantwort mit einer Verlängerung der Überlebenszeit.

Auch zellgebundene Antigene können zur Vakzinierung genutzt werden. Vonderheide et al. beluden DC von Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinom mit hTERT-Antigenen und injizierten sie anschließend subkutan (Vonderheide et al., 2004). Bei 4 von 7 Patienten konnten hTERT-spezifische, tumorlytische T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch bei 3 von 10 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zeigte die Injektion peptidbeladener DC Erfolg (Märten et al., 2006). Die mit hTERT-Peptid, z.B. p540, beladenen, reifen DC wurden intratumoral oder intradermal appliziert. Bei den Patienten, die klinisch ansprachen, konnte bereits vor der Therapie zytotoxische Aktivität von Effektorzellen gegen hTERT-beladene T2-Zellen nachgewiesen werden, die während der Behandlung signifikant anstieg. Diese Zellen produzierten außerdem IFN- $\gamma$  nach Antigenkontakt. In vitro generierte, tumorspezifische CTL sind für den adoptiven Zelltransfer geeignet. Dabei werden dem Patienten körpereigene Blutzellen entnommen, diese in vitro tumorspezifisch stimuliert und dem Patienten anschließend intravenös injiziert. Der Ansatz ist im Mausmodell vielversprechend (Schmidt et al., 2006). Die Überlebenszeit von Tieren, die einmalig mit hTERT-spezifischen CTL behandelt wurden, war signifikant verlängert gegenüber unbehandelten Mäusen. Tumorinfiltrierende hTERT-spezifische Lymphozyten konnten in der Mehrzahl der Tiere nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass zusätzlich vor dem

Zelltransfer einer Chemotherapie oder Bestrahlung durchgeführt werden könnte, die einen zusätzlichen Effekt hervorrufen könnte.

#### **4.8 Autoimmunität**

Die Telomerase ist auch in einigen körpereigenen Zellen aktiv. Eine autoimmune Reaktion gegen diese Zellen bei Durchführung einer hTERT-spezifischen Immuntherapie ist dementsprechend vorstellbar. In den bisher durchgeführten klinischen Studien lag das besondere Augenmerk auf der Sicherheit der Vakzine und auf dem frühen Erkennen von Autotoxizität. In allen Untersuchungen wurde die Impfung gut vertragen und nur in wenigen Fällen wurde geringe oder mäßige Toxizität (Grad I und II) beobachtet. Zu den aufgetretenen Nebenwirkungen durch die Vakzine GV1001 und HR2822 zählten neben lokalen Hautreaktionen grippeähnliche Symptome, leichtes Fieber und Schüttelfrost, sowie Schmerzen, Fatigue, Übelkeit und Erbrechen (Brunsvig et al., 2006; Bernhardt et al., 2006). Brunsvig et al. führten zusätzlich Untersuchungen des Knochenmarks durch. Dabei wurde kein toxischer Effekt auf die Stammzellen festgestellt. Bei Injektion der Peptide p572Y und p572 traten bei 16 von 22 Patienten lokale Hautreaktionen, leichte Anämie, Thrombozytopenie oder Fieber (Grad I) auf, ein Patient entwickelte Fatigue und Übelkeit (Grad II) (Bolonaki et al., 2007). Bei Vakzinierung mit p540, GM-CSF und dem Adjuvans Montanide wurden bei allen Patienten lokale Reaktionen (Grad I oder II) gesehen, darunter Rötung, Juckreiz, Schmerz oder Verhärtung des Gewebes (Domchek et al., 2007). Bei der Hälfte der Patienten wurde auch Schmerz oder Juckreiz in der Nähe des Tumors beobachtet. Auch bei subkutanem adoptivem DC-Transfer trat nur Grad I oder II Toxizität auf, bei Untersuchungen des Knochenmarks wurden keine histologischen Veränderungen festgestellt (Vonderheide et al., 2004). Märten et al. berichten, dass die Therapie von allen Patienten gut vertragen wurde (Märten et al., 2006). Akute myelotoxische Ereignisse wie Anämie, Leuko- oder Thrombopenie wurden bei keiner der Studien beobachtet. Über Spätfolgen der Therapie durch eventuelle Lyse hämatopoetischer Stammzellen wurde keine Aussage gemacht. Eine Nachbeobachtung der behandelten Patienten ist erforderlich, um eventuelle Nebenwirkungen durch Stammzellschädigung aufzudecken.

## 5 Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom ist weltweit der Tumor mit der höchsten Mortalität. Ein interessanter therapeutischer Angriffspunkt sind Vakzinierungen gegen Tumorantigene wie die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT). In Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) ist die Aktivität der Telomerase erhöht, während nur wenige Körperzellen dieses Enzym physiologisch exprimieren. Aktuelle Vakzinierungsstudien zeigen einen Überlebensvorteil bei Patienten, bei denen eine hTERT-spezifische Immunantwort hervorgerufen werden konnte. Allerdings ist die Anzahl derer, die auf die Vakzine ansprechen, begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb an zwei gesunden Spendern und fünf Patienten mit NSCLC untersucht, ob die Ausreifung von hTERT-peptidbeladenen dendritischen Zellen (DC) mit dem TLR-7/8-Agonisten CL097 und löslichem CD40-Liganden anstelle des Standard-Zytokincocktails die Aktivierung hTERT-spezifischer Zellen nach Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten verbessert. Als Nachweis der Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten wurde die Produktion von IFN- $\gamma$  durchflusszytometrisch gemessen.

Zur Analyse der Reifung der DC wurde die Expression von CD83 (Reifungsmarker), CD80 und CD86 (kostimulatorische Moleküle) durchflusszytometrisch untersucht. Dabei fiel auf, dass bei allen Probanden und Patienten jeweils ein Teil der ligandengereiften DC phänotypisch unreif blieb. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Stimulationspotenz. Bei zwei gesunden Spendern konnten bis zu 0,7 % zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden. Bei vier von fünf Patienten mit NSCLC wurden bis zu 2,0 % zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert. Bei Proband III und den Patienten A und D wurde mit 0,7 %, 0,9 % und 2,0 % der zytotoxischen T-Lymphozyten eine stärkere Aktivierung durch ligandengereifte DC erreicht. Bei Proband V konnten 0,2 bzw. 0,5 %, bei Patient B 0,6 % und bei Patient C 0,2 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit zytokingereiften DC aktiviert werden. Mit ligandengereiften DC konnte bei Patient B und C keine Aktivierung erreicht werden. Bei Patient E wurde unabhängig von der Art der DC-Reifung keine Aktivierung erreicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ansprechen von T-Lymphozyten auf Aktivierungssignale der DC individuell unterschiedlich ist. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob eine allgemein stärkere Aktivierung durch eine alternative Ausreifungsmethode auslösbar ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aloysius, M.M., McKechnie, A.J., Robins, R.A., Verma, C., Eremin, J.M., Farzaneh, F., Habib, N.A., Bhalla, J., Hardwick, N.R., Satthaporn, S., Sreenivasan, S., El-Sheemy, M., Eremin, O. (2009): Generation *in vivo* of 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* 7, S.18
- Altman, J.D., Moss, P.A.H., Gouldner, 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, S. 94-96
- Andersson, U., Halldén, G., Persson, U., Hed, J., Möller, G., DeLey, M. (1988): Enumeration of IFN-gamma-producing cells by flow cytometry. Comparison with fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 112, S. 139-142
- Andersson, U., Andersson, J., Lindfors, A., Wagner, K., Möller, G., Heusser, C.H. (1990): Simultaneous production of interleukin 2, interleukin 4 and interferon-gamma by activated human blood lymphocytes. *Eur J Immunol* 20, S. 1591-1596
- Arai, J., Yasukawa, M., Ohminami, H., Kakimoto, M., Hasegawa, A., Fujita, S. (2001): Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 97, S. 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, S. 7476-7482
- Bernhardt, S.L., 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, S. 1474-1482
- Bolonaki, I., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Aggouraki, D., Konsolakis, G., Vagia, A., Christophylakis, C., Nikoloudi, I., Magganas, E., Galanis, A., Cordopatis, P., Kosmatopoulos, K., Georgoulas, 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, S. 2727-2734
- Brunner, K.T., Mael, 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, S. 181-196
- Brunsvig, P.F., Aamdal, S., Gjertsen, M.K., Kvalheim, G., Markowski-Grimsrud, 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, S. 1553-1564



Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, F., Olive, D. (1995): CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol* 146, S. 164-168

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

Domchek, S.M., Recio, A., Mick, R., Clark, C.E., Carpenter, E.L., Fox, K.R., DeMichele, A., Schuchter, L.M., Leibowitz, M.S., Wexler, M.H., Vance, B.A., Beatty, G.L., 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, S. 10546-10555

Dupont, J., Latouche, J.-B., Ma, C., Sadelain, M. (2005): Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells. *Cancer Res* 65, S. 5417-5427

Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., Brandau, S. (2008): Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59, S. 32-40

Filaci, G., Fravega, M., Setti, M., Traverso, P., Millo, E., Fenoglio, D., Negrini, 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<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with cancer. *Blood* 107, S. 1505-1512

Fujita, Y., Fujikane, T., Fujiuchi, S., Nishigaki, Y., Yamazaki, Y., Nagase, A., Shimizu, T., Ohsaki, Y., Kikuchi, K. (2003): The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 98, S. 1008-1013

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, S. 8210-8218

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, S. 12182-12187

Greaves, M., Janossy, G., Doenhoff, M. (1974): Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. *J Exp Med* 140, S. 1-18

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1987): The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, S. 887-898

Gross, D.A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Cornet, S., Alves, P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F.A., Davoust, J., Miconnet, I., Vonderheide, R.H., Kosmatopoulos, K. (2004): High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 113, S. 425-433

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, S. 1164-170

Heigener, D.F., Reck, M., Gatzemeier, U. (2007): Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom - Diagnostik und stadienadaptierte Therapie. *Med Klin* 102, S. 981-988

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 U S A* 96, S. 14276-14281

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, S. 3135-3143

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., 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, S. 2011-2015

Kumaki, F., Kawai, T., Hiroi, S., Shinomiya, N., Ozeki, Y., Ferrans, V.J., Torikata, C. (2001): Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 32, S. 188-195

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, S. 558-562

Märten, 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.H. (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, Doc02

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 U S A* 97, S. 4796-4801

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

Nishikawa, H., Jäger, E., Ritter, G., Old, L.J., Gnjatic, S. (2005): CD4+CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 106, S. 1008-1011

Noble, P.B., Cutts, J.H. (1967): Separation of blood leukocytes by ficoll gradient. *Can Vet J* 8, S. 110-111

Podlevsky, J.D., Bley, C.J., Omana, R.V., Qi, X., Chen, J. (2007): The Telomerase Database. *Nucleic Acids Res* 36, S. 339-343

Parkin, D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani, P. (2002): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55, S. 74-108

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G. (1994): Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, S. 83-93

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, S. 759-764

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, S. 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, S. 4743-4755

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

Smith, K.A. (1984): Interleukin 2. *Annu Rev Immunol* 2, S. 319-333

Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J., Ishikawa, F., Ide, T. (1999): Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene* 18, S. 1561-1567

Tourdot, S., Scardino, A., Saloustrou, E., Gross, D.A., Pascolo, S., Cordopatis, P., Lemonnier, F.A., Kosmatopoulos, K. (2000): A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol* 30, S. 3411-3421

Uchida, N., Otsuka, T., Shigematsu, H., Maeda, M., Sugio, Y., Itoh, Y., Niho, Y. (1999): Differential gene expression of human telomerase-associated protein hTERT and TEP1 in human hematopoietic cells. *Leuk Res* 23, S. 1127-1132

Vallejo, A.N. (2005): CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 205, S. 158-169

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, S. 673-679

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

Vonderheide, R.H., Domchek, 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<sup>+</sup> T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10, S. 828-839

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

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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J Immunol Methods* 339, S. 23-37

White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W., Marrack, P. (1989): The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56, S. 27-35

Wolfl, 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<sup>+</sup> T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 110, S. 201-210

Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., June, C.H. (2001): Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, S. 4766-4772

Woo, E.Y., Yeh, H., Chu, C.S., Schlienger, K., Carroll, R.G., Riley, J.L., Kaiser, L.R., June, C.H. (2002): Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168, S. 4272-4276

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<sup>+</sup> 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, S. 2251-2261

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, S. 170-178

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DC	dendritic cells, dendritische Zellen
ECD	energy coupled dye
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	humanes Leukozytenantigen
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IE	Internationale Einheiten
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
MACS	magnetic cell separation, magnetische Zell-Separation
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, monozytäre (einkernige) Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Zyanid 5
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pp65	Phosphoprotein der Molmasse 65 kDa, Antigen des CMV
rE	relative Einheiten

(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Zellkulturmedium, RPMI steht für <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , den Entwicklungsort
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SSC	Side Scatter
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktor- $\beta$
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR-7/8-Agonist	Agonist der Toll-like Rezeptoren 7 und 8
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Lymphozyten

## 7.2 Verzeichnis der Oberflächenantigene

CD3	-	Teil des T-Zell-Rezeptors, Marker für alle T-Lymphozyten
CD4	-	Rezeptor, der auf T-Lymphozyten zusammen mit CD3 das HLA-Klasse II-Molekül erkennt, CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen sind T-Helfer-Zellen
CD8	-	Rezeptor, der auf T-Lymphozyten zusammen mit CD3 das HLA-Klasse I-Molekül erkennt, CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen sind zytotoxische T-Lymphozyten
CD25	-	$\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, Marker für aktivierte Lymphozyten und regulatorische T-Lymphozyten
CD28	-	Rezeptor für CD80 und CD86 auf T-Lymphozyten, Bindung aktiviert T-Lymphozyten
CD40	-	Rezeptor für CD154 auf DC, Bindung von CD154 aktiviert DC
CD45	-	Protein-Tyrosinphosphatase-Rezeptor Typ C, Marker für Leukozyten
CD80	-	kostimulatorisches Molekül auf DC, aktiviert T-Lymphozyten durch Bindung an CD28, reguliert die T-Zell-Antwort
CD83	-	Marker für reife DC, wichtig für T-Lymphozyten-Aktivierung
CD86	-	kostimulatorisches Molekül auf DC, stimuliert T-Lymphozyten durch Bindung an CD28, reguliert die T-Zell-Antwort
CD154	-	CD40-Ligand (CD40-L), exprimiert auf T-Helfer-Lymphozyten
CD137	-	gehört zur TNF-Rezeptor Superfamily, wird von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und hat kostimulatorische Funktion
TLR-7/8	-	aktivierender Rezeptor für Einzelstrang-DNA auf DC

### 7.3 Zustimmung der Ethikkommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwänenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn Dr. med. B. Gahn  
II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
im Städtischen Krankenhaus Kiel  
Chemnitzstr. 33  
24116 Kiel

Schwänenweg 20  
D-24105 Kiel  
Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

19.8.2003

**Az.: A 137/03**

**Studienplan:**

**Experimentelle, präklinische Studie über die HLA-Typ unabhängige, selektive Expansion hTERT-spezifischer T-Lymphozyten (CTL) und Analyse von Epitopspezifität und -spektrum nach Induktion durch mRNA transfizierte Dendritische Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenen pulmonalen und gastrointestinalen malignen Tumoren.**

Studienprotokoll, Patienteninformation und Einverständniserklärung – überarbeitete Version vom 15.8.2003

**Antragsteller:**

**Dr. med. Benedikt Gahn, II. Medizinische Klinik und Poliklinik im Städtischen Krankenhaus, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel**

**Datum des**

**Erstantrages: 01.06.2003 (Eingegangen 27.06.03)**

**Datum des**

**überarb. Antrages: 15.8.2003**

#### **Bestätigung**

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft. Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub  
Vorsitzender der Ethik- Kommission  
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel



## **8 Danksagung**

Bei PD Dr. Benedikt Gahn bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Zeit und Arbeit, die er in die Vorbereitung der Untersuchungen, Betreuung meiner Dissertation und Veröffentlichung der Ergebnisse gesteckt hat.

Für die Möglichkeit, die Arbeit an der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums in Kiel im Labor des Dr. Mildred-Scheel-Hauses durchführen zu dürfen, danke ich Prof. Dr. Dr. Michael Kneba und Prof. Dr. Martin Gramatzi.

Dr. Matthias Staudinger danke ich für sein jederzeit offenes Ohr für Fragen und Probleme und seine Unterstützung.

Für die Einarbeitung im Labor und praktische Unterstützung danke ich Kathrin Richter, Britta von Below und Tanja Ahrens.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten und Probanden, die sich bereit erklärt haben Blut zu spenden.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Katrin Elisabeth Wöster  
Geburtsdatum: 29. Juni 1985  
Geburtsort: Eckernförde

### Schulbildung:

1991 – 1995 Grundschule: Fritz-Reuter-Schule Eckernförde  
1995 – 2004 Gymnasium: Jungmannschule Eckernförde

6/2004 allgemeine Hochschulreife

### Studium:

2001-2010 Studium Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität, Kiel  
8/2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
11/2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr:

8/2009 - 12/2009 Chirurgie: Kreiskrankenhaus Eckernförde  
12/2009 – 4/2010 Neurologie: Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Kiel  
4/2010 – 8/2010 Innere Medizin: Bad Segeberger Kliniken

### Weiterbildung:

seit 4/2011 Klinikum Augsburg, 2. Medizinische Klinik

## 10 Veröffentlichungen

Wöster, K., Staudinger, M., Gramatzki, M., Kneba, M., Gahn, B.: Activation of specific T-cell responses to the human telomerase reverse transcriptase in patients with NSCLC and healthy donors. CIMT Annual Meeting 2009, Abstract Book, Poster 34

Wöster, K., Staudinger, M., Gramatzki, M., Kneba, M., Gahn, B.: Activation of specific T-cell responses to the human telomerase reverse transcriptase in patients with NSCLC and healthy donors. *Onkologie* 2009; 32(suppl 4): 64

B. Gahn, K. Woester, D. Wellnitz, M. Staudinger, S. Boettcher, M. Gramatzki, M. Kneba 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, 2010 (suppl; abstr e13114)