

Aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Frequenzevaluation von Ras- und Influenza-spezifischen  
T-Zellen bei Pankreaskarzinompatienten

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Achim Wiefelspütz

aus Duisburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Pezzutto  
2. Prof. Dr. C. Scheibenbogen  
3. Priv.-Doz. Dr. R. Schwartz-Albiez

Datum der Promotion: 14.06.2009

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom, aktuelle Therapie und Prognose	1
1.2	Ras und Präsentation von tumorspezifischen Peptiden	3
1.3	CD8 <sup>+</sup> -T-Zell-Funktion im Rahmen der zellulären Immunität	4
1.4	Tumor-Escape-Mechanismen	6
1.5	Immunvakzinierung gegen Ras-Peptide	7
1.6	Gründe für die Auswahl der Methodik	9
1.7	Ziel der Doktorarbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Material	11
2.1.1	Medien	11
2.1.2	Puffer	11
2.1.3	Chemikalien	12
2.1.4	Antikörper und Enzyme	13
2.1.5	Peptide	14
2.1.6	Geräte	14
2.1.7	Sonstiges Material	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Übersicht über die Vorgehensweise	16
2.2.2	PBMC-Isolation aus Buffy-coat-Präparationen und aus Patientenblut	17
2.2.3	Zellzählungen	19
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	20
2.2.5	Durchflusszytometrie (HLA-A2-FACS)	21
2.2.5.1	Zellfärbung mit dem Antikörper BB7.2 (FITC)	21
2.2.6	IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay	22
2.2.6.1	Prinzip des durchgeführten Assays	22
2.2.6.2	Varianten der T-Zell-Stimulation in den durchgeführten Assays	24
2.2.6.3	ELISpot mit frisch isolierten PBMC	26
2.2.6.4	ELISpot Assay nach Stimulation in vitro	27
2.2.6.5	Kultivieren und Expandieren von T2-Zellen	28
2.2.7	10-Tage-Stimulation in vitro	28
2.2.8	IFN- $\gamma$ -ELISA	29

2.2.8.1	Prinzip des durchgeführten Assays .....	29
2.2.8.2	Ausführung im Detail .....	30
2.2.9	Auswertung .....	32
2.2.9.1	Allgemeines .....	32
2.2.9.2	Hintergrundaktivität .....	32
2.2.9.3	Spezifische Spots .....	32
2.2.9.4	Stimulationsindex .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	Vergleich von Stimulationsvarianten im ELISpot .....	34
3.2	Reaktivität der T-Zellen gesunder Blutspender .....	36
3.2.1	T-Zellen nach direktem Test der isolierten PBMC .....	36
3.2.2	T-Zellen nach 10 Tagen Stimulation in vitro .....	37
3.2.3	Zusammenfassung .....	40
3.3	Reaktivität der T-Zellen von Patienten mit Pankreaskarzinom .....	41
3.3.1	Charakteristika der Patienten und Proben .....	41
3.3.2	T-Zellen bei direkt getesteten PBMC .....	44
3.3.3	Reaktionen der T-Zellen auf Influenza-Matrix-Peptid nach 10 Tagen Stimulation in vitro .....	45
3.3.4	Reaktionen der T-Zellen auf die Ras-Peptide nach 10 Tagen Stimulation in vitro .....	48
3.3.5	Zusammenfassung .....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1	Methodik .....	52
4.1.1	ELISpot .....	52
4.1.2	ELISA .....	54
4.1.3	Funktionalität des Untersuchungssystems und alternative Assays .....	55
4.2	Influenza- und Ras-spezifische T-Zellen .....	57
4.2.1	Gesunde Blutspender .....	57
4.2.2	Pankreaskarzinompatienten .....	58
4.3	Schlussfolgerung .....	61
4.4	Ausblick .....	62
	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>65</b>

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>83</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>84</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Pankreaskarzinom, aktuelle Therapie und Prognose**

Das Pankreaskarzinom steht europaweit auf der Liste der häufigsten Krebserkrankungen an 13. Stelle und hat die fünfthöchste Mortalität (Ferlay et al., 2007). In Deutschland werden pro Jahr zwischen 11.800 und 13.500 Neuerkrankungen registriert, die vor allem in einem Alter >60 Jahre auftreten (AG Krebsregister, 2006).

Histologisch handelt es sich zu 80 % um ein duktales Adenokarzinom, seltener (10–20 %) um ein Azinuszellkarzinom (Solcia et al., 1997). In 70 % der Fälle befindet sich der Tumor im Pankreaskopf, 25 % entstehen im Korpus und der Rest (etwa 5 %) im Pankreasschwanz.

Die Erkrankung hat eine schlechte Prognose; bis zu 70 % der Patienten versterben im ersten Jahr nach der Diagnosestellung. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt deutlich unter 5 % (Faivre et al., 1998; Lühr, 2006), da das Pankreaskarzinom nur selten in der Frühphase diagnostiziert wird. Die Symptome des Pankreaskarzinoms treten häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auf und sind von unspezifischem Charakter: Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Oberbauchschmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken (Hinweis auf eine Invasion der benachbarten Strukturen und Nervengeflechte), Ikterus, Übelkeit, Erbrechen oder eine Pankreatitis.

Wird ein Pankreaskarzinom frühzeitig in noch operablem Stadium entdeckt, gilt die chirurgische Resektion als die Therapie der Wahl. Sie wird in der klinischen Praxis gegenwärtig oft von einer adjuvanten Chemotherapie oder seltener einer Radiochemotherapie begleitet. Bei dieser Patientengruppe schwanken die Angaben zu den 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 8 und über 20 % (Kuhlmann et al., 2003; de Braud et al., 2004; Han et al., 2006).

Der Nutzen der adjuvanten Chemotherapie ist erst kürzlich nachgewiesen worden. In einer randomisierten Multicenterstudie verlängerte die Gabe von Gemcitabine über einen Zeitraum von 6 Monaten die 5-Jahres-Überlebensrate auf 16 %. Der Median der Gesamtüberlebenszeit konnte um etwa 2,5 auf 22,8 Monate verlängert werden. Es sind zwischen 1998 und 2004 insgesamt 368 Patienten untersucht worden (Oettle

et al., 2007; Neuhaus et al., 2008). Eine verbesserte Überlebenszeit bei Patienten nach adjuvanter Radiochemotherapie (Kaiser et al., 1985) konnte in einer Studie der European Organisation for Research and Treatment of Cancer nicht bestätigt werden (Klinkenbijn et al., 1999). Eine 2004 vorgestellte randomisierte Studie zu diesem Thema ergab einen signifikanten Vorteil im Überleben durch adjuvante Chemotherapie, nicht aber durch Radiochemotherapie (Neoptolemos et al., 2001; Neoptolemos et al., 2004).

Bei Diagnosestellung kommen jedoch nur etwa 20 % der Patienten für einen solchen kurativen Therapieansatz in Frage (Tan et al., 1996; Sener et al., 1999), weil das Tumorleiden meist schon zu fortgeschritten ist, um noch operieren zu können. In diesen Krankheitsstadien liegen die Prognosen mit einer medianen Überlebenszeit von 3 bis 12 Monaten deutlich schlechter. Noch schlechter ist die Situation im metastasierten Stadium.

Neuere klinische Studien mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine konnten lediglich eine Verbesserung krankheitsbezogener Symptome zeigen (Rothenberg et al., 1996; Burris et al., 1997; Storniolo et al., 1999). Die alleinige Strahlentherapie kann eine deutliche Tumorreduktion und eine Schmerzlinderung bewirken, verlängert aber nicht das Gesamtüberleben. Kombinationen von Radio- mit Chemotherapie zeigen nur geringe Verbesserungen der Überlebensrate (Moertel et al., 1981; GITSG, 1988). Insgesamt ist ein therapeutischer Durchbruch mit konventionellen Mitteln nicht in Sicht, und die durchschnittliche Überlebensrate der Patienten liegt weiterhin bei 16 % der Patienten im ersten, 5 % im zweiten und nur 4 % im fünften Jahr der Erkrankung (Faivre et al., 1998; Löhr, 2006). Auch neueste Ansätze mit Kinase-Inhibitoren haben nur zu marginalen Verbesserungen des Überlebens geführt.

Angesichts der geringen Fortschritte mit konventionellen Strategien der Tumorthherapie sind beim Pankreaskarzinom alternative Therapiemöglichkeiten zu verfolgen. Ein in den letzten Jahren intensiv erforschter Ansatz ist die sogenannte Tumorstimmulierung. Dieser Ansatz zielt auf eine selektive Anregung der zellulären Immunantwort gegen tumorspezifische Antigene. Ein Antigen ist ein Stoff, der vom körpereigenen Immunsystem als „fremd“ erkannt werden kann und damit eine Abwehrreaktion auslöst. Solche tumorspezifischen Antigene wurden auch beim Pankreaskarzinom entdeckt.

## 1.2 Ras und Präsentation von tumorspezifischen Peptiden

Die Ras-Gene sind eine Gruppe von Onkogenen, deren Produkte bereits in einer Vielzahl verschiedener humaner Krebsformen identifiziert worden sind (Bos et al., 1987). Der Name dieser Genfamilie leitet sich von der erstmaligen Identifizierung aus den Harvey- und Kirsten-Stämmen transformierender Retroviren des Rous-Avian-Sarkoma-Virus 1978 und 1979 ab (Barbacid et al., 1987). Beim Menschen wurden drei funktionell bedeutsame Ras-Gene nachgewiesen. Sie kodieren für die 21 kDa-schweren Proteine (p21) H-ras (Harvey), N-ras (Neuroblastoma) und K-ras (Kirsten). Die Ras-kodierten Proteine lassen sich in den meisten Geweben des erwachsenen Menschen nachweisen, wobei die verschiedenen Typen in bestimmten Geweben gehäuft vorkommen (Leon et al., 1987). So wird beispielsweise das K-Ras-Protein vermehrt in Gewebe von Magen-Darm-Trakt und Thymus gefunden (Lowy et al., 1993).

Ras-Proteine kontrollieren die Transkriptionsfaktoren von Genen, die eine Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) spielen.

Sie können durch Mutationen im Ras-Gen so verändert werden, dass sie resistent gegen hemmende Faktoren werden. Sekundär entsteht ein permanent aktiviertes Ras-Protein, das zur Entstehung ungehemmt wachsender Krebszellen beitragen kann (Lowy et al., 1993). Aber nicht nur Mutationen in den Ras-Genen können die Aktivität der Ras-Proteine beeinflussen. So wurde beispielsweise beim Pankreaskarzinom beobachtet, dass eine Überexpression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche zu einer Daueraktivierung von Ras führt (Friess et al., 1996).

Proteine im Inneren einer menschlichen Zelle werden durch Proteasomen in Peptide zerlegt. Ein Peptid ist eine im Vergleich zum Protein kürzere Kette von Aminosäuren (AS), welche über sogenannte Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Diese Peptide werden dann von TAP-Transportern (engl.: Transporter Associated with antigen Processing) aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) der Zelle transportiert. Dort werden sie an MHC-Klasse-I-Moleküle (Major-Histocompatibility-Complex Typ I) gebunden und auf die Zelloberfläche transportiert (Greten et al., 1998).



Der MHC besteht aus Genen, die für eine Gruppe von membranständigen Glykoproteinen kodieren. Beim Menschen wird er auch Humanes Lymphozyten-Antigen (HLA-Lokus) genannt und findet sich auf Chromosom 6. Für das MHC-Klasse-I-Glykoprotein sind im humanen System drei Genloci bekannt: HLA-A, HLA-B und HLA-C. MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich in und auf jeder kernhaltigen Zelle des menschlichen Körpers. In einer Bindungsgrube dieser Moleküle werden Peptide aus den im inneren der Zelle abgebauten Proteinen präsentiert. Es wird demnach der Proteinbestand einer Zelle auf der Zelloberfläche für das Immunsystem erkennbar abgebildet. Bei Veränderungen im Proteinbestand der Zelle durch den Einfluss von Viren oder Onkogenen kann sich dies auch durch MHC-Komplexe, die veränderte Peptide präsentieren, auf der Zelloberfläche darstellen. Diese wiederum können von T-Zellen des Immunsystems erkannt werden.

### **1.3 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Funktion im Rahmen der zellulären Immunität**

Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen und einem erworbenen Arm. Der erworbene oder adaptive Arm wird wiederum unterteilt in die zelluläre und die humorale Immunantwort.

Die wesentlichen Effektoren der zellulären Immunantwort sind spezifisch reagierende, CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten, CD4-positive T-Zellen und durch diese aktivierte Makrophagen. Die humorale Immunantwort basiert im Wesentlichen auf B-Lymphozyten und von diesen produzierten Antikörpern. Beiden ist ein Grundprinzip gemeinsam: Das körperfremde Material muss zuerst spezifisch erkannt werden, bevor es bekämpft werden kann.

Zytotoxische T-Lymphozyten als Effektorzellen des zellulären Immunsystems stehen auf der Suche nach Möglichkeiten der immunologischen Tumorthherapie besonders im Fokus (Greenberg et al., 1991; Rosenberg et al., 1991), und es wurde in der Vergangenheit mehrfach gezeigt, dass sie in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und effektiv abzutöten (Gjertsen et al., 1997; Khleif et al., 1999).

Die T-Zelle reift und differenziert im Gegensatz zur B-Zelle, welche im Knochenmark enddifferenziert, im Thymus. Typisch für die sogenannten zytotoxischen T-Zellen ist der oben genannte cluster of differentiation Typ 8 (CD8), ein membranständiges Glykoprotein, das eine wichtige Rolle als Stabilisator bei der Bindung zwischen MHC-

Peptid-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) während der Antigenerkennung spielt. Der TCR von CD8-positiven ( $CD8^+$ ) T-Zellen erkennt Peptide mit einer Länge von acht bis maximal 11 Aminosäuren (Jardetzky et al., 1991; Rammensee et al., 1995), wenn sie an den MHC Klasse I gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Im menschlichen Körper bilden  $CD8^+$ -T-Zellen, die noch nicht mit einem körperfremden Antigen in Berührung gekommen sind („naive“ T-Zellen), mit ihren TCR einen nahezu unbegrenzten Pool von Rezeptoren, die viele verschiedene Antigene erkennen können. Sie zirkulieren im Blut und bewegen sich zwischen den unterschiedlichen lymphatischen Geweben des Körpers. In den Lymphknoten werden die T-Zellen ständig mit körperfremden Antigenen konfrontiert, die ihnen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (engl.: APC) nach Aufnahme in der Peripherie angeboten werden (Picker et al., 1992). Für die Aktivierung einer naiven, noch nicht auf ein spezielles Antigen reagierenden Zelle sind Kostimulatoren (CD28 und das B7-Molekül) auf der Oberfläche der stimulierenden Zelle erforderlich (Rudd et al., 1996). Solche Kostimulatoren werden nur auf der Oberfläche der professionellen APC, vor allem dendritische Zellen und Makrophagen, in hoher Dichte exprimiert (Sharpe et al., 1995; Steinman et al., 1991). Eine erfolgreiche Aktivierung führt zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen. Die Proliferation ist vor allem abhängig von der Produktion von IL-2, einem T-Zell-Wachstumsfaktor, und dessen Bindung an die T-Zellen mittels des IL-2-Rezeptors (Minami et al., 1993).

Eine spezifisch aktivierte, zytotoxische T-Zelle benötigt bei erneutem Antigenkontakt keine Kostimulatoren mehr für ihre Aktivierung (Wong et al., 1996). Bei Kontakt mit einer Zelle, die das Antigen an ihrer Zelloberfläche präsentiert, wird diese Zielzelle durch Einschleusung eines Enzyms, das den Vorgang der Selbstzerstörung der Zelle (Apoptose) in Gang setzt, getötet (Henkart et al., 1994; Squier et al., 1994). Gleichzeitig wird als wichtigstes Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) freigesetzt. IFN- $\gamma$  ist in der Lage, die virale Replikation intrazellulär zu verhindern und induziert gleichzeitig eine gesteigerte Expression von MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Oberfläche von infizierten Zellen. Darüber hinaus lockt es Makrophagen an den Ort der Infektion, wo sie entweder infizierte Zellen aufnehmen oder aber als Antigenpräsentierende Zellen zur Stimulation der Abwehrreaktion dienen (Ramshaw et al., 1992).

## 1.4 Tumor-Escape-Mechanismen

Der schlechte Verlauf und die schlechte Prognose vieler Krebserkrankungen beim Menschen implizieren, dass die zellgebundene Immunabwehr gegen Tumorzellen entweder zu schwach ist, oder dass sie gar nicht erst aktiviert wird. Für letztere Hypothese spricht, dass bei Mäusen und Menschen, die keine Lymphozyten besitzen, die Anzahl an Tumorerkrankungen insgesamt gegenüber der Normalpopulation nur unwesentlich zunimmt. Bei den Krebstypen, die bei solchen Individuen gehäuft auftreten, handelt es sich hauptsächlich um virusassoziierte Tumoren. Daraus lässt sich schließen, dass eine Überwachung veränderter Zellen durch das Immunsystem, wie sie Burnet postulierte, vor allem bei der Abwehr virusassoziierter Tumoren eine Rolle spielt. Bei durch Mutation körpereigener Zellen entstandenen Tumoren scheint das Immunsystem jedoch nicht anzusprechen. Als Gründe hierfür werden verschiedene mögliche Erklärungen diskutiert:

Naive T-Zellen brauchen wie weiter oben erwähnt Kostimulatoren, um erfolgreich aktiviert zu werden. Um körpereigene Zellen nicht zu zerstören und eine Autoimmunität zu verhindern, fehlen diese kostimulatorischen Moleküle auf den meisten Körperzellen (Mechanismus der peripheren Toleranz von T-Zellen). Das kann dazu führen, dass die Präsentation eines durch Mutation entstandenen tumorassoziierten Peptids in Zusammenhang mit einem MHC-Klasse-I-Molekül auf der Oberfläche einer Tumorzelle ohne Kostimulatoren zu einer Toleranzinduktion von T-Zellen führt, die Tumorzelle also nicht als fremd erkannt wird. Zusätzlich sezernieren viele Tumorzellen Zytokine, die eine inhibierende Wirkung auf T-Zellen haben (IL-10 und TGF- $\beta$  beispielsweise) (Tada et al., 1991). Weiterhin wurde beobachtet, dass auf manchen Zellen von Tumormetastasen die HLA-Moleküle vermindert oder gar nicht exprimiert werden (Bodmer et al., 1993). Die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen ist jedoch die Voraussetzung dafür, dass Peptide aus dem Zytosol von Tumorzellen auf der Zelloberfläche präsentiert werden können.

Um eine Immunantwort der zytotoxischen T-Zellen auf Tumorzellen zu erhalten und das Immunsystem für die Krebstherapie nutzbar zu machen, müssen diese Toleranzmechanismen durchbrochen werden. Ein Versuch ist hier, die Bildung von spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten mit Hilfe einer Immunvakzinierung zu fördern, die sich beispielsweise gegen veränderte Ras-Peptide richtet.

## 1.5 Immunvakzinierung gegen Ras-Peptide

Bei der therapeutischen Vakzinierung soll die Gabe von tumorspezifischen Peptiden, die von den zytotoxischen T-Lymphozyten des menschlichen Körpers als fremd erkannt werden können, zu einer Aktivierung und klonalen Vermehrung von spezifisch reaktiven T-Zellen führen. So wird versucht, für Antigene, die ausschließlich oder überwiegend von einem Tumor exprimiert werden, die Immuntoleranz zu durchbrechen.

Eine entscheidende Voraussetzung für einen solchen Therapieansatz ist die Identifikation von Peptiden, die aus den Mutationen im Genom einer Krebszelle entstehen. Diese Peptide müssen tatsächlich auf den Tumorzellen an körpereigene MHC-Moleküle gebunden vorliegen. Außerdem muss ein solches Peptid von APC aufgenommen, prozessiert und an der Oberfläche zusammen mit kostimulatorischen Molekülen präsentiert werden, um eine potente Reaktion der zytotoxischen T-Lymphozyten auslösen zu können.

In den vergangenen Jahren wurde intensiv nach mutierten Ras-Peptiden gesucht, die an MHC-Moleküle gebunden als Erkennungsstrukturen (Epitope) für T-Lymphozyten dienen können. Die ersten Erfolge wurden mithilfe von Experimenten an Mäusen erzielt.

1991 wurden erstmals spezifische CTL-Epitope im mutierten Ras-Protein entdeckt, als Mäuse mit DNA für N-Ras mit und ohne eine Mutation an Kodon 61 immunisiert wurden. Isolierte zytotoxische T-Lymphozyten von den Mäusen, die mit der mutierten Ras-DNA geimpft worden waren, erkannten spezifisch nur das mutierte Protein (Peace et al., 1991). Andere Studien konnten T-Zell-Epitope mit einer Valin-Mutation an Kodon 12 im K-Ras-Gen identifizieren. Es handelte sich um Peptide aus den Aminosäuren (AS) 4–12 und 5–17 des 21 Kilo-Dalton schweren K-Ras-Proteins (K-ras p21, 4–12; 12 V; K-ras p21, 5–17; 12 V). Das erste, kürzere Epitop wurde von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, das zweite von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt. Die T-Zellen reagierten spezifisch auf APC, die vorher mit den Peptiden beladen worden waren. Darüber hinaus waren sie in der Lage, auch Tumorzellen selektiv zu erkennen, die mit dem mutierten K-ras transfiziert worden waren (Abrams et al., 1995; Abrams et al., 1996). Die Immunogenität von H-ras wurde untersucht, indem man Mäuse mit mutierten Ras-Peptiden (Cheever et al., 1993) und mutiertem Ras-Protein (Fenton et al., 1993)

immunisierte. Die aus dem Blut der Mäuse isolierten CTLs konnten spezifisch Targetzellen zerstören, die mutierte Ras-Peptide exprimierten (Peace et al., 1994; Fenton et al., 1993). Mäuse, die mit Peptiden immunisiert worden waren, blieben nach Belastung mit Ras-exprimierenden Tumorzellen tumorfrei (Fenton et al., 1993). Mit diesen Studien wurde im Tierexperiment demonstriert, dass mutierte Ras-Proteine von Tumorzellen zerlegt und ihre Peptide als tumorspezifische Epitope für Zellen des Immunsystems präsentiert werden können.

Auch beim Menschen wurde die Immunität gegen mutiertes Ras untersucht. So wurden in einer Untersuchung CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten bei 7 von 16 untersuchten Patienten mit Pankreaskarzinom und bei 2 von 25 Patienten mit Kolonkarzinom beobachtet. Es wurden PBMC der Patienten isoliert und mit unterschiedlich langen Peptiden und Proteinen des mutierten Ras-Gens (12D-Mutation an Kodon 12) konfrontiert. Gesunde Personen zeigten keine reaktiven Zellen (Qin et al., 1995). Antworten der T-Zellen gesunder Probanden auf verschiedene Peptide des mutierten Ras-Gens konnten bisher nur nach Stimulation naiver T-Zellen in vitro erzeugt werden (Jung et al., 1991; Gedde-Dahl et al., 1992; Fossum et al., 1993).

Spezifisch auf ein Ras-Peptid reagierende CD8-positive CTL konnten erstmals bei einem Patienten mit Kolonkarzinom identifiziert und kloniert werden (Fossum et al., 1994). Es handelte sich um ein Peptid aus den Aminosäuren 1–25 des Ras-Proteins mit einer Asparaginsäure-Mutation an Position 13 (p21 ras 1–25; 13D). Allerdings reagierten die T-Zellen nur in Anwesenheit von IL-2 und es konnte keine dem Peptid entsprechende Mutation in den Tumorzellen des Patienten nachgewiesen werden. Ein Jahr später wurde aus den peripheren mononukleären Zellen (engl.: PBMC) von gesunden Spendern eine CD8-positive Zelllinie generiert, die spezifisch gegen ein HLA-0201-restringiertes Ras-Peptid reagierte (p21 ras 51–61; Leucin-Mutation an Position 61). Es konnte ein Zellklon generiert werden, der aber nur eine geringe Peptid-Affinität besaß und nur nach Peptidzugabe eine Melanom-Zelllinie mit der entsprechenden Mutation erkannte (Van Elsas et al., 1995). 1997 wurde ein Peptid entdeckt, das Epitope für CD4- und CD8-positive T-Zellen enthielt. Verantwortlich für die Aktivierung der CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich ein Nonamer mit HLA-B35-Restriktion (ras 7–15; 12 Val), gegen das man eine T-Zell-Linie aus den PBMC eines Patienten mit Pankreaskarzinom generieren konnte. Der Patient war zuvor mit einem 17 Aminosäuren langen Ras-Peptid geimpft worden. Die Zelllinie erkannte und zerstörte

Zellen der Tumorzelllinie, die aus dem Tumor des Patienten generiert worden war (Gjertsen et al., 1997). Damit wurde direkt gezeigt, dass auch beim Menschen Peptide von mutierten Ras-Proteinen in Tumorzellen verarbeitet, auf deren Oberfläche exprimiert und von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden können. Solche antigenspezifischen T-Zellen sind auch dazu in der Lage, in vitro kultivierte Tumorzellen zu zerstören. Dass sie auch Tumorzellen in vivo zerstören können, ist bisher noch nicht nachgewiesen worden.

Bei vakzinieren Karzinom-Patienten wurden weitere Peptide entdeckt, darunter zehn Aminosäuren lange, HLA-A\*0201-restringierte (Ras 5–14, 12 Asp und Ras 5–14, 12 Val) Epitope für CD8-positive Zellen (Abrams et al., 1997). Alle Epitope entsprachen der im Tumormaterial der Patienten identifizierten Mutation. Die reaktiven zytotoxischen T-Zellen waren dazu in der Lage, verschiedene Typen von Tumorzellen mit den entsprechenden Mutationen im Zellgut zu erkennen und zu zerstören.

Diese Peptide, die nachgewiesenermaßen auf Tumorzellen präsentiert werden und von T-Zellen erkannt werden können, werden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwandt.

## **1.6 Gründe für die Auswahl der Methodik**

Die Identifikation von Tumorantigenen, die mögliche Zielstrukturen für CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten darstellen können, hat zu verschiedenen Vakzinierungsstrategien geführt. Die ersten Studien wurden beim Malignen Melanom durchgeführt und brachten teilweise überraschende Erfolge (Marchand et al., 1995; Nestle et al., 1998; Rosenberg et al., 1998a; Rosenberg et al., 1998b). Allerdings konnten solche Erfolge in der Folgezeit nicht zuverlässig reproduziert werden. Auch zur Vakzinierung von Krebspatienten mit Ras-Peptiden wurden bereits mehrere klinische Phase-1-Studien durchgeführt (Khleif et al., 1999; Fossum et al., 1995; Gjertsen et al., 1996; Gjertsen et al., 2001). Die Anzahl der reaktiven T-Zellen ist jedoch in keiner der Studien genau quantifiziert worden, die immunologische Antwort der Zellen wurde in Form von Stimulationsindizes oder gesteigerter Thymidin-Aufnahme dargestellt. Da sich die durchgeführten Assays in allen Studien bezüglich

ihres Protokolls unterscheiden, lässt sich der Erfolg der Impfungen schlecht vergleichen.

Aus diesem Grunde wird in der vorliegenden Arbeit ein Untersuchungssystem aus Assays verwendet, die quantitative Daten liefern. So generiert der im Mittelpunkt des Systems stehende ELISpot quantitative Daten auf dem Niveau einzelner Zellen und ist sensitiver als andere Assays (Herr et al., 1996; Schmittel et al., 1997). Hiermit soll ermöglicht werden, die mit unterschiedlichen Vakzinierungsstrategien und -protokollen erreichten T-Zell-Frequenzen von vakzinierten Patienten vergleichen zu können. In keiner der o.g. Studien war es gelungen, vor der Vakzinierung präexistente Ras-reaktive T-Zellen zu detektieren. Um unnötige Behandlungsversuche zu vermeiden, wäre es aber von Vorteil, im Vorfeld einer klinischen Studie Patienten zu identifizieren, die für eine Vakzinierung geeignet sind. Deshalb wird der ELISpot in dieser Studie zweimal durchgeführt: Einmal direkt mit frisch isolierten PBMCs und ein weiteres mal nach einer 10-tägigen Stimulation der Zellen *in vitro*, um antigenspezifische T-Zellen zu expandieren. So soll eine ausreichend hohe Sensitivität erreicht werden, auch niedrige Vorläufer-Frequenzen von T-Zellen zu quantifizieren.

## **1.7 Ziel der Doktorarbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist, eine sensitive Screeningmethode zur Vorbereitung und Begleitung einer Vakzinierungsstudie an Pankreaskarzinompatienten zu entwickeln. Mit der Methode sollen die spezifischen T-Zell-Frequenzen von gesunden Blutspendern und Pankreaskarzinompatienten gegen drei verschiedene Ras-Peptide (den Wildtyp und zwei mutierte Peptide) untersucht werden. Durch den Nachweis von Ras-spezifischen T-Zellen bei Pankreaskarzinompatienten sollen für eine Vakzinierung besonders geeignete Patienten identifiziert werden.

Zusätzlich soll die Frage beantwortet werden, ob es signifikante Unterschiede in der Reaktivität von T-Zellen gegen Influenza bei gesunden Blutspendern und Pankreaskarzinompatienten gibt.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sollen auf die Frage hin diskutiert werden, ob sie für die Vorbereitung einer Vakzinierungsstudie sowie die Beurteilung von Verlauf und Effektivität einer Vakzinierung von Bedeutung sein können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Medien**

##### **Phosphate buffered Saline (PBS)**

1 l destilliertes Wasser +  
8,0 g Natriumchlorid  
0,2 g Kaliumchlorid  
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat  
2,85 g Natriumhydrogenphosphat  
Der ph-Wert wird auf 7,2 titriert.

##### **Basales Iscove's Kulturmedium** (Biochrom KG, Deutschland)

500 ml Medium +  
50 ml humanes AB-Serum (Sigma-Aldrich, Deutschland), steril und inaktiviert  
8 ml Hepes Free Acid Ultrol Grade, 1M Lösung (Calbochem, USA)  
50 mg Penicillin/Steptomycin-Sulfat (Gibco BRL, USA)  
5 ml 1mm L-Glutamin (Gibco BRL, USA)

##### **RPMI 1640** (Biochrom KG, Deutschland)

500 ml Medium +  
50 ml FCS (Biochrom KG, Deutschland), steril und inaktiviert  
8 ml Hepes Free Acid Ultrol Grade, 1M Lösung (Calbochem, USA)  
50 mg Penicillin/Steptomycin-Sulfat (Gibco BRL, USA)  
5 ml 1mm L-Glutamin (Gibco BRL, USA)

#### **2.1.2 Puffer**

##### **ELISpot Puffer**

100 ml dest. Wasser + 293 mg  $\text{NaHCO}_3$  + 159 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , nach Herstellung steril filtriert (Bottle-Top-Filter; Schleicher und Schuell, Deutschland)



**ELISpot Wasch-Puffer**

PBS + 0,05 % Tween 20

**ELISA Coating-Puffer**

PBS, ph 7,2–7,4

**ELISA Block-Puffer**

PBS, ph 7,2–7,4; 1 % Albumin-Fraktion 5 (Sigma-Aldrich, Deutschland)

**ELISA Wasch-Puffer**

50 mm Tris-Puffer (Sigma-Aldrich, Deutschland)

0,2 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Lösung mit HCL auf einen ph von 7,9–8,1 titriert; nach Herstellung steril filtriert  
(Bottle-Top-Filter; Schleicher und Schuell, Deutschland)

**2.1.3 Chemikalien**

**Trypan blau** (0,4 %; Sigma-Aldrich, Deutschland)

**Dimethylsulfoxid** (DMSO; Sigma-Aldrich, Deutschland)

**TMB Substrat-Lösung** (N-301; Fa. Endogen, USA)

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** (0,18 M; Calibochem, USA)

**Ficoll-Dichtegradienten Lösung** (Dichte: 1,077; Biochrom KG, Deutschland)

**DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

½ silberne (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und ½ goldene (DAB: 3,3'-Diaminobenzidin-Tetra-Hydrochlorid-Dihydrat) Tablette (Sigma-Aldrich, Deutschland) auf 1 ml dest. Wasser; entspricht 0,5 mg/ml DAB und 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Humanes Interleukin-2** (Chiron Therapeutics, USA)

Injektionsflaschen;  $18 \times 10^6$  IU IL-2 Fläschchen; aliquotiert in Kryo-Gefäße (100 ul IM-Medium à  $1 \times 10^6$  IU/ml pro Gefäß) und gelagert bei  $-20^\circ \text{C}$

**Rekombinantes Interferon-Gamma** (Endogen, USA)

2.500 IU rekombinantes humanes IFN- $\gamma$  in lyophilisierter Form; aufgelöst in komplettem IM-Medium (Konz.: 1000 IU/ml); gelagert bei  $-20^\circ \text{C}$

**Humanes AB-Serum** (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Inaktivierung in einem Wasserbad für etwa 30 min bei  $56^\circ \text{C}$ , anschließende Lagerung portioniert bei  $-20^\circ \text{C}$ . Vor Verwendung wurde das Serum erneut steril filtriert.

**Fetales Kuh-Serum** (FCS; Biochrom KG, Deutschland)

Aus Pankreas-Lyophilisat des Rindes; steril; aufgelöst in sterilem Wasser in einer Konzentration von 1 mg/ml (bei einer spezifischen Aktivität von 2.000 IU/mg)

## 2.1.4 Antikörper und Enzyme

**DNase I** (Desoxyribonuclease I; Roche, Schweiz)

**Extravidin Peroxidase** (Sigma-Aldrich, Deutschland)

**HRP-konjugiertes Streptavidin** (N-100; Endogen, USA)

**Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper** (Klon 1-D1-K; Mabtech, Schweden)

**Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper biotiniliert** (Klon 7-B6-1; Mabtech, Schweden)

**Anti-humaner IFN- $\gamma$ -Antikörper** (Klon M 700 A-E; Mabtech, Schweden)

**Anti-humaner IFN- $\gamma$ -Antikörper biotiniliert** (Klon 7-B6-1; Mabtech, Schweden)

**Anti-HLA-A2-Antikörper BB7.2** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau M. Schwarz; Labor Prof. A. Pezzutto, MDC Berlin-Buch)

**Anti-Maus IgG- und IgM-Antikörper** (FITC; Jackson Immuno Research, USA)

**Anti-Maus IgG-2a-Isotyp** (FITC; Beckton Dickinson, USA)

### 2.1.5 Peptide

**Influenza-Matrix-Peptid**; AS 58–66: GILGFVFTL (Bednarek et al., 1991)

**HIV-gag-Peptid**; AS 77–85: SLYNTVATL (Harrer et al., 1998; Tsomides et al., 1994)

**Ras-Wildtyp**; K-ras AS 5–14: KLVVVGAGGV (Abrams et al., 1997)

**Ras-12Val-Mutation**; K-ras AS 5–14: KLVVVGAVGV (Abrams et al., 1997)

**Ras-12Asp-Mutation**; K-ras AS 5–14: KLVVVGADGV (Abrams et al., 1997)

Alle Peptide hergestellt von Biosyntan (Berlin, Deutschland); Reinheit: 95 %

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide decken zusammen 80 % der auf Pankreaskarzinomzellen vorkommenden Ras-Mutationen ab. Es handelt sich um Ras-Mutationen an Kodon 12, bei denen in 80 % der Fälle das Glutamin entweder durch Valin oder durch Asparaginsäure ersetzt wird (Abrams et al., 1996). Damit ergibt sich für HLA-\*02-positive Patienten eine Wahrscheinlichkeit von etwa 70 % für das Vorliegen einer durch die verwendeten Peptide vertretenen Mutation.

### 2.1.6 Geräte

#### ELISA-Reader

Wallac Victor 1420 Multilabel Counter mit automatischer MultiCalc-Auswertung  
Software: Wallac Victor Betriebssoftware Wallac multicalc.

### **Zentrifugen**

Heraeus (Deutschland) Varifugen 6. OG

### **Vermengungshilfe**

Vortex-Genie 2 von Scientific Industries (USA)

### **Mikroskope**

Leica (Deutschland) BM E Biologiemikroskop

### **PH-Messgerät**

WTW (USA) Multical PH-Meter ph 538

### **Wasserbad**

Omnilab (Deutschland) GFL Version 1003

### **Inkubatoren**

Steri-Cult 200 von Labotect (Deutschland)

### **ELISpot-Reader**

Zeiss (Deutschland) Vision C

Mikroskop mit angeschlossenem digitalisiertem Videosystem

### **Durchflusszytometer**

Becton Dickinson (USA) FACScalibur

Software: Cellquest (Becton Dickinson)

## **2.1.7 Sonstiges Material**

### **Neubauer Zählkammer**

Marienfeld (Deutschland); 0,1 mm Tiefe; 0,0025 m<sup>2</sup>

## **Pipetten**

Integra Biosciences (USA) Pipetboy mit Costar (Deutschland) serologischen Einmal-Pipetten steril: 2; 5; 10 und 25 ml.

GILSON (USA) Pipetten 2; 10; 20; 100 und 1.000  $\mu$ l

Eppendorf (Deutschland) Multikanal-Pipette 50–300  $\mu$ l

Costar (Deutschland) Pipettenspitzen

Eppendorf (Deutschland) Multipipetten mit Kombitips 2,5 und 5 ml

## **Behältnisse**

Milian (USA) TPP Zentrifugenröhrchen steril; 15 und 50 ml

Milian (USA) TPP Zellkulturplatten 24 und 96-Loch

Milian (USA) TPP Zellkulturflaschen 25, 75 und 150 cm<sup>3</sup>

Cotech (Deutschland) Cryo-Vials 1,5 ml

Eppendorf (Deutschland) Standard-Reaktionsgefäße für PCR („Eppendorf-Tubes“) 0,2 und 1,5 ml

## **Filter**

Schleicher & Schuell (Deutschland) sterile Rundfilter 0,2; 0,4; 1,2 und 5  $\mu$ m Porengröße; Bottle-Top-Filter Zap-Cap mit 0,2  $\mu$ m Porengröße

## **Verwendete Software**

Microsoft Word 2004 für Mac (Microsoft Corporation, USA)

Microsoft Excel 2004 für Mac (Microsoft Corporation, USA)

OmniGrafflePro 2007 (The Omni Group, USA)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Übersicht über die Vorgehensweise**

Zunächst wurden sieben gesunde Blutspender mit dem etablierten Untersuchungssystem getestet. Nach deren Auswertung und Bewertung fand die Untersuchung der PBMC von 43 Patienten mit Pankreaskarzinom statt.

Als erstes erfolgte die Isolation von PBMC aus Buffy-coat-Präparationen der gesunden Blutspender beziehungsweise aus heparinisiertem Vollblut der Patienten. Direkt im Anschluss wurden die isolierten PBMC auf das Vorhandensein des Oberflächenantigens HLA Typ A2 getestet, da alle verwendeten Peptide HLA-A2-restringiert sind. Da die gesunden Blutspender in der Blutbank der Charité schon HLA-typisiert worden waren, entfiel hier der Schritt, die HLA-Typisierung mittels Durchflusszytometrie vorzunehmen.

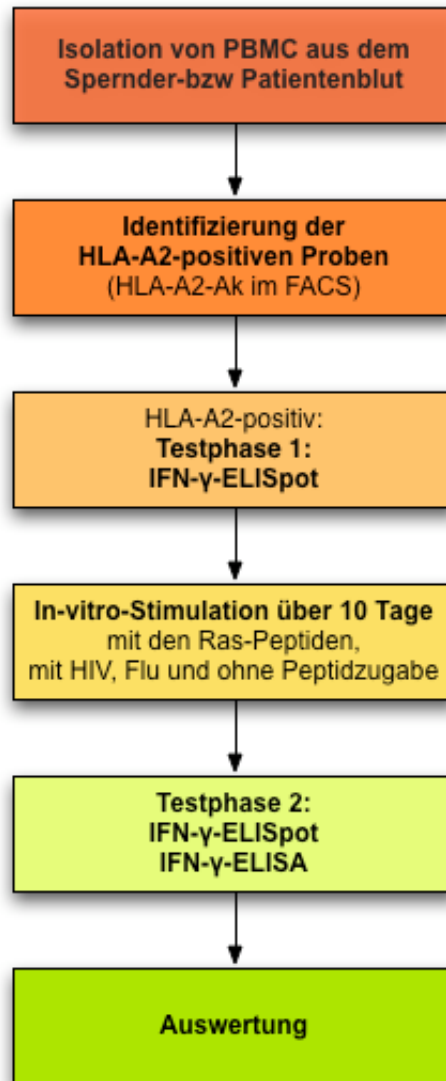
Es wurden nur die Zellen von HLA-A2-positiven Spendern weiter untersucht. Von diesen wurden noch am Tag der PBMC-Isolation ein erster ELISpot-Assay sowie verschiedene Zellkulturen angesetzt. Überschüssige Zellen wurden eingefroren. Nach 10 Tagen Stimulation in den Kulturen wurden der zweite ELISpot und ein ELISA durchgeführt (Abbildung 1).

### **2.2.2 PBMC-Isolation aus Buffy-coat-Präparationen und aus Patientenblut**

Zunächst wurde ein dem Untersuchungsvorhaben entsprechendes Votum der Ethikkommission der Charité, Campus Berlin-Buch eingeholt (Aktenzeichen AA3/01/23; genehmigt am 07.05.2001).

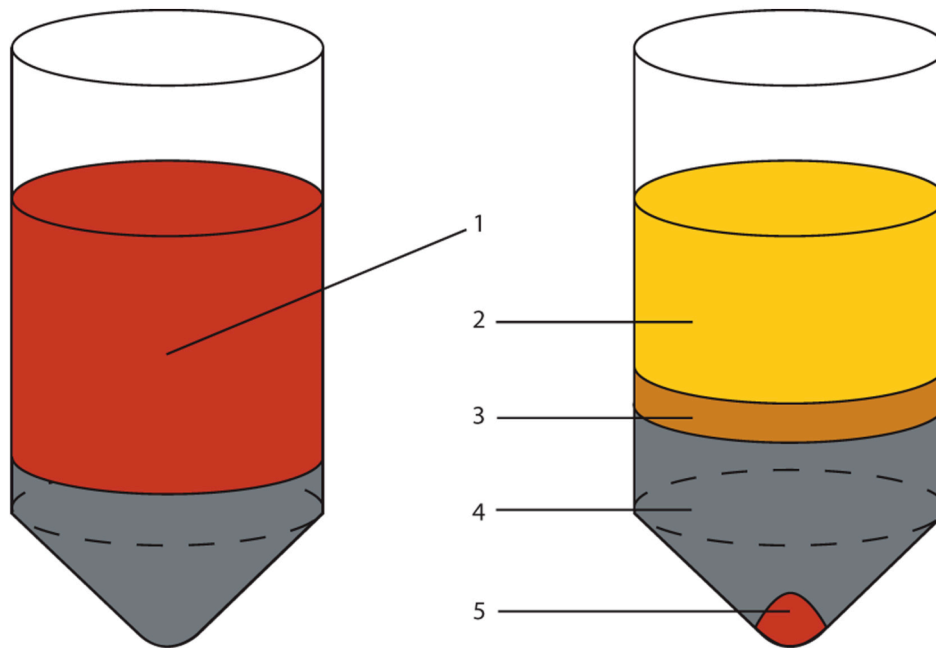
Die peripheren mononukleären Zellen der gesunden Blutspender wurden aus Buffy-coat-Präparationen gewonnen, die uns freundlicherweise von der Blutbank der Charité, medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin, Campus Virchow-Klinikum zur Verfügung gestellt wurden.

Die PBMC der Patienten wurden aus heparinisiertem Vollblut gewonnen (Patienten der Poliklinik oben genannter Klinik). Von allen Patienten/Spendern wurde nach Aufklärung vor der Blutentnahme eine schriftliche Zustimmung eingeholt. Die Isolation erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077). Bis zu 37,5 ml Blut (1:1 verdünnt mit PBS) wurden auf 12,5 ml Ficoll in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet und für 20 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Auf diese Weise werden die Erythrozyten und Granulozyten von der mononukleären Zellfraktion getrennt; sie befindet sich nach der Zentrifugation in einer Interphase über dem Ficoll (Abbildung 2).



**Abbildung 1: Übersicht über den Ablauf der Untersuchungen**

Diese Phase wurde mit einer 10 ml-Dispenser-Pipette abgenommen und drei Mal mit 50 ml PBS gewaschen. Nach der Zellzählung (siehe unten) wurde ein Teil der Zellen direkt für den ELISpot-Assay und die Zellkultur verwendet; die übrigen wurden in Einfriermedium überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe unten).



**Abbildung 2: Die Phasen vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation**

Legende: 1 Vollblut, 2 Serum, 3 PBMC, 4 Ficoll, 5 Erythrozyten

### 2.2.3 Zellzählungen

Zum Zählen von Zellen wurden 20  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Zellsuspension in eine 96-Loch-Platte mit rundem Boden überführt und dort mit 20  $\mu\text{l}$  Trypan Blau vermischt. Mit diesem Gemisch wurde die Kammer einer Neubauer-Zählplatte gefüllt; sie fasst ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ . Unter dem Mikroskop erscheinen die Zellen auf einem standardisierten Zählfeld, welches in vier Quadranten unterteilt ist. Zwei von den vier Quadranten wurden ausgezählt, um die ungefähre Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Die gezählte Zellzahl wurde mit  $10^4$  multipliziert und auf die vorhandene Menge an Zellsuspension hochgerechnet.



## 2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Überschüssige PBMC von gesunden Blutspendern und Patienten mit Pankreaskarzinom wurden im Anschluss an die Dichtegradienten-Isolation eingefroren. Dazu wurden die Zellen vor der letzten Zentrifugation im Separationsvorgang gezählt und die einzufrierende Menge in ein gesondertes Zentrifugenröhrchen übertragen. Als Einfriermedium wurde unter sterilen Bedingungen eine Lösung aus 90 % fetalem Kälberserum (steril und inaktiviert) und 10 % DMSO hergestellt. Jetzt wurden die Zellen noch einmal zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand vorsichtig abgeschüttet. Das Pellet wurde resuspendiert und in das Einfriermedium aufgenommen. Sofort im Anschluss wurde je 1 ml der Suspension in die vorbereiteten Kryoröhrchen pipettiert (2–10 x 10<sup>7</sup> Zellen auf einen Milliliter Einfriermedium pro Kryoröhrchen), die umgehend in einen Tiefkühlschrank mit einer Temperatur von –80° C überführt wurden. Um die Einwirkzeit des bei Raumtemperatur zelltoxischen DMSO auf die Zellen so gering wie möglich zu halten, wurden nicht mehr als 10 Kryoröhrchen in einem Arbeitsgang eingefroren. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Wurden Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut, so wurden vorher entsprechend der Anzahl an aufgetauten Kryoröhrchen 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorbereitet. Dazu wurde jedes Röhrchen mit 7 ml basalem Iscove's Medium und 1 ml humanem AB-Serum in steriler Umgebung befüllt. Anschließend wurden bis zu 5 Kryoröhrchen gleichzeitig aus dem Stickstoff entnommen und in einem 37° C warmen Wasserbad angetaut. Dann wurden die Röhrchen unter der Sterilbank geöffnet. Mithilfe des in den vorbereiteten Zentrifugenröhrchen enthaltenen Auftaumediums wurde die Zellsuspension vollständig aufgetaut und anschließend in das Zentrifugenröhrchen überführt. Zur optimalen Zellausbeute wurde das Kryoröhrchen mehrmals mit Auftaumedium gespült. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 37° C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml frischem IM-Medium resuspendiert. Nun folgte die Zellzählung. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einer für den weiteren Gebrauch praktischen Konzentration im Kulturmedium aufgenommen.

### 2.2.5 Durchflusszytometrie (HLA-A2-FACS)

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene Oberflächenantigene auf Zellen nachgewiesen werden. Sie müssen dazu vorher mit entsprechenden Antikörpern angefärbt werden. Die so markierten Zellen werden in dem Gerät durch eine vibrierende Kammer geschleust, welche die Zellsuspension in feine Tropfen auftrennt. Im Idealfall enthält ein solcher Tropfen eine einzelne Zelle, die dann an einem Laserstrahl vorbei geleitet wird. Die hierbei auftretende Streuung des Lichtes wird zur Charakterisierung der Zelle verwendet (die achsengerechte Streuung korreliert mit der Größe der Zelle; die Streuung im 90°-Winkel zur Laserachse korreliert mit der Granularität der Zelle).

Zusätzlich enthalten die Zytometer Detektoren für Fluoreszenzlicht, das beim Auftreffen des Laserstrahls auf einen fluoreszenzmarkierten Antikörper entsteht, der an einem spezifischen Oberflächenantigen haftet. Zwei typische solcher Fluoreszenzfarbstoffe sind das Phykoerythrin (PE; rot) und das Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün).

#### 2.2.5.1 Zellfärbung mit dem Antikörper BB7.2 (FITC)

Der BB7.2-Antikörper bindet spezifisch an das humane Lymphozyten-Antigen Typ A2 auf der Oberfläche von Zellen (Russo et al., 1984; Parham et al., 1981). Er wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung der HLA-A2-positiven Patienten mit Pankreaskarzinom verwendet, indem er zur Identifizierung im FACS mit einem FITC-konjugierten Anti-Maus-Ziege-Antikörper gekoppelt wurde.

Für eine Färbung wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen für die Ansätze mit BB7.7-Antikörper und einer entsprechenden Isotypkontrolle verwendet.

Eine Isotypkontrolle ist ein Antikörper, der dem verwendeten spezifischen Antikörper in Form und Fluoreszenzmarkierung gleicht, aber nicht an die Zelle binden soll. Seine parallele Verwendung soll nachweisen, dass das Färbeergebnis nicht durch unspezifische Bindungen verfälscht wird.

Die zu markierenden Zellen wurden in 200 µl Färbepuffer aufgenommen (PBS; 1 % FCS), in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und auf 4° C heruntergekühlt (Eisbad). Dann wurde der BB7.2-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzu gegeben

und bei 4° C für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Parallel wurde der gleiche Färbeansatz mit der Isotypkontrolle  $\gamma$ -2a-FITC durchgeführt. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Färbepuffer aufgefüllt, die Lösung wurde auf dem Vortex gut durchmischt und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Zu dem Ansatz mit dem BB7.2-Antikörper wurde nun der FITC-konjugierte Anti-Maus-Ziege-Antikörper in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml hinzu gegeben und erneut 10 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze noch zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l Färbepuffer resuspendiert und die Messung durchgeführt.

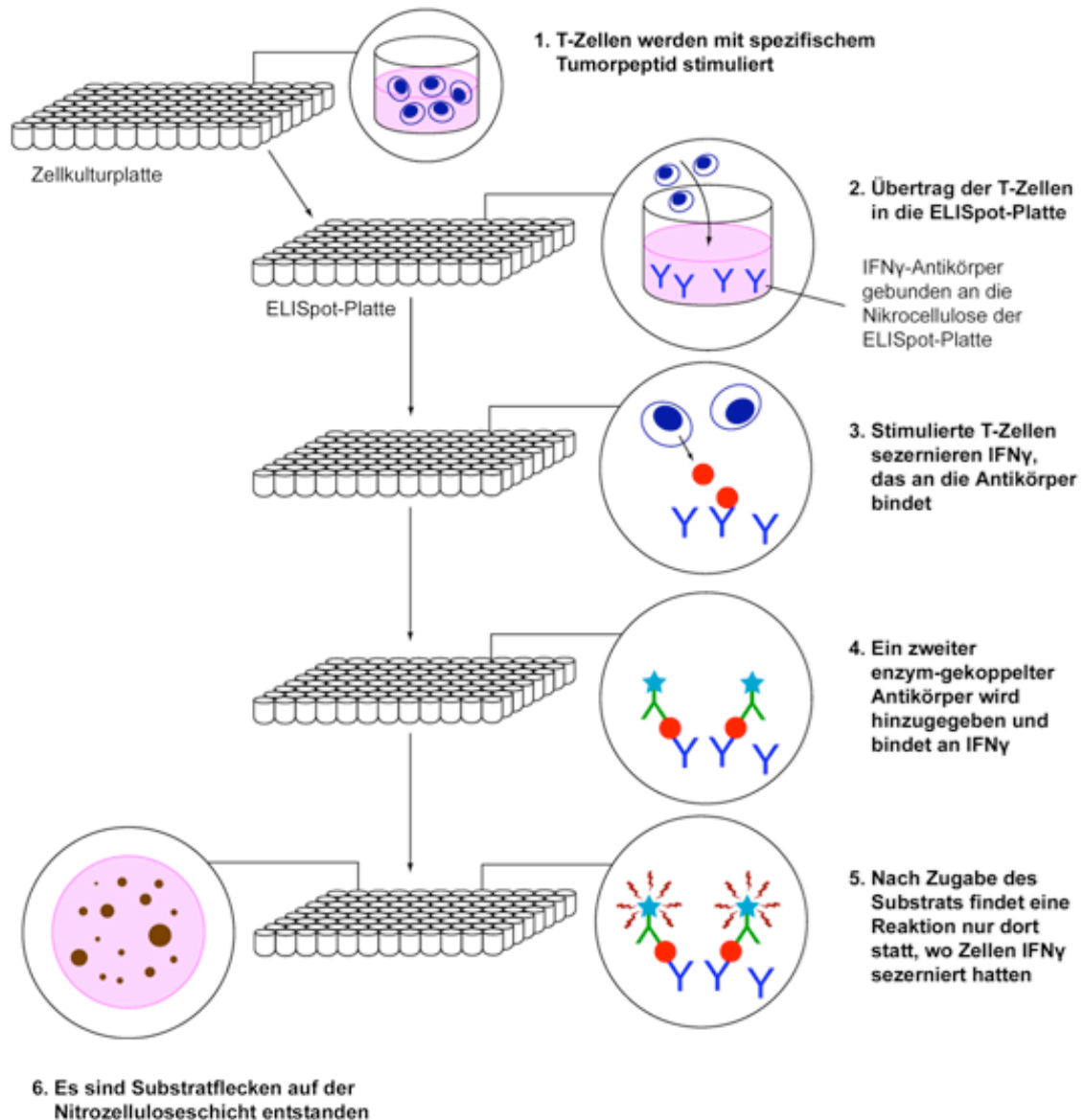
Die Auswertung erfolgte mit der Software Cellquest von Becton Dickinson.

## **2.2.6 IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay**

### 2.2.6.1 Prinzip des durchgeführten Assays

Die Abkürzung ELISpot steht für Enzyme linked Immuno-Spot. Dies beschreibt die dunkelbraunen Punkte (engl.: Spots), die am Ende eines solchen Tests auf dem Boden einer speziellen 96-Loch-Platte zu sehen sind. Die einzelnen Löcher einer solchen Platte werden auch Wells (engl.: Grube, Schacht) genannt. Die Spots repräsentieren die Immunantwort von einzelnen T-Zellen in Form von Zytokin-Sekretion. Zunächst werden T-Zellen mit Hilfe eines Antigens stimuliert (Influenza-Matrix-Peptid beispielsweise). Die T-Zellen, welche einen spezifischen TCR für das stimulierende Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, beginnen nun als Zeichen ihrer Aktivierung Interferon  $\gamma$  zu produzieren. Der Boden einer ELISpot-Untersuchungsplatte besteht aus einer speziellen Nitrozelluloseschicht, an deren Oberfläche Antikörper haften (in dem verwendeten Assay sind dies Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper). Sinkt nun eine aktivierte T-Zelle auf den Boden der ELISpot-Platte ab, wird in ihrer direkten Umgebung das produzierte IFN- $\gamma$  durch die am Boden haftenden Antikörper gebunden. In einem nächsten Schritt werden die Zellen aus der Platte gespült und es bleiben am Boden Flecken mit an Antikörper gebundenem Zytokin zurück. Dieses gebundene Zytokin wird nun erneut mit einem Antikörper gebunden, der zusätzlich an ein Enzym gekoppelt ist. Wird ein entsprechendes

Substrat in das Loch der Platte eingefüllt, wird dies nur an der Stelle umgesetzt, an der die Zelle gelegen und IFN- $\gamma$  produziert hat (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Übersicht über das Prinzip des ELISpots**

Die hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit des ELISpot-Assays ist bereits gut belegt. Die detektierten Spots repräsentieren in einem hohen Maß die Zytokin-Sekretion von CD8-positiven T-Zellen (Schmittel et al., 1997). Die Reproduzierbarkeit der ELISpot-Daten ist auch in einer Multicenterstudie belegt (Scheibenbogen et al.,

2000). Die peptidinduzierte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, wie sie in der hier verwendeten Untersuchung durchgeführt wurde, charakterisiert die Antigenreaktiven Zellen als CD8-positive Typ-1-Zellen vom Effektor- oder Memory-Subtyp (Mosmann et al., 1996; Hamann et al., 1997).

Das zur Etablierung verwendete Influenza-Matrix-Peptid (M1 58–66, Sequenz GILGFVFTL) geht aus einem intraviralen Protein hervor. Diese intraviralen Proteine weisen unter den verschiedenen Virustypen eine relativ hohe Homologie auf. Da zur Etablierung der Methode die mononukleäre Zellfraktion von gesunden Blutspendern verwendet worden ist, war nicht feststellbar, ob und mit welchem Virustyp die Probanden einmal infiziert waren.

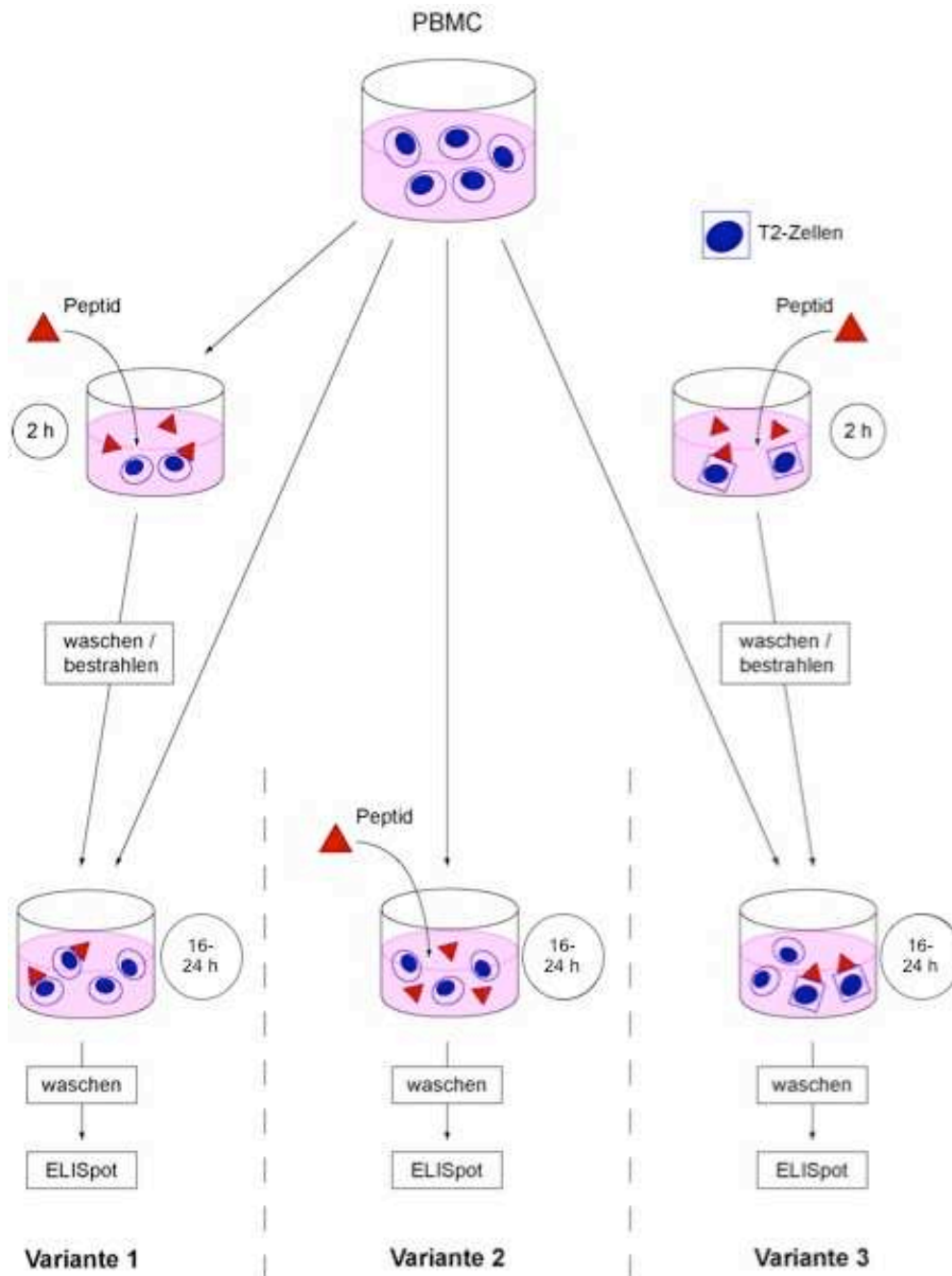
Unter der Annahme, dass eine Infektion mit HIV bei gesunden Blutspendern relativ unwahrscheinlich ist, wurde als Negativkontrolle ein HIV-Peptid verwendet

#### 2.2.6.2 Varianten der T-Zell-Stimulation in den durchgeführten Assays

In der Etablierungsphase der Assays wurde zunächst eine Untersuchung durchgeführt, um die beste Stimulationsvariante für den ELISpot herauszufinden. Dazu wurden PBMC der Blutspender Nummer 6980 und 6985 aufgetaut und in Kulturmedium überführt. Ein Teil der Zellen wurde über Nacht in dem Kulturmedium belassen und am nächsten Morgen in einem ELISpot auf die Reaktivität gegenüber Influenza-Matrix-Peptid getestet, der andere Teil wurde zunächst über 10 Tage kultiviert und anschließend getestet. Als Negativkontrolle in den Tests wurde HIV-Peptid verwendet.

Für die Stimulation der PBMC wurden im ELISpot je drei Wells à  $1 \times 10^5$  PBMC mit peptidbeladenen T2-Zellen, mit peptidbeladenen autologen PBMC und durch direkte Zugabe von  $10 \mu\text{g/ml}$  des entsprechenden Peptids 16–24 Stunden lang stimuliert (Abbildung 4).

Um die T2-Zellen und autologen PBMC mit Antigen zu beladen, wurde die benötigte Menge Zellen aus einer Kultur entnommen und zunächst in  $10 \text{ ml}$  IM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml IM eingestellt, Peptid wurde in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  hinzu gegeben, und die Zellen wurden 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ N}_2$  inkubiert. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen dann mit  $30 \text{ Gy}$  einer Caesium-37-Quelle bestrahlt, um eine



**Abbildung 4: Stimulationsvarianten im ELISpot.**

**Variante 1:** PBMC des zu untersuchenden Spenders werden auch für die Präsentation des Tumorpeptids verwendet. Nach 2-stündigem Pulsen mit 10 µg/ml Peptid werden sie bestrahlt und das überschüssige Peptid wird in einem Waschschritt entfernt. Es folgt die Konfrontation mit den ungeladenen PBMC desselben Spenders im Rahmen der Stimulation für 16 bis 24 Stunden.

**Variante 2:** Das Beladen mit Peptid (Pulsen) entfällt. Zu den zu untersuchenden PBMC wird lediglich Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzu gegeben. Die Antigenpräsentation übernehmen die in den PBMC enthaltenen APC.

**Variante 3:** Wie Variante 1, allerdings werden keine autologen PBMC, sondern TAP-mutierte T2-Zellen zur Antigenpräsentation verwendet.

Proliferation der Zellen zu verhindern. Hiernach wurden die Zellen drei Mal in IM gewaschen und dann ausplattiert. Beim ELISpot wurden  $5 \times 10^4$  APC pro Loch verwendet.

Für die Kulturen wurden von jedem Blutspender zwei Wells à  $4 \times 10^6$  Zellen angesetzt, die Stimulation erfolgte mit Influenza-Matrix-Peptid und mit HIV-Peptid als Negativkontrolle. Am 10. Tag der Zellkultur wurde erneut ein ELISpot durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt. Sie hatten zur Folge, dass in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Assays zwei Stimulationsvarianten Verwendung fanden. Bei der Untersuchung von PBMC direkt nach Isolation wird die Stimulation nur mit Peptid durchgeführt. Bei der Untersuchung nach 10-tägiger Stimulation der T-Zellen in vitro wurden T2-Zellen als APC verwandt. Autologe PBMC wurden nicht verwendet.

#### 2.2.6.3 ELISpot mit frisch isolierten PBMC

Zunächst wurde eine Millipore Multiscreen 96-Loch-Platte mit Nitrozellulosemembran mit PBS angefeuchtet. Nach einigen Minuten wurde das PBS abgesaugt (Millipore Vakuum-Pumpe) und pro Loch wurden 100  $\mu$ l Anti-IFN- $\gamma$ -AK-Lösung (Klon 1-D1-K) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml hinzu gegeben. Die Platte wurde anschließend mit einem feuchten Tuch umwickelt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 50  $\mu$ l PBS/10 % humanem AB-Serum geblockt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37° C/5 % N<sub>2</sub> wurden pro Loch 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Zellen in Lösung ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml IM) und 100  $\mu$ l IM mit 2  $\mu$ g Peptid (= 10  $\mu$ g/ml) als Stimulation hinzu gegeben. Dabei wurden die PBMC mit verschiedenen Peptiden konfrontiert: Flu, Ras-12G, Ras-12V und Ras-12D. Es wurde in Triplets getestet, also für jedes Peptid drei Löcher der Platte mit jeweils  $1 \times 10^5$  PBMC. Bei jedem Spender und Patient wurden als Negativkontrolle auch drei Löcher ohne stimulierendes Peptid untersucht. Zusätzlich wurde eine maximale Stimulation zur Kontrolle des Assays in dreifacher Ausführung mitgeführt. Dafür wurden die Zellen mit 500 IU IL-2 und 2  $\mu$ g/ml PHA stimuliert. Die folgende Inkubation dauerte zwischen 16 und 24 Stunden (37° C; 5 % N<sub>2</sub>). Anschließend wurde drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und 100  $\mu$ l des zweiten Antikörpers in Lösung pro Loch (Anti-IFN- $\gamma$ -AK, Klon 7-B6-1 Biotin; 2  $\mu$ g/ml in PBS mit 1 %igem

FCS) hinzu pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation für 2 h bei 37° C. Die Platte wurde anschließend abermals drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Jetzt wurden pro Loch 100 µl Extravidin Peroxidase (1 : 1.000 in PBS verdünnt) hinzu gegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS. Dann wurde ½ goldene (3,3'-Diaminobenzidin) und ½ silberne (Urea-Hydrogen-Peroxidase) Sigma®-DABfast-Tablette pro ml dest. Wasser aufgelöst, 50 µl pro Loch der Platte pipettiert und die Entwicklung der Spots abgewartet. Nach ein bis drei Minuten wurde die Platte exzessiv mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Auswertung erfolgte einen Tag später unter einem Mikroskop mit angeschlossenen digitalisiertem Videosystem von der Firma Zeiss.

#### 2.2.6.4 ELISpot Assay nach Stimulation in vitro

Der Assay nach In-vitro-Zellkultur unterscheidet sich von dem vor der Zellkultur dadurch, dass keine direkte Peptidstimulation durchgeführt wird. Die Stimulation erfolgt hier durch vorher mit Peptid beladene APC. Im Rahmen dieser Studie wurden sogenannte T2-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um Hybride aus den Zellen von B- und T-Zell-Lymphoblastomen mit einem genetisch veränderten TAP-Molekül. Das niedrige Peptidniveau in diesen TAP-mutierten Zellen führt dazu, dass die meisten MHC-Komplexe auf der Zellmembran unbeladen bleiben oder an niedrig affine Peptide binden. Gibt man von außen Peptide hinzu, werden die freien MHC-Komplexe stabilisiert und die niedrig affinen Peptide durch die von extern hinzu gegebenen ersetzt (Salter et al., 1986). So entsteht auf der Oberfläche dieser Zellen eine hohe Dichte an MHC-Molekülen, welche das gleiche exogen hinzu gegebene Peptid binden.

Um die T2-Zellen mit Antigen zu beladen, wurde wie oben beschrieben vorgegangen (Kapitel 2.2.6.2 Varianten der T-Zell-Stimulation in den durchgeführten Assays). Beim ELISpot wurden  $5 \times 10^4$  gepulste T2-Zellen pro Loch verwendet, in dem weiter unten beschriebenen ELISA  $1 \times 10^5$  Zellen/Loch.

Im Unterschied zu dem ELISpot, der direkt mit isolierten PBMC durchgeführt wurde, wurden bei dem Assay nach Kultur nur  $1 \times 10^4$  Effektorzellen (die Zellen der Patienten und Blutspender nach 10 Tagen Stimulation in vitro) verwendet. Sie wurden aus der jeweiligen Kultur entnommen, mit IM auf eine Konzentration von  $1 \times$



$10^5$  Zellen/ml eingestellt und mit 100  $\mu$ l pro Loch auspipettiert. Für die mit Influenza-Matrix-Peptid stimulierten Wells wurden in Erwartung einer hohen spezifischen Zellreaktion Verdünnungsreihen angefertigt. Wir testeten je 3 Wells mit  $1 \times 10^4$  Kulturzellen, 3 Wells mit  $1 \times 10^3$  Zellen und 3 Wells mit  $1 \times 10^2$  Zellen. Die Anzahl der eingesetzten Zielzellen blieb mit  $5 \times 10^4$  Zellen konstant.

Der weitere Ablauf entspricht dem des direkt von isolierten Zellen durchgeführten ELISpots (siehe oben).

#### 2.2.6.5 Kultivieren und Expandieren von T2-Zellen

Die T2-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Die minimale Zellkonzentration betrug  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium und die maximale  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml. Wenn die Kultur sich der maximalen Zellzahl näherte, wurde entweder Medium aufgefüllt oder die Kultur wurde im Verhältnis 1:1 gesplittet und auf 2 Kulturflaschen verteilt. War eine Kultur auf zwei Flaschen verteilt und erreichte in den Flaschen die maximale Füllmenge an Medium bei höchst möglicher Zellzahl, wurden die Zellen in die nächst größere Flaschensorte überführt. Es wurden Flaschen in einer Größe von 50, 75 und 150  $\text{cm}^3$  verwendet, die jeweils auf maximal 15, 25 und 50 ml Medium aufgefüllt wurden. Gelagert wurden die Flaschen im Brutschrank bei 37° C und 5 %  $\text{N}_2$  stets im Liegen.

War eine Gesamtzellzahl von  $1 \times 10^8$  T2-Zellen erreicht, wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und in flüssigen Stickstoff überführt (genauer Vorgang: s. o.). Wurden weitere T2-Zellen benötigt, wurde frühzeitig ein Kryoröhrchen einer eingefrorenen Charge aufgetaut und die Expansion einer neuen Charge begonnen. Die für die Assays benötigten Zellen wurden in der Regel im Verlauf der Expansion aus den Kulturflaschen entnommen.

#### 2.2.7 10-Tage-Stimulation in vitro

Parallel zu dem ELISpot-Ansatz wurden von den isolierten Blutspender- oder Patientenzellen Zellkulturen angefertigt. Dazu wurden die PBMC in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in basalem Iscove's Medium aufgenommen

(Herstellung s. o.) und in 24-Loch-Zellkulturplatten mit geradem Boden pipettiert; jeweils 2 ml pro Loch. Von den Zellen eines jeden Patienten oder Spenders wurden je 5 Kulturen angesetzt, die mit unterschiedlichen Peptiden in einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert wurden: Jeweils ein Loch à  $3 \times 10^6$  Zellen mit 1. HIV-, 2. Flu-, 3. Ras-12G-, 4. Ras-12V- und 5. mit Ras-12D-Peptid stimuliert.

Die Kulturplatten wurden bei 500 rpm zentrifugiert und anschließend in den Inkubator überführt (37° C und 5 % N<sub>2</sub>).

Am nächsten Tag, also dem Tag 1 der Zellkultur, wurden 300 IU IL-2 pro ml Kulturlösung dazu gegeben. An den Tagen 3 und 5 folgten weitere IL-2-Zugaben. Am 7. Tag wurde die IL-2-Stimulation auf 150 IU/ml reduziert. An dem Tag vor der erneuten Zählung und Testung der kultivierten Zellen (Tag 9) wurden diese zwei Mal in 10 ml IM gewaschen und in frische Kulturplatten (24-Loch) übertragen. Am 10. Kulturtag wurden die Zellen gezählt und erneut getestet.

## **2.2.8 IFN-γ-ELISA**

### **2.2.8.1 Prinzip des durchgeführten Assays**

Das grundlegende Prinzip des „enzyme-linked immuno sorbent assay“ ähnelt dem des ELISpot: CD8-positive T-Zellen werden über Nacht mit Hilfe von mit Peptid beladenen Targetzellen (T2-Zellen) in einer 96-Loch-Platte stimuliert. Sie werden aktiviert und produzieren IFN-γ, welches von spezifischen Antikörpern gebunden werden kann. Anschließend wird die Zelllösung zentrifugiert und der Zytokin enthaltende Überstand abgenommen. Er wird in eine vorbereitete 96-Loch-Platte gegeben, auf deren Boden Anti-IFN-γ-Antikörper haften. Sie binden nun das im Überstand enthaltene Interferon, und es wird ein zweiter Antikörper hinzu gegeben, der an den ersten Antikörper bindet. Er ist mit einem Enzym gekoppelt, welches bei Zugabe eines entsprechenden Substrats einen Farbumschlag in dem entsprechenden Loch bewirkt. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs beeinflusst die optische Dichte der Lösung, welche sich proportional zur Menge an enthaltenem IFN-γ verhält.

Die Intensität dieses Farbumschlags wird nun mit einer Standardkurve verglichen, die den Farbumschlag (gemessen als optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge) einer

standardisierten Menge an IFN- $\gamma$  (in pg/ml) in aufsteigender Konzentration darstellt. Bei jedem durchgeführten Assay wird eine solche Gruppe von Standard-Dosierungen von IFN- $\gamma$  mitgetestet und die entsprechende Kurve ermittelt.

#### 2.2.8.2 Ausführung im Detail

Zunächst wurde die benötigte Menge an APC ermittelt ( $1 \times 10^5$  T2-Zellen/Well) und aus der vorhandenen Kultur entnommen oder aufgetaut. Wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben, wurden die T2-Zellen anschließend mit den Peptiden beladen, bestrahlt und gewaschen. Als nächstes wurde die benötigte Menge an zu testenden Kulturzellen errechnet. Es wurden  $1 \times 10^4$  Kulturzellen pro Well verwendet und pro Bedingung in zwei gleichen Wells wie folgt getestet:

T-Zellen der

Flu-Kultur gegen: 1. Flu-Peptid, 2. HIV-Peptid, 3. Unstimuliert

HIV-Kultur gegen: 1. Flu-Peptid, 2. HIV-Peptid, 3. Unstimuliert

T-Zellen der

Ras-12G-Kultur gegen: 1. Flu-Peptid, 2. HIV-Peptid, 3. Unstimuliert, 4. Ras-12G-Peptid

Ras-12V-Kultur gegen: 1. Flu-Peptid, 2. HIV-Peptid, 3. Unstimuliert, 4. Ras-12V-Peptid

Ras-12D-Kultur gegen: 1. Flu-Peptid, 2. HIV-Peptid, 3. Unstimuliert, 4. Ras-12D-Peptid

Dann wurden die Kulturzellen und die peptidbeladenen T2-Zellen einem Schema folgend in eine 96-Loch-Zellkulturplatte mit rundem Boden pipettiert und 16–24 Stunden lang im Inkubator gelagert (37° C; 5 % N<sub>2</sub>).

Noch am gleichen Tag wurde die ELISA-Platte für die Testung nach Inkubation vorbereitet (Coating). Dafür wurden zu der benötigten Menge an Coating-Puffer anti-humaner IFN- $\gamma$ -Antikörper von der Maus in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml hinzu gegeben und je 100  $\mu$ l der Lösung pro Loch in eine 96-Loch-Platte mit rundem Boden pipettiert. Die Platte wurde dann über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Zellkulturplatte mit den APC- und den zu untersuchenden Kulturzellen bei 1.200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 150 µl Überstand aus den Wells abgenommen und in eine sterile 96-Loch-Platte mit rundem Boden übertragen.

Die beschichtete ELISA-Platte wurde dann ein Mal mit 200 µl Coating-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden pro Loch 250 µl Blockungs-Puffer (siehe Material) in die Platte pipettiert und die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

In dieser Zeit wurden die IFN- $\gamma$ -Standards vorbereitet: Dafür wurden fünf 1,5 ml-Eppendorf-Tubes in einem Tube-Halter platziert und mit je 600 µl Iscove's Medium gefüllt. Dann wurde ein eingefrorenes Zentrifugenröhrchen mit Standard-Stocklösung in einer Konzentration von 1.000 pg/ml IFN- $\gamma$  aufgetaut und eine Standardreihe mit den folgenden Konzentrationen für die IFN- $\gamma$ -Standards erstellt: 1. 1.000 pg/ml; 2. 400 pg/ml; 3. 160 pg/ml; 4. 64 pg/ml; 5. 25,6 pg/ml und 6. 0 pg/ml.

Jetzt wurde die Testplatte von überschüssigem Blockungspuffer befreit und drei Mal mit Wasch-Puffer (siehe Material) gewaschen. Anschließend wurden zuerst 25 der 50 µl der zu testenden Lösung und dann die Standardlösungen (50 µl/Well) immer in Dubletten auspipettiert. Zuletzt wurden 50 µl biotinylierter anti-humaner IFN- $\gamma$ -Maus-Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml und 50 µl Blockungs-Puffer hinzu gegeben. Die Platte wurde dann zwei Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Die Kulturplatte mit dem überschüssigen Zellbestand wurde in Aluminiumfolie eingeschlagen und für eine etwaige Wiederholung des Assays bei –80° C eingefroren. Nach zwei Stunden wurde die ELISA-Platte dann drei Mal mit Wasch-Puffer gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang wurden 100 µl/Well HRP-konjugiertes Streptavidin (1 : 1.000 verdünnt in PBS) hinzu pipettiert, danach blieb die Platte für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit stehen. Im Anschluss wurde nach erneutem Waschen 100 µl/Well TMB-Substrat-Lösung hinzu gegeben und die Farbentwicklung abgewartet. Sobald sich die Standards in einer deutlich sichtbaren Farbabstufung entwickelt hatten, wurden 100 µl der Stopplösung hinzu pipettiert, dann wurde die Platte im Wallac-Victor-ELISA-Reader ausgemessen.

## **2.2.9 Auswertung**

### 2.2.9.1 Allgemeines

Die in Zusammenhang mit dieser Arbeit ausgewerteten Daten sind quantitative Merkmale, die stetig sind und auf einer sogenannten Verhältnisskala liegen. Als Lagemaß zur Beschreibung der einzelnen Merkmale sowie von Konzentrationsbereichen der Merkmale innerhalb der Stichproben wurde das arithmetische Mittel, als Streuungsmaß die Standard-Abweichung verwendet.

Da sich die Merkmale beim ELISpot (SFC) auf einzelne Zellen beziehen, wurden hier rechnerisch entstandene Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet und nur die jeweiligen ganzen Zahlen angegeben.

Im Folgenden sollen noch einige Begriffe erläutert werden, die im Zusammenhang mit der Analyse der Ergebnisse in dieser Arbeit verwendet werden.

### 2.2.9.2 Hintergrundaktivität

Sowohl beim ELISA als auch beim ELISpot werden Negativkontrollen mitgeführt. In der vorliegenden Arbeit waren dies zum einen unstimulierte Zellen und zum anderen mit einem Peptid stimulierte Zellen, auf das eine Reaktion höchst unwahrscheinlich ist (HIV-Peptid). Die von den unstimulierten Zellen sezernierte Menge an IFN- $\gamma$  (ELISA) beziehungsweise die Anzahl an detektierten SFC (ELISpot) wird in der Auswertung als Hintergrundaktivität bezeichnet, um die Darstellung der Ergebnisse übersichtlich zu halten.

### 2.2.9.3 Spezifische Spots

Bei der Auswertung der ELISpot-Daten werden diejenigen Spots als spezifisch angesehen, die über das Maß der Hintergrundaktivität (nicht des Signals von vom HI-Virus-Peptid stimulierten Zellen) hinaus gezählt wurden.

#### 2.2.9.4 Stimulationsindex

Der Stimulationsindex (SI) beschreibt das Verhältnis zwischen mit Peptid stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen und dient der graphischen Darstellung der Untersuchungsergebnisse. Beispiel: Ist er größer als zwei, so übersteigt die Anzahl der SFC oder die IFN- $\gamma$ -Produktion nach Peptidstimulation die ohne Stimulation um mehr als das Doppelte.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Vergleich von Stimulationsvarianten im ELISpot**

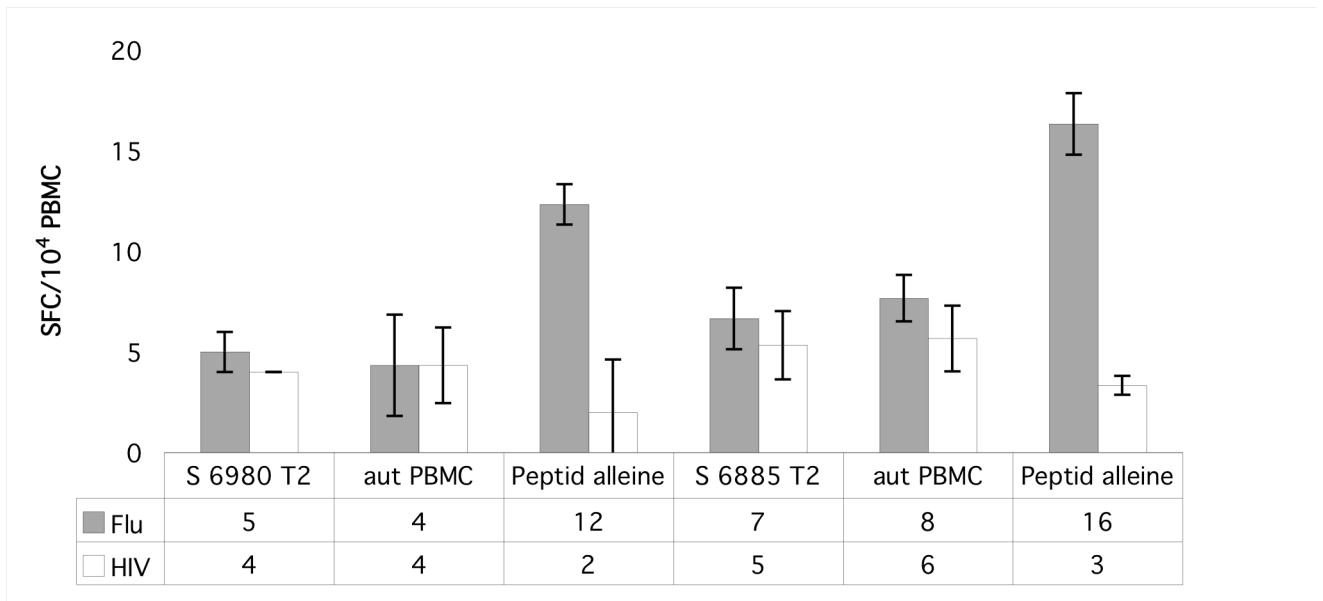
In der Etablierungsphase der Assays wurde zunächst eine Untersuchung durchgeführt, um die beste Stimulationsvariante für den ELISpot herauszufinden (Kapitel 2.2.6.2). Dazu wurden PBMC der Blutspender Nummer 6980 und 6985 direkt nach Isolation der PBMC und nach 10-tägiger In-vitro-Stimulation getestet. Als Negativkontrolle in den Tests wurde HIV-Peptid verwendet.

In dem ohne vorherige Kultur durchgeführten ELISpot-Assay zeigten nur diejenigen Wells eine spezifische Reaktion auf das Influenza-Matrix-Peptid, die direkt mit Peptid stimuliert worden waren. Spender 6980 reagierte mit 12 Spots und Spender 6985 mit 16 Spots. Bei den Stimulationen mit autologen PBMC und T2-Zellen war keine spezifische Reaktion zu beobachten (Abbildung 1). Die auf den Mikrotiterplatten mitgeführte Maximalstimulation ergab für alle Wells eine mittlere Anzahl von 200 Spots (Range 190–210; n = 6).

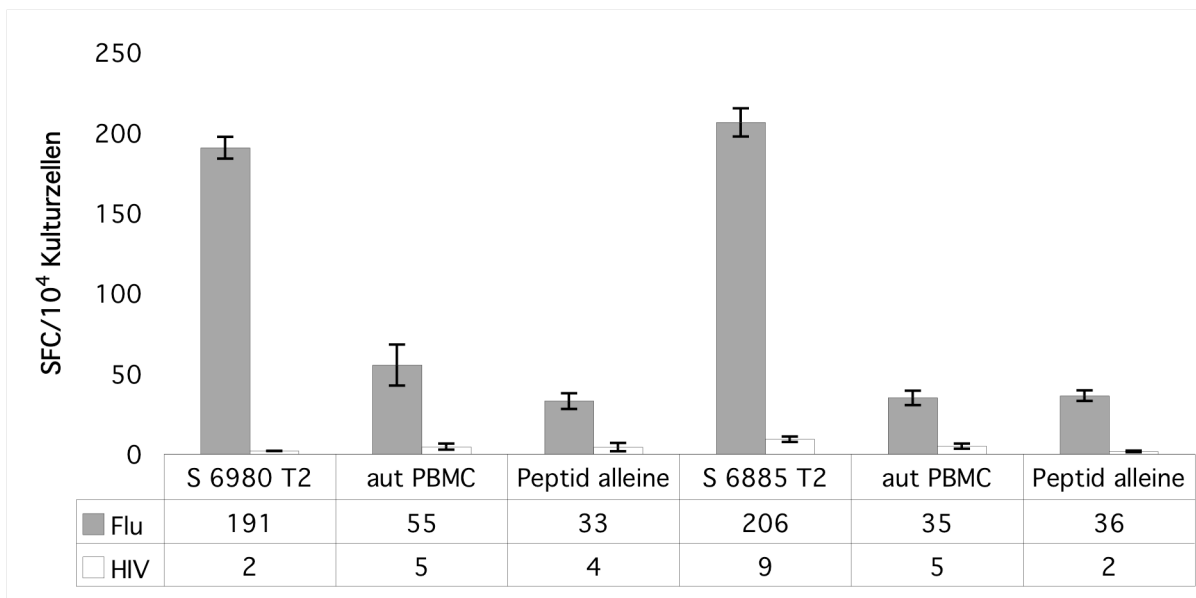
Die mit Influenza stimulierten Kulturen reagierten nach Konfrontation mit Influenza-Matrix-Peptid in allen Stimulationsvarianten spezifisch. Die mit T2-Zellen stimulierten Wells enthielten jedoch eine deutlich höhere Anzahl an SFC. Bei Spender 6980 waren es 189 Spots gegenüber 50 nach Stimulation mit autologen PBMC beziehungsweise 29 nach reiner Peptidstimulation.

Bei Spender 6985 wurden 197 spezifische Spots nach Stimulation mit peptidbeladenen T2-Zellen gezählt, dem standen 30 nach Stimulation mit autologen PBMC beziehungsweise 34 spezifische Spots nach reiner Peptidstimulation gegenüber (Abbildung 2).

Die HIV-stimulierten Kulturen wurden im Assay gegen HIV-Peptid, gegen Influenza-Matrix-Peptid und unstimuliert getestet. Unter keiner Bedingung gab es eine spezifische Zellantwort (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5:** Reaktionen der PBMC von Spender 6980 und 6985 ohne vorhergehende Kultivierung auf Influenza-Matrix (graue Balken) und HIV Peptid (weiße Balken). Alle Werte sind das arithmetische Mittel der Spot Forming Cells (SFC) aus drei Wells mit Standardabweichung. Unter den Balken findet sich die jeweilige Stimulationsvariante und der Mittelwert der in den Wells gemessenen SFC.



**Abbildung 6:** Reaktionen der Zellen von Spender 6980 und 6985 nach 10 Tagen Stimulation mit Influenza-Matrix (graue Balken) und HIV-Peptid (weiße Balken). Alle Werte sind das arithmetische Mittel der Spot Forming Cells (SFC) aus drei Wells. Unter den Balken findet sich die jeweilige Stimulationsvariante und der Mittelwert der in den Wells gemessenen SFC.



## **3.2 Reaktivität der T-Zellen gesunder Blutspender**

### **3.2.1 T-Zellen nach direktem Test der isolierten PBMC**

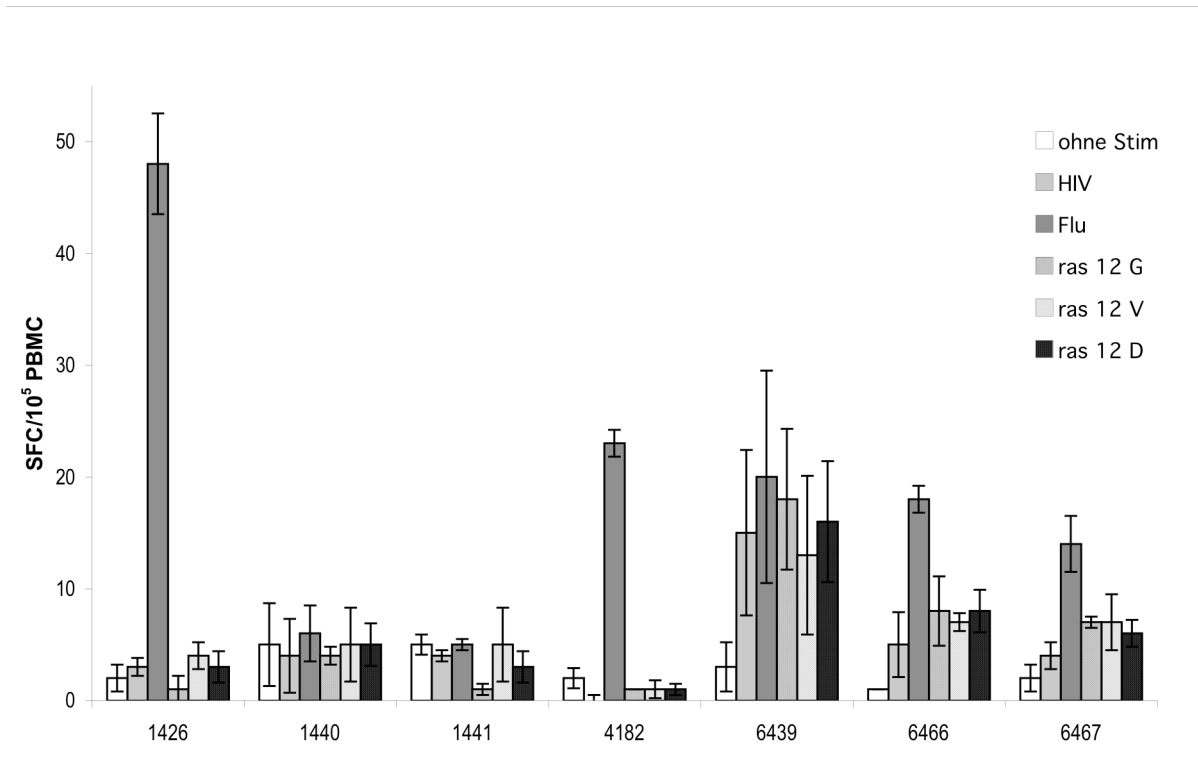
Zunächst wurden aus den Buffy coats von 7 HLA-A2-positiven Blutspendern mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation die PBMC gewonnen. Der anschließend durchgeführte ELISpot ergab bei vier Spendern eine spezifische Reaktion auf das Influenza-Matrix-Peptid.

Zwei der vier Spender zeigten eine deutlich positive Reaktion mit einer Anzahl von 45 (SI: 24) beziehungsweise 21 (SI: 11,5) spezifischen T-Zellen. Bei den anderen beiden Influenza-reaktiven Blutspendern lag die Anzahl der spezifischen Zellen bei 17 beziehungsweise 12 (Spender 6466 mit einem SI von 18 und Spender 6467 mit einem SI von 7).

Bei Spender 6439 war die Reaktion auf alle Peptide hoch, darüber hinaus lagen die Standardabweichungen der ausgezählten Wells hoch (zwischen 2 für die unstimulierten Zellen und 9,5 für die Influenza-stimulierten). Hier muss eine unspezifische Aktivierung aller T-Zellen diskutiert werden.

Keiner der übrigen getesteten Spender hat spezifisch auf eines der getesteten Ras-Peptide reagiert. In den unstimulierten Wells konnten im Durchschnitt jeweils 3 (arithmetisches Mittel; Range 1–5; n = 7) SFC gezählt werden, in den mit HIV stimulierten Zellen im Durchschnitt 5 SFC (arithmetisches Mittel; Range 0–5; ein Ausreißer mit 15; n = 7).

Je drei Wells eines jeden Spenders wurden als Positivkontrolle maximal stimuliert (siehe Methodenteil). Die gezählte Anzahl der Spots lag bei allen Spendern bei einem arithmetischen Mittel von 250 SFC/well (Range 180–300; n = 21).



**Abbildung 7:** Reaktionen der direkt getesteten PBMC von 7 Spendern. Die Nummern der Spender sind von der X-Achse ablesbar. Die Reaktionen auf die verschiedenen Peptide werden durch unterschiedlich gefärbte Balken repräsentiert. Alle Werte sind das arithmetische Mittel der Spot Forming Cells (SFC) aus drei Wells; die ebenfalls durchgeführte maximale Stimulation (siehe Text) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt.

### 3.2.2 T-Zellen nach 10 Tagen Stimulation in vitro

Es wurden von den PBMC eines jeden Spenders 5 peptidstimulierte Lymphozytenkulturen mit jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz angesetzt. Bei den mit Influenza-Peptid stimulierten Kulturen lag die Zellzahl nach 10 Tagen Kultur bei durchschnittlich  $3,2 \times 10^6$  Zellen (arithmetisches Mittel; Range 2,5–4;  $n = 7$ ). Bei den mit HIV-, Ras-12G-, Ras-12V- und Ras-12D-Peptid stimulierten Kulturen sowie bei den lediglich mit IL-2 stimulierten Kulturen lag die Zellzahl nach 10 Tagen Kultur mit durchschnittlich  $5 \times 10^6$  Zellen (arithmetisches Mittel; Range 3,4–6,5;  $n = 35$ ) höher.

Die während der Kultivierung der Zellen von dem Genlabor der Blutbank der Charité durchgeführte HLA-Subtypisierung erbrachte für die Spender die folgenden Ergebnisse:

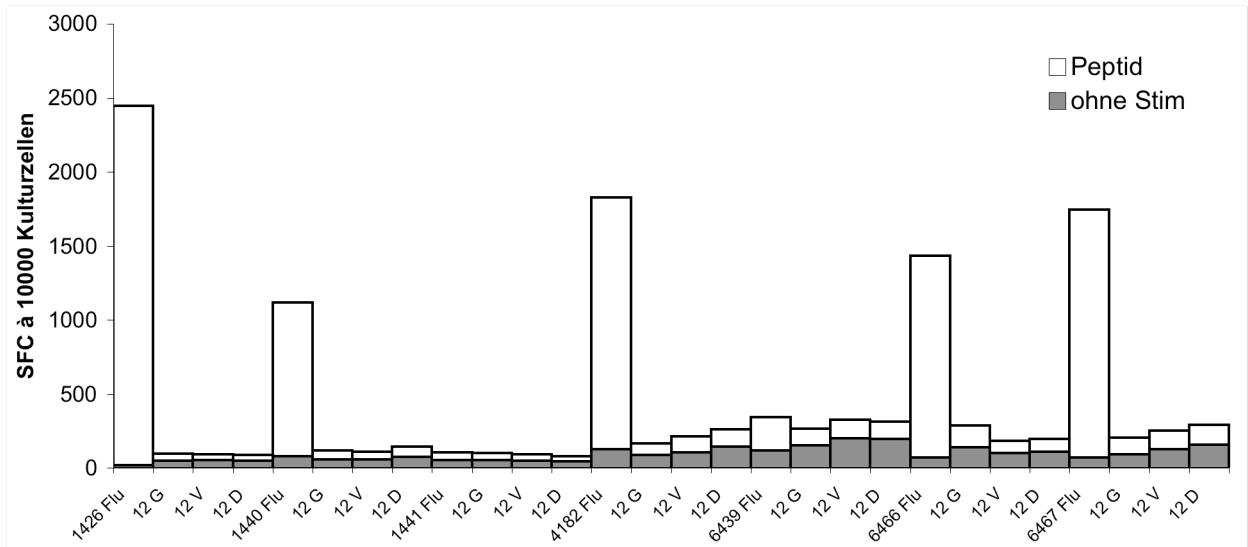
<b>Blutspendernummer</b>	<b>HLA-A2-Subtyp</b>
1426	A*01, 02011
1440	A*02011, 30
1441	A*0205, 30
4182	A*0201
6439	A*0201, 0201
6466	A*0201
6467	A*0201

**Tabelle 1: HLA-A2-Subtypen der Blutspender**

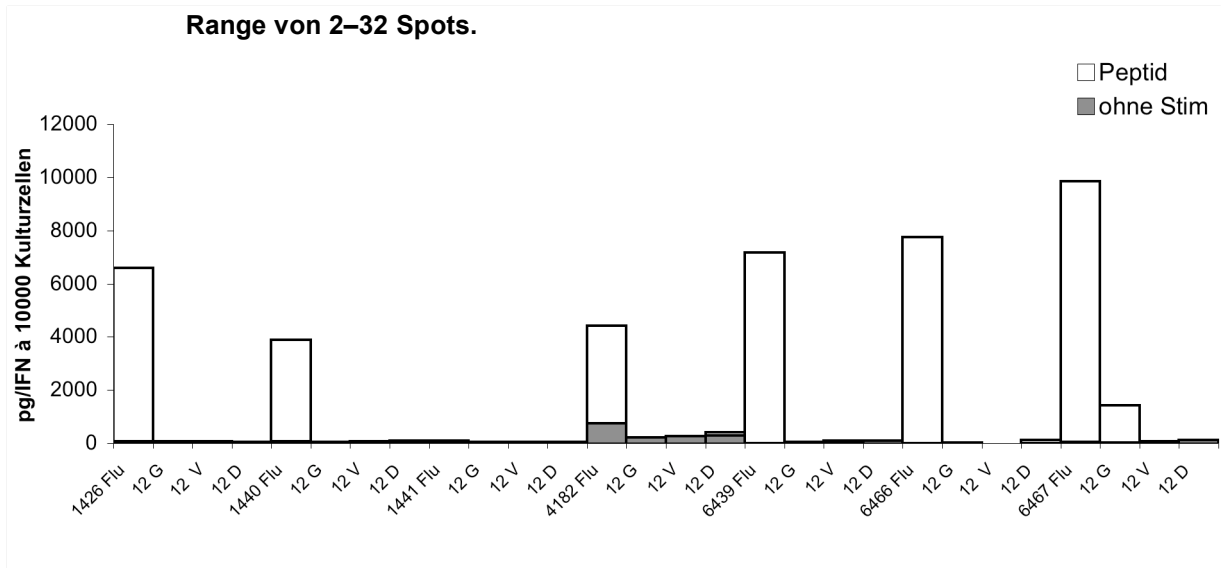
Der Spender mit der Nummer 1441 war der einzige, der nicht den Subtyp \*0201 aufwies.

Im ELISpot zeigten sich die Kulturzellen von 6 der 7 Blutspender spezifisch reaktiv nach Stimulation mit Influenza-Peptid. Am stärksten reagierte Spender 1426 mit einer Anzahl von 2408 Influenza-spezifischen T-Zellen (24 %). Dieser Spender hatte auch schon im direkten ELISpot mit 45 spezifischen SFC am deutlichsten reagiert. Bei den Spendern 1440, 4182, 6466 und 6467 konnten im Durchschnitt 1.351 (arithmetisches Mittel; Range 683–1.608; n = 4) spezifische T-Zellen detektiert werden, was 13 % der Kulturzellen entspricht. Bei Spender 6439 war die Anzahl mit 104 Zellen deutlich geringer. Der \*0201-negative Spender 1441 reagierte nicht spezifisch auf das Influenza-Matrix-Peptid.

Nach 10-tägiger Stimulation lagen die Reaktionen auf die drei Ras-Peptide bei allen Spendern im Bereich der SFC in den unstimulierten Wells (Abbildung 8). In den durchgeführten Assays waren dies durchschnittlich 90 SFC pro Well (arithmetisches Mittel; Range 19–197 Spots; n = 28).



**Abbildung 8:** IFN- $\gamma$ -ELISpot der Kulturzellen von 7 Blutspendern, die für 10 Tage mit 1. Influenza-Matrix-Peptid, 2. Ras-12G-Peptid, 3. Ras-12V-Peptid und 4. Ras-12D-Peptid stimuliert wurden. Die Kulturen sind auf der x-Achse aufgeführt. Gezeigt ist immer die Reaktion im ELISpot auf das Peptid, mit dem die jeweilige Kultur stimuliert wurde (helle Balken), im Vergleich zur Reaktion ohne Stimulation der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Spot Forming Cells (SFC) aus je 3 ausgezählten Wells. Die Standardabweichung zwischen den Wells betrug im Mittel 12 Spots bei einer Range von 2–32 Spots.



**Abbildung 9:** IFN- $\gamma$ -ELISA der Kulturzellen von 7 Blutspendern, die für 10 Tage mit 1. Influenza-Matrix-Peptid, 2. Ras-12G-Peptid, 3. Ras-12V-Peptid und 4. Ras-12D-Peptid stimuliert wurden. Die Kulturen sind auf der x-Achse aufgeführt. Gezeigt ist immer die Reaktion auf das Peptid im ELISpot, mit dem die jeweilige Kultur stimuliert wurde (helle Balken), im Vergleich zur Reaktion ohne Stimulation der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Menge an sezerniertem IFN- $\gamma$  in pg/ml aus je 2 ausgemessenen Wells. Die Standardabweichung zwischen den Wells betrug im Mittel 170 pg/ml bei einer Range von 20–320 pg/ml.

Nach Stimulation mit HIV-Peptid wurden im Mittel 86 Spots gezählt (Range 18–196 Spots; n = 28). Zwischen beiden Negativkontrollen gab es demnach keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion.

Parallel zum ELISpot wurde die spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion der kultivierten Zellen in einem Zytokin-ELISA getestet. Bis auf den Spender 1441 zeigten die T-Zellen eine spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit Influenza-Matrix-Peptid.

Die höchste Sekretion von IFN- $\gamma$  zeigten die Lymphozyten von Spender 6467 mit 11.000 pg/ml; die geringste Menge zeigte sich bei Spender 1440 mit 3.900 pg/ml. Die Sekretion nach Stimulation mit den Ras-Peptiden lag bei den Spendern 1426, 1440, 1441, 4182, 6439 und 6466 jeweils im Bereich der Sekretion von unstimulierten Zellen und Zellen, die mit HIV-Peptid stimuliert worden waren (arithmetisches Mittel 71 pg/ml; Range 0–1.400; ein Ausreißer mit 1.400 pg/ml; n = 21). Bei Spender 6467 zeigte sich eine erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit Ras-12G-Peptid (1.400 pg/ml gegenüber 16 pg/ml ohne Stimulation bei einer Standardabweichung von 304 pg/ml zwischen den beiden gemessenen Wells, siehe Abbildung 5). Die unstimulierten Zellen zeigten im Mittel eine IFN- $\gamma$ -Produktion von 75 pg/ml (Range 0–212 pg/ml; n = 21), und die mit HIV-Peptid stimulierten Zellen 103 pg/ml (Range 0–422 pg/ml; n = 21).

### **3.2.3 Zusammenfassung**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den gesunden Blutspendern 4 von 6 HLA-A\*0201-positiven PBMC im direkten ELISpot-Assay positiv auf das Influenza-Matrix-Peptid reagierten. Eine spezifische Reaktion auf die Ras-Peptide war nicht festzustellen. Nach 10-tägiger In-vitro-Stimulation mit Peptid und IL-2 erhöhte sich die Zahl der Influenza-reaktiven Spender auf 6 von 6, also 100 % im Vergleich zu 66 % ohne In-vitro-Kultivierung. Der HLA-\*0201-negative Spender war in beiden Assays negativ, was die Validität des Assays unterstützt. Die Reaktivität gegenüber den Ras-Peptiden blieb auch nach In-vitro-Kultivierung negativ. Es gab keine spezifischen Reaktionen auf das verwendete HIV-Peptid, allerdings erhöhte sich der Anteil an unspezifisch reagierenden Zellen nach 10-Tage-Kultur im ELISpot deutlich von durchschnittlich 3 SFC im direkten Test von PBMC auf durchschnittlich 81 SFC

im Test mit den Kulturzellen. Der ELISA spiegelte im Wesentlichen das Ergebnis des ELISpot wieder und lässt in Verbindung mit den ELISpot-Daten Aussagen über die durchschnittliche IFN- $\gamma$ -Produktion der Influenza-reaktiven T-Zellen zu. Auch hier erhöht sich die unspezifische Sekretion unstimulierter Zellen deutlich nach Kultivierung in vitro.

### **3.3 Reaktivität der T-Zellen von Patienten mit Pankreaskarzinom**

#### **3.3.1 Charakteristika der Patienten und Proben**

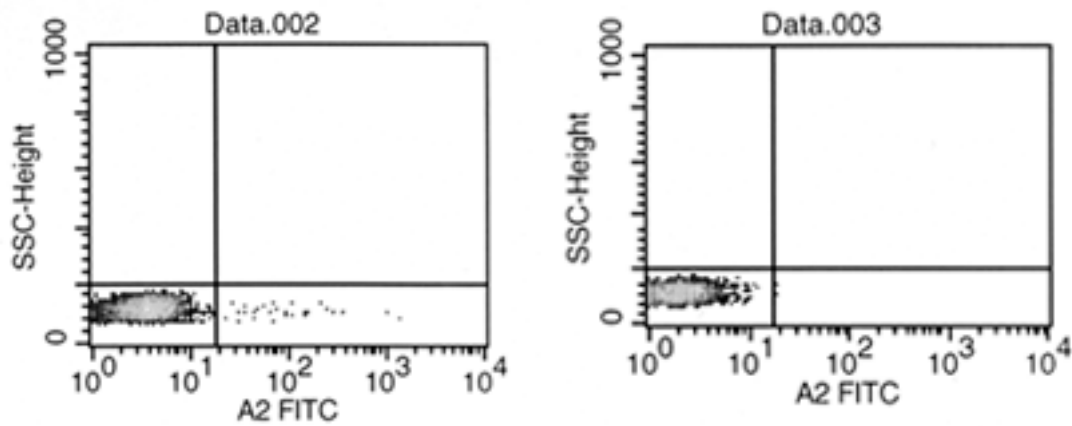
Von insgesamt 43 Patienten (männlich : weiblich = 0,9 : 1) mit der Diagnose Pankreaskarzinom wurden je 20–30 ml heparinisertes Vollblut abgenommen. Die Patienten befanden sich in verschiedenen Stadien ihrer Erkrankung. Die durchschnittlich gewonnene Zellzahl der mononukleären Zellfraktion lag bei  $4,2 \times 10^7$  PBMC. Bei Patient Nummer 43 konnten aus ungeklärten Gründen keine lebenden mononukleären Zellen aus dem Vollblut extrahiert werden (Tabelle 1). Alle verbleibenden 42 Patienten wurden auf HLA-A2 getestet. Ein Beispiel für eine HLA-A2-positive und eine negative Probe im FACS zeigt die Abbildung 9. Für eine solche Färbung wurden  $1 \times 10^5$  PBMC mit dem Antikörper BB7.2 (bzw. der Isotypkontrolle) angefärbt und von diesen dann zwischen 20.000 und 40.000 Zellen im FACS gemessen. Das gesetzte Lymphozytengate erfasste im Durchschnitt 36,1 % der Gesamtpopulation. Bei den HLA-A2-positiven Patienten befanden sich im Durchschnitt 95 % der gegateten Lymphozyten im rechten unteren Quadranten (= positiv für den HLA-A2-FITC-Antikörper).

Bei den Patienten, deren Lymphozyten negativ für HLA-A2 waren, lagen durchschnittlich 97 % im unteren linken Quadranten (= negativ für HLA-A2-FITC) und 1 % im unteren rechten. In den Kontrollfärbungen mit der Isotypkontrolle der HLA-A2-positiven und -negativen Patienten lagen 99 % der im Gate erfassten Zellen im linken unteren Quadranten und haben die Isotypkontrolle demnach nicht gebunden.

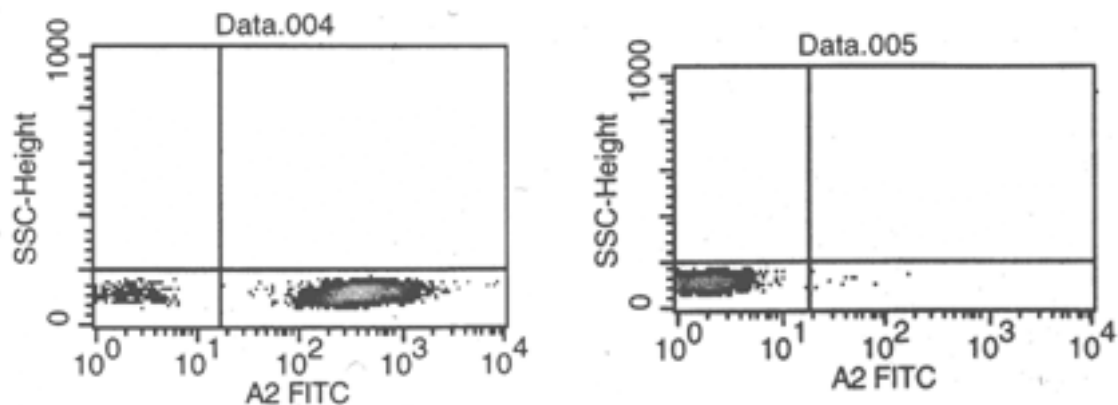
<i>Patienten- Nummer</i>	<i>Alter in Jahren</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Anzahl der sep. PBMC</i>	<i>HLA-Typ</i>
1	64	m	$1,05 \times 10^8$	A2 -
2	63	m	$3,2 \times 10^7$	A2 +
3	71	w	$2,3 \times 10^7$	A2 -
4	63	w	$2,5 \times 10^7$	A2 +
5	58	m	$4,2 \times 10^7$	A2 +
6	54	m	$7,5 \times 10^7$	A2 -
7	70	m	$2 \times 10^7$	A2 -
8	66	w	$3,5 \times 10^7$	A2 -
9	52	w	$3,2 \times 10^7$	A2 +
10	76	m	$3,7 \times 10^7$	A2 -
11	36	w	$7,5 \times 10^7$	A2 -
12	68	m	$5,7 \times 10^7$	A2 -
13	54	m	$5,2 \times 10^7$	A2 +
14	68	m	$3,7 \times 10^7$	A2 -
15	61	w	$9 \times 10^7$	A2 +
16	39	m	$3 \times 10^7$	A2 +
17	64	w	$3 \times 10^7$	A2 +
18	70	w	$2,7 \times 10^7$	A2 +
19	66	m	$2,3 \times 10^7$	A2 +
20	36	m	$1,9 \times 10^7$	A2 +
21	49	w	$1,7 \times 10^7$	A2 -
22	68	w	$1,2 \times 10^7$	A2 -
23	74	w	$1,9 \times 10^7$	A2 -
24	68	w	$4,5 \times 10^7$	A2 +
25	47	m	$8 \times 10^7$	A2 +
26	60	w	$5,5 \times 10^7$	A2 -
27	71	m	$7,5 \times 10^7$	A2 +
28	66	w	$7 \times 10^7$	A2 +
29	61	w	$3,2 \times 10^7$	A2 +
30	67	w	$5 \times 10^7$	A2 -
31	76	w	$1,5 \times 10^8$	A2 -
32	68	w	$5 \times 10^7$	A2 +
33	53	m	$5,5 \times 10^7$	A2 -
34	73	w	$2,1 \times 10^7$	A2 -
35	66	m	$3,2 \times 10^7$	A2 +
36	82	m	$3,1 \times 10^7$	A2 +
37	52	m	$4,5 \times 10^7$	A2 +
38	72	m	$7 \times 10^7$	A2 +
39	64	m	$5,5 \times 10^7$	A2 +
40	62	w	$6 \times 10^7$	A2 -
41	68	w	$1,2 \times 10^7$	A2 -
42	57	w	$5 \times 10^7$	A2 -
43	65	w	Zellen tot	?

**Tabelle 2:** Alle Patienten mit Pankreas-Karzinom, von denen die PBMC isoliert wurden. Dargestellt sind die zugeordnete Nummer, das Alter, das Geschlecht, die Anzahl der separierten PBMC und das Ergebnis der HLA-A2-Antikörperfärbung aus der Durchflusszytometrie.

Patient 1:



Patient 2:



**Abbildung 10: Beispiele der durchflusszytometrischen HLA-A2-Färbung der Pankreaskarzinompatienten. Die oberen beiden Bilder stammen vom A2-negativen Patienten 1. Links: Die Färbung mit BB7.2-Antikörper fällt negativ aus, 99,37 % der gegateten Zellen sind im linken unteren Quadranten. Rechts: Die Färbung mit der Isotypkontrolle fällt ebenfalls negativ aus (99,95 % der gegateten Zellen im linken unteren Quadranten). Die unteren beiden Bilder von Patient Nummer 2 zeigen rechts die positive Färbung mit dem BB7.2-Antikörper („A2 FITC“): 96,94 % der gegateten Zellen sind im unteren rechten Quadranten. Die Färbung mit der Isotypkontrolle fällt auch hier negativ aus.**

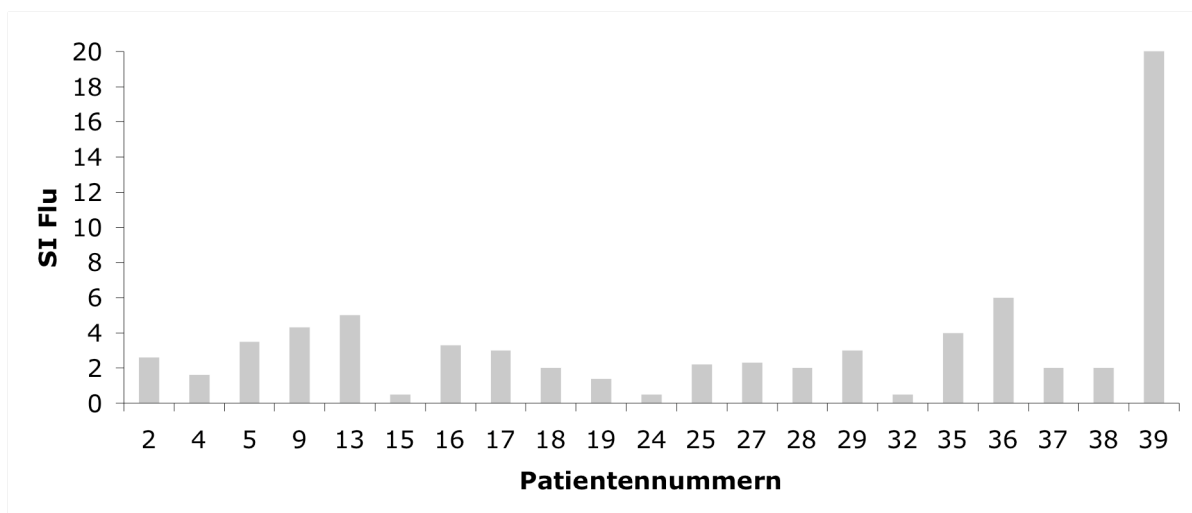
Insgesamt waren von den getesteten 42 Patienten 22 HLA-A2-positiv. Das entspricht 52,38 %. Die Zellen der HLA-A2-negativen Patienten wurde nicht weiter untersucht.



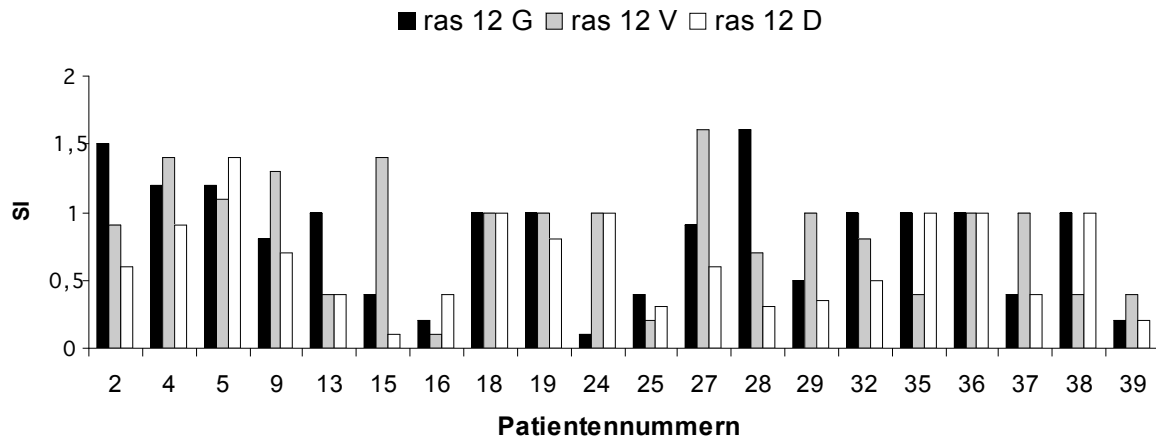
### 3.3.2 T-Zellen bei direkt getesteten PBMC

Aus technischen Gründen konnten aus dem abgenommenen Blut von den Patienten 19 und 20 nicht genügend PBMC isoliert werden. Die Zellen von Spender 20 waren wegen nicht reproduzierbarer Ergebnisse nicht verwertbar.

Die Zellen der übrigen Patienten wurden mit Influenza-Matrix-Peptid, Ras-12G-, Ras-12V-, Ras-12D- und HIV-Peptid stimuliert. Bei den Patienten 9, 16, 25, 36 und 39 zeigte sich eine spezifische Anzahl von SFC gegen Influenza-Matrix-Peptid mit mehr als 5 Spots über der Anzahl der Spots in den unspezifischen Wells (unstimuliert) mit einem Stimulations-Index (SI) von größer als zwei (Abbildung 11). Gegen keines der Ras-Peptide oder HIV wurde eine ähnliche Reaktion beobachtet (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Stimulationsindizes der getesteten Patienten-PBMC nach Konfrontation mit Influenza-Matrix-Peptid. Der Stimulationsindex wurde wie folgt berechnet: Anzahl der SFC nach Stimulation mit Peptid/Anzahl der SFC ohne Stimulation. Die Anzahl der SFC wurde als Mittelwert aus je 3 Wells berechnet. Bei den Patienten 2, 5, 13, 17, 18, 27, 28, 29, 35, 37 und 38 zeigte sich zwar ein SI von  $\geq 2$ , die Anzahl der spezifischen Spots lag jedoch unter 5, so dass die Reaktionen nicht als positiv gewertet wurden (siehe Text).**



**Abbildung 12: Stimationsindizes der Patienten-PBMC nach Stimulation mit den Ras-Peptiden 12G (schwarze Balken), 12V (graue Balken) und 12D (weiße Balken). Der Stimationsindex wurde wie folgt berechnet: Anzahl der SFC nach Stimulation mit Peptid/Anzahl der SFC ohne Stimulation. Die Anzahl der SFC wurde als Mittelwert aus je 3 Wells berechnet.**

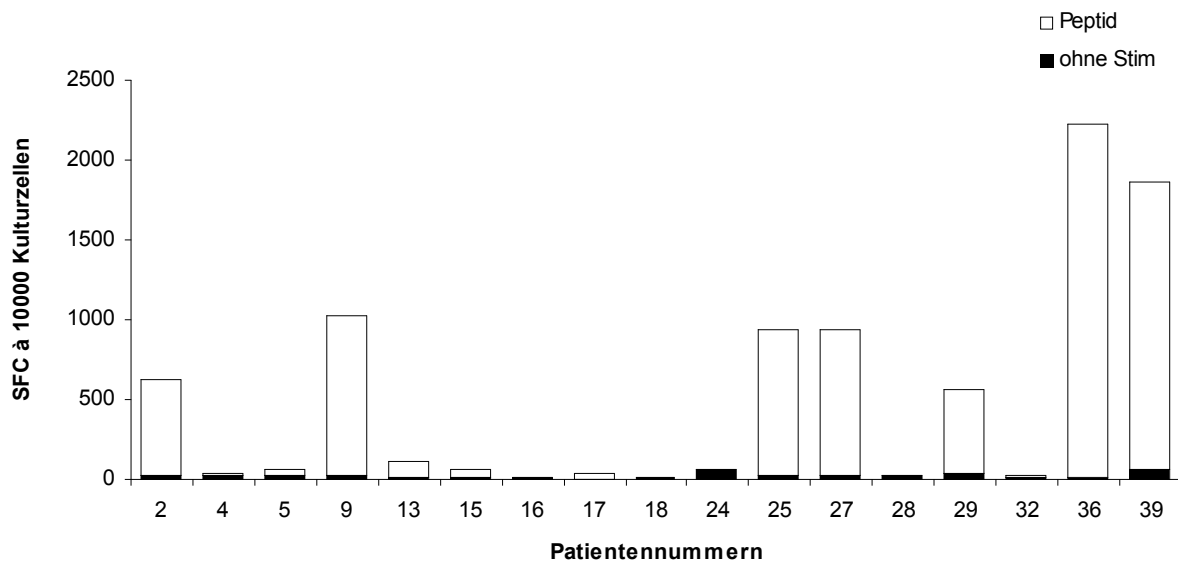
Die Reaktion der unstimulierten Zellen blieb durchweg gering. Im Durchschnitt fanden sich in den Wells jeweils 2 Spots. Spender 19 zeigte eine erhöhte unspezifische Aktivierung (7 SFC in den unstimulierten Wells und 8 SFC in den HIV-stimulierten Wells). Die Standardabweichung zwischen den ausgezählten Wells lag im Triplet bei 1.

### 3.3.3 Reaktionen der T-Zellen auf Influenza-Matrix-Peptid nach 10 Tagen Stimulation in vitro

Nach der 10-tägigen Stimulation in vitro reagierten 11 von 17 getesteten Patienten im ELISpot signifikant auf das Influenza-Matrix-Peptid, das entspricht 64,7 %.

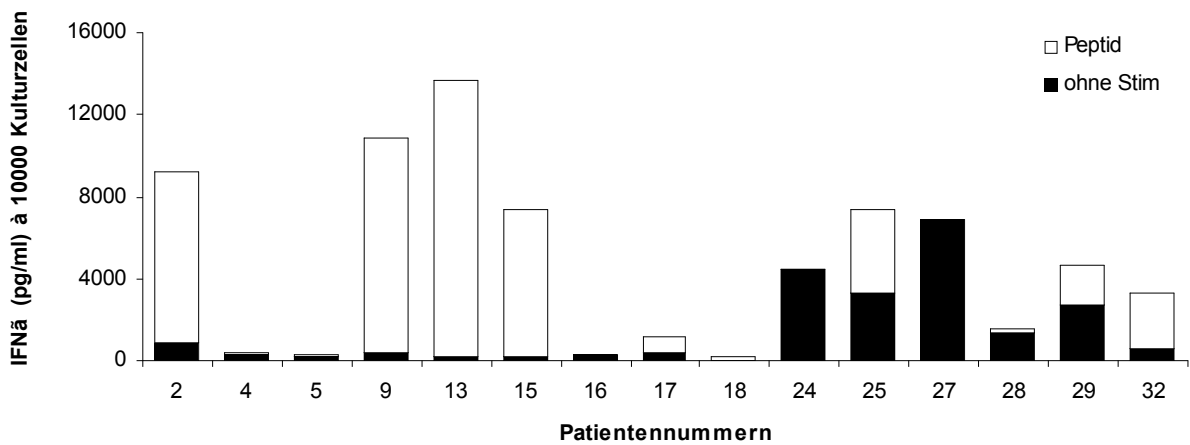
Während bei den Patienten 2, 9, 25, 27, 29, 36 und 39 die T-Zellen eine deutliche Reaktion zeigten, fiel die T-Zell-Antwort bei den Patienten 5 (33 spezifische Spots; SI: 2,4), 13 (107 spezifische Spots; SI: 16,3), 15 (53 spezifische Spots; SI: 6,3) und 17 (32 spezifische Spots; SI: 9) geringer aus. Die Standardabweichung zwischen den Wells der deutlich reaktiven Zellen lag zwischen 13 und 105 Spots, bei den weniger deutlich reaktiven Spendern und bei denen, die nicht reagiert haben, lag sie zwischen 1 und 22 SFC. Die Anzahl der Spots war in allen gezählten Wells mit

unstimulierten Lymphozyten relativ gering bei einem arithmetischen Mittel von 24 (Range 4–66; n = 17).



**Abbildung 13: IFN- $\gamma$ -ELISpot der Kulturzellen von 17 Patienten mit Pankreaskarzinom, die für 10 Tage mit Influenza-Matrix-Peptid stimuliert wurden. Gezeigt ist immer die Reaktion auf das Peptid im ELISpot (helle Balken) im Vergleich zur Reaktion ohne Stimulation der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Spot Forming Cells (SFC) aus je 3 ausgezählten Wells.**

Deutlich oberhalb dieses Durchschnitts lagen die Werte nur bei den Patienten 24 (64 unspezifische Spots) und 39 (66 unspezifische Spots); siehe Abbildung 13.



**Abbildung 14: IFN- $\gamma$ -ELISA der Kulturzellen von 17 Patienten mit Pankreaskarzinom, die für 10 Tage mit Influenza-Matrix-Peptid stimuliert wurden. Gezeigt ist immer die Reaktion auf das Peptid im ELISpot (helle Balken) im Vergleich zur Reaktion ohne Stimulation der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Menge an sezerniertem IFN- $\gamma$  in pg/ml aus jeweils 2 ausgemessenen Wells.**

In dem parallel zum ELISpot durchgeführten IFN- $\gamma$ -ELISA zeigten die Zellen der Patienten 2, 9, 13, 15 und 32 eine spezifische Produktion von IFN- $\gamma$ . Die Zellen von Patient 17 zeigten eine spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion von 168 pg/ml bei einem Stimulationsindex von 1,4, bei Patient 25 eine spezifische Produktion von 96 pg/ml mit einem Index von 1,0. Die Zellen der Patienten 24, 25, 27, 28 und 29 hatten mit einem Mittelwert von 3.754 (Range 1.380–6.304; n = 5) eine signifikant höhere unspezifische IFN- $\gamma$ -Produktion als die Zellen der übrigen Patienten. Hier lag sie im Mittel bei 286 pg/ml (Range 136–832; n = 12); siehe Abbildung 14. Die Standardabweichung zwischen den Wells der deutlich reaktiven T-Zellen lag zwischen 80 und 320 pg/ml (n = 4, ausgenommen Patient 15; siehe Text). Bei den T-Zellen mit hoher unspezifischer Reaktion lagen sie zwischen 10 und 560 pg/ml (n = 4), bei den übrigen zwischen 4 und 250 (n = 6).

### 3.3.4 Reaktionen der T-Zellen auf die Ras-Peptide nach 10 Tagen Stimulation *in vitro*

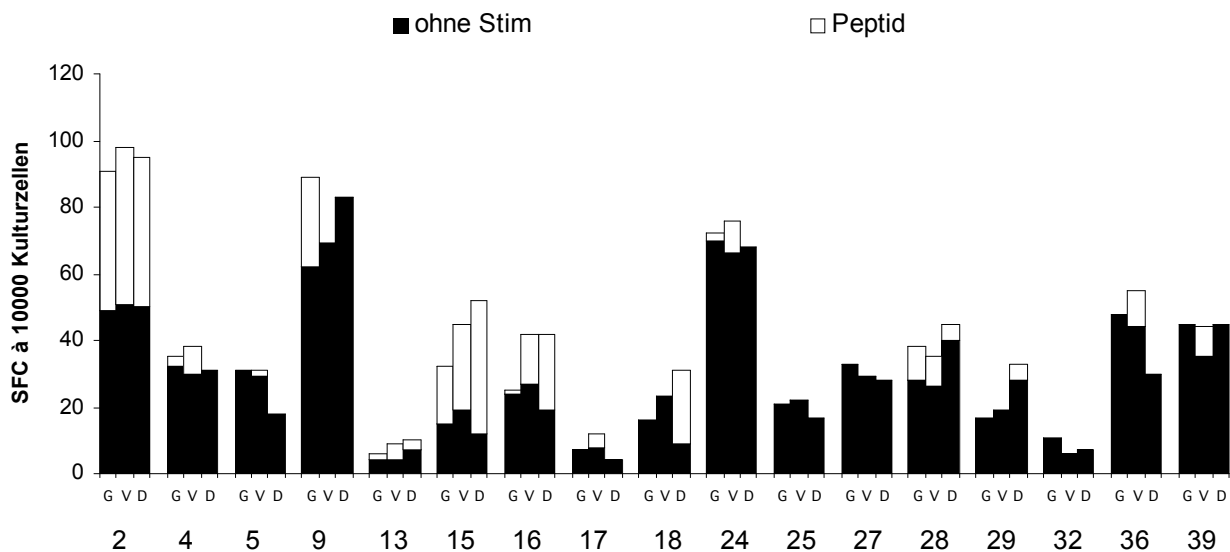
Im ELIspot zeigten die Kulturzellen der Patienten 15, 16 und 18 positive Reaktionen auf verschiedene Ras-Peptide mit einer Anzahl von über 30 SFC und einem Stimulationsindex größer 2. Im Einzelnen reagierte der Patient 15 gegen das Ras-12G-Peptid mit 32 SFC gegenüber 15 SFC in den unstimulierten Wells (SI: 2,1), gegen das Ras-12V- mit 45 gegenüber 19 SFC (SI: 2,4) und das Ras-12D-Peptid mit 52 gegenüber 12 SFC (SI: 4,3). Bei Patient 16 gab es eine Reaktion gegen Ras-12D mit 42 gegenüber 19 SFC (SI: 2,2). Bei Patient 18 reagierten die T-Zellen ebenfalls gegen Ras-12D mit 31 gegenüber 9 SFC (SI: 3,4).

Bei Patient 2 gab es eine Reaktion gegen alle drei Ras-Peptide, allerdings lag der Stimulationsindex hier unter zwei (Ras-12G/unstimulierte Zellen: 91/49; Ras-12V/unstimulierte Zellen: 98/51; Ras-12D/unstimulierte Zellen: 95/50 SFC). Bei den übrigen Patienten gab es keine spezifischen Reaktionen der Zellen gegen die Ras-Peptide. Bei den Patienten 2, 9, 24, 36 und 39 war die Reaktivität ohne Stimulation mit durchschnittlich 49 SFC sowie durchschnittlich 46 SFC nach Stimulation mit HIV-Peptid überdurchschnittlich hoch (Abbildung 15).

Bei den Patienten 15, 16 und 18 lagen die unspezifischen Reaktionen unter dem Durchschnitt. Die Zellen von 3 Patienten zeigten insgesamt nur geringe Reaktionen. Die Standardabweichung lagen für alle Bedingungen bei 0 bis maximal 13 SFC. Bei den Patienten, deren Zellen auf Ras reagierten (ausgenommen Nummer 2) lag die Standardabweichung in keinem Fall höher als 6.

In den ebenfalls untersuchten HIV-Kulturen konnten keinerlei spezifische T-Zellen nachgewiesen werden.

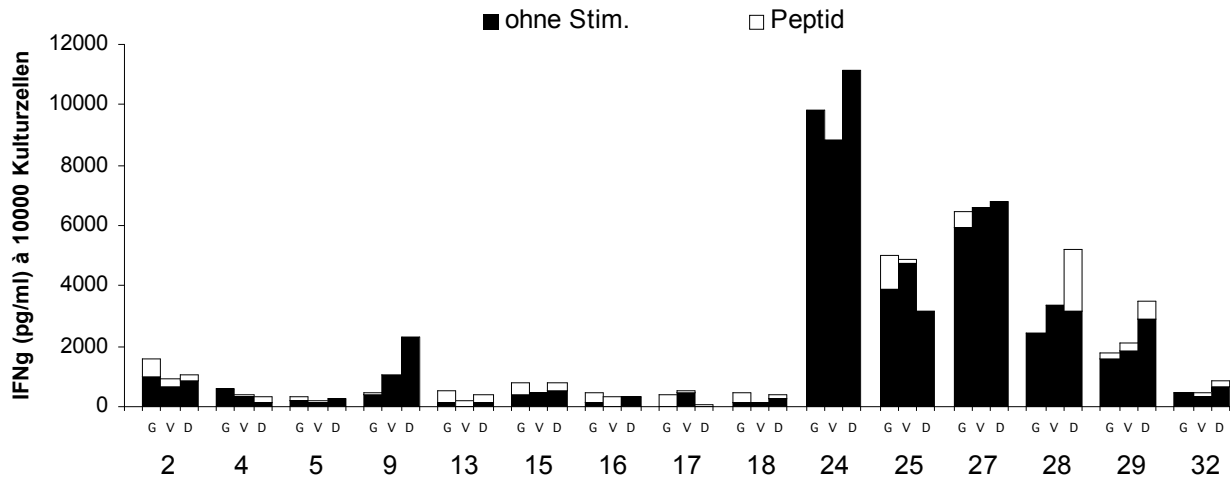
Die Standardabweichung zwischen den Wells lag zwischen 1–5 Spots. Einen Ausreißer gab es beim Patienten 18 mit einer Standardabweichung von 24 Spots zwischen den drei Ras-12D-stimulierten Wells.



**Abbildung 15: IFN- $\gamma$ -ELISpot der Kulturzellen von 17 Patienten mit Pankreaskarzinom, die für 10 Tage mit 1. Ras-12G-Peptid, 2. Ras-12V-Peptid und 3. Ras-12D-Peptid stimuliert wurden. Die Kulturen und Patientennummern sind auf der x-Achse aufgeführt. Gezeigt ist immer die Reaktion auf das Peptid im ELISpot, mit dem die jeweilige Kultur stimuliert wurde (helle Balken), im Vergleich zur Reaktion ohne Stimulation der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Nummer des zugehörigen Patienten steht auf der x-Achse unter dem jeweiligen Balken-Triplet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Spot Forming Cells (SFC) aus je 3 ausgezählten Wells.**

Die mitgeführte Maximalstimulation (siehe Methodenteil) führte durchweg in allen Tests zu einer mit dem verwendeten Gerät nicht mehr zählbaren Menge an SFC. Da das Gerät in mehreren Testreihen Zahlen von maximal etwa 500 Spots als noch zählbar angegeben hatte, ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Zahl der reaktiven Zellen in den maximal stimulierten Wells noch größer, also  $> 500/10^4$ , war.

In dem parallel durchgeführten IFN- $\gamma$ -ELISA konnte bei keinem der Patienten eine spezifische Zytokin-Sekretion nachgewiesen werden. Bei den Patienten 24, 25, 27, 28 und 29 fiel eine im Vergleich zu den übrigen Patienten hohe unspezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion auf.



**Abbildung 16:** IFN- $\gamma$ -ELISA der Kulturzellen von 17 Patienten mit Pankreaskarzinom, die für 10 Tage mit 1. Ras-12G-Peptid, 2. Ras-12V-Peptid und 3. Ras-12D-Peptid stimuliert wurden. Die Kulturen und Patientennummern sind auf der x-Achse aufgeführt. Gezeigt ist jeweils die Reaktion auf das Peptid im ELISpot, mit dem die jeweilige Kultur stimuliert worden war (helle Balken), im Vergleich zur unstimulierten Reaktion der gleichen Kulturzellen (dunkle Balken). Die Nummer des zugehörigen Patienten steht auf der x-Achse unter dem jeweiligen Balken-Triplet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der IFN- $\gamma$ -Produktion in pg/ml aus je zwei ausgemessenen Wells.

Dieses Ergebnis geht, vor allem bei Patient 24, mit dem Ergebnis des ELISpot konform.

Im ELISA konnte bei den Zellen aus den HIV-Kulturen keine spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion gegenüber HIV-Peptid nachgewiesen werden. Die Standardabweichung betrug bei den Patienten 2–18 und 32 zwischen 1 und 45 pg/ml. Bei den Zellen der Patienten 24, 25, 27, 28 und 29 lag sie zwischen 25 und 122 pg/ml.

### 3.3.5 Zusammenfassung

Die Zellen von 5 der 21 Patienten mit Pankreaskarzinom reagierten im direkten ELISpot auf Influenza-Peptid (23,8 %), ein deutlich geringerer Anteil als bei den gesunden Blutspendern (66,7 %). Durch die 10-tägige Stimulation mit Influenza-Peptid erhöhte sich das Verhältnis auf 9 von 17 getesteten Patienten (52,9 %), blieb aber unter den 100 % bei gesunden Blutspendern. Eine Reaktion auf die getesteten Ras-Peptide ließ sich im direkten ELISpot nicht feststellen. Nach Zellkultur jedoch

reagierten vier Patienten, davon drei mit einem Stimulationsindex größer 2. Hohe unspezifische Reaktivität schränkt die Aussagekraft des Befundes ein. Es gab zwei Reaktionen gegen den Wildtyp (Ras-12G), zwei gegen das Peptid mit Valin-Mutation am Codon 12, und vier Reaktionen gegen das Ras-12D-Peptid (Asparaginsäure am Codon 12). Im ELISA konnte dieser Befund nicht bestätigt werden. Durch teilweise sehr hohe unspezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion erscheint hier eine zuverlässige Aussage schwierig.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Methodik**

#### **4.1.1 ELISpot**

Im ELISpot wurden zwei verschiedene Varianten verwendet, um die T-Zellen zu stimulieren. Während der Etablierungsphase des Assays hatte sich in mehreren Versuchen gezeigt, dass bei der Untersuchung der PBMC direkt nach Isolation die Hintergrundaktivität geringer war, wenn mit Peptid allein anstatt mit peptidgepulsten autologen PBMC oder T2-Zellen stimuliert wurde. Gleichzeitig ließen sich mehr spezifische Spots nach Stimulation mit Influenza-Matrix-Peptid nachweisen (Kapitel 3.1).

Das könnte bedeuten, dass eine Beladungszeit von zwei Stunden, wie sie im Rahmen des Standard-Protokolls für den ELISpot vorgesehen ist, für eine ausreichende Präsentation der untersuchten Peptide auf autologen PBMC und T2-Zellen nicht genügt. Statt der gewünschten exogen hinzu gegebenen Peptide werden auf der Zelloberfläche vornehmlich Self-Peptide aus dem Zytosol präsentiert, was möglicherweise zu einer erhöhten unspezifischen Aktivierung der T-Zellen führt. Die Zugabe von Peptid zu den frisch isolierten PBMC hingegen ermöglicht eine Antigenpräsentation durch die in der mononukleären Zellfraktion vorhandenen autologen APC über einen Zeitraum von 16–24 Stunden (siehe Methodenteil). Ein spezieller Schritt für das Pulsen entfällt. Eventuell wird in diesem Zeitfenster die Präsentation einer ausreichenden Anzahl an Komplexen aus Fremd-Peptid und MHC-Molekülen möglich.

Im ersten Testdurchlauf konnten bei 75 % der untersuchten HLA-\*0201-positiven Blutspender spezifische Reaktionen auf Influenza-Matrix-Peptid nachgewiesen werden. Das entspricht in etwa den Werten, die auch andere Arbeitsgruppen mit ELISpot ermittelt haben (Scheibenbogen et al., 1997). Die Anzahl der SFC in unstimulierten Wells oder in Wells, die mit HIV-gag-Peptid stimuliert wurden, war sehr gering. Es lässt sich somit feststellen, dass der mit frisch isolierten PBMC durchgeführte ELISpot von den technischen Aspekten her zuverlässig funktionierte.

Nach der 10-tägigen Zellkultur zeigte sich, dass eine Stimulation mit peptidbeladenen T2-Zellen im ELISpot eine deutlich höhere Zahl von Influenza-Matrix-Peptid-

spezifischen Zellen detektieren ließ als mit gepulsten autologen PBMC oder mit alleiniger Peptidzugabe. Ähnliches haben Pass et al. berichtet, als sie die Frequenzen von gp100-Peptid-reaktiven T-Zellen untersuchten (Pass et al., 1998). Die Verwendung von T2-Zellen anstelle von Melanom-Zellen als APC erbrachte bei Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe eine 10- bis 100-fach höhere Anzahl an spezifischen Spots. Auch Scheibenbogen et al. berichten über erhöhte Frequenzen von T-Zellen im ELISpot nach Verwendung von T2-Zellen (Scheibenbogen et al., 2000). Ein Vorteil der Stimulation mit T2-Zellen ist deren deutlich erhöhte Expression von MHC-Klasse-1-Molekülen (wenn stabilisiert durch externe Peptidzugabe), die eine sehr dichte Präsentation von Antigenen erlaubt. Die Untersuchungen von Reay et al. (2000) legen nahe, dass eine vermehrte Präsentation von HLA auf der Zelloberfläche die T-Zell-Antwort verstärken. Damit sind möglicherweise auch Vorläufer-T-Zellen, die eine besonders starke Aktivierung brauchen, dazu in der Lage, auf ein präsentiertes Antigen zu reagieren. In Hinsicht auf das limitiert verfügbare Patientenblut ist auch die Einsparung der PBMC durch Verwendung von T2-Zellen zur Antigenpräsentation in den durchgeführten Assays von Vorteil. Dieser Vorteil würde auch bei einem direkt mit frisch isolierten PBMC durchgeführten ELISpot zutreffen, die Stimulation mit Peptid alleine bringt allerdings den gleichen Effekt und konnte Influenza-spezifische Zellen sensitiver nachweisen (siehe oben). Die meisten Arbeitsgruppen verwenden bei direkt von PBMC durchgeführten ELISpots ebenfalls reines Peptid zur Stimulation (Scheibenbogen et al., 1997; Schmittel et al., 1997; Yang et al., 1999; Scheibenbogen et al., 2000). Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass bei direkter Testung nach PBMC-Isolation noch ausreichend APC in der Zellsuspension vorhanden sind, während nach 10 Tagen die professionellen Antigenpräsentierenden Zellen in der Kultur absterben. Sicher ist, dass die an der Wand der Kulturplatte haftenden Makrophagen nach unserem Protokoll durch die Umsetzung der Kultur am dritten Tag größtenteils entfernt werden (interne durchflusszytometrische Daten, nicht gezeigt).

Nach 10 Tagen Zellkultur ist nicht nur die Anzahl Influenza-spezifischer SFC, sondern auch die der unspezifischen Spots in den unstimulierten Wells in allen durchgeführten Assays deutlich angestiegen. Unter der Vorstellung, die unspezifische Reaktivität könne durch das im Assay verwendete allogene AB-Serum verstärkt werden, testeten wir in mehreren Wells unstimulierte Zellen gegen 10 µl

humanes AB-Serum/Well im Vergleich zu unstimulierten Zellen ohne Zugabe von AB-Serum in serumfreiem Dulbecos-Medium (Daten werden nicht gezeigt). Wir konnten allerdings keine Reaktivität gegen das verwendete allogene Serum von Sigma nachweisen. Auch Kulturen in serumfreiem Medium und Medium mit autologem Serum erbrachten keine besseren Ergebnisse. Allerdings stellte sich eine höhere Hintergrundaktivität ein, wenn unstimulierte Zellen mit unbeladenen T2-Zellen im ELISpot konfrontiert wurden.

Eine deutliche Reduktion der unspezifischen Reaktionen konnte dadurch erzielt werden, dass die IL-2-Menge gegen Ende der Kulturzeit reduziert wurde und die Kulturzellen einen Tag vor Durchführung der Assays in IL-2-freies Medium überführt wurden. Möglicherweise sind die T-Zellen gegen Ende der Kulturzeit zu einem gewissen Maß überstimuliert und dieser Effekt lässt sich durch Reduktion der IL-2-Zugaben mildern.

#### **4.1.2 ELISA**

Aus den oben geschilderten Gründen wurde im ELISA nach der Zellkultur ebenfalls mit T2-Zellen stimuliert.

In mehreren Versuchen konnten im ELISA mit frisch isolierten PBMC keine spezifischen Reaktionen gegen Influenza nachgewiesen werden, auch nicht bei den Blutspendern, die deutlich im ELISpot reagiert hatten. Wir führten dies auf die niedrigere Sensitivität des ELISA im Vergleich zum ELISpot zurück und verwendeten daher den ELISA nur nach 10-tägiger Stimulation der Zellen. Nach dieser Stimulation zeigte der ELISA bei den Versuchen mit gesunden Blutspendern ein mit dem ELISpot weitgehend übereinstimmendes Ergebnis: Alle Spender, die auf Influenza reagierten, zeigten eine hohe spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion.

Bei der Untersuchung der Pankreaskarzinompatienten lieferte der durchgeführte ELISA nach 10-tägiger Stimulation bezüglich der Ras-Reaktionen keine verlässlichen Daten. Es gab keine Ras-spezifische Sekretion von IFN- $\gamma$ , jedoch eine teilweise sehr hohe unspezifische Sekretion. Diese Beobachtung deckt sich mit der, die bei den direkt nach Separation untersuchten PBMC gemacht worden war. Der IFN- $\gamma$ -ELISA scheint bei Nachweisversuchen von T-Zellen niedriger Frequenz an seine Grenzen zu stoßen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Methodik des Assays

liegen. Der ELISA weist Unterschiede in der Zytokinmenge in einer zellfreien Lösung nach. Im Verlauf der Untersuchungen war einerseits zu bemerken, dass die T-Zellen der Pankreaskarzinompatienten im ELISA nach Stimulation mit Ras-Peptiden eine im Vergleich zur Stimulation mit Influenza-Peptid deutlich geringere Menge an IFN- $\gamma$  produziert haben, andererseits fiel im ELISpot auf, dass die nach Stimulation mit Ras-Peptid detektierten SFC in Durchmesser und Farbdichte deutlich geringer ausfielen. Letztere Parameter korrelieren im ELISpot mit der Menge der Zytokinsekretion (Hesse et al., 2001; Guerkov et al., 2003). Es wäre demnach möglich, dass die geringe Menge an sezerniertem IFN- $\gamma$  in Lösung nicht ausreicht, um einen signifikanten Farbumschlag zu bewirken. Zusätzlich zu der geringen Produktion pro Zelle ist ein erheblicher Verdünnungsfaktor zu bedenken, wenn sich das sezernierte IFN- $\gamma$  von 10–40 Zellen auf 100  $\mu$ l Kulturmedium verteilt. Beim ELISpot hingegen wird das IFN- $\gamma$  direkt im Umfeld der Zelle kurz nach der Sekretion abgefangen, so dass der Verdünnungseffekt hier wesentlich geringer ausgeprägt ist. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Shono et al. der Nachweis von Ras-spezifischen T-Lymphozyten auf ein 18 AS langes Peptid mittels ELISA gelungen ist (Shono et al., 2003). Allerdings hat die Arbeitsgruppe die Zellen vorher 30 Tage lang mit gepulsten autologen PBMC und IL-2 stimuliert und dadurch wahrscheinlich die Zellzahl der reaktiven Zellen und so auch die insgesamt sezernierte Menge an Zytokin über die Nachweisgrenze des Assays angehoben. Eine weitere Möglichkeit ist, dass hier ein In-vivo-Priming von naiven T-Zellen stattgefunden hat. Für ein Screening erscheint eine solche Vorgehensweise allerdings zu langwierig und aufwendig, um eine möglicherweise noch nicht einmal vorhandene Immunität realistisch wiederzugeben.

#### **4.1.3 Funktionalität des Untersuchungssystems und alternative Assays**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein für den klinischen Alltag taugliches Screening-System zu entwickeln. Mit dem ELISpot und dem ELISA wurden einfache Assays verwendet, die in jedem klinischen Labor ohne großen Aufwand durchgeführt werden können. So hat der ELISpot eine hohe Sensitivität und kann ohne größeren Aufwand und direkt mit PBMC durchgeführt werden (Scheibenbogen et al., 1997; Scheibenbogen et al., 2000). Andere Assays, die eine genauere Quantifizierung

erlauben, wie der Limiting-Dilution-Assay, erfordern ein hohes Maß an Erfahrung im Umgang mit Zellkulturen und sind mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Solche Assays scheinen daher für den Routinegebrauch in größeren Screening-Untersuchungen nicht praktikabel. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungssystem liegen dagegen die ersten Daten einen Tag nach Blutentnahme und der komplette Datensatz nach insgesamt 11 Tagen vor.

Andere Assays, die ebenfalls eine Quantifizierung auf dem Niveau einzelner Zellen versprechen, wurden in der Etablierungsphase des Screeningsystems auf ihre Sensitivität getestet. So konnte eine Untersuchung mittels intrazellulärer Zytokin-Färbung (IFN- $\gamma$ ) mit anschließender Messung im Durchflusszytometer zwar Influenza-spezifische T-Lymphozyten einer Influenza-spezifischen Zelllinie nachweisen, blieb aber nach der 10-tägigen Stimulation deutlich hinter der Sensitivität von ELISpot und ELISA zurück (Daten nicht gezeigt). Ähnlich verliefen Untersuchungen mit dem von der Firma Miltenyi Biotec angebotenen „IFN- $\gamma$ -Secretion-Assay“. In diesem System wird sezerniertes Interferon mittels Antikörpern gebunden und anschließend über magnetische Beads eingefangen. Die magnetisch markierten IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen können dann mittels einer magnetischen Säule von den übrigen Zellen getrennt werden. Im Anschluss erfolgt eine Überprüfung des Ergebnisses im FACS mittels eines PE-markierten IFN- $\gamma$ -Antikörpers. Auch diese Methode konnte bei direkter Testung von PBMC keine Influenza-spezifischen T-Zellen nachweisen und blieb nach 10-tägiger Stimulation unter den Nachweismöglichkeiten von ELISpot und ELISA.

Eine mögliche Ergänzung unseres Screenings könnte allerdings die durchflusszytometrische Färbung mit HLA-A2-Tetrameren darstellen (Altmann et al., 1997). In der bisherigen Literatur scheinen sie der Sensitivität des ELISpots nahe zu kommen. Da Tetramere die spezifische Zelle auf molekularer Ebene an dem passenden TCR erkennen, können sie auch T-Zellen entdecken, die sich mit den verwendeten Methoden nicht aktivieren lassen und so dem funktionellen Nachweis durch den ELISpot oder ELISA entgehen.

Ein Nachteil wiederum ist die mögliche Anfärbung aneurer Zellen, welche zwar antigenspezifisch sind, aber keine Effektorzytokine (vor allem IFN- $\gamma$ ) sezernieren. Deshalb kann die Tetramer-Technik den ELISpot sicher nicht ersetzen, würde aber eine passende Ergänzung zur genaueren Quantifizierung spezifischer T-Zellen darstellen.

Die Auswahl von tumorspezifischen Peptiden, die HLA-A2-restringiert sind, begründet sich aus der Häufigkeit des HLA-A2-Allels (Cao et al., 2001; Ellis et al., 2000; Fleischhauer et al., 1996). Darüber hinaus sind für A2 auch die meisten tumorspezifischen Peptide bekannt.

Die durchflusszytometrische Färbung mit dem BB7.2-Antikörper ergab, dass 52 % der untersuchten Patienten HLA-A2-positiv waren. Dieses Ergebnis ist in etwa konform mit den aus der Literatur bekannten Frequenzen des HLA-A2-Allels. Da es das häufigste in der kaukasischen Bevölkerung vorkommende Allel des MHC ist, wird durch seine Wahl gewährleistet, dass im Fall eines Therapieerfolges die größte Untergruppe von Patienten therapiert werden kann. Zusätzlich würde es für zukünftige Studien einfacher, ausreichend Probanden für aussagekräftige Ergebnisse zu rekrutieren.

## **4.2 Influenza- und Ras-spezifische T-Zellen**

### **4.2.1 Gesunde Blutspender**

Im direkten ELISpot reagierten die Zellen von 4 der 6 HLA-\*0201-positiven Patienten auf Influenza-Peptid, nach der Zellkultur reagierten die T-Zellen aller Patienten. Die Ergebnisse entsprechen denen anderer Arbeitsgruppen (siehe oben) und geben den hohen Durchseuchungsgrad der Bevölkerung mit Influenza wieder. Darüber hinaus erfüllt die Stimulation über 10 Tage in vitro die gestellten Anforderungen: Sie hebt anfangs nicht detektierbare Frequenzen von Influenza-spezifischen T-Zellen über die Nachweisgrenze, ohne dabei naive T-Zellen zu stimulieren, wie die ausgebliebenen spezifischen Reaktionen der mit HIV stimulierten Zellen zeigen.

Ras-reaktive T-Zellen waren bei gesunden Blutspendern im direkten Test nicht nachweisbar. Im ELISA gab es allerdings einmalig eine spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion nach der Zellkultur bei Spender 6467 nach Stimulation mit dem Ras-12G-Peptid. Im ELISpot zeigten sich hier allerdings keine spezifischen SFC, und das Ergebnis konnte in einem erneut durchgeführten Assay mit eingefrorenem Überstand nicht reproduziert werden. Ein dennoch durchgeführter Expansionsversuch mit ras-12G ist

fehlgeschlagen, so dass wir die Reaktion insgesamt als falsch positiv gewertet haben.

Unsere Ergebnisse entsprechen denen anderer Arbeitsgruppen, die nach einer vergleichbar kurzen Stimulation keine Ras-spezifischen Zellen nachweisen konnten (Jung et al., 1991; Gjertsen et al., 1996). Allerdings konnten nach lang andauernder Stimulation mit unterschiedlichen Protokollen CD4<sup>+</sup>-Zelllinien gegen Ras-Peptide generiert werden (Jung et al., 1991; Fossum et al., 1993; Gedde-Dahl et al., 1993). Eine interessante Methode entwickelten Bergmann-Leitner et al. im Jahr 2000. Sie selektierten mit Hilfe von Antikörpern angereicherte T-Zell-Kulturen. Als APC verwendeten sie modifizierte T2-Zellen, die mit einem rekombinanten Virus transfiziert worden waren, der das costimulatorische humane B7.1-Gen enthielt. Zusammen mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin und autologen PBMC wurde die angereicherte Kultur von T-Zellen dann stimuliert. Sie konnten CD4- und CD8-positive Zelllinien generieren, die spezifisch auf ein Ras-Peptid mit einer Valin-Mutation an Codon 12 reagierten. Solche Verfahren eignen sich allerdings nicht für den Nachweis von spezifischen Precursor-T-Zellen im Rahmen von Screeninguntersuchungen.

#### **4.2.2 Pankreaskarzinompatienten**

Im direkt nach PBMC-Isolation durchgeführten ELISpot hat keiner der Patienten auf die Ras-Peptide reagiert. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass Ras-spezifische T-Zellen allenfalls in sehr niedriger Frequenz auftreten. Bisher ist es nach der vorliegenden Literatur noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, einen solchen direkten Nachweis von Ras-spezifischen T-Zellen bei Patienten ohne vorherige Vakzinierung zu führen.

Nach 10-tägiger Zellkultur haben wir im ELISpot bei vier Patienten eine Reaktion gegen die Ras-Peptide gesehen, bei drei von ihnen lagen die Stimulationsindizes über 2. Allerdings lag die Anzahl dieser SFC deutlich unter den bei Influenza-reaktiven Zellen, während die Anzahl an unspezifischen Spots vergleichbar hoch blieb. Einerseits könnte dies Anlass dazu geben, die Ergebnisse anzuzweifeln, andererseits handelt es sich bei den Ras-Peptiden um Self-Antigene, wenn auch durch Mutation verändert. Die Immunantwort gegen solche Self-Antigene scheint

immer schwächer auszufallen als gegen virale oder etwa bakterielle Antigene. Dies zeigte sich auch in mehreren Untersuchungen zu Epcam und Melanom-spezifischen Tumorzellen (Scheibenbogen et al., 1997a; Schmittel et al. 1997; Nagorsen et al., 2003; Schmetzer et al., 2005).

Es wurde mehrfach berichtet, dass nach vorhergehender Stimulation aus dem Blut von nicht vakzinierten Krebspatienten Ras-spezifische T-Zellen generiert werden können (Fossum et al., 1995; Gedde-Dahl et al., 1994). Diese Studien hatten allerdings keinen Screening-Charakter, und die Zellen wurden langen Stimulationszyklen unterzogen, bis hin zur Klonierung. Bisher veröffentlichte Screeninguntersuchungen von Patienten mit Kolon- oder Pankreaskarzinom zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Fossum et al. wiesen unter 10 Kolonkarzinompatienten nach einer siebentägigen Stimulation mit einem Peptidgemisch aus 10 Peptiden und IL-2 in einem Proliferationsassay einen Ras-reaktiven Patienten nach (Fossum et al., 1994). Bei Quin et al. (1995) zeigten nach nur vier Tagen Stimulation mit 100 µg Peptid sieben von 16 Pankreaskarzinompatienten eine Reaktion auf Ras-12D-Peptid, allerdings wurde hier als einziges Kriterium für Positivität der Stimulationsindex gewählt. Dies erscheint problematisch, da auch eine sehr geringe Proliferation bei entsprechend niedriger Proliferation der Kontrolle einen SI von über 2 ergeben kann. Im Gegensatz dazu konnten Shono et al. bei keinem von 14 Patienten, bei denen eine Ras-Mutation im Vorfeld nachgewiesen worden war, positive Signale im Proliferationsassay nach vier Tagen in Kultur mit dem entsprechenden Peptid zeigen (Shono et al., 2003).

Die Reaktivität gegen das Influenza-Matrix-Peptid war bei den direkt untersuchten PBMC der Pankreaskarzinompatienten mit 5 von 21 getesteten Patienten (23,8 %) deutlich geringer als bei den gesunden Spendern. Nach 10 Tagen Stimulation stieg die Anzahl der positiv reagierenden Patienten auf 11 von 17 getesteten an (65 %), blieb damit aber immer noch unter den 100 % bei gesunden Blutspendern. Dieses Ergebnis könnte auf eine allgemeine Verminderung der Immunkompetenz bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen hinweisen. Es ist bekannt, dass Tumore eine Art immunsuppressives Netzwerk aufbauen, das über verschiedene tumorassoziierte lösliche Faktoren wie IL-10 oder den „transforming growth factor beta“ (TGF-β) vermittelt werden. Diese Faktoren bewirken über die Induktion unreifer myeloischer Zellen und regulatorische T-Zellen eine Hemmung der



Ausreifung dendritischer Zellen sowie eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung (Kim et al., 2006). Darüber hinaus ist sowohl über eine verminderte absolute Lymphozytenzahl als auch über eine verminderte Anzahl der T-Zellen bei Karzinompatienten berichtet worden. Die Funktion der T-Zellen scheint abzunehmen, was unter anderem auf eine veränderte Signaltransduktion zurückgeführt wird (Singh et al., 1985; Zier et al., 1996; Romano et al., 2003). Beim Pankreaskarzinom wurde ein höherer Anteil an immunsupprimierten Patienten als bei anderen gastrointestinalen Karzinomen beobachtet (Romano et al., 2004). In den letzten Jahren haben sich Hinweise dafür gehäuft, dass die sogenannten regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) eine wichtige Rolle bei der Reduktion der Immunantwort gegenüber Tumorzellen spielen. Früher auch als Suppressor-T-Zellen bezeichnet, sind sie eine Untergruppe der T-Zellen, die die Aktivierung des Immunsystems unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren soll. Mit der Immunantwort aktiviert, sezernieren sie Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ , welche unter anderem für ihre regulatorische Effektorfunktion verantwortlich gemacht werden. Viehl et al. (2006) konnten nachweisen, dass es in genetisch veränderten Mausmodellen mit Pankreaskarzinom, die über keine  $CD4^+$ - $CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen verfügten, zu einer verbesserten Immunantwort gegen die Tumorzellen kam. Dass in der Umgebung von Tumoren vermehrt regulatorische T-Zellen vorkommen, ist schon länger bekannt (Udaya et al., 2002). Eine Arbeitsgruppe des deutschen Krebsforschungszentrums und der Universität Heidelberg zeigte kürzlich, dass Zellen des Pankreaskarzinoms dazu in der Lage sind, über spezielle Adhäsionsmoleküle regulatorische T-Zellen in die Umgebung des Tumorgewebes zu locken (Nummer et al., 2007).

Ein weiterer Faktor für die Beeinträchtigung des Immunsystems der in dieser Arbeit untersuchten Patienten sind die im Rahmen der Standardtherapie möglicherweise verabreichten Chemotherapeutika. Leider konnten wir diesbezüglich keine Analyse der Patientendaten vornehmen, so dass diese Frage letztlich unbeantwortet bleibt.

Es ist in dieser Hinsicht aber interessant, dass die drei Patienten, die nach 10-tägiger Stimulation im ELISpot auf Ras-Peptid reagiert haben, uneinheitlich auf Influenza-Peptid reagiert haben. So hat Patient 16 im direkten Test mit 10 SFC auf Influenza reagiert, allerdings gab es keine spezifische Reaktion nach Zellkultur. Hier hat dann Patient Nummer 15 (der in dem direkten ELISpot negativ geblieben war) mit 53

spezifischen SFC reagiert. Auch im ELISA zeigten die T-Zellen eine Influenza-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion von 6.400 pg/ml, damit lag die Produktion auf einem vergleichsweise hohen Niveau von etwa 120 pg/ml pro Zelle. Die T-Lymphozyten von Pat. 18, die deutlich auf ras-12D reagiert haben, haben nicht auf das Influenza-Matrix-Peptid reagiert. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine These, die Influenza als direkten Marker für die Immunstärke eines Patienten ansieht, wie sie z. B. für Tetanus-Toxoid postuliert worden ist (Qin et al., 1995). Ähnliche Beobachtungen sind auch schon im Zusammenhang mit dem malignen Melanom gemacht worden (Scheibenbogen et al., 1997).

### **4.3 Schlussfolgerung**

Ein Ziel dieser Arbeit war, eine sensitive Screeningmethode zur Frequenzanalyse von Ras-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zur Begleitung künftiger Vakzinierungsstudien mit Ras-Peptiden bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu entwickeln. Durch kombinierten Einsatz von Kurzzeit-Zellkultur, ELISpot-Assay und ELISA-Assay ist es gelungen, spezifische Reaktionen auf Ras-Peptide vor Vakzinierung nachzuweisen. In einer ersten Serie von Proben von Pankreaskarzinompatienten fanden wir Hinweise auf eine Ras-spezifische Reaktivität bei drei Patienten.

Ein weiteres Ziel war die Evaluation der Reaktivität der T-Zellen von gesunden Spendern und Pankreaskarzinompatienten gegen Influenzavirus. Hier zeigten sich in den untersuchten Kollektiven unterschiedliche Ergebnisse. So ergaben sich Hinweise auf eine insgesamt geringere Reaktivität bei den Pankreaspatienten, so dass Influenza ein Marker für den zellulären Immunstatus sein könnte. Insgesamt waren die Ergebnisse jedoch zu divergent, so dass für diese Hypothese weitergehende Untersuchungen nötig sind, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen hat sich das etablierte Untersuchungssystem als wenig störanfällig, einfach und mit geringem zeitlichem Aufwand durchführbar erwiesen.

Eine absehbare Verbesserung bzw. Ergänzung des Verfahrens stellt vor dem Hintergrund unzureichender ELISA-Ergebnisse bei den Patienten mit Pankreaskarzinom die Methode der Tetramer-Färbung und Analyse im FACS dar.

#### 4.4 Ausblick

In der Einleitung wurde schon auf die Frage eingegangen, warum gerade das Pankreaskarzinom für einen immunologischen Therapieansatz sinnvoll erscheint. Diese Arbeit entstand in den Jahren 2001 und 2002, Studien zur Vakzinierung mit Ras-Peptiden lieferten erste Daten mit Hinweisen auf die prinzipielle Durchführbarkeit und gaben Anlass zu der Annahme, dass der immunologische Ansatz der Tumorthherapie durch Vakzinierung mit K-Ras-Peptiden auch in Zukunft weiterer Erforschung würdig ist (Khleif et al., 1999; Gjertsen et al., 2001).

Insgesamt sind die mit aktiver Immunisierung bisher erzielten klinischen Erfolge gegen Tumoren aber gering, und Ernüchterung ist an die Stelle der ursprünglichen Euphorie getreten. In vielen positiven Studien finden sich variabel gesetzte Endpunkte zum mittleren Überleben anstelle von validen, in der Onkologie etablierten klinischen Kriterien als Maßeinheit einer erfolgreichen Therapie. Ein Beispiel hierfür ist die 2004 veröffentlichte Studie von Fukunaga et al., die einen positiven Effekt von Ras-spezifischen TIL auf das Überleben von Pankreaskarzinompatienten nachgewiesen hat (Fukunaga et al., 2004). Auch Carbone et al. vermelden einen klinischen Benefit nach Immunisierung mit K-Ras-Peptiden ohne eine Reduktion der Gesamttumormasse und ohne das fehlende Auftreten von neuen oder progressiven Läsionen in die Beurteilung mit einzubeziehen (Carbone et al., 2005).

In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsarbeit wurden insgesamt 1.306 Patienten mit unterschiedlichen Peptiden gegen eine Vielzahl von Krebsleiden vakziniert. Die Parameter waren hier: Eine Reduktion der Summe aller maximalen Durchmesser der vorhandenen Tumorkläsionen um mindestens 50 %, kein Wachstum von mehr als 25 % einer vorhandenen Läsion und das Fehlen von neu aufgetretenen Läsionen. Es zeigte sich insgesamt eine Ansprechrate von unter 3 % (Rosenberg et al., 2004).

Dieses Versagen der klassischen Peptidvakzinierung hat durch eine Reihe von Untersuchungen zu einem verbesserten Verständnis der molekularen und zellulären Grundlagen der T-Zell-vermittelten Anti-Tumorimmunität geführt (Waldmann, 2006). Eine weitere Folge war die Entwicklung neuer Therapiestrategien. So wird auf der einen Seite versucht, die Potenz der Impfstoffe zu erhöhen. Versuche hierzu umfassen die Verbesserung der APC-Funktion ex vivo durch Wachstumsfaktoren und Interleukine (Pardoll et al., 2002; Srivastava et al., 2000), und das „boosten“ von

Vakzinen mit viralen Vektoren oder mit hitzeinaktivierten Proteinen (Berzofsky et al., 2001).

Auf der anderen Seite wird versucht, Faktoren zu eliminieren, die bekanntermaßen einen hemmenden Einfluss auf das Immunsystem haben. Der möglicherweise wichtigste dieser Effekte wird über die sogenannten  $CD4^+$ - $CD25^+$ -Suppressor-T-Zellen vermittelt. In Maus-Experimenten war ein spezieller Antikörper dazu in der Lage, diese Zellen zu inaktivieren und die Immunantwort der Tiere gegen Tumore zu verbessern (Hurwitz et al., 2000; Suttmüller et al., 2001).

Der vielleicht vielversprechendste Ansatz ist derzeit die adoptive Immuntherapie, bei der die T-Zellen von Patienten zunächst *in vitro* mit tumorspezifischen Antigenen stimuliert und dann *in vivo* retransferiert werden. Vor allem nach vorheriger Immunsuppression durch Chemotherapie sind beachtliche Erfolge erzielt worden (Dudley et al., 2002; Dudley et al., 2005). Einen Überblick über die bisherigen Entwicklungen gibt ein Artikel von Gattinoni et al. (2006).

Der unzureichende klinische Effekt der gegenwärtig verfügbaren Krebsimpfstoffe sollte allerdings nicht als generelles Versagen des immunologischen Ansatzes gewertet werden. Vielmehr wird es in Zukunft darauf ankommen, die Vakzinierungsstrategien an die aktuellen Forschungsergebnisse anzupassen und zu erweitern. Das Ausschalten von Suppressor-T-Zellen, das Unterstützen der Peptidpräsentation *in vivo* durch Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie das Verbessern der T-Zell-Aktivierung durch genetisch manipulierte Rezeptoren sind gute Ansätze. Werden sie mit der adoptiven Immuntherapie kombiniert, erscheinen in Zukunft klinische Erfolge auch beim Pankreaskarzinom möglich.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Untersuchungssystem kann hier helfen, für künftige Studien geeignete Patienten zu identifizieren, und bietet Möglichkeiten zum quantitativen Monitoring aktivierter T-Zellen *in vitro* und *in vivo*.

## **Zusammenfassung**

Das Karzinom des Pankreas ist durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet, ein therapeutischer Durchbruch mit operativen Verfahren und Chemotherapie ist bisher nicht gelungen. Als eine komplementäre Therapieoption wird unter anderen die sogenannte Tumorstimmung verfolgt, die auf eine selektive Anregung der zellulären Immunantwort gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene zielt. Beim Pankreaskarzinom finden sich in 90 % der Fälle Mutationen im Ras-Gen. 80 % dieser Mutationen sind am Codon 12 lokalisiert; das im Wildtyp dort vertretene Glutamin wird entweder durch Valin oder durch Asparaginsäure ersetzt. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer sensitiven Screeningmethode, um Ras-spezifische T-Lymphozyten bei Pankreaskarzinompatienten nachzuweisen und so für Vakzinierungsstudien besonders geeignete Patientengruppen zu selektieren. Die Methode sollte weiter ein Monitoring der T-Zell-Frequenzen im Verlauf solcher Studien ermöglichen.

Es wurden die PBMC von sieben HLA-A2-positiven gesunden Blutspendern und 21 Pankreaskarzinompatienten getestet. Mittels ELISpot und ELISA wurde nach spezifischen T-Zellen für die HLA-A2-restringierten Peptide K-Ras-Wildtyp (KLVVGAGGV) sowie die mutierten Peptide 12-Val (KLVVGAVGV) und 12-Asp (KLVGADGV) gesucht. Als Kontrollpeptide wurden ein Influenza-Matrix-(Positivkontrolle) und ein HIV-Gag-Peptid untersucht.

Die Zellen von vier der gesunden Blutspender reagierten direkt auf Influenza-Peptid, nach 10-tägiger Stimulation in vitro reagierten die Zellen aller Spender. Reaktionen auf eines der Ras-Peptide zeigten sich nicht. Die Lymphozyten von 5 der 21 Patienten reagierten direkt auf Influenza, nach 10-tägiger Stimulation erhöhte sich die Anzahl auf 9 (42,9 %). Es zeigte sich keine direkte Reaktion auf eines der Ras-Peptide, nach Stimulation in vitro reagierten jedoch die Zellen von vier Patienten. Insgesamt zeigten sich Hinweise, dass mit Hilfe der verwendeten antigenspezifischen Assays bereits vor einer Vakzinierung T-Zell-Reaktionen gegen Ras-Peptide nachweisbar sind. Als möglicher Hinweis auf eine verminderte Immunkompetenz traten Zellen gegen das Influenza-Peptid bei Pankreaskarzinompatienten relativ seltener auf als bei gesunden Blutspendern. Eine direkte Korrelation zwischen der Reaktivität auf Influenza und Ras konnte nicht festgestellt werden.

### **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Pezzutto für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine Unterstützung. Weiterhin gilt mein Dank natürlich meinem Betreuer Dr. Lee, von dem ich in dieser Zeit viel gelernt habe.

Auch Herrn Prof. Dr. H. Riess und Herrn Dr. Hoppe danke ich für die Bereitstellung des Patienten- bzw. Spenderbluts.

Zu erwähnen sind an dieser Stelle noch die MTAs Sabine Joerg und Kerstin Daemen, die mir bei der täglichen Laborarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Vielen Dank auch an Markus Färber für die Hilfe bei den Abbildungen.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Frau Christina, die mich mental unterstützt hat und mir Mut gemacht hat in den Zeiten, in denen das Gelingen dieser Arbeit in Frage stand.

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 .....	18
Abbildung 2 .....	19
Abbildung 3 .....	23
Abbildung 4 .....	25
Abbildung 5 .....	35
Abbildung 6 .....	35
Abbildung 7 .....	37
Abbildung 8 .....	39
Abbildung 9 .....	39
Abbildung 10 .....	43
Abbildung 11 .....	44
Abbildung 12 .....	45
Abbildung 13 .....	46
Abbildung 14 .....	47
Abbildung 15 .....	49
Abbildung 16 .....	50

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.....	38
Tabelle 2.....	42

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Alanin
AB-Serum	Serum mit den Blutgruppenantigenen A und B
AK	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cells
BSA	Bovines Serumalbumin
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
CD	Cluster of Differentiation
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked Immunospot
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FCS	Fetal Cow Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flu	Influenza-Virus-Antigen
G	Glutamin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleukin
IM	Iscove's Medium
K	Lysin
kDa	Kilo-Dalton
L	Leucin
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBS	Phosphate-buffered Saline
PE	Phykoerythrin
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
Rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
SFC	Spot-forming Cell



TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
V	Valin

## **Literaturverzeichnis**

Abrams SI, Dobrzanski MJ, Wells DT, et al. Peptide-specific activation of cytolytic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes against tumor cells bearing mutated epitopes of K-ras p21. *Eur J Immunol* 1995; 25(9): 2588–97.

Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J, et al. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol* 1996; 23(1): 118–34.

Abrams SI, Stanziale SF, Lunin SD, Zaremba S, et al. Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Eur J Immunol* 1996; 26(2): 435–43.

Abrams SI, Khleif SN, Bergmann-Leitner ES, et al. Generation of stable CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations. *Cell Immunol* 1997; 182(2): 137–51.

AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland*. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken: Robert Koch-Institut und GEKID 2006: 36–8.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53(4): 549–54.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274(5284): 94–6.

Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779–827.

Bednarek MA, Engl SA, Gammon MC, et al. Soluble HLA-A2.1 restricted peptides that are recognized by influenza virus specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1991; 139(1): 41–7.

Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, et al. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* 1991; 147(12): 4047–53.

Bergmann-Leitner ES, Kantor JA, Shupert WL, Schlom J, Abrams SI. Identification of a human CD8<sup>+</sup> T lymphocyte neo-epitope created by a ras codon 12 mutation which is restricted by the HLA-A2 allele. *Cell Immunol* 1998; 187(2): 103–16.

Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 209–19.

Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690: 42–9.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327(6120): 293–7.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49(7): 4682–9.

Burris HA., Moore MJ 3rd, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15(6): 2403–13.

Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Vina MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol* 2001; 62(9): 1009–30.

Carbone DP, Ciernik IF, Kelley MJ, et al. Immunization with mutant p53-and-K-ras-derived peptides in cancer patients: Immune response and clinical outcome. *J Clin Oncol* 2005; 23(22): 5099–107.

Cheever MA, Chen W, Disis ML, Takahashi M, Peace DJ. T-cell immunity to oncogenic proteins including mutated ras and chimeric bcr-abl. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690: 101–12.

Dudley MR, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients following clonal repopulation with anti-tumor lymphocytes. *Science* 2002; 298: 850–4.

Dudley MR, Wunderlich JR, Jang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(10): 2346–57.

Faivre J, Forman D, Estève J, Obradovic M, Sant M. Survival of patients with primary liver cancer, pancreatic cancer and biliary tract cancer in Europe. EUROCORE Working Group. *Eur J Cancer* 1998; 34(14): 2184–90.

Fenton RG, Taub DD, Kwak LW, Smith MR, Longo DL. Cytotoxic T-cell response and in vivo protection against tumor cells harboring activated ras proto-oncogenes. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(16): 1294–302.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Onc* 2007; 18(3): 581–92

Fleischhauer K, Zino E, Mazzi B, Severini GM, Benazzi E, Bordignon C. HLA-A\*02 subtype distribution in Caucasians from northern Italy: identification of A\*0220. *Tissue Antigens* 1996; 48(6): 673–9.

Fossum B, Gedde-Dahl T 3rd, Breivik J, et al. p21-ras-peptide-specific T-cell responses in a patient with colorectal cancer. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recognize a peptide corresponding to a common mutation 13Gly-->Asp. *Int J Cancer* 1994; 56(1): 40–5.

Fossum B, Gedde-Dahl T 3rd, Hansen T, Eriksen JA, Thorsby E, Gaudernak G. Overlapping epitopes encompassing a point mutation 12Gly-->Arg) in p21 ras can be

recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells. *Eur J Immunol* 1993; 23(10): 2687–91.

Fossum B, Olsen AC, Thorsny E, Gaudernack G. CD8<sup>+</sup> T cells from a patient with colon carcinoma, specific for a mutant p21-Ras-derived peptide (Gly13-->Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40(3): 165–72.

Friess H, Berberat P, Schilling M, Kunz J, Korc M, Büchler MW. Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med* 1996; 74(1): 35–42.

Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, et al. CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2004; 28(1): e26–31.

Gastrointestinal Tumor Study Group. Treatment of locally unresectable carcinoma of the pancreas: comparison of combined-modality therapy (chemotherapy plus radiotherapy) to chemotherapy alone. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(10): 751–5.

Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(5): 383–93

Gedde-Dahl T, Eriksen JA 3rd, Thorsby E, Gaudernack G. T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides. *Hum Immunol* 1992; 33(4): 266–74.

Gedde-Dahl T, Fossum B, Eriksen JA 3rd, Thorsby E, Gaudernack G. T cell clones specific for p21 ras-derived peptides: characterization of their fine specificity and HLA restriction. *Eur J Immunol* 1993; 23(3): 754–60.

Gedde-Dahl T, Nilsen E 3rd, Thorsby E, Gaudernack G. Growth inhibition of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29) by T cells specific for mutant p21 ras. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38(2): 127–34.

Gedde-Dahl T, Spurkland A 3rd, Eriksen JA, Thorsby E, Gaudernack G. T cell epitopes encompassing the mutational hot spot position 61 of p21 ras. Promiscuity in ras peptide binding to HLA. *Eur J Immunol* 1994; 24(2): 410–4.

Gjertsen MK, Bakka A, Breivic J, et al. Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase I/II study. *Int J Cancer* 1996; 65(4): 450–3.

Gjertsen MK, Bjorheim J, Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, generated by mutant p21-ras 12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int J Cancer* 1997; 72(5): 784–90.

Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, et al. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92(3): 441–50.

Gjertsen MK, Gaudernack G. Mutated Ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer. *Vox Sang* 1998; 74Suppl 2: 489–95.

Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 1991; 49: 281–355.

Greten TF, Slansky JE, Kubota R, et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(13): 7568–73.

Guerkov RE, Targoni OS, Kreher CR, et al. Detection of low-frequency antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells vis ELISpot in PBMC: cognate vs. nonspecific production of the cytokine. *J Immunol Methods* 2003; 279(1–2): 111–21.

Hall A. A biochemical function for ras – at last. *Science* 264(5164): 1413–4.

Hamann D, Baars PA, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1994; 186(9): 1407–18.

Han SS, Jang JY, Kim SW, Kim WH, Lee KU, Park YH. Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer. *Pancreas* 2006; 32(3): 271–75.

Harrer T, Harrer E, Barbosa P, et al. Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol* 1998; 161(9): 4875–81.

Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994; 1(5): 343–6.

Herr W, Schneider J, Lohse AW, Meyer zum Büschenfelde KH, Wölfel T. Detection and quantification of blood-derived CD8<sup>+</sup> T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Methods* 1996; 191(2): 131–42.

Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. A T cell clone's avidity is a funktion of its activation state. *J. Immunol.* 2001; 167(3): 1353–61.

Hurwitz AA, Foster BA, Kwon ED, et al. Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 2000; 60: 2444–48.

Janeway CA, Travers P. Das Immunologische Gedächtnis. In: Janeway CA, Travers P. *Immunologie*. 2. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1997: 379–389.

Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991; 353(6342): 326–9.

Jung S, Schluesener HJ. Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. *J Exp Med* 1991; 173(1): 273–6.

Kalser MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985; 120(8): 899–903.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumor immunity. *Immunology* 2006; 119(2): 254–64.

Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahmoud T, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 1999; 230(6): 776–84.

Kuhlmann KF, de Castro SM, Wesseling JG, et al. Surgical treatment of pancreatic adenocarcinoma; actual survival and prognostic factors in 343 patients. *Eur J Cancer* 2004; 40(4): 549–58.

Leon J, Guerrero I, Pellicer A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 1987; 7(4): 1535–40.

Löhr M. Is it possible to survive pancreatic cancer? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 236–37.

Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 851–91.

Manabe T, Ohshio G, Baba N, et al. Radical pancreatectomy for ductal cell carcinoma of the head of the pancreas. *Cancer* 1989; 64(5): 1132–7.

Marchand M, Weynants P, Rankin E, et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; 63(6): 883–5.



McCutcheon M, Wehner N, Wensky A, et al. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1997; 210(2): 149–66.

Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 245–68.

Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, et al. Quantification of antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 1995; 181(1): 45–54.

Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, et al. Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 1981; 48(8): 1705–10.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3): 138–46.

Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G, et al. Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 221–5.

Neefjes JJ, Momburg F. Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(1): 27–34.

Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 358(9293): 1576–85.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(12): 1200–10.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4(3): 328–32.

Neuhaus P, Riess H, Post K, et al. Final results of the randomized, prospective, multicenter phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus observation in patients with resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: May 20suppl; abstrLBA4504

Nummer E, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, et al. Role of tumor endothelium in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory t cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1188–99

Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs. observation in patients undergoing curative-intent Resection of pancreatic cancer. *JAMA* 2007; 267–277

Obst R, Münz C, Stevanović S, Rammensee HG. Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 1998; 28(8): 2432–43.

Palmer KR, Kerr M, Knowles G, Cull A, Carter DC, Leonard RC. Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br J Surg* 1994; 81(6): 882–5.

Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 227–38.

Parham P, Brodsky FM. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol* 1981; 3(4): 277–99.

Pass HA, Schwarz SL, Wunderlich JR, Rosenberg SA. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J Sci Am* 1998; 4(5): 316–23.

Peace DJ, Chen W, Nelson H, Cheever MA. T cell recognition of transforming proteins encoded by mutated ras proto-oncogenes. *J Immunol* 1991; 146(6): 2059–65.

Peace DJ, Smith JW, Chan W, et al. Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. *J Exp Med* 1994; 179(2): 473–9.

Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 561–91.

Qin H, Chen W, Takahashi M. CD4<sup>+</sup> T-cell immunity to mutated ras protein in pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55(14): 2984–7.

Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1): 85–96.

Ramshaw I, Ruby J, Ramsay A, Ada G, Karupiah G. Expression of cytokines by recombinant vaccinia viruses: a model for studying cytokines in virus infections in vivo. *Immunol Rev* 1992; 127: 157–82.

Reay PA, Matsui K, Haase K, Wulfing C, Chien YH, Davis MM. Determination of the relationship between T cell responsiveness and the number of MHC-peptide complexes using specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 2000; 164(11): 5626–34.

Romano F, Caprotti R, Bravo AF, et al. Radical surgery does not recover immunodeficiency associated with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22(2): 179–83.

Romano F, Uggeri F, Crippa S, et al. Immunodeficiency in different histiotypes of radically operable gastrointestinal cancers. *J Exp Cancer Res* 2004; 23(2): 195–200.

Rommel C, Hafen E. Ras-a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8(4): 412–8.

Rosenberg SA. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res* 1991; 51(18 Suppl): 5074s–5079s.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998a; 4(3): 321–7.

Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, et al. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 1998b; 90(24): 1894–900.

Rosenberg SA, Yang CJ, Restifo NP. Cancer Immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat med* 2004; 10(9): 909–15.

Rothenberg ML, Moore MJ, Crippins MC, et al. A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol* 1996; 7(4): 347–53.

Rudd CE. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 1996; 4(6): 527–34.

Russo C, Pellegrino MA, Ferrone S. Analysis of the repertoire of anti-HLA antibodies with anti-idiotypes to a murine anti-HLA-A2,A28 monoclonal antibody. *Hum Immunol* 1984; 10(1): 57–67.

Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, Stauss HJ. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1998; 28(1): 193–200.

Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *Embo J* 1986; 5(5): 943–9.

Scheibenbogen C, Lee KH, Mayer S, et al. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997a; 3(2): 221–6.

Scheibenbogen C, Lee KH, Stevanović S, et al. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN $\gamma$ -ELISPOT assay. *Int J Cancer* 1997b; 71(6): 932–6.

Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, et al. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN $\gamma$ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods* 2000; 244(1–2): 81–9.

Schmittel A, Keilholz U, Scheibenbogen C. Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. *J Immunol Methods* 1997; 210(2): 167–74.

Schmetzer O, Moldenhauer G, Riesenberger R, Pires JR, Schlag P, Pezzutto A. Quality of recombinant protein determines the amount of autoreactivity detected against the tumor-associated epithelial cell adhesion molecule antigen: low frequency of antibodies against the natural protein. *J Immunol* 2005; 174: 942–52.

Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985–1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999; 189(1): 1–7.

Sharpe AH. Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(3): 389–95.

Shono Y, Tanimura H, Iwahashi M, et al. Specific T-cell immunity against Ki-ras peptides in patients with pancreatic and colorectal cancers. *Br J Cancer* 2003; 88(4): 530–6.

Singh G, Das SN, Khanna NN. Immune status in advanced upper gastrointestinal cancers. *J Surg Oncol* 1985; 29(1): 43–5.

Solcia E, Capella C. Tumors of the Pancreas. *Atlas of Tumor Pathology*. Washington DC, Armed Forces Institute 1997.

Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3): 447–52.

Srivastava PK. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol* 2000; 1: 363–6.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271–96.

Storniolo AM, Enas NH, Brown CA, Voi M, Rothenberg ML, Schilsky R. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1999; 85(6): 1261–8.

Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823–32.

Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, et al. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 1991; 146(3): 1077–82.

Tan HP, Smith J, Garberoglio CA. Pancreatic adenocarcinoma: an update. *J Am Coll Surg* 1996; 183(2): 164–84.

Trede M, Schwall G, Saeger HD. Survival after pancreatoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg* 1990; 211(4): 447–58.

Tsomides TJ, Aldovini A, Johnson RP, Walker BD, Young RA, Eisen HN. Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 1994; 180(4): 1283–93.

Van Elsas A, Nijman HW, van der Minne CE, et al. Induction and characterization of cytotoxic T-lymphocytes recognizing a mutated p21ras peptide presented by HLA-A\*0201. *Int J Cancer* 1995; 61(3): 389–96.

Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, et al. Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory t cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(9): 1252–8.

Waldmann TA. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Med* 2006 57: 65–81.

Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 1996; 183(1): 67–76.

Zier K, Gansbacher B, Salvadori S. Preventing abnormalities in signal transduction of T cells in cancer: the promise of cytokine gene therapy. *Immunol Today* 1996; 17(1): 39–45.

**Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



**Erklärung**

Ich, Achim Wiefelspütz, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Frequenzevaluation von Ras- und Influenza-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit Pankreaskarzinom“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift