

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
Medizinische Klinik III (Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin)  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Eckhard Thiel

Nachweis hoher Frequenzen zirkulierender Melanom-reaktiver  
CD8+ T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anne Letsch  
aus Bünde

Referent: PD Dr. C. Scheibenbogen

Koreferent: Prof. Dr. Dr. Ch. Geilen

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17.05.2002

## Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die für die Existenz spezifischer T-Zellen gegen TAAs bei Tumorpatienten sprechen. In den meisten Studien wurden die Tumor-reaktiven T-Zellen dabei aus Tumorgewebe oder dem peripheren Blut expandiert. Bisher ist noch wenig über ihre tatsächliche Funktion „in-vivo“ bekannt, unter anderem weil viele Analysen nach „in-vitro“-Stimulation durchgeführt wurden, die zu quantitativen und qualitativen Veränderungen der Tumor-reaktiven T-Zellen führen.

In dieser Arbeit gelang die Etablierung eines ELISPOT-Assays zum direkten „ex-vivo“-Nachweis tumorreaktiver T-Zellen. Dabei untersuchte ich zunächst die Eignung allogener, in bestimmten HLA-Merkmalen übereinstimmender Tumorzellen als Zielstrukturen im ELISPOT Assay, welche die Analyse eines breiten Antigenspektrums bieten. Um zu bestimmen, ob zirkulierende Tumor-reaktive T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar sind, wurden dann unstimulierte T-Zellen von Melanompatienten und von einem gesunden Normalkollektiv mittels IFN $\gamma$ -ELISPOT-Assays auf die Erkennung von HLA-A2 oder A1-identen Melanomzelllinien getestet.

Die Untersuchung des gesunden Normalkollektives ergab keine oder nur eine niederfrequente T-Zell-Antwort gegen die allogenen HLA-A1- bzw. HLA-A2-identen Tumorzelllinien. Elf von 19 Patienten mit metastasiertem Melanom zeigten eine T-Zell-Antwort mit Frequenzen von 0,04% bis 0,81% der PBMCs, die IFN $\gamma$  nach Kontakt mit verschiedenen HLA-A2 oder A1-identen Melanomzelllinien freisetzten. Diese T-Zell-Antworten wurden von CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt und konnten bei HLA-A2<sup>+</sup> Patienten durch einen anti-HLA-A2-Antikörper spezifisch blockiert werden. Zur näheren Charakterisierung wurden bei einem Patienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in (CD8<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>)- und (CD8<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>)-Subpopulationen aufgetrennt und im ELISPOT-Assay getestet. Tumor-reaktive T-Zellen konnten sowohl im CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zell- (CD45RA<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) als auch im CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zell-Kompartiment (CD45RO<sup>+</sup>/ IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) nachgewiesen werden. Zudem waren diese Tumor-reaktiven T-Zellen zur Granzyme-B-Freisetzung in der Lage, als Hinweis darauf, dass sie „in-vivo“ direkte zytotoxische Funktion ausüben können.

Bei drei von fünf Patienten, bei denen zusätzlich autologe Tumorzellen zur Verfügung standen, konnten ähnliche T-Zell-Frequenzen wie gegen die allogenen HLA-A1 oder A2-identen auch gegen die autologen Tumorzelllinien beobachtet werden. Zwei dieser Patienten zeigten allerdings nur eine Antwort entweder gegen die autologe oder gegen die allogenen Tumorzelllinien. Dies kann als Hinweis auf die Erkennung privater Antigene bzw. auf das Vorliegen von Tumor-Escape-Mechanismen gewertet werden. Auch wenn der Vergleich von autologen und allogenen Tumorzelllinien keine 100% Übereinstimmung ergab, bestätigten diese Ergebnisse die grundsätzliche Eignung des ELISPOT-Assays mit allogenen Melanomzelllinien als Zielstrukturen.

Insgesamt gelang in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von Tumor-reaktiven CD8+ T-Zellen bei mehr als der Hälfte der untersuchten Melanompatienten. Dabei sind die Tumor-reaktiven T-Zellen womöglich z.T. gegen bisher nicht definierte Antigene gerichtet. Einige der Patienten, bei denen Tumor-reaktive T-Zellen nachgewiesen wurden, zeigten klinische Hinweise für eine möglicherweise immunologisch-vermittelte Tumor-Kontrolle. Andererseits hatten viele Patienten progredient wachsende Tumoren, denen Tumor-Escape-Mechanismen zugrunde liegen könnten.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	1
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Immunantwort gegen Tumoren	3
1.2 Immuntherapie von Tumoren	3
1.3 Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen	5
1.4 Aktivierung und Effektorfunktion von T-Zellen	5
1.5 Tumorantigene	9
1.6 Nachweismethoden	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2 Material und Methoden</b>	
2.1 Material	
2.1.1 Patienten und Kontrollgruppe	16
2.1.2 Tumorzelllinien	16
2.1.3 Kulturmedium	16
2.1.4 Phosphatpuffer	17
2.1.5 Dichtegradient	17
2.1.6 Enzym-Mix	17
2.1.7 FACS-Antikörper	17
2.1.8 Peptide und Antikörper für den ELISPOT	18
2.2 Methoden	
2.2.1 Gewinnung von MNCs aus Heparin-Vollblut	18
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	18
2.2.3 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen	19
2.2.4 Separation von Tumorzellen aus Tumor-/Metastasengewebe	20

2.2.5	Kultur der Tumorzelllinien	20
2.2.6	Durchflusszytometrie	20
2.2.7	ELISPOT-Assay	21
2.3	Statistische Analysen	23

### **3 Ergebnisse**

3.1	HLA-Typisierung von gesunden Kontrollpersonen, Melanompatienten sowie Melanomzelllinien mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie	24
3.2	Analyse von Oberflächenrezeptoren auf Tumorzellen mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie	24
3.3	Analyse der Antigen-präsentierenden Fähigkeiten von HLA-A2+ Tumorzelllinien im ELISPOT-Assay	25
3.4	T-Zellantwort HLA-A1+ und HLA-A2+ gesunder Kontrollpersonen gegen allogene Tumorzelllinien	27
3.5	T-Zellantwort von Melanompatienten gegen allogene Tumorzelllinien	27
3.6	T-Zellantwort gegen allogene Melanomzelllinien bei verkürztem Antigen-Kontakt	30
3.7	Subpopulations-Analysen Tumor-reaktiver T-Zellen	31
3.8	Blockierungsexperimente von Tumor-reaktiven T-Zellen bei zwei HLA-A2 Melanompatienten	33
3.9	Analyse der Granzyme-Freisetzung Tumor-reaktiver T-Zellen	34
3.10	T-Zellantwort von Melanompatienten gegen autologe Tumorzelllinien im Vergleich mit allogenen Tumorzelllinien	35
3.11	Klinischer Verlauf von Melanompatienten mit Tumor-reaktiven T-Zellen	37

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Nachweismethoden Tumor-reaktiver T-Zellen	39
4.2	Tumor-reaktive T-Zellen bei Melanompatienten	40
4.3	Phänotyp und Funktionsstatus Tumor-reaktiver T-Zellen	41
4.4	Zusammenhang zwischen dem Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen und dem klinischen Verlauf bei Melanompatienten	43
4.5	Antigen-Repertoire beim Melanom	45
4.6	Schlussfolgerung	46
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	47
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	49
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	69
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	71

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AICD	Activation induced cell death
APC	Antigen präsentierende Zellen
AS	Aminosäuren
BCG	Bacille Calmette Guerin
CEA	Carcino-Embryonales-Antigen
CD	Cluster of differentiation
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated-molecule-4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed type hypersensitivity
ELISPOT	Enzyme-linked-Immunospot
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
FACS	Fluorescens associated cell sorter
GAM	Goat anti Mouse
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen- Colonie-stimulierender-Faktor
gp	Glykoprotein
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KLH	Keyhole limpet hemocyanine
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LDA	Limiting Dilution Assay
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
MAGE	Melanoma Antigen
mAk	Monoklonaler Antikörper
M-CSF	Makrophagen- Colonie-stimulierender-Faktor

MHC	Major histocompatibility complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Mitochondrale Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PWM	Pokeweed Mitogen
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
SD	Standardabweichung
SEREX	Serological screening of cDNA expression libraries
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
V $\beta$	Variable Region der $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
Verd	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumen

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. Eckhard Thiel als Direktor der Medizinischen Klinik III sei für die guten Forschungsbedingungen gedankt, die diese Arbeit ermöglichten.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. Carmen Scheibenbogen, die mir das Thema dieser Arbeit überließ und mich mit außergewöhnlichem Engagement, steter Diskussionsbereitschaft und vielen unentbehrlichen Hilfestellungen hervorragend betreute und mich sehr förderte. Daneben danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz für viele wertvolle Anregungen und seine umfangreiche Unterstützung, auch über die Erstellung dieser Arbeit hinaus.

Bei Frau Sandra Bauer möchte ich mich für viele unentbehrliche praktische Tipps und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente und für zahllose Kleinigkeiten bedanken, die zu der netten Arbeitsatmosphäre im Labor führten.

Herrn Dr. med. Alexander Schmittel danke ich für die gute Einarbeitung, für viele wertvolle Hinweise und seine stets gut gelaunte Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Daneben danke ich Ulrike Kuhne und Annemarie Asemissen für die ausgesprochen gute und freundschaftliche Zusammenarbeit mit vielen Aufmunterungen, nützlichen Anregungen und Gesprächen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf am DKFZ Mannheim für die freundliche Überlassung von Patientenmaterial.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für Ihre Geduld und Nachsicht während der Entstehung dieser Arbeit bedanken und besonders bei Juliane Bolbrinker für Ihre hilfreichen Korrekturen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

An letzter und besonderer Stelle danke ich meinen Eltern für Ihre unermüdliche, großzügige und liebevolle Unterstützung, die mir viel Motivation und Rückhalt gab.

## LEBENS LAUF

Name : Anne Letsch  
Geburtsdatum: 11.11.1974  
Geburtsort: Bünde  
Familienstand: ledig  
Eltern: Hartwig Letsch  
Renate Letsch, geb.Lübchemeier

### **Schulbildung :**

07/1981-06/1985 Grundschole Bünde-Ennigloh  
08/1985-06/1994 Freiherr-vom-Stein Gymnasium Bünde  
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulbildung:**

10/1994-09/1997 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts Universität Kiel  
08/1996 Ärztliche Vorprüfung  
08/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/1997- 05/2001 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin  
04/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2000-03/2001 Praktisches Jahr  
Radiologie: Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin  
Kantonsspital St.Gallen, Schweiz  
Chirurgie: St.Luke's Hospital, Malta  
Innere: Onkologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin  
05/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufserfahrung :**

10/1994-12/1996 Pflegedienst im Lukas-Krankenhaus in Bünde und im Städtischen Klinikum Kiel

- 04/1997-06/2001 Pflagedienst im Bereich der operativen Intensivstationen des Universitätsklinikums Kiel und des Krankenhaus Neukölln in Berlin
- 10/1995-07/1997 Tutorin im POL-Projekt der Anatomie und Biochemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 08/1998-03/2001 Tutorin in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin der Freien Universität Berlin
- 05/1998 Beginn der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Scheibenbogen und Herrn Prof. Dr. U. Keilholz in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin der Freien Universität Berlin
- 01/1999-07/1999 Forschungstätigkeiten als studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Scheibenbogen/ Herrn Prof. Dr. U. Keilholz
- seit 07/2001 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin der Freien Universität Berlin

### **Veröffentlichungen:**

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Nagorsen D, Schmittel A, Thiel E und Scheibenbogen C: High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+T cells in patients with advanced melanoma, Int J Cancer. 2000;87(5):659-664

Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, Berger G, Buhr HJ, Thiel E, und Scheibenbogen C: Natural T cell response against EPCAM, her-2/neu and CEA in patients with advanced melanoma, Cancer Res. 2000;2:275-281

Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Letsch A, Schmittel A, Thiel E und Scheibenbogen C: Flow cytometry determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the quantification of antigen reactive T cells, J Immunol Meth. 2001;251(1-2):101-108