

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

IMMUNTHERAPIE MIT IDIOTYP-SPEZIFISCHEN
T-ZELLEN BEIM MANTELZELLYMPHOM:
AKTIVIERUNG AUTOLOGER UND ALLOGENER
LYMPHOZYTEN IN VITRO

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

vorgelegt von
IMKE KOCKLÄUNER
aus Hannover

Kiel 2012

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2013

gez. Prof. Dr. Hartmann, Klinik für Innere Med. II, Onkologie

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung.....	1
	1. Aktuelle Therapie und Prognose des Mantelzelllymphoms	1
	2. Immuntherapie bei malignen Lymphomen	2
	2.1. Idiotyp-Vakzinierung	3
	2.2. Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen	4
	2.3. Zelluläre Immuntherapie	5
	3. Fragestellung und Zielsetzung	6
II.	Material und Methoden.....	7
	1. Gesunde Spender und Patienten	7
	2. Gewinnung von T-Zellen und DC	7
	2.1. Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation	7
	2.2. Bestimmung der Zellzahl	9
	2.3. Isolierung von T-Zellen und Monozyten sowie deren Differenzierung zu DC	9
	2.4. Kryokonservierung der Zellen	9
	3. Synthese der Idiotypeptide	10
	4. Beladung und Ausreifung der DC	10
	4.1. Ausreifung der DC mit Zytokincocktail	11
	4.2. Ausreifung der DC mit TLR7/8- und sCD40-Liganden	11
	4.3. Prinzip der Durchflusszytometrie	11
	4.4. Kontrolle der Ausreifung der DC	11
	5. Magnetische T-Zell-Separation	12
	5.1. Depletion regulatorischer T-Zellen	13
	5.2. Selektion CD3 ⁺ Zellen	14
	5.3. Kontrolle der magnetischen Separation	14
	6. Aktivierung der T-Zellen	15
	6.1. Positiv- und Negativkontrollen	15
	6.2. Vorbereitung der T-Zellen für die Durchflusszytometrie	17
	6.3. Messung der T-Zell-Aktivierung	17

	Seite
III. Ergebnisse.....	19
1. Herstellung der Idiotyppeptide	19
2. Kontrollen	21
2.1. Ausreifung der DC	21
2.2. Selektion CD3 ⁺ Zellen	21
2.3. Depletion regulatorischer T-Zellen	22
2. Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen bei gesunden Spendern	24
3. Aktivierung allogener Idiotyp-spezifischer T-Zellen	26
4. Aktivierung autologer Idiotyp-spezifischer T-Zellen	28
IV. Diskussion.....	30
1. CMV-spezifische T-Zell-Aktivierung	30
1.1. T-Zell-Aktivierung mit dem CMV-pp65-Peptidmix	30
1.2. T-Zell-Aktivierung mit dem CMV-pp65-Protein	31
2. Aktivierung autologer lymphomspezifischer T-Zellen	32
3. Aktivierung allogener lymphomspezifischer T-Zellen	34
4. Vor- und Nachteile der Verwendung von Idiotyppeptiden zur T-Zell-Stimulation	37
V. Zusammenfassung.....	40
VI. Literaturverzeichnis.....	41
VII. Danksagungen.....	49
VIII. Lebenslauf.....	50

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC (-H7)	Allophycocyanin (H7)
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity determining region
CHOP	Chemotherapie aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	dendritische Zelle
Dexa-BEAM	Chemotherapie aus Dexamethason, BCNU, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
DHAP	Chemotherapie aus Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Follikuläres Lymphom
FSC	Forwardscatter
g	Gravitation

GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor
GvHD	Graft versus Host Disease
h	Stunde
HLA	Human leukocyte antigen
IE	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
KLH	Keyhole-Limpet-Hämocyanin
LMP	latent membrane protein
M	molar
MCL	Mantelzelllymphom
MHC	Major histocompatibility complex
Min.	Minute
MRD	Minimal residual disease
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und Cyanin 5.5
PGE	Prostaglandin E
pp65	Phosphoprotein 65
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorder
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SCT	Stammzelltransplantation
SEA	Staphylokokken-Enterotoxin A
SSC	Sidescatter
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle

I. Einleitung

1. Aktuelle Therapie und Prognose des Mantelzelllymphoms

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist eine B-Zell-Neoplasie und zählt zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Es macht etwa 8 % aller malignen Lymphome aus (1) und betrifft vorwiegend Männer mit einem Altersgipfel von 65 Jahren (2). Trotz aggressiver Behandlung durch Chemotherapie und autologe Stammzelltransplantation (SCT) ist die Prognose des MCL schlecht. Heilung ist zwar in frühen Stadien durch Chemo- und Strahlentherapie möglich (2), doch ist die Erkrankung bei Diagnosestellung in der Regel fortgeschritten (1). Unter diesen Umständen beträgt die mittlere Überlebenszeit trotz aggressiver Therapie nur drei bis vier Jahre (1).

Eine Untersuchung der Deutschen Studiengruppe für niedrigmaligne Lymphome von 2005 (3) zeigte, dass die Kombination des CHOP-Protokolls (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) mit dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab bei MCL-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung die Ansprechraten auf die Chemotherapie von 75 % auf 94 % erhöhen und die Rate der kompletten Remissionen von 7 % auf 34 % steigern konnte. Allerdings hatte der zusätzliche Einsatz von Rituximab weder Einfluss auf das progressionsfreie Überleben noch auf das Gesamtüberleben. Dagegen kann eine autologe SCT, die sich an die initiale Chemotherapie anschließt, das progressionsfreie Überleben deutlich verlängern. Dies zeigte eine randomisierte Studie des Europäischen MCL-Netzwerks von 2005 (4), bei der MCL-Patienten in partieller oder kompletter Remission als Erhaltungstherapie entweder eine myeloablative Radiochemotherapie mit anschließender autologer SCT bekamen oder mit Interferon (IFN) α behandelt wurden. Das progressionsfreie Überleben der Patienten, die sich einer autologen SCT unterzogen hatten, betrug durchschnittlich 39 Monate und war damit der IFN α -Therapie (17 Monate) deutlich überlegen. Die 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate unterschied sich mit 83 % nach autologer SCT gegenüber 77 % unter IFN α -Therapie jedoch kaum. Ganti et al. (5) konnten 2005 durch einen Vergleich zwischen autologer und allogener SCT bei MCL-Patienten zeigen, dass durch allogene SCT die Rezidivrate gesenkt werden kann: Nach 5 Jahren hatten 56 % der autolog Transplantierten, aber nur 21 % der allogenen transplantierten Patienten ein Rezidiv erlitten. Dies führten die Wissenschaftler vor allem auf den „Graft-versus-Lymphoma“ Effekt bei allogener SCT und eine mögliche Verunreinigung des Transplantats mit Lymphomzellen bei autologer SCT zurück. Die beiden Therapien unterschieden sich jedoch kaum in Hinblick auf das Gesamtüberleben und die allogene SCT war im Gegensatz zur autologen SCT mit einer

höheren behandlungsbedingten Mortalität verbunden. Da die allogene SCT das Risiko der potenziell tödlichen „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) birgt, wird sie nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (2) erst im Falle eines Rezidivs angewandt.

Das Grundproblem bei der Behandlung des MCL besteht in der Therapie der minimalen Resterkrankung (MRD). Zwar gibt es zahlreiche Therapien, durch die die Tumorzellen im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium reduziert werden können, doch außer der allogenen SCT besteht keine Möglichkeit, sie komplett zu eliminieren (6). Da die allogene SCT mit dem Risiko der GvHD verbunden ist und außerdem nicht für jeden MCL-Patienten ein passender Spender zur Verfügung steht, ist die Suche nach alternativen Therapien der MRD unverzichtbar.

2. Immuntherapie bei malignen Lymphomen

Ein Ansatz zur Bekämpfung der MRD könnte die spezifische Immuntherapie sein. Dabei wird das Immunsystem gegen tumorassoziierte Antigene aktiviert, wodurch letzte Tumorzellen zerstört werden sollen. Eine solche Immunreaktion findet in vivo nicht effektiv statt, da Tumorzellen zahlreiche Strategien entwickeln, durch die sie sich der Immunabwehr entziehen. Beispiele hierfür sind die geringe Immunogenität der Tumorzellen etwa durch das Fehlen spezifischer MHC-gebundener Peptide oder kostimulatorischer Moleküle (7) und die tumorinduzierte Immunsuppression durch Aktivierung regulatorischer T-Zellen (7). Ziel der tumorspezifischen Immuntherapie ist es, das Immunsystem trotz dieser Mechanismen auf den Tumor aufmerksam zu machen. Dazu ist das Vorhandensein von charakteristischen Markern nötig, die möglichst nur auf Tumorzellen, nicht aber in gesundem Gewebe vorkommen. Als solche tumorspezifischen Antigene können beispielsweise mutierte Tumorsuppressorgene und Onkogene, stark überexprimierte oder onkovirale Proteine dienen (7). B-Zell-Lymphome wie das MCL besitzen eine besondere Struktur, die als tumorspezifisches Antigen genutzt werden kann: Den Idiotyp, der dem variablen Teil des B-Zell-Rezeptors entspricht (8). Der B-Zell-Rezeptor, ein membrangebundenes Immunglobulin-Molekül (Ig), besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne, die der Antigenbindung dient (8). Der variable Teil des Rezeptors entsteht während der Entwicklung der B-Zelle durch Rekombination verschiedener V-, D- und J-Gensegmente, wodurch eine enorme Vielfalt an B-Zell-Rezeptoren möglich ist. Aus diesem Grund ist der Idiotyp das individuelle Erkennungsmerkmal einer jeden B-Zelle. Da alle Lymphomzellen eines Patienten Klone einer maligne transformierten B-Zelle sind, tragen sie alle den gleichen Rezeptor und somit den

gleichen Idiotyp auf ihrer Oberfläche (8). Dieser ist somit ein ideales Ziel für die Immuntherapie von Lymphomen.

2.1. Idiotyp-Vakzinierung

Es gibt verschiedene Ansätze, das Immunsystem gegen den individuellen Idiotyp des Lymphoms zu aktivieren. Einer davon ist die Idiotyp-Vakzinierung, bei der Lymphompatienten mit einem Impfstoff behandelt werden, der ihre individuellen Idiotypproteine enthält. Um die Immunogenität der Idiotypproteine zu erhöhen, werden sie an den immunogenen Träger Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) gekoppelt und zusammen mit Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) als Adjuvans verabreicht (8). Zahlreiche Phase-I/II-Studien zur Idiotyp-Vakzinierung von Patienten mit MCL oder follikulärem Lymphom (FL) zeigten positive Ergebnisse (8). Die erste Studie, die auch den klinischen Nutzen der Idiotyp-Vakzinierung im Sinne eines verlängerten krankheitsfreien Überlebens zeigt, stammt von Inogès et al. (9) und wurde 2006 veröffentlicht. FL-Patienten, die nach Behandlung ihres ersten Rezidivs erneut eine komplette Remission erreicht hatten, erhielten über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren regelmäßig Idiotyp-Vakzinierungen. 80 % der geimpften Patienten zeigten Idiotyp-spezifische Immunreaktionen und blieben während der Impfphase in Remission. Diese zweite Remission hielt bei allen Patienten mit positiver Reaktion auf die Impfung und ausreichend langer Beobachtungszeit deutlich länger an als die vorherige und währte zudem länger als man aufgrund des vorangegangenen Chemotherapie-Regimes erwartet hätte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Idiotyp-Vakzinierung einen positiven Einfluss auf die Dauer der Remission haben kann. Eine Studie von Neelapu et al. (10) mit MCL-Patienten, die nach Behandlung mit einer rituximabhaltigen Chemotherapie Idiotyp-Vakzine erhielten, zeigte, dass selbst in Abwesenheit von B-Zellen zelluläre Idiotyp-spezifische Immunreaktionen möglich sind. Humorale Immunreaktionen stellten sich mit dem Wiederanstieg der B-Zellen ebenfalls ein. Somit könnten Patienten von der Idiotyp-Vakzinierung profitieren, die zuvor standardmäßig mit einer kombinierten Immunchemotherapie behandelt wurden.

Um die positiven Ergebnisse zahlreicher kleiner Studien an einem großen Patientenkollektiv zu verifizieren, wurden drei randomisierte, placebokontrollierte Phase-III-Studien durchgeführt (11,12,13), deren Ergebnisse 2008 bzw. 2009 veröffentlicht wurden. In allen drei Studien wurden FL-Patienten nach Chemo- und/oder Rituximabtherapie mit Idiotyp-Vakzinen oder einem Placebo behandelt und der primäre Endpunkt war jeweils das progressionsfreie Überleben (8). Alle Studien zeigten eine gute Verträglichkeit des

Impfstoffs, doch nur eine konnte eine statistisch signifikante Verlängerung der Remission durch Idiotyp-Vakzinierung nachweisen (12). Da jedoch auch in dieser Studie das für die reguläre Zulassung nötige Signifikanzniveau von $p < 0,01$ nicht erreicht wurde (14), bleibt die Idiotyp-Vakzinierung zunächst weiterhin Studienpatienten vorbehalten.

2.2. Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen

Eine andere Form der Immuntherapie ist die Vakzinierung mit autologen dendritischen Zellen (DC), die auf ihrer Oberfläche tumorspezifische Antigene präsentieren. DC zählen zu den wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APC) im menschlichen Körper und sind in der Lage, aufgenommene Antigene sowohl über MHC-II- als auch über MHC-I-Moleküle zu präsentieren (7). Dadurch können sie $CD4^+$ wie auch $CD8^+$ T-Zellen aktivieren und spielen eine wichtige Rolle in der Induktion zellulärer und humoraler Immunreaktionen (7). Die erste klinische Studie, bei der Idiotyp-beladene DC erfolgreich als Tumorstoff in Lymphompatienten eingesetzt wurden, stammt von Hsu et al. (15) und wurde 1996 publiziert. Von vier FL-Patienten, die nach Chemotherapie messbare Tumorresiduen hatten, zeigten drei nach drei- bis viermaliger Vakzinierung mit Idiotypprotein-beladenen DC einen Rückgang des Lymphoms. Ein Patient erreichte sogar eine komplette Remission. Nach diesem Erfolg schloss sich eine größere Studie mit insgesamt 35 FL-Patienten an, die auch die Daten der ersten vier Patienten beinhaltet (16). Insgesamt 65 % der Patienten zeigten Idiotypspezifische Immunreaktionen und bei 36 % der Patienten, die vor der Vakzinierung nicht tumorfrei waren, stellte sich klinischer Erfolg ein. Außerdem wurden sechs Patienten, die nach der DC-Impfung keine komplette Remission erreicht hatten, mit Idiotypprotein-KLH-gekoppelten Boosterimpfungen behandelt. Die Hälfte dieser Patienten zeigte sowohl Idiotypspezifische Immunreaktionen als auch einen Rückgang der Tumorzellen: Zwei von ihnen erreichten eine komplette, einer eine partielle Remission. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Wirksamkeit der DC-Vakzine, zum anderen zeigen sie eine möglicherweise gesteigerte Effektivität der Immuntherapie durch die Kombination verschiedener Verfahren. Ein anderer Weg, die DC-Vakzine effektiver zu gestalten, könnte ein breiteres Spektrum tumorspezifischer Antigene sein. 2009 publizierten Di Nicola et al. (17) die Ergebnisse einer Pilotstudie, in der 18 NHL-Patienten, die ein Rezidiv erlitten hatten, mit einer solchen DC-Vakzine behandelt wurden. Um tumorspezifische Antigene aufzunehmen, wurden DC 48 h lang mit autologen Tumorzellen, die durch Hitze und Bestrahlung abgetötet worden waren, inkubiert und anschließend den Patienten als Impfstoff verabreicht. Nach insgesamt vier Impfungen zeigte ein Drittel der Patienten einen Tumorrückgang, darunter drei komplette

Remissionen. Trotz des erweiterten Antigenspektrums traten keine Autoimmunreaktionen auf und in keiner der oben beschriebenen Studien kam es zu relevanten Nebenwirkungen oder Unverträglichkeiten im Zusammenhang mit den Impfungen.

2.3. Zelluläre Immuntherapie

Eine weitere Möglichkeit der Immuntherapie bei Lymphomen bietet der adoptive T-Zell-Transfer. Dieser Methode liegt die Beobachtung eines „Graft-versus-Lymphoma“ Effekts nach allogener SCT oder Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) zugrunde (18). Neben der Möglichkeit der dauerhaften Heilung bergen diese Therapien jedoch die Gefahr der GvHD, wodurch ihre klinische Anwendbarkeit eingeschränkt wird.

Spezifische Ansätze der adoptiven T-Zell-Therapie gibt es in der Prophylaxe und Behandlung von Epstein-Barr-Virus- (EBV-) assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantationen (PTLD). Diese treten sowohl nach allogener SCT als auch bei Empfängern von soliden Organen im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Therapie nach der Transplantation auf. Trotz der Expression stark immunogener EBV-Antigene kann die PTLD im immunsupprimierten Patienten nicht bekämpft werden. Der Transfer EBV-spezifischer Donor-T-Zellen dagegen zeigt sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie der PTLD bei Patienten nach allogener SCT vielversprechende Ergebnisse. In einer großen Studie zur Langzeiteffektivität und Sicherheit dieses Verfahrens bei Empfängern allogener SCT zeigten Heslop et al. (19) 2010 eine hundertprozentige Wirksamkeit der prophylaktischen Therapie und eine über achtzigprozentige bei therapeutischem Einsatz nach einer mittleren Beobachtungszeit von zehn Jahren. Alle 101 prophylaktisch behandelten Patienten blieben PTLD-frei und unter den 13 therapeutisch behandelten Patienten erreichten 11 eine komplette Remission. Es zeigten sich weder langfristige Nebenwirkungen noch neue Fälle von GvHD und nur wenige Reaktivierungen vorbestehender GvHD.

Auch Lymphome, die in immunkompetenten Individuen auftreten, können EBV-assoziiert sein, insbesondere Hodgkin- und Burkitt-Lymphome. Im Gegensatz zur PTLD tragen diese EBV⁺ Lymphomzellen nur schwach immunogene Virusantigene, wie die Membranproteine LMP-1 und -2 (LMP = latent membrane protein) (20). Dies erschwert die Immuntherapie, bietet aber nichtsdestotrotz die Möglichkeit der spezifischen T-Zell-Therapie. Bollard et al. (20) veröffentlichten 2004 die Ergebnisse einer Studie, bei der 14 Patienten mit EBV⁺ Hodgkin-Lymphom autologe, EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) infundiert wurden, darunter elf Patienten mit messbarer Tumorlast. Von diesen Patienten erreichten zwei komplette Remissionen, einer eine partielle und fünf Patienten einen stabilen

Krankheitszustand. Keiner der drei Patienten, die sich zum Zeitpunkt der CTL-Gabe in Remission befanden, erlitt während des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv. Außerdem konnte eine Expansion der EBV-spezifischen CTL im Blut der Patienten sowie eine Tumordinfiltration dieser Zellen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von gentechnisch veränderten LMP-2-präsentierenden DC zur T-Zell-Stimulation in vitro konnten Bollard et al. (21) den therapeutischen Erfolg noch deutlich verbessern. In beiden Studien traten außer grippeähnlichen Symptomen nach der T-Zell-Infusion keine Nebenwirkungen oder Toxizitäten auf.

Diese Studien zeigen, dass es möglich ist, T-Zellen in vitro gegen schwach immunogene Tumorantigene zu aktivieren. Die Transfusion dieser T-Zellen scheint gefahrlos durchführbar zu sein und kann einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf und die Remissionsdauer haben. Da EBV-spezifische Antigene nur bei einigen Lymphomentitäten vorkommen, stellt der Transfer EBV-spezifischer T-Zellen keine Therapieoption für alle Lymphome dar. Der Idiotyp dagegen ist eine tumorspezifische Struktur, die auf Lymphomzellen aller Entitäten vorkommt. Daher könnte die Entwicklung eines Protokolls zur Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen ex vivo ein großer Schritt zum breiten Einsatz der tumorspezifischen T-Zell-Therapie bei Lymphomen sein.

3. Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aktivierung lymphomspezifischer CD8⁺ T-Zellen bei gesunden Probanden und MCL-Patienten durch Stimulation mit Idiotyppeptid-beladenen DC in vitro.

Um das Versuchsprotokoll zu etablieren, wurde zunächst die Aktivierung Zytomegalievirus-(CMV-) spezifischer T-Zellen mithilfe von Buffy Coats gesunder CMV⁺ Spender geprüft. Darauf aufbauend wurde die Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen bei drei gesunden Spendern und sechs MCL-Patienten in vitro getestet.

Diese Arbeit könnte zur Entwicklung einer Idiotyp-spezifischen T-Zell-Therapie bei Lymphomen und zur Weiterentwicklung der Immuntherapie beitragen.

II. Material und Methoden

1. Gesunde Spender und Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Buffy Coats von CMV⁺ Spendern oder von Spendern des HLA-Typs A*02 untersucht (Tab. 1). Ebenso wurden PBMC (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut) von sechs Patienten mit MCL untersucht (Tab. 2). Bei den Patienten 1 und 2 erfolgten die Blutentnahmen unmittelbar nach der Stammzellapherese für die autologe SCT. Die Patientin 3 erlitt wenige Monate vor den Blutentnahmen ein Rezidiv im Bereich der Nasennebenhöhlen, das nach erfolgloser Chemotherapie lokal bestrahlt wurde. Die Patienten 4-6 befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahmen bereits seit über einem Jahr in kompletter Remission.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Buffy Coats.

Spender	A	B	C	D	E	F	G
HLA-Typ	unbekannt	unbekannt	A*02	A*02	A*02	A*02	A*02
CMV-Status	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv

CMV = Zytomegalievirus

2. Gewinnung von T-Zellen und DC

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank *Microflow, Modell 51424/5* (Nunc) und mithilfe steriler Materialien und Reagenzien durchgeführt.

2.1. Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

PBMC wurden aus Buffy Coats oder heparinisiertem Vollblut gewonnen. Buffy Coats wurden im Verhältnis 1:3, Vollblut im Verhältnis 1:1 mit PBS (phosphate buffered saline, *PBS Dulbecco's*, Biochrom AG) in 50-ml-Röhrchen (Sarstedt) verdünnt. Dann wurden 25 ml dieses Gemisches mithilfe des *Pipetus®-Standard* (Hirschmann) und serologischer Pipetten (Sarstedt) vorsichtig über 20 ml Ficoll-Hypaque (*Biocoll*, Biochrom AG) geschichtet und bei 700 g für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert (*Labofuge 400*, Heraeus Instruments). Nach der Zentrifugation wurden die PBMC, die sich als weiße Schicht auf dem Ficoll-Hypaque darstellten, mit Transferpipetten (Sarstedt) abpipettiert und so oft mit PBS gewaschen, bis der Überstand nach fünfminütiger Zentrifugation bei 500 g klar war. Dadurch wurden Thrombozyten und Reste des Ficoll-Hypaque entfernt. Dann wurden die PBMC in 5-10 ml

CellGro®DC (CellGenix™) resuspendiert und ein kleiner Teil wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Tab. 2: Übersicht über die MCL-Patienten.

Patient (Geschlecht, Alter)	HLA-Typ	Initial- stadium	ED	Therapie und Outcome
1 (m, 66)	A*02, *32 B*27, *44 C*01, *05	IVAE	07/09	08-12/09: 6 x R-CHOP → <u>PR</u> 01-02/10: SC-Mob. mit Dexa-BEAM
2 (m, 48)	A*02 B*18, *44 C*05, *07	IV	07/09	07-11/09: alternierend 3 x R-CHOP und 3 x R-DHAP → <u>PR</u> 11/09: SC-Mob. nach 3. R-DHAP-Zyklus
3 (w, 61)	A*02 B*27, *35 C*02, *04	IVA	12/03	02-05/04: 6 x R-CHOP → <u>CR</u> 07-09/04: SC-Mob. mit Dexa-BEAM, myeloabl. Kond. durch HD-Cyclo- phosphamid u. TBI, autologe PBSCT 10/08: lokales Rezidiv im Bereich der NNH 10-12/08: 3 x R-DHAP → <u>Status idem</u> 01-02/09: lokale Radiatio NNH (46 Gy gesamt)
4 (m, 67)	A*03, *68 B*14, *15 C*03, *08	IVB	07/06	07-11/06: 6 x R-CHOP 12/06: SC-Mob. mit Dexa-BEAM 02/07: myeloabl. Kond. durch HD- Cyclophosphamid und TBI, autologe PBSCT → <u>CR</u>
5 (m, 59)	A*02 B*37, *44 C*05, *06	IVB	02/05	03-06/05: 6 x R-CHOP 09/05: SC-Mob. mit Dexa-BEAM 11/05: myeloabl. Kond. durch HD- Cyclophosphamid und TBI, autologe PBSCT → <u>CR</u>
6 (m, 68)	A*11, *68 B*27, *40 C*02, *03	IVB	10/06	11/06-03/07: 6 x R-CHOP 03/07: SC-Mob. mit Dexa-BEAM 05/07: myeloabl. Kond. durch HD- Cyclophosphamid und TBI, autologe PBSCT → <u>CR</u>

MCL = Mantelzelllymphom, ED = Erstdiagnose, m = männlich, w = weiblich, R-CHOP = Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison, SC-Mob. = Stammzellmobilisation, Dexa-BEAM = Dexamethason + BCNU + Etoposid + Cytarabin + Melphalan, R-DHAP = Rituximab + Dexamethason + Cytarabin + Cisplatin, myeloabl. Kond. = myeloablative Konditionierung, HD = Hochdosis, TBI = total body irradiation, PBSCT = periphere Blutstammzelltransplantation, NNH = Nasennebenhöhlen, Gy = Gray, PR = partielle Remission, CR = komplette Remission

2.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer *Neubauer Zählkammer* bestimmt. Dazu wurden die in Medium gelösten Zellen zunächst gut durchmischt (*Vortex Genie 2™*, Scientific Industries), um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Flüssigkeit zu gewährleisten. Dann wurden mithilfe von Mikropipetten (Eppendorf Reference) 10 µl der Zelllösung mit 10-990 µl Trypanblau (0,5 % (w/v) in physiological saline, Biochrom AG) vermischt, so dass sich Verdünnungen zwischen 1:2 und 1:100 ergaben. Nachdem das Trypanblau-Zell-Gemisch wiederum gut durchmischt wurde, wurden 10 µl davon in die Zählkammer gefüllt und unter dem Mikroskop (Olympus) alle vier Quadranten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{400} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Menge Medium (in ml)} = Y \times 10^6 \text{ Zellen}$$

2.3. Isolierung von T-Zellen und Monozyten sowie deren Differenzierung zu DC

Die Isolierung der Monozyten aus den PBMC erfolgte durch Plastikadhärenz. Dazu wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen und anschließend gewaschenen PBMC, gelöst in 10 ml *CellGro®DC*, in eine Gewebekulturflasche mit 75 cm² Wachstumsbereich (Sarstedt) gegeben und für 2 h im Brutschrank (*Hera Cell*, Heraeus Instruments) bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Kulturflasche dreimal mit PBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Die nicht adhärenenten Zellen enthielten neben B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) die T-Zellen. Anschließend wurde die Kulturflasche wieder mit 10 ml *CellGro®DC* aufgefüllt und es wurden 500 IE Interleukin (IL) 4 sowie 800 IE GM-CSF (beides R&D-Systems) pro ml Medium zugegeben. Die Zellen wurden eine Woche lang im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 3, 5 und 7 wurden erneut die gleichen Mengen GM-CSF und IL-4 zugegeben.

2.4. Kryokonservierung der Zellen

Die nicht adhärenenten Zellen sowie DC, die nicht sofort weiter verwendet werden konnten, wurden eingefroren. Dazu wurde ein Einfriermedium, bestehend aus 50 % *RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640* Medium w/o L-Glutamin (Biochrom AG), 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, AppliChem) und 40 % Albumin (Humanalbumin 20 %, Biotest Pharma GmbH) verwendet. *RPMI 1640* wurde zuvor mit 1 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 µg/ml, Biochrom AG) pro 100 ml Medium versetzt und auch im Folgenden in dieser

Zusammensetzung verwendet. Bis zu 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium gelöst und in *Cryo Tube™ Vials* (Nunc) unter Verwendung des mit Isopropanol (Merck) gefüllten Cryo-Einfrierbehälters *Mr. Frosty* (Nalgene®), der eine Absenkung der Temperatur um nahezu $1^\circ \text{C}/\text{Min.}$ ermöglicht, bei -80°C tiefgefroren (Gefrierschrank *Hera freeze*, Heraeus Instruments). Sollten die Zellen für längere Zeit gelagert werden, wurden sie in einen Stickstofftank überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Sobald das Einfriermedium flüssig war, wurden die gelösten Zellen in ein vorbereitetes Röhrchen (Sarstedt) mit 10 ml PBS gegeben, bei 500 g 5 Min. lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal mit 10 ml PBS wiederholt und ein drittes Mal mit 10 ml *RPMI 1640* durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen.

3. Synthese der Idiotypeptide

Um Idiotypeptide herzustellen, wurde zunächst die DNA aus MCL-Zellen isoliert. Der DNA-Abschnitt des B-Zell-Rezeptors, der den Idiotyp repräsentiert, wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Datenbank *SYFPEITHI*, in der zahlreiche MHC-Liganden gespeichert sind, ermöglicht die Analyse von Gensequenzen ganzer Proteine auf Peptide, die an bestimmte MHC-I-Moleküle binden (22). Mithilfe dieser Datenbank wurden aus den DNA-Sequenzen der Idiotypen individuelle Nonapeptide ausgewählt. Peptide, die im Rammensee-Score einen Wert über 20 (Ausnahme: Patient 4) erreichten, wurden synthetisiert (Eurogentec). Diese Prozedur wurde bei Proben von sieben MCL-Patienten und an der MCL-Zelllinie Granta-519 durchgeführt.

4. Beladung und Ausreifung der DC

Für die Vorversuche wurden entweder 10 μl rekombinantes CMV-pp65-Protein (pp65 = Phosphoprotein 65) oder 20 μl *PepTivator® CMV pp65* (beides von Miltenyi Biotec) zu 1×10^6 DC gegeben, die in einer 24-Well-Platte (*Nunc Multidishes Nunclon™Δ, flat bottom*) in 1 ml *CellGro®DC* gelöst waren. Pp65 ist ein Matrixprotein des humanen Zytomegalievirus, *PepTivator® CMV pp65* enthält Peptide von 15 Aminosäuren Länge, die überlappend das gesamte CMV-pp65-Protein umspannen. Für die Aktivierung von T-Zellen gegen MCL wurden DC gleichzeitig mit zwei bis vier verschiedenen Idiotypeptiden beladen. Diese wurden vorab in einer Konzentration von 10 μg Peptid in 1 μl DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 3 μl zu den DC gegeben, so dass sich eine Peptidkonzentration

von 30 µg/ml ergab. Die Ausreifung der DC erfolgte entweder mithilfe des Zytokincocktails nach Jonuleit et al. (23) oder mit Toll-like Receptor (TLR) 7/8- und löslichem CD40-Liganden (sCD40-Ligand) nach Xu et al. (24).

4.1. Ausreifung der DC mit Zytokincocktail

Zunächst wurden die DC 2 h lang mit den gewünschten Proteinen oder Peptiden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe eines Zytokincocktails, bestehend aus 2000 IE/ml IL-1β, 1000 IE/ml IL-6, 1000 IE/ml Tumornekrosefaktor (TNF) α (alle von R&D-Systems), 1 µg/ml Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Sigma Aldrich), 500 IE/ml IL-4 und 800 IE/ml GM-CSF, um die Ausreifung der DC zu induzieren. Nach 24 h Inkubation konnten die T-Zellen zugegeben werden.

4.2. Ausreifung der DC mit TLR7/8- und sCD40-Liganden

Zunächst wurde 1 µg/ml TLR7/8-Ligand (CL097, InvivoGen) sowie 800 IE/ml GM-CSF und 500 IE/ml IL-4 zu den DC gegeben. 2 h später erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml sCD40-Ligand (Miltenyi Biotec) und nach weiteren 20 h wurden die Peptide hinzugefügt. 2 h nach Zugabe der Peptide wurden die T-Zellen zugegeben. Während der gesamten Zeit wurden die Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

4.3. Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer (Fluorescence-activated cell sorter = FACS) erfasst mithilfe verschiedener Laser die Größe und Granularität von Zellen, wodurch sich unterschiedliche Zellpopulationen voneinander abgrenzen lassen. Außerdem können Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt werden. Diese Antikörper können gegen oberflächliche Zellstrukturen wie CD-Antigene gerichtet sein, so dass zelluläre Subpopulationen analysiert werden können. Andererseits können Zellen mit Reagenzien auch für die Antikörper permeabilisiert werden, so dass intrazelluläre Substanzen wie der Aktivierungsmarker IFN γ bestimmt werden können. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Antikörper gibt Tab. 3.

4.4. Kontrolle der Ausreifung der DC

Die Ausreifung der DC wurde durch den Vergleich der Oberflächenmarker CD80, -83 und -86 zwischen unausgereiften und ausgereiften DC kontrolliert. CD80 und CD86 sind kostimulatorische Moleküle, die auf ausgereiften DC gesteigert exprimiert werden. CD83 ist

ein Marker für vollständig ausgereifte DC. Für die durchflusszytometrische Kontrolle der DC-Ausreifung wurden drei Proben gemessen: Unausgereifte DC wurden einerseits mit zytokingereiften und andererseits mit ligandengereiften DC verglichen. Dazu wurden jeweils 1×10^5 DC in 100 μ l PBS gelöst und mit je 10 μ l Anti-CD80 FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), Anti-CD83 PC5 (Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin) und Anti-CD86 PE (Phycoerythrin) angefärbt. Nach 20-minütiger Inkubation im Kühlschrank (Kirsch) wurde zu jeder Probe 1 ml PBS gegeben und die durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt (*Cytomics FC 500* mit *CXP-Software*, Beckman Coulter).

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei durchflusszytometrischen Analysen.

Antigen	Klon	Fluorochrom	Produzent
CD3	SK7	APC	BD Biosciences
CD3	UCHT1	PC7	Beckman Coulter
CD4	SK3	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
CD8	SK1	APC-H7, FITC, PE	BD Biosciences
CD8	B9.11	PC5	Beckman Coulter
CD25	2A3	PE	BD Biosciences
CD69	TP1.55.3	PE	Beckman Coulter
CD80	MAB104	FITC	Beckman Coulter
CD83	HB15a	PC5	Beckman Coulter
CD86	HA5.2B7	PE	Beckman Coulter
Interferon γ	45-15	FITC	Miltenyi Biotec

APC = Allophycocyanin, PC = Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin, PerCP-Cy5.5 = Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und Cyanin 5.5, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, PE = Phycoerythrin

5. Magnetische T-Zell-Separation

Bei diesem Verfahren der Zellseparation werden T-Zellen mit magnetischen Antikörpern markiert. Dies kann direkt geschehen, wenn der Antikörper, der an die gewünschten Zellen bindet, selbst an magnetische Partikel gekoppelt ist, oder indirekt, indem die Zellen zunächst mit einem Biotin-gekoppelten Antikörper markiert werden und erst in einem zweiten Schritt magnetische Biotin-Antikörper zugegeben werden.

Die markierten Zellen werden dann über eine Säule gegeben, die einen Metallkern enthält und in einen Magneten eingespannt ist. Dadurch entsteht ein starkes Magnetfeld, durch das die an magnetische Antikörper gekoppelten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, während nicht markierte Zellen ausgespült werden.

5.1. Depletion regulatorischer T-Zellen

Für die Experimente mit MCL-Idiotyppeptiden war es nötig, vorab die CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) zu entfernen, da diese eine Immunantwort gegen körpereigene Zelloberflächenstrukturen wie die Idiotypen des MCL verhindern. Zunächst wurde ein Depletionspuffer hergestellt: 498 ml PBS wurden mit 2,5 ml Albumin und 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung (Ethyldiamintetraessigsäure) (Sigma Aldrich) gemischt. Bei der Verwendung von Separationssäulen (*LS-Säulen*, Miltenyi Biotec) wurden bis zu 1×10^7 nicht adhärente Zellen in 90 µl Depletionspuffer gelöst und 10 µl magnetische CD25-Antikörper (*CD25 MicroBeads II*, Miltenyi Biotec) zugefügt. Wurden Depletionssäulen (*LD-Säulen*, Miltenyi Biotec) verwendet, so wurden bis zu 1×10^7 nicht adhärente Zellen in 80 µl Depletionspuffer gelöst und 20 µl *CD25 MicroBeads II* hinzugegeben. Bei höheren Zellzahlen wurden die Mengen entsprechend angepasst. Die in Depletionspuffer gelösten und mit *CD25 MicroBeads II* versetzten Zellen wurden eine Viertelstunde lang im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und bis zu 1×10^8 Zellen wurden in 500 µl Depletionspuffer gelöst.

Für die magnetische Separation wurden *LS-* oder *LD-Säulen* verwendet, die in das Magnetfeld der *MidiMACS Separation Unit* (Miltenyi Biotec) gebracht wurden. Auf die Säule wurde ein *Pre-Seperation Filter* (Miltenyi Biotec) aufgesetzt, um zu verhindern, dass sie während der Depletion durch kleine Zellklumpen verstopft. *LS-Säulen* wurden vorab mit 3 ml Depletionspuffer gespült, *LD-Säulen* mit 2 ml Depletionspuffer. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben und bei *LS-Säulen* mit 3 x 3 ml Depletionspuffer, bei *LD-Säulen* mit 2 x 1 ml Depletionspuffer nachgespült. Der durchgelaufene Teil der Zellsuspension, der den T_{reg}-depletierten Zellen entspricht, wurde in einem sterilen Reagenzglas (Sarstedt) aufgefangen.

5.2. Selektion CD3⁺ Zellen

Da die nicht adhärenen Zellen neben Lymphozyten auch Populationen anderer mononukleärer Zellen enthielten, wurden in einem zweiten Schritt die CD3⁺ Zellen isoliert. Hierzu wurde das *Pan T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec) verwendet, das biotinkoppelte Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von B-Zellen, DC, Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen enthält.

Zunächst wurden bis zu 1×10^7 T_{reg}-depletierte, nicht adhärenente Zellen in 40 µl Depletionspuffer gelöst und mit 10 µl Biotin-Antikörpern für 10 Min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Depletionspuffer und 20 µl *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugefügt und die Zelllösung weitere 15 Min. im Kühlschrank gelagert. Bei höheren Zellzahlen wurden die Mengen entsprechend angepasst. Danach wurden die Zellen einmal gewaschen und bis zu 1×10^8 Zellen in 500 µl Depletionspuffer gelöst. Eine mit einem *Pre-Separation Filter* versehene *LS-Säule* wurde in das Magnetfeld der *MidiMACS Separation Unit* gebracht und mit 3 ml Depletionspuffer gespült. Die Zelllösung wurde über die Säule gegeben und mit 3 x 3 ml Depletionspuffer durchgespült. Nichtmagnetische, also CD3⁺ Zellen, wurden in einem sterilen Reagenzglas aufgefangen.

5.3. Kontrolle der magnetischen Separation

Um das Ergebnis der magnetischen Separation zu kontrollieren, wurde der Anteil CD3⁺ und CD25⁺ Zellen vor und nach der Depletion verglichen. Es wurden dazu zwei Proben mit jeweils 1×10^6 Zellen mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl PBS gelöst und folgende AK zugefügt: 20 µl Anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und Cyanin 5.5), 20 µl Anti-CD8 FITC, 1 µl Anti-CD3 APC (Allophycocyanin) und 10 µl Anti-CD25 PE. Außerdem wurde eine Färbekontrolle durchgeführt, bei der die Zellen nur mit Anti-CD3, Anti-CD4 und Anti-CD8 gefärbt wurde, nicht aber mit Anti-CD25. Die Färbekontrolle diente dazu, die Auswertung nicht bimodal verteilter Ausprägungsmerkmale, wie der CD25-Expression, zu erleichtern. Nach 20-minütiger Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl *BD ZellFIX™-Lösung* (BD Biosciences) fixiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung (*BD FACS Canto™ Flow Cytometer* mit *FACSDiva-Software, Version 6.1.3*).

6. Aktivierung der T-Zellen

T-Zellen wurden ein- oder mehrmals mit ausgereiften und beladenen DC stimuliert. Dazu wurden je 1×10^7 T-Zellen in 1 ml *CellGro®DC* gelöst und in eine 24-Well-Platte gegeben. Bei geringeren Zellzahlen wurden 48-Well-Platten (*Becton Dickinson Multiwell™, flat bottom*) verwendet und die T-Zellen in 250-500 µl Medium gelöst. Anschließend wurden 1×10^6 ausgereifte, beladene DC in 1 ml *CellGro®DC* gelöst und zu jeweils 1×10^7 T-Zellen gegeben. Bei geringeren Zellzahlen wurde die Menge der zugegebenen DC und des Mediums reduziert, so dass ein Verhältnis von 1:10 zwischen DC und T-Zellen erhalten blieb. Die Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei einmaliger Stimulation von PBMC oder T-Zellen mit DC wurde am folgenden Tag eine FACS-Analyse durchgeführt, um die Aktivierung der T-Zellen zu messen. Bei mehrmaliger Stimulation der T-Zellen wurden diese an Tag 8 und gegebenenfalls auch an Tag 15 erneut mit DC im Verhältnis 10:1 stimuliert. Dazu wurden alle Zellen aus der Well-Platte abpipettiert, bei 500 g 5 Min. lang zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die in Medium gelösten DC zugegeben und die Zellen weiter bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Ab Tag 2 wurde das Medium mit 30 IE IL-2/ml (R&D-Systems) versetzt und diese Konzentration während der gesamten Zellkulturdauer aufrecht erhalten. Verfärbte sich das Medium gelblich, wurde es teilweise oder komplett ausgetauscht und das frische Medium wieder mit der entsprechenden IL-2-Konzentration versetzt. In Abb. 1 ist der Versuchsablauf der Idiotyp-spezifischen T-Zell-Aktivierung schematisch dargestellt.

6.1. Positiv- und Negativkontrollen

Um die spezifische Aktivierung der T-Zellen zu messen, wurden Positiv- und Negativkontrollen in die Experimente eingeschlossen. Für die Positivkontrolle wurde das bakterielle Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA) verwendet. Es wurden 1×10^7 T-Zellen mit 1×10^6 ausgereiften, aber unbeladenen DC und 2,5 µg SEA (Sigma Aldrich) pro ml Medium über Nacht inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen aus der Langzeitkultur vor der letzten Restimulation gesplittet. Eine Hälfte der Zellen wurde ein weiteres Mal mit ausgereiften, beladenen DC restimuliert, die andere Hälfte mit ausgereiften, aber unbeladenen DC inkubiert. So ließ sich die unspezifische von der spezifischen Aktivierung gegen das zugegebene Antigen unterscheiden. Bei Versuchen ohne Restimulation wurden für die Negativkontrolle 1×10^7 frische T-Zellen mit 1×10^6 ausgereiften, unbeladenen DC inkubiert.

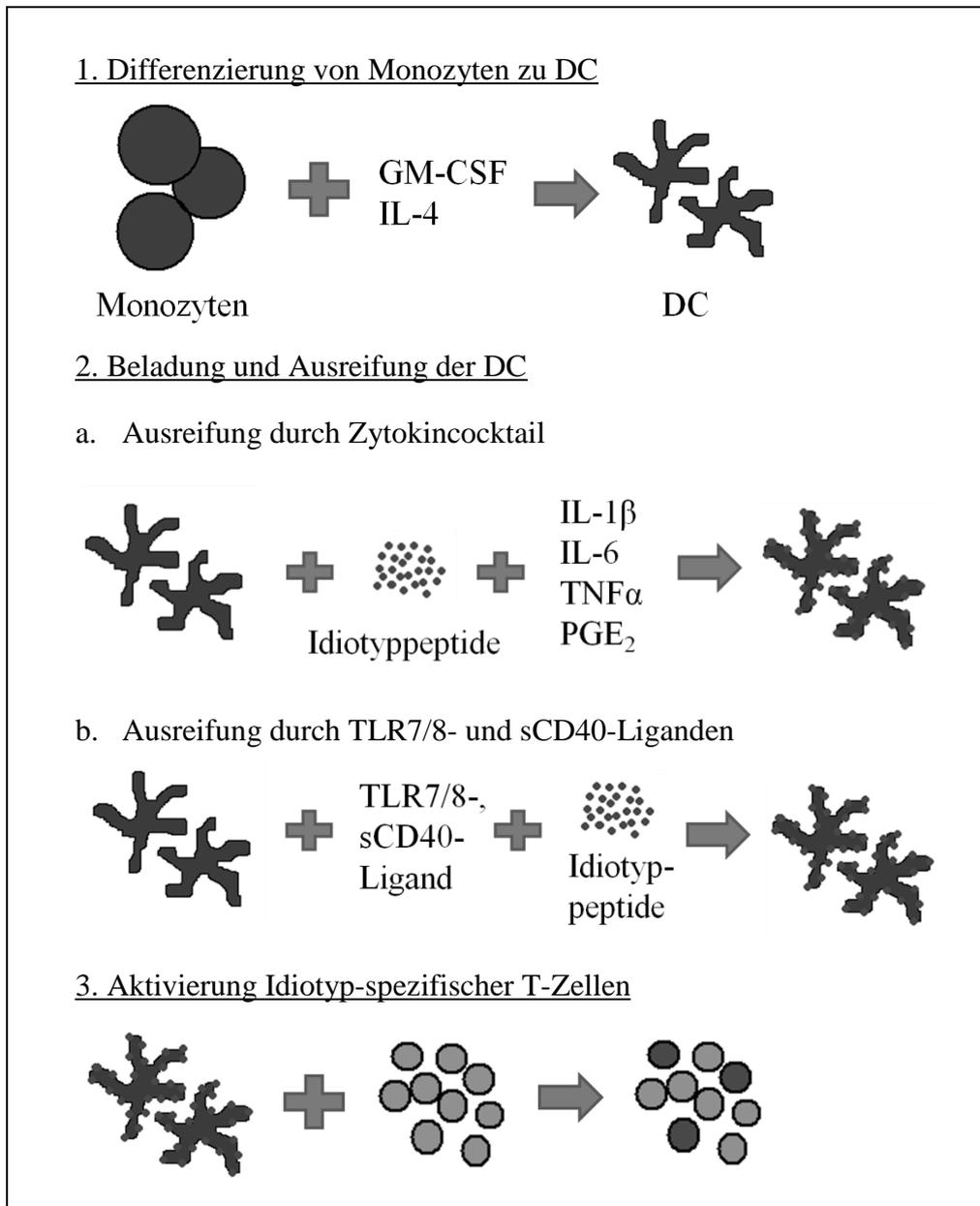


Abb. 1: Darstellung der einzelnen Schritte bei der Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen. Aus peripherem Blut oder Buffy Coats wurden Monozyten und Lymphozyten isoliert. Die Monozyten wurden mithilfe von GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen (DC) ausdifferenziert, mit Idiotyppeptiden beladen und entweder durch den Zytokincocktail oder mithilfe von TLR7/8- und sCD40-Liganden (= löslicher CD40-Ligand) ausgereift. Durch Stimulation mit diesen DC können Idiotyp-spezifische T-Zellen aktiviert werden (hier dunkel dargestellt). GM-CSF = Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor, PGE = Prostaglandin E, TLR = Toll-like Receptor

6.2. Vorbereitung der T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Die Aktivierung der T-Zellen wurde über die IFN γ -Produktion gemessen. Da IFN γ intrazellulär gemessen wurde, musste die Zytokinsekretion unterbrochen werden. Dazu wurde 2 h nach der letzten Restimulation 1 μ l Brefeldin A (Sigma Aldrich) pro ml Medium zu den Zellen gegeben. 4-10 h nach der Brefeldinzugabe wurde mit der Antikörper-Färbung begonnen.

6.3. Messung der T-Zell-Aktivierung

Für die durchflusszytometrische Messung wurden zunächst die Zellen in der Well-Platte gezählt und dann 1×10^6 Zellen aus jedem Loch abpipettiert. Diese wurden einmal mit PBS gewaschen, wobei sie für 5 Min. bei 500 g zentrifugiert wurden. Alle weiteren Waschschrte wurden mit derselben Einstellung der Zentrifuge durchgeführt. Für die Antikörperfärbung wurde das *Inside Stain Kit* (Miltenyi Biotec) verwendet, das *Inside Fix*, ein Fixiermittel auf Formaldehydbasis, und *Inside Perm*, das die Zellen für Antikörper permeabel macht, enthält. Nachdem das Medium ausgewaschen war, wurden die Zellen in 250 μ l PBS plus 250 μ l *Inside Fix* resuspendiert und 20 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie zunächst mit PBS, dann mit *Inside Perm* gewaschen und anschließend in 100 μ l *Inside Perm* aufgenommen. Die Antikörper wurden in den unten angegebenen Konzentrationen zugefügt und die Zellen bei Raumtemperatur 10 Min. im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in 350 μ l PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

Für die Vorversuche mit CMV-Antigenen wurden jeweils 10 μ l der folgenden Antikörper verwendet: Anti-CD3 PC7, Anti-CD8 PC5, Anti-CD69 PE und Anti-IFN γ FITC. Für die Versuche mit Idiotypeptiden wurden folgende Antikörper verwendet: 1 μ l Anti-CD3 APC, 4 μ l Anti-CD8 APC-H7, 20 μ l Anti-CD4 PerCP-Cy5.5 und 20 μ l Anti-IFN γ FITC. Außerdem wurde eine Färbekontrolle mit ebenfalls 1×10^6 T-Zellen durchgeführt, in der jeweils CD3, -4 und -8 mit denselben Antikörperkonzentrationen markiert wurden. Eine Übersicht über die insgesamt sechs gemessenen Proben bei Versuchen zur Idiotyp-spezifischen T-Zell-Aktivierung gibt Tab. 4.

Tab. 4: Übersicht über die durchflusszytometrisch gemessenen Proben bei Versuchen mit MCL-Idiotyppeptiden.

Bezeichnung des Röhrchens	APC	PerCP-Cy5.5	APC-H7	FITC
Probe Zytokinausreifung	CD3	CD4	CD8	IFN γ
Probe TLR7/8- u. sCD40-Liganden- Ausreifung	CD3	CD4	CD8	IFN γ
Negativkontrolle Zytokinausreifung	CD3	CD4	CD8	IFN γ
Negativkontrolle TLR7/8- u. sCD40-Liganden- Ausreifung	CD3	CD4	CD8	IFN γ
SEA	CD3	CD4	CD8	IFN γ
Färbekontrolle	CD3	CD4	CD8	-----

MCL = Mantelzelllymphom, APC = Allophycocyanin, PerCP-Cy5.5 = Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und Cyanin 5.5, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, TLR = Toll-like Receptor, sCD40-Ligand = löslicher CD40-Ligand, SEA = Staphylokokken-Enterotoxin A, IFN γ = Interferon γ

III. Ergebnisse

1. Herstellung der Idiotyppeptide

Für alle sieben MCL-Patienten sowie für die MCL-Zelllinie Granta-519 konnten mithilfe der Datenbank *SYFPEITHI* aus der Gensequenz der jeweiligen B-Zell-Rezeptoren Nonapeptide ermittelt werden, die zu den individuellen HLA-Molekülen passen. Es wurden jeweils zwei bis vier Peptide erfolgreich synthetisiert. Mit einer Ausnahme wurden nur Peptide ausgewählt, die im Rammensee-Score über 20 Punkte erreichten. Das Peptid SLYLQMNSL, das in der Sequenz von Patient 3, 4 und 7 vorkommt, hat in Kombination mit MHC-I-Molekülen der Klasse HLA-A*03 (Patient 4) im Rammensee-Score nur einen Wert von 18, während es in Kombination mit MHC-I-Molekülen der Klasse HLA-A*02 (Patient 3 und 7) 26 Punkte erreicht. Tab. 5 bietet eine Übersicht über die synthetisierten Idiotyppeptide, Abb. 2 zeigt die DNA-Sequenz und die enthaltenen Nonapeptide von Patient 4.

Tab. 5: Übersicht über die patientenspezifischen Idiotyppeptide.

Patient	Peptidsequenz	HLA-Spezifität des Peptids	Score (<i>SYFPEITHI</i>)
1	VLDIVVPA	HLA-A*0201	21
	IRQPPGKGL	HLA-B*2705	23
	SEDTSKNQF	HLA-B*4402	25
2	QLVQSGAEV	HLA-A*0201	24
	SLRSDDTAV	HLA-A*0201	23
	TAYMELRSL	HLA-A*0201	21
3	SLRAEDTAV	HLA-A*0201	23
	GLVKPGGSL	HLA-A*0201	24
	SLYLQMNSL	HLA-A*0201	26
4	TIYYADSVK	HLA-A*03	29
	SLYLQMNSL	HLA-A*03	18
	AVYYCARGP	HLA-A*03	20
	DTAVYYCAR	HLA-A*6801	23
5	SLKTEDTAV	HLA-A*0201	22
	GTTEYAASV	HLA-A*0201	21
	WELRGTDYW	HLA-B*4402	23
6	LVQSGAEVK	HLA-A*1101	23
	DTAIYYCAR	HLA-A*6801	23
	ARASGKYQM	HLA-B*2705	24
7	SLYLQMNSL	HLA-A*0201	26
	YIYYADSVK	HLA-A*03	29
	SRDNAKNSI	HLA-B*2705	23
Granta-519	QLQESGPGGL	HLA-A*0201	24
	GLVKPSETL	HLA-A*0201	24

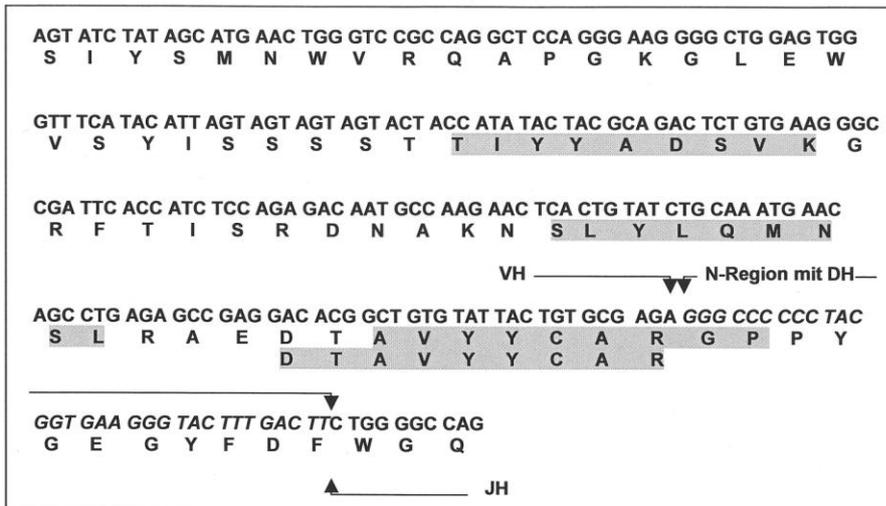


Abb. 2: Darstellung des Idiotyps von Patient 4. Die obere Zeile zeigt die DNA-Sequenz des variablen Teils der IgH-Kette des B-Zell-Rezeptors, darunter befinden sich die kodierten Aminosäuren. Die mithilfe der Datenbank *SYFPEITHI* ermittelten Nonapeptide sind grau unterlegt. Die variable Region besteht aus drei verschiedenen Gensegmenten (V, D, J), die bei jedem Lymphozyten zufällig kombiniert werden. An den Verbindungsstellen der einzelnen Segmente befindet sich die N-Region: Hier werden bei der Rekombination zufällige Nukleotide eingefügt, so dass die NDN-Region spezifisch für einen B-Zell-Klon ist.

2. Kontrollen

2.1. Ausreifung der DC

In den vorliegenden Versuchen wurde die DC-Ausreifung zum einen durch einen Cocktail aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE $_2$, zum anderen durch die Aktivierung mittels TLR7/8- und sCD40-Liganden induziert. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expressionsstärke von CD80, -83 und -86 auf naiven und ausgereiften DC ermittelt. Abb. 3 zeigt die Expression dieser Marker auf naiven DC (helle Kurve) im Vergleich zu den ausgereiften DC (dunkle Kurve) am Beispiel des gesunden Spenders B. Dabei zeigt sich eine zum Teil deutliche Steigerung der Expression als Zeichen der erfolgreichen Maturation.

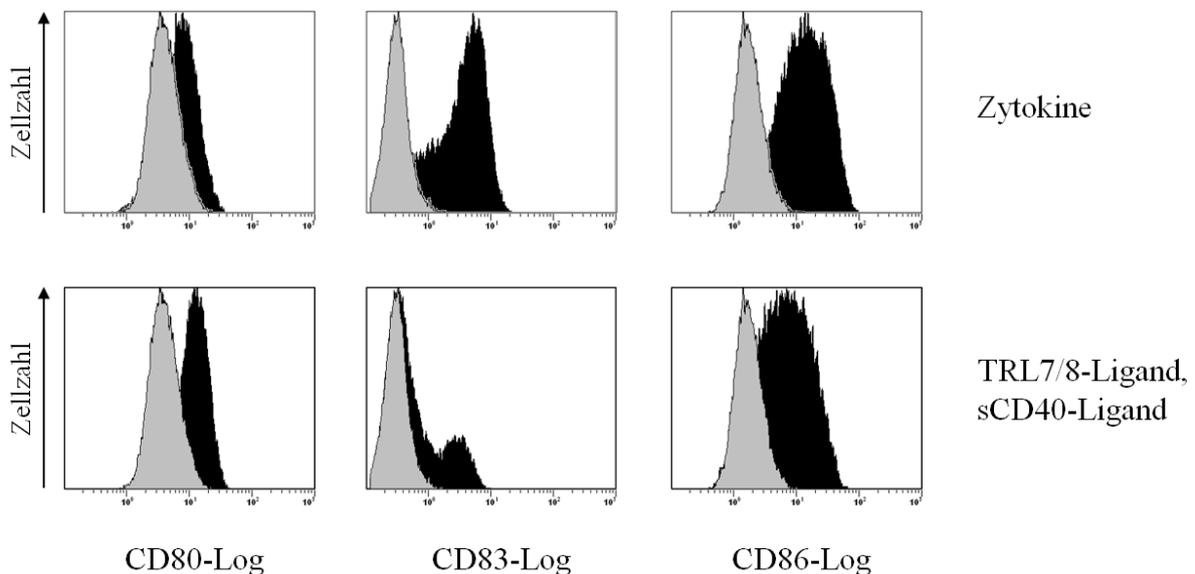


Abb. 3: Darstellung der veränderten Expressionsstärke von CD80, -83 und -86 bei naiven und ausgereiften DC des gesunden Spenders B. Obere Zeile: Ausreifung dendritischer Zellen (DC) mittels Zytokincocktail. Untere Zeile: Ausreifung der DC mit TLR7/8- und sCD40-Liganden. Die hellen Kurven zeigen die Expressionsstärke der oben genannten Marker auf naiven DC, während sich die dunklen Kurven auf ausgereifte DC beziehen. TLR = Toll-like Receptor, sCD40-Ligand = löslicher CD40-Ligand

2.2. Selektion CD3⁺ Zellen

Die durch Plastikadhärenz separierten, nicht adhärenen Zellen enthielten neben Lymphozyten Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen. Um eine reine Population CD3⁺ Zellen zu gewinnen, wurden die nicht adhärenen Zellen mithilfe CD3-gekoppelter Magnetantikörper separiert. Der Erfolg dieser Prozedur wurde durchflusszytometrisch kontrolliert. In Abb. 4 sind die Ergebnisse des gesunden Spenders G dargestellt. Anhand der durch Forwardscatter

(FSC) und Sidescatter (SSC) dargestellten unterschiedlichen Größe und Granularität verschiedener Zelltypen ließen sich zunächst die Lymphozyten von anderen Zellgruppen abgrenzen (Abb. 4a, c). Bereits der Vergleich zwischen den nicht adhären Zellen (Abb. 4a) und den Zellen nach CD3-Selektion (Abb. 4c) zeigt eine deutliche Aufreinigung der Lymphozytenpopulation. Der Anteil $CD3^+$ Zellen an den mit dem Gate eingefassten Lymphozyten beträgt unter den nicht adhären Zellen 55,8 % (Abb. 4b) und unter den selektierten 97,2 % (Abb. 4d).

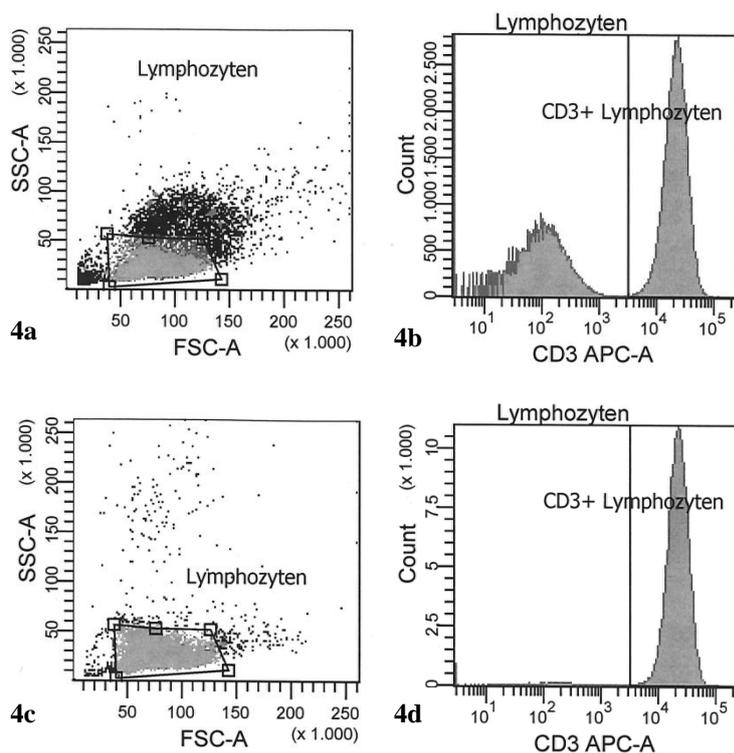


Abb. 4: Vergleich des Anteils $CD3^+$ Zellen vor und nach der magnetischen Separation bei dem gesunden Spender G.

4a, b: nicht adhären Zellen vor der CD3-Separation; 4c, d: Zellen nach der CD3-Separation. Die rechten Bilder zeigen die CD3-Expression der links eingerahmten Lymphozyten. Der Anteil $CD3^+$ Zellen in 4b beträgt 55,8%, in 4d 97,2%. FSC = Forwardscatter (Messung der Zellgröße), SSC = Sidescatter (Messung der Granularität)

2.3. Depletion regulatorischer T-Zellen

$CD4^+/CD25^+$ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) verhindern eine Immunantwort gegen körpereigene Zelloberflächenstrukturen. Aus diesem Grunde wurde diese Lymphozytenpopulation bei den Versuchen mit Idiotyppeptiden depletiert. Die Depletion erfolgte mithilfe magnetischer CD25-Antikörper und das Ergebnis wurde durchflusszytometrisch kontrolliert. Tab. 6 bietet eine Übersicht über die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen und die jeweils verwendete Antikörperkonzentration sowie die Säulenart. Es zeigte sich, dass die T_{reg} -Depletion am effektivsten mit *LD-Säulen* unter Verwendung von 20 μ l CD25-Antikörpern pro 1×10^7 Zellen war. Unter diesen Bedingungen konnte der Anteil der T_{regs} an den $CD3^+$ Zellen um das sieben- (Pat. 2) bis

neunzigfache (Spender G) reduziert werden. Bei Spender C wurde zusätzlich die Depletion mit 20 µl CD25-Antikörpern und einer *LS-Säule* getestet, wodurch sich die Konzentration der T_{regs} um das achtfache verringerte. Weniger wirksam war die Verwendung von nur 10 µl CD25-Antikörpern selbst bei zweimaliger Depletion mit einer *LS-Säule*: Bei Spender F und Pat. 1 konnte der Anteil der T_{regs} nur knapp halbiert werden. Auffällig ist darüber hinaus der erhöhte Anteil regulatorischer T-Zellen im Blut der Lymphompatienten gegenüber den gesunden Spendern: Während die hier untersuchten gesunden Spender durchschnittlich 11,3 % T_{regs} aufwiesen, war dieser Wert bei Pat. 1 verdoppelt und bei Pat. 2 nahezu verdreifacht. In Abb. 5 sind die Ergebnisse des gesunden Spenders G dargestellt. Der Anteil CD4⁺/CD25⁺ Zellen vor und nach der Depletion wurde verglichen. Im vorliegenden Beispiel betrug der Anteil der T_{regs} gemessen an allen CD3⁺ Zellen vor der Depletion 9 % (Abb. 5a), danach nur noch 0,1 % (Abb. 5b).

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen nach Depletion regulatorischer T-Zellen (T_{regs}).

	Anteil T _{regs} vor Depletion an CD3 ⁺ Zellen	Anteil T _{regs} nach Depletion an CD3 ⁺ Zellen (Methodik)	Faktor
Spender C	9,3 %	0,2 % (20 µl CD25-AK, 1 x <i>LD</i>)	46,5
		1,1 % (20 µl CD25-AK, 1 x <i>LS</i>)	8,5
Spender F	15,7 %	8,3% (10 µl CD25-AK, 2 x <i>LS</i>)	1,9
Spender G	9 %	0,1 % (20 µl CD25-AK, 1 x <i>LD</i>)	90,0
Patient 1	22,6 %	13,4 % (10 µl CD25-AK, 2 x <i>LS</i>)	1,7
Patient 2	30 %	4,1 % (20 µl CD25-AK, 1 x <i>LD</i>)	7,3

Am effektivsten war die T_{reg}-Depletion mit *LD-Säulen* unter Verwendung von 20 µl CD25-AK. CD25-AK = CD25-Antikörper, *LD* = Depletionssäule, *LS* = Selektionssäule

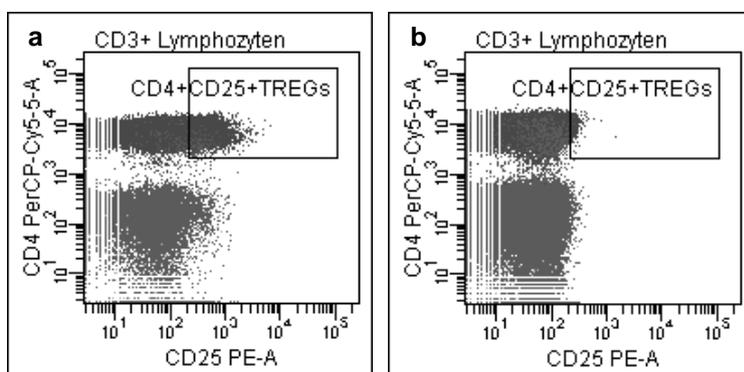


Abb. 5: Vergleich des Anteils CD4⁺/CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) vor (a) und nach (b) der magnetischen Depletion bei dem gesunden Spender G.

Abgebildet sind CD3⁺ Zellen. Vor der Depletion betrug der Anteil der Tregs 9 %, danach 0,1 %.

3. Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen bei gesunden Spendern

Um die Methodik der Aktivierung spezifischer T-Zellen zu etablieren, wurden zunächst Lymphozyten von gesunden CMV⁺ Personen gegen CMV-Antigene aktiviert. Dazu wurden Buffy Coats von zwei verschiedenen Spendern A und B verwendet.

Bei Spender A zeigte sich nach einmaliger Stimulation von T-Zellen mit DC, die mit dem CMV-pp65-Protein inkubiert und mithilfe des Zytokincocktails ausgereift worden waren, eine Aktivierung von 2,1 % aller CD4⁺ und 1,1 % aller CD8⁺ Zellen (Abb. 6b). Als Kontrolle dienten DC, die ebenfalls durch den Zytokincocktail ausgereift, aber nicht mit dem CMV-pp65-Protein inkubiert wurden. Unter den T-Zellen, die mit diesen unbeladenen DC stimuliert wurden, produzierten 0,8 % der CD4⁺ und 0,6 % der CD8⁺ Zellen IFN γ (Abb. 6a). Nach Abzug dieser Hintergrundaktivität ergibt sich eine spezifische Aktivierung von 1,3 % aller CD4⁺ und 0,5 % aller CD8⁺ Lymphozyten gegen das CMV-Antigen.

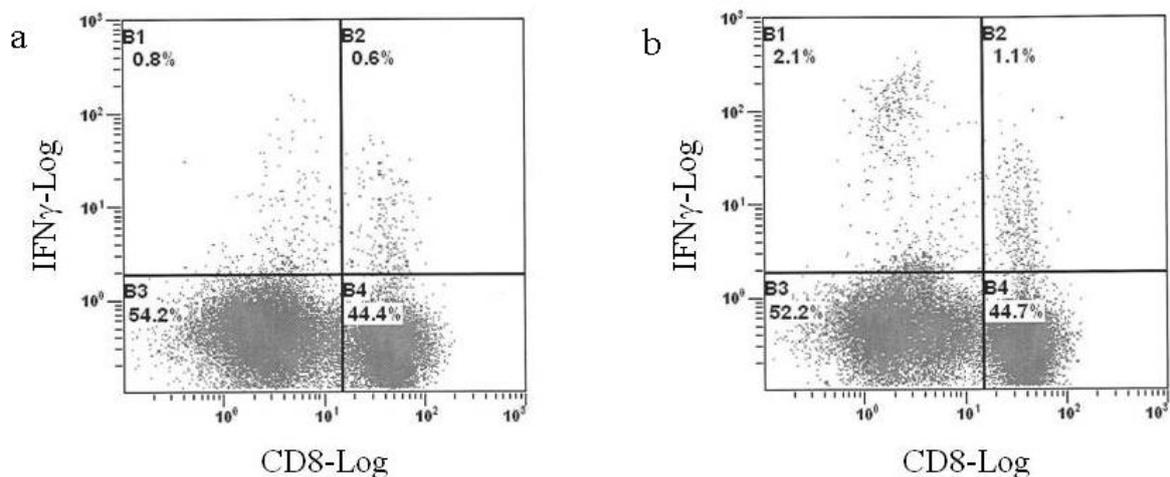


Abb. 6: Spender A: Aktivierung von CMV-spezifischen T-Zellen beim Gesunden. T-Zellen wurden durch DC, die mit dem CMV-pp65-Protein inkubiert und durch den Zytokincocktail ausgereift wurden, stimuliert. Nach Abzug der Negativkontrolle (a) ergibt sich eine CMV-spezifische Aktivierung (b) von 1,3 % der CD4⁺ und 0,5 % der CD8⁺ T-Zellen. CMV = Zytomegalievirus, pp65 = Phosphoprotein 65, IFN γ = Interferon γ

Bei Spender B wurden DC einerseits mit dem Zytokincocktail, andererseits mit TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereift und mit *PepTivator*[®] CMV pp65 inkubiert. Die einmalige Stimulation von T-Zellen mit zytokingereiften DC ergab eine Aktivierung von 0,7 % der CD8⁺ Zellen (Abb. 7b). Mit den durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereiften DC konnten 0,6 % der CD8⁺ Zellen aktiviert werden (Abb. 7e). Die Negativkontrollen zeigten keine IFN γ -Produktion (Abb. 7a, d). In der Positivkontrolle, für die T-Zellen mit ausgereiften DC und SEA inkubiert wurden, ergab sich eine Aktivierung von 9,9 % der CD8⁺ Lymphozyten (Abb. 7c).

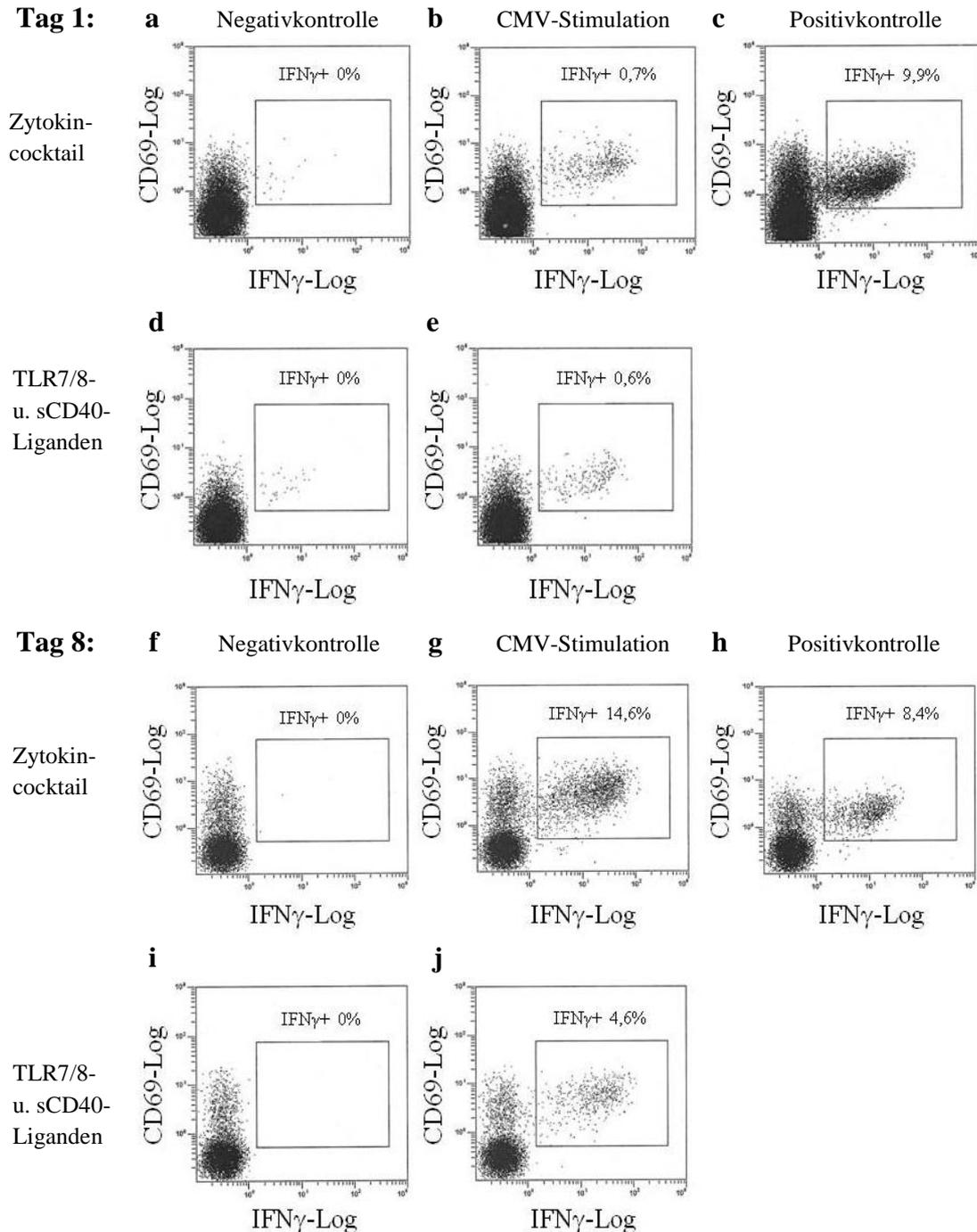


Abb. 7: Spender B: Aktivierung von CMV-spezifischen CD8⁺ Lymphozyten beim Gesunden. T-Zellen wurden an Tag 1 und 8 durch DC stimuliert, die mit *PepTivator*[®] *CMV pp65* beladen waren. Die Ausreifung der DC erfolgte einerseits durch den Zytokincocktail, andererseits durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden. Der Anteil CD8⁺, CMV-spezifischer T-Zellen hat sich durch die wiederholte Stimulation mit zytokingereiften DC verzwanzigfach, mit ligandengereiften DC versiebenfach. CMV = Zytomegalievirus, pp65 = Phosphoprotein 65, IFN γ = Interferon γ , TLR = Toll-like Receptor, sCD40-Ligand = löslicher CD40-Ligand, DC = dendritische Zelle

Nach einer einwöchigen Inkubationszeit unter einem konstanten IL-2-Spiegel von 30 IE/ml wurden die T-Zellen mit frischen, ausgereiften und mit *PepTivator*[®] *CMV pp65* beladenen DC restimuliert. Darauf reagierten nun 14,6 % der CD8⁺ T-Zellen, die mit zytokinbehandelten

DC stimuliert worden waren, mit der Produktion von IFN γ (Abb. 7g). Bei den CD8⁺ Lymphozyten, die mit TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereiften DC restimuliert wurden, waren es 4,6 % (Abb. 7j). Die Negativkontrollen zeigten keine IFN γ -Produktion (Abb. 7f, i). Die Positivkontrolle, die wieder mit SEA durchgeführt wurde, zeigte eine Aktivierung von 8,4 % der CD8⁺ Zellen (Abb. 7h).

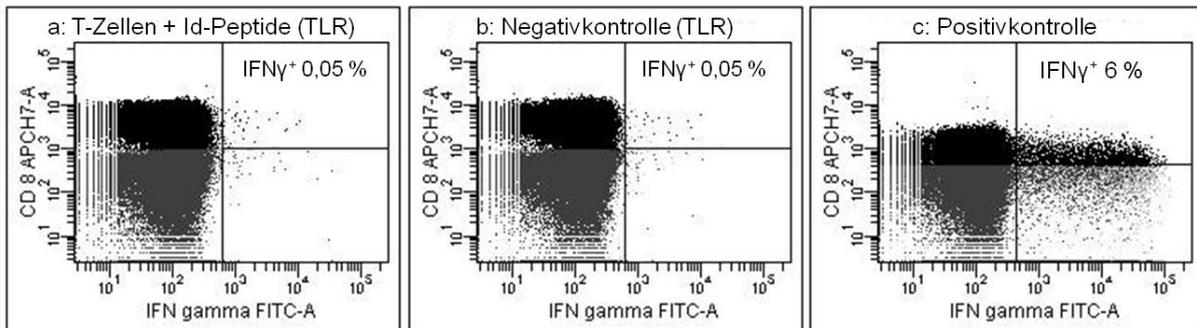
4. Aktivierung allogener Idiotyp-spezifischer T-Zellen

Um zu prüfen, ob eine T-Zell-Aktivierung gegen MCL-Idiotyppeptide bei Gesunden möglich ist, wurden T-Zellen von drei gesunden Spendern (C-E) mit Idiotyppeptiden stimuliert. Die T_{reg}-depletierten T-Zellen wurden zwei Wochen lang inkubiert und an Tag 1, 8 und 15 mit Idiotyppeptid-beladenen DC stimuliert. Alle drei Spender hatten den HLA-Typ A*02. Es wurden Idiotyppeptide verwendet, die in Kombination mit HLA-A*02-Molekülen im Rammensee-Score einen Wert von über 20 erreichten (Tab 7). Bei Spender C handelte es sich um die Idiotyppeptide der MCL-Zelllinie Granta-519 (Tab. 7). Zellen von Spender D wurden mit den Idiotyppeptiden von Patient 5 stimuliert (Tab. 7). In beiden Versuchen wurden die DC mit TLR7/8- und sCD40-Liganden ausgereift. Bei Spender E wurde ein Idiotyppeptid von Patient 7 verwendet (Tab. 7). Die DC-Ausreifung wurde hier einerseits mit dem Zytokincocktail, andererseits mit TLR7/8- und sCD40-Liganden induziert. In allen drei Versuchen zeigten die Positivkontrollen mit SEA eine deutliche T-Zell-Aktivierung: 6 % der CD8⁺ Zellen von Spender C produzierten IFN γ (Abb. 8c), 19,3 % der CD8⁺ Zellen von Spender D (Abb. 8f) und 4,2 % der zytotoxischen T-Zellen von Spender E (Abb. 8i). Jedoch war in keinem Fall eine Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung nachweisbar (Abb. 8).

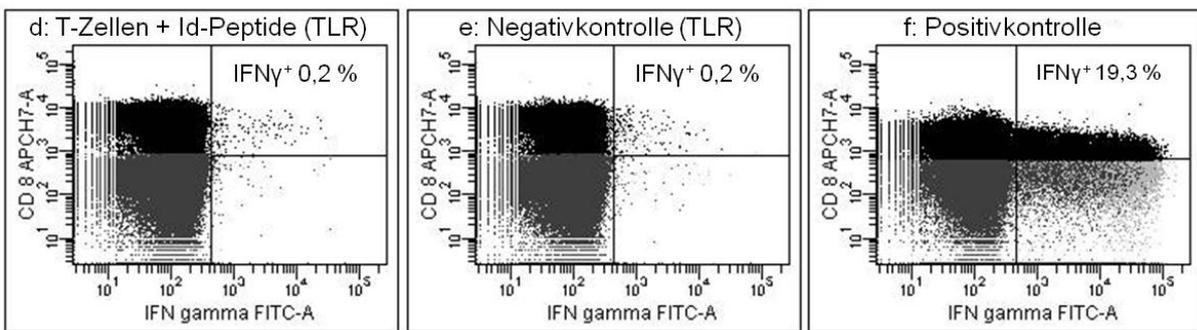
Tab. 7: Auswahl der Idiotyppeptide für die T-Zell-Stimulation bei gesunden Spendern.

Ursprung des Peptids	Peptidsequenz	Rammensee-Score für HLA-A*0201
Granta-519	QLQESGPGL	24
	GLVKPSETL	24
Patient 5	SLKTEDTAV	22
	GTTEYAASV	21
Patient 7	SLYLQMNSL	26

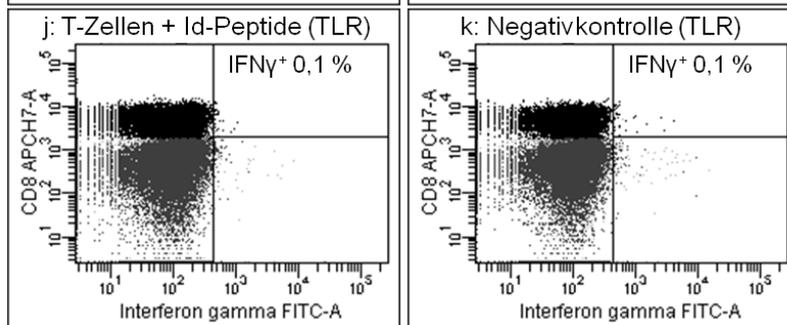
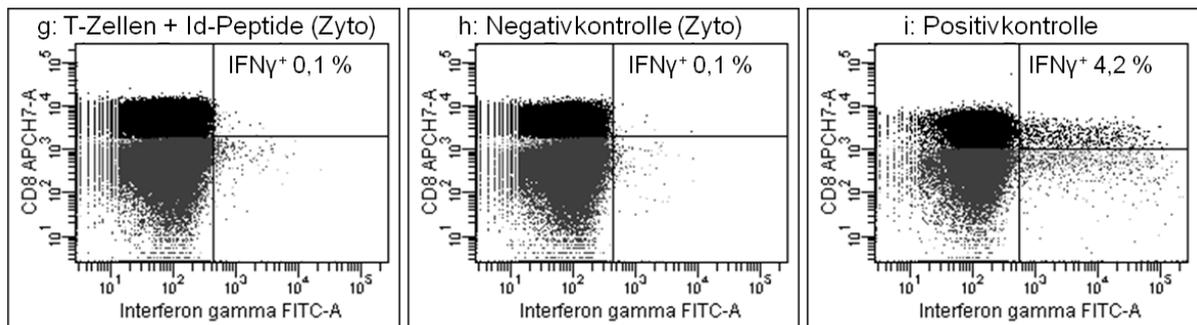
Abb. 8: Ergebnisse der Idiotyp-spezifischen T-Zell-Aktivierung bei gesunden Spendern (C-E). Nach dreimaliger Stimulation mit Idiotyppeptid-beladenen DC konnte in keinem der Versuche eine Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung erreicht werden. Id-Peptide = Idiotyppeptide, DC = dendritische Zellen, TLR = TLR7/8- und löslicher (s) CD40-Ligand, Zyto = Zytokincocktail, MCL = Mantelzelllymphom



a-c: Stimulation von T-Zellen des Spenders C mit Idiotyppeptiden der MCL-Zelllinie Granta-519 durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereifte DC. Sowohl in der Probe (a) wie auch in der Negativkontrolle (b) Aktivierung von 0,05 % der CD8⁺ Zellen. In der Positivkontrolle (c) 6 % IFN γ ⁺/CD8⁺ Zellen.



d-f: Stimulation von T-Zellen des Spenders D mit Idiotyppeptiden von Patient 5 durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereifte DC. Sowohl in der Probe (d) wie auch in der Negativkontrolle (e) Aktivierung von 0,2 % der CD8⁺ Zellen. In der Positivkontrolle (f) 19,3 % IFN γ ⁺/CD8⁺ Zellen.



g-k: Stimulation von T-Zellen des Spenders E mit einem Idiotyppeptid von Patient 7. Die DC wurden einerseits durch den Zytokincocktail (g, h), andererseits durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereift (j, k). Sowohl in den Proben (g, j) wie auch in den Negativkontrollen (h, k) Aktivierung von 0,1 % der CD8⁺ Zellen. In der Positivkontrolle (i) 4,2 % IFN γ ⁺/CD8⁺ Zellen.

5. Aktivierung autologer Idiotyp-spezifischer T-Zellen

Bei sechs MCL-Patienten wurde versucht, eine Immunreaktion gegen den individuellen Idiotyp des Lymphoms zu induzieren (Tab. 8). Dies erfolgte durch dreimalige Stimulation T_{reg}-depletierter T-Zellen mit Idiotyppeptid-beladenen DC. Bei allen Patienten wurden DC einerseits durch den Zytokincocktail, andererseits durch TLR7/8- und sCD40-Liganden ausgereift und jeweils die Hälfte der T-Zellen damit stimuliert.

In zwei Fällen, bei den Patienten 3 und 4, konnte eine Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung gezeigt werden. Bei der Patientin 3 produzierten nach Abzug der Negativkontrolle 0,16 % der CD8⁺ T-Zellen, die durch TLR7/8- u. sCD40-Liganden ausgereifte DC stimuliert worden waren, IFN γ (Abb. 9a, b). Bei Patient 4 waren es in dieser Gruppe 0,17 % der CD8⁺ Zellen (Abb. 10a, b). Weder bei der Patientin 3 noch bei Patient 4 konnte eine T-Zell-Aktivierung mit zytokingereiften DC nachgewiesen werden (Abb. 9, 10, jeweils d, e). Bei den Patienten 5 und 6 ließen sich weder durch Stimulation mit zytokin- noch mit ligandengereiften DC Idiotyp-spezifische T-Zellen aktivieren. In den Positivkontrollen mit SEA zeigte sich jedoch in allen Experimenten eine deutliche IFN γ -Produktion (Tab. 8), sodass von der Vitalität und Funktionalität der T-Zellen ausgegangen werden kann.

Ogleich die durchflusszytometrische Kontrolle der T_{reg}-Depletion an Tag 2 bei den Patienten 1 und 2 eine deutliche Population vitaler T-Zellen zeigte und frische Lymphozyten auf SEA reagierten, war es nach zwei Wochen Zellkultur kaum noch möglich, lebende T-Zellen im FACS zu detektieren. Bei beiden Patienten wurde das Blut, an dem die Versuche durchgeführt wurden, unmittelbar nach der Stammzellapherese für die autologe SCT abgenommen. Etwa zwei Wochen zuvor waren beide Patienten im Rahmen der Stammzellmobilisation chemotherapeutisch behandelt worden. Über die Aktivierbarkeit von lymphomspezifischen T-Zellen kann bei diesen beiden Patienten keine Aussage gemacht werden.

**Tab. 8: Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen bei MCL-Patienten:
CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen nach dreimaliger Stimulation mit beladenen DC.**

Patient	Probe TLR-/ sCD40L *	Probe Zytokine *	Positiv- kontrolle
1	---	---	21,9 %
2	---	---	6,0 %
3	0,16 %	0,0 %	27,38 %
4	0,17 %	0,01 %	14,04 %
5	0,01 %	0,0 %	28,08 %
6	0,0 %	0,0 %	9,57 %

* Negativkontrolle bereits abgezogen,
MCL = Mantelzelllymphom,
IFN γ = Interferon γ , DC =
dendritische Zelle, TLR = Toll-
like Receptor, s = löslich,
L = Ligand

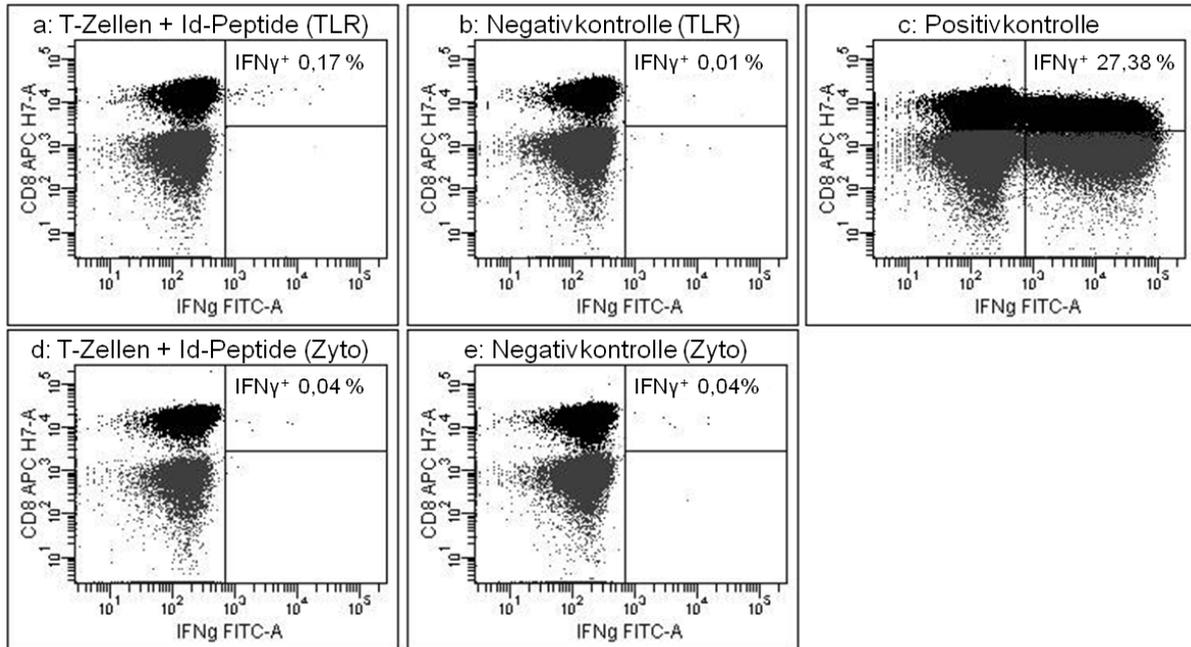


Abb. 9: Patientin 3: Erfolgreiche Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen. 0,17 % der CD8⁺ Zellen, die mit ligandengereiften DC stimuliert wurden (a), produzierten IFN γ , während in der Negativkontrolle (b) nahezu keine Aktivierung nachgewiesen werden konnte (0,01 %). T-Zellen, die mit zytokingereiften DC stimuliert wurden, zeigten keine spezifische Aktivierung (d, e). In der Positivkontrolle (c) produzierten 27,38 % der CD8⁺ Zellen IFN γ . Id-Peptide = Idiotyppeptide, (TLR) = TLR7/8- und löslicher CD40-Ligand, (Zyto) = Zytokincocktail, IFN γ = Interferon γ

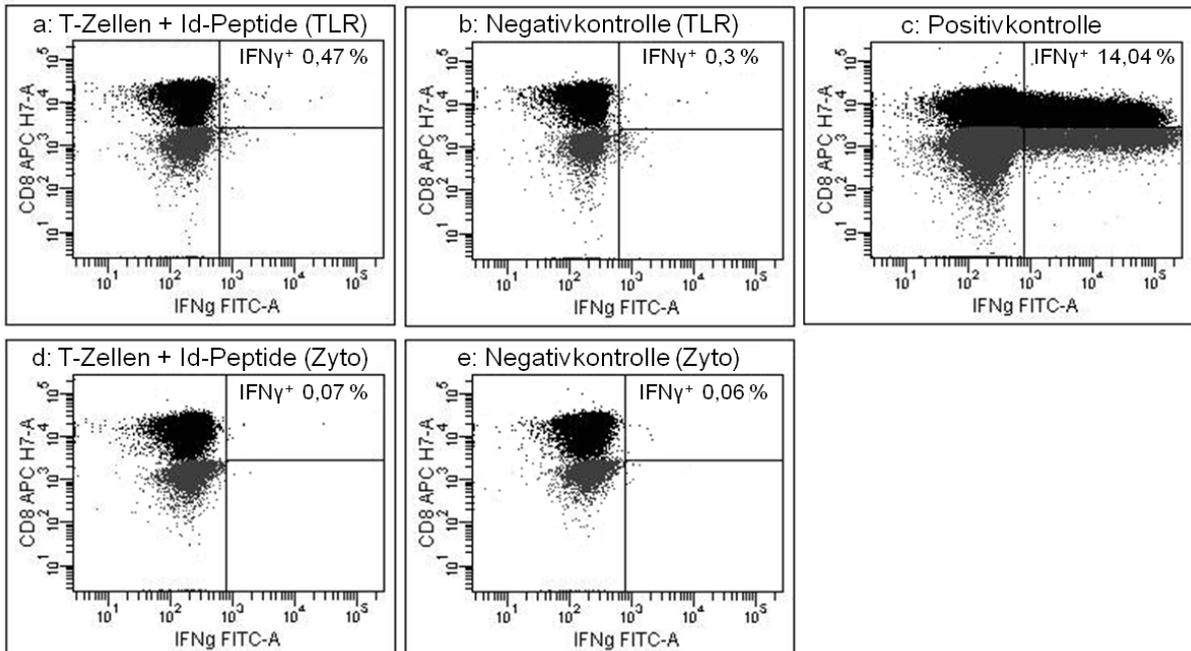


Abb. 10: Patient 4: Idiotyp-spezifische Aktivierung von 0,17 % der CD8⁺ Zellen, die mit ligandengereiften DC stimuliert wurden. Unter den stimulierten CD8⁺ Zellen produzierten 0,47 % IFN γ (a), in der Negativkontrolle 0,3 % (b). Bei den T-Zellen, die mit zytokingereiften DC stimuliert wurden, zeigte sich nahezu kein Unterschied zwischen Probe (d) und Negativkontrolle (e). Die Aktivierung CD8⁺ Zellen in der Positivkontrolle (c) betrug 14,04 %. Id-Peptide = Idiotyppeptide, (TLR) = TLR7/8- und löslicher CD40-Ligand, (Zyto) = Zytokincocktail, IFN γ = Interferon γ

IV. Diskussion

1. CMV-spezifische T-Zell-Aktivierung

CMV pp65 ist ein Matrixprotein des humanen Zytomegalievirus und wurde 1994 von McLaughlin-Taylor et al. (25) als immundominantes Antigen der CMV-spezifischen Immunreaktion CD8⁺ Lymphozyten erkannt. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Aktivierung CMV-pp65-spezifischer T-Zellen aus Buffy Coats seropositiver Spender getestet, um das Protokoll zur Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen zu etablieren. Dazu wurde einerseits das komplette rekombinante CMV-pp65-Protein, andererseits *PepTivator*® CMV pp65 (Miltenyi Biotec) verwendet. *PepTivator*® CMV pp65 enthält Pentadekapeptide, die überlappend das gesamte CMV-pp65-Protein umspannen.

1.1. T-Zell-Aktivierung mit dem CMV-pp65-Peptidmix

Nach einmaliger Stimulation von T-Zellen mit DC, die mit *PepTivator*® CMV pp65 beladen waren, betrug die Aktivierung CD8⁺ Zellen 0,6-0,7 %. Durch wöchentliche Restimulation und Zugabe von IL-2 stieg die Zahl sogar auf bis zu 14,6 % der CD8⁺ Zellen an.

Die Verwendung von überlappenden Peptiden, die das gesamte CMV-pp65-Protein umspannen, geht auf Kern et al. (26) zurück. Im Jahr 2000 veröffentlichten die Wissenschaftler eine Studie, in der sie erstmals T-Zellen mit einer Mischung aus 138 Peptiden aus dem CMV-pp65-Protein erfolgreich stimulierten (26). Nach sechsstündiger Stimulation von PBMC 26 gesunder, CMV-seropositiver Spender mit dieser Peptidmischung zeigten sich in der anschließenden IFN γ -Messung im Durchschnitt 1,05 % (0,0-3,79 %) aktivierte CTL (26). In einer weiteren Studie untersuchten Kern et al. (27) auch die Aktivierbarkeit von CD4⁺ Zellen gesunder CMV⁺ Spender mit der CMV-pp65-Peptidmischung. Hier betrug die mittlere Frequenz CMV-spezifischer, IFN γ ⁺ Zellen nach sechsstündiger Inkubation mit den Peptiden 0,19 % (0,03-1,95 %) der CD4⁺ und 0,85 % (0,04-2,38 %) der CD8⁺ Zellen. 2005 stellten Trivedi et al. (28) ein Protokoll zur Herstellung CMV-spezifischer CTL für den adoptiven Transfer nach allogener SCT vor. Dazu wurden T-Zellen von zwölf gesunden CMV⁺ Spendern wöchentlich mit DC stimuliert, die mit der CMV-pp65-Peptidmischung beladen waren. Die T-Zell-Aktivierung wurde mithilfe eines IFN γ -Assays analysiert und die Werte nach der ersten und dritten Stimulation verglichen. Dabei zeigte sich ein 60-110facher Anstieg der CMV-spezifischen T-Zellen, von 0,14-0,4 % nach der ersten Stimulation auf 4,52-7,94 % nach der dritten Stimulation. Die CMV-pp65-spezifischen T-Zell-Antworten

umfassten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen. Die aktivierten Zellen waren in der Lage, autologe CMV-infizierte Zielzellen im *Chrom*[⁵¹Cr]-*release-Assay* spezifisch zu lysieren.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Frequenzen aktivierter, CMV-spezifischer T-Zellen stimmen mit den Ergebnissen vergleichbarer Arbeiten gut überein (26-28). Durch zweimalige Stimulation von T-Zellen mit *PepTivator*® CMV pp65 konnte eine 7-20fache Steigerung der Zahl CD8⁺ CMV-spezifischer T-Zellen beobachtet werden. Diese Erhöhung liegt zwar unter den Ergebnissen von Trivedi et al. (28), die eine 60-110fache Erhöhung beobachtet haben, allerdings wurden die Zellen bei Trivedi et al. insgesamt dreimal stimuliert, während in der vorliegenden Arbeit nur zwei Stimulationen durchgeführt wurden.

1.2. T-Zell-Aktivierung mit dem CMV-pp65-Protein

Nach einmaliger Stimulation von T-Zellen mit CMV-pp65-Protein-beladenen DC produzierten 0,5 % der CD8⁺ und 1,3 % der CD4⁺ Lymphozyten IFN γ .

Maecker et al. (29) publizierten 2001 eine Studie, in der das rekombinante CMV-pp65-Protein mit einer Mischung überlappender Peptide aus demselben Protein hinsichtlich der Potenz zur Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen verglichen wurde. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung CD4⁺ Zellen mit dem Protein effektiver war als die Aktivierung CD8⁺ Zellen. Während eine sehr geringe Proteindosis genügte, um CD4⁺ Zellen zu aktivieren, wurden für die Aktivierung CD8⁺ Zellen deutlich höhere Proteinkonzentrationen benötigt. Im Gegensatz dazu konnten durch die Peptidmischung wesentlich mehr CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden als durch das Protein. Bei der Aktivierung CD4⁺ Zellen zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen der Stimulation mit dem kompletten Protein und der Peptidmischung.

Auch in der vorliegenden Arbeit war die Zahl aktivierter CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit rekombinantem CMV-pp65-Protein höher als die der CD8⁺ Zellen, was die in der Literatur beschriebene höhere Potenz von Proteinantigenen bei der Aktivierung CD4⁺ Zellen widerspiegelt (29). Dahingegen konnten mit der Peptidmischung mehr CD8⁺ Zellen aktiviert werden als mit dem kompletten Protein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung CD8⁺ Zellen mit dem Protein oder mit CMV-Lysat abhängig von intrazellulärer Spaltung und der Einschleusung in den MHC-I-Präsentationsweg ist (Kreuzpräsentation) (29). Dahingegen werden Peptide intrazellulär nicht zerkleinert, was sie effizienter in der Stimulation CD8⁺ Zellen macht (29).

2. Aktivierung autologer lymphomspezifischer T-Zellen

Von insgesamt sechs in dieser Arbeit getesteten MCL-Patienten gelang die Aktivierung Idiotyp-spezifischer T-Zellen in zwei Fällen: Bei der Patientin 3 produzierten nach dreimaliger Stimulation mit Idiotyppeptid-beladenen DC 0,16 % der CD8⁺ Zellen IFN γ , bei Patient 4 waren es 0,17 %.

Wen und Lim testeten in zwei Studien (30, 31) Idiotyppeptide aus allen drei komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) des Immunglobulins eines FL-Patienten, um antigene Strukturen zu identifizieren. Obwohl nach einmaliger Stimulation keine spezifischen Reaktionen messbar waren, konnten nach mehrmaliger Stimulation mit autologen PBMC und dem jeweiligen Peptid in allen drei Fällen spezifische T-Zell-Linien hergestellt werden. Diese produzierten in Gegenwart der Stimulatorzellen IFN γ , und zwar umso mehr, je häufiger die T-Zellen restimuliert wurden (30) und je höher die verwendete Peptidkonzentration war (31). Die T-Zell-Linie gegen das CDR-3-Peptid lysierte im Zytotoxizitätsassay sowohl Stimulatorzellen als auch autologe Lymphomzellen (30), während die übrigen T-Zell-Linien keine spezifische Lyse zeigten (31). Allerdings produzierte die CDR-1-spezifische T-Zell-Linie in Gegenwart autologer Lymphomzellen IFN γ (31).

Vuillier et al. (32) stellten 2003 eine Studie zur Idiotyp-spezifischen T-Zell-Aktivierung bei fünf B-CLL-Patienten (CLL = chronisch lymphatische Leukämie) vor, in der – wie in der vorliegenden Arbeit – DC als Stimulatorzellen verwendet wurden. Diese wurden entweder mit modifizierten CDR-3-Nonapeptiden, dem unveränderten CDR-3-Peptid oder kompletten, denaturierten Idiotypproteinen beladen. Nach insgesamt vier wöchentlichen DC-Stimulationen wurden CD8⁺ Lymphozyten mit autologen, stimulierten Tumorzellen inkubiert und die IFN γ -Produktion durchflusszytometrisch gemessen. Alle T-Zell-Linien produzierten IFN γ und der Anteil CD69⁺/IFN γ ⁺ Zellen betrug zwischen 7 und 23 % der CD8⁺ Zellen. T-Zell-Linien der drei Patienten mit indolenter B-CLL lysierten darüber hinaus spezifisch autologe Tumorzellen.

In anderen Studien werden T-Zellen nicht mit einzelnen Idiotyppeptiden, sondern mit dem kompletten Idiotypprotein stimuliert. Dieser Ansatz bietet sich besonders bei der Aktivierung myelomspezifischer T-Zellen an, da komplette Idiotypproteine aus dem Blut dieser Patienten isoliert werden können und nicht aufwendig synthetisiert werden müssen. Li et al. (33) stellten den Fall eines Myelompatienten vor, dessen T-Zellen in vitro erfolgreich gegen sein Idiotypprotein aktiviert wurden. Nach mehrmaliger Stimulation der T-Zellen mit Idiotypprotein-beladenen DC lysierten sie spezifisch autologe Tumorzellen und produzierten in deren Gegenwart IFN γ . Die FACS-Analyse ergab abzüglich der Negativkontrollen mit

gesunden autologen PBMC 9,3 % $CD8^+/CD69^+/IFN\gamma^+$ Zellen und 5,7 % $CD4^+/CD69^+/IFN\gamma^+$ T-Zellen. Mit einem ähnlichen Protokoll und ebenso erfolgreich aktivierten Wen et al. (34) autologe T-Zellen von zwei Myelompatienten in vitro gegen deren Idiotypproteine. Die T-Zell-Linien beider Patienten zerstörten im Zytotoxizitätsversuch autologe Myelomzellen und produzierten nach Antigenkontakt im ELISPOT-Assay (Enzyme-linked Immunospot Assay) $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$.

Garderet et al. (35) dagegen hatten weniger Erfolg beim Versuch der In-vitro-Aktivierung myelomspezifischer T-Zellen von sechs vortherapierten Patienten. Sie stimulierten autologe T-Zellen drei- bis viermal mit DC, die entweder mit Tumorzelllysate oder mit Idiotypproteinen beladen waren. In zwei Fällen zeigte sich eine erhöhte $IFN\gamma$ -Produktion der stimulierten T-Zellen im ELISPOT-Assay, aber keine spezifische Lyse autologer Myelomzellen im Zytotoxizitätsversuch. Bei den übrigen Patienten konnte mit keinem der beiden Verfahren eine spezifische Reaktion gemessen werden.

Obwohl die Vergleichbarkeit verschiedener Studien dadurch eingeschränkt wird, dass unterschiedliche Methoden zur Messung der T-Zell-Aktivierung herangezogen werden und in vielen Studien das komplette Idiotypprotein statt ausgewählter Idiotyppeptide zur T-Zell-Stimulation verwendet wird, bleiben die in dieser Arbeit erreichten Frequenzen Idiotypspezifischer T-Zellen doch hinter den Ergebnissen anderer Gruppen zurück. Während Vuillier et al. (32) und Li et al. (33) nach wiederholter Idiotypspezifischer Stimulation zwischen 7 und 23 % $IFN\gamma^+ CD8^+$ Lymphozyten in der Durchflusszytometrie maßen, erscheinen die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte unter 1 % sehr gering.

Garderet et al. (35) führen als einen möglichen Grund für das Scheitern der Idiotypprotein-spezifischen T-Zell-Aktivierung in ihrer Studie an, Blut von vortherapierten Patienten verwendet zu haben. Vier der untersuchten Patienten befanden sich in chemotherapeutischer Behandlung, wobei der Abstand zwischen der Zytostatikagabe und der Gewinnung der Zellen für die Stimulation in vitro 21-30 Tage betrug (35). Zudem waren zwei der sechs Patienten bereits wiederholt autolog stammzelltransplantiert worden (35). Auch alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Patienten hatten bereits mehrere Zyklen Chemotherapie erhalten und bei vier von ihnen war eine autologe SCT durchgeführt worden. Möglicherweise greifen diese Therapien nicht nur die Tumorzellen an, sondern auch gesundes Gewebe und somit auch gesunde Lymphozyten. So wurden bei zwei der in dieser Arbeit beschriebenen Patienten die Zellen für die In-vitro-Aktivierung am Tag der Stammzellapherese gewonnen. Etwa zwei Wochen zuvor waren diese Patienten standardgemäß mit Zytostatika behandelt worden: Patient 1 erhielt einen Zyklus DEXA-BEAM, Patient 2 seinen dritten Zyklus R-DHAP.

Dadurch wurden möglicherweise auch gesunde Lymphozyten derart geschädigt, dass die Zellen in vitro nicht mehr lange überlebten und keine Idiotyp-spezifische Aktivierung möglich war.

Desweiteren spielt die Reaktion des Immunsystems der Patienten auf Tumorzellen in vivo eine Rolle bei der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen in vitro. Zahlreiche Studien zeigen, dass in Tumorpatienten oft spontane Immunreaktionen gegen bestimmte Tumorantigene ablaufen (36-38). Aufgrund von Immunevasionsstrategien des Tumors, wie der Herstellung von Toleranz durch regulatorische T-Zellen, können diese malignomspezifischen Zellen in vivo den Tumor nicht zerstören (7, 36). Unter Laborbedingungen dagegen können die Schutzmechanismen des Tumors umgangen werden, so dass die Reaktivierung und Expansion vorbestehender tumorspezifischer T-Zellen möglich wird (7, 32, 39). Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen depletiert und die Zellkulturen mit IL-2 stimuliert, das aktivierte T-Zellen zur Proliferation anregt. Trotz dieser Maßnahmen konnte nur bei zwei Patienten eine geringe Idiotyp-spezifische Aktivierung gemessen werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die fehlende Idiotyp-spezifische Sensibilisierung des Immunsystems der Patienten in vivo sein. Dies muss nicht bedeuten, dass in diesen Patienten gar keine lymphomspezifischen Immunreaktionen abgelaufen sind; möglicherweise waren nur keine Zellen vorhanden, die gegen die ausgewählten Idiotyppeptide gerichtet waren.

Darüber hinaus ist das Antigenpektrum weniger Idiotyppeptide im Gegensatz zur Verwendung kompletter Idiotypproteine oder Tumorzelllysate wesentlich geringer. So zeigten Wen et al. (40), dass die Idiotyp-spezifische Immunreaktion nur einen Teil der gesamten tumorspezifischen T-Zell-Aktivität ausmacht. In der Studie wurden T-Zellen von vier Myelompatienten mit Tumorzelllysat-beladenen DC stimuliert und anschließend die Reaktivität der T-Zell-Linien gegen verschiedene Antigene getestet. Dabei konnten bei zwei der vier Patienten auch Idiotyp-spezifische Immunreaktionen nachgewiesen werden, die jeweils einen Bruchteil der T-Zell-Aktivität gegen Tumorzelllysate oder autologe Myelomzellen ausmachten.

3. Aktivierung allogener lymphomspezifischer T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen von drei gesunden HLA-A*02⁺ Spendern mit Idiotyppeptiden von HLA-identen MCL-Patienten bzw. der HLA-A*02⁺ MCL-Zelllinie Granta-519 stimuliert. Trotz dreimaliger Stimulation der T-Zellen mit Idiotyppeptid-

beladenen DC gelang in keinem der Versuche die Aktivierung allogener Idiotyp-spezifischer T-Zellen.

Trojan et al. (39) stellten im Jahr 2000 eine ähnliche Studie vor, bei der ebenfalls T-Zellen von HLA-A*02⁺ gesunden Spendern gegen Nona- oder Dekapeptide aus dem Immunglobulin verschiedener B-Zell-Tumoren aktiviert wurden. Jedes der Peptide, die mittels Bioinformatik ausgewählt worden waren, wurde an mehreren gesunden Spendern getestet. Nach drei- bis fünfmaliger Stimulation mit Peptid-beladenen APC zeigten T-Zellen von mindestens einem gesunden Spender gegen zehn von insgesamt 35 getesteten Peptiden eine positive Reaktion im *Chrom⁵¹Cr]-release-Assay*. Im Gegensatz dazu erzielten Kim et al. (41) 2003 einen hundertprozentigen Erfolg bei der T-Zell-Aktivierung zweier gesunder Spender gegen Idiotypproteine von Patienten mit multiplen Myelom. Verglichen mit unstimulierten T-Zellen zeigten T-Zellen nach dreimaliger Stimulation mit Idiotyp-beladenen DC signifikant höhere Zytokinwerte im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Desweiteren ergaben durchflusszytometrische Analysen im Verlauf der In-vitro-Stimulation einen zunehmenden Anteil CD8⁺ Zellen gegenüber der Ausgangszellpopulation.

Ein anderer Ansatz zur Aktivierung von Spender-T-Zellen gegen Empfänger malignome ist die Stimulation von T-Zellen mit ganzen Tumorzellen. Dies hat den Vorteil einer größeren Bandbreite von Antigenen und erfordert nicht die Kenntnis bestimmter antigener Strukturen auf den Tumorzellen. Andererseits besteht die Gefahr, dass sich die erzeugte Immunreaktion nicht nur gegen Tumorzellen, sondern auch gegen Strukturen im gesunden Gewebe des Patienten richtet. Hoogendoorn et al. stellten 2004 (42) und 2005 (43) zwei Studien vor, in denen B-CLL- bzw. MCL-Zellen durch Zytokine und Liganden zu APC ausdifferenziert wurden. Mithilfe dieser veränderten Tumorzellen gelang in insgesamt fünf Fällen die Aktivierung von T-Zellen gesunder HLA-I-identer Spender. Die auf diese Weise erzeugten T-Zell-Linien zeigten zytotoxische Aktivität sowohl gegen die Stimulatorzellen als auch gegen native Tumorzellen, allerdings auch gegen gesunde lymphatische Zellen der Patienten. Daraus schlossen die Autoren, dass die Immunreaktion der erzeugten T-Zell-Linien nicht tumorspezifisch, sondern möglicherweise gegen Minor-Histokompatibilitäts-Antigene der Patienten gerichtet war (42, 43). Trotz dieser Gefahr der Alloreaktivität gegen gesundes Gewebe des Empfängers bei der Verwendung modifizierter Tumorzellen als APC fand diese Methode bereits erfolgreich klinische Anwendung. 1999 stellten Falkenburg et al. (44) den Fall einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in der Akzelerationsphase vor, die durch adoptiven Transfer von in vitro hergestellten leukämiespezifischen Donor-T-Zellen eine komplette Remission erreichte. Die Patientin war drei Jahre zuvor allogenen

stammzelltransplantiert worden und hatte im Rezidiv schlecht auf DLI angesprochen. Daraufhin wurde ein Therapieversuch mit leukämiespezifischen Donor-T-Zellen unternommen. Die Donor-T-Zellen wurden mit bestrahlten CML-Zellen der Patientin stimuliert und vor dem adoptiven Transfer auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet. Dabei lysierten die T-Zellen zuverlässig CML-Zellen und zeigten keine bis geringe Reaktivität gegen gesunde Zellen der Patientin. Die Infusionen der T-Zell-Linien waren mit Fieber und Schüttelfrost verbunden, verursachten aber keine akute GvHD. Nach der dritten Infusion entwickelte die Patientin eine starke Knochenmarksdepression, von der sie sich nach einigen Wochen erholte und ein normales Blutbild zeigte. Das Knochenmark zeigte einen hundertprozentigen Donorchimärismus und es waren keine CML-Zellen mehr nachweisbar. Bis zu ihrem Tod zwei Jahre nach der adoptiven T-Zell-Therapie blieb die Patientin rezidivfrei. Nach diesem Erfolg setzte die Gruppe um Falkenburg die adoptive T-Zell-Therapie in einer Phase-I/II-Studie an einem größeren Patientenkollektiv ein, das auch Patienten mit akuter myeloischer Leukämie umfasste (45). Von acht Patienten, die nach allogener SCT ein Rezidiv erlitten hatten und mit tumorspezifischen Donor-T-Zellen behandelt wurden, profitierten vier von dieser Therapie. Zwei CML-Patienten erreichten vollständige Tumorfreiheit, darunter die in der vorherigen Studie beschriebene Patientin und ein Patient, der zusätzlich zu den spezifischen Donor-T-Zellen eine DLI erhielt. Bei zwei weiteren Patienten konnten die Donor-T-Zellen kurzzeitig das Fortschreiten der Erkrankung verhindern. Obwohl auch die in dieser Studie hergestellten spezifischen Donor-T-Zellen zum Teil gesunde Lymphozyten der Patienten in Zytotoxizitätsversuchen angriffen, trat GvHD nur bei dem Patienten auf, der gleichzeitig die DLI erhielt.

Diese Studien zeigen eindrücklich, dass die Herstellung tumorspezifischer T-Zellen von gesunden Spendern in vitro möglich ist und mit der klinischen Anwendung solcher T-Zell-Linien therapeutische Erfolge erzielt werden können. Ein Grund, weshalb in der vorliegenden Arbeit die tumorspezifische T-Zell-Aktivierung gesunder Spender nicht gelang, könnte die Verwendung weniger, spezifischer Antigene in Kombination mit einer kleinen Zahl untersuchter gesunder Spender sein. So erreichten Trojan et al. (39), die ebenfalls einzelne Peptide aus dem Immunglobulin von B-Zell-Tumoren zur T-Zell-Stimulation verwendeten, nur gegen knapp 30 % der getesteten Peptide eine Immunreaktion. Zudem war der Erfolg der T-Zell-Aktivierung spenderabhängig: Bei 70 % der getesteten Peptide gelang die Herstellung spezifischer T-Zell-Linien nicht bei allen gesunden Spendern, deren T-Zellen damit stimuliert wurden (39). Im Gegensatz dazu kann der Erfolg bei Verwendung eines breiteren Antigens größer sein: Kim et al. (41) konnten zwei von zwei getesteten gesunden Spendern gegen

Idiotypproteine von Myelompatienten aktivieren. Das komplette Idiotypprotein bietet weit mehr antigene Strukturen als ein einzelnes Idiotypeptid und hat zudem den Vorteil, dass die T-Zell-Aktivierung nicht HLA-abhängig ist, da das Idiotypprotein von DC aufgenommen und zerlegt wird, so dass zum individuellen HLA-Typ passende Fragmente entstehen können. Die meisten möglichen Antigene bietet die Verwendung kompletter Tumorzellen zur T-Zell-Stimulation – allerdings mit dem Risiko, dass die erzeugte Immunreaktion auch gegen gesunde Zellen gerichtet ist (42-45). Letztendlich hängt der Erfolg der Antigenstimulation von der Ausgangspopulation der stimulierten T-Zellen ab. Während verschiedene Studien belegen, dass aus dem Blut von Tumorpatienten T-Zellen isoliert werden können, die spezifisch für autologe Tumorantigene sind (36-38), ist dies bei gesunden Personen nicht zu erwarten (36). Denn während das Immunsystem des Patienten bereits Kontakt mit dem Tumor hatte und möglicherweise für einige Tumorantigene sensibilisiert wurde, sind solche Antigene für das Immunsystem eines Gesunden in der Regel unbekannt (46). In vitro könnten somit beim Versuch der autologen T-Zell-Aktivierung tumorspezifische Gedächtniszellen reaktiviert werden (47), während bei der Stimulation allogener T-Zellen eine de novo Immunreaktion generiert werden müsste (46). Da dies ein sehr komplexer Vorgang ist, der in vivo in den Lymphknoten stattfindet und an dem eine Vielzahl von Zellen und Botenstoffen beteiligt ist, ist die Initiierung einer solchen Immunantwort in vitro schwierig.

Ein möglicher Ausweg könnte die aktive Immunisierung von Stammzellspendern gegen tumorspezifische Antigene sein. Auf diese Weise könnten mit der allogenen SCT tumorspezifische T-Zellen auf den Empfänger übertragen werden. So konnten Li et al. (33) deutliche Idiotyp-spezifische Immunreaktionen nachweisen, nachdem zwei gesunde Spender aktiv mit den Idiotypproteinen der multiplen Myelome ihrer Empfänger geimpft worden waren. Vor der Immunisierung dagegen zeigten Spender-T-Zellen keine Reaktionen auf den Idiotyp. 2005 präsentierten Neelapu et al. (48) sogar klinische Erfolge mit der Stammzelltransplantation von derart vorimmunisierten Spendern auf drei Myelompatienten: Diese erreichten nach allogener SCT und anschließenden Booster-Impfungen mit dem individuellen Idiotypprotein komplette Tumorfreiheit und blieben mehrere Jahre rezidivfrei.

4. Vor- und Nachteile der Verwendung von Idiotypeptiden zur T-Zell-Stimulation

Als tumorspezifisches Antigen ist der Idiotyp eine sehr gute Zielstruktur für die Aktivierung lymphomspezifischer T-Zellen (8). Da der Idiotyp dem variablen Teil des B-Zell-Rezeptors entspricht (8), bieten sich Peptide aus diesem Bereich des Immunglobulins zur T-Zell-Stimulation an.

Ein Vorteil der Verwendung von kurzen Peptiden im Gegensatz zu längeren Sequenzen oder kompletten Proteinen ist die gute Stimulierbarkeit CD8⁺ T-Zellen (29, 49). Maecker et al. (29) und Kiecker et al. (49) zeigten dies am Beispiel von CMV-Peptiden und -Proteinen. Maecker et al. (29) verglichen die Stimulierbarkeit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen dem intakten CMV-pp65-Protein und Peptiden von 15 Aminosäuren Länge aus demselben Protein. Dabei zeigte sich, dass CD4⁺ Zellen im Gegensatz zu CD8⁺ schon mit sehr niedrigen Proteinkonzentrationen aktiviert werden konnten, während CD8⁺ T-Zellen durch die Peptide stärker aktiviert wurden als durch das Protein. Kiecker et al. (49) verglichen desweiteren Peptide verschiedener Längen aus dem CMV-pp65-Protein hinsichtlich der Aktivierbarkeit CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und fanden heraus, dass Nona- oder Dekapeptide am besten geeignet sind, CD8⁺ Zellen zu aktivieren. Für die gleichzeitige Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen können Peptide von 15 Aminosäuren Länge verwendet werden, weil sich die kürzeren Peptide nicht für die Stimulation CD4⁺ Zellen eignen (49). Da für eine langfristige Immunreaktion gegen Tumorzellen in vivo die simultane Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten nötig zu sein scheint (33, 44), wäre es möglicherweise sinnvoll, Idiotypeptide von 15 Aminosäuren Länge für die T-Zell-Stimulation zu verwenden.

Werden Idiotypeptide durch theoretische Berechnungen ausgewählt, ist fraglich, ob sie tatsächlich von APC präsentiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gensequenz des Idiotyps mithilfe der Datenbank *SYFPEITHI* auf Nonapeptide untersucht, die Liganden des MHC-I-Typs der Patienten sein könnten. Das Prinzip dieser Datenbank besteht darin, dass aufgrund zahlreicher bekannter MHC-Liganden die Wahrscheinlichkeit berechnet wird, mit der sich ein synthetisches Peptid an Moleküle eines bestimmten HLA-Typs anlagert (22). Bei dieser theoretischen Herangehensweise besteht jedoch das Risiko, dass die ausgewählten Peptide doch nicht oder nur mit geringer Affinität an die MHC-I-Moleküle des Patienten binden (22). Um sicher zu sein, dass die Peptide tatsächlich passen, müsste dies durch praktische Versuche bestätigt werden. Dazu eignen sich zum Beispiel Tetrameranalysen oder ein von Trojan et al. (39) angewandtes Verfahren zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von Idiotypeptiden an HLA-A*02-Moleküle durch Tests mit T2-Zellen. Diese Zellen sind nicht in der Lage, intrazellulär prozessierte Proteine an MHC-Moleküle gebunden zu präsentieren, sodass sich Peptide nur von außen an die unbeladenen MHC-Moleküle anlagern können.

Ein weiterer Punkt, der die Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung schwierig macht, ist die geringe Immunogenität von Idiotypeptiden (50). Daher gab es Bemühungen, diese Peptide durch Austausch einzelner Aminosäuren leicht zu verändern, so dass sie eine stärkere

Affinität zum gewünschten HLA-Typ bekommen, aber trotzdem das Epitop erhalten bleibt. Trojan et al. (39) beschrieben in der oben genannten Studie auch die T-Zell-Stimulation mit zwei derart veränderten, sogenannten „heteroklitischen“ Peptiden. T-Zellen, die mithilfe dieser Peptide aktiviert wurden, lysierten im Zytotoxizitätsversuch sogar Tumorzellen und APC, die mit dem unveränderten Peptid beladen waren. Die Versuche mit den entsprechenden unmodifizierten Peptiden zeigten dagegen in einem Fall gar keinen Erfolg, im anderen nur bei einem Teil der getesteten Probanden. Eine größere Studie, bei der 16 weitere „heteroklitische“ Peptide mit den unveränderten Peptiden von Patienten aus der vorangegangenen Studie verglichen wurden, bestätigte diese Ergebnisse (50).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Idiotypeptide vor allem wegen ihrer hohen Spezifität für Lymphomzellen grundsätzlich ein ideales Ziel für T-Zellen darstellen. Durch verschiedene Maßnahmen, wie die sorgfältige Auswahl der Peptidlänge oder die Verwendung modifizierter Peptide mit erhöhter Affinität zu den HLA-Molekülen, kann die Idiotype-spezifische Lymphozytenstimulation effektiver gemacht werden. Mithilfe von Bioinformatik ausgewählte Peptide müssen zusätzlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durch weitere In-vitro-Analysen funktionell getestet werden, z. B. bezüglich ihrer tatsächlichen Bindungsfähigkeit.

V. Zusammenfassung

Die Prognose des Mantelzelllymphoms ist trotz aggressiver Behandlung durch Chemotherapie und autologe Stammzelltransplantation schlecht. Um Rezidive zu verhindern, muss die minimale Resterkrankung erfolgreich behandelt werden. Eine Möglichkeit dazu bietet die zelluläre Immuntherapie mit lymphomspezifischen T-Zellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen gegen den Idiotyp von Mantelzelllymphomen *in vitro*. Es wurden sowohl T-Zellen von Mantelzelllymphompatienten wie auch von gesunden Spendern auf Idiotyp-spezifische Immunreaktionen untersucht. Dazu wurden Monozyten durch Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Diese wurden mit Idiotypeptiden beladen und mithilfe eines Zytokincocktails aus IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE $_2$ oder TLR7/8- und sCD40-Liganden ausgereift. T-Zellen wurden mehrmals mit diesen dendritischen Zellen stimuliert und die Interferon- γ -Produktion der T-Zellen wurde als Aktivierungsmarker durchflusszytometrisch gemessen.

Zunächst wurde das Protokoll an Blutproben gesunder CMV $^+$ Spendern getestet. Nach einmaliger Stimulation mit CMV-Antigen-beladenen dendritischen Zellen produzierten 0,5-0,7 % der T-Zellen Interferon γ . Dieser Wert konnte durch mehrmalige Stimulation und die Zugabe von IL-2 auf bis zu 14,6 % der CD8 $^+$ Zellen gesteigert werden. Die Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung dagegen war trotz Depletion der regulatorischen T-Zellen in keinem der drei getesteten gesunden Probanden möglich. Bei den Mantelzelllymphompatienten konnte in zwei von sechs Fällen eine geringe Idiotyp-spezifische Immunreaktion nachgewiesen werden: Nach dreimaliger Stimulation mit Idiotypebeladenen dendritischen Zellen produzierten in einem Fall 0,17 %, im anderen 0,16 % der CD8 $^+$ Zellen Interferon γ . Diese Ergebnisse ließen sich nur bei der Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen erzielen, die mithilfe von TLR7/8- und sCD40-Liganden ausgereift worden waren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Idiotyp-spezifische T-Zell-Aktivierung bei Mantelzelllymphompatienten zwar schwierig, aber dennoch möglich ist. Ein wichtiger Schritt für folgende Studien wäre die Expansion der aktivierten T-Zellen, um weitergehende Untersuchungen wie Tetrameranalysen und Zytotoxizitäts-Versuche durchführen zu können.

VI. Literaturverzeichnis

- (1) Witzig, T. E. (2005): Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 23, 6409-6414
- (2) DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V., Dreyling, M., Hiddemann, W., Trümper, L., Pfreundschuh, M. (2007): Leitlinien Maligne Lymphome, Stand Februar 2007
- (3) Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wörmann, B., Dührsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2005): Immunochemotherapy with Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J. Clin. Oncol.*, 23, 1984-1992
- (4) Dreyling, M., Lenz, G., Hoster, E., Hoof, A. van, Gisselbrecht, C., Schmits, R., Metzner, B., Truemper, L., Reiser, M., Steinhauer, H., Boiron, J.-M., Boogaerts, M. A., Aldaoud, A., Silingardi, V., Kluin-Nelemans, H. C., Hasford, J., Parwaresch, R., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2005): Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*, 105, 2677-2684
- (5) Ganti, A. K., Bierman, P. J., Lynch, J. C., Bociek, R. G., Vose, J. M., Armitage, J. O. (2005): Hematopoietic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Ann. Oncol.*, 16, 618-624
- (6) Dreyling, M., Hiddemann, W. (2009): Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2009, 542-551

- (7) Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009): *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- (8) Houot, R., Levy, R. (2009): Vaccines for lymphomas: Idiotypic vaccines and beyond. *Blood Rev.* 23, 137-142
- (9) Inogès, S., Rodríguez-Calvillo, M., Zabalegui, N., López-Díaz, A. de Cerio, Villanueva, H., Soria, E., Suárez, L., Rodríguez-Caballero, A., Pastor, F., García-Muñoz, R., Panizo, C., Pérez-Calvo, J., Melero, I., Rocha, E., Orfao, A., Bendandi, M. (2006): Clinical benefit associated with idiotypic vaccination in patients with follicular lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98, 1292-1301
- (10) Neelapu, S. S., Kwak, L. W., Kobrin, C. B., Reynolds, C. W., Janik, J. E., Dunleavy, K., White, T., Harvey, L., Pennington, R., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Steinberg, S. M., Gress, R., Hakim, F., Wilson, W. H. (2005): Vaccine-induced tumor-specific immunity despite severe B-cell depletion in mantle cell lymphoma. *Nat. Med.*, 11, 986-991
- (11) Levy, R., Robertson, M. J., Ganjoo, K., Leonard, J., Vose, J., Denney, D. J. (2008): Results of a phase 3 trial evaluating safety and efficacy of specific immunotherapy, recombinant idiotype (Id) conjugated to KLH (Id-KLH) with GM-CSF, compared to non-specific immunotherapy, KLH with GM-CSF, in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma (fNHL). *AACR Meeting Abstracts*, Abstract LB-204
- (12) Schuster, S. J., Neelapu, S. S., Gause, B. L., Muggia, F. M., Gockerman, J. P., Sotomayor, E. M., Winter, J. N., Flowers, C. R., Stergiou, A. M., Kwak, L. W. (2009): Idiotype vaccine therapy (BiovaxID) in follicular lymphoma in first complete remission: Phase III clinical trial results. *J. Clin. Oncol.*, 27, 18S

- (13) Freedman, A., Neelapu, S. S., Nichols, C., Robertson, M. J., Djulbegovic, B., Winter, J. N., Bender, J. F., Gold, D. P., Ghalie, R. G., Stewart, M. E., Esquibel, V., Hamlin, P. (2009): Placebo-controlled phase III trial of patient-specific immunotherapy with Mitumprotimut-T and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after Rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 27, 3036-3043
- (14) Bendandi, M. (2010): Hybridoma-derived idiotype vaccine for lymphoma: approval must wait. *Pharmaceuticals*, 3, 667-678
- (15) Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., Levy, R. (1996): Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 2, 52-58
- (16) Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Capsar, C. B., Okada, C. Y., Beckhoven, A. van, Liles, T. M., Engleman, E. G., Levy, R. (2002): Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 99, 1517-1526
- (17) Di Nicola, M., Zappasodi, R., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Pupa, S. M., Magni, M., Devizzi, L., Matteucci, P., Baldassari, P., Ravagnani, F., Cabras, A., Anichini, A., Gianni, A. M. (2009): Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood*, 113, 18-27
- (18) Butcher, B. W., Collins, R. H. (2005): The graft-versus-lymphoma effect: clinical review and future opportunities. *Bone Marrow Transplant.*, 36, 1-17
- (19) Heslop, H. E., Slobod, K. S., Pule, M. A., Hale, G. A., Rousseau, A., Smith, C. A., Bollard, C. M., Liu, H., Wu, M.-F., Rochester, R. J., Amrolia, P. J., Hurwitz, J. L., Brenner, M. K., Rooney, C. M. (2010): Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*, 115, 925-935

- (20) Bollard, C. M., Aguilar, L., Straathof, K. C., Gahn, B., Huls, M. H., Rousseau, A., Sixbey, J., Gresik, M. V., Carrum, G., Hudson, M., Dilloo, D., Gee, A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., Heslop, H. E. (2004): Cytotoxic T Lymphocyte therapy for Epstein - Barr Virus⁺ Hodgkin's Disease. *J. Exp. Med.*, 200, 1623-1633
- (21) Bollard, C. M., Gottschalk, S., Leen, A. M., Weiss, H., Straathof, K. C., Carrum, G., Khalil, M., Wu, M.-F., Huls, M. H., Chang, C.-C., Gresik, M. V., Gee, A. P., Brenner, M. K., Rooney, C. M., Heslop, H. E. (2007): Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood*, 110, 2838-2845
- (22) Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N. P. N., Bachor, O. A., Stevanović, S. (1999): SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50, 213-219
- (23) Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A. H. (1997): Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, 27, 3135-3142
- (24) Xu, S., Koldovsky, U., Xu, M., Wang, D., Fitzpatrick, E., Son, G., Koski, G., Czerniecki, B. J. (2006): High-avidity antitumor T-cell generation by toll receptor 8-primed, myeloid-derived dendritic cells is mediated by IL-12 production. *Surgery*, 140, 170-178
- (25) McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C.-R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D., Riddell, S. R. (1994): Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol.*, 43, 103-110
- (26) Kern, F., Faulhaber, N., Frömmel, C., Khatamzas, E., Prösch, S., Schönemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H.-D., Reinke, P. (2000): Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur. J. Immunol.*, 30, 1676-1682

- (27) Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I.-M., Pruss, A., Gratama, J.-W., Volkmer-Engert, R., Ewert, R., Reinke, P., Volk, H.-D., Picker, L. J. (2002): Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J. Infect. Dis.*, 185, 1709-1716
- (28) Trivedi, D., Williams, R. Y., O'Reilly, R. J., Koehne, G. (2005): Generation of CMV-specific T lymphocytes using protein-spanning pools of pp65-derived overlapping pentadecapeptides for adoptive immunotherapy. *Blood*, 105, 2793-2801
- (29) Maecker, H. T., Ghanekar, S. A., Suni, M. A., He, X.-S., Picker, L. J., Maino, V. C. (2001): Factors affecting the efficiency of CD8⁺ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J. Immunol.*, 166, 7268-7275
- (30) Wen, Y.-J., Lim, S. H. (1997): T cells recognize the VH complementarity-determining region 3 of the idiotypic protein of B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Immunol.*, 27, 1043-1047
- (31) Wen, Y.-J., Lim, S. H. (1999): Different properties of T-cell epitopes within complementarity-determining regions 1 and 2 of idiotypic VH in B-Lymphoma. *Scand. J. Immunol.*, 50, 296-301
- (32) Vuillier, F., Maloum, K., Thomas, E. K., Magnac, C., Dumas, G., Payelle-Brogard, B., Oppezzo, P., Dighiero, G., Scott-Algara, D. (2003): Idiotypic-pulsed dendritic cells are able to induce antitumoral cytotoxic CD8 cells in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 120, 243-250
- (33) Li, Y., Bendandi, M., Deng, Y., Dunbar, C., Munshi, N., Jagannath, S., Kwak, L.W., Lysterly, H. K. (2000): Tumor-specific recognition of human myeloma cells by idiotype-induced CD8⁺ T cells. *Blood*, 96, 2828-2833

- (34) Wen, Y.-J., Barlogie, B., Yi, Q. (2001): Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells. *Blood*, 97, 1750-1755
- (35) Garderet, L., Mazurier, C., Pellat-Deceunynck, C., Karim, A., Baudin, B., Funck-Brentano, C., Bouchet, S., Geffroy, A., Bataille, R., Gorin, N.-C., Lopez, M. (2006): Poor ex vivo induction of T-cell responses to idiotype or tumor cell lysate-pulsed autologous dendritic cells in advanced pre-treated multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, 47, 1340-1347
- (36) Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F. M., Letsch, A., Keilholz, U. (2003): Natural T cell immunity against cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9, 4296-4303
- (37) Veelken, H., Osterroth, F. (2002): Vaccination strategies in the treatment of lymphomas. *Oncology*, 62, 187-200
- (38) Reza Rezvany, M., Jeddi-Tehrani, M., Rabbani, H., Lewin, N., Avila-Cariño, J., Österborg, A., Wigzell, H., Mellstedt, H. (2000): Autologous T lymphocytes may specifically recognize leukaemic B cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 111, 608-617
- (39) Trojan, A., Schultze, J. L., Witzens, M., Vonderheide, R. H., Ladetto, M., Donovan, J. W., Gribben, J. G. (2000): Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell-malignancies. *Nat. Med.*, 6, 667-672
- (40) Wen, Y.-J., Min, R., Tricot, G., Barlogie, B., Yi, Q. (2002): Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood*, 99, 3280-3285
- (41) Kim, S.-B., Baskar, S., Kwak, L. W. (2003): In vitro priming of myeloma antigen-specific allogeneic donor T cells with idiotype pulsed dendritic cells. *Leuk. Lymphoma*, 44, 1201-1208

- (42) Hoogendoorn, M., Olde Wolbers, J., Smit, W. M., Schaafsma, M. R., Barge, R. M. Y., Willemze, R., Falkenburg, J. H. F. (2004): Generation of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)-reactive T-cell lines and clones from HLA class I-matched donors using modified B-CLL cells as stimulators: implications for adoptive immunotherapy. *Leukemia*, 18, 1278-1287
- (43) Hoogendoorn, M., Olde Wolbers, J., Smit, W. M., Schaafsma, M. R., Jedema, I., Barge, R. M. Y., Willemze, R., Falkenburg, J. H. F. (2005): Primary allogeneic T-cell responses against mantle cell lymphoma antigen-presenting cells for adoptive immunotherapy after stem cell transplantation. *Clin. Cancer Res.*, 11, 5310-5318
- (44) Falkenburg, J. H. F., Wafelman, A. R., Joosten, P., Smit, W. M., Bergen, C. A. M. van, Bongaerts, R., Lurvink, E., Hoorn, M. van der, Kluck, P., Landegent, J. E., Kluin-Nelemans, H. C., Fibbe, W. E., Willemze, R. (1999): Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 94, 1201-1208
- (45) Marijt, E., Wafelman, A., Hoorn, M. van der, Bergen, C. van, Bongaerts, R., Luxemburg-Heijs, S. van, Muijsenberg, J. van den, Olde Wolbers, J., Werff, N. van der, Willemze, R., Falkenburg, F. (2007): Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 92, 72-80
- (46) Montagna, D., Maccario, R., Locatelli, F., Rosti, V., Yang, Y., Farness, P., Moretta, A., Comoli, P., Montini, E., Vitiello, A. (2001): Ex vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood*, 98, 3359-3366
- (47) Riddell, S.R. (2007): Engineering antitumor immunity by T-cell adoptive immunotherapy. *Hematology* 2007, 250-256

- (48) Neelapu, S. S., Munshi, N. C., Jagannath, S., Watson, T. M., Pennington, R., Reynolds, C., Barlogie, B., Kwak, L. W. (2005): Tumor antigen immunization of sibling stem cell transplant donors in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.*, 36, 315-323
- (49) Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H.-D., Volkmer-Engert, R., Kern, F. (2004): Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides- what kind of peptide for which purpose? *Hum. Immunol.*, 65, 523-536
- (50) Harig, S., Witzens, M., Krackhardt, A. M., Trojan, A., Barrett, P., Broderick, R., Zauls, A. J., Gribben. J. G. (2001): Induction of cytotoxic T-cell responses against immunoglobulin V region-derived peptides modified at human leukocyte antigen-A2 binding residues. *Blood*, 98, 2999-3005

VII. Danksagungen

Ich danke meinem Doktorvater Benedikt Gahn für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, die Ergebnisse in Form eines Posters beim Cellular Therapy Kongress in Erlangen 2011 selbst vorstellen zu können. Im Rahmen dessen bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Verfassung des Abstracts und des Posters.

Besonderer Dank gilt Matthias Staudinger aus dem Mildred-Scheel-Haus für die Einführung in die Laborarbeit, die Anleitung und Hilfe bei durchflusszytometrischen Messungen und deren Auswertung, sowie für anregende Diskussionen und die Beantwortung unzähliger Fragen.

Desweiteren danke ich Sebastian Böttcher für die Hilfe bei der Auswertung durchflusszytometrischer Messungen im wissenschaftlichen Labor der II. Medizinischen Klinik und Ingrid Bolz für die Organisation der Peptide. Besonders möchte ich mich bei den MTAs im FACS-Labor bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für ihre moralische Unterstützung und das Mittragen dieser Arbeit danke ich meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders Ansgar Kregel-Olf und Dominique Wellnitz.

VIII. Lebenslauf

Persönliches

Name: **Imke Kockläuner**
Geboren: 07.05.1987 in Hannover
Eltern: *Vater:* Prof. Dr. Gerhard Kockläuner, geb. 1951
Mutter: Gabriele Fletemeyer-Kockläuner, geb. 1953

Ausbildung

1993-1997 Astrid-Lindgren-Grundschule, Schwentinental
1997-2006 Gymnasium Elmschenhagen, Kiel
2006 Abitur
2006-2012 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2008 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2011/ Praktisches Jahr
2012 - Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus Kiel
- Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- Chirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
2012 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Doktorarbeit

2008-2010 wissenschaftliche Laborarbeiten in der II. Medizinischen
Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
2011 Vorstellung der Doktorarbeit beim Cellular Therapy Kongress in Erlangen in
Form eines Posters

Veröffentlichung Kockläuner, I., Staudinger, M., Böttcher, S., Bolz, I., Gramatzki, M.,
Kneba, M., Gahn, B. (2011): Activation of lymphoma-specific T-cells
from mantle cell lymphoma patients by stimulation with idio-
type-pulsed dendritic cells in vitro. 6th International Symposium on the
Clinical Use of Cellular Products, Cellular Therapy 2011, A39