

AUS DEM UNIVERSITÄTSKLINIKUM MÜNSTER  
MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK - INNERE MEDIZIN A  
KNOCHENMARKTRANSPLANTATIONS-ZENTRUM  
-DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. W. E. BERDEL-

STIMULATION DER ALLOGENEN T-ZELL-ANTWORT AUF  
NORMALE UND MALIGNEN B-LYMPHOZYTEN DURCH  
CD40LIGAND

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE  
DER  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER  
WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

VORGELEGT VON  
THILO PETER KAISER  
AUS HAMM/WESTFALEN

2002

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Joachim Kienast

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stephan Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik - Innere Medizin A  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel-  
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Kienast  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. S. Grabbe

### **Zusammenfassung**

## **Stimulation der allogenen T-Zell-Antwort auf normale und maligne B-Lymphozyten durch CD40Ligand**

Kaiser, Thilo Peter

Die vorliegende Arbeit gibt einen weiterführenden Einblick in die Möglichkeiten der ex- vivo-Generierung und Expansion allogener, lymphomreaktiver zytotoxischer T-Zellen (CTL) über Stimulation mit CD40Ligand(CD40L)-aktivierten malignen B-Zellen. Sie dient als Grundlage für eine geplante allogene T-Zell-Therapie zur Induktion beziehungsweise Verstärkung eines Graft-versus-Lymphoma-Effektes.

Durch die CD40L-Aktivierung konnten maligne B-Zellen von Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie oder einem Immunozytom in vitro in optimal antigen-präsentierende Zellen transformiert werden, welche bei allogenen, nicht-HLA-typisierten T-Zellen eine zytotoxische Aktivität gegenüber nativen und aktivierten malignen B-Zellen sowie fremden gesunden aktivierten B-Zellen induzierten. Die induzierte Antwort war keine MHC-I-restringierte unspezifische Alloreaktivität, sondern gegen ein Merkmal gerichtet, das offensichtlich von gesunden und malignen B-Zellen exprimiert wird. Dieses Merkmal ist noch nicht näher charakterisiert; nach der Analyse der zytotoxischen T-Zell-Antwort handelt es sich aber am ehesten um ein Pan-B-Antigen oder ein Merkmal für aktivierte B-Zellen, da andere Zellgruppen nicht lysiert wurden. Durch die Stimulation zeigten die generierten CTL eine mediane Verdreifachung der Zellzahlen sowie eine signifikante Interferon- $\gamma$ -Sekretion. Im Einzelversuch konnte eine tumorspezifische T-Zell-Antwort eines HLA-identen Stammzellspenders gegenüber den malignen B-Zellen des Empfängers induziert werden, während sich autologe T-Zellen von Patienten in Zytotoxizitätsmessungen stets anerg zeigten. Die Arbeit schafft somit Voraussetzungen für den Einsatz von in vitro generierten CTL als adjuvante adoptive Immuntherapie.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2003

Meinen Eltern gewidmet

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 <i>Lymphozytische Lymphome und Immunozytom</i></b>                           | <b>1</b>  |
| <b>1.2 <i>Rationale für eine Immuntherapie</i></b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.1 <i>Geräte, Materialien, Kulturmedien und Antikörper</i></b>                  | <b>6</b>  |
| 2.1.1 Geräte  | 6         |
| 2.1.2 Materialien   | 7         |
| 2.1.3 Kulturmedien und Lösungen   | 8         |
| 2.1.4 Antikörper  | 10        |
| <b>2.2 <i>Zelllinien</i></b>  | <b>11</b> |
| 2.2.1 Suspensionszellkultur   | 11        |
| 2.2.2 tCD40L-Fibroblastenkultur   | 11        |
| <b>2.3 <i>Gewinnung der Zellen aus dem Blut gesunder Probanden</i></b>              | <b>12</b> |
| 2.3.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PMNC)                          | 12        |
| 2.3.2 Aktivierung gesunder B-Zellen über das CD40/CD40L-System                      | 13        |
| 2.3.2.1 Vorbereitung der tCD40L-Platten   | 13        |
| 2.3.2.2 B-Lymphozyten-Kultur  | 13        |
| 2.3.3 Isolierung von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch magnetische Separation        | 15        |
| 2.3.4 PHA-Blasten   | 16        |
| <b>2.4 <i>Aufarbeitung der Patientenproben</i></b>                                  | <b>17</b> |
| 2.4.1 Maligne B-Zellen  | 17        |
| 2.4.1.1 Aufarbeitung  | 17        |
| 2.4.1.2 Aktivierung über das CD40/CD40L-System                                      | 18        |
| 2.4.2 Knochenmarkstromazellen   | 18        |
| 2.4.3 T-Zellen  | 19        |
| <b>2.5 <i>Induktion B-Zell-/bzw. lymphomspezifischer cytotoxischer T-Zellen</i></b> | <b>20</b> |
| 2.5.1 Vorbereitung der Stimulatorzellen   | 20        |
| 2.5.2 Kultivierung cytotoxischer T-Zellen   | 20        |
| <b>2.6 <i>Durchflusszytometrische Analysen</i></b>                                  | <b>23</b> |
| <b>2.7 <i>Messung der zytolytischen Aktivität</i></b>                               | <b>25</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>2.8</b> | <b><i>Messung der Zytokinkonzentration</i></b>   | <b>27</b> |
| 2.8.1      | Zytokinkonzentration im Überstand der CTL-Kulturen                                     | 27        |
| 2.8.2      | Koinkubationsansätze   | 27        |
| 2.8.3      | Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA)  | 28        |
| <b>2.9</b> | <b><i>Statistische Auswertung und Präsentation</i></b>                                 | <b>31</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Ergebnisse</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1</b> | <b><i>Vorbereitende Versuche mit gesunden PMNC</i></b>                                 | <b>32</b> |
| 3.1.1      | PMNC-Zellpopulationen  | 32        |
| 3.1.2      | Aktivierung gesunder B-Zellen  | 34        |
| <b>3.2</b> | <b><i>Charakterisierung und Aktivierung maligner B-Zellen</i></b>                      | <b>40</b> |
| 3.2.1      | Patientenkollektiv   | 40        |
| 3.2.2      | Aktivierung maligner B-Zellen  | 43        |
| 3.2.2.1    | Immunphänotyp nativer maligner B-Zellen  | 43        |
| 3.2.2.2    | Immunphänotyp nach Aktivierung mit CD40Ligand  | 45        |
| 3.2.2.3    | Wachstumsverhalten in der tCD40L-Kokultur  | 47        |
| <b>3.3</b> | <b><i>Zytotoxizität von CTL nach Stimulation mit aktivierten malignen B-Zellen</i></b> | <b>49</b> |
| 3.3.1      | Stimulation autologer T-Zellen   | 49        |
| 3.3.2      | Stimulation von T-Zellen des HLA-identen Spenders                                      | 52        |
| 3.3.3      | Stimulation allogener, nicht-HLA-typisierter T-Zellen                                  | 55        |
| <b>3.4</b> | <b><i>Zytokinantwort der CTL auf ihre Stimulation</i></b>                              | <b>60</b> |
| 3.4.1      | Zytokine im Überstand der CTL-Kulturen   | 60        |
| 3.4.2      | Spezifische Zytokinantwort der CTL in Koinkubationsansätzen                            | 62        |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>63</b> |
| <b>4.1</b> | <b><i>Diskussion der Einzelergebnisse</i></b>  | <b>63</b> |
| <b>4.2</b> | <b><i>Resümee</i></b>  | <b>72</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>74</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Danksagung</b>  | <b>83</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Lebenslauf</b>  | <b>84</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>I</b>  |

---

# 1. Einleitung

## 1.1 *Lymphozytische Lymphome und Immunozytom*

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) und das Immunozytom sind lymphozytische Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) von niedrigem Malignitätsgrad (Harris et al. [36]).

Mit einer Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen/100 000 Einwohner/Jahr in Deutschland ist die B-CLL das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (11 %). Zudem stellt sie in den westlichen Ländern mit 30 % den größten Anteil aller Leukämieformen. Die Ätiologie der B-CLL ist unklar. Mit steigendem Lebensalter nimmt die Erkrankungshäufigkeit zu, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Knauf [40]). Beim Immunozytom, welches etwa 7,8 % der lymphozytischen NHL stellt, sind Männer und Frauen gleich häufig betroffen, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren (Emmerich [27]; Meusers [49]).

Die B-CLL ist eine monoklonale B-Zell-Erkrankung morphologisch reif erscheinender, jedoch immunologisch inkompetenter B-Lymphozyten mit langsamer Proliferationsrate (Dameshek [17]). Sie akkumulieren in Blut, Knochenmark, Lymphknoten und Milz und führen zur Organvergrößerung und Knochenmarkinsuffizienz. Der Beginn ist meist schleichend. Als unspezifische Leitsymptome treten Lymphknotenschwellungen, Leber- und Milzvergrößerungen sowie eine Leukozytose auf. Ein Teil der Patienten gibt bei der Diagnosestellung B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust an. Der Krankheitsverlauf ist durch die zunehmende Tumorzellmasse und eine hämatopoetische und immunologische Insuffizienz gekennzeichnet. Opportunistische Infektionen und akute Infekte sind Haupttodesursache. Als weitere Komplikationen können Autoimmunzytopenien, besonders die autoimmunhämolytische Anämie, und assoziierte Störungen auftreten. In einigen Fällen wird die Transformation in ein hochmalignes NHL (Richter-Syndrom), ein Plasmozytom oder eine Prolymphozytenleukämie beobachtet, welche trotz Therapie rasch zum Tode führen. Auch Sekundärmalignome wie Hirntumoren und Melanome treten gehäuft auf (Knauf [40]).

---

Demgegenüber ist das Manifestationsmuster beim Immunozytom unterschiedlich und variabler. Nicht immer ist das Knochenmark infiltriert und nur in 30 % der Fälle findet man eine leukämische Aussaat der Lymphomzellen (Meusers [49]).

Für die Diagnosestellung ist eine immunphänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie erforderlich. Charakteristisch für die B-CLL ist die Koexpression von CD5 mit einem typischen B-Zell-Marker (CD19 oder CD20). Die Monoklonalität wird durch Bestimmung einer Leichtkettenrestriktion mittels Antikörpern gegen die Kappa- bzw. Lambda-Immunglobulin-Leichtkette nachgewiesen. Immunozytomzellen zeigen eine Abwesenheit von CD5, während eine starke intrazytoplasmatische Immunglobulin-Positivität vorhanden ist (Knauf [40]; Meusers [49]).

Der natürliche Krankheitsverlauf variiert mit einer medianen Überlebenszeit ab Erstdiagnose von zwei bis über zehn Jahren. Die Tumormasse und das Ausmaß der Knochenmarkinsuffizienz sind grundlegend für die Stadieneinteilung in prognostisch differente Gruppen nach Binet et al. [5]. Zur Unterscheidung indolenter Frühformen von solchen mit rascher Progression werden als aussagekräftige Faktoren unter anderem das Knochenmarkinfiltrationsmuster und die Lymphozytenverdopplungszeit verwendet.

Bei zunehmender Intensivierung der Therapiestrategien können diese B-NHL-Formen durch die verfügbaren Therapien einschließlich Hochdosismoradiotherapie mit autologem Stammzellsupport nicht geheilt werden. So ist in den letzten Jahren zunehmend die allogene Stammzelltransplantation als Therapieoption untersucht worden (Verdonck [66]). Trotz einer relativ hohen transplantationsassoziierten Mortalität zeichnen sich nach einer kritischen Frühphase für einen Teil dieser Patienten langanhaltende Remissionen, womöglich Heilungen ab. Dies wird verbunden mit dem sogenannten *Graft-versus-Lymphoma-Effekt*, der nach der Transplantation für eine zusätzliche Eradikation residualer Tumorzellen verantwortlich gemacht wird (Kolb [41]). Meist ist dieser Effekt verbunden mit einer *Graft-versus-Host-Erkrankung*, die für den Patienten sehr schwer verlaufen kann. Verantwortlich für beide immunologischen Ereignisse sind übertragene Lymphozyten des Spenders, welche auf vorhandene Gewebeunterschiede in unterschiedlicher Ausprägung reagieren.

---

## 1.2 Rationale für eine Immuntherapie

Allogene Stammzelltransplantationen haben als erste Therapieform einen langfristigen Nutzen und mögliche Heilung für B-NHL-Patienten gezeigt (Verdonck [66]). Der Erfolg der Therapie ist jedoch häufig mit einer schweren *Graft-versus-Host-Erkrankung* verbunden, die für den Patienten sogar Todesursache sein kann. Im Rahmen der *Graft-versus-Host-Erkrankung* wird aber auch häufig ein *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* beobachtet, welcher wahrscheinlich der Grund für das kurative Potential einer allogenen Transplantation ist (Kolb [41]). Mit der Entdeckung, dass B-NHL-Zellen einen spezifischen Oberflächenrezeptor exprimieren und diesen Idiotyp antigenspezifischen T-Zellen präsentieren können (Krolick [42]), rückte die Möglichkeit einer Immuntherapie mit dem Ziel, einen *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* zu induzieren oder zu verstärken, in den Vordergrund. Verschiedene Impfstrategien zur Förderung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort wurden daher in den letzten Jahren entwickelt. Fünf unterschiedliche Ansätze (nach Schultze [56]) kann man heute prinzipiell unterscheiden:

Kwak et al. [43] sowie Tao et al. [61] konnten bei B-NHL-Patienten das lymphomspezifische Idiotyp(Id)-Protein isolieren und benutzten dieses zur Impfung entweder mit einem Adjuvans oder als Fusionsprotein mit Zytokinen.

Als zweite Möglichkeit verwendeten Stevenson et al. [60] anstelle des Id-Proteins die nackte DNA, welche dieses Protein kodiert.

Drittens wurden antigenpräsentierende Zellen mit dem Id-Protein oder der entsprechenden DNA *in vitro* beladen und dann zur Impfung eingesetzt (Hsu [37]).

Die Transfektion von Lymphomzellen mit den Genen immunmodulierender Zytokine oder kostimulatorischer Moleküle (Dranoff [24]; Kato [38]; Levitsky [46]; Wierda [68]) wurde ebenfalls untersucht.

Als fünfte Möglichkeit hatten Schultze et al. [57] nachgewiesen, dass die malignen B-Zellen selbst als antigenpräsentierende Zellen fungieren und somit ihre eigenen Antigene einschließlich des Id-Proteins oder anderer möglicher Tumorantigene zeigen können.

---

Native maligne B-Zellen zeigen eine hohe Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, sind aber trotzdem schlechte Stimulatorzellen in „mixed lymphocyte reactions“, wie Studien von Ranheim et al. [54] und anderen Arbeitsgruppen (Cardoso [13]) belegen. Die ineffektive Antigenpräsentation wird zum Teil zurückgeführt auf eine verminderte Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen.

Die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, in dem mindestens drei Schritte eine wichtige Rolle für eine optimale Erkennung spielen. Zunächst muss ein *Kontakt* mit der Antigen-präsentierenden Zelle über Zelladhäsionsmoleküle (zum Beispiel CD54) hergestellt werden. Zweitens erfolgt die *Antigen-Erkennung* über den T-Zell-Rezeptor (TCR), und drittens muss eine *Kostimulation* der T-Zelle, zum Beispiel über den CD80:CD28-Weg, erfolgen. Es wurde gezeigt, dass eine alleinige Expression von MHC-Molekülen für die Induktion einer produktiven Immunantwort nicht ausreicht und die Expression von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen der bestimmende Faktor für eine potente T-Zell-Antwort sind. Fehlen diese Signale, werden die potenziellen Effektorzellen anerg oder tolerant (Cardoso [13]; Dorfman et al. [23]).

Die Bedeutung der *CD40:CD40L-Interaktion* für die spezifische Immunantwort wurde in jüngerer Zeit von einigen Arbeitsgruppen gezeigt. CD40 ist ein integrales Membranprotein, das von verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), vor allem dendritischen Zellen, aktivierten Makrophagen und B-Zellen exprimiert wird. Die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden (CD40L) auf aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen ist essentiell für die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen sowie für die Bildung von Keimzentren und Gedächtnis-B-Zellen im Rahmen thymusabhängiger Immunantworten (Banchereau [1]; Durie [26]; Foy [33]; Grewal [34]).

Die Bindung von CD40L an CD40 führt bei den APCs zur Induktion kostimulatorischer Signale wie CD80 und CD86. Die Signalvermittlung durch CD40 über APCs kann dann die Mitwirkung von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen im Rahmen der Prägung von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ersetzen (Borrow [6]; Schoenberger [55]). CD40-defiziente B-Zellen sind nicht in der Lage, kostimulatorische Signale zu geben und naive T-Zellen zu stimulieren (Evans [28]).

---

Die Aktivierung von B-Zellen über CD40L kann auch unabhängig von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen geschehen – sowohl die lösliche Form (sCD40L) in trimerer Form als auch die Transfektion von Zelllinien mit dem humanen CD40L haben sich als gleichwertiger Ersatz erwiesen (Lane [45]; Schultze [57]).

In verschiedenen Studien wurde *in vivo* und *in vitro* gezeigt, dass die Expression kostimulatorischer Moleküle von Mitgliedern der B7-Familie, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), eine Immunantwort gegen modifizierte und native Tumorzellen induzieren kann (Boyer [7]; Dorfman [23]; Dunussi-Joannopoulos [25]; McAdam [48]; Townsend [63]; Yellin [69]).

Diese Erkenntnisse über die Möglichkeiten der T-Zell-Aktivierung und Kostimulation sollten in der vorgelegten Untersuchung genutzt werden, um die Frage zu klären, welches Potenzial die *in-vitro*-Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten mit Hilfe CD40L-aktivierter maligner B-Zellen bietet. Eine genaue Charakterisierung der induzierten T-Zell-Antwort ist im Hinblick auf die immunologisch bedeutsamen *Graft-versus-Lymphoma-* und *Graft-versus-Host-Reaktionen* von besonderer Bedeutung und entscheidend für die Möglichkeit der Anwendung einer adoptiven Immuntherapie.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

1. Besteht ein qualitativer oder quantitativer Unterschied autologer versus allogener HLA-typisierter T-Zellen, die mit CD40L-aktivierten malignen B-Zellen stimuliert wurden?
2. Kann die Spezifität der generierten T-Zell-Antwort näher charakterisiert werden (lymphom-, B-Zell- oder hämatopoese-spezifisch, alloreaktiv)?
3. Welcher Subtyp von T-Zellen ist für die zytotoxische Aktivität gegenüber malignen B-Zellen verantwortlich?
4. Können *in vitro* ausreichende Mengen zytotoxischer T-Zellen generiert und für eine adoptive Immuntherapie expandiert werden?

---

## 2. Material und Methoden

Da die im Folgenden aufgeführten Versuche die experimentelle Vorarbeit zu einer klinischen Studie darstellen sollen, wurden möglichst Produkte verwendet, die GMP (Good Manufacturing Practice) Richtlinien entsprechen.

### 2.1 *Geräte, Materialien, Kulturmedien und Antikörper*

#### 2.1.1 Geräte

Becton Dickinson, Heidelberg:

FACSCalibur™ A4C (fluorescence activated cell sorter)

BioRad, Hercules, CA, USA:

Benchmark Microplate-Reader

Eppendorf, Hamburg:

Dispensiersystem Multipette® plus; Kolbenhubpipetten Eppendorf Research: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

Heraeus Instruments, Hanau:

BioFuge Pico

Brutschrank Heracell, eingestellt auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>

Sicherheitswerkbank Herasafe

Megafuge 3.0R

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt:

Pipettierhilfe pipetus® -akku

---

Memmert, Schwabach:

Wasserbad, eingestellt auf 37 °C

Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode:

Tischkühlzentrifuge 4K15C

Wallac, Turku, Finnland:

Microbeta 1450

Zeiss, Jena:

Inverses Mikroskop Axiovert 25, mit Spiegelreflexkamera MC80DX

## 2.1.2 Materialien

Amefta, Kriftel:

Einmalspritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml

B. Braun Melsungen AG, Melsungen:

Einmalspritze Omnifix<sup>®</sup> 50 ml

Falcon<sup>®</sup>, Becton Dickinson Labware, Meylau Cedex, Frankreich:

5 ml-Polystyrol-Rundbodenröhrchen für FACS-Ansätze

Verschlusskappen für FACS-Röhrchen

100 µm Nylon Cell Strainer

Greiner Cellstar, Solingen:

Gewebekulturflaschen (25, 75 und 182 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche)

14 ml-PP (Poly-Propylen)-Rundbodenröhrchen

Konische 15 ml-Röhrchen

Hydrophobe 24-multiwell-Kulturplatten für Suspensionskulturen

96-multiwell-Kulturplatten U-Form (Rundboden)

96-multiwell-Kulturplatten V-Form (Spitzboden)

Nunc, Wiesbaden:

Hydrophil beschichtete 6-, 24- und 96-multiwell-Kulturplatten,

96-well-Maxisorp Immunomodule für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

1 ml-Einfrierröhrchen Cryo Serve

Sarstedt, Nümbrecht:

Konische 50 ml-Röhrchen

Schleicher & Schuell, Dassel:

0,2 µm Einmal-Filterhalter (FP 030/3)

Wallac, Turku, Finnland:

Flexible 96-well-Mikrotiterplatten

### 2.1.3 Kulturmedien und Lösungen

Als Standardmedium für Suspensionszellkulturen diente, sofern nicht anders erwähnt, Na(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-gepuffertes Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium (RPMI 1640; Seromed Biochrom KG, Berlin) unter Zusatz von L-Glutamin (Gibco BRL, Paisley, UK), Penicillin-Streptomycin (PenStrep), Natriumpyruvat (beides von Seromed Biochrom KG, Berlin) und fetalem Rinderserum (FCS, Gibco BRL, Paisley, UK) in den folgenden effektiven Konzentrationen im Medium:

- L-Glutamin 4 mM
- Penicillin-Streptomycin 100 Units = 100 µg/ml
- Natriumpyruvat 1 mM
- FCS 10 vol%

Dieses wird im Folgenden als RPMI-Medium bezeichnet.

Für Waschvorgänge wurde dieses Medium in serumfreier Form verwendet (SF-RPMI).

Die Kultur von tCD40L-Fibroblasten erfolgte in Dulbecco's MEM/Nut Mix F-12 (Gibco BRL, Paisley, UK) unter Zusatz von FCS und PenStrep in den oben angegebenen Konzentrationen, Hepes (Gibco BRL, Paisley, UK), L-Glutamin und

---

Geneticin/G 418 (Gibco BRL, Paisley, UK). Deren effektive Konzentrationen im Medium betragen:

- Hepes 10 mM
- L-Glutamin 2 mM
- Geneticin/G 418 400 µg/ml

Im Folgenden wird es als tCD40L-Medium bezeichnet. Bei Einsatz der tCD40L-Fibroblasten zur Aktivierung von B-Zellen wurde das Medium ohne G 418 angesetzt (Wildtyp-Medium).

Zur Gewinnung von Stromazellen aus dem Knochenmark wurde  $\alpha$ -Minimal Essential Medium (Gibco BRL, Paisley, UK) mit FCS und PenStrep versetzt und eingesetzt. PenStrep wurde ebenfalls in obiger Konzentration angewendet; FCS befand sich zu 20 vol% im verwendeten Medium.

Das für CTL- und B-Zell-Kulturen verwendete AIMV-Medium (Research Grade, Gibco BRL, Paisley, UK) wurde als Fertigmedium mit 50 µg/ml Streptomycinsulfat, 10 µg/ml Gentamicinsulfat und 0,1 % humanem Serumalbumin geliefert. Zusätzlich wurde es mit 4 mM L-Glutamin und 2 vol% humanem AB-Serum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) angereichert (CTL-Medium).

Als Medium für <sup>51</sup>Chrom-release-assays und Koinkubationsansätze wurde Hepes-gepuffertes RPMI 1640-Medium (Seromed Biochrom KG, Berlin) mit L-Glutamin, PenStrep und Natriumpyruvat in den oben aufgeführten Endkonzentrationen und unter Zugabe von 10 % humanem AB-Serum (BioWhittaker, Walkersville, Maryland, USA) eingesetzt (Assay-Medium).

Das Einfriermedium setzte sich aus 80 vol% SF-RPMI und 20 vol% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zusammen und wurde unmittelbar vor dem Einfriervorgang 1:1 mit FCS versetzt. Die effektive Endkonzentration von DMSO betrug 10 vol%.

Für einige Waschschriffe bei der tCD40L-Passagierung wurde einfach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS Dulbecco's, Gibco BRL, Paisley, Schottland) verwendet.

Zur Dichtegradientenzentrifugation wurde Ficoll Separating Solution (Seromed Biochrom KG, Berlin) eingesetzt.

---

#### 2.1.4 Antikörper

Zur Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wurden monoklonale Antikörper der Maus gegen folgende humane Antigene eingesetzt: CD1a, CD83 (Immunotech, Marseille, Frankreich); CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD23, CD56, CD40L, HLA-DR (Becton Dickinson, Heidelberg); CD40, CD54, CD58, CD80, CD86,  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Leichtkette (PharMingen, San Diego, USA); HLA-ABC (Serotec, Eching). Die genannten Antikörper waren gekoppelt mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Peridinchlorophyllprotein (PerCP) und gehörten der IgG<sub>1</sub>-Unterklasse an. Isotypkontrollen gegen diesen IgG-Subtyp wurden bei allen Färbungen mitgeführt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde vor der eigentlichen Färbung eine Inkubation mit monoklonalem Maus-IgG<sub>1</sub> (Jackson Dianova, Hamburg) durchgeführt.

Zur cytoplasmatischen und nukleären Immunphänotypisierung wurde ein IntraPrep<sup>TM</sup>-Permeabilization Kit (Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet, welches aus einer Permeabilisierungs- und Fixationslösung bestand.

---

## 2.2 Zelllinien

### 2.2.1 Suspensionszellkultur

Die humane HLA-Antigen-negative Lymphoblastenlinie K562 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) wurde zur Detektion unerwünschter NK-Zell-Aktivität benutzt. Die Kultivierung erfolgte in 75-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen in je 30 ml RPMI-Medium mit einer 1:5-Ausdünnung zweimal in der Woche. Zum Zeitpunkt der Ausdünnung waren in einer Gewebekulturflasche 5-10×10<sup>6</sup> Zellen. Mykoplasmen-tests (Mycoplasma PCR ELISA, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt und waren stets negativ.

### 2.2.2 tCD40L-Fibroblastenkultur

Zur Aktivierung von B-Zellen wurden adhärente NIH3T3-Mausfibroblasten eingesetzt, welche mit dem humanen CD40-Ligand transfiziert waren (tCD40L-Fibroblasten, freundliche Gabe von Dr. med. Joachim L. Schultze, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA). Durchflusszytometrische Kontrollen in regelmäßigen Abständen bestätigten eine gleichbleibend hohe Expression (> 98 % CD40L<sup>+</sup>-Zellen) des CD40L-Moleküls. Der Test auf Mykoplasmen (siehe 2.2.1) war immer negativ.

Die Kultivierung erfolgte in 182 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen in je 25 ml tCD40L-Medium. Zweimal in der Woche wurden die konfluenten Zellen nach Entfernen des alten Mediums zunächst mit PBS gewaschen, bevor sie mit 7 ml Trypsin-Lösung (Trypsin-EDTA 10fach, 0,5/0,2 % (w/v), 1:10 in PBS verdünnt, Seromed Biochrom KG, Berlin) für drei Minuten angedaut und anschließend zur Neutralisierung mit 10 ml Medium abgespült wurden. Nach dem Abzentrifugieren (660×g, 5 Minuten) wurde das Pellet resuspendiert und je 3×10<sup>6</sup> Zellen wurden in 25 ml Medium und neuen 182 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen weitergeführt.

## 2.3 *Gewinnung der Zellen aus dem Blut gesunder Probanden*

### 2.3.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PMNC)

- Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat(ACK)-Puffer: 4,145 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g  $\text{K}(\text{HCO})_3$ , 0,0186 g EDTA, mit Aqua bidestillata auf 500 ml aufgefüllt

Die vorbereitenden Versuche wurden mit PMNC gesunder Blutspender durchgeführt. Alle Waschschriffe erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, über 5 Minuten mit  $660\times g$  bei Raumtemperatur.

Sämtliche Blutspender hatten in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster Blut gespendet und ihr schriftliches Einverständnis für dessen Verwendung zu Forschungszwecken gegeben. Das Ausgangsmaterial für die Isolation der gewünschten Zellen waren Blutprodukte, welche bei der Verarbeitung von citrathaltigen Vollblutspenden zu Plasmakonzentraten anfallen (buffy coats). Im Zeitraum zwischen der Aufarbeitung in der Transfusionsmedizin und der folgenden Aufreinigung, der in allen Fällen weniger als 24 Stunden betrug, wurden die buffy coats bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert.

Nach einer 1:1-Verdünnung des buffy coat mit SF-RPMI wurde eine Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der mononukleären Zellen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden konische 50 ml-Röhrchen mit je 15 ml Ficoll Separating Solution (Seromed Biochrom KG, Berlin) befüllt und mit 25 ml der Zellsuspension überschichtet. Durch eine Zentrifugation bei  $1400\times g$  über 25 Minuten ohne Bremse flottierten die Zellen mit geringer Dichte, vorwiegend PMNC, über dem Ficoll, während Erythrozyten und Granulozyten ein Pellet am Boden des Röhrchens bildeten. So konnten die PMNC vorsichtig mit einer 20 ml-Spritze und langer Kanüle (TSK-Supra  $2\times 80$  mm, Ehrhardt-Söhne GmbH, Geislingen) entnommen werden. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit jeweils 50 ml SF-RPMI gewaschen.

Bei starker Kontamination des Pellets durch Erythrozyten erfolgte zusätzlich eine Lyse über 2 Minuten mit je 5 ml ACK-Puffer, welche mit RPMI-Medium abgestoppt wurde. Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 20-30 ml SF-RPMI, bevor die Zellausbeute bestimmt wurde. Aus 100 ml buffy coat resultierten durchschnittlich

---

$4 \times 10^8$  PMNC. Von diesen wurde im Anschluss ein kleiner Anteil zur Immunphänotypisierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Die weitere Verarbeitung richtete sich nach dem Verwendungszweck. Entweder wurden die Zellen direkt in einer B-Zell-Kultur eingesetzt, oder sie wurden weiter separiert zur Anreicherung von  $CD8^+$ -T-Zellen. Wenn sie nicht sofort in Kulturen eingesetzt wurden, konnten sie bis zur Verwendung in geeigneten Portionen im Einfriermedium (siehe 2.1.3) aufgenommen und im flüssigen Stickstoff gelagert werden.

## 2.3.2 Aktivierung gesunder B-Lymphozyten über das CD40/CD40-Liganden-System

### 2.3.2.1 Vorbereitung der tCD40L-Platten

Am Tag vor dem eigentlichen Beginn einer B-Lymphozyten-Kultur oder dem Umsetzen in Kultur befindlicher B-Lymphozyten mussten neue tCD40L-Platten vorbereitet werden. Dazu wurden tCD40L-Fibroblasten abgeerntet (siehe 2.2.2) und in Wildtyp-Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Im Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Münster wurden sie dann mit 90 Gray bestrahlt. Anschließend wurden sie auf 6-Well-Kulturplatten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml und  $4 \times 10^5$  Zellen/Well ausplattiert. Im Brutschrank erfolgte eine Inkubation über Nacht oder über einen Zeitraum von mindestens 8 Stunden, um eine optimale Adhärenz der Fibroblasten gewährleisten zu können.

### 2.3.2.2 B-Lymphozyten-Kultur

Das Ausgangsmaterial für die Generierung aktivierter B-Zellen waren PMNC.  $100 \times 10^6$  Zellen wurden in CTL-Medium in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und mit 100 Units/ml IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA) und  $5,5 \times 10^{-7}$  M Ciclosporin A (CsA, Sandimmun<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg; gelöst in 100 % Ethanol und gelagert bei  $-80$  °C in der Konzentration von 1 mg/ml)

versetzt. Das WT-Medium der tCD40L-Platten wurde abgenommen und 4 ml/Well an PMNC hinzugegeben. Nach 5 Tagen wurden die PMNC auf neue, entsprechend vorbereitete tCD40L-Platten umgesetzt und mit frischem IL-4 und CsA versorgt. Mit zunehmender Aktivierung wuchsen die B-Zellen schneller und nahmen an Größe zu. Daher mussten die Zellen dünner ausplattiert werden als zu Beginn der Kultur. Der Zeitplan und die Konzentrationen sahen folgendermaßen aus:

| Tag der Kultur | Arbeitsschritt                  | Konzentration der Zellen in $1 \times 10^6/\text{ml}$ |
|----------------|---------------------------------|---|
| -1             | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 0              | Beginn der B-Zellen-Kultur      | 2   |
| 4              | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 5              | Rekultur der PMNC               | 2   |
| 7              | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 8              | Rekultur der B-Zellen           | 1,5   |
| 11             | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 12             | Rekultur der B-Zellen           | 1   |
| 14             | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 15             | Rekultur der B-Zellen           | 1<br>(Ansatz für vier Tage)                           |
| 18             | Vorbereitung der tCD40L-Platten |   |
| 19             | Rekultur der B-Zellen           | 0,75<br>(Ansatz für drei Tage)                        |
| Etc.           |                                 |   |

**Tabelle 2-1:** Zeitplan einer B-Zellen-Kultur

### 2.3.3 Isolierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch magnetische Separation

- MidiMACS<sup>®</sup>-Puffer: PBS, 2,5 vol% HSA (Human-Albumin 20 % Behring, Centeon Pharma GmbH, Marburg), 2 M EDTA, sterilfiltriert und gekühlt (4 °C)
- Immunomagnetische MidiMACS<sup>®</sup>-Separation: Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül sind an kleine eisenhaltige Kügelchen gekoppelt (beads) und erlauben dadurch eine Auftrennung von Zellfraktionen über ein Magnetfeld

Um eine Fraktion zu erhalten, die nahezu ausschließlich CD8<sup>+</sup>-T-Zellen enthält, wurden gewonnene PMNC mit einem CD8<sup>+</sup>-Isolation Kit (dieses, wie alle erwähnten Materialien und Substanzen in diesem Abschnitt, von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgereinigt. Dieses Verfahren erlaubt eine negative Selektion von CD8<sup>+</sup>-Zellen nach dem Prinzip der immunomagnetischen MidiMACS<sup>®</sup>-Separation. Durch eine Depletion CD4-, CD11b-, CD16-, CD19-, CD36- und CD56-positiver Zellen über einen Cocktail entsprechender Hapten-gekoppelter Antikörper konnte eine angereicherte und weitgehend nicht-voraktivierte CD8<sup>+</sup>-Fraktion isoliert werden.

1×10<sup>8</sup> Zellen wurden in 800 µl gekühlten MidiMACS-Puffer resuspendiert und mit 200 µl Hapten-Antikörper-Cocktail für zehn Minuten bei 6-12 °C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Beads folgten zwei Waschschrte in 10-20fachem Volumen mit Zentrifugation über fünf Minuten bei 660×g. Darauf wurde das Zellpellet in 800 µl Puffer aufgenommen und mit 200 µl Anti-Hapten Microbeads für 15 Minuten bei 6-12 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet in 500 µl Puffer aufgenommen und über einen Vorfilter auf eine MidiMACS<sup>®</sup>-Säule (Typ LS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup>) gegeben, welche zuvor mit 5 ml Puffer äquilibriert worden war und sich in einem Magnetfeld befand. Viermal wurde mit jeweils 3 ml Puffer nachgespült, um die CD8<sup>+</sup>-Zellen möglichst vollständig zu eluieren. Nach dem Herausnehmen der Säule aus dem Magnetfeld konnten die markierten CD8<sup>+</sup>-Zellen durch kräftiges Spülen der Säule mit 5 ml Puffer in einem weiteren Röhrchen aufgefangen werden. Beide Fraktionen wurden anschließend vom Puffer abzentrifugiert und ausgezählt. Nach Verwendungszweck wurden die Zellen dann kryokonserviert oder direkt in Kulturen eingesetzt.

---

#### 2.3.4 PHA-Blasten

Als eine Negativkontrolle in Zytotoxizitätstests wurden  $10 \times 10^6$  PMNC eines buffy coat in einer 25-cm<sup>2</sup>-GKF mit Phytohämagglutinin (PHA-M, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) stimuliert. Die Endkonzentration von PHA-M in der Lösung betrug 100 µg/ml. Dadurch kam es zu einer polyklonalen Proliferation der T-Zellen. Zur weiteren Expansion wurde die Zellsuspension nach drei Tagen abzentrifugiert und das frische Medium mit Proleukin<sup>®</sup> (Chiron GmbH, Ratingen) in der Konzentration von 50 Units/ml versetzt. Bereits nach einer Woche waren die Zellen bei durchflusszytometrischer Kontrolle zu über 90 % CD3-positiv. In Abhängigkeit von der Proliferation wurden die Zellen zweimal die Woche ausgedünnt und mit frischem Medium und Proleukin<sup>®</sup> versorgt. Meist wurden die Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen fortgeführt und dann in Zytotoxizitätstests eingesetzt.

---

## 2.4 *Aufarbeitung der Patientenproben*

Grundlage der Untersuchung waren Patienten mit einem niedrig- oder intermediär-malignen Non-Hodgkin-Lymphom vom B-Zell-Typ, welche in der Medizinischen Klinik und Poliklinik -Innere Medizin A- des Universitätsklinikums Münster stationär oder ambulant behandelt wurden. Alle Patienten wurden durch den behandelnden Arzt oder mich über den Verwendungszweck ihrer Proben aufgeklärt und bestätigten durch Unterschrift ihr Einverständnis. Bei Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation wurden die HLA-identen Spender ebenfalls über das Vorhaben unterrichtet und nach schriftlicher Einverständniserklärung zwecks Blutentnahme punktiert. Insgesamt konnten Proben von elf Patienten aufgearbeitet werden. In vier Fällen konnte eine Blutprobe des vorgesehenen Spenders gewonnen werden.

### 2.4.1 Maligne B-Zellen

#### 2.4.1.1 Aufarbeitung

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung maligner B-Zellen dienten im Rahmen diagnostischer Maßnahmen entnommenes Lymphknotenbiopsat, heparinisierte Knochenmarkaspirate sowie peripheres Blut der Patienten vor Therapiebeginn. Das Lymphknotenmaterial wurde zunächst in einer Petrischale in SF-RPMI gewendet und mit einem Skalpell fein zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde durch einen Filter (Cell Strainer 100µm Nylon, Falcon<sup>®</sup>, Becton Dickinson Labware, Meylau Cedex, Frankreich) gepresst und mit SF-RPMI mehrmals nachgespült, um eine homogenisierte Probe und eine optimale Zellausbeute zu erhalten. Die anderen Proben wurden ohne weitere Vorbehandlung mit SF-RPMI im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurde bei allen Proben eine Dichtegradientenzentrifugation, wie sie in 2.3.1 beschrieben ist, zur Isolierung der mononukleären Zellen durchgeführt. Da die malignen B-Zellen labiler als gesunde Zellen sind, wurden Waschschriffe nur mit 246×g durchgeführt, um den Zellverlust möglichst gering zu halten.

---

#### 2.4.1.2 Aktivierung über das CD40/CD40L-System

Die Aktivierung der B-NHL-Zellen erfolgte analog zur beschriebenen B-Lymphozyten-Aktivierung (2.3.2) in einer Kokultur mit letal bestrahlten tCD40L-Fibroblasten. Die Zellen wurden entsprechend der Tabelle 2-1 (S. 14) kultiviert. Meist wurden die Zellen aber nur einmal aktiviert und für vier Tage in Kultur gehalten, um ein mögliches Überwachsen durch residuale gesunde B-Zellen zu verhindern. Zudem war eine längere Kultivierung zur Aktivierung nicht erforderlich, was durch die durchflusszytometrische Kontrolle des Immunphänotyps bestätigt wurde.

Bei allen Proben wurde die Expression von MHC-, Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen auf der Zelloberfläche bestimmt. Der Grad ihrer Expression wurde nach ihrer mittleren Fluoreszenzintensität ermittelt. Dieser Wert konnte bei der Auswertung als Zehnerlogarithmus aus der Legende der erstellten Histogramme abgelesen werden.

#### 2.4.2 Knochenmarkstromazellen

Das Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Stromazellen bildeten MNC aus den Knochenmarkaspiraten der Patienten, welche nach der leicht modifizierten Methode von Lagneaux et al. [44] behandelt wurden (Dankbar [18]). Zur Vorbereitung wurden zunächst 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen mit Gelatine (2 % Solution; Sigma Aldrich Co. LTD., Irvine, UK) beschichtet. Dazu wurde die auf 37 °C erwärmte Gelatine 1:10 mit PBS verdünnt und jede Gewebekulturflasche mit 5 ml dieses Gemischs für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Antrocknen unter der Sicherheitswerkbank konnten die Gewebekulturflaschen eingesetzt werden.

Ungefähr 30-40×10<sup>6</sup> Zellen wurden in 20 ml Medium (siehe Kapitel 2.1.3) aufgenommen und in eine Gewebekulturflasche gefüllt. Für eine Woche musste diese dann bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stehen und durfte nicht bewegt werden, um eine optimale Adhärenz der enthaltenen Knochenmarkstromazellen zu erhalten. Anschließend wurde ein Mediumwechsel nach Bedarf vorgenommen und bei deutlich konfluentem Zellrasen, der nach drei bis fünf Wochen zu sehen war, ein Umsetzen der Zellen durchgeführt.

---

Dazu wurden sie mit 4 ml Trypsin-Lösung (1:10-Verdünnung, siehe 2.2.2) angedaut und mit Medium abgespült, wenn sich nach mikroskopischer Kontrolle ein Großteil der Zellen im Überstand befand. Nach Zentrifugation bei 660×g über 5 Minuten konnte das Pellet in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 ausgedünnt werden. Dieses wurde bis zu einer ausreichenden Expansion der Zellen fortgeführt, meist über sechs bis sieben Passagen, um dann die Zellen in geeigneter Menge in den geplanten Versuchen einzusetzen oder vorübergehend im flüssigen Stickstoff zu lagern.

### 2.4.3 T-Zellen

- ACK-Puffer siehe 2.3.1

Für die Gewinnung von T-Zellen gab es drei unterschiedliche Quellen:

1. Autologer Ansatz: Enthielten die PMNC der Patienten noch ausreichend T-Zellen, so wurden diese direkt als Responderzellen für die T-Zell-Kultur eingesetzt. Aufgrund der geringen Zellmengen war eine vorhergehende, weitere Anreicherung der T-Zellen nicht möglich.
2. Allogener Ansatz mit HLA-identem Spender: Falls bei den Patienten eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde oder geplant war, wurden dem HLA-identen Spender im Rahmen der Evaluations-Diagnostik zusätzlich 40 ml peripheres Blut entnommen.
3. Allogener, nicht-HLA-typisierter Ansatz: Als dritte Quelle wurden buffy coats aus der Transfusionsmedizin, wie in den Vorversuchen geschildert, benutzt; auch diese stammten von gesunden Blutspendern.

In allen drei Fällen wurde das Material bis zur Aufarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Innerhalb von 24 Stunden folgte die Isolierung der mononukleären Zellen nach der oben beschriebenen Methode der Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll (2.3.1).

Die gewonnenen Zellen konnten dann direkt zur CTL-Kultivierung eingesetzt werden (1. Ansatz) oder noch einmal mit dem bereits erwähnten CD8<sup>+</sup>-Isolation Kit (2. und 3. Ansatz) weiter aufgereinigt werden.

---

## 2.5 *Induktion B-Zell-/bzw. lymphomspezifischer cytotoxischer T-Zellen*

### 2.5.1 Vorbereitung der Stimulatorzellen

Die jeweils als Stimulatorzellen vorgesehenen antigenpräsentierenden Zellen (aktivierte B-NHL-Zellen) wurden geerntet und in CTL-Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Im Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Münster wurden sie mit 30 Gray bestrahlt und konnten dann zur Stimulation cytotoxischer T-Zellen verwendet werden.

### 2.5.2 Kultivierung cytotoxischer T-Zellen

Die Kultivierung der CTL erfolgte auf hydrophil beschichteten 24-well-Kulturplatten in einem Endvolumen von 1,5 ml pro Well. Als Ausgangspopulation dienten periphere T-Zellen (siehe 2.4.4). Zum Schutz vor etwaigen Kontaminationen und hohen Verdunstungsraten, welche zu schwankenden Salzkonzentrationen geführt hätten, wurden die äußeren 16 Well jeder Platte mit jeweils 1 ml PBS befüllt und lediglich die innenliegenden 8 Well zur T-Zell-Kultur verwendet.

Je  $2 \times 10^6$  T-Zellen/Well wurden in 1 ml CTL-Medium ausgesät. Rekombinantes humanes Interleukin-7 (rhIL-7, TEBU, Frankfurt am Main) wurde in einer Konzentration von 15 ng/ml hinzugegeben. Die bestrahlten Stimulatorzellen wurden auf eine Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen (aktivierte B-NHL-Zellen) in 0,5 ml CTL-Medium eingestellt und zur primären Stimulation (P) der naiven T-Zellen verwendet. Somit ergab sich ein Responder : Stimulator-Verhältnis von 4:1 (CTL : aktivierte B-NHL-Zellen).

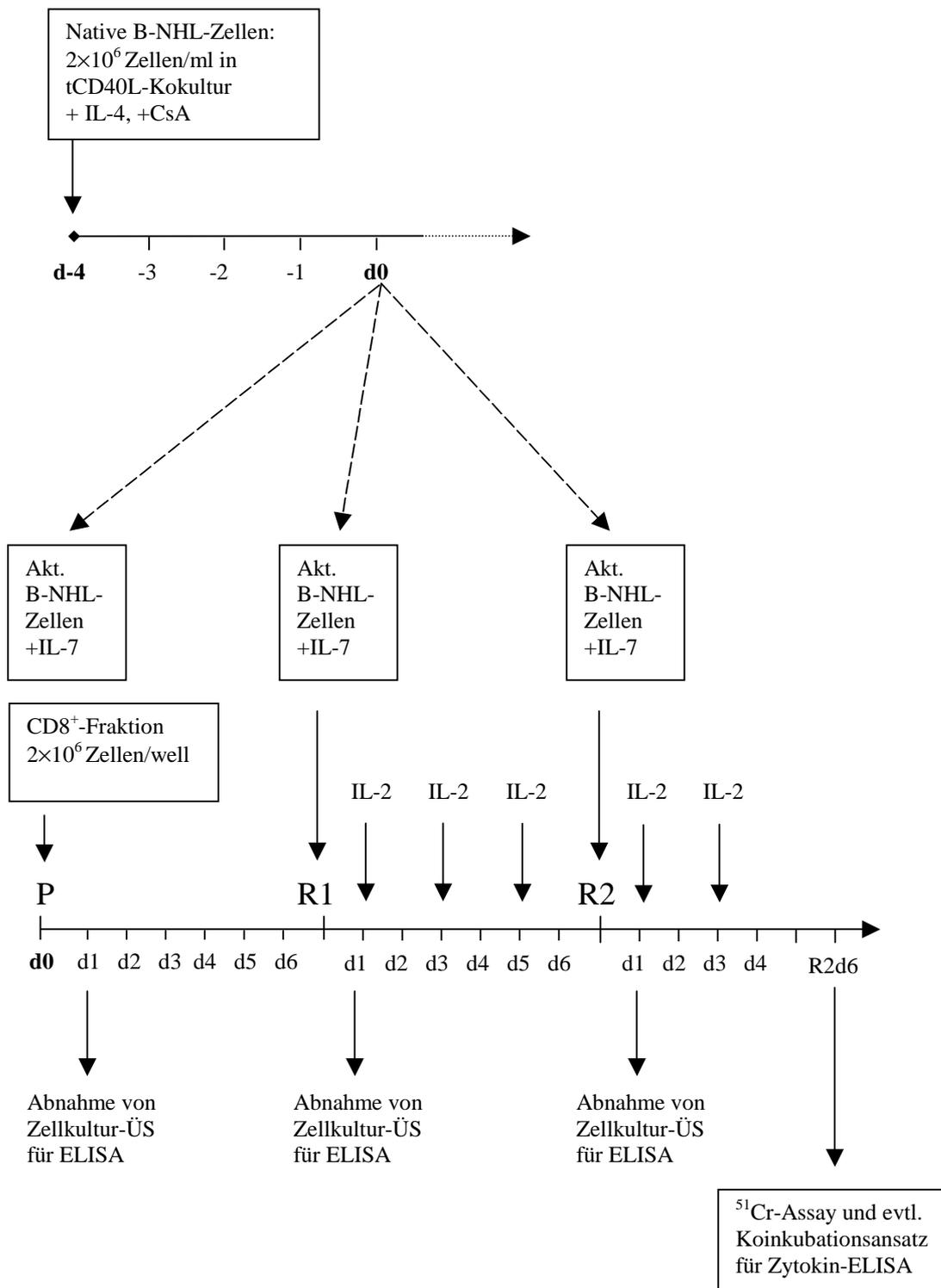
Die Restimulationen (R1, R2, ...) erfolgten in wöchentlichen Abständen. Das Verhältnis von CTL zu Stimulatorzellen blieb dabei stets identisch. Am Tag der Restimulation wurden die CTL-Ansätze geerntet, ausgezählt und auf neue Kulturplatten ausplattiert; in einer Menge von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well für die erste Restimulation bzw.  $2 \times 10^6$  Zellen/Well für die folgenden Restimulationen in einem Volumen von 0,5 ml CTL-Medium. Anschließend wurden rhIL-7 in eingangs erwähnter Konzentration sowie frisch

---

bestrahlte Stimulatorzellen in einem Volumen von 0,5 ml CTL-Medium hinzugegeben. 24 Stunden nach jeder Restimulation erfolgte die Zugabe von Proleukin<sup>®</sup> (biologische Vorstufe und äquivalent zu Interleukin-2, Chiron GmbH, Ratingen) in 0,5 ml CTL-Medium und einer effektiven Konzentration von 50 Units/ml. Die Kulturen wurden mindestens jeden zweiten Tag mikroskopisch begutachtet und alle 2-3 Tage mit frischem Proleukin<sup>®</sup> in der oben erwähnten Konzentration versorgt. Am letzten Tag vor einer Restimulation oder einem geplanten Versuch erhielten die CTL-Ansätze kein frisches Proleukin<sup>®</sup> mehr. Bei starker Expansion der Zellen wurden sie im Verhältnis 1:1 ausgedünnt. Nach Resuspension wurde die Hälfte der Zellsuspension in neue Wells überführt und mit 0,75 ml CTL-Medium und Proleukin<sup>®</sup> (in obiger Konzentration) wieder auf 1,5 ml Endvolumen aufgefüllt.

Standardmäßig wurden die CTL am sechsten Tag nach ihrer zweiten Restimulation (R2d6, beziehungsweise Tag 20 der Kultur) in einem <sup>51</sup>Cr-assay auf ihre zytolytische Aktivität überprüft.

Auf der folgenden Seite ist das Zeitschema für die CTL-Ansätze graphisch dargestellt.



**Abbildung 2-1:** Zeitschema für CTL-Ansätze

Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Generierung spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). **P:** Primärstimulation; **R1, R2:** Restimulationen 1+2; **d:** Tag vor/nach der jeweiligen Stimulation, **ÜS:** Überstand

## 2.6 Durchflusszytometrische Analysen

- FACS-Puffer: 1 g  $\text{NaN}_3$  in 5 ml PBS gelöst, 5 ml HSA (20%ig), ad 1000 ml mit PBS
- Fixationslösung: 0,1 % Paraformaldehyd (PFA, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) in destilliertem Wasser

Alle unter diesem Abschnitt aufgeführten Waschschriffe wurden mit 4 ml FACS-Puffer über 4 Minuten bei  $660\times g$  und Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten lichtgeschützt im Kühlschrank bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Mengenangaben für Antikörper und weitere Substanzen beziehen sich stets auf eine Gesamtmenge von  $1\times 10^6$  Zellen.

Für Färbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst 10 Minuten mit  $2,5\text{ }\mu\text{l}$  monoklonalem Maus-IgG<sub>1</sub> (Jackson Dianova, Hamburg) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen und dadurch mögliche Kreuzreaktionen zu verhindern. Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte die eigentliche Färbung mit jeweils  $2,5\text{ }\mu\text{l}$  Maus-anti-Human-Antikörper der Klasse IgG<sub>1</sub>. Auf die 20minütige Inkubation folgte noch ein Waschschriff, bevor die Zellen in  $300\text{ }\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Konnte die FACS-Messung nicht direkt im Anschluss erfolgen, wurden die Zellen in  $300\text{ }\mu\text{l}$  Fixationslösung aufgenommen. Auf diese Weise konnten sie bis zu maximal zwei Wochen im Kühlschrank gelagert und zu einem geeigneten Zeitpunkt analysiert werden.

Zur Bestimmung einer Leichtkettenrestriktion bei den B-NHL-Patienten musste eine zytoplasmatische Immunphänotypisierung mittels eines IntraPrep<sup>TM</sup>-Kit (Immunotech, Marseille, Frankreich) durchgeführt werden. Dieses bestand aus zwei verschiedenen Lösungen, einer Fixations- und einer Permeabilisierungslösung, um die Zellmembranen der Lymphozyten für Antikörper durchlässig zu machen und die Morphologie der Zelle im Ganzen nicht zu beeinträchtigen. Im Folgenden beziehen sich die Mengenangaben jeweils auf eine Zahl von  $5\times 10^6$  Zellen.

---

Jeder Ansatz wurde zunächst mit 100  $\mu$ l Fixationslösung versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurden jeweils 100  $\mu$ l Permeabilisierungslösung hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Hierauf konnte die Färbung mit je 20  $\mu$ l der entsprechenden konjugierten Antikörper durchgeführt werden. Nach einer viertelstündigen Inkubation konnten die Ansätze gewaschen und in 500  $\mu$ l Fixationslösung aufgenommen werden. Bis zur Analyse, welche innerhalb von 24 Stunden erfolgen musste, lagerten die Ansätze im Kühlschrank.

## 2.7 Messung der zytolytischen Aktivität

Die Funktionsprüfung der generierten CTL geschah mit Hilfe des  $^{51}\text{Cr}$ -release-assay, oder  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest. Zunächst erfolgte eine Markierung von Zielzellen mit radioaktivem  $^{51}\text{Cr}$ , welches an intrazytoplasmatische Proteine bindet und spontan nur zu einem geringen Teil wieder abgegeben wird. Durch die Zugabe von Effektorzellen, den CTL, in verschiedenen Konzentrationen werden die Zielzellen lysiert, ihre Zellmembran rupturiert und gibt das radioaktive  $^{51}\text{Cr}$  wieder frei. Die Menge des freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  ist proportional zur Effektivität der Lyse; nach Ermittlung der maximal möglichen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung und Berücksichtigung der spontanen Freisetzung konnte für die unterschiedlichen Verhältnisse der CTL zu den Zielzellen die spezifische Lyse mit einer Rechenformel bestimmt werden. Der Wert wurde in Prozent angegeben und errechnete sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{Probenwert} - \text{Spontanrelease}}{\text{Maximalrelease} - \text{Spontanrelease}} \times 100$$

Am R2d6, entspricht dem Tag 20 der CTL-Kultur, wurden die CTL in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1,67 \times 10^4$  Zellen/Well in je 100  $\mu\text{l}$  Assay-Medium auf einer 96-well-Spitzbodenplatte ausgesät. Nach Zugabe von 5000 Zielzellen/Well ergaben sich Effektor:Target-Verhältnisse von 30:1, 10:1 und 3,3:1. Bei jedem Versuch wurden Dreifachwerte angesetzt.

Die Art der untersuchten Zielzellen richtete sich nach den Möglichkeiten, bei einem Patienten unterschiedliche Zelltypen generieren zu können. So konnten nicht in allen Fällen Knochenmarkstromazellen oder PHA-Blasten aufgrund zu geringer Zellmengen gewonnen werden. In jedem  $^{51}\text{Cr}$ -Assay gab es Negativkontrollen, um die Spezifität der CTL bestimmen zu können, zum Beispiel Zellen eines anderen Patienten oder Stromazellen. Zum Ausschluss einer NK-Zell-Aktivität wurden K562-Zellen mitgeführt.

Zur Markierung mit radioaktivem  $^{51}\text{Cr}$  wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zielzellen in 10-ml-Rundboden-Röhrchen aufgenommen und mit  $520 \times g$  zentrifugiert. Die Zellpellets

---

wurden in 100  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung (3,7 MBq/ml, NEN Life Science Products, Zaventem, Belgien) aufgenommen und für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 2-ml-Eppendorf-Gefäße überführt und dreimal in einem Volumen von je 1,8 ml Assay-Medium gewaschen (Zentrifugation bei Raumtemperatur über 4 Minuten mit  $300\times g$ ). Dann wurden sie auf eine Konzentration von  $1\times 10^5$  Zellen/ml eingestellt, um zu jedem Well 50  $\mu\text{l}$  (entsprechend 5000 Zielzellen) pipettieren zu können. Zur Bestimmung der Spontanlyse gab es jeweils drei Ansätze, in denen sich nur Zielzellen und Assay-Medium befanden. Die Maximallyse wurde durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$ /Well Triton X 100 (5 %) als Detergens ermittelt. Die Koinkubation mit den CTL erfolgte über 4 Stunden im Brutschrank.

Anschließend wurden die Platten 5 Minuten mit  $200\times g$  zentrifugiert. So konnten von jedem Ansatz 25  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen und in eine flexible 96-well-Mikrotiterplatte überführt werden. Nach Zugabe von 150  $\mu\text{l}$ /Well des Flüssigszintillators Optiphase Supermix (Wallac, Turku, Finnland) wurden die Platten mit Klebefolie versiegelt und für 15 Minuten auf einem Schüttler vermischt. Darauf wurde die Aktivität im Betacounter gemessen.

---

## 2.8 *Messung der Zytokinkonzentration*

### 2.8.1 Zytokinkonzentration im Überstand der CTL-Kulturen

Zur groben Bestimmung der Zytokinsekretion verschiedener CTL-Ansätze wurden jeweils einen Tag nach einer Primär- oder Restimulation geringe Mengen an Überständen entnommen, bevor die Ansätze mit Proleukin<sup>®</sup> versorgt wurden. Die Überstände konnten bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden.

### 2.8.2 Koinkubationsansätze

Um eine differenzierte Aussage über die Zytokinantwort gewinnen zu können, wurden die CTL mit verschiedenen Zielzellen koinkubiert. Dazu wurden sie in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in 100  $\mu\text{l}$  Assay-Medium auf hydrophilen 96-well-Kulturplatten ausgesät. Die Zielzellen waren identisch mit denen im parallel angesetzten <sup>51</sup>Chrom-release assay. Sie wurden mit 30 Gray bestrahlt und in einer Menge von  $1 \times 10^4$  Zellen/Well zu den CTL gegeben. Zur Bestimmung der basalen Zytokinkonzentration wurden Kontrollwells angesetzt, die jeweils nur CTL oder Zielzellen enthielten. Jeder Ansatz wurde in Dreifachwerten angesetzt.

Nach 16 Stunden Koinkubation im Brutschrank wurden die Überstände der Dreifachansätze gepoolt und bis zur Durchführung des ELISA (siehe 2.8.3) bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren.

### 2.8.3 Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA)

- Assay-Puffer: PBS mit 4 % bovine serum albumin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) und 0,01 % Thimerosal (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Waschpuffer: 50 mM Trishydroxymethyl-aminomethan (Merck Eurolab GmbH, Bochum), 0,2 % Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat (Tween 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), mit Aqua bidestillata ad 1000 ml

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Eingesetzte Konzentrationen der benutzten Reagenzien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Das Vorgehen richtete sich nach dem vom Hersteller (Endogen, Woburn, USA) empfohlenen Protokoll.

96-well-Immunomodulplatten wurden über Nacht mit 100 µl/Well des Zytokin-Antikörpers inkubiert. Darauf wurden die Platten entleert, mit 200 µl/Well Assay-Puffer eine Stunde blockiert und dreimal mit jeweils 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden jeweils mit Assay-Puffer 1:1 verdünnt und als Zweifachwerte à 50 µl/Well aufgetragen. Zur Erstellung der Standardkurve wurden 100 µl des humanen rekombinanten Zytokins in zwei Wells gegeben und in log<sub>2</sub>-Schritten verdünnt. Der entsprechende biotin-gekoppelte monoklonale Antikörper wurde in einer Menge von 50 µl/Well hinzugegeben, woraus eine weitere 1:1-Verdünnung in einem Endvolumen von 100 µl/Well resultierte. Die Inkubation dauerte zwei Stunden.

Anschließend wurden die Platten dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor 100 µl/Well Streptavidin-konjugierte Meerrettich-peroxidase zugegeben wurde. Nach einer halbstündigen Inkubation dieses Enzymkomplexes folgten drei weitere Waschschrte und die Zugabe von 100 µl/Well TMB One-Step Substrate Solution (DAKO, Glostrup, Dänemark), einem Substrat für die Peroxidase-Reaktion. Dieser Schritt erfolgte lichtgeschützt und wurde nach 15-60 Minuten mit 100 µl/Well einer 0,18molaren H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gestoppt.

Die Messung der Platten und deren Auswertung erfolgte an einem Benchmark Microplate-Reader (BioRad, Hercules, CA, USA) bei 450 nm Messe und 655 nm Referenzwellenlänge mit dem Programm des Herstellers (Microplate-Manager 5.0).

| <i>Substanz</i>                            | <i>Konzentration<br/>bzw.<br/>Verdünnung</i> | <i>Verdünnungsmedium</i> | <i>Volumen in<br/><math>\mu</math>l/Well</i> | <i>Hersteller</i>                     |
|--|--|--------------------------|--|---------------------------------------|
| Primärer Antikörper                        | 1,5 $\mu$ g/ml                               | PBS                      | 100  | Endogen,<br>Woburn, USA               |
| Rekombinantes humanes Interferon- $\gamma$ | 4 ng/ml                                      | Assay-Puffer             | 50   | Endogen                               |
| Biotin-gekoppelter Antikörper              | 800 ng/ml                                    | Assay-Puffer             | 50   | Endogen                               |
| Enzymkomplex                               | 1:15 000                                     | Assay-Puffer             | 100  | Zymed Corp.,<br>San Francisco,<br>USA |

**Tabelle 2-2:** Interferon- $\gamma$  ELISA

| <i>Substanz</i>                     | <i>Konzentration<br/>bzw.<br/>Verdünnung</i> | <i>Verdünnungsmedium</i> | <i>Volumen in<br/><math>\mu</math>l/Well</i> | <i>Hersteller</i>                     |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--|---------------------------------------|
| Primärer Antikörper                 | 2,5 $\mu$ g/ml                               | PBS                      | 100  | Endogen,<br>Woburn, USA               |
| Rekombinantes humanes Interleukin-4 | 4 ng/ml                                      | Assay-Puffer             | 50   | R&D Systems,<br>Minneapolis,<br>USA   |
| Biotin-gekoppelter Antikörper       | 500 ng/ml                                    | Assay-Puffer             | 50   | Endogen                               |
| Enzymkomplex                        | 1:4 000                                      | Assay-Puffer             | 100  | Zymed Corp.,<br>San Francisco,<br>USA |

**Tabelle 2-3:** Interleukin-4 ELISA

| <i>Substanz</i>                            | <i>Konzentration<br/>bzw.<br/>Verdünnung</i> | <i>Verdünnungsmedium</i> | <i>Volumen in<br/><math>\mu</math>l/Well</i> | <i>Hersteller</i>                     |
|--|--|--------------------------|--|---------------------------------------|
| Primärer<br>Antikörper                     | 2,5 $\mu$ g/ml                               | PBS                      | 100  | Endogen,<br>Woburn, USA               |
| Rekombinantes<br>humanes<br>Interleukin-10 | 4 ng/ml                                      | Assay-Puffer             | 50   | Endogen                               |
| Biotin-<br>gekoppelter<br>Antikörper       | 500 ng/ml                                    | Assay-Puffer             | 50   | Endogen                               |
| Enzymkomplex                               | 1:8 000                                      | Assay-Puffer             | 100  | Zymed Corp.,<br>San Francisco,<br>USA |

**Tabelle 2-4:** Interleukin-10 ELISA

---

## 2.9 *Statistische Auswertung und Präsentation*

Die abgebildeten Daten der durchflusszytometrischen Messungen sowie der  $^{51}\text{Cr}$ -Assays und der ELISA-Ergebnisse stellen eine möglichst repräsentative Auswahl der mehrfach durchgeführten Versuche dar. In den Tabellen sind entweder die Daten aller gewerteten Einzelversuche enthalten oder der Mittelwert mit Angabe der unterschiedlichen Einzelmessungen.

Expansionsverläufe im Verlauf von CTL-Kulturen und die Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen im Überstand der Kulturen werden als Median mit erstem und drittem Quartil dargestellt. Zur Bestimmung des Expansionsverhaltens wurden die Zellzahlen der unterschiedlichen Kulturen auf eine relative Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen umgerechnet und zusammengefasst.

Zum Vergleich des Immunphänotyps zwischen nativen und malignen B-Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Oberflächenmoleküle in fünf Grade von negativ bis sehr hoch eingeteilt und mit einer entsprechenden Anzahl von „-“ oder „+“ gekennzeichnet. Die Einteilung orientierte sich dabei an den Grenzen, die in einer ähnlichen Untersuchung verwendet wurden (Buhmann [9]).

Eine statistische Auswertung erfolgte für die Interferon- $\gamma$ -ELISA mittels Kruskal-Wallis-Test und Multi-Paarvergleich. Eine Signifikanz wurde dabei bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

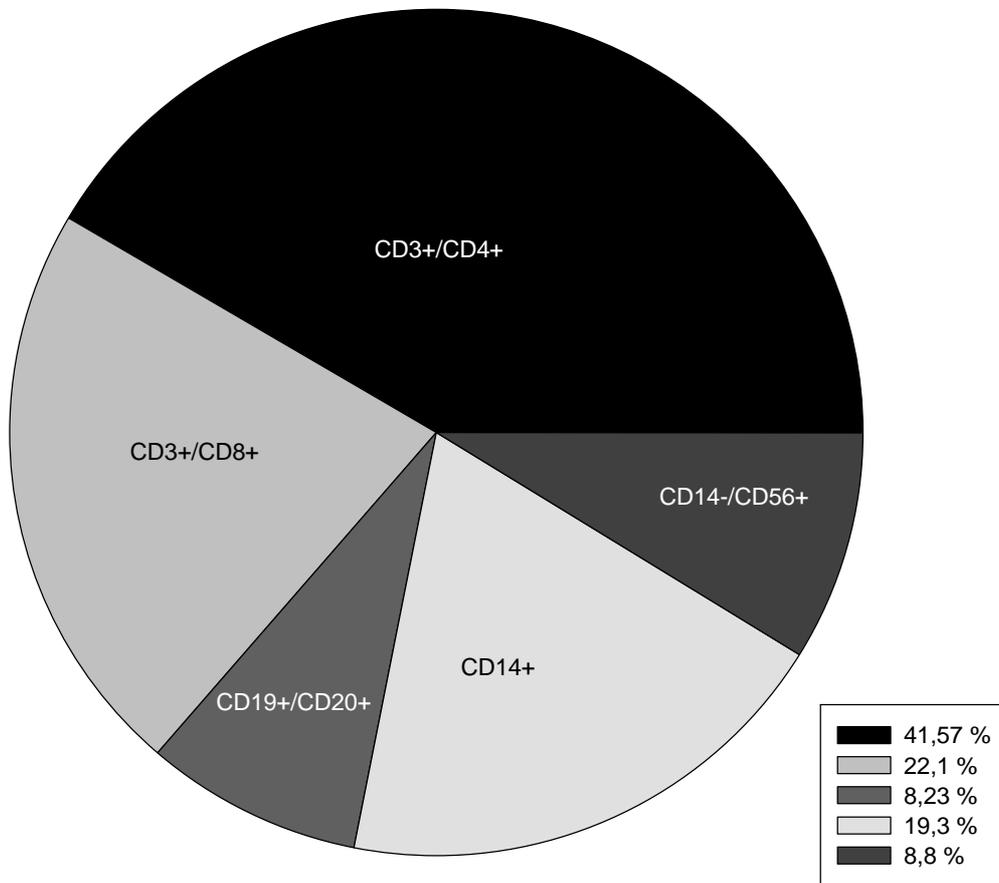
#### 3.1 *Vorbereitende Versuche mit gesunden PMNC*

##### 3.1.1 PMNC-Zellpopulationen

Zur immunphänotypischen Charakterisierung aller aus buffy coats isolierten Zellen wurden diese nach der Aufarbeitung durchflusszytometrisch untersucht. Die peripheren mononukleären Zellen stellen keine einheitliche Fraktion dar, sondern setzen sich aus verschiedenen Subpopulationen zusammen. Wichtige Subpopulationen sind T-Helfer-Zellen ( $CD3^+/CD4^+$ ), zytotoxische T-Zellen ( $CD3^+/CD8^+$ ), Monozyten ( $CD14^+$ ), B-Zellen ( $CD19^+/CD20^+$ ) und NK-Zellen ( $CD3^+/CD56^+$ ).

Für die auf der nächsten Seite folgende Abbildung 3-1 wurden die in der Ficoll-Separation isolierten PMNC von 12 buffy coats in Zweifachfarbansätzen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, Brüssel, Belgien). Aus den erstellten Dot Plots wurden die prozentualen Anteile der Fraktionen abgelesen und der Mittelwert berechnet.

Von besonderer Bedeutung für die beschriebenen Versuche war der Anteil an B-Zellen ( $8,23 \pm 2,4 \%$ ) und die Menge der zytotoxischen T-Zellen ( $22,1 \pm 3,6 \%$ ).



**Abbildung 3-1:** Graphische Darstellung der PMNC-Subpopulationen

Nach der Aufreinigung von buffy coats mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die gewonnenen Zellen per FACS-Analyse auf ihren Phänotyp untersucht (n=12). Der angegebene prozentuale Wert repräsentiert den errechneten Mittelwert.

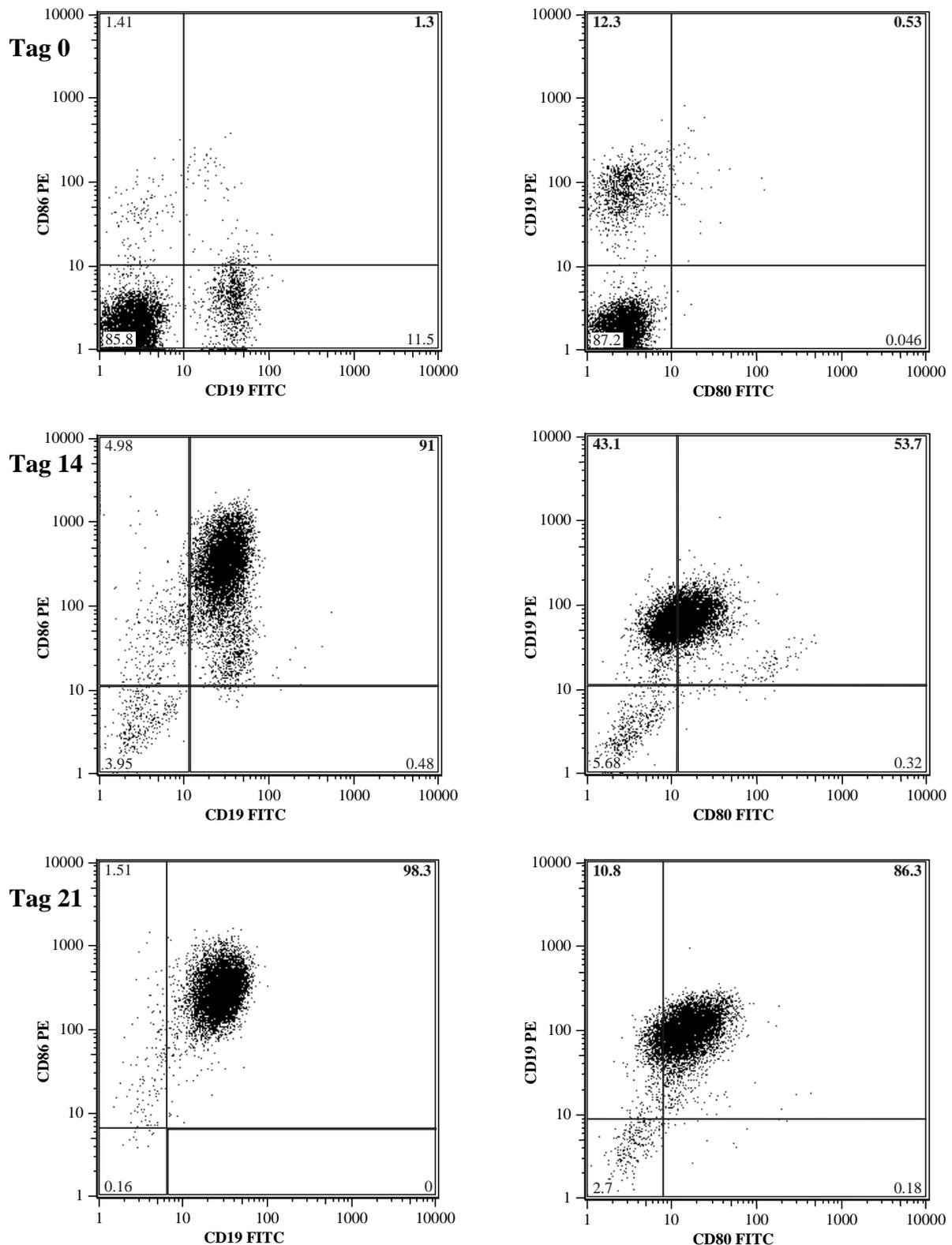
### 3.1.2 Aktivierung gesunder B-Zellen

Die Aktivierung von gesunden B-Zellen erfolgte in einer Kokultur von PMNC mit tCD40L-Fibroblasten. Mit IL-4 als B-Zell-spezifischem Wachstumsfaktor und Ciclosporin A zur Suppression der ursprünglich vorhandenen T-Zellen wurde das Herauswachsen gesunder aktivierter B-Zellen gefördert. Durchflusszytometrische Messungen in wöchentlichen Abständen erlaubten Rückschlüsse über die zunehmende Aktivierung anhand der steigenden Expression der MHC-Moleküle der Klasse II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Zusätzlich sind in der folgenden Tabelle 3-1 die Expression vom T-Zell-Marker CD3 und dem B-Zell-Marker CD19 aufgeführt. CD23 ist charakteristisch für aktivierte B-Zellen und wurde als weiterer Aktivierungsmarker bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Kulturen mit verschiedenen buffy coats.

| Tag der B-Zell-Kultur | % - Anteil der Oberflächenexpression |       |       |        |       |       |       |
|-----------------------|--------------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
|                       | CD3                                  | CD19  | MHC-I | MHC-II | CD23  | CD80  | CD86  |
| 0                     | 60,6                                 | 11,4  | 97,99 | 38,63  | 10,72 | 5,98  | 28,66 |
| 7                     | 38,21                                | 52,26 | 98,87 | 66,79  | 51,89 | 31,11 | 61,14 |
| 14                    | 21,07                                | 74,02 | 98,74 | 92,19  | 80,59 | 62,03 | 88,88 |
| 21                    | 10,62                                | 76,13 | 97,83 | 96,13  | 76,66 | 65,6  | 91,45 |
| 35                    | 9,55                                 | 87,28 | 99,48 | 98,54  | 91,38 | 66,66 | 97,09 |

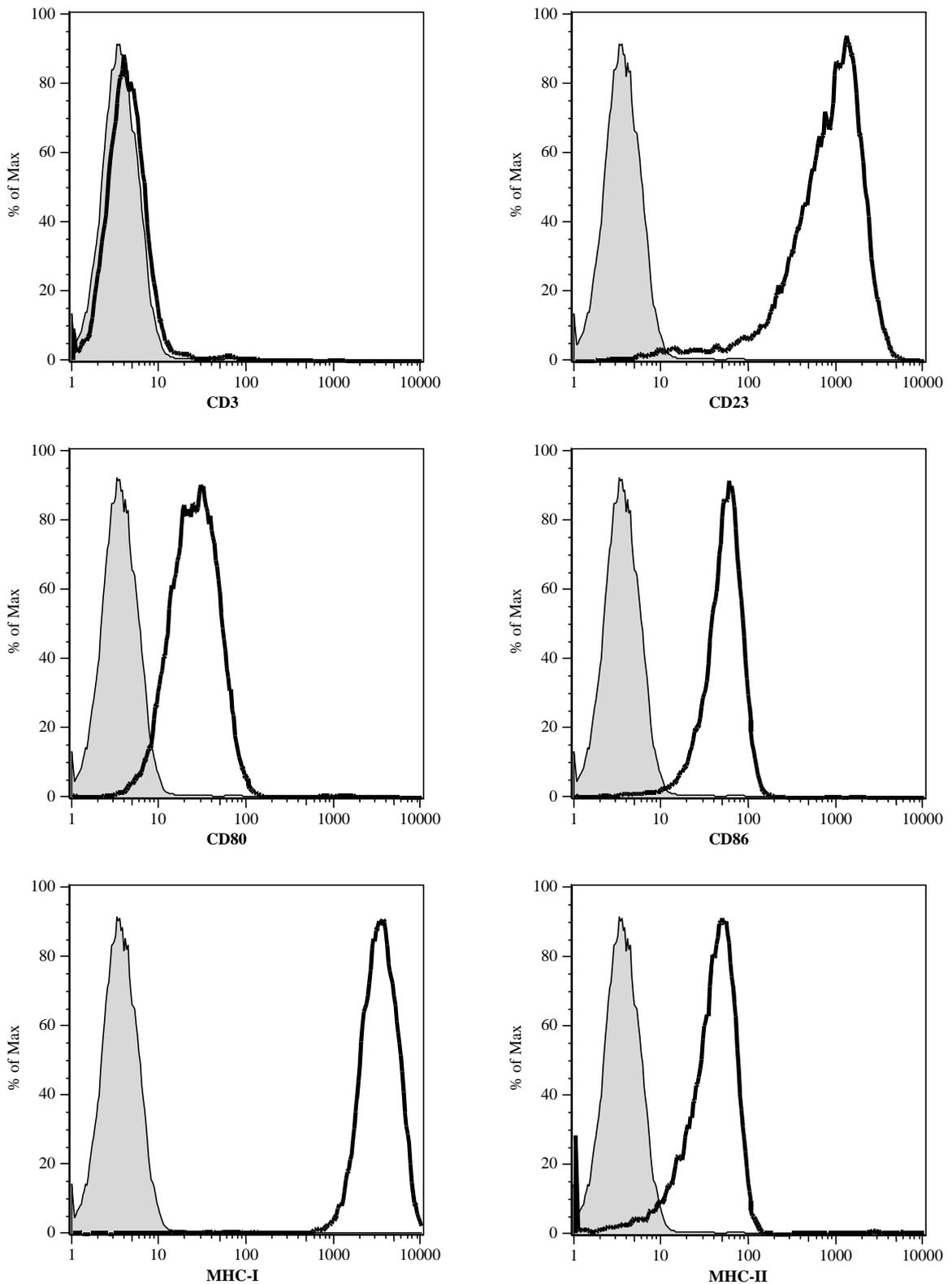
**Tabelle 3-1:** Prozentuale Anteile der Oberflächenmoleküle in der B-Zell-Kultur bis zum Tag 35 (n=5)

Unter den angewendeten Kulturbedingungen war es innerhalb von zwei bis drei Wochen möglich, aktivierte B-Zellen zu generieren und diese Kultur über Wochen fortzuführen. Die Expression der MHC-II-Moleküle und der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 nahm in den ersten vierzehn Tagen stetig zu und blieb dann konstant auf einem hohem Niveau. CD23 als Merkmal hochaktivierter B-Zellen wurde ebenfalls hochreguliert.



**Abbildung 3-2: CD80/CD86 im Verlauf einer B-Zell-Kultur (Tag 0, 14, 21)**

Repräsentative Darstellung für 5 verschiedene Kulturen. **FITC/PE**  $\Rightarrow$  Fluoreszenzen der Antikörper; Zahlenwerte in den Quadranten  $\Rightarrow$  Prozentualer Anteil in der Kultur.

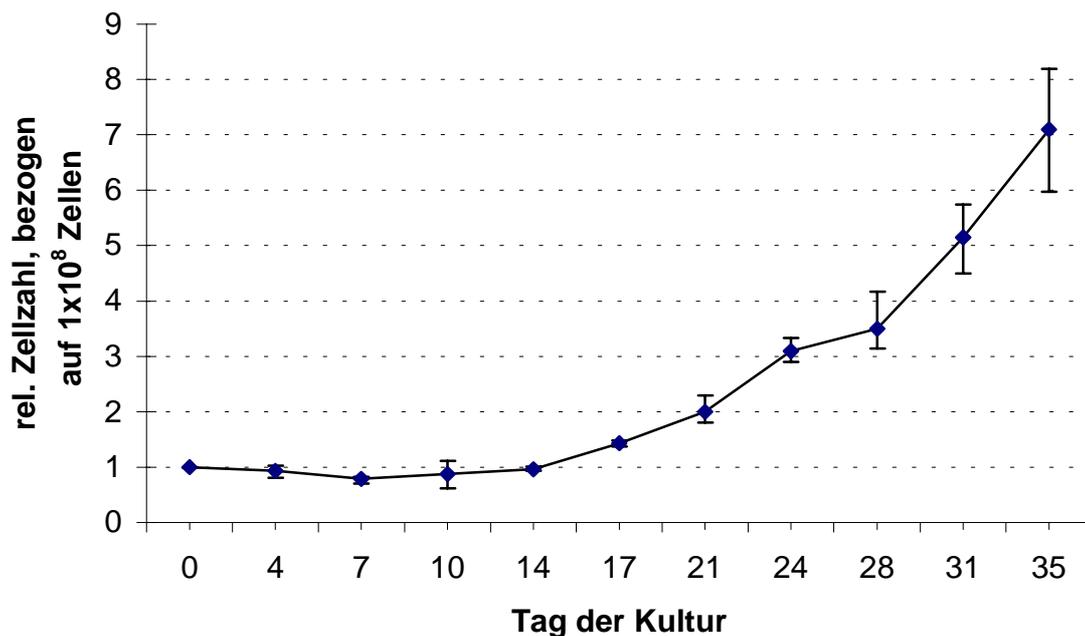


**Abb. 3-3:** Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle in einer B-Zell-Kultur

Beispiel einer B-Zell-Kultur am Tag 41 (repräsentativ für fünf unabhängige Versuche);  
grau unterlegt: Isotypenkontrolle, weißer Peak: Expression des angegebenen Moleküls

Aktivierete B-Zellen konnten für einige Wochen in einem vergleichbaren Zustand der Aktivierung fortgeführt werden.

Das Wachstumsverhalten zeigte zunächst eine leichte Abnahme der Zellzahl, welche von einer stetig zunehmenden Zellexpansion abgelöst wurde. Dieses rührt von der Tatsache her, dass mit einer Mischfraktion von PMNC begonnen wurde, aus der dann durch die B-Zell-spezifischen Kulturbedingungen aktivierte B-Zellen herauswuchsen. Mit dem wachsenden Anteil expandierender B-Zellen stellt die Wachstumskurve nach dem Tag 14 ausschließlich das Wachstumsverhalten dieser B-Zellen dar. Durch regelmäßigen Mediumwechsel und Erneuerung der Kokulturplatten war also eine Kultivierung für längere Zeiträume bei stetiger Expansion und gleichbleibendem Immunphänotyp möglich.



**Abb. 3-4:** Expansion von B-Zell-Kulturen

Für diese Abbildung wurden Expansionsdaten von vier unterschiedlichen B-Zell-Kulturen zusammengefasst und auf eine relative Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen am Tag 0 umgerechnet. Gezeigt sind der Median sowie das erste und dritte Quartil ( $n=4$ ).

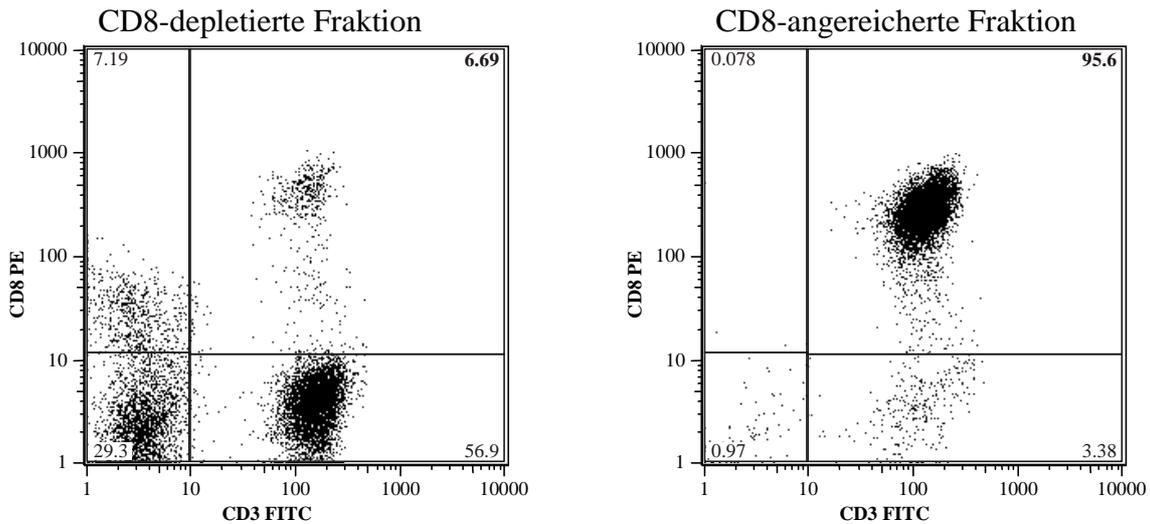
### 3.1.3 CD8<sup>+</sup>-Separation

Um eine möglichst reine CD8<sup>+</sup>-Ausgangsfraction für die CTL-Kultur einsetzen zu können, wurden PMNC nach ihrer Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation noch einmal mit einem CD8<sup>+</sup>-Isolation Kit<sup>®</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; siehe 2.3.3) magnetisch aufgetrennt. Nach der Separation wurden die beiden erhaltenen Zellfraktionen durchflusszytometrisch auf ihre Zusammensetzung untersucht.

| <i>Untersuchte<br/>Fraktion</i>   | <b>%-Anteil der Zellpopulationen</b> |                                      |                         |                         |   |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
|                                   | <i>CD3<sup>+</sup>/4<sup>+</sup></i> | <i>CD3<sup>+</sup>/8<sup>+</sup></i> | <i>CD19<sup>+</sup></i> | <i>CD14<sup>+</sup></i> | <i>CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup></i> |
| Ausgangs-<br>PMNC                 | 42,74                                | 20,21                                | 9,25                    | 16,5                    | 9,79                                    |
| CD8-<br>angereicherte<br>Fraktion | 0,46                                 | 85,44                                | 1,49                    | 0,06                    | 0,25                                    |
| CD8-<br>depletierte<br>Fraktion   | 48,67                                | 7,42                                 | 9,24                    | 18,98                   | 9,32                                    |

**Tab.3-2:** Zusammensetzung der Zellpopulationen vor und nach CD8-Separation

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Versuchen.



**Abb.3-5:** Zellfraktionen nach der CD8-Separation

Ein Beispiel für den Phänotyp der beiden Zellfraktionen nach einer CD8-Separation, Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD8. Die Zahlenwerte in den Quadranten geben den prozentualen Anteil der Expression an der Gesamtfraktion an. Die Abbildungen sind repräsentativ für vier voneinander unabhängige Versuche.

Durch die immunomagnetische Aufreinigung der PMNC mittels CD8<sup>+</sup> Isolation Kit<sup>®</sup> konnte eine Zellfraktion gewonnen werden, welche im Mittel aus 85,44 % CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestand (stets > 80 %) und nur noch geringe Restmengen der übrigen PMNC-Subfraktionen enthielt (jede andere Fraktion < 1,5 %). Da die Aufreinigung eine negative Selektion darstellt, wurde der Großteil der Ausgangszellen mit Antikörper-Beads markiert. Daraus erklärt sich der relativ hohe Anteil von durchschnittlich 7,42 % CD8<sup>+</sup>-Zellen in der CD8-depletierten Fraktion. Die Aufnahmefähigkeit von Aufreinigungsäulen ist auf eine bestimmte Zellmenge begrenzt. Die unmarkierten Zellen werden daher trotz Spülens zu einem Teil in der Säule durch die markierten Zellen zurückgehalten. Auf einen weiteren Trennungsschritt durch eine zweite Säule wurde aber verzichtet, da die Zellmengen zu gering gewesen wären. Die in einem Separationsschritt erreichte Zellmenge und Reinheit war für die Testreihen vollkommen ausreichend. Zudem konnte durch Negativselektion eine weitgehend nicht-voraktivierte CD8<sup>+</sup>-Fraktion gewonnen werden.

---

## 3.2 *Charakterisierung und Aktivierung maligner B-Zellen*

### 3.2.1 Patientenkollektiv

Für die Untersuchung konnten Proben von insgesamt elf Patienten aufgearbeitet werden. In vier Fällen waren die isolierten Zellzahlen entweder zu gering, um Versuche durchführen zu können, oder es waren bei durchflusszytometrischer Kontrolle keine malignen Zellen nachweisbar. Die Tabelle 3-3 auf Seite 42 zeigt eine Übersicht über die Patientenproben und die Möglichkeit, mit ihnen CTL-Ansätze durchzuführen. Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden die Proben mit fortlaufenden Patientenidentifikationsnummern (UPN) gekennzeichnet.

Bei sieben Patienten konnte eine ausreichende Menge an B-NHL-Zellen aufgearbeitet werden. Die Zellzahlen variierten zwischen  $1\text{-}30 \times 10^8$  Zellen und waren im Einzelfall abhängig vom Volumen der Blutprobe (20-40 ml), dem Grad der Leukozytose des Patienten und der mechanischen Belastbarkeit labiler B-NHL-Zellen. In jedem Fall wurde ein geringer Teil der Zellen zur immunphänotypischen Charakterisierung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt, um die Zusammensetzung der Probe zu bestimmen. Bei Patienten mit einer B-CLL wurde die Fraktion der  $\text{CD}5^+/\text{CD}19^+$ -Zellen als immunphänotypisches Korrelat der Erkrankung bestimmt, beim Immunozytom der Anteil der  $\text{CD}5^-/\text{CD}19^+$ -Zellen. Zusätzlich sicherte der Nachweis einer Immunglobulin-Leichtkettenrestriktion das Vorliegen einer monoklonalen malignen Population. Da in allen Fällen der Anteil maligner Zellen sehr hoch war ( $> 70\%$ ), wurde auf eine weitere Auftrennung verzichtet. Der Zellverlust durch weitere Markierungs- und Zentrifugationsschritte wäre zu groß gewesen. Bei fünf von sieben Patienten war zudem der Anteil von T-Zellen und anderen Zelltypen so gering, dass keine autologen T-Zellen isolierbar waren.

Für autologe Testreihen kamen somit nur zwei Patienten (05 und 02, siehe Tabelle 3-3) in Frage – bei ihnen war eine Restmenge von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen. Aufgrund der geringen Zellmengen wurde eine CD8-Separation jedoch

---

nicht durchgeführt, so dass eine PMNC-Mischpopulation die Ausgangsfraction für die CTL-Kulturen bildete.

Allogene CTL-Ansätze mit HLA-identem Spender waren ebenfalls bei zwei Patienten möglich. Im ersten Fall (02) wurden die PMNC des Spenders nicht weiter aufgereinigt und es konnten zwei Versuchsansätze im HLA-identen System durchgeführt werden. Beim zweiten Fall (06) wurde nach der PMNC-Gewinnung eine CD8-Separation der Spenderzellen durchgeführt. Damit war nur ein Ansatz möglich, bei welchem die CTL-Ausgangsfraction eine nahezu reine CD8<sup>+</sup>-Population darstellte.

In sechs von sieben möglichen Fällen dienten die malignen B-Zellen der Stimulation allogener, nicht-HLA-identer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Waren ausreichende Zellmengen vorhanden, konnten einige Ansätze mehrfach durchgeführt werden. In diesem Fall wurden die Ansätze individuell bei jedem Patienten mit römischen Ziffern durchnummeriert. Die Benennung der Ansätze mit den UPN zeigt die jeweils eingesetzten B-NHL-Zellen zur Stimulation der T-Zellen an. Die T-Zellen stammten stets aus unterschiedlichen buffy coats, welche nicht näher bezeichnet wurden.

| <i>UPN</i> | <i>Erkrankung</i> | <i>Leichtketten<br/>-restriktion</i> | <i>Material</i>                             | <i>Spender</i>       | <i>Durchgeführte<br/>Experimente</i> |
|------------|-------------------|--------------------------------------|---|----------------------|--------------------------------------|
| 01         | B-CLL             | λ-Kette                              | Peripheres Blut                             | /                    | <b>3</b>                             |
| 02         | B-CLL             | Nicht<br>nachweisbar                 | Peripheres Blut,<br>Knochen-<br>markaspirat | Periphe-<br>res Blut | <b>1, 2, 3</b>                       |
| 03         | B-CLL             | κ-Kette                              | Peripheres Blut                             | /                    | <b>3</b>                             |
| 04         | B-CLL             | κ-Kette                              | Peripheres Blut                             | /                    | <b>3</b>                             |
| 05         | B-CLL             | κ-Kette                              | Lymphknoten,<br>Peripheres Blut             | /                    | <b>1, 3</b>                          |
| 06         | Immuno-<br>zytom  | κ-Kette                              | Peripheres Blut                             | Periphe-<br>res Blut | <b>2</b>                             |
| 07         | B-CLL             | ND                                   | Peripheres Blut,<br>Knochen-<br>markaspirat | Periphe-<br>res Blut | <b>4</b>                             |
| 08         | Immuno-<br>zytom  | ND                                   | Peripheres Blut                             | /                    | <b>4</b>                             |
| 09         | B-CLL             | ND                                   | Knochenmark-<br>aspirat,<br>Lymphknoten     | /                    | <b>4</b>                             |
| 10         | B-CLL             | ND                                   | Peripheres Blut                             | Periphe-<br>res Blut | <b>4</b>                             |
| 11         | B-CLL             | κ-Kette                              | Peripheres Blut                             | /                    | <b>3</b>                             |

**Tabelle 3-3:** Übersicht über die Patientenproben und die durchgeführten Experimente

Erläuterung zu den Zahlen : **1** ⇒ autologer Ansatz, **2** ⇒ allogener Ansatz mit HLA-identem Spender, **3** ⇒ allogener, nicht-HLA-typisierter Ansatz, **4** ⇒ kein Ansatz möglich; **ND** ⇒ nicht durchgeführt

---

## 3.2.2 Aktivierung maligner B-Zellen

### 3.2.2.1 Immunphänotyp nativer maligner B-Zellen

In den nachfolgenden Tabellen sind bis auf eine Ausnahme alle Proben aufgenommen, mit denen auch CTL-Ansätze durchgeführt wurden. Beim Patienten 06 reichte die Zellmenge nicht für eine Charakterisierung aktivierter maligner B-Zellen, so dass auch kein Vergleich mit der Ausgangsprobe möglich war. Aus diesem Grund wurde er nicht in die Übersicht aufgenommen.

Die untersuchten, frisch isolierten malignen B-Zellen zeigen eine relativ hohe Expression von MHC-Molekülen der Klassen I und II. Dagegen werden Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle nur sehr gering bis überhaupt nicht exprimiert.

In allen sechs Proben zeigte sich direkt nach der Isolierung eine hohe bzw. sehr hohe Expression von MHC-Molekülen der Klassen I und II (Abstufungen siehe Tabelle 3-4). Die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) waren bis auf einen Fall, in dem sich eine hohe Expression von CD54 (Patient 11) zeigte, nur in einem mittleren bis geringen Grad exprimiert. Ebenso waren die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 lediglich im geringen bis mittleren Maße exprimiert. Bei einem Patienten (Patient 04) war CD80 überhaupt nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar. CD40 wurde bei den zwei durchgeführten Messungen ebenfalls in einer mittleren Fluoreszenzintensität nachgewiesen.

Insgesamt zeigte sich also eine deutlich reduzierte Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen, insbesondere von CD80.

| UPN | <u>Erkennung</u> |        | <u>Adhäsion</u> |      | <u>Kostimulation</u> |      |      |
|-----|------------------|--------|-----------------|------|----------------------|------|------|
|     | MHC-I            | MHC-II | CD54            | CD58 | CD80                 | CD86 | CD40 |
| 01  | ++++             | ++++   | +               | +    | ++                   | ++   | ND   |
| 02  | ++++             | +++    | +               | ND   | +                    | ++   | ND   |
| 03  | ++++             | ++++   | +               | ND   | +                    | ++   | ND   |
| 04  | ++++             | ++++   | ND              | +    | -                    | ++   | ++   |
| 05  | ++++             | +++    | ++              | ND   | +                    | ++   | ND   |
| 11  | ++++             | +++    | +++             | ++   | ++                   | ++   | ++   |

**Tabelle 3-4:** Immunphänotyp nativer B-NHL-Zellen aus den Patientenproben

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Oberflächenmoleküle:

|      |   |                    |             |
|------|---|--------------------|-------------|
| -    | : | negativ            |             |
| +    | : | > 0,2-0,5 log      | (niedrig)   |
| ++   | : | 0,5-1,5 log        | (mittel)    |
| +++  | : | 1,5-2,5 log        | (hoch)      |
| ++++ | : | > 2,5 log          | (sehr hoch) |
| ND   | : | nicht durchgeführt |             |

---

### 3.2.2.2 Immunphänotyp nach Aktivierung mit CD40Ligand

Die Kokultur maligner B-Zellen mit tCD40L-Fibroblasten in Gegenwart von IL-4 führte über den Zeitraum von vier Tagen zu einer deutlichen Hochregulation der Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle. Die unveränderte Koexpression von CD5 und CD19 (Abbildung 3-6) bzw. der Nachweis der Leichtkettenrestriktion (nicht dargestellt) zeigten, dass diese immunphänotypischen Charakteristika maligner B-Zellen während der Kokultur unbeeinflusst blieben.

Die Auswertung und Stadieneinteilung der Oberflächenexpression orientiert sich an Tabelle 3-4. In der Tabelle 3-5 ist die Zunahme/Veränderung der Expression nach CD40L-Aktivierung im Vergleich zum nichtaktivierten Zustand durch blaue Pluszeichen hervorgehoben.

In allen Fällen konnte beobachtet werden, dass die CD86-Expression von mittlerer Intensität auf hohe (ein Patient) bzw. sehr hohe (sechs der sieben Patienten) Werte zunahm. CD80 wurde nach Aktivierung bei allen Patientenproben im mittleren Grad exprimiert. Das bedeutete bei zwei Patienten keine Veränderung, bei allen anderen eine Zunahme um ein bis zwei Expressionsgrade (Einteilung gemäß Tabellen 3-4/5). Eine CD40-Expression zeigte sich bei allen Patienten ebenfalls in mittlerer Intensität.

Die Adhäsionsmoleküle CD54 und CD58 nahmen in allen Fällen in ihrer Expression deutlich zu. Besonders CD54 wurde nach Aktivierung von allen Zellen sehr hoch exprimiert, was eine Zunahme um bis zu drei Expressionsgrade bedeutete. Auch die Expression von CD58 lag bei allen Zellen ausschließlich im hohen und sehr hohen Bereich.

Die Expression der MHC-Moleküle nahm in zwei Fällen, bei denen MHC-Moleküle der Klasse II vor der Aktivierung einen hohen Grad zeigten, weiter zu. In den restlichen Fällen war eine gleichbleibend sehr hohe Expression zu beobachten.

| UPN | <u>Erkennung</u> |        | <u>Adhäsion</u> |      | <u>Kostimulation</u> |      |      |
|-----|------------------|--------|-----------------|------|----------------------|------|------|
|     | MHC-I            | MHC-II | CD54            | CD58 | CD80                 | CD86 | CD40 |
| 01  | ++++             | ++++   | ++++            | +++  | ++                   | ++++ | ++   |
| 02  | ++++             | ++++   | ++++            | ++++ | ++                   | ++++ | ++   |
| 03  | ++++             | ++++   | ++++            | +++  | ++                   | ++++ | ++   |
| 04  | ++++             | ++++   | ++++            | ++++ | ++                   | ++++ | ++   |
| 05  | ++++             | ++++   | ++++            | ++++ | ++                   | ++++ | ++   |
| 11  | ++++             | +++    | +++             | +++  | ++                   | ++++ | ++   |

**Tabelle 3-5:** Immunphänotyp aktivierter B-NHL-Zellen

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Oberflächenmoleküle:

|      |   |                    |             |
|------|---|--------------------|-------------|
| -    | : | negativ            |             |
| +    | : | > 0,2-0,5 log      | (niedrig)   |
| ++   | : | 0,5-1,5 log        | (mittel)    |
| +++  | : | 1,5-2,5 log        | (hoch)      |
| ++++ | : | > 2,5 log          | (sehr hoch) |
| ND   | : | nicht durchgeführt |             |

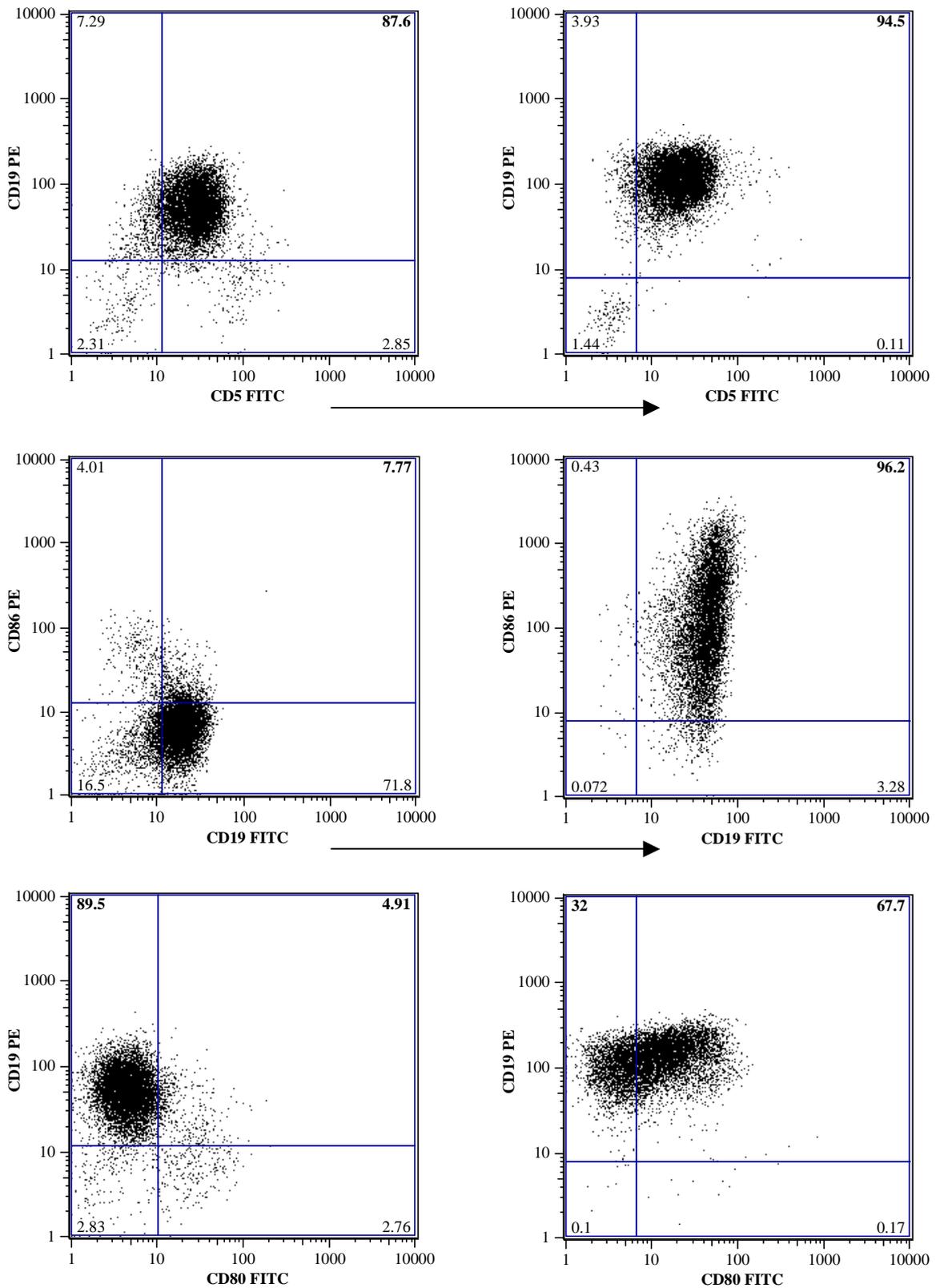
Die blauen „+“ zeigen die Zunahme der Expression im Vergleich zu den frisch isolierten B-NHL-Zellen.

---

### 3.2.2.3 Wachstumsverhalten in der tCD40L-Kokultur

Im Gegensatz zu der beobachteten Expansion gesunder B-Zellen in der tCD40L-Kokultur konnte bei den malignen B-Zellen keine Zunahme der Zellzahlen beobachtet werden. Die Dauer der Kokultur war allerdings auf vier Tage begrenzt und der Beobachtungszeitraum deshalb zu gering.

Da während einer längeren Kokultur die Möglichkeit bestanden hätte, dass gesunde residuale B-Zellen des Patienten expandieren und nach einiger Zeit den Hauptanteil der Kultur stellen, wurde die Dauer der Kokultur maligner B-Zellen mit tCD40L-Fibroblasten auf vier Tage begrenzt. Diese Zeit war für die Aktivierung der B-NHL-Zellen vollkommen ausreichend, wie Abbildung 3-6 auf der folgenden Seite veranschaulicht.

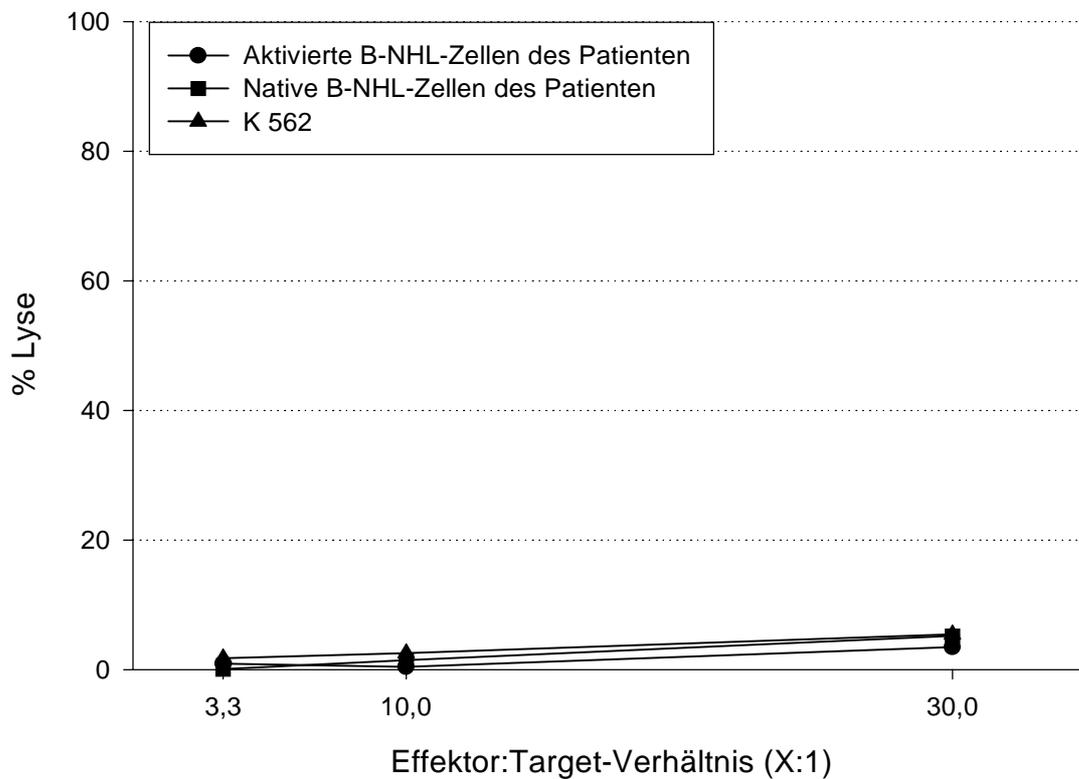


**Abb. 3-6:** Hochregulation von CD80/86 nach vier Tagen tCD40L-Kokultur

Repräsentative Darstellung des Immunphänotyps maligner B-Zellen nach Stimulation bei stabiler CD5/CD19-Koexpression; linke Spalte: d0, rechte Spalte: d4 (Patient 05).

### 3.3 Zytotoxizität von CTL nach Stimulation mit aktivierten malignen B-Zellen

#### 3.3.1 Stimulation autologer T-Zellen



**Abbildung 3-7:** Zytotoxische Aktivität von autologen CTL nach Stimulation mit aktivierten B-NHL-Zellen

Repräsentative Darstellung der zytotoxischen Aktivität (Kultur 05/II) einer autologen CTL-Kultur an R2d6 (Tag 20 der Kultur)

| <i>Kultur</i> | <b>Spezifische Lyse der Zielzellen (%)</b>       |  |             |
|---------------|--|--|-------------|
|               | <b>Effektor:Target-Verhältnis jeweils 30:1</b>   |  |             |
|               | <i>Aktivierte B-NHL-Zellen<br/>des Patienten</i> | <i>Native B-NHL-Zellen<br/>des Patienten</i> | <i>K562</i> |
| 05/I          | 0,4  | 1,4  | 6,5         |
| 05/II         | 3,5  | 5,5  | 5,2         |
| 02/I          | 0,4  | 0,8  | 0,6         |

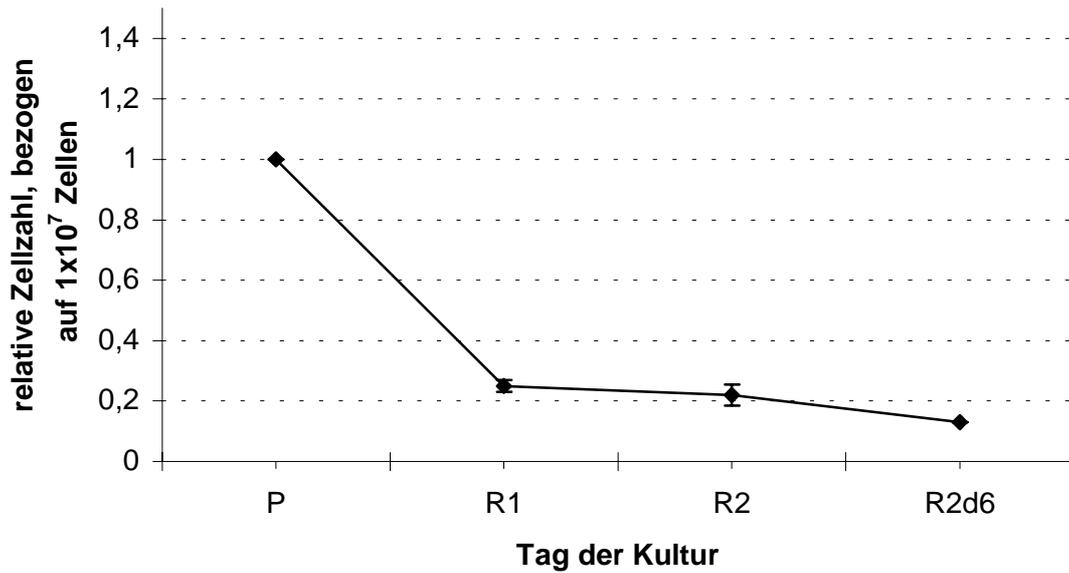
**Tabelle 3-6:** Zytotoxische Aktivität von autologen T-Zellen nach Stimulation mit aktivierten B-NHL-Zellen

Die zytotoxische Aktivität wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay am Tag 20 der Kultur (R2d6) gemessen. Die Bezeichnung des Ansatzes mit den jeweiligen UPN kennzeichnet immer die Herkunft der verwendeten malignen B-Zellen. Die römische Ziffer wird bei jedem Patienten zur Nummerierung der jeweils erfolgten Kulturen eingesetzt.

Insgesamt war es lediglich bei zwei Patienten möglich, autologe T-Zellen zur CTL-Generierung zu isolieren. Beim Patienten 05 konnten zwei unterschiedliche Kulturen durchgeführt werden, beim Patienten 02 eine. In allen drei CTL-Kulturen waren die Ausgangseffektorzellen PMNC-Mischpopulationen, da die geringen Zellzahlen eine CD8-Separation nicht erlaubten.

In den standardmäßig an Tag 20 jeder CTL-Kultur durchgeführten  $^{51}\text{Cr}$ -Assays blieb eine spezifische Erkennung der Stimulatorzellen sowie der anderen Targetzellen (native eigene B-NHL-Zellen und die Kontrolle für NK-Zellaktivität K562) aus (Tabelle 3-6).

Im Verlauf der Kultivierung zeigte sich in allen Kulturen eine deutliche Abnahme der Zellzahlen (siehe Abbildung 3-8).

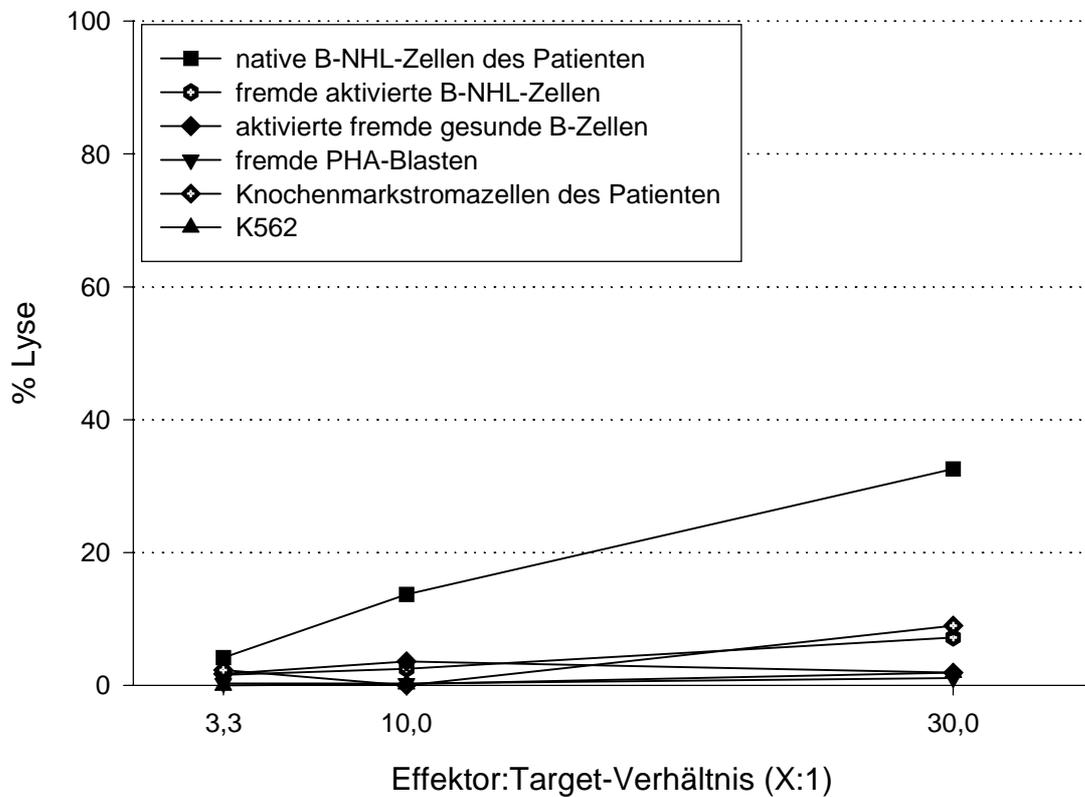


**Abbildung 3-8:** Zellzahlen im Verlauf der Kultivierung autologer CTL-Kulturen

Die Zellzahlen der drei autologen CTL-Kulturen wurden für diese Abbildung zusammengefasst und auf eine relative Zellzahl umgerechnet. Gezeigt sind der Median sowie erstes und drittes Quartil ( $n = 3$ ).

P  $\Rightarrow$  Primärstimulation; R1/R2  $\Rightarrow$  Restimulationen 1+2; R2d6  $\Rightarrow$  Tag 6 nach der 2. Restimulation

## 3.3.2 Stimulation von T-Zellen des HLA-identen Spenders



**Abbildung 3-9:** Zytotoxische Aktivität von T-Zellen des HLA-identen Spenders nach Stimulation mit aktivierten B-NHL-Zellen des Patienten

Gezeigt ist als Beispiel die Kultur 06: die Ergebnisse wurden im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay standardmäßig an Tag 20 (R2d6) der Kultur ermittelt.

| Kultur | Spezifische Lyse der Zielzellen (%)             |                                     |                                      |                                      |                                    |             |             |
|--------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|
|        | Effektor:Target-Verhältnis jeweils 30:1         |                                     |                                      |                                      |                                    |             |             |
|        | <i>Aktivierte<br/>B-NHL-Zellen<br/>des Pat.</i> | <i>Native<br/>B-NHL-<br/>Zellen</i> | <i>Fremde akt. B-<br/>NHL-Zellen</i> | <i>Fremde<br/>akt. B-<br/>Zellen</i> | <i>Fremde<br/>PHA-<br/>Blasten</i> | <i>BMSC</i> | <i>K562</i> |
| 02/II  | 1,2   | 1,7                                 | ND                                   | ND                                   | ND                                 | ND          | 0,9         |
| 02/III | 33,6  | 3,8                                 | 14,3                                 | 16,6                                 | 6,3                                | 7,4         | 48          |
| 06     | ND  | 32,6                                | 7,2                                  | 1,9                                  | 1,1                                | 9           | 1,9         |

**Tabelle 3-7:** Zytotoxische Aktivität in allogenen CTL-Kulturen mit HLA-identen T-Zellen

CTL-Kulturen mit T-Zellen des HLA-identen Spenders konnten bei insgesamt zwei Patienten durchgeführt werden. Beim Patienten 02 wurden zwei CTL-Kulturen durchgeführt, bei denen die PMNC des Spenders nach der Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation direkt als Ausgangsfraktion zur CTL-Generierung dienten. Beim Spender von Patient 06 wurden die gewonnenen PMNC noch einmal über eine CD8-Separation aufgereinigt.

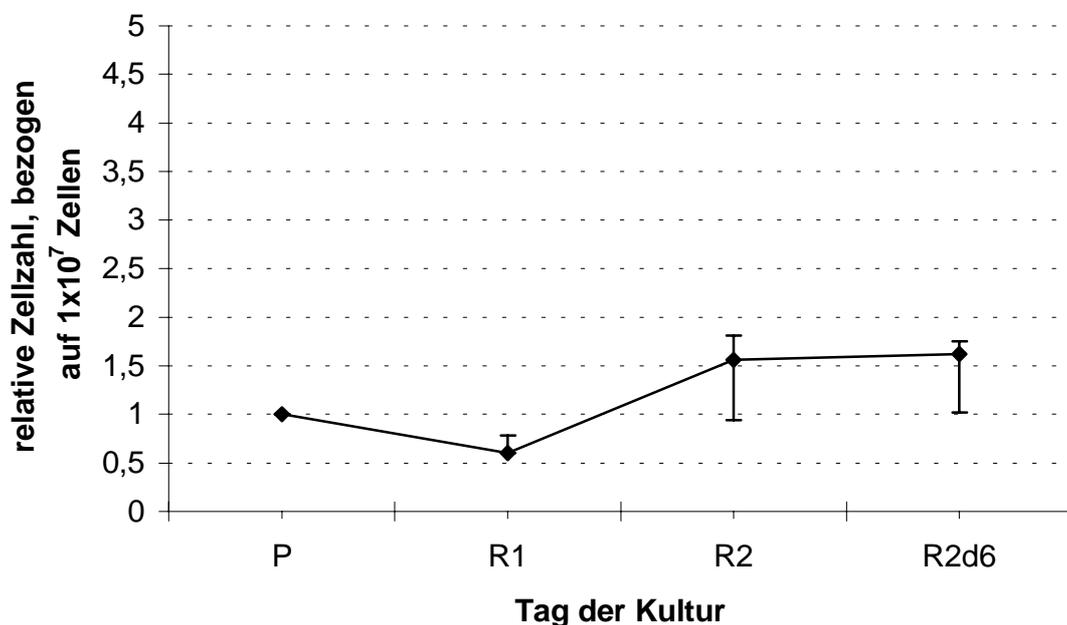
In zwei der durchgeführten Kulturen konnte eine zytotoxische Aktivität der CTL beobachtet werden. Die Kultur 02/II zeigte keine lytische Aktivität.

In der CTL-Kultur 02/III war eine deutliche Lyse der aktivierten B-NHL-Zellen nachweisbar (33,6 %), ebenso wie eine leichte Aktivität gegenüber fremden aktivierten B-NHL-Zellen und fremden gesunden B-Zellen (14,3/16,6 %). Gleichzeitig wurde jedoch auch die Negativkontrolle K562 zu 48 % lysiert, was auf die Präsenz von NK-Zellen in der Kultur hinwies. Dieses konnte bei durchflusszytometrischer Kontrolle bestätigt werden (14,12 % CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-Zellen).

Eine zytotoxische Aktivität ausschließlich gegen native B-NHL-Zellen war in der Kultur 06 zu messen (32,6 %). Aufgrund zu geringer Zellzahlen standen hier keine

aktivierten B-NHL-Zellen zur Verfügung. Die weiteren im Test eingesetzten Zielzellen wurden nicht lysiert.

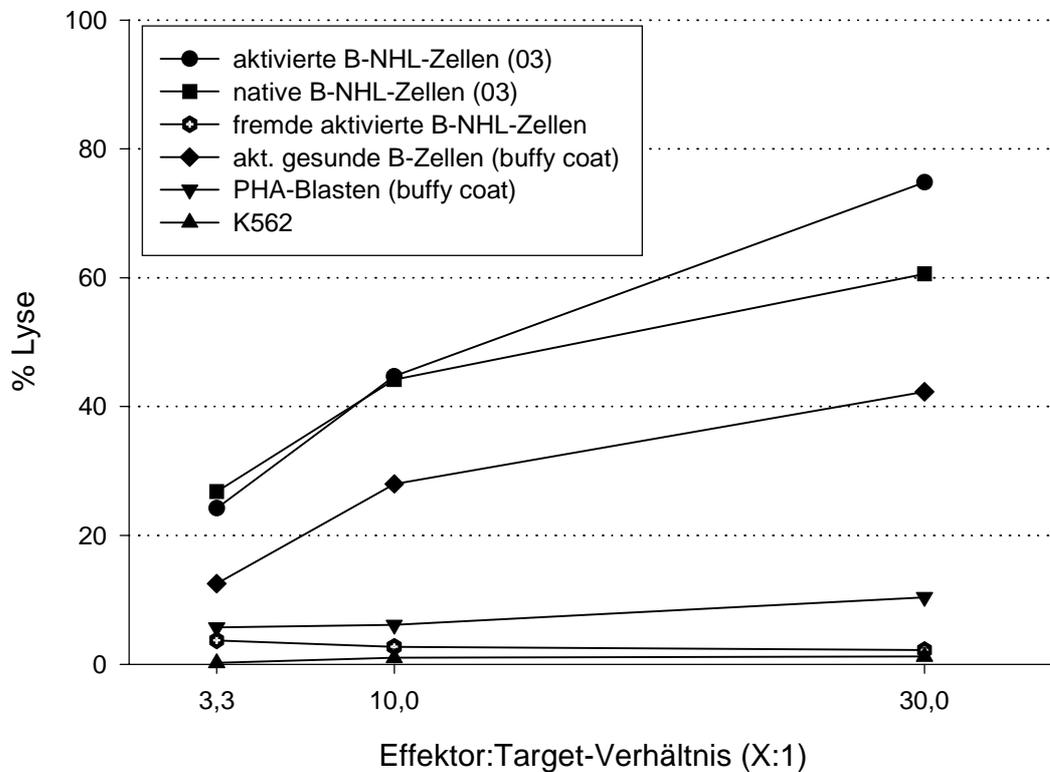
Im Verlauf der Kultivierung stellte sich zum Zeitpunkt der ersten Restimulation zunächst eine leichte Abnahme der eingesetzten Zellzahlen ein, um anschließend gegenüber dem Ausgangswert um durchschnittlich 31,3 % zu steigen und dieses Niveau bis zum  $^{51}\text{Cr}$ -Assay zu halten.



**Abbildung 3-10:** Expansion allogener, HLA-identer T-Zell-Kulturen nach Stimulation mit aktivierten B-NHL-Zellen

Die durchgeführten Kulturen wurden auf eine relative Zellzahl umgerechnet und zusammengefasst. Gezeigt sind der Median sowie erstes und drittes Quartil (n=3).

## 3.3.3 Stimulation allogener, nicht-HLA-typisierter T-Zellen



**Abbildung 3-11:** Zytotoxische Aktivität allogener, nicht-HLA-typisierter T-Zellen nach Stimulation mit aktivierten B-NHL-Zellen

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel für das zytotoxische Verhalten allogener T-Zellen (Kultur 03), gemessen im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay zum Zeitpunkt R2d6.

| Kultur | Spezifische Lyse der Targetzellen (%); Effektor: Target-Verhältnis jeweils 30:1 |                              |                        |                              |                    |               |      |
|--------|---|------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------|---------------|------|
|        | Akt. B-NHL-Zellen des Patienten   | Native B-NHL-Zellen des Pat. | Fremde akt. NHL-Zellen | Fremde akt. gesunde B-Zellen | Fremde PHA-Blasten | BMSC des Pat. | K562 |
| 02/IV  | 4,3   | 0                            | 0                      | ND                           | ND                 | ND            | 1,6  |
| 02/V   | 24,5  | 59,6                         | ND                     | ND                           | ND                 | ND            | 7,1  |
| 02/VI  | 40,6  | 40                           | 7,6                    | 22,3                         | 13,5               | 7,2           | 0,8  |
| 04/I   | 46  | 36,3                         | 6,7                    | 19,8                         | ND                 | ND            | 8,1  |
| 04/II  | 32  | 6,9                          | 6,7                    | 30,8                         | ND                 | ND            | 3,4  |
| 05/III | 30,2  | 21,7                         | 9,2                    | 28,1                         | ND                 | ND            | 1,6  |
| 03     | 74,8  | 60,6                         | 2,2                    | 42,3                         | 10,4               | ND            | 1,2  |
| 01/I   | 6,1   | 14                           | 8,1                    | ND                           | ND                 | ND            | 2,8  |
| 01/II  | 2,8   | 25,8                         | ND                     | ND                           | ND                 | ND            | 4,9  |
| 01/III | 22,6  | 46                           | 10,8                   | 8,8                          | 2,7                | ND            | ND   |
| 11     | 41,7  | 57,4                         | 8                      | 23,5                         | 10,6               | ND            | 0,1  |

**Tabelle 3-8:** Zytotoxische Aktivität in allogenen CTL-Kulturen mit nicht-HLA-typisierten T-Zellen

---

Die Stimulation allogener, nicht-HLA-typisierter T-Zellen aus buffy coats gesunder Blutspender durch aktivierte B-NHL-Zellen wurde in insgesamt elf unterschiedlichen Versuchen getestet. Dabei wurden B-NHL-Zellen von sechs verschiedenen Patienten aktiviert und als Stimulatorzellen eingesetzt. Wurden die Zellen eines Patienten in mehreren Kulturen verwendet, stammten die Effektorzellen auch aus unterschiedlichen buffy coats.

Jede CTL-Kultur wurde am Tag 20, dem sechsten Tag nach der zweiten Restimulation (R2d6), in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Assay auf ihre zytotoxische Aktivität überprüft. Eine ermittelte Lyse von weniger als 15 % wurde als nicht-relevante Erkennung behandelt. Die Kontrolle für NK-Zell-Aktivität, K562, wurde *in keiner Kultur* von den CTL erkannt.

In *neun von elf* Fällen konnte eine *deutliche zytotoxische Aktivität gegenüber B-NHL-Zellen* nachgewiesen werden (Tabelle 3-8). Zwei Kulturen (02/IV und 01/I) zeigten überhaupt keine (02/IV) beziehungsweise nur moderate (01/I) zytotoxische Aktivität, welche nicht als eine positive Erkennung der Stimulatorzellen gewertet werden konnte.

Die Zytotoxizität gegenüber malignen B-Zellen des jeweiligen Patienten war unterschiedlich – nicht immer wurden sowohl aktivierte als auch native B-NHL-Zellen in gleichem Maße erkannt. In vier Kulturen lag die Lyse nativer B-NHL-Zellen zwischen 25,8 und 59,6 %, und damit um bis zu 35,1 Prozentpunkte höher (bei 15,7-35,1 % Differenz) als die der aktivierten B-NHL-Zellen. In einer dieser Kulturen (01/II) waren die nativen B-NHL-Zellen zudem die einzigen erkannten Zielzellen (25,8 % Lyse).

In der Kultur 02/VI wurden aktivierte wie native B-NHL-Zellen des Patienten gleichermaßen zu 40 % bzw. 40,6 % lysiert.

In vier Kulturen war die Lyse aktivierter B-NHL-Zellen stärker (30,2-74,8 %), der Unterschied betrug 8,5-25,1 Prozentpunkte. Bis auf die Kultur 04/II (keine Lyse nativer B-NHL-Zellen) war bei diesen Kulturen aber auch eine deutliche Lyse der nativen B-NHL-Zellen zu beobachten (zwischen 21,7 % und 60,6 %).

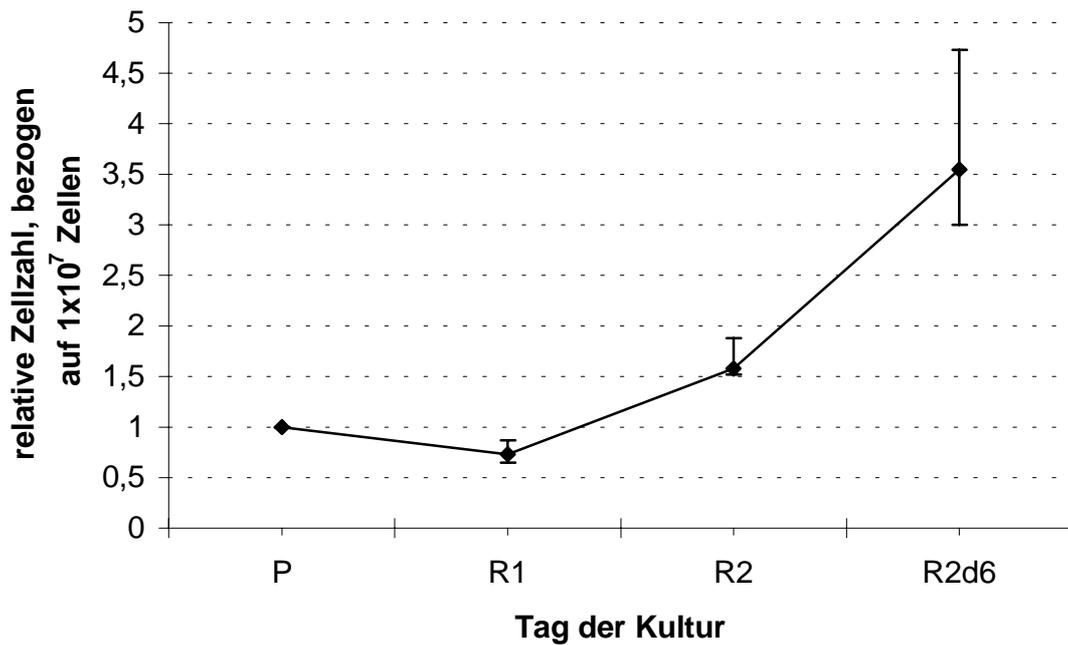
---

*Drei* der neun CTL-Kulturen mit zytotoxischer Aktivität zeigten eine *alleinige Erkennung von B-NHL-Zellen des entsprechenden Patienten*. Aktivierte B-NHL-Zellen eines anderen Patienten wurden von den CTL in *keiner* Kultur erkannt.

In den restlichen sechs Kulturen ließ sich eine Erkennung fremder aktivierter gesunder B-Zellen beobachten. Diese Erkennung war in zwei Kulturen (04/II und 05/III) ähnlich der Erkennung der aktivierten B-NHL-Zellen (28,1 % zu 30,2 % , bzw. 30,8 % zu 32 %), bei den übrigen Kulturen bestand eine zum Teil deutliche Lyse (bei 03: 42,3 %), welche aber stets (16,5-18,3 Prozentpunkte) geringer ausfiel als die Lyse aktivierter und nativer B-NHL-Zellen.

Um in diesen Fällen die zytotoxische Aktivität näher eingrenzen zu können, wurde in den nachfolgend durchgeführten <sup>51</sup>Cr-Assays überprüft, ob die CTL auch eine Erkennung gegenüber PHA-Blasten zeigen, die den gleichen PMNC entstammten wie die generierten gesunden B-Zellen. In den drei getesteten Kulturen konnte *keine* Erkennung der PHA-Blasten festgestellt werden, ebensowenig wie in der Kultur 01/III, in der ausschließlich B-NHL-Zellen lysiert wurden.

Eine deutliche Zunahme der Zellzahlen (Abbildung 3-12) zeigte sich bis auf eine Ausnahme (01/III) in allen Kulturen, welche im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay eine erkennbare zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen zeigten. Die beiden Ansätze mit fehlender zytotoxischer Aktivität im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay zeigten keine Expansion. Ihre Zellzahlen nahmen im Verlauf der Kultur ab.



**Abbildung 3-12:** Expansion allogener, nicht-HLA-typisierter CTL nach Stimulation mit aktivierten malignen B-Zellen

Relative Zellzahlen wurden für jeden Ansatz ermittelt und zusammengefasst. Gezeigt sind in der Abbildung der Median sowie erstes und drittes Quartil ( $n=7$ ).

### 3.4 Zytokinantwort der CTL auf ihre Stimulation

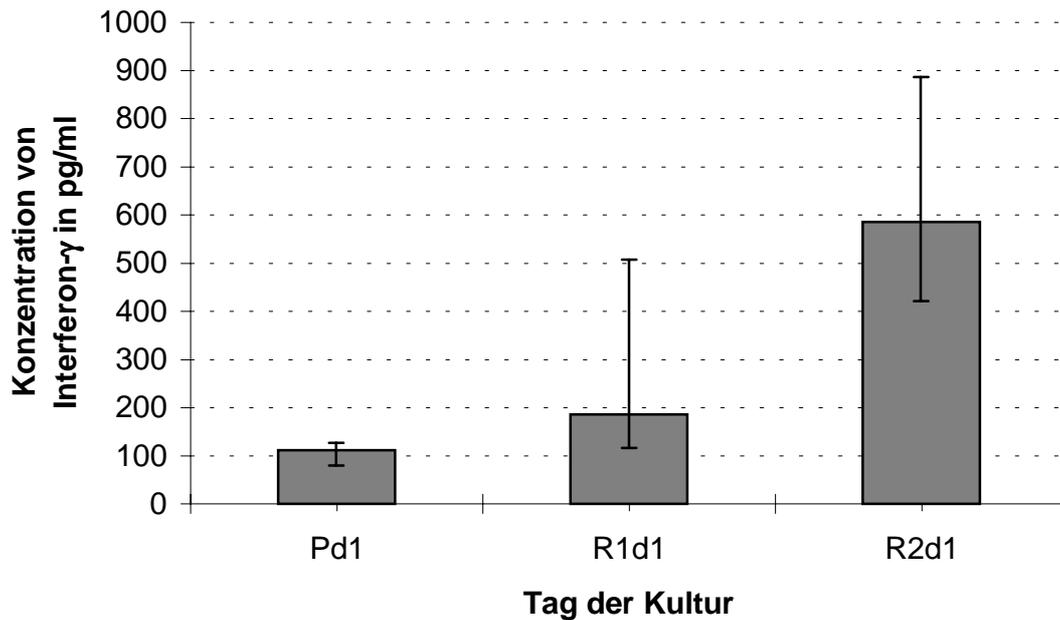
#### 3.4.1 Zytokine im Überstand der CTL-Kulturen

Zur groben Bestimmung der Zytokinsekretion in den CTL-Kulturen wurden jeweils einen Tag nach einer Primär- oder Restimulation geringe Mengen Überstand abgenommen und im ELISA auf ihren Gehalt an Interferon- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 überprüft. Die Nachweisgrenze betrug in allen Fällen 16 pg/ml.

Die Messung erfolgte bei acht der allogenen, nicht-HLA-typisierten CTL-Kulturen vollständig. IL-4 und IL-10 konnte zu keinem Zeitpunkt in großen Mengen festgestellt werden ( $< 200$  pg/ml). In drei Kulturen ließen sich geringe Mengen IL-10 zum Zeitpunkt R2d1, dem ersten Tag nach der zweiten Restimulation, und/oder Pd1 (erster Tag nach der Primärstimulation) nachweisen, welche jedoch deutlich geringer als die entsprechend sezernierte Menge an Interferon- $\gamma$  waren. IL-4 war lediglich in der Kultur 01/I zum Zeitpunkt Pd1 nachzuweisen.

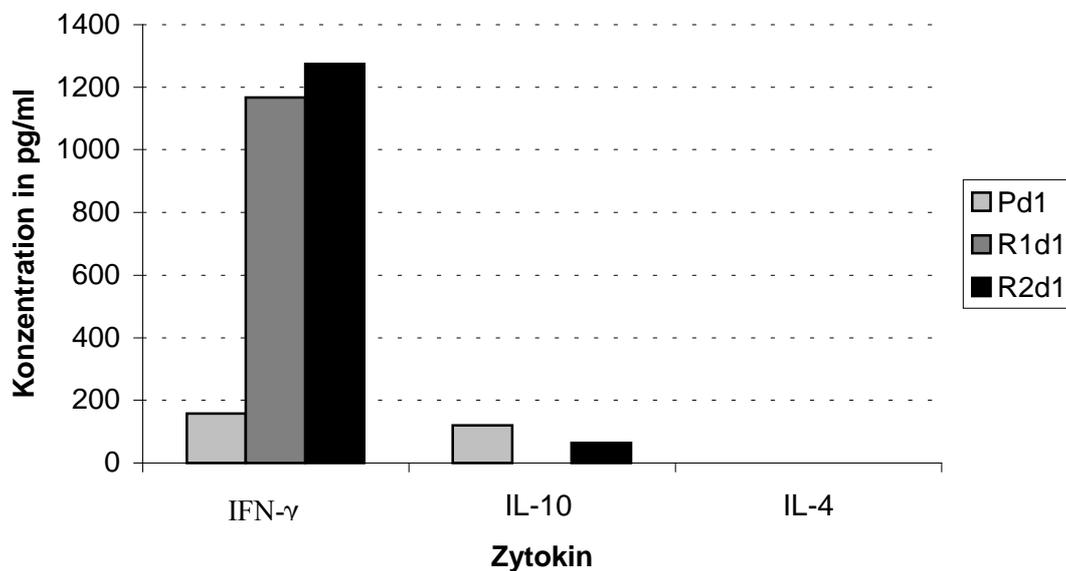
Daher wurde auf eine eigene Darstellung der IL-4- und IL-10-Ergebnisse verzichtet. Die Darstellung der Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen erfolgt in Abbildung 3-13.

Am ersten Tag nach der Primärstimulation waren in allen Kulturen lediglich niedrige Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  festzustellen. Auch nach der ersten Restimulation war die sezernierte Menge in fünf Ansätzen nur unwesentlich höher als zu Beginn. Bei drei Kulturen war allerdings schon eine deutlich erhöhte Menge mit Werten von 469-1168 pg/ml nachzuweisen, welches in der Abbildung 3-13 ein breites drittes Quartil an R1d1 zur Folge hat. Am ersten Tag nach der zweiten Restimulation war schließlich in allen Kulturen eine deutlich erhöhte Interferon- $\gamma$ -Sekretion (Median 585,5 pg/ml, bei Werten zwischen 284-2811 pg/ml) festzustellen. Die Kruskal-Wallis-Analyse der Gesamtdaten ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,002$ . Im darauf durchgeführten Multi-Paarvergleich zeigte sich eine signifikante Zunahme der Interferon- $\gamma$ -Menge zwischen Pd1 und R2d1 mit  $p<0,01$ . Die Unterschiede zwischen Pd1 $\leftrightarrow$ R1d1 sowie R1d1 $\leftrightarrow$ R2d1 waren nicht signifikant.



**Abbildung 3-13:** Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen im Überstand allogener, nicht-HLA-typisierter CTL-Kulturen

Dargestellt sind der Median sowie erstes und drittes Quartil aus acht CTL-Kulturen.



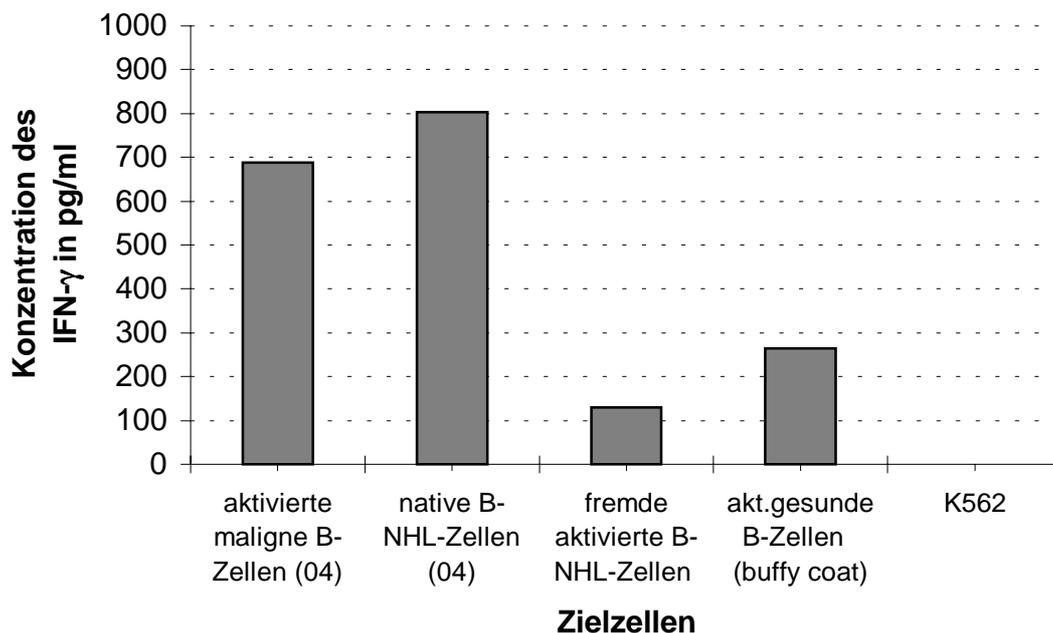
**Abbildung 3-14:** Beispiel für das überprüfte Zytokinspektrum in CTL-Kulturen (03)

Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen von Interferon- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 an den Tagen Pd1, R1d1 und R2d1.

### 3.4.2 Spezifische Zytokinantwort der CTL in Koinkubationsansätzen

In drei allogenen, nicht-HLA-typisierten Kulturen (05/III, 04/I und 04/II) wurden die generierten CTL zeitgleich mit dem  $^{51}\text{Cr}$ -Assay in einem Koinkubationsansatz auf ihre spezifische Zytokinantwort auf verschiedene Zielzellen untersucht.

Die Abbildung 3-15 steht repräsentativ für die drei durchgeführten Versuchsansätze. IL-4 und IL-10 waren nur in geringen Mengen nachweisbar und wurden daher nicht in die Darstellung aufgenommen. Die *höchste* Menge an Interferon- $\gamma$  wurde bei Koinkubation der CTL mit den aktivierten oder nativen B-NHL-Zellen sezerniert (688 bzw. 804 pg/ml). Auf fremde aktivierte gesunde B-Zellen reagierten die CTL mit einer verminderten, aber messbaren Sekretion (264 pg/ml), ebenso auf fremde aktivierte B-NHL-Zellen (130 pg/ml). Nach Koinkubation mit K562 war *kein* Interferon- $\gamma$  nachzuweisen.



**Abbildung 3-15:** Interferon- $\gamma$ -Sekretion der CTL an R2d6 nach Koinkubation mit verschiedenen Zielzellen

Repräsentativ für drei unabhängige Versuche ist hier die Kultur 04/II dargestellt.

---

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Einzelergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit CD40L-aktivierter maligner B-Zellen untersucht, eine allogene zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren. Die Schwerpunkte lagen dabei auf einer Charakterisierung dieser Antwort mittels Zytotoxizitätsmessungen und Zytokinbestimmungen.

Über die Kokultur maligner B-Zellen mit tCD40L-Fibroblasten wurden optimale antigenpräsentierende B-NHL-Zellen generiert, welche eine *allogene CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort gegenüber aktivierten und nativen B-NHL-Zellen sowie fremden gesunden aktivierten B-Zellen* induzierten.

Als Ausgangsfraktion für die Effektorzellen in den CTL-Kulturen wurden, soweit es möglich war, isolierte PMNC noch einmal mit einer *CD8-Separation* aufgereinigt. Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen hatten ergeben, dass für die zytolytische Antwort gegenüber Tumorzellen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verantwortlich sind (Buhmann [9]; Fowler [31/32]; Li [47]). CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hingegen zeigen keine zytotoxische Aktivität nach Stimulation mit malignen B-Zellen (Van den Hove [64]), werden zum Teil aber besser von aktivierten malignen B-Zellen über CD40 stimuliert als zytotoxische T-Zellen (Cayabyab [14]). Da eine signifikante Proliferation allogener CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch in Abwesenheit einer CD4<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelten Hilfe stattfindet (Bennett [3]; Van den Hove [64]), wurde die CD8-Separation durchgeführt, um ausschließlich zytotoxisch wirksame Zellen zu stimulieren. Die Negativselektion wurde gewählt, um eine Fraktion zu gewinnen, die nicht durch Antikörper-Beads markiert und somit nicht in irgendeiner Weise beeinträchtigt oder voraktiviert war. Andere Methoden der T-Zell-Anreicherung wie Erythrozyten-Rosetting mit Schafserythrozyten wären weniger selektiv gewesen und hätten stets eine Mischpopulation aus CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie einigen NK-Zellen zur Folge gehabt. Mit der CD8-Separation wurde eine Methode benutzt, bei welcher die CD8-angereicherte Fraktion nur noch kleinste Mengen anderer Zelltypen enthielt und im Wesentlichen aus CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestand.

---

In den Versuchen mit gesunden PMNC wurden Mausfibroblasten, die stabil mit dem humanen CD40Ligand transfiziert waren, zur *Generierung aktivierter gesunder B-Zellen* benutzt. tCD40L-Fibroblasten sind im Gegensatz zur löslichen Form sCD40L kostengünstiger, aber *nur für in-vitro-Experimente* geeignet. Die tCD40L-Kokultur in Kombination mit der Gabe von IL-4 als spezifischem B-Zell-Wachstumsfaktor und Ciclosporin A zur Suppression von T-Zellen führte zur Expansion gesunder B-Zellen aus PMNC-Mischpopulationen. Aktivierte B-Zellen exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und können über längere Zeit in Kultur expandiert werden. Schultze et al. [57] verglichen die antigenpräsentierenden Eigenschaften solcher B-Zellen mit denen von dendritischen Zellen und stellten fest, dass aktivierte B-Zellen eine ebenbürtige Alternative darstellen und auch zur Induktion autologer zytotoxischer T-Zellen verwendet werden können.

Die Generierung einer Population hochaktivierter gesunder B-Zellen durch CD40L-Stimulation konnte hier bestätigt werden. Diese wurden als zusätzliche Zielzellen in den Zytotoxizitätsmessungen eingesetzt, um die Antigenspezifität der generierten CTL zu überprüfen.

Die Möglichkeit, über die CD40:CD40L-Interaktion auch *maligne B-Zellen zu stimulieren* und eine hohe Expression von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen zu induzieren, war bereits durch einige Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Buhmann [9]; Buske [10]; Crawford [16]; Fluckiger [30]; Van den Hove [64]).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen die bisher erbrachten Resultate und zeigen, dass die Stimulation von malignen B-Zellen mit tCD40L-Fibroblasten zu einer signifikanten Hochregulation von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen führt. In allen Fällen führte die tCD40L-Kokultur zu einer deutlich vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD58. Dadurch konnten antigenpräsentierende Zellen generiert werden, die für alle notwendigen Stadien der Induktion einer antigen-spezifischen Immunantwort (Guinan [35]) die erforderlichen Oberflächenmoleküle exprimieren. Sowohl die *Adhäsion* über CD54:LFA-1 und CD58:CD2 als auch die *Erkennung* über den T-Zell-Rezeptor mit MHC-Molekülen und

---

*Kostimulation* via CD80/CD86 mit CD28 waren von der Expression der Oberflächenmoleküle her möglich.

Für die CTL-Kulturen in unserer Untersuchung wurden somit stets CD40L-aktivierte, antigenpräsentierende maligne B-Zellen eingesetzt, da sich in anderen Studien native B-NHL-Zellen trotz hoher MHC-Expression als schlechte Stimulatorzellen erwiesen hatten (Buhmann [9]; Dazzi [19]; Ranheim [54]). Der Status der Aktivierung von APC ist nach vorangegangenen Untersuchungen der entscheidende Faktor für die Induktion einer suffizienten CTL-Antwort gegenüber malignen Tumoren (Diehl [20]; Todryk [62]).

Die *Stimulation einer autologen T-Zell-Antwort gegen B-NHL-Zellen* konnte lediglich bei zwei Patienten in insgesamt drei unterschiedlichen Kulturen überprüft werden. Dies erlaubt daher keine eindeutige Aussage. Die in allen Fällen ausbleibende zytotoxische Aktivität stimmt aber mit den Ergebnissen der Untersuchung von Buhmann et al. [9] überein, die ebenfalls keine zytotoxische Antwort bei der Stimulation autologer T-Zellen nachweisen konnten. Wie in der genannten Studie wurden auch in meiner Untersuchung PMNC-Mischpopulationen als Effektorfraktion verwendet. Die von Buhmann berichtete bevorzugte Expansion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte nicht festgestellt werden, der Anteil von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen blieb nahezu unverändert. Insgesamt nahmen die Zellzahlen im Verlauf der Kultur stark ab.

Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten wie der akuten lymphoblastischen Leukämie (Cardoso [13]), dem folliculären Lymphom (Schultze [59]) oder Multiplem Myelom (Li [47]) scheint die Expansion autologer T-Zellen mit zytolytischer Aktivität bei der B-CLL schwierig. Dies kann auch daran liegen, dass zytotoxische T-Zellen im peripheren Blut in nur geringer Menge vorkommen und stattdessen zum Beispiel aus dem Knochenmark isolierbar sind. Cardoso et al. [13] konnten bei der akuten lymphoblastischen Leukämie CTL lediglich aus dem Knochenmark isolieren.

Einen anderen Erklärungsansatz für die Anergie autologer T-Zellen von CLL-Patienten haben die Untersuchungen von Cantwell et al. [11] ergeben; ihre Studien legen eine rezeptorvermittelte Herunterregulierung von CD40L bei den T-Zellen in Anwesenheit zunehmender Mengen von CD40 exprimierenden CLL-Zellen nahe. Die provozierte

---

CD40L-Defizienz verursacht eine mangelnde Kostimulation und schließliche Anergie der T-Zellen. Isolierte T-Zellen eines CLL-Patienten werden somit trotz ausreichender Expression von CD80 und CD86 seitens der aktivierten malignen Zellen nur unzureichend kostimuliert, da die erforderliche CD40:CD40L-Interaktion zwischen T- und B-Zellen ausbleibt (Borrow [6]).

Allogene T-Zellen gesunder Spender sind von einer solchen Herunterregulierung primär nicht betroffen und zeigen eine normale Expression von CD40L (Cantwell [11]). Werden diese mit aktivierten malignen B-Zellen stimuliert, kann eine ausreichende Kostimulation zur allogenen Erkennung führen (Buhmann [9]).

In den nächsten Versuchsreihen wurden daher *allogene T-Zellen HLA-identer Spender* stimuliert. Hier konnten insgesamt drei unterschiedliche Versuche durchgeführt werden. Bei Patient 02 wurde mit nicht weiter aufgereinigten PMNC des HLA-identen Spenders gearbeitet. In zwei getrennten Versuchsansätzen zeigte sich ein uneinheitliches Bild: Die erste CTL-Kultur zeigte keine zytotoxische Aktivität; in der zweiten wurde die Lyse der malignen B-Zellen des Patienten durch eine unspezifische NK-Zell-Aktivität überlagert.

Bei Patient 06 wurden CD8-separierte Effektorzellen des HLA-identen Spenders verwendet. Die Untersuchungen können daher lediglich als *Einzelergebnis* diskutiert werden und bedürfen einer weiteren Abklärung in zukünftigen Versuchen. Bei der Stimulation allogener CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des HLA-identen Spenders wurde eine Lyse der malignen B-Zellen beobachtet. Alle anderen Zielzellen (fremde aktivierte B-NHL-Zellen, fremde gesunde aktivierte B-Zellen, fremde PHA-Blasten, Knochenmarkstromazellen des Patienten und K562) wurden nicht lysiert. Dies scheint die Ergebnisse von Buhmann [9] zu bestätigen, der nach Stimulation allogener, nicht-HLA-typisierter T-Zellen mit CD40L-aktivierten B-CLL-Zellen eine Lyse dieser B-CLL-Zellen erreichte. Durch die Verwendung einer größeren Anzahl von Zielzellen war in der vorgelegten Arbeit eine weitergehende Charakterisierung der Spezifität der T-Zellen möglich.

---

Ein weiterer Unterschied ergibt sich aus der Herkunft der Effektorzellen. In unserem Versuch wurden die Effektorzellen vom HLA-identen Stammzellspender des Patienten 06 isoliert. Diese Konstellation erlaubte eine genauere Aussage durch die in-vitro-Simulation der klinischen Situation eines direkt betroffenen Patienten. Die spätere klinische Verwendbarkeit der Ergebnisse ließ sich dadurch unmittelbar und prognostisch relevanter ableiten.

Untersuchungen von Dolstra et al. [21], Faber et al. [29], Van der Harst et al. [65] und Warren et al. [67] hatten die Existenz von zytotoxischen T-Zell-Klonen nach einer allogenen HLA-identen Knochenmarktransplantation im Blut des Empfängers nachgewiesen, welche spezifisch auf Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (mHAg) reagierten. Die mHAg stammen von intrazellulären Proteinen, die im einzelnen noch nicht näher charakterisiert sind, und werden mit MHC-I-Molekülen präsentiert. Unterschiede in den mHAg zwischen Patient und Spender machen sie zum Ziel für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des Spenders. Diese spezifischen CTL wurden bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, die mit einer allogenen Knochenmarktransplantation behandelt wurden, isoliert, darunter verschiedene Leukämieformen einschließlich der CLL und myelodysplastischer Syndrome. Die meisten mHAg werden von vielen Empfängergeweben exprimiert und können damit sowohl eine *Graft-versus-Host-Disease* als auch einen *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* induzieren. Einige mHAg konnten bestimmt werden, welche nur von hämatopoetischen Zellen und nicht von anderen Zellen wie Fibroblasten exprimiert wurden. Mit der Identifizierung der mHAg und mHAg-spezifischer CTL wurde somit ein erstes morphologisches Korrelat zum klinisch beobachteten *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* nach einer allogenen Knochenmarktransplantation bestimmt. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich der Grund für die Überlegenheit der allogenen versus autologen Knochenmarktransplantation (Porter [53]; Verdonck [66]). Sie erklärt den Umstand, den Kolb et al. [41] in einer retrospektiven CML-Studie beobachteten, dass nach einer allogenen Transplantation bei einem Rückfall des Patienten die Gabe von Spender-Lymphozyten in drei Viertel der Fälle zu einer kompletten Remission führt. Diesen *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* durch die Generierung tumorspezifischer CTL zu stärken, ist ein wichtiger Ansatzpunkt in der Entwicklung adoptiver Immuntherapien. Wesentliche Voraussetzung für die Entstehung einer tumorspezifischen T-Zellantwort ist

---

die Präsentation entsprechender Tumorantigene durch professionelle APCs. Durch die Aktivierung der malignen B-Zellen von Patient 06 konnten die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen seines HLA-identen Spenders erfolgreich stimuliert werden. Im <sup>51</sup>Cr-Assay zeigte sich eine *ausschließlich gegen maligne B-Zellen gerichtete zytotoxische Antwort*; Knochenmarkstromazellen und andere Kontrollen wurden nicht lysiert.

Zum erstenmal zeigt sich in diesem Einzelergebnis die Möglichkeit einer zusätzlichen adoptiven Immuntherapie mit tumorspezifischen CTL für Patienten, deren B-NHL mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt werden muss. Die Stimulation mit aktivierten malignen B-Zellen führte zu einer spezifischen *Graft-versus-Lymphoma-Aktivität* durch die generierten CTL und zeigte keinen Hinweis auf eine alloreaktive, unspezifische *Graft-versus-Host-Reaktion*. Ob dieses in-vitro-Ergebnis nur ein singuläres Ereignis oder wirklich ein therapeutisch ausnutzbares Phänomen ist, müssen weitere Untersuchungen in der HLA-identen Patient-Spender-Konstellation zeigen.

Weiteren Aufschluss über die Möglichkeiten einer adoptiven Immuntherapie mit zytotoxischen T-Zellen ergaben die *Versuche mit allogenen, nicht-HLA-typisierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen*. Da die HLA-Merkmale von Stimulator- und Effektorzellen nicht übereinstimmen mussten, konnten allogene T-Zellen aus den PMNC gesunder Blutspender (siehe 2.3.3) verwendet werden. Diese standen in ausreichender Menge zur Verfügung und waren damit kein limitierender Faktor für die Versuchsansätze. Insgesamt konnten elf verschiedene CTL-Kulturen durchgeführt werden, welche daher genauere Aussagen im Gegensatz zu den bereits geschilderten Ergebnissen zulassen.

Neun der elf CTL-Kulturen zeigten nach dreimaliger Stimulation mit aktivierten malignen B-Zellen eine *zytotoxische Aktivität gegenüber malignen B-Zellen*. Im Verlauf der CTL-Kulturen zeigte sich im Median eine *Verdreifachung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellmengen* vom Primäransatz bis zum sechsten Tag nach der zweiten Restimulation. Diese Tatsachen bestätigen die Ergebnisse von Van den Hove et al. [64], dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ohne die Hilfe von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine signifikante Proliferation und zytotoxische Aktivität gegenüber malignen B-Zellen aufweisen. Auch Buhmann et al. [9] hatten

---

unter diesen Versuchsbedingungen eine Lyse nativer und aktivierter B-CLL-Zellen sowie eine Proliferation der CTL beobachtet.

Eine weitere *Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellantwort* war bisher aber noch nicht erfolgt. Eine mögliche MHC-I-restringierte Alloreaktivität konnte aufgrund der bislang vorliegenden Studien nicht ausgeschlossen werden.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die angewandte Methodik die Generierung spezifischer CTL erlaubt, deren *zytotoxische Antwort native und aktivierte maligne B-Zellen umfasst und sich auch gegen fremde gesunde aktivierte B-Zellen richten kann*. In *keinem* Fall konnte eine MHC-I-restringierte unspezifische Alloreaktivität festgestellt werden.

Das Ausmaß der Zytotoxizität gegenüber malignen B-Zellen des jeweiligen Patienten war unterschiedlich; zwischen nativen und aktivierten Zellen konnten Unterschiede auftreten. In einigen Fällen wurden native B-NHL-Zellen besser lysiert, in anderen die aktivierten Zellen. Eine eindeutige Bevorzugung eines Aktivierungszustandes war nicht auszumachen; vielmehr waren die Unterschiede gleichmäßig verteilt. Eine erhöhte Resistenz CD40L-aktivierter CLL-Zellen, wie sie gegenüber Fludarabin-induzierter oder Fas-vermittelter Apoptose zu beobachten war (Kitada [39]; Panayiotidis [52]), war gegenüber der CTL-vermittelten Apoptose nicht festzustellen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Chu et al. [15], die keine Beeinträchtigung der zytotoxischen Wirkung von CTL gegenüber CD40L-aktivierten CLL-Zellen ermittelt und den Perforin/Granzyme-Weg als wesentliche Wirkungsweise der CTL bestimmt hatten.

Sollen spezifische CTL generiert werden, müssen sie mehrmals mit den entsprechenden aktivierten malignen B-Zellen stimuliert werden. In den Versuchen zeigten die CTL stets zytotoxische Aktivität gegenüber den malignen B-Zellen, mit denen sie stimuliert worden waren. Aktivierte maligne B-Zellen eines anderen Patienten wurden ohne vorherige Stimulation in keinem Ansatz erkannt. Dieses Ergebnis erlaubt *keinen Rückschluss auf ein mögliches gemeinsames tumorassoziiertes Antigen*, welches pathognomonisch für die B-CLL wäre und somit von allen malignen B-Zellen

---

präsentiert werden könnte. Es zeigt vielmehr die *Entwicklung einer (patienten)spezifischen zytotoxischen Aktivität* an.

Es existieren, wie oben bereits angeführt, Minor-Histokompatibilitäts-Antigene, welche nur von malignen oder transformierten B-Zellen exprimiert werden. Dolstra et al. [21] konnten zum Beispiel ein solches HLA-B44-restringiertes mHAg bei einer akuten lymphoblastischen B-Zell-Leukämie isolieren, das von Spenderlymphozyten erkannt wurde. Diese sind stets mit einem bestimmten HLA-Subtyp assoziiert und können somit immer nur von einem kleinen Teil der Bevölkerung exprimiert werden (Warren [67]).

In den durchgeführten CTL-Kulturen wurden keine HLA-Typisierungen vorgenommen. Daher ist die Zusammensetzung rein zufällig und die Frage, ob die zytotoxische Aktivität der CTL über die Erkennung von spezifischen mHAg zu erklären ist, nicht zu beantworten. Die zufällige Zusammensetzung spricht aber dafür, dass mit Sicherheit unterschiedliche HLA-Typen vertreten sind. Da in neun von elf CTL-Kulturen eine Lyse zu beobachten war, ist ein Prinzip anzunehmen, das nicht unbedingt nur gegen ein einziges mHAg gerichtet ist. Aus der Analyse der beobachteten zytotoxischen Aktivitäten gegenüber den getesteten Zielzellen lassen sich Forderungen über Eigenschaften ableiten, welche das von den CTL erkannte Merkmal haben muss.

Neben der Lyse nativer und aktivierter maligner B-Zellen des jeweiligen Patienten wurde in sechs Ansätzen zusätzlich eine Lyse von fremden aktivierten gesunden B-Zellen beobachtet. Diese Erkennung war zwar lediglich in zwei durchgeführten Versuchen vergleichbar so stark ausgeprägt wie die Erkennung der malignen B-Zellen und in den übrigen Fällen wesentlich geringer, aber vorhanden. Fremde gesunde PHA-Blasten wurden jedoch nicht erkannt, so dass für die CTL-Erkennung nicht ein panlymphozytäres Merkmal in Betracht zu ziehen ist. Dieses Merkmal ist auf malignen B-Zellen und gesunden B-Zellen vorhanden, wird aber augenscheinlich unterschiedlich präsentiert, da im Gegensatz zu gesunden aktivierten B-Zellen fremde aktivierte maligne B-Zellen nie erkannt wurden. B-Zell-Aktivierungsmarker könnten in Frage kommen, da in den Versuchen stets aktivierte, aber keine nativen gesunden B-Zellen verwendet wurden. Ein weiterer Angriffspunkt der CTL könnte ein Pan-B-Antigen sein ähnlich der Wirkungsweise von Rituximab, einem monoklonalem CD20-Antikörper,

der in der Therapie des B-NHL zum Einsatz kommt. Dies wäre die am weitesten gefasste Möglichkeit, welche die meisten verschiedenen Zelltypen einschließen würde. Insgesamt zeigten allogene, nicht-HLA-typisierte CTL nach der Stimulation mit CD40L-aktivierten malignen B-Zellen eine zytotoxische Aktivität gegenüber malignen und gesunden B-Zellen.

Mit den Messungen der Zytokinantwort der CTL bot sich eine genauere Bestimmung des T-Zell-Subtyps an, welcher sich durch die Stimulation entwickelt hatte. Die Ermittlung der Zytokinkonzentrationen im Überstand der CTL-Kulturen diente der groben Bestimmung und wurde durch die Koinkubationsansätze von CTL mit jeweils unterschiedlichen Zielzellen genauer eingegrenzt.

Anhand der Messungen aus dem Überstand der CTL-Kulturen konnte eine *signifikante Zunahme der Interferon- $\gamma$ -Menge* zwischen dem Primäransatz und der zweiten Restimulation der CTL-Kulturen festgestellt werden. IL-4 und IL-10 waren bis auf einige Ausnahmen, in denen geringe Mengen festgestellt wurden, überhaupt nicht nachweisbar. In den Koinkubationsansätzen wurde von den CTL die *höchste Menge an Interferon- $\gamma$*  sezerniert, wenn sie mit *malignen B-Zellen* inkubiert wurden. Eine abgeschwächte Sekretion war bei Inkubation mit fremden aktivierten gesunden B-Zellen und fremden aktivierten malignen B-Zellen zu beobachten. IL-4 und IL-10 waren wieder nur in geringen Mengen nachweisbar.

Zusammengefasst lässt sich daraus das Vorliegen einer CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation vom Tc1-Phänotyp ableiten, welche parallel zu den Ergebnissen der <sup>51</sup>Cr-Assays die größte Reaktion gegenüber malignen B-Zellen zeigte. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vom Tc1-Phänotyp sind nach Fowler und Gress [31/32] durch die Produktion von Interferon- $\gamma$  und IL-2 gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu präsentieren sich CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vom Tc2-Phänotyp durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10. Diese Unterteilung ist der Untergruppeneinteilung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ähnlich, welche sich in Th1- und Th2-Zellen aufteilen lassen. Typ-I-Zytokine, welche von Th1/Tc1-Zellen produziert werden, induzieren im Allgemeinen eine proinflammatorische/Antitumor-Immunreaktion, während Zytokine vom Typ II durch Hemmung der Makrophagenfunktion antiinflammatorisch und eher immunsupprimierend wirken.

---

## 4.2 Resümee

Im Hinblick auf die Entwicklung einer adoptiven Immuntherapie geben die vorgelegten Ergebnisse einen weiterführenden Einblick in die Generierung und Spezifität allogener zytotoxischer T-Zellen und die Möglichkeiten, über die CD40L-Aktivierung maligner B-Zellen eine spezifische Immunantwort durch T-Zellen zu induzieren.

Maligne B-Zellen sind durch die Entnahme einer venösen Blutprobe bei den meisten Patienten in ausreichender Anzahl zu gewinnen und erfordern nur eine Aufarbeitung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Die Aktivierung über CD40:CD40L erfolgt schnell über den Zeitraum von vier Tagen. Bei einer nachfolgenden in-vivo-Nutzung müssen tCD40L-Fibroblasten lediglich durch die lösliche trimere Form des CD40L ersetzt werden. Diese lösliche trimere Form besitzt den gleichen Wirkungsmechanismus und ist daher äquivalent einsetzbar, wie von Bergwelt-Baildon et al. [4] jüngst publiziert haben.

Über die CD40:CD40L-Interaktion können antigenpräsentierende B-Zellen gewonnen werden, welche sich durch eine hohe Expression von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen bei gleichbleibend hoher MHC-Expression auszeichnen und eine allogene T-Zell-Antwort induzieren.

Die Ausgangspopulation für die resultierenden zytotoxischen T-Zellen vom entsprechenden HLA-identen Spender kann über PMNC-Isolierung und CD8-Separation nach einer venösen Blutentnahme ebenso einfach gewonnen werden. Die Negativselektion gewährleistet das Erhalten einer unmarkierten, ungeprägten Fraktion. Im Gegensatz zu Immuntherapien, die auf dem Einsatz lymphomspezifischer Oberflächenproteine oder deren DNA beruhen, ist die verwendete Methodik wesentlich einfacher. Es ist zwar in der dargestellten Methodik für jeden Patienten eine spezifische Generierung von CTL erforderlich, eine aufwendige Protein- oder DNA-Isolierung entfällt jedoch.

---

Die Auswertung des Expansionsverhaltens zeigt, dass nach Stimulation eine mediane Verdreifachung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu erwarten ist. Für die klinische Anwendung bedeutet dieses die wichtige Erkenntnis, dass die primär gewonnenen und nativen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch die beschriebene Versuchsanordnung expandiert und gleichzeitig spezifisch geprägt werden können.

Die Analyse der generierten T-Zell-Antwort über Zytotoxizitätsmessungen und Bestimmungen des sezernierten Zytokinspektrums zeigt die Entwicklung einer *patientenspezifischen zytotoxischen Aktivität* gegen native und aktivierte maligne B-Zellen, gelegentlich auch gegen gesunde aktivierte B-Zellen. Das verwendete Spektrum an getesteten Zielzellen führt zum Ausschluss einer MHC-I-restringierten Alloreaktivität und erlaubt die Eingrenzung auf einen Angriffspunkt, welcher sowohl von malignen als auch gesunden aktivierten B-Zellen dargeboten wird. Da Zellen mit T-Zell-Eigenschaften nicht erkannt werden, ist aufgrund der durchgeführten Versuche die am weitesten gefasste Möglichkeit des Angriffspunktes ein *Pan-B-Antigen*.

Der Nachweis einer *signifikanten Zunahme der Interferon- $\gamma$ -Sekretion* im Verlauf der Stimulationsversuche führt zur Identifikation einer CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation vom Tc1-Phänotyp, welche für proinflammatorische/Antitumor-Immunreaktionen verantwortlich ist [31/32]. Die Koinkubation von CTL mit den jeweiligen Zielzellen offenbart zudem, dass die höchste Menge an Interferon- $\gamma$  als wesentlicher Parameter einer Immunreaktion bei Inkubation mit malignen B-Zellen sezerniert wird.

Diese Ergebnisse dokumentieren, wie über die Stimulation der allogenen T-Zell-Antwort durch CD40Ligand in vitro eine zytotoxische Antwort vornehmlich gegen maligne B-Zellen und im abgeschwächten Maße gegen gesunde aktivierte B-Zellen entwickelt wird. Die Generierung und Expansion derartiger spezifischer Zellen bildet die Grundlage für die Entwicklung einer adjuvanten adoptiven Immuntherapie, welche einen *Graft-versus-Lymphoma-Effekt* auslösen oder zusätzlich verstärken kann.

---

## 5. Literaturverzeichnis

1. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi J P, van Kooten C, Liu Y J, Rousset F, Saeland S (1994) The CD40 antigen and its ligand.  
Annu Rev Immunol 12: 881-922
2. Bendandi M, Gocke C D, Kobrin C B, Benko F A, Sternas L A, Pennington R, Watson T M, Reynolds C W, Gause B L, Duffey P L, Jaffe E S, Creekmore S P, Longo D L, Kwak L W (1999) Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma.  
Nature Medicine 5: 1171-1177
3. Bennett S R M, Carbone F R, Karamalis F, Flavell R A, Miller J F A P, Heath W R (1998) Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling.  
Nature 393: 478-480
4. von Bergwelt-Baildon M S, Vonderheide R H, Maecker B, Hirano N, Anderson K S, Butler M O, Xia Z, Zeng W Y, Wucherpfennig K W, Nadler L M, Schultze J L (2002) Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application.  
Blood 99: 3319-3325
5. Binet J L, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault M T, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.  
Cancer 48: 198-206
6. Borrow P, Tough D F, Eto D, Tishon A, Grewal I S, Sprent J, Flavell R A, Oldstone M B (1998) CD40Ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection.  
J Virol 72: 7440-7449

- 
7. Boyer M W, Vallera D A, Taylor P A, Gray G S, Katsanis E, Gorden K, Orchard P J, Blazar B R (1997) The role of B7 costimulation by murine acute myeloid leukemia in the generation and function of a CD8+ T-cell line with potent in vivo graft-versus-leukemia properties.  
Blood 89: 3477-3485
  8. Buggins A G S, Lea N, Gäken J, Darling D, Farzaneh F, Mufti G J, Hirst W J R (1999) Effect of costimulation and the microenvironment on antigen presentation by leukemic cells.  
Blood 94: 3479-3490
  9. Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M (1999) CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells.  
Blood 93: 1992-2002
  10. Buske C, Twiling A, Gogowski G, Schreiber K, Feuring-Buske M, Wulf G G, Hiddemann W, Wörmann B (1997) In vitro activation of low-grade non-Hodgkin's lymphoma by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies and the soluble CD40 ligand.  
Leukemia 11: 1862-1867
  11. Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps T J (1997) Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia.  
Nature Medicine 3: 984-989
  12. Cardoso A A, Schultze J L, Boussiotis V A, Freeman G J, Seamon M J, Laszlo S, Billet A, Sallan S E, Gribben J G, Nadler L M (1996) Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells may induce T-cell anergy to alloantigen.  
Blood 88: 41-48
  13. Cardoso A A, Seamon M J, Afonso H M, Ghia P, Boussiotis V A, Freeman G J, Gribben J G, Sallan S E, Nadler L M (1997) Ex vivo generation of human anti-pre-B leukemia-specific autologous cytolytic T cells.  
Blood 90: 549-561

- 
14. Cayabyab M, Phillips J H, Lanier L L (1994) CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes.  
J Immunol 152: 1523-1531
  15. Chu P, Wierda W G, Kipps T J (2000) CD40 activation does not protect chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes.  
Blood 95: 3853-3858
  16. Crawford D I I, Catovsky D (1993) In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40.  
Immunology 80: 40-44
  17. Dameshek W (1967): Chronic lymphocytic leukemia – an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes.  
Blood 29: 566-584
  18. Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters R M, Serve H, Berdel W E, Kienast J (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma.  
Blood 95: 2630-2636
  19. Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, De Silvestro G, Gaidano G, Schena M, Tison T, Vianello F, Girolami A, Caligaris-Cappio F (1995) Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens.  
Clin Immunol Immunopathol 75: 26-32
  20. Diehl L, Den Boer A T, van der Voort E I H, Melief C J M, Offringa R, Toes R E M (2000) The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity.  
J Mol Med 78: 363-371
  21. Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie P G, Brasseur F, Mensink E, Adema G J, de Witte T, Figdor C G, van de Weil-Kemenade E (1999) A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia.  
J Exp Med 189: 301-308
  22. Dolstra H D, Fredrix H, Preijers F, Goulmy E, Figdor C G, de Witte T M, van de Weil-Kemenade E (1997) Recognition of a B cell leukemia-associated minor histocompatibility antigen by CTL.  
J Immunol 158: 560-565

- 
23. Dorfman D M, Schultze J L, Shahsafaei A, Michalak S, Gribben J G, Freeman G J, Pinkus G S, Nadler L M (1997) In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation.  
Blood 90: 4297-4306
  24. Dranoff G, Jaffe E, Lazenby A et al. (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting tumor immunity.  
Proc Natl Acad Sci USA 90: 3539-3543
  25. Dunussi-Joannopoulos K, Weinstein H, Nickerson P N (1996) Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML.  
Blood 87: 2938-2946
  26. Durie F H, Foy T M, Masters S R, Laman J D, Noelle R J (1994) The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity.  
Immunol Today 15: 406-411
  27. Emmerich B, Hiller E, Nerl C, Schneller F (2000) Manual Maligne Lymphome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.  
Zuckschwerdt, Germering/München, 6. Auflage , 1-122
  28. Evans D E, Munks M W, Purkerson J M, Parker D C (2000) Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: Dependence on CD40Ligand/CD40.  
J Immunol 164: 688-697
  29. Faber L M, van Luxemburg-Heijs S A P, Willemze R, Falkenburg J H F (1992) Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes from the HLA-identical bone marrow donor of a patient with leukemia.  
J Exp Med 176: 1283-1289
  30. Fluckiger A C, Rossi J F, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, Defrance T (1992) Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Ig or CD40 to B-cell tropic factors.  
Blood 80: 3173-3181

- 
31. Fowler D H, Gress R E (1998) CD8<sup>+</sup> T cells of Tc2 phenotype mediate a GVL effect and prevent marrow rejection.  
*Vox Sanguinis* 74: 331-340
  32. Fowler D H, Gress R E (2000) Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma.  
*Leuk Lymphoma* 38: 221-234
  33. Foy T M, Aruffo A, Bajorath J, Buhmann J E, Noelle R J (1996) Immune regulation by CD40 and its ligand.  
*Annu Rev Immunol* 14: 591-617
  34. Grewal I S, Flavell R A (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.  
*Annu Rev Immunol* 16: 111-135
  35. Guinan E C, Gribben J G, Boussiotis V A, Freeman G J, Nadler L M (1994) Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity.  
*Blood* 84: 3261-3282
  36. Harris N L, Jaffe E S, Stein H, Banks P M, Chan J K C, Cleary M L, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter K C, Grogan T M, Isaacson P G, Knowles D M, Mason D Y, Müller-Hermelink H K, Pileri S A, Piris M A, Ralfkier E, Warnke R A (1984) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group.  
*Blood* 84: 1361-1392
  37. Hsu F J, Benike C, Fagnoni F, Liles T M, Czerwinski D K, Taidi B, Engleman E G, Levy R (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.  
*Nature Medicine* 2: 52-58
  38. Kato K, Cantwell M J, Sharma S, Kipps T J (1998) Gene transfer of CD40-Ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells.  
*J Clin Invest* 101: 1133-1141

- 
39. Kitada S, Zapata J M, Andreeff M, Reed J C (1999) Bryostatins enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.  
Br J Haematol 106: 995-1004
  40. Knauf W, Thiel E (1999) Non-Hodgkin-Lymphome. In: Alexander K et al. (Hrsg.) Thiemes Innere Medizin: TIM.  
Thieme, Stuttgart/New York, 920-924
  41. Kolb H, Schattenberg A, Goldman J (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.  
Blood 86: 2041-2050
  42. Krolick K A, Isakson P C, Uhr J W, Vitetta E S (1979) BCL-1, a murine model for chronic lymphocytic leukemia: use of the surface immunoglobulin idiotype for the detection and treatment of tumor.  
Immunol Rev 481: 81-106
  43. Kwak L W, Campbell M J, Czerwinski D K, Hart S, Miller R A, Levy R (1992) Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors.  
N Engl J Med 327: 1209-1215
  44. Lagneaux L, Delforge A, Dorval C, Bron D, Stryckmans P (1993) Excessive production of transforming growth factor- $\beta$  by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-6 production.  
Blood 82: 2379-2385
  45. Lane P, Brocker T, Hubele S, Padovan E, Lanzavecchia A, McConell F (1993) Soluble CD40Ligand can replace the normal T cell-derived CD40 Ligand signal to B cells in T cell-dependent activation.  
J Exp Med 177: 1209-1213
  46. Levitsky H, Montgomery J, Ahmadzadeh M et al. (1996) Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity.  
J Immunol 156: 3858-3865

- 
47. Li Y, Bendandi M, Deng Y, Dunbar C, Munshi N, Jagannath S, Kwak L W, Lyerly H K (2000) Tumor-specific recognition of human myeloma cells by idiotype-induced CD8<sup>+</sup> T cells.  
Blood 96: 2828-2833
  48. McAdam A J, Gewurz B E, Farkash E A, Sharpe A H (2000) Either B7 costimulation or IL-2 can elicit generation of primary alloreactive CTL.  
J Immunol 165: 3088-3093
  49. Meusers P, Brittinger G (1999) Non-Hodgkin-Lymphome. In: Alexander K et al. (Hrsg.) Thiemes Innere Medizin: TIM.  
Thieme, Stuttgart/New York, 897-905
  50. Nelson E L, Li X, Hsu F J, Kwak L W, Levy R, Clayberger C, Krensky A M (1996) Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, Non-Hodgkin's Lymphoma.  
Blood 88: 580-589
  51. Or R, Ackerstein A, Nagler A, Amar A, Naparstek E, Varadi G, Kapelushnik J, Samuel S, Pugatsch T, Brautbar C, Slavin S (1998) Allogeneic cell-mediated and cytokine-activated immunotherapy for malignant lymphoma at the stage of minimal residual disease after autologous stem cell transplantation.  
J Immunoth 21: 447-453
  52. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand A V (1995) Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia.  
Leukemia 9: 1227-1232
  53. Porter D L, Antin J H (1999) The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy.  
Annu Rev Med 50: 369-386
  54. Ranheim E A, Cantwell M J, Kipps T J (1995) Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells.  
Blood 85: 3556-3565

- 
55. Schoenberger S P, Toes R E, van der Voort E I, Offringa R, Melief C J (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.  
Nature 393: 480-483
  56. Schultze J L (1997) Vaccination as immunotherapy for B cell lymphoma.  
Hematol Oncol 15:129-139
  57. Schultze J L, Michalak S, Seamon M J, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado J C, Gribben J G, Nadler L M (1997) CD40-activated human B cells: An alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy.  
J Clin Invest 100: 2757-2765
  58. Schultze J L, Nadler L M, Gribben J G (1996) B7-mediated costimulation and the immune response.  
Blood Rev 10: 111-127
  59. Schultze J L, Seamon M J, Michalak S, Gribben J G, Nadler L M (1997) Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro.  
Blood 89: 3806-3816
  60. Stevenson F K, Zhu D, King C A, Ashworth L J, Kumar S, Hawkins R E (1995) Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma.  
Immunol Rev 145: 211-228
  61. Tao M, Levy R (1993) Idiotypic/granulocyte-macrophage colony stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma.  
Nature 362: 755-758
  62. Todryk S M, Tutt A L, Green M H A, Smallwood J A, Halanek N, Dalglish A G, Glennie M J (2001) CD40 ligation for immunotherapy of solid tumours.  
J Immunol Methods 248:139-147
  63. Townsend S E, Allison J P (1993) Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells.  
Science 259: 368-370

- 
64. Van Den Hove L E, Van Gool S W, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts M A, Ceuppens J L (1997) CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules.  
Leukemia 11: 572-580
65. Van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg J H F, Kooij-Winkelaar Y M C, van Luxemburg-Heijs S A P, Goselink H M, Brand A (1994) Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemia cells by cytotoxic T-cell clones.  
Blood 83: 1060-1066
66. Verdonck L F, Dekker A W, Lokhorst H M, Petersen E J Nieuwenhuis H (1997) Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade-non-Hodgkin's lymphoma.  
Blood 84: 4201-4205
67. Warren E H, Greenberg P D, Riddell S R (1998) Cytotoxic T-lymphocyte-defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution.  
Blood 91: 2197-2207
68. Wierda W G, Cantwell M J, Woods S J, Rassenti L Z, Prussak C E, Kipps T J (2000) CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia.  
Blood 96: 2917-2924
69. Yellin M J, Sinning J, Covey L R, Sherman W, Lee J L, Glickman-Nir E, Sippel K C, Rogers J, Cleary A M, Parker M, Chess L, Lederman S (1994) T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity.  
J Immunol 153: 666-674

---

## 6. Danksagung

Herrn *Professor Dr. med. Joachim Kienast* danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau *Dr. med. Annette Nolte* danke ich für ihre hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft und Geduld.

Der „*Verein zur Förderung der Knochenmarkspende Münster e.V.*“ unterstützte mich im Sommersemester 2000 mit einem „Nolte-Doktoranden-Förderstipendium“. Ohne dieses hätte ich mich nicht vollständig auf die Experimente konzentrieren können. Ich danke den Mitgliedern daher für diese großzügige Unterstützung.

Für die nutzbringenden Diskussionen im Alltag der Laborarbeit und die Einführung in verschiedene Methoden, die in meiner Dissertation zum Einsatz kamen, möchte ich mich besonders bei Frau *Colette Hünefeld*, Frau *Birgit Feldmann* und Frau *Janina Slotty* bedanken.

Für die große Geduld bei zahlreichen Fragen zur Formatierung der Arbeit sowie des Umgangs mit Text- und Grafikverarbeitungsprogrammen möchte ich meiner Freundin, Frau *Simone Finster*, danken. Ohne ihre Mithilfe und stetigen Zuspruch wäre die Arbeit ein Fragment geblieben.

Meinem Bruder *Andre Kaiser* danke ich für die akribische und sorgfältige Durchsicht der fast abgabereifen Fassung und die Vorschläge zur besseren Gestaltung.

Dass Kruskal-Wallis-Test und Multi-Paarvergleich keine Fremdwörter mehr für mich sind, habe ich Frau *Dr. rer. nat. Teresa Padró* zu verdanken. Ich möchte ihr auch für die zahlreichen Hinweise und Vorschläge, besonders zum Kapitel „Material und Methoden“, danken.

Ebenso möchte ich *Dr. med. Christian Scheffold* danken für seine Anregungen und Hinweise bei der Erstellung des Manuskripts, insbesondere der graphischen Darstellung durchflusszytometrischer Daten.

---

## 7. Lebenslauf

Name: Kaiser

Vorname: Thilo Peter

Geburtsdatum, -ort: 14.Dezember 1974, in Hamm/Westfalen

Familienstand: ledig

Eltern: Wilhelm Kaiser, Bankkaufmann  
Elisabeth Maria Kaiser, geb. Schanzmann, Hausfrau

Schulischer Werdegang: 01.08.1981 - 31.07.1985  
Gemeinschaftsgrundschule Welper  
01.08.1985 - 30.06.1994  
Städtisches Mariengymnasium Werl  
03.06.1994  
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife, Note „1,0“

Weiterer Werdegang: 04.07.1994 - 30.09.1995  
Zivildienst am Mariannenhospital Werl im Pflegedienst

Universitärer Werdegang: 01.10.1995  
Beginn des Studiums der Humanmedizin in Münster  
10.09.1997  
Ärztliche Vorprüfung, Note „gut“ (1,66)  
27.08.1998  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“  
01.10.1998  
UNICERT III-Stufe, „Englisch für Mediziner“,  
Gesamtnote „sehr gut“ (1,3)

---

Akademisches Jahr 1998/99

Einjähriger Auslandsaufenthalt an der Universität  
Padua/Italien mit einem ERASMUS-Teilstipendium

Sommersemester 2000

„Nolte-Doktoranden-Stipendium“ vom „Verein zur  
Förderung der Knochenmarkspende Münster e.V.“ zur  
Anfertigung der Dissertation

03.09.2001

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,

Note „gut“(1,66)

22.10.2001 - 22.09.2002

Praktisches Jahr (PJ) am Universitätsklinikum Münster in  
den Fächern Innere Medizin und Orthopädie sowie am  
Spital Schwyz/Schweiz in Chirurgie

05.11.2002

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,

Note „sehr gut“ (1,0), Gesamtnote „sehr gut“ (1,49)

---

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| (B)-CLL                        | chronische lymphatische Leukämie, B-Zell-Typ |
| (B)-NHL                        | Non-Hodgkin-Lymphom, B-Zell-Typ              |
| (P)MNC                         | (periphere) mononukleäre Zelle               |
| <sup>51</sup> Cr-release-assay | <sup>51</sup> Chrom-Freisetzungstest         |
| AB-Serum                       | gepooltes menschliches AB-Serum              |
| ACK                            | Ammoniumchlorid-Hydrogencarbonat             |
| APC                            | antigenpräsentierende Zelle                  |
| B/T-Zelle                      | B/T-Lymphozyt                                |
| bzw.                           | beziehungsweise                              |
| CD                             | cluster of differentiation                   |
| CD40L                          | CD40Ligand                                   |
| CsA                            | Ciclosporin A                                |
| CTL                            | Zytotoxischer T-Lymphozyt                    |
| DMSO                           | Dimethylsulfoxid                             |
| d                              | Tag  |
| ELISA                          | enzyme-linked immunosorbent assay            |
| Etc.                           | und so weiter                                |
| FACS                           | fluorescence activated cell sorter           |
| FCS                            | fetales Kälberserum                          |
| FITC                           | Fluorescein-Isothiocyanat                    |
| GMP                            | good manufacturing practice                  |
| HLA                            | human leucocyte antigen                      |
| Hrsg.                          | Herausgeber                                  |
| HSA                            | humanes Serum-Albumin                        |
| Id-(Protein)                   | Idiotyp-(Protein)                            |
| IgG                            | Immunglobulin vom Typ G                      |
| IL-4/10                        | Interleukin-4/10                             |
| MEM                            | minimal essential medium                     |
| MHAg                           | minor histocompatibility antigen             |
| MHC                            | major histocompatibility complex             |

---

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| n             | Anzahl                              |
| ND            | nicht durchgeführt                  |
| P             | Primärstimulation                   |
| PBS           | phosphatgepufferte Salzlösung       |
| PE            | Phycoerythrin                       |
| PenStrep      | Penicillin/Streptomycin             |
| PerCP         | Peridinchlorophyllprotein           |
| PHA           | Phytohämagglutinin                  |
| PP            | Poly-propylen                       |
| R1/2          | Restimulation 1/2                   |
| rhIL-7        | rekombinantes humanes Interleukin-7 |
| RPMI          | Roswell Park Memorial Institute     |
| sCD40L        | löslicher CD40Ligand                |
| SF-RPMI       | serumfreies RPMI-Medium             |
| tCD40L-Zellen | Zellen, transfiziert mit CD40Ligand |
| TCR           | T-Zell-Rezeptor                     |
| ÜS            | Überstand                           |
| UPN           | Patientenidentifikationsnummer      |