

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A / Hämatologie-Onkologie  
-Zentrum für Knochenmarkstransplantation-  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel-

ETABLIERUNG VON KULTURBEDINGUNGEN FÜR EINE ALLOGENE  
IMMUNTHERAPIE MIT MELANOMSPEZIFISCHEN ZYTOTOXISCHEN  
T-LYMPHOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Janina Barbara Slotty  
aus Hamburg

2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Kienast

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. S. Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09. 2003 u. 22.09. 2003

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

## **ZUSAMMENFASSUNG**

ETABLIERUNG VON KULTURBEDINGUNGEN FÜR EINE ALLOGENE IMMUNTHERAPIE MIT  
MELANOMSPEZIFISCHEN ZYTOTOXISCHEN T-LYMPHOZYTEN

Janina Barbara Slotty

In der vorliegenden Arbeit wurde die Generierung melanomspezifischer CTL aus PMNC gesunder Spender für eine adoptive Immuntherapie in Anlehnung an GMP-Richtlinien optimiert. Für sechs der acht untersuchten HLA-A2-restringierten Peptidepitope aus melanomassoziierten Antigenen gelang die Induktion peptidspezifischer CTL, wobei bei drei Peptiden auch das endogen prozessierte Antigen auf Melanomzellen spezifisch erkannt wurde. Eine nicht-proportionale Korrelation zwischen der Affinität der Peptide an HLA-A2 und ihrer Immunogenität war zu beobachten. Die erwähnten Peptide MT<sub>27-35</sub> aus Melan-A/MART1, G<sub>209-2M</sub> aus gp100 und T<sub>368-376</sub> aus Tyrosinase sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit für den Einsatz in einer klinischen Studie geeignet.

Der Vergleich verschiedener Protokolle zeigte, daß die dreimalige Stimulation mit peptidbeladenen Zellen innerhalb einer 21tägigen Kulturzeit für die resultierende Zytotoxizität der CTL ideal ist. Die primäre Stimulation mit DC, gefolgt von zwei Restimulationen mit PMNC erwies sich als suffizient für die Induktion peptid- und melanomspezifischer CTL aus T-Zellen gesunder Spender. Die zytolytische Aktivität dieser CTL war nicht geringer als jene wiederholt mit DC stimulierter Zellen. Mittels des etablierten Protokolls konnte eine vier- bis fünffache Expansion der Ausgangspopulation erreicht werden.

Die Anpassung der Kulturbedingungen an den klinischen Einsatz war für CTL-Kulturen ohne Einschränkung möglich. Bei der Generierung der DC aus CD14+ Zellen mußte ein Kompromiß zwischen den antigenpräsentierenden Qualitäten der Zellen und der angestrebten GMP-Konformität eingegangen werden.

MEINEN ELTERN

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 DAS MALIGNEN MELANOM UND SEINE THERAPIEMÖGLICHKEITEN .....	1
1.2 IMMUNTHERAPEUTISCHE ANSÄTZE .....	2
1.3 ZIELSETZUNG .....	4
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>6</b>
2.1 GERÄTE, MATERIALIEN, KULTURMEDIEN UND ANTIKÖRPER .....	6
2.1.1 Geräte .....	6
2.1.2 Materialien .....	6
2.1.3 Kulturmedien und Lösungen.....	7
2.1.4 Antikörper.....	9
2.2 ZELLINIEN .....	10
2.2.1 Melanomzellkultur.....	10
2.2.2 Suspensionszellkultur.....	10
2.3 VORVERSUCHE.....	11
2.3.1 Herstellung T-Zell konditionierten Mediums (TCM) .....	11
2.3.2 Proliferationsassays zur Austestung von TCM und autologen Seren	12
2.4 ISOLATION DER PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN (PMNC) .....	13
2.5 ANREICHERUNG VON MONOZYTEN UND UMDIFFERENZIERUNG DIESER ZU DENDRITISCHEN ZELLEN (DC).....	16
2.5.1 Herstellung Monozyten-konditionierten Mediums (MCM) .....	16
2.5.2 Adhärenzdepletion.....	16
2.5.3 T-Zell-Depletion mittels Erythrozyten-Rosetting .....	17
2.5.4 CD 14-Separation mit dem MACS <sup>®</sup> -System.....	18
2.6 INDUKTION PEPTID-SPEZIFISCHER CTL .....	22
2.6.1 Peptide .....	22
2.6.2 Vorbereitung der Stimulatorzellen .....	23
2.6.3 Kultivierung cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) .....	23
2.7 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN.....	27
2.7.1 Messung der Peptid-Affinität an MHC-I (T2-Assay).....	28

2.7.2	Messung der Antigen-Expression auf Melanomzellen.....	29
2.7.3	Messung der MHC-I Expression auf Melanomzellen in Abhängigkeit von vorangegangener Inkubation mit IFN- $\gamma$ .....	29
2.8	MESSUNG DER CYTOLYTISCHE AKTIVITÄT .....	29
2.9	MESSUNG DER ZYTOKINSEKRETION .....	31
2.9.1	Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand .....	31
2.9.2	Koinkubationsansätze .....	32
2.9.3	ELISA .....	32
2.10	PRÄSENTATION DER ERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	35
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
3.0	VORVERSUCHE.....	35
3.0.1	Gewinnung T-Zell konditionierten Mediums .....	35
3.0.2	Simultane Peptid- und <sup>51</sup> Cr-Inkubation in Zytotoxizitäts-Assays.....	35
3.0.3	Zeitschema der <sup>51</sup> Cr-Assays.....	36
3.1	PMNC-SUBPOPULATIONEN.....	38
3.1.1	Zusammensetzung der mononukleären Fraktion des peripheren Blutes .....	38
3.1.2	Zusammensetzung bzw. Reinheit der durch CD14-MACS Separation gewonnenen Zellfraktionen .....	39
3.2	GENERIERUNG REIFER DENDRITISCHER ZELLEN (DC) .....	40
3.2.1	Vergleich von drei verschiedenen Generierungsmethoden anhand der Oberflächenantigene kultivierter Zellen .....	40
3.2.2	Gegenüberstellung verschiedener Generierungsmethoden anhand der Zellmorphologie .....	43
3.3	BINDUNGS-AFFINITÄT SYNTHETISCHER PEPTIDE AN HLA-A2 .....	44
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER MELANOMZELLINIEN.....	47
3.4.1	Melanozytäre Differenzierungsantigene und kostimulatorische Moleküle .....	47
3.4.2	Beeinflußbarkeit der MHC-I Expression durch IFN- $\gamma$ Präinkubation ..	49
3.5	ZYTOTOXIZITÄT DER SPEZIFISCHEN CTL .....	51
3.5.1	Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit MT <sub>27-35</sub> (AAGIGILTV) .....	51

3.5.2 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit G <sub>209-217</sub> (ITDQVPFSV).....	53
3.5.3 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit G <sub>207-2M</sub> (IMDQVPFSV).....	54
3.5.4 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit G <sub>9154</sub> (KWTGQYWQV).....	55
3.5.5 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit T <sub>1-9</sub> (MLLAVLYCL).....	57
3.5.6 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit T <sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV).....	58
3.5.7 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit GnT-V <sub>nt38-67</sub> (VLPDVFIRCV).....	59
3.5.8 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit M <sub>3271-279</sub> (FLWGPRALV).....	61
3.6 ELISA.....	62
3.6.1 IFN- $\gamma$ Sekretion nach Koinkubation mit Zielzellen.....	62
3.6.2 IL-4 Sekretion nach Koinkubation mit Zielzellen.....	66
3.6.3 Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand.....	67
3.7 PHÄNOTYPISIERUNG DER CTL.....	68
3.8 WACHSTUMSVERSUCHE.....	68
3.8.1 Einfluß verschiedener Stimulatorzellen auf Expansionsraten von CTL .....	68
3.8.2 Einfluß von Lymphocult-T <sup>®</sup> auf Expansion und Spezifität von CTL ...	70
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>72</b>
4.1 IMMUNOGENITÄT VERSCHIEDENER PEPTIDE.....	72
4.1.1 Beziehung zwischen MHC-Affinität und Immunogenität.....	76
4.1.2 Charakterisierung der Effektorzellen.....	76
4.2 MODIFIKATION DER KULTURBEDINGUNGEN FÜR DIE GENERIERUNG SPEZIFISCHER CTL AUS PMNC GESUNDER SPENDER.....	77
4.2.1 Adaptation der Kulturzeit.....	77
4.2.2 Adaptation des Stimulationsprotokolls.....	78
4.2.3 Optimierung der DC-Generierung.....	79



## Inhaltsverzeichnis

---

4.3 EXPANSION SPEZIFISCHER CTL .....	80
4.4 KONSEQUENZEN FÜR DIE IN VIVO ANWENDUNG .....	81
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>6. DANKSAGUNG .....</b>	<b>XII</b>
<b>7. LEBENSLAUF .....</b>	<b>XIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
<sup>51</sup> Cr	radioaktives Isotop 51 des Elements Chrom
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
Ag	Antigen
APC	antigen-presenting cells
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxic T-lymphocytes
d	day
DC	dendritic cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
E:T	Verhältnis der Effektor- zu Targetzellzahlen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F(ab') <sub>2</sub>	antigenbindendes Fragment von Immunglobulinen mit zwei Bindungsstellen
FACS	fluorescence activated cell sort
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G <sub>209-217</sub>	Nonapeptid ITDQVPFSV aus gp100
G <sub>209-2M</sub>	an Position 2 modifiziertes Nonapeptid IMDQVPFSV aus gp100
G <sub>9154</sub>	Nonapeptid KTWGQYWQV aus gp100
GKF	Gewebekulturflasche
GM-CSF	granulocyte/monocyte colony stimulating factor
GMP	good manufacturing practice
GnT-V	N-Acetylglucosaminyltransferase V Gen

## Abkürzungsverzeichnis

---

GnT-V <sub>38-67</sub>	Dekapeptid VLPDVFIRCV, kodiert von einem Intron des N-Acetylglucosaminyltransferase V Gens
Gy	Gray
h	Stunde
HLA	human leucocyte antigen
HSA	human serum albumin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAK	lymphokine-activated killer cells
LFA-3	Leukozytenfunktionsantigen 3
M3 <sub>271-279</sub>	Nonapeptid FLWGPRALV aus MAGE-3
MAA	Melanom-assoziiertes Antigen
MACS	magnetic activated cell sort
MBq	Mega-Becquerel
MCM	monocyte conditioned medium
mFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MT <sub>27-35</sub>	Nonapeptid AAGIGILTV aus Melan-A/MART-1
NK	natural killer cells
P	Primärstimulation
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridium-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PHA	Phytohämagglutinin
PMNC	peripheral mononuclear cells
PP	Poly-Propylen
R	Restimulation
rh	recombinant human

## Abkürzungsverzeichnis

---

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SF	serumfrei
T <sub>1-9</sub>	Nonapeptid MLLAVLYCL aus Tyrosinase
T <sub>368-376</sub>	Nonapeptid YMDGTMSQV aus Tyrosinase
TAP	transporter associated with antigen processing
TCM	T-cell conditioned medium
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
U	Unit
ÜN	über Nacht

## 1. Einleitung

### 1.1 *Das maligne Melanom und seine Therapiemöglichkeiten*

Maligne Melanome sind invasive bösartige Geschwulste, die sich aus Melanozyten entwickeln. Diese Zellen neuroektodermalen Ursprungs finden sich überwiegend in der Basalzellschicht der Haut, wo sich auch über 90% der primären Tumoren manifestieren.

Das maligne Melanom ist ein Tumor des mittleren Lebensalters, der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Je nach Hautfarbe, ethnischer Zugehörigkeit und Lebensraum der untersuchten Bevölkerung finden sich unterschiedliche Angaben über die Häufigkeit dieser Erkrankung: In unseren Breiten liegt sie im Bereich von 10-15 Neuerkrankungen / 100.000 / Jahr und macht damit ca. 2% aller Krebserkrankungen aus. Die Inzidenz dieses Tumors ist jedoch weltweit steigend (um 5-10%/ Jahr), so daß innerhalb der nächsten 10 Jahre mit einer Verdopplung der Erkrankungsrate gerechnet werden muß [23, 56].

Die Entstehung von Melanomen in unveränderten Hautbezirken und die Entartung definierter Vorläuferläsionen (Nävi, Lentigines) wird durch helle, empfindliche Haut, übermäßige Sonnenlichtexposition, häufige und schwere Sonnenbrände, genetische Dispositionen und bestehende Immunschwäche begünstigt [24, 56].

Abhängig vom Krankheitsstadium bei Diagnosestellung schwankt die 10-Jahres-Überlebensrate stark [27, 52]. Prognostisch wichtige Faktoren sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die vertikale Tumordicke in mm (nach BRESLOW), die Invasion in die unterschiedlichen Hautschichten (nach CLARK), die Lokalisation, die Tumorhistologie, das Geschlecht und Alter des Patienten sowie der lokale und disseminierte Metastasierungsgrad [24]. Die hohe globale Letalität von 20-30% aller Patienten, die an einem malignen Melanom erkranken [56] begründet sich hauptsächlich in der frühzeitigen und ausgeprägten Metastasierung des Primärtumors. Diese erfolgt in zwei Drittel der Fälle zunächst lymphogen in regionäre Lymphknoten und seltener direkt hämatogen als Fernmetastasen in Haut und Unterhaut anderer Körperregionen, in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn. Das weitere Fortschreiten der

Erkrankung führt bei vielen Patienten zu einer Multiorganmetastasierung mit infauster Prognose und einer mittleren Überlebenszeit von 6 Monaten [24].

Die Möglichkeit einer kurativen Therapie des malignen Melanoms ist bislang auf die Operation von Primärtumoren im Frühstadium limitiert.

Wird der Tumor erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, bedeutet dies für den Patienten ein erhebliches Metastasierungs- und Rezidivrisiko. Therapieerfolge im metastasierten Stadium beschränken sich zumeist auf eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit um wenige Monate, welche jedoch häufig mit einer Verminderung der Lebensqualität erkaufte wird [6, 28, 41].

### **1.2 Immuntherapeutische Ansätze**

Immunologische Faktoren spielen nicht nur in der Entstehung des Melanoms eine Rolle, sondern haben auch Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung: Als Zeichen einer Aktivierung des Immunsystems werden beim Melanom verglichen mit anderen Tumorentitäten relativ häufig spontane Remissionen des Primärtumors mit simultan auftretenden Infiltraten aus T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen beschrieben [45]. Lange Latenzphasen zwischen der Diagnose des Primärtumors und dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen lassen auf eine zumindest teilweise erfolgreiche immunologische Tumorabwehr schließen, ebenso der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen Melanozyten und Melanomzellen im Blut von Patienten. Aus diesen Beobachtungen wurde schon in den frühen 70er Jahren die Rationale für die Entwicklung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien gezogen.

Die unspezifische Stimulierung des Immunsystems mit bestimmten Bakterien (Bacille Calmette Guerin, *Corynebacterium parvum*) oder mit Interferonen (IFN- $\alpha$ ) und Interleukinen (IL-2) wurde dabei ebenso auf ihre therapeutische Wirksamkeit überprüft wie gentherapeutische Ansätze (z.B. Tumorzelltransfektionen mit kostimulatorischen Molekülen) und Vakzinierungsstrategien mit Tumorzelllysaten [7, 9, 25, 40, 55, 62, 72, 81, 83].

Die Entdeckung, daß die Tumorregression häufig mit dem Auftreten Tumorinfiltrierender-Lymphozyten (TIL) korreliert, macht die wichtige Rolle der T-Zellen in der körpereigenen Immunantwort auf maligne Melanome deutlich.

---

Eine daraus erwachsende Behandlungsstrategie ist die Applikation von *in vitro* expandierten TIL oder Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) aus dem peripheren Blut. In den meisten Fällen wird diese adoptive Immuntherapie mit einer systemischen IL-2 Gabe kombiniert. Vergleichende Studien mit IL-2-Monotherapien zeigen für die kombinierte LAK-/IL-2-Therapie keine Verbesserung von Therapieansprechen oder Überlebenszeit, während bei einer Kombination von TIL-Reinfusion und IL-2 höhere Remissionsraten als bei Monotherapie resultieren [5, 20, 67].

Vor allem Untersuchungen der Rezeptorspezifität von TIL führten im letzten Jahrzehnt zur Identifizierung verschiedener Melanom-assoziiierter Antigene (MAA), an welche große Hoffnungen für die Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immuntherapie geknüpft sind. Bei diesen Antigenen handelt es sich teils um tumorassoziierte Antigene, wie die Produkte der MAGE-Genfamilie oder eines Introns des N-Acetylglucosaminyltransferase V Gens, zum weitaus größeren Teil aber um melanozytäre Differenzierungsantigene, wie Tyrosinase, gp100 und Melan-A/MART-1 [4, 10, 26, 39, 80].

Die Erkennung von Tumorantigenen durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) erfolgt nach zellulärer Prozessierung MHC-I gebunden in Form von Nona- oder Dekameren [74]. Inzwischen konnten für die MAA zahlreiche dieser Peptidepitope identifiziert werden [26, 37, 38, 49, 54, 79, 84, 85]. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Vakzinierung von Melanompatienten mittels synthetischer Peptide [32, 46, 63, 64] oder Peptid-beladener oder -transfizierter antigenpräsentierender Zellen (APC) [2, 29, 50]. Zusätzlich kann die Effektivität von *ex vivo* generierten CTL durch Stimulation mit antigenen Peptiden gesteigert werden [59].

Trotz vielversprechender Behandlungsansätze konnte sich wegen mangelnder klinischer Effizienz bisher noch keines dieser Verfahren als adjuvante Standardtherapie des malignen Melanoms durchsetzen. Dies ist teilweise durch folgende immunologische Phänomene bedingt, die bei der Entwicklung einer Immuntherapie für ein großes Patientenkollektiv besondere Schwierigkeiten bereiten:

- Viele MAA besitzen eine sehr viel schwächere Immunogenität als virale oder andere Fremdartigene [37]. Diese konnte für einige Peptidepitope durch Veränderung der Ankerresiduen gesteigert werden [54], was sich jedoch auch negativ auf die Erkennung des originalen Antigens durch die stimulierten Zellen auswirken kann.
- „Tumor-escape Mechanismen“, wie die Herunterregulation der für die Tumorzelle nicht essentiellen Antigene, werden besonders für die Metastasen der malignen Melanome beschrieben [18].
- Häufig entwickeln die immunkompetenten Zellen des Patienten eine Toleranz gegen Tumorantigene, da diese in einem autologen Kontext und ohne ausreichende Expression kostimulatorischer Moleküle präsentiert werden [58].

Allogene Effektorzellen sind von den zuletzt genannten Toleranzmechanismen primär nicht betroffen. Der adoptive Transfer melanomspezifischer CTL eines HLA-identen gesunden Spenders könnte daher ein erfolgversprechendes Therapiekonzept darstellen.

### **1.3 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollen die Grundlagen für eine allogene, adoptive Immuntherapie des metastasierten Melanoms mit melanomspezifischen CTL geschaffen werden.

Aus fünf in der Literatur beschriebenen Melanomantigenen, welche von einem hohen Prozentsatz an Melanomzellen *in vivo* exprimiert werden, wurden acht Peptidepitope ausgewählt. Alle ausgewählten Peptide unterliegen einer Restriktion auf den in der kaukasischen Bevölkerung und anderen ethnischen Gruppen weit verbreiteten HLA-Haplotyp A\*0201 [21, 42]. Diese Peptide werden auf ihre Eignung untersucht, im Zusammenhang mit antigenpräsentierenden Zellen gesunde T-Lymphozyten auf die assoziierten Melanomantigene zu primen und so hochspezifische CTL zu induzieren. Die Spezifität dieser Zellen für peptidbeladene T2-Zellen und antigenexprimierende Melanomzellen wird anhand von Standard-Chromassays und Zytokin-ELISA getestet.



Zur Generierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) aus peripheren mononukleären Blutzellen (PMNC) gesunder HLA-A2-positiver Probanden sollen verschiedene Protokolle miteinander verglichen und gegebenenfalls modifiziert werden. Ein Hauptkriterium ist dabei neben der Qualität der APC und der Spezifität der CTL die Eignung des Kulturprotokolls für die *in vivo* Anwendung.

Auf diese Weise sollen Kulturbedingungen etabliert werden, welche in Adaption an GMP-Richtlinien die Generierung optimaler APC und melanomspezifischer CTL für den therapeutischen Einsatz ermöglichen.

Im Anschluß an diese Arbeit soll die entwickelte Methodik in einer Patientenstudie eingesetzt werden, um allogene stammzelltransplantierten Patienten mit Melanomerkrankungen im metastasierten Stadium *in vitro* stimulierte und expandierte melanomspezifische CTL des HLA-identen Knochenmarkspenders zu transfundieren.

## 2. Material und Methoden

Da die im Folgenden aufgeführten Versuche die experimentelle Vorarbeit zu einer klinischen Studie darstellen, wurden soweit möglich Produkte verwendet, die GMP (good manufacturing practice) Richtlinien entsprechen.

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

#### 2.1.1 Geräte

Becton Dickinson, Brüssel, Belgien:

FACSCalibur (fluorescence activated cell sorter)

BioRad, Hercules, CA, USA:

Benchmark Microplate-Reader

Heraeus (Kendro Laboratory Products), Hanau:

Biofuge Pico

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

Sicherheitswerkbank Herasafe

Megafuge 3.0 R

Sigma, Osterode am Harz:

Sigma Laboratory Centrifuge 4K15 C

Wallac, Turku, Finnland:

Microbeta 1450

#### 2.1.2 Materialien

Falcon, Becton Dickinson Labware, Meylau Cedex, Frankreich:

Gewebekulturschalen 10 cm

5 ml-Polystyrol-Rundbodenröhrchen für FACS-Ansätze

Verschlusskappen für FACS-Röhrchen

100 µm Nylon Cell Strainer

Greiner Cellstar, Solingen:

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

14 ml PP (Polypropylen) 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, Nürmbrecht:

Konische 50 ml Röhrchen

Schleicher & Schuell, Dassel:

0,2 µm Einmal-Filterhalter (FP 030/3)

Wallac, Turku, Finnland:

Flexible 96-well-Mikrotiterplatten (#1450-401)

Printed Filtermat A (#1450-421)

Festszintillator Platten MeltiLex™ A (#1450-441)

### 2.1.3 Kulturmedien und Lösungen

Als Standardzellkulturmedium für Suspensions- und Melanomzellkulturen diente, sofern nicht anders erwähnt, Na-Bicarbonat-gepuffertes RPMI 1640 (Seromed Biochrom KG, Berlin) unter Zusatz von L-Glutamin (Gibco BRL, Paisley, UK), Penicillin-Streptomycin (PenStrep), Natrium-Pyruvat (beides von Seromed Biochrom KG, Berlin) und fetalem Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK) in den folgenden effektiven Konzentrationen im Medium:

- 
- L-Glutamin 4 mM
  - Penicillin-Streptomycin 100 U = 100 µg/ml
  - Natrium-Pyruvat 1 mM
  - FCS 10 vol%

Dieses wird im folgenden als RPMI-Medium bezeichnet.

Zum Waschen wurde das gleiche Medium in serumfreier Form verwendet (SF-RPMI).

Einige Melanomzelllinien wurden in dem speziell für adhärenz Zellen empfohlenen Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, Paisley, UK) mit PenStrep, Na-Pyruvat und FCS in den oben angegebenen Konzentrationen plus 2 mM L-Glutamin kultiviert.

Als Medium für Chrom-Assays und Koinkubationsansätze wurde Hepes-gepuffertes RPMI 1640 Medium (Seromed Biochrom KG, Berlin) mit L-Glutamin, PenStrep und Na-Pyruvat in den oben aufgeführten Endkonzentrationen unter Zugabe von 10% humanem AB-Serum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) eingesetzt.

Da sowohl für T2-Stabilisierungsassays als auch für die Peptid-Beladung der Stimulatorzellen bei CTL-Kulturen und Koinkubationsassays eine 4-16stündige Inkubation in serumfreiem Medium erforderlich war, wurde das beschriebene Hepes-gepufferte RPMI 1640 Medium in diesen Fällen ohne Serumzusatz verwendet (SF-Hepes).

Die Generierung der dendritischen Zellen (DC) erfolgte in X-VIVO 15 Medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA), das mit 4 mM L-Glutamin und 100 U/ml PenStrep ergänzt wurde (DC-Medium). Direkt vor Verwendung des Mediums wurde hitzeinaktiviertes Plasma des jeweils entsprechenden Spenders in einer Endkonzentration von 1% zugegeben.

Das für CTL-Kulturen verwendete AIMV (Research Grade, #12030-029) (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, 100 U/ml PenStrep und 2% humanem AB-Serum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) versetzt (CTL-Medium).

Das Einfriermedium setzte sich aus 80 vol% SF-RPMI und 20 vol% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zusammen und wurde direkt vor dem Einfriervorgang 1:1 mit FCS gemischt.

Für Waschvorgänge bei der Melanomzell-Passagierung wurde 1fach konzentrierte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Dulbecco's, Gibco BRL, Paisley, Scotland) verwendet.

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

#### 2.1.4 Antikörper

Für die Durchflußzytometrie wurden spezifische Maus-Antikörper gegen folgende humane Antigene eingesetzt: CD 1a, CD 83 (Immunotech, Marseille, Frankreich), CD 3, CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, CD 20, CD 25, CD 56, CD 69, HLA-DR (Becton Dickinson, Brüssel, Belgien), CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, CD95, CD95-L (Pharmingen, San Diego, USA), HLA-ABC (Serotec, Eching). Die genannten monoklonalen Antikörper waren entweder Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC), Phycoerythrin- (PE) oder Peridium-Chlorophyll-Protein- (PerCP) gekoppelt und gehörten der IgG<sub>1</sub>-Unterkategorie an. Isotypkontrollen gegen diesen IgG-Subtyp wurden bei allen Färbungen mitgeführt.

Der Antikörper BB7.2 für die Untersuchung der HLA-A2-Expression wurde freundlicherweise von Dr. Joachim Schultze, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA zur Verfügung gestellt. Als Sekundärantikörper fungierte FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> IgG (Dako, Glostrup, Denmark).

Für die intrazellulären Färbungen der Melanomzelllinien wurden ungekoppelte Maus-Antikörper gegen MelanA/MART-1, gp 100 (Dako, Glostrup, Denmark), MAGE-1 und die MAGE-Subfamilie -3,4,6,12 (letztere freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Noppen, Kantonsspital Basel, Schweiz) in Verbindung mit dem oben erwähnten Sekundärantikörper eingesetzt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen konnte bei Verwendung Fluoreszenz-gekoppelter AK vor der eigentlichen Färbung eine Inkubation mit monoklonalem Maus-IgG<sub>1</sub> (Jackson Dianova, Hamburg) durchgeführt werden.

## 2.2 Zelllinien

### 2.2.1 Melanomzellkultur

Die folgenden Melanomzelllinien wurden bei Versuchen eingesetzt: SK-Mel-24, SK-Mel-28 (ATCC, Manassas, VA, USA), 2A14, 93.04 (überlassen von Dr. Corlien Aarnoudse, Department of clinical oncology, Academisch Ziekenhuis Leiden, Niederlande), D 10, HBL, Na8-MEL (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Noppen, Kantonsspital Basel, Schweiz), K 029 (freundliche Gabe von Dr. Joachim Schultze, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA)

Die Melanomzelllinien 2A14, 93.04, K 029 und SK-Mel-24 wurden in DMEM kultiviert, während für die Linien SK-Mel-28, D10, HBL und Na8-MEL das Medium RPMI 1640 verwendet wurde. Sobald der Zellrasen in den liegenden 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen zu mindestens 75% konfluent war, wurden die adhären Zellen mit 4 ml Trypsin (Trypsin EDTA 10fach, 0,5/0,2 % (w/v) 1:10 in PBS verdünnt) (Seromed Biochrom KG, Berlin) drei Minuten angedaut und mit 5 ml RPMI im ersten bzw. 10 ml PBS im zweiten Waschschrift abgespült. Nach der Zentrifugation dieser Zellsuspension (660×g, 5 Minuten) wurde das Pellet resuspendiert, in einem den Erfahrungswerten nach für die jeweilige Zelllinie günstigen Verhältnis auf neue Gewebekulturflaschen verteilt und mit Medium auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich auf diese Weise versorgt.

### 2.2.2 Suspensionszellkultur

Eine HLA-A0201-positive, TAP-defiziente humane Lymphoblastenlinie (T2 von ATCC, Manassas, VA, USA) diente sowohl in <sup>51</sup>Cr-Assays als auch bei Peptidbindungs-Assays und Koinkubationsansätzen für ELISA als Trägerzelle für die synthetischen Peptide. Diese Zellen wurden pro 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche in 30 ml RPMI Medium kultiviert und jeden zweiten Tag 1:2 ausgedünnt.

Die humane, auf HLA-Antigene negative Lymphoblastenlinie K 562 (ATCC, Manassas, VA, USA) wurde zur Detektion unerwünschter NK-Zell Aktivität

genutzt. Die Kultivierung erfolgte mit den gleichen Materialien wie bei T2-Zellen. Die K 562 wurden zweimal in der Woche 1:5 ausgedünnt.

### **2.3 Vorversuche**

Ziel dieser Versuche war es, für die CTL-Kultivierung ein T-Zell-konditioniertes IL-2-haltiges Medium herzustellen. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von SCHENDEL ET AL. [66]. Da vermutet wurde, daß diese Medien in ihrer Wirkung großen interindividuellen Schwankungen unterliegen, wurden sie zunächst einzeln in Proliferationsassays getestet, mit der Absicht, aus den optimalen Chargen einen Pool zu bilden.

#### **2.3.1 Herstellung T-Zell konditionierten Mediums (TCM)**

Von 11 gesunden Spendern wurden je 15 ml venöses Blut entnommen, welches in konischen 15 ml Röhrchen mit je vier Glasbeads (2 mm Durchmesser, aus Serum-Monovetten) bei 4°C für 15 Minuten bei Stufe 3-4 rotiert wurde. Die sich bildenden Fibringerinnsel wurden mittels Filtration durch ein 100 µm Nylonsieb entfernt. Es folgte eine 15minütige Zentrifugation des defibrinierten Blutes mit 650×g, wonach die Serumfraktion abgenommen, mit 0,2 µm Filtern sterilfiltriert, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert und danach bei 4°C gelagert wurde. Das verbleibende Zellpellet wurde mit PBS wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, in einem 50 ml Röhrchen über 15 ml Ficoll Separating Solution geschichtet und mit 1400×g für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde geerntet und insgesamt dreimal mit 400×g in einem Volumen von 10-20 ml SF-RPMI gewaschen.

Die so isolierten Zellen entsprechen den peripheren mononukleären Zellen (PMNC) des Blutes. Sie wurden ausgezählt, in SF-RPMI ohne Antibiotika mit 1% autologem Serum und 1% PHA M (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und auf hydrophilen 24-well-Platten à 1,5 ml/well ausplattiert. Vor der Inkuabtion im Brutschrank wurden die Zellen mit 9 Gy bestrahlt.

Die Kulturen wurden nach 48 Stunden abgeerntet und 15 Minuten mit 450×g zentrifugiert. Das T-Zell konditionierte Medium wurde abgenommen, sterilfiltriert (0,2 µm) und bis zur Austestung bei -20°C eingefroren.

### 2.3.2 Proliferationsassays zur Austestung von TCM und autologen Seren

Zur Austestung der mitogenen Wirkung des T-Zell konditionierten Mediums wurden PHA-Blasten in TCM-haltigem Medium in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert. Mit Hilfe eines Beta-Counters konnte im Anschluß die Aufnahme rate des markierten Thymidins in die Zellen bestimmt werden, welche der Mitoserate proportional ist.

Die PHA-Blasten wurden generiert, indem PMNC in einer Konzentration von  $2 \times 10^5/\text{ml}$  in RPMI Medium mit 1% PHA M (Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) auf hydrophilen 24-well-Platten ausplattiert und im Brutschrank inkubiert wurden. Nach vier Tagen konnten die Blasten geerntet und entweder direkt in Versuchen eingesetzt oder zur späteren Verwendung eingefroren werden.

Für die Proliferationsassays wurden die PHA-Blasten in serumfreiem CTL-Medium aufgenommen und à  $1,5 \times 10^4$  in 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  auf einer 96-well Flachboden-Platte ausplattiert. Pro well wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  CTL-Medium inklusive 4% AB-Serum, 100 U/ml Proleukin<sup>®</sup> und 40% TCM zugegeben. Als Standard wurde statt des TCM Lymphocult<sup>®</sup>, ein industriell gewonnenes Wachstumsmedium, eingesetzt.

Die Austestung der autologen Seren erfolgte, indem die wells mit 100  $\mu\text{l}$  CTL-Medium inklusive 40% Lymphocult<sup>®</sup>, 100 U/ml Proleukin<sup>®</sup> und je 4% der individuellen Seren befüllt wurden. Hierbei diente gepooltes, humanes AB-Serum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) als Standard.

Diese Ansätze wurden für fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor pro well 25  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (NEN Life Science Products, Zaventem, Belgium) zugegeben wurden (Stocklösung 925 KBq/ml). Nach weiteren 16 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Platten auf Filtermatten geerntet und nach dem Verschmelzen mit einer Szintillator-haltigen Kunststoffplatte im Betacounter Microbeta 1450 gemessen.



#### **2.4 Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PMNC)**

- *Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat- (ACK-) Puffer*: 4,145 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g KHCO<sub>3</sub>, 0,0186 g EDTA, mit Aqua bidestillata auf 500 ml aufgefüllt.

Sämtliche Versuche wurden mit Lymphozyten gesunder HLA-A2-positiver Blutspender durchgeführt. Alle Waschschriffe erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, fünf Minuten mit 660×g bei Raumtemperatur.

Die Transfusionsmedizinische Abteilung der Uniklinik Münster (nach Absprache mit Dr. U. Cassens) stellte uns freundlicherweise Blutprodukte, die bei der Verarbeitung von heparinisierten Vollblutspenden zu Plasmakonzentraten anfallen (buffy coats), als Ausgangsmaterial für unsere CTL-Kulturen zur Verfügung. Alternativ wurden nach dem gleichen Protokoll auch Leukaphereseprodukte aus der genannten Abteilung aufbereitet. Im Zeitraum zwischen Blutentnahme und Verarbeitung, der in allen Fällen weniger als 24 Stunden betrug, wurden die buffy coats bzw. Leukaphereseprodukte bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

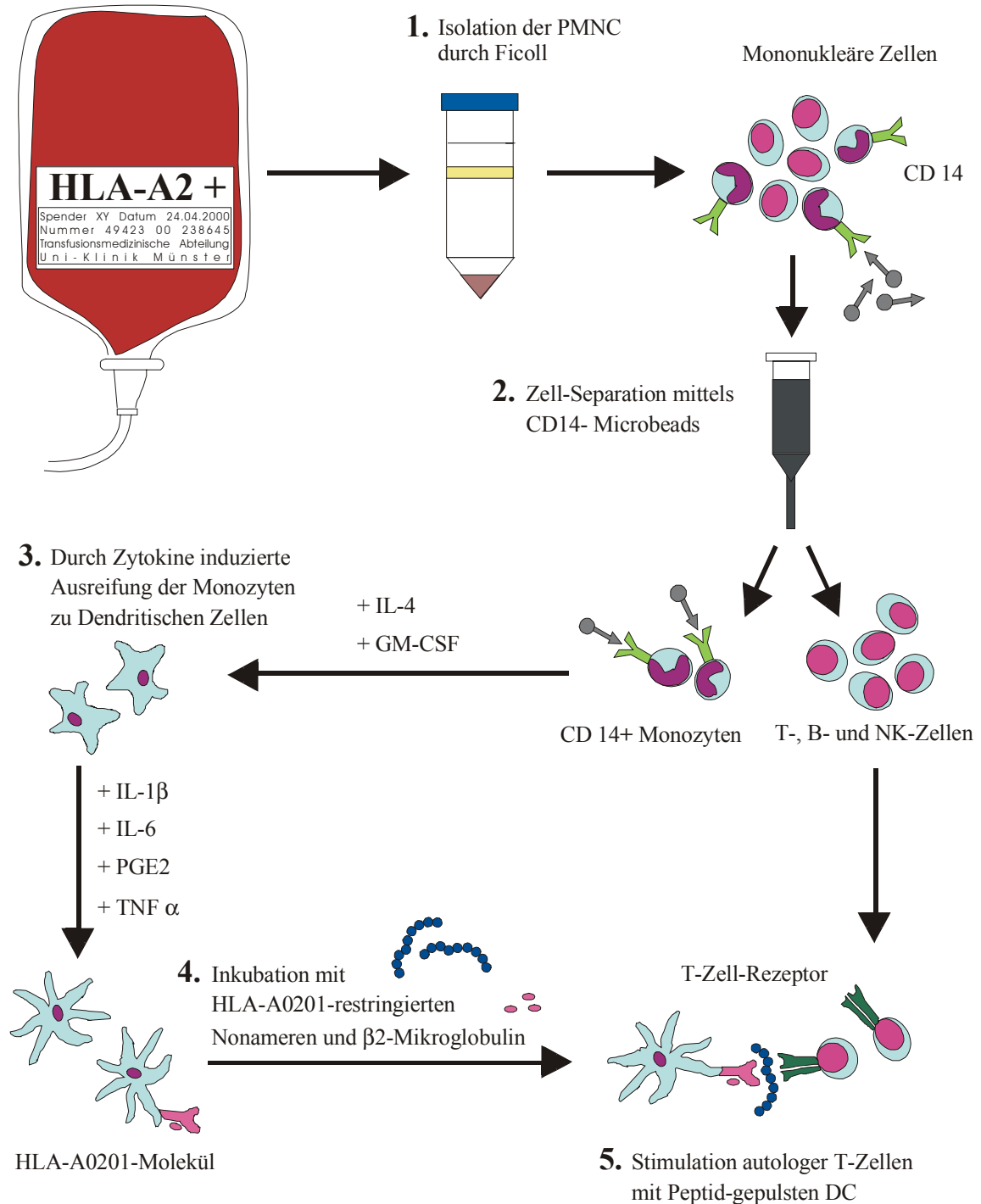
Für jeden Ansatz wurde zur Ausreifung der DC autologes Plasma benötigt. Zu diesem Zweck wurden 10-15 ml des Blutprodukts 10 Minuten mit 2500×g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde mit 0,2 µm-Filtern sterilfiltriert und nach 30minütiger Hitzeinaktivierung im 56°C warmen Wasserbad bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt. Das Pellet konnte mit SF-RPMI auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und in der weiteren Aufreinigung wie das originäre Blutprodukt verwendet werden.

Die Isolation der peripheren mononukleären Zellen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden konische 50 ml Röhrrchen mit je 15 ml Ficoll Separating Solution befüllt und vorsichtig mit 25 ml eines 1:1-Gemisches aus Blutprodukt und SF-RPMI überschichtet. Diese wurden bei 1400×g 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, so daß eine Phasentrennung erfolgte, bei welcher die PMNC in den Interphasen angereichert waren. Mittels einer 20 ml Spritze mit langer Kanüle (TSK-Supra 2×80 mm, Ehrhardt-Söhne GmbH, Geislingen) konnten die Interphasen abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt werden. Die Zellen wurden dann zweimal in je 50 ml SF-RPMI gewaschen, beim ersten Waschschriffe 10 Minuten bei 1080×g, dann

fünf Minuten bei 900×g. Bei starker Kontamination der Pellets durch Erythrozyten erfolgte zusätzlich über zwei Minuten eine Lyse mit je 5 ml ACK-Puffer, die mit RPMI inklusive 10% FCS abgestoppt wurde. Nach Durchführung der ACK-Lyse folgten zwei weitere Waschschrte (660×g, 5 Min.) mit jeweils 20-30 ml SF-RPMI, bevor die Zellausbeute bestimmt wurde.

Bei Aufreinigungen von buffy coats resultierten aus 100 ml Ausgangsmaterial durchschnittlich  $4 \times 10^8$  Zellen. Von diesen wurden  $1 \times 10^8$  für die CD14 Separation verwendet, während die restlichen PMNC in 50% FCS, 40% SF-RPMI und 10% DMSO bei  $-80^\circ\text{C}$  cryokonserviert wurden.

Aufreinigungen von Leukaphereseprodukten erbrachten pro 100 ml im Durchschnitt  $30 \times 10^8$  PMNC. In diesen Fällen wurden  $4 \times 10^8$  Zellen für die CD14 Separation eingesetzt.



**Abbildung 1:** Gewinnung der Ausgangszellen für CTL-Ansätze

Diese schematische Darstellung zeigt den Weg vom Blutprodukt zur ausgereiften Dendritischen Zelle. Bei der Aufreinigung fallen zusätzlich CD14<sup>-</sup> Zellen an, welche die Ausgangspopulation für die cytotoxischen T-Lymphozyten bildeten.

## **2.5 Anreicherung von Monozyten und Umdifferenzierung dieser zu Dendritischen Zellen (DC)**

Um die Anreicherung von Monozyten aus PMNC und deren Umdifferenzierung zu DC zu optimieren und zu standardisieren wurden verschiedene Protokolle vergleichend auf ihre Durchführbarkeit und die Qualität der Ergebnisse überprüft. Die Protokolle unterschieden sich sowohl in der Methode, die angewandt wurde, um eine Monozyten-angereicherte Zellfraktion zu gewinnen, als auch im zur Umdifferenzierung eingesetzten Zytokinschema. Zusätzlich wurde verglichen, ob die Induktion der DC-Ausreifung durch Zytokine vorteilhafter ist als durch Monozyten-konditioniertes Medium (MCM).

### **2.5.1 Herstellung Monozyten-konditionierten Mediums (MCM)**

Bakteriologische Gewebekulturplatten wurden für 10 Minuten bei RT mit 4 ml der humanen Immunglobulinlösung Gammagard® S/D (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißhem) beschichtet und danach zweimal mit PBS gewaschen. Auf jeder Platte wurden  $5 \times 10^7$  PMNC in 10 ml DC-Medium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h wurden die nicht adhärenen Zellen vorsichtig entfernt, 10 ml frisches Medium zugegeben und der Ansatz für weitere 20-24 h im Brutschrank inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, sterilfiltriert (0,2 µm) und bei -20 °C eingefroren.

Dieses Medium wurde bei Bedarf aufgetaut und anstelle des Zytokinmix an Tag 6 zur Induktion der DC-Ausreifung eingesetzt.

### **2.5.2 Adhärenzdepletion**

$5 \times 10^7$  PMNC wurden in 10 ml DC-Medium auf einer bakteriologischen Gewebekulturplatte für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen und die adhärenen Zellen wurden mit frischem, vorgewärmten Medium versorgt. Der Überstand wurde abzentrifugiert (5 Minuten mit  $660 \times g$ ) und die im Pellet befindliche nicht adhärenen Zellfraktion wurde nach dem gleichen Prinzip erneut für 1 h inkubiert. Nach dieser zweiten Adhärenzdepletion wurde der Überstand verworfen und auf die in der Petrischale verbliebenen Zellen wurde ebenfalls frisches, warmes Medium

gegeben. Beiden Ansätzen wurden je 800 U/ml GM-CSF (Leukomax<sup>®</sup>) (Sandoz, Basel, Schweiz) und 1000 U/ml IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA) zugesetzt. An Tag 3 wurde jede Petrischale mit 3 ml frischem Medium und GM-CSF sowie IL-4 in den oben angegebenen Konzentrationen (berechnet auf das neue Endvolumen) versorgt.

An Tag 6 wurden die nicht adhärennten Zellen als Korrelat der unreifen DC geerntet, ausgezählt und in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$ /ml erneut in Medium mit 1 % autologem Plasma à 4 ml/well ausplattiert. Diese Zellen erhielten zur vollständigen Ausreifung je 10 ng/ml IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (beide R&D Systems, Minneapolis, USA), 100 ng/ml IL-6 (TEBU, Frankfurt am Main) und 1  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub> (Biomol, Hamburg) oder in der Austestungsphase alternativ zu diesen Zytokinen 25 vol% autologes MCM. Die Ausreifung der DC war an Tag 9 abgeschlossen. Die Zellen wurden geerntet, ausgezählt und ihr Phänotyp durchflußzytometrisch analysiert.

### 2.5.3 T-Zell-Depletion mittels Erythrozyten-Rosetting

- *ACK-Puffer*: siehe 2.4

PMNC können durch Erythrozyten-Rosetting von CD2-positiven Zellen depletiert werden. Das von T- und NK (natural killer) -Zellen exprimierte CD2 bindet dabei an einen Rezeptor auf Schafserythrozyten, welcher dem humanen CD2-Rezeptor (CD58) entspricht. Bei einer nachfolgenden Ficoll-Separation finden sich die an Schafserythrozyten gebundenen Zellen im Pellet (E<sup>+</sup> Fraktion), während die nicht gebundenen Zellen, bei denen es sich hauptsächlich um B-Zellen, DC, Monozyten und einige NK-Zellen handelt, sich in der Interphase anreichern (E<sup>-</sup> Fraktion).

Als Ausgangsmaterial dienten  $2 \times 10^8$  PMNC in 10ml SF-RPMI. 2,5 ml Schafserythrozyten (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA oder ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) wurden viermal in je 10 ml SF-RPMI gewaschen und dann in 10 ml aufgenommen. Die gewaschenen Erythrozyten wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit den PMNC vermischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann 10 Minuten mit  $11 \times g$  zentrifugiert und weitere 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Für die darauf folgende Dichtegradientenzentrifugation wurde das entstandene Pellet durch vorsichtiges Rotieren des Röhrchens vom Plastik gelöst und mit 15 ml Ficoll Separating Solution unterlegt. Dies geschah am einfachsten mittels einer Spritze mit langer Kanüle. Das Röhrchen wurde 20 Minuten mit 500×g zentrifugiert, dann wurde für weitere 10 Minuten auf 660×g beschleunigt ohne die Zentrifuge anzuhalten. Das Auslaufen der Zentrifuge erfolgte ohne Bremse. Die Interphase wurde geerntet, in ein frisches Röhrchen überführt und gewaschen wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Auch hier wurde bei Bedarf eine Erythrozyten-Lyse mit ACK-Puffer durchgeführt und schließlich die Zellausbeute bestimmt.

Die von T- und NK-Zellen depletierte E<sup>-</sup> Fraktion wurde à 6×10<sup>6</sup> Zellen in 4 ml DC-Medium unter Zugabe von 500 U/ml GM-CSF und 2000 U/ml IL-4 auf 6-well-Platten angesetzt (Tag 0). An Tag 3 wurden 500 µl frisches Medium inklusive 1 % autologen Serums sowie IL-4 und GM-CSF in den oben erwähnten Konzentrationen zugegeben.

Ab Tag 6 wurden die Zellen versorgt, wie unter 2.5.2 bereits beschrieben.

Die E<sup>+</sup> Fraktion konnte als Ausgangspopulation für CTL-Kulturen Verwendung finden. Zu diesem Zweck wurde das nach dem Ernten der Interphase verbleibende Pellet in 50 ml SF-RPMI gewaschen, die Schafserythrozyten durch ACK-Puffer lysiert und die verbleibenden Zellen nach zwei weiteren Waschschritten ausgezählt und eingefroren.

#### 2.5.4 CD 14-Separation mit dem MACS<sup>®</sup>-System

- *MidiMACS-Puffer*: PBS, 2,5 vol% HSA (human serum albumin) (20%ig), 2 M EDTA, sterilfiltriert und gekühlt (4 °C)

Die Anreicherung monozytärer Zellen erfolgte in diesem Fall nach dem Prinzip der magnetischen MidiMACS<sup>®</sup>-Separation (magnetic activated cell sort) (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) mit anti-CD 14-microbeads und wurde in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Protokoll durchgeführt. Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Materialien und Substanzen stammten von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach.

$1 \times 10^8$  PMNC wurden in 800  $\mu$ l gekühltem MidiMACS-Puffer resuspendiert und mit 200  $\mu$ l CD 14-Microbeads 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um die überschüssigen beads zu entfernen erfolgten zwei Waschschrte in jeweils 15 ml MidiMACS-Puffer. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l Puffer aufgenommen und über einen Vorfilter auf eine mit 5 ml Puffer äquilibrierte MidiMACS-Säule (Typ LS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup>) geladen, die einem Magnetfeld ausgesetzt war. Es folgten 3 Waschschrte mit jeweils 3 ml MidiMACS-Puffer, um die CD 14-negativen Zellen zu eluieren. Zur Eluierung der CD 14-positiven Fraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit Hilfe eines Stempels unter Druck mit 5 ml Puffer gespült. Die CD 14-depletierte Fraktion wurde cryokonserviert, wie schon im letzten Abschnitt beschrieben.

Die CD 14<sup>+</sup>-Zellen wurden in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$ /well in 4 ml DC-Medium mit 1 % autologem hitzeinaktivierten Plasma auf 6-well-Platten ausgesät. Am Ansatztag (Tag 0) wurden 1000 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF zugegeben. An Tag 3 erfolgte die Zugabe von 300  $\mu$ l/ml Medium sowie 1 % autologem Plasma, IL-4 und GM-CSF in den oben genannten Konzentrationen bezogen auf das resultierende Endvolumen von 5,2 ml.

Im folgenden wurden die Zellen nach dem unter 2.5.2 beschriebenen Protokoll versorgt.

**Tabelle 1** : Zytokinkonzentrationen für die Ausreifung Dendritischer Zellen nach MACS-Separation

<i>Zytokin</i>	<i>Effektive Konzentration</i>
GM-CSF	800 U/ml
IL-4	1000 U/ml
IL-1 $\beta$	10 ng/ml
IL-6	100 ng/ml
PGE <sub>2</sub>	1 $\mu$ g/ml
TNF $\alpha$	10 ng/ml

---

Stammten die CD 14<sup>+</sup>- Zellen aus Leukaphereseprodukten, so wurde mit einem nach THURNER ET AL. [73] abgewandelten Protokoll zur Ausreifung großer Mengen dendritischer Zellen aus Leukaphereseprodukten gearbeitet. Dafür wurden die bereits erwähnten Materialien und Zelldichten beibehalten, während die Zytokine nach einem anderen zeitlichen Schema eingesetzt wurden.

Nachdem sich diese neue Methode auch für die Ausreifung von DC aus Buffy coats als durchführbar erwiesen hatte, ersetzte sie die alte Methode komplett. (siehe Tabelle 2)

Weiterhin erwies es sich als möglich, ausgereifte DC an Tag 7 oder 8 einzufrieren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für die Stimulation von T-Lymphozyten einzusetzen. Die so konservierten Zellen konnten einen Tag vor dem Primäransatz aufgetaut werden und wurden über Nacht noch einmal unter Zugabe von IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF  $\alpha$  in der Hälfte der üblicherweise eingesetzten Konzentrationen im Brutschrank inkubiert. Sowohl die Morphologie als auch die durchflußzytometrische Charakterisierung der Zellen am Tag des Primäransatzes zeigten keine nennenswerten Veränderungen gegenüber frisch ausgereiften DC an Tag 8.



**Tabelle 2** : Gegenüberstellung zweier verschiedener Methoden der DC-Generierung nach CD14-Separation<sup>1</sup>

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Etablierte Methode für Buffy coats</i>	<i>Modifizierte Methode nach THURNER [73]</i>
Tag 0	Zelldichte $1 \times 10^6$ /ml in 4 ml/well + 1 % autologes Plasma + GM-CSF + IL-4	Zelldichte $1 \times 10^6$ /ml in 4 ml/well + 1 % autologes Plasma
Tag 1		Abnahme des kompletten Mediums, Zugabe der daraus abzentrifugierten Zellen in frischem Medium + 1 % autologes Plasma + GM-CSF + IL-4
Tag 3	Zugabe von 300 $\mu$ l frischen Mediums pro ml Zellsuspension + 1 % autologes Plasma + GM-CSF + IL-4	Zugabe von 300 $\mu$ l frischen Mediums pro ml Zellsuspension + 1 % autologes Plasma + GM-CSF + IL-4
Tag 5		Nicht-adhärenente Zellen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ in frischem Medium ausgesät, 4 ml/well + 1 % autologes Plasma + GM-CSF + IL-4
Tag 6	Nicht-adhärenente Zellen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ /ml in frischem Medium ausgesät, 4 ml/well + 1 % autolog. Plasma + IL-1 $\beta$ + IL-6 + PGE <sub>2</sub> + TNF $\alpha$	+ IL-1 $\beta$ + IL-6 + PGE <sub>2</sub> + TNF $\alpha$
Tag 8		Ernten der ausgereiften DC und Verwendung für CTL-Ansatz
Tag 9	Ernten der ausgereiften DC und Verwendung für CTL-Ansatz	

<sup>1</sup> alle verwendeten Zytokinkonzentrationen sind Tabelle 1 zu entnehmen

## 2.6 Induktion Peptid-spezifischer CTL

Die Generierung spezifischer CTL erfolgte durch wiederholte Stimulation CD14-depletierter PMNC mit Peptid-beladenen DC oder PMNC unter Zugabe von IL-2.

### 2.6.1 Peptide

Die an einigen Stellen auftretende Nummerierung der Peptide (P1-9, siehe Tabelle 3) wurde arbeitsgruppenintern vorgenommen und beinhaltet keine Wertung der Peptid-Eigenschaften.

Bei den für die Versuche eingesetzten Peptiden handelte es sich um HLA-A0201-restringierte Nonamere (mit Ausnahme des aus dem *N*-Acetylglucosaminyltransferase V Gen isolierten Dekamers VLPDVFIRCV) aus melanomassoziierten Antigenen. Sie wurden in lyophilisierter Form als freie Säuren geliefert (Perkin Elmer, PE Applied Biosystems, PE Deutschland GmbH, Langen), in PBS mit anteilmäßig < 10 % DMSO auf eine Konzentration von 1 M/l eingestellt und in 500 µl Aliquots bei –80 °C eingefroren.

**Tabelle 3** : HLA-A0201-restringierte Peptide aus verschiedenen melanom-assoziierten Antigenen<sup>2</sup>

	<i>Antigen</i>	<i>Lokalisation des Peptidepitopes</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Konzentration</i>
1	Melan-A/MART-1	MT <sub>27-35</sub>	AAGIGILTV	1 mg/ml
2	gp 100	G <sub>209-2M</sub>	IMDQVPFSV	1 mg/ml
4	gp 100	G <sub>209-217</sub>	ITDQVPFSV	1 mg/ml
5	MAGE-3	MAGE-3 <sub>271-279</sub>	FLWGPRALV	1 mg/ml
6	Tyrosinase	T <sub>1-9</sub>	MLLAVLYCL	2 mg/ml
7	gp 100	G <sub>9154</sub>	KTWGQYWQV	5 mg/ml
8	Tyrosinase	T <sub>368-376</sub>	YMDGTMSQV	1 mg/ml
9	GnT-V	GnT-V <sub>38-67</sub> <sup>3</sup>	VLPDVFIRCV	1 mg/ml

<sup>2</sup> Bei dem in dieser Tabelle nicht aufgeführten Peptid 3 handelte es sich um ein für die Austestung der CTL-Induktion verwendetes hochaffines Nonamer aus Influenza-Matrix.

Eine Ausnahme machten dabei Peptid 6 und 7, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. S. Grabbe, Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Uniklinik Münster, zur Verfügung gestellt wurden und in 50% Ethanol und 50% 0,05M HCl gelöst waren.

### 2.6.2 Vorbereitung der Stimulatorzellen

Die jeweils als Stimulatorzellen vorgesehenen DC bzw. PMNC wurden direkt nach dem Auftauen bzw. Abernten in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$ /ml in SF-Hepes resuspendiert und auf einer hydrophoben 24-well-Platte für 3-4 h mit 40  $\mu$ g/ml Peptid und 3  $\mu$ g/ml  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abernten wurden die Peptid-gepulsten Zellen abzentrifugiert, in CTL-Medium aufgenommen und mit 30 Gray bestrahlt.

### 2.6.3 Kultivierung cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)

Die Kultivierung der CTL erfolgte auf hydrophil beschichteten 24-well-Platten in einem Endvolumen von 1,5 ml pro well. Die äußeren 16 wells dieser Platten sind zur CTL-Kultivierung wenig geeignet, da die sehr empfindlichen T-Lymphozyten in diesem Bereich einer durch hohe Verdunstungsraten bedingt schwankenden Salzkonzentration ausgesetzt wären. Daher wurden diese wells mit je 1 ml sterilem PBS befüllt, was zusätzlich dem Schutz vor Kontaminationen dienen sollte.

Als Ausgangspopulation für CTL-Kulturen diente die Negativfraktion der CD 14-Separation. Diese Zellen wurden nach dem Auftauen zweimal mit SF-RPMI gewaschen und in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /well in 0,5 ml AIMV-Medium ausgesät. Dem Kulturmedium wurde rh IL-7 hinzugefügt, welches die Entstehung einer TC1-Antwort unterstützt [1, 14, 44]. Das zuzugebende Volumen an IL-7 (TEBU, Frankfurt am Main) wurde immer so berechnet, daß im Endvolumen von 1,5 ml eine Konzentration von 15 ng/ml vorlag.

---

<sup>3</sup> Da dieses antigene Peptid aus einem Intron des N-Acetylglucosaminyltransferase V Gens stammt, ist hier nicht die Lokalisation des Peptidepitopes, sondern der Nukleotidsequenz angegeben.

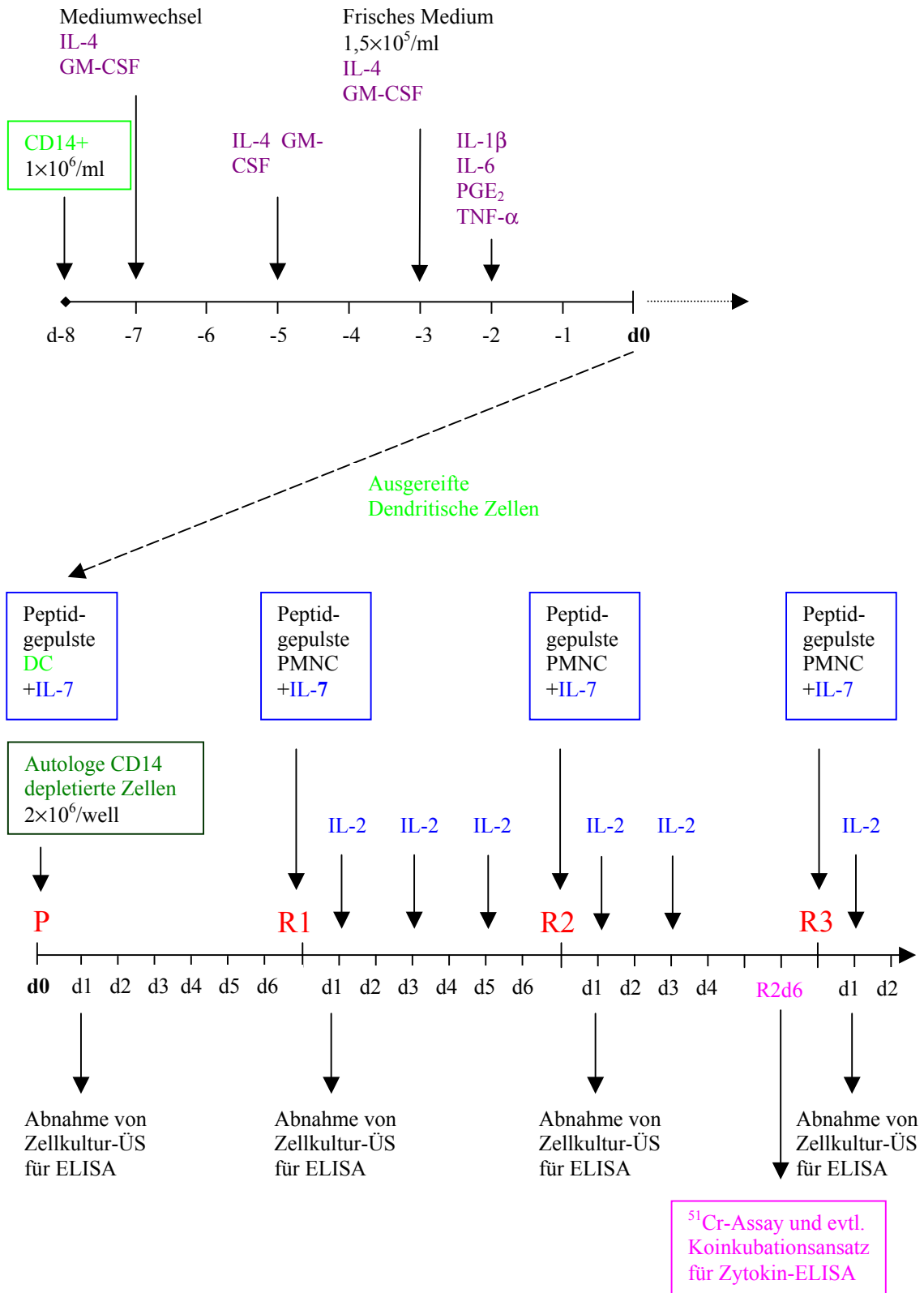
Zur primären Stimulation (P) der nativen Zellen wurden pro well  $1 \times 10^5$  der bestrahlten autologen DC in 1 ml AIMV-Medium zugegeben, woraus ein CTL:DC-Verhältnis von 20:1 resultierte.

Die Restimulationen (R1,R2,...) erfolgten jeweils in wöchentlichen Abständen und wurden entweder mit autologen DC im oben genannten Verhältnis von 20:1 oder mit PMNC im Verhältnis 5:1 (CTL:PMNC) durchgeführt. Am Tag der Restimulation wurden die CTL-Ansätze geerntet, ausgezählt und sofern die Zellzahlen ausreichend waren wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen für eine durchflußzytometrische Analyse abgenommen. Die restlichen Zellen wurden für die erste Restimulation à  $1 \times 10^6$  sowie für alle folgenden Restimulationen à  $2 \times 10^6$  Zellen pro well in 0,5 ml frischem Medium auf neue Platten verteilt und wie oben erwähnt mit IL-7 versorgt. Die jeweiligen Stimulatorzellen wurden auf die bereits beschriebene Art und Weise mit den Peptiden beladen, bestrahlt und in 0,5 ml Medium zugegeben. Nach 24 h erfolgte dann die Zugabe von 75 U Proleukin<sup>®</sup> (50 U/ml effektive Konzentration auf 1,5 ml Endvolumen) (Chiron GmbH, Ratingen) in 0,5 ml Medium. Die Kulturen wurden mindestens jeden zweiten Tag, wenn möglich jeden Tag, mikroskopisch begutachtet und alle 2-3 Tage mit Proleukin<sup>®</sup> in der oben angegebenen Endkonzentration versorgt. An den letzten beiden Tagen vor einem <sup>51</sup>Cr-Assay oder einem Koinkubationsansatz erhielten die CTL idealerweise kein Proleukin<sup>®</sup> mehr.

Zur Austestung des T-Zell-konditionierten Wachstumsmediums Lymphocult-T<sup>®</sup> (Biotest, Dreieich) wurde dieses zusätzlich zu Proleukin<sup>®</sup> in einer effektiven Konzentration von 20 vol%, entsprechend 20 U/ml, eingesetzt. Bei Zugabe von Proleukin<sup>®</sup> zwischen den Restimulationen, wurde in diesem Fall gleichzeitig anteilmäßig Medium abgenommen und durch Lymphocult-T<sup>®</sup> ersetzt, um im Endvolumen von 1,5 ml die effektive Konzentration wiederherzustellen.

Bei starker Expansion wurde jeweils die Hälfte der Zellsuspension in neue wells überführt, sobald der Boden der wells vollständig mit einem Zellrasen bedeckt war. Beide wells wurden dann mit 750 µl CTL-Medium inklusive 50 U/ml Proleukin<sup>®</sup> (und gegebenenfalls 20 vol% Lymphocult T<sup>®</sup>) wieder auf 1,5 ml aufgefüllt.

Standardmäßig wurden die CTL am sechsten Tag nach der zweiten Restimulation (R2d6 bzw. Tag 21 der CTL-Kultur) in einem  $^{51}\text{Chrom}$  Assay auf ihre cytolytische Aktivität überprüft.



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

Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Generierung spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). P: Primärstimulation; R1, 2, 3: Restimulationen 1, 2, 3; d: Tag nach der jeweils letzten Stimulation, ÜS: Überstand

## 2.7 Durchflußzytometrische Analysen

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

Alle unter diesem Abschnitt aufgeführten Waschschrte wurden mit 4 ml FACS-Puffer 4 Minuten bei  $660\times g$  und Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten lichtgeschützt bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank.

Für Färbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (AK) wurden die zu untersuchenden Zellen zuerst 10 Minuten mit  $2,5\ \mu\text{l}$  monoklonalem Maus-IgG<sub>1</sub> (Jackson Dianova, Hamburg) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen und so mögliche Kreuzreaktionen zu unterdrücken. Direkt im Anschluß erfolgte die eigentliche Färbung mit je  $2,5\ \mu\text{l}$  der Maus-anti-Human AK der Klasse IgG<sub>1</sub>. Auf die 20minütige Inkubation folgte ein Waschschrte, bevor die Zellen in  $300\ \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und durchflußzytometrisch analysiert wurden. Konnte die FACS-Analyse nicht direkt im Anschluß an die Färbung erfolgen, so wurden die Zellen in  $300\ \mu\text{l}$  0,1%igem Paraformaldehyd fixiert und konnten auf diese Weise bis zu 2 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Für Färbungen mit ungekoppelten Antikörpern wurde keine Absättigung mit Maus-IgG<sub>1</sub> vorgenommen, da der Sekundärantikörper eine anti-Maus Spezifität besaß. Nach der Färbung mit dem direkten Antikörper<sup>4</sup> und einem Waschschrte erfolgte in diesem Fall eine weitere 20minütige Inkubation mit je  $5\ \mu\text{l}$  des FITC-konjugierten F(ab')<sub>2</sub> Ziege-anti-Maus IgG<sub>1</sub>. Die Proben konnten ebenfalls entweder sofort gemessen oder mit PFA fixiert werden.

Die Messung und Auswertung erfolgte an einem FACS-Calibur, welcher an einen MacIntosh-Computer mit der entsprechenden Software angeschlossen war.

---

<sup>4</sup> Die im Einzelfall verwendeten Volumina waren vom eingesetzten Antikörper abhängig und werden bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche erwähnt.

### 2.7.1 Messung der Peptid-Affinität an MHC-I (T2-Assay)

T2-Zellen sind Hybridomzellen aus T- und B-Lymphoblasten mit dem HLA-Haplotyp A2, die keine MHC-II-Antigene exprimieren. Aufgrund einer Defizienz des Transportmoleküls TAP (transporter associated with antigen processing) sind diese Zellen nicht in der Lage, zelleigene Antigene zu prozessieren und in Verbindung mit MHC-I-Molekülen als stabile Komplexe auf ihrer Oberfläche zu präsentieren [12]. Diese Tatsache kann ausgenutzt werden, um die Bindungsfähigkeit exogen zugeführter synthetischer Peptide zu überprüfen. Werden exogene Peptide an das Antigen-präsentierende Molekül gebunden, resultieren stabile MHC-I-Peptid-Komplexe, deren Quantität mittels durchflußzytometrischer Analyse bestimmt werden kann. Je höher dabei die Expressionsrate von MHC-I-Molekülen ist, desto höher ist die Affinität des getesteten Peptids zu HLA-A2.

Für den T2-Stabilisierungsassay wurden pro Ansatz  $5 \times 10^5$  T2 Zellen in einem Volumen von 1 ml SF-Hepes auf 24-well-Suspensionskulturplatten ausgesät. Pro well wurden 50 µg Peptid und 5 µg  $\beta_2$ -Mikroglobulin zugegeben, wobei ein Kontrollansatz ohne Peptidzugabe mitgeführt wurde, um die MHC-I-Grundexpression von T2-Zellen ermitteln zu können. Die Zellen wurden im Brutschrank für circa 16 Stunden mit den Peptiden inkubiert, danach abgeerntet und einmal in FACS-Puffer gewaschen. Mit Hilfe eines gegen HLA-Moleküle vom Subtyp A2 gerichteten Maus-Antikörpers (BB7.2) wurden die stabilen HLA-A2-Peptid-Komplexe markiert und dann mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper der Spezifität Ziege-anti-Maus gefärbt.

Durchflußzytometrisch wurde die Expression als Einzelfluoreszenz gemessen und konnte in Form eines Histogramms dargestellt werden. Als Vergleichsgröße wurde die mFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von T2-Zellen nach Peptid-Inkubation als Vielfaches der mFI von nativen T2-Zellen, welche der basalen MHC-I-Expression entsprach, berechnet. Von diesem relativen Wert konnte angenommen werden, daß er sich zur Affinität des jeweiligen Peptids zu MHC-I proportional verhält.



### 2.7.2 Messung der Antigen-Expression auf Melanomzellen

Alle in Assays verwendeten Melanomzelllinien wurden mittels intrazellulärer durchflußzytometrischer Analyse auf die Expression von Tumorantigenen und melanozytären Differenzierungsantigenen untersucht. Fixation und Permeabilisation der Zellen wurden laut Herstellerprotokoll mit dem Intra Prep™-Kit (#2389) (Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich) durchgeführt. Nach diesen Schritten wurden die Zellen 20 Minuten mit den Primärantikörpern gegen MelanA/MART-1, gp 100, (je 10 µl pro Ansatz) MAGE-1 und die MAGE-3,4,6,12-Subfamilie (je 300 µl pro Ansatz) inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Sekundärfärbung mit FITC-gekoppeltem Ziege-anti-Maus-AK.

### 2.7.3 Messung der MHC-I Expression auf Melanomzellen in Abhängigkeit von vorangegangener Inkubation mit IFN- $\gamma$

Durch Zugabe von IFN- $\gamma$  zum Kulturmedium kann die Expression von MHC-Molekülen bei vielen Zelllinien gesteigert werden [43] eine optimale Antigenpräsentation in  $^{51}\text{Cr}$ -release-Assays und Koinkubationsansätzen sicherzustellen wurde überprüft, ob die MHC-I-Expression der in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien durch Präinkubation mit IFN- $\gamma$  gesteigert werden konnte.

Zu diesem Zweck wurden die Melanomzellen in 7 ml Medium auf 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten, nämlich 72 h, 48 h, 24 h und 12 h vor der Untersuchung wurden dem Kulturmedium 100 U/ml rh-IFN- $\gamma$  (Endogen, Woburn, USA) zugegeben. Als Kontrolle wurde eine Gewebekulturflasche ohne IFN- $\gamma$  Zugabe belassen, um die basale Expression an MHC-I zu bestimmen.

Für die FACS-Analyse wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, mit anti-HLA-ABC-FITC markiert und durchflußzytometrisch auf die Stärke der Expression untersucht.

## **2.8 Messung der cytolytische Aktivität**

Für  $^{51}\text{Cr}$ -Assays wurden die CTL an R2d6 (entspricht Tag 27 der CTL-Kultur) in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1,67 \times 10^4$ /well in je 100µl Assay-Medium

auf einer 96-multiwell-Spitzbodenplatte ausgesät. Dafür wurden die auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellten Effektorzellen in die erste Reihe pipettiert und zweimal in log-3-Verdünnung in die jeweils folgende Reihe überführt. Daraus ergaben sich nach Zugabe von 5000 Zielzellen pro well Effektor:Target-Verhältnisse von 30:1, 10:1 und 3,3:1. Alle Versuche wurden in Dreifachwerten durchgeführt.

Als Zielzellen wurden Peptid-beladene T2-Zellen und HLA-A0201-positive / Antigen-positive Melanomzellen (D 10, HBL, K 029) verwendet. Native T2-Zellen und HLA-A0201-positive / Ag-negative (Na8-MEL, 2A14<sup>5</sup>, 93.04) oder HLA-A0201-negative / Ag-positive Melanomzellen (SK-Mel-28) dienten als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde überprüft, ob die stimulierten T-Lymphozyten unspezifisch T2-Zellen lysierten, die mit einem ihnen vorher noch nicht präsentierten Peptid beladen waren. Um den Anteil an NK-Zellen zu bestimmen wurden auch K562 als Zielzellen eingesetzt.

Die Peptidinkubation der T2-Zellen erfolgte dabei anfangs als separater Schritt vor der <sup>51</sup>Cr-Inkubation. Dazu wurden pro Ansatz je  $2 \times 10^6$  T2 auf hydrophoben 24-well-Platten in 1 ml SF-Hepes ausplattiert und unter Zugabe von 40 µg Peptid und 30 µg β<sub>2</sub>-Mikroglobulin im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden die Ansätze in 14 ml Rundboden-Röhrchen geerntet und mit 520×g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets der T2 zusammen mit denen aller anderen vorbereiteten Zelllinien, die ebenfalls à  $2 \times 10^6$  abzentrifugiert worden waren, aufgeratscht und mit je 100 µl <sup>51</sup>Chrom (3,7 MBq/ml) (NEN Life Science Products, Zaventem, Belgien) pro Ansatz für weitere 90 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Versuchsergebnisse durch eine Zusammenfassung dieser beiden Inkubationsschritte nicht signifikant beeinflusst wurden (s. Ergebnisteil), konnte der Versuch wie folgt abgekürzt werden: In einem ersten Schritt wurden  $2 \times 10^6$  Zellen jeder Zelllinie in 14 ml Rundboden-Röhrchen überführt, darin abzentrifugiert und die Zellpellets aufgeratscht. Den T2-Zellen wurde dann gleichzeitig mit der <sup>51</sup>Cr-Zugabe auch das jeweilige

---

<sup>5</sup> Auf die phänotypische Charakterisierung dieser und aller anderen Melanomzelllinien wird im Ergebnisteil 3.3 näher eingegangen.

Peptid und  $\beta_2$ -Mikroglobulin in unveränderten Konzentrationen zugegeben. Die Inkubationszeit verlängerte sich dadurch für alle Zelllinien auf 2 h.

Nach der  $^{51}\text{Chrom}$ - und Peptidinkubation wurden die Ansätze in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt, dreimal in einem Volumen von 1,8 ml gewaschen (300×g, 4 Minuten, RT), erneut ausgezählt und in Assay-Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingestellt. Die Suspensionen der radioaktiv markierten Zellen wurden à 50  $\mu\text{l}$  (=5000 Zellen) pro well zu den CTL gegeben und mit diesen 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung der Spontan- und Maximallyse wurden 100  $\mu\text{l}$  Medium beziehungsweise Triton X 100 (5%) als Detergens zupipettiert.

Auf die Inkubation folgte eine 5minütige Zentrifugation der Platten mit 200×g. Je 25  $\mu\text{l}$  der Überstände wurden in flexible 96-well-Mikrotiterplatten überführt, die nach Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  des Flüssigszintillators Optiphase Supermix (Wallac, Turku, Finnland) mit Klebefolie versiegelt und für 15 Minuten auf einem Schüttler vermischt wurden. Die Messung der Aktivität in „counts per minute“ (cpm) erfolgte in dem Betacounter Mikrobeta 1450.

Aus den Dreifachwerten wurde der rechnerische Mittelwert gebildet und der Prozentsatz der spezifischen Lyse dann wie folgt berechnet:

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

## **2.9 Messung der Zytokinsekretion**

### **2.9.1 Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand**

Zur Bestimmung der Zytokinsekretion der CTL in der Zellkultur wurden vor der Zugabe des Proleukin<sup>®</sup> jeweils einen Tag nach der Primär- beziehungsweise Restimulation geringe Volumina der Überstände abgenommen und zur späteren Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Die so gewonnenen Werte konnten allerdings nur einen Anhalt über die Zytokinantwort der CTL auf die Stimulation durch das jeweils in der Kultur verwendete Peptid geben.

### 2.9.2 Koinkubationsansätze

Um eine differenziertere Aussage über die Zytokinantwort treffen zu können wurden die CTL mit verschiedenen Zielzellen koinkubiert, Überstände abgenommen und in ELISA-Assays auf Zytokinspektrum und -konzentration überprüft.

Für den Kokulturanatz wurden die CTL in einer Dichte von  $1 \times 10^5$ /well in 100  $\mu$ l Assay-Medium auf hydrophilen 96-well-Kulturplatten ausgesät. Als Zielzellen dienten Melanomzellen, die mit einer Dosis von 90 Gy bestrahlt wurden, sowie T2 und K562, die eine Strahlendosis von 30 Gy erhalten hatten. Für die Peptid-gepulsten T2-Zellen erfolgte die erforderliche Inkubation vor der Bestrahlung wie unter Punkt 2.7 für die separate Peptidinkubation beschrieben. Alle Zielzellen wurden auf  $1 \times 10^5$ /ml eingestellt und in Dreifachwerten à 100  $\mu$ l also  $1 \times 10^4$  Zellen pro well zu den CTL gegeben. Kontrollwells, die nur CTL oder Zielzellen enthielten und zur Messung der basalen Zytokinsekretion dienten, wurden mit Medium auf ein Volumen von 200  $\mu$ l aufgefüllt.

Die Kulturen wurden 16 Stunden im Brutschrank koinkubiert, die Überstände der Dreifachansätze jeweils gepoolt und bis zur Messung im ELISA bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 2.9.3 ELISA

- *Assay-Puffer*: PBS mit 4% BSA (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% Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), mit Aqua bidestillata auf 1000 ml aufgefüllt

Bei den beschriebenen Versuchen handelt es sich um Sandwich-ELISA. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen aller verwendeten Reagenzien sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

---

96-well-Immunomodulplatten wurden über Nacht mit 100 µl mAK pro well inkubiert. Die Platten wurden entleert und mit 200 µl/well des Assay-Puffers eine Stunde blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit jeweils 200 µl Waschpuffer pro well wurden diese auf Papiertüchern ausgeklopft.

Die Beschickung der Platten mit den Proben erfolgte in Zweifachwerten à 50 µl pro well in einer 1:1-Vorverdünnung mit Assay-Puffer. Zur Erstellung der Standardkurve wurden 100 µl des humanen rekombinanten Zytokins in zwei wells gegeben und in log-2-Schritten verdünnt. Sowohl zu den Proben als auch zu den Standardwerten wurden 50 µl des entsprechenden Biotin-gekoppelten mAK zugegeben, woraus eine weitere 1:1-Verdünnung in einem Endvolumen von 100 µl/well resultierte. Die Inkubation dieses Ansatzes erfolgte über 2 Stunden in verschlossenen Platten.

Die Platten wurden wiederum 3mal gewaschen und ausgeklopft, bevor pro well 100 µl einer Streptavidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase zugegeben wurden. Nach 30minütiger Inkubation dieses Enzymkomplexes folgten weitere 3 Waschschrte und die Zugabe von 100 µl TMB One-Step Substrate System (Dako, Glostrup, Denmark) als Substrat für die Peroxidase-Reaktion. Die Inkubation der Platten erfolgte für diesen Schritt lichtgeschützt. Die Reaktion wurde nach 15 bis 60 Minuten mit 100 µl/well einer 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt.

Die Messung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte bei 450 nm Meßwellenlänge und 570 nm Referenzwellenlänge an einem Benchmark Microplate-Reader mit Hilfe des Programms Microplate-Manager Version 5.0.

**Tabelle 4** : Verwendete Substanzen und ihre Konzentrationen im IFN- $\gamma$  ELISA

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration bzw. Verdünnung</i>	<i>Verdünnungs- medium</i>	<i>Volumen (<math>\mu</math>l pro well)</i>	<i>Hersteller</i>
Primärer AK	1,5 $\mu$ g/ml	PBS	100	Endogen, Woburn, USA
rh IFN- $\gamma$	4 ng/ml	Assay-Puffer	50	Endogen
Biotin- gekoppelter mAK	800 ng/ml	Assay-Puffer	50	Endogen
Enzym- Komplex	1:15000	Assay-Puffer	100	Zymed Corp., San Francisco, USA

**Tabelle 5** : Verwendete Substanzen und ihre Konzentrationen im IL-4 ELISA

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration bzw. Verdünnung</i>	<i>Verdünnungs- medium</i>	<i>Volumen (<math>\mu</math>l pro well)</i>	<i>Hersteller</i>
Primärer AK	2,5 $\mu$ g/ml	PBS	100 $\mu$ l	Endogen, Woburn, USA
rh IL-4	4 ng/ml	Assay-Puffer	50 $\mu$ l	R&D Systems, Minnneapolis, USA
Biotin- gekoppelter mAK	500 ng/ml	Assay-Puffer	50 $\mu$ l	Endogen
Enzym- Komplex	1:4000	Assay-Puffer	100 $\mu$ l	Zymed Corp., San Francisco, USA

### **2.10 Präsentation der Ergebnisse und Statistische Auswertung**

Die gezeigten  $^{51}\text{Cr}$ -Assays stellen eine möglichst repräsentative Auswahl der mehrfach durchgeführten Versuche dar, zusätzlich zeigen die zugehörigen Tabellen die Daten aller gewerteten Einzelversuche. Peptid-Bindungsassays, IFN- $\gamma$  ELISA mit MT<sub>27-35</sub>, IFN- $\gamma$  Bestimmung in Kulturüberständen und Wachstumsversuche sind als Mediane sowie 1. und 3. Quartil der mehrfach durchgeführten Versuche dargestellt. Die Werte der Bindungsassays, IFN- $\gamma$  ELISA und Wachstumsversuche wurden dafür anhand der Leerwerte beziehungsweise auf eine identische Ausgangszellzahl korrigiert. Alle anderen dargestellten IFN- $\gamma$  ELISA sind aus den mehrfach durchgeführten Versuchen als repräsentativ ausgewählt.

Die dargestellten Ergebnisse der DC-Austestung entsprechen den Mittelwerten zweier unabhängiger Versuche. Die Zusammensetzungen der PMNC bzw. der CD14- Fraktion sind als Mittelwerte von 20 bzw. 19 Versuchen angegeben.

Für die semi-quantitative Darstellung der Antigenpräsentation auf Melanomzellen wurden die Meßwerte anhand der Isotypenkontrollen korrigiert, der Mittelwert gebildet und dem abgebildeten Schema zugeordnet.

Die Vorversuche zur Methodik der  $^{51}\text{Cr}$ -Assays sowie die Versuche zur IFN- $\gamma$  Präinkubation wurden nur jeweils einmal durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte für die Peptid-Bindungsassays und die IFN- $\gamma$  ELISA mit MT<sub>27-35</sub> mittels Kruskal-Wallis-Test und Multi-Paarvergleich. Eine Signifikanz wurde dabei ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen. Die im einzelnen festgestellten Signifikanzen sind jeweils im Text angegeben.

## 3. Ergebnisse

### 3.0 Vorversuche

Als Vorversuche werden hier Versuche bezeichnet, die Grundlagen für spätere Standards in der Versuchsdurchführung schafften, aber nicht zwangsläufig ganz zu Beginn der experimentellen Arbeit durchgeführt wurden.

#### 3.0.1 Gewinnung T-Zell konditionierten Mediums

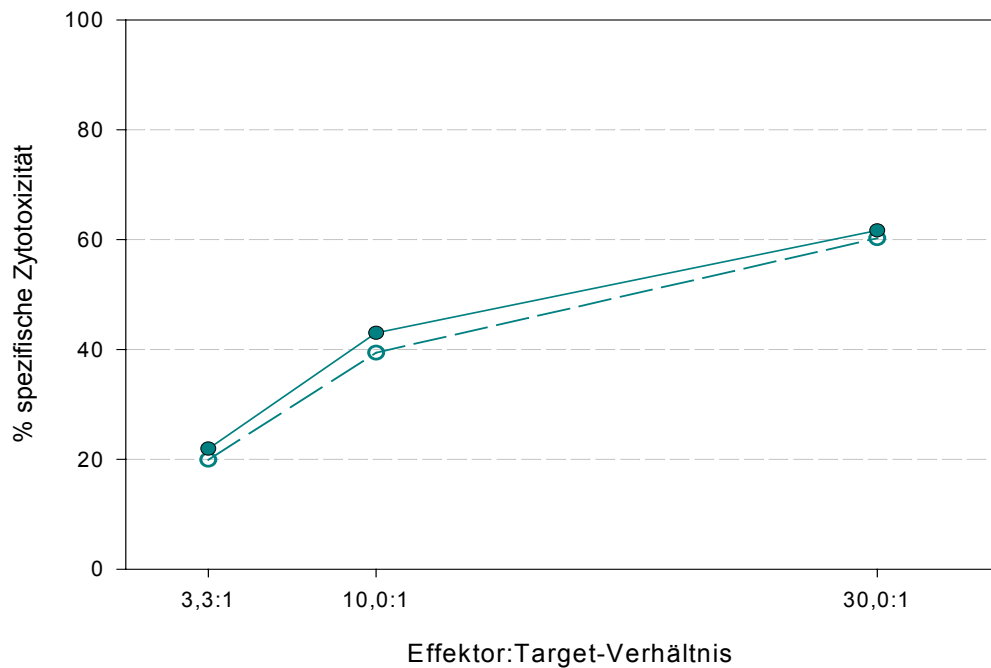
Mit der beschriebenen Methode war es möglich, unter GMP-konformen Bedingungen ein T-Zell konditioniertes Wachstumsmedium herzustellen, welches in Proliferationsassays einen vergleichbaren mitogenen Effekt wie Lymphocult-T<sup>®</sup> hatte (Daten nicht gezeigt).

#### 3.0.2 Simultane Peptid- und <sup>51</sup>Cr-Inkubation in Zytotoxizitäts-Assays

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden zur Vorbereitung der T2-Zellen für <sup>51</sup>Cr-Assays jeweils zwei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte durchgeführt. Die erste Inkubation dient der Beladung der Trägerzellen mit Peptiden, während bei der zweiten radioaktives <sup>51</sup>Cr in die Zelle diffundieren und an intrazytoplasmatische Proteine binden kann. Zusammengenommen führen diese Schritte zu einer fast vierstündigen Inkubation der sehr empfindlichen T2-Zellen unter serumfreien Bedingungen. Neben der starken Beanspruchung der Zellen stellt dieser Vorgang auch einen erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand dar. Deshalb wurde untersucht, ob die gleichzeitige, zweistündige Inkubation mit beiden Reagenzien möglich ist, ohne die Ergebnisse des <sup>51</sup>Cr-Assays signifikant zu verändern.

Abbildung 3 macht deutlich, daß die simultane Markierung nur minimale Veränderungen in der Lyse peptidbeladener T2-Zellen bewirkte. Die Abschwächung der Erkennung nach gleichzeitiger Inkubation lag in einem Bereich zwischen 1,02 und 3,63 Prozentpunkten.





**Abbildung 3:** Einfluß der Markierung von T2-Zellen auf die Erkennung im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay

Nach Stimulation mit  $\text{M3}_{271-279}$  wurde an Tag 26 (R2d11) die Aktivität von CTL.Mel 5 gegenüber  $\text{T2}^+ \text{M3}_{271-279}$  gemessen. Die Markierung der T2-Zellen mit dem Peptid wurde dabei entweder nach der  $^{51}\text{Cr}$ -Inkubation vorgenommen (●), oder simultan mit dieser durchgeführt (○).

### 3.0.3 Zeitschema der $^{51}\text{Cr}$ -Assays

Zunächst wurden  $^{51}\text{Cr}$ -Assays zur Überprüfung der Spezifität einer CTL-Kultur standardmäßig an Tag 21 (R2d6) durchgeführt. Diese Festlegung begründete sich allerdings rein empirisch auf der Tatsache, daß sich zu diesem Zeitpunkt eine sicher meßbare Spezifität im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay zeigte.

Um zu ermitteln, ob diese eventuell schon nach einer kürzeren Kulturzeit erreicht wird oder sich sogar durch weitere Restimulationen noch steigern läßt, wurde bei einem Ansatz nach jeder Woche ein  $^{51}\text{Cr}$ -Assay durchgeführt. Diese Kultur wurde in jeder anderen Hinsicht genauso behandelt, wie alle CTL-Kulturen.

Als Stimulatorpeptid wurde  $\text{MT}_{27-35}$  ausgewählt. Für dieses Peptid konnte in vorhergehenden Versuchen bereits eine Lyse von Ag-positiven

Melanomzelllinien nachgewiesen werden, so daß auch dieser Aspekt in seiner Abhängigkeit von der Kulturzeit beurteilt werden konnte.

**Tabelle 5:** Einfluß von Stimulationshäufigkeit und Kulturzeit auf die Spezifität von CTL

Zeitpunkt des <sup>51</sup> Cr-Assays	% spezifische Zytotoxizität bei E:T = 30:1			
	T2	T2+MT <sub>27-35</sub>	HBL (HLA-A2 <sup>+</sup> /MT <sup>+</sup> )	K562
Pd7 (Tag 8)	10,79	<b>8,69</b>	<b>14,81</b>	7,07
R1d6 (Tag 14)	19,25	<b>25,52</b>	<b>25,35</b>	24,53
R2d6 (Tag 21)	7,91	<b>59,66</b>	<b>52,44</b>	14,22
R3d6 (Tag 28)	5,72	<b>54,31</b>	<b>26,09</b>	1,29
R4d6 (Tag 35)	1,48	<b>40,83</b>	<b>6,31</b>	0,61

Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, daß am siebten Tag nach der Primärstimulation eine niedrige unspezifische Lyse (in einem Bereich zwischen 7,07% und 14,81%) aller eingesetzten Zielzellen vorlag. Nach einer weiteren Restimulation war diese immer noch als unspezifisch zu bezeichnen, lag aber mit Werten zwischen 19,25% und 25,52% in einem deutlich höheren Bereich. An Tag 21 der Kultur (R2d6) hob sich die Erkennung der mit dem Stimulatorpeptid beladenen T2-Zellen und der Ag-positiven Melanomzelllinie HBL deutlich von den niedrigen Lysewerten der nativen T2-Zellen und K562 ab (59,66% und 52,44% gegenüber 7,91% und 14,22%). Eine Woche später, an Tag 28, war die lytische Aktivität der CTL bereits rückläufig, was sich zunächst in der Abnahme der Melanomzellyse zeigte (26,09%). Auch bei allen anderen Zielzellen war ein Rückgang der Lyse gegenüber der Vorwoche sichtbar (T2+MT<sub>27-35</sub>: 54,31%, native T2: 5,72% und K562: 1,29%). Dieser Trend wurde bei dem folgenden <sup>51</sup>Cr-Assay an R4d6 (Tag 35) noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt konnte immer noch eine spezifische Erkennung des Stimulatorpeptids festgestellt werden (40,83%), während die Lyse der Melanomzelllinie HBL (6,31%) sich

nicht mehr signifikant von den Lysewerten der beiden Negativkontrollen T2 und K562 abhob (1,48% respektive 0,61%).

### **3.1 PMNC-Subpopulationen**

Zur Charakterisierung aller aus Blutprodukten hergestellten und in Versuchsansätzen verwendeten Zellen wurden diese nach jeder Aufbereitung eines buffy-coats oder Leukaphereseproduktes durchflußzytometrisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten keinerlei Unterschied in der zellulären Zusammensetzung eines buffy-coats gegenüber der eines Leukaphereseproduktes, so daß diese in einer Grafik zusammengefaßt und in Versuchsansätzen als übereinstimmend angesehen wurden.

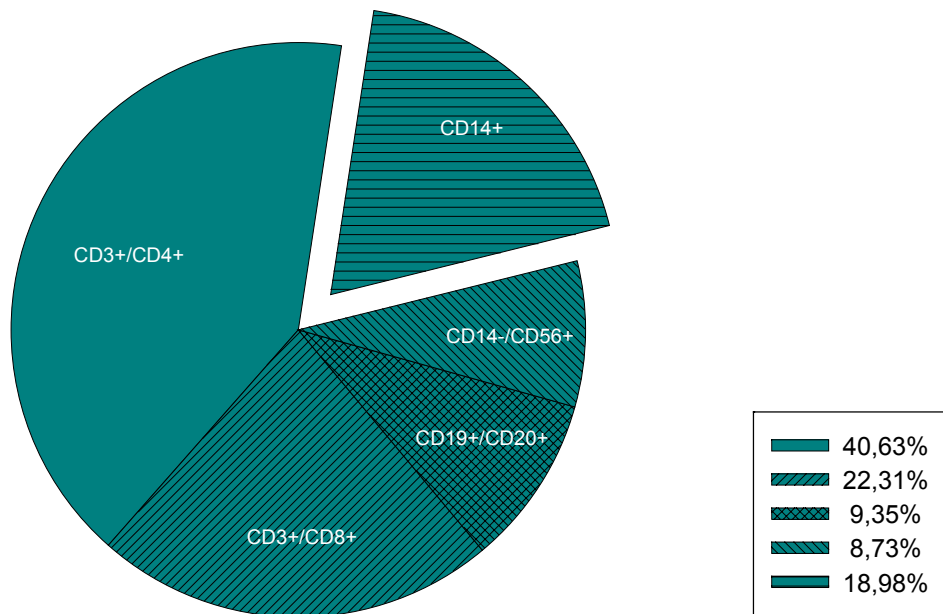
#### **3.1.1 Zusammensetzung der mononukleären Fraktion des peripheren Blutes**

Periphere mononukleäre Zellen (PMNC) stellen keine einheitliche Fraktion des Blutes dar, sondern setzen sich aus verschiedenen Subpopulationen zusammen. Ihre gemeinsamen morphologischen Eigenschaften bedingen, daß die PMNC sich während der Dichtegradientenzentrifugation in einer Phase sammeln und sich so von den anderen Blutbestandteilen trennen lassen.

Wichtige Subpopulationen dieser inhomogenen Gruppe werden gestellt von B-Zellen (CD19+/CD20+), T-Helfer-Zellen (CD3+/CD4+), cytotoxischen T-Zellen (CD3+/CD8+), NK-Zellen (CD3-/CD56+) und Monozyten (CD14+).

Für Abbildung 4 wurden die in der Ficoll-Separation isolierten PMNC von 16 buffy-coats und vier Leukaphereseprodukten mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern in Zweifachfarbansätzen gefärbt. Daraufhin wurden die prozentualen Anteile der Fraktionen durchflußzytometrisch bestimmt.

Von besonderer Bedeutung für die beschriebenen Versuchsansätze ist der Anteil der cytotoxischen T-Zellen ( $22,31 \pm 6,05\%$ ) und die CD14+ Fraktion der Monozyten ( $18,98 \pm 5,09\%$ ).



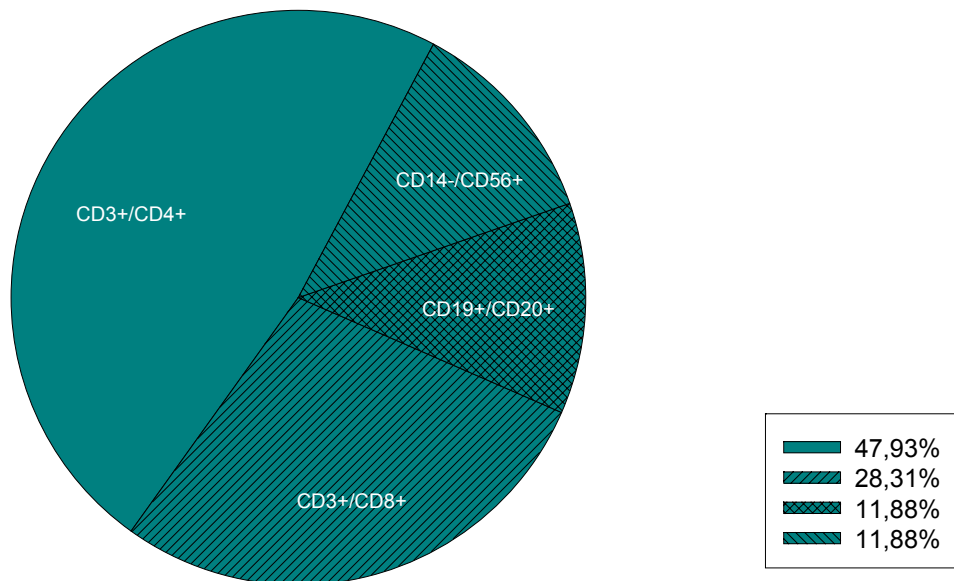
**Abbildung 4:** FACS-Analyse der peripheren mononukleären Zellen

Nach der Aufreinigung von Blutprodukte mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die gewonnenen Zellen per FACS-Analyse auf ihren Phänotyp untersucht. n = 20

### 3.1.2 Zusammensetzung bzw. Reinheit der durch CD14-MACS Separation gewonnenen Zellfraktionen

Nach der Separation wurden beide Zellfraktionen ebenfalls durchflußzytometrisch untersucht. Es wurden dabei die gleichen Färbungen verwendet wie bei der Untersuchung der PMNC. Es handelt sich bei diesen Daten um die entsprechenden Fraktionen der oben aufgeführten Ausgangszellen (bei 19 der 20 Ansätze wurde eine CD14-MACS Separation durchgeführt).

In der positiven Fraktion wurden dabei Reinheiten von durchschnittlich 89,71% CD14+ Zellen erreicht (n=19), wobei die Werte zwischen 82,39 und 95,45% schwanken. Die Zusammensetzung der CD14- Fraktion ist Abbildung 5 zu entnehmen. Da diese Fraktion als Basis für CTL-Ansätze diente, ist der Wert der CD3+/CD8+ zytotoxischen T-Zellen mit  $28,31 \pm 5,39\%$  von besonderem Interesse. Der Anteil an nach der Separation verbleibenden CD14+ Zellen war mit  $0,59 \pm 0,34\%$  minimal und wurde aus diesem Grunde nicht in Abbildung 5 aufgenommen.



**Abbildung 5:** FACS-Analyse der PMNC nach Depletion der CD14+ Monozyten

Diese Fraktion wurde nach der MACS-Separation erneut phänotypisch erfasst und stellt die Ausgangspopulation für CTL-Kulturen dar. Der Anteil an verbliebenen CD14+ Zellen beträgt  $\leq 1\%$ . n = 19

### 3.2 Generierung reifer Dendritischer Zellen (DC)

#### 3.2.1 Vergleich von drei verschiedenen DC-Generierungsmethoden anhand der Oberflächenantigene kultivierter Zellen

Zur Generierung dendritischer Zellen wurden drei verschiedene Methoden eingesetzt, die mittels durchflußzytometrischer Analysen der reifen DC miteinander verglichen wurden. Bei den untersuchten Antigenen handelte es sich hierbei um MHC-Moleküle der Klassen I und II, CD3 und CD14 als Zelllinien-Marker für T-Lymphozyten beziehungsweise Monozyten, CD80 und CD86 als kostimulatorische Moleküle antigenpräsentierender Zellen sowie CD1a und CD83 als Oberflächenmarker reifer DC.

Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Zellen für jeweils eine Adhäsionsdepletion, ein Erythrozyten-Rosetting und eine CD14 MACS-Separation stammten dabei aus demselben Ausgangsmaterial. Die reifen DC wurden an Tag 9 geerntet, ausgezählt und für die

---

durchflußzytometrische Analyse markiert. Die Mittelwerte der beiden Versuche sind in Tabelle 7 in der Übersicht dargestellt.

Es zeigte sich, daß bei der Depletionsmethode auch nach 9tägiger Kultivierung der zu Beginn adhärennten und damit vermeintlich monozytären Zellfraktion noch sehr große Anteile an T-Lymphozyten (CD3: 79,2% bzw. 79,39%) in der Kultur vorhanden waren. Die Expressionsraten DC-spezifischer Marker und kostimulatorischer Moleküle lagen bei dieser Methode bei unter 11% (0,25% - 10,03%). MHC-II-Moleküle wurden auf 19,84% (MCM) bzw. 25,35% (Zytokine) der untersuchten Zellen exprimiert.

Gegenüber der zuvor erwähnten Methode war nach Durchführung eines Erythrozyten-Rosettings der Anteil an CD3-positiven Zellen an Tag 9 der DC-Kultur sehr viel geringer (36,44% bzw. 37,02%). Der Prozentsatz CD1a und CD83 exprimierender Zellen war bei Ausreifung der T-Zell depletierten Zellen durch MCM gegenüber der vorherigen Methode kaum gesteigert (0,29% bzw. 2,41%), während nach Induktion der DC-Ausreifung durch Zytokine Werte von 2,94% und 14,26% gemessen wurden. Verglichen mit der adhärenzdepletierten Fraktion wurden außerdem von einem größeren Anteil der Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie MHC-II exprimiert. Diese Werte waren bei Induktion der DC-Ausreifung durch Zytokine noch deutlich höher als bei der Fraktion, welche MCM erhalten hatte (siehe Tabelle 6).

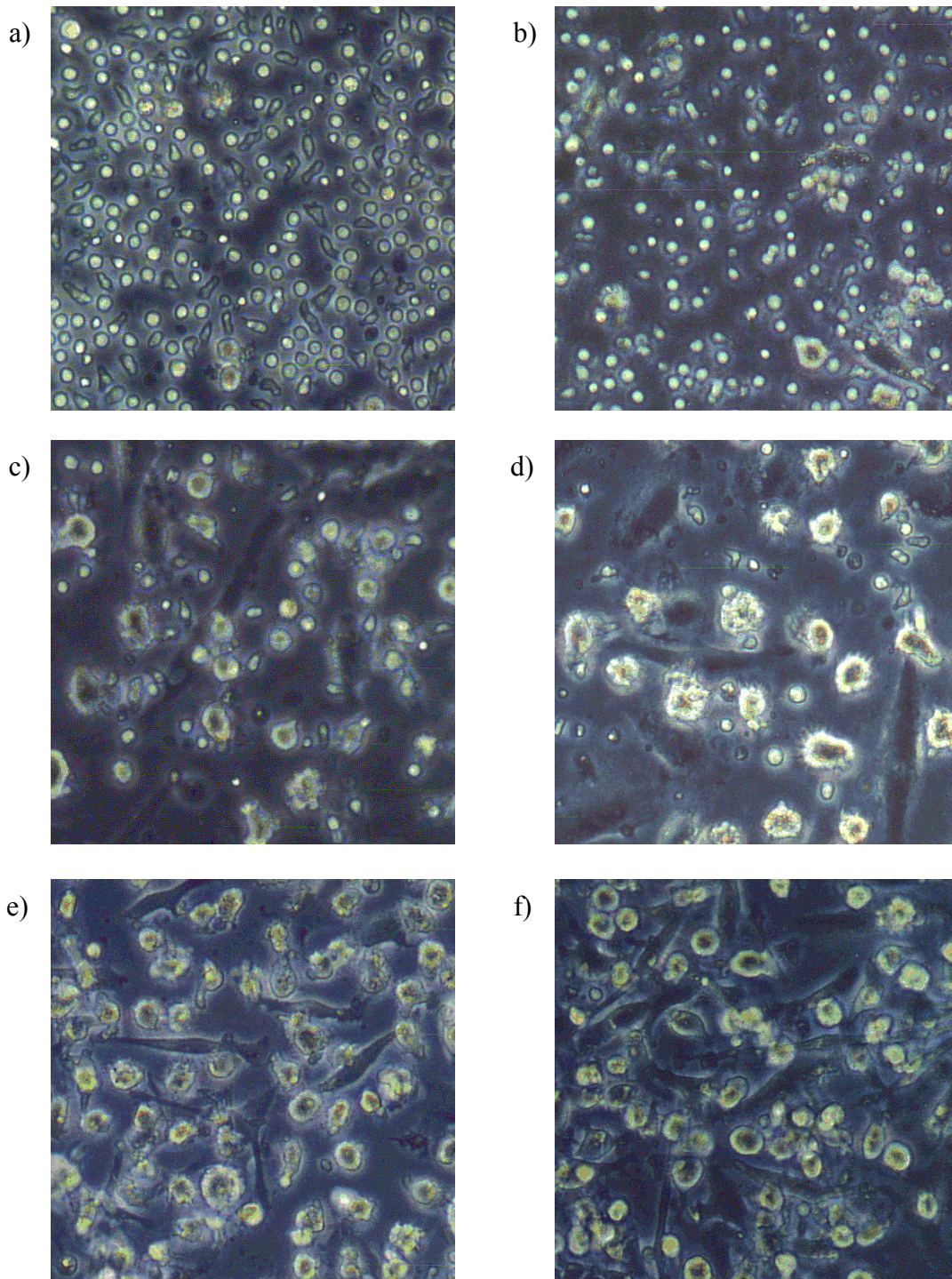
Die durch MACS-Separation CD14 angereicherten Zellen zeigten nach Induktion der DC-Ausreifung durch Zytokine insgesamt von allen Methoden den niedrigsten Anteil an Lymphozyten (22,65%) und die höchsten Prozentsätze CD1a- (9,35%), CD80- (76,19%), CD83- (35,93%), CD86- (94,26%) und MHC-II- (94,67%) positiver Zellen.

**Tabelle 6:** Vergleich von DC anhand ihrer Oberflächenantigene in % der durchflußzytometrisch ermittelten Fraktionen

		CD1a	CD3	CD14	CD80	CD83	CD86	MHC-I	MHC-II
Adhärenz- depletion	MCM	0,25	79,39	0,26	2,63	1,38	7,34	99,37	19,84
	Zytokin- mix	0,68	79,20	0,77	3,53	2,69	10,03	99,53	25,35
Erythrozyten- Rosetting	MCM	0,29	36,44	0,40	4,43	2,41	15,93	98,49	44,56
	Zytokin- mix	2,94	37,02	1,84	14,86	14,26	26,10	98,29	54,58
CD14-MACS- Separation	MCM	3,71	39,68	30,57	25,57	2,92	67,07	99,75	76,66
	Zytokin- mix	9,35	22,65	7,31	76,19	35,93	94,26	99,85	94,67



### 3.2.2 Gegenüberstellung verschiedener DC-Generierungsmethoden anhand der Zellmorphologie



**Abbildung 6:** Mikroskopische Ansicht (20 $\times$ ) ausgereifter DC

Die DC wurden an Tag 9 der Generierung nach verschiedenen Protokollen fotografiert. a) und b): Adhärenzdepletion mit MCM bzw. Zytokinen; c) und d): Erythrozyten-Rosetting mit MCM bzw. Zytokinen; e) und f): CD14-MACS Separation mit MCM bzw. Zytokinen.



Reife DC sind morphologisch als Zellen mit multiplen Ausläufern charakterisiert, die zur Migration befähigt sind. Mikroskopisch lassen sie sich auch durch ihre Größe von anderen peripheren Zellen gut abgrenzen. Die in Abbildung 6 gezeigten vergrößerten Photographien von DC-Kulturen an Tag 9 des Protokolls zeigen in Abhängigkeit von der verwandten Kulturmethode deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Populationen. Der Unterschied zwischen den mit MCM oder Zytokinen ausgereiften DC zeigte sich dagegen weniger mikroskopisch als eher in der durchflußzytometrisch gemessenen Expressionsstärke bestimmter Oberflächenmarker (s. 3.2.1).

Der nach Adhärenzdepletion auch durchflußzytometrisch gemessene hohe Anteil an Lymphozyten wird in Abbildung 6 a) und b) deutlich: Innerhalb der homogen kleinzelligen Population sind nur wenige Zellen zu sehen, welche als DC beurteilt werden können. Nach T-Zell-Depletion mittels Erythrozyten-Rosetting (Abb.6 c) und d)) überwiegen die großen, „geflügelten“ DC im mikroskopischen Bild. Die reinsten DC-Kulturen konnten nach CD14-MACS Separation generiert werden, was in Abbildung 6 e) und f) zu erkennen ist.

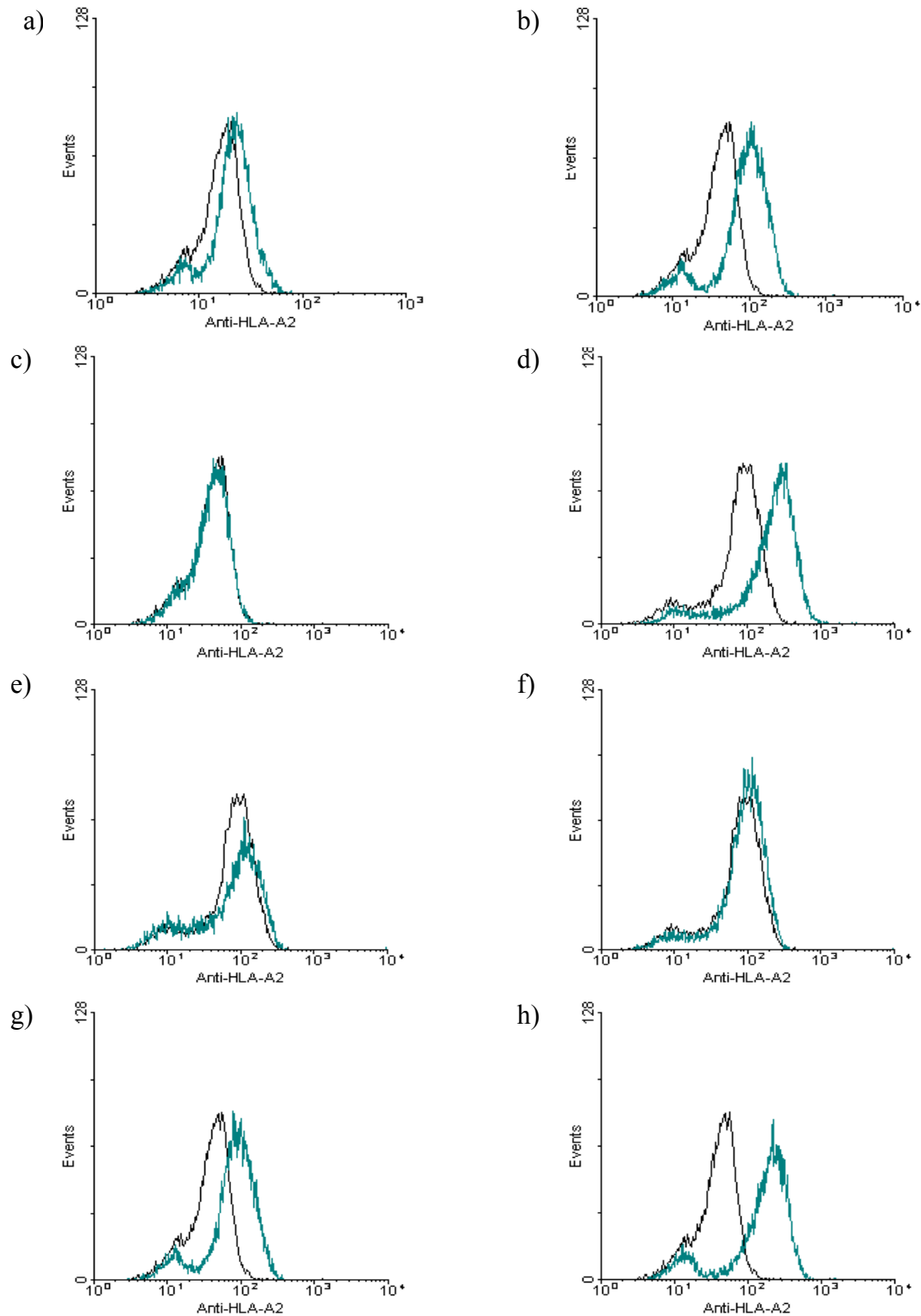
Allgemein läßt sich sagen, daß die unter dem Mikroskop beobachtete Zellmorphologie mit den Ergebnissen der FACS-Analysen gut in Übereinstimmung zu bringen war.

### **3.3 Bindungsaffinität synthetischer Peptide an HLA-A2**

Im Laufe der Versuche wurden acht verschiedene melanomassoziierte Peptide zur Induktion spezifischer CTL eingesetzt. Parallel zu den CTL-Ansätzen wurden diese in T2-Stabilisierungsassays auf ihre Affinität an MHC-II Moleküle untersucht. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Analysen dieser Assays. Die Bindungskurven der peptidbeladenen T2-Zellen sind dabei im direkten Vergleich zu denen unbeladener T2-Zellen als Overlaygraphiken dargestellt.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen als Mediane von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Eine Inkubation mit dem MART-1 Peptid MT<sub>27-35</sub> führte bei T2-Zellen im Median zu einer 1,45fachen Steigerung der HLA-A2 Expression, ebenso bei dem nativen gp100 Peptid G<sub>209-217</sub> (1,45fach). Durch eine Modifikation dieses Peptids

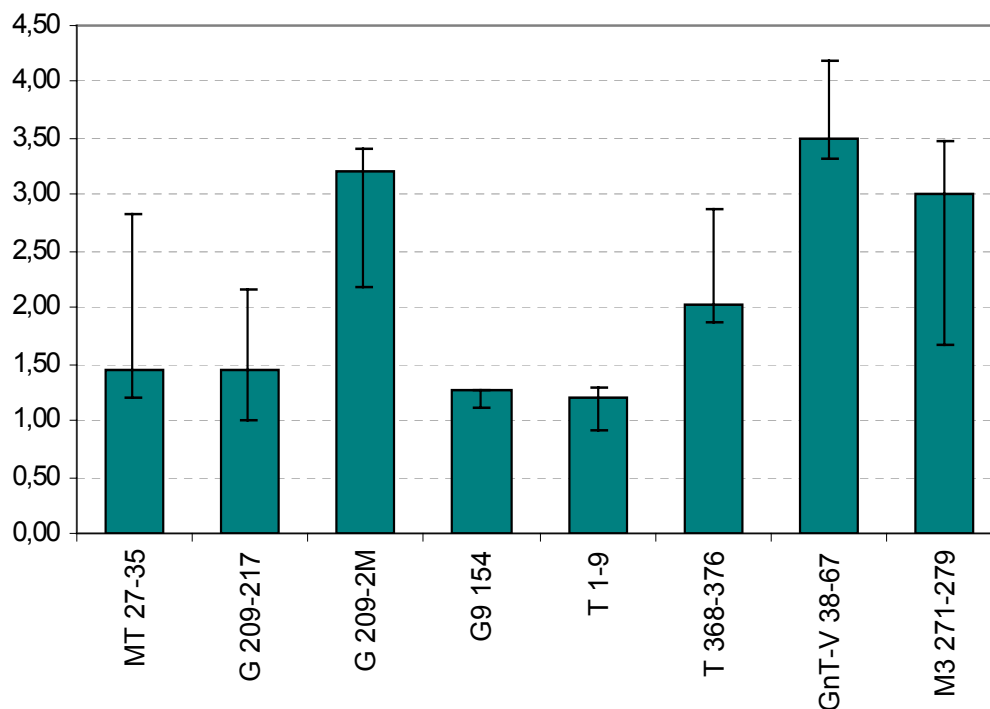


**Abbildung 7:** HLA-A2 Expression von T2-Zellen vor und nach Inkubation mit verschiedenen Peptiden.

Die oben abgebildeten durchflußzytometrischen Graphiken zeigen die HLA-A2 Grundexpression der T2-Zellen (—) sowie die gesteigerte Expression nach 16stündiger Inkubation mit den Peptiden: a) MT<sub>27-35</sub>, b) G<sub>209-2M</sub>, c) G<sub>209-217</sub>, d) M<sub>3271-279</sub>, e) T<sub>1-9</sub>, f) G<sub>9154</sub>, g) T<sub>378-376</sub> und h) GnT-V<sub>nt38-67</sub> (—)

an einer der Ankerresiduen nach PARKHURST ET AL. [54] konnte die Affinität auf das 3,22fache der Basisexpression gesteigert werden. Die Peptidnonamere T<sub>378-376</sub> aus Tyrosinase, M3<sub>271-279</sub> aus MAGE 3 und das Dekamer GnT-V<sub>nt38-67</sub> bewirkten ebenfalls eine deutliche Steigerung der HLA-A2 Expression (2,03, 3,02 beziehungsweise 3,50). Das gp100 Peptid G9<sub>154</sub> zeigte mit einem Faktor von 1,26 ebenso wie das Tyrosinase Peptid T<sub>1-9</sub> (1,20) eine sehr geringe Bindung an HLA-A2 Moleküle.

In der statistischen Auswertung aller durchgeführten Versuche stellte sich die Steigerung der HLA-A2 Expression nach Inkubation mit MT<sub>27-35</sub> und G<sub>209-217</sub> ( $p \leq 0,05$ ), mit T<sub>368-376</sub> ( $p \leq 0,005$ ) sowie mit G<sub>209-2M</sub>, GnT-V und MAGE-3<sub>271-279</sub> ( $p \leq 0,001$ ) als signifikant heraus. Für G9<sub>154</sub> und T<sub>1-9</sub> ließ sich in diesem Punkt keine Signifikanz nachweisen.



**Abbildung 8:** Mittlere Bindungsaffinität verschiedener Peptide.

Die Affinität der Peptide an HLA-A2 ist in dieser Grafik als Vielfaches der HLA-A2 Basisexpression von T2-Zellen (in mFI) dargestellt. Die Basisexpression wurde gleich 1 gesetzt. Aufgetragen ist der Median (2.Quartile) sowie das 1 und 3.Quartil.  $3 \leq n \leq 15$

### **3.4 Charakterisierung der Melanomzelllinien**

#### **3.4.1 Melanozytäre Differenzierungsantigene und kostimulatorische Moleküle**

Die untersuchten Melanomzelllinien wurden in  $^{51}\text{Cr}$ -Assays und Kostimulationsansätzen als Targetzellen eingesetzt. Um Aussagen über ihre Antigenexpression treffen zu können, wurden alle Zelllinien unabhängig von bereits bestehenden Publikationen während der Versuchsdurchführungen wiederholt durchflußzytometrisch untersucht (siehe Tabelle 7). Die Zelllinien wurden dann in den Assays entsprechend ihres antigenen Profils entweder als Positiv- (D10, HBL, K029) oder als Negativkontrollen (2A14, 93.04, Na8-MEL, SK-Mel-24, SK-Mel-28) eingesetzt.

Bei den HLA-A2-positiven Zelllinien 2A14, 93.04, Na8-MEL und SK-Mel-24 lag die Expression aller betrachteten Antigene in einem sehr niedrigen Bereich. Die Zelllinie SK-Mel-28 zeigte dagegen eine deutliche Expression von gp100, ist allerdings HLA-A2-negativ (HLA-A1+). Daher eignen sich diese Zelllinien für die durchgeführten Versuche nicht als positive Kontrollen.

Die Melanomzelllinien D10, HBL und K029 exprimierten deutlich, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, die Antigene Melan-A/MART-1 und gp100, während Antigene der MAGE-Subfamilie (MAGE-3,4,6,12) nur bei der Zelllinie D10 positiv waren.

Das Antigen MAGE-1 wurde von keiner der untersuchten Zelllinien im eindeutig positiven Bereich exprimiert. Diese Beobachtung hatte jedoch für die durchgeführten Versuche keine Bedeutung, da diesem Antigen keines der eingesetzten Peptide entstammte.

Die Expression der Antigene Tyrosinase und GnT-V konnte mangels entsprechender Antikörper nicht untersucht werden.

Zusätzlich zu diesen intrazellulären Färbungen auf melanomassoziierte Antigene wurden wichtige Zelllinien auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und auf ihre HLA-Merkmale untersucht.

Keine der Zelllinien 2A14, D10, HBL und Na8-MEL zeigte eine Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 oder CD86, während eine CD40-Expression auf HBL gemessen werden konnte. Mit Ausnahme von 2A14 trugen alle

Zelllinien das interzelluläre Adhäsionsmolekül CD54 (ICAM-1). Alle Linien waren weiterhin positiv für MHC-I und MHC-II Moleküle und den CD2-Rezeptor CD58. Die Zelllinien D10 und HBL wurden außerdem auf CD95 (Fas) und CD95-L (Fas-L) untersucht und erwiesen sich beide als Fas negativ und Fas-L positiv.

**Tabelle 7:** Charakterisierung der Melanomzelllinien nach Stärke der intrazellulären Antigenexpression<sup>5</sup>

Zelllinie	<i>Melan-A/MART-1</i>	<i>HMB45 (gp100)</i>	<i>MAGE 1</i>	<i>MAGE 3,4,6,12</i>
2A14 <sup>6</sup>	-	-	-	-
93.04	-	-	-	-
D10	++	++	(+)	+
HBL	+++	+	(+)	(+)
K029	+++	+++	-	(+)
Na8-MEL	(+)	(+)	-	-
SK-Mel-24	-	-	(+)	-
SK-Mel28	(+)	+	-	(+)

<sup>5</sup>Die abgebildeten Daten wurden ermittelt, indem für jeden Versuch die gemessene mFI als Vielfache der Isotypenkontrolle berechnet, deren Werte über mehrere Versuche gemittelt und für die semi-quantitative Darstellung folgendem Schema zugeordnet wurden.  
 - : 0-5fache, (+) : 5-10fache, + : 10-30fache, ++ : 30-60fache, +++ : 60-100fache Stärke der Expressionwerte der Isotypenkontrolle

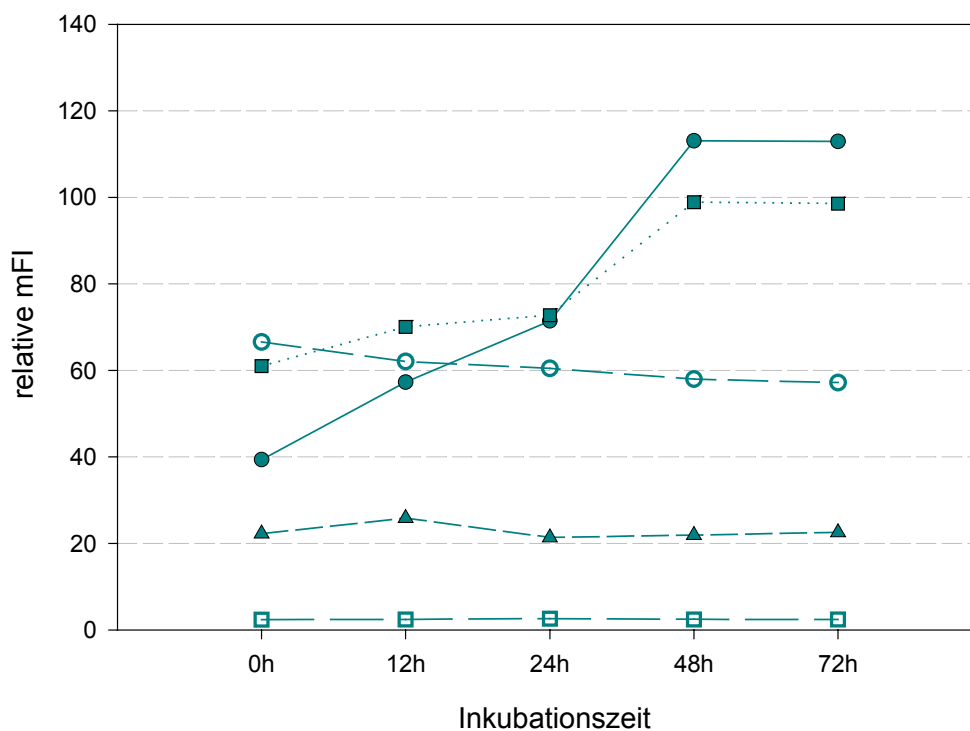
<sup>6</sup> Nach Angaben der Arbeitsgruppe, von welcher die Zelllinie 2A14 zur Verfügung gestellt wurde, sollte diese für einige der untersuchten Antigene positiv sein. Das konnte in den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Beeinflußbarkeit der MHC-I Expression durch IFN- $\gamma$ Präinkubation

Die Höhe der MHC-I Expression ist neben der Expression melanomspezifischer Antigene eine weitere wichtige Variable für die Erkennung der Melanomzellen durch spezifische CTL. Es wurde versucht, diese durch Präinkubation der Melanomzelllinien mit IFN- $\gamma$  zu steigern.

In diesen Experimenten soll zum Ersten die Grundexpression an MHC-I festgestellt werden. Zusätzlich ist von Interesse, ob diese sich durch IFN- $\gamma$  steigern läßt und welche Inkubationszeiten dabei ideale Ergebnisse erbringen.

Dabei zeigte sich, daß schon die basale MHC-I Expression auf den verschiedenen Melanomzelllinien sehr unterschiedlich ist. Diese lag bei 93.04 mit 2,39 mFI im untersten, bei D10 und 2A14 in einem mittleren Bereich (22,24 und 39,35 mFI), während bei HBL und K029 mit 66,55 respektive 60,97 mFI die höchsten Grundexpressionen gemessen wurden.



**Abbildung 9:** Kinetik der Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die MHC-I Expression

Der Einfluß von IFN- $\gamma$  auf die MHC-I Expression wurde nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit gemessen. Bei den untersuchten Melanomzelllinien handelt es sich um 2A14 (●), 93.04 (□), D10 (▲), K029 (■) und HBL (○).

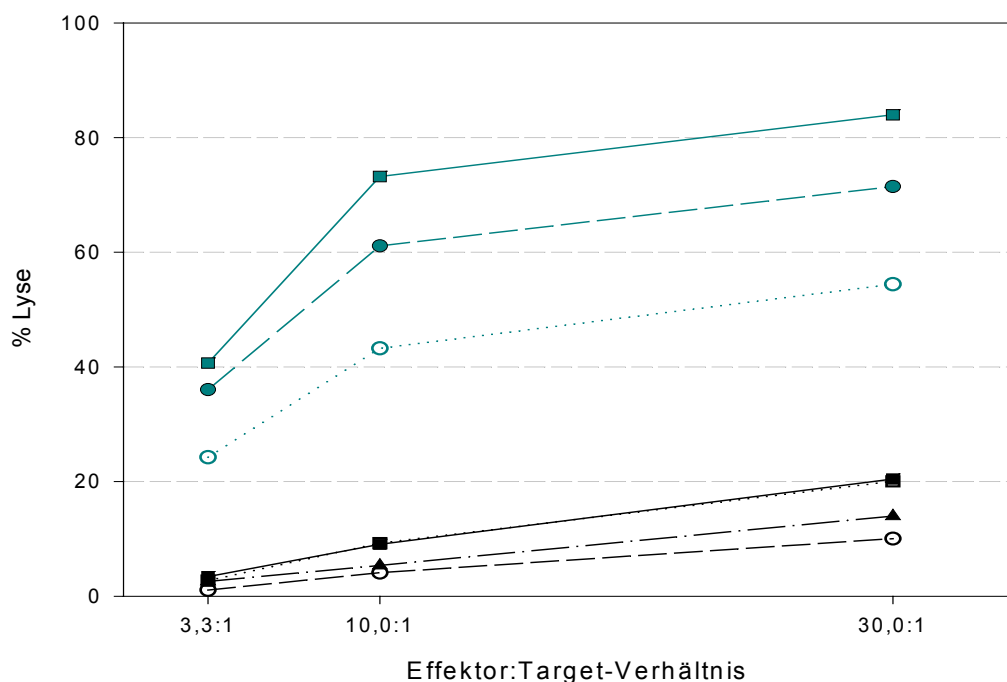
Drei der fünf untersuchten Melanomzelllinien zeigten in der FACS-Analyse nach 12-, 24-, 48- oder 72stündiger Inkubation mit IFN- $\gamma$  keine signifikanten Veränderungen in der Expression von MHC-I Molekülen.

Bei den Zelllinien K029 und 2A14 war es dagegen möglich, diese Expressionsraten durch IFN- $\gamma$  Inkubation insgesamt fast zu verdoppeln bzw. zu verdreifachen. Für beide Zelllinien zeigte sich dabei übereinstimmend, daß nach 48stündiger Inkubation ein Maximalwert der Expression erreicht wird, der durch längere Inkubationszeiten nicht mehr zu steigern war.

### 3.5 Zytotoxizität der spezifischen CTL

Alle untersuchten Peptide wurden eingesetzt, um nach der beschriebenen Methode (siehe Abschnitt 2.6) spezifische CTL zu generieren. Die Spezifität wurde einerseits anhand von Zytotoxizitätsassays mit dem radioaktivem Isotop  $^{51}\text{Cr}$  und andererseits anhand des Zytokinspektrums in ELISAs beurteilt.

#### 3.5.1 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit $\text{MT}_{27-35}$ (AAGIGILTV)



**Abbildung 10:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 10 nach Stimulation mit  $\text{MT}_{27-35}$ ; gemessen im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay an Tag 21 (R2d6)

Dargestellt ist die zytolytische Aktivität der CTL gegenüber T2+ $\text{MT}_{27-35}$  (■), nativen T2-Zellen (□), T2+Kontrollpeptid (■) und K562 (▲) sowie den HLA-A0201+/MART-1+ Melanomzelllinien D10 (○) und HBL (●) und der HLA-A0201+/MART-1- Melanomzelllinie Na8-MEL (○).

Nach Stimulation CD14-depletierter PMNC mit  $\text{MT}_{27-35}$  konnte in 12 von 14 Ansätzen eine spezifische Erkennung der mit dem Stimulatorpeptid beladenen T2-Zellen gezeigt werden. Die gemessenen Lysewerte lagen bei einem Effektor:Target-Verhältnis von 30:1 zwischen 18,56% und 83,99% (Tabelle 8). Die drei HLA-A0201- und MART-1-exprimierenden Melanomzelllinien D10, HBL



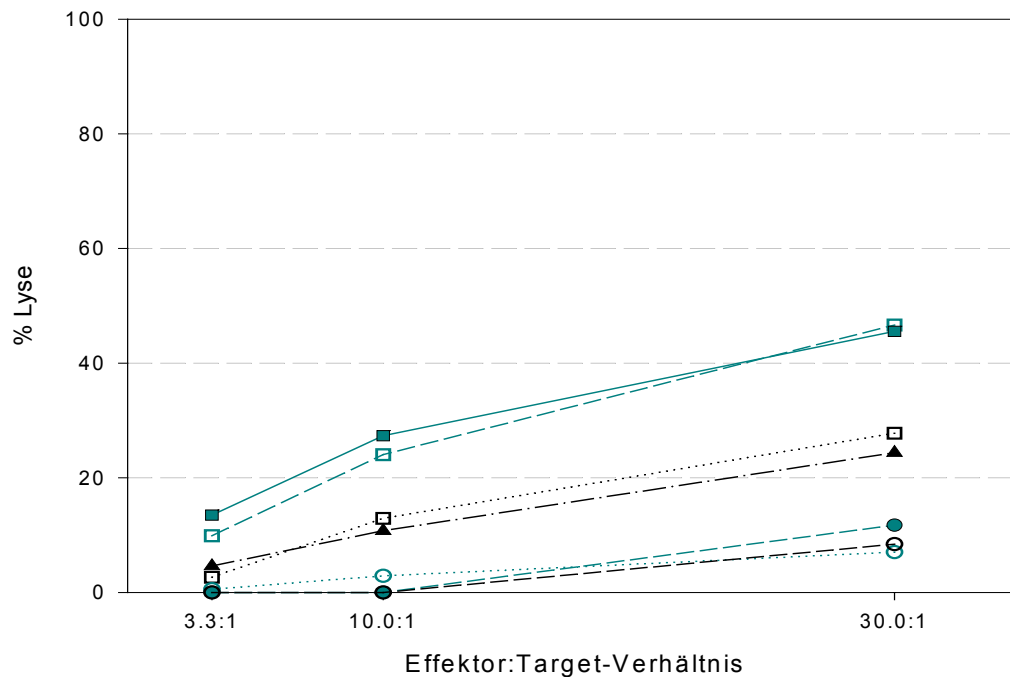
und K029 wurden von den mit MT<sub>27-35</sub> stimulierten CTL in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls spezifisch lysiert (in 7/13, 8/13 beziehungsweise 3/4 Versuchen). Bei diesen Versuchen wurden bei nativen oder mit einem Kontrollpeptid beladenen T2-Zellen sowie bei der HLA-defizienten Zelllinie K562 nur geringe Lysewerte gesehen. Auch die HLA-A0201+/MART-1- Melanomzelllinien Na8-MEL und 2A14 wurden nicht spezifisch erkannt.

**Tabelle 8:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im <sup>51</sup>Cr-Assay nach Stimulation mit MT<sub>27-35</sub>, angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

<i>E</i> \ <i>T</i>	T2 (+G <sub>209-217</sub> )	T2+MT <sub>27-35</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201+/ MART-1 <sup>++</sup>	HBL HLA-A0201+/ MART-1 <sup>+++</sup>	K029 HLA-A0201+/ MART-1 <sup>+++</sup>	Na8-MEL HLA-A0201+/ MART-1 <sup>(+)</sup>	2A14 HLA-A0201+/ MART-1
Mel6	8,54	54,04	1,23	29,69	19,02	/	/	7,75
Mel8	0,00	1,21	1,18	0,94	4,51	/	0,37	0,00
Mel10	20,45	83,99	13,98	54,43	71,46	/	10,05	/
Mel11	40,81	81,42	11,97	36,01	44,07	/	17,65	/
Mel13 <sup>6</sup>	19,82	28,12	13,46	7,15	8,76	/	4,14	/
Mel15	14,59	67,80	13,43	43,29	65,44	/	5,55	/
Mel16	5,17	45,95	6,45	13,35	11,64	/	7,95	/
Mel17	7,67	66,26	13,63	35,93	52,31	/	9,86	/
Mel18	3,46	18,56	2,22	7,53	7,05	/	5,35	/
Mel19	7,91	59,66	14,22	/	52,44	/	/	/
Mel20	5,13	49,75	9,86	33,72	46,18	29,10	12,36	/
Mel25	18,73	76,15	11,95	32,73	60,80	24,93	19,61	/
Mel30	7,82	48,57	9,42	20,03	20,30	13,94	2,63	/
Mel31	3,16	13,63	15,68	4,35	/	0,00	1,67	/

<sup>6</sup> Bei dieser Kultur wurde der <sup>51</sup>Cr-Assay an R1d6 (Tag 14) durchgeführt.

### 3.5.2 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit $G_{209-217}$ (ITDQVPFSV)



**Abbildung 11:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 11 nach Stimulation mit  $G_{209-217}$ ; gemessen im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay an Tag 21 (R2d6)

Zielzellen waren native T2-Zellen (□) sowie T2+ $G_{209-217}$  (■), T2+ $G_{209-2M}$  (□) und K562 (▲). Weiterhin wurden die Melanomzellen D10 (○), HBL (●) (beide HLA-A0201+/gp100+) und Na8-MEL (○) (HLA-A0201+ /gp100-) eingesetzt.

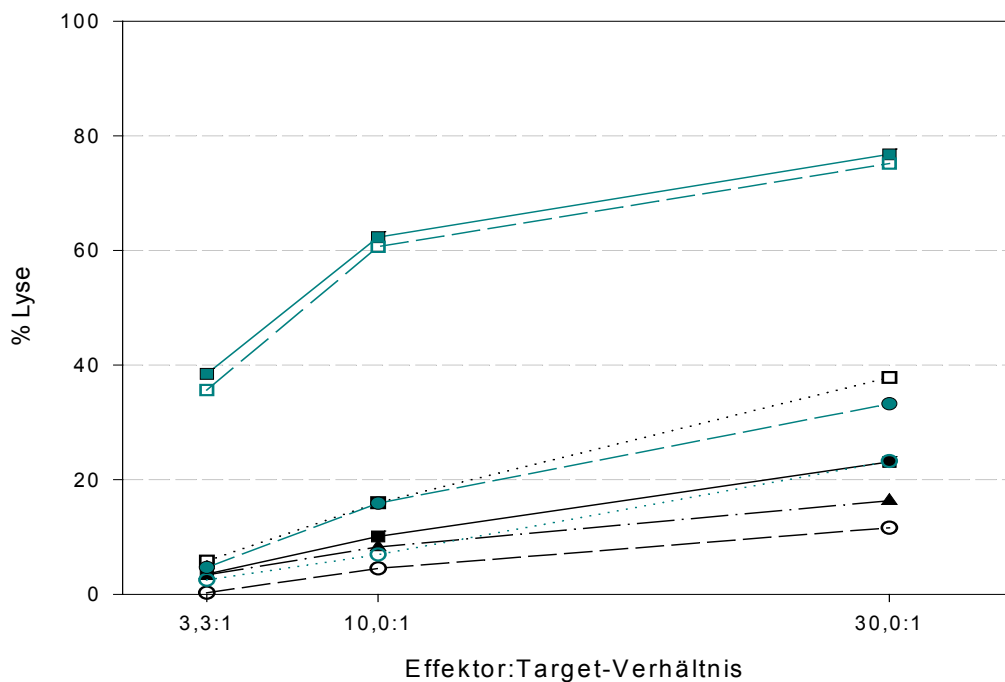
Durch Stimulation mit  $G_{209-217}$  konnten in einem von zwei Fällen spezifische CTL induziert werden, die sowohl das native Peptid ITDQVPFSV als auch das an einem Ankerresiduum modifizierte Peptid IMDQVPFSV lysierten (siehe Abb.11/Tabelle 9).

Die maximal erreichten Lysewerte lagen für ein Effektor:Target-Verhältnis von 30:1 bei 45,65% bzw. 46,65%. Die Lyse aller anderen Zielzellen lag in einem Bereich zwischen 7,03% und 27,78%, der als basale zytolytische Aktivität der CTL angesehen wurde. Die gp100-positiven Melanomzelllinien D10 und HBL wurden nach Stimulation mit diesem Peptid nicht spezifisch erkannt.

**Tabelle 9:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay nach Stimulation mit  $G_{209-217}$ , angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

E	T								
		T2 (+MT <sub>27-35</sub> )	T2+G <sub>209-217</sub>	T2+G <sub>209-2M</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>++</sup>	HBL HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>+</sup>	K029 HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>+++</sup>	Na8-MEL HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>(+)</sup>
Mel6		0,00	0,00	0,00	0,00	5,35	0,00	/	/
Mel11		27,78	45,65	46,65	24,36	11,72	8,41	/	7,03

### 3.5.3 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit $G_{207-2M}$ (IMDQVPFSV)



**Abbildung 12:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 15 nach Stimulation mit  $G_{209-2M}$ ; gemessen im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay an Tag 21 (R2d6)

Als Zielzellen wurden native T2-Zellen (□), T2+  $G_{209-2M}$  (■), T2+ $G_{209-217}$  (□), T2+Kontrollpeptid (■) und K562 (▲) eingesetzt. Außerdem wurde die Aktivität gegenüber den Melanomzellen D10 (●), HBL (○) (beide HLA-A0201+/gp100+) und Na8-MEL (○) (HLA-A0201+/gp100-) überprüft.

Bei  $G_{209-2M}$  handelt es sich um das an Position 2 modifizierte Analogon von  $G_{209-217}$ , dessen zytolytische Aktivität im vorhergegangenen Abschnitt beschrieben wurde.

Nach Stimulation von CTL mit dem modifizierten Peptid zeigte sich in vier von fünf Fällen eine spezifische Erkennung sowohl des Stimulatorpeptids als auch des originalen Peptids, wobei in zwei von vier Versuchen die Lyse des originalen Peptids höher war (siehe Tabelle 10). Für einen der Ansätze konnte eine Erkennung der HLA-A0201+/gp100+ Melanomzelllinie D10 gezeigt werden (CTL.Mel 6), während die Zelllinien HBL (HLA-A0201+/gp100+) sowie Na8-MEL (HLA-A0201+/gp100-) nicht spezifisch erkannt wurden.

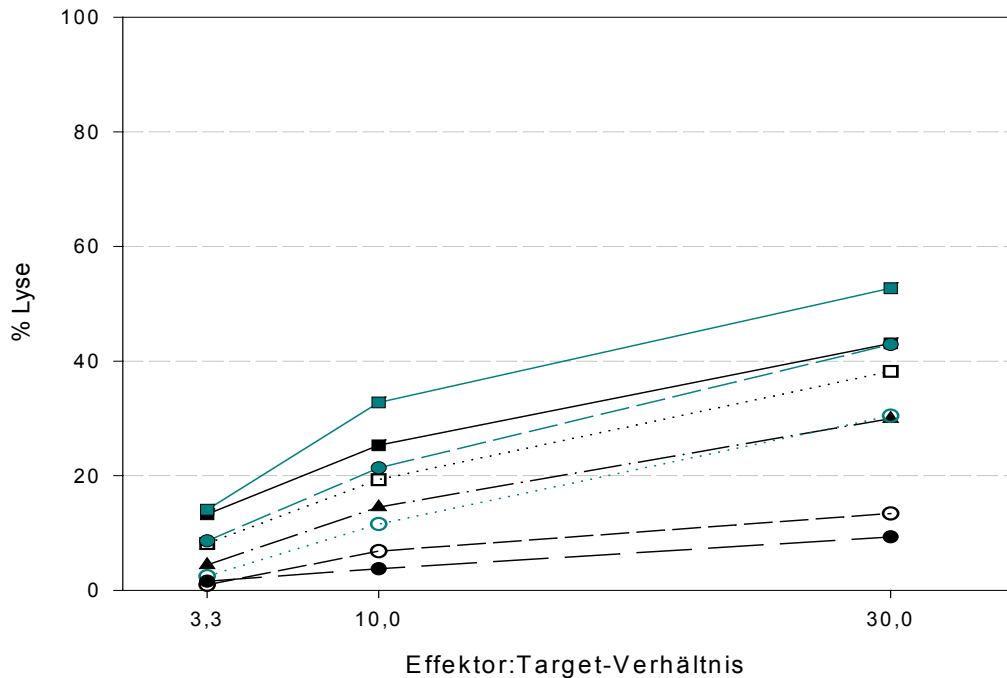
**Tabelle 10:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay nach Stimulation mit  $G_{209-2M}$ , angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

$E \backslash T$	T2 (+MT <sub>27-35</sub> )	T2+ $G_{209-2M}$	T2+ $G_{209-217}$	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201+/ gp100 <sup>++</sup>	HBL HLA-A0201+/ gp100 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201+/ gp100 <sup>(+)</sup>	2A14 HLA-A0201+/ gp100 <sup>-</sup>
Mel6	7,27	52,36	63,78	4,08	28,87	11,14	/	13,47
Mel11	37,52	77,74	92,94	16,15	20,38	25,37	6,80	/
Mel14	4,92	2,78	3,94	3,43	5,43	6,05	1,09	/
Mel15	25,10	69,46	65,65	28,68	23,24	33,23	11,60	/
Mel33	3,02	21,70	13,63	2,64	0,00	0,00	0,00	/

#### 3.5.4 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit $G_{9154}$ (KTWGQYWQV)

Durch Stimulation mit  $G_{9154}$  war es in nur einem von zwei Versuchen möglich, spezifische CTL zu generieren (Tabelle 11). Jedoch setzte sich auch in diesem Versuch die Erkennung der mit dem Stimulatorpeptid beladenen T2-Zellen nicht deutlich von der Erkennung der Kontrollzellen ab (Abb.13). Eine

spezifische Lyse HLA-A0201+/gp100+ Melanomzelllinien (D10, HBL) konnte nicht gezeigt werden.



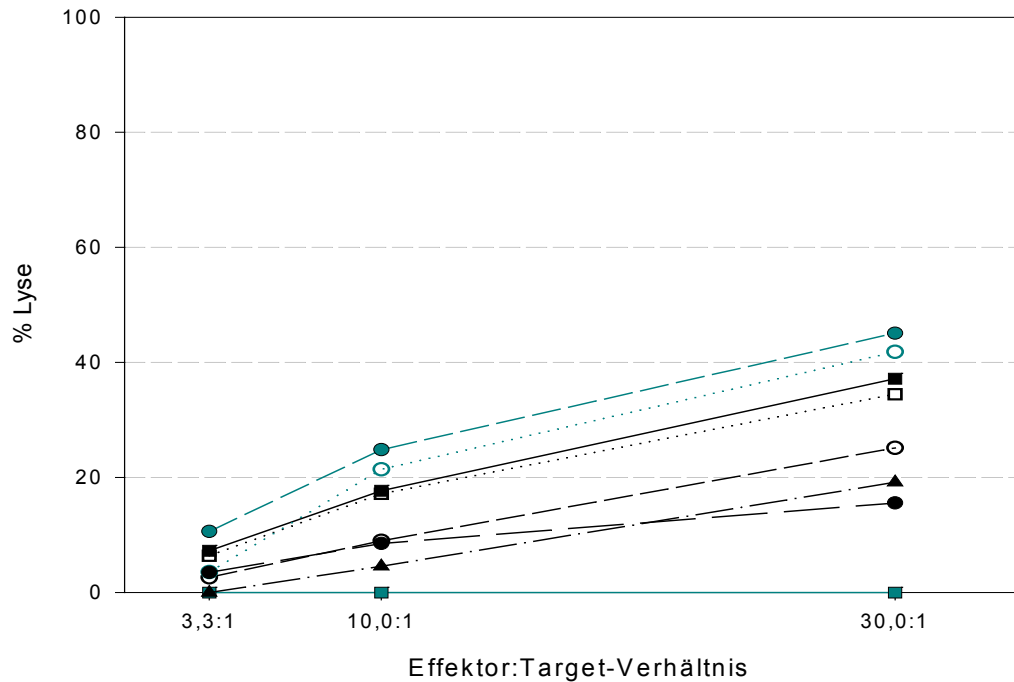
**Abbildung 13:** Zytolytische Aktivität von CTL:Mel 10 nach Stimulation mit G9<sub>154</sub>; gemessen im <sup>51</sup>Cr-Assay an Tag 21 (R2d6)

In diesem Assay wurde die Aktivität der CTL gegenüber T2+G9<sub>154</sub> (■), nativen T2-Zellen (□), T2+Kontrollpeptid (▲) und K562 (▲) bestimmt. Die HLA-A0201+/gp100+ Melanomzelllinien D10 (○) und HBL (●) sowie die HLA-A0201+/gp100- Zelllinien Na8-MEL (○) und SK-Mel-24 (●) wurden ebenfalls als Zielzellen eingesetzt.

**Tabelle 11:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im <sup>51</sup>Cr-Assay nach Stimulation mit G9<sub>154</sub>, angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

E \ T	Zielzellen							
	T2 (+G <sub>209-217</sub> )	T2+G9 <sub>154</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201+/ gp100 <sup>++</sup>	HBL HLA-A0201+/ gp100 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201+/ gp100 <sup>(+)</sup>	2A14 HLA-A0201+/ gp100 <sup>-</sup>	SK-Mel-24 HLA-A0201+/ gp100 <sup>-</sup>
Mel8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,72	/
Mel10	43,10	52,71	29,96	30,44	42,88	13,39	/	9,32

3.5.5 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit T<sub>1-9</sub> (MLLAVLYCL)



**Abbildung 14:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 10 nach Stimulation mit T<sub>1-9</sub>; gemessen im <sup>51</sup>Cr-Assay an Tag 21 (R2d6)

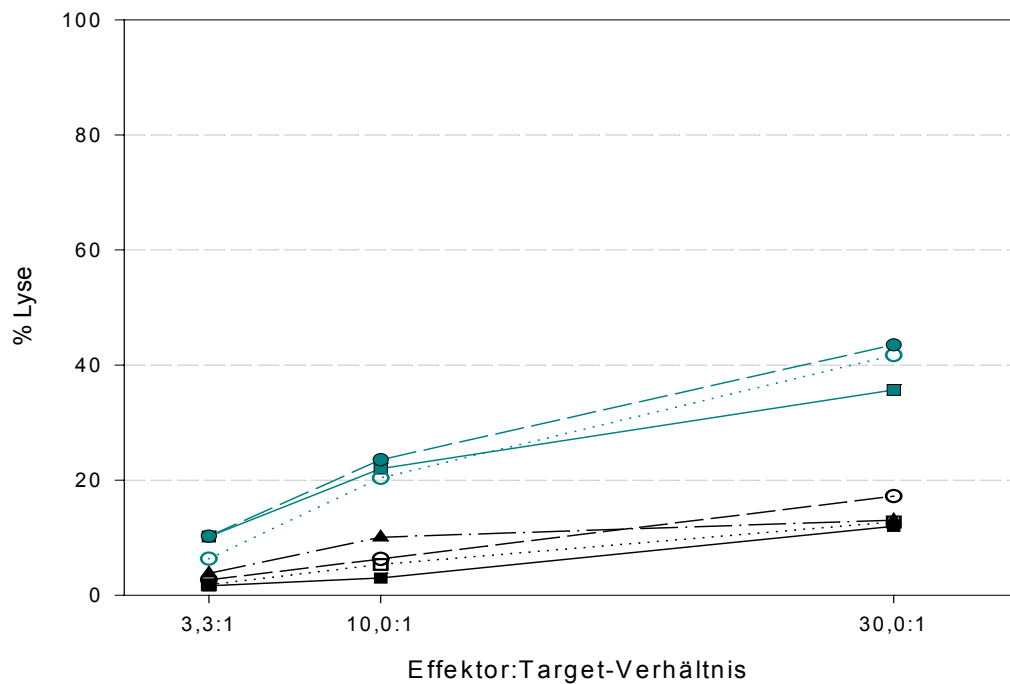
Eingesetzte Zielzellen waren native T2 (□), T2+T<sub>1-9</sub> (■), T2+Kontrollpeptid (▣) und K562 (▲) sowie die Melanomzelllinien D10 (○), HBL (●), Na8-MEL (○) und SK-Mel-24 (●) (alle HLA-A0201+).

Die Stimulation mit T<sub>1-9</sub> führte in keinem der durchgeführten Versuche zu einer Erkennung der mit dem Stimulatorpeptid beladenen T2-Zellen. Alle anderen Zielzellen wurden ebenfalls nur in einem unspezifischen Bereich lysiert.

**Tabelle 12:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im <sup>51</sup>Cr-Assay nach Stimulation mit T<sub>1-9</sub>, angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

E \ T	Zielzellen							
	T2 (+G <sub>209-217</sub> )	T2+T <sub>1-9</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>++</sup>	HBL HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>(+)</sup>	2A14 HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>-</sup>	SK-Mel-24 HLA-A0201 <sup>+</sup> / gp100 <sup>---</sup>
Mel8	0,00	0,00	0,00	0,00	12,52	0,18	0,91	/
Mel10	31,17	0,00	19,16	41,82	45,06	25,13	/	15,56

### 3.5.6 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit T<sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV)



**Abbildung 15:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 17 nach Stimulation mit T<sub>368-376</sub>; gemessen im 51Cr-Assay an R2d6 (Tag 21)

Zielzellen waren neben nativen T2-Zellen (□), T2+T<sub>368-376</sub> (■), T2+Kontrollpeptid (■) und K562 (▲) die HLA-A0201-positiven Zelllinien D10 (○), HBL (●) und Na8-MEL (○).

Nach Stimulation mit T<sub>368-376</sub> konnten in allen durchgeführten Versuchen CTL generiert werden, die das Stimulatorpeptid spezifisch erkannten (Tabelle 13). Die Lysewerte für eine Effektor:Target (E:T)-Verhältnis von 30:1 lagen dabei zwischen 15,25% und 55,39%.

Drei der HLA-A0201-positiven Melanomzelllinien wurden von den CTL in einem Teil der Versuche ebenfalls zu einem ähnlich hohen Prozentsatz lysiert (D10: 3/5, HBL: 4/5, K029: 1/4), woraus sich schließen läßt, daß diese Zelllinien für das Tyrosinaseantigen positiv sind. Na8-MEL und die HLA-defiziente Zelllinie K562 wurden nicht spezifisch erkannt.

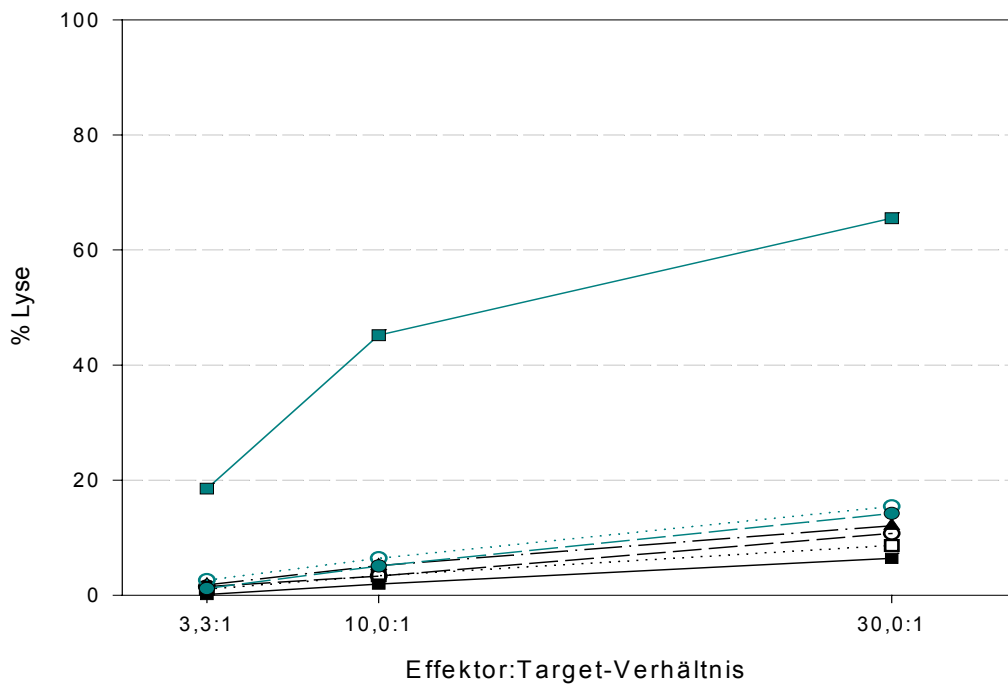
**Tabelle 13:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay nach Stimulation mit  $\text{T}_{368-376}$ , angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

E	T								
		T2 (+MT <sub>27-35</sub> )	T2+T <sub>368-376</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201 <sup>+</sup>	HBL HLA-A0201 <sup>+</sup>	K029 HLA-A0201 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201 <sup>+</sup>	2A14 HLA-A0201 <sup>+</sup>
Mel17		11,98	35,68	13,04	41,72	43,49	/	17,20	/
Mel25		38,64	55,39	28,74	39,89	63,87	21,65	28,46	/
Mel30		6,66	35,36	9,53	30,02	18,30	12,71	2,09	/
Mel32		9,17	15,25	8,17	8,88	10,21	3,89	3,32	/
Mel33		17,76	42,59	5,94	79,99	31,95	2,49	13,12	/

### 3.5.7 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit GnT-V<sub>nt38-67</sub> (VLPDVFIRCV)

Das Dekamer VLPDVFIRCV stammt aus einem Intron des *N*-Acetylglucosaminyl-transferase V Gens (GnT-V<sub>nt38-67</sub>). Die Stimulation mit diesem Peptid führte in drei von vier Versuchen zur Induktion spezifischer CTL, die dieses in  $^{51}\text{Cr}$ -Assays erkannten (die Lysewerte lagen bei einem E:T-Verhältnis von 30:1 zwischen 43,91% und 65,51%). Eine spezifische Lyse HLA-A0201-positiver Melanomzelllinien lag in keinem dieser Fälle vor.





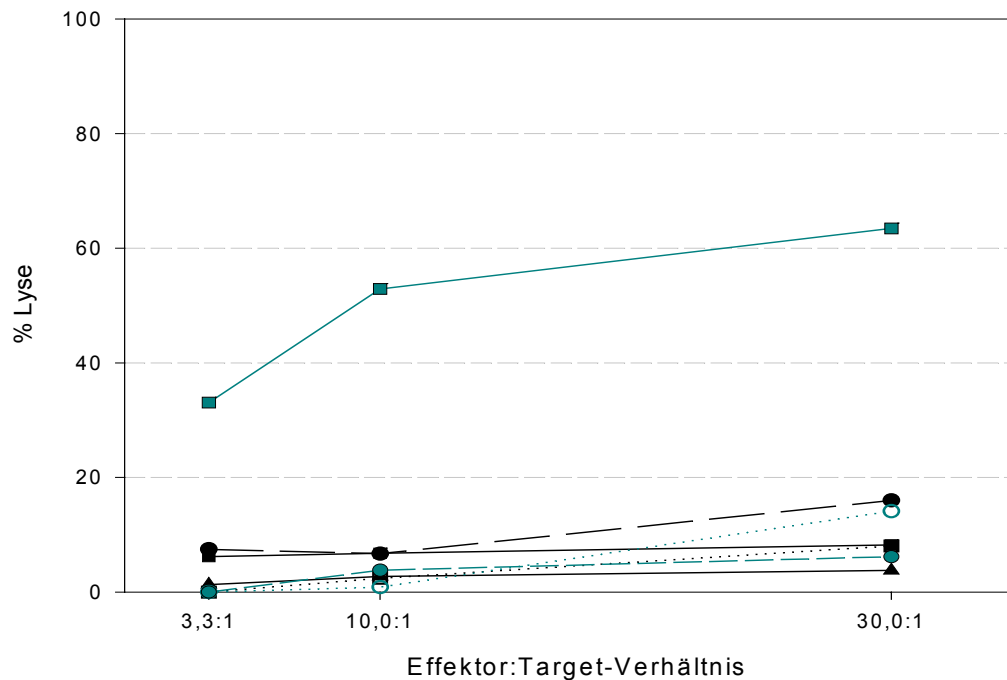
**Abbildung 16:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 17 nach Stimulation mit GnT-V<sub>nt38-67</sub>; gemessen im <sup>51</sup>Cr-Assay an Tag 21 (R2d6)

Dargestellt ist die Aktivität gegenüber T2+GnT-V<sub>nt38-67</sub> (■), nativen T2 (□), T2+Kontrollpeptid (■) und K562-Zellen (▲). Die Lyse HLA-A0201-positiver Melanomzellen wurde anhand der Zelllinien D10 (○), HBL (●) und Na8-MEL (○) überprüft.

**Tabelle 14:** Zytotoxische Aktivität spezifischer CTL im <sup>51</sup>Cr-Assay nach Stimulation mit GnT-V<sub>nt38-67</sub>, angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

E \ T	T								
	T2 (+MT <sub>27-35</sub> )	T2+ GnT-V <sub>nt38-67</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201 <sup>+</sup>	HBL HLA-A0201 <sup>+</sup>	K029 HLA-A0201 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201 <sup>+</sup>	2A14 HLA-A0201 <sup>+</sup>	
Mel17	6,42	65,51	12,08	15,42	14,21	/	10,74	/	
Mel25	36,83	58,27	39,14	37,81	40,11	28,22	46,95	/	
Mel30	5,85	43,91	9,01	10,62	6,56	6,39	1,17	/	
Mel32	25,14	16,23	12,02	23,87	11,46	10,38	5,65	/	

### 3.5.8 Cytotoxische Aktivität von CTL nach Stimulation mit MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV)



**Abbildung 17:** Zytolytische Aktivität von CTL.Mel 6 nach Stimulation mit M3<sub>271-279</sub>; gemessen im <sup>51</sup>Cr-Assay an R2d6 (Tag 21)

Die gezeigten Werte wurden gemessen als Aktivität der CTL gegenüber nativen T2 (□), T2+M3<sub>271-279</sub> (■), T2+Kontrollpeptid (■) und K562 (▲) sowie gegen die HLA-A0201+/MAGE 3- Melanomzelllinien D10 (●), HBL (○) und SK-Mel-24 (●).

Nach Stimulation mit MAGE-3<sub>271-279</sub> zeigten die generierten CTL in drei von vier Versuchen eine spezifische Erkennung der mit dem Stimulatorpeptid beladenen T2-Zellen (Tabelle 15). Die erreichten Lysewerte lagen dabei in einem Bereich von 63,47% bis 75,78% (E:T = 30:1).

Entsprechend der Feststellung, daß keine der untersuchten Melanomzelllinien D10, HBL, Na8-MEL, 2A14 und SK-Mel-24 in der phänotypischen Analyse eine Expression des MAGE-3 Antigens zeigte, wurde im <sup>51</sup>Cr-Assay auch keine dieser Zelllinien spezifisch lysiert.

**Tabelle 15:** Zytotxische Aktivität spezifischer CTL im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay nach Stimulation mit  $\text{M3}_{271-279}$ , angegeben in % spezifischer Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 30:1

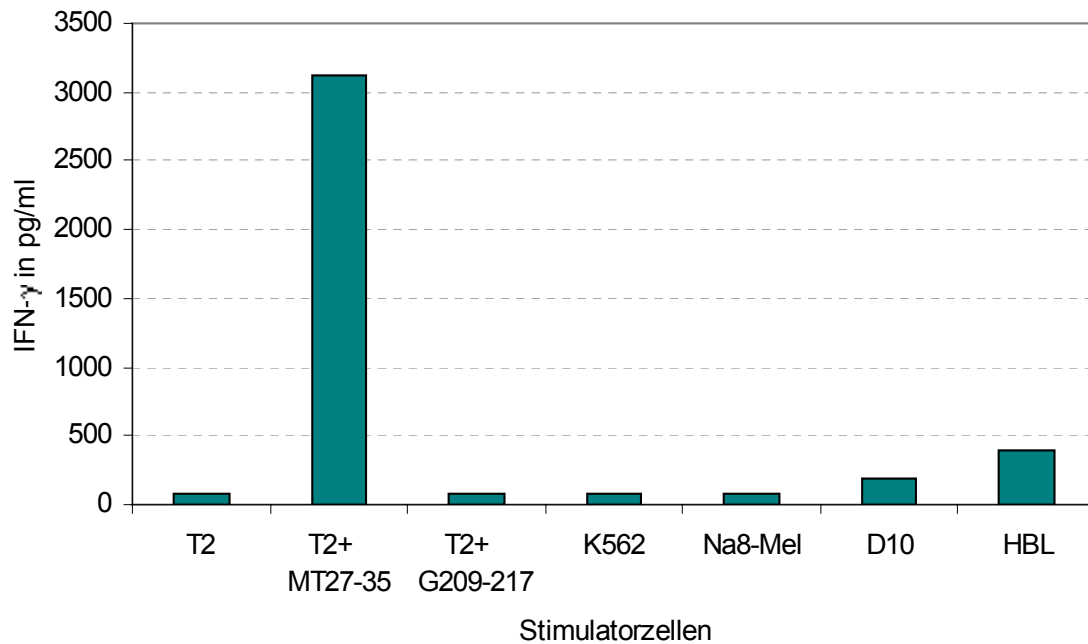
E	T	T2 (+MT <sub>27-35</sub> )	T2+ M3 <sub>271-279</sub>	K562 HLA-defizient	D10 HLA-A0201 <sup>+</sup>	HBL HLA-A0201 <sup>+</sup>	K029 HLA-A0201 <sup>+</sup>	Na8-MEL HLA-A0201 <sup>+</sup>	2A14 HLA-A0201 <sup>+</sup>
		Mel6	8,21	63,47	3,78	14,11	6,15	/	/
Mel11	77,95	75,12	37,32	36,81	39,66	/	22,37	/	
Mel13	38,85	64,68	23,42	26,35	24,00	/	9,31	/	
Mel25	44,46	75,78	33,86	36,82	41,34	34,56	30,73	/	

### 3.6 ELISA

#### 3.6.1 IFN- $\gamma$ Sekretion nach Koinkubation mit Zielzellen

Die IFN- $\gamma$  Werte wurden nach einer 16stündigen Koinkubation der CTL mit verschiedenen Zielzellen gemessen.

Abbildung 18 zeigt die IFN- $\gamma$  Sekretion eines  $\text{MT}_{27-35}$ -spezifischen CTL-Ansatzes. Die anhand des Leerwertes korrigierten Werte von 10 Einzelversuchen mit diesem Peptid wiesen für die Erkennung des Peptids und der MART-1<sup>+</sup> Melanomzellen eine Signifikanz auf (Daten nicht komplett gezeigt). Die IFN- $\gamma$  Sekretion nach Koinkubation mit T2+  $\text{MT}_{27-35}$  lag im Median bei 2296,15 pg/ml und war damit signifikant höher als für die Negativkontrollen T2 (71,60 pg/ml,  $p \leq 0,005$ ), T2+Kontrollpeptid (71,72 pg/ml,  $p \leq 0,01$ ), K562 (65,66 pg/ml,  $p \leq 0,001$ ) und Na8-MEL (67,40 pg/ml,  $p \leq 0,001$ ). Die Steigerung der IFN- $\gamma$  Sekretion nach Koinkubation mit HBL (369,07 pg/ml) war nur gegenüber den Kontrollwerten K562 und Na8-MEL signifikant ( $p \leq 0,01$ ). Für die sekretorische Reaktion auf die Inkubation mit D10 (146,14 pg/ml) ließ sich keine Signifikanz zeigen.

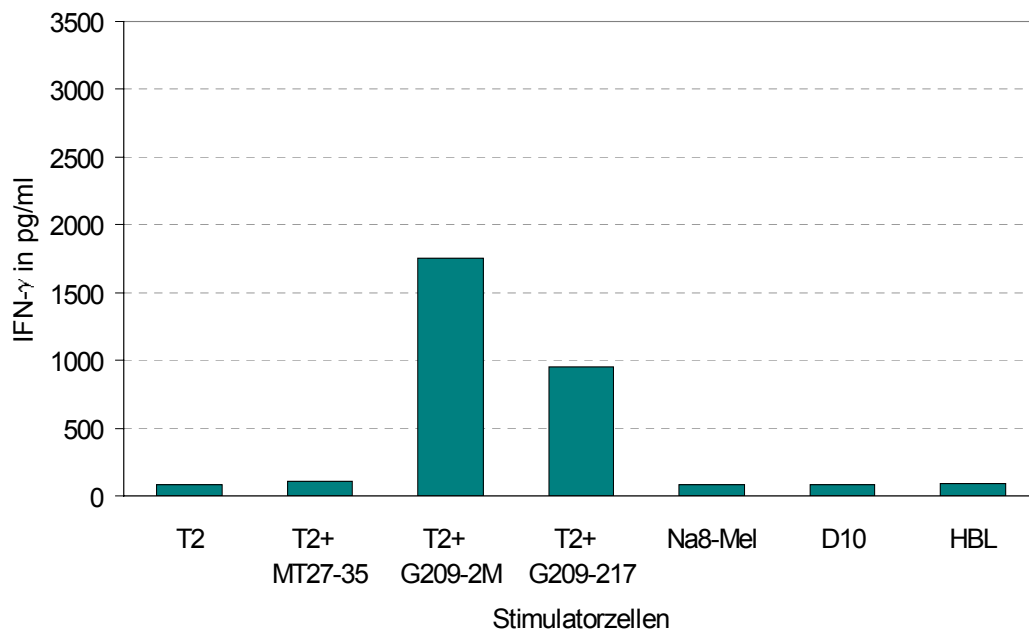


**Abbildung 18:** IFN- $\gamma$  Sekretion von CTL nach Stimulation mit MT<sub>27-35</sub>

Verwendete Zielzellen waren native T2, T2+MT<sub>27-35</sub>, T2+G<sub>209-217</sub>, K562, die HLA-A0202+/Melan-A- Zelllinie Na8-MEL sowie die HLA-A0201+/Melan-A+ Zelllinien D10 und HBL.

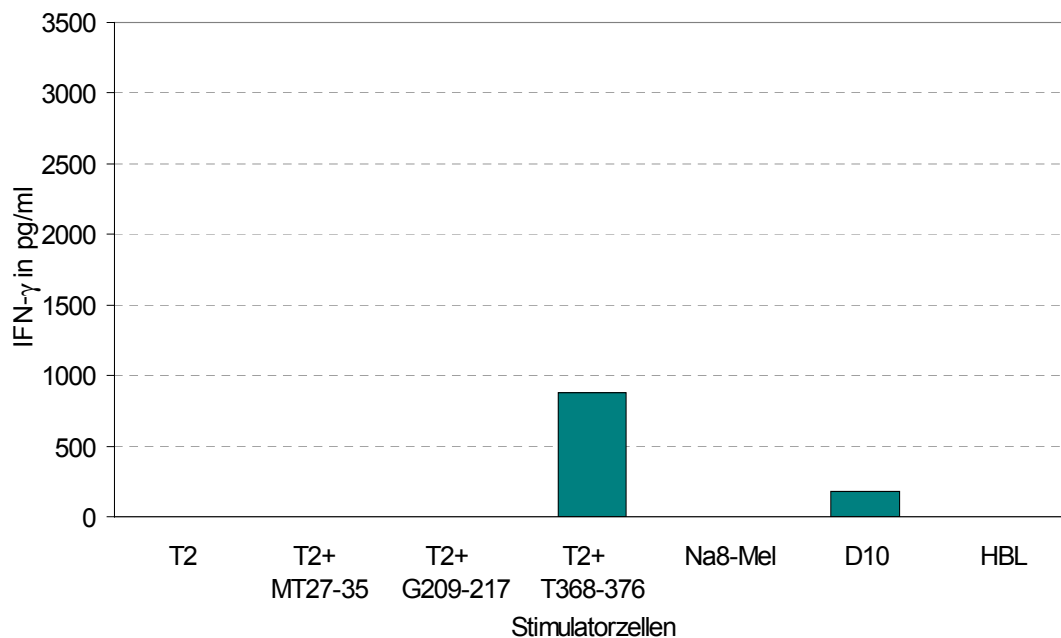
In Abbildung 19 ist einer von drei durchgeführten Koinkubationsansätzen nach Stimulation mit G<sub>209-217</sub> dargestellt. Alle dieser Versuche zeigten nach Koinkubation der CTL mit dem Stimulatorpeptid eine gesteigerte IFN- $\gamma$  Sekretion (252,43-1751,81 pg/ml). Eine Erkennung des originalen Peptids G<sub>209-217</sub> lag ebenfalls in allen Fällen vor (38,87-1852,00 pg/ml). In einem der drei Versuche wurde analog zu den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion nach Koinkubation mit der HLA-A0201<sup>+</sup>/gp100<sup>+</sup> Melanomzelllinie D10 gemessen (522 pg/ml).

Nach Stimulation mit T<sub>368-376</sub> zeigten die CTL in 2/2 Fällen als Reaktion auf die Koinkubation mit diesem Peptid eine spezifische IFN- $\gamma$  Sekretion (391,00 bzw. 875,70 pg/ml). In einem der beiden durchgeführten Koinkubationsversuche führte auch die Koinkubation mit der Melanomzelllinie D10 (HLA-A0201<sup>+</sup>) zu einer deutlich erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion (178,40 pg/ml), während die Zelllinie HBL (ebenfalls HLA-A0201<sup>+</sup>) keine Reaktion hervorrief (Abbildung 20).



**Abbildung 19:** IFN- $\gamma$  Sekretion von CTL nach Stimulation mit  $G_{209-2M}$

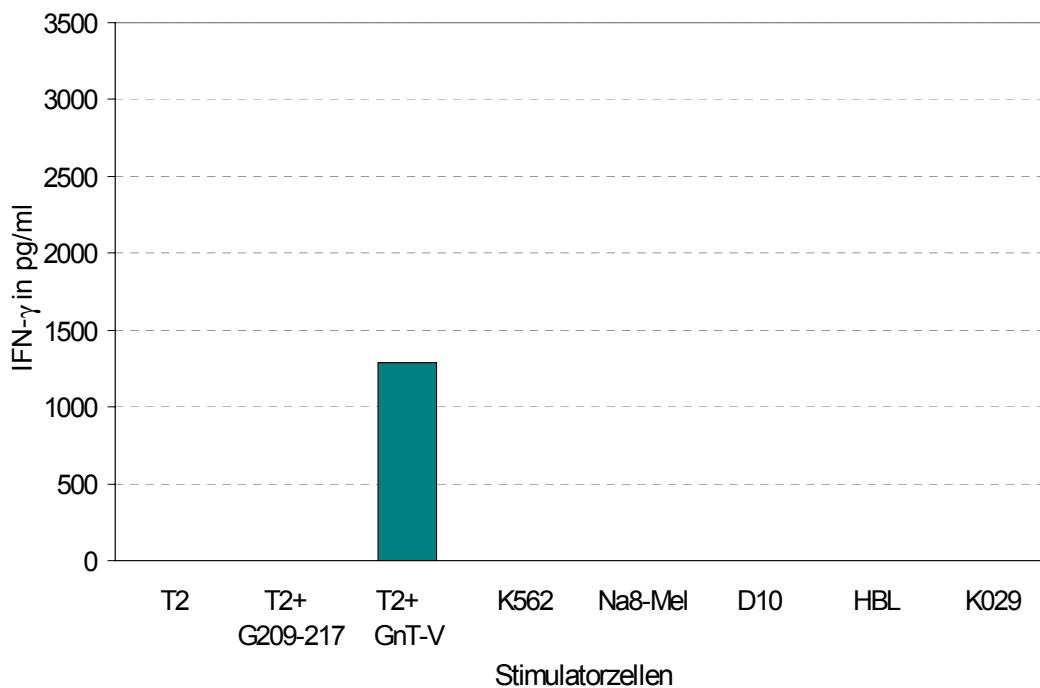
In diesem Versuch wurde  $MT_{27-35}$  als Kontrollpeptid eingesetzt,  $G_{209-2M}$  ist ein Analogon des gp100-Peptids  $G_{209-217}$  und in diesem Fall das untersuchte Stimulatorpeptid.



**Abbildung 20:** IFN- $\gamma$  Sekretion von CTL nach Stimulation mit  $T_{368-376}$

Die untersuchten CTL sind mit  $T_{368-376}$  stimuliert worden. Mit  $MT_{27-35}$  und  $G_{209-217}$  beladene T2-Zellen dienen in diesem Versuch als Negativkontrollen.

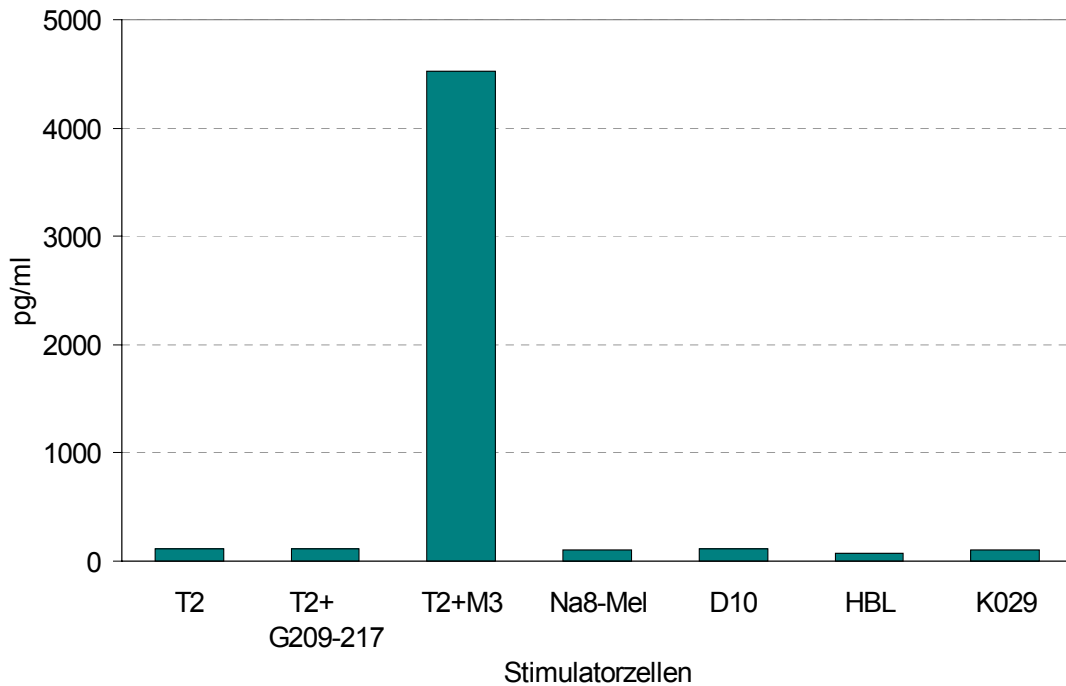
CTL, welche mit dem Dekamer GnT-V<sub>nt38-67</sub> stimuliert wurden, erkannten dieses Peptid in den Koinkubationsassays ebenfalls in 2/2 Versuchen (712,30 bzw. 1290,00 pg/ml). Gegenüber Melanomzellen zeigten sie keine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** IFN- $\gamma$  Sekretion von CTL nach Stimulation mit GnT-V<sub>nt38-67</sub>

Das untersuchte Stimulatorpeptid war in diesem Versuch GnT-V<sub>nt38-67</sub>. Zur Kontrolle wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion nach Koinkubation mit G<sub>209-217</sub> gemessen.

Die Spezifität der mit M3<sub>271-279</sub> stimulierten CTL zeigte sich mit 650,00 bzw. 4528,00 pg/ml in Koinkubationsansätzen ebenfalls in einer deutlich gesteigerten IFN- $\gamma$  Sekretion gegenüber den mit diesem Peptid beladenen Zielzellen (2/2). Einer dieser Versuche ist in Abbildung 22 repräsentativ dargestellt.



**Abbildung 22:** IFN- $\gamma$  Sekretion von CTL nach Stimulation mit M3<sub>271-279</sub>

Zielzellen waren native T2, T2+ M3<sub>271-279</sub>, T2+ G<sub>209-217</sub>, K562, die HLA-A0202+/Melan-A- Zelllinie Na8-MEL sowie die HLA-A0201+ Zelllinien D10, HBL und K029.

### 3.6.2 IL-4 Sekretion nach Koinkubation mit Zielzellen

Nach dem gleichen Verfahren wie für die Detektion einer IFN- $\gamma$  Sekretion wurde nach der Koinkubation von CTL-Kulturen mit bestimmten Zielzellen auch die Konzentration an IL-4 als Markerzytokin für eine Tc2-Zellen bestimmt.

Für MT<sub>27-35</sub> lag diese in 4/6 Versuchen unterhalb des meßbaren Bereiches. In einem Versuch zeigte sich eine geringe Sekretion nach Inkubation mit nativen T2-Zellen (103 pg/ml) in einem weiteren wurde eine schwache Reaktion auf K562, Na8-MEL, D10 und HBL sichtbar (45-343 pg/ml) (Daten nicht gezeigt).

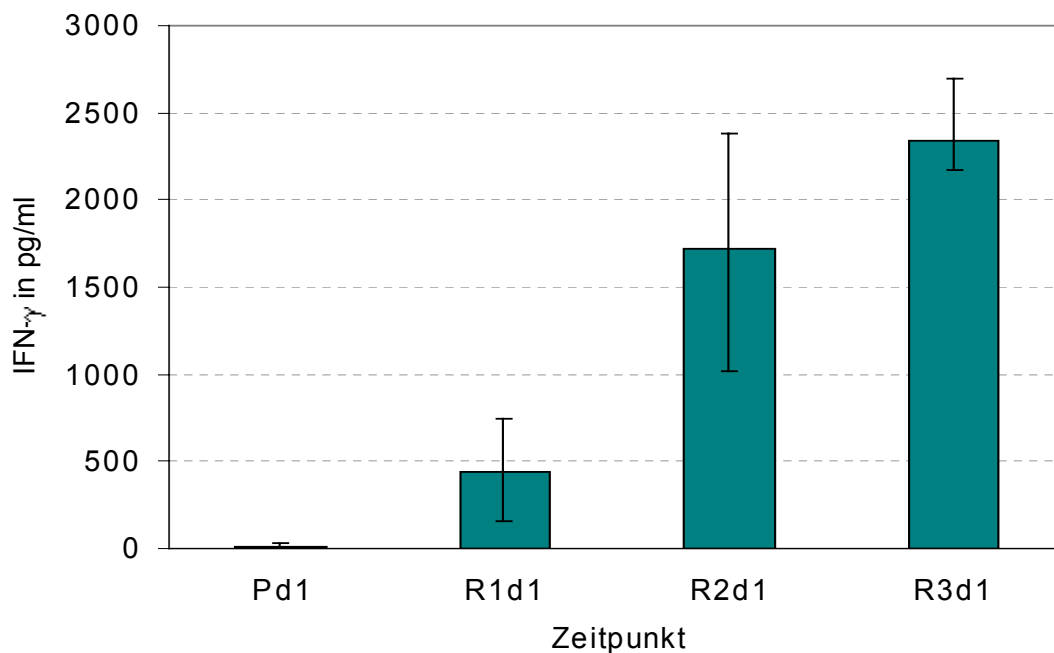
Die IL-4 Sekretion nach Stimulation mit dem modifizierten Peptid G<sub>209-2M</sub> war in einem von zwei Versuchen nicht meßbar, in dem anderen konnte nach Koinkubation mit den Kontrollen T2 (936 pg/ml), T2+Kontrollpeptid (551 pg/ml) und der Melanomzelllinie D10 (30 pg/ml) eine IL-4 Sekretion gemessen werden.

In jeweils zwei Versuche mit M3<sub>271-279</sub>, GnT-V<sub>38-67</sub> sowie mit dem Tyrosinase-Peptid T<sub>368-376</sub> zeigte sich nach Koinkubation mit relevanten Zielzellen ebenfalls keine gegenüber der Basissekretion der CTL gesteigerte IL-4 Sekretion.

Allgemein läßt sich zusammenfassen, daß in keinem Fall eine IL-4 Sekretion als spezifische Reaktion auf das Stimulatorpeptid oder eine das entsprechende Antigen tragende Melanomzelllinie zu beobachten war. Diese Tatsache läßt eine relevante Beteiligung von Tc2 Zellen an der cytolytischen Reaktion der spezifischen CTL eher unwahrscheinlich erscheinen.

### 3.6.3 Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand

Die Konzentrationen an IFN- $\gamma$  im Zellkultur-Überstand wurden bei neun voneinander unabhängigen CTL-Kulturen jeweils am ersten Tag nach jeder (Re-)Stimulation untersucht.



**Abbildung 23:** IFN- $\gamma$  Konzentration im CTL-Kulturüberstand

Die Überstände aus der Zellkultur wurden jeweils am ersten Tag (d1) nach der Primärstimulation (P) oder den darauffolgenden Restimulationen (R1-3) abgenommen und später im ELISA untersucht.

In 8/9 Versuchen zeigte sich dabei übereinstimmend, daß die Konzentration an IFN- $\gamma$  von Woche zu Woche deutlich ansteigt. Am ersten Tag nach der



Primärstimulation lag diese in vielen Fällen noch nicht im meßbaren Bereich (Median an Pd1: 13,38 pg/ml), an R1d1 wurde im Median eine Konzentration von 436,55 pg/ml festgestellt. Die Meßwerte an R2d1 und R3d1 lagen bei 1719,00 beziehungsweise 2343,00 pg/ml.

Auf dem 5% Niveau ließ sich für diese Werte wegen der großen Streuung zwischen den verschiedenen Ansätzen keine Signifikanz nachweisen.

### **3.7 Phänotypisierung der CTL**

Die durchflußzytometrische Charakterisierung der Effektorzellpopulationen ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der zytolytischen Aktivität und dem Verhältnis zwischen CD4+ und CD8+ Zellen.

Die Zusammensetzung der CTL-Kulturen zum Zeitpunkt des <sup>51</sup>Cr-Assays unterlag allgemein sehr großen Schwankungen. Dabei wurden Anteile von T-Helferzellen in einem Bereich von 18,73-67,68% und von zytotoxische T-Zellen in einem Bereich von 25,32–78,95% gefunden. Auch die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69, die bei allen CTL-Kulturen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden konnte, zeigte keine Korrelation mit der Peptid- oder Melanomspezifität der generierten CTL.

CD56-positive natürliche Killerzellen (NK) machten < 5% der untersuchten Populationen aus.

Bei Kulturen, welche mit dem T-Zell Wachstumsmedium Lymphocult-T® behandelt wurden, zeigte sich eine Verschiebung der vorherrschenden T-Zell Subpopulationen zugunsten der CD8+ Zellen (64,43-90,88%), was sich jedoch nicht positiv auf die Spezifität der generierten CTL auswirkte (siehe auch 3.8.2).

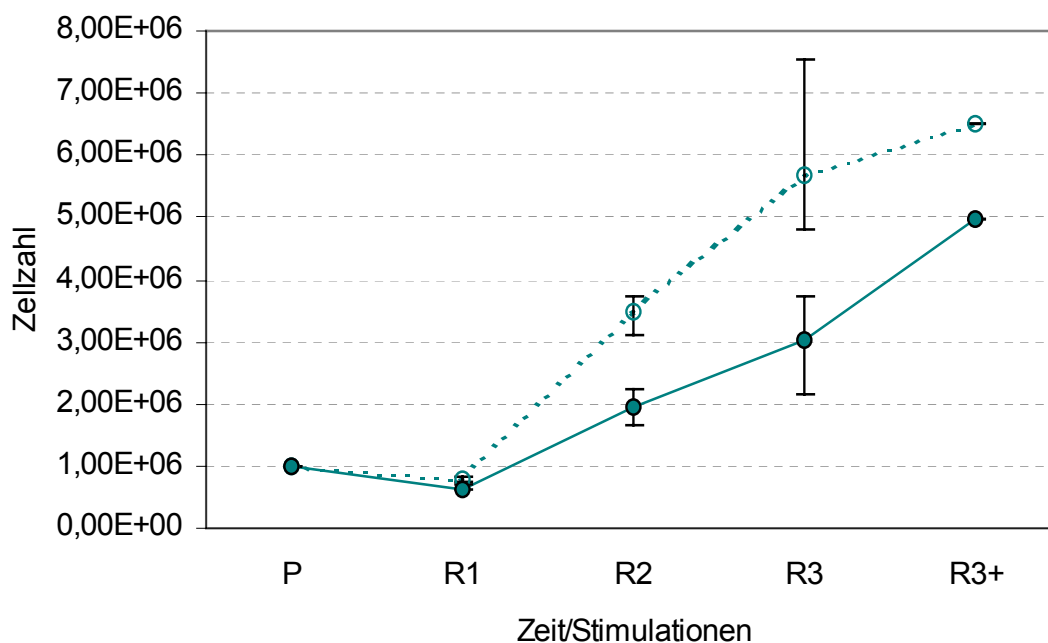
### **3.8 Wachstumsversuche**

#### **3.8.1 Einfluß verschiedener Stimulatorzellen auf Expansionsraten von CTL**

Zur Primärstimulation spezifischer CTL wurden in allen Versuchen peptidbeladene DC eingesetzt, während bei den darauf folgenden Restimulationen in einigen Fällen auch PMNC verwendet wurden. Diese verschiedenen Kulturmethoden verursachten Unterschiede in den Expansionsraten der generierten CTL.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigten CTL, welche unter Zugabe von IL-2 bei jeder Stimulation mit DC stimuliert wurden eine höhere Expansionsrate als solche, deren Restimulation ab Tag 8 mit PMNC erfolgte. Dabei war die Expansion der mit DC stimulierten CTL beim Vergleich der über vier Versuche gebildeten Medianwerte um das bis zu 1,88fache höher (R3:  $3,02 \times 10^6$  respektive  $5,69 \times 10^6$ ).

Auf die Spezifität der CTL wirkte sich die Stimulation durch PMNC nicht negativ aus, vielmehr wurde in einem von zwei Versuchen sogar eine höhere spezifische Lyse beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bei wiederholten Stimulationen mit reifen DC muß außerdem der im Vergleich zur Restimulation mit PMNC hohe Zellverlust bei der Ausreifung sowie der große finanzielle und Arbeitsaufwand berücksichtigt werden.



**Abbildung 24:** Expansion zytotoxischer T-Zellen nach Stimulation mit DC oder PMNC

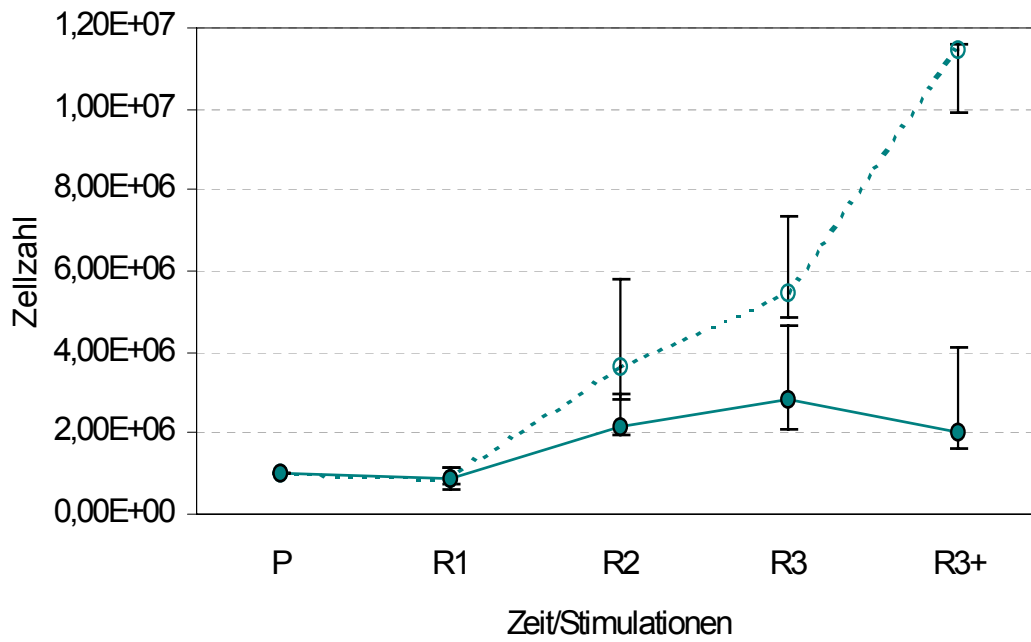
Dargestellt sind die Expansionsdaten von CTL, die nach der Primärstimulation entweder mit DC (○) oder mit PMNC (●) restimuliert wurden. Alle Werte sind auf eine Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^6$  umgerechnet. Die Abbildung zeigt die Mediane sowie das 1. und 3. Quartil.  $n = 4$

### 3.8.2 Einfluß von Lymphocult-T<sup>®</sup> auf Expansion und Spezifität von CTL

Um die Expansionsraten von CTL-Kulturen zu steigern wurde in einigen Versuchen das T-Zell Wachstumsmedium Lymphocult-T<sup>®</sup> eingesetzt. Die Auswirkungen dieses Mediums auf die T-Zell Expansion sind in Abbildung 25 zusammengefaßt. Im Vergleich der Mediane konnte dabei durch Verwendung von Lymphocult-T<sup>®</sup> eine fast fünffache Steigerung des Zellwachstums erreicht werden (R3+:  $10,1 \times 10^6$  versus  $2,13 \times 10^6$ ). Bei der alleinigen Verwendung von Proleukin<sup>®</sup> war in der Mehrzahl der Versuche spätestens nach der dritten Restimulation keine weitere Expansion mehr möglich, die Zellzahlen waren teilweise sogar rückläufig. Dieser Effekt wurde unter zusätzlicher Gabe von Lymphocult-T<sup>®</sup> nicht beobachtet.

Die Verwendung von Lymphocult-T<sup>®</sup> beeinflusste aber neben der Expansion auch die Spezifität der generierten CTL. Im direkten Vergleich von Ansätzen, welche jeweils mit beziehungsweise ohne Zusatz dieses Wachstumsmediums generiert wurden, zeigte sich in drei von sechs Fällen unter Gabe von Lymphocult-T<sup>®</sup> eine unspezifischere Lyse als in den entsprechenden Kontrollansätzen. Die mit Lymphocult-T<sup>®</sup> stimulierten Zellen bewirkten dabei eine starke Zytolyse der Negativkontrollen (z.B. native T2, K562, Na8-MEL). Dieser Effekt scheint besonders ausgeprägt zu sein, wenn die CTL an den letzten zwei bis drei Tagen vor einem <sup>51</sup>Cr-Assay noch Lymphocult-T<sup>®</sup> erhalten hatten.

In den anderen Versuchen (ebenfalls 3/6) zeigte sich weder ein positiver noch ein negativer Einfluß auf die Spezifität der CTL.



**Abbildung 25:** Expansion cytotoxischer T-Zellen mit und ohne Lymphocult-T<sup>®</sup>

Diese Abbildung faßt Expansionsdaten von mit MT<sub>27-35</sub> stimulierten CTL-Kulturen zusammen, die entweder nur Proleukin<sup>®</sup> (●) oder zusätzlich das Wachstumsmedium Lymphocult-T<sup>®</sup> (○) erhalten haben. Die Werte wurden auf eine Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^6$  umgerechnet. Gezeigt sind die Mediane sowie das 1. und 3. Quartil. n = 5

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Generierung melanomspezifischer CTL aus PMNC gesunder Spender in Anlehnung an GMP-Richtlinien zu optimieren. Die entwickelte Methode soll in einem Therapieversuch als adoptive Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation eingesetzt werden.

### 4.1 Immunogenität verschiedener Peptide

Acht HLA-A\*0201-restringierte Peptidepitope aus den melanomassoziierten Antigenen Melan-A/MART-1, gp100, MAGE-3, Tyrosinase und N-Acetylglucosaminyl-Transferase V (GnT-V) wurden auf ihre Eignung für die Induktion tumorspezifischer CTL untersucht. Es gelang mit jedem der Peptide mittels dendritischer Zellen expandierende CTL-Kulturen zu induzieren. Die Generierung spezifischer CTL mit einer signifikanten lytischen Aktivität gegenüber peptidbeladenen T2-Zellen schien jedoch sowohl interindividuellen Schwankungen unterworfen als auch peptidabhängig zu sein. Es war in den durchgeführten Versuchen für sechs der acht getesteten Peptide reproduzierbar möglich, spezifische CTL zu generieren, nämlich für MT<sub>27-35</sub> aus Melan-A/MART-1 (AAGIGILTV), G<sub>209-217</sub> aus gp100 (ITDQVPFSV) sowie sein an Position 2 modifiziertes Analogon G<sub>209-2M</sub> (IMDQVPFSV), T<sub>368-376</sub> aus Tyrosinase (YMDGTMSQV), das durch die Nukleotidsequenz 38-67 kodierte Peptiddekamer aus einem GnT-V Intron (VLPDVFIRCV) und die Sequenz 271-279 aus MAGE-3 (FLWGPRALV).

Für MT<sub>27-35</sub>, ein Nonamer mit einer nur intermediären Affinität zu MHC-I, konnte eine besonders verlässliche Induktion peptidspezifischer CTL gezeigt werden. Diese Zellen erkannten nicht nur in 12 von 14 Versuchen die mit „ihrem“ Peptid beladenen T2-Zellen, sondern in der Mehrzahl der Fälle auch das assoziierte Antigen in seiner endogen prozessierten Form auf Melanomzellen. Diese Ergebnisse der <sup>51</sup>Cr-Assays korrelierten positiv mit der in ELISA-Untersuchungen gemessenen IFN- $\gamma$  Sekretion und negativ mit der IL-4 Sekretion dieser CTL-Kulturen. Ähnliche Beobachtungen anderer

Arbeitsgruppen [53, 59, 76, 82] unterstützen die Hypothese, daß dieses Epitop für immuntherapeutische Ansätze geeignet ist.

Das MART-1 Antigen wird von der Mehrzahl HLA-A2 restringierter TIL von Melanompatienten erkannt und zeichnet sich durch eine starke *in vitro* Immunogenität aus [38]. Die Rolle dieses Antigens in der *in vivo* Tumorregression ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Die Expression von Melan-A/MART-1 auf primären Melanomen und Melanometastasen wird in verschiedenen Untersuchungen mit 75-80% angegeben [17, 47].

Das Membran-Glykoprotein gp100 zeigt auf Melanomzellen üblicherweise ein ähnliches Expressionsmuster wie MART-1 [39], was die durchflußzytometrischen Analysen in dieser Arbeit bestätigten (s. Tabelle 7). Die Induktion gp100-spezifischer T-Zellen gestaltet sich schwieriger als für MART-1 [65], es gibt jedoch Anhaltspunkte, die für eine Korrelation zwischen der Therapie mit gp100-reaktiven TIL und einer klinischen Tumorregression sprechen [37], was dieses Antigen für therapeutische Ansätze besonders interessant macht.

Das von einem gp100-Epitop abgeleitete Peptidnonamer G<sub>209-2M</sub> (IMDQVPFSV) ist nach PARKHURST ET AL. [54] an einer Ankerresidue modifiziert, um die Affinität zu HLA-A\*0201 zu steigern. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß mittels dieses Peptides spezifische CTL generiert werden können, die neben dem modifizierten auch das native Peptid und gp100-positive Melanomzellen erkennen. Bezüglich der Peptidspezifität lieferten auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche vergleichbare Ergebnisse; die Lyse einer Ag-exprimierenden Melanomzelllinie konnte allerdings nur in einem Einzelfall beobachtet werden (1/5). In Übereinstimmung damit berichten CLAY ET AL. [15] von einer Vakzinierungsstudie mit diesem Nonamer, bei welcher sich nur in einem Bruchteil der aus PMNC von vakzinierten Patienten generierten Kulturen (3/20) CTL nachweisen ließen, welche außer dem modifizierten und dem nativen Peptid auch Ag-positive Melanomzelllinien erkannten. CLAY ET AL. führen diese Beobachtung auf eine durch die Peptidmodifikation bedingte Variabilität in der Spezifität der CTL zurück.

---

Für das 1995 von KAWAKAMI ET AL. identifizierte Original des oben beschriebenen Nonamers (ITDQVPFSV) wurde in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eine eher schwache Immunogenität beobachtet [37]. So gelang die Induktion peptidspezifischer CTL in Ansätzen mit Patientenmaterial bei PARKHURST ET AL. in nur zwei der sieben durchgeführten Versuche [54]. Diese Frequenz scheint bei Verwendung von PMNC gesunder Spender mit ca. 10% erfolgreicher Ansätze noch niedriger zu liegen [75]. In der vorliegenden Arbeit konnte in einem von zwei Ansätzen eine Erkennung sowohl des originalen als auch des modifizierten Peptids nachgewiesen werden. Eine allgemeine Aussage über die Immunogenität läßt sich daraus allerdings aufgrund der geringen Versuchszahlen nicht treffen. Wegen seiner höheren Affinität an MHC-I wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich das modifizierte Peptidnonamer IMDQVPFSV untersucht.

Bei dem Peptid YMDGTMSQV handelt es sich um das posttranslational an Position 3 deaminierte Tyrosinaseepitop T<sub>368-376</sub> [69]. Nach Beobachtungen anderer Gruppen ist die Induktion spezifischer CTL sowohl mit dem direkten Genprodukt als auch mit dem posttranslational veränderten Peptid möglich [3, 34]. Das modifizierte Nonamer zeigt allerdings eine bessere Immunogenität und höhere Affinität zu HLA-A\*0201, weshalb vermutet wird, daß dieses Peptid auch die *in vivo* vorkommende Form darstellt [69]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels dieses Epitopes in 5/5 Versuchen induzierbaren spezifischen CTL erkannten neben dem Stimulatorpeptid auch drei verschiedene Melanomzelllinien. Das melanozytäre Differenzierungsantigen Tyrosinase, aus welchem dieses Peptid isoliert wurde, kann Untersuchungen von CORMIER ET AL. zufolge bei allen primären Melanomen und Melanommetastasen nachgewiesen werden [17, 18] und stellt somit ein gutes Zielantigen für eine Immuntherapie dar.

Das von einem Intron des N-Acetylglucosaminyltransferase V Gens kodierte Dekamer VLPDVFIRCV wies hier ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität auf und war zur Induktion peptidspezifischer CTL geeignet. Das assoziierte Antigen ist

---

nach Angaben von GUILLOUX ET AL. auf gesunden Zellen im Regelfall nicht nachweisbar, wird dagegen aber von ca. 50% der HLA-A2<sup>+</sup> Melanome sowie von einer Reihe anderer maligner Tumoren exprimiert [26]. In den vorliegenden Versuchen wurde jedoch keine der untersuchten Melanomzelllinien von den peptidspezifischen CTL lysiert. In Ermangelung eines entsprechenden Antikörpers konnte der Antigenstatus der verwendeten Melanomzelllinien bezüglich dieses Antigens jedoch nicht überprüft werden, so daß nur vermutet werden kann, daß die untersuchten Zelllinien das Antigen nicht oder nur unzureichend exprimieren. Über die *in vivo* Wirkung GnT-V-spezifischer CTL ist aus anderen Arbeiten bisher nichts bekannt.

Im Gegensatz dazu konnte die Expression des MAGE-3 Antigens bei mindestens einer der in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien durchflußzytometrisch sicher nachgewiesen werden. Laut MARINCOLA ET AL. handelt es sich bei diesem um ein auf ca. 80% der Melanommetastasen exprimiertes Antigen [47]. Obwohl es möglich war, mit dem hoch affinen Nonamer FLWGPRALV in drei von vier Versuchen peptidspezifische CTL zu generieren, zeigten diese keine Erkennung der antigenexprimierenden Melanomzellen. Auch die für einige Melanomzelllinien mögliche Steigerung der MHC-Expression durch IFN- $\gamma$  Präinkubation führte nicht zu einer effizienten Lyse. Ähnliche Beobachtungen machten schon andere Arbeitsgruppen [48, 78]. VALMORI ET AL. kamen in der weiterführenden Untersuchung dieses Phänomens zu dem Ergebnis, daß bei einigen Melanomzelllinien anscheinend ein Fehler in der proteasomalen Spaltung des MAGE-3 Antigens die Bildung eben dieses antigenen Peptides verhindert [77, 78]. Die Eignung für einen immuntherapeutischen Ansatz ist trotz der guten Immunogenität dadurch leider extrem eingeschränkt.

Für das gp100-Peptid KTWGQYWQV wurde in den hier durchgeführten Bindungsassays eine extrem niedrige Affinität zu MHC-I gefunden. Zusätzlich zeigte sich keine ausreichende Immunogenität, um mittels dieses Peptids *in vitro* spezifische CTL zu generieren. Diese Beobachtungen decken sich jedoch



---

nur zum Teil mit Untersuchungen anderer Gruppen, in welchen G<sub>9154</sub> eine relativ hohe MHC-I Affinität aufwies [54, 75] und von aus TIL generierten CTL spezifisch erkannt wurde [37, 60, 65]. Die Induktion peptidspezifischer CTL aus PBL gesunder Spender gelang jedoch auch dort nur bei ca. 10% der Kulturen [75], was eine ähnliche Tendenz aufzeigt wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Der Versuchsumfang ist jedoch hier zu gering, um genauere Aussagen treffen zu können.

Gegen das ebenfalls niedrig affine Tyrosinase-Peptid T<sub>1-9</sub> konnten in der vorliegenden Arbeit keine spezifischen CTL generiert werden. Die geringe MHC-Affinität und Immunogenität wurde in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sowohl für Zellen gesunder Spender als auch für TIL und PMNC von Melanompatienten schon in verschiedenen Arbeiten beschrieben [13, 31, 33, 48, 71].

#### 4.1.1 Beziehung zwischen MHC-Affinität und Immunogenität

Die Versuchsergebnisse weisen auf eine Korrelation zwischen der beobachteten Immunogenität und der MHC-I Affinität der jeweiligen Peptide hin. Diese scheint jedoch keinen proportionalen Charakter zu haben.

Mit niedrig affinen Peptiden (T<sub>1-9</sub>, G<sub>154</sub>) war es den vorliegenden Daten nach in keinem Versuch möglich, spezifische CTL zu induzieren, wogegen intermediär und hoch affine Peptide zur Induktion peptid- und melanomspezifischer CTL geeignet waren. Das Ausmaß der Immunogenität, gemessen an der zytolytischen Aktivität der Effektorzellen, korrelierte dabei allerdings nicht quantitativ mit der Peptidaffinität an MHC-I. Diese Feststellung deckt sich sehr gut mit der in neueren Veröffentlichungen vertretenen Theorie, daß die Immunogenität eines Peptides von der Stabilität der MHC-Peptid-Komplexe abhängig ist, welche zwar eine gewisse Mindestaffinität im Sinne eines Schwellenwertes voraussetzt, ansonsten aber mit dieser in keinem Zusammenhang steht [68, 82].

#### 4.1.2 Charakterisierung der Effektorzellen

Die Untersuchungen des Zytokinspektrums der generierten CTL zeigte eine qualitative Korrelation zwischen dem Nachweis peptidspezifischer CTL im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay und der Sekretion von IFN- $\gamma$  nach Koinkubation mit den entsprechenden Zielzellen. Eine signifikante Sekretion von IL-4 konnte in keiner der IFN- $\gamma$  sezernierenden Kulturen nachgewiesen werden und zeigte sich auch in anderen Kulturen nur als Reaktion auf die Koinkubation mit Negativkontrollen (K562, T2, Na8-Mel). Diese Ergebnisse implizieren, daß es sich bei den Zellen, welche die Lyse vermitteln, um zytotoxische Effektorzellen des Subtyps Tc1 handelt, welche durch Sekretion der Typ I Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie fehlende Sekretion des Typ II Zytokins IL-4 charakterisiert werden können [22]. Das beobachtete Zytokinspektrum schließt jedoch eine Beteiligung CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (des Subtyps Th1) an der Generierung der gezeigten Immunantwort nicht aus. Die Generierung melanomspezifischer CTL aus PMNC war in allen Versuchen ohne vorherige Anreicherung CD8-positiver Zellen möglich. Zusätzlich zeigte sich keine Korrelation zwischen der gemessenen zytolytischen Aktivität im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay und dem durchflußzytometrisch bestimmten Mengenverhältnis von CD8<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> Zellen. Die Notwendigkeit der Anwesenheit von T-Helferzellen für die Induktion und Differenzierung nativer zytotoxischer T-Lymphozyten, wahrscheinlich durch Schaffung eines geeigneten Zytokinmilieus, ist in einer Reihe von Untersuchungen bereits formuliert worden [19, 30].

#### **4.2 Modifikation der Kulturbedingungen für die Generierung spezifischer CTL aus PMNC gesunder Spender**

Offensichtlich bereitet die Generierung melanomspezifischer CTL aus PMNC gesunder Spender mehr Schwierigkeiten als aus TIL oder PMNC von Melanompatienten. Die Frequenz von CTL-Vorläuferzellen im Blut von Melanompatienten scheint durch „*in vivo* priming“ bereits erhöht zu sein [11, 59]. Kulturbedingungen, welche in Studien mit Patientengut etabliert wurden, sind also nicht immer auch geeignet, um CTL aus Zellen gesunder Probanden zu generieren.

#### 4.2.1 Adaptation der Kulturzeit

Für CTL-Kulturen aus TIL oder PMNC von Melanompatienten wird in etablierten Protokollen meist eine Stimulationszeit von 14 Tagen angegeben. Diese scheint für die Generierung einer zytotoxischen Immunantwort durch Zellen gesunder Spender jedoch nicht ideal zu sein, was auch eine mögliche Erklärung für erfolglose Versuche anderer Arbeitsgruppen mit dieser Methode darstellen könnte [31]. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, daß eine Verlängerung der Stimulationszeit bei Kulturen von Melanompatienten zur Steigerung der CTL-Reaktivität führen kann [13]. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch CTL aus Zellen gesunder Probanden von einer gesteigerten Anzahl an Restimulationen im Hinblick auf ihre Spezifität und zytolytische Aktivität profitieren. Während sich in Zytokinmessungen des Kulturüberstandes nach jedem Stimulationszyklus eine Steigerung der IFN- $\gamma$  Konzentration als Zeichen der steigenden Tc1 Aktivität zeigte, nahm die im  $^{51}\text{Cr}$ -Assay gemessene spezifische Lyse bis zur dritten Stimulation zu, um dann, zunächst nur gegenüber den Melanomzellen, eine weitere Woche später auch gegenüber peptidbeladenen T2-Zellen, wieder abzunehmen (s. Tabelle 5, Kapitel 3.0.3). Die Zytotoxizität betreffend wurden ähnliche Beobachtung übereinstimmend schon von PARKHURST ET AL. [54] gemacht. Als optimale Kulturzeit für die Generierung peptidspezifischer Zellen aus PMNC gesunder Spender wurde hier daher ein Zeitraum von 20 Tagen postuliert, innerhalb dessen in wöchentlichen Abständen insgesamt drei Stimulationen durchgeführt wurden.

#### 4.2.2 Adaptation des Stimulationsprotokolls

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß für die Reaktivierung der CTL-Vorläuferzellen von Melanompatienten, die ja quasi zuvor bereits *in vivo* aktiviert wurden, peptidgepulste PMNC ausreichend sind. Dies bedeutet für die entsprechenden Protokolle eine Einsparung an Material, Zeit und Arbeitsaufwand. Auf diese Weise gelingt es allerdings nur selten, spezifische CTL zu generieren, wenn die Ausgangszellen nicht von Melanompatienten sondern von gesunden Spendern stammen. Scheinbar ist in diesen Fällen die

---

Potenz von PMNC in der Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APC) nicht suffizient [31, 33]. Allgemein wird angenommen, daß diese in der Stimulation von T-Lymphozyten weniger potent und effizient sind als „professionelle“ APC. Potente APC sind zum Beispiel dendritische Zellen (DC), die inzwischen in vielen Untersuchungen zur wiederholten Stimulation von CTL eingesetzt werden. Die Generierung dendritischer Zellen *in vivo* gestaltet sich jedoch recht aufwendig und setzt die Verfügbarkeit von großen Blutvolumina oder Knochenmark voraus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß eine einmalige Stimulation nativer T-Zellen mit reifen DC, gefolgt von weiteren Stimulationen durch PMNC, für die Induktion von peptidspezifischen CTL absolut ausreichend ist. Bei den so generierten CTL wurde keine geringere Spezifität als in den wiederholt mit DC stimulierten Kulturen beobachtet. Dieses Protokoll gestattet eine Einsparung an DC, die gleichbedeutend mit einer Einsparung an Ausgangsmaterial ist und den notwendigen Arbeits- und Zeitaufwand deutlich reduziert.

#### 4.2.3 Optimierung der DC-Generierung

DC sind „professionelle“ APC, welche in ihrer unreifen Form auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen spezialisiert sind und in der ausgereiften Form CD8<sup>+</sup> Zellen primen und zur Proliferation anregen können. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß reife DC den unreifen in der Stimulation von CTL überlegen sind [8, 57, 61], was wahrscheinlich unter anderem durch die im reifen Zustand erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion T-Zell stimulierender Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18 bedingt ist [35]. Diese Zellen weisen gegenüber ihrer unreifen Vorstufe zudem den Vorteil auf, daß sie ihre Stabilität über einen längeren Zeitraum bewahren [61] und gegen inhibitorische Faktoren wie IL-10 und VEGF resistent sind.

Für die Induktion tumorspezifischer CTL aus PMNC gesunder Spender formulierten JONULEIT ET AL. in einer aktuellen Veröffentlichung die Notwendigkeit reifer DC als APC [34]. Diese verhindern durch die adäquate Expression kostimulatorischer Moleküle die Entstehung einer Toleranz beim primären Antigenkontakt.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Protokolle zur Generierung dendritischer Zellen ausgetestet. Diese beruhten alle auf der 1994 zuerst beschriebenen Methode der Umdifferenzierung von CD14<sup>+</sup> Zellen (in dieser Arbeit > 18% der PMNC) aus dem peripheren Blut, was die Entnahme von Knochenmark oder großen Blutvolumina zur Isolierung von CD34<sup>+</sup> Zellen unnötig macht. Es zeigte sich für die in dieser Arbeit miteinander verglichenen Protokolle, daß die CD14-Isolation mittels Microbeads und die anschließende achttägige Kultivierung in Anwesenheit von Zytokinen die qualitativ hochwertigsten DC mit Expressionsraten kostimulatorischer Moleküle von 76,19% (CD80) und 94,26% (CD86) lieferte. Dabei erfolgte nach anfänglicher Kultivierung in GM-CSF und IL-4 die Ausreifung mittels eines Zytokincocktails aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE-2 (modifiziert nach JONULEIT ET AL. [35]). Die so generierten Zellen konnten in vollständig ausgereiftem Zustand eingefroren und zur späteren Verwendung aufgetaut werden, ohne ihre Eigenschaften zu verlieren (Daten nicht gezeigt).

Bei anderen Methoden der CD14 Anreicherung zeigten sich niedrigere Expressionsraten an CD80 und CD83 (3,53% respektive 10,03% nach Adhärenzdepletion und 14,86% bzw. 26,10% nach Erythrozyten-Rosetting) sowie starke Verunreinigungen durch CD3<sup>+</sup> Lymphozyten (79,20% respektive 37,02%). Bei Verwendung eines Monozyten-konditionierten Mediums zur Ausreifung der DC wurden, entgegen den Ergebnissen anderer Gruppen [8, 73], ebenfalls nur niedrige Expressionsraten kostimulatorischer Moleküle beobachtet.

### **4.3 Expansion spezifischer CTL**

Für die Verwendung melanomspezifischer CTL im Sinne eines Therapieversuches werden möglichst große Mengen dieser Zellen benötigt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß die CTL-Expansion großen interindividuellen Schwankungen unterworfen ist, wobei es nach dem hier etablierten Protokoll im Mittel zu einer Expansion auf das vier- bis fünffache der Ausgangspopulation kam. Die fortlaufende Stimulation mit dendritischen Zellen ergab demgegenüber gesteigerte Expansionsraten (sechs- bis siebenfach), was sich durch die proliferationsanregende Wirkung reifer DC erklären läßt. Würden

jedoch für jede Stimulation neue DC generiert, so würde dies aufgrund der starken Zelldezimierung bei diesem Verfahren bezogen auf das Gesamtergebnis einen relativen Zellverlust bedeuten.

Eine weitere Möglichkeit, die Expansionsraten von CTL-Kulturen weiter zu steigern sind T-Zell Wachstumsmedien, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen häufig verwendet werden, so zum Beispiel in einer aktuellen Arbeit von OELKE ET AL., in welcher darunter eine 40fache Expansion gezeigt werden konnte [51]. Es bereitet jedoch Schwierigkeiten, diese Medien nach GMP-Richtlinien zu produzieren, was für den Einsatz in Therapieprotokollen Bedingung sein sollte. Im Vorfeld dieser Arbeit gelang die Produktion eines T-Zell konditionierten Mediums (TCM) unter GMP-Bedingungen. Dieses kam aber im schlußendlich in CTL-Kulturen nicht zum Einsatz, da nach Verwendung eines vergleichbaren, käuflich erhältlichen Wachstumsmediums (Lymphocult-T<sup>®</sup>) in Voruntersuchungen zwar eine Steigerung der Expansionsrate auf das mehr als 10fache, jedoch auch eine vermehrte unspezifische Aktivität der CTL beobachtet wurde.

#### **4.4 Konsequenzen für die in vivo Anwendung**

Für die Anwendung dieses Protokolls in einem immuntherapeutischen Ansatz sind GMP-konforme Kulturbedingungen absolut erstrebenswert. In einigen Punkten mußte hier allerdings ein Kompromiß zwischen der Qualität der generierten Zellen und der GMP-Konformität geschlossen werden. Dies betrifft nicht die eigentliche CTL-Kultivierung, aber Teile des DC-Protokolls: Sowohl CD14 Microbeads als auch Bestandteile des zur Ausreifung verwendeten Zytokincocktails sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht in GMP-Qualität erhältlich. Es bleibt zu hoffen, daß wie im Falle der CD34-Microbeads oder IL-2 und GM-CSF die GMP-Zulassung in absehbarer Zeit erfolgt.

Insgesamt ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, mittels eines unter gewissen Einschränkungen GMP-adaptierten Protokolls eine peptidspezifische Immunantwort gegen sechs verschiedene Antigenepitope hervorzurufen. Bei drei der untersuchten Peptide zeigte sich zusätzlich eine Erkennung endogen prozessierten Antigens in Form einer Melanomzell-Lyse, was für den Einsatz in

der klinischen Studie das Hauptkriterium darstellt. Bei den genannten Peptiden handelt es sich um MT<sub>27-35</sub> aus Melan-A/MART1 (AAGIGILTV), G<sub>209-2M</sub> aus gp100 (IMDQVPFSV) und das Tyrosinasepeptid T<sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV).

Die melanomspezifische Zytotoxizität der *ex vivo* generierten CTL soll nach Transfusion in den allogenen Patientenorganismus zu einem Ansprechen des Tumors im Sinne eines „Graft-versus-Tumor“-Effektes beitragen, analog dem für Leukämien beschriebenen Graft-versus-Leukemia-Effekt [16]. Die kombinierte Transfusion von CTL verschiedener Spezifitäten soll im geplanten Therapieversuch zusätzlich der Entstehung von Tumor-escape-Mechanismen entgegenwirken.

Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine effektive therapeutische Wirkung *in vivo* hoffen.

---

## 5. Literaturverzeichnis

1. ALDERSON MR, SASSENFELD HM, WIDMER MB (1990) Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *J Exp Med* **172**: 577-587.
2. ALIJAGIC S, MOLLER P, ARTUC M, JURGOVSKY K, CZARNETZKI BB, SCHADENDORF D (1995) Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol* **25**: 3100-3107.
3. BAKKER ABH, MARLAND G, DE BOER AJ, HUIJBENS RJF, DANEN EHJ, ADEMA GJ, FIGDOR CG (1995) Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells *in vitro*. *Cancer Res* **55**: 5330-5334.
4. BAKKER ABH, SCHREURS MWJ, DE BOER AJ, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA, ADEMA GJ, FIGDOR CG (1994) Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **179**: 1005-1009.
5. BAR MH, SZNOL M, ATKINS MB ET AL. (1990) Metastatic malignant melanoma treated with combined bolus and continuous infusion interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *J Clin Oncol* **8**: 1138-1147.
6. BECKER JC, KÄMPGEN E, BRÖCKER E-B (2000) Classical Chemotherapy of metastatic melanoma. *Clin Exp Dermatol* **25**: 503-508.
7. BELLI F, ARIENTI F, SULE-SUSO J, CLEMENTE C, MASCHERONI L, CATTELAN A, SANANTONIO C, GALLINO GF, MELANI C, RAO S, COLOMBO MP, MAIO M, CASCINELLI N, PARMIANI G (1997) Active immunization of metastatic melanoma patients with interleukin-2-transduced allogeneic melanoma cells: evaluation of efficacy and tolerability. *Cancer Immunol Immunother* **44**: 197-203.
8. BENDER A, SAPP M, SCHULER G, STEINMANN RM, BHARDWAJ N (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* **196**: 121-135.



- 
9. BERD D, MAGUIRE HCJ, SCHUCHTER LM, HAMILTON R, HAUCK WW, SATO T, MASTRANGELO MJ (1997) Autologous hapten-modified melanoma vaccine as postsurgical adjuvant treatment after resection of nodal metastases. *J Clin Oncol* **15**: 2359-2370.
  10. BRICHARD V, VAN PEL A, WÖLFEL T, WÖLFEL C, DE PLAEN E, LETHÉ B, COULIE P, BOON T (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* **178**: 489-495.
  11. CELIS E, TSAI V, CRIMI C, DEMARS R, WENTWORTH PA, CHESNUT RW, GREY HM, SETTE A, SERRA HM (1994) Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2105-2109.
  12. CERUNDOLO V, ALEXANDER J, ANDERSON K, LAMB C, CRESSWELL P, MCMICHAEL A, GOTCH F, TOWNSEND A (1990) Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* **345**: 449-452.
  13. CHEN Q, JACKSON H, GIBBS P, DAVIS ID, TRAPANI J, CEBON J (1998) Spontaneous T cell responses to melanoma differentiation antigens from melanoma patients and healthy subjects. *Cancer Immunol Immunother* **47**: 191-197.
  14. CHOU YK, BOURDETTE DN, BARNES D, FINN TP, MURRAY S, UNSICKER L, ROBEY I, WHITHAM RH, BUENAFE AC, ALLEGRETTA M, OFFNER H, VANDENBARK AA (1999) IL-7 enhances Ag-specific human T cell response by increasing expression of IL-2R  $\alpha$  and  $\gamma$  chains. *J Neuroimmunol* **96**: 101-111.
  15. CLAY TM, CUSTER MC, MCKEE MD, PARKHURST M, ROBBINS PF, KERSTANN K, WUNDERLICH J, ROSENBERG SA, NISHIMURA MI (1999) Changes in the fine specificity of gp100<sub>(209-217)</sub>-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J Immunol* **162**: 1749-1755.
  16. COLLINS JR. RH, SHPILBERG O, DROBYSKI WR, PORTER DL, GIRALT S, CHAMPLIN R, GOODMAN SA, WOLFF SN, HU W, VERFAILLIE C, LIST A, DALTON W, OGNOSKIE N, CHETRIT A, ANTIN JH, NEMUNAITIS J (1997) Donor leukocyte

- infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* **15**: 433-444.
17. CORMIER JN, ABATI A, FETSCH P, HIJAZI YM, ROSENBERG SA, MARINCOLA FM, TOPALIAN SL (1998) Comparative analysis of the *in vivo* expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother* **21**: 27-31.
18. CORMIER JN, HIJAZI Y, ABATI A ET AL. (1998) Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma *in vivo*. *Int J Cancer* **75**: 517-524.
19. DEETHS MJ, KEDL RM, MESCHER MF (1999) CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol* **163**: 102-110.
20. DILLMANN RO, OLDHAM RK, BARTH NM ET AL. (1991) Continuous interleukin-2 and tumor-infiltrating lymphocytes as treatment of advanced melanoma: A National Biotherapy Study Group trial. *Cancer* **68**: 1-8.
21. FERNANDEZ-VINA MA, FALCO M, YIPING S, STASTNY P (1992) DNA typing for HLA class I alleles: I. Subsets of HLA-A2 and -A28. *Human Immunol* **33**: 163-173.
22. FOWLER DH, GRESS RE (1998) CD8+ T cells of Tc2 phenotype mediate a GvL effect and prevent marrow rejection. *Vox Sang* **74**: 331-340.
23. FRITSCH P (1997) Malignes Melanom. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph. U, *Pathologie*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 1. Auflage 1997, S 927-929.
24. GARBE C, SCHAUMBURG-LEVER G (1997) Klinik und Histologie des malignen Melanoms. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg.), *Dermatologische Onkologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1. Auflage 1997, S 247-270.
25. GROB JJ, DRENO B, DE LA SALMONIÈRE P, DELAUNAY M, CUPISSOL D, GUILLOT B, SOUTEYRAND P, SASSOLAS B, CESARINI J-P, LIONNET S, LOK C, CHASTANG C, BONERANDI JJ (1998) Randomized trial of interferon  $\alpha$ -2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1,5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet* **351**: 1905-1910.

- 
26. GUILLOUX Y, LUCAS S, BRICHARD VG, VAN PEL A, VIRET C, DE PLAEN E, BRASSEUR F, LETHÉ B, JOTEREAU F, BOON T (1996) A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the *N*-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* **183**: 1173-1183.
27. HÄFFNER AC, GARBE C, BURG G, BÜTTNER P, ORFANOS CE, RASSNER G (1992) The prognosis of primary and metastasising melanoma. An evaluation of the TNM classification in 2,495 patients. *Br J Cancer* **66**: 856-861.
28. HAUSCHILD A, VOLKENANDT M, GARBE C (2000) Adjuvante medikamentöse Therapie des malignen Melanoms. *Dtsch Med Wschr* **125**: 1272-1278.
29. HU X, CHAKRABORTY NG, SPORN JR, KURTZMAN SH, ERGIN MT, MUKHERJI B (1996) Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting-cell based vaccine. *Cancer Res* **56**: 2479-2483.
30. HUNG K, HAYASHI R, LAFOND-WALKER A, LOWENSTEIN C, PARDOLL D, LEVITSKY H (1998) The central role of CD4<sup>+</sup> T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* **188**: 2357-2368.
31. JÄGER E, BERNHARD H, ROMERO P, RINGHOFFER M, ARAND M, KARBACH J, ILSEMANN C, HAGEDORN M, KNUTH A (1996) Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides *in vivo*: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* **66**: 162-169.
32. JÄGER E, MAEURER M, HÖHN H, KARBACH J, JÄGER J, ZIDIANAKIS Z, BAKHSHANDEH-BATH A, ORTH J, NEUKIRCH C, NECKER A, REICHERT TE, KNUTH A (2000) Clonal expansion of Melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides. *Int J Cancer* **86**: 538-547.
33. JÄGER E, RINGHOFFER M, ARAND M, KARBACH J, JÄGER D, ILSEMANN C, HAGEDORN M, OESCH F, KNUTH A (1996) Cytolytic T cell reactivity against melanoma-associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals. *Mel Res* **6**: 419-425.

- 
34. JONULEIT H, GIESECKE A, KANDEMIR A, PARAGNIK L, KNOP J, ENK AH (2000) Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells. *Arch Dermatol Res* **292**: 325-332.
  35. JONULEIT H, KÜHN U, MÜLLER G, STEINBRINCK K, PARAGNIK L, SCHMITT E, KNOP J, ENK AH (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27**: 3135-3142.
  36. KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, DELGADO CH, ROBBINS PF, RIVOLTINI L, TOPALIAN SL, MIKI T, ROSENBERG SA (1994) Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3515-3519.
  37. KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, JENNINGS C, SAKAGUCHI K, KANG X-Q, SOUTHWOOD S, ROBBINS PF, SETTE A, APPELLA E, ROSENBERG SA (1995) Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 associated with *in vivo* tumor regression. *J Immunol* **154**: 3961-3968.
  38. KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, SAKAGUCHI K, ROBBINS PF, RIVOLTINI L, YANNELLI JR, APPELLA E, ROSENBERG SA (1994) Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **180**: 347-352.
  39. KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA (1997) Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp100 and their use for immuno-gene therapy. *Intern Rev Immunol* **14**: 173-192.
  40. KIRKWOOD JM, STRAWDERMANN MH, ERNSTHOFF MS ET AL. (1996) Interferon- $\alpha$ 2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* **14**: 7-17.
  41. KOMMISSION KLINISCHE STUDIEN DER ARBEITSGEMEINSCHAFT DERMATOLOGISCHE ONKOLOGIE (1999) Aktuelle Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie zur Hochdosistherapie mit Interferon  $\alpha$ 2b. *Hautarzt* **50**: 395-397.

- 
42. KRAUSA P, BRYWKA III M, SAVAGE D, HUI KM, BUNCE M, NGAI JLF, TEO DLT, ONG YW, BAROUCH D, ALLSOP CEM, HILL AVS, MCMICHAEL AJ, BODMER JG, BROWNING MJ (1995) Genetic polymorphism within HLA-A\*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens* **45**:223-231.
43. LANZA L, PEIRANO L, BOSCO O, CONTINI P, FILACI G, SETTI M, PUPPO F, INDIVERI F, SCUDELETTI M (1995) Interferons up-regulate with different potency HLA class I antigen expression in M14 human melanoma cell line. Possible interaction with glucocorticoid hormones. *Cancer Immunol Immunother* **41**: 23-28.
44. LYNCH DH, MILLER RE (1994) Interleukin 7 promotes long-term *in vitro* growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy *in vivo*. *J Exp Med* **179**: 31-42.
45. MACKENSEN A, CARCELAIN G, VIEL S ET AL. (1994) Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* **93**: 1397-1402.
46. MARCHAND M, VAN BAREN N, WEYNANTS P, BRICHARD V, DRENO B, TESSIER M-H, RANKIN E, PARMIANI G, ARIENTI F, HUMBLET Y, BOURLOND A, VANWIJCK R, LIENARD D, BEAUDUIN M, DIETRICH PY, RUSSO V, KERGER J, MASUCCI G, JÄGER E, DE GREVE J, ATZPODIEN J, BRASSEUR F, COULIE PG, VAN DER BRUGGEN P, BOON T (1999) Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* **80**: 219-230.
47. MARINCOLA FM, HIJAZI YM, FETSCH P, SALGALLER ML, RIVOLTINI L, CORMIER J, SIMONIS TB, DURAY PH, HERLYN M, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA (1996) Analysis of expression of the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and *in situ* lesions. *J Immunother* **19**: 192-205.
48. MATEO L, GARDNER J, CHEN Q, SCHMIDT C, DOWN M, ELLIOT SL, PYE SJ, FIRAT H, LEMONNIER FA, CEBON J, SUHRBIER A (1999) An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J Immunol* **163**: 4058-4063.

- 
49. MOSSE CA, MEADOWS L, LUCKEY CJ, KITTESEN DJ, HUCZKO EL, SLINGLUFF JR. CL, SHABANOWITZ J, HUNT DF, ENGELHARD VH (1998) The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J Exp Med* **187**: 37-48.
50. NESTLE FO, ALIJAGIC S, GILLIET M, SUN Y, GRABBE S, DUMMER R, BURG G, SCHADENDORF D (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**: 328-332.
51. OELKE M, MOEHRLE U, CHEN J-L, BEHRINGER D, CERUNDOLO V, LINDEMANN A, MACKENSEN A (2000) Generation and purification of CD8+ Melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive transfer in tumor immunotherapy. *Clin Can Res* **6**: 1997-2005.
52. ORFANOS CE, JUNG EG, RASSNER G, WOLFF HH, GARBE C (1994) Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms der Haut. Stand 1993 / 94. *Hautarzt* **45**: 285-291.
53. OSTANKOVICH M, LE GAL F-A, CONNAN F, CHASSIN D, CHOPPIN J, GUILLET J-G (1997) Generation of Melan-A/MART-1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from human naive precursors: helper effect requirement for efficient primary cytotoxic T lymphocyte induction *in vitro*. *Int J Cancer* **72**: 987-994.
54. PARKHURST MR, SALGALLER ML, SOUTHWOOD S, ROBBINS PF, SETTE A, ROSENBERG SA, KAWAKAMI Y (1996) Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *J Immunol* **157**: 2539-2548.
55. PEHAMBERGER H, SOYER HP, STEINER A, KOFLER R, BINDER M, MISCHER P, PACHINGER W, AUBÖCK J, FRITSCH P, KERL H, WOLFF K (1998) Adjuvant interferon  $\alpha$ -2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **16**: 1425-1429.

- 
56. RASSNER G (2000) Erkrankungen des Pigmentsystems. In: Rassner G, *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. Urban & Fischer, München Jena, 6. Auflage 2000. S 239-251.
57. REDDY A, SAPP M, FELDMAN M, SUBKLEWE M, BHARDWAJ N (1997) A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* **90**: 3640-3646.
58. RESTIFO NP, KAWAKAMI Y, MARINCOLA F ET AL. (1993) Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogen therapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* **14**: 182-190.
59. RIVOLTINI L, KAWAKAMI Y, SAKAGUCHI K, SOUTHWOOD S, SETTE A, ROBBINS PF, MARINCOLA FM, SALGALLER ML, YANNELLI JR, APPELLA E, ROSENBERG SA (1995) Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by *in vitro* stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol* **154**: 2257-2265.
60. RIVOLTINI L, LOFTUS DJ, BARRACCHINI K, ARIENTI F, MAZZOCCHI A, BIDDISON WE, SALGALLER ML, APPELLA E, PARMIANI G, MARINCOLA FM (1996) Binding and presentation of peptides derived from melanoma antigens MART-1 and glycoprotein-100 by HLA-A2 subtypes. Implications for peptide-based immunotherapy. *J Immunol* **156**: 3882-3891.
61. ROMANI N, REIDER D, HEUER M, EBNER S, KÄMPGEN E, EIBL B, NIEDERWIESER D, SCHULER G (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* **196**: 137-151.
62. ROSENBERG SA, LOTZE MT, YANG JC, AEBERSOLD PM, LINEHAN WM, SEIPP CA, WHITE DE (1989) Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* **210**: 474-485.
63. ROSENBERG SA, YANG JC, SCHWARZENTRUBER DJ, HWU P, MARINCOLA FM, TOPALIAN SL, RESTIFO NP, DUDLEY ME, SCHWARZ SL, SPIESS PJ, WUNDERLICH JR, PARKHURST MR, KAWAKAMI Y, SEIPP CA, EINHORN JH, WHITE

- DE (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* **4**: 321-327.
64. ROSENBERG SA, ZHAI Y, YANG JC, SCHWARZENTRUBER DJ, HWU P, MARINCOLA FM, TOPALIAN SL, RESTIFO NP, SEIPP CA, EINHORN JH, ROBERTS B, WHITE DE (1998) Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* **90**: 1894-1900.
65. SALGALLER ML, AFSHAR A, MARINCOLA FM, RIVOLTINI L, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA (1995) Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated *in vitro* with synthetic peptides. *Cancer Res* **55**: 4972-4979.
66. SCHENDEL DJ, WANK R (1981) Production of human T cell growth factor. *Human Immunol* **2**: 325-332.
67. SCHILLER JH, HANK J, STORER B ET AL. (1993) A direct comparison of immunological and clinical effects of interleukin-2 with and without interferon-alpha in humans. *Cancer Res* **53**: 1286-1292.
68. SETTE A, VITIELLO A, REHERMAN B, FOWLER P, NAYERSINA R, KAST WM, MELIEF CJM, OSEROFF C, YUAN L, RUPPERT J, SIDNEY J, DEL GUERCIO M-F, SOUTHWOOD S, KUBO RT, CHESNUT RW, GREY HM, CHISARI FV (1994) The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* **153**: 5586-5592.
69. SKIPPER JCA, HENDRICKSON RC, GULDEN PH, BRICHARD V, VAN PEL A, CHEN Y, SHABANOWITZ J, WOLFEL T, SLINGLUFF JR. CL, BOON T, HUNT DF, ENGELHARD VH (1996) An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* **183**: 527-534.
70. SLAVIN S, NAGLER A, NAPARSTEK E, KAPELUSHNIK Y, AKER M, CIVIDALLI G, VARADI G, KIRSCHBAUM M, ACKERSTEIN A, SAMUEL S, AMAR A, BRAUTBAR C, BEN-TAL O, ELDOR A, OR R (1998) Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone



- marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* **91**: 756-763.
71. SPAGNOLI GC, SCHAEFER C, WILLIMANN TE, KOCHER T, AMOROSO A, JURETIC A, ZUBER M, LUSCHER U, HARDER F, HEBERER M (1995) Peptide-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp100 and tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients. *Int J Cancer* **64**: 309-315.
72. THATCHER N, MENE A, BANERJEE SS, CRAIG P, GLEAVE N, ORTON C (1986) Randomized study of corynebacterium parvum adjuvant therapy following surgery for (stage II) melanoma [abstract]. *Br J Surg* **73**: 111-115.
73. THURNER B, RÖDER C, DIECKMANN D, HEUER M, KRUSE M, GLASER A, KEIKAVOUSSI P, KÄMPGEN E, BENDER A, SCHULER G (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* **223**: 1-15.
74. TOWNSEND A, BODMER H (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* **7**: 601-624.
75. TSAI V, SOUTHWOOD S, SIDNEY J, SAKAGUCHI K, KAWAKAMI Y, APPELLA E, SETTE A, CELIS E (1997) Identification of subdominant CTL epitopes of the gp100 melanoma-associated tumor antigen by primary *in vitro* immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *J Immunol* **158**: 1796-1802.
76. VALMORI D, FONTENEAU J-F, LIZANA CM, GERVOIS N, LIÉNARD D, RIMOLDI D, JONGENEEL V, JOTEREAU F, CEROTTINI J-C, ROMERO P (1998) Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL *in vitro* by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* **160**: 1750-1758.
77. VALMORI D, GILEADI U, SERVIS C, DUNBAR PR, CEROTTINI J-C, ROMERO P, CERUNDOLO V, LÉVY F (1999) Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* **189**: 895-905.
78. VALMORI D, LIÉNARD D, WAANDERS G, RIMOLDI D, CEROTTINI J-C, ROMERO P (1997) Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients. *Cancer Res* **57**: 735-741.

- 
79. VAN DER BRUGGEN P, BASTIN J, GAJEWSKI T, COULIE PG, BOEL P, DE SMET C, TRAVERSARI C, TOWNSEND A, BOON T (1994) A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol* **24**: 3038-3043.
80. VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, VAN DEN EYNDE B, KNUTH A, BOON T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**: 1643-1647.
81. VAN ELSAS A, AARNOUDSE C, VAN DER MINNE CE, VAN DER SPEK CW, BROUWENSTIJN N, OSANTO S, SCHRIER PI (1997) Transfection of IL-2 augments CTL Response to human melanoma cells *in vitro*: immunological characterization of a melanoma vaccine. *J Immunother* **20**: 343-353.
82. VAN ELSAS A, VAN DER BURG SH, VAN DER MINNE CE, BORGHİ M, MOURER JS, MELIEF CJM, SCHRIER PI (1996) Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A\*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. *Eur J Immunol* **26**: 1683-1689.
83. VERONESI U, ADAMUS J, AUBERT C ET AL. (1982) A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. *N Engl J Med* **307**: 913-916.
84. WÖLFEL C, DREXLER I, VAN PEL A, THRES T, LEISTER N, HERR W, SUTTER G, HUBER C, WÖLFEL T (2000) Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int J Cancer* **88**: 432-438.
85. WÖLFEL T, VAN PEL A, BRICHARD V, SCHNEIDER J, SELIGER B, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K-H, BOON T (1994) Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Europ J Immunol* **24**: 759-764.

## 6. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Kienast für die Bereitstellung des Themas und die großzügige Überlassung von Material und Arbeitsplatz.

Frau Dr. med. Annette Nolte möchte ich für die engagierte Betreuung und das motivierende Interesse an meinen schriftlichen Entwürfen besonders danken. Ihre fachliche Erfahrung und ständige Diskussionsbereitschaft haben sehr zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Für die tolle Zusammenarbeit und die daraus entstandenen Freundschaften danke ich besonders Colette Hünefeld und Thilo Kaiser. Desweiteren möchte ich Astrid, Beate, Berno, Birgit, Christian, Christiane, Simone, Thorsten und Torsten erwähnen, mit denen ich eine schöne Zeit in der „Alten Medizin“ und im „KMT-Labor“ verbracht habe.

Frau Dr. rer. nat. Teresa Padros hat mich in die Geheimnisse der statistischen Auswertung eingeweiht, wofür ihr ein besonderer Dank gebührt.

Ich danke allen Münsteraner Freunden für die schöne Studienzeit, besonders dankbar bin ich Jan für seine Unterstützung in allen Lebenslagen. Meinen Mitbewohnern Kristina und Matthias danke ich für ihr Verständnis und ihre Hilfe beim Umgang mit Computer und Drucker.

Meiner Familie gilt ein ganz spezieller Dank. Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir jederzeit mit fachlichem und menschlichem Rat zur Seite standen ebenso wie meinen Geschwistern Kristina, Philipp und Katharina. Für ihre privaten und beruflichen Lebensziele wünsche ich ihnen viel Erfolg.

Ich danke Helmut, der mich immer wieder auffängt und mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit den Rücken gestärkt hat.