INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangen der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Katrin Ehlert
aus Arnsberg (Westfalen)

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Thema:

Tumor-reaktive T-Zellen des Knochenmarks - Neue Perspektiven für die adoptive Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinoms

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirrmacher

Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Volker Schirrmacher bedanken, der nicht nur die Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung ermöglichte, sondern der durch ständige Diskussionen und Anregungen die Phase I Studie entscheidend vorangebracht hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Nils Metzler-Nolte, der sich ganz spontan bereit erklärte, die Arbeit zu begutachten und den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Philipp Beckhove für seine stete Unterstützung und konstruktive Kritik, sowie für sein Vertrauen in meine Arbeitskraft bedanken. Darüber hinaus hat sein breites immunologisches und medizinisches Fachwissen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Florian Schütz, der als leitender Arzt der Mammakarzinom-Studie die Patientinnen rekrutierte, die Knochenmarkaspirationen durchführte und schließlich die therapeutische Applikation in der Universitätsfrauenklinik vornahm. Ohne sein hohes Engagement und seine Risikobereitschaft wäre die Studie nicht durchführbar gewesen. (Unsere erste gemeinsame Knochenmarksaspiration werde ich nie vergessen ;-))

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Jan Müller-Berghaus bedanken, der sich unermüdlich für unsere Kooperation mit der Dermato-Onkologie des Universitätsklinikums Mannheims eingesetzt hat. Danke, für viele interessante Diskussionen und Ratschläge auch über das Wissenschaftliche hinaus. Ebenso haben Herr Prof. D. Schadendorf und Dr. Selma Ugurel entscheidend zum Erfolg des Melanom-Projekts beigetragen.

Dank schulde ich auch Herrn PD Gerd Mikus aus der Abteilung Klinische Pharmakologie der Medizinischen Klinik der Universität Heidelberg für seine kompetente Unterstützung bei der Etablierung des Modells zur Testung zytostatischer Wirkstoffe *in vitro*.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Mariana Bucur für die Einführung in die verschiedenen immunologischen Techniken und die Organisation unseres gesamten Laborbetriebes bedanken. Ein Dank geht auch an das LiSi-Team, das mich tatkräftig unterstützt hat, wenn ich es mal nicht geschafft habe, an zwei Orten gleichzeitig zu sein.

Des weiteren möchte ich mich auch bei den zahlreichen Praktikanten und Praktikantinnen, insbesondere bei Herrn Manuel Ritter bedanken. Sie alle haben mit ihrem Arbeitseifer einen Beitrag zu den verschiedenen Projekten geleistet und konnten mich mit Hilfe interessanter Fragen und Anregungen vor der totalen Vereinsamung im Otto-Meyerhof-Zentrum bewahren.

Schließlich danke ich auch allen Freunden und Arbeitskollegen für die ungezwungene Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen interessanten Gesprächsrunden. Jetzt weiß ich bestens Bescheid über Hasen- und Kinderaufzucht, die angesagtesten Trends aus Schanghai, über Brigitte-Diäten und Fahrrad-Unfallprophylaxe sowie über die besten Motorrad-Routen durch Spanien. Was ich bis heute nicht weiß ist, wie man ein Word-Dokument richtig formatiert und warum G4 und Drucker immer nur in meiner Gegenwart unerklärliche Arbeitsausfälle zeigten. Danke für die unglaubliche Geduld und Hilfsbereitschaft aller Mitwirkenden.

Abkürzungsverzeichnis

aa	*amino acid*
Abb.	Abbildung
ADI	adoptive Immuntherapie
AJCC	*American Joint Commitee on Cancer*
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ASI	aktiv-spezifische Immunisierung
ATP	Adenosin-Triphosphat
B	Belgien
BM	*bone marrow*
BSA	*bovine serum albumin*
bzw.	beziehungsweise
ca.	*circa*
CCR7	*chemokine (C-C motif) receptor 7*
CD	*cluster of differentiation*
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CH	Schweiz
CHT	Chemotherapie
CM	*Central Memory*
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5´-Fluoruracil
CML	Chronische Myeloische Leukämie
D	Deutschland
d	*dies*, Tag
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	*Dulbecco's modifiziertes eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle(n)
EBV	Epstein Barr Virus
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EDC	Epirubicin, Docetaxel, Cyclophosphamid
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELISpot	*Enzyme-linked immunosorbent spot*
EM	*Effector Memory*
et al.	*et alii*
F	Frankreich
FACS	*fluorescence activated cell sorter*
FasL	Fas-Ligand
Fc	*fragment crystallizable*
FI	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	*forward scatter*
g	Gramm
G	*Grading*

GEDoc	Gemcitabin, Epirubicin, Docetaxel
GM-CSF	*granulocyte and monocyte colony stimulating factor*
GTZ	Gedächtnis-T-Zelle(n)
h	*hora*(*s*), Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HLA	*human leukocyte antigen*
HPV	humanpathogenes Papillomvirus
HT	Hormontherpaie
i. p.	intraperitonal
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ins.	Insulin
KM	Knochenmark
l	Liter
Lab.	*Laboratories*
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
m	*mensis,* Monat
M	Molar (mol/l)
MAGE	*Melanoma associated antigen*
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	*major histocopatibility complex*
min.	Minuten
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNZ	mononukleäre Zellen
MPC	*Magnetic particle concentrator*
MUC	Mucin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Normal
NAD^+/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
$NADP^+$/NAPDH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDV	*Newcastle Disease* Virus
NK	Natürliche Killer
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NOD/SCID	*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*
NED	*no evidence of disease*
NTZ	naive T-Zelle(n)
PB	peripheres Blut
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blut
PBS	*phosphate buffered saline*
PD	*progressive disease*

PGE_2	Prostaglandin E_2
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
S	Schweden
s. c.	subkutan
SD	*stable disease*
SEB	*Staphylococcus* Enterotoxin B
sog.	sogenannte
SSC	*side scatter*
T/ TU	Tumor
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tc	zytotoxische T-Zelle(n)
TGF	*Transforming growth factor*
T_h	T-Helferzellen
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TM	*Trademark*
TNF	Tumornekrosefaktor
TZ	T-Zelle(n)
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	*Units*
u.a.	und andere
USA	*United States of America*
v/v	*volume per volume*
w/v	*weight per volume*
z. B.	zum Beispiel
ZTZ	zytotoxische T-Zelle(n)
z. Z.	zum Zeitpunkt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Die T-Zellvermittelte Immunität 1
1.1.1 Von der Antigenerkennung zur T-Zellaktivierung 2
1.1.2 Eigenschaften bewaffneter Effektorzellen 2
1.1.3 Das immunologisches T-Zellgedächtnis 4
1.2 Das Maligne Melanom 5
1.3 Das Mammakarzinom 6
1.3.1 Die systemische Therapie des Mammakarzinoms 7
1.3.2 Die Auswirkungen systemischer Therapien auf die Zellen des Immunsystems 8
1.4 Tumorimmunologie 10
1.4.1 Die Induktion Tumor-gerichteter T-Zellantworten 12
1.4.2 Immuntherapien humaner Malignome 13
1.4.3 Tumor-reaktive Gedächtniszellen des Knochenmarks 14
1.5 Aufgabenstellung 17

2. Material 19
2.1 Geräte 19
2.2 Verbrauchsmaterialien 20
2.3 Chemikalien 21
2.4 Zellen, Zellkultivierung und –Anreicherung 22
2.4.1 Etablierte humane Tumorzelllinien 22
2.4.2 Medien und Mediensupplemente 22
2.4.3 Zytokine 23
2.4.4 Dynabeads 23
2.5 Quantitative und qualitative immunologische Methoden 24
2.5.1 Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte und unkonjugierte Antikörper 24
2.5.2 Proteine und Peptide 24
2.5.3 ELISpot-Kits 25
2.5.4 ELISA-Kits 25
2.6 Zusätzliche Software 25

3. Methoden 27
3.1 Zellbiologische Methoden 27
3.1.1 Lösungen und Puffer 27
3.1.2 Medien und Mediensupplemente 27
3.2 Kultivierung von Zellen 28
3.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen 28
3.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität 29
3.3 Proteinchemische Methoden 29
3.3.1 Herstellung von Gewebslysat 29
3.3.2 Herstellung von Zellysaten 29
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 30
3.4 Analytische immunbiologische Methoden 30
3.4.1 Lösungen und Medien 30
3.4.2 Klinisches Material von Malignompatienten 31

3.4.3 Isolierung und Kultivierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark 32
3.4.4 Isolierung spezifischer Immunzellpopulationen über Zelloberflächenmoleküle 32
3.4.4.1 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads® 33
3.4.4.2 Anreicherung von Gedächtnis- und naiven T-Zellen mittels Dynabeads® 33
3.4.4.3 Anreicherung Dendritischer Zellen mittels Dynabeads® 34
3.4.5 Antigenbeladung Dendritischer Zellen 34
3.4.6 Durchflußzytometrie 35
3.4.9.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen 36
3.4.9.2 Nachweis von toten Zellen mittels Propidiumiodid-Inkorporation 36
3.4.9.3 Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Phosphatidylserin-Färbung durch Annexin V 36
3.4.9.4 Nachweis von HLA-A2-exprimierenden Lymphozyten 37
3.4.9.5 Nachweis von Oberflächenmoleküle auf humanen Dendritischen Zellen 37
3.4.7 ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*) 38
3.4.8 ELISpot-Test (*enzyme-linked immunospot assay*) 39
3.5 Das CMF *In Vitro*-Protokoll 40
3.6 Therapeutische immunbiologische Methoden 44
3.6.1 Medien 44
3.6.2 Reaktivierung Patienten-eigener Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen 45
3.6.3 Hygienische Überwachung 45
3.6.4 Applikation der therapeutischen Zellen 46
3.7 Ethikvoten 46

4. Ergebnisse 47
4.1 Der Einfluss des CMF-Therapieregimes auf humane T-Lymphozyten *in vitro* 47
4.2 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen neoadjuvant, zytostatisch behandelter Mammakarzinompatientinnen 54
4.3 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen adjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen 58
4.3.1 Adjuvante Chemotherapie 58
4.3.2 Adjuvante Hormontherapie 63
4.3.3 Korrelation der phänotypischen Charakterisierung und Funktionalität von T-Gedächtniszellen des Knochenmarks nach adjuvanter Therapie 67
4.4 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen palliativ behandelter Mammakarzinompatientinnen im metastasierten Stadium 69
4.5 Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinom mittels Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks 73
4.5.1 Frequenzbestimmung Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen vor der adoptiven Immuntherapie 74
4.5.2 Reaktivierung Tumor-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen mittels autologer Dendritischer Zellen 75
4.5.2.1 Qualitative Analyse Dendritischer Zellen nach 72-stündiger Stimulationskultur 77
4.5.2.2 Phänotypische Charakterisierung Antigen-beladener Dendritischer Zellen im Verlauf der Stimulationskultur mit autologen, antigenspezifischen T-Zellen 81

4.5.2.3 Qualitative Analyse der KM-T-Zellen nach Stimulationskultur mit Tumorantigen-präsentierenden Dendritischen Zellen 85
4.5.2.4 Charakterisierung des Zytokinmilieus der therapeutischen Stimulationskulturen 89
4.5.3 Evaluierung der Hauptzielkriterien der Therapiestudie 95
4.5.3.1 Durchführbarkeit der Phase I Studie 95
4.5.3.2 Evaluierung der Toxizität 95
4.5.4 Evaluierung des immunologischen Ansprechens nach adoptivem T-Zelltransfer 96
4.5.4.1 Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität im peripheren Blut 96
4.5.4.2 Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität im Knochenmark 103
4.5.4.3 Perforin-reaktive T-Zellen im Blut und Knochenmark 104
4.5.4.4 Zusammenfassende Analyse des immunologischen Ansprechens 106
4.5.5 Evaluierung des klinischen Ansprechens aufgrund von Tumorverlaufs-parametern 111
4.6 Der Effekt von Interleukin 7 und Interleukin 15 auf Tumor-reaktive Gedächtniszellen des Knochenmarks *in vitro* 114
4.7 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit Malignem Melanom 117

5. Diskussion 123
5.1 Systemische Therapien des Mammakarzinoms beeinflussen die Vitalität und Tumor spezifische Reaktivität von Gedächtnis-T-Zellen 123
5.1.1 Die Zytostatika-Behandlung *in vitro* induziert eine selektive Reduktion der vitalen Gedächtniszellpopulation 123
5.1.2 Eine Tumor-spezifische Reaktivität der KM-T-Zellen ist mit einer relativen Zunahme des $CD4^+$ Gedächtniszellanteils im Knochenmark assoziiert 126
5.1.3 Die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen nach neoadjuvanter sowie nach adjuvanter Chemotherapie ist deutlich reduziert 128
5.1.4 Eine Tumor-spezifische KM-T-Zellreaktivität kann im metastasierten Stadium der Erkrankung in weniger als 25 % der Patientinnen nachgewiesen werden 132
5.2 Reaktivierte Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks – ein vielversprechender Ansatz einer neuartigen adoptiven T-Zelltherapie 135
5.2.1 Die therapeutische Stimulationskultivierung induziert eine Zunahme aktivierter Effektor/Gedächtnis-T-Zellen 138
5.2.2 Die nach adoptivem Transfer nachweisbare Tumor-Reaktivität im peripheren Blut spricht für eine massive Expansion der therapeutischen Zellen *in vivo* 140
5.2.3 Der adoptive T-Zelltransfer induziert möglicherweise eine Mobilisierung Tumor-reaktiver Gedächtniszellen bei ADI-reaktiven Patientinnen 144
5.2.5 Das ADI-Ansprechen korreliert mit dem Erkrankungsstadium der therapierten Patientinnen 145
5.3 Tumor-reaktive T-Zellen des Knochenmarks beim Malignen Melanom 148
5.4 Die Entstehung Tumor-reaktiver T-Zellen: Ein Vergleich von Mammakarzinom und Malignem Melanom 149

6. Literaturverzeichnis 153

7. Anhang 168
7.1 Zytostatische Therapieregime 168
7.1.1 Gemcitabin/ Epirubicin/ Docetaxel (GEDoc) 168
7.1.2 Cyclophosphamid/ Methotrexat/ 5´-Fluoruracil (CMF) 168
7.1.3 Epirubicin/ Cyclophosphamid (EC) 169
7.1.4 Epirubicin/ Docetaxel/ Cyclophosphamid (EDC) 169
7.2 Klinische Charakteristika der untersuchten Malignompatienten 170
7.2.1 Klinische Charakteristika primär operierter Mammakarzinom-patientinnen 170
7.2.2 Klinische Charakteristika neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen 171
7.2.3 Klinische Charakteristika adjuvant zytostatisch behandelter Mammakarzinompatientinnen 172
7.2.4 Klinische Charakteristika adjuvant endokrin behandelter Mammakarzinompatientinnen 173
7.2.5 Klinische Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen in der palliativen Situation ohne positiven Nachweis Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark 174
7.2.6 Klinische Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen in der palliativen Situation mit positivem Nachweis Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark 175
7.2.7 Klinische Charakteristika der ADI-reaktiven und nicht-reaktiven Studienpatientinnen 176
7.2.8 Klinische Charakteristika der Melanompatienten 177

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei Mammakarzinompatientinnen, die bereits verschiedenste systemische, zytostatische und/oder endokrine Therapien durchlaufen haben, Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark (KM) nachweisbar sind. Allerdings konnte insbesondere nach neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie eine deutliche Reduktion der Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen festgestellt werden. Aus dem hier entwickelten Modell zur Testung des Einflusses von Zytostatika auf separierte T-Zellpolulationen *in vitro* ging hervor, dass durch die eingesetzten Zytostatika selektiv die Vitalität Teilungs-aktiver Gedächtnis-T-Zellen limitiert wurde. Obwohl derzeit nicht geklärt ist, in welchem Aktivierungszustand Tumor-reaktive T-Zellen im KM von Mammakarzinompatientinnen vorliegen, legen die hier erbrachten Untersuchungen einen direkt schädigenden Einfluss systemisch applizierter Chemotherapeutika auf das Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellreservoir nahe. Bei Patientinnen im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (palliative Situation) wurde ein weiterer Rückgang Tumor-reaktiver KM-T-Zellen festgestellt, so dass bei weniger als 25 % der untersuchten Fälle eine tumorspezifische Reaktivität im KM nachgewiesen werden konnte.

Diese letztgenannten Patientinnen bildeten die Kandidaten für die in dieser Arbeit etablierte Immuntherapie beim metastasierten Mammakarzinom mittels autologer Tumor-reaktiver KM Gedächtnis-T-Zellen im Rahmen einer klinischen Phase I Studie. Die qualitative Analyse der 72-stündigen Stimulationskulturen Patienten-eigener KM-T-Zellen mit autologen TAA-gepulsten dendritischen Zellen wies auf eine effektive Aktivierung und Expansion therapeutisch wirksamer Zellen *ex vivo* hin. Nach adoptivem Transfer kam es bei fünf von elf behandelten Patientinnen zu einer massiven Expansion Tumor-reaktiver T-Zellen *in vivo*, was sich in einer erstmalig detektierbaren tumorspezifischen T-Zellreaktivität sieben Tage nach Applikation im peripheren Blut manifestierte. Dieser Therapieeffekt, der mit der Anzahl applizierter Tumor-reaktiver Zellen und mit dem Erkrankungsstadium der Patientin assoziiert war, wurde als ADI-Reaktivität interpretiert. Zusätzlich konnte eine Therapie-induzierte Mobilisierung Tumor-reaktiver T-Zellen aus dem KM bei ADI-reaktiven Patientinnen beobachtet werden, während ein klinisches Ansprechen nicht ausreichend evaluierbar war. Insgesamt war die hier erstmalig durchgeführte Therapie praktikabel und gut verträglich.

Beim Malignem Melanom konnten Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe autologer dendritischer Zellen, die zuvor mit Melanom-assoziierten Tumorantigenen beladen worden waren, zu gleichen Teilen im KM und Blut nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte eine detektierbare tumorspezifische Reaktivität nur im KM mit einer nachweisbaren Tumormanifestation sowie dem Krankheitsstadium der untersuchten Patienten. Tumor-reaktive KM-T-Zellen waren hier ausschließlich im Spätstadium (Stadium IV) der Erkrankung nachweisbar und mit einer signifikant längeren Krankheitsdauer der reaktiven Patienten assoziiert. Dies könnte auf eine prognostische Bedeutung Tumor-reaktiver KM-T-Zellen beim Malignen Melanom hindeuten.

Abstract

We have previously shown that primary breast cancer patients, but not healthy donors, frequently harbour tumor-reactive memory T cells in their bone marrow (BM). The present data indicates that tumor-reactive memory T cells can also be detected in the BM of breast cancer patients, who underwent various forms of systemic treatment. Upon restimulation with autologous dendritic cells pre-pulsed with tumor-associated antigens, patient-derived memory T cells from the BM could be detected in 30 % of patients after primary chemotherapy, in 36 % after adjuvant cytostatic treatment and in 38 % after/during adjuvant endocrine therapy. The observed reduction in the frequency of tumor reactive memory cells in treated patients in comparison to primary operated patients could be associated with a selective negative effect of chemotherapeutical drugs on activated memory T cells *in vitro*. Among advanced stage breast cancer patients in the palliative situation, a further reduction of patients harbouring tumor reactive memory T cells was observed (25 %).

Eleven patients of the latter group were enrolled in a phase I clinical trial with reactivated, autologous memory T cells derived from the BM of metastatic breast cancer patients to investigate feasibility, toxicity and immunologic effects of this cellular immunotherapy. For all patients, BM aspiration, generation of therapetic cells and intravenous application was feasible and safe. While tumor-reactive memory T cells were absent in the peripheral blood (PB) before therapy, five from eleven patients showed tumor-specific PB T cell reactivity seven days after therapeutic cell application. Therapy responsiveness was associated with the number of specifically reactivated transferred T cells as well as with patients´ status of disease at the timepoint of therapy. Furthermore, adoptive transfer of reactivated BM memory T cells induced mobilization of tumor reactive memory T cells from bone marrow, most likely to sites other than the PB three months after adoptive cell transfer.

In addition tumor-reactive T cells could be detected in peripheral blood and bone marrow in 21 % of melanoma patients of different disease stages. The presence of melanoma reactive BM and PB T cells was found to be largely non-overlapping. Interestingsly, the BM T cell response was dependent on the disease stage of the patients and was associated with a prolonged disease duration. In contrary, no correlation was found between the PB memory T cell response and tumor stage or duration of disease. These results implicate a potential prognostic relevance of BM-derived melanoma-reactive memory T cells in malignant melanoma..

1. Einleitung

Die Bedeutung des Immunsystems für die Entstehung und den Verlauf von Tumorerkrankungen ist derzeitig nur unzureichend geklärt. Inzwischen verdichten sich allerdings die Anhaltspunkte, dass es bei vielen Krebspatienten im Verlauf der Erkrankung zu einer intensiven Auseinandersetzung des zellulären Immunsystems mit den entarteten Zellen kommt, was in der Bildung und Persistenz von Tumor-spezifischen T-Zellen in lymphatischen Organen, wie dem Knochenmark, resultiert.
Eine naheliegende Krebstherapie bestünde darin, Tumor-spezifische T-Zellen in den Patienten zu reaktivieren bzw. zu mobilisieren. Deren Tumorspezifität und das damit verbundene geringere Risiko an Nebenwirkungen machen Immuntherapien zu einer attraktiven Alternative zu unspezifisch wirkenden Strahlen- und Chemotherapien, die mit negativen Effekten auf das gesunde Gewebe, insbesondere auf das Knochenmark, verbunden sind.

1.1 Die T-Zellvermittelte Immunität

T-Zellen werden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks gebildet und wandern als sogenannte Vorläuferlymphozyten in den Thymus ein. In dem Mikromilieu dieses lymphatischen Organs findet die weitere T-Zellentwicklung und Bildung des T-Zell-Rezeptorrepertoire statt. Dabei werden T-Zellen mittels Kontakt zwischen dem T-Zellrezeptor und Selbst-MHC(*major histocompatibility complex*)-Molekülen positiv selektiert, während solche, die gegen körpereigene, an Selbst-MHC-Moleküle gebundene Antigene stark reagieren, eliminiert werden.
Der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung naiver T-Zellen durch professionelle Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Aufgrund einer spezifische Erkennung werden die T-Zellen aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen angeregt. Es können zwei Hauptklassen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen unterschieden werden: 1.) Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) exprimieren neben dem T-Zellrezeptor den Korezeptor CD8 für MHC Klasse I-Moleküle. Sie können eine mit intrazellulären Erregern infizierte Zielzelle töten. 2.) T-Helfer(Th)-Zellen werden in zwei Subtypen, Th1 und Th2, unterteilt. Diese haben den

Korezeptor CD4 für MHC II-Moleküle gemeinsam. Auf die Effektorfunktionen der verschiedenen T-Zellklassen wird in Abschnitt 1.2 eingegangen.

1.1.1 Von der Antigenerkennung zur T-Zellaktivierung

Die Antigenerkennung während der adaptiven zellulären Immunantwort wird durch ein hochvariables Molekül, den Antigen-spezifischen T-Zellrezeptor vermittelt. Dieser ist mit dem CD3-Komplex und einem Homodimer aus ξ-Ketten assoziiert, über welche die Signalübertragung nach Stimulierung des T-Zellrezeptors vermittelt wird.
Der Ligand des T-Zellrezeptors besteht aus einem Fremdpeptid, das an ein MHC-Molekül gebunden ist. Diese membrangebundenen Glykoproteine werden als Klasse I bzw. Klasse II auf der Oberfläche von Zellen exprimiert. MHC Klasse I-Moleküle binden Peptide, welche durch Prozessierung im Proteasom innerhalb des Zytosols generiert wurden. Mittels MHC Klasse II hingegen werden Peptide von Proteinen präsentiert, die von aufgenommenen extrazellulären Fremdantigenen stammen. MHC I-Moleküle können jedoch ebenfalls, über einen Mechanismus der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird, Peptide, die von extrazellulären aufgenommenen Proteinen stammen, binden und auf der Zelloberfläche präsentieren (Heath und Carbone, 2001).
Für eine primäre Aktivierung (*priming*) naiver T-Zellen zu bewaffneten Effektorzellen ist sowohl eine Erkennung von Fremdantigen über Selbst-MHC-Moleküle sowie eine Kostimulation durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) notwendig. Zu den potentesten APZ zählen die Dendritischen Zellen, welche aus $CD34^+$ Vorläuferzellen im Knochenmark bzw. aus $CD14^+$ Monozyten im peripheren Blut entstehen. Nach Aktivierung durch Fremdantigen exprimieren sie große Mengen an MHC-Peptid-Komplexen sowie kostimulatorische Moleküle (u. a. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86)). Diese binden an CD28 auf naiven T-Zellen, was in einer Aktivierung und schließlich in der Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen resultiert (Paul; 2003).

1.1.2 Eigenschaften bewaffneter Effektorzellen

Die Effektorfunktionen von T-Zellen werden durch ein breites Spektrum von Effektormolekülen vermittelt. So können aktivierte $CD8^+$ T-Zellen durch die Freisetzung von Zytotoxinen, wie Perforin und Granzyme, den sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) der Zielzellen induzieren (Griffiths *et al*., 1995). Perforin führt zur

Permeabilisierung der Zytoplasmamembran, so dass Granzyme ins Zytoplasma gelangen können, wodurch schließlich Apoptose ausgelöst wird. Auf diese Art und Weise kann eine zytotoxische $CD8^+$ T-Zelle mehrere Zielzellen eliminieren (Henkart *et al*., 1994; Squier und Cohen, 1994). Ein weiteres wichtiges Effektormolekül zytotoxischer T-Zellen stellt das IFN-γ dar. Es wird neben aktivierten $CD8^+$ T-Zellen auch von $CD4^+$ T-Zellen (s. u.) und Natürlichen Killerzellen (NK) gebildet und wirkt vor allem aktivierend auf infizierte Makrophagen. IFN-γ fördert außerdem die T-Zellreifung und verstärkt die Proliferation von ZTL. Des weiteren induziert es eine gesteigerte Expression von MHC Klasse I und II-Molekülen sowie Peptidtransportermolekülen und erhöht damit die Effizienz der Antigenpräsentation auf den jeweiligen Zielzellen (Mire-Sluis und Thorpe, 1998).

$CD4^+$ T-Zellen können sich in Th1- oder Th2-Zellen differenzieren, die unterschiedliche Effektormoleküle produzieren und sich daher funktionell unterscheiden (Mossman und Coffman, 1989). Th1-Zellen produzieren vorwiegend IFN-γ (s. o.). Des weiteren sezernieren sie IL-2, das für die Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen nötig ist. Als Konsequenz einer selektiven Th1-Differenzierung wird somit vorwiegend eine Zell-vermittelte Immunität induziert, was mit einer Etablierung einer effektiven zytotoxischen T-Zellantwort einhergeht (Santana und Rosenstein, 2003).

Th2-Zellen hingegen zeichnen sich durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 aus und fördern hauptsächlich eine humorale Immunität durch die Stimulation der Antikörperproduktion von B-Zellen (Santana und Rosenstein, 2003). Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 stimuliert die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu Dendritischen Zellen und die Aktivierung von Makrophagen. Zugleich besitzt IL-4 eine antiinflammatorische Wirkung, indem es die TNF-α Sekretion durch Makrophagen und T-Zellen inhibiert. IL-4 stellt somit einen essentiellen Regulator von T-Helferantworten dar, da es die Th2-Differenzierung fördert und die Entwicklung der IFN-γ Sekretion von Th1-Zellen hemmt (Ibelgaufts *et al*., 1995).

Auch IL-10 spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Th1/Th2-Gleichgewichts. Es wird neben Th2-Zellen von Dendritischen Zellen sowie von regulatorischen T-Zellen gebildet und inhibiert wie IL-4 die Aktivierung und Differenzierung von Th1-Zellen. Zudem wirkt IL-10 hemmend auf Antigen-präsentierende Zellen, indem es proinflammatorische Funktionen der APZ durch die Inhibierung der Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischen Moleküle unterdrückt und deren Maturierung verhindert (Mocellin *et al*., 2003).

Die Generierung der unterschiedlichen $CD4^+$ T-Zellantworten wird neben IL-4 und IL-10 auch durch IL-12 vorrangetrieben (Trinchieri *et al*., 1995; Seder *et al*., 1994; Glimcher *et al*.

1999). Das heterodimere Zytokin IL-12 ist ein essentieller Regulator von Th1-Antworten und wird hauptsächlich von Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert (Hsieh *et al*., 1993; Macatonia *et al*., 1995; Gately *et al*., 1998). In der frühen Phase einer Infektion induziert IL-12 die IFN-γ-Produktion von NK und T-Zellen, was eine Entzündungsreaktion sowie eine weitere Phagozytenaktivierung bewirkt. IL-12 begünstigt, zusammen mit dem induzierten IFN-γ, eine Th1-Differenzierung, indem $CD4^+$ T-Zellen primär aktiviert werden, hohe Konzentrationen an IFN-γ zu produzieren. Zudem fördert IL-12 die weitere Proliferation von Th1-Zellen. Somit hängt die frühzeitige Entscheidung des Immunsystems für eine entsprechende Th-Zellpolarisierung von dem Gleichgewicht zwischen IL-12, das eine Th1-Antwort vorantreibt, und IL-4 ab, was eine Th2-Differenzierung begünstigt (Trinchieri *et al*., 1995; Langrish *et al*. 2004). Des weiteren stellen die Antigendosis (Hosken *et al*., 1995), die Stärke der Antigenstimulation (Constant *et al*., 1997), die Dauer der T-Zellrezeptorbindung (Iezzi *et al*., 1999) sowie die Eigenschaften der Kostimulation während der T-Zellaktivierung (Kuchroo *et al*., 1995) wichtige regulatorische Faktoren des Th1/Th2-Gleichgewichts dar.

1.1.3 Das immunologisches T-Zellgedächtnis

Nach einer adaptiven Immunantwort wird ein Großteil der Effektorzellen über die Induktion von Apoptose eliminiert, während einige antigenspezifische Lymphozyten überleben und zur Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses führen. Mit Hilfe dieser Gedächtniszellen, die sich durch eine besondere Langlebigkeit auszeichnen (Tanchot und Rocha, 1997), kann das Immunsystem schneller und effektiver gegen eine erneute Infektion reagieren.

Gedächtnis-T-Zellen unterscheiden sich funktional in vielerlei Hinsicht von naiven T-Zellen. Zum einen reagieren sie auf geringere Antigenkonzentrationen (Zinkernagel *et al*., 1996) und sind weniger abhängig von Kostimulation auf APZ (Vaiga-Fernandes *et al*., 2000; Tuma *et al*., 2002; Lanzaveccia und Sallusto, 2000). Gedächtnis-T-Zellen proliferieren schneller nach einer Antigenstimulation. Zudem setzen sie schneller und größere Mengen an Zytokinen frei, wobei das Zytokinspektrum breiter ist als das der Effektorzellen (Goldrath und Bevan, 1999). Somit sind die von Gedächtnis-T-Zellen nach Antigenreexposition ausgehenden sekundären Immunantworten stärker als primäre Reaktionen naiver T-Zellen (Zinkernagel *et al*., 1996; Vaiga-Fernandes *et al*., 2000; Tuma *et al*., 2002).

Gedächtnis-T-Zellen lassen sich aufgrund verschiedener Oberflächenmarker phänotypisch von naiven T-Zellen unterscheiden. Hierzu zählen insbesondere die Varianten des CD45 (eine

Tyrosinphosphatase). Während die niedrig-molekulare RO-Isoform des CD45 bevorzugt auf Gedächtnis-T-Zellen vorkommt, ist die höher molekulare Form CD45RA vor allem auf naiven Zellen zu finden (Michie *et al*., 1992). Zusätzlich können nach Sallusto *et al*. (1999) zwei Gedächtnis-T-Zellpopulationen anhand der differentiellen Expression des Chemokinrezeptors CCR7 unterschieden werden. Sogenannte zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*central memory*, CM) exprimieren CCR7 sowie CD62L und sind vorwiegend innerhalb sekundär lymphatischer Organe lokalisiert. Sie zeichnen sich durch ein hohes proliferatives, aber geringes Effektorpotential aus. Effektorgedächtnis-T-Zellen (*effector memory*, EM) fehlt die CCR7-Expression. Dies ermöglicht es ihnen, sich in peripheren Geweben anzureichern, wo sie schnelle und effektive Effektorfunktionen ausüben können.

1.2 Das Maligne Melanom

Das Maligne Melanom ist ein neuroektodermaler Tumor, der von den Pigment-bildenden Zellen (Melanozyten) der Haut ausgeht. In Mitteleuropa erkranken pro Jahr 4-10 von 100.000 Menschen an diesem hochgradig bösartigen Hautkrebs, wobei seine Inzidenz seit den vergangenen 15 Jahren stark zunimmt.

Die Stadieneinteilung des Melanoms beruht auf der TNM-Klassifikation, die eine für solide Tumoren übliche Einteilung in Tumordicke (T), Lymphknotenbeteiligung (N) und Fernmetastasen (M) darstellt. Danach unterscheidet man beim Melanom vier Stadien (entsprechend der aktuellen Einteilung durch das *American Joint Committee on Cancer*, AJCC, 2002): Die Stadien I bis III sind durch ein lokal begrenztes Tumorwachstum charakterisiert, wobei Tumorzellen in die Epidermis, Dermis oder bereits die Subkutis infiltriert sein können. Eine Ausbreitung über das Hautgewebe hinaus begrenzt sich ausschließlich auf lokoregionale Lymphknoten. Bei weiter fortschreitender Metastasierung auf andere Organe bzw. auf Lymphknoten in großer Entfernung des Primärtumors spricht man von einer systemischen Erkrankung (Stadium IV). Dabei ist eine frühzeitige Metastasierung des Melanoms über das Blut oder über das lymphatische System mit einer Verschlechterung der Überlebensprognose des Patienten assoziert (Garbe *et al*, 2002).

1.3 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom, ein epithelialer Tumor der Brustdrüse, ist mit geschätzten 48.000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen in Deutschland. Allein in der Bundesrepublik sterben jährlich ca. 19.000 Frauen an Brustkrebs. Die weltweite Heilungsrate liegt hingegen nur bei ca. 50 %. Das Mammakarzinom stellt schon früh keine lokal begrenzte, sondern eine generalisierte systemische Erkrankung dar. So können disseminierte Tumorzellen nach einer zum Teil langjährigen Latenzzeit distante Metastasen bilden (Mansi *et al*., 1999; Demicheli *et al*., 2001).

Die Therapie der Erkrankung wird risikoadaptiert durchgeführt und orientiert sich an der TNM-Klassifikation und der Abschätzung individueller Risikofaktoren. Die vollständige chirurgische Entfernung des Tumors aus der Brust steht im Vordergrund der Therapie. Dabei kann eine Brustamputation (*Ablatio mammae)*, welche lange Zeit Therapiestandard war, zugunsten einer Brust erhaltenden Therapie vermieden werden, wenn eine adjuvante Bestrahlung des verbliebenen Brustgewebes erfolgt. Neben der lokalen Sanierung stehen jedoch systemische Therapien zur Behandlung des Mammakarzinoms im Vordergrund. Diese sollen hier kurz charakterisiert werden:

1. Primäre Therapie:	Chirurgische Exzision des Primärtumors;
2. Adjuvante Therapie:	Systemische Therapien nach Exzision des Primärtumors zur Verbesserung der Heilungsrate: Chemotherapien und/oder Hormonersatztherapien (endokrin);
3. Palliative Therapie:	Alle Therapien mit der Zielsetzung einer Verbesserung der Lebensqualität und eventuellen Verlängerung des Lebens durch Milderung der Symptome; kein kurativer Ansatz: Chemotherapien und/oder Hormonersatztherapien; Bestrahlung von Metastasen.

Bei besonders großen oder inflammatorischen Tumoren, die primär nicht brusterhaltend operiert werden können, kann eine neoadjuvante Chemotherapie (*primary chemotherapy*) vor der Operation den Tumor soweit reduzieren, dass eine Brustamputation in 20 % der Fälle vermieden werden kann. Gleichzeitig stellt die neoadjuvante Chemotherapie eine Chemosensitivitätstestung *in vivo* dar, da ein Ansprechen des Tumors direkt *in situ* beurteilt werden kann.

Des weiteren rücken neue supportive Therapien immer stärker in den Mittelpunkt des onkologischen Interesses. Hierzu zählen die Behandlung mit Bisphosphanaten bei Patientinnen mit Knochenmetastasen (Diel *et al*., 2000) sowie verschiedenste immuntherapeutische Ansätze (siehe 1.4.2).

1.3.1 Die systemische Therapie des Mammakarzinoms

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, spielt die Behandlung mit Zytostatika neben den primär operativen Maßnahmen bei der Tumortherapie eine wichtige Rolle. Zytostatika wirken bevorzugt auf proliferierende Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, während Zellen in der G_0-Phase meist nicht beeinflusst werden. Aufgrund ihrer verschiedenen Angriffspunkte während der Zellteilung können Zytostatika wie folgt eingeteilt werden:

- Antimetabolite (z. B. Methotrexat, 5´Floururacil)
- Alkylantien (z. B. Cyclophophamid)
- Anthracycline (z. B. Epirubicin)
- Mitosehemmstoffe (z. B. Taxane)
- Hormonantagonisten (z. B. Tamoxifen)

Alle hier genannten Zytostatika, die primär auf unterschiedliche Weise wirken (s. u.), führen schließlich zur Eliminierung der sensitiven Zellen durch Apoptose. Hierbei werden Caspasen, mitochondriale Apoptose-induzierende Faktoren, Bcl-2 sowie CD95 involviert (Hickman *et al*., 1992; Friesen *et al*., 1996; Posovsky *et al*., 1999). Die Wirkmechanismen der wichtigsten in der Universitätsfrauenklinik Heidelberg zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzten Substanzen sollen nun kurz vorgestellt werden: Cyclophosphamid ist ein starkes Alkylans, das nach Aktivierung multiple DNA-Veränderungen induziert. Dadurch wird die DNA-Replikation dermaßen beeinträchtigt, dass schließlich die Zellteilung zum Erliegen kommt. Wegen seiner starken immunsuppressiven Wirkung wird Cyclophosphamid auch zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt. Methotrexat und 5´-Fluoruracil sind sogenannte Antimetabolite. Aufgrund ihrer chemische Struktur, werden sie anstelle natürlicher Metabolite bei Stoffwechselprozessen verwendet, wodurch diese irreversibel blockiert werden. Während Methotrexat als Folsäureantagonist die Nucleinsäuresynthese hemmt, greift 5´-Fluoruracil über die Blockierung der Thymidilatsynthase in die DNA-

Synthese ein. Die Störung der Nukleinsäuresynthese hat ein schnelles apoptotisches Absterben der betroffenen Zellen zur Folge.

Taxane (Paclitaxel, Docetaxel) beschleunigen die Bildung von Mikrotubuli, wobei sie schließlich an die β-Tubulinuntereinheit binden und damit die Desaggregation des Spindelapparates verhindern. Die Zellen werden dadurch in der G_2- bzw. M-Phase blockiert und sterben schließlich ab. Epirubicin, ein Anthracyclin, besitzt seine stärkste zytotoxische Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus. Es interkaliert in die DNA und führt so zur Blockierung der Nukleinsäuresynthese.

Bei Hormon-sensitiven Tumoren kommen u. a. Hormonantagonisten und Substanzen, die in die Hormonsynthese eingreifen zur Anwendung. Tamoxifen wirkt als kompetitiver Antagonist am Östrogenrezeptor. Hierdurch wird die Expression Östrogen-regulierter Gene, die für Wachstumsfaktoren codieren und dadurch für die parakrine und autokrine Kontrolle des Tumorwachstums bedeutsam sind, blockiert. Dies resultiert in einer Blockade der G_1-Phase des Zellzyklus, was schließlich zu einem apoptotischen Absterben der Zelle führt. Zu der Gruppe der spezifischen Aromataseinhibitoren zählen Letrozol und Anastrozol. Diese inhibieren reversibel die enzymatische Aktivität der Aromatase, wodurch die endogene Östrogensynthese gehemmt wird.

Um möglichen Resistenzbildungen gegen einzelne Therapeutika entgegenzuwirken, kommen klinisch häufig sogenannte Kombinationstherapien zur Anwendung. Die Kombination mehrerer Wirkstoffe hat außerdem den Vorteil, dass hierdurch eine synergistische Wirkungssteigerung ohne eine gefährliche Erhöhung der Toxizität erreicht wird. Eine standardisierte Kombinationstherapie, die häufig zur adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms angewandt wird, stellt das CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5´-Fluoruracil)-Regime dar.

1.3.2 Die Auswirkungen systemischer Therapien auf die Zellen des Immunsystems

Über einen potentiellen Einfluss einer Hormonersatztherapie (mit z. B. Tamoxifen) auf Immunzellpopulationen ist in der Literatur nur wenig bekannt. Vereinzelte Studien berichten über eine reduzierte Alloreaktivität nach einer Tamoxifen-Behandlung *in vitro*. Dies wurde auf eine beeinträchtigte Zytokinproduktion (TNF-α und IL-12) durch Monozyten und Makrophagen sowie auf eine Inhibierung der IFN-γ-Produktion von T-Zellen zurückgeführt (Frank *et al*., 2001; Baral *et al*., 2000).

Die Auswirkungen verschiedener zytostatischen Substanzen auf Immunzellen, insbesondere auf die T-Zellpopulation des Knochenmarks, wurden ebenfalls bisher kaum untersucht. Lediglich einzelne Effekte auf *in vitro* kultivierte Immunzellen wurden in der Literatur beschrieben. So können Taxane die zytotoxische Aktivität von T- und NK-Zellen *in vitro* unterdrücken, wobei Docetaxel weniger immunsuppressiv wirkt als Paclitaxel (Chuang *et al*., 1993; Munkarah *et al*., 1994). Ferner inhibiert Paclitaxel die IL-2-vermittelte Aktivierung von T-Zellen. Dabei erhöhen Proliferations-stimulierende Kulturbedingungen in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der T-Zelle die Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum (Mullins *et al*., 1997). Cyclophosphamid induziert eine als Lymphopenie bezeichnete Reduktion der Gesamtlymphozytenzahl. Insbesondere scheint hiervon die B-Zellpopulation betroffen zu sein, was mit einer Inhibierung der B-Zellvermittelten Antikörperreaktion einhergeht (Shi *et al*., 1983; Allison *et al*., 2000). Die Proliferation Mitogen-aktivierter Lymphozyten scheint hierbei nicht beeinträchtigt zu werden. Methotrexat hingegen induziert selektiv Apoptose von aktivierten und proliferierenden, aber nicht von ruhenden T-Zellen (Genestier *et al*., 1998; Ciaiolo *et al*., 1988). Auch 5´-Fluoruracil besitzt einen hemmenden Effekt auf teilungsaktive Lymphozyten. Es inhibiert die Proliferation Mitogen-aktivierter T-Zellen (Shi *et al*., 1983; Ben-Efraim *et al*., 1986) und wirkt selektiv suppressiv auf die Aktivierung von NK-Zellen (Shi *et al*., 1983).

Einige Studien befassten sich mit den potentiellen Langzeiteffekten der CMF-Kombinationstherapie und deren Einfluss auf physiologische Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass die naive $CD4^+$ T-Zellfraktion des peripheren Blutes bei Mammakarzinompatientinnen zunächst rapide absank, um sich dann graduell während der folgenden zwölf Monate wieder zu regenerieren. Der Anteil naiver $CD4^+$ T-Zellen war auch noch nach einem Jahr deutlich erniedrigt im Vergleich zum Zeitpunkt vor der zytostatischen Therapie (Sabbioni *et al*., 1999). Eine messbare Zunahme der $CD4^+$ T-Zellen ein Jahr nach Beendigung des CMF-Regimes war auf einen selektiven Anstieg der $CD4^+$ Gedächtniszellpopulation zurückzuführen. Somit wurden insbesondere naive T-Zellen durch die CMF-Therapie reduziert, während $CD4^+$ Gedächtniszellen nur in geringem Maße beeinträchtigt wurden. Insgesamt konnte nach mehr als einem Jahr nach Beendigung der Chemotherapie eine deutliche Reduktion der gesamten Lymphozytenpopulation beobachtete werden (Solomayer *et al*., 2003). Zudem wurde berichtet, dass sowohl T-, B- und NK-Zellen langanhaltend in ihrer Funktionsfähigkeit inhibiert waren (Zielinski *et al*., 1990).

Das Interesse unserer Arbeitsgruppe ist auf das funktionelle Potential Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks fokussiert. Das Knochenmark stellt ein lymphoides

Organ mit einer hohen Teilungsaktivität dar und bildet somit einen Angriffspunkt für unerwünschte Nebenwirkungen von Zytostatika. Um dies genauer zu untersuchen, wurde in einer von uns durchgeführten Studie der Effekt adjuvanter zytostatischer und endokriner Therapie auf die zellulären Komponenten des Knochenmarks analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie sollen hier kurz zusammengefasst werden: Mononukleäre Zellen wurden aus den Knochenmarkaspiraten von 34 adjuvant behandelten Mammakarzinompatientinnen isoliert und die einzelnen Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie phänotypisch charakterisiert. Im Vergleich zu noch nicht therapierten, primär operierten Mammakarzinompatientinnen sank der Anteil der $CD4^+$ T-Zellen 24 Monate nach Beendigung der zytostatischen Behandlung signifikant ab. Hiervon waren insbesondere naive Zellen betroffen, so dass ein Anstieg der relativen $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellpopulation verzeichnet werden konnte. Das $CD8^+$ Gedächtniszellreservoir wurde hingegen sichtlich nicht beeinflusst. Sein Anteil war, wie bei primären Patientinnen auch, signifikant höher als im Knochenmark gesunder Donoren. Im Gegensatz zur zytostatischen Behandlung wurden durch endokrine Therapien naive und Gedächtnis-$CD8^+$ T-Zellen gleichermaßen beeinträchtigt. Trotz des lymphopenischen Effekts lag der Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellpopulation nach Hormontherapie signifikant höher als derjenige im Knochenmark gesunder Donoren (Solomayer *et al*. 2003). Diese Studie legt einen suppressiven Effekt des CMF-Regimes auf Immunzellen des Knochenmarks nahe. Somit könnten zytostatische Therapien die funktionelle Kapazität der dort ansässigen T-Zellen entscheidend beeinflussen.

1.4 Tumorimmunologie

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Tumore ihre Immunogenität durch die Ausbildung von sogenannten *Immune Escape* Varianten verringern können, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen. So sezernieren viele Tumore sowie das Tumor-umgebende Stroma immunsuppressive Faktoren, wie z. B. TGF-β (Woitowicz-Praga, 1997). Des weiteren können Tumore Resistenzmechanismen gegen Apoptose entwickeln (von Benstorff, 2001) oder Apoptose-induzierende Rezeptoren exprimieren, die schließlich den Tod von interagierenden Immunzellen bewirken (von Benstorff, 2003).

Bei zahlreichen Tumoren wurde eine Expressionsreduktion von MHC I Molekülen bzw. von Antigenpräsentation-assoziierten Molekülen gefunden (Marincola *et al*., 2000; Kageshita *et al*., 1999). Zudem konnte eine direkte Korrelation zwischen Tumorprogression und dem Verlust der MHC Klasse I-Expression bei Krebspatienten beobachtet werden (Garrido *et al*., 1997; Hicklin *et al*., 1999). Zusammengenommen weist dies auf eine besondere Rolle zytotoxischer T-Zellen bei der Tumorkontrolle hin.

Die molekulare Identifikation des ersten Melanom-assozierten Tumorantigens (MAGE-1), das von zytotoxischen T-Zellen *in vitro* erkannt wurden (van der Bruggen *et al*., 1991), hat eine umfangreiche Charakterisierung potentieller ZTL-Zielstrukturen für humane Tumore ausgelöst. Tumorantigene können *de novo*, durch somatische Mutationen entstehen. Hierdurch werden einzigartige, Tumor-spezifische ZTL-Epitope generiert, dessen Expression auf den individuellen Tumor restringiert ist. Ebenso zählen die viralen Proteine sogenannter Onkoviren (z. B. EBV, HPV16) zu den Tumor-spezifischen Antigenen, da sie nicht auf normalen Zellen exprimiert werden. Gegen solche Antigene könnte aufgrund der fehlenden zentralen Toleranz stärkere und physiologisch bedeutendere T-Zellantworten induziert werden (Pawelec *et al*., 2004).

Interessanterweise werden aber die meisten identifizierten Antigene nicht ausschließlich von Tumorzellen exprimiert, sondern können auch auf normalen Körperzellen gefunden werden und stellen somit Selbstantigene dar (Wang *et al*., 1999). Es handelt sich hierbei entweder um Differenzierungsantigene, die nur in bestimmten Geweben exprimiert bzw. auf den Tumorzellen überexprimiert werden (z. B. Her2/neu) oder um Antigene, deren Expression im Verlauf der Embryonalentwicklung erfolgt und die lediglich noch in immunprivilegierten Geweben der Gonaden gebildet werden (sogenannte *Cancer Testis* Antigene; Gilboa *et al*., 1999; Boon *et al*., 2002; Scanlan *et al*., 2002).

Aufgrund der im Thymus induzierten zentralen Toleranz werden ausschließlich T-Zellen mit einer niedrigen Affinität zum Selbstantigen in die Peripherie entlassen. Außerhalb des Thymus spielen sogenannte regulatorische $CD25^+CD4^+$ T-Zellen bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eine wichtige Rolle (Sakaguchi *et al*.,2000 a und b). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass diese T-Zellsubpopulation, die ca. 5-10 % des peripheren $CD4^+$ T-Zellanteils ausmacht, in der Lage ist, die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen in einer Antigen-abhängigen Weise zu unterdrücken (Thornton *et al*., 2000). Kürzlich wurde anhand eines Tumormausmodells gezeigt, dass regulatorische T-Zellen selektiv im Tumor akkumulieren (Yu *et al*., 2005). So verdichten sich die Hinweise, dass diese T-Zellsubpopulation

entscheidend dazu beiträgt, eine effektive Antitumorantworten *in situ* zu verhindern (Dudley und Rosenberg; 2003).

1.4.1 Die Induktion Tumor-gerichteter T-Zellantworten

Die prinzipielle Möglichkeit funktionelle T Zellantworten gegen Tumorantigene bei Patienten zu induzieren, konnte bereits in vielen früheren Studien belegt werden, bei denen die mehrfache Stimulation von T-Zellen *in vitro* schließlich zur Generierung Tumor-spezifischer ZTZ führte (Ito *et al*., 2001; Suzuki *et al*., 2002; Peiper *et al*., 2002; Dhodakpar *et al*., 2002; Hansson *et al*., 2003). Obwohl Tumor-spezifische $CD8^+$ T-Zellen bei unterschiedlichsten Tumorerkrankungen spontan induziert werden, erweisen sie sich oft *in vitro* als funktionell anerg (Lee *et al*., 1999; Valmori *et al*, 2000). Meist wurden hier isolierte $CD8^+$ T-Zellpopulationen untersucht. Dabei ist bisher weitgehend unklar, ob auch $CD4^+$ T-Zellen an Antitumorreaktionen beteiligt sind. In der Tat wurden bislang nur wenige Tumor-spezifische $CD4^+$ Epitope charakterisiert (Novellino *et al*., 2004). Verschiedene Mausmodelle weisen aber darauf hin, dass $CD4^+$ T-Zellen bzw. $CD4^+$ im Zusammenspiel mit $CD8^+$ T-Zellen für die Induktion protektiver Tumorantworten erforderlich sind. (Wang *et al*., 2003; Schirrmacher *et al*., 1993; Yu *et al*., 2003). $CD4^+$ T-Zellen können wesentlich zu einer effizienten Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellantworten beitragen, u. a. indem sie über Interaktionen des CD40-Liganden mit CD40 die kostimulatorische Kapazität der beteiligten APZ erhöhen (Peguet-Navarro *et al*., 1995; Kiener *et al*., 1995; Cella *et al*., 1996). Zudem scheint eine $CD4^+$ T-Zellhilfe essentiell für die Generierung von $CD8^+$ Gedächtniszellen (Gao *et al*., 2002; Sun *et al*., 2004) sowie für das Überleben adoptiv transferierter T-Zellen zu sein (Walter *et al*., 1995). Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, bei der Etablierung einer T-Zell basierten Immuntherapie sowohl Tumor-spezifische $CD8^+$ als auch $CD4^+$ T-Zellen zu involvieren. Hierbei kommt den Dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle zu, da diese in der Lage sind aufgenommene Antigene sowohl über MHC I (Kreuzpräsentation) als auch MHC II zu präsentieren. Mit der Möglichkeit zur Generierung und *ex vivo* Beladung mit Tumor-assoziierten Antigenen stehen somit potente APZ zur Verfügung, um eine polyklonale Antitumor-T-Zellantwort auszulösen.

1.4.2 Immuntherapien humaner Malignome

Bei immuntherapeutischen Ansätzen wird versucht, die Immunogenität des Tumors zu erhöhen oder eine Tumor-gerichtete Immunreaktion zu induzieren. Immuntherapien werden allgemein in unspezifische und spezifische Strategien unterteilt, wobei sich letztere wiederum in passive und aktive Ansätze unterscheiden lässt.

Die *unspezifische Immuntherapie* stellt eine der ältesten immuntherapeutischen Strategien bei malignen Erkrankungen dar. Bereits vor über hundert Jahren konnte W. Coley (1893) mittels Bakterienextrakte eine sporadische Antitumorreaktion auslösen. Das Prinzip einer unspezifischen Immuntherapie beruht auf einer generellen Aktivierung des Immunsystems mittels unspezifischer, immunstimulatorisch wirksamer Substanzen. Heutzutage macht die systemische Gabe unspezifisch wirkender Zytokine, wie z. B. IFN-α, eine Standardtherapie bei der Behandlung des Malignen Melanoms aus (Mohr *et al*., 2003; Kirkwood *et al*., 2003).

In der *passiven Immuntherapie* werden u. a. monoklonale Antikörper gegen Tumor-spezifische Antigene zur gezielten Tumorzelleliminierung eingesetzt. Ein Meilenstein der Krebstherapie bildet hierbei der Wirkstoff Trastuzumab (Herceptin®) zur Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms. Dieser Antiköper ist gegen den Her2/neu-Rezeptor gerichtet, der auf vielen Brustkrebstumoren überexprimiert ist. Die Bindung des Medikaments induziert schließlich eine ZTZ-vermittelte Apoptose der Tumorzellen (Wang *et al*., 2001; Hortobagyi, 2001).

Eine weitere Rolle bei der Bekämpfung maligner Erkrankungen spielen spezifische, T-Zell-vermittelte Immuntherapien. Bei sogenannten *aktiv-spezifischen Immunisierungen* (ASI) versucht man Tumor-gerichtete T-Zellantworten im Patienten selbst zu aktivieren. Die häufigste Variante ist die Vakzinierung mit autologen Dendritischen Zellen, die zuvor mit Tumor-assoziierten Antigenen beladen oder mit Tumorantigen-codierender RNA transfiziert wurden (Pérez-Díez und Marincola, 2002). Ein verbesserter Ansatz der Tumorvakzinierung stellt die Infektion autologer Tumorzellen mit dem *Newcastle Disease* Virus (NDV) dar (Schirrmacher, 1993 und 1998). Dieses Vogelvirus repliziert selektiv in Tumorzellen und zeichnet sich durch antineoplastische sowie immunstimulatorische Eigenschaften aus. Nach Infektion durch NDV, werden die Tumorzellen bestrahlt und dem Patienten appliziert. Diese Therapie konnte in Mausmodellen sowie bei Patienten verschiedener Malignome z. T. beachtliche therapeutische Erfolge erzielen (Termeer *et al*., 2000; Ahlert *et al*., 1997; von Hoegen *et al*., 1990; Pomer *et al*., 1995; Schirrmacher, 2005). Die hier beschriebenen Ansätze erfordern eine Kenntnis der individuell exprimierten Tumorantigene bzw. eine autologe Tumorprobe. Da jedoch eine genaue Charakterisierung des individuellen Tumorantigen-

Expressionsmusters derzeit keine Option darstellt und geeignetes Tumormaterial bei der Mehrzahl metastasierter Patienten nicht zur Verfügung steht, sind diese Therapieansätze in ihrer Anwendbarkeit stark begrenzt.

Eine vielversprechende Alternative bildet die *adoptive Immuntherapie* (ADI), die auf einem allogenen oder autologen Transfer *ex vivo* aktivierter und expandierter T-Zellen beruht. Erste Ansätze dieser Therapie stellten der Transfer Lymphokin-aktivierter Killerzellen (Rosenberg *et al*., 1985) oder die allogene Donorlymphozyten-Transfusion nach einer KM-Transplantation bei der Chronischen Myeloischen Leukemie (CML; Kolb *et al*., 1996) sowie bei EBV-induzierten Lymphomen (Rooney *et al*., 1998; Comoli *et al*., 2002) dar.

Klinisch relevante Ergebnisse liefern derzeitige Studien zum adaptiven Transfer autologer T-Lymphozyten beim Malignen Melanom. Hierbei bedient man sich Tumor-spezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut (Yee *et al*., 2002) oder Tumor-infiltrierender T-Lymphozyten (TIL; Dudley *et al*., 2002), die *in vitro* und unter Einsatz hoher Zytokindosen (u. a. IL-2) expandiert werden. Die Applikation dieser $CD8^+$ T-Zellklone führte bei einigen Patienten nach immunosuppressiver Chemotherapie zu einer partiellen Regression der Tumormetastasen (Dudley und Rosenberg; 2003).

1.4.3 Tumor-reaktive Gedächtniszellen des Knochenmarks

Das Knochenmark ist ein stark durchblutetes lymphatisches Organ, das ein geeignetes Mikromilieu für die Interaktionen zwischen Parenchymzellen, zirkulierenden Lymphozyten sowie KM-ansässigen Antigen-präsentierenden Zellen darstellt (Osmond *et al*., 1994). Basierend auf dem gegenwärtigen Forschungsstand scheint dem Knochenmark – entgegen der klassischen immunologischen Lehrmeinung – auch eine besondere Rolle als sekundär lymphatisches Organ bei der T-Zellimmunität zuzukommen. So wurde kürzlich anhand von Mausexperimenten gezeigt, dass naive Antigen-spezifische T-Zellen im Knochenmark primär aktiviert werden können (Feuerer *et al*., 2003). Zudem bildet das Knochenmark ein Hauptreservoir für Gedächtnis-T-Zellen, die über die Interaktion mit konstitutiv exprimierten Adhäsionsmolekülen aus dem Blut rekrutiert werden (Mazo *et al*., 2005) und sich teilweise in Follikel-ähnlichen Strukturen ansammeln (Bain *et al*., 2001; Feuerer *et al*., 2004).

Auch bei Tumor-gerichteten Immunreaktionen scheint das Knochenmark wesentlich involviert zu sein (Schirrmacher *et al*., 2001; Feuerer *et al*., 2001). So belegen Tumorvakzinierungs-Studien an Mäusen, dass das Knochenmark ein wichtiger Ort für die Langzeitpersistenz Tumor-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen und vereinzelter ruhender

Tumorzellen ist. Bei der Induktion und Aufrechterhaltung dieses Ruhezustandes, der als *Tumordormancy* bezeichnet wird, sind KM-ansässige $CD8^+$ T-Zellen aktiv beteiligt (Khazaie *et al*., 1994; Schirrmacher *et al*., 2002). Ein Verlust der T-Zellfunktion kann zu einem Auswachsen von Tumormetastasen nach zum Teil langen Latenzzeiten führen (Müller *et al*., 2001). Diese Befunde weisen auf eine intensive Auseinandersetzung zwischen Tumorzellen und T-Zellen im Knochenmark hin. Tatsächlich konnten wir für das Mammakarzinom belegen, dass Tumor-spezifische T-Zellantworten in einer Vielzahl der Patientinnen im Verlauf der Tumorerkrankung induziert werden und dass diese Information in Form von Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark gespeichert wird. Diese Zellen ließen sich in ca. 40 % der untersuchten Mammakarzinompatientinnen *in vitro* mit Hilfe TAA-beladener Dendritischer Zellen zu funktionalen IFN-γ-produzierenden und zytotoxischen Effektorzellen reaktivieren (Feuerer *et al*., 2001). Während im KM funktionelle Tumor-reaktive T-Zellen nachweisbar waren, konnte eine vergleichbare spezifische T-Zellreaktivität im peripheren Blut nicht festgestellt werden. Des weiteren wurde anhand eines in unserer Arbeitsgruppe etablierten Xenotransplantationsmodells gezeigt, dass die Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks ein beachtliches therapeutisches Potential besitzen können (Abb. 1.1).

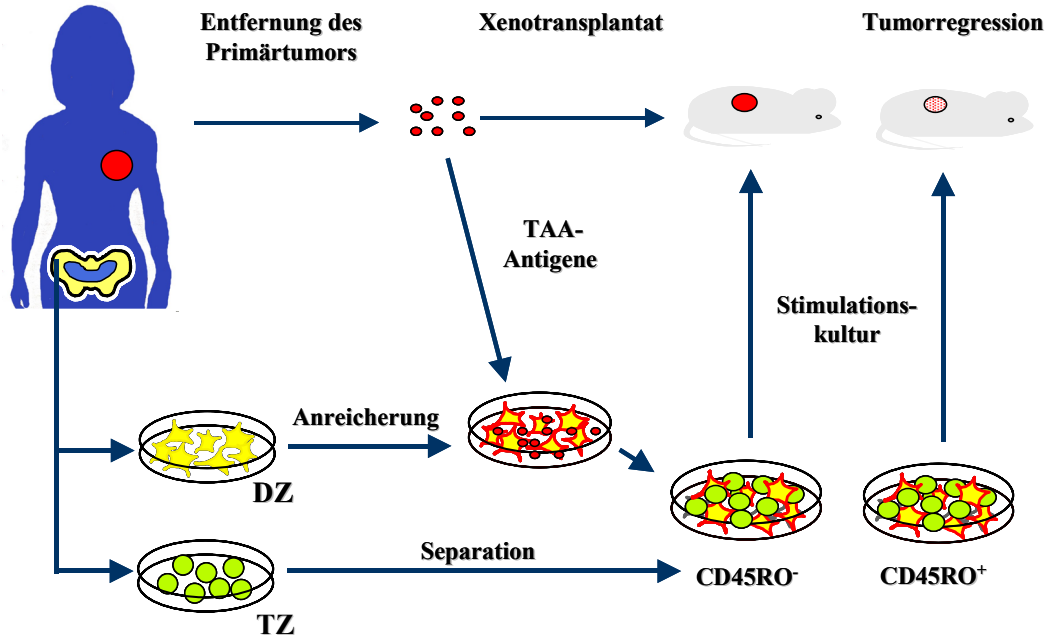


Abb. 1.1 Schema der adoptiven Therapie des Xenotransplantationsmodells
Teile von resezierten humanen Mammakarzinomen wurden s. c. in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse transplantiert. KM-Aspirate derselben Patientinnen wurden während der Tumorresektion gewonnen und daraus DZ und TZ angereichert. Die DZ wurden mit Tumorantigen beladen und mit separierten autologen naiven ($CD45RO^-$) oder Gedächtnis-T-Zellen ($CD45RO^+$) koinkubiert. Schließlich wurden die Zellen i. p. in Tumor-transplantierte Mäuse appliziert.

Bei diesen Experimenten war ein einmaliger Transfer humaner reaktivierter KM-Gedächtnis-T-Zellen ausreichend, um eine Regression des autologen transplantierten Tumors zu induzieren (Feuerer *et al*., 2001). Die Tumorabstoßung *in vivo* konnte hierbei auf die selektive Infiltration von reaktivierten Gedächtniszellen, jedoch nicht auf die Infiltration von naiven T-Zellen zurückgeführt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Regression des Tumors durch die Interaktion mit koapplizierten, tumorinfiltrierenden Dendritischen Zellen unterstützt wurde (Bai *et al*., 2002; Beckhove *et al*., 2004). Diese Ergebnisse bildeten die Rationale der in der vorliegenden Arbeit etablierten Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinoms mittels reaktivierter Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks.

1.5 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit stellte die Planung, Durchführung und Nachbereitung der im Rahmen einer klinischen Phase I Studie durchgeführten Immuntherapie beim metastasierten Mammakarzinom mit Hilfe autologer, reaktivierter Gedächtnis T-Zellen des Knochenmarks dar. Die einzelnen Schritte zur Etablierung dieser neuartigen Therapie umfassten folgende Teilaufgaben:

1.5.1 Planung:

Zunächst sollte das Vorkommen Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Mammakarzinompatientinnen unter palliativer, zytostatischer Therapie evaluiert werden. Zusätzlich wurde das Tumor-spezifische T-Zellgedächtnis nach standardisierten neoadjuvanten und adjuvanten Therapien untersucht. Um die Auswirkung zytostatischer Therapieregime auf isolierte T-Zellpopulationen zu studieren, sollte ein Model zur Testung bestimmter Chemotherapeutika *in vitro* etabliert werden. Schließlich wurde die Bedeutung von Tumorantigen und dem Erkrankungsstadium anhand des Vorkommens Tumor-reaktiver T-Zellen bei Melanompatienten in verschiedenen Stadien untersucht.

1.5.2 Durchführung:

Aus den Knochenmarkaspiraten der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen sollten T-Zellen angereichert werden, die dann in einer 72-stündigen Stimulationskultur mit Tumorantigen-beladenen Dendritischen Zellen *ex vivo* reaktiviert und schließlich intravenös appliziert werden sollten. Hierbei sollten insbesondere toxische Nebenwirkungen auf den adoptiven Zelltransfer evaluiert werden.

1.5.3 Nachbereitung:

Anhand eines geeigneten Immunmonitorings sollte schließlich die immunologische Effektivität der zellulären Therapie untersucht werden.

Diese Arbeit wurde durch die Bereitstellung von klinischem Material von Patienten mit Mammakarzinom und Malignem Melanom durch die Universitätsfrauenklinik Heidelberg und der Dermato-Onkologie des Universitätsklinikums Mannheim ermöglicht.

2. Material

2.1 Geräte

Brutschrank	Nuaire, Plymouth; USA
Dispergiergerät Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen; D
ELISA-Meßgerät	Labsystems, Helsinki; FI
ELISpot-Mikroskop Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Oberkochen; D
Eppendorff-Zentrifuge Biofuge	Heraeus, Hanau; D
FACSvantage	Becton Dickinson, Heidelberg; D
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen; D
Gefrierschrank -70°C Bio Freeze®	Forma Scientific; USA
Glasgeräte	Schott, Mainz; D
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt; D
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen; D
Laborzentrifuge Minifuge	Heraus, Hanau; D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg; D
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar; D
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn; D
MPC (*magnet particle concentrator*) für 6x 15ml Röhrchen)	Dynal, Hamburg; D
Multikanalpipette (8 Kanäle)	Rainin, Leiden; NL
Neubauer-Zählkammer (0,100 mm Tiefe)	Brand, Wertheim; D
pH-Meßgerät	WTW, Weilheim i. OB; D
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen; D
Pipetten 2-1000 µl	Gilson, Bad Camberg; D
Pipettierhilfe Accujet	Brand, Wertheim; D
Präparierbesteck	Dumont; CH
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen; D
Spektrophotometer Titertek Multiscan Plus MK II	Laborsystems, Helsinki; FI
Sterilwerkbank SterilGARD Hood	Baker, Sanford, Maine; USA
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach; D

Waage	Sartorius, Göttingen; D
Wasserbad	Julabo, Seelbach; D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Armschützer 40cm	Ansell, Aalst; B
Combitips	Eppendorf, Hamburg; D
Einfrierbehälter (*Cryo 1°C Freezing Container*)	Nalgene, Rochester; USA
Einfrierröhrchen	Corning B.V., Schipol-Rijk; NL
Einmalkanülen 20G, 25G, 27G	BD Biosciences, Heidelberg; D
Einmalpipetten	Renner, Darmstadt; D
Einmalskalpelle	PfM Ag, Köln; D
Einmalspritze 1ml	Henke Sass Wolf, Tutlingen; D
Einmalspritzen 10-50 ml	BD Discardit II, Heidelberg; D
ELISA-Platten	BD Biosciences, Heidelberg; D
ELISpot-Klebefolien (*tape multiscreen harvester plate*)	Milipore, Eschborn; D
ELISpot 96-Loch Platte (0,45 µm *cellulose-ester membrane*)	Milipore, Molsheim; D
Eppendorf-Röhrchen 0,5;1,5;2 ml	Eppendorf, Köln; D
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen; D
Flachbodenplatten 6-, 24-, 48- und 96-Loch	Falcon BD, Heidelberg; D
Flachbodenplatten 6- und 12-Loch (zellkulturbehandelt)	TPP, Trasadingen; CH
Flachbodenplatten 24-, 48- und 96-Loch (zellkulturbehandelt)	Greiner, Frickenhausen; D
Parafilm	American National Can; USA
Pipetten 2, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Bad Camberg; D
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg; D
Röhrchen mit Filterscheibe Leucosep® 50ml	Greiner, Frickenhausen; D
Rundbodenplatten 96-Loch (zellkulturbehandelt)	Biochrom, Berlin; D
Rundboden-Röhrchen 5ml	Greiner, Frickenhausen; D

Sterilfilter 0,22 µm	Milipore, Molsheim; F
Zellkulturflaschen 25, 75 und 150 cm^3	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen 6x15 mm und 100x20 mm	TPP, Trasadingen; CH
Zellkulturschalen 145x20 mm	Greiner, Frickenhausen; D
Zellschaber	TPP, Trasadingen; CH
Zellsieb 40 µm	Falcon BD, Heidelberg; D
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Biochrom, Berlin; D

2.3 Chemikalien

Aceton	Riedl-de Haën, Seelze; D
AP Konjugat-Substrat-Kit	Bio-Rad, München; D
BCIP/NBT Substrat	Dako, Hamburg; D
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin; D
Bio-Rad Proteinassay Lösung	Bio-Rad, München; D
BSA (*bovine serum albumine*)	Sigma, Deisenhofen; D
Cyclophosphamid	Baxter Oncology, Frankfurt; D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt; D
5´-Fluoruracil	Gry Pharma, Kirchzarten; D
EDTA	Biochrom, Berlin; D
Endobulin	Baxter, Unterschließheim; D
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt; D
Ethanol, p.a.	Riedl-de Haën, Seelze; D
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt; D
Heparin-Natrium	B.Braun, Melsungen; D
Isopropanol	Riedl-de Haën, Seelze; D
Kaiser's Glycerolgelatine	Merck, Darmstadt; D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt; D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH^2PO^4)	Merck, Darmstadt; D
Natriumazid	Merck, Darmstadt; D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt; D
Natriumchlorid-Infusionslösung	Berlin-Chemie AG, Berlin; D

Natriumchloridpulver	J.T.Baker, Deventer; NL
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt; D
Natronlauge, 10N	Riedl-de Haën, Seelze; D
MEM-nichtessentielle Aminosäurelösung	Sigma, Deisenhofen; D
Methotrexat	Gry Pharma, Kirchzarten; D
PBS (*phosphate buffered saline*), Fertiglösung	Invitrogen, Karlsruhe; D
PBS-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen; D
Ringerlösung	Berlin-Chemie AG, Berlin; D
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt; D
Schwefelsäure 95-97%	Merck, Darmstadt; D
Trypanblaupulver	Serva, Heidelberg; D
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin; D
Tween 20	Gerbu Biotechnik, Gaiberg; D
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt; D

2.4 Zellen, Zellkultivierung und -Anreicherung

2.4.1 Etablierte humane Tumorzelllinien

MCF-7	humane Mammakarzinomlinie (HLA-A2+); Soule *et al*.,1973
SK-Mel-23	humane Melanomlinie (HLA-A2+); zur Verfügung gestellt von L. Old, Memorian Sloan-Kettering Cancer Center, New York; USA
U937	humane promonozytäre Leukämielinie (HLA-A3+); Nilsson und Sundstrom, 1974

2.4.2 Medien und Mediensupplemente

BACTEC Plus/Aerobic/F	BD Pharmingen, Hamburg; D
BACTEC Plus/Anaerobic/F	BD Pharmingen, Hamburg; D
BACTEC FOS Supplement	BD Pharmingen, Hamburg; D
DMEM-Pulver	Sigma, Deisenhofen; D
Erythrocin	Abott, Wiesbaden; D

FCS	Biochrom, Berlin; D
Genitcin® (G418 Sulfat)	Life Technologies, Karlsruhe; D
Gentamycin	Biochrom, Berlin; D
Glutamin	Biochrom, Berlin; D
HEPES	Biochrom, Berlin; D
humanes AB-Serum	Sigma, Deisenhofen; D
Penicilin/Streptomycin	Pan™ Biotech, Aidenbach; D
RPMI 1640 (Fertiglösung)	Invitrogen, Karlsruhe; D
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Vancomycin	Abott, Wiebaden; D
X-VIVO 20; serumfrei	BioWhittaker, Vervier; B
Zienam	MSD Sharp & Dohme; Harr; D

2.4.3. Zytokine

rekombinantes GM-CSF	Essex Pharma, München; D
rekombinantes humanes IL-2	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-4	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-7	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-15	PromoCell, Heidelberg; D

2.4.4 Dynabeads®

Dynabeads® M-450 CD3	Dynal, Hamburg; D
Dynabeads® M-450 CD15	Dynal, Hamburg; D
Dynabeads® M-450 CD19	Dynal, Hamburg; D
Dynabeads® Pan Mouse IgG	Dynal, Hamburg; D
T Cell Negative Isolation Kit	Dynal, Hamburg; D

2.5 Quantitative und qualitative immunologische Methoden

2.5.1 Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte und unkonjugierte Antikörper

Name	Spezies	Klon	Referenz oder Firma
Annexin V-FITC	Maus	non human1	Beckman Coulter, Krefeld; D
anti-CD3-PE	Maus	SK7	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD4-APC	Maus	SK3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD4-FITC	Maus	RPA-T4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD8-FITC	Maus	HIT8a	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD11c-APC	Maus	S-HCL-3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD14-PE	Maus	M5E2	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD19-PE	Maus	4G7	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD25-FITC	Maus	2A3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD40-FITC	Maus	5C3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD45RA	Maus	4KB5	Dako, Hamburg; D
anti-CD45RO	Maus	UCHL-1	Dako, Hamburg; D
anti-CD45RO-PE	Maus	UCHL-1	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD56-PE	Maus	MY31	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD69-APC	Maus	L78	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD80-FITC	Maus	L307.4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD83-FITC	Maus	HB15e	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD86-FITC	Maus	IT2.2	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-HLA-A2	Maus	BB7.2	Dr. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D
anti-HLA-DR	Maus	L243	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC			Dianova, Hamburg; D

2.5.2 Proteine und Peptide

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma, Deisenhofen; D
Insulin-Peptid (HLA-A201, aa_{34}-aa_{42})	DKFZ (V270), Heidelberg; D
Her2/neu-Peptid (HLA-A201, aa_{369}-aa_{377})	DKFZ (V270), Heidelberg; D
MUC-1-Peptid (HLA-A201, aa_{12}-aa_{20})	DKFZ (V270), Heidelberg; D

2.5.3 ELISpot-Kits

Maus-anti-Human-IFN-γ	Mabtech, Hamburg; D
Maus-anti-Human-IFN-γ-Biotin	Mabtech, Hamburg; D
Maus-anti-Human-Perforin	Mabtech, Hamburg; D
Maus-anti-Human-Perforin-Biotin	Mabtech, Hamburg; D
AP-Farbentwicklungspuffer	Bio-Rad, München; D
AP-Farbreagenz A	Bio-Rad, München; D
AP-Farbreagenz B	Bio-Rad, München; D

2.5.4 ELISA-Kits

Quantikine® Human IL-4 HS Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden; D
Quantikine® Human IL-10 HS Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden; D
Quantikine® Human IL-12 HS Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden; D
Quantikine® Human TNF-α HS Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden; D
Quantikine® Human TGF-β1 Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden; D

2.6 Zusätzliche Software

FlowJo (FACScan Software)	Tree Star Inc., San Carlo; USA
KS-ELISpot	Zeiss, Göttingen; D
PharmaCalc v 1.0 (Pharmakokinetik Software)	ETH, Zürich; CH

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Lösungen und Puffer

PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH_2PO_4	0,2 g
NaH_2PO_4 x $12H_2O$	2, 85 g

ad 1l ddH_2O; pH 7,2; Lagerung bei 4°C

Trypanblau-Färbelösung

Trypanblau	1,28 g
NaCl	8,5 g

ad 1l ddH_2O; sterilfiltriert; mit Natriumazid (NaN_3, Endkonzentration 1%) versetzt; Lagerung bei RT

3.1.2 Medien und Mediensupplemente

„DZ-Medium“(humane Dendritische Zellkulturen); pH 7,4

X-VIVO 20	10 ml
HEPES	10 mM
Penicilin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
GM-CSF	560 Einheiten/ml
IL-4	1000 Einheiten/ml

„T-Zellmedium“ (humane T-Zellkulturen); pH 7,4

RPMI 1640	10 ml
HEPES	10 mM
Humanes AB-Serum	10 % (v/v)
Penicilin	50 µg/ml

Streptomycin	50 µg/ml
IL-2	100 Einheiten/ml
IL-4	60 Einheiten/ml
(IL-7	20 ng/ml)
(IL-15	20 ng/ml)

RPMI-FKS (SK-Mel 23; U937); pH 7.4

RPMI 1640	10 ml
HEPES	10 mM
FKS	10 % (v/v)
Penicilin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml

„Einfriermedium“

X-VIVO 20	5 ml
Humanes AB-Serum	5 ml
DMSO	10 % (v/v)

3.2 Kultivierung von Zellen

3.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5 min, 1400 rpm) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 900 µl „Einfriermedium“ aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µl DMSO (Endkonzentration 10 %) wurden die Röhrchen bei -70°C eingefroren bzw. nach ca. 24 h bei -200°C in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde auf 37°C erwärmtes X-VIVO 20 mit einer Pasteurpipette zur Zellsuspension zugegeben und resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm, um die Zellen vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Schließlich wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen ausgesät.

3.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zelldichte einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei entspricht die Zellzahl, die in 16 Zählquadranten gezählt wird, der Anzahl der Zellen in 0.1 µl und wurde daher noch mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten.
Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde die Zellsuspension vor dem Auszählen 1:2-1:10 mit einer Trypanblau-Lösung (0.02 %) verdünnt. Dieser Farbstoff dringt nur in toten Zellen ein und färbt diese blau.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gewebslysat

Solide Tumore wurden direkt nach der Entnahme während der Primäroperation in „RPMI-Medium“ bei -20°C eingefroren. Zur Herstellung von Lysat wurden die Gewebe aufgetaut, gegebenenfalls anhaftendes Fettgewebe entfernt und die Gewebe mittels Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke in 5 ml Röhrchen mit 500 µl PBS überführt und mit Hilfe eines Dispergiergerätes homogenisiert. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde das Dispergiermesser vor und nach jeder Benutzung dreimal mit 0.2 N Natronlauge und anschließend sechsmal mit ddH_2O gespült.
Die Gewebssuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, durch einen Sterilfilter (0.22 µm) passiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 3.3.3) die Proteinkonzentration bestimmt und das Gewebslysat bei -20°C aufbewahrt.

3.3.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus primären mononukleären Zellen oder etablierten Tumorzelllinien wie MCF-7, U937 oder SK-Mel 23 wurden die entsprechenden Zellen zentrifugiert und fünfmal mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 50-100 µl PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Durch fünfmaliges, abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde ein vollständige Lyse der Zellen erreicht. Das Lysat wurde für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (siehe 3.3.3) wurde das Zelllysat bei –20°C aufbewahrt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford *et al.*, 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* von 465 nm zu 595 nm durch nicht-kovalente Bindung an Protein in saurer Lösung. Dabei verhält sich die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Eine Eichkurve zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe von standardisierten Proteinlösungen bekannter Rinderserumalbumin-Konzentrationen (0.1 –1.4 mg/ml) erstellt. Die Farblösung „BioRad®-Protein Assay“ wurde 1:5 mit ddH_2O verdünnt und jeweils 200 µl dieser Lösung mit 5 µl der unbekannten Probe bzw. der bekannten Standard-Proteinlösungen in Duplikaten pipettiert. Nach Beendigung einer 5-minütigen Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit dem Computerprogramm *Graph Pad Prism* erstellt und daraus die Konzentration der Proben ermittelt.

3.4 Analytische immunbiologische Methoden

3.4.1 Lösungen und Medien

5 % AB-Medium

RPMI komplett	475 ml
Humanes AB-Serum	25 ml

ELISpot-Beschichtungspuffer

Bikarbonat	2.93 g
Karbonat	1.59 g

ELISpot-Waschpuffer

1x PBS	500 ml
Tween 20	0.25 %

ELISpot-Substratlösung

ddH_2O	10 ml
25x Substratpuffer	400 µl
Substratreagenz A	100 µl
Substratreagenz B	100 µl

FACS-Puffer

1x PBS	50 ml
FKS	1 % (v/v)

Annexin V-Bindungspuffer

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
$CaCl_2$	2.5 mM

ad 1l ddH_2O, pH 7,4, Lagerung bei 4°C

3.4.2 Klinisches Material von Malignompatienten

Klinisches Material wurde den Tumorpatienten nach schriftlicher Einwilligung in der Universitätsfrauenklinik Heidelberg bzw. in der Dermato-Onkologie des Universitätsklinikums Mannheim entnommen. Die Knochenmarkaspiration erfolgte unter systemischer (während der Primäroperation) oder unter lokaler Anästhesie aus dem Beckenkamm. Das heparinisierte Knochenmark sowie das periphere Blut wurden anschließend einer Ficoll-Gradientenzentrifugation unterworfen und isolierte mononukleäre Zellen (MNZ) in Kultur genommen. Tumorbiopsien von Mammakarzinomen wurden während der Primäroperation der Tumore gewonnen, in Medium überführt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet oder kryokonserviert und bei –70°C aufbewahrt.

3.4.3 Isolierung und Kultivierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Humane mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut und Knochenmark wurden mittels Dichtezentrifugation über einen Ficoll-Stufengradienten (Dichte 1.077g/ml) isoliert.
Dazu wurden Leucosep®-Röhrchen mit 15 ml Ficolllösung beladen und 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden je 20 ml PB oder KM mit 15 ml RPMI 1640 verdünnt und auf die Ficolllösung geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 rpm (ohne Bremse). Dabei sammelten sich die MNZ in der sogenannten Interphase, die dann mittels einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein steriles Zentrifugationsröhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm), das Sediment in X-VIVO 20 aufgenommen und die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 2 Stunden bei 37°C in X-VIVO 20 kultiviert. Dabei adhärieren Monozyten an der Plastikoberfläche der Kulturflaschen, während Lymphozyten im Überstand verbleiben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden adhärente Zellen zur Generierung Dendritischer Zellen für sieben Tage in „DZ-Medium“ überführt (Feuerer *et al.*, 2001). Nicht-adhärente Lymphozyten wurden separat in „TZ-Medium“ kultiviert.
Bei einem Teil der ELISpot-Experimente wurden Dendritische Zellen aus $CD34^+$ Stammzellen des Knochenmarks generiert (Bai *et al.*, 2003). Hierzu wurden MNZ des Knochenmarks für 14 Tage in „DZ-Medium“ kultiviert.

3.4.4 Isolierung spezifischer Immunzellpopulationen über Zelloberflächenmoleküle

Zur Isolierung bzw. Depletion bestimmter Zellfraktionen wurden magnetische Dynabeads® eingesetzt. Dynabeads® sind monodisperse Polystyrol-Beads, die mit einer gleichmäßigen Schicht an Eisenoxiden (Fe_2O_3 und Fe_3O_4) überzogen sind. An die Oberfläche der Beads sind Antikörper gekoppelt, die entweder gegen bestimmte Oberflächenantigene oder Immunglobuline gerichtet sind. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften lassen sich spezifisch an die Beads gebundene Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes anreichern.

3.4.4.1 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads®

T-Lymphozyten des Blutes bzw. des Knochenmarks wurden durch die Depletion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B-Lymphozyten sowie myeloischen Zellen mit Hilfe der Dynabeads® angereichert.

Zur Depletion von NK-Zellen wurde monoklonaler Maus-anti-Human-CD56-Antikörper an anti-Maus-IgG-Beads gekoppelt. Für eine Ausgangszahl von 1 x 10^7 Zellen wurden hierzu 100 µl anti-Maus-IgG-Beads zweimal mit X-VIVO 20 gewaschen und mit 20 µl anti-CD56-Antikörper (0.2 mg/ml) für 30 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Bead-Suspension zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper für 1 min in den *Magnetic Particle Concentrator* (MPC) überführt, die Beads zweimal mit X-VIVO 20 gewaschen und nachfolgend in 100 µl „5% AB-Medium“ aufgenommen.

Für die Depletion von B-Lymphozyten als auch von myeloischen Zellen wurden kommerziell erwerbliche anti-Human-CD19- bzw. anti-Human-CD15-Beads eingesetzt. Pro 10^7 Zielzellen wurden 100 µl der jeweiligen Beads in X-VIVO 20 gewaschen und in 200 µl „5% AB-Medium“ resuspendiert.

Die Beads wurden zu den TZ in einem 15 ml Röhrchen zugegeben und für 25 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die sich im Überstand befindlichen TZ wurden anschließend mittels MPC isoliert. Dazu wurde das Röhrchen am MCP fixiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die Beads und die daran anhaftenden Zellen vollständig zu entfernen. Durch diese Methode konnte eine durchschnittliche TZ-Anreicherung von ca. 95 % erzielt werden.

3.4.4.2 Anreicherung von Gedächtnis- und naiven T-Zellen mittels Dynabeads®

Zunächst wurden T-Lymphozyten wie in Abschnitt 2.4.5 mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten Dynabeads angereichert. Das Zellsediment wurde in X-VIVO 20 resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Jeweils 2 x 10^8 Zellen wurden anschließend in 500 µl X-VIVO 20 aufgenommen und jeweils 500 µl humanes AB Serum, 250 µl FKS und 500 µl Antikörper-Mix (enthielt anti-CD14-, -CD16-, -CD56-, -HLA Klasse II DR/DP-; -CD235a-Antikörper) des *T Cell Negative Isolation Kits* hinzugegeben. Zur Anreicherung naiver T-Zellen wurden 6 µg des anti-CD45RO-Antikörpers bzw. 6 µg des anti-CD45RA-Antikörpers zur Anreicherung von Gedächtnis-T-Zellen zugefügt und das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden je 7.5 ml X-VIVO 20 zur jeweiligen

Zellsuspension zugegeben und zum Entfernen ungebundener Antikörper einmal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 5 % AB X-VIVO 20 aufgenommen. Zu jeder Zellsuspension wurden 2.5 ml gereinigte Dynabeads hinzugegeben und auf einer Rollapparatur für 15 min bei 21°C inkubiert. Die Dynabeads des *T Cell Negative Isolation Kits* waren mit einem Fc-spezifischen humanen anti-IgG4-Antikörper konjugiert, der eine hohe Affinität zu allen murinen IgG-Subklassen besitzt. Hiermit wurden die spezifischen Antikörper-Zellkomplexe innerhalb der Suspension gebunden und konnten schließlich mit Hilfe des MCP entfernt werden. Nicht-markierte Zellen im Suspensionsüberstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dreimal mit X-VIVO 20 gewaschen und schließlich im entsprechenden T-Zellmedium aufgenommen.

3.4.4.3 Anreicherung Dendritischer Zellen mittels Dynabeads®

Humane dendritische Zellen differenzieren sich *in vitro* aus $CD34^+$ Vorläuferzellen des Knochenmarks oder aus $CD14^+$ Vorläuferzellen des Blutes. Nach 14- oder respektive 7-tägiger Inkubation in DZ-Medium können differenzierte Dendritische Zellen durch Depletion von T- und B-Lymphozyten mit Hilfe von anti-Human-CD3- bzw. anti-Human-CD19-gekoppelten Dynabeads® (je 100 µl pro 1 x 10^7 Zielzellen) angereichert werden. Das methodische Vorgehen erfolgte analog zur Anreicherung von T-Lymphozyten (siehe 3.4.4.1). Es wurde dabei eine Reinheit von > 95 % erreicht (Feuerer *et al.*, 2001).

3.4.5 Antigenbeladung Dendritischer Zellen

Für den ELISpot-Test wurden die Zellen auf 1 bzw. 2 x 10^4 DZ pro 100 µl mit X-VIVO 20 eingestellt und in der Mikrotiterplatte mit 20 µg Proteinlysat bzw. 10 µg/ml Peptid für 4 h bei 37°C inkubiert.

Zur Generierung therapeutischer Zellen in den ADI-Stimulationskulturen wurden 1 x 10^6 DZ pro ml mit 200 µg/ml über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vor der Zugabe autologer TZ zweimal mit X-VIVO 20 gewaschen, um überschüssiges Antigen zu entfernen.

Folgende Test- und Kontrollantigene wurden für die Beladung von DZ zur Stimulation von TZ eingesetzt:

Testantigen	**Korrespondierendes Kontrollantigen**
Autologe Tumorlysate	Autologe PBMZ-Lysate
Allogene Tumorzelllysate ▪ MCF-7 (Brusttumore) ▪ SK-Mel 23 (Melanome)	Allogene Tumorzelllysate (nicht verwandter Tumorentitäten) ▪ U937 ▪ U937
MUC1-Peptid Her2/neu-Peptid	Insulin-Peptid Insulin-Peptid

3.4.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (Coligan *et al*., 1991; Coons *et al*., 1995; Thiel *et al*., 1996) ist ein Verfahren, bei dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrom phänotypisch charakterisiert und quantifiziert werden können. Unterschiede in Lichtbeugung und Lichtstreuung geben Aufschluss über Größe sowie Binnenstruktur der Zellen und Zellorganellen. Des weiteren können definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Moleküle mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert und untersucht werden.

Einzelne Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl. Dieser induziert eine Lichtstreuung, die zellgebundene Farbstoffe zur Fluoreszenzstrahlung anregt. Photomultiplier detektieren das gestreute Licht, das Auskunft über Größe und Granularität der Zellen gibt, sowie die Fluoreszenzstrahlung, welche die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinnern nachweist.

Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Durchflußzytometers FACSCalibur bestimmt, das mit zwei Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlänge ausgestattet ist. Die relative Grün- (FITC-konjugierte Antikörper), Orange- (PE-konjugierte Antikörper) bzw. Rot-Fluoreszenz (CyChrome-konjugierte Antikörper; PI) wurde mit einem Argon-Krypton-Laser, mit einer Wellenlänge von 488 nm, bestimmt. Mit Hilfe des Helium-Neon-Laser wurde die relative Tiefrot-Fluoreszenz bei 366 nm (APC-konjugierte Antikörper) induziert. Je nach Experiment wurden 10.000 bis 2 x 10^4 Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels *FlowJo*-Software analysiert.

3.4.6.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Pro Ansatz wurden 2 x 10^4 - 2 x 10^6 Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 µl) gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 50 µl (2.5 mg/ml) Endobulin aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Endobulin enthält humanes IgG, welches Fc-Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen für die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper absättigt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 µl) gewaschen und in 50 µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:5 in FACS-Puffer) für 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.4.6.2 Nachweis von toten Zellen mittels Propidiumiodid-Inkorporation

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender aromatischer Kohlenwasserstoff, der von spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und schließlich in die DNA interkaliert. PI kann sowohl zur Ermittlung der Anzahl toter Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation als auch zum Ausschluss toter Zellen bei der Analyse definierter Oberflächenmoleküle herangezogen werden.

Nach der Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (siehe 3.4.6.1) wurde kurz vor der Messung im Durchflußzytometer 1 µg/ml PI zugegeben und die Zellen für ca. 1 min inkubiert.

3.4.6.3 Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Phosphatidylserin-Färbung durch Annexin V

Phosphatidylserin (PS) ist ein negativ-geladenes Phospholipid, das an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. In einer frühen Phase des programmierten Zelltods (Apoptose) kommt es zu einer Umordnung der Phospholipide, wonach PS auf der Zelloberfläche exponiert wird (Martin *et al.*, 1995; Diaz und Schroit, 1996). Dies bildet ein spezifisches Signal für die Erkennung und Entfernung apoptotische Zellen durch Makrophagen (Fadock *et al.*, 1992; Verhoven *et al.*, 1995). Das Oberflächen-exprimierte PS kann durch Annexin V, einem Calcium- und Phospholipid-bindenden Protein, spezifisch detektiert werden.

Zur Bestimmung früh-apoptotischer Zellen wurden die Zellen nach der Färbung mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern einmal mit eiskaltem Annexin V-Bindungspuffer gewaschen, in 100 µl Annexin V-Bindungspuffer aufgenommen und mit 1 µl

FITC-konjugiertem Annexin V für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit Annexin V-Bindungspuffer gewaschen und anschließend in 50 µl Annexin V-Bindungspuffer zur Analyse im Durchflußzytometer aufgenommen.
Als Positivkontrolle wurden autologe Zellen wie oben beschrieben gefärbt, die zuvor 30 min mit 300 µl Formaldehyd (3 %) auf Eis inkubiert worden waren.

3.4.6.4 Nachweis von HLA-A2-exprimierenden Lymphozyten

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) besteht aus einer Gruppe zusammenhängender Genloci, die für verschiedene Proteine codieren. Diese spielen bei der Antigenpräsentation eine essentielle Rolle. Beim Menschen wird der MHC auch als HLA (humanes Leukozytenantigen) bezeichnet, wobei eines von drei Hauptgenen der Klasse I das HLA A bildet. Die MHC-Gene sind hochpolymorph, d. h. für jedes Gen existieren multiple Allele, die jeweils mit einer Nummer benannt sind. Das am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung Westeuropas vertretene HLA Klasse I Allel ist das HLA A2 (ca. 50 %). Da die MHC-Restriktion von T-Zellen bei der Peptidantigen-Erkennung von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Lymphozyten der Patienten vor ihrem Einsatz im Peptid-ELISpot-Test auf HLA A2-Expression untersucht.
Hierzu wurden die Zellen mit Endobulin geblockt und in 50 µl anti-human-HLA A2-Antikörper aus Hybridomüberständen für 15 min auf Eis gefärbt. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und für 15 min mit 100 µl Ziege-anti-Maus-IgG-FITC-Antikörperlösung (1:100 mit FACS-Puffer) auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Waschen konnte die Zellen im Durchflußzytometer analysiert werden.

3.4.6.5 Nachweis von Oberflächenmoleküle auf humanen Dendritischen Zellen

Für humane Dendritische Zellen wurde bisher kein spezifischer Oberflächenmarker identifiziert, der exklusiv nur auf Dendritischen Zellen exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde eine Kombination von exprimierten und nicht-exprimierten Oberflächenmolekülen zur Detektion Dendritischer Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie angewendet. Die Dendritischen Zellen in den therapeutischen Stimulationskulturen wurden mit einem APC-konjugierten anti-CD11c Antikörper positiv markiert. CD11c ist ein Adhäsionsmolekül (Integrin αX), das auf 98 % der Dendritischen Zellen sowie auf Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Gleichzeitig wurde das Zellgemisch mit einem sogenannten Linienmarker-Antikörpermix (anti-CD3-PE; -CD14-PE; -CD19-PE; -CD56-PE) inkubiert, der vorhandene T-Zellen, Monozyten, B-Zellen und NK-Zellen PE-markierte. Nach Ausschluss

PI-positiver, toter Zellen konnten somit bei der Analyse Dendritischer Zellpopulationen „nicht-dendritische“, PE-positive Zellen ausgegrenzt und die CD11c-positiven und Linienmarker-negativen Zellpopulationen phänotypisch untersucht werden. Die Färbung erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wie in Abschnitt 3.4.9.1 beschrieben.

3.4.7 ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Mit Hilfe des ELISA-Tests lassen sich lösliche Moleküle, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine in Zellkulturüberständen quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentration von IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α sowie TGF-β1 in den Überständen der Stimulationskulturen für den adoptiven Transfer bestimmt.

Die zu untersuchenden Proben werden in eine Mikrotiterplatte inkubiert, die mit einem polyklonalen Zytokin-spezifischen Antikörper beschichtet ist. Das in den Proben befindliche Zytokin wird durch die Bindung an den Erstantikörper immobilisiert und durch einen zweiten Enzym-gekoppelten Antikörper, der spezifisch für das jeweils zu detektierende Zytokin ist, detektiert. Dieser katalysiert in einer nachfolgenden Substratreaktion die Bildung eines farbigen Produkts, wobei die Farbentwicklung direkt proportional zur Menge an gebundenem Zytokin ist. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter Zytokin-Standardkonzentrationen kann eine Eichgerade erstellt werden und somit die Menge an vorhandenem Zytokin ermittelt werden.

Für folgende ELISA-Tests gab es Abweichungen zum oben beschriebenen funktionellen Prinzip. Im Falle von TGF-β1 war die Mikrotiterplatte mit TGF β-Rezeptor Typ II überzogen. Latentes TGF-β1 wurde zunächst durch Ansäuerung und nachfolgender Neutralisierung zu immunaktivem, detektierbarem TGF-β1 umgewandelt. Für die hochsensitive Quantifizierung von IL-4, IL-10 und IL-12 wurde eine Verstärkung des Signals durch einen zusätzlichen Schritt erzielt. Das an das Zytokin-spezifischen Antikörper konjugierte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) dephosphoryliert Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), welches als spezifischer Kofaktor zur Aktivierung eines Reduktions-Oxidations-Kreislaufs dient. In diesem Kreislauf katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion eines Tetrazolium-Salz zu einem intensiv gefärbten Formazan-Farbstoff unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD^+. Letzteres dient wiederum als Kofaktor in einer nachfolgenden Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion, bei der NADH durch Oxidation von Ethanol regeneriert wird. Die Reduktionsrate des Tetrazolium-

Salzes und damit die Menge des farbigen Reaktionsprodukts ist direkt proportional zur Menge an Platten-gebundenem Zytokin.
Prinzipiell wurden pro Loch der beschichteten Mikrotiterplatte 50 µl Testpuffer vorgelegt und mit 200 µl Standard bzw. Probe pro Loch für 2-3 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und mit 200 µl Zytokinkonjugat pro Loch erneut für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde viermal gewaschen und 200 µl Substratlösung pro Loch zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei RT unter Lichtausschluss wurde die Reaktion mit 50 µl Stop-Lösung pro Loch abgestoppt und die Absorption innerhalb der nachfolgenden 30 min im Photometer gemessen. Dabei erfolgte die Absorptionsmessung für IL-4, IL-10, IL-12 und TNF-α bei 490 nm und für TGF-β1 bei 450 nm. Je nach zu bestimmenden Molekül ergaben sich Abweichungen von diesem allgemeinen Protokoll, die nach Herstellerangaben befolgt wurden.

3.4.8 ELISpot-Test (*enzyme-linked immunospot assay*)

Der ELISpot-Test stellt eine hochsensitive Methode zur Frequenzbestimmung Antigen-reaktiver TZ innerhalb einer T-Zellpopulation dar. Lokal sezernierte Zytokine werden von einem immoblisierten Antikörper gebunden und schließlich über eine Enzym-gekoppelte Farbreaktion visualisiert. Dabei entspricht ein farbiger Punkt (*spot*) einer einzelnen Zytokin-produzierenden Zelle.
In der vorliegenden Arbeit sollten selektiv Gedächtnis-T-Zellantworten untersucht werden. Hierzu wurden TZ für nur 40 Stunden mit Antigen-präsentierenden autologen DZ *in vitro* stimuliert und auf ihre Fähigkeit IFN-γ und Perforin zu produzieren getestet.
Eine 96-Loch Nitrozellulose-Mikrotiterplatte wurde zunächst mit dem Antikörper gegen das zu detektierende Zytokin beladen. Hierzu wurde die Platte mit 100 µl pro Loch des jeweiligen Antikörpers (siehe 2.5.3) mit einer Konzentration von 15 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch viermaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt und die Platte für mindestens eine Stunde mit „5 % AB-Medium“ (mit 200 µl pro Loch) bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und die Platte konnte mit den zu testenden Zellen beladen werden.
Aufgereinigte DZ (siehe 3.4.4.3) wurden hierzu mit X-VIVO 20 auf 1 x 10^4 bzw. 2 x 10^4 DZ pro 100 µl eingestellt und in der Mikrotiterplatte mit 20 µg Proteinlysat bzw. 10 µg/ml Peptid für 4 h bei 37°C beladen. Anschließend wurden die über Nacht in Zytokin-freiem Medium

kultivierten T-Zellen angereichert (siehe 3.4.4.1), auf eine Zellzahl von 5 x 10^4 bzw. 1 x 10^5 pro 100 µl mit „5 % AB-Medium“ eingestellt und mit den beladenen DZ bei 37°C kokultiviert. Alle Testgruppen wurden mindestens in Triplikaten angesetzt.

Nach einer Inkubationsdauer von 40 h wurden die mit Hilfe der Nitrozellulose-gebundenen Antikörper fixierten Zytokine visualisiert. Zunächst wurde die Platte viermal mit ELISpot-Waschpuffer gewaschen, verbliebene Zellen mit Wasser lysiert und die Platte erneut viermal gewaschen. Anschließend wurde mit Zytokin-spezifischen, biotinylierten Zweitantikörpern (je 100 µl pro Loch mit 1µg/ml) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und mit 100 µl (1µg/ml) alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin für 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde fünfmal mit Waschpuffer sowie einmal mit PBS gewaschen und die Zytokinpunkte durch Inkubation mit einer Farbsubstratlösung für ca. 15 min bei RT im Dunkeln sichtbar gemacht. Die Anzahl der Farbpunkte wurde anschließend mit Hilfe des Axioplan 2-Mikroskops und der KS-ELISpot-Software bestimmt.

Durch den Vergleich der eingesetzten Gesamt-T-Zellzahl mit der Anzahl an gemessenen Farbpunkten wurde die Frequenz Antigen-reaktiver TZ innerhalb der T-Zellpopulation ermittelt. Die Präsenz Antigen-reaktiver TZ wurde angenommen, wenn die Anzahl Zytokin-sezernierender Zellen nach Stimulation mit den spezifischen Testantigenen signifikant erhöht im Vergleich zu den mit Kontrollantigenen stimulierten Gruppen war ($p < 0.05$).

3.5 Das CMF *In Vitro*-Protokoll

3.5.1 Lösungen und Medien

„T-Zellmedium“ (humane T-Zellkulturen); pH 7.4

RPMI 1640	10 ml
HEPES	10 mM
Humanes AB-Serum	10 % (v/v)
Penicilin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
IL-2	100 bzw. 300 Einheiten/ml
IL-4	60 Einheiten/ml

„Zytostatika-substituierte Medien“

RPMI 1640	10 ml
HEPES	10 mM
Humanes AB-Serum	10 % (v/v)
Penicilin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
IL-2	100 bzw. 300 Einheiten/ml
IL-4	60 Einheiten/ml

Cyclophosphamid, Methotrexat und 5’-Fluoruracil wurden in der Apotheke des Universitätsklinikums Heidelberg entsprechend der folgenden Tabelle zugefügt:

Substanz	CM 1	CMF	CM 2	CM 3
Cyclophosphamid	14.13 mg/l	14.13 mg/l	7.93 mg/l	3.96 mg/l
Methotrexat	1.68 mg/l	1.68 mg/l	0.82 mg/l	0.41 mg/l
5’-Fluoruracil	-	1.38 mg/l	-	-

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der im CMF *In Vitro*-Protokoll eingesetzten Zytostatika-substituierten Medien.

Das CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5’-Fluoruracil)-Therapieregime ist ein standardisiertes Chemotherapieschema, das sowohl zur adjuvanten als auch zur palliativen Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt wird. Die Applikationsschemata sind im Anhang (siehe 7.1) aufgeführt.

Um diese systemisch applizierte Kombinationstherapie *in vitro* zu simulieren, wurde anhand der Maße einer idealisierten Person (1.80 m; 80 kg; 2 m^2) und mit Hilfe des Pharmakokinetik-Simulations-Programms *PharmaCalc v 1.0* die Abbaukurven im Plasma jedes der drei Zytostatika bestimmt.

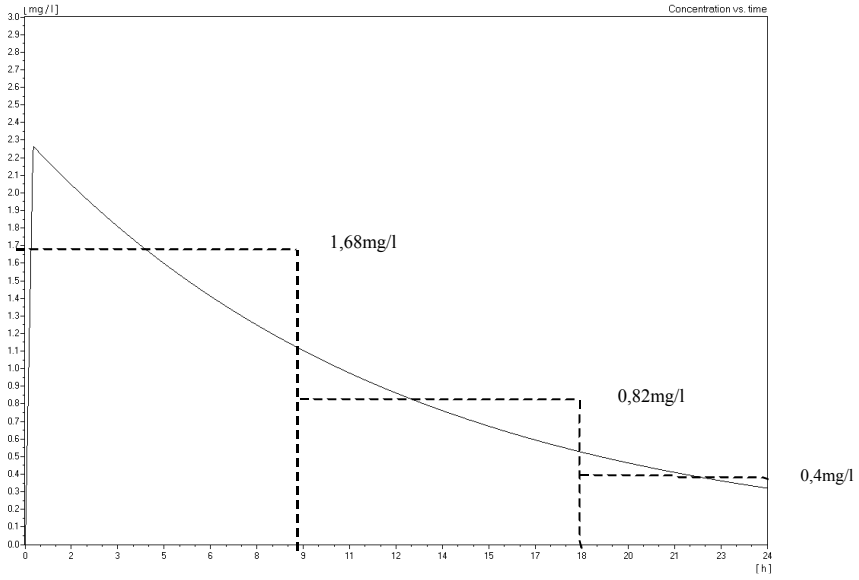


Abb. 3.1 Simulation des Abbaus von Methotrexat im Plasma.
Angegeben ist die mittels des Pharmakokinetik-Simulations-Programms (*PharmaCalc v 1.0*) ermittelten Abbaukurve im Plasma einer idealisierten Person (Körpergröße: 1.80 m; Gewicht: 80 kg; Körperoberfläche: 2 m^2), bei einer Initialdosis von 80 mg, einer Infusionsdauer von 1 h, einem angenommenen Verteilungsvolumen von 35 l sowie einer Halbwertszeit von 9 h. Die Konzentrationsangaben an den gestrichelt dargestellten Quadraten geben die gemittelten Plasmakonzentrationen über dem jeweiligen neunstündigen Abbauintervall an.

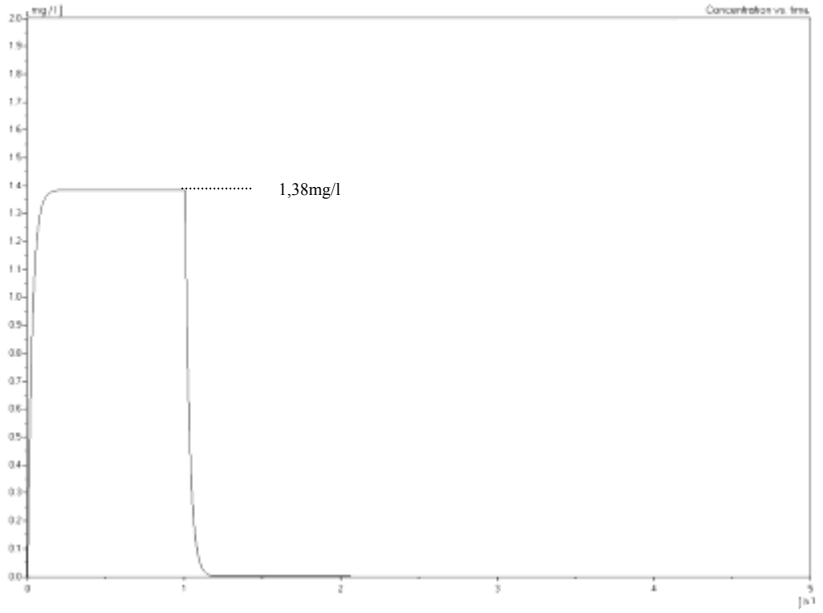


Abb. 3.2 Simulation des Abbaus von 5-Fluoruracil im Plasma.
Angegeben ist die mittels des Pharmakokinetik-Simulations-Programms (*PharmaCalc v 1.0*) ermittelten Abbaukurve von 5'-Fluoruracil im Plasma einer idealisierten Person (Körpergröße: 1.80 m; Gewicht: 80 kg; Körperoberfläche: 2 m^2), bei einer Initialdosis von 1200 mg, einer Infusionsdauer von 1 h sowie einem angenommenen Verteilungsvolumen von 25 l.

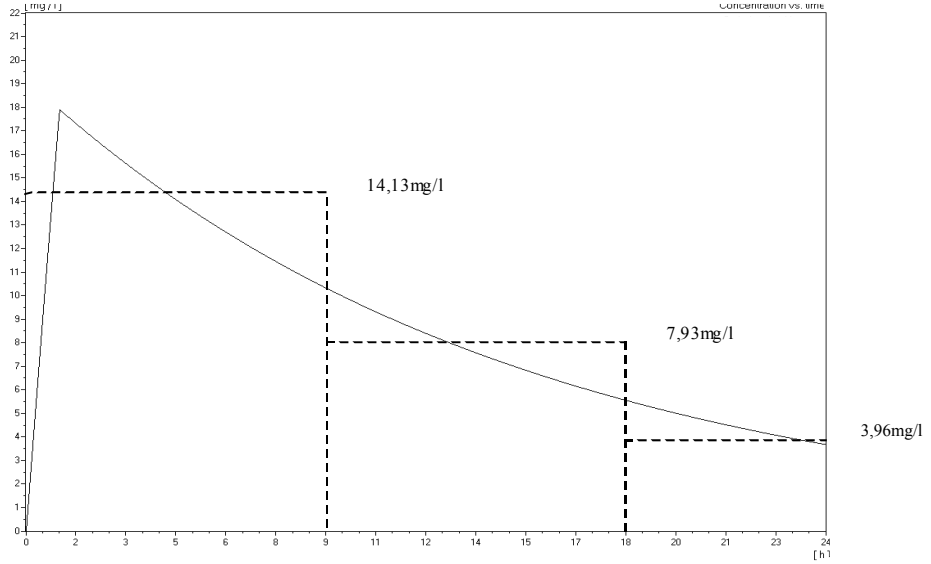


Abb. 3.3 Simulation des Abbaus von Cyclophosphamid im Plasma.
Angegeben ist die mittels des Pharmakokinetik-Simulations-Programms (*PharmaCalc v 1.0*) ermittelten Abbaukurve im Plasma einer idealisierten Person (Körpergröße: 1.80 m; Gewicht: 80 kg; Körperoberfläche: 2 m^2), bei einer Initialdosis von 1200 mg, einer Infusionsdauer von 1 h, einem angenommenen Verteilungsvolumen von 54 l sowie einer Halbwertszeit von 9 h. Die Konzentrationsangaben an den gestrichelt-dargestellten Quadraten geben die gemittelten Plasmakonzentrationen über dem jeweiligen neunstüngigen Abbauintervall an.

Die in den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 gemittelte Konzentrationen innerhalb eines Abbauintervalls berechnen sich wie folgt:

((Konzentration bei 1h , 9h, 18h) + (Konzentration bei 9h, 18h, 27h))/2

Basierend auf den ermittelten Abbaukinetiken wurde ein 72-stündiges CMF *In Vitro*-Behandlungsprotokoll entwickelt. Anhand dieses Modells, das einen Zyklus des CMF-Regimes simuliert, sollte die Auswirkung von CMF auf verschiedene T-Zellsubpopulationen *in vitro* getestet werden.

Hierzu wurde die gleiche Anzahl der zu testenden T-Zellpopulationen nach dem *CMF In Vitro*-Protokoll mit Zytostatika-substituierten Medium inkubiert, während die verbleibende Hälfte unter gleichen Bedingungen in „normalem“ T-Zellmedium inkubiert wurde. Bei einigen Versuchsreihen wurde sowohl das T-Zellmedium als auch das Zytostatikamedium mit 300 U/ml rekombinantem IL-2 substituiert. Die Abbildung 3.4 zeigt den zeitlichen Einsatz der verschiedenen Zytostatika-substituierten Medien.

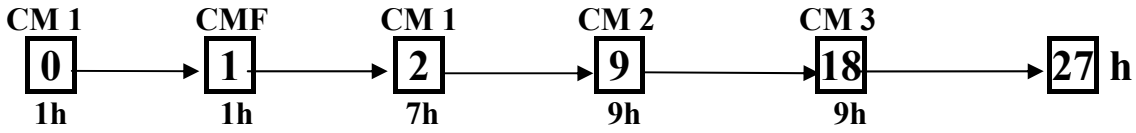


Abb. 3.4 Das CMF *In Vitro*-Protokoll.
Dargestellt ist der zeitlicher Ablauf der *in vitro* Zytostatika-Inkubation. Zu den in den Kästen angegebenen Zeitpunkten wurde das jeweilige Kulturmedium steril entfernt und durch das angegebene Folgemedium ersetzt. 5´-Fluoruracil-haltiges Medium wurde für 1 h eingesetzt, da es laut simulierter Abbaukinetik nur eine Stunde im Plasma nachweisbar ist. Für Cyclophosphamid und Methotrexat wurde eine initiale Inkubationsphase von neun Stunden angesetzt, was den Halbwertszeiten dieser Zytostatika entspricht. Während der folgenden Inkubationsintervalle wurde die Konzentrationen von Cyclophosphamid und Methotrexat jeweils halbiert, um den Abbau der Zytostatika im Organismus zu simulieren.

Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationsphase wurde überständiges Medium vollständig abgenommen, die verbliebenen Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend das Folgemedium zu den Zellen hinzugegeben. Bei jedem Mediumwechsel der nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll behandelten T-Zellkulturen wurde ebenso das Medium der nicht-behandelten Kontrollkulturen ausgetauscht. Nach Beendigung der letzten Zytostatikainkubation (CM3) wurden alle T-Zellpopulationen zweimal gewaschen und in „normalem“ bzw. 300 U IL-2-substituiertem Medium aufgenommen und für 24 h bei 37°C weiterkultiviert.

3.6 Therapeutische immunbiologische Methoden

3.6.1 Medien

„Stimulationskultur-Medium“

X-VIVO 20	10 ml
HEPES	10 mM
Humanes AB-Serum	10 % (v/v)
Penicilin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Ringerlösung	1 l
NaCl-Infusions-Lösung	100 ml

3.6.2 Reaktivierung Patienten-eigener Tumor-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen

Zur Gewinnung von Gedächtnis-T-Zellen und Dendritischen Vorläuferzellen wurde eine ambulante Knochenmarkpunktion an beiden Beckenkämmen (je bis zu 50 ml) durchgeführt. Zusätzlich wurde den Patientinnen ca. 80 ml peripheres Blut zur Generierung weiterer Dendritischer Zellen entnommen. Das heparinisierte Knochenmark sowie das periphere Blut wurden anschließend einer Ficoll-Gradientenzentrifugation unterworfen und isolierte mononukleäre Zellen für 2 h in X-VIVO 20 in sterilen Kulturflaschen bei 37°C inkubiert. Nicht-adhärente Lymphozyten wurden in „TZ-Medium“ überführt, das bei Patientin ADI 06 und bei nachfolgenden Patientinnen mit 20 ng IL-7 und IL-15 substituiert wurde. Adhärente Zellen wurden zur Generierung Dendritischer Zellen für sieben Tage separat in „DZ-Medium“ kultiviert. Nach phänotypsicher Ausdifferenzierung der Dendritischen Zellen wurden diese zweimal gewaschen, gezählt und zur Antigenbeladung (siehe 3.4.5) je nach Zellzahl mit der entsprechenden Menge des MCF-7-Lysats für 24 h bei 37°C in X-VIVO 20 kultiviert.

$1x\ 10^6$ DZ	–	200µg Lysat	–	1ml

Anschließend wurde der Kulturüberstand entfernt, die DZ zweimal mit sterilem PBS gewaschen und zusammen mit autologen, aufgereinigten KM-T-Zellen (siehe 3.4.4.1) im Verhältnis 1:13 bis 1:5 für 72 h bei 37°C in „Stimulationskultur-Medium“ für 72 h kultiviert. Nach 48 h wurde ca. die Hälfte des Kulturüberstands verworfen und durch neues Medium ersetzt. Um ein optimales Überleben der therapeutischen Zellen zu gewährleisten, wurden die Kulturbedingungen während der Studie z. T. variiert: Die Stimulationskulturen der Patientinnen ADI 04 und ADI 05 erhielten zusätzlich 20 U/ml rekombinantes IL-2, während die Kulturen ADI 06 und folgende Kulturen mit jeweils 100 U IL-2 substituiert wurden.

3.6.3 Hygienische Überwachung

Nach Anreicherung der therapeutischen T- und Dendritischen Zellen (d 0) sowie nach Ablauf der 72-stündigen Stimulationskultur (d 3) wurden 10 ml des Kulturüberstandes steril entnommen und mit Hilfe einer Spritze jeweils 5 ml in aerobe und anaerobe BACTEC Plus/F®-Blutkulturflaschen überführt. Zusätzlich wurde den Kulturen jeweils 2 ml BACTEC-

Fos®-Supplement zugefügt. Die Kulturüberstände wurden so zur Untersuchung in das Labor des Hygieneinstituts der Universität Heidelberg gegeben, wo sie auf potentielle mikrobielle Kontaminationen untersucht wurden. Der Befund wurde drei Tage nach Probeneingang telefonisch abgefragt und die Zellsuspension nach Ausschluss einer detektierbaren Kontamination appliziert.

3.6.4 Applikation der therapeutischen Zellen

Zur Applikation der therapeutischen Zellen wurden die Patientinnen stationär zur Observanz aufgenommen. Vor der Therapie wurden folgende Laborparameter bestimmt: Blutbild, Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff, Gerinnung, Transaminasen. Nach dieser Abklärung erhielt die Patientin einen peripheren Zugang.
Währenddessen wurde der Zellkulturüberstand der 72-stündigen Stimulationskulturen abgenommen und bei 20°C für anschließende Untersuchungen konserviert. Die Zellen wurden fünfmal mit 20 ml Ringerlösung gewaschen und durch ein Zellsieb (40 μm) passiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension in 20 ml Ringerlösung aufgenommen und über eine Spritze in 80 ml NaCl-Infusionslösung transferiert und schließlich der Patientin über eine gesteuerte Kurzinfusion mit 100 ml/15 min intravenös appliziert. Der Infusionsschlauch wurde mit 15 ml steriler NaCl-Lösung gespült, um potentiell im Schlauch verbliebende Zellen zu lösen. Anschließend wurde prophylaktisch eine antibiotische Abdeckung der Patientin mit einem Breitbandantibiotikum (Ciprobay®; 3x 400 mg i. v.) und einem Antimykotikum (Diflucan®; 2x 400 mg i. v.) durchgeführt. 24 h nach Applikation wurden oben genannte Laborparametern kontrolliert und, sofern keine Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, wurde die Patientin entlassen.

3.7 Ethikvoten

Für die Gewinnung und Untersuchung sämtlicher humaner Gewebeproben sowie für die Durchführung des adoptiven T-Zelltransfers lag das schriftliche Einverständnis der betroffenen Patienten vor. Das Versuchsvorhaben erfolgte jeweils nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Heidelberg.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss des CMF-Therapieregimes auf humane T-Lymphozyten *in vitro*

Um einen potentiellen Einfluss zytostatischer Therapien auf humane T-Lymphozyten zu evaluieren, wurde zunächst die Wirkung ausgesuchter zytostatischer Wirkstoffe auf isolierte naive und Gedächtnis-T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Donoren *in vitro* untersucht. Hierbei orientierte ich mich an dem CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil)-Therapieregime, ein standardisiertes Chemotherapieschema, das vielfach in der Universitätsfrauenklinik Heidelberg zur adjuvanten als auch palliativen Behandlung von Mammakarzinompatientinnen einsetzt wird. Bezogen auf die Körperparameter einer idealisierten Person (1.80 m; 80 kg; 2 m^2) und mit Hilfe des Pharmakokinetik-Simulationsprogramms *PharmaCalc v 1.0* wurden die Abbaukurven der drei Zytostatika im Plasma bestimmt und daraus ein Behandlungsprotokoll entworfen (siehe 3.5). Anhand dieses Modells sollte nun die physiologische Wirkung dieser systemisch applizierten Kombinationstherapie auf humane T-Zellen *in vitro* simuliert werden.

Hierzu wurde von acht gesunden Donoren durchschnittlich 300 ml peripheres Blut entnommen und daraus mononukleäre Zellen mittels Ficolldichtezentrifugation isoliert. Anschließend wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert und die gleiche Anzahl Zellen der entsprechenden T-Zellsubpopulationen in Zytostatika-substituiertem Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden autologe Zellen der jeweiligen Zellpopulation in nicht substituiertem Medium mit derselben Ausgangszellzahl inkubiert. In Tabelle 4.1 sind die Ausgangszellzahlen der angereicherten naiven und Gedächtnis-T-Zellen der einzelnen Donoren aufgeführt.

	Isolierte T-Zellzahlen (x10^6)		Ausgangszellzahlen (x10^6)	
Donor Nr. #	**NTZ**	**GTZ**	**CMF *In Vitro*-Protokoll (NTZ, GTZ)**	**unbehandelt (NTZ, GTZ)**
1	35.40	14.7	7.35	7.35
2	29.20	41.10	14.60	14.60
3	25.00	-	12.50	12.50
4	29.80	23.00	11.50	11.50
10	8.60	41.85	4.30	4.30
11	3.02	8.42	1.51	1.51
12	40.90	42.00	20.45	20.45
13	7.47	15.77	3.73	3.73

Tabelle 4.1: Übersicht der isolierten T-Zellzahlen und der Ausgangszellzahlen für das CMF *In Vitro*-Protokoll. Von acht gesunden Donoren wurde peripheres Blut entnommen und jeweils die naive und die Gedächtnis-T-Zellfraktion mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert. Die so separierten T-Zellfraktionen wurden gezählt und jeweils die gleiche Anzahl Zellen der entsprechenden Fraktionen nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll in Zytostatika-substituierten Medium oder herkömmlichen TZ-Medium kultiviert.

Die angereicherten naiven und Gedächtnis-T-Zellen wurden entsprechend dem CMF *In Vitro*-Protokoll inkubiert. 24 Stunden nach Zugabe des letzten Zytostatika-substituierten Mediums wurden die T-Zellen gewaschen und die vitale Zellzahl mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Proliferations-förderndes T-Zellmedium (300 U IL-2) überführt und nach siebentägiger Inkubation die Zellzahl wie oben erneut bestimmt.

In Abbildung 4.1 sind die ermittelten Zellzahlen der so behandelten naiven und Gedächtnis-T-Zellen der einzelnen Donoren aufgezeigt. Für jeden Donor konnte eine massive Reduktion der Anzahl naiver und Gedächtnis-T-Zellen 24 Stunden nach Beendigung der letzten Zytostatika-Inkubation (d 1) festgestellt werden. Während dies bei den Donoren #1 und #4 insbesondere die Gedächtniszell-Subpopulation betraf, konnte bei den restlichen Donoren ein vergleichbarer Zellzahlverlust für beide T-Zell-Subpopulationen beobachtet werden. Interessanterweise wurde ein Rückgang der vitalen T-Zell Populationen sowohl in den mit Zytostatika-behandelten als auch in den unbehandelten Kulturen verzeichnet, so dass der beobachtete Effekt vermutlich nicht auf eine spezifische Wirkung der eingesetzten Zytostatika zurückzuführen war. Vielmehr schienen die isolierten naiven und Gedächtnis-T-Zellen aufgrund fehlender Zellinteraktionen oder anderer, nicht-optimaler Kulturbedingungen zu sterben.

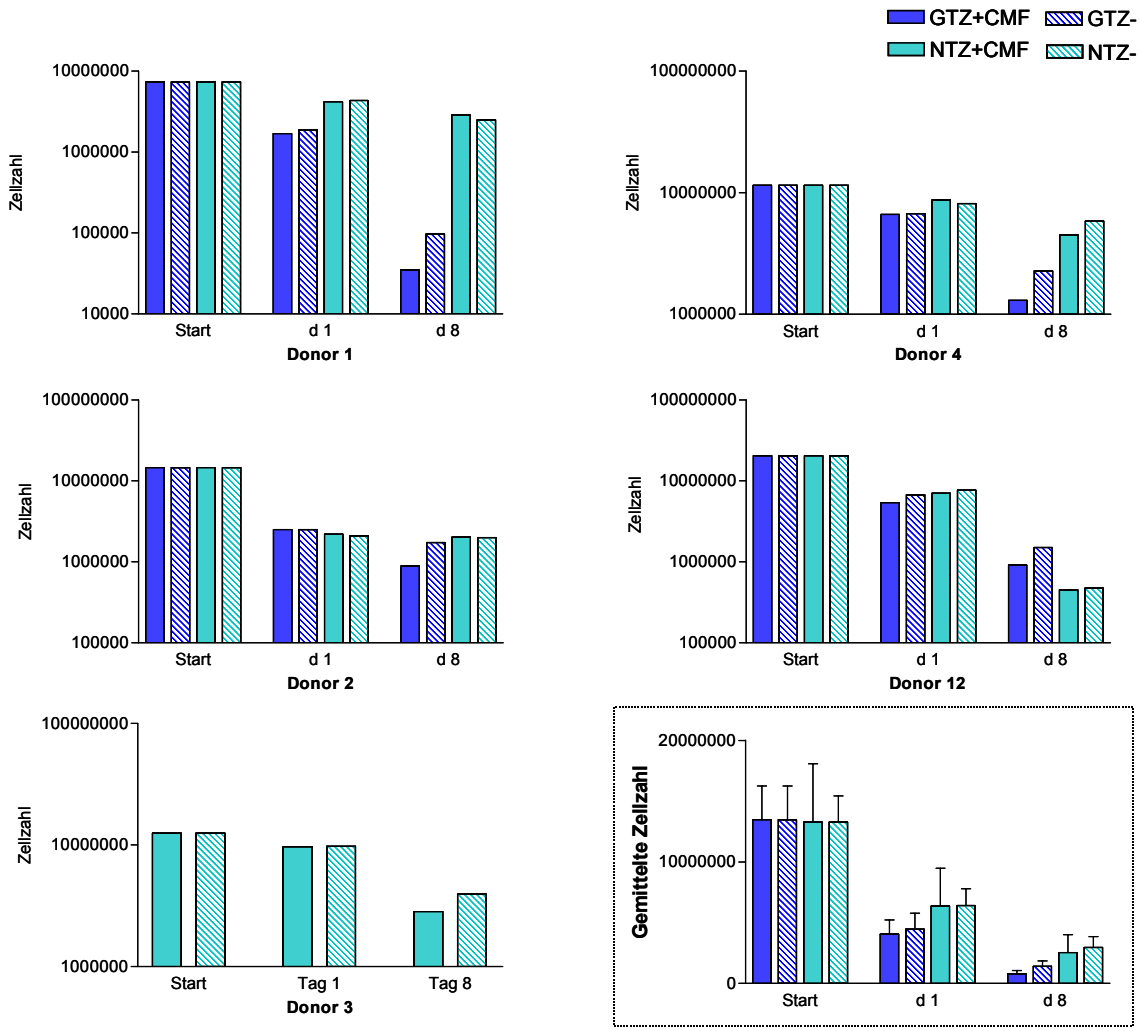


Abb. 4.1: Quantitative Analyse der naiven und der Gedächtnis-T-Zellpopulationen nach Behandlung gemäß dem *CMF In Vitro*-Protokoll. Aus dem peripheren Blut fünf gesunder Donoren wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert. Die Zellzahl der vitalen T-Zellpopulationen wurde mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmt. Anschließend wurden die separierten T-Zellfraktionen geteilt und jeweils die gleiche Anzahl Zellen nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll in Zytostatika-substituiertem Medium (+CMF; ausgefüllte Balken) oder herkömmlichem TZ-Medium ohne Zytostatikasubstitution (-; schraffierte Balken) kultiviert. Einen Tag nach Beendigung des CMF *In Vitro*-Protokolls wurden die Zellen gewaschen und alle Zellfraktionen in herkömmlichem, IL-2-substituiertem T-Zellmedium (300 U/ml) für weitere sieben Tage kultiviert. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen zu Beginn sowie an Tag 1 (d 1) und Tag 8 (d 8) nach Beendigung des CMF *In Vitro*-Protokolls von fünf unabhängigen Experimenten. Die ermittelten Zellzahlen der Gedächtnis-T-Zellpopulationen (GTZ) sind blau, die der naiven T-Zellpopulationen (NTZ) sind grün dargestellt. Für Donor 3 wurde nur die naive T-Zellpopulation untersucht. Der Graph im eingeschobenen Kasten gibt die gemittelten Zellzahlen der verschiedenen T-Zellfraktionen aller untersuchten Donoren zusammenfassend wieder

Nachdem die so behandelten Zellen für sieben weitere Tage, nun in IL-2-substituiertem T-Zellmedium kultiviert wurden, konnte bei allen untersuchten Donoren ein verstärkter Rückgang der vitalen T-Zellzahl innerhalb der CMF-behandelten Gedächtnis-T-Zellpopulationen festgestellt werden. Dieser Effekt wird besonders anhand der graphischen

Darstellung der prozentualen Zellverluste für die verschiedenen T-Zellfraktionen aller untersuchten Donoren deutlich (Abb. 4.2).

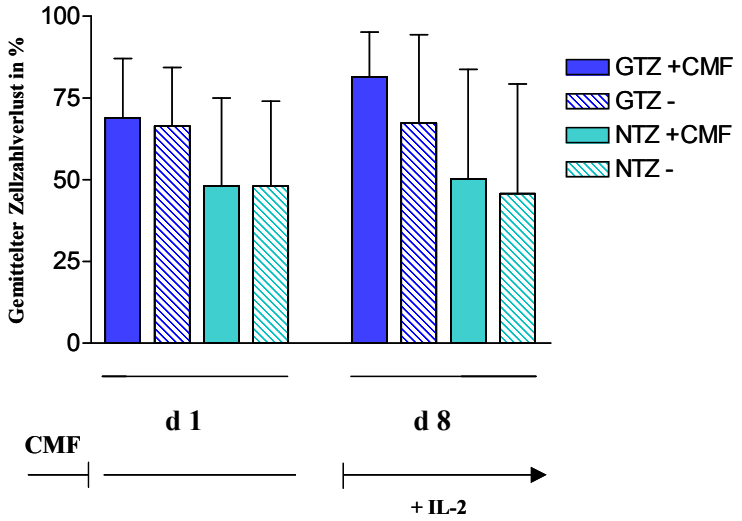


Abb. 4.2: Prozentualer Zellzahlverlust nach Behandlung gemäß dem CMF *In Vitro*-Protokoll.
Aus dem peripheren Blut fünf gesunder Donoren wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert. Die separierten T-Zellfraktionen wurden gezählt und jeweils die gleiche Anzahl Zellen nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll in Zytostatika-substituiertem Medium (+CMF; ausgefüllte Balken) oder herkömmlichem TZ-Medium ohne Zytostatikasubstitution (-; schraffierte Balken) kultiviert. Einen Tag nach Beendigung des CMF *In Vitro* Protokolls wurden die Zellen gewaschen und alle Zellfraktionen in herkömmlichem, IL-2-substituiertem T-Zellmedium (300 U/ml) für weitere sieben Tage kultiviert. Dargestellt ist der relative Zellzahlverlust an Tag 1 (d 1) sowie an Tag 8 (d 8) nach Beendigung des CMF *In Vitro*-Protokolls für die isolierte naive (grüne Balken) und die Gedächtniszell-Population (blaue Balken). Hierzu wurden die ermittelten Zellzahlen an Tag 1 ins prozentuale Verhältnis zu der Ausgangszellzahl vor Zytostatika Inkubation gesetzt. Die ermittelten Zellzahlen an Tag 8 wurden ins Verhältnis zur Zellzahl an Tag 1 gesetzt. In jedem Balken sind vier bis fünf unabhängige Experimente verschiedener Donoren zusammengefasst.

Anhand der gemittelten Zellzahlverluste der fünf unersuchten Donoren wurde erkennbar, dass acht Tage nach der finalen Zytostatikagabe alle Zellpopulationen weitere Verluste erlitten, insbesondere aber die Gedächtniszellpopulationen weiter dezimiert wurden. Dabei wurde für Zytostatika-behandelte Gedächtniszellen durchschnittlich höhere Zellzahlverluste festgestellt als für die nicht behandelten Kontrollpopulationen. Diese Beobachtung ließ einen negativen Langzeiteffekt der *in vitro* simulierten Chemotherapie vermuten, der scheinbar nur unter Proliferations-fördernden Kulturbedingungen evaluierbar war.

Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob die eingesetzten Zytostatika des CMF *In Vitro*-Protokolls einen direkt negativen Effekt auf proliferierende T-Zellen besitzen. Hierzu wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen wie oben beschrieben aus dem peripheren Blut von drei gesunden Donoren angereichert und nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll mit den entsprechenden Zytostatika inkubiert. Das Kulturmedium wurde nun mit 300 U/ml IL-2

substituiert. Um die Proliferation der T-Zellen *in vitro* weiter zu begünstigen, wurden den Kulturen zusätzlich 10^4 sogenannter *Feeder*-Zellen beigefügt. Diese sezernieren nach letaler Bestrahlung eine Vielzahl verschiedenster Zytokine ins Kulturmedium und fördern damit das Überleben und die Proliferation der isolierten T-Zellpopulationen. Autologe Kontrollkulturen wurden ebenfalls mit zusätzlichen 300 U/ml IL-2 kultiviert. Wiederum wurden 24 Stunden nach Zugabe des letzten Zytostatika-substituierten Mediums die T-Zellen gewaschen und die vitale Zellzahl mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmt. Die Zellen wurden anschließend in Zytostatika-freiem, IL-2-substituiertem T-Zellmedium aufgenommen. Nach siebentägiger Inkubation wurde die Zellzahl wie oben erneut bestimmt. In Abbildung 4.3 sind die Ausgangszellzahlen sowie die ermittelten Zellzahlen 24 Stunden und acht Tage nach Zytostatikainkubation unter Proliferations-fördernden Bedingungen für die drei untersuchten Donoren angegeben.

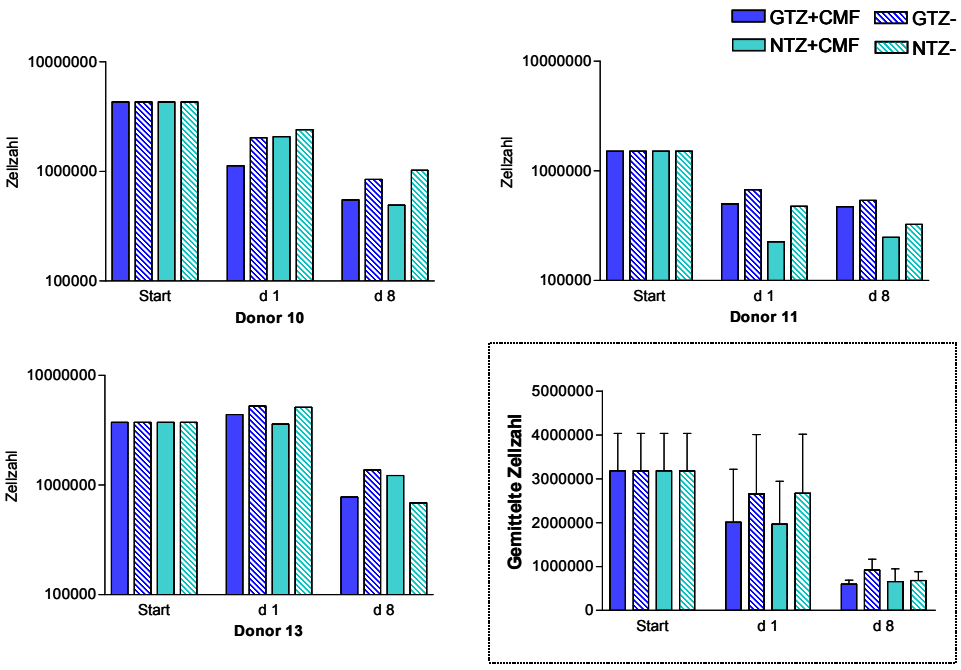


Abb. 4.3: Quantitative Analyse der naiven und der Gedächtnis-T-Zellpopulationen nach Behandlung gemäß dem *CMF In Vitro*-Protokoll unter proliferationsfördernden Bedingungen. Aus dem peripheren Blut von drei gesunden Donoren wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert. Die Zellzahl der vitalen T-Zellpopulationen wurde mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmt. Anschließend wurden die separierten T-Zellfraktionen geteilt und jeweils die gleiche Anzahl Zellen nach dem CMF *In Vitro*-Protokoll in Zytostatika-substituiertem Medium (+CMF; ausgefüllte Balken,) oder herkömmlichem TZ-Medium ohne Zytostatikasubstitution (-;schraffierte Balken) kultiviert. Alle verwendeten TZ-Medien wurden zusätzlich mit 300 U IL-2 pro ml angereichert. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen zu Beginn sowie an Tag 1 (d 1) und Tag 8 (d 8) nach Beendigung des CMF *In Vitro*-Protokolls von drei unabhängigen Experimenten. Die ermittelten Zellzahlen der Gedächtnis-T-Zellpopulationen (GTZ) sind blau, die der naiven T-Zellpopulationen (NTZ) sind grün dargestellt. Der Graph im eingeschobenen Kasten gibt die gemittelten Zellzahlen der verschiedenen T-Zellfraktionen aller untersuchten Donoren zusammenfassend wieder.

Verglichen mit der ursprünglichen Zellzahl zu Beginn der Untersuchung, konnte zumindest für Donor #13 eine deutliche Steigerung der Zellzahl innerhalb der naiven und Gedächtnis-T-Zellkulturen verzeichnet werden, die insgesamt 51 Stunden mit 300 U IL-2 sowie *Feeder*-Zellen inkubiert wurden. Indes führte die Zytostatikabehandlung des CMF *In Vitro*-Protokolls zu einer deutlichen Reduktion der verschiedenen T-Zellen 24 h nach Beendigung des letzten Behandlungszyklus im Vergleich zur jeweiligen nicht-behandelten Kontrolle. Bei den Donoren #10 und #11 waren für alle Gruppen, trotz Proliferations-fördernder Kulturbedingungen, Zellverluste zu verzeichnen, wobei auch hier eine deutliche Dezimierung der Zellen insbesondere nach Zytostatikainkubation festzustellen war. Die Abbildung 4.4 zeigt die gemittelten Zellverluste der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen während der *in vitro* Zytostatika-Behandlung unter Proliferations-induzierenden Bedingungen.

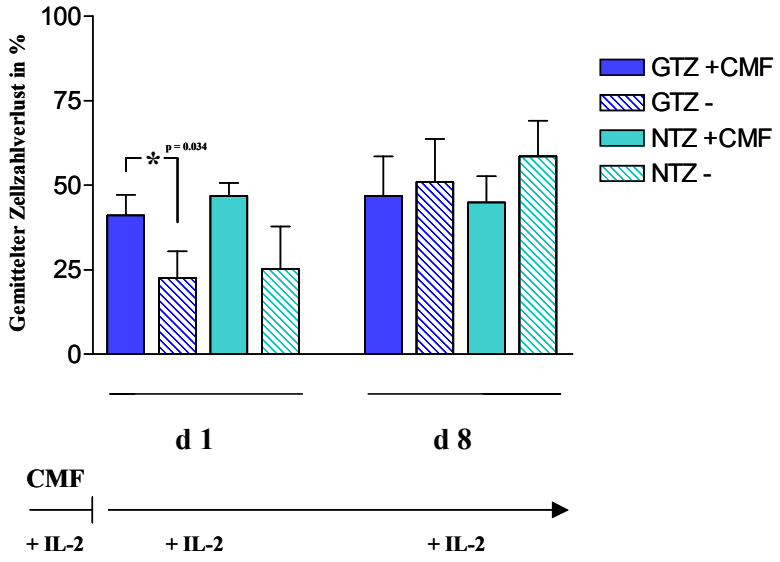


Abb. 4.4: Prozentualer Zellzahlverlust nach Behandlung gemäß dem *CMF-In-Vitro*-Protokoll unter Proliferations-fördernden Kulturbedingungen. Aus dem peripheren Blut von drei gesunden Donoren wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen mit Hilfe des *T Cell Negative Isolation Kit* angereichert. Die separierten T-Zellfraktionen wurden gezählt und jeweils die gleiche Anzahl Zellen nach dem CMF-*In-Vitro*-Protokoll in Zytostatika-substituiertem Medium (+ CMF; ausgefüllte Balken) oder herkömmlichem TZ-Medium ohne Zytostatikasubstitution (-; schraffierte Balken) kultiviert. Alle verwendeten TZ-Medien wurden zusätzlich mit 300 U IL-2 pro ml angereichert. Dargestellt ist der relative Zellzahlverlust an Tag 1 (d 1) sowie an Tag 8 (d 8) nach Beendigung des CMF *In-Vitro*-Protokolls für die isolierte naive (grüne Balken) und die Gedächtniszellpopulation (blaue Balken). Hierzu wurden die ermittelten Zellzahlen an Tag 1 ins prozentuale Verhältnis zu der Ausgangszellzahl vor Zytostatikainkubation gesetzt. Die ermittelten Zellzahlen an Tag 8 wurden ins Verhältnis zur Zellzahl an Tag 1 gesetzt. In jedem Balken sind drei unabhängige Experimente verschiedener Donoren zusammengefasst. * gibt eine signifikanten Unterschied zwischen CMF-behandelten und unbehandelten Gedächtnis-T-Zellen an Tag 1 an ($p \leq 0.05$).

Die Graphik macht deutlich, dass unter Proliferations-stimulierenden Bedingungen bereits 24 h nach Beendigung des letzten Behandlungszyklus eine massive Reduktion in der naiven als auch in der Gedächtnis-T-Zellpopulation im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen festzustellen war. Dieser Effekt war zumindest für den Verlust innerhalb der Gedächtniszellfraktion signifikant. Allerdings schienen sich diese Unterschiede acht Tage nach Inkubation in Zytostatika-freiem Medium zu relativieren.
Somit konnte aufgrund dieser Ergebnisse auf einen direkten inhibitorischen Effekt der Kombinationszytostatika auf *in vitro* proliferierenden T-Zellen geschlossen werden. Zusammengenommen kann hieraus gefolgert werden, dass die *in vitro* simulierte CMF-Chemotherapie einen negativen Einfluss insbesondere auf das Überleben von Gedächtnis-T-Zellen besitzt, wenn diese sich in einem proliferierenden Zustand befinden. Indes werden nicht-teilungsaktive T-Zellen, zumindest mit diesem Protokoll, nicht nachweislich geschädigt.

Da *in vivo* die T-Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks vermutlich in unterschiedlichem Maße den Einflüssen systemischer Therapeutika ausgesetzt sind, wurde im Folgenden das Vorkommen und die funktionale Kapazität Tumor-reaktiver KM-Gedächtnis-T-Zellen bei Mammakarzinompatientinnen nach unterschiedlichen Therapieformen untersucht. Gleichzeitig sollten nun potentielle Langzeiteffekte der Therapieregime analysiert werden, die anhand des *In Vitro*-Modells, aufgrund der begrenzten Lebensdauer der separierten T-Zellpopulationen, nicht evaluierbar waren.

4.2 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen neoadjuvant, zytostatisch behandelter Mammakarzinompatientinnen

Zuerst wurde das Tumor-reaktive Potential im Knochenmark von 36 Mammakarzinompatientinnen nach einer sogenannten neoadjuvanten zytostatischen Vortherapie untersucht. Die Patientinnen erhielten drei bis sechs Zyklen des Therapieschemas *GEDoc* (Gemcitabin 800 mg/m^2, Epirubicin 90 mg/m^2, Docetaxel 75 mg/m^2; siehe 7.1.1). Vier Wochen nach Beendigung des letzten Therapiezyklus wurde der Tumor reseziert und das parallel aus dem Beckenkamm entnommene Knochenmark auf das Vorhandensein Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen untersucht.

Der Frequenznachweis wurde anhand der Anzahl IFN-γ-produzierender T-Zellen nach 40-stündiger Stimulation mit autologen Dendritischen Zellen im ELISpot-Test durchgeführt. Hierzu wurden Dendritischen Zellen entweder mit autologem Tumorlysat oder Lysat der Brustkrebszelllinie MCF-7 (siehe 2.4.1), als Quelle Brustkrebs-spezifischer TAAs für 4 h vorinkubiert. Das Kontrollysat wurde respektive aus autologen mononukleären Zellen oder der nicht-verwandten Promonozytenzelllinie U937 hergestellt. Eine immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl IFN-γ-produzierender Zellen signifikant höher lag als die Anzahl reaktiver Zellen in der Negativkontrolle. Zusätzlich wurden T-Zellproben mit dem *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) inkubiert. Mit Hilfe dieses bakteriellen Superantigens kann die grundsätzliche Stimulierbarkeit der T-Zellpopulation ermittelt werden.

Die KM-T-Zellen jeder untersuchten Patientin waren in der Lage, nach Stimulation mit SEB eine INF-γ-Antwort zu generieren. Diese war so massiv, dass sie mit Hilfe der Axioplan 2/KS-ELISpot-Software nicht quantitativ erfasst werden konnte (Daten nicht dargestellt). Es konnten keine Unterschiede der Reaktivität gegen SEB zwischen neoadjuvant vorbehandelten und nicht behandelten, primären Patientinnen festgestellt werden, so dass generell von keiner Einschränkung bezüglich der Funktionalität der T-Zellen nach zytostatischer Vortherapie ausgegangen wurde.

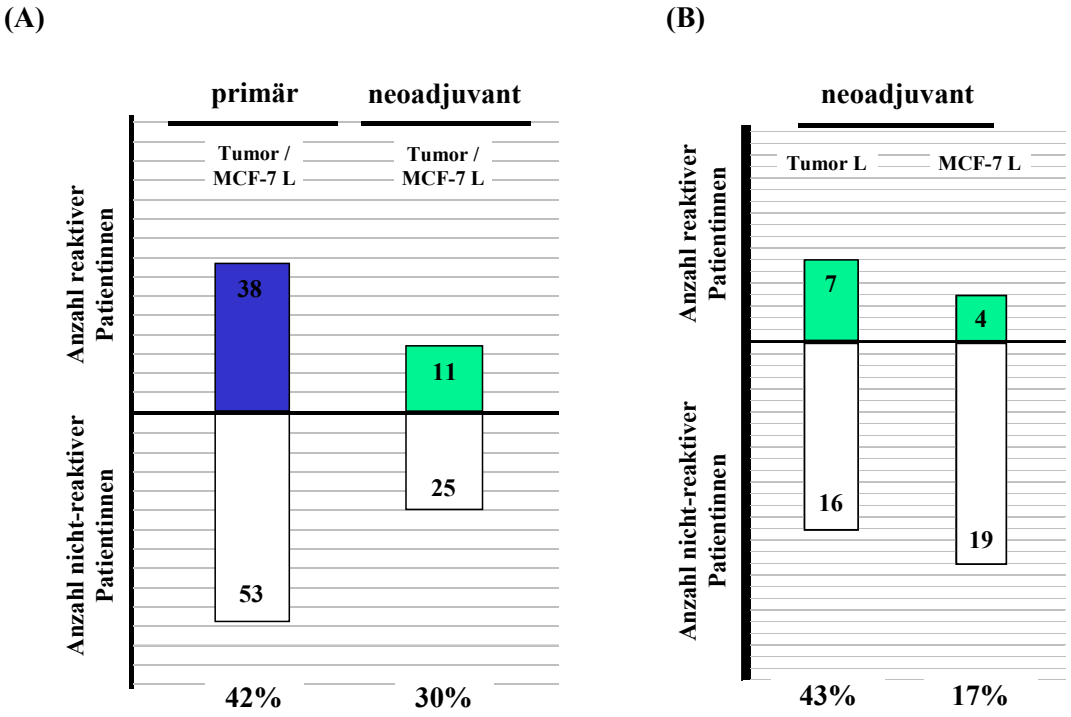


Abb. 4.5: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität nach neoadjuvanter Chemotherapie.
Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark neoadjuvant behandelter Patientinnen (6x GEDoc; n = 36; grüne Balken). Die zum Vergleich dargestellte Reaktivität primärer Patientinnen (n = 91; blauer Balken) wurde freundlicherweise von PD P. Beckhove zur Verfügung gestellt Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat, MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. Die Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle ($p \leq 0.05$). In der Abbildung ist die Anzahl reaktiver Patientinnen (farbige Balken) der Anzahl nicht-reaktiver Patientinnen (weiße Balken) gegenübergestellt. (A) zeigt den Gesamtanteil reaktiver Patientinnen gegen Tumorlysat und/oder MCF-7-Lysat. In (B) ist die Reaktivität gegen Tumorlysat und gegen MCF-7-Lysat der neoadjuvanten Patientinnen gegenüberstellend dargestellt. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen.

Insgesamt wurde bei 30 % der untersuchten Patientinnen eine Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellantwort im Knochenmark mittels Kurzzeit-ELISpot-Test nachgewiesen (Abb. 4.5). Dieser Befund ist im Vergleich zu der Häufigkeit, mit welcher Tumor-reaktive Gedächtniszellen im Knochenmark primär operierter, d. h. nicht-vortherapierter Patientinnen gefunden werden können (ca. 42 %), leicht reduziert. Zusätzlich lagen die Frequenzen spezifisch-reaktiver Gedächtniszellen bei neoadjuvant zytostatisch behandelten Patientinnen deutlich niedriger als bei nicht-behandelten Patientinnen (Abb. 4.6).

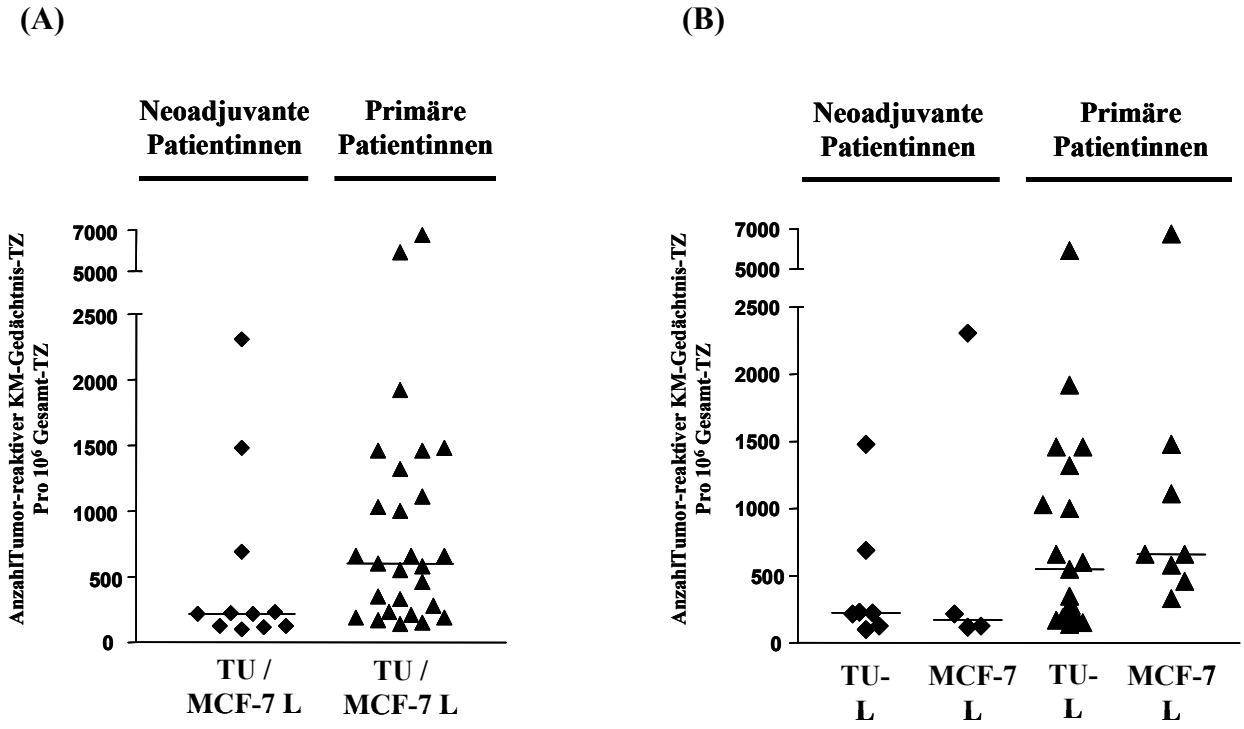


Abb. 4.6: Frequenzen Tumor-reaktiver KM-Gedächtnis-T-Zellen neoadjuvant behandelter und primär operierter Mammakarzinompatientinnen. Dargestellt ist die Anzahl INF-γ-sezernierender KM-Gedächtnis-T-Zellen pro 10^6 Gesamt-TZ nach Kurzzeitstimulation im ELISpot-Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit autologen DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat, MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. Immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl der IFN-γ-produzierender Zellen signifikant höher lag, als die der entsprechenden Negativkontrolle ($p \leq 0.05$). Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Für nicht-reaktive Patientinnen ist dieser Wert per Definition ≤ 0 und wurde in der Graphik nicht dargestellt. Waagrechte Balken kennzeichnen den jeweiligen Median der untersuchten Gruppe. (A) gibt die Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen insgesamt an. In (B) sind die ermittelten Frequenzen gegen das autologe Tumorlysat und die Frequenzen gegen das allogene MCF-7-Lysat einzeln dargestellt.

Die mittels IFN-γ-ELISpot ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen liegen bei der Mehrheit der neoadjuvanten Patientinnen (ca. 75 %) auf einem sehr niedrigen Niveau (117-230 reaktive Gedächtniszellen pro 10^6 TZ) und sind damit deutlich geringer als die der primär operierten Patientengruppe. Allerdings gibt es in beiden untersuchten Kohorten Patientinnen, die sich durch eine sehr hohe Anzahl Tumor-reaktiver Zellen (≥ 1000 pro 10^6; max. 6760 pro 10^6 Gesamt-TZ) im KM auszeichnen. Dadurch ist der beobachtete Rückgang Tumor-reaktiver T-Zellen nach neoadjuvanter Chemotherapie statistisch nicht abgesichert. Ungeachtet dessen wird aus der Graphik ersichtlich, dass der Anteil der Patientinnen mit einer sehr hohen Frequenz in der neoadjuvant behandelten Gruppe deutlich reduziert ist (< 20 %).
Interessanterweise konnte in sieben von 16 vortherapierten Patientinnen (30 %) eine Reaktivität gegen das autologe Tumorlysat, aber nur in 4 von 23 Fällen (17 %) eine

Reaktivität gegen das allogene MCF-7-Lysat gefunden werden. Bei einer nachweislichen Reaktivität gegen das autologe Tumorlysat war für keine Patientin eine vergleichbare Reaktion gegen das allogene Lysat feststellbar. (Bei einem Drittel der untersuchten Patientinnen stand der autologe Tumor zur Testung nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund fehlt für jeden positiven MCF-7 Reaktivitätsnachweis dieser Gruppe die Untersuchung des autologen Tumors.)

Das Proteinlysat autologer Tumore unterscheidet sich von dem Lysat der allogenen Brusttumorzelllinie MCF-7 u. a. durch die Präsenz autologer Neoantigene, die für die jeweilige Patientin spezifisch sind. Die hier durchgeführten Analysen beruhen auf einer kurzeitigen Stimulation des Tumor-assoziierten Antigens mit KM-T-Zellen, wodurch ausschließlich sekundäre Gedächtniszellantworten evaluiert werden. Somit kann die allogene MCF-7 Linie in dieser experimentellen Anordnung ausschließlich als Quelle sogenannter *common shared* Antigene dienen (Gilboa *et al.*, 1999). Interessanterweise zeigt die immunologische Reaktivität primär operierter Patientinnen keine Verlagerung der spezifischen Gedächtniszellreaktivität zur Seite der autologen TAA-Quelle, wie sie für die neoadjuvant behandelte Gruppe deutlich wurde. Hier wurden in 54 % der Fälle Tumor-reaktive T-Zellen mit Hilfe MCF-7-beladener Dendritischer Zellen nachgewiesen. Trotz der deutlichen Reduktion der Reaktivität gegen die allogene TAA-Quelle, ist ein Rückgang der Tumor-reaktiven T-Zellfrequenz sowohl für das allogene als auch das autologe Tumorlysat gleichermaßen in der neoadjuvant behandelten Gruppe zu beobachten (Abb. 4.6). Der Rückgang der Frequenz Tumor-reaktiver KM-Gedächtnis-T-Zellen bei vergleichbarer Gesamtreaktivität könnte entweder auf einen direkten Einfluss der zytostatischen Vortherapie auf das Überleben bzw. die Funktion Tumor-reaktiver Gedächtniszellen des Knochenmarks hinweisen oder alternativ durch eine Therapie bedingte Eliminierung von Tumorzellen erklärt werden. Die Bedeutung der Persistenz von Tumorantigen für die Erhaltung kognitiver Gedächtniszellen im KM ist derzeit nicht vollkommen geklärt. Es ist vorstellbar, dass sich das Tumor-spezifische Gedächtniszellreservoir durch den Verlust von Tumorantigenen, im Knochenmark oder im peripheren Blut, über die Zeit reduzierte und damit der beobachtete Frequenzrückgang erklärt werden kann.

Ungeachtet der zytostatischen Behandlung könnte die Frequenzreduktion bei neoadjuvant behandelten Patientinnen auch in klinischen Unterschieden dieser Patientenkohorte im Vergleich zur nicht vortherapierten Gruppe begründet liegen. Tatsächlich zeichneten sich die Tumore der hier untersuchten neoadjuvanten Patientinnen durch einen insgesamt höheren Grad der Entartung aus, der mittels sogenanntem *Grading* mikroskopisch bestimmt wird

(siehe 7.2.2). Demnach kann angenommen werden, dass sich die zytostatisch vortherapierten Patientinnen von Beginn an durch ein aggressiveres Tumorwachstum von nicht vortherapierten Patientinnen unterschieden, wodurch eine Veränderung der Tumor-spezifischen Reaktivität erklärbar würde.

4.3 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen adjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen

Als nächstes wurde die Tumor-spezifische Immunität im Verlauf standardisierter, adjuvanter Krebstherapien analysiert. Hierzu wurde 24 Mammakarzinompatientinnen, die aktuell unter einer endokrinen Therapie standen oder eine adjuvante Chemotherapie vor mindestens einem Monat beendet hatten, ambulant Knochenmark entnommen. (Die Charakteristika der einzelnen Patientinnen sowie die verschiedenen Therapieregime sind dem Anhang zu entnehmen; siehe 7.1, 7.2.3 und 7.2.4). Die mittels Ficolldichtezentrifugation isolierten T-Zellen wurden anschließend phänotypisch charakterisiert und die funktionelle Kapazität der Gedächtnis-T-Zellpopulation bestimmt.

4.3.1 Adjuvante Chemotherapie

Mittels phänotypischer Charakterisierung des Knochenmarks adjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen wurde bereits ein Einfluss zytostatischer Therapien auf Immunzellen des Knochenmarks beschrieben (Solomayer *et al.*, 2003). Anhand der Bestimmung der immunologischen Reaktivität im Knochenmark von zehn adjuvant, zytostatisch behandelten Patientinnen sollte nun untersucht werden, ob eine mögliche Korrelation zwischen der Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen und der Gesamtzellzahl der Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark dieser Patientinnen besteht. Im Durchschnitt lagen 15 Monate zwischen Beendigung der zytostatischen Therapie (3-6x CMF; EC; EDC; siehe 7.1) und der ambulant durchgeführten Knochenmarkpunktion (siehe 7.2.3).

Aus dem Knochenmark der Patientinnen wurden mononukleäre Zellen isoliert und anschließend die verschiedenen T-Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die phänotypische Analyse der KM-$CD4^+$ und -$CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen nach adjuvanter Chemotherapie ist in der Abbildung 4.7 graphisch dargestellt.

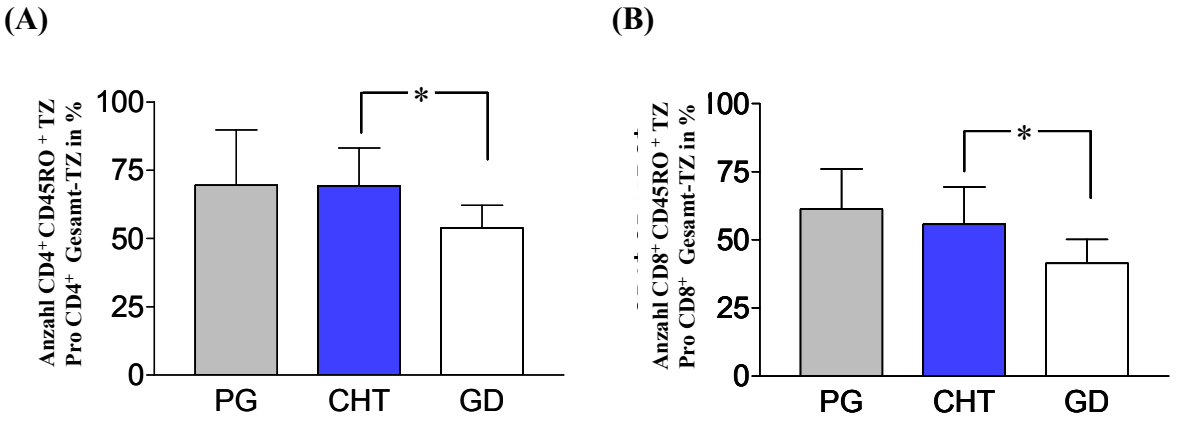


Abb. 4.7: Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszell-Subpopulationen an der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Gesamt-T-Zellpopulation. Mononukleäre Zellen aus dem KM zytostatisch behandelter Mammakarzinompatientinnen wurden isoliert und mit den jeweiligen mAK gefärbt. Tote, PI-positive Zellen wurden zur Analyse ausgegrenzt und die vitale Lymphozytenpopulation auf $CD4^+$ (A) bzw. auf $CD8^+$ (B) beschränkt. $CD45RO^+$ wurden als Gedächtnis-T-Zellen definiert. Dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie ermittelten prozentualen Anteile der KM $CD45RO^+CD4^+$ und $CD8^+$ Subpopulationen an der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Gesamt-T-Zellpopulation der zytostatisch behandelten Patientengruppe (CHT; n = 11). Die zum Vergleich dargestellten Werte der primären Patientengruppe (PG; n = 90) und die gesunder Donoren (GD; n = 10) wurden freundlicherweise von Dr. M. Feuerer zur Verfügung gestellt. * zeigt eine signifikante Erhöhung der $CD45RO^+CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Donoren an ($p \leq 0.05$).

Bei den zytostatisch behandelten Patientinnen konnte, analog zu den Beobachtungen bei primär operierten Mammakarzinompatientinnen (PG), ein signifikanter Anstieg der $CD45RO^+CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellpopulation bezogen auf die gesamte $CD4^+$ Anzahl im Vergleich zu gesunden KM-Donoren (GD) festgestellt werden. Ebenso war die $CD45RO^+CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellsubpopulation im Vergleich zu gesunden Donoren deutlich erhöht. Diese relative Zunahme der Gedächtniszellen im KM von Mammakarzinom-patientinnen konnten Feuerer *et al.* (2001) mit einem fortgeschrittenen Tumorstatus korrelieren. Demzufolge kommt es während der Tumorprogression zu einer gesteigerten Induktion von Gedächtnis-T-Zellen, welche schließlich im Knochenmark akkumulieren. Eine adjuvante Chemotherapie scheint, aufgrund der obenstehenden Ergebnisse, diesen Prozess der relativen Anreicherung nicht zu beeinflussen.

Im Folgenden wurde die Tumor-gerichtete Reaktivität der KM-Gedächtnis-T-Zellen zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors und nach Beendigung der zytostatischen Therapie mittels IFN-γ ELISpot-Test bestimmt. Der autologe Tumor oder allogenes MCF-7-Lysat dienten hierbei als Quelle Brustkrebs-assoziierter Tumorantigene. Die elf untersuchten Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der Negativkontrolle. Die

Abbildung 4.8 zeigt die ermittelte KM-T-Zellreaktivität der untersuchten Patientenkohorte vor und nach adjuvant zytostatischer Behandlung.

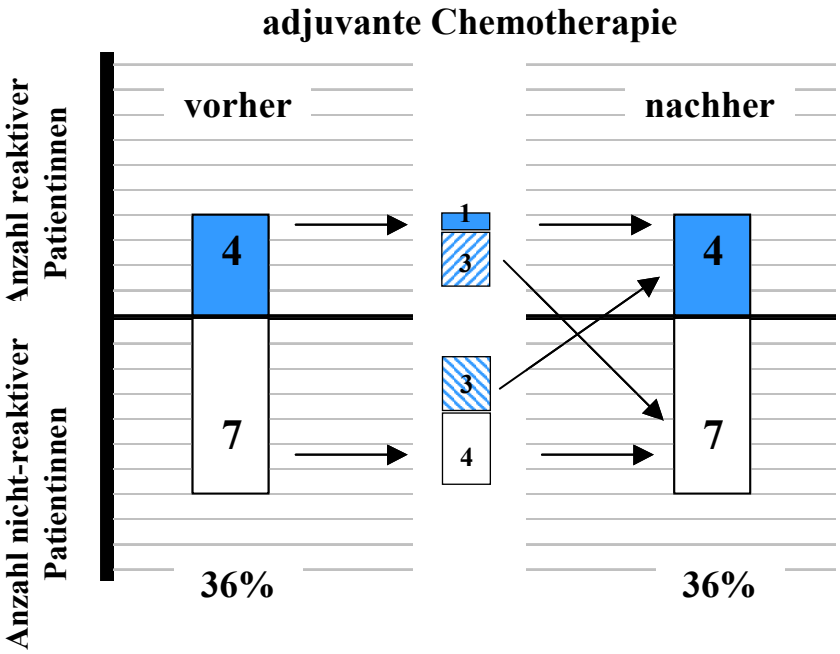


Abb. 4.8: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität vor und nach adjuvanter Chemotherapie. Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zell im Knochenmark von elf Mammakarzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und nach Beendigung des nachfolgenden zytostatischen Therapieregimes (nachher). Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat, MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. Die Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ-produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Kontrolle ($p \leq 0.05$). In der Abbildung ist die Anzahl reaktiver Patientinnen (blaue Balken) der Anzahl nicht-reaktiver Patientinnen (weiße Balken) gegenübergestellt. Waagrechte Pfeile indizieren konstante Reaktivität, überkreuzende Pfeile markieren Veränderungen der T-Zellreaktivität nach zytostatischer Therapie. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen.

Insgesamt konnten Tumor-reaktive T-Gedächtniszellen in 36 % der untersuchten Patientinnen (4/11), sowohl vor als auch nach adjuvanter zytostatischer Behandlung im Knochenmark nachgewiesen werden. Interessanterweise schien sich aber auf individueller Ebene die Tumor-spezifische Reaktivität in der Zeit zwischen Tumorentfernung und anschließender Therapie zu wandeln. Drei von vier Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive T-Zellen beim ersten Evaluierungszeitpunkt nachgewiesen wurden, zeigten nach zytostatischer Behandlung keine spezifische Reaktivität. Indes waren bei drei von sieben ursprünglich nicht-reaktiven Patientinnen Tumor-reaktive T-Zellen nach Therapie detektierbar. Nur eine einzige Patientin

zeigte eine vergleichbare Reaktivität vor und nach zytostatischer Behandlung. Bei ca. einem Drittel der untersuchten Patientinnen (4/11) war zu keinem der beiden Zeitpunkte eine Tumor-spezifische T-Zellreaktivität nachweisbar. Die Abbildung 4.9 zeigt den individuellen Verlauf der Tumor-spezifischen Reaktivität exemplarisch für vier Patientinnen.

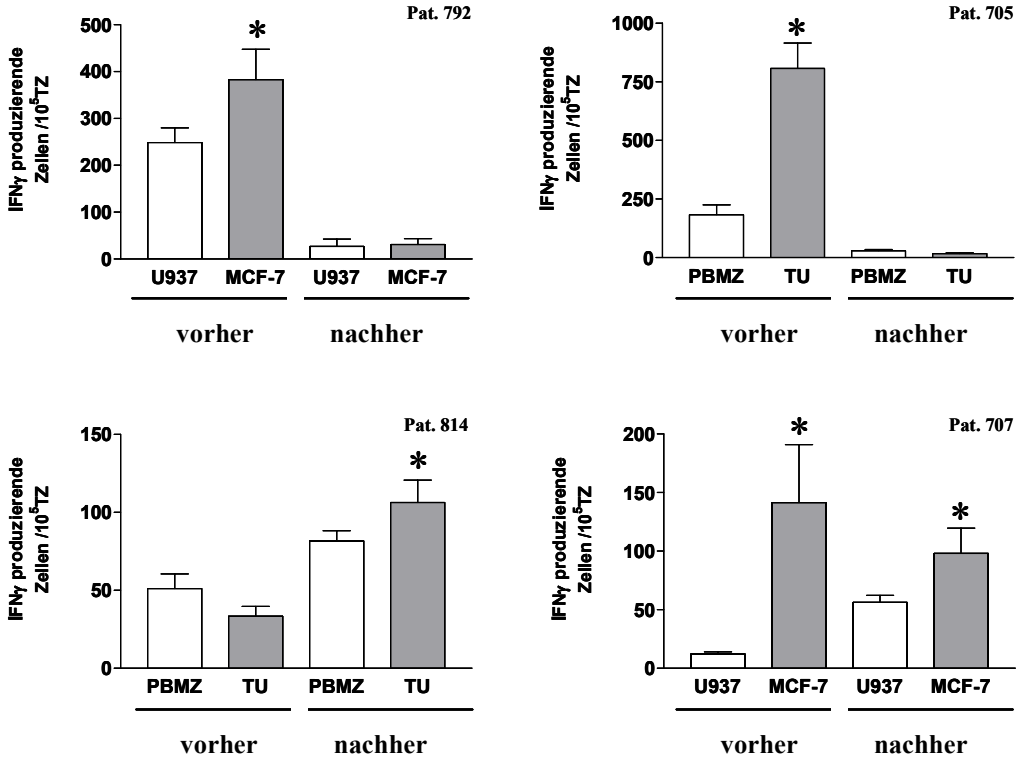


Abb. 4.9: Individueller Verlauf der Tumor-spezifischen Gedächtnis-T-Zellreaktivität unter adjuvanter Chemotherapie. Dargestellt ist die Detektion Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im IFN-γ ELISpot-Test zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und nach Beendigung der nachfolgenden zytostatischen Therapie (nachher). KM-T-Zellen von Mammakarzinompatientinnen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat, MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. * Die Anzahl gemessener INF-γ Punkte war im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle signifikant erhöht ($p \leq 0.05$). Die angegebenen Mittelwerte von Triplikaten bezeichnen die Anzahl ermittelter IFN-γ Punkte pro eingesetzten 10^5 Gesamt-TZ. Es sind die Ergebnisse von vier untersuchten Patientinnen exemplarisch dargestellt.

Die beobachtete Heterogenität scheint nicht auf unterschiedliche Zeitspannen zwischen Beendigung des letzten zytostatischen Therapiezyklus und dem Test auf Reaktivität zurückzuführen zu sein. Es wurden Patientinnen untersucht, deren Gedächtniszellreaktivitäten nach Therapie nicht mehr detektierbar waren und die sich durch ein relativ langes Zeitintervall (22-36 Monate) zwischen beiden Evaluierungszeitpunkten auszeichneten (siehe 7.2.3). Andere Patientinnen konnten schon 1-6 Monate nach Beendigung der Therapie eine

Tumor-spezifische Antwort *de novo* generieren. Bei letzteren könnten vom Tumor sezernierte immunsuppressive Mediatoren bis zum Zeitpunkt der Entfernung der Tumorzellen die Generierung Tumor-spezifischer Gedächtniszellen verhindert haben. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass durch die zytotoxische Therapie verfügbare Tumorantigene limitiert wurden, so dass das zuvor induzierte Tumor-spezifische Gedächtniszellreservoir in bestimmten Patientinnen nicht mehr aufrecht erhalten werden konnte.

Allerdings deutet die Tatsache, dass die Reaktivität bei diesen Patientinnen sowohl in den Gruppen mit Brustkrebs-spezifischem als auch mit irrelevantem Antigen nach Therapie deutlich niedriger lag als zum primären Evaluierungszeitpunkt, auf einen direkten suppressiven Effekt der zytostatischen Behandlung hin (siehe Abb. 4.9). Diese Vermutung wird durch einen signifikanten Rückgang der Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark nach adjuvanter Chemotherapie weiter gestützt ($p \leq 0.01$, Abb. 4.10).

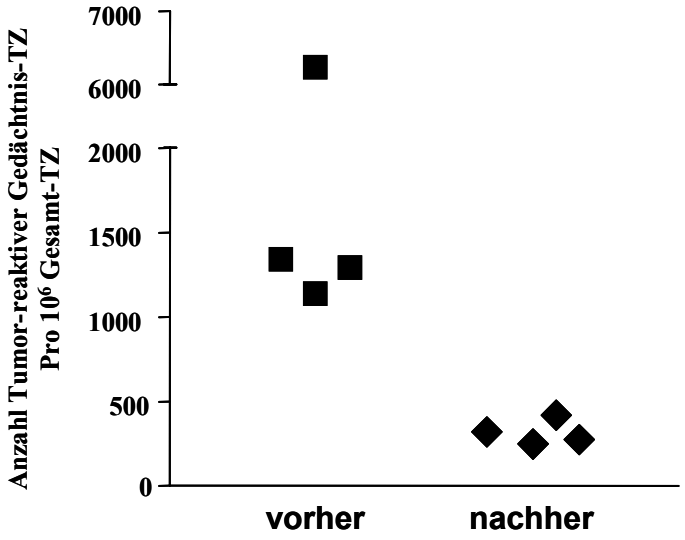


Abb. 4.10: Frequenzen Tumor-reaktiver KM-Gedächtnis-T-Zellen vor und nach adjuvanter Chemotherapie. Dargestellt ist die Anzahl IFN-γ-sezernierender KM-Gedächtnis-T-Zellen pro 10^6 Gesamt-TZ zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und nach Beendigung der nachfolgenden zytostatischen Therapie (nachher). Der Frequenznachweis erfolgte mittels Kurzzeit IFN-γ ELISpot-Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat, MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. Immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl IFN-γ-produzierender Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Kontrolle ($p \leq 0.05$). Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Nicht-reaktive Patientinnen sind in der Graphik nicht dargestellt.

Die Anzahl Tumor-reaktiver T-Zellen lag vor Beginn der Therapie zwischen 1140 bis 6240 spezifischer Zellen pro 10^6 Gesamt-T-Zellen und entsprach damit eine sehr hohen Frequenz, die auch bei über 36 % der primär operierten Patientinnen zu finden war (siehe Abb. 4.6). Indes sanken die ermittelten Frequenzen nach Beendigung der Therapie auf 250 bis 420 pro 10^6. Somit befanden sich die Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen der adjuvant zytostatisch behandelten Patientinnen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau wie diejenigen der neoadjuvanten Patientinnen (siehe Abb. 4.6).
Zusammenfassend kann unter adjuvanter Chemotherapie eine signifikante Reduktion der Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen beobachtet werden. Die Tumor-spezifische Reaktivität zeigte dabei große intraindividuelle Unterschiede. Insgesamt betrachtet blieb der prozentuale Anteil an Patientinnen mit Tumor-reaktiven Gedächtniszellen vor und nach Therapie konstant.

4.3.2 Adjuvante Hormontherapie

Im KM-T-Zellpool endokrin therapierter Mammakarzinompatientinnen konnte von Solomayer *et al.* (2003) eine generelle Lymphopenie beobachtet werden, die sich insbesondere in einem signifikanten Rückgang der $CD8^+$ Population manifestierte. Dabei wurden $CD8^+$ naive und Gedächtnis-T-Zellen durch die Hormontherapie gleichermaßen beeinträchtigt. Trotz des lymphopenischen Effekts lag der Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellpopulation nach Hormontherapie signifikant höher als derjenige im Knochenmark gesunder Donoren.
In der vorliegenden Arbeit wurde das Knochenmark von 14 Patientinnen untersucht, die sich einer endokrinen Therapie (Tamoxifen; Anastrazol; Letrozol) unterzogen hatten bzw. sich aktuell unter Hormonbehandlung befanden (siehe 7.2.4). Aus dem Knochenmark der Patientinnen wurden mononukleäre Zellen isoliert und anschließend die verschiedenen T-Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Die phänotypische Analyse der KM-T-Zellen unter adjuvanter Hormontherapie ist in Abbildung 4.11 zusammengefasst.

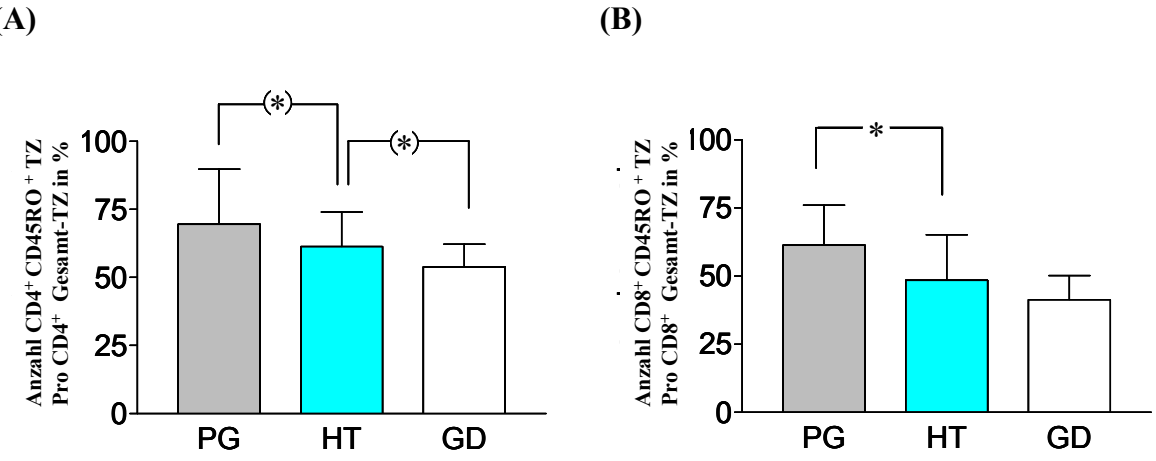


Abb. 4.11: Anteil der CD4$^+$ und CD8$^+$ Gedächtniszell-Subpopulationen an der CD4$^+$ bzw. CD8$^+$ Gesamt-T-Zellpopulation. Mononukleäre Zellen aus dem KM endokrin behandelter Mammakarzinompatientinnen wurden isoliert und mit den jeweiligen mAK gefärbt. Tote, PI-positive Zellen wurden zur Analyse ausgegrenzt und die vitale Lymphozytenpopulation auf CD4$^+$ (A) bzw. auf CD8$^+$ (B) beschränkt. CD45RO$^+$ wurden als Gedächtnis-T-Zellen definiert. Dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie ermittelten prozentualen Anteile der KM CD45RO$^+$CD4$^+$ und CD8$^+$ Subpopulationen an der CD4$^+$ bzw. CD8$^+$ Gesamt-T-Zellpopulation der endokrin behandelten Patientengruppe (HT; n = 13). Die zum Vergleich dargestellten Werte der primären Patientengruppe (PG; n = 90) und die gesunder Donoren (GD; n = 10) wurden freundlicherweise von Dr. M. Feuerer zur Verfügung gestellt. * zeigt einen signifikanten Unterschied der CD45RO$^+$CD4$^+$ bzw. CD8$^+$ Subpopulationen zur angegebenen Referenzgruppe an (* $p \leq 0.05$, $^{(*)}$ $p \leq 0.01$).

Im Gegensatz zur zytostatisch behandelten Gruppe, konnte bei Patientinnen unter endokriner Therapie eine deutliche Reduktion der CD4$^+$ und CD8$^+$ Gedächtniszellpopulationen im Vergleich zur primär operierten Patientengruppe festgestellt werden. Diese Annäherung des Gedächtniszellniveaus an den Status gesunder Donoren könnte entweder auf einen direkten Einfluss der endokrinen Therapie auf die Gedächtniszellsubpopulationen hinweisen oder alternativ durch eine Therapie bedingte Reduktion von Tumorantigenen erklärt werden.

Anschließend sollte auch hier untersucht werden, ob die beobachtete Veränderung der verschiedenen Gedächtniszell-Subpopulationen mit der Frequenz Tumor-reaktiver Zellen des Knochenmarks korrelierte. Hierzu wurde die Anzahl Tumor-reaktiver T-Zellen zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors und unter laufender endokrinen Therapie mittels IFN-γ ELISpot-Test bestimmt. Das Lysat des autologen Tumors oder allogenes MCF-7-Lysat dienten als Quelle Brustkrebs-assoziierter Tumorantigene. Die Beurteilung der immunologischen Reaktivität erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1 ($p < 0.05$). Die Abbildung 4.12 zeigt die mittels IFN-γ ELISpot-Test ermittelte KM-T-Zellreaktivität der untersuchten Patientenkohorte vor und unter endokriner Behandlung.

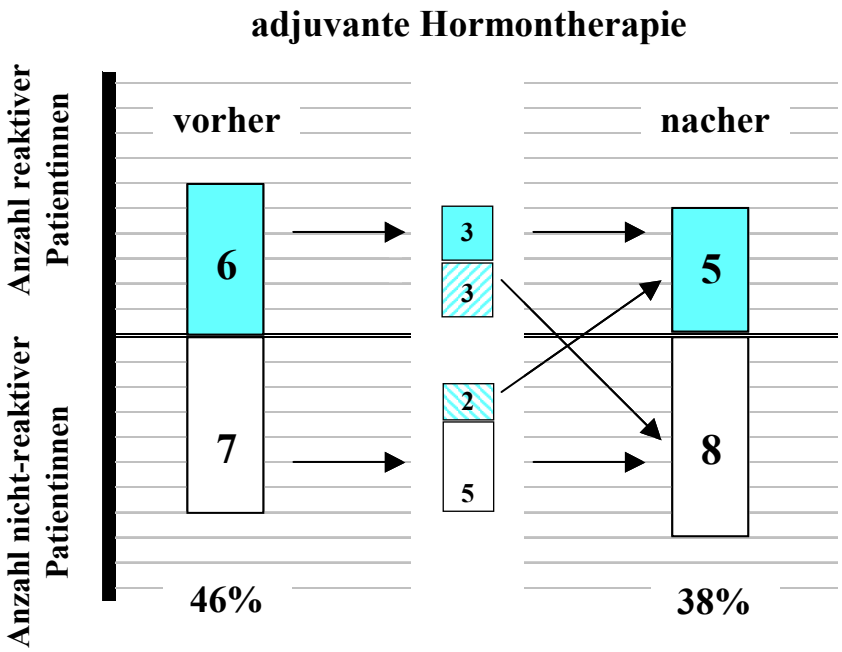


Abb. 4.12: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität unter adjuvanter Hormontherapie.
Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark von 13 Mammakarzinom-Patientinnen zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und unter/nach endokriner Therapie (nacher). Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat (TU); MCF-7; Muc-1 Peptid, Her2/neu-Peptid) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat; U937; Insulin-Peptid) beladen worden waren. Die Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ-produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Kontrolle ($p \leq 0.05$). In der Abbildung ist die Anzahl reaktiver Patientinnen (grüne Balken) der Anzahl nicht-reaktiver Patientinnen (weiße Balken) gegenübergestellt. Waagrechte Pfeile indizieren konstante Reaktivität, überkreuzende Pfeile markieren individuelle Veränderungen der T-Zellreaktivität unter endokriner Therapie. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen.

Analog zu den Beobachtungen in Abschnitt 4.3.1 war die immunologische Gesamtreaktivität vor Beginn (6/11) und unter adjuvanter Hormontherapie (5/11) vergleichbar.

Auch hier zeigten die Gedächtniszellreaktivitäten auf individueller Ebene unterschiedliche Entwicklungen. Diese sind in Abbildung 4.13 schematisch dargestellt. Bei dieser Untersuchung konnten bei der Hälfte der endokrin behandelten Patientinnen (3/6), die zum Zeitpunkt der Primärtherapie eine tumorgerichtete Reaktivität generiert hatten, keine reaktiven T-Zellen zum späteren Evaluierungszeitpunkt mehr festgestellt werden. Währenddessen war bei zwei von sieben ursprünglich nicht-reaktiven Patientinnen eine Tumorreaktivität nach Therapie detektierbar. Auch in dieser Gruppe konnte eine allgemeine Reduktion der IFN-γ-Produktion nach Restimulation festgestellt werden. Diese war Antigen-unabhängig, wie aus der folgenden Abbildung (4.13) deutlich wird .

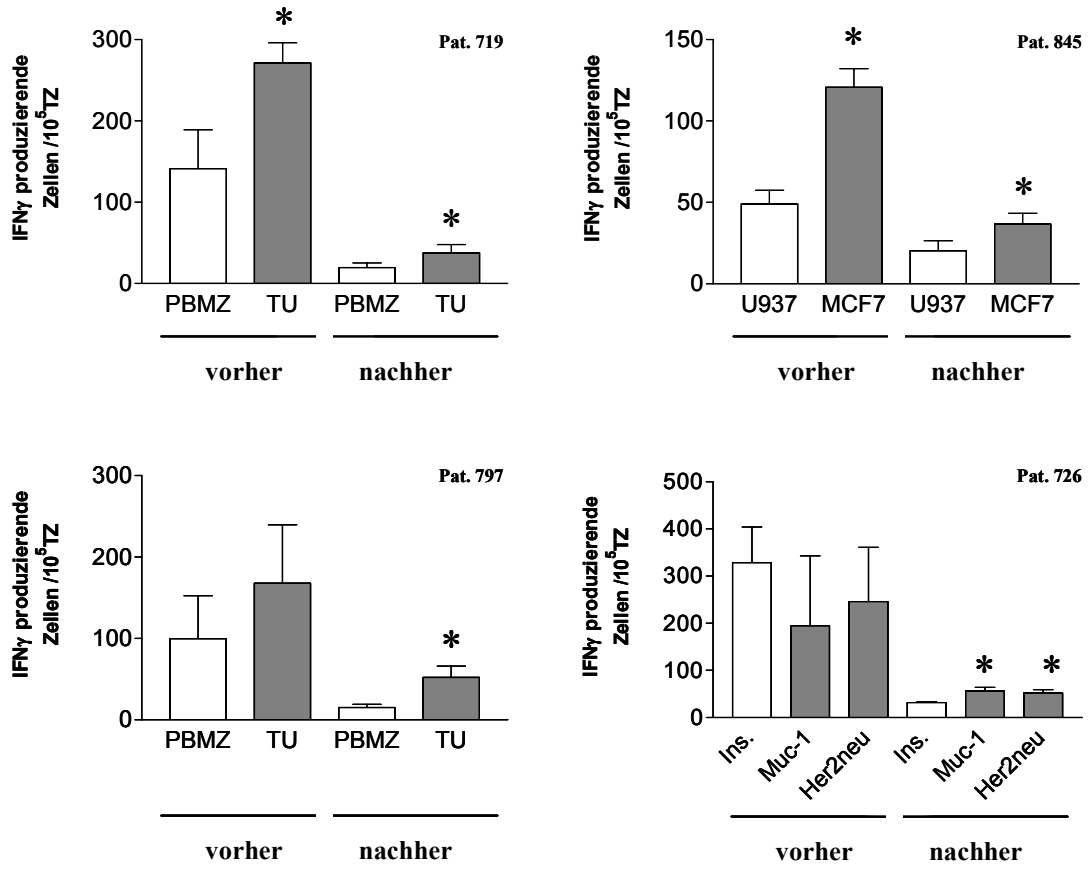


Abb. 4.13: Individueller Verlauf der Tumor-spezifischen Gedächtnis-T-Zellreaktivität unter adjuvanter Hormontherapie. Dargestellt ist die Detektion Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im IFN-γ ELISpot-Test zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und nach Beendigung der nachfolgenden zytostatischen Therapie (nachher). KM-T-Zellen von Mammakarzinompatientinnen wurden für 40 h mit DZ stimuliert. Diese wurden zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat (TU), MCF-7; Muc-1 Peptid; Her2-neu Peptid) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937, Insulin-Peptid (Ins)) beladen. * Die Anzahl gemessener INF-γ Punkte war im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle signifikant erhöht ($p \leq 0.05$). Die angegebenen Mittelwerte von Triplikaten bezeichnen die Anzahl ermittelter IFN-γ Punkte pro eingesetzten 10^5 Gesamt-TZ. Es sind die Ergebnisse von vier untersuchten Patientinnen exemplarisch dargestellt.

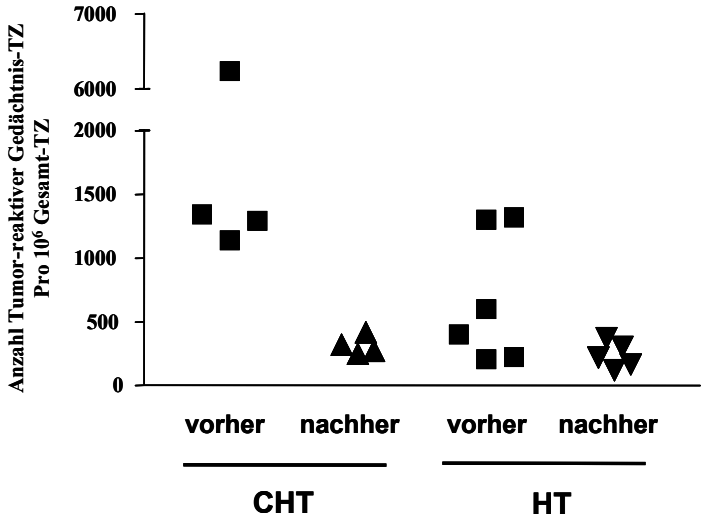


Abb. 4.14: Frequenzen Tumor-reaktiver KM-Gedächtnis-T-Zellen vor und nach adjuvanter Therapie. Dargestellt ist die Anzahl IFN-γ-sezernierender KM-Gedächtnis-T-Zellen pro 10^6 Gesamt-TZ zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors (vorher) und nach Beendigung der nachfolgenden adjuvanten Therapie (nachher). Der Frequenznachweis erfolgte mittels Kurzzeit IFN-γ ELISpot-Test wie zuvor in Abb. 4.10 beschrieben.

Die beobachtete unspezifische Suppression der T-Zellreaktivität führte nicht zu einem vollständigen Verlust der Tumor-reaktiven Kapazität, sondern lediglich zu einer Reduktion der T-Zellfrequenz bei zuvor reaktiven Patientinnen (206-1320 Tumor-reaktive TZ vor Therapie, 120-370 Tumor-reaktive TZ nach Therapie; siehe 7.2.4). Die Abbildung 4.14 stellt den Effekt adjuvanter Therapien auf die Frequenzen Tumor-reaktiver KM-T-Zellen zusammenfassend dar.

4.3.3 Korrelation der phänotypischen Charakterisierung und Funktionalität von T-Gedächtniszellen des Knochenmarks unter/nach adjuvanter Therapie

Während mit der phänotypischen Charakterisierung der KM-Gedächtniszellen nur die quantitative Verteilung verschiedener Subpopulationen untersucht werden konnte, wurde mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Tests die spezifische Funktionalität auf Zytokinsekretionsebene bestimmt. Es sollte nun anhand der erhobenen Daten analysiert werden, ob eine relative Erhöhung des $CD4^+$ oder $CD8^+$ Gedächtniszellreservoirs im Knochenmark mit einer Tumor-gerichteten T-Zellreaktivität korreliert ist.

In Abbildung 4.15 ist der prozentuale Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellen an der jeweiligen Gesamtpopulation für adjuvant behandelte Patientinnen mit und ohne nachweislicher tumorgerichteter T-Zellreaktivität im ELISpot-Test dargestellt.

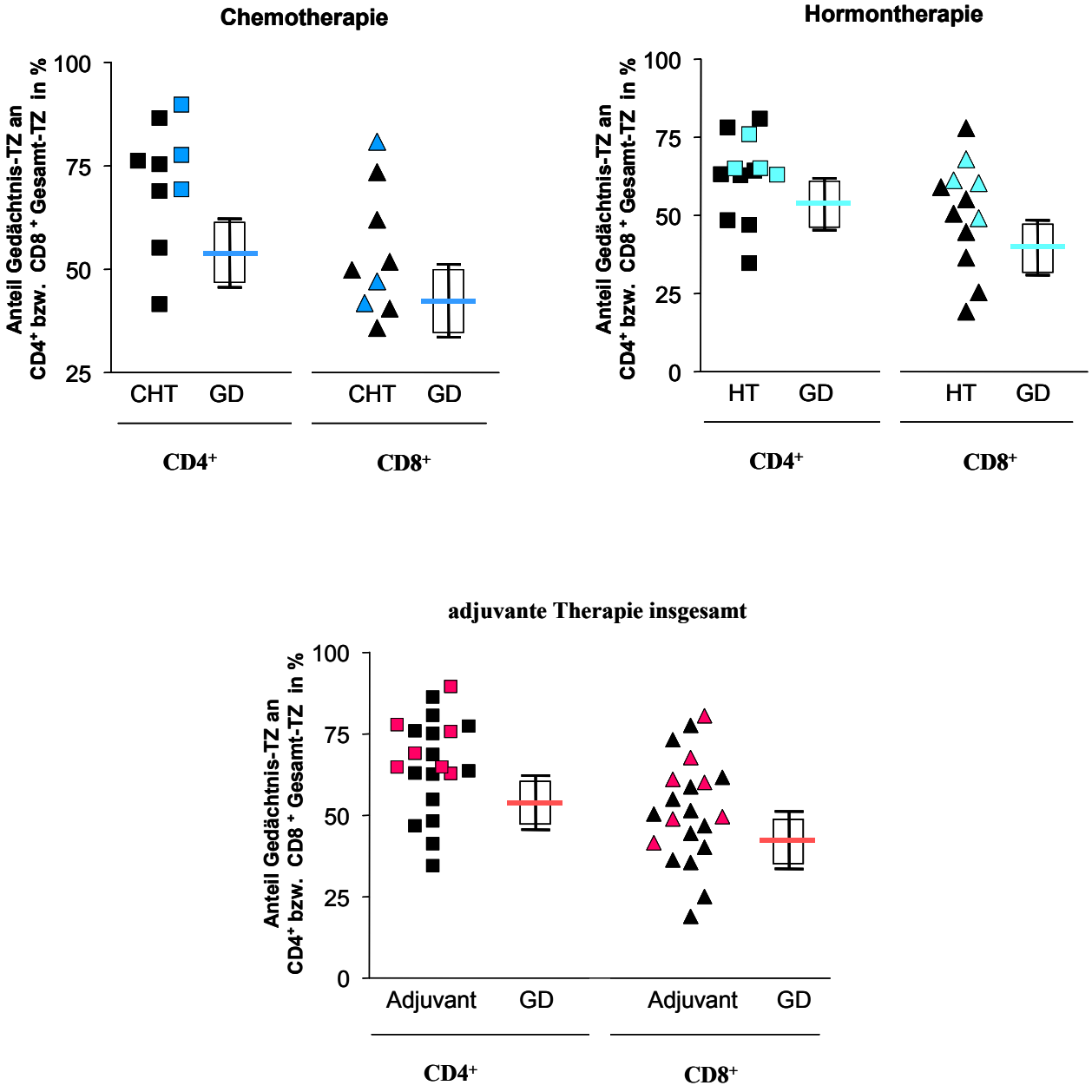


Abb. 4.15: Zusammenhang zwischen der Erhöhung der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellsubpopulationen und der Tumor-spezifischer Reaktivität nach adjuvanter Behandlung. Mononukleäre Zellen aus dem KM adjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt und die vitale Lymphozytenpopulation auf $CD4^+$ bzw. auf $CD8^+$ beschränkt. CD45RO-positive Zellen wurden als Gedächtnis-T-Zellen definiert. Die ermittelten prozentualen Anteile der KM-$CD45RO^+CD4^+$ (Quadrate) und $CD8^+$ (Dreiecke) Subpopulationen an der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Gesamt-T-Zellpopulation sind als Streudiagramm zusammenfassend dargestellt. Die zum Vergleich als Boxplot dargestellte Verteilung der Gedächtniszellpopulation bei gesunden Donoren (GD; n = 10) wurden der jeweiligen Subpopulation gegenübergestellt. Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive KM-T-Zellen im IFN-γ ELISpot-Test nachweisbar waren, sind farbig markiert. Nicht-reaktive Patientinnen sind schwarz dargestellt.

Es wird erkennbar, dass all diejenigen Patientinnen, die nach zytostatischer bzw. unter endokriner Therapie eine Tumor-spezifische Aktivität nach Restimulation im ELISpot-Test generieren konnten, eine Erhöhung der $CD4^+CD45RO^+$ Gedächtniszellpopulation im Vergleich zu gesunden Donoren zeigen ($p < 0.1$). Auch der $CD8^+$ T-Gedächtniszellanteil liegt zumindest bei Patientinnen die unter endokriner Therapie Tumor-spezifische Gedächtniszellreaktivität vorwiesen, oberhalb des $CD8^+$ Gedächtniszellniveaus der gesunden Kontrollgruppe. Einzig für das $CD8^+$ Gedächtniszellreservoir der zytostatisch behandelten Gruppe konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden. Zusammenfassend scheint also insbesondere ein gesteigerter $CD4^+$ Gedächtniszellanteil eine wichtige Voraussetzung für eine detektierbare Tumor-reaktive Funktionalität der KM-T-Zellen darzustellen.

Alles in allem deuten die Untersuchungen der Tumor-spezifischen Immunreaktivität nach standardisierten Krebstherapien darauf hin, dass zytostatische Therapeutika tatsächlich einen suppressiven Effekt auf das während des Krankheitsverlaufs induzierte Gedächtniszellreservoir ausüben können. Dabei scheint die sowohl in der neoadjuvanten als auch in der adjuvanten Patientengruppe beobachtete Frequenzreduzierung Tumor-reaktiver Gedächtniszellen weder von dem applizierten Therapieregime noch von der potentiellen Regenerierungszeit des Immunsystems nach Chemotherapie beeinflusst zu sein. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich Tumor-reaktive T-Zellen auch im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nachweisen lassen, die in der Regel bereits eine Vielzahl zytotoxischer und endokriner Therapien durchlaufen haben.

4.4 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen palliativ behandelter Mammakarzinompatientinnen im metastasierten Stadium

Die Tumor-spezifische Reaktivität im fortgeschrittenem Stadium der Brustkrebserkrankung wurde anhand von 69 Mammakarzinompatientinnen bestimmt. In diesem Stadium dienen endokrine und zytostatische Therapien im wesentlichen der Symptombehandlung (*Palliation*), da die Krebserkrankung aufgrund der fortschreitenden Metastasierung als unheilbar diagnostiziert wird. (7.2.5 und 7.2.6 geben eine Übersicht über die klinischen Charakteristika der einzelnen Patientinnen.)

Der Nachweis der Tumor-spezifischen Reaktivität wurde anhand der Anzahl IFN-γ-produzierender KM-T-Zellen im ELISpot-Test durchgeführt. Die Beurteilung der immunologischen Reaktivität erfolgte wie in Abschnitt 4.2 beschrieben. Da Gewebeproben des autologen Primärtumors bei Mammakarzinompatientinnen im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung nicht zur Verfügung stehen und vereinzelte Metastasen zur Gewinnung eines autologen Tumorlysats operativ nicht zugänglich sind, musste zur Testung der Tumor-spezifischen Reaktivität auf das Lysat der allogenen Brusttumorzelllinie MCF-7 als Quelle Tumor-assoziierter Antigene zurückgegriffen werden. Dendritische Zellen wurden mit MCF-7-Lysat für 4 h vorinkubiert, wobei zur Kontrolle mit dem Lysat der nicht verwandten Promonozytenzelllinie U937 stimuliert wurde. Zusätzlich wurden T-Zellproben zur Testung auf eine grundsätzliche Stimulierbarkeit der KM-T-Zellen mit dem *Staphylococcus* Enterotoxin B inkubiert. Die Abbildung 4.16 zeigt die mittels IFN-γ ELISpot-Test ermittelte KM-T-Zellreaktivität der untersuchten Patientenkohorte unter palliativer Behandlung im Vergleich zur immunologischen Reaktivität primär operierter Patientinnen.

Die KM-T-Zellen jeder untersuchten Patientin waren in der Lage, nach Stimulation mit SEB eine deutliche INF-γ Antwort zu generieren, die sich im Ausmaß nicht von derjenigen neoadjuvant vorbehandelter oder primär operierter Patientinnen unterschied (nicht dargestellt). Somit konnte auch bei Spätstadienpatientinnen unter palliativer Behandlung von einer generellen Funktionalität der KM-T-Zellen ausgegangen werden.

Hingegen konnte eine beachtliche Reduktion der Tumor-spezifischen T-Zellreaktivität der Mammakarzinompatientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung im Vergleich zur Gesamtreaktivität primär operierter Patientinnen (42 %) festgestellt werden (Abb. 4.16 A). Mit diesem Befund korrelierte eine deutlich verminderte Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen im Knochenmark palliativ behandelter Patientinnen (Abb. 4.16 B).

Verglichen mit der Frequenzverteilung bei nicht vorbehandelten Patientinnen lagen die Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen der palliativ behandelten Gruppe in einem relativ niedrigen Intervall zwischen 120 – 843 pro 10^6 Gesamt-TZ. Allerdings war die gemittelte Frequenz dieser Patientengruppe (470 pro 10^6 Gesamt-TZ) höher als diejenige der überwiegenden Mehrheit zytostatisch vorbehandelter, neoadjuvanter Patientinnen.

Bezüglich der Reaktivität gegen die allogene TAA-Quelle MCF-7 ist ein gesteigerter Verlust palliativ behandelter Patientinnen mit nachweislichen Tumor-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen gegenüber der unbehandelten Patientengruppe beobachtbar (Abb. 4.16 A).

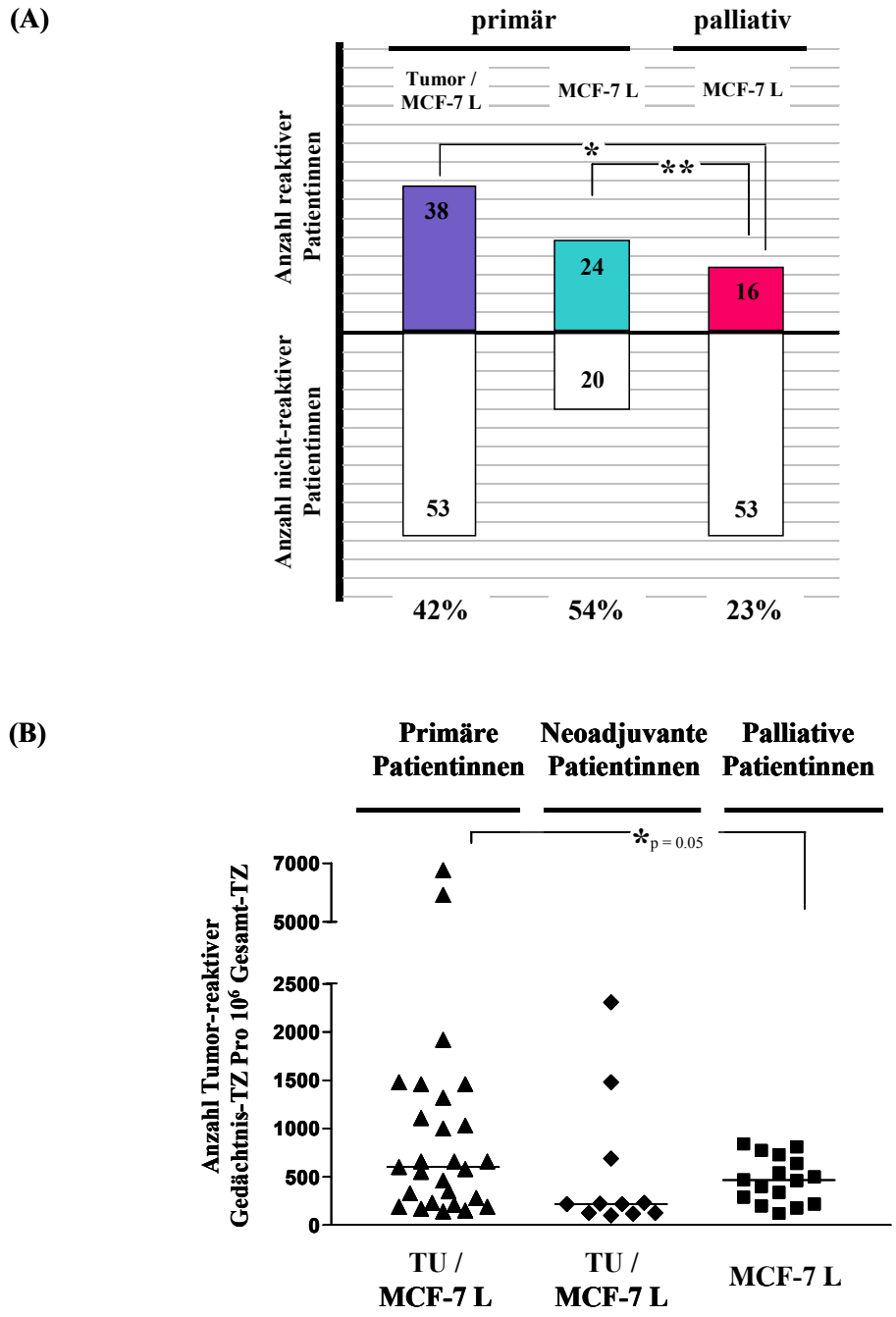


Abb. 4.16: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität unter palliativer Therapie.
(A) Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark von Patientinnen in der palliativen Situation (roter Balken; n = 69) gegenüber demjenigen bei primär operierten Mammakarzinompatientinnen (blauer Balken: Reaktivität gegen TU- oder MCF-7-Lysat (L), n = 91/ grüner Balken: Reaktivität gegen MCF-7, n = 44). Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot Test. KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Brusttumor-assoziierten Antigenen (autologes Tumorlysat (TU), MCF-7-Lysat) oder respektive mit Kontrollantigenen (PBMZ-Lysat, U937-Lysat) beladen worden waren. Die Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Kontrolle ($p \leq 0.05$). In der Abbildung ist die Anzahl reaktiver Patientinnen (farbige Balken) der Anzahl nicht-reaktiver Patientinnen (weiße Balken) gegenübergestellt. In (B) sind die ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen der primären, neoadjuvanten und palliativen Patientenkohorte vergleichend dargestellt. Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Nicht-reaktive Patientinnen sind nicht dargestellt. Waagrechte Balken kennzeichnen den jeweiligen Median der untersuchten Gruppe. * zeigt einen signifikanten Unterschied in der palliativen Situation im Vergleich zur primären Gruppe an (mit * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$).

Die klinischen Parameter wie z. B. Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus oder vorrangegangenen Medikation der palliativ behandelten Patientinnen ließen keine Abhängigkeit mit einem positiven Nachweis Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark erkennen (siehe 7.2.5 und 7.2.6). Allerdings war auffällig, dass die Tumore der Patientinnen ohne nachweisliche T-Zellreaktivität im IFN-γ ELISpot-Test seltener eine Her2/neu-Überexpression aufwiesen (22 %; siehe 7.2.5). Währenddessen korrelierte ein positiver Her2/neu-Nachweis mit der Detektion Tumor-reaktiver T-Zellen in fast der Hälfte der untersuchten Patientinnen (45 %; siehe 7.2.6). Dies weist darauf hin, dass das Her2/neu Onkogen, welches bei 20-30 % aller Mammakarzinompatientinnen überexprimiert ist (Slamon *et al.*, 1987), ein dominantes Tumorantigen bei der Detektion Tumor-reaktiver T-Zellen im Kurzzeit IFN-γ ELISpot-Test darstellt. Es kann spekuliert werden, dass die Her2/neu-Expression auf disseminierten Tumorzellen bei einem gewissen Teil der Patientinnen maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Tumor-reaktiven Gedächtnis-T-Zellreservoirs im KM beigetragen hat, während bei der anderen Hälfte der reaktiven Patientinnen vermutlich andere Tumorantigene dominierten.

Für die beobachtete Minderung der Tumor-spezifischen Reaktivität der palliativ behandelten Patientenkohorte bestehen unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte der Effekt tatsächlich auf einen direkt immunsuppressiven Effekt der durchlaufenden Therapien zurückzuführen sein. Betrachtet man die enorme Variabilität der induzierten Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen innerhalb der primär operierten Patientengruppe (siehe Abb. 4.16 B), könnten die in dieser Untersuchung eingeschlossenen Patientinnen im Spätstadium der Erkrankung eine klinisch selektive Gruppe darstellen, welche sich eventuell bereits zum Zeitpunkt der Diagnose durch eine niedrige Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen auszeichnete. Ein intraindividueller Vergleich der Immunreaktivität im primären und palliativen Stadium der Erkrankung war leider nicht durchführbar.

Es bleibt festzustellen, dass Tumor-reaktive T-Zellen bei einem Teil der Mammakarzinompatientinnen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung trotz zahlreicher vorangegangener Therapien nachweisbar waren. Somit könnten diese Zellen als Basis eines immuntherapeutischen Ansatzes zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt werden (siehe Abschnitt 4.5).

4.5 Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinom mittels Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks

Im Rahmen einer klinischen Phase I Studie sollte primär die Durchführbarkeit und Verträglichkeit einer Therapie mittels autologer, Tumor-reaktiver T-Zellen von Brustkrebspatientinnen zur Behandlung des Mammakarzinoms in der palliativen Situation untersucht werden. Das Prinzip dieser Therapie beruht auf einem adoptiven Transfer *ex vivo* reaktivierter Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks mit Hilfe von Brustkrebsantigen-präsentierenden Dendritischen Zellen. Nach erfolgter Zellapplikation sollte die Tumor-spezifische Reaktivität im Blut und Knochenmark der behandelten Patientinnen charakterisiert werden, um Hinweise auf ein potentielles Ansprechen der Therapie auf immunologischer Ebene zu erhalten. Die Beurteilung eines Ansprechens bezüglich des Verlaufs einzelner Tumormessparameter stellte ein untergeordnetes Ziel dieser Phase I Studie dar.

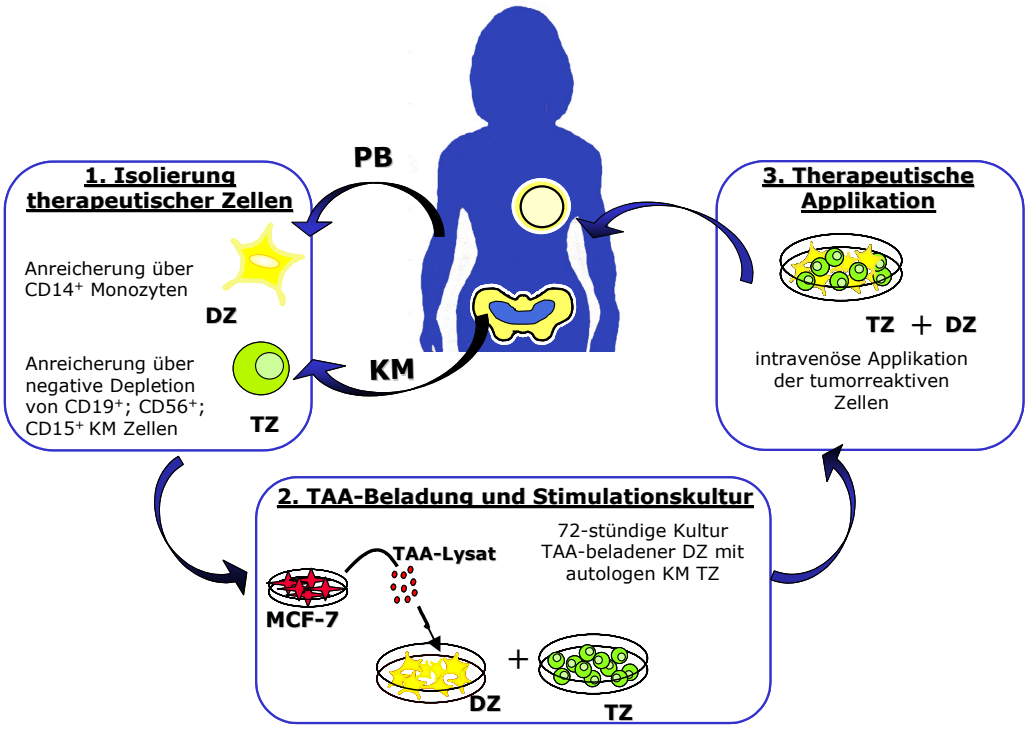


Abb. 4.17: Adoptive Immuntherapie mittels Tumor-reaktiven Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks. MNZ aus dem Knochenmark wurden acht Tage in TZ-Medium kultiviert und anschließend die T-Zellpopulation (TZ) mittels negativer Depletion angereichert. Aus dem PB isolierte $CD14^+$ Vorläuferzellen wurden acht Tage in DZ-Medium kultiviert. Angereicherte Dendritische Zellen (DZ) wurden dann für 24 h mit MCF-7-Lysat inkubiert, gewaschen und in einer 72-stündigen Stimulationskultur mit autologen KM-T-Zellen koinkubiert. Nach Ablauf der Stimulationskultur wurden die Zellen gewaschen, in Ringerlösung aufgenommen und schließlich über 15 min intravenös appliziert. Insgesamt wurden elf Mammakarzinompatientinnen im metastasierten Stadium der Erkrankung nach diesem Protokoll zwischen Dez. 2003 und Sept. 2004 behandelt.

Abbildung 4.17 gibt eine schematische Übersicht über den Ablauf der adoptiven Immuntherapie mittels *ex vivo* reaktivierter KM-Gedächtnis-T-Zellen. Im Folgenden sind die formalen Kriterien und Ziele dieser neuartigen Therapiestudie aufgeführt:

- Einschlusskriterien: Mammakarzinompatientinnen im metastasierten Stadium der Erkrankung;
  Alter: 18-75 Jahre;
  Tumor-reaktive KM-Gedächtnis-T-Zellen mittels ELISpot-Test nachweisbar (siehe Abschnitt 4.4);
- Ausschlusskriterien: Zweitkarzinomerkrankung;
  Niereninsuffizienz;
  Autoimmunerkrankung;
  Schwangerschaft;
- Hauptzielkriterien: Durchführbarkeit;
  Toxizität und Nebenwirkungen;
- Nebenzielkriterien: Beurteilung der klinischen Effektivität;
  Evaluierung des immunologischen Ansprechens (*Immunmonitoring*);

4.5.1 Frequenzbestimmung Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen vor der adoptiven Immuntherapie

Da die Therapie auf der Reaktivierung im Laufe der Erkrankung gebildeter Gedächtnis-T-Zellen beruht, sich diese aber nur in ca. 22 % der Mammakarzinompatientinnen in der palliativen Situation nachweisen ließen (siehe Abschnitt 4.4), wurde zunächst die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark potentieller Therapiekandidatinnen bestimmt.

Hierzu wurden angereicherte KM-T-Zellen der Patientinnen mit TAA-beladenen autologen Dendritischen Zellen in einem 40-stündigen ELISpot-Test stimuliert und anhand der IFN-γ Produktion die individuelle Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bestimmt. Als Tumor-assoziiertes Testantigen zur Reaktivierung Tumor-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen wurde das Lysat der Brustkrebszelllinie MCF-7 verwendet. Als Quelle unspezifischer Kontrollantigene diente das Lysat der nicht-verwandten Promonozytenzelllinie U937. Abbildung 4.18 zeigt die Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark der in der

Studie eingeschlossenen Patientinnen. Die ermittelten Frequenzen variierten zwischen 120 und 843 Tumor-reaktiven Zellen pro 1 x 10^6 KM-T-Zellen. Die gemittelte Frequenz betrug 470 pro 1 x 10^6 T-Zellen. Zwei Mammakarzinompatientinnen verstarben, bevor ihnen Knochenmark zur Generierung therapeutischer Zellen entnommen werden konnte. Drei Patientinnen lehnten trotz nachweislich vorhandener Tumor-reaktiver T-Zellen eine ADI-Behandlung ab.

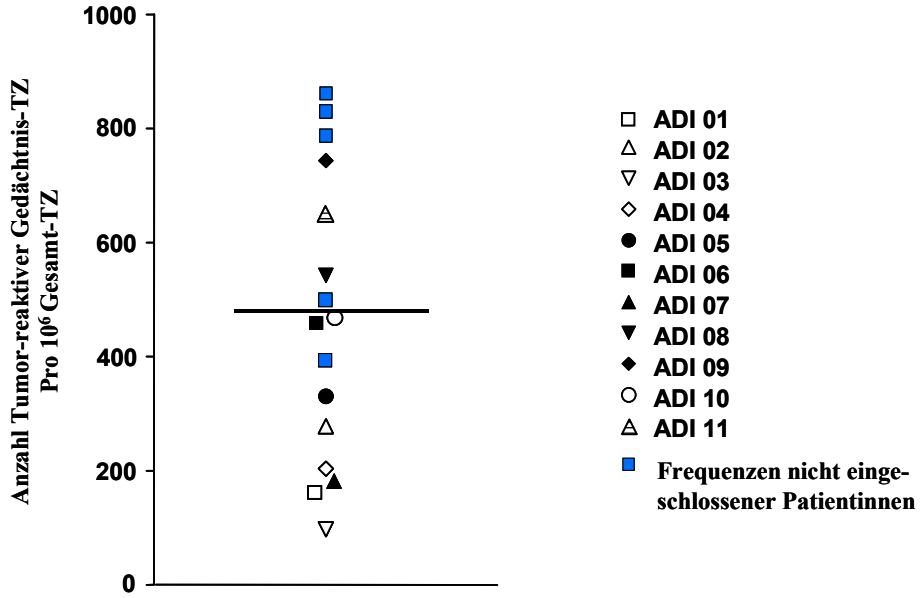


Abb. 4.18: Frequenzen Tumor-reaktiver KM-T-Zellen der ADI-Studienpatientinnen.
Dargestellt ist die mittels IFN-γ ELISpot-Test ermittelte Anzahl Tumor-reaktiver KM-T-Zellen pro 1 x 10^6 Gesamt-T-Zellen für jede potentielle ADI-Studienpatientin. Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl spezifisch-reaktiver T-Zellen nach TAA-Stimulation signifikant höher lag als die der Negativkontrolle mit irrelevantem Antigen ($p \leq 0.5$). In die Therapiestudie eingeschlossenen Patientinnen wurden nach Zeitpunkt der ADI chronologisch codiert (siehe 7.2.7). Die Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen der nicht in die Studie eingeschlossenen Patientinnen sind durch blaue Symbole dargestellt.

4.5.2 Reaktivierung Tumor-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen mittels autologer Dendritischer Zellen

Patientinnen mit nachweislichen Tumor-reaktiven Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark wurde erneut Knochenmark sowie peripheres Blut abgenommen. Nach Isolierung mononukleärer Zellen wurde aus einem Drittel der Zellen T-Zellkulturen angelegt, während aus den restlichen KM-Zellen bzw. den Zellen des peripheren Blutes autologe Dendritische Zellen generiert wurden. Die Dendritischen Zellen wurden über Nacht mit TAA aus dem

MCF-7-Lysat beladen und mit angereicherten KM-T-Zellen der entsprechenden Patientin im Verhältnis 1:13 bis 1:5 über 72 h kokultiviert (siehe 3.6.2). Schließlich wurde den Patientinnen die reaktivierten T-Zellen und Dendritischen Zellen intravenös appliziert (siehe 3.6.4). Die Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über die Volumina des erhaltenen Knochenmark und die daraus gewonnene Anzahl therapeutischer Zellen.

	Tumor-reaktive TZ vor ADI (pro 10^6)	**KM (ml)**	**Anzahl TZ vor Kokultur**	**Verhältnis TZ:DZ**	**Anzahl transferierter TZ**
Pat. ADI 01	180	100	2.5×10^7	5 : 1	4.0×10^7
Pat. ADI 02	290	66	0.5×10^7	5 : 1	0.3×10^7
Pat. ADI 03	120	96	2.0×10^7	5 : 1	1.0×10^7
Pat. ADI 04	220	35	0.5×10^7	13 : 1	0.2×10^7
Pat. ADI 05	340	90	5.0×10^7	6 : 1	1.0×10^7
Pat. ADI 06	460	108	3.5×10^7	7 : 1	2.0×10^7
Pat. ADI 07	200	105	2.2×10^7	5 : 1	2.5×10^7
Pat. ADI 08	540	68	0.6×10^7	6 : 1	0.3×10^7
Pat. ADI 09	730	100	4.5×10^7	5 : 1	2.2×10^7
Pat. ADI 10*	470	104	1.3×10^7	5 : 1	0.9×10^7
Pat. ADI 11	640	107	6.2×10^7	8 : 1	5.7×10^7

Tabelle 4.2: Übersicht über die Anzahl isolierter KM-T-Zellen und adoptiv transferierter therapeutischer Zellen der elf Studienpatientinnen. Angegeben ist das Ausgangsvolumen des Knochenmarkaspirats, die isolierte Gesamt-T-Zellzahl, das TZ:DZ Verhältnis innerhalb der 72-stündigen Stimulationskultur sowie die resultierende Anzahl therapeutischer Zellen, die adoptiv transferiert wurde. * Bei ADI 10 wurde vier Tage nach Beginn der Stimulationskultur durch das Hygieneinstitut Heidelberg eine leichte bakterielle Kontamination festgestellt (siehe Abschnitt 4.5.3.1).

Aus dem Knochenmark der Patientinnen konnten wurden 0.5 bis 6 x 10^7 T-Zellen angereichert. Aufgrund individueller Unterschiede konnte bei drei Patientinnen nicht die angestrebte Menge von 100 ml Knochenmark entnommen werden, was in einer entsprechend geringen Ausgangs-T-Zellzahl resultierte. Nach der 72-stündigen Kokultivierung mit autologen Dendritischen Zellen wurde bei acht Patientinnen eine Reduktion der T-Zellzahl beobachtet, während die Anzahl der T-Zellen bei Pat. ADI 07 und Pat. ADI 11 konstant blieb. Nur in Stimulationskultur ADI 01 kam es unter diesen Bedingungen zu einer deutlichen Zunahme der T-Zellpopulation (siehe Abb. 4.19).

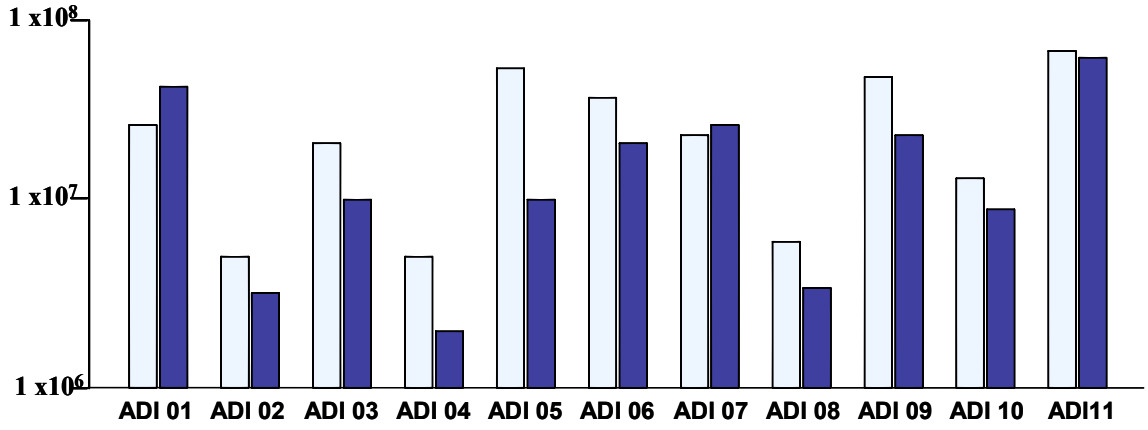


Abb. 4.19: Quantitative Analyse der KM-T-Zellpopulationen während der Stimulationskultivierung. Dargestellt sind die mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmten vitalen T-Zellpopulationen zu Beginn (hellblaue Balken) und nach Beendigung (dunkelblaue Balken) der 72-stündigen Stimulationskulturen. Angereicherte KM-T-Zellen wurden für 72 h mit autologen, MCF-7-beladenen DZ kokultiviert. Als Kulturmedium diente X-VIVO 20 mit 10 % humanem AB-Serum. Das Kulturmedium von ADI 04 und 05 wurde mit 20 U rekombinantem IL-2 substituiert; ADI 06 und folgende wurden mit 100 U IL-2 substituiert.

4.5.2.1 Qualitative Analyse Dendritischer Zellen nach 72-stündiger Stimulationskultur

Vorarbeiten aus unserer Gruppe konnten zeigen, dass es in 40-stündigen Stimulationskulturen zwischen MCF-7-Lysat beladenen Dendritischen Zellen und autologen Tumor-spezifischen KM-T-Zellen von Brustkrebspatientinnen zu kognitiven Interaktionen kommt, was in der bidirektionalen Aktivierung der beteiligten Zellen resultiert. Bezogen auf Dendritische Zellen konnte unter diesen Bedingungen eine Hochregulation von MHC-Klasse II Molekülen und CD40 sowie eine Induktion der kostimulatorisch wirkenden Moleküle CD83 und CD86 beobachtet werden (Bai *et al*., 2003).

Um die kognitiven Interaktionen innerhalb der 72-stündigen therapeutischen Stimulationskulturen näher zu charakterisieren, sollten die Dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie phänotypisch analysiert werden. Zu Beginn und nach 72 h wurden Zellen mit monoklonalen Antikörpern gefärbt und auf die Oberflächenexpression kostimulatorischer (CD80, CD83, CD86) und aktivierender Moleküle (HLA-DR, CD40) analysiert. PI-positive Zellen wurden zuerst ausgegrenzt, um dann die Expression des jeweiligen Oberflächenmarkers für die vitale Dendritenpopulation (CD11c-positiv und Linienmarker (CD3, CD14, CD19, CD56)-negativ) zu quantifizieren. In Abbildung 4.20 ist die qualitative Analyse der Dendritischen Zellen nach Stimulationskultivierung exemplarisch dargestellt. Durch die Überlagerung der Histogramme wird der Expressionsrückgang der verschiedenen Oberflächenmarker deutlich.

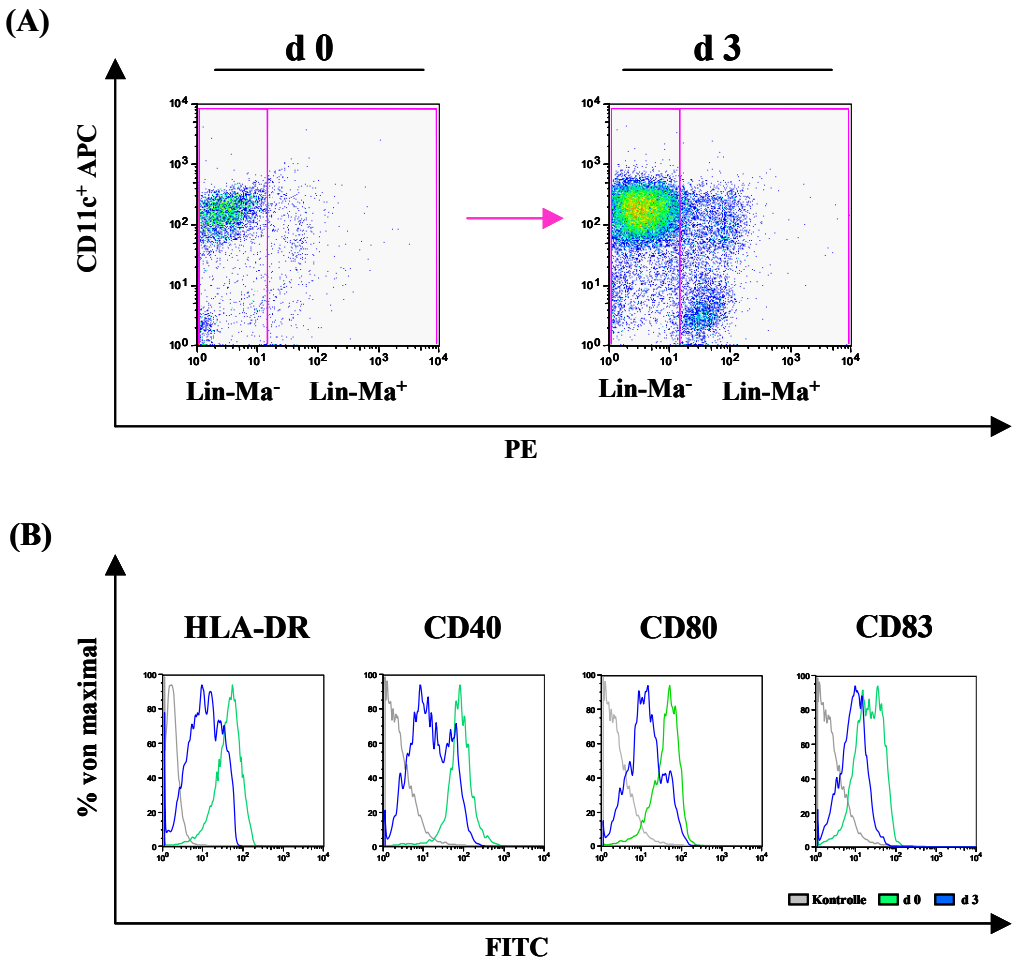


Abb. 4.20: Qualitative Analyse der Dendritischen Zellen nach Stimulationskultivierung.
Dendritische Zellen wurden über sieben Tage aus $CD14^+$ Vorläuferzellen angereichert, mit MCF-7-Lysat für 24 h beladen und anschließend für 72 h mit autologen KM-T-Zellen inkubiert. Die Analyse erfolgte nach Antigen-Beladung (d 0) und nach Beendigung der Stimulationskultur (d 3) mittels Durchflusszytometrie. Tote, PI-positive Zellen wurden von der Analyse ausgegrenzt. In (A) ist die Linienmarker(Lin-Ma)-negative und CD11c-positive Dendritische Zellpopulation sowie die Linienmarker-positive Zellpopulation ($CD3^+$, $CD19^+$, $CD15^+$, $CD56^+$) dargestellt. (B) Zur Analyse der Expression Dendriten-spezifischer Oberflächenmarker wurde die Linienmarker-negative Zellpopulation eingegrenzt und die Expression von HLA-DR, CD40, CD80 und CD83 an Tag 0 (d 0) und Tag 3 (d 3) der Stimulationskultur als Histogramm darstellt. Als Kontrolle dienten vitale, unbehandelte Dendritische Zellen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.21) ist das so erstellte Expressionsprofil der Oberflächenmarker auf den Dendritischen Zellen aller untersuchten Studienpatientinnen dargestellt.

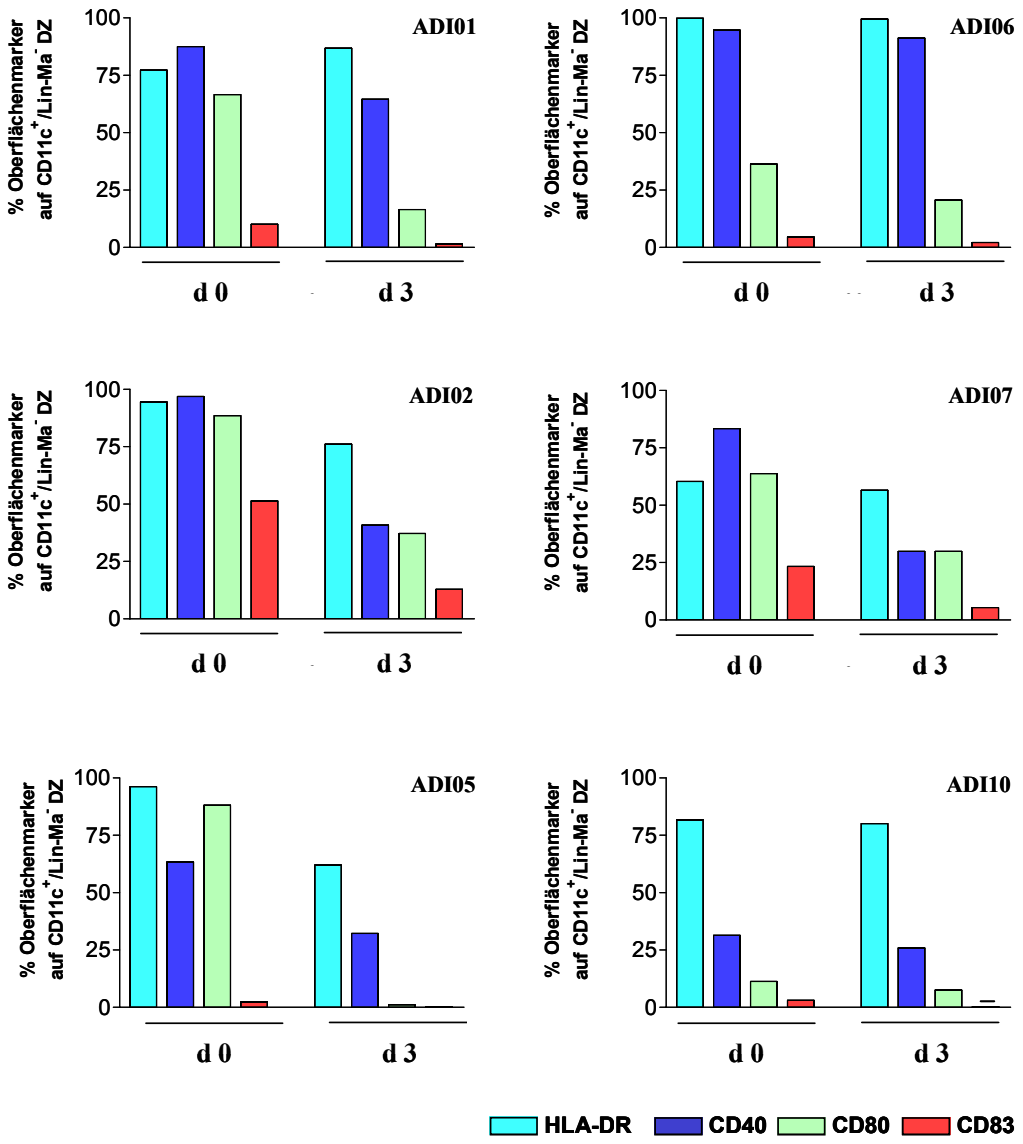


Abb. 4.21: Expressionsprofil von HLA-DR, CD40, CD80 und CD83 auf Dendritischen Zellen nach Stimulationskultur mit autologen T-Zellen. Dargestellt ist die mittels Durchflusszytometrie ermittelte Expression spezifischer Oberflächenmarker auf Dendritischen Zellen von sechs ADI-Studienpatientinnen. Dendritische Zellen wurden für sieben Tage aus $CD14^+$ Vorläuferzellen angereichert, mit MCF-7-Lysat für 24 h beladen und anschließend für 72 h mit autologen KM-T-Zellen inkubiert. Der prozentuale Anteil HLA-DR-, CD40-, CD80- und CD83-exprimierender Zellen an der $CD11c^+$/Linienmarker$^-$ Dendritenpopulation nach Antigenbeladung (d 0) und nach Beendigung der 72-stündiger Stimulationskultur mit autologen KM-T-Zellen (d 3) ist für sechs Stimulationskulturen repräsentativ dargestellt. Tote, PI-positive Zellen wurden von der Analyse ausgegrenzt.

Bezüglich der Expression Dendriten-spezifischer Oberflächenmarker in den verschiedenen Stimulationskulturen ergab sich ein heterogenes Bild (Abb. 4.21). Während HLA-DR bereits zu Beginn der Stimulationskulturen auf allen untersuchten Dendritischen Zellpopulationen relativ hoch exprimiert war und auch noch nach 72 h bei der Mehrzahl der untersuchten Kulturen auf einem hohen Niveau nachweisbar war, wurde für anderen Dendriten-spezifische

Oberflächenmarker ein z. T. starker Expressionsrückgang verzeichnet. So führte die 72-stündige Inkubation der Dendritischen Zellen mit autologen KM-T-Zellen in mehr als der Hälfte der untersuchten Kulturen zu einer Reduktion des Anteils CD40- und CD80-exprimierender Dendritischer Zellen. CD83 hingegen wurde anfangs nur zu einem geringen Anteil auf $CD11c^{+}$/$Linienmarker^{-}$ Dendritischen Zellen exprimiert und war zum Ende der Stimulationskulturen z. T. gar nicht mehr nachweisbar. In Abbildung 4.22 ist der prozentuale Expressionsrückgang der Dendriten-spezifischen Oberflächenmarker auf der $CD11c^{+}$/$Linienmarker^{-}$ Zellpopulation über die 72-stündige Stimulationskultur zusammenfassend dargestellt.

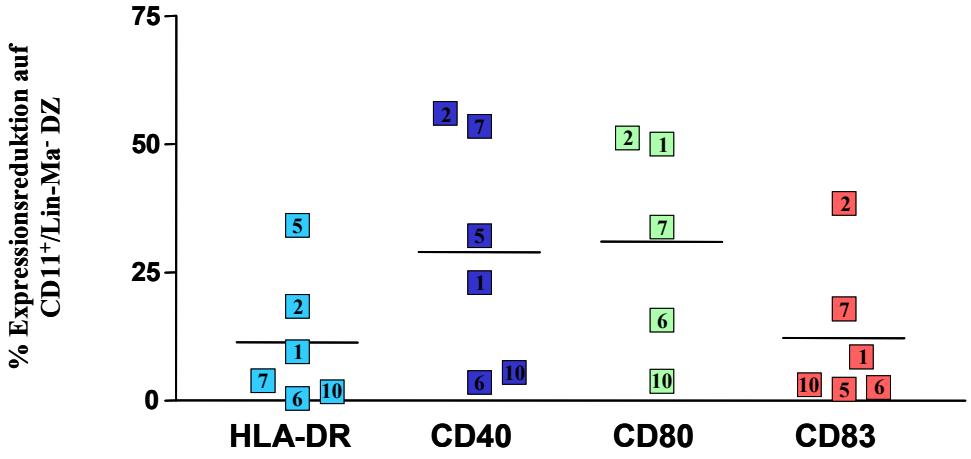


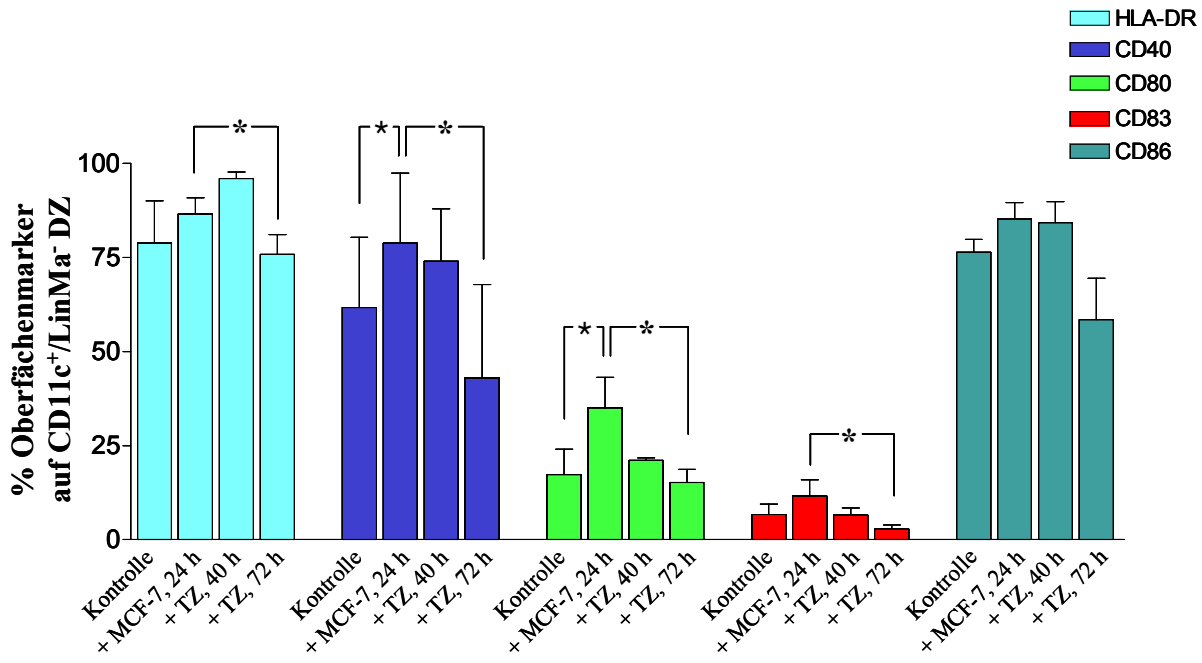
Abb. 4.22: Streudiagramm der Expressionsprofile von HLA-DR, CD40, CD80 und CD83 auf Dendritischen Zellen nach Stimulationskultur. Dargestellt ist der prozentuale Rückgang der Expression nach 72-stündiger Kultivierung. Der prozentuale Expressionsanteil jedes Moleküls wurde nach TAA-Inkubation und 72-stündiger Stimulationskultur bezogen auf die $CD11c^{+}$/$Linienmarker^{-}$ Zellpopulation (DZ) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Die prozentuale Expressionsreduktion ist als Differenz beider Zeitpunkte für jedes Oberflächenantigen zusammenfassend dargestellt. Die angegebenen Ziffern bezeichnen die individuellen Stimulationskulturen der untersuchten Studienpatientinnen.

Das Streudiagramm macht deutlich, dass der Verlauf der Expression Dendriten-spezifischer Oberflächenmarker große interindividuelle Unterschiede aufweist. Während bei den Patientinnen ADI 06 und ADI 10 die Anzahl aktivierender und kostimulatorischer Moleküle über die 72-stündige Kultur relativ konstant blieb, kam es bei den Patientinnen ADI 02 und ADI 07 zu großen Verlusten dieser Oberflächenmoleküle. Insgesamt betrachtet, schien die Anzahl HLA-DR- und CD83-exprimierender Dendritischer Zellen nur mäßig abzunehmen (-12 %), während die prozentuale CD40- bzw. CD80-Expression signifikant reduziert wurde (-30 %; $p = 0.02$).

4.5.2.2 Phänotypische Charakterisierung Antigen-beladener Dendritischer Zellen im Verlauf der Stimulationskultur mit autologen, Antigen-spezifischen T-Zellen

Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu den vorangegangenen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe standen, wurden weitere, nicht-therapeutisch verwendete Stimulationskulturen von Mammakarzinompatientinnen phänotypisch untersucht. Hierzu wurden jeweils vor dem Beginn der Stimulationskultur, sowie nach 40 und 72 h Dendritische Zellen wie oben beschrieben gefärbt und mittels Durchflusszytometer auf die Expression von HLA-DR, CD40, CD86, CD80 und CD83 analysiert. In Abbildung 4.23 ist die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle gemessen an ihrem prozentualen Anteil an $CD11c^{+}$/Linienmarker^{-} Dendritischen Zellen dargestellt.

(A)



(B)

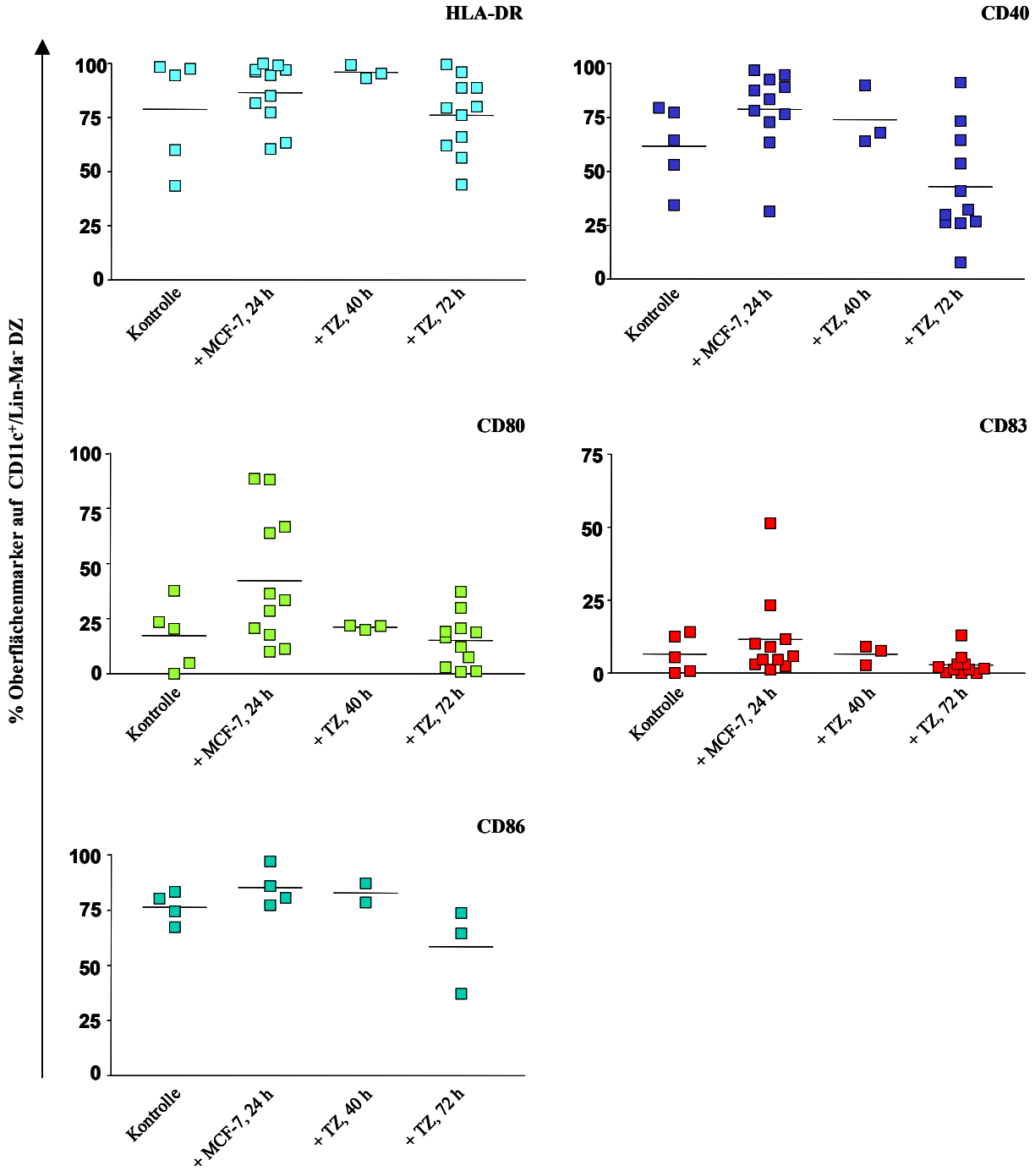


Abb. 4.23: Expressionsprofil Dendritischen Zellen nach TAA-Inkubation und Stimulationskultur mit autologen T-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil HLA-DR-, CD40-, CD80-, CD83- und CD86-exprimierender Zellen an der $CD11c^+$/$Linienmarker^-$ Dendritenpopulation (DZ) nach TAA-Inkubation, sowie nach 40- und 72-stündiger Stimulationskultur mit autologen KM-T-Zellen (TZ). Dendritische Zellen von Mammakarzinompatientinnen wurden über $CD14^+$ Vorläuferzellen angereichert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Für jeden einzelnen Oberflächenmarker ist die unbehandelte Kontrolle, die Expression nach 24-stündiger Inkubation mit MCF-7-Lysat sowie die Expression nach 40- und 72-stündiger Inkubation mit autologen KM-T-Zellen dargestellt. In (A) ist die Expression der Oberflächenmarker als Balkendiagramm von zwei bis elf unabhängigen Experimenten zusammenfassend dargestellt. (B) zeigt die Expression der einzelnen Oberflächenmarker auf den DZ der untersuchten Patientinnen als Streudiagramm.

Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit MCF-7-Lysat führte zunächst zu einer Expressionsinduktion kostimulatorischer und aktivierender Moleküle. Während die Expression innerhalb der ersten 40 h nach Zugabe der autologen T-Zellen relativ konstant blieb, nahm der Anteil CD40-, CD80- sowie CD83-exprimierenden Zellen nach 72 h deutlich ab ($p < 0.05$). Besonders augenfällig erschien der Rückgang von CD40 und CD80 (siehe Abb. 4.22). Der Anteil HLA DR-exprimierender Zellen lag nach der 72-stündigen Stimulationskultur nur geringfügig niedriger im Vergleich zu unbehandelten Dendritischen Zellen ($p = 0.077$). Bezogen auf jedes untersuchte Molekül werden diese Effekte im Streudiagramm nochmals verdeutlicht. Der Anteil CD86-exprimierender Dendritischer Zellen konnte nicht für alle Kulturen bestimmt werden. Auch hier war ein Expressionsverlust dieses T-Zell-aktivierenden Moleküls zumindest tendenziell erkennbar. Zusammenfassend konnte für jedes der hier untersuchten Moleküle ein Expressionsrückgang nach anfänglicher Induktion während der 72-stündigen Stimulationskultur verzeichnet werden.

Der beobachtete Rückgang Dendriten-spezifischer Oberflächenmarker innerhalb der 72-stündigen Stimulationskulturen lässt zwei Interpretationen zu. Zum einen könnten Tumorantigen-präsentierende Dendritische Zellen Angriffspunkte für autologe zytotoxische Effektorzellen bilden, die aufgrund kognitiver Interaktionen in den Stimulationskulturen generiert wurden. Ebenso vorstellbar wäre eine Herunterregulierung der Oberflächenexpression als Folge einer effizienten Aktivierung der Dendritischen Zellen während der ersten 40 Stunden.
Um die Vitalität der Zellen innerhalb der Stimulationskulturen zu untersuchen, wurde der Anteil PI- und Annexin V-anfärbbarer Zellen innerhalb der $CD11c^{+}$/$Linienmarker^{-}$ Population mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Annexin V detektiert früh-apototische Zellen durch die Bindung an Phosphatidylserin, das beim Eintritt der Zelle in die Apoptose auf der Oberfläche exponiert wird. PI hingegen wird erst nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert und markiert damit tote, spät-apoptotische oder nekrotische Zellen. Die Abbildung 4.24 zeigt den prozentualen Anteil mit Annexin V-anfärbbarer und PI-positiver Dendritischer Zellen zu Beginn und nach Beendigung der 72-stündigen Stimulationskultur.

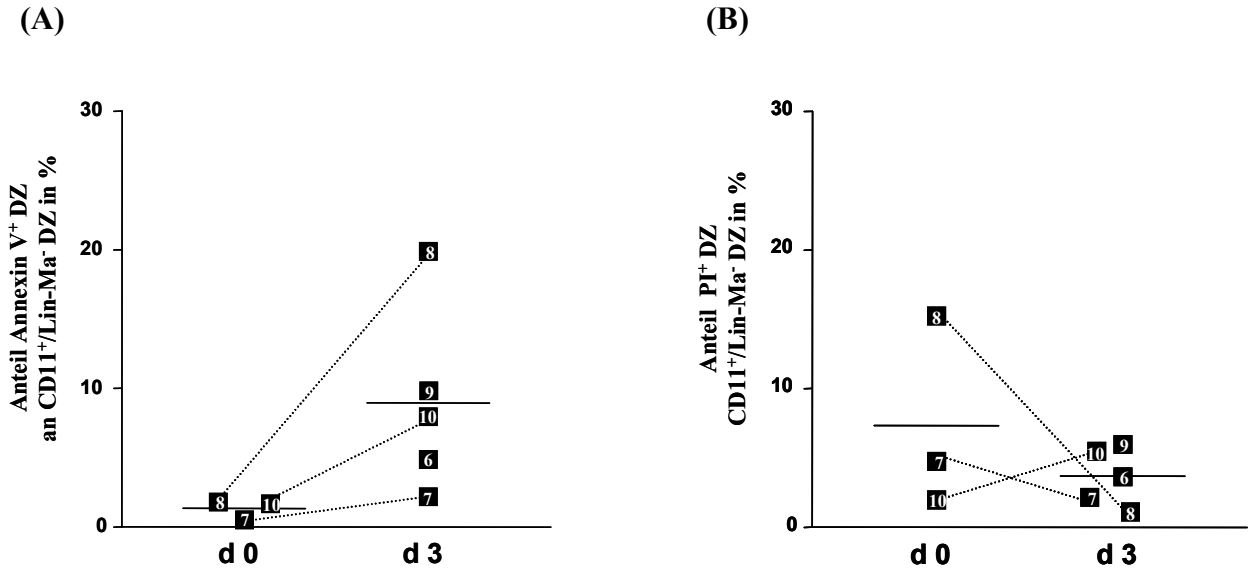


Abb. 4.24: Apoptoseinduktion Dendritischer Zellen während der Stimulationskultur mit autologen KM-T-Zellen. Dendritische Zellen (DZ) der ADI-Studienpatientinnen wurden über $CD14^+$ Vorläuferzellen angereichert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Annexin V-bindender (A) bzw. PI-inkorporierender Zellen (B) an der $CD11c^+$/Linienmarker$^-$ Gesamtpopulation nach MCF-7-Inkubation (d 0) sowie nach 72-stündiger Stimulationskultur (d 3) mit autologen KM-T-Zellen. Die gestrichelten Linien verbinden korrespondierende Analysen derselben Patientin. Für zwei Patientinnen wurde ausschließlich die Anzahl apoptotischer bzw. toter Dendritischer Zellen nach Ablauf der Stimulationskultur angegeben.

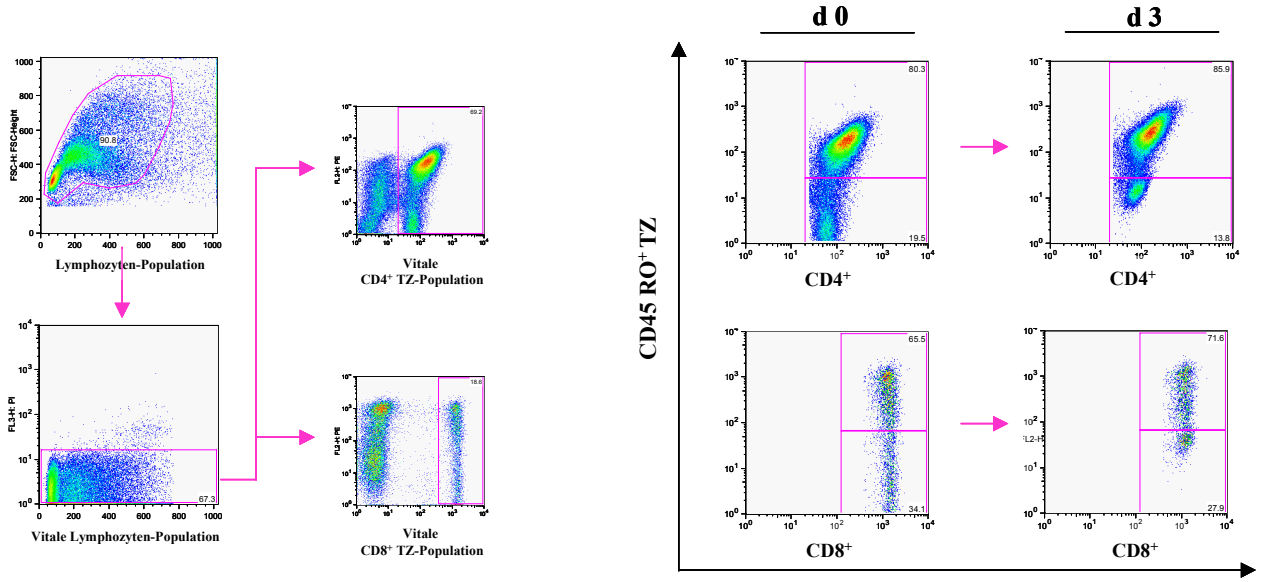
Tendenziell konnte eine Zunahme früh-apoptotischer Dendritischer Zellen auf durchschnittlich 10 % der gesamten $CD11c^+$/Linienmarker$^-$ Population während der 72-stündigen Stimulationskultur beobachtet werden. Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil toter, PI-inkorporierender Dendritischer Zellen insgesamt betrachtet leicht ab. Drei Tage nach Beginn der Kultur mit autologen KM-T-Zellen befanden sich durchschnittlich weniger als 5 % tote Dendritische Zellen in den Stimulationskulturen. Somit ist der für die Mehrheit der Kulturen beobachtete Expressionsrückgang Dendriten-spezifischer Oberflächenmarker nicht auf ein kürzliches Absterben Dendritischer Zellen zurückzuführen. Vermutlich kommt es tatsächlich, bedingt durch eine vorangegangene starke Interaktion mit autologen T-Zellen, zu einer Herunterregulierung der Maturierungsmarker. Der Anstieg früh-apoptotischer $CD11c^+$/Linienmarker$^-$ Zellen während der Stimulationskultur könnte ebenfalls als Zeichen einer Aktivierungs-induzierten Erschöpfung Dendritischer Zellen interpretiert werden.

4.5.2.3 Qualitative Analyse der KM-T-Zellen nach Stimulationskultur mit Tumorantigen-präsentierenden Dendritischen Zellen

Nun wurde untersucht, ob die KM-Gedächtnis-T-Zellen der Therapiekandidatinnen innerhalb der 72-stündigen Kultur mit TAA-beladenen autologen Dendritischen Zellen effizient stimuliert wurden. Hierzu wurden die T-Zellen ebenfalls vor und nach Beendigung der Stimulationskultur mittels Durchflusszytometrie qualitativ analysiert. Die in Bai *et al.* (2003) beschriebenen kognitiven Interaktionen zwischen MCF-7-Lysat beladenen Dendritischen Zellen und Tumor-spezifischen KM-Gedächtnis-T-Zellen induzierten eine bidirektionale Aktivierung der kognitiver Gedächtnis-T-Zellen, was in einer erhöhten Viabilität und gesteigerten therapeutischen Kapazität dieser T-Zellen resultierte. Aufgrund der Annahme, dass Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark der Patientinnen mit einer erhöhten Frequenz vorliegen (Feuerer *et al.*, 2001) und dass die Reaktivierung der Kinetik einer sekundären Immunantwort folgen sollte, würde man nach Aktivierung durch autologe, TAA-beladene APZ eine verstärkte Proliferation der spezifischen T-Zellen erwarten.

In Abbildung 4.25 A ist jeweils eine repräsentative Analyse für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gezeigt. Tote Zellen wurden durch die Inkorporation von zugegebenen Propidiumiodid detektiert und von der Analyse ausgegrenzt. Die vitale Lymphozytenpopulation wurde eingegrenzt and analysiert. Für beide T-Zellsubpopulationen konnte eine Induktion der CD45RO-exprimierenden Zellen beobachtet werden, was für eine Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen zu Effektorzellen spricht. Die Abbildung 4.25 B stellt den prozentualen Anteil CD45RO-positiver und -negativer T-Zellen zu Beginn und nach Beendigung der Stimulationskultur als Streudiagramm dar.

(A)



(B)

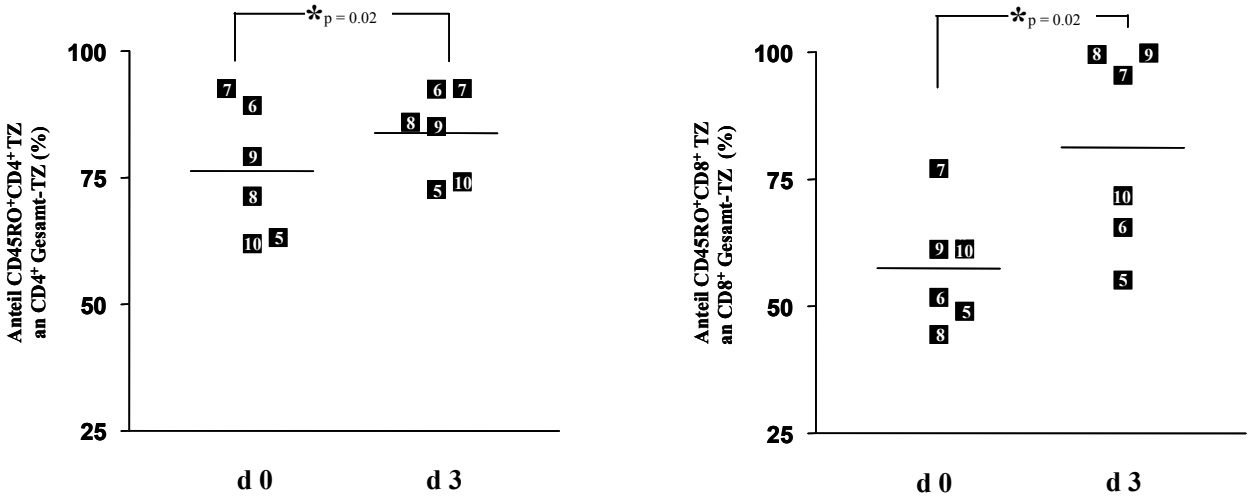


Abb. 4.25: CD45RO-Induktion auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Stimulationskultur mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen. KM-T-Zellen (TZ) wurden für 14 Tage kultiviert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) stellt beispielhaft das analytische Vorgehen dar. Lymphatische Zellen wurden anhand von Zellgröße und Zellgranularität eingefasst und tote, PI-positive Zellen von der weiteren Analyse ausgegrenzt. Die Analyse der vitalen Lymphozytenpopulation wurde auf die $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellpopulation begrenzt und der prozentuale Anteil $CD45RO^+$ T-Zellen an der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Gesamtpopulation vor Beginn (d 0) sowie nach 72-stündiger Stimulationskultur (d 3) mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen bestimmt. (B) stellt den prozentualen Anteil der $CD45RO^+$ T-Zellen an der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Gesamtpopulation für sechs Studienpatientinnen als Streudiagramm dar. * indiziert einen signifikanten Unterschied zwischen d 0 und d 3 ($p < 0.5$).

In jedem Ansatz nahm der Anteil $CD45RO^+$ Zellen im gleichen Maße zu wie der Anteil $CD45RO^-$ Zellen sank (nicht dargestellt). Durchschnittlich konnte für die $CD4^+CD45RO^+$ Subpopulation eine 7.5 %-ige Steigerung und für die $CD8^+CD45RO^+$ eine 24 %-ige Zunahme verzeichnet werden. Somit kam es für beide untersuchten T-Zellpopulationen unter den Stimulationsbedingungen mit TAA-beladenen Dendritischen Zellen zu einer deutlichen Zunahme CD45RO-exprimierender Effektor/Gedächtniszellen. Um zu testen, ob die Stimulationskulturen mit TAA-beladenen Dendritischen Zellen zu einer effizienten Aktivierung der KM-Gedächtnis-T-Zellen *in vitro* führten, wurde die $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellpopulation auf die Expression von CD69 untersucht. CD69 ist ein früher T-Zellaktivierungsmarker und indiziert eine kürzlich erfolgte kognitive Interaktion mit einer Antigen-präsentierenden Zelle.

In Abbildung 4.26 ist die CD69-Expression auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu Beginn und nach 72 h der Stimulationskultur als Streudiagramm dargestellt. In den Stimulationskulturen zweier Patientinnen (ADI 05 und ADI 06) kam es sowohl auf $CD4^+$ als auch auf $CD8^+$ Zellen zu einer deutlichen Expressionsinduktion des Aktivierungsmarkers. Während die CD69-

Expression der Gedächtnis- bzw. Effektorzellen während der Stimulationskulturen für $CD45RO^+CD4^+$-Zellen im Mittel relativ konstant blieb, konnte für die $CD8^+$ Subpopulation eine deutlichere Steigerung von 14 auf 24 % beobachtet werden. Das Streudiagramm macht zusätzlich deutlich, dass die CD69-Induktion auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, mit einer Ausnahme (ADI 07), stets analog verlief. Somit führten die bidirektionalen Interaktionen in den Stimulationskulturen für den überwiegenden Teil der $CD45RO^+$ T-Zellpopulationen zu einer Induktion von CD69 auf Effektor- bzw. Gedächtnis-T-Zellen.

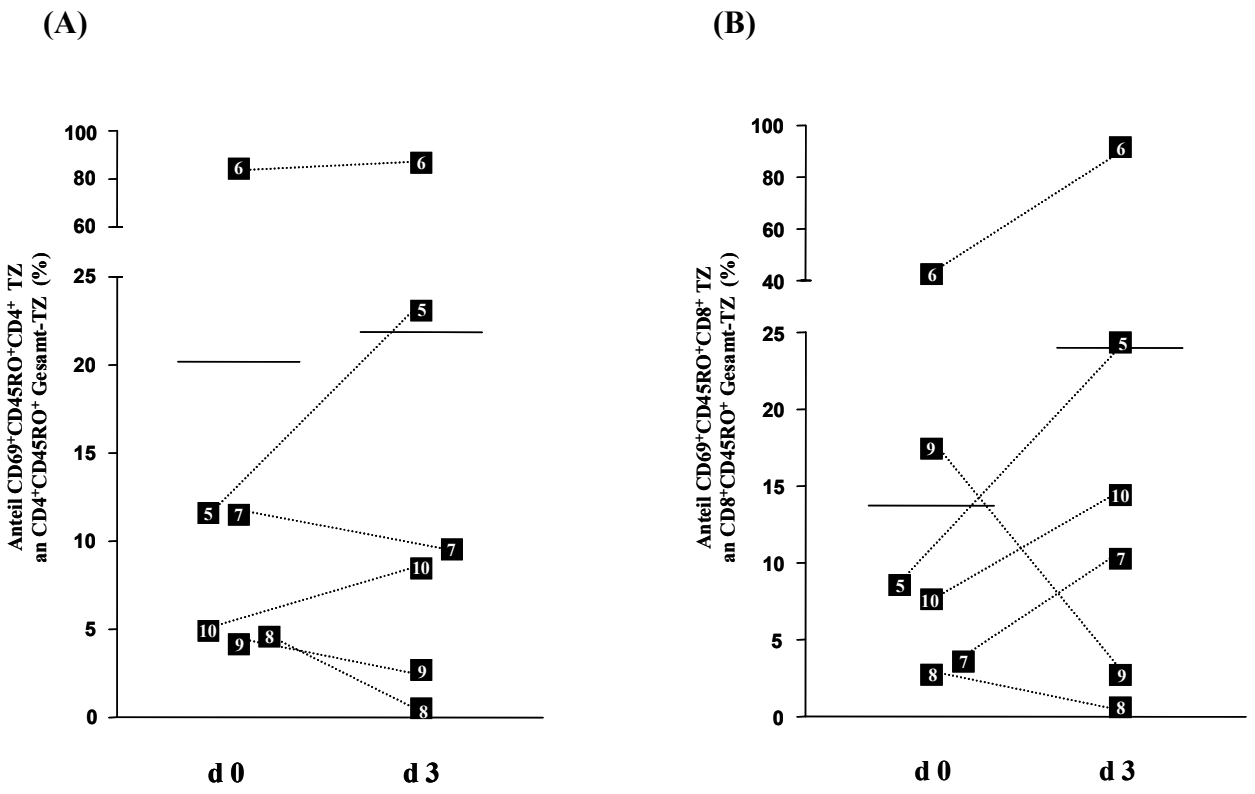


Abb. 4.26: CD69-Induktion auf $CD45RO^+CD4^+$ und $CD45RO^+CD8^+$ T-Zellen nach Stimulationskultur mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen. KM-T-Zellen von sechs ADI-Studienpatientinnen wurden für 14 Tage kultiviert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD69-exprimierender Zellen an der $CD45RO^+$ T-Zellpopulation vor Beginn (d 0) sowie nach 72-stündiger Stimulationskultur (d 3) mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen. (A) Anteil CD69-exprimierender Zellen der $CD45RO^+CD4^+$ Subpopulation; (B) Anteil der CD69-exprimierenden Zellen der $CD45RO^+CD8^+$ Subpopulation. Die gestrichelten Linien verbinden korrespondierende Analysen derselben Patientin.

Als nächstes sollten die $CD4^+CD45RO^+$ Populationen der Stimulationskulturen auf die Expression von CD25, einem weiteren T-Zellaktivierungsmarker, untersucht werden. In Abbildung 4.27 sind die Ergebnisse dieser mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Analyse dargestellt. Tote Zellen wurden wiederum mittels PI-Färbung ausgegrenzt. Die vitale Lymphozytenpopulation wurde anschließend auf die $CD4^+CD45RO^+$ Subpopulation begrenzt und auf die CD25-Expression untersucht.

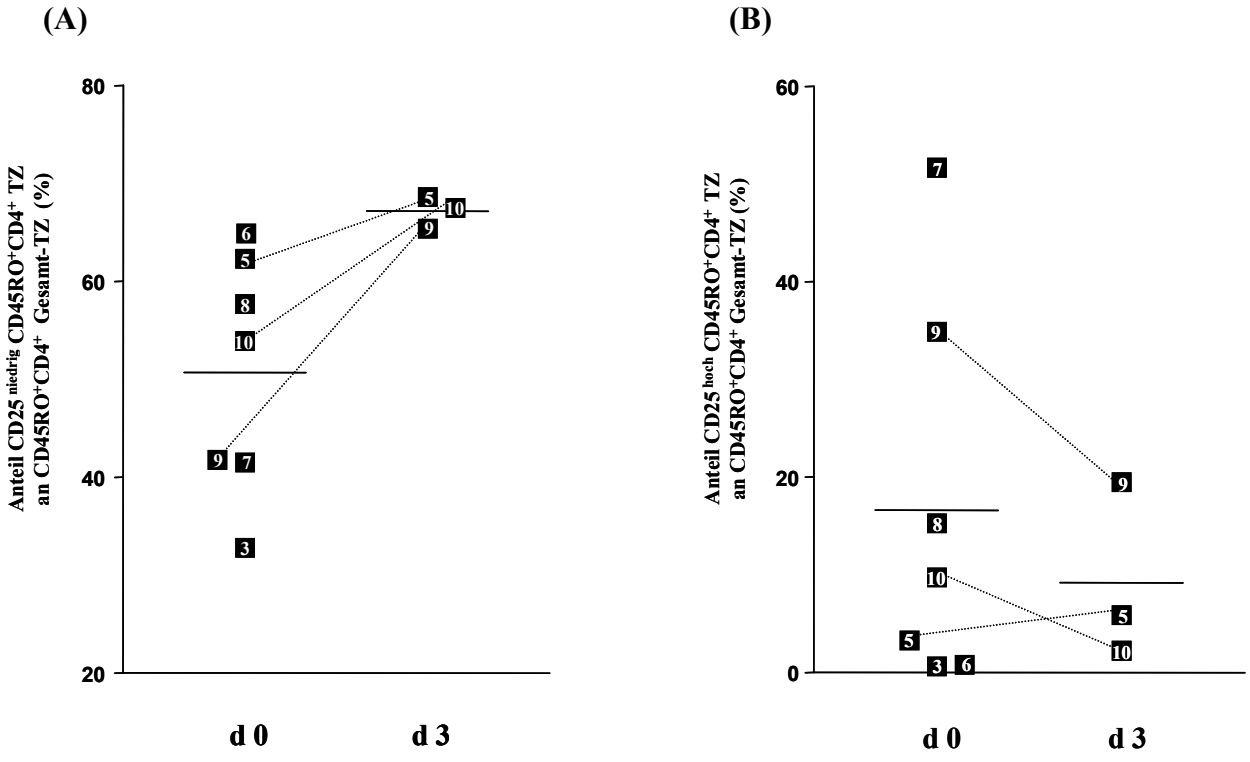


Abb. 4.27: CD25-Induktion auf $CD45RO^+CD4^+$ T-Zellen nach Stimulationskultur mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen. KM-T-Zellen von acht ADI-Studienpatientinnen wurden für 14 Tage kultiviert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD25-exprimierender T-Zellen an der $CD45RO^+CD4^+$ Zellpopulation vor Beginn (d 0) sowie nach 72-stündiger Stimulationskultur (d 3) mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen. (A) Anteil $CD25^{niedrig}$-exprimierender T-Zellen; (B) Anteil $CD25^{hoch}$-exprimierender T-Zellen. Die gestrichelten Linien verbinden korrespondierende Analysen derselben Patientin zu verschiedenen Zeitpunkten. ADI-reaktive Patientinnen sind rot, nicht-reaktive Patientinnen sind blau dargestellt.

Innerhalb der 72-stündigen Stimulationskulturen kam es zu einer gesteigerten Expression von CD25 auf CD45RO-positiven $CD4^+$ Zellen. Die anhand dreier Patientinnen direkt vergleichbare Expression von $CD25^{niedrig}$ auf $CD4^+CD45RO^+$ Zellen zu Beginn und nach Beendigung der 72-stündigen Stimulationskultur bestätigte diese Beobachtung. Im Durchschnitt stieg der Anteil $CD25^{niedrig}$-exprimierender $CD4^+$ T-Zellen von ca. 50 % auf über 67 %, während der prozentuale Anteil $CD25^{hoch}$-exprimierender $CD4^+CD45RO^+$ Zellen

insgesamt einen rückläufigen Trend zeigte. Diese Beobachtung spricht für eine moderate Hochregulation des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25) auf den $CD4^+$ Effektor/Gedächtniszellen der untersuchten Patientinnen, was auf eine Aktivierung der Zellen während den Stimulationskulturen hinweist.
Zusammenfassend resultierte die Kokultivierung therapeutischer T-Zellen mit autologen, TAA-exprimierenden Dendritischen Zellen in einer Zunahme der Effektorzellpopulationen, die für einen Großteil der $CD45RO^+$ Zellen mit einer nachweisbaren Aktivierung einherging.

4.5.2.4 Charakterisierung des Zytokinmilieus der therapeutischen Stimulationskulturen

Werden Dendritische Zellen aufgrund kognitiver Interaktionen mit Antigen-spezifischen T-Zellen aktiviert, sind diese in der Lage, die Differenzierung der T-Zellen und die damit resultierende T-Zellantwort zu beeinflussen. Dieser Prozess geschieht in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie der Art und Menge des Antigens, der kostimulatorischen Kapazität und der zellulären Zytokinsekretion. Die Fähigkeit Dendritischer Zellen bestimmte T-Zellaktivierende bzw. –polarisierende Zytokine zu sezernieren wird wiederum durch freigesetzte Signalmoleküle der T-Zellen reguliert. Insofern kann das Zytokinmilieu innerhalb einer Stimulationskultur von Dendritischen und T-Zellen Aufschluss über die Effektivität der Aktivierung und dem darin resultierenden therapeutischen Potential der Zellen geben.
Um das Zytokinmilieu der therapeutischen Stimulationskulturen zu charakterisieren, wurden an drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten Zellkulturüberstände entnommen und die Mengen an IL-12p70, IL-4, IL-10, TGF-β1 und TNF-α anhand repräsentativer Stichproben mittels ELISA-Test bestimmt.

- **IL-12**

IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten APZs produziert. Es induziert eine effektive Differenzierung Typ-1 Zytokin-sezernierender Zellen (v. a. Th1), es fördert die T-Zellproliferation und verstärkt deren zytotoxische Kapazität. Bai *et al.* (2003) konnten in 40-stündigen Kokulturen zwischen TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen und Tumor-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen eine spezifische Induktion von IL-12 beobachten. Die Abbildung 4.28 zeigt die nachgewiesenen Mengen an IL-12 in den Stimulationskulturen der Therapiepatientinnen.

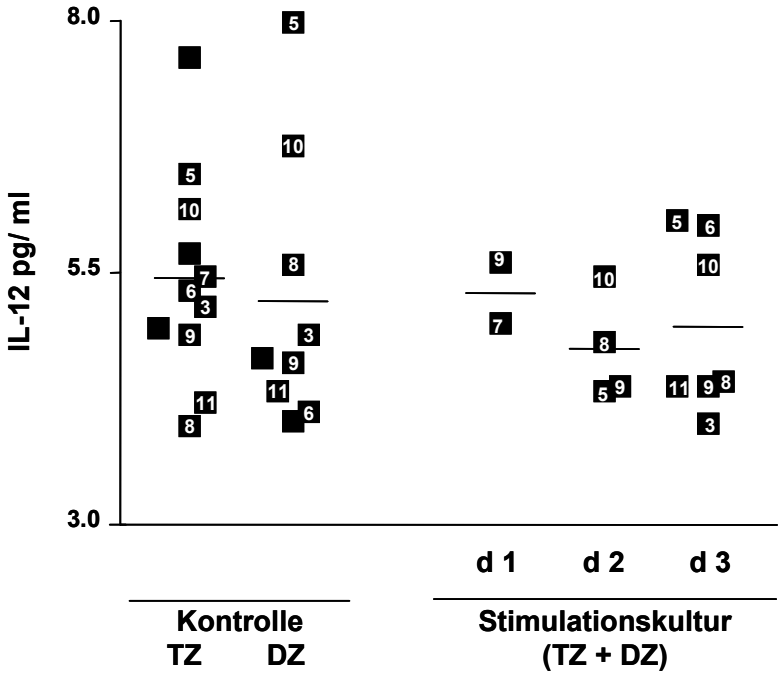


Abb. 4.28: Quantitative Bestimmung von IL-12 im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die ermittelten Mengen an IL-12 zu verschiedenen Zeitpunkten der therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Test. MCF-7-beladene Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h kokultiviert und die IL-12-Konzentration nach 24 (d 1), 40 (d 2) und 72 h (d 3) im Kulturüberstand ermittelt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände autologer T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ untersucht.

Entgegen den Beobachtungen von Bai *et al.* (2003) konnte keine signifikante Induktion von IL-12 in den Kulturen der Therapiepatientinnen beobachtet werden. Verglichen mit den IL-12 Konzentrationen autologer, nicht-stimulierter Dendritenkulturen schien IL-12 in der Mehrzahl der Patientinnen sogar abzunehmen. Lediglich bei zwei Patientinnen (ADI 06, ADI 09) konnte eine leichte IL-12-Zunahme gemessen werden. Somit schien es in der Mehrzahl der untersuchten Stimulationskulturen zu keiner Zunahme der IL-12-Sekretion von Tumorantigen-beladenen Dendritischen Zellen gekommen zu sein.

- **TNF-α**

Um Hinweise auf den Aktivierungszustand der koinkubierten KM-T-Zellen zu erhalten, wurde nun die Konzentration von TNF-α in den Stimulationskulturen der Therapiepatientinnen mittels ELISA-Test bestimmt. TNF-α wird vorwiegend von Monozyten und aktivierten T-Zellen sezerniert und fördert sowohl die Th1-Polarisierung sowie eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort. Die Abbildung 4.29 zeigt die nachgewiesenen Mengen an TNF-α in den Stimulationskulturen der Therapiepatientinnen.

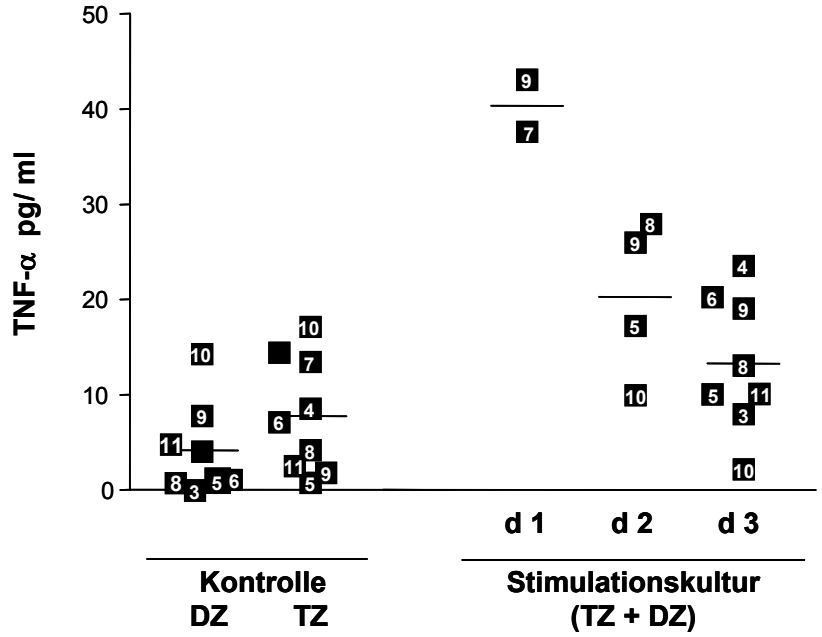


Abb. 4.29: Quantitative Bestimmung von TNF-α im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die ermittelten Mengen an TNF-α zu verschiedenen Zeitpunkten der therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests. MCF-7-beladene Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h kokultiviert und die Konzentration des jeweiligen Zytokins nach 24 h (d 1), 40 h (d 2) und 72 h (d 3) im Kulturüberstand ermittelt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände autologer T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ untersucht.

Während es innerhalb der ersten 24 h der Stimulationskulturen zu einer Induktion von TNF-α kam (bis zu 34 pg/ml), fiel die Konzentration schließlich nach 72 h auf einen durchschnittlichen Wert von 13 pg/ml. Damit war die Menge an sezerniertem TNF-α auch nach 72 h (unter Ausschluss einer Patientin (ADI 10)), signifikant gegenüber den autologen, nicht-stimulierten T-Zellkulturen erhöht.

- **IL-4**

Als nächstes wurden die Zytokine, die eine Th1/Tc1-gegenläufige Differenzierung der Effektorzellen kennzeichnen, untersucht. IL-4 stellt einen essentiellen Regulator von T-Helferzellantworten dar, indem es die Th2-Differenzierung fördert und die Entwicklung und IFN-γ-Sekretion von Th1-Zellen hemmt (Ibelgaufts *et al*., 1995).

Das Streudiagramm (Abb. 4.30) zeigt den zeitlichen Verlauf der IL-4-Konzentration in den Stimulationskulturen der Therapiepatientinnen. Verglichen mit den konstitutiv sezernierten Mengen nicht-stimulierter Zellen kam es in den meisten Kulturen zu keiner sichtlichen Induktion von IL-4.

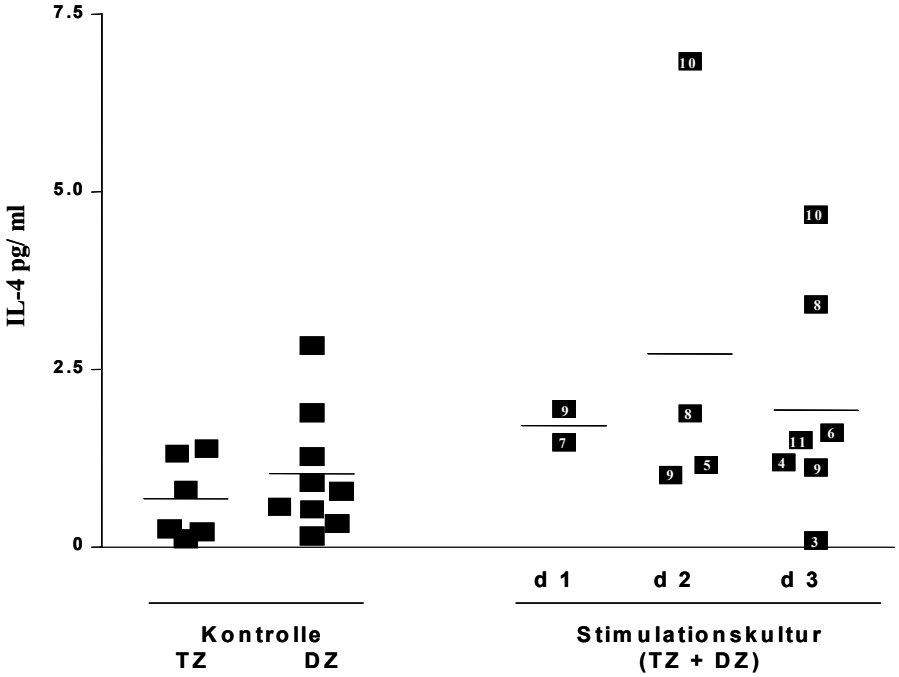


Abb. 4.30: Quantitative Bestimmung von IL-4 im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die ermittelten Mengen an IL-4 zu verschiedenen Zeitpunkten der therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests. MCF-7-beladene Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h kokultiviert und die Konzentration des jeweiligen Zytokins nach 24 (d 1), 40 h (d 2) und 72 h (d 3) im Kulturüberstand ermittelt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände allogener T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ untersucht.

Lediglich zwei Patientinnen (ADI 08, ADI 10) zeichneten sich durch eine überdurchschnittliche Sekretion am zweiten und dritten Tag der Stimulationskulturen aus, wobei nie mehr als 7 pg/ml nachgewiesen wurden. Somit wurden insgesamt sehr geringe Mengen dieses Th2-polarisierenden Zytokins während den 72-stündigen therapeutischen Stimulationskulturen produziert.

- **IL-10**

Ähnlich wie IL-4, wirkt auch IL-10 inhibierend auf eine effiziente Entwicklung und Aktivierung von Th1/Tc1-Zellen. Es wird u. a. von Th2-Zellen sowie von regulatorischen T-Zellen gebildet und kann eine langzeitige, Antigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellanergie auslösen (Moore *et al*., 2001). Zudem besitzt IL-10 einen immunsuppressive Effekt auf Antigen-präsentierende Zellen. Indem es die Maturierung und die Kapazität zur Kostimulation herabsetzt, behindert es die Fähigkeit der Antigen-präsentierenden Zellen, eine effiziente adaptive Effektorzellantwort zu induzieren (Moore *et al*., 2001; Mocellin *et al*., 2001).

Das Streudiagramm (Abb. 4.31) zeigt den zeitlichen Verlauf von IL-10 innerhalb der therapeutischen Stimulationskulturen. Bezogen auf die durchschnittlich nachgewiesene Menge dieses Zytokins wurde IL-10 zunächst initial induziert. Dann fiel die IL-10-Produktion während der folgenden zwei Tage ab. Dabei ergaben sich große individuelle Unterschiede hinsichtlich des Verlaufs des IL-10-Spiegels. Während die Mehrzahl der Kulturen eine kaum detektierbare bzw. keine IL-10-Induktion zeigte, wurde insbesondere in der Stimulationskultur der Patientin ADI 08 eine massive IL-10-Produktion beobachtet. Interessanterweise schien die IL-10-Induktion bei den Kulturen der Studienpatientinnen konform mit der IL-4-Induktion zu verlaufen. Somit wurde nur in den Kulturen einiger weniger Patientinnen Th1/Tc1-inhibierende bzw. immunsuppressive Zytokine gebildet.

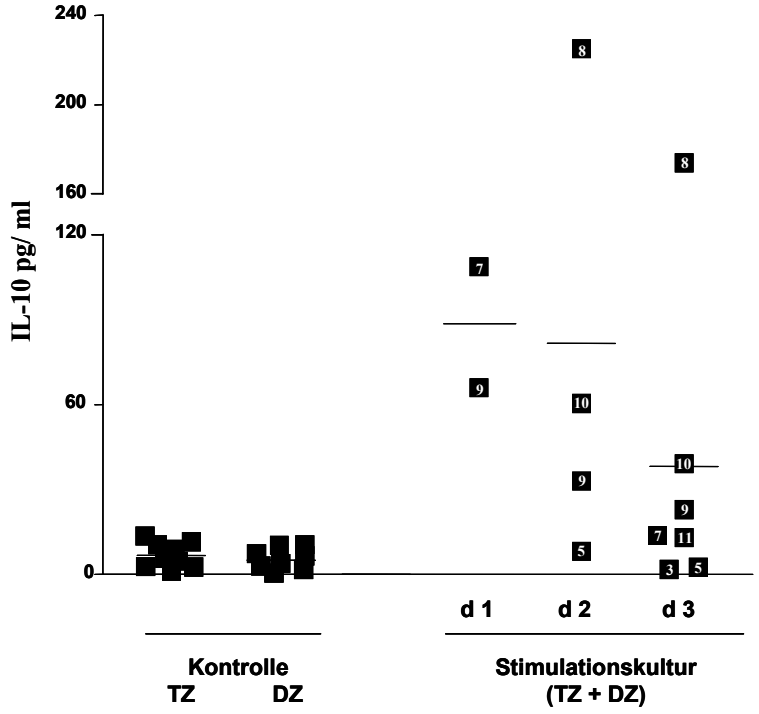


Abb. 4.31: Quantitative Bestimmung von IL-10 im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die ermittelten Mengen an IL-10 zu verschiedenen Zeitpunkten der therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests. MCF-7-beladene Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h kokultiviert und die Konzentration des jeweiligen Zytokins nach 24 (d 1), 40 h (d 2) und 72 h (d 3) im Kulturüberstand ermittelt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände allogener T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ untersucht.

- **TGF-β1**

Zuletzt wurde hier die Sekretion von TGF-β1, einem weiteren Th1-suprimierenden Mediatormolekül untersucht. TGF-β1 besitzt u. a. einen negativen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, indem es die IL-2-Produktion hemmt und inhibierend auf den Erwerb von Effektorfunktionen nach T-Zellaktivierung wirkt.

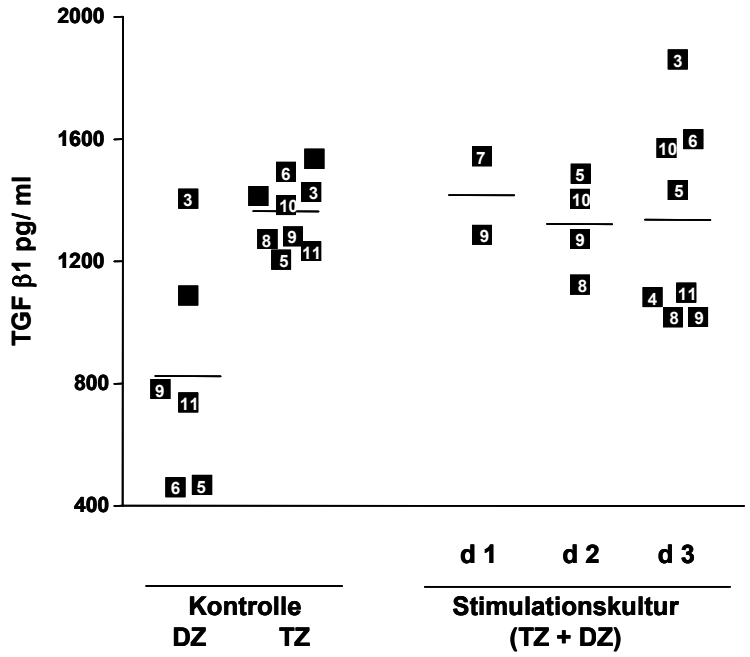


Abb. 4.32: Quantitative Bestimmung von TGF-β1 im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die ermittelten Mengen an TGF-β1 zu verschiedenen Zeitpunkten der therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests. MCF-7-beladene Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h kokultiviert und die Konzentration des jeweiligen Zytokins nach 24 h (d 1), 40 h (d 2) und 72 h (d 3) im Kulturüberstand ermittelt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände autologer T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ untersucht.

Insgesamt betrachtet blieb die Konzentration während der 72-stündigen Stimulationskulturen relativ konstant. Allerdings konnte, verglichen mit autologen, nicht-stimulierten T-Zellen, bei ca. der Hälfte der untersuchten Kulturen (ADI 08; 09; 11) ein Abfall der TGF-β1-Konzentration beobachtet werden. Indes zeigte die Menge an ermitteltem TGF-β1 für die andere Hälfte der untersuchten Kulturen (ADI 03, 05, 06, 10) nach 72-stündiger Inkubation mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen einen leicht zunehmenden Trend (siehe Abb. 4.32).

Zusammenfassend konnte anhand des ermittelten Zytokinmilieus nicht auf eine Aktivierung der TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen geschlossen werden. Bezüglich der hier untersuchten Mediatoren, die polarisierend auf T-Zellantworten wirken, ergaben sich starke interindividuelle Unterschiede. Eine die Th1-Differenzierung hemmende IL-4- und IL-10-Induktion konnte nur bei einzelnen Patientinnen beobachtet werden, während das ebenfalls auf T-Zellen suppressiv wirkende TGF-β1 teilweise herauf und zum anderen Teil herunterreguliert wurde. TNF-α wurde bei allen repräsentativ untersuchten Kulturen initial induziert, was für eine effiziente Induktion einer zytotoxischen bzw. Th1-Antwort zumindest bei den repräsentativ analysierten Patientinnen spricht.

4.5.3 Evaluierung der Hauptzielkriterien der Therapiestudie

4.5.3.1 Durchführbarkeit der Phase I Studie

Die diagnostischen IFN-γ ELISpot-Tests zur Bestimmung der Anzahl Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark der Therapiekandidatinnen waren gut durchführbar sowie quantitativ auswertbar. Keine Patientin zeigte Komplikationen aufgrund der KM-Punktion. Die KM-Punktion zur Gewinnung der therapeutischen T-Zellen gestaltete sich z. T. schwierig, so dass nicht bei allen Patientinnen 100 ml KM-Aspirat gewonnen werden konnte und somit die schließlich generierte Anzahl therapeutischer Zellen sehr variierte (siehe Tabelle 4.2). Auch hier zeigte keine Patientin mittelfristige Nebenwirkungen.

Die Herstellung der therapeutischen Zellen war bei zehn Patientinnen ohne nennenswerte Probleme möglich. Bei einer Patientin (ADI 10) ereignete sich während der 72-stündigen Stimulationskultur eine geringfügige bakterielle Kontamination der Zellsuspension durch *Staphylococcus aureus*, die erst 12 h nach Zellapplikation im Hygieneinstitut Heidelberg nachgewiesen werden konnte (siehe 3.6.3). Die intravenöse Applikation der Zellsuspension verlief in allen Fällen komplikationslos.

4.5.3.2 Evaluierung der Toxizität

Keine Patientin zeigte eine klinisch oder labortechnisch auswertbare Reaktion auf den Transfer autologer Zellen sowohl in der akuten Therapiephase als auch während des Nachsorgezeitraums. Gemäß der Angaben in der Literatur und der persönlichen Erfahrung des durchführenden Arztes (Dr. med. F. Schütz) hätten Übelkeit, allergische oder septische Symptome, Fieber oder eine Niereninsuffizienz aufgrund systemisch zirkulierender lysierten

Zellen auftreten können. Die oben beschriebene bakterielle Kontamination der Stimulationskultur ADI 10 war unter antibiotischem Schutz vollständig asymptomatisch und hatte keinerlei Folgen für die Patientin. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass dies die Stimulationseffizienz der therapeutischen Zellen während der 72-stündigen Kokultur beeinträchtigte.

4.5.4 Evaluierung des immunologischen Ansprechens nach adoptivem T-Zelltransfer

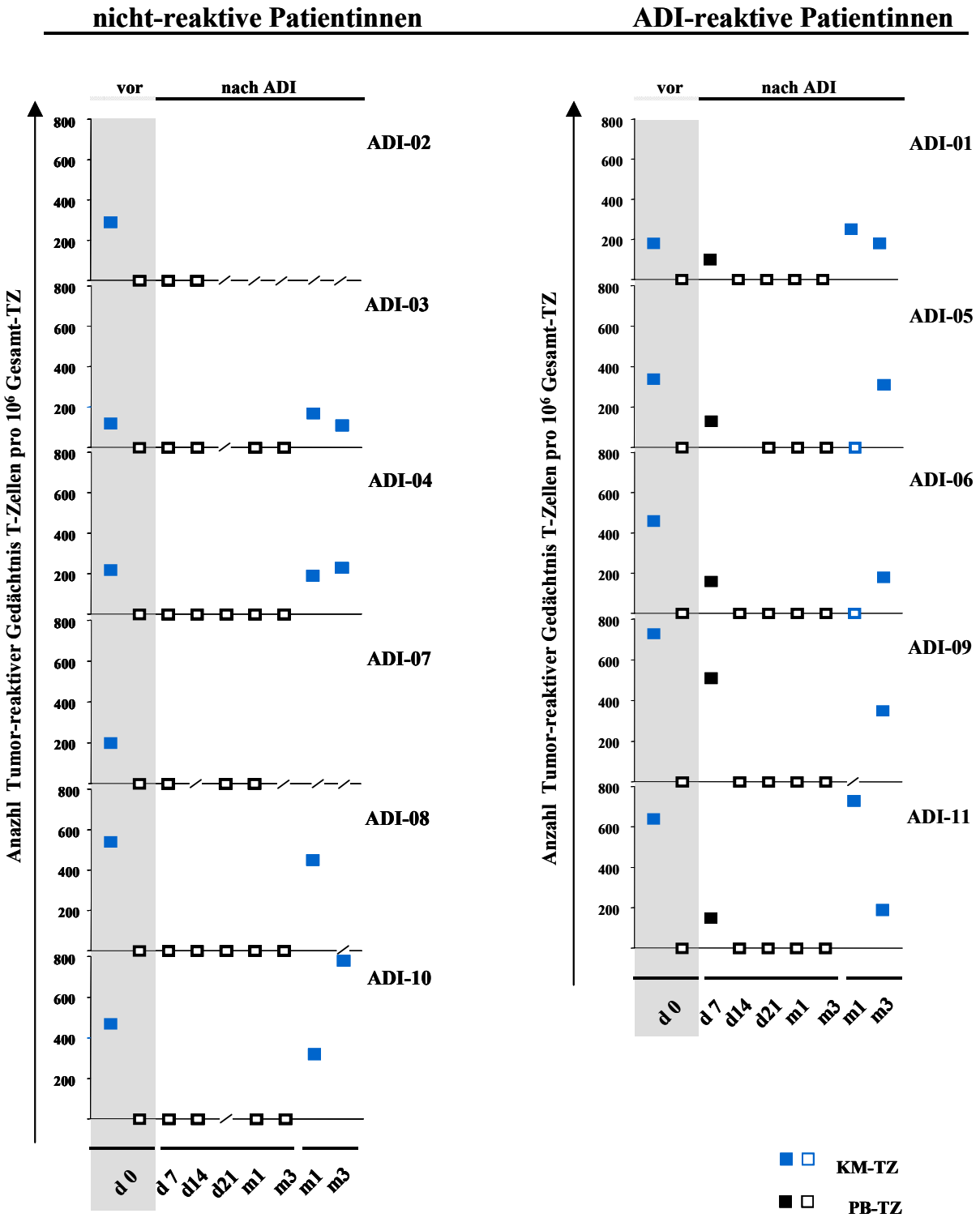
4.5.4.1 Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität im peripheren Blut

Um Hinweise auf ein mögliches Ansprechen der Therapie auf immunologischer Ebene zu erhalten, wurde die Tumor-spezifische Reaktivität der Immunzellen nach Zellapplikation über einen Nachsorgezeitraum von drei Monaten im peripheren Blut überwacht. Hierzu wurde die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen sieben, 14 und 21 Tage sowie nach einem und drei Monaten nach Zellapplikation mittels Kurzzeit-INF-γ ELISpot-Test analysiert und mit der Reaktivität zum Zeitpunkt vor der Therapie verglichen.

Mononukleäre Zellen wurden mittels Ficolldichtezentrifugation aus dem Blut zum jeweiligen Zeitpunkt isoliert und zunächst kryokonserviert. Die anschließenden Frequenzbestimmung erfolgte zeitgleich für alle Proben mittels Stimulation durch autologe, MCF-7-beladene Dendritische Zellen. Die untersuchten Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ-produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der Negativkontrollen ($p \leq 0.1$).

Die Abbildung 4.33 zeigt die ermittelten Frequenzen für jede behandelte Patientin zu den verschiedenen Evaluierungszeitpunkten. In Übereinstimmung mit Feuerer *et al.* (2001) konnten zum Zeitpunkt vor der Therapie keine Tumor-reaktiven Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut gefunden werden. Indes waren hier sieben Tage nach dem adoptiven Zelltransfer bei fünf Patientinnen Tumor-reaktive Zellen nachweisbar. Im folgenden werden diese Patientinnen als „ADI-reaktive Patientinnen“ bezeichnet.

(A)


nicht-reaktive Patientinnen
ADI-reaktive Patientinnen
vor
nach ADI
Anazhl Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen pro 10⁶ Gesamt-TZ
Anzahl Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen pro 10⁶ Gesamt-TZ
ADI-02
ADI-03
ADI-04
ADI-07
ADI-08
ADI-10
ADI-01
ADI-05
ADI-06
ADI-09
ADI-11
d 0
d 7
d14
d21
m1
m3
m1
m3
KM-TZ
PB-TZ

(B)

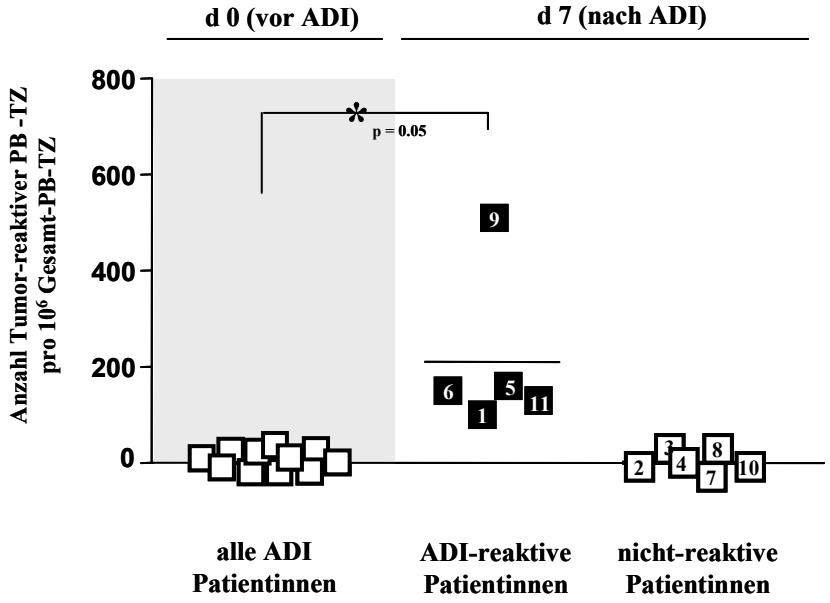


Abb. 4.33: Frequenzen tumorreaktiver, IFN-γ-sezernierender PB- und KM-Gedächtnis T-Zellen vor und nach ADI. Dargestellt sind die mittels IFN-γ ELISpot ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen der ADI-Studienpatientinnen im Blut (schwarze Quadrate) und im Knochenmark (blaue Quadrate) vor und nach adoptivem T-Zelltransfer. Immunologische Reaktivität (gefüllte Quadrate) wurde angenommen, wenn die Anzahl spezifisch reaktiver T-Zellen nach Inkubation mit MCF-7-Lysat signifikant höher lag als die der Kontrolle mit irrelevantem Antigen ($p \leq 0.1$). Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Ist die Frequenz mit null angegeben, konnte keine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber MCF-7 nachgewiesen werden. (A) zeigt die Reaktivität über den gesamten Evaluierungszeitraum im peripheren Blut und im Knochenmark; (B) fasst die ermittelten Frequenzen zu den angegebenen Zeitpunkten für alle untersuchten Patientinnen im peripheren Blut zusammen.

Interessanterweise ließen sich Tumor-reaktive Zellen ausschließlich bei denjenigen Patientinnen im Blut detektieren, welche mindestens 1 x 10^7 therapeutische Zellen erhalten hatten. Wurden weniger verabreicht, konnte keine Tumor-Reaktivität nachgewiesen werden. In Abbildung 4.34 ist die Verteilung der verschieden Therapiepatientinnen bezüglich der applizierten Zellmengen und der im Blut ermittelten Reaktivität sieben Tage nach Therapie graphisch verdeutlich.

Der beobachtete Effekt erwies sich als statistisch signifikant ($p = 0.002$). An keinem der folgenden Evaluierungszeitpunkte, 14, bzw. 21 Tage sowie ein und drei Monate nach Therapie, waren Tumor-reaktive T-Zellen in der Blutzirkulation der behandelten Patientinnen detektierbar (siehe Abb. 4.33).

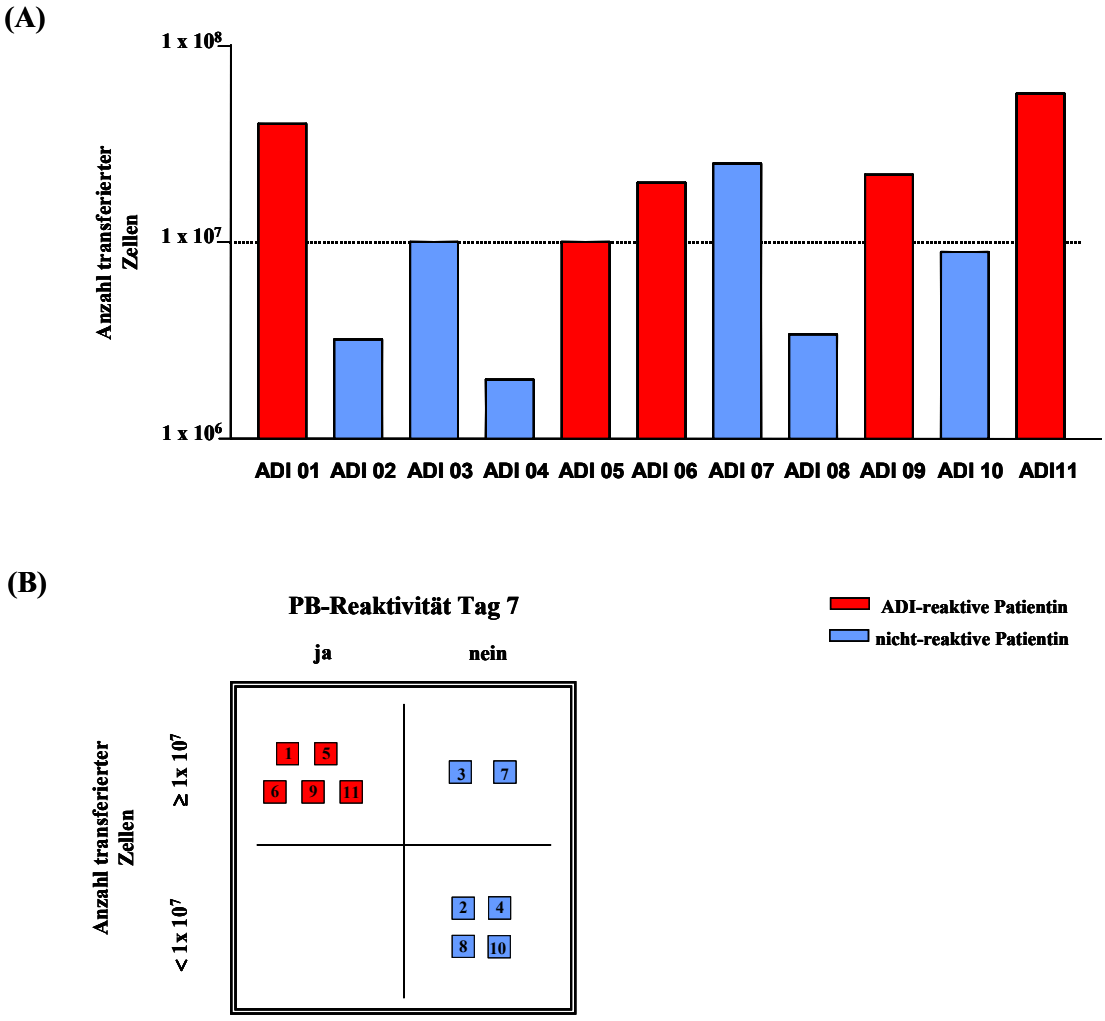


Abb. 4.34: Zusammenhang zwischen Anzahl therapeutisch applizierter KM-T-Zellen und Tumor-spezifischer Reaktivität an Tag 7 nach Zellapplikation im peripheren Blut. In (A) sind die mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmten vitalen T-Zellpopulationen nach Beendigung der Stimulationskulturen dargestellt. Angereicherte KM-T-Zellen wurden für 72 h mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen kokultiviert, in Ringerlösung aufgenommen und anschließend den Studienpatientinnen i. v. appliziert. Patientinnen, bei denen sieben Tage nach Zellapplikation Tumor-reaktive T-Zellen im peripheren Blut (PB) nachweisbar waren, sind rot dargestellt (ADI-reaktive Patientinnen). Nicht-reaktive Patientinnen sind blau dargestellt. In (B) ist die Verteilung der verschiedenen Therapiepatientinnen bezüglich der applizieren Zellmengen und der Reaktivität an Tag sieben nach Therapie schematisch verdeutlicht.

Bezogen auf die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen im Knochenmark vor Beginn der Therapie (siehe Tabelle 4.2), wurde die Anzahl reaktiver T-Zellen, die der jeweiligen Patientin appliziert wurden, näherungsweise bestimmt. Im Verlauf der Stimulationskulturen kam es bei den meisten Patientinnen zu einer Reduktion der absoluten T-Zellmenge (siehe Abb. 4.19). Ausgehend davon, dass Antigen-spezifische, reaktivierte Zellen innerhalb der Kulturen eher expandieren als abnehmen, wurde bei der Extrapolierung der spezifischen T-Zellzahl die Gesamtmenge der T-Zellen zu Beginn der Stimulation zu Grunde gelegt. In

Abbildung 4.35 sind die extrapolierten Werte für ADI-reaktive und nicht-reaktive Patientinnen darstellt. Aufgrund dieser Näherung konnte eine kritische Zellzahl ermittelt werden (ca. 7000 Tumor-spezifische, reaktive KM-T-Zellen), deren Überschreitung mit einer Reaktivität an Tag sieben nach Zellapplikation korrelierte.

In Anbetracht der absoluten Zahl applizierter, spezifisch Tumor-reaktiver T-Zellen (maximal 4×10^4 (ADI 11)), deutet die evaluierte Frequenz Tumor-reaktiver Zellen im Blut sieben Tage später, auf eine massive Vermehrung der systemisch applizierten Effektorzellen hin. Dabei scheint die Anzahl transferierter reaktiver Gedächtnis-T-Zellen für eine nachweisliche Expansion bzw. ein Überleben der spezifischen Zellpopulation nach systemischer Applikation ausschlaggebend zu sein.

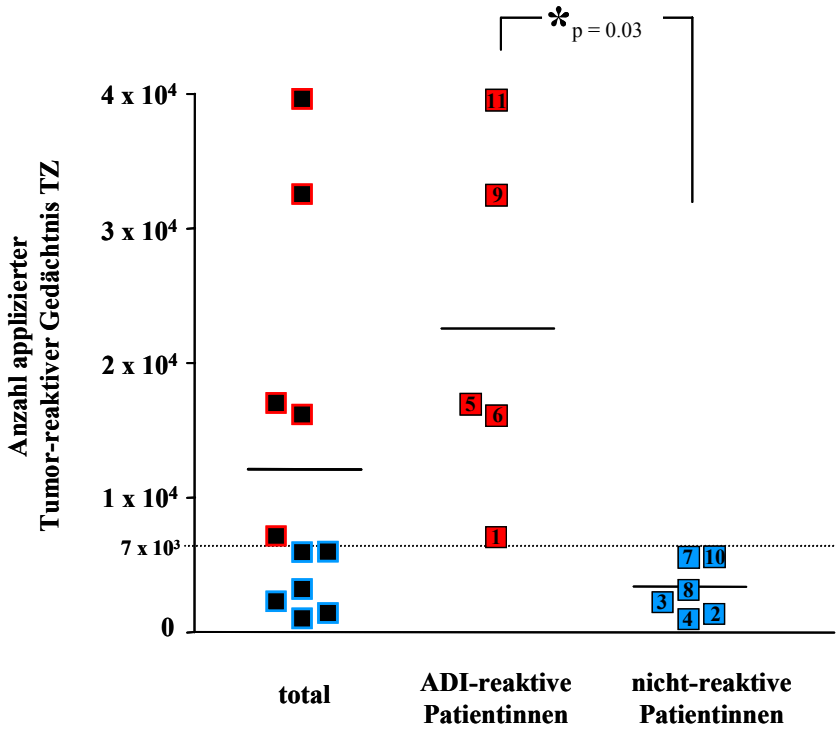


Abb. 4.35: Extrapolierte Anzahl reaktiver, adoptiv transferierter KM-T-Zellen.
Für jede ADI-Studienpatientin ist die extrapolierte Anzahl spezifisch reaktivierter Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der Stimulationskulturen mit autologen Dendritischen Zellen angegeben. Der Berechnung liegen die mittels IFN-γ ELISpot-Test ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen im Knochenmark vor Therapie zu Grunde (Abschnitt 4.5.1). Für diejenigen Kulturen, in denen eine T-Zellzunahme beobachtet wurde (ADI 01; ADI 07), wurde der Anteil Tumor-reaktiver T-Zellen an der Gesamt-T-Zellzahl nach 72-stündiger Stimulationskultur ermittelt. Für alle anderen Stimulationskulturen, in denen die T-Zellzahl konstant blieb bzw. sank, wurde zur Berechnung die T-Zellzahl zu Beginn der Stimulation zu Grunde gelegt. Dargestellt ist sowohl die Anzahl spezifisch reaktivierter Gedächtnis-T-Zellen aller ADI-Studienpatientinnen, sowie nach Auftrennung in ADI-reaktive (rot) und nicht-reaktive Patientinnen (blau). * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen ADI-reaktiven und nicht reaktiven Patientinnen an ($p < 0.05$).

In Abschnitt 4.5.2.3 wurde beschrieben, dass es unter den Bedingungen der 72-stündigen Stimulationskulturen zu einer Hochregulation des Effektorzell- bzw. Gedächtniszellmarkers CD45RO kam, während der Anteil CD45RO-negativer Zellen im gleichen Maße abnahm. Dieser Beobachtung könnte eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen oder eine Proliferation reaktivierter Gedächtnis-T-Zellen zu Grunde liegen.

In Abbildung 4.36 ist der Anteil phänotypisch definierter naiver $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu Beginn der Stimulationskulturen und zum Zeitpunkt der Applikation dargestellt. Es fiel auf, dass die Patientinnen ADI 05; 09 und 06 anteilig hohe Mengen an naiven $CD4^+$ T-Zellen zu Beginn der Kulturen zeigten, welche dann innerhalb der folgenden 72 Stunden entweder zu Effektorzellen umdifferenzierten oder gegebenenfalls starben. Unter Ausschluss letztgenannter Möglichkeit wurden bei diesen ADI-reaktiven Patientinnen tendenziell mehr naive $CD4^+$ Zellen im Vergleich zu nicht-reaktiven Patientinnen während der Stimulationskultur primär aktiviert und folglich auch mehr umdifferenzierte naive T-Zellen appliziert. Für $CD8^+$ konnte dieses Muster nicht festgestellt werden, wenngleich sich auch hier die Patientinnen ADI 05 und ADI 09 durch eine initial hohe Anzahl naiver $CD8^+$ T-Zellen auszeichneten.

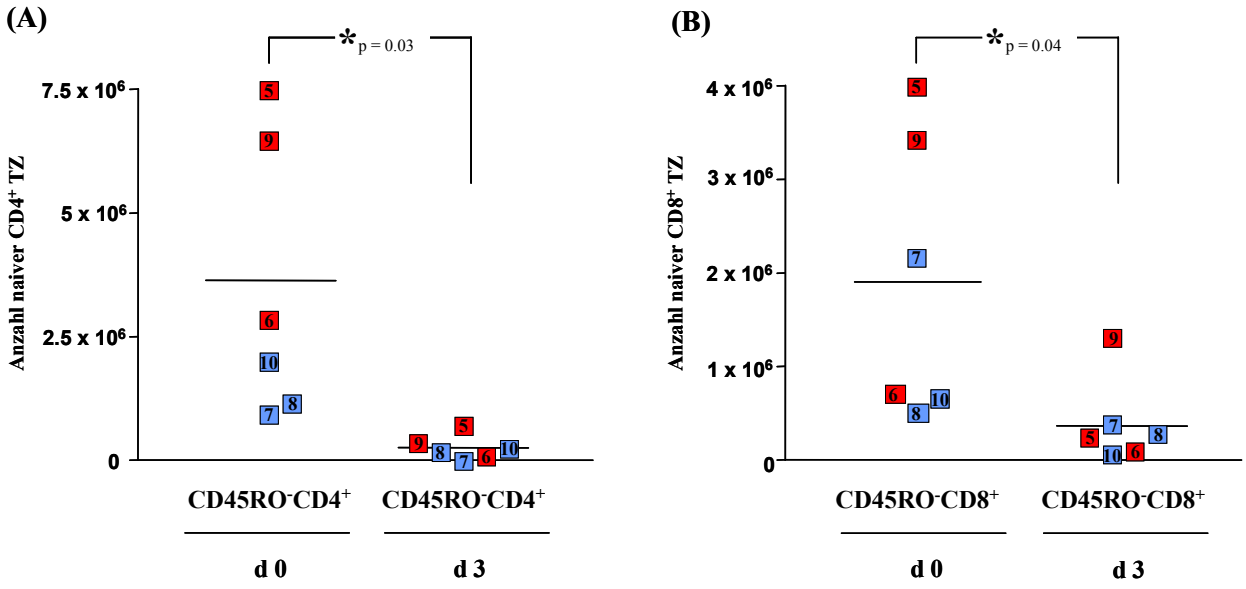


Abb. 4.36: Anteil naiver KM-T-Zellen zu Beginn und nach Stimulationskultur mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen. KM-T-Zellen von sechs ADI-Studienpatientinnen wurden angereichert und 72 h mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen kultiviert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil naiver T-Zellen vor Beginn (d 0) sowie nach 72-stündiger Stimulationskultur (d 3) analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. CD45RO-negative T-Zellen wurden als naive Zellen definiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $CD45RO^-$ T-Zellen an der $CD4^+$ (A) bzw. $CD8^+$ (B) Gesamtpopulation. ADI-reaktive Patientinnen sind rot, nicht-reaktive Patientinnen sind blau dargestellt. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen d 0 und d 3 an ($p < 0.05$).

Hier konnte somit nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den Tumor-reaktiven T-Zellen, die sieben Tage nach Applikation bei den sogenannten ADI-reaktiven Patientinnen nachweisbar waren, ausschließlich um expandierte, *ex vivo* reaktivierte KM-Gedächtniszellen handelte, oder ob der beobachtete Effekt eventuell auch auf eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen zurückzuführen war.

Des weiteren muss berücksichtigt werden, dass die koapplizierten Dendritischen Zellen zu einer weiteren, primären Aktivierung naiver T-Zellen *in vivo* führen konnten. Die Abbildung 4.37 zeigt die Anzahl der in den individuellen Stimulationskulturen eingesetzten Dendritischen Zellen für ADI-reaktive und nicht-reaktive Patientinnen.

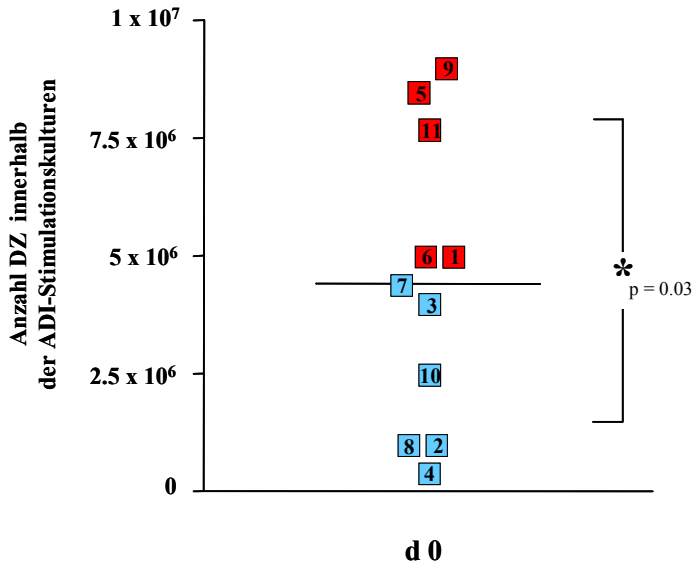


Abb. 4.37: Anteil Dendritischer Zellen innerhalb der Stimulationskulturen mit autologen KM-T-Zellen. Dendritische Zellen der elf ADI-Studienpatientinnen wurden über $CD14^+$ Vorläuferzellen aus PB und KM über sieben Tage angereichert, über 24 h mit MCF-7-Lysat beladen und anschließend für 72 h mit autologen KM-T-Zellen inkubiert. Dargestellt ist die mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmte Anzahl vitaler Dendritischer Zellen, die zu Beginn der jeweiligen therapeutischen Stimulationskultur eingesetzt wurden (d 0). ADI-reaktive Patientinnen sind rot, nicht-reaktive Patientinnen sind blau dargestellt. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen ADI-reaktiven und nicht reaktiven Patientinnen an ($p < 0.05$).

Aufgrund des in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Verhältnisses von T-Zellzahl und der Anzahl Dendritischer Zellen in den Stimulationskulturen, erhielten diejenigen Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive T-Zellen sieben Tage nach Zellapplikation nachweisbar waren, nicht nur größere Mengen autologer T-Zellen sondern auch höhere Anzahlen TAA-präsentierender Dendritischer Zellen. Damit kann die Frage, ob die beobachtete Antwort der ADI-reaktiven Patientinnen ursächlich mit der Anzahl transferierter TAA-reaktiver Gedächtniszellen zusammenhängt, nicht abschließend geklärt werden.

4.5.4.2 Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität im Knochenmark

Parallel zur Reaktivität im peripheren Blut, wurde die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark nach therapeutischem Zelltransfer bestimmt. Hierbei sollten insbesondere Eigenschaften wie das Migrationsverhalten der Immunzellen und deren Potential zur langfristigen Tumorkontrolle analysiert werden.

T-Zellen des Knochenmarks wurden ein und drei Monate nach Therapie aus Knochenmarkaspiraten der Studienpatientinnen angereichert und mittels autologer, TAA-beladener Dendritischer Zellen im Kurzzeit IFN-γ ELISpot-Test analysiert. Eine Übersicht über die ermittelten Frequenzen gibt Abbildung 4.33.

Für jede behandelte Patientin konnte ein und/oder drei Monate nach therapeutischem Zelltransfer eine Tumor-spezifische Reaktivität im Knochenmark nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde bei den ADI-reaktiven Patientinnen ein signifikanter Rückgang der Tumor-reaktiven Gedächtnis-T-Zellen nach drei Monaten beobachtet. Währenddessen blieben die Frequenzen im Knochenmark der ADI nicht-reaktiven Patientinnen über den Beobachtungszeitraum annähernd konstant (Abb. 4.38).

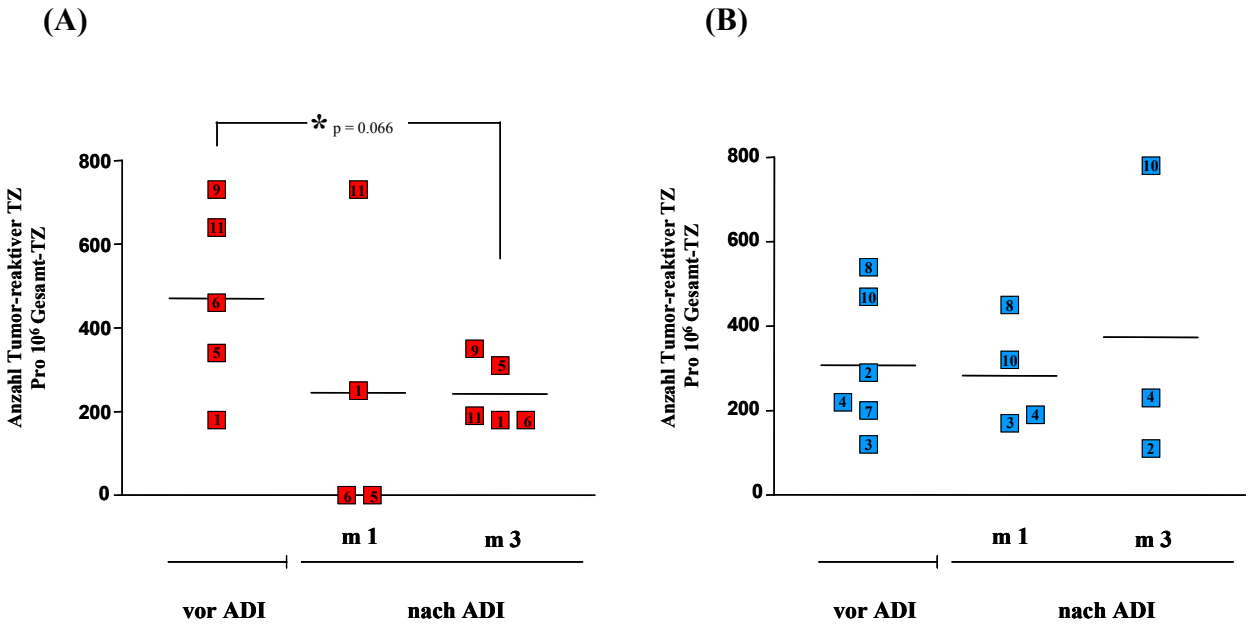


Abb. 4.38: Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark vor und nach ADI. Dargestellt sind die mittels IFN-γ ELISpot ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen der ADI-Studienpatientinnen im Knochenmark vor, sowie ein und drei Monate nach ADI-Therapie. (A) ADI-reaktive Patientinnen. (B) nicht-reaktive Patientinnen. Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl spezifisch-reaktiver T-Zellen nach Inkubation mit MCF-7-Lysat signifikant höher lag als die der Negativkontrolle mit irrelevantem Antigen ($p \leq 0.5$). Ist die Frequenz mit null angegeben, konnte keine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber MCF-7 nachgewiesen werden. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den ermittelten Frequenzen vor und drei Monaten nach Therapie an ($p < 0.1$).

Es scheint unwahrscheinlich, dass die spezifisch reaktiven Zellen bei der therapeutischen Knochenmarkaspiration dezimiert wurden. Der beobachtete Frequenzrückgang lässt somit eher eine eventuell Therapie-induzierte Mobilisierung der reaktiven T-Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut oder Gewebe vermuten.

4.5.4.3 Perforin-reaktive T-Zellen im Blut und Knochenmark

Neben INF-γ stellt Perforin ein weiteres wichtiges Effektormolekül aktivierter T-Zellen dar. Es wird ausschließlich von zytotoxischen T-Zellen sezerniert und wirkt Apoptose-induzierend durch die Zerstörung der Membranintegrität der Zielzelle.

Um zu untersuchen, ob sich im Blut oder Knochenmark der therapierten Patientinnen Tumor-spezifische Zellen befinden, die nach Restimulation mittels TAA-präsentierender, autologer Dendritischer Zellen mit der Sekretion von Perforin reagieren, wurde ein Perforin ELISpot-Test durchgeführt. Die angereicherten T-Zellzahlen der verschiedenen Patientinnen waren allerdings nicht immer ausreichend, um die Frequenz spezifisch-reaktiver Zellen für jeden Evaluierungszeitpunkte zu bestimmen.

Mittels Kurzzeit-ELISpot-Test konnten so im Knochenmark von fünf untersuchten Studienpatientinnen Perforin-sezernierende T-Zellen nach Restimulation nachgewiesen werden. Die Frequenzen der spezifisch-reaktivierten KM-T-Zellen variierten zwischen 240 und 1465 pro 10^6 T-Zellen. In Abbildung 4.39 sind die ermittelten Frequenzen Perforin-sezernierender T-Zellen aus Blut und Knochenmark zu den verschiedenen Evaluierungszeitpunkten aufgeführt. Interessanterweise waren Tumor-reaktive, Perforin-sezernierende T-Zellen bei einer von drei untersuchten Patientinnen sieben Tage nach Therapie im Blut nachweisbar. Somit korrelierte die Tumor-spezifische Perforin-Reaktivität in diesem Fall mit der spezifischen Sekretion von IFN-γ sieben Tage nach Applikation der therapeutischen Zellen (vergleiche Abb. 4.33).

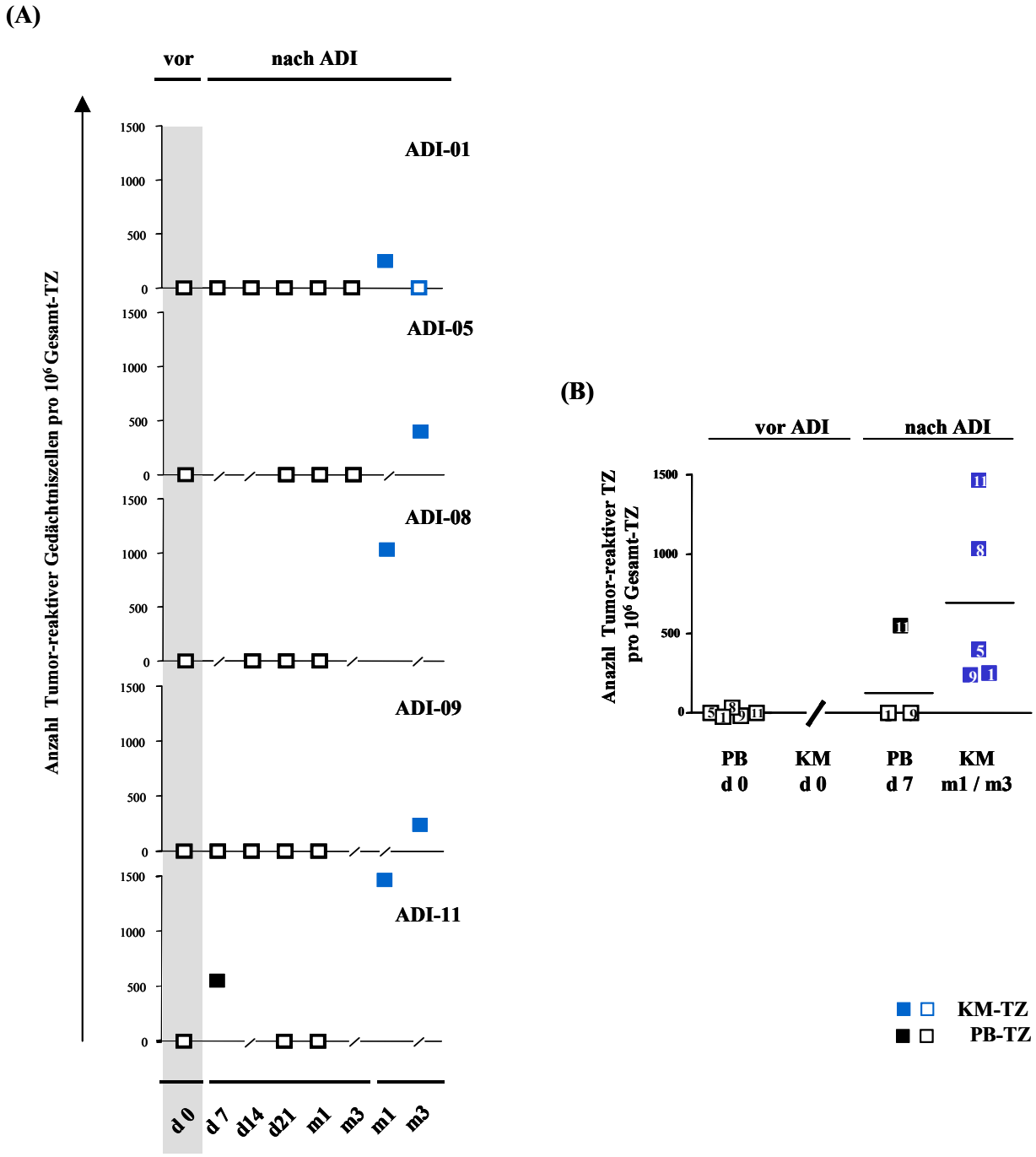


Abb. 4.39: Frequenzen tumorreaktiver, Perforin-sezernierender PB- und KM-Gedächtnis T-Zellen vor und nach ADI. Dargestellt sind die mittels Perforin-ELISpot ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen der ADI-Studienpatientinnen. Die Frequenzbestimmung im Blut (schwarze Quadrate) erfolgte vor adoptivem Zelltransfer und 7, 14, 21 Tage sowie 1 und 3 Monate nach ADI. Die Frequenzbestimmung reaktiver Zellen im Knochenmark (blaue Quadrate) erfolgte 1 und/oder 3 Monate nach ADI. Immunologische Reaktivität (gefüllte Quadrate) wurde angenommen, wenn die Anzahl spezifisch reaktiver T-Zellen nach Inkubation mit MCF-7-Lysat signifikant höher lag als die der Kontrolle mit irrelevantem Antigen ($p \leq 0.1$). Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Ist die Frequenz mit null angegeben, konnte keine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber MCF-7 nachgewiesen werden. (A) zeigt die Reaktivität über den gesamten Evaluierungszeitraum im Blut und Knochenmark; (B) fasst die ermittelten Frequenzen zu den angegebenen Zeitpunkten für alle untersuchten Patientinnen zusammen.

4.5.4.4 Zusammenfassende Analyse des immunologischen Ansprechens

In Abschnitt 4.5.4.1 wurden die Studienpatientinnen anhand der Tumor-spezifischen Reaktivität der PB-T-Zellen sieben Tage nach therapeutischer Zellapplikation in ADI-reaktive und nicht-reaktive Patientinnen eingeteilt. Dabei konnte eine Abhängigkeit der ADI-Reaktivität von der Anzahl applizierter T-Zellen sowie der Anzahl Dendritischer Zellen festgestellt werden. Nun sollte anhand der erhobenen Daten retrospektiv untersucht werden, ob bestimmte Aktivierungsparameter oder Zytokinmuster zusätzliche Hinweise auf ein späteres immunologische Ansprechen der Patientinnen geben könnten.

Bezüglich der Expression Dendriten-spezifischer Aktivierungsmarker ergab sich, wie in 4.5.2.1 gezeigt, ein sehr heterogenes Bild. Bei der Mehrzahl der Patientinnen kam es auf den Dendritischen Zellen zu einer starken Abnahme aktivierender und kostimulatorischer Oberflächenmarker während der Stimulationskulturen. Interessanterweise schien der Anteil CD83-exprimierender Dendritischer Zellen bei nicht-reaktiven Patientinnen tendenziell stärker abzunehmen als bei ADI-reaktiven Patientinnen. Hinzu kommt, dass Patientin ADI 10 bereits vor Beginn der Stimulationskultur durch eine äußerst geringe Expression von CD80 und CD83 auffiel (vergleiche Abb. 4.21).

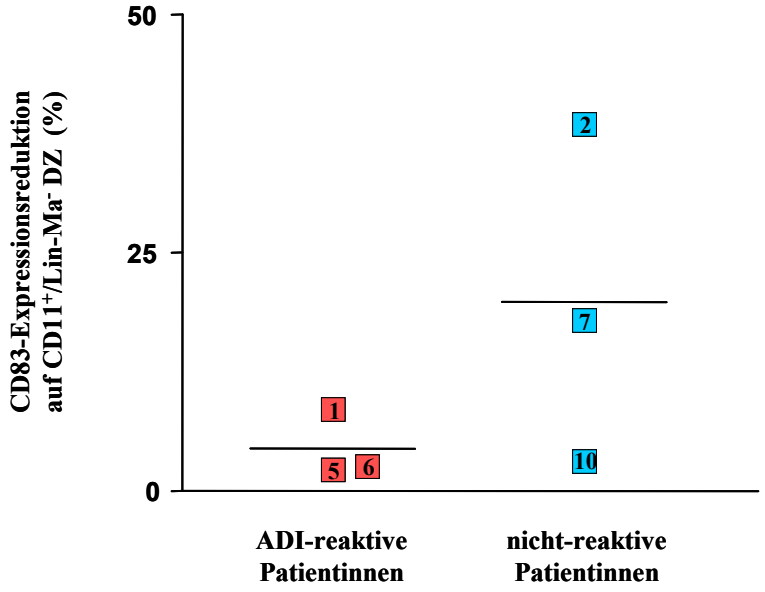


Abb. 4.40: Streudiagramm des CD83-Expressionsprofils auf Dendritischen Zellen nach Stimulationskultur. Dargestellt ist der prozentuale Rückgang der CD83-Expression auf Dendritischen Zellen nach 72-stündiger Kokultivierung mit autologen KM-T-Zellen. Der prozentuale Expressionsanteil wurde nach TAA-Inkubation und 72-stündiger Stimulationskultur bezogen auf die $CD11c^{+}$/Linienmarker^{-} Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Die prozentuale Expressionsreduktion ist als Differenz beider Zeitpunkte für ADI-reaktive (rot) und nicht-reaktive Patientinnen (blau) dargestellt.

Für IL-12, einen weiteren Indikator einer effizienten Aktivierung Dendritischer Zellen, konnte kein vergleichbarer Trend festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.5.2.4). Allerdings konnte bei zwei ADI-reaktiven Patientinnen (ADI 06, ADI 09) eine tendenzielle IL-12-Induktion gemessen werden (vergleiche Abb. 4.28).

Bei Betrachtung des Aktivierungsstatus der KM-T-Zellen zeichneten sich besonders die Patientinnen ADI 06 und ADI 05 aus. Sowohl die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen sowie der Anteil $CD25^{niedrig}$-positiver $CD4^+$ T-Zellen dieser ADI-reaktiven Patientinnen lagen tendenziell höher als bei allen anderen behandelten Patientinnen (siehe Abschnitt 4.5.2.3).

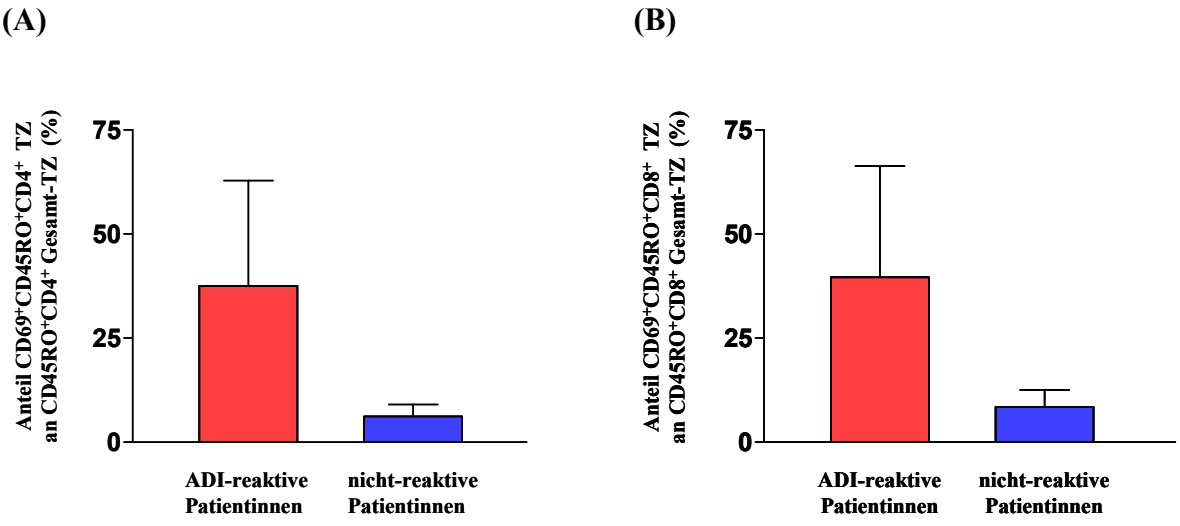


Abb. 4.41: CD69-Induktion auf $CD45RO^+CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Stimulationskultur mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen. KM-T-Zellen von sechs ADI-Studienpatientinnen wurden über 14 Tage kultiviert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD69-exprimierender Zellen an der $CD45RO^+$ T-Zellpopulation nach 72-stündiger Stimulationskultur mit autologen, MCF-7-beladenen Dendritischen Zellen. (A) Anteil CD69-exprimierender Zellen der $CD45RO^+CD4^+$ Subpopulation; (B) Anteil der CD69-exprimierenden Zellen der $CD45RO^+CD8^+$ Subpopulation. ADI-reaktive Patientinnen sind durch rote Balken, nicht-reaktive Patientinnen sind durch blaue Balken repräsentiert. Es sind die gemittelten Werte der Analysen von jeweils drei Patientinnen angegeben.

Allerdings konnte aufgrund der hier genannten Aktivierungsmarker kein Muster für ADI-reaktive und nicht-reaktive Patientinnen abgeleitet werden, da auch ADI nicht-reaktive Patientinnen z. T. einen hohen Anteil aktivierter T-Zellen nach 72-stündiger Stimulationskultur aufwiesen (z. B. ADI 10). Bezogen auf die analysierte CD69-Expression konnte aber insgesamt festgehalten werden, dass ADI-reaktiven Patientinnen tendenziell mehr aktivierte T-Zellen appliziert wurden als nicht-reaktiven Patientinnen (siehe Abb. 4.41).

Die TNF-α-Sekretionsprofile der Stimulationskulturen (siehe Abb. 4.29) sowie der 40-stündigen Restimulationskulturen (4.42) ließen ebenfalls keinen eindeutigen Hinweis auf einen potentiellen Therapieerfolg erkennen.

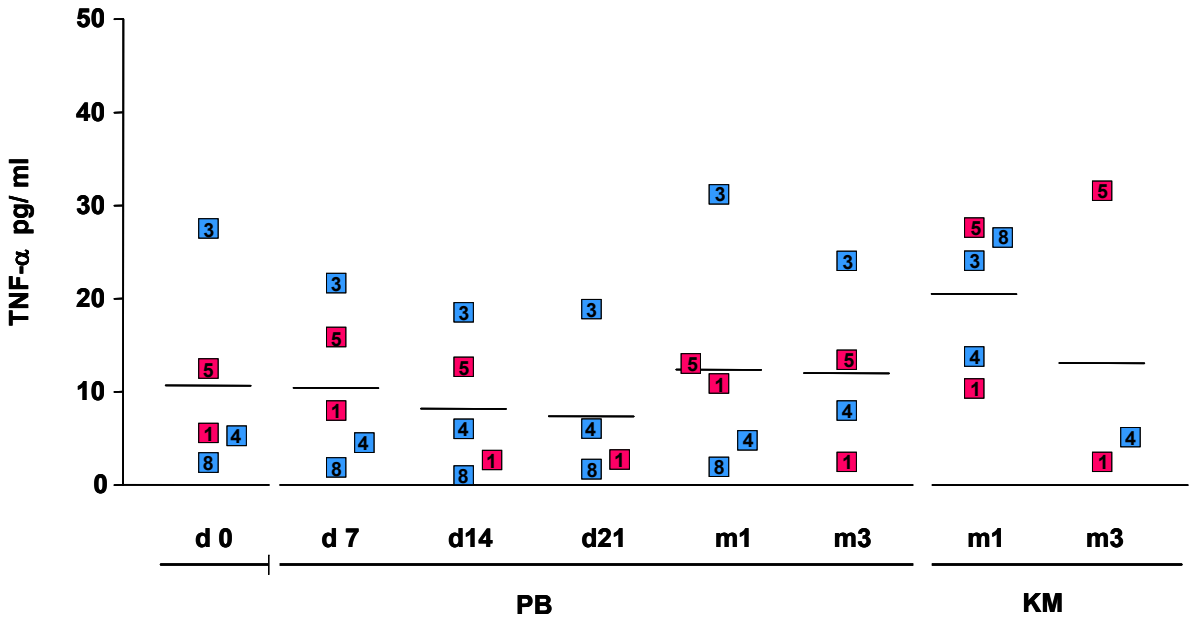


Abb. 4.42: Quantitative Bestimmung von TNF-α in 40-stündigen Restimulationskulturen nach ADI. Dargestellt sind die Mengen an TNF-α, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach ADI mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests ermittelt wurden. Den ADI-behandelten Patientinnen wurde vor und zu den angegebenen Tagen (d) bzw. Monaten (m) nach ADI PB und KM entnommen. Daraus isolierte T-Zellen wurden für 40 h mit MCF-7-beladenen autologen Dendritischen Zellen kokultiviert und anschließend die TNF-α-Konzentration in den verschiedenen Kulturüberständen ermittelt. ADI-reaktive Patientinnen sind rot, nicht-reaktive Patientinnen sind blau dargestellt.

So befanden sich unter den Patientinnen, die mit einer erhöhten Produktion TNF-α an Tag sieben nach Therapie reagierten, sowohl eine ADI-reaktive (ADI 05) als auch eine nicht-reaktive Patientin (ADI 03). Gleichermaßen galt dies für Stimulationskulturen mit geringer TNF-α-Induktion. Das Ergebnis des ELISpot-Tests konnte also nicht mit der induzierten Menge an TNF-α innerhalb der Kurzzeitstimulation mit TAA-präsentierenden Dendritischen Zellen korreliert werden.

Die oben diskutierten Zytokine und Aktivierungsmarker stellten potentielle Indikatoren für eine Typ 1-polarisierende T-Zellantwort dar. Als Vertreter essentieller Th2-Regulatoren wurden die Sekretionsprofile von IL-4 und IL-10 in den 40-stündigen Restimulationskulturen untersucht (siehe Abschnitt 4.5.2.4). Interessanterweise zeigten die Kulturen der ADI-reaktiven Patientinnen konstante bzw. rückläufige Entwicklungen der IL-4- und IL-10-Produktion. Indes wurden in den Kulturen der Patientinnen, die nicht auf die Therapie

reagierten, tendenziell höhere Mengen dieser Th1-supprimierenden Zytokine gebildet (siehe Abb. 4.30 und 4.31). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der folgenden Abbildung (Abb. 4.43) für alle drei Evaluierungszeitpunkte der Stimulationskulturen zusammenfassend dargestellt.

(A) **(B)**

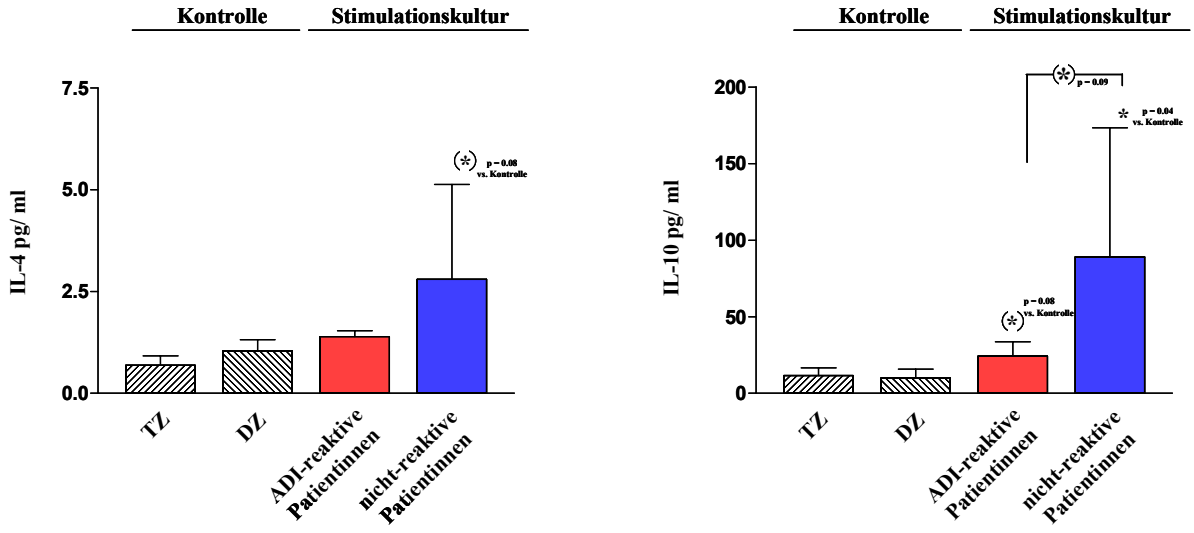


Abb. 4.43: Quantitative Bestimmung von IL-4 und IL-10 im Verlauf der therapeutischen Stimulationskulturen. Dargestellt sind die gemittelten Mengen an (A) IL-4 und (B) IL-10 über die 72-stündigen therapeutischen Stimulationskulturen mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests. MCF-7 beladene, Dendritische Zellen der ADI-Studienpatientinnen wurden mit autologen KM-T-Zellen für 72 h co-kultiviert. Zum jeweiligen Evaluierungszeitpunkt (nach 24 h, 40 h, 72 h) wurde die Zytokinkonzentration im Kulturüberstand anhand von zwei bis sieben therapeutische Stimulationskulturen repräsentativ ermittelt und daraus die mittlere Konzentration berechnet. ADI-reaktive Patientinnen sind in den roten Balken, nicht-reaktive Patientinnen sind in den blauen Balken zusammenfassend dargestellt. Als Negativkontrolle dienten die Kulturüberstände allogener T- und Dendritischer Zellen, die 72 h unter nicht-stimulatorischen Bedingungen kultiviert wurden (schraffierte Balken). * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den angegebenen Gruppen an (* $p \leq 0.05$, $^{(*)}$ $p \leq 0.1$).

ADI nicht-reaktive Patientinnen zeichneten sich somit durch eine erhöhte Sekretion von IL-4 und IL-10 in den 72-stündigen therapeutischen Stimulationskulturen im Vergleich zu ADI-reaktiven Patientinnen aus. Die IL-4-Sekretion der 40-stündigen Restimulationskulturen nach ADI ließen ein vergleichbares Muster erkennen (Abb. 4.44). Die ermittelten Konzentrationen im Blut der ADI-reaktiven Patientinnen lagen an Tag 7, sowie tendenziell nach 21 Tagen und einem Monat, unterhalb des mittleren IL-4-Niveaus, während nicht-reaktiven Patientinnen deutlich höhere Mengen IL-4 induzierten. Ebenso reagierten die KM-T-Zellen der nicht-reaktiven Patientinnen während der 40-stündigen Restimulation mit einer sehr hohen IL-4-Produktion, während die IL-4 Konzentration der ADI-reaktiven Patientinnen konstant unter dem mittleren Niveau blieb.

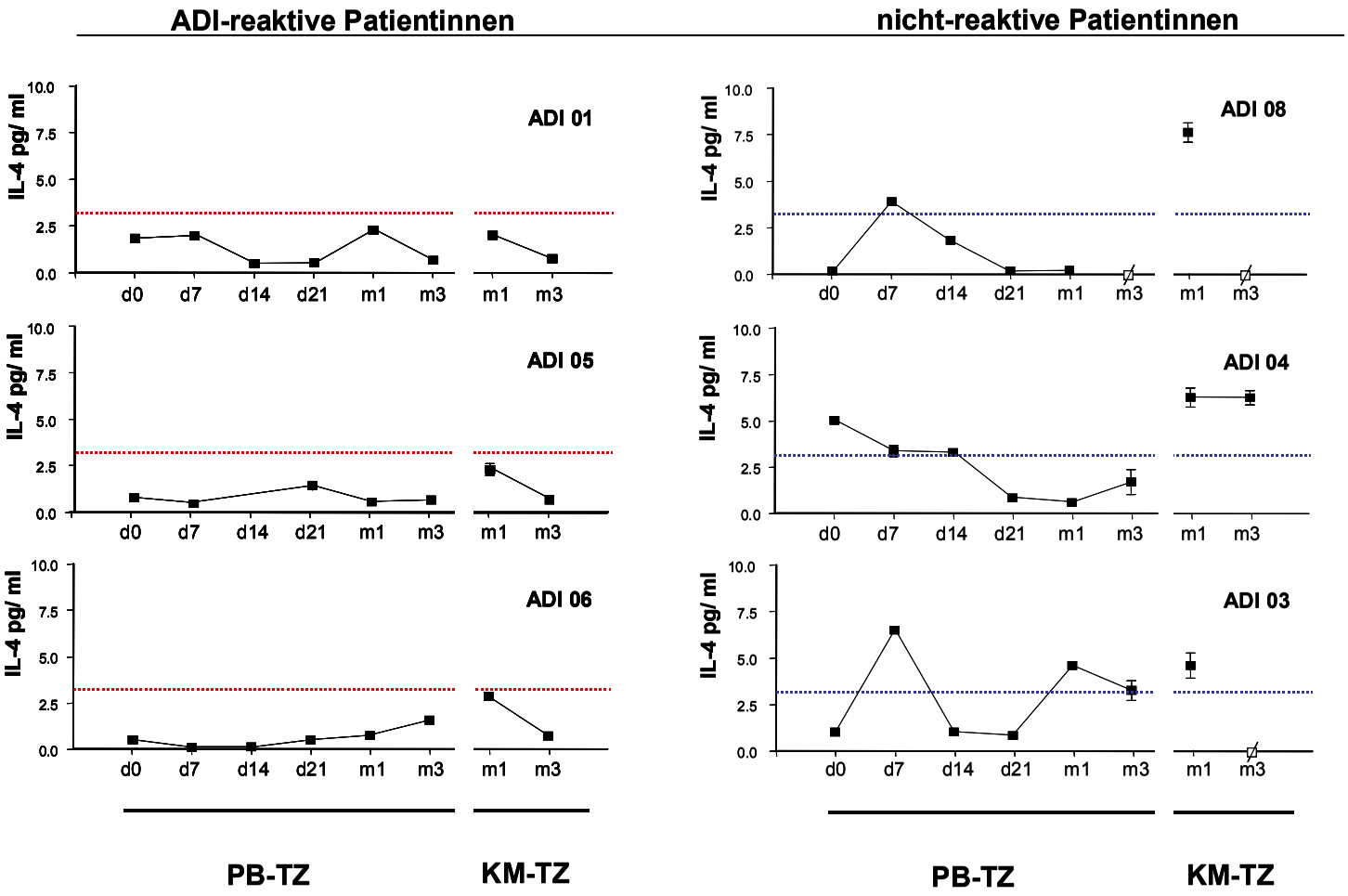


Abb. 4.44: Quantitative Bestimmung von IL-4 in 40-stündigen Restimulationskulturen nach ADI.
Dargestellt sind die IL-4-Mengen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach ADI mit Hilfe des hochsensitiven ELISA-Tests ermittelt wurden. Den ADI-behandelten Patientinnen wurde vor und zu den angegebenen Zeitpunkten nach ADI PB und KM entnommen. Daraus isolierte T-Zellen wurden für 40 h mit MCF-7-beladenen, autologen dendritische Zellen kokultiviert. Anschließend wurde die IL-4-Konzentration in den verschiedenen Kulturüberständen ermittelt. In (A) ist die ermittelte IL-4-Konzentration ADI-reaktive Patientinnen, in (B) diejenige nicht-reaktiver Patientinnen dargestellt. Stand kein Probenmaterial zur Zytokin-Bestimmung zur Verfügung, ist dies durch offene Symbole angezeigt.

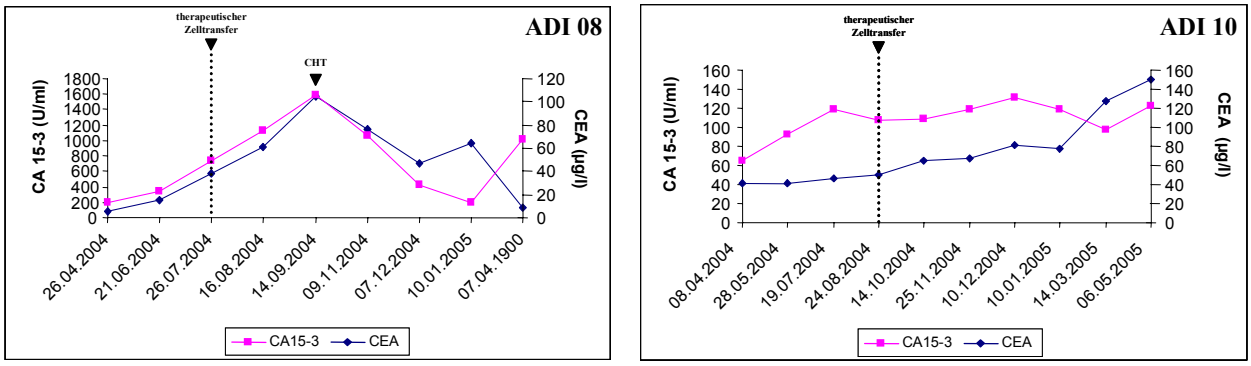
Die anhand der IFN-γ-Produktion ermittelte Tumor-spezifische Reaktivität der PB-T-Zellen konnte also mit einem gegenläufigen Trend in der IL-4-Sekretion innerhalb der Restimulationskulturen mit autologen Tumorantigen-präsentierenden DZ korreliert werden. Im Gegensatz hierzu sezernierten KM-T-Zellen nicht-reaktiver Patientinnen, trotz nachweislicher INF-γ-Reaktivität, hohe Mengen an IL-4 während der 40-stündigen Restimulationskulturen. Für KM-T-Zellen ADI-reaktiver Patientinnen traf diese Beobachtung nicht zu (siehe Abb. 4.44).

4.5.5 Evaluierung des klinischen Ansprechens aufgrund von Tumorverlaufs-parametern

Tumormarker sind Proteine, die von Tumoren sezerniert werden und im Serum mit Hilfe monoklonaler Antikörper quantitativ erfasst werden können. Mammakarzinomzellen produzieren u. a. CEA (Carcinoembryonales Antigen) und CA 15-3 (serumlösliches MUC-1). MUC-1 ist ein transmembranes Glykoprotein, das in unterglykolisierter Form beim Mammakarzinom ein Tumor-assoziiertes Antigen darstellt. Durch die Bestimmung von Tumormarkern kann bei vorhandenen Tumorzellen *in situ* (z. B. in der metastasierten Situation) der Verlauf einer Therapie beurteilt und verfolgt werden. Dies ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn die Plasmaspiegel zu Beginn der Therapie mindestens bei 2.5 µg/l beim CEA und bei 25 U/ml beim CA 15-3 liegen.

Die genannten Tumormarker waren nur bei drei der elf ADI-Studienpatientinnen zum Zeitpunkt der therapeutischen KM-Punktion erhöht, so dass nur bei diesen Patientinnen eine Verlaufsbeobachtung unter Immuntherapie auswertbar war (Abb. 4.45).

ADI nicht-reaktive Patientinnen



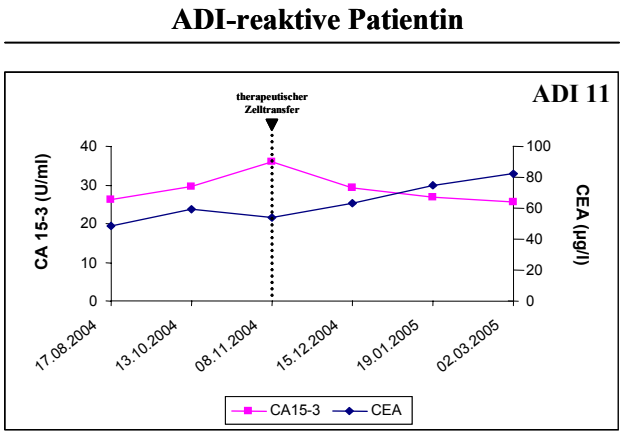


Abb. 4.45: Verlauf der CEA und CA 15-3 Tumormarker unter ADI.
Dargestellt ist die im Serum von drei ADI-Studienpatientinnen durchgeführte quantitative Bestimmung von CEA (rosa Symbole) und CA 15-3 (blaue Symbole). Die Verlaufsbeobachtung der Tumormarker ist drei bzw. vier Monate vor bis maximal neun Monate nach adoptiven Zelltransfer (gestrichelte Linie) dokumentiert. Die Tumormarkerbestimmung erfolgte mittels spezifischem ELISA-Test im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Heidelberg. Die Grenzwerte der Plasmaspiegel betragen hier: CEA > 2.5µg/l ; CA 15-3 > 25 U/ml.

In Abbildung 4.45 wird deutlich, dass bei der Patientin ADI 08 die therapeutische Zellapplikation, gemessen am Tumormarkeranstieg in einer progressiven Phase der Erkrankung erfolgte. Auch nach Zellapplikation stiegen die Serumspiegel von CEA und CA 15-3 dieser ADI nicht-reaktiven Patientin kontinuierlich an, bis die Tumormarker, vermutlich aufgrund der palliativen zytostatischen Intervention, wieder abfielen. In diesem Einzelfall korrelierte ein fehlendes Ansprechen der Zelltherapie auf immunologischer Ebene mit einem Fortschreiten der Erkrankung. (Die Patientin ADI 08 ist mittlerweile verstorben.) Bei ADI 10, einer weiteren nicht-reaktiven Patientin, verhielten sich die CEA- und CA 15-3-Serumspiegel sowohl vor als auch nach Therapie relativ konstant, so dass kein Effekt der Immuntherapie auf Tumormarkerebene beobachtet werden konnte.

Der CA 15-3-Verlauf bei Patientin ADI 11 war vor Therapie zunächst leicht ansteigend, wohingegen direkt nach Applikation der therapeutischen Zellen ein Rückgang dieses Tumormarkers verzeichnet werden konnte. So kann vermutet werden, dass durch die Applikation therapeutischer T-Zellen eine MUC-1-spezifische T-Zellantwort bei dieser Patientin ausgelöst wurde, die schließlich zu einer Verminderung MUC-1-exprimierender Tumorzellen führte. Als Konsequenz sank der CA 15-3-Spiegel innerhalb der folgenden vier Monate ab. Unabhängig hiervon stieg die CEA-Konzentration nach Therapie leicht an. In Anbetracht der Tatsache, dass die Tumormarker dieser ADI-reaktiven Patientin über dem gesamten Beobachtungszeitraum nur geringfügig erhöht waren, bleibt es fraglich, ob der

beobachtete Effekt auf den CA 15-3-Verlauf tatsächlich mit dem Transfer Tumor-reaktiver T-Zellen assoziert werden kann.

An dieser Stelle soll ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass die Evaluierung eines Ansprechen aufgrund der Verlaufsbeobachtung definierter Tumormessparameter kein Hauptziel dieser im Rahmen einer Phase I-Studie durchgeführten Immuntherapie darstellte. Zudem verlieren die genannten Tumormarker aufgrund der fehlenden Tumor- und Organspezifität in der klinischen Diagnostik zunehmend an Stellenwert. Zur Beobachtung des klinischen Ansprechens auf eine solche Therapie wären bildgebende Verfahren (wie z. B: MRT; Ultraschall) zur direkten Beurteilung des Ausmaß der Metastasierung aussagekräftiger.

4.6 Der Effekt von Interleukin 7 und Interleukin 15 auf Tumor-reaktive Gedächtniszellen des Knochenmarks *in vitro*

Da ein ADI-Ansprechen signifikant mit der Anzahl transferierter reaktivierter T-Zellen korreliert war (siehe Abschnitt 4.5.4.1), sollte anhand von Patienten-eigenen KM-T-Zellen untersucht werden, ob die Anzahl Tumor-reaktiver T-Zellen durch die Zugabe Gedächtniszell-spezifischer Interleukine *in vitro* erhöht werden kann.

Bei der Regulierung der Gedächtniszell-Homöostase *in vivo* spielen zwei Zytokine aus der γ_c-Familie, Interleukin 7 (IL-7) und Interleukin 15 (IL-15), eine wichtige Rolle. Während IL-7 das Überleben von $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen erhöht, dient IL-15 der Aufrechterhaltung der $CD8^+$-Zellteilung. Beide Zytokine können eine T-Zellproliferation *in vitro* induzieren (Geginat *et al*., 2001).

Zunächst sollte getestet werden, ob durch die 14-tägige Inkubation von KM-T-Zellen in IL-7/IL-15-substituiertem Medium eine Steigerung der Gesamt-T-Zellzahl *in vitro* erreicht werden kann. Anschließend wurde untersucht, welchen Effekt die Inkubation mit IL-7 und IL-15 auf die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen hat.

Die aus dem Knochenmark von 19 Mammakarzinompatientinnen isolierten mononukleären Zellen wurden zunächst in zwei Populationen gleicher Zellzahl geteilt und für 14 Tage in herkömmlichem T-Zellmedium oder in IL-7/IL-15-substituiertem Medium getrennt kultiviert. Anschließend wurde die T-Zellfraktion mittels negativer Depletion angereichert und die Anzahl vitaler T-Zellen mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt (Abb. 4.46).

In 68 % (13/19) der untersuchten Patientinnen führte die Inkubation mit IL-7 und IL-15 zu einer Steigerung der Gesamt-T-Zellzahl, während bei sechs Patientinnen eine höhere Zellzahl ohne die Zugabe von IL-7 und IL-15 erzielt wurde. Die Ursache für letztgenannte Beobachtung konnte hier nicht geklärt werden. Insgesamt kann aber festgehalten werden, dass die 14-tägige Inkubation in IL-7/IL-15-substituiertem Medium zu einer signifikanten Erhöhung der T-Zellpopulation *in vitro* führte.

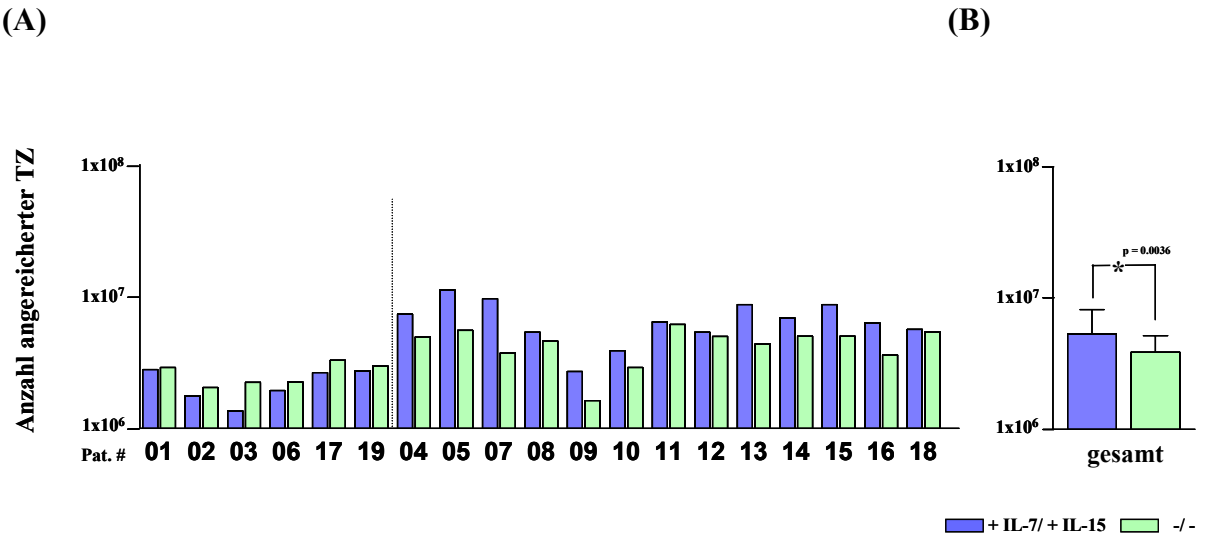


Abb. 4.46: Quantitative Analyse der KM-T-Zellpopulation unter Kultivierung mit IL-7 und IL-15.
Aus dem KM von 19 Mammakarzinompatientinnen wurden MNZ mittels Ficolldichtezentrifugation separiert, gezählt und zu gleichen Teilen in IL-7/IL-15-substituiertem TZ-Medium (blaue Balken) bzw. in nicht-substituiertem TZ-Medium (grüne Balken) getrennt kultiviert. (A) Dargestellt sind die mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung bestimmten vitalen T-Zellpopulationen der unterschiedlichen Kulturbedingungen nach 14 Tagen für jede einzelne Patientin. (B) gibt den Mittelwert der T-Zellpopulationen aller untersuchten Patientinnen an. * indiziert eine signifikante Erhöhung der T-Zellzahl nach 14-tägiger Kultivierung in IL-7/IL-15-substituiertem TZ-Medium ($p < 0.05$).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Inkubation der T-Zellen mit IL-7 und IL-15 einen Effekt auf die Frequenz Tumor-reaktiver T-Gedächtniszellen *in vitro* hat. Hierzu wurde die Tumor-spezifische Reaktivität der T-Zellen, die mit IL-7 und IL-15 kultiviert wurden, mit derjenigen autologer, herkömmlich kultivierter T-Zellen verglichen. Der Nachweis der Tumor-spezifischen Reaktivität wurde anhand der IFN-γ-Produktion nach 40-stündiger Stimulation mit autologen Dendritischen Zellen im ELISpot-Test bestimmt. Insgesamt konnten in 6 der 19 untersuchten Patientinnen Tumor-reaktive Gedächtniszellen nach IL-7/IL-15-Inkubation *in vitro* nachgewiesen werden. Bei fünf von diesen sechs Patientinnen war eine Tumor-spezifische Reaktivität auch ohne IL-7/IL-15-Zugabe zu den T-Zellkulturen detektierbar. Nur bei einer Patientin konnten eine solche Reaktivität, wenngleich mit relativ niedriger Frequenz, ausschließlich innerhalb der IL-7/IL-15-behandelten T-Zellfraktion beobachtet werden (Abb. 4.47).

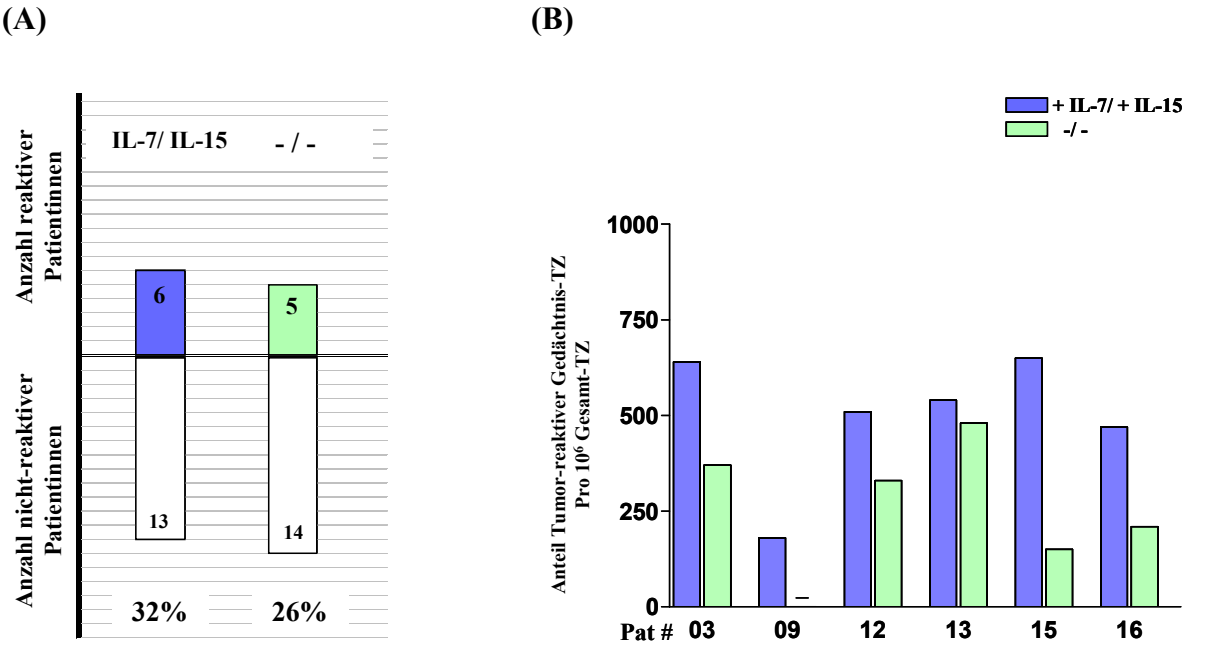


Abb. 4.47: Die Tumor-spezifische Reaktivität unter Kultivierung mit IL-7 und IL-15.
In (A) ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark palliativ behandelter Patientinnen dargestellt. Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot Test. MNZ des Knochenmarks wurden mittels Ficolldichtezentrifugation separiert, gezählt und zu gleichen Teilen in IL-7/IL-15-substituiertem TZ-Medium (blaue Balken) bzw. in nicht-substituiertem TZ-Medium (grüne Balken) getrennt kultiviert. Angereicherte KM-T-Zellen wurden für 40 h mit DZ stimuliert, die zuvor mit Lysaten der MCF-7 Brusttumorzelllinie oder der nicht-verwandten U937-Tumorzelllinie beladen worden waren. Die Patientinnen wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl IFN-γ-produzierender Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Kontrolle ($p \leq 0.05$). In der Abbildung ist die Anzahl reaktiver Patientinnen (farbige Balken) der Anzahl nicht-reaktiver Patientinnen (weiße Balken) gegenübergestellt. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen. (B) zeigt die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen, die 14 Tage entweder in IL-7/IL-15-substituiertem TZ-Medium oder in herkömmlichem TZ-Medium kultiviert wurden. Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle.

Interessanterweise lagen die ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen nach Inkubation mit IL-7 und IL-15 stets höher als in der nicht behandelten Vergleichsgruppe ($p = 0.024$).

Durch Zugabe von IL-7 und IL-15 kann demnach eine selektive Frequenzerhöhung Antigen-spezifischer Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen *in vitro* erzielt werden.

4.7 Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit Malignem Melanom

Zahlreiche Untersuchungen zur Tumor-gerichteten Immunität beim Malignen Melanom weisen darauf hin, dass Melanom-spezifische T-Zellen in der Lage sind, ein Fortschreiten des Tumors zu kontrollieren und tatsächlich lassen sich Tumor-reaktive Effektorzellen in hohen Frequenzen im peripheren Blut von Melanompatienten nachweisen (Letsch *et al*., 2000; Valmori *et al*., 2002). Kürzlich wurde zum ersten Mal über Tumor-reaktive $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark von fünf Melanompatienten im Spätstadium berichtet. Die mittels Peptid-MHC-Tetramerfärbung ermittelten Frequenzen im Knochenmark waren z. T. ähnlich oder lagen höher als die Frequenzen Melanom-reaktiver Zellen im peripheren Blut (Letsch *et al*., 2003).

Beim Malignen Melanom kann es, wie bei verschiedenen soliden Tumoren auch, zu einer Einwanderung disseminierter Tumorzellen in das Knochenmark kommen. Derzeit ist noch nicht geklärt, wo die Generierung Tumor-reaktiver T-Zellen tatsächlich stattfindet und ob die Anwesenheit von Tumorzellen *in situ* zur Induktion bzw. Erhaltung Tumor-reaktiver T-Zellen beiträgt. Da Mikrometastasierungen ins Knochenmark bisher ausschließlich im fortgeschrittenen Stadium beim Malignen Melanom beobachtet wurden (Meyers *et al*., 1998), sollte hier das Vorkommen Melanom-reaktiver T-Zellen im Knochenmark der Patienten in verschiedenen Stadien der Krebserkrankung (I-IV) untersucht werden und mit der Tumor-spezifischen Reaktivität im Blut verglichen werden.

Die Melanom-spezifische Reaktivität wurde anhand der Anzahl IFN-γ-produzierender T-Zellen nach 40-stündiger Stimulation mit autologen Dendritischen Zellen im ELISpot-Test ermittelt. Hierzu wurden Dendritische Zellen mit dem Lysat der Melanomzelllinie SK-Mel 23, als Quelle Melanom-spezifischer TAAs, für 4 h vorinkubiert. Das Kontrollysat wurde aus der nicht-verwandten Promonozyten-Zelllinie U937 hergestellt. Insgesamt wurde die Frequenz Melanom-reaktiver T-Zellen im Knochenmark und Blut von 29 Patienten untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.48 dargestellt. Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen fanden sich in 21 % der Knochenmarkproben (6/29) und in 21 % der Blutproben (6/ 29). Insgesamt konnten bei 34 % der Patienten (10/29) Tumor-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden. Die graphische Darstellung der daraus ermittelten Frequenzen lässt eine deutliche Polarisierung der T-Zell-vermittelten Tumor-Reaktivität zugunsten des einen oder anderen TZ-Kompartiments erkennen. Lediglich zwei Patienten zeigten eine spezifische Reaktivität sowohl im Blut als auch im Knochenmark. Somit scheint das Vorhandensein

Tumor-reaktiver T-Zellen im peripheren Blut unabhängig von der Existenz solcher Zellen im Knochenmark zu sein.

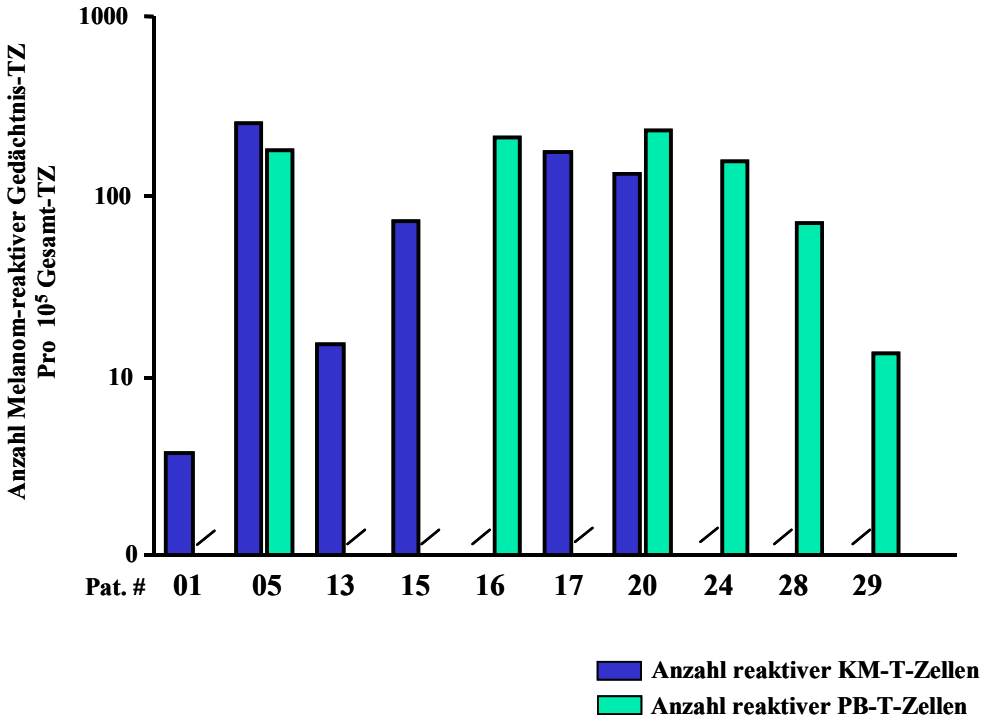


Abb. 4.48: Frequenzen Melanom-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark und Blut von Melanom-Patienten. Dargestellt ist die Anzahl INF-γ-sezernierender Gedächtnis-T-Zellen im KM (blaue Balken) und im PB (grüne Balken) pro 10^5 Gesamt-TZ nach Kurzzeitstimulation im ELISpot-Test. KM- und PB-T-Zellen wurden für 40 h mit autologen Dendritischen Zellen stimuliert, die zuvor mit Lysaten der Melanom-Tumorzelllinie SK-Mel 23 (Testantigen) oder der nicht-verwandten U937-Tumorzelllinie beladen worden waren. Immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die Anzahl IFN-γ-produzierenden Zellen nach Inkubation mit dem Melanom-spezifischen Testantigen signifikant höher lag, als die der Kontrolle ($p \leq 0.05$). Die Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen bezogen auf die eingesetzte Gesamt-TZ-Zahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Kontrolle. Konnte keine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber dem SK-Mel 23-Lysat festgestellt werden, ist die Frequenz mit Null (/) angegeben.

Im Folgenden wurde die individuelle Melanom-spezifische Reaktivität im Knochenmark und im Blut mit dem Krankheitsstadium der untersuchten Patienten korreliert. Die Stadieneinteilung erfolgte nach den aktuellen Vorgaben des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC; 2002). Während es sich bei den Stadien I-III per Definition um eine regional begrenzte Tumorerkrankung handelt, ist das Stadium IV durch eine Metastasierung in periphere Gewebe bzw. in Lymphknoten in weiter Entfernung zum Primärtumor charakterisiert (siehe Abschnitt 1.2). Die Tabelle 7.2.8 gibt eine Übersicht über die klinischen Charakteristika der einzelnen Patienten. Zur Korrelationsanalyse mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurden die Patienten der Stadien I-III zusammengefasst und ihre Tumor-spezifische Reaktivität mit Patienten im fortgeschrittenem Stadium (IV) verglichen. Die Abbildung 4.49

zeigt die Verteilung Melanom-reaktiver und nicht-reaktiver Patienten für Blut und Knochenmark in Abhängigkeit ihrer Stadieneinteilung.

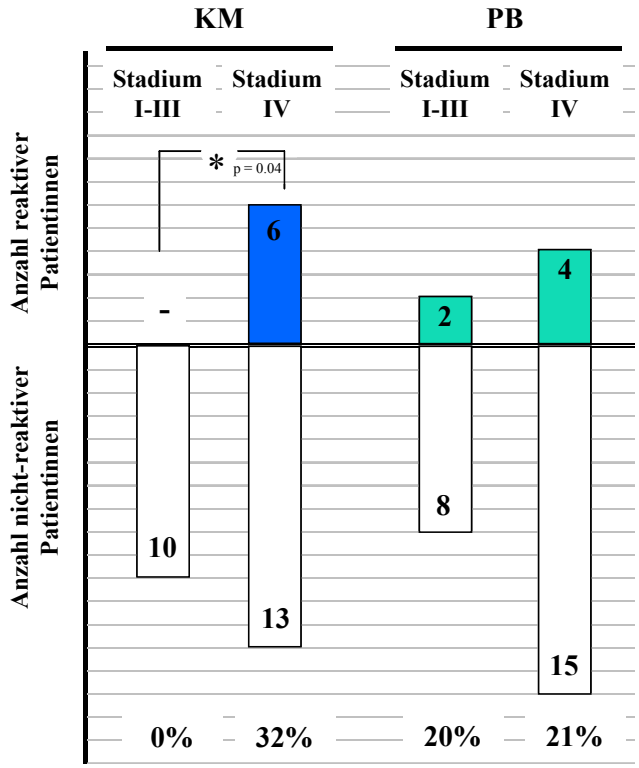


Abb. 4.49: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität in Abhängigkeit des Tumorstadiums.
Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark (blaue Balken) und Blut (grüne Balken) von Melanom-Patienten verschiedener Tumorstadien. Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot-Test wie bereits in Abb. 4.48 beschrieben. In der Abbildung sind reaktive Patienten durch farbige, nicht-reaktive Patienten sind durch weiße Balken repräsentiert. Alle reaktiven Patienten der Stadien I, II und III wurden zusammengefasst und der Anzahl reaktiver Patienten im Stadium IV gegenübergestellt. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen frühen Stadien und dem Spätstadium bezüglich des Vorkommens Melanom-reaktiver T-Zellen im Knochenmark ($p < 0.05$).

Interessanterweise konnten Tumor-reaktive T-Zellen ausschließlich im Knochenmark von Stadium IV-Patienten gefunden werden. Der Anteil reaktiver Patienten betrug hier fast 50 % (6/13). Dagegen waren T-Zellen aus dem Knochenmark von zehn Patienten mit früherem Tumorstadien nicht in der Lage, eine derartige spezifische Aktivität zu generieren. Diese für das Knochenmark ermittelte Korrelation zwischen Erkrankungsstadium und Tumor-spezifischer T-Zellreaktivität ($p = 0.04$) konnte bei der Analyse der Blut T-Zellen nicht beobachtet werden. Hier waren reaktive Patienten sowohl in frühen als auch in späten Stadien zu finden. Falls das Reservoir Tumor-reaktiver T-Zellen im KM ausschließlich über

eingewanderten PB-T-Zellen gebildet wird, sollten diese Zellen, ähnlich wie im Blut auch bei Frühstadien nachweisbar sein. Die vorliegenden Daten sprechen daher für eine Induktion primärer, Tumor-spezifischer T-Zellantworten durch KM-residente Melanomzellen.

Die Bedeutung der Anwesenheit von Tumorzellen für die Erhaltung Tumor-reaktiver T-Zellen im KM belegt die Korrelation der ermittelten Tumor-spezifischen T-Zellreaktivität und der zum Zeitpunkt der Untersuchung vorliegenden Tumormanifestation. Während eine nachweislich vorhandene oder fehlende Tumormanifestation keine Auswirkung auf das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Blut der Patienten hatte, zeigte sich im Knochenmark eine signifikante Abhängigkeit der T-Zellreaktivität von der aktuellen Tumormanifestation. Dieser Effekt wird in Abbildung 4.50 verdeutlicht. Eine spezifische Tumor-Reaktivität konnte fast ausschließlich in denjenigen Patienten beobachtet werden, die zum Zeitpunkt der Evaluierung tatsächlich eine klinisch gesicherte Tumormanifestation aufwiesen (5/6).

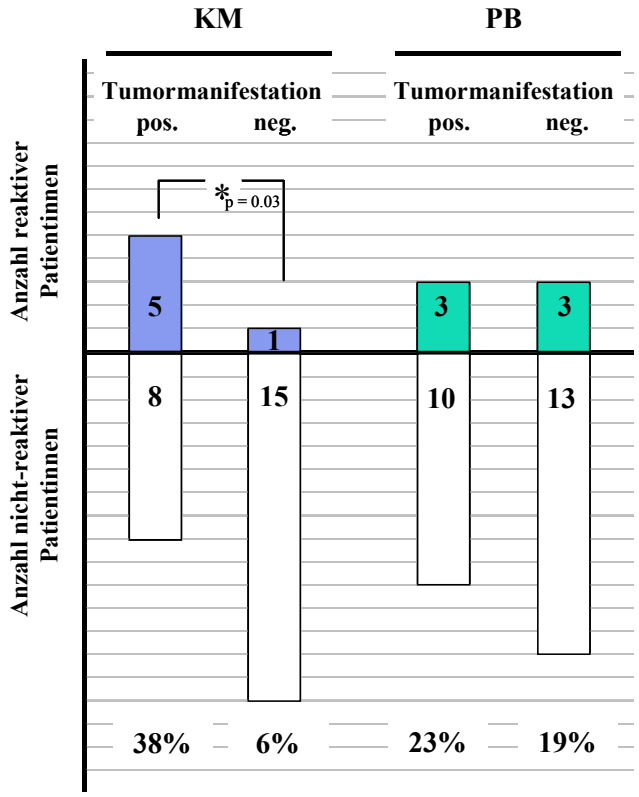


Abb. 4.50: Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität in Abhängigkeit der Tumormanifestation. Dargestellt ist das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark (blaue Balken) und Blut (grüne Balken) von Melanompatienten mit nachweislicher (pos.) oder ohne (neg.) Tumormanifestation zum Zeitpunkt der Evaluierung. Der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen erfolgte mittels IFN-γ ELISpot-Test wie bereits in Abb. 4.48 beschrieben. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht-reaktiver Patientinnen an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtreaktivität innerhalb einer Gruppe beziehen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Tumormanifestation bezüglich des Vorkommens Melanom-reaktiver T-Zellen im Knochenmark ($p < 0.05$).

Aufgrund der geringen verfügbaren Knochenmarkmengen der Patienten konnte keine eindeutige Aussage gemacht werden, in wie weit Tumorantigen in Form intakter Tumorzellen *in situ* vorliegen muss, oder ob hierzu eine Einwanderung Tumorantigen-beladener APZ in das Knochenmark ausreichend ist.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Bildung Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen einen Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung haben könnte. Die mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Tests auf ihre Tumor-spezifische Reaktivität untersuchten Patienten im Stadium IV hatten eine mediane Krankheitsdauer von 13 Monaten. (siehe Abb. 4.51), was den Angaben über die Krankheitsdauer in diesem fortgeschrittenem Krankheitsstadium aus der Literatur entsprach. Interessanterweise wiesen Patienten, in deren KM Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen nachweisbar waren, eine mit 32 Monaten signifikant höhere Krankheitsdauer auf, als diejenigen, bei denen keine derartige Reaktivität im Knochenmark zu finden war. Ein solcher Zusammenhang konnte für die T-Zellen des peripheren Bluts nicht festgestellt werden. Die mediane Krankheitsdauer bei nachweislich vorhandener Tumor-spezifischer T-Zellreaktivität betrug hier lediglich vier Monate im Vergleich zu 14 Monaten bei Patienten, denen Tumor-reaktive T-Zellen fehlten (Abb. 4.51).

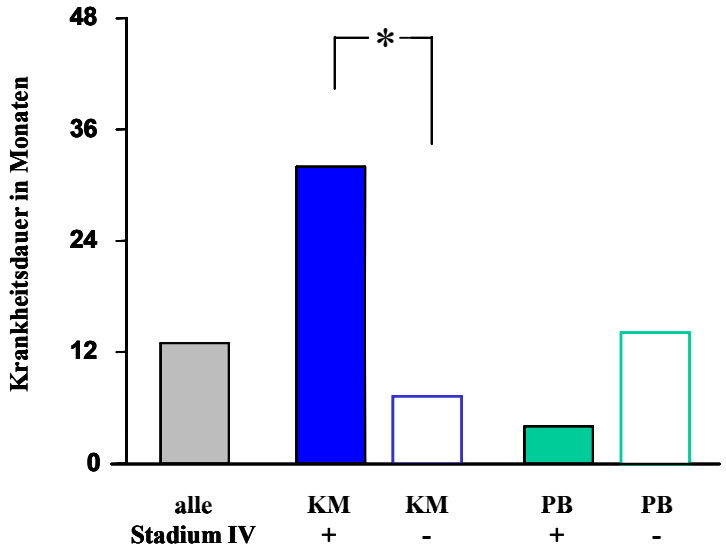


Abb. 4.51: Das Vorkommen Melanom-reaktiver Gedächtniszellen bei Stadium IV Melanompatienten in Abhängigkeit der Krankheitsdauer. Angegeben ist die mediane Krankheitsdauer (Zeitspanne zwischen Krankheitsdiagnose und Knochenmarkaspiration zur Bestimmung der immunologischen Reaktivität) der Melanompatienten im Stadium IV mit (+) bzw. ohne (-) nachweisbare Melanom-reaktive T-Zellen im Knochenmark (blaue Balken) oder im Blut (grüne Balken) sowie die durchschnittliche Krankheitsdauer aller untersuchten Patienten im Stadium IV. Der Nachweis Melanom-reaktiver Zellen erfolgte mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Tests wie bereits in Abb. 4.48 beschrieben. * gibt eine signifikant längere Krankheitsdauer der Patienten mit nachweisbaren Tumor-reaktiven KM-T-Zellen an ($p \leq 0.05$).

An dieser Stelle soll abschließend angemerkt werden, dass eine Anreicherung Tumor-reaktiver Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark der Melanompatienten möglicherweise nur unter der Vorraussetzung einer vorangegangenen Therapie stattgefunden hat. Es ist nachvollziehbar, dass die Effektivität einer solchen Vortherapie wiederum maßgeblich die Überlebensdauer des Patienten beeinflussen kann. In diesem Falle wäre das Vorhandensein Tumor-reaktiver T-Zellen Ausdruck, aber nicht Ursache der beobachteten verlängerten Überlebenszeiten. Eine Abhängigkeit der Existenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen vom jeweils vorrangegangenen Therapieregime konnte allerdings weder für die T-Zellreaktivität des Knochenmarks noch des peripheren Blutes festgestellt werden (vergleiche Tabelle 7.2.8).

5. Diskussion

5.1 Systemische Therapien des Mammakarzinoms beeinflussen die Vitalität und Tumor-spezifische Reaktivität von Gedächtnis-T-Zellen

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Tumor-spezifische T-Zellen bei vielen malignen Erkrankungen spontan generiert werden (Yoo *et al*., 1990; Nagorsen *et al*., 2000; Letsch *et al*., 2000; Calhoun *et al*., 2000; Schmitz-Winnenthal *et al*., in Vorbereitung) und sich beim Mammakarzinom als Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark anreichern (Feuerer *et al*., 2001). Diese ließen sich in ca. 40 % der untersuchten Fälle *in vitro* mit Hilfe von TAA-beladenen Dendritischen Zellen zu funktionalen Effektorzellen reaktivieren. Tumor-spezifische Gedächtniszellen des Knochenmarks waren zudem in der Lage, eine Regression autologer Tumore in xenotransplantierten Mäusen zu vermitteln, während autologe T-Zellen aus dem peripheren Blut keine vergleichbare Tumor-spezifische Reaktivität generieren konnten (Feuerer *et al*., 2001). Diese Ergebnisse bildeten die Rationale zur therapeutischen Nutzung reaktivierter Tumor-spezifischer T-Gedächtniszellen des Knochenmarks.

Da für die Erprobung neuartiger Therapieansätze in erster Linie Patientinnen im fortgeschrittenem Stadium der Tumorerkrankung in Frage kommen, die in der Regel bereits eine Vielzahl verschiedener zytostatischer und endokriner Behandlungen erhalten haben, wurde der Einfluss verschiedener Therapieformen zur Behandlung des Mammakarzinoms (neoadjuvante Chemotherapie, adjuvante Chemo- oder Hormontherapie, palliative Therapie) auf therapeutisch relevante Immunzellen untersucht.

5.1.1 Die Zytostatikabehandlung *in vitro* induziert eine selektive Reduktion der vitalen Gedächtniszellpopulation

Zunächst wurde die Wirkung ausgesuchter zytostatischer Wirkstoffe auf isolierte naive und Gedächtnis-T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Donoren *in vitro* getestet. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde sich auf das CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil)-Therapieregime konzentriert, ein standardisiertes Chemotherapie-schema, das vielfach in der Universitätsfrauenklinik Heidelberg zur adjuvanten als auch palliativen Behandlung von Mammakarzinompatientinnen einsetzt wird (siehe 3.5 und 7.1.2).

Mit Hilfe des Simulationsprogramms *PharmaCalc v 1.0* wurden die Abbaukurven der drei Zytostatika im Plasma berechnet und daraus ein für die *in vitro* Behandlung adaptiertes Protokoll entworfen. Anhand dieses Modells wurde die physiologische Wirkung der systemisch applizierten Kombinationstherapie auf humane T-Zellen *in vitro* simuliert. Interessanterweise zeigten alle separat kultivierten T-Zellsubpopulationen, unabhängig von einer zuvor erfolgten Zytostatikainkubation, massive Zellverluste zum ersten Evaluierungszeitpunkt nach Beginn des Experiments (51 h). Diese Beobachtung war nicht auf einen spezifischen Effekt der zytostatischen Substanzen zurückzuführen. Die großen Zellverluste ließen eher auf unzureichende Kulturbedingungen für isolierte naive und Gedächtnis-T-Zellen schließen. So ist zum Beispiel für naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gezeigt worden, dass diese eine kontinuierliche Interaktion mit Selbst-MHC-Molekülen benötigen, um zu überleben und zu proliferieren, während das Überleben von Gedächtnis-T-Zellen nicht davon abhängig zu sein scheint (Brocker *et al*., 1997; Tanchot *et al*., 1997; Geginat *et al*., 2001). Zur Aufrechterhaltung von Gedächtnis-T-Zellen *in vivo* spielen zwei Zytokine aus der γ_c-Familie, IL-7 und IL-15, eine wichtige Rolle. IL-7 erhöht das Überleben von $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen (Goldrath *et al*., 2002; Kieper *et al*., 2002). IL-15 dient hingegen der Aufrechterhaltung der $CD8^+$ Zellteilung (Goldrath *et al*., 2002; Schluns *et al*., 2002; Becker *et al*., 2002). Beide Zytokine können eine T-Zellproliferation *in vitro* induzieren (Geginat *et al*., 2001).

Generell fördert das von aktivierten Zellen autokrin sezernierte IL-2 eine T-Zellproliferation. Eine Inkubation der isolierten T-Zellen für weitere sieben Tage in IL-2-substituiertem Medium führte allerdings zu einer gesteigerten Dezimierung der vitalen Lymphozytenpopulationen. Insbesondere wurde hierbei die Zytostatika-behandelte Gedächtnis-T-Zellfraktion reduziert. Auch wenn der genaue Mechanismus hier nicht untersucht wurde, lässt dies auf eine erhöhte Sensitivität der Gedächtniszellen auf eine Zytostatika-vermittelte Apoptose schließen. Zudem weist die Beobachtung auf einen negativen Langzeiteffekt der *in vitro* simulierten CMF-Chemotherapie hin. Erfolgte die Zytostatikainkubation direkt unter Proliferations-fördernden Kulturbedingungen, erfuhren selektiv die behandelte T-Zellfraktionen massive Zellzahlverluste. Für bestimmte zytostatische Wirkstoffe wurde bereits *in vitro* belegt, dass Proliferations-fördernde Kulturbedingungen (IL-2-Zugabe) die Sensitivität gegenüber Apoptose in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der T-Zellen erhöhen (Mullins *et al*., 1997). Gemäß der selektiven Wirkung von Zytostatika auf proliferierende Zellen konnte somit auf einen direkten Effekt der *in vitro* simulierten CMF-Chemotherapie auf teilungsaktive T-Zellen geschlossen werden.

Auch unter Proliferations-stimulierenden Bedingungen wurde selektiv die Anzahl vitaler Gedächtnis-T-Zellen nach Zytostatikainkubation reduziert. Gedächtnis-T-Zellen zeigen *in vivo* unter konstanten, nicht-inflammatorischen Bedingungen nur ein langsame homöostatische Teilungsrate (Tough und Sprent, 1994; Lempicki *et al*., 2000). Indes zeichnen sich aktivierte Gedächtnis-T-Zellen durch eine erhöhte Neigung zu Apoptose aus (Akbar *et al*., 1993; Cho *et al*., 1999). Des Weiteren induziert eine sogenannte *Bystander*-Aktivierung das Sterben von Gedächtnis-T-Zellen (McNally *et al*., 2001). Solch eine unspezifische Aktivierung kann durch hohe Dosen des Zytokins IL-2 *in vitro* induziert werden (Ehl *et al*., 1997). Damit könnte erklärt werden, warum während des CMF *In Vitro*-Protokolls und unter Zugabe von 300 U IL-2 insbesondere die behandelte Gedächtniszellpopulation reduziert wurde. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Analyse der Apoptoseinduktion unter Zytostatikainkubation. Acht Tage nach Beendigung des CMF *In Vitro*-Protokolls unter Proliferations-fördernden Bedingungen zeigte die behandelte Gedächtnis-T-Zellpopulation bei einem untersuchten Donor einen mehr als doppelt so hohen Anteil Annexin V-anfärbbarer, d. h. früh-apoptotischer Zellen innerhalb der $CD4^+$ Subpopulation als nicht behandelte $CD4^+$ Gedächtniszellen. Durch weitere Untersuchungen zur Apoptoseinduktion von Gedächtniszellen nach Zytostatikainkubation müsste dieses präliminäre Ergebnis reproduziert werden, um zu evaluieren, ob eine Zytostatikabehandlung wirklich selektiv Apoptose in Gedächtnis-T-Zellen induziert und welche apoptotischen Signalwege hierbei involviert werden.

Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der separierten T-Zellpopulationen *in vitro* konnte ein Langzeiteffekt der CMF-Kombinationstherapie mit diesem experimentellen System nicht untersucht werden. Zudem beschränkten sich die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen, wie auch die überwiegenden Mehrheit der in der Literatur bekannten Studien, auf die Evaluierung des Effekts einer adjuvanten Therapie auf T-Zellen des peripheren Blutes. Es ist allerdings anzunehmen, dass sich Immunzellen aus lymphoiden Organen bezüglich der Auswirkungen eines systemisch applizierten Therapeutikums, des Aktivierungszustandes und der Relevanz bei malignen Erkrankungen von zirkulierenden T-Zellen in der Peripherie grundlegend unterscheiden (Solomayer *et al*., 2003). Weitere Untersuchungen an Brustkrebspatientinnen belegen zudem, dass immunologische Parameter im Knochenmark stabiler sind als im peripheren Blut (Feuerer *et al*., 2001). Deshalb wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf den potentiellen Einfluss systemischer Therapien auf das Gedächtnis-T-Zellreservoir des Knochenmarks gelegt.

5.1.2 Eine Tumor-spezifische Reaktivität der KM-T-Zellen ist mit einer relativen Zunahme des $CD4^+$ Gedächtniszellanteils im Knochenmark assoziiert

Bislang wurde nur in einer Studie der Einfluss zytostatischer Therapien auf die zellulären Komponenten des Knochenmarks beschrieben. Hierzu wurden Immunzellen, die aus dem Knochenmark adjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen stammten, einer phänotypischen Charakterisierung unterworfen. Allgemein wurde von einer Verringerung der T-Zellzahl 18 Monate nach Beendigung der Chemotherapie berichtet, die sich insbesondere in einer Reduktion naiver $CD4^+$ T-Zellen manifestierte, so dass ein relativer Anstieg der $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellpopulation verzeichnet wurde (Solomayer *et al*., 2003). Der Effekt wurde auf eine schnellere Regeneration des Gedächtniszellreservoirs verglichen mit der naiven T-Zellpopulation zurückgeführt, der auch in anderen Studien nach Chemotherapie beobachtete wurde (Solomayer *et al*., 2003; Hakim *et al*., 1997; Mackall *et al*., 1994).

Dieser Befund konnte anhand der Knochenmarkproben der in dieser Arbeit evaluierten adjuvant zytostatisch behandelten Patientinnen nicht bestätigt werden (siehe 4.3.1). Der prozentuale Anteil der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellen war ähnlich hoch im Vergleich zur primär operierten, nicht zytostatisch behandelten Gruppe. Während das Patientenkollektiv in der Studie von Solomayer *et al*. (2003) zwischen 20-28 Monate nach Beendigung des letzten Therapiezyklus analysiert wurde, betrug der Therapie-freie Zeitraum der in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen durchschnittlich 15 Monate (siehe 7.2.3). Somit war der Evaluierungszeitpunkt gegebenenfalls zu früh gewählt, um einen Unterschied der Regenerationskapazität zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen nach Zytostatikabehandlung zu detektieren. Auf intraindividueller Ebene konnte allerdings keine Abhängigkeit zwischen $CD4^+$ Gedächtnisanteil und Therapie-freiem Intervall beobachtet werden. Auch die Art des zur adjuvanten Behandlung gewählten Zytostatikaregimes ließ keinen Rückschluss auf die Verteilung der naiven und Gedächtniszellpopulation nach Therapie zu (siehe 8.2.3). Insgesamt war sowohl das $CD4^+$ als auch das $CD8^+$ Gedächtniszellreservoir signifikant gegenüber gesunden Donoren erhöht. Diese relative Zunahme der KM-Gedächtniszellen konnte bei primär operierten Mammakarzinom-patientinnen mit einem fortgeschrittenem Tumorstatus korreliert werden. Demnach kommt es unter Tumorprogression zu einer gesteigerten Induktion von Gedächtnis-T-Zellen, welche schließlich im Knochenmark der Patientinnen akkumulieren (Feuerer *et al*., 2001). Eine adjuvante Chemotherapie scheint aufgrund der hier evaluierten Daten, diesen Prozess nicht zu beeinflussen bzw. keinen negativen Effekt auf ein bereits etabliertes Gedächtniszellreservoir zu besitzen.

Bezogen auf die Auswirkungen der adjuvanten Hormontherapie auf die KM-Gedächtniszellpopulationen konnte der beschriebene Rückgang der $CD4^+$ und $CD8^+$ Population (Solomayer *et al*., 2003) im Vergleich zu primären Patientinnen bestätigt werden (siehe 4.3.2). Die $CD8^+$ Gedächtniszellpopulation war bei den hier untersuchten Patientinnen signifikant gegenüber der primären Vergleichsgruppe reduziert und demzufolge nicht erhöht verglichen mit dem Anteil $CD8^+$ Gedächtniszellen, der im KM gesunder Donoren vorzufinden ist. Es ist aufgrund der hier vorliegenden Daten nicht abschließend zu klären, ob die Annäherung des Gedächtniszellniveaus an den Status gesunder Donoren auf einen direkten Einfluss der Therapie auf das Überleben der Gedächtniszellpopulation hinweist oder alternativ durch eine Therapie-bedingte Reduzierung von Tumorantigen erklärt werden kann.
Während mit der phänotypischen Charakterisierung der KM-Gedächtnis-T-Zellen die quantitative Verteilung verschiedener Subpopulationen analysiert wurde, konnte anhand der funktionellen Analyse eine Korrelation zwischen der Gedächtnis-T-Zellzahl und der Tumor-spezifischen Reaktivität evaluiert werden. Die funktionelle Untersuchung erfolgte mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Tests. Diejenigen adjuvant behandelten Patientinnen, die eine Tumor-spezifische Aktivität nach Restimulation im ELISpot-Test generierten, zeigten gleichsam eine signifikante Erhöhung der $CD4^+$ Gedächtnispopulation im Vergleich zu gesunden Donoren (siehe 4.3.3). Tendenziell traf diese Beobachtung auch für die $CD8^+$ Gedächtniszellen in vergleichbarer Weise zu. Man könnte somit annehmen, dass der bereits in der früheren Studie beschriebene Anstieg innerhalb der KM-Gedächtniszellfraktion auf einer aktiven Auseinandersetzung des zellulären Immunsystems mit Tumorantigen beruht. Dies würde dann zu einem Anstieg spezifischer, Tumor-reaktiver Gedächtniszellen im Knochenmark führen. Die Tatsache, dass $CD4^+$ Gedächtniszellen bevorzugt bei Patientinnen akkumulieren, bei denen disseminierte Tumorzellen im KM nachweisbar sind (Solomayer *et al*., 2003), unterstützt diese Vermutung.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Beurteilung der funktionellen Kapazität Tumor-spezifischer T-Zellen in dieser Arbeit im wesentlichen Teil auf Kurzzeit-ELISpot-Analysen beruhte. Hierbei wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass vorwiegend sekundäre Gedächtniszell-vermittelte Immunantworten evaluiert wurden und Antworten naiver Zellen nicht erfasst wurden. Dies sichert die Aussage über spontan generierte, Tumor-spezifische Immunantworten der untersuchten Patientengruppen ab. Aufgrund der nicht eindeutigen Definition humaner Effektorzellen fällt eine Abgrenzung zwischen Effektor- und Gedächtniszellantworten schwieriger. Derzeit werden hierzu funktionelle, phänotypische

sowie chronologische Definitionen in der Literatur verwendet. Für die Aussage, dass die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Tumor-spezifischen Immunreaktionen im wesentlichen auf sekundäre Gedächtnis-T-Zellantworten basieren, sprechen Untersuchungen mittels separierten T-Zellfraktionen. Nach einer 40-stündigen Restimulation mit Tumorantigenen antworteten ausschließlich Gedächtniszellen, nicht aber Effektor- oder naive Zellen, mit einer signifikant erhöhten IFN-γ-Produktion (unveröffentlichte Daten, C. Choi). Generell zeichnen sich Effektorzellen durch eine konstitutive Zytokinsekretion aus, so dass diese eine vergleichbare Reaktivität auch in den unspezifischen Kontrollansätzen zeigen und somit bei der Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität im ELISpot-Test nicht erfasst werden.

5.1.3 Die Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen nach neoadjuvanter sowie nach adjuvanter Chemotherapie ist deutlich reduziert

Anhand der KM-T-Zellproben von insgesamt 129 Mammakarzinompatientinnen mit verschiedensten Erkrankungsverläufen wurde der Einfluss standardisierter Therapien des Mammakarzinoms auf die Frequenz und die Funktion Tumor-reaktiver Gedächtniszellen evaluiert.

Insgesamt waren alle untersuchten KM-T-Zellpopulationen unabhängig von der Art der therapeutischen Vorbehandlung der Patientinnen in der Lage, im ELISpot-Test eine IFN-γ - spezifische Gedächtnisantwort nach 40-stündiger Inkubation mit dem Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) zu generieren. Es konnte kein Unterschied der Reaktivität zwischen zytostatisch oder endokrin vorbehandelten und primär operierten Patientinnen gegenüber SEB festgestellt werden. Somit wurde grundsätzlich von einer Funktionalität der KM-T-Zellen nach Vortherapie ausgegangen.

Innerhalb der neoadjuvanten Gruppe konnte bei ungefähr 30 % der untersuchten Patientinnen eine Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellreaktivität im Knochenmark nachgewiesen werden. Nach adjuvanter Behandlung wiesen 36 % (nach Chemotherapie) bzw. 46 % (nach/unter Hormontherapie) der Mammakarzinompatientinnen Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen auf. Dieser Befund ist durchaus mit der Häufigkeit, mit welcher diese Zellen im Knochenmark primär operierter Patientinnen gefunden werden können, vergleichbar (ca. 42 %). Allerdings war sowohl nach neoadjuvanter als auch adjuvanter zytostatischer Behandlung eine deutliche Abnahme der Frequenz Tumor-reaktiver KM-Gedächtniszellen im Vergleich zur nicht-behandelten Patientengruppe nachweisbar (siehe 4.2 und 4.3.). Zusammen mit der eigenen

Beobachtung, dass insbesondere Gedächtnis T-Zellen während der Zytostatikabehandlung *in vitro* geschädigt wurden (siehe 4.1), weist dies deutlich auf einen negativen Einfluss der zytostatischen Therapien bei den behandelten Patientinnen hin. Die Bedeutung der Persistenz von Tumorantigenen für die Erhaltung Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark ist derzeit nicht vollkommen geklärt. Bei vielen operierten Brustkrebspatientinnen korreliert der positive Nachweis disseminierter Tumorzellen mit einer Anreicherung von Gedächtnis-T-Zellen in ihrem Knochenmark (Feuerer *et al*., 2001; Solomayer *et al*., 2003). Das Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen könnte demnach ein Reservoir persistierender Tumorantigene darstellen und somit die Induktion und Erhaltung Tumor-spezifischer Gedächtniszellen *in situ* ermöglichen. Es ist vorstellbar, dass persistierende Tumorantigene eine Aktivierung der Tumor-spezifischen Gedächtniszellen im KM induzieren, so dass insbesondere diese Zellen empfindlich für die Zytostatika-induzierte Apoptose werden und absterben.

Alternativ könnte der beobachtete Frequenzrückgang Tumor-reaktiver T-Zellen auch durch die Effizienz der angewandten Therapie erklärt werden. Falls in das Knochenmark disseminierte Tumorzellen durch systemisch applizierte Zytostatika erreichbar sind, könnte bei den zytostatisch behandelten Patientinnen verfügbare Tumorantigene so reduziert worden sein, dass sich dadurch das Tumor-spezifische Gedächtniszellreservoir über die Zeit verringerte. Hierdurch würde der beobachtete Frequenzrückgang erklärbar. Nach einer Lymphopenie-induzierenden Chemotherapie wird das Gedächtniszellreservoir wieder durch homöostatische Proliferation regeneriert (Cho *et al*., 2000; Goldrath *et al*., 2000). Es ist vorstellbar, dass die Regeneration von aktuellen dominierenden Immunreaktionen abhängt (z. B. Virusinfektion) und somit die verschiedenen Gedächtnis-T-Zellspezifitäten nach zytostatischer Therapie neu verteilt werden. Ob hiervon allerdings auch die KM-ansässige Tumor-reaktive Gedächtniszellpopulation beeinflusst wird bleibt unklar. Verschiedene Studien zeigen aber, dass der Raum für Gedächtniszellen im Knochenmark prinzipiell limitiert ist und verschiedene Zellpopulationen um spezifische Nischen konkurrieren (Di Rosa und Santoni, 2003; Sipkins *et al*., 2005). Somit ist es nicht abwegig, dass auch hier das Gedächtniszellreservoir nach Chemotherapie neu generiert wird und damit ein Rückgang der Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen nachvollziehbar würde.

Ungeachtet der zytostatischen Therapie könnte die beobachtete Frequenzreduktion innerhalb der neoadjuvant behandelten Patientengruppe durch generelle Unterschiede der zwei verglichenen Gruppen beeinflusst worden sein. Die Mammakarzinompatientinnen, die eine neoadjuvante Vortherapie erhalten hatten, zeichneten sich insgesamt durch ein höheres *Grading* (mikroskopischer Grad der Entartung) als die primär operierte Patientinnengruppe

aus (siehe 7.2.1 und 7.2.2). Beim *Grading* wird anhand des histologisch aufgearbeiteten Tumorpräparats die mitotische Aktivität und der Differenzierungsgrad der Tumorzellen klassifiziert (G1 = gut differenziert bis G3 = stark verändert). Interessanterweise konnte ein ansteigendes *Grading* bei nicht vortherapierten Patientinnen mit einer erhöhten Menge an TGF-β1 im Tumorgewebe assoziiert werden (unveröffentlichte Ergebnisse, C. Domschke). Das von vielen Tumoren sezernierte TGF-β1 hemmt eine Fülle von immunologischen Prozessen (Gold *et al*., 1999), wodurch der Tumor einer Abstoßung durch das Immunsystem entgehen kann. Somit waren die neoadjuvant behandelten Patientinnen vermutlich durch ein aggressiveres Tumorwachstum und eine stärkere Tumor-induzierte Immunsuppression gekennzeichnet. Zusammen mit dem Befund, dass TGF-β1 selektiv die Funktionalität von Th1-differenzierten Gedächtnis-T-Zell inhibiert (Ludviksson *et al*., 2000), könnte hiermit erklärt werden, warum sich die detektierbare Frequenz Tumor-reaktiver Zellen im IFN-γ ELISpot-Test im Vergleich zu primären Patientinnen verringerte. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wäre es interessant, die Sekretion von TGF-β1 im Primärtumor und im Plasma von Mammakarzinompatientinnen, für die eine neoadjuvante Chemotherapie indiziert ist, zu evaluieren und mit einer Th1- und Th2-Gedächtniszellreaktivität im KM zu vergleichen.

Im Vergleich zur primär operierten Gruppe blieb der prozentuale Anteil der Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive T-Zellen nach adjuvanter Therapie nachweisbar waren, konstant. Allerdings zeigte der Verlauf der Tumor-spezifischen T-Zellreaktivität deutliche intraindividuelle Unterschiede (siehe 7.2.3 und 7.2.4). Von besonderem Interesse sind diejenigen Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive Zellen zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors zunächst nicht nachweisbar waren, wohingegen sie nach Beendigung der Therapie *de novo* eine spezifische T-Zellreaktivität generieren konnten. Dieses Phänomen konnte in ca. 43 % der adjuvant zytostatisch behandelten und in fast 30 % der endokrin behandelten Patientinnen beobachtet werden. Denkbar wäre, dass vom Tumor sezernierte immunsuppressive Mediatoren bis zum Zeitpunkt der Entfernung der Tumormasse (durch chirurgische Exzision und/oder durch effiziente adjuvante Therapie) die Generierung Tumor-spezifischer Gedächtniszellen verhinderten. Angesichts dieser Tatsache könnte bei den Patientinnen mit negativem ELISpot-Ergebnis die Zeitspanne zwischen dem ersten Evaluierungszeitpunkt (operative Entfernung des Primärtumors) und der Untersuchung der Tumor-spezifischen Reaktivität nach adjuvanter Therapie nicht ausreichend gewesen sein, um eine detektierbare Immunantwort zu etablieren. Hierfür spricht die Beobachtung, dass die

Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen einer *de novo* nachgewiesenen Reaktivität stets niedriger lagen als bei Patientinnen, die diese Zellen bereits zum primären Zeitpunkt trugen (siehe 4.3.2).

60 % der untersuchten Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive Zellen zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors nachgewiesen werden konnten, zeigten nach adjuvanter Behandlung keine spezifische T-Zellreaktivität mehr. Dieser Trend war sowohl bei adjuvant zytostatisch sowie bei endokrin therapierten Patientinnen beobachtbar. Der Befund weist auf einen direkten Einfluss der eingesetzten Therapeutika auf das Überleben und die Funktionalität Tumor-reaktiver Gedächtniszellen hin, der zumindest für die zytostatische Behandlung von den eigenen, *in vitro* erhobenen Daten gestützt wird (siehe 4.1). Ob auch endokrine Wirkstoffe einen toxischen Effekt auf T-Zellpopulationen ausüben können, ist derzeit nicht ausreichend geklärt. Der von Solomayer *et al*. (2003) beobachtete lymphopenische Effekt nach adjuvanter Hormontherapie auf die Immunzellen des Knochenmarks spricht für diese Vermutung. Andererseits könnte der Verlust der spezifischen T-Zellreaktivität durch eine Eliminierung von Tumorantigenen erklärt werden (s. o.).

Möglicherweise veränderte sich die Anzahl Tumor-reaktiver Gedächtniszellen nicht grundsätzlich unter adjuvanter Behandlung. Denkbar wäre, dass durch die zytostatische oder endokrine Therapie eine divergent polarisierte Reaktion zu hier detektierten Tc1/Th1-Antwort induziert wurde, die mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Test nicht evaluierbar ist. So ist für das in der endokrinen Therapie angewandte Tamoxifen bekannt, dass es die Sekretion von TNF-α und IL-12 durch Monozyten/Makrophagen sowie die IFN-γ-Produktion von T-Zellen hemmt (Frank *et al*., 2001). All diese Zytokine stellen charakteristische Indikatoren einer Th1-polarisierten T-Zelldifferenzierung dar. Auch nach standarddosierten Chemotherapien beim fortgeschrittenen Mammakarzinom ist eine Umpolarisierung der $CD4^+$ T-Zellantwort von einer Th1- zu einer Th2-Differenzierung beobachtet worden (Ferrari *et al*., 2005).

Beim Vergleich der Tumor-spezifischen Reaktivität nach adjuvanter endokriner und zytostatischer Therapie fällt auf, dass bei letzterer Gruppe die Anzahl IFN-γ-produzierender Zellen nach Zytostatikabehandlung sowohl gegen das Brustkrebs-spezifische (MCF-7 oder autologes Tumorlysat) als auch gegen das irrelevante Antigen (U937 oder autologes PBMZ-Lysat) deutlich niedriger als zum primären Evaluierungszeitpunkt waren. Auch nach endokriner Therapie konnte eine generelle Reduktion der IFN-γ-Produktion nach Restimulation festgestellt werden. Indes führte dies nicht zu einem vollständigen Verlust der Tumor-reaktiven Kapazität, sondern lediglich zu einer leichten Reduktion der nachweislichen T-Zellfrequenz. Dieser Befund belegt tatsächlich einen direkten suppressiven Effekt der

zytostatischen Behandlung, welcher mit Hilfe der Reaktivitätsanalyse gegen das bakterielle Superantigen SEB nicht feststellbar war (s. o.).

5.1.4 Eine Tumor-spezifische KM-T-Zellreaktivität kann im metastasierten Stadium der Erkrankung in weniger als 25 % der Patientinnen nachgewiesen werden

Auch bei Patientinnen im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung, die alle bis zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration eine Vielzahl zytostatischer und endokriner Therapien durchlaufen hatten (siehe 7.2.7), konnten Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine beachtliche Reduktion der T-Zellreaktivität im Vergleich zur Gesamtreaktivität primärer Patientinnen festgestellt. Diese Beobachtung schlug sich in einer deutlichen Verminderung der Frequenz Tumor-reaktiver T-Zellen nach palliativer Behandlung nieder. Auch hier können neben einem direkt zytotoxischen Effekt des palliativen Therapieregimes auf die KM-Gedächtniszellpopulation die bereits diskutierten Ursachen für die Reduktion der Tumor-spezifischen T-Zellreaktivität herangezogen werden. Interessanterweise war bei der Betrachtung der detektierbaren Frequenzen Tumor-reaktiver Gedächtniszellen primär operierter Patientinnen eine enorme Varianz erkennbar (siehe 4.4). Circa ein Drittel aller untersuchten Patientinnen dieser Gruppe zeichneten sich durch eine sehr hohe Frequenz ($\geq$ 1000 pro 10^6 TZ) Tumor-reaktiver Zellen aus, während die Mehrheit deutlich niedrigere Frequenzen aufwiesen und damit eine vergleichbare Tumorreaktivität wie Patientinnen im metastasierten Stadium der Erkrankung zeigten. Eventuell stellen letztgenannte Patientinnen eine selektive Gruppe dar, welche sich bereits in einem frühen Stadium durch eine niedrige Frequenz von Gedächtniszellen auszeichnen und bei denen sich die Tumorerkrankung progressiv weiterentwickeln wird. Die Beobachtung, dass eine nachweisliche T-Zellvermittelte Tumorreaktivität im frühen Stadium der Brustkrebserkrankung mit einer günstigeren Prognose korreliert (McCoy *et al*., 2000), könnte diese Hypothese unterstützen. Ein intraindividueller Vergleich der Immunreaktivität im frühen und fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung hätte diesbezüglich vermutlich Aufschluss gegeben.

Ebenso wäre denkbar, dass sich eine zunächst zytotoxische bzw. Th1-polarisierte T-Zelldifferenzierung im progressiven Verlauf der Tumorerkrankung zu Seiten einer humoralen Th2-Polarisierung verlagerte, welche mit Hilfe des IFN-γ ELISpot-Tests nicht evaluierbar ist. Tatsächlich ist beim Nierenkarzinom ein derartiger Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-T-Zellantwort im peripheren Blut mit Fortschreiten des Krankheitsstadiums beschrieben worden

(Onishi *et al*., 2001). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Sekretion charakteristischer Th2-polarisiernder Zytokine (z. B. IL-4, IL-10) von Tumor-reaktiven KM-Gedächtniszellen primärer Patientinnen und von Patientinnen im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung zu vergleichen.
Auch der allgemein kritische Gesundheitszustand der Patientinnen unter palliativer Behandlung (mögliche Sekundärerkrankungen, psychosoziale Belastung, etc.; Bonadonna *et al*., 1997) könnte einen weiteren Einfluss auf die T-Zellreaktivität des Knochenmarks besitzen und somit einen von der eigentlichen Tumorerkrankung unabhängigen Faktor darstellen.

Wie bereits erwähnt stand für die Patientinnen im palliativen Stadium kein autologes Tumormaterial zur Gewinnung von Tumorantigenen zur Verfügung, da der Primärtumor zur pathologischen Begutachtung genutzt wurde und eine operative Entfernung von Tumormetastasen medizinisch nicht praktikabel ist. Aus diesem Grund konnte die Tumor-spezifische Reaktivität lediglich nach Restimulation mit Brustkrebs-assoziierten Tumorantigenen aus der allogenen MCF-7-Tumorlinie getestet werden. Bezüglich der Reaktivität gegen diese allogene TAA-Quelle war ein zunehmender Rückgang Tumor-reaktiver T-Zellen bei palliativ behandelten Patientinnen im Vergleich zu unbehandelten Patientinnen feststellbar (siehe 4.4). Ein ähnlicher Befund wurde innerhalb der neoadjuvanten Patientengruppe beobachtet. Hier war nur in 17 % der Fälle eine Reaktivität gegen das allogene Lysat nachweisbar. Eine nennenswerte Reduktion der Gesamtreaktivität konnte in dieser Gruppe hingegen nicht beobachtet werden (siehe 4.2).
Das Proteinlysat autologer Tumore unterscheidet sich von dem Lysat der Brusttumorzelllinie u. a. durch die Präsenz individuell-spezifischer Neoantigene. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden ELISpot-Analysen wurden experimentell so konzipiert, dass durch die 40-stündige Stimulation mit Tumor-assoziierten Antigenen, ausschließlich sekundäre T-Zellantworten detektiert werden (siehe 5.1.2). Es wird somit eine Tumor-spezifische Reaktion *ex vivo* getestet, die auf im Tumorpatienten gebildete Gedächtniszellen beruht. Deshalb kann die allogene MCF-7-Linie in dieser experimentellen Anordnung nur als Quelle sogenannter *common shared* Antigene (Gilboa *et al*., 1999) dienen. Dies sind bekannte, überexprimierte Autoantigene, gegen die bei allen untersuchten Mammakarzinompatientinnen eine vergleichbare vorherige Exposition vorliegen sollte. Eine individuelle Gedächtnis-T-Zellreaktion gegen Neoantigene ist hierbei nicht erfassbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund aus der neoadjuvant behandelten Patientenkohorte. Hier wurde die Evaluierung der Tumor-spezifischen Reaktivität z. T. sowohl mit Hilfe des MCF-7-Lysats

als auch mit autologem Tumorlysat durchgeführt. Obwohl keine Unterschiede in der Frequenz Tumor-reaktiver Gedächtniszellen gegen das allogene und das autologe Tumorlysat feststellbar waren, konnte eine deutliche Reduktion der Gesamtreaktivität gegen die allogene TAA-Quelle beobachtet werden. Die Frequenz reaktiver Zellen lag in dieser Patientenkohorte insgesamt sehr niedrig. Aufgrund dieser Beobachtung liegt es nahe, dass bei der Ermittlung der Reaktivität gegen das MCF-7-Lysat vermutlich die Detektionsgrenze des Assays erreicht wurde und dadurch eine geringere Frequenz als 100 Tumor-reaktive TZ pro 10^6 Gesamt-TZ nicht mehr erfasst wurde. Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass bei der Verwendung des allogenen Tumorzelllysats zur Restimulation Patienten-eigener Gedächtnis-T-Zellen in der Tat Antworten gegen individuell-spezifische Neoantigene vernachlässigt werden. Bedingt durch ihre höhere T-Zellrezeptoraffinität scheinen diese T-Zellantworten bei der quantitativen Bestimmung der Tumor-spezifischen Reaktivität deutlich ins Gewicht zu fallen.

Damit sich ein *in situ* wachsender Tumor weiter ausbreiten und distante Metastasen bilden kann, muss er neue Fähigkeiten erlangen. Dies geschieht in der Regel durch Mutagenese, d. h. es werden neuartige Proteine synthetisiert, die dem Tumor eine Ausbreitung ermöglichen. Man könnte vermuten, dass bei Patientinnen im metastasierten Stadium der Erkrankung Neo-Tumorantigene dominieren. In der frühen Phase der Erkrankung etablierte Gedächtniszellen gegen *common shared* Antigene würden somit eventuell in der späteren Phase durch individuell-spezifische Gedächtnis-T-Zellen verdrängt werden. Dies wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit, warum es innerhalb der palliativen Patientengruppe zu einer signifikante Reduktion der Tumorreaktivität bezüglich des allogenen Tumorzelllysats kam.

Alles in allem deuten die Untersuchungen *in vitro* und *ex vivo* darauf hin, dass zytostatische Therapeutika tatsächlich einen dezimierenden Effekt auf das Tumor-induzierte Gedächtnis-T-Zellreservoir ausüben. Der damit einhergehende Frequenzrückgang Tumor-reaktiver T-Zellen, der sowohl in der neoadjuvanten, adjuvanten als auch in der palliativ behandelten Patientengruppen beobachtet wurde, stand dabei nicht in Abhängigkeit zum individuell applizierten Therapieregime. Auch die Regenerierungsphase des Immunsystems nach Beendigung des letzen Therapiezyklus konnte nicht mit der Tumorreaktivität der Gedächtniszellen korreliert werden.

5.2 Reaktivierte Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks – ein vielversprechender Ansatz einer neuartigen adoptiven T-Zelltherapie

Obwohl bei einer Vielzahl der Mammakarzinompatientinnen Tumor-spezifische T-Zellen spontan generiert und als Reservoir von Gedächtniszellen aufrecht erhalten werden, scheint dies offensichtlich nicht ausreichend zu sein, um eine Antitumorimmunität zu etablieren und eine weitere Progression des Tumors zu verhindern. Als Ursache hierfür werden unter anderem eine nicht ausreichende Stimulierung während der primären T-Zellaktivierung, eine inadäquate Polarisierung der T-Zellantwort durch Tumor-sezernierte Zytokine sowie direkte immunsuppressive Mechanismen des Tumors *in situ* diskutiert (Rivoltini *et al*., 2002; Dudley und Rosenberg, 2003).

Die Aktivierung einer effektiven antitumoralen Zytotoxizität stellt das wichtigste Ziel jeder immuntherapeutischen Intervention dar. Gegenüber Tumorvakzinierungs-Strategien, bei denen versucht wird, eine Tumor-gerichtete T-Zellantwort *in vivo* zu induzieren, bietet die Generierung Tumor-reaktiver Effektorzellen *ex vivo* entscheidende Vorteile: Die gewünschten therapeutischen Zellen können *in vitro* selektiv angereichert und anschließend unter Ausschluss einer Tumor-induzierten immunsuppressiven Umgebung reaktiviert und expandiert werden (Dudley and Rosenberg, 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte adoptive Immuntherapie beim metastasierten Mammakarzinom basierte auf dem Transfer reaktivierter Patienten-eigener Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks. Tumor-spezifische Gedächtniszellen entstehen durch die klonale Expansion naiver T-Zellen nach kognitiver Erkennung des Tumorantigens auf Antigen-präsentierenden Zellen. Angesichts der Tatsache, dass Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellen bei Mammakarzinompatientinnen zu hohen Frequenzen im Knochenmark akkumulieren (Feuerer *et al*., 2001), stellt das Knochenmark eine optimale Quelle zur Generierung Tumor-reaktiver Effektorzellen dar (Schirrmacher *et al*., 2003).

Die Reaktivierung der therapeutischen Zellen erfolgte *in vitro* mit Hilfe autologer Dendritischer Zellen, die zuvor mit Brustkrebs-assoziierten Tumorantigenen beladen worden waren. Nach Beendigung der 72-stündigen Stimulationskulturen wurden die therapeutischen Zellen den Patientinnen intravenös appliziert. Es kann festgehalten werden, dass diese im Rahmen einer Phase I Studie durchgeführten neuartigen Immuntherapie generell praktikabel und gut verträglich für die elf behandelten Patientinnen war. Somit wurden die Hauptzielkriterien vollkommen zufriedenstellend erfüllt (siehe 4.5).

Bezüglich der Nebenzielkriterien konnte gezeigt werden, dass bei fünf Patientinnen sieben Tage nach Zellapplikation eine Tumor-spezifische Reaktivität erstmalig im peripheren Blut detektierbar war. Anhand dieses immunologischen Ansprechens wurden die behandelten Patientinnen in ADI-reaktive bzw. nicht-reaktive Patientinnen eingeteilt (siehe 4.5.4.1). Eine klinische Effektivität konnte anhand dieses Studienprotokolls nicht ausreichend evaluiert werden.

Zur Reaktivierung der therapeutischen Zellen wurde, wie auch bei der Bestimmung der Frequenz Tumor-reaktiver Zellen vor Beginn der Therapie, das Lysat der Brustkrebszelllinie MCF-7 verwendet. Diese etablierte und kommerziell erwerbliche Zelllinie exprimiert die meisten der bekannten Brusttumor-assoziierten Tumorantigene (Soule *et al*., 1973) und stellt somit eine geeignete Quelle zur Reaktivierung Tumor-spezifischer Gedächtniszellen dar. Zahlreiche IFN-γ ELISpot-Analysen mit T-Zellen, die mit dem MCF-7-Lysat für 40 h stimuliert wurden, belegen die Kapazität dieses Antigens, Tumor-spezifische Gedächtniszellen zu Effektorzellen zu reaktivieren. Zudem zeigen Versuche an einem in unserer Gruppe etablierten Mausmodell, dass durch die Präsentation allogener TAAs auf Patienten-eigenen APZ tatsächlich therapeutisch hochwirksame Effektorzellen generiert werden können. Der adoptive Transfer von MCF-7-reaktivierten KM-T-Zellen in Tumor-tragende NOD/SCID-Mäuse induzierte eine Regression xenotransplantierter Brusttumore mit vergleichbaren Effizienz wie KM-T-Zellen, die mit Hilfe des autologen Tumorlysats reaktiviert wurden (unveröffentlichte Daten, M. Feuerer und P. Beckhove).

Allerdings ist es möglich, dass durch den Einsatz der allogenen TAAs dominante, Tumor-gerichtete T-Zellantworten gegen individuelle Neoantigene nicht aktiviert werden (siehe 5.1.4). Diese unterliegen nicht der zentralen Toleranz im Thymus und könnten daher besonders starke Immunreaktionen auslösen. Somit wären die Spezifität und die Frequenz der so aktivierten Tumor-reaktiven Effektorzellen limitiert. Aus diesen Gründen wäre das Totallysat des autologen Tumors vermutlich die beste Tumorantigenquelle zur Reaktivierung der Gedächtniszellen. Geeignete Gewebeproben des autologen Primärtumors der in der Studie eingeschlossenen Patientinnen standen jedoch nicht zur Verfügung und eine operative Metastasenexzision zur Gewinnung eines autologen Tumorlysats war nicht praktikabel. Auch eine spezifische Charakterisierung des individuellen Tumorantigen-Expressionsmusters jeder einzelnen Mammakarzinompatientin stellt gegenwärtig keine Option dar, so dass auf die nahelegendste Alternative, dem allogenen MCF-7-Lysat, zurückgegriffen wurde.

Wie bei den präklinischen Versuchen auch, wurden zur Reaktivierung der Patienten-eigenen Gedächtniszellen phänotypisch differenzierte, Dendritische Zellen eingesetzt, die nicht durch Zugabe weiterer Adjuvantien (IFN-α, PGE_2, TNF-α) maturiert wurden. In diesem „unreifen" Zustand besitzen Dendritische Zellen die höchste Kapazität Antigen aufzunehmen (Banchereau und Steinman, 1998). Das Lysat der Tumorzelllinie, mit denen die Zellen anschließend inkubiert wurden, enthält verschiedene TAAs und *Heat-Shock*-Proteine (Singh-Jasuja *et al*., 2000), die nach Prozessierung eine Reifung und Hochregulation aktivierender und kostimulatorische Moleküle auf Dendritischen Zellen induzieren (Sauter *et al*., 2000).
Tatsächlich konnte nach der Inkubation der aus $CD14^+$ Monozyten generierten Dendritischen Zellen mit MCF-7-Lysat initial eine deutliche Expressionssteigerung Dendriten-spezifischer Aktivierungsmarker (HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86) nachgewiesen werden (siehe 4.5.2.1). Nach Beendigung der Stimulationskultur war allerdings eine deutliche Reduktion dieser kennzeichnenden Moleküle zu verzeichnen, die mit einem Verlust mikroskopisch identifizierbarer Dendritischer Zellen einherging (eigene Beobachtung). Eine genauere Analyse mit Hilfe weiterer experimenteller Stimulationskulturen ergab, dass der Rückgang detektierbarer aktivierter APZ nach ca. 40 h einsetzte (siehe 4.5.2.2). Tatsächlich gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Dendritische Zellen nach einer besonders starken Aktivierung zügig absterben. Dieses Phänomen wurde als „Erschöpfung" interpretiert (Bjorck *et al*., 2004; Langenkamp *et al*., 2000). Ebenso wäre es möglich, dass die Tumorantigen-präsentierenden Zellen Angriffspunkte für zytotoxische Effektorzellen bildeten und somit von autologen T-Zellen lysiert wurden (Loyer *et al*., 1999; Odermatt *et al*., 1991; Hermans *et al*., 2000). Welcher Mechanismus tatsächlich zum Dendritenverlust in den therapeutischen Stimulationskulturen führte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Beide Erklärungsmöglichkeiten weisen jedoch auf eine initiale Aktivierung der APZ im hier angewandten System hin.
Diese Daten bildeten die Grundlage zur Annahme, dass mit der *ex vivo* Beladung Patienten-eigener Dendritischer Zellen potente APZ generiert wurden, die zu einer effizienten Präsentation exogen aufgenommener Antigene sowohl über MHC II als auch MHC I (Kreuzpräsentation) in der Lage sind. Diese Methode sollte sich daher besonders für die gleichzeitige Induktion von $CD8^+$ als auch $CD4^+$ T-Zellantworten eignen. Da DZ die Kapazität zur Proteinaufnahme und Prozessierung besitzen, können sie durch Beladung mit lysierten Tumorzellen zur Präsentation multipler Epitope verschiedener Tumorantigene eingesetzt werden und damit eine effizientere, polyklonale Antitumor-T-Zellantwort auslösen (Johnston *et al*., 1996).

Das hier gewählte Studienprotokoll unterscheidet sich somit grundlegend von aktuellen klinischen Studien zum adoptiven T-Zelltransfer bei anderen Tumorerkrankungen. So bedient man sich beispielweise beim Malignen Melanom Tumor-spezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut (Yee *et al*., 2000) oder Tumor-infiltrierender T-Lymphozyten (Dudley *et al*., 2002) zur Generierung von Antitumor-Effektorzellen. Trotz z. T. beeindruckender Einzelfallberichte konnte aber bislang ein therapeutischer Nutzen solcher Therapien nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine Ursache für diesen Befund könnte im Einsatz monospezifischer $CD8^+$ T-Zellklone liegen, die anhand definierter, Tumor-assoziierter Peptidsequenzen selektiert wurden. Da die Frequenz solcher, für ein einzelnes Epitop spezifischer T-Zellen sehr gering ist, werden diese unter Einsatz hoher IL-2-Dosen *in vitro* expandiert. Um ein Überleben der Effektorklone nach adoptivem Transfer, d. h. unter physiologischen IL-2-Bedingungen im peripheren Blut, zu gewährleisten, muss das Zytokin nachfolgend systemisch appliziert werden. Dies ist z. T. mit erheblichen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden (Atkins *et al*., 2002). Zudem wurde im Zusammenhang mit der Verwendung Tumor-spezifischer, monoklonaler $CD8^+$ T-Zellen häufig von einem selektiven Expressionsverlust des Zielantigens auf den Tumorzellen berichtet (Maeurer *et al*., 1996; Thurner *et al*., 1999; Jager *et al*., 2000; Yee *et al*., 2002). Die Beobachtung solcher Therapie-induzierten *Tumorescape*-Varianten zeigen deutlich die Notwendigkeit einer polyklonal orientierten T-Zelltherapie auf (Parmiani *et al*., 2002; Dudley und Rosenberg, 2003), wie sie in der vorliegenden Studie verwirklicht wurde.

5.2.1 Die therapeutische Stimulationskultivierung induziert eine Zunahme aktivierter Effektor/Gedächtnis-T-Zellen

Interessanterweise führte die 72-stündige Inkubation der autologen Dendritischen Zellen mit angereicherten T-Zellen nicht zu einer massiven Zunahme der gesamten T-Zellzahl (siehe 4.5.2). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Inkubation Tumorantigen-exprimierender DZ mit T-Zellen von Mammakarzinompatientinnen selektiv das Überleben derjenigen T-Zellen erhöhte, die das präsentierte Antigen spezifisch erkannten. Wurden die Kulturbedingungen so gewählt, dass keine kognitiven Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen und autologen T-Zellen bestanden, konnte eine erhöhte Apoptoserate der T-Zellen innerhalb von 40 Stunden festgestellt werden (Bai *et al*., 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen kann angenommen werden, dass innerhalb der 72-stündigen Kulturen insbesondere nicht Tumor-spezifische Zellen zu Grunde gingen. Die Tumor-spezifischen,

reaktivierbaren T-Zellen hingegen machten bei jeder Therapiepatientin zu Beginn der Stimulation deutlich weniger als 0.1 % der gesamten T-Zellpopulation aus. Selbst eine intensive Proliferation nach Restimulation durch kognitives Antigen (maximal drei Verdoppelungen innerhalb 72 h) hätte keine detektierbare Zunahme der Gesamtzellzahl bewirkt. Somit kann die beobachtete Stagnation bzw. Reduktion der T-Zellzahl während der 72-stündigen Kulturen nicht mit einer Dezimierung therapeutisch relevanter Effektorzellen gleichgesetzt werden.

Mit Hilfe der phänotypischen Analyse zu Beginn und nach Beendigung der Kultivierung war eine signifikante Zunahme der CD45RO-positiven T-Zellpopulation beobachtbar, während die CD45RO-negative Zellfraktion einen rückläufigen Trend zeigte (siehe 4.5.2.3). Wie schon erwähnt ist eine Abgrenzung zwischen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen aufgrund der nicht eindeutigen Definition humaner Effektorzellen problematisch. Die Zunahme der CD45RO-positiven Population kann zum einen mit einer auf kognitiver Erkennung beruhenden Proliferation Tumor-spezifischer Gedächtniszellen gedeutet werden. Alternativ könnte dies auch in einer primären Aktivierung und Expansion naiver T-Zellen begründet liegen. Neben der fundierten Annahme, dass Tumor-spezifische Gedächtniszellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen bereits in höheren Frequenzen zu Beginn der Stimulationskultur vorliegen, besitzen diese weitere selektive Überlebensvorteile gegenüber naiven T-Zellen. So reagieren Gedächtnis-T-Zellen bereits auf geringere Konzentrationen des spezifischen Antigens, zeigen eine schnellere Proliferation nach Antigenstimulation und sind weniger auf Kostimulation durch Antigen-präsentierende Zellen angewiesen (Zinkernagel *et al*., 1996; Goldrath und Bevan, 1999; Veiga-Fernandes *et al*., 2000; Tuma *et al*., 2002; Lanzaveccia und Sallusto, 2000). Diese besonderen funktionalen Fähigkeiten könnten für die Tumor-spezifischen Gedächtniszellen innerhalb der Stimulationskulturen einen Selektionsvorteil bieten. Aufgrund dessen ist es vorstellbar, dass expandierte Tumor-spezifische Gedächtnis-T-Zellen tatsächlich zu dem beobachteten Anstieg innerhalb der CD45RO-Population beigetragen haben.

Trotz der hier diskutierten Beschränkungen ergab die Analyse von TZ-Aktivierungsmarkern und die Charakterisierung des Zytokinmilieus innerhalb der Stimulationskulturen deutliche Hinweise auf eine effiziente Aktivierung der therapeutischen Zellen (siehe 4.5.2.3 und 4.5.2.4). So spricht die Zunahme der $CD8^+$ Effektor/Gedächtnis-T-Zellfraktion für die Induktion Tumor-spezifischer zytotoxischer Effektorzellen *in vitro*. Auch der beobachtete Anstieg der CD69- und CD25-exprimierenden Effektor/Gedächtniszellen weist auf eine

effiziente Reaktivierung Patienten-eigener Tumor-spezifischer Zellen hin. Powell *et al*. (2005) konnten einen ganz ähnlichen Phänotyp ($CD45RO^{hoch}$, $CD69^{hoch}$) auf Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten nach zwei- bis vierwöchiger Kultur unter polyklonaler Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern beobachten. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Expansion der aktivierten CD45RO-Effektor/Gedächtnis-T-Zellfraktion tatsächlich durch eine Aktivierung des T-Zellrezeptors vermittelt wurde und somit möglicherweise auf eine spezifische T-Zellaktivierung zurückzuführen ist.

Für $CD45RO^{+}CD25^{hoch}$-exprimierende $CD4^{+}$ Zellen konnte eine tendenzielle Abnahme in den therapeutischen Kulturen verzeichnet werden (siehe 4.5.2.3). *In vivo* induziert diese als regulatorische T-Zellen bezeichnete Population eine funktionelle Anergie autoreaktiver T-Zellen, wodurch eine Autoimmunität verhindert wird. Dadurch dienen diese Zellen der Aufrechterhaltung der sogenannten peripheren Toleranz (Sakaguchi *et al*., 2000). Weiter ist gezeigt worden, dass viele humane Tumore von regulatorischen T-Zellen infiltriert werden und dass eine selektive Depletion dieser Zellen zu einer gesteigerten Immunzell-vermittelten Tumorregression führt (Yu *et al*., 2005). Daher werden regulatorische T-Zellen neben anderen als wichtige Faktoren für eine ausbleibende Antitumor-Immunreaktion diskutiert (Smyth *et al*., 2001; Dudley und Rosenberg, 2003). Es wäre denkbar, dass eine Koapplikation dieser Zellen zusammen mit potenten Antitumor-Effektorzellen den therapeutischen Nutzen einer solchen Immuntherapie mindern könnte. Auch wenn nur repräsentative Stichproben der therapeutischen Kulturen untersucht wurden, gibt es Grund zur Annahme, dass durch das gewählte Stimulationsprotokoll regulatorische $CD4^{+}CD25^{+}$ T-Zellen nicht induziert wurden.

5.2.2 Die nach adoptivem Transfer nachweisbare Tumorreaktivität im peripheren Blut spricht für eine massive Expansion der therapeutischen Zellen *in vivo*

Die zentralen Probleme einer adoptiven Immuntherapie bestehen einerseits in der ausreichenden Generierung Tumor-reaktiver Effektorzellen und andererseits in der dauerhaften Erhaltung von Tumor-reaktiven T-Zellen *in vivo*, um eine fortbestehende Tumorbekämpfung zu gewährleisten (Dudley und Rosenberg, 2003).

In der vorliegenden Studie konnte bei einem Teil der Patientinnen zum ersten Evaluierungszeitpunkt nach adoptivem Transfer (Tag 7) eine Tumor-spezifische IFN-γ T-Zellantwort *de novo* im peripheren Blut nachgewiesen werden. Dabei korrelierte der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen sieben Tage nach therapeutischer Applikation mit der individuellen Anzahl applizierter, Tumor-reaktiver T-Zellen (siehe 4.5.4.1). In Anbetracht der

applizierten Zellzahl (maximal 4 x 10^4) und einem PB-Verdünnungsvolumen von ca. 7 Litern, ist die evaluierte Frequenz reaktiver Zellen (100 bis 510 reaktive Zellen pro 10^6 TZ) eine Woche nach Zellapplikation bemerkenswert. Diese Beobachtung lässt auf eine massive Vermehrung der transferierten Effektorzellen während der ersten Tage nach Applikation, vermutlich in lymphatischen Organen, wie den drainierenden Lymphknoten oder auch dem Knochenmark, schließen. Aufgrund des Verdünnungseffekts des Blutes wären die applizierten, Tumor-reaktiven T-Zellen ohne eine massive Expansion nicht nachweisbar gewesen.

Schwendemann *et al*. (2005) konnten anhand eines Mausmodells zeigen, dass Gedächtnis-T-Zellen nach einer Reaktivierung zunächst den Chemokinrezeptor CCR7 hochregulierten, der *in vivo* ein Einwandern (*homing*) von Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten ermöglicht. Danach konnte eine intensive Proliferation beobachtet werden. Interessanterweise regulierte ein Großteil der proliferierenden T-Zellen CCR7 nach drei bis fünf Tagen wieder herunter, was mit dem Erlangen von direkten Effektorzellfunktionen einherging. Dies konnte anhand von intrazellulären IFN-γ- und Perforinfärbungen gezeigt werden. In diesem Zusammenhang ist eine kürzlich erschienene Studie zum adoptiven Transfer in einem transgenen Melanom-Mausmodell interessant (Gattinoni *et al*., 2005). Auch hier konnte eine massive Expansion Melanom-spezifischer Zellen in lymphatischen Organen (Milz) drei bis fünf Tage nach systemischem T-Zelltransfer beobachtet werden. Die Proliferation der therapeutischen Zellen war von der Expression des *Homing*-Rezeptors CD62L und von der Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen in den lymphatischen Organen abhängig. Nach Abschluss der Proliferation wurden die Tumor-spezifischen Zellen aus der Milz freigesetzt, worauf sie ein bis zwei Tage später im Tumor detektierbar waren. Diese Studien unterstützen die Annahme, dass die therapeutischen Zellen der ADI-reaktiven Patientinnen eventuell bereits während der 72-stündigen Stimulationskultur *Homing*-Rezeptoren hochregulierten und nach Applikation in die drainierenden Lymphknoten einwanderten. Von dort wurden sie nach wenigen Tagen als zweite Effektorzellpopulation in hohen Frequenzen ins periphere Blut freigesetzt, wodurch sie ebenso in der Lage waren, IFN-γ und Perforin nach Restimulation *in vitro* zu produzieren.

Die Fähigkeit der adoptiv transferierten Zellen in lymphatische Organe zu migrieren und dort zu expandieren, könnte entscheidend durch das gewählte Stimulationsprotokoll sowie durch den Einsatz von Gedächtnis-T-Zellen aus dem Knochenmark geprägt worden sein. Bei den gängigen Studienprotokollen zum adoptiven Transfer beim Malignen Melanom werden vorwiegend aus dem Blut isolierte $CD8^+$ T-Zellen eingesetzt, die durch wiederholte Antigen-

Stimulationen und unter Einsatz hoher Zytokindosen *in vitro* expandiert werden (Dudley und Rosenberg). Hierdurch werden möglicherweise sogenannte terminal-differenzierte Effektorzellen generiert (Tan et al., 1999; Gattinoni *et al*. 2005). Yee *et al*. (2002) konnten zwar nach Applikation derart generierter Effektorklone einen deutlichen Anstieg Tumor-spezifischer T-Zellen im Blut von Melanompatienten feststellen, allerdings sank ihre Frequenz innerhalb der folgenden 24 Stunden rapide ab, bis die Zellen 21 Tage nach Applikation nicht mehr nachweisbar waren (Yee *et al*., 2002). Dieser Befund legt nahe, dass mit diesem Studienprotokoll keine Expansion von therapeutischen Zellen in lymphatischen Organen stattgefunden hat und somit keine zweite Effektorzellphase induziert wurde. Tatsächlich fehlt terminal-differenzierten T-Zellen die Expression von CCR7 und CD62L (Gattinoni *et al*., 2005). Diese Zellen sind zwar potentiell in der Lage, eine direkte zytotoxische Antitumorreaktion im Tumor zu generieren, jedoch sterben sie aufgrund ihrer fortgeschrittenen Differenzierung und der fehlenden Kapazität in sekundär lymphatische Organe zu migrieren bald ab. Im Gegensatz hierzu wurden in der vorliegenden Studie zum adoptiven T-Zelltransfer Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark eingesetzt, die „einmalig“, in einer 72-stündigen Stimulationskultur mit Tumorantigen-beladenen Dendritischen Zellen, reaktiviert wurden. Auch wenn die Zellen nicht dahingehend phänotypisch untersucht wurden, wird mit diesem kurzeitigen Stimulationsprotokoll vermutlich keine terminale Differenzierung der T-Zellen induziert.

Auch der Ursprungsort der reaktivierten, therapeutischen Zellen könnte entscheidend zur Expansion *in vivo* beigetragen haben. Aktuelle Studien zeigen, dass das Knochenmark ein bedeutendes Reservoir für Gedächtniszellen, insbesondere für zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*central memory*, CM) darstellt (Mazo *et al*., 2005). Bei Mammakarzinompatientinnen scheinen ca. 40 % der Tumor-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen als CM-Zellen im Knochenmark vorzuliegen (Beckhove *et al*., 2004). Daher kann angenommen werden, dass den hier behandelten Mammakarzinompatientinnen zentrale Gedächtnis-T-Zellen appliziert wurden. Diese Gedächtniszell-Subpopulation zeichnet sich durch die Expression von *Homing*-Rezeptoren und durch eine niedrigere Differenzierung im Vergleich zu Effektor-Gedächtniszellen aus (Sallusto *et al*., 2004). Im Melanom-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass insbesondere wenig differenzierte Effektorzellen bzw. CM-Gedächtniszellen nach adoptivem Transfer in sekundär lymphatische Organe einwanderten und dort proliferativ expandierten (Klebanoff *et al*., 2005). Dies bildete die Vorraussetzung für die beobachtete Regression großer, etablierter Tumore (Gattinoni *et al*., 2005; Klebanoff *et al*., 2005). Die hier diskutierten Aspekte lassen daher vermuten, dass durch das in dieser Arbeit angewandte

Studienprotokoll bestmögliche Bedingungen für eine Expansion der therapeutischen Zellen *in vivo* geschaffen wurden.

An dieser Stelle ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen der hier verglichenen Studien auf verschiedenen experimentellen Techniken beruht. Somit ist ein direkter Frequenzvergleich nach Therapie schwierig. Yee *et al*. (2002) wählten zur Verlaufsbeobachtung nach Applikation Melanom-spezifischer $CD8^+$ T-Zellklone die Tetrameranalyse, die mit Hilfe einer semiquantitativen PCR bestätigt wurde. Hiermit kann zwar eine quantitative Angabe über T-Zellen einer bestimmten Spezifität gemacht werden, eine Aussage über eine tatsächliche Tumor-spezifische Reaktivität kann indes mit dieser Methode nicht getroffen werden. Andere Studien aus der Arbeitsgruppe um S. Rosenberg verfolgten das Schicksal adoptiv transferierter $CD8^+$ TIL-Klone über die IFN-γ-Sekretion nach Restimulation *in vitro* mit Hilfe eines standardisierten ELISA-Tests (Powell *et al*., 2005). Hiermit wird zwar ein Reaktivitätsnachweis erbracht, allerdings kann nicht unmittelbar auf die Anzahl reaktiver T-Zellen geschlossen werden. Die zum adoptiven Transfer des fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingesetzten Effektorzellen wurden mit Hilfe eines totalen Tumorzelllysats aktiviert, was in einer polyklonalen $CD4^+$ als auch $CD8^+$ Stimulation resultiert. Deswegen wurde der ELISpot-Test als *Read-Out* System zum Nachweis Tumor-reaktiver Zellen gewählt. Mit Hilfe MCF-7-beladener Dendritischer Zellen konnte die Anzahl Tumor-reaktiver T-Zellen ($CD4^+$/$CD8^+$) nach Therapie bestimmt und direkt mit der vorher ermittelten Frequenz verglichen werden. Somit beruhte die Entscheidung über ein immunologisches Ansprechen der Therapie auf der IFN-γ-Sekretion der PB-T-Zellen nach 40-stündiger spezifischer Restimulation (siehe 4.5.4.1).

Neben den oben diskutierten besonderen Eigenschaften von Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks, könnte ebenso die vorangegangene polyklonale Tumorantigenstimulation durch autologe APZ, die Bereitstellung der kognitiven CD4-Hilfe sowie die Koapplikation Antigen-beladener Dendritischer Zellen maßgeblich zur beobachteten Expansion beigetragen haben. Genauso wären synergistische Effekte dieser Faktoren denkbar. So können $CD4^+$ T-Zellen wesentlich zu einer effizienten Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellantworten beitragen. Dies geschieht entweder über die Sekretion T-Helferzell-spezifischer Zytokine (u. a. IL-2) oder indem $CD4^+$ T-Zellen über Interaktionen des CD40-Liganden mit CD40 die kostimulatorische Kapazität der beteiligten APZ erhöhen (Benett *et al*., 1998; Ridge *et al*., 1996; Schönberger *et al*., 1998). Zudem beschreiben Studien zum adoptiven Transfer im Mausmodell die

Erfordernis von $CD4^+$ T-Zellen (Walter *et al*., 1995) sowie von professionellen APZ (Beckhove *et al*., 2004) für das Überleben adoptiv transferierter T-Zellen. Aufgrund der in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Abhängigkeit vom Verhältnis Dendritischer und T-Zellen in den Stimulationskulturen, erhielten diejenigen Patientinnen, bei denen Tumor-reaktive T-Zellen sieben Tage nach Zellapplikation nachweisbar waren, eine höhere Anzahl TAA-präsentierender Dendritischer Zellen. Untersuchungen am NOD/SCID-Modell belegen, dass kotransferierte Dendritische Zellen entscheidend zur Persistenz therapeutischer Effektorzellen beitragen können. Wurden Dendritischen Zellen experimentell aus den Stimulationskulturen vor adoptivem Transfer in tumortragende Mäuse depletiert, war eine wesentlich geringere T-Zellinfiltration des Tumors zu beobachten, die mit einer verminderten therapeutischen Wirkung einherging (Beckhove *et al*., 2004). Somit scheinen Interaktionen *in vivo* zwischen Dendritischen und T-Zellen für einen therapeutischen Effekt eine Rolle zu spielen. So könnten T-Zellen antiapoptotische Signale von Dendritischen Zellen erhalten, wie es bereits für Stimulationskulturen *in vitro* beschrieben wurde (Bai *et al*., 2003). Des Weiteren fördern Dendritische Zellen, u. a. durch Interaktionen zwischen CD154 und CD40, die Persistenz von T-Zellen und tragen zur Bildung eines Mikromilieus bei, das für die T-Zellaktivierung und Proliferation benötigt wird (Angelini *et al*., 2002; Edinger and Thompson, 2002; Iezzi *et al*., 1998).

Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Applikation Tumorantigen-tragender Dendritischer Zellen eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen *in vivo* auslöste. Studien an Mäusen zeigen, dass *in vitro* generierte Dendritische Zellen nach intravenöser Applikation präferentiell in lymphatische Organe, insbesondere in die Milz, einwandern (Mackensen *et al*., 1999; Mullins *et al*., 2003). Diese Umgebung ist geeignet für ein *Priming* kognitiver naiver T-Zellen. Somit kann nicht abschließend geklärt werden, ob die beobachtete Tumor-spezifische Reaktivität, sieben Tage nach Applikation der therapeutischen Zellsuspension, zum Teil auch durch primär aktivierte, Tumor-spezifische T-Zellen bedingt war.

5.2.3 Der adoptive T-Zelltransfer induziert möglicherweise ein Mobilisierung Tumor-reaktiver Gedächtniszellen bei ADI-reaktiven Patientinnen

Tumor-reaktive T-Zellen waren später als sieben Tage nach adoptivem Transfer nicht mehr im peripheren Blut der Patientinnen detektierbar (siehe 4.5.4.1). Dieser Befund lässt vermuten, dass die Zellen aus dem peripheren Blut möglicherweise in potentielle Zielgewebe (lymphatische Gewebe, Tumor?) eingewandert sind. Die freigesetzte zweite T-Zellpopulation

schien dabei nicht ins Knochenmark zu migrieren. Dies lässt sich daraus ableiten, dass sich die Anzahl Tumor-reaktiver Gedächtnis-Zellen im Knochenmark insbesondere bei ADI-reaktiven Patientinnen drei Monate nach Therapie deutlich verringerte (siehe 4.5.4.2). Es ist relativ unwahrscheinlich, dass bei der Aspiration von 100 Millilitern aus einem lymphatischen Organ von ca. zwei Litern Gesamtvolumen, die KM-ansässigen Tumor-reaktiven T-Zellen derart dezimiert wurden. Der beobachtete Frequenzrückgang lässt sich daher eher mit einer Mobilisierung reaktiver T-Zellen aus dem Knochenmark interpretieren, die eventuell als Reaktion auf den Zelltransfer induziert wurde. Falls diese Vermutung zutreffen sollte, könnte dies eine Migration Tumor-reaktiver KM-T-Zellen in andere lymphatische Gewebe oder in persistierende Tumorzellnester begünstigt haben. Tatsächlich konnte im Brustkrebs-Xenotransplantationsmodell eine Infiltration des Tumorgewebes durch therapeutisch-applizierte Zellen nach 7-10 Tagen beobachtet werden (Feuerer *et al*., 2001; Beckhove *et al*., 2004). Auch im oben beschriebenen Melanom-Modell erreichten die Tumor-spezifischen T-Zellen das Tumorgewebe in vergleichbarer Zeit nach adoptivem T-Zelltransfer (Gattinoni *et al*., 2005). Ein Rückgang Tumor-reaktiver T-Zellen im KM könnte andererseits bedeuten, dass durch die Expansion und Mobilisierung reaktiver Effektorzellen bei ADI-reaktiven Patientinnen residuale Tumorzellen zerstört wurden und somit schließlich das Tumor-reaktive T-Zellreservoir durch die fehlenden Tumorantigene dezimiert wurde.
In einer anschließenden Phase II Studie zur adoptiven Immuntherapie beim Mammakarzinom sollte daher insbesondere Augenmerk auf den Verbleib der applizierten T-Zellen gelegt werden. So ließen sich die Zellen nach adoptivem Transfer beispielsweise durch eine vorangehende radioaktive Markierung *in vivo* verfolgen. Auch eine Charakterisierung der Expression von *Homing*-Rezeptoren wäre in diesem Zusammenhang von Interesse.

5.2.5 Das ADI-Ansprechen korreliert mit dem Erkrankungsstadium der therapierten Patientinnen

Bei vier von fünf Patientinnen war das ADI-Ansprechen mit einer klinisch stabilen Erkrankungsphase zum Zeitpunkt der therapeutischen Zellentnahme assoziiert (siehe 7.2.7). Möglicherweise stellt dieses Kriterium die Ausgangsbasis für einen späteren Therapieerfolg dar. Bei Betrachtung der klinischen Tumormanifestation der Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom wird augenfällig, dass alle nicht-reaktiven Patientinnen durch eine Knochenmetastasierung und eine damit einhergehende höhere Tumorlast gekennzeichnet waren. Die Einnistung disseminierter Tumorzellen in das Knochenmark führt

zu einer Karzinose dieses lymphatischen Organs. Dadurch werden KM-ansässige Zellen verdrängt (Mundy, 2002). Ob hiervon auch Tumor-reaktive Gedächtnis-T-Zellen betroffen sind ist nicht geklärt. Es ist jedoch auffällig, dass Patientinnen mit Knochenmetastasen oft nur geringe Mengen Knochenmark entnommen werden konnten. Zusammen mit der Tatsache, dass diese Patientinnen tendenziell geringere Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen enthielten, könnte hier die Ursache für eine geringere Ausgangszellzahl reaktivierbarer Gedächtniszellen liegen. Insgesamt kann festgehalten werden, dass bei denjenigen Patientinnen, die sich zum Zeitpunkt der Therapie in einer progressiven Erkrankungsphase befanden, kein immunologisches Ansprechen nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund korrelierte z. T. mit einem Anstieg der Tumormarker vor und nach therapeutischer Zellapplikation (siehe 4.5.5).

Auf der anderen Seite konnte das Ausbleiben eines Ansprechens auf die therapeutische Applikation mit einer Induktion Th2-spezifischer Zytokine (IL-4, IL-10) während der Stimulationskulturen assoziiert werden. IL-10 inhibiert *in vitro* eine effiziente APZ-Maturierung, wodurch die kostimulatorische Kapazität herabgesetzt wird. Damit wird schließlich die Fähigkeit der APZ, eine effiziente adaptive Effektorzellantwort zu induzieren, vermindert (Moore *et al*., 2001; Mocellin *et al*., 2001). Tatsächlich konnte eine Expressionsreduktion kostimulatorischer Moleküle und Aktivierungsmarker (CD83, CD80) auf Dendritischen Zellen während der Stimulationskulturen einiger ADI nicht-reaktiver Patientinnen nachgewiesen werden. Die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 werden häufig im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen diskutiert (Vicari und Trinchieri, 2004). IL-10 wird von manchen Tumorzellen und zudem von Tumor-infiltrierenden Makrophagen und Lymphozyten in hohen Mengen produziert. Auch eine IL-10 Sekretion von Lymphozyten des peripheren Blutes wurde bei verschiedensten Tumorpatienten beobachtet (Vicari und Trinchieri, 2004). Sowohl für solide als auch hämatologische Tumore korrelierte ein erhöhter IL-10-Plasmaspiegel mit einer schlechten Prognose, was auf eine hohe Tumorlast metastasierter Patienten zurückgeführt wurde (Moore *et al*., 2001). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass ADI nicht-reaktive Patientinnen, die durch eine deutlich höhere Tumorlast gekennzeichnet waren und sich in einer progressiven Phase der Erkrankung befanden, eine vermehrte Sekretion von IL-10 *in vitro* zeigten (siehe 4.5.4.4 und 7.2.7). Untersuchungen aus unserer Gruppe belegen, dass erhöhte Konzentrationen an IL-10 und TGF-β1 (im Tumorgewebe) eine signifikante, inverse Korrelation mit dem Nachweis IFN-γ-sezernierender Tumor-spezifischer T-Zellen aufwiesen (unveröffentlichte Ergebnisse, C. Choi). Auch IL-4, eine weiteres Th2-polarisierendes Zytokin, wurde insbesondere in den Stimulationskulturen

der Patientinnen mit progressivem Krankheitsverlauf induziert. Indes ließen die Sekretionsprofile der Th1-polarisierenden Zytokine IL-12 und TNF-α keinen eindeutigen Hinweis auf eine Ansprechempfindlichkeit erkennen.

Interessanterweise konnte ein ähnliches Polarisierungsmuster der T-Zellen ADI-reaktiver und nicht-reaktiver Patientinnen auch nach erfolgtem T-Zelltransfer festgestellt werden (siehe 4.5.4.4). Bei letztgenannten Patientinnen wurde nach kurzzeitiger Restimulation mit MCF-7 eine erhöhte IL-4 Produktion gemessen, während dies bei ADI-reaktiven Patientinnen nicht beobachtet wurde. Dieser Effekt relativierte sich innerhalb der folgenden 14 Tage im peripheren Blut. Allerdings konnte eine deutliche IL-4-Induktion ein bzw. drei Monate nach ADI ausschließlich im KM nicht-reaktiver Patientinnen beobachtet werden. Unabhängig davon waren die KM-T-Zellen sämtlicher behandelter Patientinnen zu diesem Zeitpunkt in der Lage, eine spezifische Th1/Tc1-Reaktion zu induzieren. Hypothetisch könnte es bei nicht-reaktiven Patientinnen, welche gemäß der Einschlusskriterien Tumor-reaktive T-Zellen während des Krankheitsverlaufs akkumuliert hatten, mit der Zeit zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts im Knochenmark gekommen sein. Ein derartiger Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Antwort im peripheren Blut ist beim Nierenkarzinom in Assoziation mit einem fortschreitenden Krankheitsstadium bereits beschrieben worden (Onishi *et al*., 2001). Die genannten Mammakarzinompatientinnen waren durch eine hohe Tumorlast, insbesondere durch Knochenmetastasen, gekennzeichnet. Es ist demnach vorstellbar, dass sich das Zytokinmilieu im Knochenmark als Funktion der fortdauernden Tumorprogression entscheidend veränderte und somit die Generierung einer potentiellen Tumor-gerichteten Th1/Tc1-Differenzierung unterdrückt wurde. So könnte z. B. das von progressiv wachsenden Tumoren sezernierte TGF-β einen negativen Effekt auf die Differenzierung KM-ansässiger Th1-Gedächtnis-T-Zellen (Ludviksson *et al*., 2000) sowie auf die Funktion Antigen-präsentierender Zellen ausüben (Stevens *et al*., 1995; Bonham *et al*., 1996; King *et al*., 1998).

Es kann festgehalten werden, dass der adoptive Transfer reaktivierter KM-Gedächtniszellen in Abhängigkeit von der Zahl transferierter spezifischer Zellen und dem individuellen Krankheitszustand der Patientin zu einer Expansion Tumor-reaktiver T-Zellen *in vivo* führte. Zusätzlich erscheint es wahrscheinlich, dass bei ADI-reaktiven Patientinnen eine Mobilisierung Tumor-reaktiver T-Zellen aus dem Knochenmark erfolgte. Diese eindrücklichen Reaktionen auf die systemische Applikation einer verhältnismäßig geringen Anzahl an Effektorzellen lassen hoffen, dass die expandierten und mobilisierten Tumor-reaktiven T-Zellen die Potenz besitzen, residuale Tumornester zu erreichen.

Aufgrund der Beobachtung, dass eine mögliches Therapieansprechen mit der Anzahl reaktiver, transferierter Zellen assoziert war, sollte ein optimiertes Stimulationsprotokoll etabliert werden, das eine Generierung größerer Mengen potenter Effektorzellen ermöglicht. So weisen die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen darauf hin, dass durch den Einsatz der Zytokine IL-7 und IL-15 die Anzahl Tumor-reaktiver Gedächtniszellen *in vitro* deutlich erhöht werden kann (siehe 4.6). Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit dieses Therapieansatzes könnte die Verwendung Brustkrebs-assoziierter Antigene in Form definierter Proteine zur Stimulation darstellen. Es ist nicht auszuschließen, dass T-Zellen in den Stimulationskulturen zu einem gewissen Teil primär aktiviert werden. Daher würde ein zur Reaktivierung genau definiertes Proteinprofil aus *common shared* Tumorantigenen (in Kombination mit geeigneten Adjuvantien zur effektiven Aktivierung der beteiligten Dendritischen Zellen) ein *Priming* gegen Autoantigene verhindern, die sowohl im allogenen Zelllysat (MCF-7) als auch im autologen Tumorlysat enthalten sind. Auf diese Art und Weise könnte das Immunsystem eventuell noch zielgerichteter zu Gunsten einer Antitumorantwort manipuliert werden.
Eine Phase II Studie, die als Fortsetzung der dieser Arbeit zu Grunde liegenden klinischen Studie geplant ist, soll Aufschluss darüber geben, ob die reaktivierten T-Zellen tatsächlich das Tumorgewebe erreichen und ob diese in der Lage sind, eine beständige Antitumorreaktivität *in situ* zu etablieren.

5.3 Tumor-reaktive T-Zellen des Knochenmarks beim Malignen Melanom

Die Tatsache, dass Tumor-spezifische T-Zellen zu hohen Frequenzen im peripheren Blut von Melanompatienten nachgewiesen werden können, weist auf eine aktive Auseinandersetzung des zellulären Immunsystems mit diesem Tumor hin. In dieser Arbeit ließen sich Tumor-reaktive Gedächtniszellen nicht nur im peripheren Blut sondern auch zu 21 % in Knochenmarkaspiraten von Melanompatienten detektieren (siehe 4.7). Dabei schien die Präsenz Tumor-reaktiver T-Zellen in einem T-Zellkompartiment unabhängig von der Frequenz solcher Zellen im jeweils anderen zu sein. Anhand von Mausexperimenten konnte bereits demonstriert werden, dass Gedächtniszellen in den Kompartimenten angereichert werden, in denen sie generiert wurden bzw. wo der initiale Kontakt zwischen APZ und

kognitiver T-Zelle stattgefunden hat (Mullins *et al*., 2003). Zudem scheinen aus bestimmten Organen isolierte Gedächtnis-T-Zellpopulationen nach adoptivem Transfer aus dem peripheren Blut wieder präferentiell in ihre Ursprungsorgane zu migrieren (Masopust *et al*., 2004). Ein solches Kompartiment-spezifisches immunologisches Gedächtnis könnte somit die beobachtete Polarisierung Tumor-reaktiver T-Zellpopulationen bei verschiedenen Patienten erklären. Alternativ ist vorstellbar, dass bei bestimmten Patienten KM-ansässige Tumor-reaktiven T-Zellen spontan oder als Reaktion auf eine Tumorzell-induzierte Aktivierung von dort freigesetzt wurden und in verschiedene T-Zellkompartimente migrierten. Eine derartige Mobilisierung Tumor-reaktiver Zellen konnte nach adoptivem Transfer reaktivierter KM-Gedächtniszellen beim metastasierten Mammakarzinom in der Tat beobachtet werden (siehe 5.2.3).

Kürzlich berichtete eine andere Gruppe von Tumor-reaktiven KM-T-Zellen beim Malignen Melanom (Letsch *et al*., 2003). Hier konnten in allen von insgesamt fünf untersuchten Melanompatienten Tumor-reaktive $CD8^+$ T-Zellen mit Hilfe einer intrazellulären Zytokinfärbung in Kombination mit einer Tetrameranalyse detektiert werden. Vier der fünf reaktiven Patienten waren ebenfalls im Stadium IV der Melanomerkrankung, was sich somit größtenteils mit unseren Beobachtungen deckte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass fünf der von uns untersuchten Patienten mit detektierbarer Tumorreaktivität im Knochenmark durch eine nachweisbare Tumormanifestation gekennzeichnet waren. Zudem lag die LDH-Konzentration, ein Kennzeichen eines erhöhten Tumorzellumsatzes, in dieser Gruppe signifikant über derjenigen der Gruppe ohne Tumor-reaktive Gedächtniszellen (siehe 8.2.8). Im Gegensatz zu den T-Zellen im Knochenmark konnte ein solcher Zusammenhang zwischen Tumormanifestation und dem Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen im peripheren Blut wiederum nicht festgestellt werden.

5.4 Die Entstehung Tumor-reaktiver T-Zellen: Ein Vergleich von Mammakarzinom und Malignem Melanom

Verglichen mit vorrangegangenen Ergebnissen fällt auf, dass der Anteil der Melanompatienten mit nachweislichen Tumor-reaktiven T-Zellen im Knochenmark geringer erscheint, als derjenige reaktiver Mammakarzinompatientinnen. Während reaktive T-Zellen bei Mammakarzinompatientinnen bereits in frühen Stadien detektierbar waren, konnte eine

vergleichbare Reaktivität im Knochenmark von Melanompatienten der Stadien I-III (regionale Begrenzung der Tumorerkrankung) nicht gefunden werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Präsenz Tumor-reaktiver KM-T-Zellen beim Malignen Melanom eindeutig mit dem Krankheitsstadium assoziiert war (Müller-Berghaus *et al*., in Revision). So konnte eine Reaktivität ausschließlich in Melanompatienten im fortgeschrittenem Stadium mit Fernmetastasierung (Stadium IV) festgestellt werden. Die ermittelten Frequenzen Tumor-reaktiver Zellen lagen dabei in einem vergleichbaren Intervall zu demjenigen, das bei Mammakarzinompatientinnen evaluiert wurde. Im Gegensatz zum Knochenmark, wurde bei der PB-T-Zellreaktivität keine Korrelation mit dem Krankheitsstadium der Melanompatienten erkennbar. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Melanom-reaktive PB-T-Zellen möglicherweise bereits in früheren Stadien in Tumor-drainierenden Lymphknoten induziert werden, die dann im Blut zirkulieren.

Dies wirft die Frage auf, wo die Generierung Tumor-reaktiver Gedächtniszellen stattfindet und ob die Anwesenheit von Tumorzellen *in situ* zur Induktion bzw. Erhaltung Tumor-reaktiver T-Zellen beiträgt. Falls das KM-Reservoir dieser Zellen ausschließlich durch eingewanderte PB-T-Zellen gebildet wird, sollten diese, ähnlich wie im Blut, auch bei Frühstadien nachweisbar sein. Es gibt Hinweise, dass T-Zellen, die im Lymphknoten oder in der Milz primär aktiviert wurden, ins Knochenmark einwandern (Masopust *et al*., 2001; Di Rosa *et al*., 2003). Eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen könnte aber auch direkt im Knochenmark stattfinden (Tripp *et al*., 1997; Feuerer *et al*., 2003). Dies setzt allerdings voraus, dass genügend Tumorantigen dorthin gelangt. Basierend auf den vorliegenden Daten ist es vorstellbar, dass dies nur im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung der Fall ist. Die Tatsache, dass eine Metastasierung ins Knochenmark beim Malignen Melanom bislang nur bei Patienten im Spätstadium beobachtet wurde, könnte unsere Theorie unterstützen (Meyers *et al*., 1998; Schadendorf *et al*., 2003). Beim Mammakarzinom stellt sich die Situation hingegen anders dar. Hier kommt es schon früh zu einer Metastasierung ins Knochenmark (Müller und Pantel, 2004), wodurch erklärbar wäre, warum ein Tumor-reaktives Gedächtniszellreservoir bei Mammakarzinompatientinnen teilweise schon zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors nachweisbar ist.

Zusätzlich war der Nachweis Tumor-reaktiver T-Zellen im Knochenmark, jedoch nicht im peripheren Blut, mit einem signifikant günstigeren Krankheitsverlauf der Spätstadien-Melanompatienten korreliert (Müller-Berghaus *et al*., in Revision). Dies konnte unabhängig von der jeweils vorangegangenen Therapie beobachtet werden. Auch die von Letsch *et al*. (2003) untersuchten Melanompatienten zeichneten sich durch eine außerordentlich günstige

Überlebensprognose aus. Dies spricht für eine prognostische Bedeutung Tumor-reaktiver KM-T-Zellen beim Malignen Melanom. Weitere Daten aus unserer Gruppe zu anderen Malignomen weisen daraufhin, dass das Vorkommen Tumor-reaktiver T-Zellen in lymphatischen Organen, nicht aber im peripheren Blut, mit der Prognose der Patienten korreliert ist (unveröffentlichte Ergebnisse, P. Beckhove). Trotz dieser Korrelation kann nicht abschließend geklärt werden, ob die bessere Prognose auf eine funktionelle Aktivität der T-Zellen zurückzuführen ist oder lediglich eine Folge einer günstigeren tumorbiologischen Konstellation darstellt.

6. Literaturverzeichnis

Ahlert, T., W. Sauerbrei, *et al*. (1997). "Tumor-cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus-modified cancer vaccines in patients with breast or ovarian cancer." J Clin Oncol 15(4): 1354-66.

Akbar, A. N., M. Salmon, *et al*. (1993). "A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory--a 'balancing act' between cell death and survival." Immunol Today 14(11): 526-32.

Allison, A. C. (2000). "Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward." Immunopharmacology 47(2-3): 63-83.

Angelini, G., S. Gardella, *et al*. (2002). "Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1491-6.

Atkins, M. B. (2002). "Interleukin-2: clinical applications." Semin Oncol 29(3 Suppl 7): 12-7.

Bai, L., P. Beckhove, *et al*. (2003). "Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo." Int J Cancer 103(1): 73-83.

Bai, L., M. Feuerer, *et al*. (2002). "Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells." Int J Oncol 20(2): 247-53.

Bain, B. J., D. M. Clark, *et al*. (2001) “Bone marrow pathology.” 3rd edition. Blackwell, Oxford: 30-115

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392(6673): 245-52.

Baral, E., E. Nagy, *et al*. (2000). "Suppression of lymphocyte mitogenesis by tamoxifen: studies on protein kinase C, calmodulin and calcium." Neuroimmunomodulation 7(2): 68-76.

Basu, S., R. J. Binder, *et al*. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol 12(11): 1539-46.

Becker, T. C., E. J. Wherry, *et al*. (2002). "Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells." J Exp Med 195(12): 1541-8.

Beckhove, P., M. Feuerer, *et al*. (2004). "Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors." J Clin Invest 114(1): 67-76.

Ben-Efraim, S., S. Shoval, *et al*. (1986). "The difference between 5-fluorouracil and melphalan in their ability to promote antitumor immune response against MOPC-315 plasmacytoma." Cancer Immunol Immunother 22(1): 43-8.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, *et al*. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature 393(6684): 478-80.

Bjorck, P. (2004). "Dendritic cells exposed to herpes simplex virus in vivo do not produce IFN-alpha after rechallenge with virus in vitro and exhibit decreased T cell alloreactivity." J Immunol 172(9): 5396-404.

Bonadonna, G., G. N. Hortobagyi *et al*.(1997).”Textbook of breast cancer, a clinical guide to therapy.” Martin Dunitz Ltd; UK

Bonham, C. A., L. Lu, *et al*. (1996). "TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells." Transpl Immunol 4(3): 186-91.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-54.

Brocker, T. (1997). "Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." J Exp Med 186(8): 1223-32.

Calhoun, R. F., 2nd, B. Naziruddin, *et al*. (2000). "Evidence for cytotoxic T lymphocyte response against human lung cancer: reconstitution of antigenic epitope with peptide eluted from lung adenocarcinoma MHC class I." Surgery 128(1): 76-85.

Callahan, R. (1996). "MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer." Breast Cancer Res Treat 39(1): 33-44.

Cella, M., D. Scheidegger, *et al*. (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med 184(2): 747-52.

Chang, A. E., H. Yoshizawa, *et al*. (1993). "Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T-lymphocytes secondarily sensitized to tumor in vitro." Cancer Res 53(5): 1043-50.

Cho, B. K., V. P. Rao, *et al*. (2000). "Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells." J Exp Med 192(4): 549-56.

Cho, B. K., C. Wang, *et al*. (1999). "Functional differences between memory and naive CD8 T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 2976-81.

Chuang, L. T., E. Lotzova, *et al*. (1993). "Effect of new investigational drug taxol on oncolytic activity and stimulation of human lymphocytes." Gynecol Oncol 49(3): 291-8.

Chuang, L. T., E. Lotzova, *et al*. (1994). "Alteration of lymphocyte microtubule assembly, cytotoxicity, and activation by the anticancer drug taxol." Cancer Res 54(5): 1286-91.

Ciaiolo, C., D. Ferrero, *et al*. (1988). "Enhancement of methotrexate cytotoxicity by modulation of proliferative activity in normal and neoplastic T lymphocytes and in a myeloid leukemia cell line." Tumori 74(5): 537-42.

Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." Clin Orthop Relat Res(262): 3-11.

Coligan, J. (1991). “Current protocols in immunology, 1st ed., Greene Pup. Ass. and Wiley Interscience.

Comoli, P., M. Labirio, *et al*. (2002). "Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication." Blood 99(7): 2592-8.

Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." Annu Rev Immunol 15: 297-322.

Demicheli, R. (2001). "Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer." Semin Cancer Biol 11(4): 297-306.

Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky, *et al*. (2002). "T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13009-13.

Di Rosa, F. and A. Santoni (2003). "Memory T-cell competition for bone marrow seeding." Immunology 108(3): 296-304.

Diel, I. J., E. F. Solomayer, *et al*. (2000). "Treatment of metastatic bone disease in breast cancer: bisphosphonates." Clin Breast Cancer 1(1): 43-51.

Donawho, C. K., M. W. Pride, *et al*. (2001). "Persistence of immunogenic pulmonary metastases in the presence of protective anti-melanoma immunity." Cancer Res 61(1): 215-21.

Dudley, M. E. and S. A. Rosenberg (2003). "Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer." Nat Rev Cancer 3(9): 666-75.

Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, *et al*. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science 298(5594): 850-4.

Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, *et al*. (2002). "A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma." J Immunother 25(3): 243-51.

Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2002). "Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1107-9.

Ehl, S., J. Hombach, *et al*. (1997). "Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model." J Exp Med 185(7): 1241-51.

Enk, A. H., H. Jonuleit, *et al*. (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." Int J Cancer 73(3): 309-16.

Feuerer, M., P. Beckhove, *et al*. (2001). "Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow." Nat Med 7(4): 452-8.

Feuerer, M., P. Beckhove, *et al*. (2003). "Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen." Nat Med 9(9): 1151-7.

Feuerer, M., P. Beckhove, *et al*. (2004). "Bone marrow microenvironment facilitating dendritic cell: CD4 T cell interactions and maintenance of CD4 memory." Int J Oncol 25(4): 867-76.

Feuerer, M., M. Rocha, *et al*. (2001). "Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients." Int J Cancer 92(1): 96-105.

Frank, M. H., M. D. Denton, *et al*. (2001). "Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro." J Immunol 166(4): 2451-9.

Friesen, C., I. Herr, *et al*. (1996). "Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells." Nat Med 2(5): 574-7.

Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol 13(1): 114-9.

Gao, F. G., V. Khammanivong, *et al*. (2002). "Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell." Cancer Res 62(22): 6438-41.

Garbe, C. (2002). "A rational approach to the follow-up of melanoma patients." Recent Results Cancer Res 160: 205-15.

Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, *et al*. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours." Immunol Today 18(2): 89-95.

Gately, M. K., L. M. Renzetti, *et al*. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." Annu Rev Immunol 16: 495-521.

Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, *et al*. (2005). "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells." J Clin Invest 115(6): 1616-26.

Geginat, J., F. Sallusto, *et al*. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." J Exp Med 194(12): 1711-9.

Genestier, L., R. Paillot, *et al*. (1998). "Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells." J Clin Invest 102(2): 322-8.

Gilboa, E. (1999). "The makings of a tumor rejection antigen." Immunity 11(3): 263-70.

Glimcher, L. H. and H. Singh (1999). "Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together." Cell 96(1): 13-23.

Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." Nature 402(6759): 255-62.

Goldrath, A. W., L. Y. Bogatzki, *et al*. (2000). "Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation." J Exp Med 192(4): 557-64.

Goldrath, A. W., P. V. Sivakumar, *et al*. (2002). "Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells." J Exp Med 195(12): 1515-22.

Griffiths, G. M. (1995). "The cell biology of CTL killing." Curr Opin Immunol 7(3): 343-8.

Hakim, F. T., R. Cepeda, *et al*. (1997). "Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells." Blood 90(9): 3789-98.

Hansson, L., H. Rabbani, *et al*. (2003). "T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma." Blood 101(12): 4930-6.

Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol 19: 47-64.

Henkart, P. A. (1994). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules." Immunity 1(5): 343-6.

Hermans, I. F., D. S. Ritchie, *et al*. (2000) "FCD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity." J Immunol. 15; 164(6): 3095-101

Hicklin, D. J., F. M. Marincola, *et al*. (1999). "HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story." Mol Med Today 5(4): 178-86.

Hickman, J. A. (1992). "Apoptosis induced by anticancer drugs." Cancer Metastasis Rev 11(2): 121-39.

Hortobagyi, G. N. and E. A. Perez (2001). "Integration of trastuzumab into adjuvant systemic therapy of breast cancer: ongoing and planned clinical trials." Semin Oncol 28(5 Suppl 16): 41-6.

Hosken, N. A., K. Shibuya, *et al*. (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model." J Exp Med 182(5): 1579-84.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, *et al*. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science 260(5107): 547-9.

Ibelgaufts, H. (1995). „Dictionary of Cytokines." VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland,

Iezzi, G., K. Karjalainen, *et al*. (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." Immunity 8(1): 89-95.

Iezzi, G., E. Scotet, *et al*. (1999). "The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization." Eur J Immunol 29(12): 4092-101.

Ito, M., S. Shichijo, *et al*. (2001). "Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells." Cancer Res 61(5): 2038-46.

Jager, E., S. Gnjatic, *et al*. (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers." Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12198-203.

Jelley-Gibbs, D. M., J. P. Dibble, *et al*. (2005). "Repeated stimulation of CD4 effector T cells can limit their protective function." J Exp Med 201(7): 1101-12.

Johnston, J. V., A. R. Malacko, *et al*. (1996). "B7-CD28 costimulation unveils the hierarchy of tumor epitopes recognized by major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytolytic T lymphocytes." J Exp Med 183(3): 791-800.

Kageshita, T., S. Hirai, *et al*. (1999). "Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression." Am J Pathol 154(3): 745-54.

Kalinski, P., C. M. Hilkens, *et al*. (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." Immunol Today 20(12): 561-7.

Khazaie, K., S. Prifti, *et al*. (1994). "Persistence of dormant tumor cells in the bone marrow of tumor cell-vaccinated mice correlates with long-term immunological protection." Proc Natl Acad Sci U S A 91(16): 7430-4.

Kiener, P. A., P. Moran-Davis, *et al*. (1995). "Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes." J Immunol 155(10): 4917-25.

Kieper, W. C., J. T. Tan, *et al*. (2002). "Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells." J Exp Med 195(12): 1533-9.

King, C., J. Davies, *et al*. (1998). "TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype." Immunity 8(5): 601-13.

Kirkwood, J. M. and A. A. Tarhini (2003). "Adjuvant high-dose interferon-alpha therapy for high-risk melanoma." Forum (Genova) 13(2): 127-40; quiz 187-8.

Klebanoff, C. A., L. Gattinoni, *et al*. (2005). "Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 102(27): 9571-6.

Kolb, H. J., A. Schattenberg, *et al*. (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients." Blood 86(5): 2041-50.

Kuchroo, V. K., M. P. Das, *et al*. (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." Cell 80(5): 707-18.

Langenkamp, A., G. Casorati, *et al*. (2002). "T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification." Eur J Immunol 32(7): 2046-54.

Langenkamp, A., M. Messi, *et al*. (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat Immunol 1(4): 311-6.

Langrish, C. L., B. S. McKenzie, *et al*. (2004). "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity." Immunol Rev 202: 96-105.

Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation." Curr Opin Immunol 12(1): 92-8.

Lee, P. P., C. Yee, *et al*. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." Nat Med 5(6): 677-85.

Lempicki, R. A., J. A. Kovacs, *et al*. (2000). "Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients." Proc Natl Acad Sci U S A 97(25): 13778-83.

Letsch, A., U. Keilholz, *et al*. (2003). "Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells." Cancer Res 63(17): 5582-6.

Letsch, A., U. Keilholz, *et al*. (2000). "High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma." Int J Cancer 87(5): 659-64.

Liu, Y. J., H. Kanzler, *et al*. (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol 2(7): 585-9.

Loyer, V., P. Fontaine, *et al*. (1999). “The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and / or MHC differences is regulated by CTLs spcific for immundominant class I-associated epitopes.” J Immunol. 15; 163(12): 6462-7

Ludviksson, B. R., D. Seegers, *et al*. (2000). "The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells." Eur J Immunol 30(7): 2101-11.

Macatonia, S. E., N. A. Hosken, *et al*. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." J Immunol 154(10): 5071-9.

Mackall, C. L., T. A. Fleisher, *et al*. (1994). "Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer." Blood 84(7): 2221-8.

Mackensen, A., T. Krause, *et al*. (1999). "Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells." Cancer Immunol Immunother 48(2-3): 118-22.

Maeurer, M. J., S. M. Gollin, *et al*. (1996). "Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen." J Clin Invest 98(7): 1633-41.

Mansi, J. L., H. Gogas, *et al*. (1999). "Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study." Lancet 354(9174): 197-202.

Marincola, F. M., E. M. Jaffee, *et al*. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." Adv Immunol 74: 181-273.

Marzo, A. L., B. F. Kinnear, *et al*. (2000). "Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity." J Immunol 165(11): 6047-55.

Masopust, D., V. Vezys, *et al*. (2001). "Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue." Science 291(5512): 2413-7.

Masopust, D., V. Vezys, *et al*. (2004). "Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin." J Immunol 172(8): 4875-82.

Matzinger, P. (1998). "An innate sense of danger." Semin Immunol 10(5): 399-415.

Mazo, I. B., M. Honczarenko, *et al*. (2005). "Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells." Immunity 22(2): 259-70.

McCoy, J. L., R. Rucker, *et al*. (2000). "Cell-mediated immunity to tumor-associated antigens is a better predictor of survival in early stage breast cancer than stage, grade or lymph node status." Breast Cancer Res Treat 60(3): 227-34.

McNally, J. M., C. C. Zarozinski, *et al*. (2001). "Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses." J Virol 75(13): 5965-76.

Meyers, M. L., and C. M. Balch (1998). “Diagnosis and treatment of metastatic melanoma.” In: C. M. Balch, A. N. Houghton, A. J. Sober and S. J. Soong (eds.) “Cutaneous Melanoma” Third edition, pp. 325-372. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc.

Michie, C. A., A. McLean, *et al*. (1992). "Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms." Nature 360(6401): 264-5.

Mire-Sluis, A. R. and R. Thorpe (1998). "Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines." J Immunol Methods 211(1-2): 199-210.

Mocellin, S., G. A. Ohnmacht, *et al*. (2001). "Kinetics of cytokine expression in melanoma metastases classifies immune responsiveness." Int J Cancer 93(2): 236-42.

Mocellin, S., M. C. Panelli, *et al*. (2003). "The dual role of IL-10." Trends Immunol 24(1): 36-43.

Mocellin, S., E. Wang, *et al*. (2001). "Cytokines and immune response in the tumor microenvironment." J Immunother 24(5): 392-407.

Mohr, P., M. Weichenthal, *et al*. (2003). "Adjuvant therapy in melanoma." Onkologie 26(3): 227-33.

Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, *et al*. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol 19: 683-765.

Mor, G., F. Kohen, *et al*. (2000). "Regulation of fas ligand expression in breast cancer cells by estrogen: functional differences between estradiol and tamoxifen." J Steroid Biochem Mol Biol 73(5): 185-94.

Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 7: 145-73.

Müller-Berghaus, J. and K. Ehlert, *et al*. "Melanoma-reavtive T cells in the bone marrow of melanoma patients: Association with disease stage and disease duration." Cancer Res, in revision

Muller, M., F. Gounari, *et al*. (1998). "EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells." Cancer Res 58(23): 5439-46.

Muller, V. and K. Pantel (2004). "Bone marrow micrometastases and circulating tumor cells: current aspects and future perspectives." Breast Cancer Res 6(6): 258-61.

Mullins, D. W., S. L. Sheasley, *et al*. (2003). "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control." J Exp Med 198(7): 1023-34.

Mullins, D. W., T. M. Walker, *et al*. (1997). "Taxol-mediated changes in fibrosarcoma-induced immune cell function: modulation of antitumor activities." Cancer Immunol Immunother 45(1): 20-8.

Mundy, G. R. (2002). "Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer 2(8): 584-93.

Munkarah, A., L. Chuang, *et al*. (1994). "Comparative studies of taxol and taxotere on tumor growth and lymphocyte functions." Gynecol Oncol 55(2): 211-6.

Nagorsen, D., U. Keilholz, *et al*. (2000). "Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer." Cancer Res 60(17): 4850-4.

Novellino, L., C. Castelli, *et al*. (2005). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update." Cancer Immunol Immunother 54(3): 187-207.

Odermatt, B., M. Eppler, *et al*. (1991). "Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure." Proc Natl Acad Sci U S A 88(18): 8252-6.

Onishi, T., Y. Ohishi, *et al*. (2001). "An assessment of the immunological status of patients with renal cell carcinoma based on the relative abundance of T-helper 1- and -2 cytokine-producing CD4+ cells in peripheral blood." BJU Int 87(9): 755-9.

Osmond, D. G. (1994). "Production and selection of B lymphocytes in bone marrow: lymphostromal interactions and apoptosis in normal, mutant and transgenic mice." Adv Exp Med Biol 355: 15-20.

Pawelec, G. and C. Gouttefangeas (2004). "Strategies for immune therapy: Wurzburg, Germany, 29 February-3 March 2004." Cancer Immunol Immunother 53(8): 755-8.

Peguet-Navarro, J., C. Dalbiez-Gauthier, *et al*. (1995). "Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells." J Immunol 155(9): 4241-7.

Peiper, M., T. Sato, *et al*. (2002). "Cytotoxic T lymphocyte mediated recognition of human pancreatic cancer cells." Int J Cancer 99(1): 88-92.

Peng, L., S. Shu, *et al*. (1997). "Treatment of subcutaneous tumor with adoptively transferred T cells." Cell Immunol 178(1): 24-32.

Perez-Diez, A. and F. M. Marincola (2002). "Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players." Cell Mol Life Sci 59(2): 230-40.

Pomer, S., R. Thiele, *et al*. (1995). "[Tumor vaccination in renal cell carcinoma with and without interleukin-2 (IL-2) as adjuvant. A clinical contribution to the development of effective active specific immunization]." Urologe A 34(3): 215-20.

Posovszky, C., C. Friesen, *et al*. (1999). "Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis." Leukemia 13(3): 400-9.

Powell, D. J., Jr., M. E. Dudley, *et al*. (2005). "Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy." Blood 105(1): 241-50.

Ridge, J. P., E. J. Fuchs, *et al*. (1996). "Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells." Science 271(5256): 1723-6.

Rivoltini, L., M. Carrabba, *et al*. (2002). "Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction." Immunol Rev 188: 97-113.

Robbins, P. F., M. E. Dudley, *et al*. (2004). "Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy." J Immunol 173(12): 7125-30.

Rooney, C. M., C. A. Smith, *et al*. (1998). "Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients." Blood 92(5): 1549-55.

Rosenberg, S. A. (1999). "A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance." CA Cancer J Clin 49(2): 70-3, 65.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, *et al*. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." N Engl J Med 313(23): 1485-92.

Sakaguchi, S. (2000). "Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases." Curr Opin Immunol 12(6): 684-90.

Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." Cell 101(5): 455-8.

Sallusto, F., D. Lenig, *et al*. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-12.

Santana, M. A. and Y. Rosenstein (2003). "What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms." J Cell Physiol 195(3): 392-401.

Sauter, B., M. L. Albert, *et al*. (2000). "Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells." J Exp Med 191(3): 423-34.

Scanlan, M. J., A. O. Gure, *et al*. (2002). "Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy." Immunol Rev 188: 22-32.

Schadendorf, D., A. Dorn-Beineke, *et al*. (2003). "Limitations of the immunocytochemical detection of isolated tumor cells in frozen samples of bone marrow obtained from melanoma patients." Exp Dermatol 12(2): 165-71.

Schirrmacher, V. (2005). "Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection: improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory." Cancer Immunol Immunother 54(6): 587-98.

Schirrmacher, V., T. Ahlert, *et al*. (1998). "Immunization with virus-modified tumor cells." Semin Oncol 25(6): 677-96.

Schirrmacher, V., M. Feuerer, *et al*. (2002). "T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia 7(2): 201-8.

Schirrmacher, V., M. Feuerer, *et al*. (2003). "T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity." Trends Mol Med 9(12): 526-34.

Schirrmacher, V. and C. Haas (1998). "Modification of cancer vaccines by virus infection and attachment of bispecific antibodies. An effective alternative to somatic gene therapy." Adv Exp Med Biol 451: 251-7.

Schirrmacher, V., H. J. Schild, *et al*. (1993). "Tumour-specific CTL response requiring interactions of four different cell types and recognition of MHC class I and class II restricted tumour antigens." Immunol Cell Biol 71 (Pt 4): 311-26.

Schirrmacher, V., P. Schlag, *et al*. (1993). "Specific immunotherapy of colorectal carcinoma with Newcastle-disease virus-modified autologous tumor cells prepared from resected liver metastasis." Ann N Y Acad Sci 690: 364-6.

Schluns, K. S., K. Williams, *et al*. (2002). "Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells." J Immunol 168(10): 4827-31.

Schneeweiss, A., J. Huober, *et al*. (2004). "Gemcitabine, epirubicin and docetaxel as primary systemic therapy in patients with early breast cancer: results of a multicentre phase I/II study." Eur J Cancer 40(16): 2432-8.

Schoenberger, S. P., R. E. Toes, *et al*. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature 393(6684): 480-3.

Schwendemann, J., C. Choi, *et al*. (2005). "Dynamic Differentiation of Activated Human Peripheral Blood CD8+ and CD4+ Effector Memory T Cells." J Immunol 175(3): 1433-9.

Seder, R. A. and W. E. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol 12: 635-73.

Shih, W. W., R. W. Baumhefner, *et al*. (1983). "Difference in effect of single immunosuppressive agents (cyclophosphamide, CCNU, 5-FU) on peripheral blood immune cell parameters and central nervous system immunoglobulin synthesis rate in patients with multiple sclerosis." Clin Exp Immunol 53(1): 122-32.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol 2(3): 151-61.

Singh-Jasuja, H., H. U. Scherer, *et al*. (2000). "The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor." Eur J Immunol 30(8): 2211-5.

Sipkins, D. A., X. Wei, *et al*. (2005). "In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment." Nature 435(7044): 969-73.

Slamon, D. J., G. M. Clark, *et al*. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science 235(4785): 177-82.

Smyth, M. J., D. I. Godfrey, *et al*. (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol 2(4): 293-9.

Solomayer, E. F., M. Feuerer, *et al*. (2003). "Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer." Clin Cancer Res 9(1): 174-80.

Soule, H. D., J. Vazguez, *et al*. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst 51(5): 1409-16.

Squier, M. K. and J. J. Cohen (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol 6(3): 447-52.

Stevens, S. R., A. Shibaki, *et al*. (1995). "Suppressor T cell-activating macrophages in ultraviolet-irradiated human skin induce a novel, TGF-beta-dependent form of T cell activation characterized by deficient IL-2r alpha expression." J Immunol 155(12): 5601-7.

Sun, J. C., M. A. Williams, *et al*. (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." Nat Immunol 5(9): 927-33.

Suzuki, N., Y. Maeda, *et al*. (2002). "Detection of peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer." Int J Cancer 98(1): 45-50.

Tan, R., X. Xu, *et al*. (1999). "Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome." Blood 93(5): 1506-10.

Tanchot, C., F. A. Lemonnier, *et al*. (1997). "Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells." Science 276(5321): 2057-62.

Tanchot, C. and B. Rocha (1997). "Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output." J Exp Med 186(7): 1099-106.

Termeer, C. C., V. Schirrmacher, *et al*. (2000). "Newcastle disease virus infection induces B7-1/B7-2-independent T-cell costimulatory activity in human melanoma cells." Cancer Gene Ther 7(2): 316-23.

Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol 164(1): 183-90.

Thurner, B., I. Haendle, *et al*. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med 190(11): 1669-78.

Tough, D. F. and J. Sprent (1994). "Turnover of naive- and memory-phenotype T cells." J Exp Med 179(4): 1127-35.

Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol 13: 251-76.

Trinchieri, G. (1995). "The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells." Ciba Found Symp 195: 203-14; discussion 214-20.

Trinchieri, G. and P. Scott (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions." Res Immunol 146(7-8): 423-31.

Tripp, R. A., D. J. Topham, *et al*. (1997). "Bone marrow can function as a lymphoid organ during a primary immune response under conditions of disrupted lymphocyte trafficking." J Immunol 158(8): 3716-20.

Tuma, R. A. and E. G. Pamer (2002). "Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells." Curr Opin Immunol 14(3): 348-53.

Valmori, D., V. Dutoit, *et al*. (2000). "Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients." Cancer Res 60(16): 4499-506.

Valmori, D., C. Scheibenbogen, *et al*. (2002). "Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity." Cancer Res 62(6): 1743-50.

van der Bruggen, P., C. Traversari, *et al*. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science 254(5038): 1643-7.

Van Der Bruggen, P., Y. Zhang, *et al*. (2002). "Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells." Immunol Rev 188: 51-64.

Veiga-Fernandes, H., U. Walter, *et al*. (2000). "Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo." Nat Immunol 1(1): 47-53.

Vicari, A. P. and G. Trinchieri (2004). "Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth?" Immunol Rev 202: 223-36.

von Bernstorff, W., R. A. Spanjaard, *et al*. (1999). "Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand." Surgery 125(1): 73-84.

von Bernstorff, W., M. Voss, *et al*. (2001). "Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients." Clin Cancer Res 7(3 Suppl): 925s-932s.

von Hoegen, P., R. Zawatzky, *et al*. (1990). "Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. III. Potentiation of tumor-specific cytolytic T cell activity via induction of interferon-alpha/beta." Cell Immunol 126(1): 80-90.

Walter, E. A., P. D. Greenberg, *et al*. (1995). "Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor." N Engl J Med 333(16): 1038-44.

Wang, R. F. (1999). "Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development." J Mol Med 77(9): 640-55.

Wang, R. F. (2003). "Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells." Methods 29(3): 227-35.

Wang, S. C., L. Zhang, *et al*. (2001). "Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients." Semin Oncol 28(6 Suppl 18): 21-9.

Winter, H., H. M. Hu, *et al*. (2003). "Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies." Immunology 108(3): 409-19.

Wojtowicz-Praga, S. (1997). "Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy." J Immunother 20(3): 165-77.

Yee, C., J. A. Thompson, *et al*. (2002). "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 16168-73.

Yee, C., J. A. Thompson, *et al*. (2000). "Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo." J Exp Med 192(11): 1637-44.

Yoo, Y. K., D. S. Heo, *et al*. (1990). "Tumor-infiltrating lymphocytes from human colon carcinomas. Functional and phenotypic characteristics after long-term culture in recombinant interleukin 2." Gastroenterology 98(2): 259-68.

Yu, P., Y. Lee, *et al*. (2005). "Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors." J Exp Med 201(5): 779-91.

Yu, P., M. T. Spiotto, *et al*. (2003). "Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells." J Exp Med 197(8): 985-95.

Zielinski, C. C., C. Muller, *et al*. (1990). "Effects of adjuvant chemotherapy on specific and non-specific immune mechanisms." Acta Med Austriaca 17(1): 11-4.

Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, *et al*. (1996). "On immunological memory." Annu Rev Immunol 14: 333-67.

7. Anhang

7.1 Zytostatische Therapieregime

7.1.1 Gemcitabin/ Epirubicin/ Docetaxel (GEDoc)

Epirubicin (Farmorubicin®)	1 Std.-Inf.	90 mg/ m^2	Tag 1
Docetaxel (Taxotere®)	1 Std.-Inf.	75 mg/ m^2	Tag 1
Gemcitabin (Gemzar®)	30 min.-Inf.	800 mg/ m^2	Tag 1+8
Wiederholung			Tag 22

7.1.2 Cyclophosphamid/ Methotrexat/ 5´-Fluoruracil (CMF)

Methotrexat	15 min.-Inf.	40 mg/m^2	Tag 1+8
Cyclophosphamid (Endoxan®)	1 Std.-Inf.	600 mg/m^2	Tag 1+8
5´-Fluoruracil (Fluoroblastin®)	1 Std.-Inf.	600 mg/m^2	Tag 1+8
Wiederholung			Tag 29

7.1.3 Epirubicin/ Cyclophosphamid (EC)

Epirubicin (Farmorubicin®)	1 Std.-Inf.	90 mg/m^2	Tag 1
Cyclophosphamid (Endoxan®)	1 Std.-Inf.	600 mg/m^2	Tag 1
Wiederholung			Tag 22

7.1.4 Epirubicin/ Docetaxel/ Cyclophosphamid (EDC)

Epirubicin (Farmorubicin®)	1 Std.-Inf.	90 mg/m^2	Tag 1
Docetaxel (Taxotere®)	1 Std.-Inf.	75 mg/m^2	Tag 1
Cyclophosphamid (Endoxan®)	1 Std.-Inf.	600 mg/m^2	Tag 1
Wiederholung			Tag 22

7.2 Klinische Charakteristika der untersuchten Malignompatienten

7.2.1 Klinische Charakteristika primär operierter Mammakarzinompatientinnen

Kriterium	Spezifizierung	Mittelwert*, Median¥	Anzahl	(in %)
Anzahl der Patienten			166	
Alter (Jahre)		58* [32-79]		
Tumorgröße (T)	1/ 2/ 3/ 4	1¥	75/ 52/ 7/ 4	(54.7/ 37.3/ 5.1/ 2.9)
Lymphknotenstatus (N)	0/ 1/ 2	1¥	28/ 80/ 58	(16.9/ 48.1/ 35)
Histologischer Grad (G)	1/ 2/ 3	1¥	100/ 53/ 8/ 1	(61.3/ 32.5/ 5/ 0.6)
Hormonrezeptor Status	ER-positiv		53	(59)
	PR-positiv		54	(60)
	ER- und PR-positiv		44	(49)
	doppelt negativ		19	(21)
Her2/neu-Expression	positiv/ negativ		30/ 130	(19/ 81)
Tumormarker	CEA (µg/ l)	1.6¥ [0.5-37.7]		
	CA 15-3 (U/ ml)			

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus; G: histologischer Grad; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; Her2/neu-Expression (Angabe zum Zeitpunkt der Diagnose).

7.2.2 Klinische Charakteristika neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen

Kriterium	Spezifizierung	Mittelwert*, Median¥	Anzahl	(in %)
Anzahl der Patienten			35	
Alter (Jahre)		48* (30-65)		
Tumorgröße (T)	1/ 2/ 3/ 4	1-2¥	17/ 13/ 1/ 3	(50/ 38.3/ 2.9/ 8.8)
Lymphknotenstatus (N)	0/ 1/ 2/ 3	0¥	20/ 12/ 1/ 1	(58.8/ 35.3/ 2.9/ 2.9)
Histologischer Grad (G)	1/ 2/ 3	2-3¥	4/ 12/ 17	(12.2/ 36.4/ 51.5)
Hormonrezeptor Status	ER-positiv		27	(79.4)
	PR-positiv		25	(73.5)
	ER- und PR-positiv		21	(61.8)
	doppelt negativ		6	(17.6)
Her2/neu-Expression	positiv/ negativ		8/ 27	(23/ 77)

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus; G: histologischer Grad; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; Her2/neu-Expression (Angabe zum Zeitpunkt der Diagnose).

7.2.3 Klinische Charakteristika adjuvant zytostatisch behandelter Mammakarzinompatientinnen

Pat.	T	N	CHT	+HT	KM-Reaktivität 1. Zeitpunkt (ELISpot)	KM-Reaktivität 2. Zeitpunkt (ELISpot)	CHT-freie Zeit vor 2. KM-Aspiration (m)	Anteil $CD4^+$ GTZ an $CD4^+$ Gesamt (%)	Anteil $CD8^+$ GTZ an $CD8^+$ Gesamt (%)
901	1	0	2x CMF	-	Neg.	Neg.	8	76.21	51.74
792	2	0	3x CMF	Tamoxifen	Pos. (1342/10^6)	Neg.	36	41.62	61.93
758	2	0	3x CMF	-	Neg.	Neg.	36	86.58	47.03
798	2	1	3x CMF	Tamoxifen	Neg.	Pos. (247/10^6)	6	-	-
814	2	0	6x CMF	Tamoxifen	Neg.	Pos. (273/10^6)	4	77.68	49.83
705	2	1	6x CMF	Tamoxifen; Zoladex	Pos. (6240/10^6)	Neg.	22	68.93	40.48
927	2	1	6x CMF	-	Neg.	Neg.	1	75.41	73.42
813	2	0	4x EC	-	Neg.	Neg.	15	55.20	35.77
856	1	0	4x EC	-	Neg.	Pos. (320/10^6)	4	69.36	41.80
759	1	1	4x EC	Zoladex	Pos. (1140/10^6)	Neg.	15	-	-
707	2	1	4x EDC	Tamoxifen	Pos. (1293/10^6)	Pos. (417/10^6)	19	89.83	80.81
	2¥	**0¥**			**36 % Pos.**	**36 % Pos.**	**15 m***	**71.2 %***	**53.6 %***

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus (Angabe zum 1. Zeitpunkt); ¥ Median; * Mittelwert; m: Monat; CHT: Chemotherapie; HT: Hormontherapie; Pos: nachweisliche TZ-Reaktivität im IFN-γ ELISpot-Test, einschließlich Frequenzangabe reaktiver KM-T-Zellen pro 10^6 Gesamt-TZ; Neg: keine nachweisliche TZ-Reaktivität; GTZ: Gedächtnis-T-Zellen (Angabe zum 2. Zeitpunkt).

7.2.4 Klinische Charakteristika adjuvant endokrin behandelter Mammakarzinompatientinnen

Pat.	T	N	HT	+CHT	KM-Reaktivität 1. Zeitpunkt (ELISpot)	KM-Reaktivität 2. Zeitpunkt (ELISpot)	Anteil $CD4^+$ GTZ an $CD4^+$ Gesamt (%)	Anteil $CD8^+$ GTZ an $CD8^+$ Gesamt (%)
719	1	0	Tamoxifen		Pos. ($1300/10^6$)	Pos. ($163/10^6$)	65.20	60.35
723	1	0	Tamoxifen		Neg.	Neg.	76.02	55.20
797	1	0	Tamoxifen		Neg.	Pos. ($370/10^6$)	65.12	61.24
893	1	0	Tamoxifen		Pos. ($600/10^6$)	Pos. ($303/10^6$)	-	-
736	2	0	Tamoxifen		Neg.	Neg.	34.85	19.25
845	2	0	Tamoxifen		Pos. ($206/10^6$)	Pos. ($120/10^6$)	78.19	68.00
846	1	0	Tamoxifen; Evista		Neg.	Neg.	47.07	36.51
932	1	0	Tamoxifen; Arimidex		Neg.	Neg.	63.14	44.70
695	2	0	Tamoxifen; Zoladex	Neoadjuvante CHT (3x CMF)	Pos. ($223/10^6$)	Neg.	63.27	50.63
737	1	0	Zoladex		Neg.	Neg.	62.96	59.00
853	1	1	Zoladex		Pos. ($400/10^6$)	Neg.	48.57	25.39
726	1	1	Arimidex		Neg.	Pos. ($218/10^6$)	63.97	49.12
738	2	2	Femara		Pos. ($1320/10^6$)	Neg.	80.98	77.87
	1¥	**0¥**			**46 % Pos.**	**38 % Pos.**	**62.4 %***	**50.6 %***

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus (Angabe zum 1. Zeitpunkt); CHT: Chemotherapie; HT: Hormontherapie; ¥ Median; * Mittelwert; Pos: nachweisliche TZ-Reaktivität im IFN-γ ELISpot-Test, einschließlich Frequenzangabe reaktiver KM-T-Zellen pro 10^6 Gesamt-TZ; Neg: keine nachweisliche TZ-Reaktivität; GTZ: Gedächtnis-T-Zellen (Angabe zum 2. Zeitpunkt).

7.2.5 Klinische Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen in der palliativen Situation ohne positiven Nachweis Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark

Kriterium	Spezifizierung	Mittelwert*, Median¥	Anzahl	(in %)
Anzahl der Patienten			60	(100)
Alter (Jahre)		58* [38-76]		
Zeit seit Erstdiagnose (Monate)		60*		
Tumorgröße (T)	1/ 2/ 3/ 4	2¥	17/ 30/ 10/ 2	(29/ 51/ 17/ 3)
Lymphknotenstatus (N)	0/ 1/ 2	1¥	24/ 31/ 4	(40/ 53/ 7)
Histologischer Grad (G)	1/ 2/ 3	2¥	1/ 29/ 27	(2/ 51/ 47)
Hormonrezeptor Status	ER-positiv		44	(73)
	PR-positiv		42	(70)
	ER- und PR-positiv		38	(63)
	doppelt negativ		12	(20)
Her2/neu-Expression	positiv/ negativ		12/ 42	(22/ 78)
Knochenmetastasen	positiv/ negativ		31/ 29	(52/ 48)
Tumormarker	CEA (µg/ l)	5.8¥ [1-12.7]	9	
	CA 15-3 (U/ ml)	28.2¥ [18-357]	14	
Chemotherapeutische Vortherapien	Anthrazykline		36	(60)
	Taxane		33	(55)
Endokrine Vortherapien	Tamoxifen		32	(53)
	Aromataseinhibitoren		29	(48)

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus; G: histologischer Grad; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; Her2/neu-Expression; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor (Angabe zum Zeitpunkt der Diagnose). Knochenmetastasen; Tumormarker (Angabe zum Zeitpunkt der Reaktivitätsbestimmung im KM).

7.2.6 Klinische Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen in der palliativen Situation mit positivem Nachweis Tumor-reaktiver Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark (= ADI-Studienpatientinnen)

Kriterium	Spezifizierung	Mittelwert*, Median¥	Anzahl	(in %)
Anzahl der Patienten			11	(100)
Alter (Jahre)		53* (42-73)		
Zeit seit Erstdiagnose (Monate)		63* (13-158)		
Tumorgröße (T)	1/ 2/ 3	2¥	3/ 7/ 1	(27/ 64/ 9)
Lymphknotenstatus (N)	0/ 1	1¥	2/ 9	(9/ 81)
Histologischer Grad (G)	1/ 2/ 3	3¥	-/ 3/ 8	(-/ 27/ 73)
Hormonrezeptor Status	ER-positiv	positiv¥	7	(64)
	PR-positiv	positiv¥	7	(64)
	ER- und PR-positiv		4	(36)
	doppelt negativ		1	(9)
Tumormarker	CEA (µg /l)	5.5¥ [1.8-75.4]		
	CA 15-3 (U/ ml)	27¥ [8-912.1]		
Her2/neu-Expression	positiv/ negativ		5/ 6	(45/ 55)
Knochenmetastasen	positiv/ negativ		5/ 6	(45/ 55)
Chemotherapeutische Vortherapien	Anthrazykline		6	(55)
	Taxane		6	(55)
Endokrine Vortherapien	Tamoxifen		9	(81)
	Aromataseinhibitoren		9	(81)

T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus; G: histologischer Grad; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; Her2/neu-Expression; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor (Angabe zum Zeitpunkt der Diagnose). Knochenmetastasen; Tumormarker (Angabe zum Zeitpunkt der Reaktivitätsbestimmung im KM).

7.2.7 Klinische Charakteristika der ADI-reaktiven und nicht-reaktiven Studienpatientinnen

Pat.	Diagnose	T	N	G	ER	PR	Her2/neu	Knochen-metastasen	Anthra-zykline	Taxane	Tamoxifen	Aromatase-inhinbitoren	Zustand z. Z. des adoptiven Zelltransfers
ADI 01	1999	2	1	3	1	1	0	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	SD (19.12.03)
ADI 02	2001	3	1	3	1	1	1	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	PD (24.01.04)
ADI 03	1999	2	1	2	0	1	0	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	SD (31.01.04)
ADI 04	1989	2	0	3	0	1	0	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	PD (13.03.04)
ADI 05	2001	2	1	3	0	1	1	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	SD (13.03.04)
ADI 06	2003	2	1	2	0	0	1	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	SD (03.04.04)
ADI 07	2001	1	0	3	1	0	1	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	PD (16.05.04)
ADI 08	1999	1	1	2	1	1	0	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	PD (26.07.04)
ADI 09	1998	1	1	3	1	1	0	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	SD (24.07.04)
ADI 10	1997	2	1	3	1	0;	0	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	PD (24.08.04)
ADI 11	1996	2	1	3	1	0	1	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	PD (06.11.04)

ADI-reaktive Patientinnen sind grau unterlegt. T: Tumorgröße; N: Lymphknotenstatus; G: histologischer Grad; ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor (zum Zeitpunkt der Diagnose). SD: stable disease; PD: progressive disease (Angabe zum Zeitpunkt des adoptiven T-Zelltransfers).

7.2.8 Klinische Charakteristika der Melanompatienten

Pat.	Stadium (AJCC)	Alter	Krankheits Dauer (mo)	LDH (U/l)	Lokalisation der Metastasen	Vortherapie	Therapie z. Z. des ELISpot-Test	KM-Reaktivität (ELISpot)	PB-Reaktivität (ELISpot)
1	I	33	1	134	NED	keine	keine	Neg.	**Pos.**
2	I	50	0	173	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
3	I	72	1	168	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
4	III	38	1	196	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
5	III	44	7	158	NED	keine	IFN-α	Neg.	**Pos.**
6	III	54	1	201	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
7	III	54	0	206	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
8	III	58	6	161	NED	keine	Peptidvakzinierung	Neg.	Neg.
9	III	63	1	162	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
10	III	71	3	199	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
11	IV	34	3	173	NED	keine	keine	Neg.	Neg.
12	IV	37	14	174	NED	Peptidvakzinierung	keine	Neg.	Neg.
13	IV	39	41	185	N	keine	Temozolomid+IFN-α	**Pos.**	Neg.
14	IV	40	7	293	N	keine	Peptidvakzinierung	Neg.	Neg.
15	IV	42	82	197	NED	IFN-α; Peptidvakzinierung	keine	**Pos.**	Neg.
16	IV	42	1	160	NED	keine	keine	Neg.	**Pos.**
17	IV	44	60	487	H, N, Hi, Lu, M, Le	DTIC + IFN-α	Temozolomid	**Pos.**	Neg.
18	IV	44	18	419	H, Lu	IFN-α	Peptidvakzinierung	Neg.	Neg.
19	IV	46	11	173	NED	IFN-α	keine	Neg.	Neg.
20	IV	48	1	287	N, Lu, Hi	keine	keine	**Pos.**	**Pos.**
21	IV	56	36	197	N, M, KM	IFN-α; Peptidvakzinierung	Temozolomid	Neg.	Neg.
22	IV	58	3	284	KM	Bestrahlung	keine	Neg.	Neg.
23	IV	58	6	237	LE	Bestrahlung; IFN-α	keine	Neg.	Neg.
24	IV	58	26	595	Abd	Bestrahlung; IFN-α	keine	**Pos.**	**Pos.**
25	IV	60	92	157	NED	Bestrahlung; IFN-α	Peptidvakzinierung	Neg.	Neg.
26	IV	65	1	180	Lu, KM	keine	keine	Neg.	Neg.
27	IV	67	135	372	N, Lu, Ni	DTIC + IFN-α	Imatinib	Neg.	Neg.
28	IV	68	13	187	H	IFN-α	Peptidvakzinierung	**Pos.**	Neg.
29	IV	71	7	111	N	keine	keine	Neg.	**Pos.**

Stadium V Patienten sind grau unterlegt. Pos: nachweisliche TZ-Reaktivität im IFN-γ ELISpot-Test; Neg: keine nachweisliche TZ-Reaktivität; Abd: Abdomen; DTIC: Dacarbazin; H: Haut; Hi: Hirn; KM: Knochenmark; Le: Leber; Lu: Lunge; M: Milz; N: Lymphknoten; NED: no evidence of disease; PB: peripheres Blut (alle Angaben zum Zeitpunkt der Reaktivitätsbestimmung im KM).