

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**hTERT, CD23 und CD229 als Tumorantigene
bei der B-CLL**

Dagmar Bund

aus

Augsburg

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. med. Michael Hallek betreut und von PD Dr. Haralabos Zorbas vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 23. Juli 2009

Dagmar Bund

Dissertation eingereicht am 3. August 2009

1. Gutachter Prof. Dr. med. Michael Hallek

2. Gutachter Prof. Dr. Haralabos Zorbas

Mündliche Prüfung am 27. Juni 2012

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltserzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	B-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)	8
1.1.1	Definition	8
1.1.2	Klinische Symptome	8
1.1.3	Diagnose	9
1.1.4	Stadieneinteilung und Verlauf	10
1.1.5	Andere Risikofaktoren und Prognose	11
1.1.6	Pathogenese	12
1.1.7	Immunologie	13
1.1.8	Therapie	15
1.1.8.1	Chemotherapie	16
1.1.8.2	Weitere Therapiemöglichkeiten	17
1.1.8.2.1	Immuntherapie	17
1.1.8.2.1.1	Antikörper	17
1.1.8.2.1.2	Zytokine	18
1.1.8.2.1.3	Genherapie	19
1.1.8.2.1.4	Adoptive Immuntherapie	20
1.1.8.2.1.5	Transplantation	20
1.1.8.3	Primärtherapie	21
1.2	Immunantwort	22
1.2.1	Aktivierung von T-Zellen	22
1.2.2	Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen (CTLs)	24
1.2.3	Tumor-escape Mechanismen	25
1.3	Tumorantigene	26
1.3.1	Universelle, Tumor-assoziierte und Patienten-spezifische Tumorantigene	27
1.3.2	Antigene bei der B-CLL	28
1.3.2.1	hTERT	28
1.3.2.2	Humanes Ly9 (CD229)	31
1.3.2.3	CD23	32
2	Aufgabenstellung	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Material	35
3.1.1	Chemikalien	35
3.1.2	Zusätzliche Reagenzien	36
3.1.3	Weitere Materialien	36
3.1.4	Geräte	36
3.1.5	Reagenzienkits	37
3.1.6	Molekulargewichtsmarker	37
3.1.7	Oligonukleotide (Primer)	37
3.1.8	Antikörper	37
3.1.8.1	Sekundäre Antikörper	38
3.1.8.2	Blockierungsantikörper	38
3.1.8.3	HLA-A2-Immunphänotypisierung	38
3.1.8.4	Immunphänotypisierung	38
3.1.8.5	Isotypkontrollen	39

3.1.9	Medien und Lösungen	39
3.1.10	Peptide	40
3.1.11	Zelllinien	41
3.1.12	Patientenproben und gesunde Spender	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Zellkulturtechniken	43
3.2.1.1	Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut	43
3.2.1.2	Generierung Dendritischer Zellen (DCs)	44
3.2.1.3	T-Lymphozyten Isolierung aus gesunden Spendern und B-CLL Patienten	45
3.2.1.4	Generierung Antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen (gesunde Spender)	45
3.2.1.5	Herstellung von BLCLs	46
3.2.1.6	Generierung der Effektor T-Zellen von B-CLL Patienten	47
3.2.1.7	Stimulation der B-CLL Zellen mittels humanem CD40-Ligand (hCD40L)	47
3.2.1.8	Einfrieren und Auftauen von Zellen	48
3.2.1.9	Zellkultur der Standardzelllinien	48
3.2.2	RT-PCR	48
3.2.2.1	RNA Extraktion	48
3.2.2.2	cDNA Synthese (Reverse Transkription)	49
3.2.2.3	PCR	49
3.2.2.4	Agarose Gelelektrophorese	50
3.2.3	IFN- γ -ELISPOT	50
3.2.4	Chromfreisetzungsnachweis ([Cr ⁵¹]-Release Assay)	51
3.2.5	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	52
3.2.5.1	Immunphänotypische Analysen	52
3.2.5.2	HLA-A2-DimerX Färbung der T-Zellen	52
3.2.5.3	HLA-A0201-Immunphänotypisierung	53
3.2.5.4	Standard T2-Bindungstest	53
3.2.5.5	Humaner T _H 1/T _H 2 Cytometric Bead Array (CBA)	54
3.2.6	Statistische Auswertung	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Peptidbindungskapazität (T2-Bindungstest)	57
4.2	hTERT	59
4.2.1	hTERT-mRNA Überexpression in B-CLL Zellen	59
4.2.2	<i>In vitro</i> Generierung hTERT-spezifischer CTLs von gesunden Spendern mit Peptid-beladenen Dendritischen Zellen (DCs)	59
4.2.3	hTERT-spezifische CTLs erkennen B-Zell Tumorzelllinien	61
4.2.4	Expansion autologer T-Zellen von B-CLL Patienten	63
4.2.4.1	Naive und CD40L-aktivierte B-CLL Zellen als Stimulatoren	64
4.2.4.1.1	Naive B-CLL Zellen als Stimulatorzellen	65
4.2.4.1.2	HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der mit naiven autologen B-CLL Zellen expandierten T-Zellen von B-CLL Patienten	66
4.2.4.1.3	CD40L-aktivierte B-CLL Zellen als Stimulatoren	68
4.2.4.1.4	Dimerfärbung der mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen expandierten T-Zellen von B-CLL Patienten	69
4.3	CD229	72
4.3.1	Überexpression von CD229 (humanes Ly9) in B-CLL Zellen	72
4.3.2	Generierung CD229-spezifischer CTL Antworten mit Peptid-beladenen DCs als APCs <i>in vitro</i>	74
4.3.2.1	CD229-spezifische CTLs erkennen Tumorzelllinien verschiedenen	

	B-Zellursprungs	76
4.3.2.2	Antigen-spezifische CTLs gesunder Spender erkennen naive B-CLL Zellen	77
4.3.3	Expansion autologer T-Zellen von B-CLL Patienten	78
4.3.3.1	Naive B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen	79
4.3.3.1.1	Naive B-CLL Zellen können spezifisch autologe T-Zellen expandieren	79
4.3.3.1.2	CD229-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen	82
4.3.4	CD40L-stimulierte B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen	84
4.3.4.1	Expansion autologer CD229-spezifischer T-Zellen mit CD40L-stimulierten B-CLL Zellen	84
4.3.4.2	CD229-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung expandierter T-Zellen nach Stimulation mit CD40-aktivierten B-CLL Zellen	86
4.4	CD23	90
4.4.1	Überexpression von CD23 auf B-CLL Zellen	90
4.4.2	Generierung CD23-spezifischer CTL Antworten <i>in vitro</i> mit Hilfe Peptid-beladener DCs	92
4.4.2.1	Erkennung B-zellulärer Tumorzelllinien durch CD23-spezifische CTLs	92
4.4.2.2	Naive B-CLL Zellen werden effizient von <i>in vitro</i> generierten, gesunden CD23-spezifischen CTLs erkannt	94
4.4.3	Autologe T-Zellexpansion von B-CLL Patienten	96
4.4.3.1	Naive B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs)	96
4.4.3.1.1	CD23-spezifische T-Zellexpansion durch autologe B-CLL Zellen	96
4.4.3.1.2	CD23-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen	98
4.4.3.2	CD40L-stimulierte B-CLL Zellen (CD40L-B-CLLs) als Antigen-präsentierende Zellen	100
4.4.3.2.1	CD23-spezifische T-Zellexpansion durch autologe CD40L-B-CLLs	100
4.4.3.2.2	CD23-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen nach Stimulation mit CD40L-stimulierten B-CLL Zellen	101
4.5	Zytokinprofile der naiven und CD40L-aktivierten B-CLL Zellen	105
5	Diskussion	107
5.1	Zusammenfassung der Daten und kritische Beurteilung	107
5.1.1	Erfüllung der TAA-Kriterien	107
5.1.2	Autologe T-Zellstimulation - naive B-CLL Zellen als APCs	110
5.1.3	Autologe T-Zellstimulation - CD40L-stimulierten B-CLL Zellen als APCs	111
5.1.4	Naive B-CLL Zellen als APCs: Mögliche Mechanismen	112
5.2	Potential der Antigene hTERT, CD23 und CD229 in der Immuntherapie und Ausblick	113
5.2.1	Vergleich der untersuchten Antigene	113
5.2.2	Ausblick	117
6	Zusammenfassung	119
7	Abkürzungen	121
8	Literatur	124

Anhang	155
Danksagung	156

1 Einleitung

1.1 B-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)

1.1.1 Definition

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ (B-CLL) zählt zu den niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphomen (NHL), die meist einen leukämischen Verlauf hat (Schultze 1999). Die B-CLL stellt die häufigste Form der Leukämien in der westlichen Welt dar und beträgt 25-30% aller Leukämien (Inzidenz: 5/100.000 Fälle pro Jahr; Linet *et al* 1988). Klinisch gesehen ist die B-CLL vor allem bei älteren Patienten zu finden, wobei das mediane Alter bei Diagnose 65 Jahre beträgt. Die Krankheit ist häufiger bei Männern als bei Frauen zu finden (Verhältnis 2:1 bis 3:1; Pangalis *et al* 1993, Montserrat *et al* 1995). Seltener tritt die B-CLL im Alter von 50 Jahren oder jünger auf (15% aller B-CLL Patienten; De Lima *et al* 1998). Der Anteil jüngerer Patienten nimmt in den letzten Jahren jedoch stetig zu, was an der verbesserten medizinischen Versorgung mit häufigen Blutbildkontrollen liegt (Hallek *et al* 1999). Charakterisiert ist die B-CLL durch eine klonale Proliferation und Akkumulation von CD5⁺ B-Lymphozyten im peripheren Blut ($> 1 \times 10^{11}$ Lymphozyten/l), Knochenmark, der Milz und in den Lymphknoten, wobei die Zellen in einem mittleren Stadium der Differenzierung „arretiert“ sind (Caligaris-Cappio *et al* 1996 & 1999, De Lima *et al* 1998, Geisler *et al* 1996, Kipps 1995). Die Zellen sind für die Organvergrößerungen und die Knochenmarkinsuffizienz verantwortlich (Criel *et al* 1999, Döhner *et al* 2000, Matutes *et al* 1996).

1.1.2 Klinische Symptome

Da die B-CLL eine Krankheit mit schleichendem Verlauf ist, wird sie in 70% aller Fälle zufällig in einem Routineblutbild diagnostiziert, die eine Leukozytose zeigt. Die meisten Patienten sind zu Beginn asymptomatisch oder zeigen unspezifische Symptome wie Müdigkeit und Infekte, die durch eine hämatopoetische Insuffizienz hervorgerufen werden. Des Weiteren sind Nachtschweiß, häufig Fieber, Petechien, geschwollene Lymphknoten und ein Gewichtsverlust bei ca. 20% der Patienten als B-Symptomatik zu finden. Als Leitsymptome der Erkrankung sind Lymphknotenschwellungen, Leber- und Milzvergrößerungen, sowie eine Leukozytose charakteristisch. Ferner können durch die Verdrängung im Knochenmark Anämie und Thrombozytopenie bestehen. Blutbestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten, vor allem Neutrophile, werden von den klonalen CD5⁺ B-Lymphozyten zurückgedrängt, da diese Zellen im Verlauf der Krankheit überwiegend im Blut vorliegen. Dies ist der Grund für häufig auftretende bakterielle Infektionen, da Neutropenie, Hypogammaglobulinämie (verminderte Produktion von Antikörpern) und Defekte bei der zellvermittelten Immunität und Phagozytose zu finden sind (Mauro *et al* 2000, Schultze 1999).

Da die B-CLL bislang noch nicht geheilt werden kann, sind die häufigsten Todesursachen Infektionen (Pneumonie und Sepsis) und Blutungen der betroffenen Patienten. Im Verlauf der Krankheit können weitere Komplikationen wie Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA; 10-15% der Fälle), Autoimmunthrombozytopenien und die „pure red cell“ Anämie auftreten (Mauro *et al* 2000).

In seltenen Fällen ist eine Transformation in ein hochmalignes NHL (Richter-Syndrom) oder in eine ALL (akute lymphoblastische Leukämie) zu sehen. B-CLL Patienten neigen zu Zweitneoplasien, wie Bronchialkarzinomen, maligne Melanome oder Karzinome des Gastrointestinaltrakts (Dighiero *et al* 1998, Travis *et al* 1992).

1.1.3 Diagnose

Die Diagnose der B-CLL basiert auf einem Differentialblutbild und einer durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung der peripheren Blutlymphozyten. Für die Diagnose einer B-CLL müssen die folgenden drei Kriterien erfüllt sein: eine Blutlymphozytose mit >5000 Zellen/dl, die Feststellung des B-CLL Immunphänotyps (CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺) und die Leichtkettenrestriktion (Kappa oder Lambda; Hallek *et al* 1999, Sarfati 1993).

Morphologisch sind B-CLL Zellen kleine reife Lymphozyten. Bei der Erstellung eines Blutaussstrichs werden typische Merkmale wie der schmale Zytoplasmasaum, der dichte Kern und teilweise verklumptes Chromatin ohne Nukleoli sichtbar. Die Membranen dieser Zellen sind leicht zerstörbar und bilden charakteristische Zellfragmente, die Gumprecht'schen Kernschatten. Durch den Nachweis einer Leichtkettenrestriktion wird die Monoklonalität der B-Zellen nachgewiesen (Hallek *et al* 1999) und wird durch ein asymmetrisches Verhältnis von Kappa und Lambda Ketten der Oberflächenimmunglobuline charakterisiert (>3:1 oder <1:2; Geary *et al* 1993). Das antigene Profil der B-CLL Zellen entspricht dem der Mantelzonen Lymphozyten in den sekundären Lymphfollikeln und wird mittels Durchflußzytometrie-Analysen (FACS) bestimmt (Caligaris-Cappio *et al* 1996 & 1999, De Lima *et al* 1998, Geisler *et al* 1996, Kipps 1995, Mauro *et al* 2000).

Der charakteristische Immunphänotyp dieser Zellen zeigt die Koexpression von CD5, CD19 oder CD20 als typische B-Zellmarker, CD23 und schwache monoklonale Oberflächenimmunglobuline aller Klassen (Batata & Shen, 1992, Sarfati 1993, Schwonzen *et al* 1993). Marker wie FMC7 und CD79b fehlen (Hulkkonen *et al* 2002, Monaghan *et al* 2003). CD25 wird in ca. 25-70% der Fälle exprimiert, CD22 Moleküle zeigen eine geringe Expression oder fehlen ganz. CD38 ist in ca. 80% aller Patienten nicht vorhanden (Matutes E *et al* 1994, Newman *et al* 1993). Als Oberflächenantigene spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei allen Lymphozyten, da sie am Zell-Zell-Kontakt, beim homing („Heimfindevermögen“), also bei der gerichteten Wanderung in bestimmte Organ- und Gewebebezirke, der Zirkulation und der Verteilung der Zellen beteiligt sind. Bei der B-CLL stellt das häufigste Adhäsions-

sionsmolekülprofil eine hohe Expression von CD44, die Anwesenheit von L-Selektin, unterschiedliche Anteile von LFA-1 und CD11c und Abwesenheit von CD54 dar (Angelopoulou *et al* 1999, De Rossi *et al* 1993, Domingo *et al* 1997, Eisterer *et al* 1996, Lucio *et al* 1998).

Die durchflußzytometrische Bestimmungen sind sehr sensitiv und zuverlässig. Daher sind histologische Untersuchungen der Lymphknoten nicht zwingend notwendig. Jedoch kann nur durch diese eine eindeutige Abgrenzung zum Mantelzell- und Marginalzelllymphom, sowie der Differenzierung plasmazytoider bzw. plasmozystischer Lymphome getroffen werden. Um eine weitere Prognose, das Krankheitsstadium und mögliche Begleiterkrankungen besser abschätzen zu können, werden weitere Untersuchungen angeraten (Hallek *et al* 1999). Dazu zählt eine körperliche Untersuchung mit Lymphknotenstatus und eine Knochenmarkspunktion mit anschließenden zytologischen und histologischen Analysen. Letztere ist für die Diagnosestellung nicht notwendig, aber sinnvoll, da das Infiltrationsmuster eine Aussage über die Prognose geben kann. Außerdem werden weitere Laboruntersuchungen durchgeführt (u.a. Bestimmung folgender Werte im Serum: LDH, β_2 -Mikroglobulin, Thymidinkinase, Bilirubin, Leberwerte, Kreatinin, Gesamteiweiß, Albumin, Immunglobuline und Serum-Elektrophorese). Zytogenetische Untersuchungen, Röntgenaufnahmen des Thorax, Sonographie des Abdomens und quantitative Immunglobulinbestimmungen zur Abschätzung des Antikörpermangels werden ebenfalls vorgenommen (siehe 1.1.5 Andere Risikofaktoren und Prognose, Hallek *et al* 1999 (1)).

1.1.4 Stadieneinteilung und Verlauf

Die klinische Einteilung der B-CLL Stadien basiert in Nordamerika auf dem beschriebenen System von Rai (1975) und in Europa auf dem von Binet (1981, **Tabelle 1**; Binet *et al* 1981, Rai *et al* 1975). Diese wird aufgrund der körperlichen Untersuchung, des Hämoglobins (Hb), des Thrombozytenwerts, Lymphozytenzahl und die Erfassung der betroffenen Lymphknoten getroffen. Die Ermittlung des Krankheitsstadiums ermöglicht eine grobe Prognoseabschätzung und ist entscheidend für die Wahl der Therapie. Die Systeme unterteilen die Krankheit in frühes, intermediäres und fortgeschrittenes Stadium. In der Niedrigrisikogruppe (Binet A) beträgt die mediane Überlebenszeit über 10 Jahre, in der intermediären Risikogruppe (Binet B) fünf bis sieben Jahre und in der Hochrisikogruppe (Binet C) zwei bis dreieinhalb Jahre (Binet *et al* 1981; **Tabelle 1**).

Einen sehr günstigen Verlauf des Binet Stadiums A zeigt ein Ausnahmefall, die sogenannte „Smouldering B-CLL“. Sie ist charakterisiert durch ein noduläres Knochenmarksinfiltrationsmuster, einem Hb von mehr als 12 g/dl, einer Lymphozytenverdoppelungszeit von mehr als 12 Monaten und einer absoluten Lymphozytenzahl mit weniger als 30000/dl. Eine „Smouldering B-CLL“ ist in etwa 30% aller Binet A Patienten zu finden und bedarf keiner Therapie.

Die Lebenserwartung dieser Patienten unterscheidet sich kaum von der der Normalbevölkerung (Montserrat *et al* 1988).

Durch die verbesserten Diagnosemethoden fand in den letzten Jahren eine Verschiebung in Richtung der früheren Stadien statt (Hallek M *et al* 2008, Keating (1) 1999). Die Stadieneinteilung hat großen Einfluss auf das Überleben der B-CLL Patienten. In den frühen Stadien verläuft die chronische lymphatische Leukämie meist asymptomatisch. Mit zunehmender Progression der Krankheit entwickeln die Patienten Lymphadenopathie, Müdigkeit, B-Symptome und oft Infektionen. In den fortgeschrittenen Stadien findet man Knochenmarksinfiltrationen, die aufgrund von Anämie und Thrombozytopenie zustande kommen. Aus unbekanntem Gründen kann das Infiltrationsprofil auch unterschiedlich erscheinen und ein diffuses Infiltrationsprofil weist auf eine schlechte Prognose hin (Hallek *et al* 1999, Molica & Levato 2001, Pangalis *et al* 1999).

Stadium	Definition	Medianes Überleben	
A	<ul style="list-style-type: none"> • Hb>10 g/dl • Thrombozytenzahl normal • maximal 2 vergrößerte Lymphknotenregionen 	>10 Jahre	Niedriges Risiko
B	<ul style="list-style-type: none"> • Hb>10 g/dl • Thrombozytenzahl normal • mindestens 3 vergrößerte Lymphknotenrgionen 	5-7 Jahre	Intermediäres Risiko
C	<ul style="list-style-type: none"> • Hb<10 g/dl (Anämie) und/oder • Thrombozytenzahl <100000 x 10⁹/l (Thrombozytopenie) • unabhängig von der Zahl der befallenen Regionen 	2-3,5 Jahre	Hochrisiko

Tabelle 1. Prognoseabschätzung der B-CLL nach Binet (1981).

1.1.5 Andere Risikofaktoren und Prognose

Die biologische Heterogenität dieser Krankheit spiegelt sich in verschiedenen klinischen Verläufen wieder. Viele Patienten überleben viele Jahre ohne beeinflusst zu werden und benötigen keine Therapie. Andere versterben innerhalb weniger Jahre aufgrund von Komplikationen durch die Krankheit, obwohl maximale therapeutische Bemühungen unternommen wurden.

Die Abschätzung der Prognose mittels Tumorstadieneinteilung nach Rai und Binet ist wichtig und unerlässlich. Jedoch ist sie unbefriedigend, da die B-CLL eine heterogene Krankheit darstellt. Um eine präzisere Risikostratifizierung zu erreichen und damit die Überlebenschance genauer abschätzen zu können, müssen weitere Untersuchungen (Lymphknotenstatus, Knochenmarkspunktion), Laborparameter und biologische Marker miteinbezogen werden.

Dies ist vor allem für Patienten in frühen Stadien wichtig, weil sie am meisten von neuen Therapiestrategien profitieren können. Für B-CLL Patienten im Binet Stadium A wurde gezeigt, dass der Thymidinkinasewert im Serum einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt (Hallek *et al* 1999). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Patienten mit mutierten IgV_H-Genen (schwere Kette des Immunglobulins) eine höhere Überlebensrate mit einem medianen Überleben von mehr als 18 Jahren haben. In **Tabelle 2** ist ein Überblick über die wichtigsten unabhängigen Prognosefaktoren aufgeführt, die mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sind und bereits in der klinischen Routine verwendet oder in Studien untersucht werden. (Döhner *et al* 2000, Hallek *et al* 2002, Keating *et al* 1999, Stilgenbauer 2001). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Serumwerte CD23, Thymidinkinase und β_2 -Mikroglobulin ein Überleben oder ein progressionsfreies Überleben vorhersagen können. Eine kürzlich veröffentlichte multivariate Studie des CLL1-Protokolls der DCLLSG (Deutsche CLL Studien Gruppe) konnte die Serumwerte Thymidinkinase und β_2 -Mikroglobulin als potente Faktoren für eine Vorhersage eines progressionsfreien Überlebens im Binet Stadium A bestätigen (Hallek (German CLL Study Group) 2008).

1.1.6 Pathogenese

Bei B-CLL Zellen sind in >80% chromosomale Aberrationen zu finden. Im Vergleich zu anderen B-Zellneoplasien sind diese Anormalitäten jedoch eher selten. Die häufigste genomische Aberration stellt dabei die Deletion der Bande 14 des Chromosoms 13q in 55% aller Fälle dar. Der Nachweis dieser Aberration wirkt sich günstig auf das Überleben des entsprechenden Patienten aus. Die zweithäufigsten chromosomalen Abweichungen stellen die Deletion des Chromosoms 11q22-q23 (18%) und die Trisomie 12 (16%) dar. Seltener sind Deletionen der Chromosomen 17p13 und 6q21 mit einer Frequenz von 7% bzw. 6% zu finden. Die Veränderungen von 11q- und 17p- korrelieren mit einer schlechtesten Prognose. Insgesamt haben 65% der B-CLL Patienten eine, 25% zwei und 10% drei oder mehr karyotypische Anormalitäten (Döhner *et al* 2000, Stilgenbauer *et al* 2002). Komplexe chromosomale Anormalitäten und Translokationen korrelieren mit fortgeschrittenen Stadien und einer ungünstigen Prognose (Haferlach *et al* 2007, Mayr *et al* 2006). Zytogenetische Anormalitäten haben damit einen hohen prognostischen Stellenwert, der für die weiteren therapeutischen Entscheidungen deutlich beiträgt.

Das Proteinprodukt des Tumorsuppressorgens *TP53* (ein Transkriptionsfaktor), das auf dem Chromosom 17p kodiert ist, ist in der Hälfte aller Tumorerkrankungen mutiert. *TP53* reguliert Signalproteine, die verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation (p21), DNA-Reparatur (GADD45) und Apoptose (Fas, Bax, Bcl-2) steuern (Oduncu *et al* 2000). Dieses Gen ist bei 10-17% der B-CLL Patienten mutiert. p53-Veränderungen stellen den stärksten negativen prognostischen Faktor für das Überleben dar und ist vor allem bei Patienten im Binet

Stadium C zu finden. Ferner ist das Progressionsrisiko von Patienten mit einer p53-Mutation wesentlich erhöht, da sich in Studien gezeigt haben, dass die Inaktivierung von p53 eine Akkumulation von p53-Anormalitäten begünstigt und ein nicht Ansprechen auf eine Purin-Analoga Therapie zur Folge hat. (Döhner *et al* 1995 & 2000).

Der Mutationsstatus der IgV_H-Gene ist ebenfalls ein Faktor mit wichtiger prognostischer Bedeutung. Durch DNA-Micoarrays wurde gezeigt, dass anhand dessen B-CLL Zellen in zwei Gruppen unterteilt werden können mit unterschiedlichen Expressionsprofilen. Die malignen Klone entstammen entweder von naiven B-Zellen (kein Antigenkontakt, hohe CD38-Expression, ZAP70⁺) ohne Mutationen in den IgV_H-Genen oder von mutierten B-Zellen nach der Reifung (Memorytyp, ausgeprägter Antigenkontakt, geringe oder keine Expression von CD38, ZAP70⁻) im Keimzentrum eines Lymphfollikels. Patienten, die unmutierte IgV_H-Gene besitzen, haben eine deutlich kürzere Überlebenszeit und eine schlechtere Prognose, als die mit mutierten Genen. Im Vergleich liegt die mediane Überlebenszeit im Binet Stadium A mit unmutierten IgV_H-Genen bei 95 Monaten und 293 Monaten bei Patienten mit mutierten IgV_H-Genen (Crespo *et al* 2003, Damle *et al* 1999, Ghia *et al* 2003, Hamblin *et al* 1999, Ibrahim *et al* 2001, Rassenti *et al* 2004).

Klinische Befunde, die mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert sind	
Lymphozytenverdopplungszeit	Weniger als 12 Monate (Montserrat <i>et al</i> 1986)
Lymphozytenwert zu Beginn	Größer $5 \times 10^{10}/l$ (Montserrat <i>et al</i> 1988)
β₂-Mikroglobulin	Erhöhter Serumtiter (Molica <i>et al</i> 1999)
LDH	Erhöhter Serumtiter (Lee <i>et al</i> 1987)
CD23	Erhöhter Serumtiter (Safati <i>et al</i> 1996)
Thymidinkinase	Erhöhter Serumtiter (Hallek <i>et al</i> 1999 (1))
Interphase FISH	Aberrationen der Chromosomen 11q oder 17p (Döhner <i>et al</i> 2000)
CD38 Status	CD38-Positivität der B-CLL Zellen (Zupo <i>et al</i> 1996, Damle <i>et al</i> 1999)
Mutationsstatus der Immunoglobulin V_H-Genregion	Fehlen von somatischen Hypermutationen (Hamblin <i>et al</i> 1999)
Muster der Knochenmarksinfiltration	Diffus oder nichtnodulär (Rozman <i>et al</i> 1984)
Körperlicher Allgemeinzustand	Schlecht (Lee <i>et al</i> 1987)
Ansprechen auf die erste Chemotherapie mit Alkylanzien	Negativ (Catovsky <i>et al</i> 1989)
ZAP70 Status	ZAP70 Expression der B-CLL Zellen (Crespo <i>et al</i> 2003)

Tabelle 2. Parameter für die Risikostratifizierung von B-CLL Patienten. FISH = Fluorescence *in situ* hybridization.

1.1.7 Immunologie

Was die Immunsystemdefekte bei der B-CLL betrifft, sind sowohl das humorale, als auch das zelluläre Immunsystem betroffen. Aufgrund der komplexen Interaktionen der verschiedenen

Effektorsysteme können viele beobachtete Mechanismen noch nicht erklärt werden. Möglicherweise verursacht die hohe Tumormenge im Blut, im Knochenmark und in den lymphatischen Organen ein suppressives Milieu für unterschiedlichen Effektorzellpopulationen. In den meisten Fällen reagieren B-CLL Zellen nicht auf Mitogene (Soderberg 1998). Dies mag auf der Tatsache beruhen, dass die Mehrheit der Zellen nicht proliferiert. Sie bleiben in der G₀-Phase und haben Anormalitäten im BCR (B-Zellantigenrezeptorkomplex), dem CD79b (extrazelluläre Domäne des BCR) fehlt (Alfarano *et al* 1999, Dighiero & Binet 1996, Lankester *et al* 1996). Die B-CLL scheint eine Erkrankung der Anergie, deregulierten und supprimierten Apoptose zu sein, was in einer Akkumulation der B-CLL Zellen resultiert (Caligaris-Cappio *et al* 2001). Dafür verantwortlich sind verschiedene anti-apoptotisch wirkende Mechanismen. Beispielsweise zeigt das die Apoptose hemmende Protein Bcl-2 bei der Mehrzahl der B-CLL Patienten (85%) eine erhöhte Expression. Die Ursache hierfür ist jedoch noch unbekannt (Hallek *et al* 1999, Meinhardt *et al* 1999, Molica *et al* 1998). Auch Survivin (Inhibitor der Apoptose), das eine Rolle im Zellzyklus spielt und den programmierten Zelltod reguliert, zählt zu diesen Mechanismen (Nakagawa *et al* 2004, Schmidt *et al* 2003). Zusätzlich sind pro-apoptotische Moleküle wie Fas (CD95; Panayiotidis *et al* 1995, Sampalo & Brieva 2002) oder c-myc (Caligaris-Cappio 1999, Raghoebier *et al* 1991) nicht exprimiert, was den ruhenden Status der B-CLL Zellen unterstützt. In anderen Fällen ist die Regulation von einigen pro-apoptotischen Genprodukten komplett verloren gegangen (Bax, bcl-X_L, bcl-X_S; Kitada *et al* 1998, Molica *et al* 1998, Reed 1997, Wickremasinghe & Hoffbrand 1999). Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax scheint eine Rolle zu spielen, da dieses mit der Fludarabin-assoziierten Chemotherapiesensivität korreliert (Hallek *et al* 1999, Meinhardt *et al* 1999). Mutationen, wie z.B. im Tumorsuppressorgen p53, führen zu einer schlechten Prognose im Verlauf der Krankheit (Cordone *et al* 1998, Döhner *et al* 1995). Des Weiteren zeigt sich das Protein Mcl-1 als wichtiges Molekül bei der B-CLL, da bei dessen erhöhten Expression therapierte Patienten nur selten in Remission gelangen (Hallek *et al* 1999, Meinhardt *et al* 1999).

Auch das Mikroenvironment hat einen wichtigen Einfluss auf das Überleben der B-CLL Zellen. Neben Proteinen wirken auch Zytokine bei der spezifischen Apoptosemodulation mit. Es wurde gezeigt, dass B-CLL Zellen eine große Anzahl verschiedener Zytokine einschließlich IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 and IL-10, IFN- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, TNF- α und TGF- β exprimieren (Patten *et al* 2008). Die autokrine Produktion der B-CLL Zellen von Zytokinen können sowohl die Apoptose der B-CLL Zellen selbst inhibieren (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 und IFN- γ), als auch das Leben der T-Zellen verlängern (Ghia & Caligaris-Cappio 2000, Meinhardt *et al* 1999, Mu *et al* 1997, Scrivener *et al* 2003).

Aufgrund der immunsupprimierenden Zytokine sind die malignen Zellen ineffiziente Antigenproduzierer und -präsentierer. Die fehlende Kapazität der B-CLL Zellen eine T-zelluläre

Immunantwort zu induzieren ist keine Konsequenz einer reduzierten MHC-Expression, sondern eher die Abwesenheit von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen. Dies kann zu einer Toleranz führen, d.h. Antigen-spezifische T-Zellen sind nicht in der Lage auf dominante Epitope zu reagieren. Dies resultiert daraus, dass entweder die Intensität des Stimulus zu gering ist oder inhibitorische Moleküle exprimiert werden (Schultze 1999).

Des Weiteren zeigen T-Zellen von B-CLL Patienten Abweichungen bezüglich der Zellzahl, der Verteilung ihrer verschiedenen T-Zelltypen, ihrer Muster des T-Zellrezeptors (TCR) und die Herunterregulation von CD154 (CD40 Ligand, CD40L) auf den T-Zellen (Cantwell *et al* 1997). In vielen Patienten mit B-CLL ist die T-Zellzahl erhöht. Dies betrifft vor allem die CD8⁺ Zellen, aber auch die CD4⁺ Zellen, denn das CD4/CD8-Verhältnis ist umgekehrt. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen haben einen aktivierten Phänotyp, da CD69, CD16, CD56, CD71 und HLA-DR hochreguliert sind und CD62L und CD28 nicht exprimiert werden. Die CD8⁺ T-Zellen von B-CLL Patienten zeigen eine Positivität für CD45RA and CD57 und sind negativ für CD27, was ihnen immunphänotypisch eine zytotoxische Effektorfunktion zuschreibt (Mackus *et al* 2003).

Die Immunität der B-CLL ist in mehrfacher Weise gestört: eine fehlende oder ineffiziente Immunantwort gegen Pathogene und die im Allgemeinen schlechte stimulatorischen Qualitäten der malignen Zellen, d.h. sie sind ineffiziente APCs (Antigen-präsentierende Zellen) der primären Immunantwort. Diese Insuffizienz entsteht durch defekte BCRs, geringe Immunglobulinwerte und dem Fehlen von Kostimulationsmolekülen. Des Weiteren resultiert die Immuninkompetenz der B-CLL Patienten in der Herunterregulation des CD40L auf den T-Zellen und funktionelle Defekte der NK-Zellen (Caligaris-Cappio *et al* 2001, Cantwell *et al* 1997, Ghia & Caligaris-Cappio 2000, Schultze 1999).

Defekte in der phagozytotischen Funktion und zytotoxischen Aktivität von Neutrophilen, Monozyten und NK-Zellen werden wahrscheinlich durch die B-CLL Zellen vermittelt. Hinweise darauf zeigten Untersuchungen, bei denen die NK-Zellfunktion nach Entfernen der B-CLL Zellen wiederhergestellt werden konnte. Auch Defekte bei der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch die B-CLL Monozyten und der Chemotaxis, jedoch nicht der Phagozytose oder der intrazellulären Lyse der B-CLL Granulozyten konnten festgestellt werden (Ravandi *et al* 2006, Wadhwa *et al* 2006).

1.1.8 Therapie

Für die B-CLL steht neben der sehr risikoreichen Knochenmarkstransplantation (KMT) derzeit keine kurative Behandlung zur Verfügung. Bis vor einer Dekade war die Therapie palliativ. Die konventionelle Chemotherapie konnte in den letzten Jahren durch die Etablierung neuer Chemotherapeutika und Kombinationstherapien verbessert werden, was zu länger an-

haltenden Remissionen führen kann. Außerdem sind mittlerweile mehrere neue Möglichkeiten gegeben, die Leukämie zu behandeln.

1.1.8.1 Chemotherapie

Chlorambucil. Als häufigstes Standardzytostatikum wird Chlorambucil (Leukeran®), ein Alkylan, als Monotherapie eingesetzt. Die Substanz hat starke Anti-lymphatische Effekte mit gleichzeitig sehr geringem Einfluss auf die Suppression von Granulozyten und Thrombozyten. Die Therapie wird beendet, wenn die Leukozytenzahl einen Wert von 20000/μl oder weniger erreicht hat (Knospe *et al* 1974). Remissionen können bei vorher unbehandelten B-CLL Patienten in zwischen 30% und 70% der Fälle erreicht werden. Diese sind jedoch selten komplett und meist nur kurzweilig (Sawitsky *et al* 1977).

Polychemotherapie. Die konventionellen Polychemotherapien mit Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison (COP), mit Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednison (mini-CHOP) oder mit Cyclophosphamid, Adriamycin und Prednison (CAP) zeigten in den meisten Studien keinen Überlebensvorteil gegenüber einer Chlorambucilmonotherapie (Raphael *et al* 1991).

Purinanaloga. Auch Purinanaloga werden bei der Therapie der B-CLL eingesetzt. Dazu zählen die Substanzen Fludarabin (2-Fluoro-ara-AMP; Fludara®) und Cladribin (2-Chloro-2-desoxy-adenosin; Keating 1999). Ansprechraten mit Fludarabin werden in Patienten mit einem Rezidiv in 50-60% erzielt, in unbehandelten Patienten von bis zu 80%, die in 23-37% der Fälle bis zu einer kompletten Remissionen führen können. Bei vorbehandelten Patienten werden Ansprechraten zwischen 13-67% mit bis zu 37% kompletten Remissionen erreicht. Die häufigste Nebenwirkung unter Fludarabinmonotherapie ist eine Myelosuppression mit Neutro-, Lympho- und Thrombopenie (Cheson *et al* 1998). Verglichen mit Chlorambucil hat die Fludarabintherapie zwar keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben, jedoch ermöglicht es ein längeres krankheitsfreies Überleben mit signifikant erhöhtem Ansprechen (Cheson *et al* 1998, Leparrier *et al* 2001, Rai *et al* 2000). Cladribin ermöglicht in 56-82% der vorbehandelten Patienten ein Ansprechen. Komplette Remissionen werden nur in 10-47% erreicht. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Fieber, bakterielle Infekte und schwere Neutropenien (Robak 2001).

Fludarabin-Kombinationstherapien. Die Kombination von Fludarabin mit einem anderen Zytostatikum wie Doxorubicin, Mitoxantron oder Prednison zeigte kein verbessertes Ansprechen im Vergleich zu Fludarabin alleine (Keating 1998). Nur der Einsatz von Fludarabin und Cyclophosphamid (FC) konnte bei vorbehandelten B-CLL Patienten eine Ansprechrate von bis zu 80% erreicht werden (Hallek *et al* 1999, O'Brien *et al* 2001). Die Ansprechraten konnten sogar bei unbehandelten Patienten auf 94% erhöht werden, wobei knapp die Hälfte der Patienten (44%) eine komplette Remission erreichten (O'Brien *et al* 1998). Die Kombination

von Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM) erzielten Ansprechraten von 61%, wobei wiederum ca. die Hälfte (44%) eine komplette Remission erreichte. Dies ist auf die synergistische Wirkung von Mitoxantron zu Fludarabin mit Cyclophosphamid zurückzuführen (Bosch 2002). Die Nebenwirkungen dieser Therapie sind schwere Infektionen und ausgeprägte Neutropenien. Bei Fludarabin-refraktären Patienten ist FCM eine gute Therapiemöglichkeit. Neben der Kombination von Fludarabin und Cyclophosphamid scheint der Einsatz von Fludarabin und Epirubicin vergleichbar effizient zu sein (Rummel *et al* 1999).

Infektionen stellen bei der B-CLL die größte Komplikation und Haupttodesursache dar (25-50%; Hamblin 1987). Die Hauptursache stellt dabei die systemische Hypogammaglobulinämie dar, die zu einem Antikörpermangel führt und ein erhöhtes Risiko für Infekte birgt. Die Chemotherapie verstärkt dazu das Auftreten von Keimen. Je nach Substanz können z.B. *Staphylokokkus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis carinii* und *Mykobakterien*, aber auch Viren wie Cytomegalovirus, Herpes-simplex-Virus und Varizella Zoster-Virus zu finden sein (Morrison *et al* 2001).

1.1.8.2 Weitere Therapiemöglichkeiten

1.1.8.2.1 Immuntherapie

1.1.8.2.1.1 Antikörper

Humanisierte oder chimäre monoklonale Antikörper, die an definierte Oberflächenantigene der malignen B-Zellen binden, werden ebenfalls effizient bei der B-CLL Therapie eingesetzt (Mavromatis & Cheson 2003). Sie aktivieren das Komplementsystem, blockieren Membranrezeptoren, binden und neutralisieren lösliche Faktoren. Diese Effekte sind für die Therapie von Vorteil, da sie für die Tumorprogression notwendige Signalwege spezifisch eliminieren (Anderson 1998).

Derzeit werden vor allem Rituximab und Alemtuzumab bei der B-CLL Therapie verwendet. Rituximab (MabThera) ist ein Anti-CD20 Antikörper und wirkt durch Bindung an das CD20-Antigen. Alemtuzumab (CAMPATH-1H) ist ein Antikörper, der gegen CD52 gerichtet ist (O'Brien *et al* 2003). Beide Antikörper induzieren sowohl direkt Apoptose in den Zielzellen, als auch ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) und CDC (complement-dependent cytotoxicity), was indirekt zur Zerstörung der B-CLL Zellen führt (Golay *et al* 2000, Treon *et al* 2001). Alemtuzumab wird im Vergleich zu Rituximab weniger häufig eingesetzt, da der Antikörper eine hohe Toxizität besitzt, die zwar durch subkutane Administration verringert werden kann, aber dennoch vorhanden ist (Christian BA & Lin TS 2008)

Kürzlich wurden zwei Phase-III-Studien veröffentlicht, die Rituximab als wichtigen Therapiebaustein bei der B-CLL etabliert haben: In der CLL8-Studie der DGCLL (820 Patienten) führte die Immunchemotherapie mit Fludarabin/Cyclophosphamid plus Rituximab (FCR) im Vergleich zum bisherigen Standard Fludarabin/Cyclophosphamid (FC) bei therapienaiven Patienten zu einer Verdopplung der Ansprechrate (44,5% versus 22,9% komplette Ansprechrate) und einer Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens (42,8 Monate versus 32,3 Monate). Die zusätzliche Gabe von Rituximab bewirkte eine Verschiebung von den partiellen hin zu kompletten Remissionen (Hallek *et al*, ASH 2008). In der REACH-Studie (Roche) bewährte sich die Rituximab-Therapie auch bei rezidivierten und/oder refraktären Patienten. Im Vergleich zur Chemotherapie wurde bei zusätzlicher Antikörpergabe ebenfalls eine Verbesserung von progressionsfreiem Überleben und Ansprechen erreicht: Patienten mit MabThera-Behandlung lebten ohne ein Fortschreiten der Erkrankung durchschnittlich 10 Monate länger, als Patienten, die nur eine Chemotherapie erhielten (30,6 Monate verglichen mit 20,6 Monaten).

Vielversprechende experimentelle Ansätze stellen derzeit bispezifische Antikörper und Anti-CD200 Antikörper dar. Bispezifische Antikörper sind chimäre Antikörper, die anti-CD3 und Konstrukte, die gegen Antigene auf den malignen Zellen gerichtet sind (CD19, CD20 (Bi20) und den Idiotyp), vereinen. *In vitro* zeigten die Antikörper effiziente Zytotoxizitäten gegen B-CLL Zellen (Bohlen *et al* 1993, Buhmann *et al* 2008, Löffler *et al* 2003, Reusch *et al* 2004, Shen *et al* 1999, Stanglmaier *et al* 2008). CD200 spielt eine Rolle bei der Regulierung des Immunsystems und ist bei soliden und einigen hämatologischen Erkrankungen, wie auch der B-CLL, überexprimiert. Bei der B-CLL vermittelt CD200 eine immunsupprimierende Wirkung: Herunterregulation des T_H1-Zytokinprofils (Inhibition der zytotoxische T-Zellen) bei gleichzeitiger Erhöhung des T_H2-Profiles (Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{regs})). Durch den Einsatz von Anti-CD200 Antikörpern konnte die Aufhebung der inhibierenden Funktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Kretz-Rommel *et al* 2007, Kretz-Rommel & Bowdish 2008, McWhirter *et al* 2006, Pallasch *et al* 2008). Diese Antikörper müssen allerdings besonders im Hinblick auf die Nebenwirkungen in weiteren Studien noch besser untersucht werden.

1.1.8.2.1.2 Zytokine

Auch Zytokine, wie beispielsweise das kürzlich entdeckte Mitglied der IL-2 Familie, IL-21, ist ein attraktiver Kandidat mit Anti-Tumor Eigenschaften. Dieses Zytokin zeigt teilweise überlappende Funktionen mit IL-2, wobei es *in vitro* einen Wachstumsfaktor für Myelome und akute T-Zellleukämien darstellt, bei der B-CLL jedoch Apoptose induziert. Durch vorläufige Daten aus Phase I Studien kann davon ausgegangen werden, dass IL-21 eine neue Möglichkeit bei der Immuntherapie der B-CLL darstellen könnte (Di Carlo *et al* 2007).

1.1.8.2.1.3 Genterapie

Die ideale Krebstherapie stellt eine komplette Auslöschung aller Tumorzellen ohne Nebenwirkungen bzw. die spezifische Korrektur aller existierenden genetischen Veränderungen in jeder Krebszelle dar. Bis jetzt sind die Ergebnisse der klinischen Studien weit von diesem Ziel entfernt. Die unzulänglichen Effizienzen der verfügbaren Gentransfertechnologien und die ungenügenden Kontrollmechanismen der Transferexpressionen stellen limitierende Faktoren dar. Daher konzentrieren sich die meisten Strategien auf die Stimulation des Immunsystems oder die Verwendung rekombinanter Genkonstrukte (Anderson 1998, Anether *et al* 2002, Takahashi *et al* 2001).

Bei der B-CLL wird solch eine Strategie durch aktive Immunisierung mit genetisch modifizierten autologen oder allogenen Tumorzellen verfolgt. Die vielversprechendsten und verfügbaren Gentransfersysteme sind virale Vektoren (adenoviral (Wierda *et al* 2000), retroviral (Hesdorffer *et al* 1998), AAV (adeno-assoziiertes Virus) und EBV (Epstein-Barr-Virus; Cantwell *et al* 1996, Huang *et al* 1997, Kato *et al* 1998, Wattel *et al* 1996, Wendtner *et al* 2002 & 2004)). Das Transgen wird in den Tumorzellen exprimiert, um eine Tumorspezifische zytotoxische T-Zellreaktion zu induzieren (Buhmann *et al* 1999, Kato *et al* 1998). Die Vektoren AAV und EBV eignen sich für die genetische Rekonstitution von genetischen Defekten bei der B-CLL, da AAV mit keiner bekannten Erkrankung verbunden (apathogen) ist und EBV-Vektoren einen strikten B-Zelltropismus haben (Delecluse *et al* 1998, Kay & Kaplan 2001).

Studien im Kleintiermodell haben gezeigt, dass eine Induktion einer protektiven Antwort möglich ist, wenn Tumorzellen *ex vivo* mit Vektoren transduziert wurden, die für immunmodulatorische Zytokine kodieren (IL-2 oder GM-CSF; Santos *et al* 2006). In experimentellen Modellen konnte ein verringertes Tumorwachstum oder eine Eliminierung der Tumorzellen mit CD40L-kodierenden Vektoren erzielt werden. In einer Phase I Studie, bei der B-CLL Zellen mit einem replikationsdefizienten Adenovirusvektor mit rekombinantem CD40L (Ad-CD40L Zellen) transfiziert wurden, konnte eine erhöhte Expression einer Vielzahl kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD54, CD38, CD80, CD86 und CD70, sowohl auf den transfizierten, als auch leukämischen „bystander“ B-Zellen erreicht werden (Biagi *et al* 2003, Cantwell *et al* 1997, Ranheim & Kipps 1993, Spaner *et al* 2004, Van den Hove *et al* 1997). Auch konnte die absolute Lymphozytenzahl und Lymphknotengröße innerhalb 1-4 Wochen um 40% und 70% reduziert werden. Diese Antworten konnten mindestens 3 Monate nach Behandlung aufrechterhalten werden (Kato *et al* 1998, Wierda *et al* 2000).

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Daher kann eine Anti-leukämische, zelluläre Immunität auch durch DCs erzielt werden. Die DCs müssen dafür mit Tumorantigenen beladen werden. Dies geschieht durch die Inkubation mit Tumorlysaten, definierten Peptiden oder durch Endozytose apoptotischer B-CLL Zellen. Die

Antigene können aber auch durch Transfer von DNA oder RNA in den Dendritischen Zellen zur Expression gebracht werden (Palma *et al* 2008).

Die Gentherapie stellt zwar eine große Chance bei der Heilung der B-CLL dar, jedoch werden die Erfolge durch technische (Transduktions- und Expressionseffizienz) und sicherheitsbedingte Einschränkungen (Immunogenität der Vektoren) geschmälert.

1.1.8.2.1.4 Adoptive Immuntherapie

Eine andere attraktive Methode für die Immuntherapie, v.a. bei B-Zellerkrankungen, stellt der adoptive T-Zelltransfer dar. Da die Mehrzahl der Tumorantigene anhand der Erkennung durch CTLs identifiziert wurde, konnte der Einsatz dieser Antigene bei der adoptiven Immuntherapie durch diese Modellsysteme ermöglicht werden. Die am besten charakterisierten Systeme stellen die EBV-assoziierten Lymphome dar. Nach einer allogenen Stammzelltransplantation wird eine Therapie mit unmanipulierten Spender-T-Zellen angewandt, da diese B-Zelllymphome relativ immunogen sind. Diese Strategie zeigte ein hohes klinisches Ansprechen (Masucci *et al* 1992). Jedoch ist die Gefahr der „graft-versus-host-disease“ (GVHD) hierbei erhöht. Daher wurden Bemühungen angestellt EBV-spezifische CTLs zu transfundieren, die *in vitro* stimuliert und/oder mit autologen APCs gewonnen wurden (Bonini *et al* 1997, Schetelig *et al* 2003).

Auch genmanipulierte T-Lymphozyten werden für den adoptiven T-Zelltransfer eingesetzt, die somit ihre Aktivität gezielt gegen eine bestimmte Zielstruktur auf der Tumorzelle richten können. Dazu zählen z.B. T-Zellen, die Tumor-spezifische TCRs exprimieren oder chimäre Antigen-Rezeptoren von z.B. CD19 oder CD20 (Biagi *et al* 2007, Foster *et al* 2008). Letztere haben den Vorteil, dass ihre Spezifität und Effektoraktivität gegen eine bestimmte Zielzelle in einer nicht-MHC-restringierten Weise vermittelt wird. Diese Ansätze werden derzeit in Phase I Studien untersucht. Technische und sicherheitsbedingte Fortschritte sind jedoch noch erforderlich, um den Gentransfer und die Proteinexpression zu verbessern (Biagi *et al* 2007).

1.1.8.2.1.5 Transplantation

Die KMT ist derzeit die einzige kurative Möglichkeit bei der B-CLL. Aufgrund des Auftretens der Krankheit im höheren Alter stellt der Einsatz dieser Therapie ein deutliches Risiko dar. Daher werden nur jüngere Patienten (<60 Jahre) mit ungünstigen Prognoseparametern mit der aggressiven Therapie in Form einer myeloablativen Hochdosischemotherapie gefolgt von einer allogenen KMT von einem HLA-identischen Spender behandelt. Daher verwundert es nicht, dass die therapieassoziierte Mortalität bei über 40% liegt, jedoch sind Remissionen in bis zu 70% der Fälle möglich (Waselenko *et al* 1999). Die Mortalität konnte durch die Dosisreduzierung der Konditionierung auf 20% gesenkt werden (Dreger *et al* 2002). Mit einer autologen peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSCT) kann eine Remission in bis

90% der transplantierten Patienten erreicht werden, da die Methode weitaus weniger toxisch ist als die allogene KMT (Waselenko *et al* 1999). Diese Therapie ist jedoch nicht so erfolgreich wie die allogene KMT und ist im Gegensatz dazu nicht-kurativ. Der Grund hierfür ist eine erhöhte Rezidivrate nach Transplantation (Dreger *et al* 2002).

1.1.8.3 Primärtherapie

Bei der Primärtherapie stehen drei verschiedene Optionen zur Wahl. Erstens werden Patienten nicht therapiert und nur beobachtet („watch and wait“), zweitens sie werden mit Hilfe der konventionellen Chemotherapie behandelt oder drittens sie werden einer Stammzelltransplantation mit Hochdosiskonditionierung unterzogen. Welche der drei Möglichkeiten für einen Patienten zur Wahl steht, wird durch die Kriterien Alter, Komorbidität, Stadium und Krankheitsaktivität bestimmt. Durch die bereits dargelegten neuen Therapieoptionen ergaben sich in den letzten Jahren vor allem bei jüngeren Patienten neue Therapieansätze (Cheson *et al* 1998). Die Altersabgrenzung zwischen „jungen“ und „alten“ Patienten erfolgt meist anhand 65 Jahren, was das mediane Alter bei Stellung der Diagnose ist.

Die meisten Patienten (70%) im Binet A haben in ca. 50% eine hohe Krankheitsaktivität (erhöhte Werte der Thymidinkinase, des β_2 -Mikroglobulins und des löslichen CD23) mit verkürzter Lebenserwartung. Hier gilt es zu überlegen, ob diese Patienten frühzeitig behandelt werden sollten. Patienten im Stadium A außerhalb der Studie werden bislang nicht behandelt. Darunter fallen die 30% der „smoldering B-CLL“, die aufgrund ihrer guten Prognose nicht behandelt werden sollten (Molica *et al* 1999). Patienten im Binet B qualifizieren sich für eine Chemotherapie, wenn u.a. B-Symptome oder schmerzhaft vergrößerte Lymphknoten und der Milz auftreten, (Hallek *et al* 2002, Cheson *et al* 1996). Das Binet C wird in jedem Fall behandelt. Die Wahl des Chemotherapeutikums bei der Primärtherapie fällt entweder auf Chlorambucil oder Fludarabin. Jedoch ist derzeit nicht klar, welches der beiden sich besser eignet. Es wurde gezeigt, dass Fludarabin sowohl in Bezug auf die Remissionsrate, als auch das progressionsfreie Überleben bessere Daten aufwies, als die Therapie mit Chlorambucil, CAP oder CHOP. Ob Fludarabin das Gesamtüberleben verlängert ist bis dato jedoch noch nicht bekannt (FCLLG *et al* 1996, Rai *et al* 2000, Leparrier *et al* 2001).

Im Allgemeinen wird eine Therapie ab dem Binet Stadium B empfohlen. Jüngere Patienten werden mit Fludarabin behandelt und ältere Patienten sollen Chlorambucil erhalten (Hallek *et al* 2002). Wie bereits erwähnt, könnte sich aufgrund der kürzlich veröffentlichten Phase-III CLL8-Studie die Standardtherapie bei der CLL maßgeblich verändern.

1.2 Immunantwort

1.2.1 Aktivierung von T-Zellen

Bei der normalen Immunantwort sind die Interaktionen von APCs - DCs und B-Zellen - in die T-Zellaktivierung involviert. T-Zellen kommen mit einem Antigen in Kontakt, das als prozessierte Peptide auf den APCs präsentiert wird. Diese Peptide werden in Assoziation mit dem „Major histocompatibility complex“ (MHC) Klasse I und II dem TCR (T-Zellrezeptor) präsentiert. MHC-I-Moleküle werden ubiquitär auf allen kernhaltigen somatischen Zellen exprimiert, MHC-II Moleküle nur auf APCs wie B-Zellen, Makrophagen, DCs und Epithelialzellen des Thymus. Endogene Peptid-Antigene, wie virale oder Tumorantigene, werden den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTLs) auf MHC-I, und exogene Peptide den CD4⁺ T-Helferlymphozyten (T_H-Zellen) auf MHC-II präsentiert. Diese Separierung ist jedoch nicht strikt, da DCs auch Antigene von apoptotischen Zellen aufnehmen und diese via MHC-I zu präsentieren vermögen (Albert *et al* 1998, Kovacsovics-Bankowski & Rock 1995).

Die humorale und zytotoxische Immunantwort wird durch den Kontakt zwischen CD4⁺ T_H-Zellen und MHC-II exprimierenden APCs initiiert. Die T_H-abhängige humorale Reaktion benötigt die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch B-Zellen. CTLs hingegen können MHC-I-gebundene Antigene direkt erkennen. *In vivo* werden T-Helferzellen benötigt, um naive CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen zu differenzieren (Cardin *et al*, 1996, Keene & Forman 1982). MHC-II exprimierende DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung einer zytotoxischen Reaktion. Sie interagieren einerseits mit CD8⁺ T-Zellen über MHC-I-restringierte Antigene und andererseits mit CD4⁺ T-Lymphozyten via MHC-II-restringierte Antigene. Die B-CLL DCs sind phänotypisch und funktionell normal und entstammen möglicherweise von peripheren Blutmonozyten (Messmer *et al* 2004). Dennoch ist es so, dass B-CLL Zellen selbst schlechte APCs darstellen (Johnston & Kay 2004).

Die Aktivierung der T-Zellen erfordert drei Signale (**Abbildung 1A**): Erstens, eine Antigen-spezifische TCR-Stimulation, nachdem der Peptid-MHC-Komplex auf der APC erkannt wurde. Zweitens, ein kostimulatorisches Signal, das durch die Interaktion von CD28 auf den T-Zellen und Kostimulationsmolekülen CD80/CD86 vermittelt wird (Caux *et al* 1994). Weitere solcher Kostimulationspaare sind Komplexe wie CD27/CD70 und CD40L/CD40. Das dritte Signal kommt durch die Interaktion von IL-2 und dem IL-2 Rezeptor (IL-2R) zustande. Ein Antigen induziert die IL-2 Rezeptor Expression und geringe Mengen an autokrinem IL-2. Diese drei Signale führen zur Differenzierung und klonalen Proliferation der T-Zellen.

Antigen-aktivierte, proliferierende T_H1-Zellen, ein Subtyp der CD4⁺ T-Zellen, produzieren große Mengen an IL-2. Sie unterstützen damit die Induktion von CTLs. Spezifische Antigene werden von APCs, sowohl T-Helferzellen, als auch CTLs im Komplex mit MHC-II bzw. MHC-I präsentiert (Buhmann *et al* 1999, Guerder & Matzinger 1992, Stuhler & Walden 1993). Es

wurde gezeigt, dass die APCs selbst durch die Interaktion mit einer T_H-Zelle über CD40/CD40L aktiviert werden. In diesem Stadium können sie CTLs aktivieren, ohne sich gleichzeitig in Kontakt mit einer T_H-Zelle zu befinden (Bennett *et al* 1998, Ridge *et al* 1998, Schoenberger *et al* 1998). Durch die Interaktion von CD40 mit CD40L wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der APC induziert, die für eine effiziente T-Zellstimulation notwendig sind (Shinde *et al* 1996). Dieser Zellkontakt wird durch Bindung von CD11a/CD18 (LFA-1) und CD2 auf der T-Zelle an CD54 (ICAM-1) oder CD58 (LFA-3) auf der APC verstärkt. Die Interaktion von CD80/CD86 und CD28 verstärkt die IL-2 Produktion und die Hochregulation von CD40L (June *et al* 1990). Daraufhin intensiviert sich das TCR-Signal, was zu einer effizienten Aktivierung der T-Zelle führt. Zusätzlich verhindern antiapoptotische Proteine, wie z.B. die der bcl-Familie, die Aktivierung des induzierten Zelltodes („activation of induced cell death“ (AICD); Lanzavecchia *et al* 1999, Viola *et al* 1999). Die Signalkaskadenaktivierung in den T-Zellen hängt daneben von Faktoren ab, wie die Anzahl der TCR Molekülen auf den T-Zellen, die Konzentration der Antigene und die Zahl der Kostimulationsmolekülen auf den APCs. In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Signalkaskade in den T-Zellen ebenfalls erreicht werden kann, wenn die Anzahl der TCR Moleküle niedrig ist, aber die Menge der Kostimulationsmoleküle hoch ist (Bachmann *et al* 1996, Grossman & Singer 1996, Waldrop *et al* 1998).

Die Aktivierung von T-Helferzellen bei einer Immunantwort kann eine definierte Polarität haben, in Abhängigkeit der produzierten Zytokine. Eine T_H1-Polarität, mit einer IFN- γ -Sekretion, induziert eine zellvermittelte Immunität. Eine T_H2-Polarität mit einer Sekretion von IL-4, Antikörperproduktion. Bei einer T_H2-Antwort können die aktivierten T-Zellen „helfen“, B-Zellen zu aktivieren und sie zur Maturierung und Sekretion von Antikörpern zu veranlassen (Teft *et al* 2006).

Die T-Zellaktivierung hat eine eingebaute Ausschaltfunktion, das späte Aktivierungsmolekül CTLA-4 (CD152) auf der T-Zelloberfläche. Dieses interagiert mit dem CD80/CD86-Komplex auf den APCs/B-Zellen und inaktiviert die T-Zellantwort (Teft *et al* 2006). CTLA-4 wird auch auf einer Subpopulation von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) exprimiert, die eine Antigen-spezifische T-Zellantwort unterdrücken. Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, indem sie autoreaktive T-Zellpopulationen supprimieren. Abgesehen von CD152 sind T_{regs} durch die Expression von CD4 und CD25 zusammen mit FOXP3 (Forkhead box P3), CD62L, GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related protein), TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) und IL-10 charakterisiert. Die Zahl der T_{regs} ist in Patienten mit B-CLL erhöht, wobei die größte Zunahme an T_{regs} bei Patienten in sehr fortgeschrittenem Stadium zu finden ist. Es ist nicht klar, ob diese Tatsache zur Immundefizienz beiträgt, aber es konnte gezeigt werden, dass diese Population sehr sensitiv auf die Behandlung mit Fludarabin reagiert, da nach einer Therapie mit Fludarabin

eine verminderte Anzahl und Suppression CD4⁺/CD25^{hi} T_{regs} beobachtet werden konnte (Beyer *et al* 2005). Es wird angenommen, dass dies der Grund für die Entwicklung einer autoimmunen hämolytischen Anämie nach der Behandlung mit Fludarabin sein könnte (Hamblin 2006).

Nicht aktivierte T-Zellen produzieren weder IL-2, den IL-2 Rezeptor, noch proliferieren sie oder zeigen zytotoxische Aktivität (Stuhler & Walden 1993). Die Stimulation des TCR ohne Interaktion zwischen CD28 und CD80/CD86 und das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen resultiert in einer klonalen Anergie (Johnston & Kay 2004) und Apoptose der T-Zellen *in vitro* (Jenkins *et al* 1987) und einer peripheren T-Zelltoleranz *in vivo*. Ein vergleichbares Profil ist bei B-CLL Zellen zu finden (**Abbildung 1B**). Als Folge der ineffizienten APC-Qualitäten der B-CLL Zellen, die aus keiner oder geringer Expression von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen resultiert (CD54, CD80 und CD86; Angelopoulou *et al* 1999, Buhmann *et al* 1999, De Rossi *et al* 1993, Lucio *et al* 1998), sind B-CLL T-Zellen defizient. Sie können das 2. Signal nicht empfangen. Zusätzlich rührt die T-Zellinkompetenz bei der B-CLL von einer Herunterregulation des CD40L auf den T-Zellen her (Caligaris-Cappio *et al* 2001, Ghia & Caligaris-Cappio 2000).

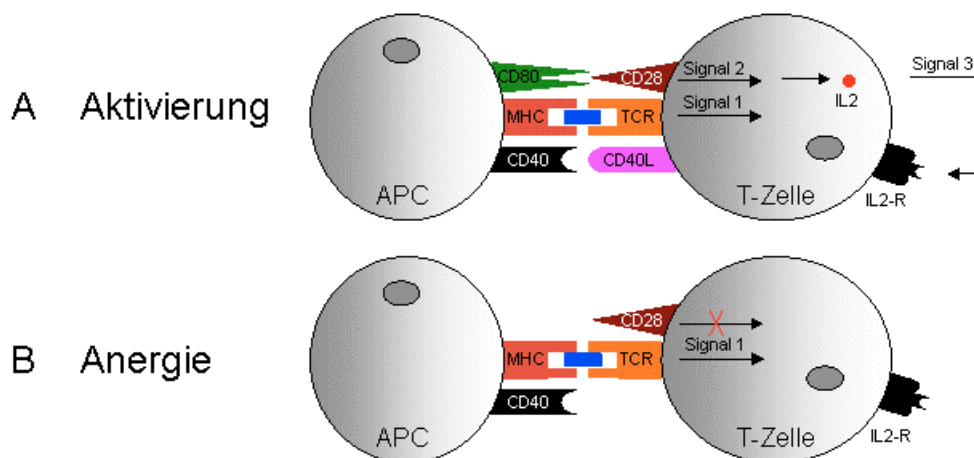


Abbildung 1. T-Zellaktivierung. (A) Essentielle Signale für eine Aktivierung. MHC (rot), präsentiertes Antigen (blau), T-Zellrezeptor (TCR, orange), CD40L/CD40 (pink/schwarz), CD28/CD80 (braun/grün). IL-2 (rot) IL-2 Rezeptor (IL-2R). **(B) T-Zellanergie.** APC: Antigen-präsentierende Zelle; MHC: Major-Histocompatibility-Complex; IL-2: Interleukin 2, IL-2R: Rezeptor für IL-2.

1.2.2 Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen (CTLs)

Die Aktivierung von prä-CTLs wird durch die Erkennung ihres spezifischen Antigens und das von T_H-Zellen produzierte IL-2 induziert. Die prä-CTLs exprimieren daraufhin den hochaffinen IL-2 Rezeptor (CD25), proliferieren und differenzieren zu reifen CTLs. Zu Beginn der Differenzierung wird CD28 hoch exprimiert und im Verlauf herunterreguliert. Wie schon

erwähnt, wird dieses Molekül für die Bindung an CD80/CD86 benötigt. Adhäsionsmoleküle (CD54 (ICAM-1), CD44 (H-CAM), CD11a (α -L-Integrin Kette, α -Kette von LFA-1), CD95L (Ligand für CD95, das Apoptose induziert) und CD62L (L-Selektin, homing-Marker)) auf den T-Zellen sind für deren „homing“ zu den lymphatischen Organen und den inflammatorischen Zentren zuständig (Oughton & Kerkvliet 1999).

Nach Reifung der CTLs verlassen sie die sekundären lymphatischen Organe und zirkulieren in der Peripherie. CTLs produzieren IFN- γ und TNF- α , die zu einer Aufregulation von MHC-Molekülen auf APCs führen. Die zytotoxische Aktivität der CTLs besteht in der Freisetzung zytotoxischer Granula, die Granzyme und Perforin enthalten (Henkart 1985). Nach Erkennung des spezifischen Antigens auf einer APC werden Granula sezerniert und die Perforinmoleküle in die Zellmembran der Zielzelle eingebaut. Sie bilden Poren, durch die Ionen (v.a. Ca^{2+}) in das Zytoplasma gelangen und dort Apoptose induzieren (Esser *et al* 1998, Hishii *et al* 1999). Stark aktivierte CTLs können mehrere Zielzellen töten (Koren *et al* 1973). Die meisten CTLs werden nach der Effektorphase durch AICD beseitigt, jedoch kann die Reduktion auch über die CD95-vermittelte Apoptose erfolgen. CTLs exprimieren zusätzlich zu CD95L auch CD95. Nur ein kleiner Teil der CTLs überlebt und differenziert zu Gedächtnis T-Zellen (Carter *et al* 1998, Di Somma *et al* 1999, Opfermann *et al* 2001).

1.2.3 Tumor-escape Mechanismen

Eine Vielzahl von soliden Tumoren und Leukämien, einschließlich der B-CLL, wachsen stetig und entziehen sich der Erkennung und/oder der Zerstörung durch das Immunsystem. Der Erfolg der derzeitigen immuntherapeutischen Ansätze mag wegen mehrerer Gründe eingeschränkt sein: Das Versagen der Effektorzellen dem Tumorwachstum standzuhalten (B-CLL Zellen v.a. in G_0 -Phase (Dighiero & Binet 1996)), die Produktion humoraler Faktoren (z.B. das immunmodulatorische lösliche HLA-G (sHLA-G)), vom Tumor erzeugte inhibitorische Faktoren (Mikromilieu), die lokal die Zytotoxizität blockieren (z.B. Zytokine, die die Apoptose der B-CLL Zellen und eine Aktivierung von CTLs inhibieren, u.a. IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-13, Kay & Pittner 2003, Scrivener *et al* 2003, Patten *et al* 2008), die Expression proapoptotischer Moleküle (z.B. Fas-Ligand (Fas-L), der Apoptose in Zellen induziert, die den Todesrezeptor Fas (CD95) exprimieren (O'Connell *et al* 1999, Sampalo & Brieva 2002), defekte Antigenprozessierung und -präsentation (z.B. ineffiziente Signaltransduktion über den BCR durch Fehlen von CD79b in 95% aller B-CLL Patienten (Alfarano *et al* 1999, Catovsky 1997, Chiorazzi & Ferrarini 2003), die reduzierte Produktion von monoklonalen Oberflächenimmunglobulinen (Batata & Shen 1992, Hartley *et al* 1993), die Herunterregulation von MHC-Allelen (Bubenik 2004), der Verlust kostimulatorischer Moleküle (LFA-1, CD22, CD40, CD54, CD80/CD86; Angelopoulou *et al* 1999, Lucio *et al* 1998, Van den Hove *et al* 1997), T-Zelldefekte (z.B. sowohl funktionale Beeinträchtigung der CTLs durch den

Verlust der CD3-zeta Kette im TCR/CD3-Komplex der T-Zellen (Kuss *et al* 1999), als auch Abweichungen bezüglich der Zellzahl und der Verteilung der verschiedenen T-Zellsubtypen (Ghia & Caligaris-Cappio 2000) und die Produktion von T_{regs}. Die stark eingeschränkte zelluläre und humorale Immunität bei der B-CLL ist multifaktoriell bedingt und betrifft sowohl die Funktion der anormalen B-Zellen, als auch die der T-Zellen (Ahmad *et al* 2004, Bubenik 2004, Kiessling *et al* 1996, Kono *et al* 2002).

1.3 Tumorantigene

Eine entscheidende Voraussetzung für die Generierung einer spezifischen Immunantwort ist das Vorhandensein von antigenen Strukturen auf Tumoren und Leukämien. Obwohl Tumorzellen von gesunden autologen Zellen abstammen exprimieren diese in Abhängigkeit der malignen Transformation Antigene, die durch spezifische Immunzellen als „nicht selbst“ erkannt werden. Diese so genannten Tumorantigene (TA) oder Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) unterscheiden sich in der resultierenden Immunantwort, die sie zur Folge haben: Antigene die eine humorale Immunantwort vermitteln, eine CD4⁺ T-Zell- oder eine CD8⁺ T-Zellantwort induzieren. Die meisten Tumorantigene, die identifiziert wurden binden an MHC-I-Moleküle (Anderson 1998, Gordan & Vonderheide 2002, Townsend & Allison 1993).

Im Allgemeinen sollte ein „ideales“ Tumorantigen/Tumor-assoziiertes Antigen bestimmte Kriterien erfüllen, um sich für den Einsatz bei der Immuntherapie zu qualifizieren. Einerseits sollte das Antigen auf einer Vielzahl von Tumoren oder einer Kategorie exprimiert sein, die so genannten universellen Tumorantigene. Andererseits sollte die Immunreaktion gegen das Antigen zu einer Tumoreliminierung führen ohne eine Autoimmunreaktion gegen gesunde Gewebe zu induzieren. Des Weiteren sollte das antigene Produkt nicht mit der malignen Transformation verbunden sein, da dies eine Erkennung durch das Immunsystem nicht gewährleistet. Die Antigene sollten aus Peptidsequenzen bestehen, die an Major histocompatibility (MHC) Moleküle binden können, sie müssen prozessiert und auf MHC Molekülen der Tumorzellen präsentiert werden und in dem jeweiligen Tumor exprimiert sein. Nur so können T-Zellen die Antigene erkennen und eine Tumor-spezifische Immunantwort hervorbringen (Gordan & Vonderheide 2002, Rosenberg 1997, Vonderheide *et al* 1999). Diese Antigene sind direkt am malignen Phänotyp des Tumors involviert. Bestimmte Peptide solcher Antigene werden auf der Tumorzelloberfläche exprimiert. Dies wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten bewiesen, bei denen Antigen-spezifische, MHC-restringierte Anti-Tumor T-Zellreaktivität gezeigt werden konnte (Gordan & Vonderheide 2002). Im Folgenden werde ich mich auf Antigene beschränken, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (CD8⁺ CTL Antworten). Da Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen die Haupteffektorzellen bei der Immunantwort gegen Tumorzellen darstellen, ist die Induktion und Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen von

entscheidender Rolle bei der Entwicklung von immuntherapeutischen Therapien (Jäger *et al* 2001).

1.3.1 Universelle, Tumor-assoziierte und Patienten-spezifische Tumorantigene

Bei den Tumorantigenen unterscheidet man zwischen universellen oder Tumor-spezifischen Antigenen, Tumor-assoziierten (TAAs) und Patienten-spezifischen Antigenen.

Die Haupteigenschaft eines universellen/Tumor-spezifischen Antigens ist, dass sie aufgrund ihrer Pathophysiologie ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert sind, d.h. sie werden in den meisten Tumoren exprimiert oder überexprimiert und sind nicht oder wenigstens nur zu sehr geringem Maße in normalen gesunden Zellen und Geweben zu finden. Im Gegensatz dazu können Tumor-assoziierte Antigene auch in nicht transformierten Zellen exprimiert werden. Die Existenz der universellen Tumorantigene ist von großer praktischer Bedeutung. Tumoren sind von großer genetischer Instabilität geprägt, so dass sich spontane Mutationen ereignen können. Antigene, die durch solche Mutationen entstehen, sind spezifisch für jeden einzelnen Tumor. Für therapeutische Ansätze würde dies bedeuten, dass durch die Mutationen entstandenen Antigene für jeden einzelnen Patienten spezifisch sind und individuell detektiert und isoliert werden müssten. In diesem Zusammenhang erlauben universelle Tumorantigene und TAAs ihren Einsatz in einer Vielzahl von Tumoridentitäten im Gegensatz zu Patienten-spezifischen Antigenen, die nur auf einen sehr eingeschränkten Patientenanteil anwendbar ist. Zu den universellen Tumorantigenen und TAAs werden z.B. aktivierte Onkogene oder mutierte Tumorsuppressorgene, viruskodierte Proteine und Gewebe- und Tumorspezifische Antigene gezählt. Einige der bekanntesten Beispiele sind in **Tabelle 3** aufgelistet (Gitelson *et al* 2003, Rezvany *et al* 2000, Rosenberg 1997, Shinohara *et al* 1988, Van den Eynde & van der Bruggen 1997, Van Pel *et al* 1995, Vonderheide *et al* 1999).

Für die Tumormunologie ist die Identifizierung von Tumorantigenen und TAAs ein großes Ziel. Peptidsequenzen der verschiedenen Antigene, die eine T-Zellantwort induzieren könnten, gilt es zu finden. Die Tumorantigene und TAAs dienen nicht nur zum besseren Verständnis der Tumorbioogie, sondern ermöglichen auch die Entwicklung von Immuntherapien, die eine spezifische T-Zellantwort induzieren.

Für die meisten identifizierten Tumorantigene (z.B. MAGE-1, hTERT, p53, Her-2/neu, gp100, Tyrosinase, der Laminin-Rezeptor, EBNA1, das kürzlich beschriebene FMOD, Survivin, MDM2, idiotypische Strukturen des Immunglobulins und die Oberflächenmoleküle CD19 und CD20) wurden bereits CTLs *in vitro* generiert und sind zum Teil schon in präklinischer und klinischer Entwicklung (Grube *et al* 2004, Liu *et al* 2004, Masucci *et al* 1992, Mayr (1) *et al* 2005, Riker *et al* 2000, Schmidt *et al* 2003, Siegel *et al* 2003, Soruri *et al* 2004, Trojan *et al* 2000, Valmori *et al* 1999, Vonderheide *et al* 1999 & 2004, Voss *et al* 2000). Bislang konnte

der klinische Erfolg bei der Tumorstimmung jedoch noch nicht die Erwartungen erfüllen. Ein Grund dafür ist die geringe Quantität und Qualität der vorhandenen Antigene.

1.3.2 Antigene bei der B-CLL

Für die B-CLL wurden bislang nur wenige Tumorantigene identifiziert, die als potentielle Zielstrukturen für eine Generierung einer spezifischen T-Zellantwort in Frage kommen (**Tabelle 3**). Fibromodulin (FMOD), Survivin, MDM2, die idiotypischen Strukturen des Immunglobulins, das OFAiLRP („oncofetal antigen-immature laminin receptor protein“), RHAMM/CD168 („receptor for hyaluronic acid mediated motility“), CD19 und CD20 zählen zu diesen (Giannopoulos *et al* 2006, Giannopoulos & Schmitt 2006, Grube *et al* 2004, Mayr (1) *et al* 2005, Trojan *et al* 2000, Voss *et al* 2000).

Aufgrund der geringen Anzahl von Tumorantigenen, die sich für B-Zellerkrankungen, insbesondere die B-CLL, eignen, sind die Bestrebungen groß neue Antigene zu identifizieren. Expressionsstudien bringen stetig neue Moleküle zum Vorschein, die es zu verifizieren gilt (Giannopoulos *et al* 2006). Daher wurden in dieser Arbeit ein bereits bekanntes universelles Tumorantigen, hTERT, und zusätzlich zwei neue Oberflächenantigene (CD23 und CD229) auf ihr mögliches immunogenes Potential, als Antigene bei der B-CLL zu fungieren, untersucht.

1.3.2.1 hTERT

Die Telomerase, eine spezialisierte Reverse Transkriptase, spielt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Telomerlänge und in der zellulären replikativen Lebensspanne (Blackburn 1992, De Lange 1998, Nakamura & Cech 1998). Die Funktion des Enzyms besteht in der Aufrechterhaltung der Telomerlänge während des Zellzyklus, indem TTAGGG Tandem Wiederholungssequenzen an die Telomerenden angefügt werden, um diese vor Degradation und „Ende an Ende“ Fusionen zu schützen. Bei diesem Vorgang wird eine RNA-Vorlage des Enzymkomplexes verwendet (**Abbildung 2**; Greider 1995). Telomeraseaktivität (TA) ist beim Menschen in den Keimzellen, den meisten malignen Tumoren und in wenigen somatischen Zellen, wie z.B. Lymphozyten, zu finden. In der Mehrheit der somatischen Zelltypen ist jedoch keine Telomeraseaktivität detektierbar (Greider 1998, Kim *et al* 1994, Weng *et al* 1998). Die Mechanismen, die die TA kontrollieren, sind jedoch noch nicht vollständig klar. Die beiden Hauptkomponenten der humanen Telomerase stellen hTER und hTERT dar (Feng *et al* 1995, Harrington *et al* 1997, Kilian *et al* 1997, Meyerson *et al* 1997, Nakamura *et al* 1997), die beide essentiell und ausreichend sind für die Aktivität des Enzyms *in vitro* (Beattie *et al* 1998, Weinrich *et al* 1997). In normalen Zellen zeigen die beiden Komponenten unterschiedliche Expressionsprofile. hTER ist ubiquitär in allen humanen Zelltypen exprimiert, ungeachtet des TA Status. Die hTERT Komponente ist jedoch nur in

Zellen und Geweben anwesend, die eine Telomeraseaktivität zeigen, d.h. in Tumor- und fetalen Zellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen, denen eine Telomeraseaktivität fehlt (Feng *et al* 1995, Harrington *et al* 1997, Kilian *et al* 1997, Kolquist *et al* 1998, Meyerson *et al* 1997, Nakamura *et al* 1997, Ramakrishnan *et al* 1998).

Die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) stellt die Polypeptidkomponente und katalytische Untereinheit des Ribonukleoproteins Telomerase dar. Die Expression des Enzyms ist in den meisten normalen humanen adulten Zellen sehr gering oder nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu ist die Expression der Telomerase in 85% der humanen Krebsarten reaktiviert, was für hTERT eine potentielle Möglichkeit impliziert als universelles Tumorantigen zu fungieren. Die Generierung Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTLs) stellt ein attraktives Werkzeug für eine spezifische Immuntherapie (aktive Vakzinierung und adoptive Immuntherapie) oder das Immunmonitoring dar. MHC-I-restringierte, hTERT-entstammende Peptide wurden in den letzten Jahren identifiziert und CTLs, die spezifisch waren für die antigenen hTERT-Epitope lysierten hTERT-positive Tumoren verschiedenen Ursprungs (Li *et al* 2007).

Des Weiteren wurde hTERT als prognostischen Faktor bei der B-CLL identifiziert. Es zeigte sich, dass eine signifikant höhere hTERT-mRNA Expression in Patienten mit schlechter Prognose (unmutiertes IgV) zu finden war im Vergleich zu Patienten mit mutierten IgV. Die Trennung zwischen B-CLL Patienten mit unmutierten und mutierten IgV war in 89% der Fälle mittels hTERT-Expression möglich (Tchirkov *et al* 2004). Neuere, differenzierte Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Überleben von unmutierten Patienten mit einer niedrigen hTERT-mRNA Expression vergleichbar war mit dem mutierter Patienten mit einer hohen hTERT Expression (Terrin *et al* 2007).

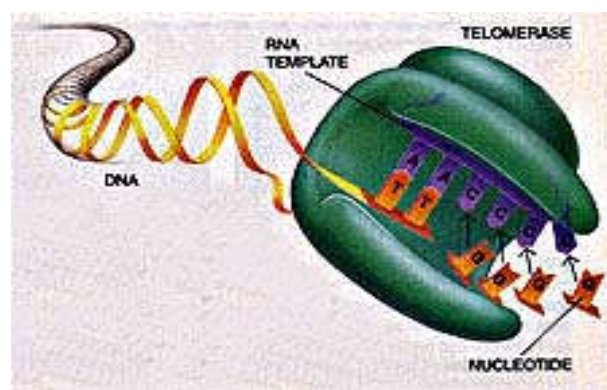


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Funktionsweise der katalytischen Untereinheit hTERT der Telomerase. Durch Anfügen von TTAGGG Tandem Wiederholungssequenzen (rot) an die Telomerenden der DNA (gelb) erhält die Telomerase (grün) die Länge dieser bei der Replikation aufrecht. So wird eine DNA-Degradation und Fusionen der Enden vermieden. Bei diesem Vorgang wird eine RNA Vorlage des Enzymkomplexes verwendet (blau; Greider CW & Blackburn EH 1996)

	Universelle Tumorantigene und TAAs			Patienten-spezifische Tumorantigene
Typ	Aktivierte Onkogene oder mutierte Tumorsuppressorgene	Viruskodierte Proteine	Gewebe- und Tumorspezifische Antigene	Zufällige Mutationen normaler oder hypervariabler Genprodukte
Beispiele	P21 mit Punktmutationen in Kodon 12 und 61 (in 50% der humanen Kolonkarzinome) (Allen <i>et al</i> 1987, Johnson <i>et al</i> 1987)	EBNA1 (Expression auf EBV-assoziierten Malignomen) (Masucci <i>et al</i> 1992)	MAGE-1 (Expression in <30% aller humaner Melanome) (Liu <i>et al</i> 2004)	Idiotyp (Trojan <i>et al</i> 2000) des Immunglobulins (wird auf B-Zellen und B-Zelllymphomen exprimiert)
	P53 (Voss <i>et al</i> 2000)		Tyrosinase (Liu <i>et al</i> 2004), gp100 (Valmori <i>et al</i> 1999), Her2/neu (Riker <i>et al</i> 2000) (Glioblastome und Melanome)	
	Der onkofetale Antigen-immature Laminin-Rezeptor (hämatologische Erkrankungen) (Siegel <i>et al</i> 2003)		hTERT katalytische Untereinheit der Telomerase (Frolkis <i>et al</i> 2003, Kokhaei <i>et al</i> 2007, Vonderheide <i>et al</i> 1999 & 2002 & 2004)	
			Framework Segmente der variablen Region der Immunglobuline (Trojan <i>et al</i> 2000)	
			Fibromodulin, ein kollagen-bindendes Protein (Mayr (1) <i>et al</i> 2005)	
			Apoptoseinhibitor Survivin (Andersen & Thor 2002, Schmidt <i>et al</i> 2003)	
			P53-interagierendes Protein MDM2 (Soruri <i>et al</i> 2004, Voss <i>et al</i> 2000)	
			Oberflächenmoleküle CD19 und CD20 (Grube <i>et al</i> 2004, Voss <i>et al</i> 2000) (humane B-Zellerkrankungen) RHAMM/CD168 (Giannopoulos <i>et al</i> 2006)	

Tabelle 3. Universelle, Tumor-assoziierte und Patienten-spezifische Tumorantigene, die T-Zellantworten induzieren können.

1.3.2.2 Humanes Ly9 (CD229)

Humanes Ly9, CD229 oder auch als Slam Family Member 3 (SLAMF3) bezeichnet, ist ein Mitglied der SLAM- (signaling lymphocyte activation molecule) Familie. Diese Zelloberflächenmoleküle interagieren mit Antigen-spezifischen Rezeptoren, indem sie an der Zelladhäsion von Lymphozyten beitragen und modulieren so eine Reihe von Immunantwort, wie T-Zellaktivierung, Generierung von B-Gedächtniszellen, Antikörperproduktion und NK-Zellaktivierung (Veillette 2006). Die SLAM-Familie umfasst die Moleküle SLAM (CD150), CD48, Ly9 (CD229), 2B4 (CD244), CD84, NTB-A (SLAM6), CS1 (CRACC), BLAME und SLAMF9 und stellt eine Untergruppe der CD2-Familie dar. Zu dieser zählen auch CD2 und CD58 (Fraser *et al* 2002, Kingsbury *et al* 2001). Ursprünglich wurde Ly9 als murines Zelloberflächen Glykoprotein beschrieben, wo es auf Thymozyten, reifen T- und B-Zellen exprimiert wird. Das humane Ly9 ist das Homolge des murinen Ly9 (De la Fuente *et al* 2001, Romero *et al* 2004, Sandrin *et al* 1996). Strukturell gesehen besteht das humane CD229 aus vier Immunglobulin Domänen an seinem extrazellulären Teil, wobei Domäne 1 und 3 (Immunglobulin variable Domäne (IgV)), sowie 2 und 4 (Immunglobulin konstante-2 Domäne (IgC2)) identisch sind. Dies lässt annehmen, dass Ly9 durch eine Genduplikation aus einem Vorläufer entstand (**Abbildung 3**). Die membran-distale IgV Domäne ist verantwortlich für die Erkennung des Liganden. Interessanterweise stammen die Bindungspartner aller charakterisierten Mitglieder der SLAM/CD2-Familie aus dieser und es gibt sowohl homophile (z.B. CD150, CD84, Ly9 und NTB-A binden an sich selbst), als auch heterophile Interaktionen (z.B. 2B4 bindet an CD48 und CD2 an CD58; Engel *et al* 2003, Fraser *et al* 2002, Kingsbury *et al* 2001). Bislang sind mehrere kleine SH2-enthaltende Adaptorproteine bekannt, die mit der intrazellulären Domäne der SLAM-Familienmitglieder assoziieren. Beispielsweise werden aktivierten SLAM-Rezeptoren in T- und NK-Zellen tyrosin-phosphoryliert und rekrutieren den sog. Adaptor SAP (SLAM-associated protein) und die Src-Kinase Fyn. Die darauffolgende Signaltransduktionskaskade beeinflusst die Interaktion zwischen T-Zelle und APC, bzw. NK-Zelle und Zielzelle. Die funktionale Bedeutung der SLAM-Familie zeigt sich am Beispiel der XLP (X-linked lymphoproliferative disease). Diese ist eine vererbte Immundefizienz, die meistens durch eine EBV-Infektion ausgelöst wird. Die meisten EBV-infizierten XLP-Patienten haben eine ineffiziente Immunantwort, die zu infektiöser Mononukleose, Organversagen und zum Tod führen kann. Patienten, die überleben oder nicht mit EBV infiziert sind, leiden an malignen NHLs oder anderen lymphoproliferativen Krankheiten. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein signifikanter Teil der XLP-Fälle in Verbindung mit fast 50 verschiedenen zu Funktionsverlust führenden Mutationen im SAP-Gen steht (Engel *et al* 2003, Latour & Veillette 2003, Veillette 2004, Veillette & Latour 2003). Mit Hilfe von SAP knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass SAP-Mutationen zu einer signifikanten T-Zelldysregulation führen. Die Anzahl der CD8⁺ und

CD4⁺ T-Zellen ist erhöht, CD4⁺ T-Zellen zeigen eine verminderte Fähigkeit in Th2-Zellen zu differenzieren, was zu einer vorwiegenden Th1 Antwort führt. Ebenso ist die Zahl der B-Gedächtnis- und Plasmazellen reduziert, wahrscheinlich aufgrund der verminderten CD4⁺ T-Zellen. Die SLAM-Familie und SAP spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Lymphozyteninteraktionen und -adhäsion, die bei der normalen Entwicklung, Homeostase und Funktion des Immunsystems notwendig sind (Crotty *et al* 2003, Czar *et al* 2001, Schwartzberg *et al* 2009, Wu *et al* 2001)

In Bezug auf die B-CLL wurde nur in einer Publikation die CD229 Expression in hämatopoetischen Erkrankungen untersucht. Darin wurde gezeigt, dass 12/15 untersuchten B-CLL Patienten Ly9-positiv im Durchflußzytometer gescreent wurden (De la Fuente *et al* 2001).

Name	Synonyme	Expression	Ligand	Struktur
CD150	SLAM, SLAMF1	Monozyten, Makrophagen, DCs, B-Zellen, T-Zellen	selbst, Masernvirus	
CD48	BLAST2, SLAMF2	B-Zellen, T-Zellen	SLAMF4	
CD229	Ly-9, SLAMF3	B-Zellen, T-Zellen	selbst	
CD244	2B4, SLAMF4	Monozyten, Basophile, T-Zellen, NK-Zellen	SLAMF2	
CD84	Ly-9b, SLAMF5	Monozyten, Makrophagen, DCs, B-Zellen, T-Zellen	selbst	
NTB-A	SF2000, SLAMF6	B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen	selbst	
CS1	19A, CRACC, SLAMF7	DCs, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen	selbst	
BLAME	SLAMF8	Makrophagen, DCs	unbekannt	
CD2F-10	SF2001, SLAMF9	Makrophagen, DCs, B-Zellen, T-Zellen	unbekannt	

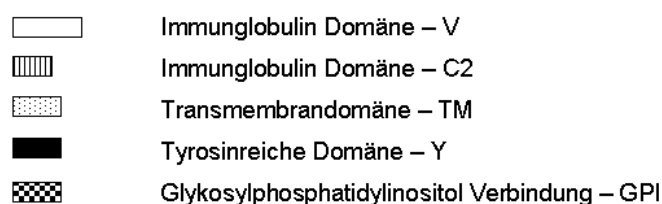


Abbildung 3. SLAM-Familie. (In Anlehnung an <http://www.rndsystems.com>).

1.3.2.3 CD23

Das humane CD23, auch bekannt als der Niederaffinitätsrezeptor für IgE (Fc Epsilon RII), gehört zur Superfamilie der Typ II Integralmembranproteine und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa. Die Fc Epsilon RII Expression wurde ursprünglich auf B-Zellen beschrieben, jedoch ist diese auf einer Reihe von hämatopoetischen Zellen zu finden. CD23 vermittelt IgE-abhängige Zytotoxizität und Phagozytose durch Makrophagen und Eosinophile (Sarfati *et al*

1992). In der frühen Phase der normalen B-Zellaktivierung findet ein An- und Abschalten der Hochregulation der CD23 Oberflächenexpression stetig statt. Daraus lässt sich eine Schlüsselrolle von CD23 bei diesem Prozess schließen (Fournier *et al* 1994). Wie bereits erwähnt, stellt die CD23-Positivität der B-CLL Zellen einen wichtigen Bestandteil bei Diagnosestellung dar. Bei der B-CLL wird CD23 konstitutiv exprimiert. Das Molekül wird atypisch auf den malignen B-Zellen im Vergleich zu normalen B-Zellen reguliert, was in einer Überexpression von CD23 resultiert (Sarfati *et al* 1992 & 1993). Durch Genexpressionsanalysen konnte bestätigt werden, dass die CD23-Expression in B-CLL Zellen 5,9-fach höher verglichen mit gesunden Gedächtnis B-Zellen ist (Klein *et al* 2001). Das Antigen stellt einen Oberflächenmarker mit signifikanter prognostischer Bedeutung bei der B-CLL dar (Fournier *et al* 1992). Des Weiteren existieren bei der B-CLL zwei Isoformen dieses Moleküls, CD23a und CD23b, die sich nur in einer kurzen Aminosäuresequenz (YSEIE) am N-Terminus ihrer zytoplasmatischen Domäne unterscheiden. Die CD23a Isoform trägt ein Endozytosesignal und ist im Gegensatz zur zweiten Isoform vorwiegend in die Antigenpräsentation involviert. CD23b ist mit Wachstum und Aktivierung der B-CLL Zellen verbunden (Fournier *et al* 1994, Visan *et al* 2003, Yokota *et al* 1992). Die Expression von CD23b wird spezifisch durch IL-4 auf B-Zellen und Zellen der myeloischen Linie induziert, wohingegen die CD23a Expression nur auf B-Zellen beschränkt ist (Visan *et al* 2003). Bei der B-CLL ist CD23a vorwiegend exprimiert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD23 als Antigen auf den B-CLL Zellen als Zielmolekül für monoklonale Antikörper (IDEC-152) verwendet wird, dieses sehr effektiv präsentiert und angegriffen wird (Mavromatis & Cheson 2004). Daher könnte möglicherweise auch CD23 ein geeignetes Zielmolekül bei der B-CLL darstellen, um eine spezifische T-Zellantwort zu aktivieren (Goller *et al* 2002).

2 Aufgabenstellung

Eine kritische Voraussetzung für eine effektive Krebstherapie stellt die Identifizierung von Tumor-spezifischen oder Tumor-assoziierten/Leukämie-assoziierten Antigenen (TAAs/LAAs) dar. Bei B-Zellerkrankungen, insbesondere der B-CLL, ist nur eine geringe Anzahl von Tumorantigenen bekannt.

Ziel der Arbeit war, neue und geeignete Tumorantigene bei der B-CLL zu definieren, die eine Antigen-spezifische Erkennung für diese Erkrankung ermöglichen. Hierfür wurden das bereits für andere Tumorerkrankungen beschriebene intrazelluläre Tumorantigen hTERT und zwei neue Antigene, die Oberflächenmoleküle CD229 und CD23, ausgewählt und im Hinblick auf ihr mögliches Potential die Tumorantigenkriterien zu erfüllen (Tumor-spezifische Expression/Überexpression, endogene Prozessierung und MHC-restringierte Präsentation auf den malignen Zellen, Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort), untersucht. Daher sollte zunächst das Expressionsprofil der drei Antigene bei der B-CLL verifiziert werden. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Prozessierung und Präsentation von definierten, potentiell MHC-I- (HLA-0201) restringierten hTERT-, CD23- und CD229-abstammenden Peptiden von B-CLL-Zellen in einer Weise vorgenommen wird, die eine spezifische CD8⁺ T-Zellerkennung erlaubt. Dies wurde durch Generierung und Expansion Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen mit Hilfe autologer CD40L-aktiverter und naiver B-CLL Zellen untersucht, und die Immunantwort charakterisiert.

CD8⁺ T-Lymphozyten sind vor allem bei der Etablierung einer Anti-leukämischen Immunantwort von Bedeutung, da sie die Tumorzellen anhand TAAs/LAAs direkt eliminieren können. Auf diese Weise sollten immunologisch relevante Marker für ein späteres Immunmonitoring in Therapiestudien (z.B. nach einer Therapie mit Gentransfer-modifizierten B-CLL-Zellen wie dem kostimulatorischen Molekül CD40L) oder antigene Determinanten für einen adoptiven T-Zelltransfer bei B-CLL Patienten definiert werden. Eine wachsende Anzahl neu identifizierter und charakterisierter Tumorantigene macht die Untersuchung der Tumorimmunogenität und die Antigenselektion für eine mögliche Immuntherapie spezifischer. Im Hinblick auf die B-CLL kann ein Immunmonitoring Informationen über die Frequenz und Qualität Antigen-spezifischer T-Zellen vor bzw. nach einer Immuntherapie oder zellulären Therapie geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Basal Iscove's Medium (mit L-Glutamin; Biochrome, Berlin, Deutschland)
 β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
 β_2 -Mikroglobulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
BSA (Sigma, München, Deutschland)
Cyklosporin A (Sigma, München, Deutschland)
Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DTT (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DMEM (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat; Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
DPBS (ohne Mg^{2+} and Ca^{2+} ; Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma, München, Deutschland)
GM-CSF (100 ng/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Humanes AB Serum (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
IL-1 β (500 U/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
IL-2 (160 U/ml, Cell concepts, Umkirch, Deutschland)
IL-4 (5 ng/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
IL-6 (1000 U/ml, Roche Applied Bioscience, Mannheim, Deutschland)
IL-7 (5 ng/ml, Cell concepts, Umkirch, Deutschland)
L-Glutamin (2 mmol/l, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
p(dN)₆-Primer (Roche Applied Bioscience, Mannheim, Deutschland)
Pancoll (humaner Ficoll, Dichte: 1,77 g/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
PCR Nukleotid Mix (10 mM je dNTP, Roche, Mannheim, Deutschland)
Penizillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 μ g/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Prostaglandin E₂ (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
RNasin RNase Inhibitor (40 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA)
RPMI 1640 (mit L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Sera-Plus (standardisiertes FCS, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Natriumazetat (Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland)

Natriumpyruvat (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U/μl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
TNF-α (1000 U/ml, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Trypan-Blau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Trypsin (0,05%)/EDTA-Lösung (0,02%, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Alle anderen Chemikalien wurden von Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Zusätzliche Reagenzien

- Anti-FITC Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Chromium-51 (Natriumchromat in Puffer, Perkin Elmer, Boston, MA, USA)
- DimerX I: Humanes, rekombinantes, lösliches, HLA-A2:Ig Dimer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- RedTaq Ready Mix PCR Mix (mit MgCl₂, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

3.1.3 Weitere Materialien

- LS Separationssäulen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Luma-Platten-96-well-Mikrotiterplatten (Packard BioScience, Dreieich, Deutschland)
- Neubauer-Kammer (Neubauer, Marienfeld, Deutschland)
- Plastikwaren für die Zellkultur und allgemeine Verbrauchsmaterialien (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; Nunc, Wiesbaden, Deutschland; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 96-well-Platten mit Nitrozelluloseboden (MultiScreen MAHAN4510; Millipore, Bedford, CA, USA)
- Sterile Filter (0,45μm und 0,22μm; Millipore, Bradford, MA, USA)

3.1.4 Geräte

- Coulter Epics XL/MCL Durchflußzytometer (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- FACS-Calibur Durchflußzytometer (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)
- Gamma-Zählgerät (Packard, Dreieich, Deutschland)
- Inkubator Hera-cell (Hereaus, Binder, Tuttlingen, Deutschland)
- Mikrowelle (Siemens, Deutschland)
- PCR-Maschine Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)

- Vario-MACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße (Hereaus, Binder, Tuttlingen, Deutschland)

3.1.5 Reagenzienkits

- Alkalische Phosphatase-Konjugat Substrat Kit (enthält: NBT und BCIP; Biorad, München, Deutschland)
- Humaner CD8⁺ T-Zellisolutionskit II (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Humaner Interferon- γ -ELISPOT (enthält: anti-IFN- γ -mAk 1-D1K, Biotin-konjugierter, sekundärer mAk 7-B6-1 und Streptavidin-AP; Mabtech, Schweden)
- Humaner T_H1/T_H2 Cytometrischer Bead Array (CBA; Becton Dickinson; Hamburg, Deutschland)
- RNeasy Mini Kit und QIAshredder Homogenisatoren (Qiagen, Hilden, Deutschland)

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

- DNA Leiter Molekulargewichtsmarker XVI (250-3000 bp, 250 bp Stufen; Roche Applied Bioscience, Mannheim, Deutschland)

3.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen (Martinsried, Deutschland) und hatten eine Konzentration von 100 pmol/ μ l. Die Primerpaare resultierten in PCR-Produkten mit den Größen 328 bp (hTERT) und 540 bp (Actin).

hTERT: 5' ttc ctg cac tgg ctg atg agt gt 3' und 5' cgc tcg gcc ctc ttt tct ctg 3'

Actin: 5' gtg ggg cgc ccc agg cac ca 3' und 5' ctc ctt aat gtc acg cac gat ttc 3'

3.1.8 Antikörper

Alle humanen Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, einschließlich Informationen über ihre Spezifität, Fluorochrommarkierung und deren Hersteller sind im Folgenden aufgeführt. Die Antikörper wurden von Beckmann Coulter (Immunotech; Krefeld, Deutschland), Becton Dickinson (Pharmingen; Hamburg, Deutschland), Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland) oder DAKO (Glostrup, Dänemark) bezogen. FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phyco-erythrin; PC-5: Phycoerythrin cyanine 5.

3.1.8.1 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
Anti-Maus IgG	Kaninchen	Polyklonal	PE	DAKO

3.1.8.2 Blockierungsantikörper

Antikörper	Spezies	Isotyp	Klon	Hersteller
Anti-HLA Klasse I (A,B,C), azid-frei	Maus	IgG _{2a}	W6/32	Acris

3.1.8.3 HLA-A2-Immunphänotypisierung

Antikörper	Spezies	Isotyp	Spezifität	Hersteller
HB54	Maus	IgG ₁	αA2*, αAw69**	Kremer E.†
HB82	Maus	IgG ₁	αA2*, αB17#	Kremer E.†
Anti-Maus	Maus	IgG ₁	-	Immunotech

*αA2 = Anti-HLA-A2 Antikörper; **αAw69 = Anti-Aw69 Antikörper; #αB17 = Anti-HLA-B17 Antikörper; †Antikörper (Zellkulturüberstände) wurden von Dr. E. Kremmer produziert (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Großhadern, Deutschland).

3.1.8.4 Immunphänotypisierung

Antikörper	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD1a	Maus	IgG ₁	FITC	Pharmingen
CD3	Maus	IgG ₁	FITC	Immunotech
CD4	Maus	IgG ₁	FITC, PE	Immunotech
CD5	Maus	IgG _{2a}	FITC, PE	Immunotech
CD8	Maus	IgG ₁	PC-5	Immunotech
CD14	Maus	IgG ₁	FITC	Pharmingen
CD19	Maus	IgG ₁	FITC, PC-5	Immunotech
CD23	Maus	IgG ₁	FITC	Immunotech
CD25	Maus	IgG _{2a}	FITC, PE	Immunotech
CD40	Maus	IgG ₁	PE	Immunotech
CD54	Maus	IgG ₁	PE	Immunotech
CD58	Maus	IgG _{2a}	PE	Immunotech
CD56	Maus	IgG ₁	PE	Immunotech
CD80	Maus	IgG ₁	PE	Immunotech
CD83	Maus	IgG ₁	FITC	Immunotech
CD86	Maus	IgG ₁	FITC	Pharmingen
CD94	Maus	IgG ₁	FITC	Pharmingen
CD122	Maus	IgG ₁	PE	Pharmingen
CD229	Maus	IgG ₁	FITC	Acris
HLA-ABC	Maus	IgG ₁	FITC	Pharmingen
HLA-DR	Maus	IgG _{2b}	PE	Immunotech

3.1.8.5 Isotypkontrollen

Antikörper	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
IgG ₁	Maus	IgG ₁	FITC/PE/PC-5	Immunotech
IgG _{2a}	Maus	IgG _{2a}	FITC/PE/PC-5	Immunotech
IgG _{2b}	Maus	IgG _{2b}	FITC/PE/PC-5	Immunotech
IgG ₁	Maus	IgG ₁	FITC/PE/PC-5	Pharmingen
IgG _{2a}	Maus	IgG _{2a}	FITC/PE/PC-5	Pharmingen
IgG _{2b}	Maus	IgG _{2b}	FITC/PE/PC-5	Pharmingen

3.1.9 Medien und Lösungen

Medium 1

RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃

10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium 2 (B-CLL)

Basal Iscove's Medium mit 2 mmol/l L-Glutamin

10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium 3 (DCs)

RPMI 1640 mit 2 mmol/l L-Glutamin

10% humanes AB Serum (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin

Sterilfiltriert (0,22 µm)

Medium 4 (T-Zellen)

RPMI 1640 mit 2 mmol/l L-Glutamin

7% humanes AB Serum (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

7% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

1% Nichtessentielle Aminosäuren

1% Natriumpyruvat

100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin

Sterilfiltriert (0,22 µm)

Medium 5 (HeLa)

DMEM mit L-Glutamin und 2 g/l NaHCO₃

10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min)

100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium 6 (Chrom)

RPMI 1640 mit 2 mmol/l L-Glutamin

15% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min)

MACS Puffer

DPBS ohne Magnesium/Calcium

0,5% BSA

2 mM EDTA

Puffer E (ELISPOT Waschpuffer)

DPBS ohne Magnesium/Calcium

0,05% Tween 20

Substratlösung E

Die Komponenten wurden dem Alkalische Phosphatase-Konjugat Substrat Kit (Biorad, München, Deutschland) entnommen. Für eine ELISPOT-Platte (96-wells) wird folgende Mischung verwendet (50 µl/well):

4,8 ml steriles destilliertes Wasser

200 µl AP Farbwicklungspuffer, gut mischen

50 µl AP Farblösung A

50 µl AP Farblösung B

FACS-Puffer

DPBS

2% FCS

20X TAE

800 mM Tris

400 mM NaAc

40 mM EDTA

pH-Wert auf 7,8 einstellen mit Essigsäure

3.1.10 Peptide

Die HLA-A0201-bindenden Peptide der CD23- und CD229- (humanes Ly9) Sequenzen wurden mit Hilfe der öffentlich nutzbaren Algorithmen http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind und <http://www.syfpeithi.de> zur Berechnung hypothetischer Peptidbindung ermittelt

(Rammensee *et al* 1995). Die potentielle, natürliche Prozessierung der gewählten Peptide durch die Spaltung des Proteasoms wurde mittels der "Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages" Webseite (<http://www.paproc.de>) verifiziert. Die HLA-A0201-bindenden hTERT-Peptide wurden aus der entsprechenden Publikation entnommen (Vonderheide *et al* 1999). Für alle drei Antigene wurden je drei nonamere (9-mere) Peptide ausgewählt. Diese wurden mit C-Terminus synthetisiert, mit HPLC (High performance liquid chromatography) aufgereinigt und deren Qualität durch Massenspektroskopie und HPLC in der Arbeitsgruppe von Dr. G. J. Arnold (Genzentrum, Großhadern, München) kontrolliert. Die Peptide wurden in DMSO gelöst und Stammlösungen von 10 mg/ml bei -20 °C aufbewahrt. Für die Experimente wurden entweder die einzelnen Peptide oder Peptidmixe verwendet: M1 (I540, E555, R865), M2 (Ly2, Ly3, Ly4) oder M3 (A33, L41, F232). Als Positivkontrollen dienten das MAGE-3 Peptid (bindet an HLA-A0201 und entstammt vom Melanomantigen MAGE-3) oder IMP (HLA-A0201-restringiert, ein sehr immunogenes Peptid des Influenza Matrix Proteins). Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Antigen	Peptid und Position	Sequenz
<i>HLA-A2 restringiert:</i>		
CD23 CD23 CD23	A33 (33-41) L41 (41-49) F232 (232-240)	ALWAGLLTL LLLLWHWDT FIWVDGSHV
CD229 CD229 CD229	Ly2 = K454 (454-462) Ly3 = V31 (31-39) Ly4 = S35 (35-43)	KLWIGLFLM VLQTSLLFL SLLFLLMGL
hTERT hTERT hTERT	I540 (540-548) ^a E555 (555-563) ^a R865 (865-873) ^a	ILAKFLHWL ELLRSFFYV RLVDDFLLV
MAGE-3 (Positivkontrolle) IMP (Positivkontrolle)	MAGE-3 (271-278) ^{a,b} IMP (58-66) ^c	FLWGPRALV GILGFVFTL
<i>Nicht-HLA-A2 restringiert:</i>		
hTERT (Negativkontrolle) Idiotyp (Negativkontrolle)	I540S (I540-Aminosäuren, jedoch andere Sequenz) ^a A98-ID (bindet an HLA-B38; aus der Idiotypsequenz eines Patienten mit Plasmazellleukämie) ^a	HFLLWKLIA AHTKDGFNF

Tabelle 4. Peptide. Aufgelistet sind die verwendeten, HLA-A0201-bindenden, nonameren Peptide der Proteine CD23, CD229 und hTERT, sowie die verschiedenen HLA-A2-restringierten und nicht restringierten Kontrollpeptide. Für jedes Peptid ist Name, Position, Sequenz angegeben ^a(Vonderheide *et al* 1999); ^b(Van der Bruggen *et al* 1994); ^c(Würtzen *et al* 2002).

3.1.11 Zelllinien

Die meisten Zelllinien wurden von verschiedenen Mitarbeitern des Helmholtz Zentrums München (Großhadern) und des Genzentrums München (Großhadern) zur Verfügung gestellt

und entsprechend der Anweisungen von ATCC (American Type Culture Collection) kultiviert. Alle hier aufgeführten Zelllinien sind humanen Ursprungs:

BLCLs	Patienten-spezifische B-lymphoblastoide Zelllinien; Immortalisierung der Patienten B-Zellen durch Inkubation deren PBMCs mit dem EBV Laborstamm B95.8 (Dr. A. Mossman, KKG Klinische Onkologie, Helmholtz Zentrum München)
hCD40L-L Zellen	Mausfibroblasten L Zellen, stabil transfiziert mit hCD40L (Dr. A. Moosman)
HeLa	Zervixkarzinom (Dr. H. Büning, Genzentrum, München)
K562	Chronisch myeloische Leukämie (CML; Dr. E. Nössner, Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München)
Mec-1	Transformation einer B-CLL in eine Prolymphozytoide Leukämie (PLL), ATCC, Rockville, MD, USA) USA)
Raji	Burkitt-Lymphom (ATCC, Rockville, MD,
Ramos	Burkitt-Lymphom (Dr. E. Nössner)
RCC-26	Nierenzellkarzinom (Dr. E. Nössner)
RCC-53	Nierenzellkarzinom (Dr. E. Nössner)
T2	TAP-defizientes Hybridom aus einer B- und T-lymphoblastischen Zelllinie (Dr. E. Nössner)
Mg-63	Osteosarkom (Dr. E. Nössner)
Saos-2	Osteosarkom (Dr. E. Nössner)
Jurkat	Akute lymphozytische T-Zellleukämie (ALL; Dr. E. Nössner)
HT29	Kolonkarzinom (Dr. E. Nössner)
MCF-7	Mammakarzinom (Dr. E. Nössner)

3.1.12 Patientenproben und gesunde Spender

Die untersuchten Patienten wurden mit typischer B-CLL diagnostiziert. Die Diagnose erfolgte anhand klinischer Kriterien und Laboruntersuchungen (Cheson B *et al* 1996). Nach Einwilligung der Spender wurde heparinisiertes, peripheres, venöses Blut sowohl von B-CLL Patienten, als auch gesunden Spendern gewonnen. Die Zellen der B-CLL Patienten und der gesunden Spender wurden auf ihre HLA-A2-Expression getestet. In den experimentellen Analysen wurden nur HLA-A2-positive Proben untersucht.

Die B-CLL Patienten in dieser Studie waren entweder unbehandelt oder haben keine zytoreduktive Behandlung für mindestens drei Monate vor den Untersuchungen erhalten. 18 HLA-A0201-positive Patienten (3 Frauen und 15 Männer; 45 bis 86 Jahre alt, Binet A: 1, Binet B: 5, Binet C: 12) wurden analysiert. Nur zwei der Patienten waren vorbehandelt

(B-CLL1 (Chlorambucil) und B-CLL2 (Fludarabin und Chlorambucil)), 16 waren unbehandelt (**Tabelle 5**).

Des Weiteren wurden PBMCs von drei HLA-A2-positiven gesunden Spendern in die Untersuchungen eingeschlossen.

Probe	Geschlecht	Alter in Jahren	Binet	Vorbehandlung
B-CLL1	m	86	B	Chlorambucil
B-CLL2	w	75	C	Fludarabin/Chlorambucil (FC)
B-CLL3	w	62	C	-
B-CLL4	m	55	A	-
B-CLL5	m	58	C	-
B-CLL6	m	55	C	-
B-CLL7	w	64	C	-
B-CLL8	m	70	C	-
B-CLL9	m	74	C	-
B-CLL10	m	65	B	-
B-CLL11	m	65	C	-
B-CLL12	m	49	B	-
B-CLL13	m	50	B	-
B-CLL14	m	61	C	-
B-CLL15	m	45	C	-
B-CLL16	m	61	B	-
B-CLL17	m	66	C	-
B-CLL18	m	67	C	-

Tabelle 5. B-CLL Patientenproben. Aufgeführt sind die 18 B-CLL Proben, deren Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), Alter in Jahren, Binet Stadium (A-C) und Behandlungsstatus (unbehandelt oder behandelt, inklusive Art der Vorbehandlung).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

Alle verwendeten humanen primären Zellen und Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank in der Zellkultur durchgeführt.

3.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut

Peripheres Blut wurde mit heparinisierten Spritzen von B-CLL Patienten (20-40 ml) und gesunden Spendern (80 ml) abgenommen. Die peripheren mononukleären Zellen wurden durch Ficoll-Dichte-Zentrifugation isoliert, wobei das Blut zuerst 1:1 mit DPBS verdünnt wurde. Das Blut/DPBS-Gemisch wurde im Verhältnis 1:1 auf den Ficoll aufgeschichtet und für

30 min bei 2750 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphasezellen wurden vorsichtig abgenommen, in 50 ml Reaktionsgefäßen vereint und mit DPBS aufgefüllt, um die Zellen zu waschen (10 min, 1100 rpm, RT). Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt und die Zellen dann in Medium 2 resuspendiert.

Die Monozyten wurden von den Lymphozyten durch Plastikadhärenz am Zellkulturflaschenboden separiert (1h bei 37 °C und 5% CO₂). Der Überstand, der PBMCs (gesunde Spender) bzw. B-CLL und T-Zellen (Patientenmaterial) enthielt, wurde abgenommen und die so isolierten Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Ihre Viabilität wurde mit Hilfe einer Trypan-Blau Färbung festgestellt. Die Zellen wurden entweder anschließend für Experimente in Kultur genommen oder in FCS und 10% DMSO bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Durchflußzytometrische Analysen zeigten, dass alle Patientenproben eine B-Zellpopulation von mindestens 90% CD5⁺/CD19⁺ Zellen enthielten.

3.2.1.2 Generierung Dendritischer Zellen (DCs)

Für die Generierung von Dendritischen Zellen (DCs) wurden autologe Monozyten der HLA-A2-positiven gesunden Spender, die nach 1 h (37°C; 5% CO₂) in Medium 2 an den Zellkulturflaschenboden adhärten, verwendet. Nach Abziehen des Überstands wurden die Monozyten zweimal vorsichtig mit DPBS gewaschen. Medium 2 wurde zu den Zellen pipettiert, diese mit einem Zellschaber vom Plastikboden gelöst und in 50 ml Reaktionsgefäße gegeben. Durch zweimaliges Waschen der Zellkulturschale mit DPBS wurden die noch verbliebenen Monozyten geerntet und ebenfalls gesammelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 1100 rpm, RT) wurden die Zellen in Medium 3 resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und das Expressionsprofil der Monozyten im Durchflußzytometer charakterisiert (>85% CD14⁺). Die Monozytenzahl wurde auf 1-1,5 x 10⁶ Zellen/ml mit Medium 3 eingestellt und in 6-well Platten (2 ml/well) in Anwesenheit von IL-4 (5 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) für 7 Tage kultiviert (37°C; 5% CO₂). Die so erhaltenen unreifen DCs wurden für weitere 2 Tage mit Prostaglandin E₂ (1 µg/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF-α (1000 U/ml), IL-1β (500 U/ml) und dem entsprechenden Peptid (40 µg/ml) inkubiert, um die Reifung der DCs zu induzieren. Die Peptide wurden in diesem Schritt zugegeben, um neben der exogenen Beladung der HLA-A2-Moleküle mit diesen auch die Aufnahme, endogene Prozessierung und Präsentation zu gewährleisten. Die reifen DCs wurden geerntet, gezählt und mittels Durchflußzytometrie immunphänotypisch charakterisiert, wobei sie ein charakteristisches, reifes DC-Expressionsprofil zeigten (CD1a⁺/CD83⁺/CD40⁺/CD14⁻). Die maturierten DCs wurden dann als Antigen-präsentierende Zellen für die Etablierung Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTLs) verwendet.

3.2.1.3 T-Lymphozyten Isolierung aus gesunden Spendern und B-CLL Patienten

T-Lymphozyten der HLA-A2⁺ gesunden Spender und B-CLL Patienten wurden mit Hilfe des magnetischen Zellsortierungssystems MACS (Miltenyi) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Das Prinzip der Technologie basiert auf monoklonalen Antikörpern, die mit paramagnetischen Partikeln markiert sind. Diese binden an Zellen, die das entsprechende Oberflächenantigen tragen. Die markierten Zellen können dann in einem magnetischen Feld in einer Säule von den nicht markierten Zellen separiert werden (Positivselektion). Diese Vorgehensweise wurde bei der Gewinnung von B-CLL T-Zellen gewählt. Im Gegensatz dazu wurden die CD8⁺ T-Zellen der gesunden Spender negativ selektiert (Depletion), d.h. alle nicht-CD8⁺ Zellen wurden markiert und vom magnetischen Feld in der Säule zurückgehalten, wobei die gewünschten Zellen durch die Säule flossen.

Gesunde Spender: 0,5 bis 1×10^7 Zellen des nicht-adhärenen Überstands wurde zentrifugiert (10 min, 1100 rpm, RT), das Zellpellet in 2 Tropfen MACS Puffer aufgenommen und mit 10 µl Biotin Antikörper Cocktail inkubiert (15 min, 4°C). Ein weiterer Tropfen MACS Puffer wurde zugegeben und die Zellen für nochmals 15 min bei 4°C mit 20 µl Anti-Biotin MicroBeads inkubiert. Die Zellen wurden in MACS Puffer gewaschen, der Überstand verworfen, das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert, auf eine LS-Säule im Vario-MACS Separator pipettiert und nach Lauf der Zellen durch die Säule, wurde diese dreimal mit je 3 ml MACS Puffer gespült. Der Durchlauf wurde gesammelt (CD8⁺ T-Zellen), gewaschen und in Medium 4 resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl der Fraktion und die Reinheit im Durchflußzytometer bestimmt (99% CD3⁺/CD8⁺; <1% CD56⁺/CD94⁺).

B-CLL Patienten: 0,5 bis 1×10^7 des Überstands nach Monozytenadhärenz wurde zentrifugiert (10 min, 1100 rpm, RT), das Zellpellet in 2 Tropfen MACS Puffer aufgenommen und mit 10 µl Anti-CD3-FITC Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden in MACS Puffer gewaschen und in 2 Tropfen MACS Puffer vereinzelt und für weitere 15 min bei 4°C mit 20 µl Anti-FITC MicroBeads inkubiert. Nach einem Waschschrift in MACS Puffer wurde das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert und auf die LS-Säule gegeben. Nach Durchlauf der Zellen durch die Säule wurde diese dreimal mit je 3 ml MACS Puffer gespült und aus dem Magneten entfernt. Mit Hilfe eines Stempels und 10 ml Medium 2 wurden die CD3⁺ T-Zellen aus der Säule eluiert, zentrifugiert und in Medium 2 resuspendiert. Auch hier wurde die Zellzahl und die Reinheit im Durchflusszytometer bestimmt (99% CD3⁺, <1% CD56⁺/CD94⁺). Der Durchlauf, der die B-CLL Zellen enthielt, wurde ebenfalls gesammelt, zentrifugiert und in Medium 2 aufgenommen.

3.2.1.4 Generierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (gesunde Spender)

Für die Überprüfung einer peptid-spezifischen CTL-Antwort *in vitro* wurden die in Abschnitt 2.2.1.1 isolierten Lymphozyten in einer Konzentration von 2×10^6 CD8⁺ T-Zellen/ml in

24-well Platten (1 ml/well) in Medium 4 und Anwesenheit von IL-2 (160 U/ml) und IL-7 (5 ng/ml) ausgesät. Für die Stimulation der T-Zellen dienten die in Abschnitt 2.2.1.4 generierten autologen, reifen DCs als APCs. Diese wurden für jedes Peptid geerntet, zentrifugiert (10 min, 1100 rpm, RT) und in Medium 4 resuspendiert. DCs wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 (DCs:T-Zellen) in 1 ml pro well den T-Zellen zugegeben. Die Peptide (4 µg/ml) wurden dem Medium zugesetzt, um durch eine exogene Beladung der MHC-I-Moleküle die T-Zellstimulation zu verbessern. Durch die wöchentliche Restimulation (4-6 mal) der T-Zellen mit frisch generierten, Peptid-beladenen DCs, IL-2 (160 U/ml) und IL-7 (5 ng/ml) wurde die Expansion Antigen-spezifischer CTLs forciert (37°C, 5% CO₂). Vor Zugabe der vorbereiteten DCs wurde die Hälfte des Mediums entfernt. Parallel wurde die Zunahme der CD3⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten sowohl durch Trypan Blau Färbung, als auch durch FACS-Analysen verifiziert. Für die Langzeitkultur der T-Zellen wurden die DCs als APCs durch autologe BLCLs ersetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.5). Entsprechend der T-Zellzahl wurden die BLCLs geerntet, mit 100 Gy bestrahlt (γ-Strahlung) und für 2 h mit den jeweiligen Peptiden beladen (80 µg/ml; 37°C, 5% CO₂). Die BLCLs wurden anschließend im Verhältnis 1:2 bis 1:10 in 1 ml Medium 4 und 160 U/ml IL-2 für die Restimulation der CTLs eingesetzt. Das Prinzip der Generierung Antigen-spezifischer CTLs ist in **Abbildung 4** schematisch zusammengefasst.

3.2.1.5 Herstellung von BLCLs

Zur Langzeitkultivierung der Antigen-spezifischen CTLs der gesunden Spender wurden autologe BLCLs (Spender-spezifische B-lymphoblastoide Zelllinien) hergestellt, um die autologen DCs zu ersetzen. Sie wurden durch die Exponierung der Lymphozyten mit einem Labor EBV-Stamm erzeugt, wobei die B-Zellen durch EBV immortalisiert wurden. PBMCs der verschiedenen HLA-A2⁺ gesunden Spender wurden wie unter Abschnitt 2.2.1.1 gewonnen, in Medium 1 resuspendiert und die Zellzahl auf 2,5 x 10⁶/ml eingestellt. 5 x 10⁵ PBMCs wurden in 96-U-well-Platten ausgesät und in Anwesenheit von 1,2 µg/ml CyA (Cyclosporin A) und 15 µl/well des EBV-Stamms B95.8 kultiviert. Nach 4-5 Wochen zeigte das Medium einen Farbumschlag von rot zu gelb und die B-Zellen wurden einmal pro Woche mit 100 µl Medium 1/CyA gefüttert. Ab diesem Zeitpunkt waren alle anderen Zelltypen (vor allem T-Zellen) durch CyA eliminiert und die immortalisierten B-Zellen wurden sukzessive von Medium 1 an Medium 2 gewöhnt.

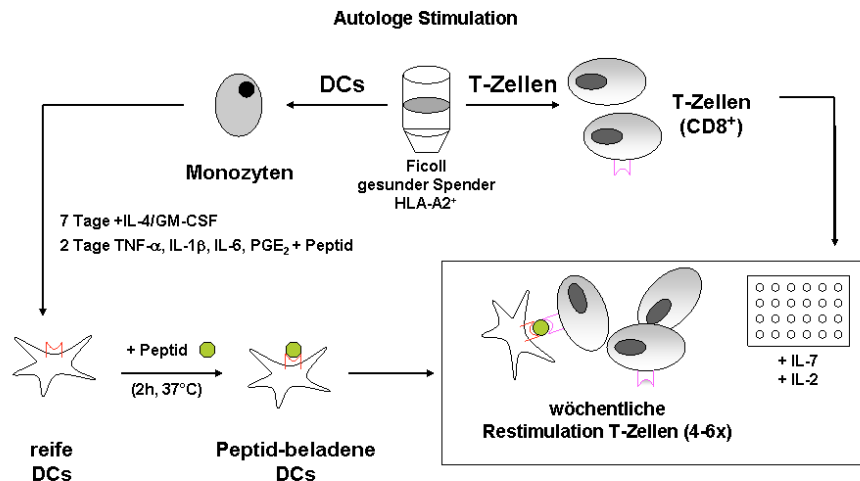


Abbildung 4. Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen.

3.2.1.6 Generierung der Effektor T-Zellen von B-CLL Patienten

Mindestens 2×10^5 CD3⁺ T-Zellen/ml der B-CLL Patienten (siehe Abschnitt 3.2.1.3) wurden in 24-well-Platten (1 ml/well) ausgesät und entweder mit der gleichen Anzahl naiver autologer B-CLL Zellen oder hCD40L-aktivierter autologer B-CLL Zellen in Gegenwart von IL-2 (160 U/ml) und IL-7 (5 ng/ml) in Medium 2 bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Restimulation der T-Zellen erfolgte wöchentlich bis Tag 32 mit naiven oder hCD40L-aktivierten B-CLL Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.7) im Verhältnis 1:1 bis 1:5 mit 1 ml Medium 2 und den Zytokinen, um das T-Zellwachstum aufrecht zu erhalten. Vor Zugabe der Stimulatorzellen wurde die Hälfte des Mediums entfernt. Ferner wurde die Proliferation der T-Zellen durch Trypan-Blau Färbung und FACS-Analysen kontrolliert.

3.2.1.7 Stimulation der B-CLL Zellen mittels humanem CD40-Ligand (hCD40L)

Für die CD40L-induzierte Aktivierung der B-CLL Zellen wurden ein leicht verändertes Protokoll verwendet (Buhmann *et al* 1999). Der humane CD40L (hCD40L) wurde stabil in die Mausfibroblasten L Zelllinie (CD40L-L Zellen, Feederzellen) transfiziert (Dr. A. Moosmann). Die Feeder-Zellen wurden trypsiniert, in Medium 2 aufgenommen und bei 100 Gy γ -bestrahlt. Anschließend wurden die Fibroblasten in 6-well-Platten mit 1,5 bis 2×10^6 Zellen/well ausplattiert und über Nacht im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) inkubiert (Garrone *et al* 1995). Das Medium wurde von den Zellen entfernt und B-CLL Zellen wurden mit $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium 2 zugegeben. Diese wurden für 72 h entweder ohne oder mit 40 μ g/ml Peptid auf den Feederzellen kokultiviert. Die hCD40L-B-CLL Zellen wurden durch vorsichtiges Abnehmen von den Fibroblasten geerntet. Sowohl naive, als auch aktivierte B-CLL Zellen wurden phänotypisch mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Bei erfolgreicher Stimulation

wurde eine variable Hochregulation von CD95, CD80 und CD86 beobachtet (Buhmann *et al* 1999).

3.2.1.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden entweder für kurze Perioden bei -80°C (<1 Monat) oder für längere Zeit in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden 0,1 bis 1×10^7 Zellen in 1 ml 90% FCS und 10% DMSO bei -80°C in einer Einfrierbox eingefroren. Diese war mit Isopropanol gefüllt, um eine kontinuierliche Temperaturabnahme der einzufrierenden Proben gewährleisten zu können ($1^{\circ}\text{C}/\text{h}$).

Das Auftauen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Zellen bei 37°C , bis nur noch etwas Eis vorhanden war. Dann wurden die Zellen zu kaltem FCS im Verhältnis 1:10 gegeben, zentrifugiert (1100 rpm, 10 min, RT), in ihrem entsprechendem Medium resuspendiert und unter ihren spezifischen Konditionen kultiviert.

3.2.1.9 Zellkultur der Standardzelllinien

Die Burkitt-Lymphom Zelllinien Raji und Ramos, die PLL Zelllinie Mec-1, die hCD40L Mausfibroblasten L Zellen, und die Spender-spezifischen BLCL Zelllinien wurden in Medium 2 kultiviert. Die Zelllinien T2, K562, Jurkat, Mg-63, Saos-2, HT29, MCF-7, RCC-26 und RCC-53 wuchsen in Medium 1. HeLa Zellen wurden in Medium 5 in Kultur gehalten. Für die Expansion adhärenter Zelllinien (hCD40L Mausfibroblasten L Zellen, HeLa, Mg-63, Saos-2, HT29, MCF-7, RCC-26 und RCC-53) wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA für maximal 5 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Danach wurden sie im entsprechenden Medium resuspendiert (1:10 bis 1:25) und wieder bis zur Konfluenz kultiviert (2-3 Tage). Suspensionszellen (BLCL Zelllinien, Raji, Ramos, Mec-1, Jurkat, T2 and K562) wurden ebenfalls alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit frischem Medium verdünnt.

3.2.2 RT-PCR

3.2.2.1 RNA Extraktion

Mindestens 5×10^6 Zellen wurden geerntet, zweimal mit DPBS gewaschen (10 min, 1100 rpm) und der Überstand entfernt. Die Zellpellets wurden entweder direkt in der RT-PCR weiterverarbeitet oder bei -80°C für spätere Analysen eingefroren. Entsprechend der Anweisungen des Herstellers wurde die Gesamt-RNA aus den Proben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und den QIAshredder Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Zuerst wurden die Zellen mit 700 μl RLT/ β -Mercaptoethanol Puffer lysiert, auf QIAshredder Säulen geladen und zentrifugiert (2 min, 15000 rpm, RT). Das Homogenisat (Durchlauf) wurde mit einem Volu-

menanteil 70% EtOH gemischt, in zwei Portionen nacheinander auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und zentrifugiert (15 sec, 10000 rpm). Die in der Säule verbleibende RNA wurde mit 700 µl RW1 Puffer versetzt und zentrifugiert (15 sec, 10000 rpm). Danach wurde die Säule zweimal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen, wobei der zweite Waschschrift für 2 min bei 15000 rpm erfolgte. Die RNA wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 30 µl RNase-freiem Wasser nach 1 min Inkubation der Membran aus der Säule eluiert (1 min, 10000 rpm). Die Konzentration der RNA wurde am Photometer ermittelt und kalkuliert: $OD_{260nm} \times 40$ (Faktor für ssRNA) $\times 50$ (Verdünnungsfaktor) = ng/µl.

3.2.2.2 cDNA Synthese (Reverse Transkription)

Für jede Probe wurden 2µg Gesamt-RNA mit Hilfe der SuperScript II Reversen Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz für die Reverse Transkription enthielt 2 µg Gesamt-RNA, 2 µl p(dN)₆ Primer (Roche Applied Bioscience), 1 µl RNasin RNase Inhibitor (10 U/µl, Promega) und wurde mit RNase freiem Wasser auf ein finales Volumen von 30 µl/Ansatz aufgefüllt. Nachdem die Probe für 5 min bei 65°C inkubiert worden war, wurden 8 µl 5X First strand Puffer, 4 µl 0,1M DTT und 8µl PCR Nukleotid Mix (dNTPs, je 10 mM, Roche Applied Bioscience) zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 min bei 42°C erwärmt, anschließend auf Eis gekühlt und 2 µl SuperScript II (200 U/µl, Invitrogen) hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C (1h). Im Anschluss daran wurde das Enzym inaktiviert (15 min, 70°C). Als Kontrolle diente eine Probe, die alle Komponenten enthielt, außer dem Enzym. So konnten DNA-Kontaminationen ausgeschlossen werden. In dieser Probe wurde das Volumen mit 2 µl RNase freiem Wasser adjustiert.

3.2.2.3 PCR

1/15 der resultierenden cDNA-Menge wurde in die PCR eingesetzt (Gesamtvolumen pro Reaktion: 40 µl). Für die Detektion hTERT-spezifischer cDNA wurde der "Red Taq Ready-mix PCR Reaction Mix" (mit MgCl₂, Sigma-Aldrich) und die entsprechenden Primer (100 pmol/µl, Metabion) verwendet. Die Primerpaare ergaben Produkte der Größe 328 bp (hTERT) und 540 bp (Actin). Die DNA-Fragmente wurden mit folgendem Protokoll und Amplifikationsreaktionen in der PCR generiert:

25 µl Red Taq Ready-mix PCR Reaction Mix

1 µl hTERT Primer 1

1 µl hTERT Primer 2

1 µl Actin Primer 1

1 µl Actin Primer 2

Mit RNase freiem Wasser auf 40 µl Gesamtvolumen auffüllen.

Für hTERT und die interne Kontrolle Actin wurde folgendes Protokoll verwendet: 95°C für 5 min, 45 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 65°C für 45 sec und 72°C für 45 sec. Finale wurde eine Inkubation von 10 min bei 72°C durchgeführt.

3.2.2.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Analyse der DNA-Fragmente wurde durch Agarose Gelelektrophorese in 1 x TAE durchgeführt. Im Allgemeinen bestanden die verwendeten Gele aus 1% Agarose. Diese wurde in 1 x TAE durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Kurz bevor das Gel gegossen wurde, wurde Ethidiumbromid (EtBr, 1 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Die PCR-Proben konnten direkt auf das Gel geladen werden, da der Red Taq Ready-mix PCR Reaction Mix einen Ladungspuffer enthielt. Die Gele (ca. 6,5 x 9,5 cm) wurden horizontal bei 80-120 V gefahren und die DNA/EtBr wurde unter dem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) detektiert.

3.2.3 IFN- γ -ELISPOT

Die IFN- γ -ELISPOT Methode ist ein sensitiver Nachweis für spezifische Immunantworten auf Einzelzellebene. Hierbei ist es möglich, aufgrund der analysierten Zytokine zwischen verschiedenen T-Zellantworten zu unterscheiden (z.B. T_H1- und T_H2-Zellen; Czerkinsky *et al* 1988). Der IFN- γ -ELISPOT wurde durchgeführt, um Peptid-spezifische, IFN- γ -sezernierende CD8⁺ Effektor T-Zellen zu quantifizieren (Tan *et al* 1999). Das Nachweisprinzip basiert auf dem eines ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und wurde laut Vorschrift des Hersteller (Mabtech) durchgeführt.

96-well-Mikrotiterplatten mit Nitrozelluloseboden (Millipore) wurden mit 50 µl/well Anti-IFN- γ -mAb (15µg/ml; 1-D1K) bei 4°C über Nacht beschichtet und anschließend fünfmal (200 µl/well) mit entweder Medium 3 (bei Experimenten mit CTLs von gesunden Spendern) oder Medium 4 (bei Experimenten mit Zellen von B-CLL Patienten) gewaschen. Unspezifische Reaktionen wurden durch die Inkubation mit dem jeweiligen Medium blockiert (200 µl/well, 30-60 min, RT) und das Medium anschließend verworfen. 0,2 - 1 x 10⁵ CD3⁺ T-Zellen/well in 100 µl wurden mit den Zielzellen (100 µl) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Platte bestückt. Zusätzlich wurden entweder die einzelnen Peptide (400ng/well), die Peptidmixe oder in Kombination mit einem Anti-MHC-Klasse-I mAb W6/32 (Acris; 600ng/well) zu den Zellen gegeben und über Nacht kokultiviert (37°C, 5% CO₂). Der Nachweis zur Antigen-spezifität und MHC-I-Restriktion der *in vitro* induzierten CTLs wurde durch Blockierungsexperimente mit dem W6/32 Antikörper erbracht. Die Zellen wurden entfernt, die Platte gewaschen (Puffer E, fünfmal, 200 µl/well) und mit 50 µl Biotin-konjugiertem, sekundären Antikörper (1µg/ml; 7-B6-1-Biotin) für 3h inkubiert (RT, im Dunkeln). Nach Entfernen des Antikörpers und wiederholten Waschschritten (Puffer E, fünfmal, 200 µl/well) folgte eine Inkubation mit einem Streptavidin-AP gekoppeltem

Antikörper (50 µl/well, 1:1000; 3h, RT, im Dunkeln). Die Platte wurde gewaschen (Puffer E, fünfmal, 200 µl/well) und die Reaktionen wurden durch Zugabe der Substratlösung E (50 µl/well) sichtbar gemacht. Nach 15-60 min (RT, im Dunkeln) wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser gestoppt. Nachdem die Membran getrocknet war, wurden die Punkte in verdeckter Weise gezählt.

In allen Experimenten wurden Duplikate bzw. Triplikate angesetzt. In Abhängigkeit des experimentellen Aufbaus dienten als Negativkontrollen ein B-CLL-unverwandtes HLA-A2-bindendes MAGE-3-Peptid, ein irrelevantes, nicht-HLA-A2-restringiertes Peptid (I540S) oder DMSO. Die Anzahl der spezifischen Punkte wurde ermittelt, indem die Hintergrundwerte (Punktezahl der Stimulator- und Effektorzellen alleine (+/- DMSO)) von den experimentellen Werten abgezogen wurden.

Die T-Zellexpansion der B-CLL Patienten wurde an Tag 14 und/oder 21 der Stimulation im IFN-γ-ELISPOT Assay untersucht. Die Vorläuferfrequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten wurde an Tag 0 im IFN-γ-ELISPOT Assay festgestellt.

3.2.4 Chromfreisetzungsnachweis ([Cr⁵¹]-Release Assay)

Die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen (CTLs) von gesunden Spendern gegenüber den verschiedenen Peptiden wurde nach 4-6 Restimulationen in einem Chromfreisetzungsnachweisexperiment ([Cr⁵¹]-Release Assay; Hirohashi *et al* 2002, Sato T *et al* 1986) untersucht.

Die Experimente wurden in Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt. Als Zielzellen für die *in vitro* expandierten CTLs dienten T2-Zellen. Diese TAP-defizienten Zellen sind nicht in der Lage, endogene MHC-I-Peptide auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. T2-Zellen exprimieren „leere“ HLA-A0201-Moleküle und können daher exogen mit A2-restringierten Peptiden beladen werden. Als Zielzellen wurden daher die T2-Zellen mit den relevanten, einem HLA-A0201-bindenden oder I540S-Peptid über Nacht (37°C, 5% CO₂) beladen (40 µg/ml und 1,5 µg/ml β₂-Mikroglobulin). Des Weiteren wurden nicht beladene T2 und die NK-Zielzelle K562 getestet. Die Zellen wurden geerntet (10 min, 1100 rpm, RT), in FCS aufgenommen und mit 100 µCi [Cr⁵¹] für 1,5 h im Brutschrank markiert (4h bei naiven und hCD40L-aktivierten B-CLL Zellen). Nach zweimaligem Waschen in Medium 6 wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und 2 x 10³/50 µl [Cr⁵¹]-markierte Zielzellen (5 x 10³ naive und hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen) zu den in 96-U-well-Mikrotiterplatten titrierten T-Zellen (100 µl) zugegeben. Die Verhältnisse von Effektor zu Zielzellen betragen 40:1 bis 1,25:1. Das Gesamtvolumen von 200 µl/well wurde durch Zugabe von 50 µl Medium 6 allein, in Anwesenheit der verschiedenen Peptide (800 ng/well) und β₂M (300 ng/well) oder DMSO erreicht. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden 50 µl Überstand auf Lumaplaten transferiert und diese über Nacht getrocknet. Die freigesetzte Radioaktivität im Kulturüberstand wurde in

einem γ -Zählgerät gemessen. Als Referenzwerte dienten die spontane (Überstand der Zielzellen allein nach 4h) und maximale (Zielzellen nach 1,5 bzw. 4h Markierung) [Cr^{51}]-Freisetzung. Die spezifische Lyse (Zytotoxizität) der Effektorzellen in Prozent wurde wie folgt berechnet: % Zytotoxizität = (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100.

3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Lymphozyten wurden im Durchflußzytometer (FACS) bestimmt und erfolgte durch Multiparameter-Analysen nach Färbung mit FITC-, PE- und PC-5-konjugierten monoklonalen Antikörpern. Die Fluoreszenz wurde mit einem Coulter Epics XL/MCL (Beckmann Coulter) gemessen und die Daten wurden mit der WinMDI2.8 FACS-Software analysiert. Die verwendeten Antikörper sind unter Abschnitt 3.1.8.4 aufgeführt. Unspezifische Bindungen der Antikörper wurden durch Inkubation mit den jeweiligen Isotypkontrollen detektiert (Abschnitt 3.1.8.5). Entsprechend der Untersuchungen wurden unterschiedliche Meßprotokolle verwendet.

3.2.5.1 Immunphänotypische Analysen

Für die Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen wurden 0,5 bis 1×10^6 Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und für 10 min bei 4°C im Dunklen mit den Antikörpern (mAbs und Isotypen) inkubiert. Nach zwei Waschschritten im FACS-Puffer wurden die Zellen in geeignetem Volumen resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert.

3.2.5.2 HLA-A2-DimerX Färbung der T-Zellen

Antigen-spezifische T-Zellen wurden mit einer HLA-A2-DimerX Färbung (Becton Dickinson) identifiziert und analysiert. Die Methode basiert auf dem natürlichen immunologischen Prozess der Assoziation von MHC-I-Molekülen mit einem antigenen Peptid. An diese können dann für das Antigen spezifische CD8^+ T-Zellen über ihren TCR binden. Das HLA-A2-DimerX ist ein artifizielles, lösliches Fusionsprotein, das aus drei extrazellulären MHC-I-Domänen nicht-kovalent mit $\beta_2\text{M}$ Polypeptidketten assoziiert ist, an die die V_{H} -Regionen des Maus IgG₁ fusioniert sind (Altman *et al* 1996, Dal Porto *et al* 1993, Schneck *et al* 2001).

Die Beladung des DimerX-HLA-A2:Ig Fusionsproteins ($0,5 \mu\text{l}/2 \times 10^5$ Zellen) mit den HLA-A0201-restringierten Peptiden ($7 \mu\text{g}/2 \times 10^5$ Zellen) fand in DPBS über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 statt (Endvolumen: $10 \mu\text{l}/\text{Ansatz}$). Die Negativkontrolle mit DMSO wurde unter gleichen Bedingungen behandelt. 2×10^5 T-Zellen/90 μl wurden mit den HLA-A0201-Dimer/Peptidkomplexen ($10 \mu\text{l}$) für eine Stunde auf Eis im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem DPBS gewaschen (3 min, $300 \times g$) und für die Detektion der DimerX-positiven T-Zellen ein sekundärer Kaninchen Anti-Maus-Immunglobulin/PE F(ab')₂ Antikörper

(1 µg/Ansatz in 50 µl) für 20 min auf Eis im Dunklen zugegeben. Nach zwei Waschschritten mit DPBS wurden die T-Zellen zusätzlich mit 2 µl Anti-CD8-Cy5 pro Ansatz gefärbt (20 min, auf Eis, im Dunklen). Die Zellen wurden abermals gewaschen und in 0,5 ml DPBS für die durchflusszytometrische Analyse aufgenommen. Die HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der stimulierten Antigen-spezifischen T-Zellen wurde an Tag 28 durchgeführt, die Vorläuferfrequenz der T-Zellen im peripheren Blut der B-CLL Patienten an Tag 0 bestimmt.

3.2.5.3 HLA-A0201-Immunphänotypisierung

Die HLA-A0201-Typisierung der gesunden Spender und der B-CLL Patienten erfolgte immunphänotypisch. PBMCs wurden gewaschen (DPBS, 3 min, 300 x g) und je 5 x 10⁵ Zellen mit HB54, HB82 (50 µl/Ansatz) oder der Isotypkontrolle (10 µl) für 30 min bei 4°C (dunkel) inkubiert. Nachdem die Zellen gewaschen waren, wurden die primären Antikörper mit 1 µg/50 µl sekundärem Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin/PE F(ab')₂ Antikörper markiert (30 min, 4°C, dunkel). Nach einem Waschschriff und Zugabe von 100 µl DPBS konnten die Zellen im FACS analysiert werden.

Für jede Probe wurden beide Antikörper verwendet, da sie nicht ausschließlich A2-spezifisch sind (siehe Abschnitt 3.1.8.3). Eine Probe wurde als HLA-A0201⁺ bewertet, wenn beide Färbungen eine Expression ≥50% zeigten. Alle verwendeten Spender- und B-CLL Proben waren HLA-A0201⁺. In **Abbildung 5** sind die FACS-Daten eines gesunden Spenders (**A**) und eines B-CLL Patienten (**B**) gezeigt. Des Weiteren ist der HLA-A0201-Status der untersuchten Zelllinien aufgeführt (**C**).

3.2.5.4 Standard T2-Bindungstest

Die HLA-A0201-Bindungskapazität der nonameren Peptide der CD23- und CD229-Sequenzen, die mit Hilfe der beiden Peptididentifizierungssysteme identifiziert worden sind (siehe Abschnitt 3.1.10), und der publizierten hTERT-Peptide (I540, E555 and R865) wurde in einem Standard T2-Bindungstest untersucht. Dazu wurden die HLA-A0201⁺ T2-Zellen mit den Peptiden von CD23, CD229, hTERT, den Kontrollpeptiden MAGE-3 bzw. IMP (HLA-A2-restringiert) und dem nicht-HLA-A2-restringierten I540S in Anwesenheit von β₂M inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Peptidbindung wurde mittels FACS-Analyse detektiert.

1,5 x 10⁵ T2-Zellen wurden in 24-well-Platten in einem Gesamtvolumen von 1 ml ausgesät (Medium 1). Pro Peptid wurden drei Konzentrationen (1 µg, 4 µg und 6 µg) in Duplikaten getestet, wobei zu jedem Ansatz 1,5 µg/ml β₂M gegeben wurden. T2-Zellen alleine dienten als Kontrolle. Nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h Inkubation bei 37°C and 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet und zentrifugiert (1100 rpm, 10 min). Die Zellpellets wurden resuspendiert und 50 µl HB54 (Anti-HLA-A0201-Antikörper) zugegeben. Eine weitere unbeladene T2 Probe diente

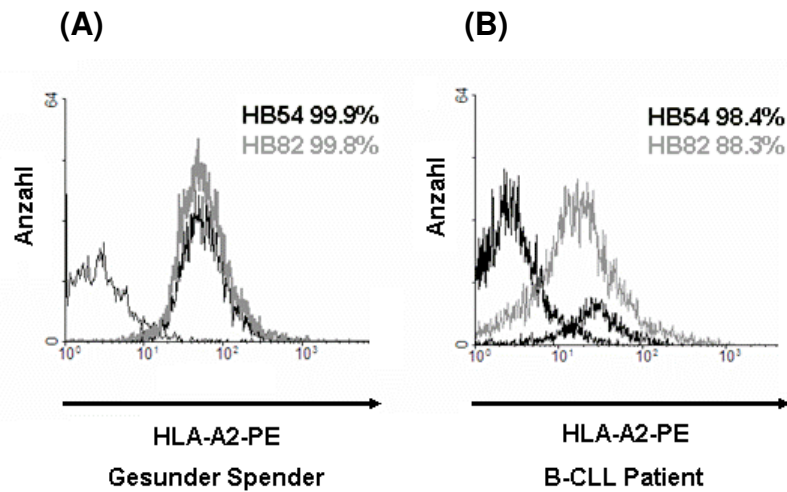
als Isotypkontrolle (IgG₁; 10 µl). Alle Zellen wurden für 30 min inkubiert (4°C, dunkel), gewaschen und mit 1 µg/50 µl sekundärem Kaninchen Anti-Maus-Immunglobulin/PE F(ab')₂ Antikörper markiert (30 min, 4°C, dunkel). Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von 100 µl DPBS und die Proben konnten im FACS (Coulter Epics XL/MCL, Beckmann Coulter) analysiert werden. Die Bewertung der Daten erfolgte wie bereits beschrieben (Gatfield *et al* 1998). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MnX) wurde für jedes Peptid, jede Konzentration und jeden Zeitpunkt erhoben. Die Bindungseffizienz (BE) jedes Peptids an das HLA-A0201-Molekül wurde mit folgendem Quotienten berechnet: (MnX T2 + Peptid nach Inkubation)/(MnX T2 – Peptid nach Inkubation). Werte ≥1.2 weisen auf eine Bindung an das HLA-A0201-Molekül hin (Nijman *et al* 1993).

3.2.5.5 Humaner T_H1/T_H2-Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA-Test besteht aus sechs verschiedenen Beadpopulationen, die unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten besitzen und an spezifische Antikörper gegen IL-2-, IL-4-, IL-6-, IL-10-, TNF-α- und IFN-γ-Proteine gekoppelt sind. Die Zytokincapturebeads werden mit PE-konjugierten Detektionsantikörper gemischt und entweder mit den rekombinanten Standards oder den Proben (Überstände) inkubiert. Dabei bildet sich ein „Sandwichkomplex“. Die Proben werden dann mit einem FACS-Calibur Durchflußzytometer (BD Bioscience) gemessen und die Daten mit Hilfe der BD CBA-Analyse-Software analysiert (**Abbildung 6**).

1 x 10⁶ naive bzw. hCD40L-stimulierte B-CLL Zellen/ml werden für 72 h in Medium 2 kultiviert und der Überstand abgenommen, um die CBA-Analyse entsprechend der Herstellerinformation durchzuführen. Die T_H1/T_H2-Zytokinstandards wurden durch eine Verdünnungsreihe (5000 pg/ml bis 20 pg/ml Protein) im Testpuffer verdünnt und eine Negativkontrolle (nur Testpuffer) ohne Protein wurde zusätzlich mitgeführt.

Pro Ansatz wurden 10 µl jeder humaner Zytokincapturebeadsuspension gemischt und 50 µl dieses Beadmix in jedes Teströhrchen transferiert. Anschließend wurden 50 µl des PE-Detektionsreagenz zu den Proben gegeben. Der Beadmix und das PE-Detektionsreagenz wurden sowohl zu den Standards, Proben, als auch zu der Kontrolle pipettiert und für 3 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle Proben wurden mit 1 ml Waschpuffer gewaschen (200 x g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und in 300 µl Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte an einem FACS-Calibur (BD Bioscience). Als Hintergrundwert diente eine Probe mit Medium 2. Hierbei waren keine Zytokine detektierbar.



(C)

Zelllinie	HLA-0201 Expression
Mec-1	-
Raji	-
Ramos	+
RCC-26	+
RCC-53	+

Abbildung 5. HLA-A0201-Immunphänotypisierung gesunder Spender, B-CLL Patienten und Zelllinien verschiedenen Ursprungs. Die HLA-A0201-detektierenden Antikörper HB54 und HB82 wurden für die Bestimmung des HLA-A0201-Status verwendet. Durch einen sekundären PE-markierten Antikörper konnten die primären Antikörper in der Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Eine Probe wurde als HLA-A0201-positiv gewertet, wenn die Färbungen mit beiden Antikörpern eine Expression $\geq 50\%$ zeigten. Gezeigt sind die HLA-A0201-Expressionsdaten des gesunden Spenders 1 (A) und des B-CLL Patienten #6 (B), wobei der Isotyp (schwarz, links), die Färbung mit HB54 (schwarz) und HB82 (grau) dargestellt ist, inklusive der Prozentzahlen. (C) Der HLA-A0201-Status der untersuchten Zelllinien Mec-1, Raji, Ramos, RCC-26 und RCC-53 ist gezeigt.

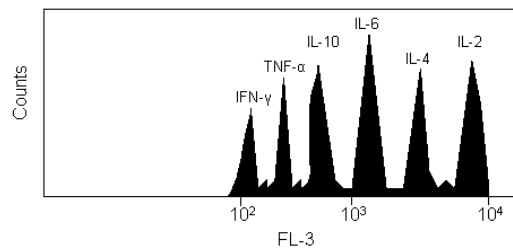


Abbildung 6. Das CBA-Prinzip. Sechs Beadpopulationen mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten sind an Captureantikörper spezifisch für IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ gekoppelt (FL-3, Fluoreszenz 3). Diese werden mit einem PE-konjugiertem Detektionsantikörper gemischt und mit entweder den rekombinanten Standards oder den Proben (Überstände) inkubiert. Die Daten wurden in einem Durchflußzytometer erhoben und mit der BD CBA-Analyse-Software ausgewertet. Gezeigt sind die sechs Beadpopulationen mit ihren unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die an IL-2-, IL-4-, IL-6-, IL-10-, TNF- α - und IFN- γ -spezifische Capture-Antikörper gekoppelt sind. IFN- γ hat die schwächsten, IL-2 die stärksten Fluoreszenzintensitätscharakteristika. Durch den PE-konjugierten Detektionsantikörper kann die Konzentration der Zytokine bestimmt werden, wenn die Proben bei FL-3 gegen PE (Fluoreszenz 2) gemessen werden (hier nicht gezeigt).

3.2.6 Statistische Auswertung

Zur Analyse abhängiger Stichproben wurde der Wilcoxon Test angewandt, für unabhängige Stichproben der Mann-Whitney U Test. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.5. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

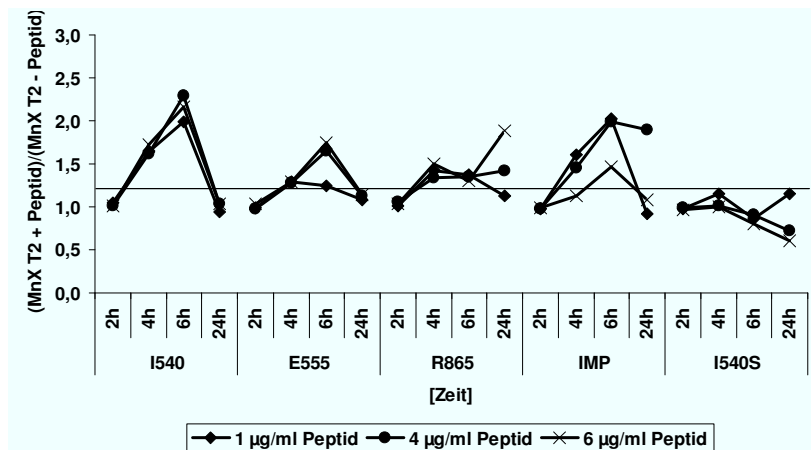
4 Ergebnisse

4.1 Peptidbindungskapazität (T2-Bindungstest)

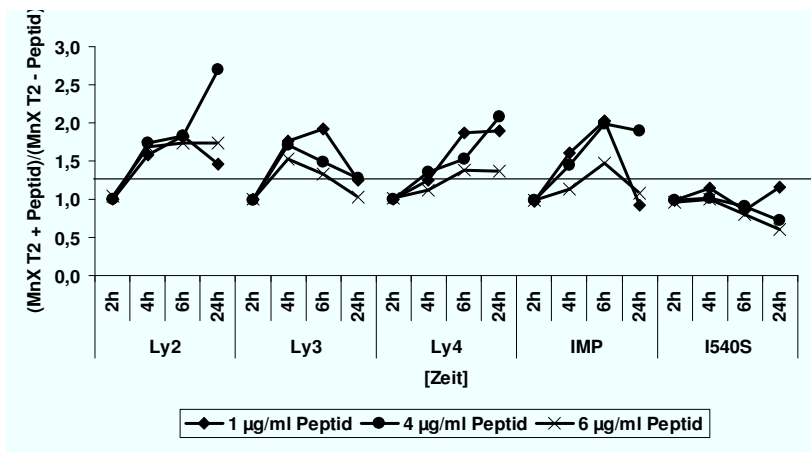
Die Affinität der gewählten nonameren Peptide der CD23-, CD229- und hTERT-Proteine zu den HLA-A0201-Molekülen wurde in Standard T2-Bindungstests untersucht (Nijman *et al* 1993). In **Abbildung 7** ist die Bindungskapazität der hTERT-Peptide (Vonderheide *et al* 1999) I540, E555 und R865 (**A**), der CD23-Peptide L41, A33 und F232 (**B**) und der CD229-Peptide Ly2, Ly3 und Ly4 (**C**) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h und 24 h) und in drei Konzentrationen (1 µg/ml, 4 µg/ml und 6 µg/ml) gezeigt. Parallel wurde als Positivkontrolle ein Peptid des Influenza Matrix Proteins getestet (IMP, HLA-A0201-restringiert; Würtzen *et al* 2002), als Negativkontrolle das nicht HLA-A0201-restringierte Peptid I540S (Vonderheide *et al* 1999). Eine konzentrationsabhängige Peptidbindung (1 µg - 4 µg) an die HLA-A0201-Moleküle fand nach 4-6 h (Median: 1,61, Bereich: 1,25 (Ly4) bis 2,32 (F232)). 6 µg Peptid brachte im gleichen Zeitraum verminderte, aber konzentrationsabhängige Quotienten hervor (Median: 1,44, Bereich: 1,04 (L41) bis 2,16 (I540)). Nach 24 h Koinkubation zeigte nur Ly4 eine zunehmende Bindung an MHC-I, alle anderen Peptidbindungswerte sanken, meist unter den Wert von 1,2. I540S zeigte über den Versuchszeitraum keine Bindung (Bereich: 0,61 - 1,15), IMP ein vergleichbares Bindungsverhalten wie die Testpeptide (Median: 1,29, Bereich: 0,92 bis 2,02). Zwei Kontrollpeptide aus der Literatur (A98-ID und MAGE-3; Vonderheide *et al* 1999, Van der Bruggen *et al* 1994) wurden ebenfalls im T2-Bindungstest untersucht, sind aber hier nicht gezeigt. A98-ID band wie I540S nicht an HLA-A2 (Bereich: 0,93 - 1,00), jedoch MAGE-3, dessen Bindungsverhalten vergleichbar mit IMP war (Bereich: 0,93 (2 h) bis 2,3 (6 h)). Die Literatur bestätigt diese Daten.

Die besten Bindungsergebnisse konnten in den Konzentrationen 4 µg/ml bis 6 µg/ml und einer Inkubationszeit von 4-6 h erzielt werden. Hierbei zeigten die Peptide F232 (1,90), Ly2 und Ly3 (1,73 bzw. 1,71) und I540 (1,61) die stärkste HLA-A2-Affinität. Für die folgenden Experimente wurde daher eine Beladungszeit von 4-6 h mit 4 µg/ml Peptid und 1,5 µg/ml β_2M gewählt.

(A)



(B)



(C)

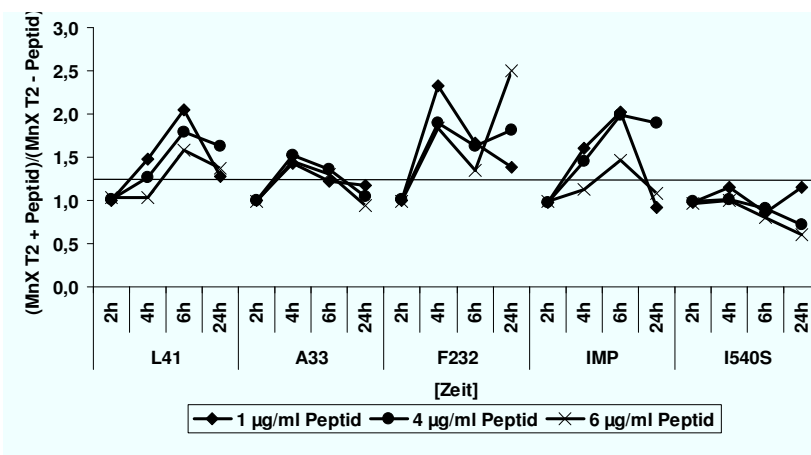


Abbildung 7. T2-Bindungstest. Die Affinität der nonameren, putativ HLA-A0201-bindenden Peptide der Proteine hTERT (I540, E555, R865, **A**), CD229 (Ly2, Ly3, Ly4, **B**) und CD23 (L41, A33, F232, **C**) an die MHC-I-Moleküle wurden in einem T2-Bindungstests getestet. 1 µg/ml (◆), 4 µg/ml (●) und 6 µg/ml (x) der Peptide wurden für 2 h, 4 h, 6 h und 24 h in Anwesenheit von 1,5 µg/ml β_2 M untersucht, wie auch die Positivkontrolle IMP und das nicht HLA-A2-bindende I540S. Werte des Quotienten $(\text{MnX T2} + \text{Peptid})/(\text{MnX T2} - \text{Peptid}) \geq 1,2$ weisen auf eine Bindung an das HLA-A0201-Molekül hin.

4.2 hTERT

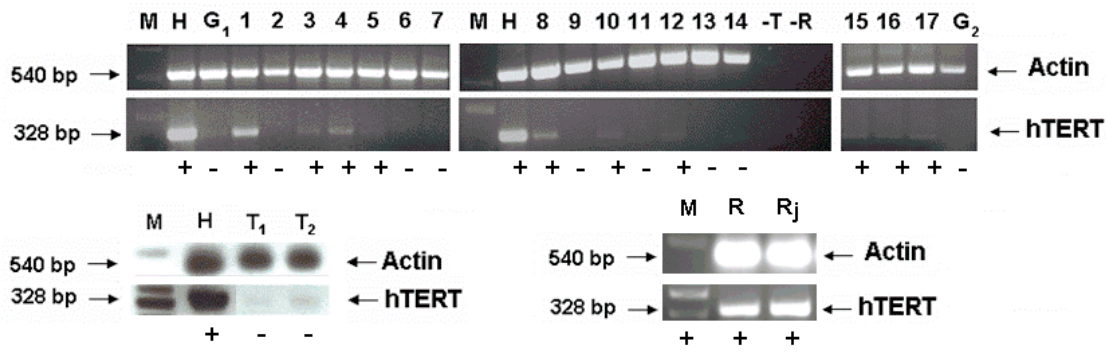
4.2.1 hTERT-mRNA Überexpression in B-CLL Zellen

Die Frequenz der hTERT-mRNA Expression in HLA-A201-positiven B-CLL Patienten wurde mittels RT-PCR bestimmt (**Abbildung 8**). hTERT-mRNA konnte in 10/17 naiven B-CLL Proben (59%) und den Tumorzelllinien HeLa, Mec-1, Ramos und Raji detektiert werden. Normale Zellen, wie Granulozyten (n = 2) waren hTERT negativ und normale tonsilläre B-Zellen (n = 2) exprimierten hTERT-mRNA nur schwach (**Abbildung 8A** und **C**). B-CLL Zellen wurden auch nach CD40-Aktivierung für 72 h mit hCD40L-Mausfibroblasten auf ihre hTERT-Expression getestet (**Abbildung 8B**) und waren in 77% (13/17) hTERT positiv. In 9 Patienten (B-CLL2, 3, 5, 7, 12, 14-16 und 18) konnte eine Zunahme der Expression festgestellt werden, bei 4 Proben (B-CLL4, 6, 10, 11) konnte nur nach hCD40L-Stimulation eine hTERT-mRNA nachgewiesen werden. Trotzdem wurde in 3 B-CLL Proben (B-CLL8, 13 und 17) weder in naiven, noch in aktivierten Zellen eine hTERT-Expression gefunden. In B-CLL1 konnte nach Aktivierung keine sichtbare mRNA Menge festgestellt werden. Als interne Kontrolle wurde β -Actin verwendet. Des Weiteren wurden RT-PCR Kontrollen mitgeführt, um DNA Kontaminationen auf RNA- und PCR-Ebene auszuschließen (-T und -R, **Abbildung 8A** und **B**). Die hTERT-mRNA Expression der B-CLL Proben (naiv und hCD40L-aktiviert) und Kontrollzellen ist in **Abbildung 8C** zusammengefasst.

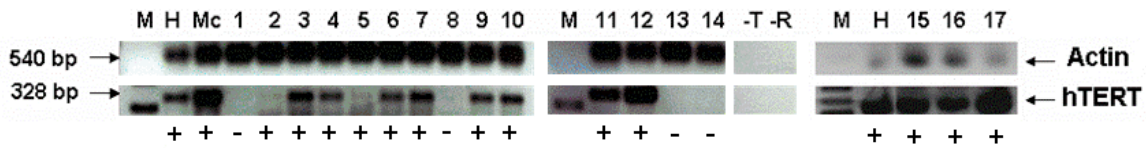
4.2.2 *In vitro* Generierung hTERT spezifischer CTLs von gesunden Spendern mit peptid-beladenen Dendritischen Zellen (DCs)

Zunächst wurde die Erkennung der hTERT abstammenden Peptide durch CD8⁺ T-Lymphozyten *in vitro* untersucht. Dazu wurden Antigen-spezifische CTLs der HLA-A0201⁺ gesunden Spender induziert, indem deren T-Zellen mit autologen DCs, die aus der adhärennten Monozytenfraktion generiert wurden, stimuliert. Die DCs fungierten als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) bei den T-Zellstimulationen und wurden mit den HLA-A0201-bindenden hTERT-Peptiden I540, E555 und R865 beladen. Die zytotoxische Aktivität der T-Zellen wurde nach 4-6 Wochen Kultur in Standard [⁵¹Cr]-release Assays getestet.

(A)



(B)



(C)

	Naive B-CLL Zellen	hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen		
Probe	hTERT mRNA Expression	hTERT mRNA Expression	Probe	hTERT mRNA Expression
B-CLL1	+	-	Tonsillen	-
B-CLL2	+	+	Mec-1	+
B-CLL3	+	+	Raji	+
B-CLL4	-	+	Ramos	+
B-CLL5	+	+	HeLa	+
B-CLL6	-	+	Granulozyten	-
B-CLL7	+	+		
B-CLL8	-	-		
B-CLL9	n.d.	n.d.		
B-CLL10	-	+		
B-CLL11	-	+		
B-CLL12	+	+		
B-CLL13	-	-		
B-CLL14	+	+		
B-CLL15	+	+		
B-CLL16	+	+		
B-CLL17	-	-		
B-CLL18	+	+		

Abbildung 8: hTERT-mRNA Expression in naiven und hCD40L-stimulierten B-CLL Zellen. Gezeigt ist die hTERT- (328 bp) und β -Actin- (540 bp) mRNA Expression in 17 HLA-A0201⁺ B-CLL Patienten: (A) naive B-CLLs, gesunde Kontrollzellen, d.h. HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen (n = 2) und Granulozyten (n = 2), und (B) hCD40L-aktivierte B-CLLs. hTERT⁺ Proben sind mit einem (+) gekennzeichnet. Die RT-PCR Kontrollen -T (cDNA Synthese ohne Reverse Transkriptase) und -R (PCR Kontrolle ohne cDNA) wurden ebenfalls mitgeführt. (A) Die Spuren 1-17 repräsentieren die naiven HLA-A0201⁺ B-CLL Patienten (Reihenfolge: 1, 4, 14, 5, 7, 6, 8, 2, 10, 3, 11, 15, 13, 17, 16, 12 und 18), T₁₊₂ gesunde tonsilläre B-Zellen. (B) hCD40L-aktivierte Proben sind in folgender Reihenfolge aufgelistet: 1, 4, 14, 5-7, 2, 8, 10, 3, 15, 11, 13, 17, 16, 12 und 18. M = Marker, H = HeLa, R = Ramos, Rj = Raji und Mc = Mec-1 (Positivkontrollen), G₁₊₂ = Granulozyten (Negativkontrolle). (C) Zusammenfassung der hTERT-mRNA Expression der 17 HLA-A0201⁺ naiven und hCD40L-aktivierten B-CLL Proben und der Kontrollen. n.d. = nicht detektiert.

Wie in **Abbildung 9A** gezeigt, war es möglich, hTERT-spezifische CTLs von gesunden Spendern zu generieren. Nach mehreren Restimulationen konnten CTLs *in vitro* detektiert werden, die Peptid-spezifische Reaktionen gegen T2-Zellen zeigten, die mit den hTERT Peptiden gepulst (beladen) waren. Gegen E555 (100% Lyse bei E:T = 40:1) und I540 (84,3% Lyse, E:T = 40:1) hatten die T-Zellen die höchste lytische Aktivität. Für R865 wurde eine Lyse von 51,4% (E:T = 40:1) beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden weder K562 Zellen, die Zielzellen der NK-Zellen, spezifisch lysiert (Median: 0,1%, Bereich: 1,5%), noch T2 Zellen mit Kontrollpeptiden (I540 oder E555: Median: 5,2% Lyse; Bereich: 0,1 - 16,6%). Unbeladene T2-Zellen wurden ebenfalls nicht erkannt (Bereich: 0,1 - 4,2%), mit Ausnahme der E555-CTLs (31,0 - 6,5% Lyse; E:T = 40:1 - 5:1).

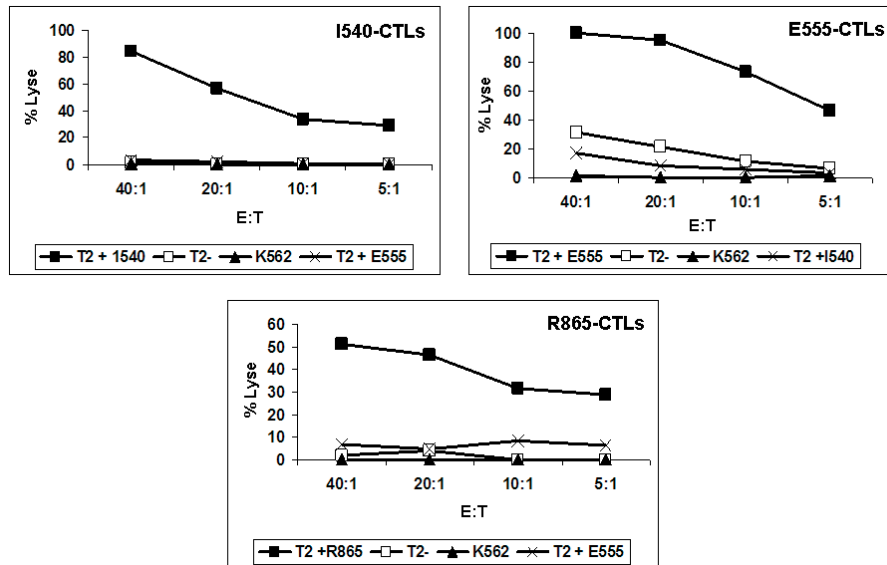
Weiter wurden die hTERT-spezifischen CTLs der gesunden Spender auf ihre Erkennung von primären naiven unmodifizierten B-CLL Zellen getestet. Dies erfolgte in [⁵¹Cr]-release Assays. Es konnte gezeigt werden, dass HLA-A0201⁺/hTERT⁺ B-CLL Patienten (n = 3, B-CLL14, 16 und 18, siehe **Abbildung 8**) durch die generierten hTERT-spezifischen CTLs lysiert wurden (E:T = 5:1 bis 1,25:1, **Abbildung 9B**). Als Kontrollzellen wurden gesunde HLA-A0201⁺/hTERT⁻ tonsilläre B-Zellen verwendet. Eine spezifische Lyse wurde für R865-spezifische CTLs in 11,0% ± 4,7% der Zielzellen, in 10,5% ± 5,7% für E555-spezifische T-Zellen und 9,5% ± 3,4% für I540-spezifische Effektorzellen detektiert (E:T Verhältnisse 5:1). In geringeren E:T Verhältnissen von 2,5:1 bzw. 1,25:1 zeigten die Reaktionen eine abnehmende Lyse (R865: 3,2% ± 5,1% und 2,6% ± 2,3%; E555: 2,7% ± 4,0% und 3,6% ± 4,5%; I540: 2,2% ± 2,6% und 2,3% ± 4,0%). Tonsilläre B-Zellen (n = 2) wurden nicht erkannt (0,1% Lyse für alle E:T Verhältnisse).

4.2.3 hTERT-spezifische CTLs erkennen B-Zell Tumorzelllinien

Die hTERT-spezifischen T-Zellen wurden daraufhin auf ihre Erkennung von B-Zell-abstammenden Lymphom- und Leukämiezelllinien untersucht. In [⁵¹Cr]-release Assays wurden die Zelllinien Ramos^{HLA-A0201⁺, hTERT⁺}, Raji^{HLA-A0201⁻, hTERT⁺}, Mec-1^{HLA-A0201⁻, hTERT⁺} und HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen (siehe **Abbildung 8**) als Zielzellen für die *in vitro* generierten CTLs der gesunden Spender verwendet. Der Nachweis für eine MHC-I-Restriktion der generierten CTLs und der Antigen-spezifität wurde mit Hilfe des W6/32 Antikörpers erbracht. Die für I540, E555 und R865 spezifischen, *in vitro* induzierten CTLs lysierten HLA-A0201⁺/hTERT⁺ Ramos Zellen (I540: 26,2 ± 20,7% - 2,9 ± 3,3% Lyse; E555: 12,3 ± 3,2% bis 3,5 ± 4,2% Lyse; R865: 37,7 ± 27,2% - 3,9 ± 4,8% Lyse; E:T = 20:1 - 5:1). Die CTL-Reaktionen konnten durch den mAb W6/32 inhibiert werden, was für eine MHC-I-Restriktion spricht (I540: 4,8 ± 1,6% - 0,3 ± 0,4% Lyse; E555: 1,1 ± 0,1% bis 0,8 ± 0,4% Lyse; R865: 6,8 ± 0,7% bis 1,8 ± 1,8% Lyse; E:T = 20:1 - 5:1; **Abbildung 10**). HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen wurden nicht von den hTERT-spezifischen CTLs lysiert (alle: 0,3 ± 0,3% bei E:T = 20:1 bis 5:1). Ebenso wurden

hTERT-exprimierende Raji^{HLA-A0201}- und Mec-1^{HLA-A0201}- Zellen nur unspezifisch erkannt (I540: Be-reich: $8,3 \pm 0,3\%$ - $1,5 \pm 0,4\%$ Lyse; E555: Bereich: $7,2 \pm 3,1\%$ bis $3,2 \pm 2,1\%$ Lyse; R865: Bereich: $8,5 \pm 1,5\%$ bis $1,9 \pm 1,6\%$ Lyse; E:T = 20:1 - 5:1).

(A)



(B)

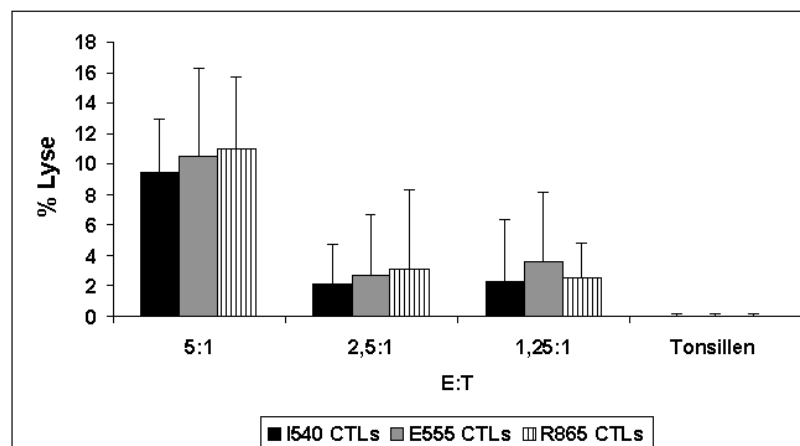


Abbildung 9. Generierung hTERT-spezifischer CTLs *in vitro* mit Hilfe von Peptid-beladenen DCs. Die aus autologen Monozyten generierten DCs wurden mit den HLA-A0201-bindenden Peptiden des hTERT-Proteins (I540, E555 und R865) beladen, um durch Restimulationen eine CTL-Antwort *in vitro* zu induzieren. Die Zytotoxizität der I540-, E555- und R865-spezifischen T-Zellen nach 4-6 Wochen *in vitro* Kultur wurde in Standard [⁵¹Cr]-release Assays untersucht. (A) Die T-Zellen lysierten nur T2-Zellen, die mit den hTERT-Peptiden waren (■), spezifisch. Im Gegensatz dazu erkannten sie nicht die mit den Kontrollpeptiden beladenen Zielzellen (I540 bzw. E555; x) und K562-Zellen (▲). Ferner wurden T2-Zellen ohne Peptid (□) nur in geringem Maße lysiert. (B) Die hTERT-spezifischen CTLs wurden auf ihre Lysekapazität von HLA-A0201⁺/hTERT⁺ B-CLL Proben (n = 3, B-CLL14, 16, 18) und HLA-A0201⁺/hTERT⁻ tonsillären B-Zellen in [⁵¹Cr]-release Assays untersucht. Die B-CLL Zellen wurden von allen drei hTERT-spezifischen CTLs in gleichem Maße lysiert, wobei die Kontrollzellen nicht erkannt wurden (E:T = 5:1 bis 1,25:1). E:T = Effektor zu Target (Zielzellen); % Lyse = Zytotoxische Aktivität.

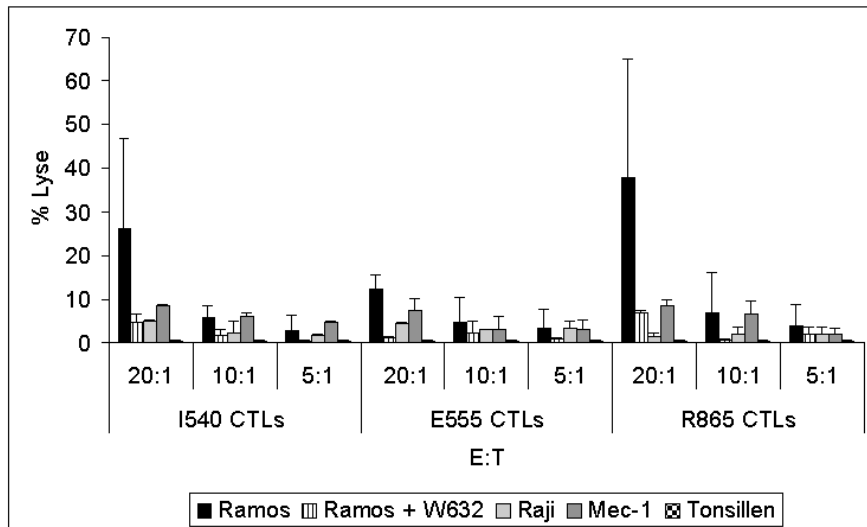


Abbildung 10: hTERT-spezifische CTLs erkennen B-Zell-abgeleitete Tumorzelllinien. hTERT-spezifische CTLs von gesunden Spendern wurden in $[^{51}\text{Cr}]$ -release Assays in Anwesenheit von B-Zellen abstammenden Lymphom- und Leukämiezelllinien (Ramos, Raji und Mec-1) als Zielzellen untersucht. Nur HLA-A0201⁺/hTERT⁺ Ramos Zellen wurden spezifisch von den CTLs erkannt, aber nicht HLA-A0201⁺/hTERT⁺ Raji und Mec-1 oder HLA-A0201⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen (Negativkontrolle). Die Reaktivität der T-Zellen gegen Ramos Zellen wurde durch den MHC-I-spezifischen Antikörper W6/32 blockiert. E:T = 20:1 - 5:1.

4.2.4 Expansion autologer T-Zellen von B-CLL Patienten

Es ist bekannt, dass die meisten primären B-CLL Zellen verminderte Stimulatorqualitäten besitzen und somit weniger gute APCs darstellten (Angelopoulou *et al* 1999). Daher wurden die naiven leukämischen Zellen mit Hilfe von „Feeder-Zellen“ (mit humanem CD40L stabil transfizierte und konstitutiv exprimierende Mausfibroblasten L Zellen) für 72 Stunden aktiviert. Durch die Interaktion von CD40 (B-CLL Zellen) und hCD40L (Feeder) wird die Expression von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen erhöht (Buhmann *et al* 1999). Die Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 (CD58), LFA-3 (CD54)), Aktivierungsmarker (CD40, MHC-I, MHC-II und Komponenten des IL-2 Rezeptors CD25 und CD122), Kostimulationsmoleküle (B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)) und CD95 (Fas) wurde auf CD40L-aktivierten Zellen mit der von naiven B-CLL Zellen verglichen (**Abbildung 11**). Die Expression dieser Moleküle wurde signifikant durch die CD40L-Stimulation erhöht (Wilcoxon Test: jedes Molekül: $Z = -2,521$; $p < 0,012$). Bei allen Proben wurde parallel eine CD5⁺/CD19⁺ Expression von mindestens 90% festgestellt (Daten nicht gezeigt). In **Abbildung 11** sind die Expressionsprofile der verschiedenen Oberflächenmoleküle des Patienten B-CLL3 auf naiven und aktivierten B-CLL Zellen gezeigt.

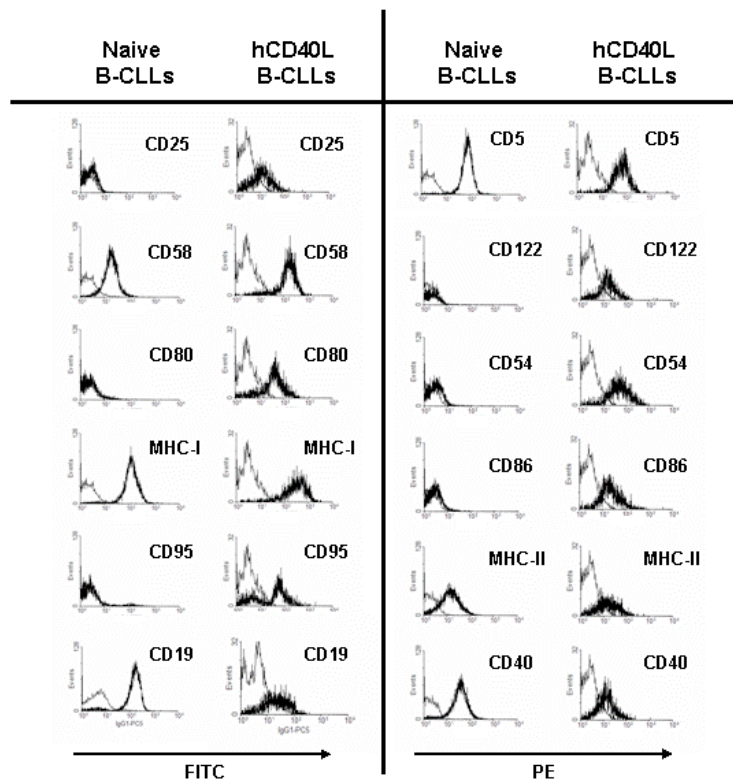


Abbildung 11. Expressionsprofile naiver B-CLL Zellen vor und nach CD40L Stimulation. Das Expressionsprofil von Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen der naiven B-CLL Patienten wurde durch Koinkubation mit CD40L-exprimierenden Feeder-Zellen verstärkt. Als Beispiel ist hier das Expressionsniveau auf naiven und CD40L-aktivierten B-CLL Zellen des Patienten B-CLL3 aufgeführt. Neben den Molekülen CD25, CD58, CD80, MHC-I und CD95 (linke Seite, FITC-markierte Antikörper) und CD122, CD54, CD86, MHC-II and CD40 (rechte Seite, PE-markierte Antikörper) wurden die B-CLL Marker CD5 und CD19 auf naiven und aktivierten Zellen ebenfalls gemessen. Durch die Aktivierung erhöhte sich die Expression der verschiedenen Moleküle signifikant.

4.2.4.1 Naive und CD40L-aktivierte B-CLL Zellen als Stimulatoren

Im Zusammenhang mit immuntherapeutischen Ansätzen sollte untersucht werden, in wie weit autologe T-Zellen von B-CLL Patienten expandiert und B-CLL Zellen mittels der hTERT-Peptide in MHC-I-restringierter Weise erkannt werden können. Daher wurden hTERT⁺ B-CLL Zellen mit unterschiedlichen APC-Qualitäten als Stimulatoren für eine T-Zellexpansion verwendet.

Es wurden 8 der 18 Proben, die eine positive hTERT Expression in der RT-PCR zeigten (B-CLL2, 3, 7, 12, 14-16 und 18, siehe **Abbildung 8**), für eine autologe T-Zellstimulation eingesetzt. Als APCs wurden sowohl autologe, naive, unmodifizierte B-CLL Zellen, als auch ungepulste, hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen (CD40L-U) untersucht und die T-Zellen wurden für 21 Tage in Anwesenheit der APCs *in vitro* expandiert. Die T-Zellen wurden dann in IFN- γ -ELISPOT Assays untersucht. Die autologen naiven und CD40L-U B-CLL Zellen wurden mit den verschiedenen HLA-A0201-bindenden hTERT-Peptiden I540, E555 und R865 gepulst.

APCs, die mit MAGE-3 Peptid (HLA-A0201-bindend, aber B-CLL unverwandt) oder dem Peptidlösungsmittel DMSO beladen wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Antigen-spezifität und MHC-I-Restriktion wurde durch Blockierungsexperimente mit dem MHC-I-spezifischen W6/32 Antikörper getestet. Hintergrundwerte, die durch Zugabe von DMSO zu den APCs und den T-Zellen alleine ermittelt wurden, wurden von den experimentellen Werten abgezogen. HLA-A0201⁻, aber hTERT⁺ B-CLL Zellen und HLA-A0201⁺ nicht-maligne tonsilläre B-Zellen (je n = 2) wurden ebenfalls untersucht, um unspezifische T-Zellreaktionen auszuschließen.

4.2.4.1.1 Naive B-CLL Zellen als Stimulatorzellen

In Anwesenheit von naiven B-CLL Zellen als APCs, die mit den hTERT-Peptiden I540, E555 und R865 beladen wurden, war es in 5 der 8 Proben (B-CLL2-4, 12 und 15) nicht möglich, eine hTERT-spezifische T-Zellantwort nach drei Wochen *in vitro* Kultur in den IFN- γ -ELISPOT Assays nachzuweisen (0/100.000 T-Zellen, **Tabelle 6**, Spalten eins und zwei). Interessanterweise konnten jedoch in den drei anderen Proben (B-CLL14, 16 und 18) autologe CTLs expandiert werden. Im IFN- γ -ELISPOT wurden 200 bis 242/100.000 E555-spezifische T-Zellen (Median: 221/100.000 T-Zellen) und 67 bis 278/100.000 R865-spezifische CTLs (Median: 173/100.000) detektiert. In allen drei Patienten konnte eine MHC-I-Restriktion (W6/32) gezeigt werden (Wilcoxon Test: $Z = -2,533$; $p < 0,011$). APCs, die mit dem HLA-A0201-bindenden Peptid MAGE-3 gepulst waren, HLA-A0201⁻/hTERT überexprimierende B-CLL Zellen von zwei Patienten und HLA-A0201⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen (n = 2) wurden von den Patienten T-Zellen nur im Bereich der Hintergrundwerte erkannt (Median: 0/100.000; 0-81/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test: MAGE-3: $p < 0,029$; **Tabelle 6**). Die Werte der gestesteten Zellen alleine (T-Zellen und Zielzellen mit DMSO) ergab keine Punkte (0/100.000 Zellen). Dies zeigt, dass T-Zellen von B-CLL Patienten hTERT-entstammende Peptide in MHC-I-restringierter Weise erkennen.

Zusätzlich wurde die Vorläuferfrequenz von hTERT-spezifischen CTLs mit naiven B-CLL Zellen als APCs in IFN- γ -ELISPOT Assays untersucht, jedoch konnte keine spezifische Reaktivität gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Probe	Naive B-CLL Zellen gepulst mit I540-R865	Naive B-CLL Zellen gepulst mit I540-R865 + W6/32	HLA-A0201-hTERT ⁺ B-CLL Zellen	HLA-A0201 ⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen	Naive B-CLL Zellen + MAGE-3
B-CLL14	E555 200 R865 67	67 33	n.d.	n.d.	0
B-CLL16	R865 278	139	0	n.d.	0
B-CLL18	E555 242	226	0	81	16

Tabelle 6. Spezifische Erkennung durch expandierte autologe T-Zellen von HLA-A0201-restringierten hTERT-Peptiden auf B-CLL Zellen. T-Zellen der Patienten B-CLL 14, 16 und 18 wurden mit autologen, naiven B-CLL Zellen als APCs expandiert. IFN- γ -ELISPOT Assays wurden an Tag 21 mit autologen, naiven B-CLL Zellen als Stimulatorzellen durchgeführt. Die HLA-A0201-bindenden hTERT-Peptide wurden dem Assay zugesetzt, um die Anzahl der hTERT-spezifischen T-Zellen zu detektieren. Angegeben ist die Anzahl der hTERT-spezifischen Punkte/100.000 T-Zellen. Die Negativkontrollen (HLA-A0201/hTERT⁺ B-CLL Zellen (n = 2), nicht-maligne Zellen von zwei HLA-A0201⁺ gesunden Spendern (tonsilläre B-Zellen) und naive B-CLL Zellen, die mit dem MAGE-3-Peptid beladen waren) wurden nicht spezifisch erkannt. n.d. = nicht detektiert.

4.2.4.1.2 HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der mit naiven autologen B-CLL Zellen expandierten T-Zellen von B-CLL Patienten

Die T-Zellen der drei Patienten B-CLL14, 16 und 18, die mit naiven unmanipulierten B-CLL Zellen *in vitro* expandiert wurden, wurden mit HLA-A2-Dimer/Peptid Komplexen spezifisch für hTERT und das Kontrollpeptid MAGE-3 an Tag 28 gefärbt, um die Ergebnisse der IFN- γ -ELISPOT Analysen zu validieren (**Abbildung 12A, C-D**). Die Vorläuferfrequenz der T-Zellen in diesen Patienten wurde ebenfalls bestimmt. Dazu wurden HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen mit PBMCs der B-CLL Patienten ohne Stimulation (Tag 0) durchgeführt, damit die Zunahme der Antigen-spezifischen T-Zellen durch die Expansion verifiziert werden konnte. Hintergrundswerte wurden durch Beladung der HLA-A2-Dimer Komplexe mit dem Lösungsmittel allein (DMSO) ermittelt und von den experimentellen Werten subtrahiert.

Nach 4 Wochen Stimulation mit autologen naiven B-CLL Zellen konnten hTERT-reaktive CD8⁺ T-Zellen mit 10,8% bis 25,9% (Median: 25,5%, **Abbildung 12A-B**, Tag 28) detektiert werden, die den Peptidmix M1 (I540, E555, R865) spezifisch erkannten. Die T-Zellen reagierten hingegen mit dem Kontrollpeptid MAGE-3 nur gering (Median: 0%, Bereich: 0 - 2,9%, **Abbildung 12A-B**, Tag 28; Wilcoxon Test: Z = -2,913; p < 0,004). Unstimulierte T-Lymphozyten erkannten an Tag 0 die M1-Dimere spezifisch zwischen 3,6% und 26,4% (Median: 9,9%) und MAGE-3 nur auf Hintergrundniveau (Median: 0,1%, 0 - 1,1%; Tag 0; **Abbildung 12A-B**; Wilcoxon Test: p < 0,003). Insgesamt wurde die relative Anzahl der hTERT-reaktiven T-Zellen innerhalb 28 Tagen Stimulation mit autologen, naiven B-CLL Zellen im Median 2,6-fach (Bereich: 1- bis 3-fach; Wilcoxon Test: Z = -1,993; p < 0,046) erhöht.

(A)

Probe	Peptid	% spezifische T-Zellen Tag 0	% spezifische T-Zellen Tag 28
B-CLL14	M1	3,60	10,8
	MAGE-3	0	2,90
B-CLL16	M1	26,4	25,5
	MAGE-3	1,10	0
B-CLL18	M1	9,90	25,9
	MAGE-3	0,10	0

(B)

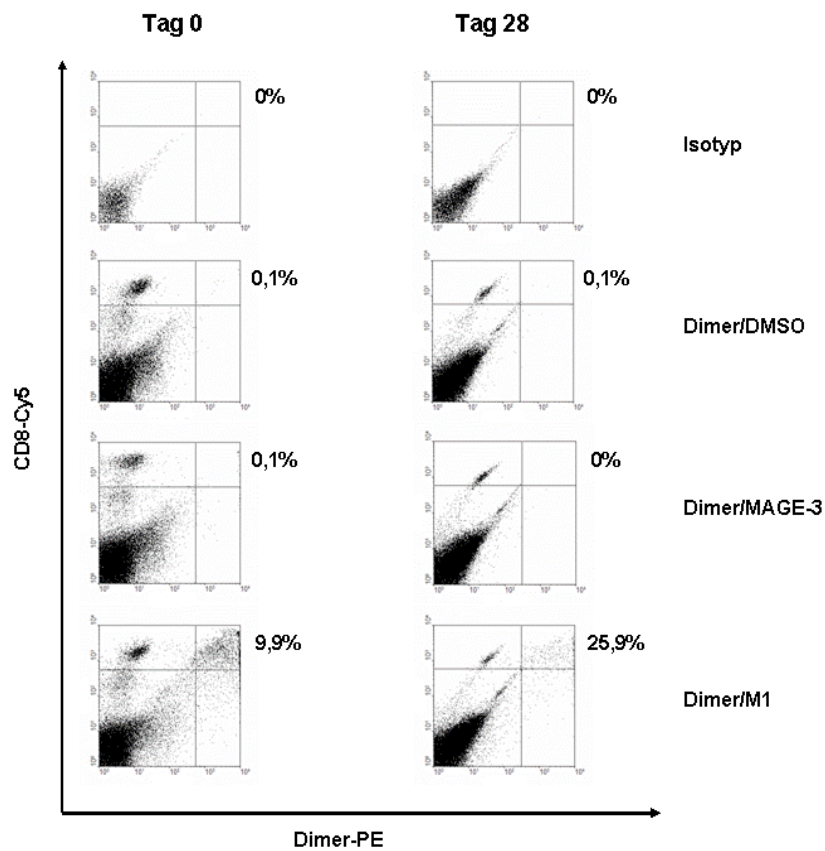


Abbildung 12. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen hTERT-erkennender CD8⁺ T-Zellen von B-CLL Patienten vor (Tag 0) und nach vier Wochen *in vitro* Stimulation (Tag 28) mit naiven B-CLL Zellen. (A) Gezeigt sind die HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen der T-Zellen der B-CLL Proben 14, 16 und 18 an Tag 0 und nach 4 Wochen *in vitro* Kultur (Tag 28) mit naiven B-CLL Zellen. Die Detektion der hTERT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde durch den Peptidmix M1 festgestellt. Der Prozentsatz der MAGE-3 beladenen HLA-A2-Komplexe wurde ebenfalls untersucht. Nach 4 Wochen Stimulation nahm die hTERT-spezifische Reaktivität zu und war signifikant höher als die gegen die Kontrolle (MAGE-3). (B) Die Dimerfärbungen des Patienten B-CLL18 an Tag 0 und 28 sind hier graphisch dargestellt. Die ersten drei Histogramme repräsentieren die Kontrollen (Isotyp, Dimer beladen mit DMSO und MAGE-3), das letzte Histogramm zeigen den prozentualen Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die mit den hTERT-Peptiden (M1)/Dimeren im oberen rechten Quadranten reagierten.

4.2.4.1.3 CD40L-aktivierte B-CLL Zellen als Stimulatoren

Im Folgenden wurde die Fähigkeit von CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als APCs bei der autologen T-Zellexpansion überprüft. Als Folge der CD40L-Stimulation der B-CLL Zellen wird die Expression der Adhäsions-, Kostimulations- und hTERT-Moleküle erhöht (siehe **Abbildung 11**), wobei angenommen werden kann, dass die aktivierten B-CLL Zellen als APCs eine autologe T-Zellexpansion ermöglichen. Dabei wurden zwei im vorherigen Abschnitt überprüften B-CLL Patienten (B-CLL14 und 16), die mit naiven B-CLL Zellen stimuliert wurden, untersucht. Für B-CLL18 wurden keine T-Zellen mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen expandiert, da nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand. Außerdem wurden fünf weitere Proben (B-CLL2, 3, 7, 12 und 15) in die Untersuchung eingeschlossen, die nicht mit naiven B-CLL expandiert werden konnten.

In 5/8 der untersuchten Fälle (B-CLL2, 3, 12, 14 und 16) konnten hTERT-spezifische CTLs mit Hilfe autologer, CD40L-aktivierter B-CLL Zellen als Stimulatoren nach 4 Wochen *in vitro* Kultur erfolgreich expandiert werden. Es konnten 58 bis 241/100.000 hTERT-spezifische T-Zellen (Median: 103/100.000 T-Zellen) detektiert werden, die MHC-I-restringiert waren (W6/32; Median: 0/100.000 T-Zellen; Wilcoxon Test: $Z = -2,201$; $p < 0,028$). Die Kontrollzellen, wie HLA-A0201⁻/hTERT⁺ B-CLL Zellen, HLA-A0201⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen und Zielzellen die mit dem MAGE-3-Peptid beladen waren, wurden nicht von den Patienten T-Zellen erkannt (Median: 0/100.000 T-Zellen; Bereich: 0 - 29 Punkte/100.000 T-Zellen). Mit naiven B-CLL Zellen als APCs wurden vor allem die Peptide E555 und R865 als antigene Determinanten erkannt, bei den CD40L-aktivierten Zellen hauptsächlich I540. In den Patientenproben B-CLL7 und 15 konnten weder mit naiven, noch mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen Antigen-spezifische T-Zellen generiert werden.

Ogleich 8/17 Patienten auf spezifische T-Zellreaktionen getestet wurden, wurden die übrigen 9/17 B-CLL Proben, die ebenfalls positiv auf hTERT getestet worden sind (**Tabelle 7**), nicht auf ihre potentielle T-Zellexpansion analysiert. Gründe hierfür waren entweder keine ausreichenden Mengen an Tumorzellen und/oder autologen T-Zellen (B-CLL4, 5, 6, 10 und 11) oder keine hTERT-Expression nach CD40L-Aktivierung (B-CLL1, 8, 13, 17).

Probe	hCD40L B-CLL Zellen gepulst mit I540-R865	hCD40L B-CLL Zellen gepulst mit I540-R865 + W6/32	HLA-A0201- hTERT ⁺ B-CLL Zellen	HLA-A0201 ⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen	hCD40L B-CLL Zellen + MAGE-3
B-CLL2	I540 68	45	0	0	0
B-CLL3	I540 117 E555 58	0 0	0	0	0
B-CLL12	I540 241	0	0	0	0
B-CLL14	I540 88	0	0	29	0
B-CLL16	I540 167	0	0	n.d.	0

Tabelle 7. Expansion autologer T-Zellen mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als APCs.

Autologe T-Zellen von 5/8 hTERT⁺ B-CLL Patienten (B-CLL2, 3, 12, 14, 16) konnten erfolgreich mit Hilfe von naiven B-CLL Zellen als APCs expandiert werden. IFN- γ -ELISPOT Assays wurden an Tag 21 mit naiven, autologen B-CLL Zellen durchgeführt, die mit den hTERT Peptiden I540, E555 und R865 in Form des Peptidmixes M1 beladen wurden. Die Zahl der Punkte nach Koinkubation der naiven B-CLL Zellen bzw. der autologen T-Zellen mit DMSO wurde ermittelt und von den experimentellen Werten abgezogen (0/100.000 T-Zellen). Die MHC-I-Restriktion wurde durch Blockierungsexperimente mit dem W6/32 Antikörper untersucht. Angegeben ist die Anzahl der hTERT-spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen. HLA-A0201/hTERT⁺ B-CLL Zellen und gesunde tonsilläre B-Zellen^{HLA-A0201+} (je n = 2) und MAGE-3-beladene naive B-CLL Zellen wurden von den T-Zellen nur im Hintergrundbereich von den T-Zellen erkannt. n.d. = nicht detektiert.

4.2.4.1.4 Dimerfärbung der mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen expandierten T-Zellen von B-CLL Patienten

In Analogie zu den autologen T-Zellen, die mit naiven B-CLL Zellen expandiert wurden, erfolgte auch hier eine Bestätigung der IFN- γ -ELISPOT Daten mittels HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen nach 4 Wochen *in vitro* Kultur mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen. Neben den hTERT-beladenen Dimer Komplexen wurde auch MAGE-3 als Kontrollpeptid abgefragt. Die T-Zellen wurden sowohl an Tag 0 (Vorläuferfrequenz), als auch an Tag 28 der Stimulation untersucht. An beiden Zeitpunkten dienten mit DMSO beladene Dimerkomplexe als Kontrollwerte, die von den spezifischen T-Zellpunkten subtrahiert wurde.

(A)

Probe	Peptid	% spezifische T-Zellen Tag 0	% spezifische T-Zellen Tag 28
B-CLL2	M1	7,20	80,8
	MAGE-3	0,50	0
B-CLL3	M1	9,30	65,8
	MAGE-3	0,05	0
B-CLL12	M1	0,60	23,5
	MAGE-3	0	0
B-CLL14	M1	3,60	34,6
	MAGE-3	0	0
B-CLL16	M1	26,4	30,4
	MAGE-3	1,10	0

(B)

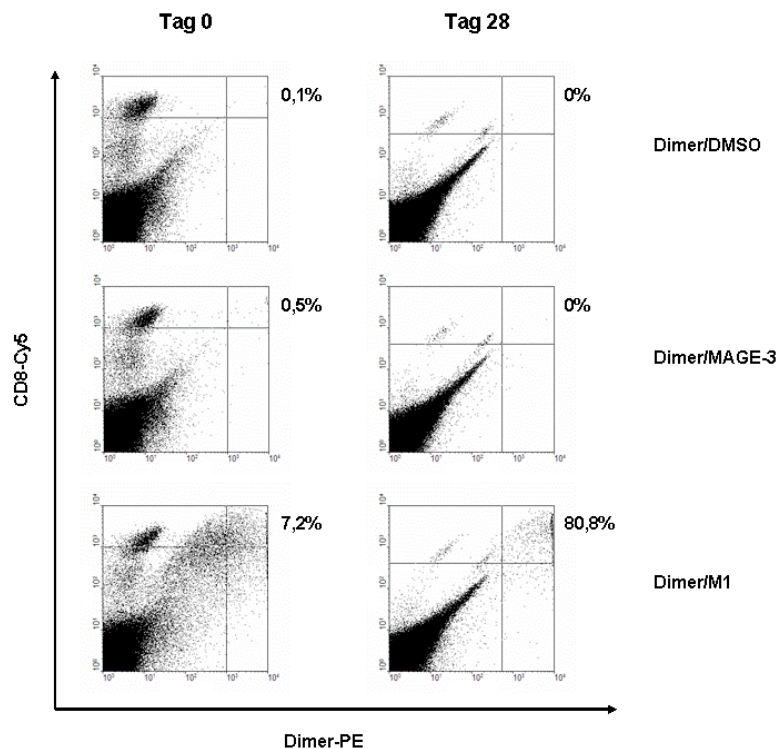


Abbildung 13. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen der hTERT-erkennenden CD8⁺ T-Zellen von B-CLL Patienten vor und nach 28 Tagen *in vitro* Kultur. (A) T-Zellen der B-CLL Patienten B-CLL2, 3, 12, 14 und 16 wurden mit Hilfe autologer unbelasteter CD40L-aktivierter B-CLL Zellen expandiert. Angegeben ist die Zahl der reaktiven CD8⁺ T-Zellen (%), die mit HLA-A2-Dimeren spezifisch für hTERT (Peptidmix M1) oder MAGE-3 an Tag 0 und nach 4 Wochen Kultur (Tag 28) gefärbt wurden. (B) Die Dimer Färbungen der T-Zellen des Patienten B-CLL2 vor (Tag 0) und nach Stimulation mit autologen CD40L-B-CLLs (Tag 28) sind dargestellt. Die ersten beiden Histogramme repräsentieren die Kontrollen (Dimer beladen mit DMSO und dem Kontrollpeptid MAGE-3). Das letzte Histogramm zeigt die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen, die mit den hTERT-Peptiden (M1)/Dimeren reagierten (Quadrant rechts oben).

CD8⁺ T-Zellen aller fünf untersuchten Patienten (B-CLL2, 3, 12, 14, 16), die an Tag 28 mit MAGE-3 tragenden HLA-A2 dimeren Komplexen gefärbt wurden, zeigten keine Reaktivität (alle 0%), wohingegen bei 5/5 Patienten T-Zellen die hTERT-Peptide als Mix M1 mit 23,5% bis 80,8% (Median: 34,6%) signifikant höher erkannten (**Abbildung 13A**, Tag 28; Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). Im Vergleich dazu reagierten die Patienten T-Zellen mit dem Peptidmix M1 an Tag 0 im Median mit 7,2% (Bereich: 0,6 and 26,4%; **Abbildung 13A**, Tag 0) und mit dem B-CLL unverwandten MAGE-3-Peptid mit 0 bis 1,1% (Median: 0,05%; Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). Damit nahm die relative Anzahl der hTERT-spezifischen T-Zellen in Anwesenheit von CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als APCs von Tag 0 bis Tag 28 deutlich zu (Median: 9,6-fach, Bereich: 1,2- bis 39,2-fach; Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). In **Abbildung 13B** sind die Histogramme der Dimerfärbungen des Patienten B-CLL2 an Tag 0 und Tag 28 gezeigt.

Des Weiteren konnte in den beiden Patienten, die sowohl mit naiven, als auch CD40L-stimulierten B-CLL Zellen expandiert werden konnten (B-CLL14 und 16), eine Zunahme der hTERT-spezifischen T-Zellen durch die CD40L-Stimulation festgestellt werden: B-CLL14 von 3,6% (Tag 0) auf 10,8% (Tag 28, naiv) auf 34,6% (Tag 28, CD40L) und B-CLL16 von 26,4% (Tag 0) auf 25,5% (Tag 28, naiv) auf 30,4% (Tag 28, CD40L).

4.3 CD229

4.3.1 Überexpression von CD229 (humanes Ly9) in B-CLL Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte eine CD229-Expression (**Tabelle 8**) sowohl in allen 18 getesteten naiven (Median: 63,2%) und hCD40L-aktivierten HLA-A0201⁺ B-CLL Proben (Median: 29,1%) detektiert werden, als auch in der prolymphozytischen Leukämiezelllinie Mec-1 und in den Burkitt-Lymphom Zelllinien Raji und Ramos. Normale B-Lymphozyten (PBMCs von vier gesunden Spendern (Mittelwert: 5,36% ± 3,23%) und tonsilläre B-Zellen (Mittelwert: 27,9% ± 11,8%)), exprimierten geringe Mengen an CD229 Protein. Im Vergleich zu den negativen Kontrollzellen, d.h. PBMCs und Tonsillen, war CD229 in allen naiven B-CLL Proben überexprimiert (Wilcoxon Test: PBMCs und Tonsillen: $Z = -3,724$; $p < 0,001$), gleiches galt für Mec-1 und Raji Zellen (Wilcoxon Test: Mec-1, Raji: $Z = -3,724$; $p < 0,001$). Zwischen naiven B-CLL- und Ramos Zellen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p < 0,584$).

In CD40L-aktivierten Proben konnte eine höhere CD229-Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs, tonsillären B-Zellen und Mec-1 Zellen (PBMCs und Mec-1: $p < 0,001$, Tonsillen: $p < 0,022$) festgestellt werden, jedoch eine niedrigere als in Raji und Ramos Zellen (beide: $p < 0,001$). Die naiven B-CLL Zellen wurden an verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um eine stabile CD229-Expression im Verlauf der Krankheit zu zeigen. (**Abbildung 14**). Ferner wurde die CD229/19-Expression in weiteren Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs (HeLa, HT29, RCC-26, RCC-53, Jurkat, K562, **Tabelle 8**) untersucht. Alle diese Zelllinien zeigten keine CD229-Expression.

Zusätzlich wurde die MFI („mean fluorescence intensity“) der untersuchten Proben angegeben. Die Dichte der CD229-Moleküle war vergleichbar auf naiven B-CLL Zellen (Median: 2,9; Bereich: 1,9-4,6), den CD40-aktivierten B-Zellen (Median: 2,8 Bereich: 1,8-7,2) und der Positivkontrollen (Median: 4,1). Gesunde Kontrollzellen (PBMCs und tonsilläre B-Zellen) hatten eine mittlere Fluoreszenzintensität von 3,5. Im Gegensatz dazu konnten geringere MFI-Werte der B-Zell-unverwandten Zelllinien detektiert werden (Median: 1,4).

Probe	Naive B-CLL Zellen		hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen		Probe	% CD229/CD19 Expression	MFI [Median]
	% CD229/CD19 Expression	MFI [Median]	% CD229/CD19 Expression	MFI [Median]			
B-CLL1	59,6	4,3	22,3	3,2	PBMCs	6,52	3,7
B-CLL2	49,7	3,5	16,3	3,5	Tonsillen	27,9	3,2
B-CLL3	54,1	2,7	47,6	2,4	Mec-1	14,6	1,1
B-CLL4	55,1	3,5	30,2	3,1	Raji	50,3	4,3
B-CLL5	40,0	2,1	22,3	2,2	Ramos	71,8	4,1
B-CLL6	41,8	3,4	24,9	3,4	K562	0,46	1,4
B-CLL7	83,8	3,1	26,6	7,2	RCC-26	0,48	1,4
B-CLL8	83,5	4,1	23,5	2,1	RCC-53	0,57	1,1
B-CLL9	52,6	2,3	28,0	7,0	HeLa	0,70	1,3
B-CLL10	79,9	2,7	69,9	4,0	Jurkat	0,51	1,8
B-CLL11	59,4	2,3	20,2	2,4	HT29	0,16	1,4
B-CLL12	61,5	3,1	22,0	6,6			
B-CLL13	82,0	2,2	32,5	2,4			
B-CLL14	77,9	3,1	40,8	2,2			
B-CLL15	88,8	4,6	32,0	3,2			
B-CLL16	77,1	2,3	31,9	2,1			
B-CLL17	76,1	1,9	50,2	2,0			
B-CLL18	64,9	2,1	49,1	1,8			

Tabelle 8. FACS-Analysen zur Detektion des CD229-Proteins. Gezeigt sind die Mittelwerte in % der CD229/CD19-Expression auf naiven und hCD40L-stimulierten HLA-A0201⁺ B-CLL Proben (n = 18), PBMCs von gesunden Spendern (n = 4), tonsillären B-Zellen (n = 3), Mec-1 (n = 2), Raji (n = 2) und Ramos Zellen (n = 2), die im FACS untersucht wurden. Zusätzlich wurde die CD229-Expression auf nicht B-Zelllinien getestet: HeLa (Zervixkarzinom), HT29 (Kolonkarzinom), RCC-26 and RCC-53 (Nierenkarzinom), Jurkat (ALL) und K562 (CML). Des Weiteren sind die zugehörigen MFI-Werte angegeben.

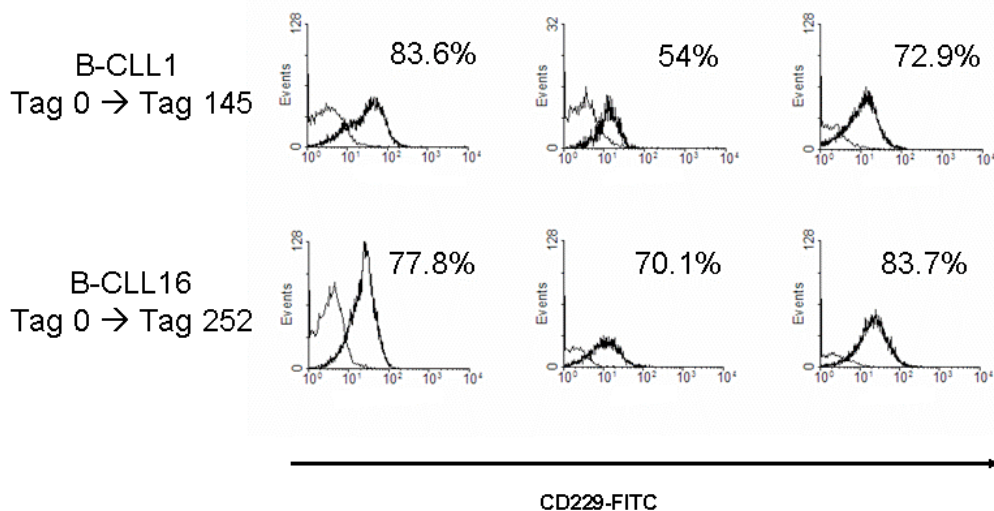


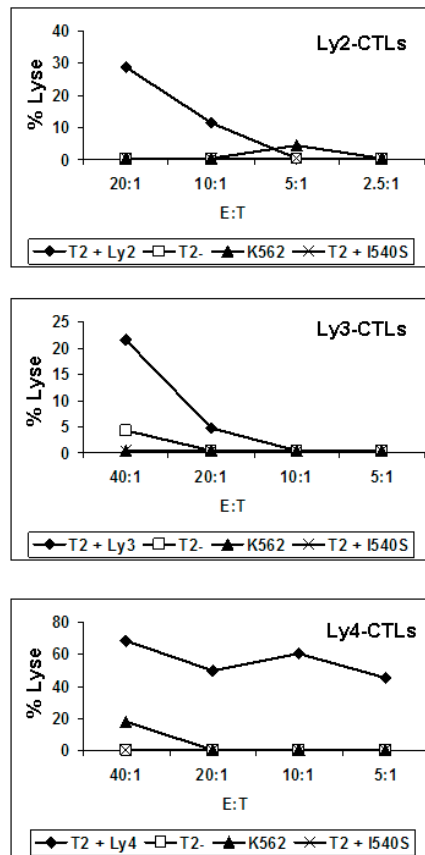
Abbildung 14. CD229-Expressionsanalysen auf B-CLL Zellen (FACS). Zur Demonstration einer stabilen CD229-Expression während des Krankheitsverlaufs wurden die B-CLL Zellen an verschiedenen Zeitpunkten gefärbt. Hier gezeigt sind zwei repräsentative Patienten, B-CLL1 (vorbehandelt) und B-CLL16 (unbehandelt), vom ersten Tag der Untersuchungen (Tag 0) und zwei weiteren aufeinander folgenden Zeitpunkten (B-CLL1: Tag 90, Tag 145; B-CLL16: Tag 100, Tag 252).

4.3.2 Generierung CD229-spezifischer CTL-Antworten mit Peptid-beladenen DCs als APCs *in vitro*

Die Erkennung von CD229-abgeleiteten Peptiden durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen wurde im Folgenden *in vitro* untersucht. Hierfür wurden Antigen-spezifische CTLs mit autologen DCs, die von adhärennten Monozyten HLA-A0201⁺ gesunder Spender stammten, induziert. Die DCs dienten als APCs und wurden mit den identifizierten HLA-A0201-bindenden CD229-Peptiden Ly2, Ly3 und Ly4 gepulst. Die Zytotoxizität der stimulierten CTLs wurde in [⁵¹Cr]-release assays nach 4-6 Wochen getestet. Die nach mehreren Restimulationen erhaltenen T-Zellen zeigten eine spezifische Lyse gegen T2-Zellen, die mit synthetischen Ly9-Peptiden *in vitro* beladen waren (**Abbildung 15A**). Die CTLs erkannten nur T2-Zellen, die mit CD229-Peptiden beladen waren, jedoch lysierten sie keine Zielzellen, die mit dem Kontrollpeptid I540S gepulst waren (0% Lyse in allen Fällen). T2-Zellen ohne Peptid und die NK-Zielzelllinie K562 wurden ebenfalls nicht erkannt. T-Zellen zeigten die höchste lytische Aktivität gegen die CD229-Peptide Ly2 (28,8% Lyse bei E:T = 20:1) und Ly4 (68,8% Lyse bei E:T = 40:1). Für Ly3 wurde eine Lyse von 21,5% (E:T = 40:1) detektiert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die CD229-spezifischen CTLs in der Lage sind, naive, primäre unmodifizierte HLA-A0201⁺/CD229⁺ B-CLL Zellen zu lysieren (n = 4; B-CLL11 und B-CLL16 - 18; E:T = 20:1 - 5:1, **Abbildung 15B**). Eine spezifische Lyse wurde für Ly2-spezifische T-Zellen in 17,9% ± 11,7% der Zielzellen, in 14,7% ± 6,9% für Ly3-spezifische CTLs und 15% ± 5,2% für Ly4-spezifischen Effektorzellen gefunden werden (E:T Verhältnisse 20:1). Die Reaktionen zeigten abnehmende Lyse in den geringeren E:T Verhältnissen 10:1 bzw. 5:1 (Ly2: 6,7% ± 10,8% und 3,4% ± 6,9%; Ly3: 4,1% ± 5,0% und 0,4% ± 0,8%; Ly4: 4,5% ± 5,2% und 0,7% ± 1,4%). Tonsilläre B-Zellen (n = 2) wurden nicht erkannt (0% Lyse für alle E:T Verhältnisse).

(A)



(B)

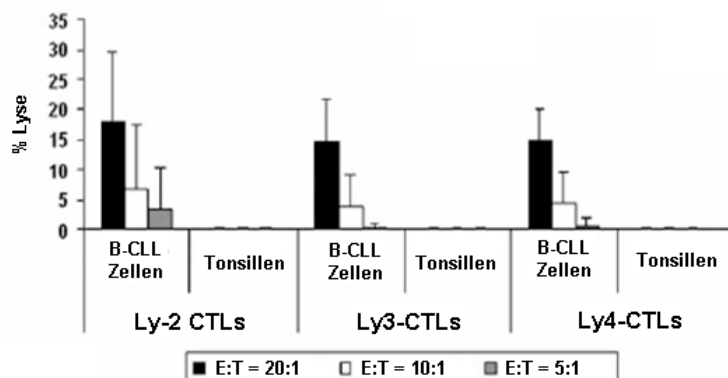


Abbildung 15. Generierung CD229-spezifischer CTL-Antworten *in vitro* mittels Peptid-beladener DCs als APCs. (A) Aus autologen Monozyten generierte DCs wurden mit den synthetischen Peptiden des CD229-Proteins gepulst und als APCs für die Induzierung einer CTLs Antwort *in vitro* genutzt. Die zytotoxische Aktivität der induzierten CTLs wurde in Standard [⁵¹Cr]-release assays geprüft. Die T-Zellen erkannten nur T2-Zellen, die mit den entsprechenden Ly9-Peptiden beladen waren (♦), wo hingegen sie Zielzellen mit I540S-Kontrollpeptid (x), T2-Zellen ohne Peptid (□) und die NK-Zielzelllinie K562 (▲) nicht lysierten. E:T bedeutet Effektor zu Target (Zielzelle) Verhältnis. **(B)** Diese T-Zellen waren ebenfalls in der Lage, primäre HLA-A0201⁺/CD229⁺ B-CLL Zellen (n = 4; B-CLL11, 16 bis 18), nicht aber HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen zu lysieren (E:T: 20:1 - 5:1).

4.3.2.1 CD229-spezifische CTLs erkennen Tumorzelllinien verschiedenen B-Zell-ursprungs

In anschließenden Experimenten wurde die Fähigkeit der *in vitro* induzierten CD229-spezifischen CTLs untersucht, Tumorzellen, wie B-Zell-abgeleitete Lymphom- und Leukämiezelllinien, in [⁵¹Cr]-release Assays zu lysieren. Die MHC-I-Restriktion der *in vitro* generierten CTLs wurde mit dem MHC-I-spezifischen W6/32-Antikörper nachgewiesen. Die Tumorzelllinien Raji^{HLA-A2-, CD229+}, Ramos^{HLA-A2+, CD229+}, Mec-1^{HLA-A2, CD229+}, RCC-26^{HLA-A2+, CD229-} und RCC-53^{HLA-A2+, CD229-} wurden als Kontrollen auf die endogene Antigenexpression untersucht. Die für Ly2- und Ly3-spezifischen *in vitro* induzierten CTLs lysierten HLA-A0201⁺ und CD229⁺ Ramos Zellen (Ly2: 2,4 - 19,8%, Lyse; Ly3: 10,3 - 13,7% Lyse; E:T = 20:1 - 40:1) und die CTLs konnten durch W6/32 inhibiert werden, was eine MHC-I-Restriktion indiziert (Ly2 und Ly3 0% Lyse, für beide E:T Verhältnisse). HLA-A0201⁺, aber CD229 negative RCC53 Zellen, wurden nicht durch CD229-spezifische CTLs erkannt (Ly2 und Ly3 0% Lyse, für beide E:T Verhältnisse). Auch Raji und Mec-1 Zellen, die HLA-A0201 negativ sind und positiv für das Antigen, wurden nur unspezifisch von den CD229-spezifischen CTLs lysiert (Ly2: Raji: 0 - 1,6% Lyse, Mec-1: 4,4 - 6,4% Lyse; Ly3: Raji: 0% Lyse, Mec-1: 0 - 9,6% Lyse; E:T = 20:1 - 40:1; **Abbildung 16**).

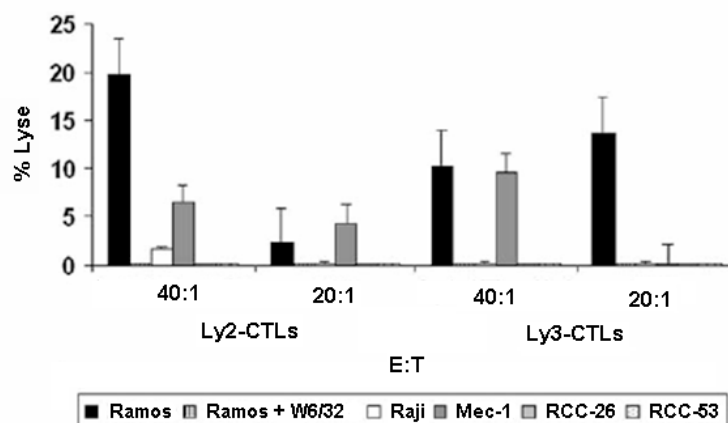


Abbildung 16: CD229-spezifische CTLs erkennen Tumorzelllinien mit B-zellulärer Herkunft. Die *in vitro* induzierten, gesunden Ly2- und Ly3-spezifischen CTLs wurden auf ihre Lysefähigkeit in [⁵¹Cr]-release Assays in Bezug auf Tumorzelllinien getestet (B-Zell-abstammende Lymphom- und Leukämiezelllinien; E:T = 40:1 und 20:1). Ly2- und Ly3-CTLs lysierten spezifisch HLA-A0201⁺ und CD229⁺ Ramos Zellen, was durch die Inhibierung der Reaktionen mit W6/32 gezeigt werden konnte. Andere Zielzellen (Raji, Mec-1, RCC-26 und RCC-53) wurden nicht oder nur unspezifisch erkannt.

4.3.2.2 Antigen-spezifische CTLs gesunder Spender erkennen naive B-CLL Zellen

Die Tatsache, dass das CD229 Protein in B-CLL Zellen überexprimiert wird, legt die Frage nahe, ob die Überexpression auch in einer erhöhten Präsentation der CD229-Peptide auf der Oberfläche von B-CLL Zellen resultiert und ob die generierten MHC-I-restringierten CTLs der gesunden Spender primäre, humane, maligne B-CLL Zellen (HLA-A0201⁺) erkennen können. Daher wurden die Antigen-spezifischen CTLs (siehe Abschnitt 4.3.2) mit naiven B-CLL Zellen in IFN- γ -ELISPOT Assays inkubiert (**Abbildung 17**). Die MHC-I-Restriktion wurde wiederum mit dem W6/32 Antikörper verifiziert. Fünf B-CLL Patienten mit hoher CD229-Expression (B-CLL11, 14, 16 - 18; siehe **Tabelle 8**) wurden ausgewählt, um die Reaktivität der CD229-spezifischen CTLs zu untersuchen. Als Kontrolle dienten HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen (n = 2) und HLA-A0201⁻/CD229⁺ B-CLL Patienten (n = 2). Ly2-spezifische CTLs, die von gesunden Spendern generiert wurden, erkannten 4/5 getestete B-CLL Proben (B-CLL14 und B-CLL16 - 18) mit 119 bis 1429/100.000 (Median: 786/100.000) spezifischen Punkten im IFN- γ -ELISPOT Assay. Die T-Zellen waren MHC-I-restringiert, was die Blockierung der Reaktionen mit dem W6/32 Antikörper zeigte. Die Kontrollen, d.h. gesunde HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen und HLA-A0201⁻/CD229⁺ B-CLL Patienten wurden nicht erkannt (0/100.000 T-Zellen). CTLs spezifisch für Ly3 waren nicht in der Lage, mit einer B-CLL Probe zu reagieren (0/100.000 T-Zellen; Daten nicht gezeigt). Im Falle der Ly4-spezifischen CTLs wurde eine IFN- γ -Sekretion bei allen fünf B-CLL Proben induziert und konnte durch W6/32 blockiert werden (72 bis 725/100.000 CD229-spezifische T-Zellen, Median: 420/100.000; Wilcoxon Test: Z = -2,032; p < 0,042). HLA-A0201-negative B-CLL Zellen wurden nicht von den Ly4-spezifischen CTLs erkannt, tonsilläre B-Zellen nur im Bereich der Hintergrundwerte (45/100.000 T-Zellen).

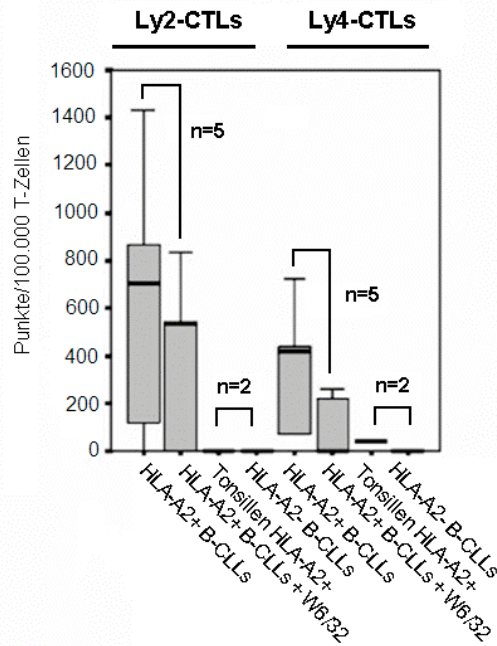


Abbildung 17. CD229-spezifische CTLs von gesunden Spendern erkennen effizient naive HLA-A0201⁺ B-CLL Zellen. T-Zellen von gesunden Spendern wurden mit Hilfe von DCs als APCs, die mit CD229-Peptiden (Ly2, Ly4) gepulst waren, expandiert. Die Ly2- und Ly4-spezifischen CTLs der gesunden Spender sind auf der x-Achse aufgelistet. IFN- γ -ELISPOT Assays, in denen die CD229-spezifischen CTLs untersucht wurden, wurden an Tag 21 in Anwesenheit verschiedener Zielzellen durchgeführt: 5 HLA-A0201⁺/CD229⁺ B-CLL Proben (B-CLL11, 14, 16 - 18) und die Kontrollzellen gesunde, tonsilläre B-Zellen HLA-A0201⁺ Spender (n = 2) und 2 HLA-A0201⁻ B-CLL Patienten. Zur Darstellung der Immunogenität der zwei CD229-entstammenden Peptide und die MHC-I-Restriktion der T-Zellen (W6/32) wurde die Anzahl der detektierten Punkte zusammengefasst. Die y-Achse repräsentiert die gezählten Punkte/100.000 T-Zellen. Diese zeigen IFN- γ -sezernierende T-Zellen an.

4.3.3 Expansion autologer T-Zellen von B-CLL Patienten

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob nicht nur CD229-spezifische T-Zellen von gesunden Spendern, sondern auch autologe T-Zellen von B-CLL Patienten die malignen B-Zellen über CD229-Peptide in einer MHC-I-restringierten Weise erkennen können. Als APCs wurden sowohl autologe, naive, unmodifizierte B-CLL Zellen, als auch hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen untersucht und die T-Zellen wurden für 28 Tage in Anwesenheit der APCs *in vitro* expandiert. Die T-Zellen wurden dann in IFN- γ -ELISPOT Assays getestet. 11 der 18 HLA-A0201⁺ B-CLL Patienten (B-CLL2, 3, 6, 7, 11, 12, 14 bis 18) wurden in diese Studien eingeschlossen. Die autologen naiven und hCD40L-aktivierten B-CLL Zellen wurden mit den verschiedenen HLA-A0201-bindenden CD229-Peptiden Ly2, Ly3 und Ly4 gepulst. APCs, die mit MAGE-3-Peptid oder DMSO beladen wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Blockierungsexperimente wurden mit dem MHC-I-spezifischen W6/32 Antikörper getestet, um die Antigen-spezifität zu zeigen.

Des Weiteren wurden die IFN- γ -ELISPOT Analysen der expandierten T-Zellen nach 28 Tagen in Kultur mit HLA-A2-Dimer/Peptid-Komplex Färbungen bestätigt. Auch hier dienten MAGE-3 und DMSO als Kontrollen.

Die Vorläuferfrequenz CD229-spezifischer CTLs wurde in IFN- γ -ELISPOT Assays mit autologen B-CLL Zellen als APCs an Tag 0 festgestellt. Hier wurde keine spezifische Reaktivität gefunden werden.

4.3.3.1 Naive B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen

4.3.3.1.1 Naive B-CLL Zellen können spezifisch autologe T-Zellen expandieren

Die T-Zellen von 5/11 Patienten (B-CLL11, 14, 16 bis 18), die mit naiven B-CLL Zellen stimuliert wurden, konnten innerhalb von 4 Wochen *in vitro* Kultur expandiert werden (**Abbildung 18**). Die Zahl der T-Zellen nahm zunächst bis Tag 14 ab, jedoch proliferierten die überlebenden T-Zellen, was in einer 3,7- (B-CLL16) bis 7,5-fachen (B-CLL17) Zunahme der CD3⁺/CD8⁺ positive T-Zellen (%) nach 4 Wochen resultierte.

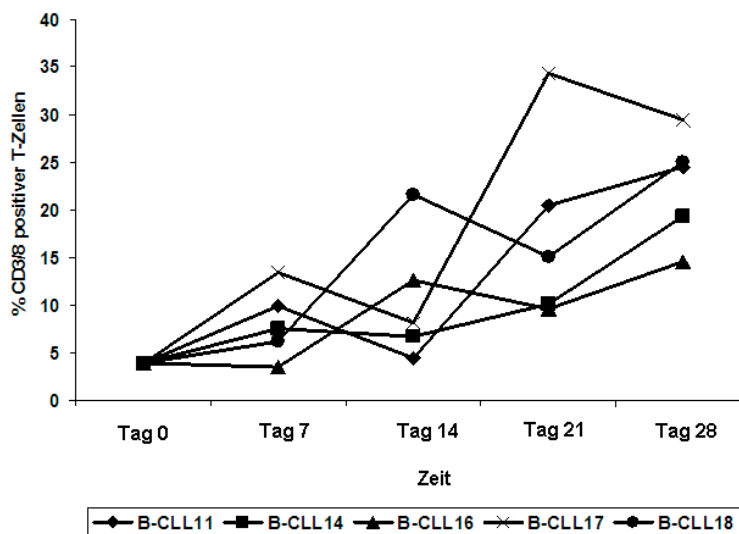


Abbildung 18: Zunahme der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellpopulation nach 4 Wochen *in vitro* Kultur. Der Anteil CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen konnte in Anwesenheit von naiven B-CLL Zellen (5/11 Patienten: B-CLL11, 14, 16 bis 18) innerhalb 28 Tage vermehrt werden.

Nach 14 bis 21 Tagen *in vitro* Kultur wurden IFN- γ -ELISPOT Assays durchgeführt, um CD229-reaktive T-Zellen zu detektieren. Dazu wurden T2-Zellen als APCs verwendet, die mit den HLAA0201-bindenden CD229-Peptiden Ly2, Ly3 und Ly4 oder dem Mix aus diesen drei Peptiden, genannt M2, gepulst. Als Negativkontrolle wurden T2-Zellen mit dem HLA-A0201-bindenden, B-CLL unverwandten Peptid MAGE-3 beladen und der W6/32 Antikörper diente zur Überprüfung der Antigen-spezifität.

Patient	Peptid	T2 +Peptid	T2 + Peptid + W6/32
B-CLL11	Ly2	82	63
	Ly3	38	0
	MAGE-3	15	n.d.
B-CLL14	M2	4116	1260
	MAGE-3	0	n.d.
B-CLL16	Ly2	368	0
	Ly3	740	0
	Ly4	544	0
	MAGE-3	0	n.d.
B-CLL17	Ly2	61	0
	Ly3	207	15
	Ly4	168	0
	MAGE-3	0	n.d.
B-CLL18	Ly2	590	0
	Ly3	363	0
	Ly4	259	0
	M2	3160	2760
	MAGE-3	0	n.d.

Tabelle 9. Spezifische Erkennung von CD229-Peptid-beladenen T2-Zellen durch expandierte T-Zellen von B-CLL Patienten. T-Zellen von fünf B-CLL Patienten wurden mit Hilfe autologer, naiver, ungeladener B-CLL Zellen als APCs expandiert. Die IFN- γ -ELISPOT Assays wurden an Tag 14 oder 21 in Anwesenheit von T2-Zellen, die mit den Ly9-abstammenden, HLA-A0201-bindenden Peptiden (Ly2, Ly3 und Ly4) oder dem Peptidmix (M2) oder dem B-CLL-unverwandten Kontrollpeptid MAGE-3 beladen waren, durchgeführt. Die MHC-I-Restriktion der T-Zellen wurde durch Zugabe des Anti-MHC-I-Antikörpers W6/32 getestet. Koinkubation der T2- bzw. T-Zellen der Patienten mit DMSO dienten als Negativkontrollen und deren gezählten Punkte wurden von den experimentellen Werten abgezogen (0-10/100.000 T-Zellen). In der Tabelle ist die Zahl der CD229-spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen gezeigt. n.d. = nicht detektiert.

In Anwesenheit der T2-Zellen als APCs konnten 38 bis 4116/100.000 (Median: 363/100.000) CD3⁺ CD229-spezifische T-Zellen nach 2-3 Wochen *in vitro* Kultur mit Hilfe des IFN- γ -ELISPOT Assays gefunden werden. In allen getesteten Patienten (5/5) wurde eine MHC-I-Restriktion (W6/32) gezeigt (Wilcoxon Test: $Z = -3,180$; $p < 0,001$). Die Anzahl der unspezifischen Punkte, die durch Zugabe des MAGE-3-Peptids detektiert wurde, war gering (Median: 0; Bereich: 0 - 15 Punkte/ 100.000 T-Zellen). Dieses Experiment zeigt, dass T-Zellen von verschiedenen B-CLL Patienten alle drei CD229-entstammenden Peptide in einer MHC-I-restringierten Weise erkennen (**Tabelle 9**). Daraufhin wurden die expandierten T-Zellen auf ihre Reaktivität gegen Tumorzellen getestet, die das CD229-Antigen überexprimierten. Hierfür wurden autologe, naive, CD229-exprimierende B-CLL Zellen als APCs in IFN- γ -ELISPOT Assays untersucht, die mit den verschiedenen Ly9-Peptiden geladung wurden. Es konnten 66 bis 1500 Punkte (Median: 156/100.000 T-Zellen) gefunden werden, die CD229-spezifisch

waren, was durch die MHC-I-Blockierung gezeigt werden konnte (Wilcoxon Test: $Z = -3,296$; $p < 0,001$). Mit zwei Ausnahmen (B-CLL11 und 17) war die Anzahl der CD229-spezifischen Punkte niedriger, als die, die in Anwesenheit der T2-Zellen detektiert wurden (Wilcoxon Test: $Z = -2,666$; $p < 0,008$). HLA-A0201⁻, aber CD229-überexprimierende B-CLL Zellen ($n = 2$) und HLA-A0201⁺ gesunde, tonsilläre B-Zellen ($n = 2$) wurden von den Patienten T-Zellen nur auf Hintergrundniveau erkannt (**Tabelle 10**).

Patient	Peptid	Naive B-CLL Zellen gepulst mit Ly2-Ly4	Naive B-CLL Zellen gepulst mit Ly2-Ly4 + W6/32	HLA-A0201 ⁻ CD229 ⁺ B-CLL Zellen	HLA-A0201 ⁺ gesunde tonsilläre B-Zellen
B-CLL11	Ly2	125	62	0	0
	Ly3	125	0		
	Ly4	130	11		
B-CLL14	Ly2	233	0	0	n.d.
	Ly3	167	0		
	Ly4	100	0		
B-CLL16	Ly2	238	0	8	33
	Ly3	161	145		
	Ly4	296	0		
B-CLL17	Ly2	1000	500	0	61
	Ly3	1500	0		
B-CLL18	Ly2	151	0	0	19
	Ly3	77	0		
	Ly4	66	0		

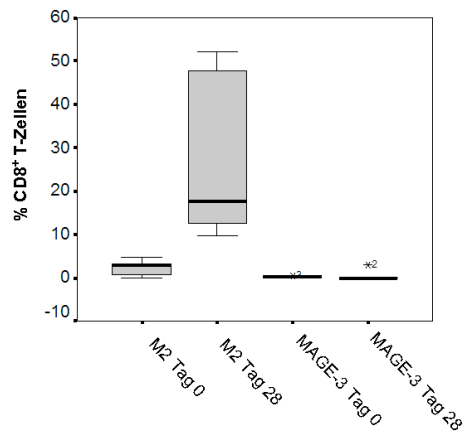
Tabelle 10. Spezifische Erkennung von HLA-A0201-restringierten CD229-Peptiden durch expandierte autologe T-Zellen präsentiert auf B-CLL Zellen. T-Zellen von Patienten wurden mit autologen, naiven B-CLL Zellen als APCs expandiert. IFN- γ -ELISPOT Assays wurden an Tag 21 mit autologen, naiven B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen durchgeführt. Die HLA-A0201-bindenden CD229-Peptide wurden dem Assay zugesetzt, um die Anzahl der CD229-spezifischen Punkte zu identifizieren. Als Negativkontrollen wurden naive B-CLL Zellen bzw. autologe T-Zellen mit DMSO inkubiert und die erhaltenen Punkte von den experimentellen Werten abgezogen (0 - 5/100.000 T-Zellen). Angegeben ist die Anzahl der CD229-spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen. HLA-A0201⁻, CD229-überexprimierende B-CLL Zellen ($n = 2$) und nicht-maligne Zellen von HLA-A0201⁺ gesunden Spendern (tonsilläre B-Zellen, $n = 2$) wurden nicht spezifisch erkannt. n.d. = nicht detektiert.

4.3.3.1.2 CD229-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen

Zur zusätzlichen Bestätigung der gewonnenen IFN- γ -ELISPOT Daten wurden die expandierten T-Zellen mit HLA-A2-Dimer/Peptid Komplexen gefärbt. Die CD229 und MAGE-3 spezifischen HLA-A2-Komplexe wurden an Tag 28 durchgeführt. Die Färbung der Zellen mit HLA-A2-Dimerkomplexen, die mit DMSO „beladen“ waren, wurden als Hintergrundswerte gemessen und von den experimentellen Werten subtrahiert. Die Werte der mit MAGE-3 beladenen HLA-A2-Dimerkomplexe waren gering (Median: 0,5%, Bereich: 0 - 2,9%). Im Gegensatz dazu wurden die CD229-Peptide (M2) mit bis zu 52.2% (Median: 17,6%) aller an Tag 28 lebenden CD8⁺ T-Zellen erkannt (**Abbildung 19A**, Tag 28). In **Abbildung 19B** ist die Dimerfärbung der mit einem repräsentativen B-CLL Patienten (B-CLL18) stimulierten T-Zellen inklusive der Kontrollen gezeigt (Isotyp, Dimer beladen mit DMSO und dem Kontrollpeptid MAGE-3).

Auch wurde die Vorläuferfrequenz der CD229-erkennenden B-CLL T-Zellen bestimmt. Zwischen 0 und 4,8% (Median: 2,9%) der CD8⁺ T-Zellen waren an Tag 0 in der Lage, CD229-Peptide auf den HLA-A2-Dimerkomplexen zu erkennen (**Abbildung 19A**). Die Werte in Anwesenheit von MAGE-3 waren vergleichbar mit denen an Tag 28 (0 - 0,5%, Median: 0,05%). Insgesamt erhöhte sich innerhalb 28 Tage *in vitro* Kultur die relative Anzahl der CD229-spezifischen T-Zellen im Durchschnitt 12-fach (4,1- bis 87-fach) durch die Stimulation der T-Zellen mit autologen, naiven B-CLL Zellen (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$).

(A)



(B)

Patient	Peptid	% spezifische T-Zellen Tag 0	% spezifische T-Zellen Tag 28
B-CLL11	M2	4,8	47,7
	MAGE-3	0,05	0
B-CLL14	M2	0	9,9
	MAGE-3	0	2,9
B-CLL16	M2	2,9	17,6
	MAGE-3	0,5	0,01
B-CLL17	M2	0,6	52,2
	MAGE-3	0	0
B-CLL18	M2	3,1	12,6
	MAGE-3	0,1	0

(C)

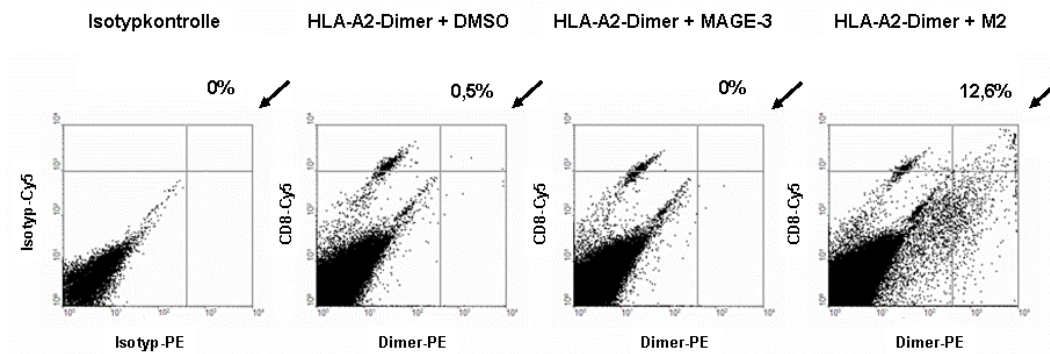


Abbildung 19. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der CD8⁺ T-Zellen von B-CLL Patienten vor (Tag 0) und nach 4 Wochen (Tag 28) *in vitro* Kultur. Gezeigt sind fünf B-CLL Proben, die an Tag 0 und nach 4 Wochen Kulturzeit untersucht wurden (B-CLL11, 14, 16 - 18; Box-plot). Die HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der CD8⁺ T-Zellen wurde mit dem Peptidmix M2 durchgeführt. Die HLA-A2-Komplexe wurden ebenfalls mit dem Lösungsmittel DMSO allein beladen (Hintergrundwerte), die von den experimentellen Daten subtrahiert wurden. Zusätzlich wurden die Raten der MAGE-3-beladenen HLA-A2-Dimer-Komplexe bestimmt (A). Die jeweiligen Einzelwerte sind in (B) aufgelistet. (C) Die Dimer-Färbung der T-Zellen des Patienten B-CLL18 an Tag 28 ist dargestellt. Die ersten drei Histogramme repräsentieren die Kontrollen (Isotyp, Dimer beladen mit DMSO und dem Kontrollpeptid MAGE-3). Das letzte Histogramm zeigt die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen, die mit den CD229-Peptiden (M2)/Dimeren reagierten (Quadrant rechts oben, Pfeil).

4.3.4 CD40L-stimulierte B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen

4.3.4.1 Expansion autologer CD229-spezifischer T-Zellen mit CD40L-stimulierten B-CLL Zellen

In den 6/11 Fällen, bei denen es nicht möglich war, T-Zellen mit naiven B-CLL Zellen als Stimulatorzellen zu expandieren, wurden die B-CLL Zellen als APCs durch CD40L-Stimulation aktiviert, um die Expression der Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle zu verstärken (siehe Abschnitt 3.2.1.7).

Autologe T-Zellen konnten erfolgreich durch CD40L-Stimulation in 4/6 Fällen (B-CLL2, 3, 6 und 12) expandiert werden, die nicht reaktiv waren, als sie mit naiven APCs stimuliert wurden. Bei den zwei anderen B-CLL Proben (B-CLL7 und 15; Binet C, unbehandelt) wurde keine erfolgreiche T-Zell-expansion erzielt, trotz CD40L-stimulierter Tumorzellen. Es war bei diesen Proben nicht möglich, die Expression der Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle durch die CD40L-Stimulation deutlich zu steigern (im Vergleich zu den naiven B-CLL Zellen), was eine Voraussetzung ist, um eine effiziente APC bei der T-Zellstimulation zu fungieren. Dieses Phänomen ist in ca. 10% aller B-CLL Patienten bekannt (Granziero *et al* 2001, Mayr *et al* 2006).

Mit den expandierten T-Zellen der vier anderen Fälle wurden IFN- γ -ELISPOT Assays nach 4 Wochen in Kultur durchgeführt, in denen Peptid-beladene CD40L-B-CLL Zellen als APCs eingesetzt wurden (**Tabelle 11**). Die detektierten Punkte bei Koinkubation der CD40L-B-CLL Zellen bzw. autologen T-Zellen mit DMSO wurden von den experimentellen Werten abgezogen und die MHC-I-Restriktion wurde mit dem W6/32 Antikörper verifiziert. Durch die Stimulation der autologen T-Zellen mit CD40L-B-CLL Zellen konnten CD229-spezifische, MHC-I-restringierte T-Zellen (W6/32) in allen vier Patienten gefunden werden (Wilcoxon Test: $Z = -2,201$; $p < 0,028$) mit Werten von 15 bis 456/100.000 T-Zellen (Median: 51/100.000). Das Ly2-Peptid wurde in 3/4 Patienten mit bis zu 46/100.000 CD229-spezifischen T-Zellen (Median: 20) detektiert, was die höchste Reaktivität andeutet. Das Ly3-Peptid brachte eine T-Zellreaktion in der Hälfte der Fälle hervor (Bereich: 71 - 456/100.000 T-Zellen; Median: 264), die MHC-I-restringiert waren. Das Ly4-Peptid wurde nur in einem Patienten erkannt (55/100.000 Ly4-spezifische T-Zellen). MAGE-3-gepulste CD40-aktivierte B-CLL Zellen, HLA-A0201/CD229⁺ B-CLL Zellen und HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen zeigten keine messbare T-Zellantwort (Wilcoxon test: MAGE: $Z = -2,201$; $p < 0,028$; **Tabelle 11**).

Patient	CD40-aktivierte B-CLL Zellen (CD229 ⁺ , HLA-A0201 ⁺) gepulst mit Ly2-Ly4	CD40-aktivierte B-CLL Zellen (CD229 ⁺ , HLA-A0201 ⁺) gepulst mit Ly2-Ly4 + W6/32	HLA-A0201 ⁻ /CD229 ⁺ B-CLL Zellen	CD40-aktivierte B-CLL Zellen + MAGE-3
B-CLL2	Ly2 15 Ly3 456 Ly4 55	0 0 0	n.d.	0
B-CLL3	Ly2 20	0	0	0
B-CLL6	Ly2 46	30	0	0
B-CLL12	Ly3 71	0	n.d.	0

Tabelle 11. Autologe CD229-spezifische T-Zellexpansion durch Stimulation mit CD40-aktivierten B-CLL Zellen von Patienten. Vier B-CLL Patienten waren nicht in der Lage die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen mit naiven B-CLL Zellen zu vermehren (B-CLL2, 3, 6 und 12). Daher wurden sie in Anwesenheit von CD40-aktivierten, autologen B-CLL Zellen expandiert. In den an Tag 28 durchgeführten IFN- γ -ELISPOT Assays wurden die CD40L-B-CLL Zellen mit den CD229-Peptiden Ly2 bis Ly4 beladen. Die Zahl der Punkte nach Koinkubation der CD40L-stimulierten B-CLL Zellen mit DMSO und den autologen T-Zellen wurden von den experimentellen Werten subtrahiert. Die MHC-I-Restriktion wurde in Blockierungsexperimenten mittels W6/32 durchgeführt. Angegeben ist die Anzahl der spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen. HLA-A0201⁻/CD229⁺ B-CLL Zellen, tonsilläre B-Zellen und MAGE-3 gepulste CD40-aktivierte B-CLLs wurden von den T-Zellen nicht erkannt. n.d. = nicht detektiert.

In den fünf B-CLL Fällen (B-CLL11, 14, 16 - 18), in denen es möglich war mit naiven, unmanipulierten B-CLL Zellen eine CD229 spezifische T-Zellantwort zu generieren, konnten ebenfalls erfolgreich CD229-spezifische T-Zellen mit CD40L-B-CLL Zellen in 4/4 (B-CLL11, 14, 16 und 18) expandiert werden. B-CLL17 wurde nicht untersucht.

Unter Verwendung von Peptid-beladenen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen in den IFN- γ -ELISPOT Assays konnten CD229-spezifische, MHC-I-restringierte Patienten T-Zellen gefunden werden (Wilcoxon Test: $Z = -2,371$; $p < 0,018$), jedoch in sehr geringen Frequenzen (7 bis 72/100.000 T-Zellen; Median: 31). CD40-aktivierte B-CLL Zellen gepulst mit dem Kontrollpeptid MAGE-3, HLA-A0201⁻ und CD229⁺ B-CLL Zellen oder tonsilläre B-Zellen von HLA-A0201⁺ gesunden Spendern wurden nicht, oder nur auf Hintergrundwertniveau von den T-Zellen erkannt (Bereich: 0 - 8/100.000, Median: 0/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test: MAGE-3: $p = 0,001$; HLA-A0201⁻/CD229⁺ B-CLL Zellen: $p = 0,006$; tonsilläre B-Zellen: $p = 0,005$, **Tabelle 12**).

Elf der 18 Patienten wurden bezüglich ihrer T-Zellreaktionen untersucht. Bei den restlichen 7/18 B-CLL Patienten, die durchflußzytometrisch auf ihre CD229-Expression getestet worden waren (siehe **Tabelle 8**) erfolgte keine Untersuchung hinsichtlich der T-Zellexpansion. Gründe hierfür waren, dass zum zweiten Zeitpunkt der Probenengewinnung (für B-CLL Zellen und T-Zellen, nachdem die CD229-Expression während der ersten Probenabnahme gezeigt

worden war) die Patienten entweder unter Chemotherapie waren, sich in Remission befanden, verloren gingen für „follow-up“ Untersuchungen oder starben (B-CLL1, 4, 5, 8 bis 10 und 13).

Patient	CD40-aktivierte B-CLL Zellen (CD229 ⁺ , HLA-A0201 ⁺) gepulst mit Ly2-Ly4	CD40-aktivierte B-CLL Zellen (CD229 ⁺ , HLA-A0201 ⁺) gepulst mit Ly2-Ly4 + W6/32	HLA-A0201 ⁻ /CD229 ⁺ B-CLL Zellen	HLA-A0201 ⁺ tonsilläre B-Zellen	CD40-aktivierte B-CLL Zellen + MAGE-3
B-CLL11	Ly3 10 Ly4 35	5 10	0	0	0
B-CLL14	Ly2 31 Ly4 7	6 0	0	n.d.	0
B-CLL16	Ly2 38	22	n.d.	8	0
B-CLL18	Ly2 18 Ly4 72	0 15	n.d.	5	0

Tabelle 12. Autologe CD229-spezifische T-Zellexpansion mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen von B-CLL Patienten. Vier der fünf B-CLL Patienten (B-CLL11, 14, 16 und 18), in denen es möglich war mit Hilfe naiver B-CLL Zellen eine T-Zellexpansion zu erhalten, wurden ebenfalls in Gegenwart von autologen CD40L-B-CLL Zellen expandiert. In den IFN- γ -ELISPOT Assays, die an Tag 21 durchgeführt wurden, dienten die mit den CD229-Peptiden Ly2 bis Ly4 beladenen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als APCs. Die Anzahl der Punkte, die nach Koinkubation von CD40-aktivierten B-CLL Zellen bzw. autologen T-Zellen mit DMSO erhalten wurden, wurden von den experimentellen Werten subtrahiert. MHC-I-Restriktion wurde durch Blockierungsexperimente mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 durchgeführt. Angegeben ist die Zahl der CD229-spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen. HLA-A0201⁻/CD229⁺ B-CLL Zellen, tonsilläre B-Zellen und CD40L-aktivierte B-CLLs gepulst mit dem MAGE-3-Peptid wurden von den T-Zellen nicht erkannt. n.d. = nicht detektiert.

4.3.4.2 CD229-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung expandierter T-Zellen nach Stimulation mit CD40-aktivierten B-CLL Zellen

Die T-Zellen wurden mit den CD229- und MAGE-3 spezifischen HLA-A2-Dimer/Peptidkomplexen an Tag 0 und Tag 28 gefärbt, um die experimentellen Daten der IFN- γ -ELISPOT Analysen zu validieren. Die Vorläuferfrequenz der CD229-spezifischen T-Zellen in Patientenproben, bei denen T-Zellen nur durch CD40-aktivierte B-CLL Zellen expandiert werden konnten (BCLL2, 3, 6 und 12), lag für die einzelnen Ly9-Peptide Ly2 und Ly3 zwischen 0,71 und 6,1% (Median: 3,59%, **Abbildung 20A**, Tag 0). Die Frequenz der T-Zellen, die auf das B-CLL unverwandte MAGE-3-Peptid reagierten, war nur gering (Bereich: 0,07% bis 3,43%; Median: 0,10%). Der Unterschied war statistisch signifikant (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). An Tag 28 war die Frequenz der T-Zellen, die dimere HLA-A2-Komplexe mit MAGE-3 erkannten war vernachlässigbar (0 - 1%, Median: 1%). Im Gegensatz dazu waren nach 28 Tagen 1,92% bis 85,5% (Median: 16,7%) aller CD8⁺ T-Zellen spezifisch für die

CD229-Peptide (**Abbildung 20A**, Tag 28). Die Zahl der Ly9-spezifischen T-Zellen nach 4 Wochen Stimulation war signifikant höher, als die Frequenz der MAGE-3-spezifischen T-Zellen (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). Zwischen Tag 0 und Tag 28 wurde die Anzahl CD229-spezifischer T-Zellen signifikant vermehrt (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). Nach 4 Wochen *in vitro* Stimulation wurde die relative Menge an CD229-erkennenden T-Zellen durch die Stimulation mit autologen CD40-aktivierten B-CLL Zellen zwischen 2,7-fach und 14,1-fach (Median: 13,1-fach) erhöht. In allen untersuchten Patienten wurde eine Ly9-spezifische T-Zellamplifikation von Tag 0 auf Tag 28 determiniert. In **Abbildung 20B** sind die Dimerfärbungen an Tag 28 des Patienten B-CLL2 gezeigt.

Die mit autologen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen expandierten T-Zellen der Patienten (B-CLL11, 14, 16 bis 18), die mit naiven B-CLL Zellen kultiviert werden konnten, zeigten an Tag 0 eine Reaktivität gegen die CD229-Peptide als M2 im Median von 3,0% (Bereich: 0 bis 4,8%; Tag 0, **Abbildung 21**), wohingegen das Kontrollpeptid MAGE-3 nicht erkannt wurde (Median: 0,08%, Bereich: 0 bis 0,5%). Nach 28 Tagen in Kultur wurden nur die CD229-Peptide in Form des M2-Mixes im Bereich von 26,3-74,1% (Median: 64,9%) durch die CTLs erkannt. HLA-A2-Dimerkomplexe, die mit MAGE-3 beladen waren, wurden nicht detektiert (alle 0%, Tag 28, **Abbildung 21A**). Die Zahl der T-Zellen, die die CD229-Peptide erkannten war signifikant höher als die der MAGE-3 (Wilcoxon Test: $Z = -3,596$; $p < 0,001$). Auch hier nahm der Anteil Ly9-spezifischer CTLs von Tag 0 bis Tag 28 durch die Stimulation mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen signifikant zu ($p < 0,001$; Median: 21,6-fach, Bereich: 15,4- bis 26,3-fach). Die Histogramme der zwei Patienten B-CLL16 und 18 an Tag 28 sind in **Abbildung 21B** graphisch dargestellt.

(A)

Patient	Peptid	% spezifische T-Zellen Tag 0	% spezifische T-Zellen Tag 28
B-CLL2	Ly2	4,10	85,50
	Ly3	0,86	16,70
	MAGE-3	0,10	1,00
B-CLL3	Ly2	3,59	57,9
	MAGE-3	3,43	1,00
B-CLL6	Ly2	6,10	11,30
	MAGE-3	0,14	0
B-CLL12	Ly3	0,71	1,92
	MAGE-3	0,07	0

(B)

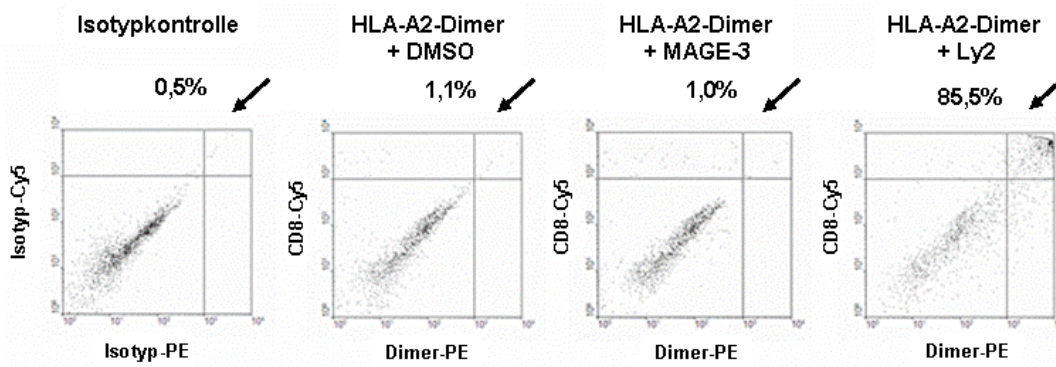


Abbildung 20. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung von Patienten T-Zellen vor und nach 28 Tagen *in vitro* Kultur, die CD229-Peptide erkennen. Autologe T-Zellen von B-CLL Patienten, die nicht durch naive autologe B-CLL Zellen expandiert werden konnten (BCLL2, 3, 6 und 12), wurden mit CD40-aktivierten B-CLLs stimuliert. **(A)** Die angegebenen Zahlen repräsentieren die CD229- (Ly2 und Ly3) und MAGE-3-reaktiven CD8⁺ T-Zellen in der HLA-A2-Dimerfärbung an Tag 0 und 28. **(B)** Die FACS-Analyse der HLA-A2-Dimer/Peptidfärbung des Patienten B-CLL2 an Tag 28 ist hier gezeigt. Neben dem CD229-Peptid Ly2 sind ebenfalls die Isotypkontrolle, das HLA-A2-Dimer (PE) beladen mit DMSO und MAGE-3 gezeigt. Die T-Zellen wurden mit CD8-Cy5 gegengefärbt. Die Pfeile zeigen auf die rechten oberen Quadranten, die die CD8⁺/Dimer⁺ Zellen enthalten.

(A)

Patient	Peptid	% spezifische T-Zellen Tag 0	% spezifische T-Zellen Tag 28
B-CLL11	M2	4,80	74,1
	MAGE-3	0,05	0
B-CLL14	M2	0	26,3
	MAGE-3	0	0
B-CLL16	M2	2,90	59,4
	MAGE-3	0,50	0
B-CLL18	M2	3,10	70,3
	MAGE-3	0,10	0

(B)

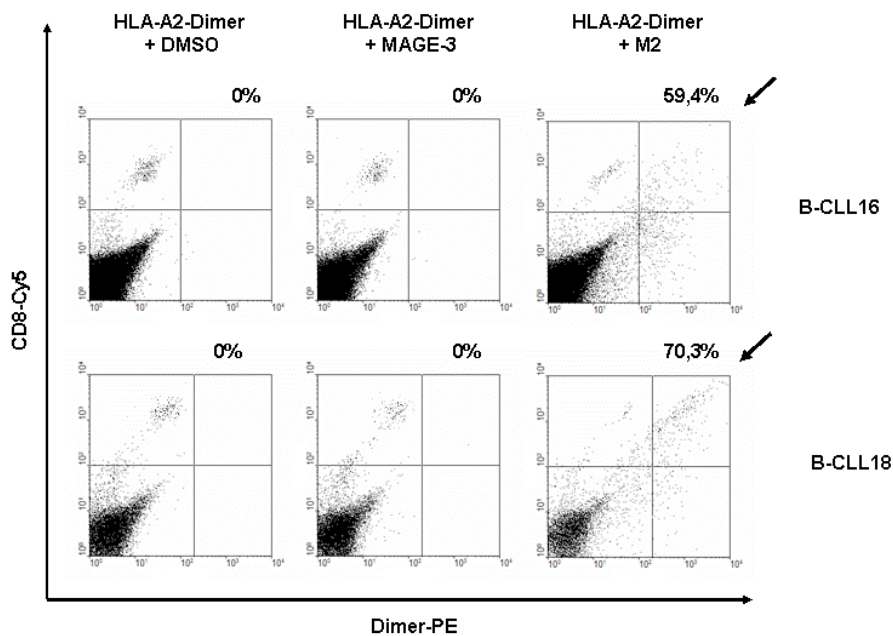


Abbildung 21. CD229/HLA-A2-Dimerfärbungen der Patienten T-Zellen vor und nach 28 Tagen *in vitro* Kultur. Autologe T-Zellen der B-CLL Patienten B-CLL11, 14, 16 und 18 wurden vier Wochen mit CD40L-aktivierten B-CLLs als Stimulatorzellen expandiert und zu Beginn (Tag 0) und nach 28 Tagen mit CD229- und MAGE-3-spezifischen HLA-A2-Dimeren gefärbt. **(A)** Die angegebenen Zahlen stellen die % der CD8⁺ T-Zellen dar, die mit den CD229- (M2) oder MAGE-3-spezifischen HLA-A2-Dimeren an Tag 0 bzw. 28 reagierten. **(B)** Die Histogramme zweier B-CLL Patienten (B-CLL16 und 18) an Tag 28 sind aufgeführt, einschließlich der HLA-A2-Dimere (PE) beladen mit DMSO bzw. MAGE-3 (Kontrollen) und den CD229-Peptiden als M2. Die T-Zellen wurden mit CD8 Cy-5 gegengefärbt. Die Angaben in % zeigen den CD8⁺ T-Zellanteil, der mit dem jeweiligen Dimer reagiert.

4.4 CD23

4.4.1 Überexpression von CD23 auf B-CLL Zellen

Die CD23-Expression wurde durch FACS-Analysen in allen 18 untersuchten HLA-A0201⁺ naiven (Bereich: 7,7 - 58,5%, Median: 20,8%) und CD40L-aktivierten B-CLL Proben (5,1 - 27,2%, Median: 10,4%), den B-Zell-abstammenden Tumorzelllinien Mec-1 (Median: 11%, Bereich: 10,6 - 11,4%), Raji (Median: 58,6%, Bereich: 56 - 61,1%) und Ramos (Median: 81,2%, Bereich: 76,2 - 86,2%) detektiert (**Tabelle 13**). Normale B-Lymphozyten aus gesunden Spendern, wie PBMCs (n = 6, Bereich: 0 - 1,1%, Median: 0,4%) und tonsilläre B-Zellen (n = 4, Bereich: 0,2 - 1,5%, Median: 0,4%), exprimierten kein CD23-Protein. CD23 wurde in allen naiven und CD40-aktivierten B-CLL (>95% CD5⁺/CD19⁺) Zellen überexprimiert (Mann-Whitney U Test: beide: Z = -6,178, p < 0,001), wohingegen sie signifikant niedriger exprimiert waren im Vergleich zu den Positivkontrollzelllinien Raji und Ramos (Mann-Whitney U Test: beide: Z = -3,596, p < 0,001). Zusätzlich wurde die MFI („mean fluorescence intensity“) angegeben. Die mediane MFI aller naiver B-CLL Zellen lag bei 3,05 (Bereich: 1,3 - 4,9), die der CD40L-stimulierten B-CLL Zellen bei 2,3 (1,3 bis 6,7), während die Kontrollen eine niedrigere MFI-Expression zeigten (normale B-Lymphozyten: Median: 1,4, Bereich: 1,3 - 1,5; Mec-1, Raji und Ramos: Median: 2,7, Bereich: 1,9 - 3,1). Die CD23 Expression wurde auch in Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs (K562, RCC-26 und -53, HeLa, HT29) untersucht, in denen jedoch kein bedeutendes Expressionsniveau detektiert wurde (Mediane MFI: 0,6, Bereich: 0,5 - 0,9). In **Abbildung 22** sind die Expressionsprofile zweier repräsentativer Patienten (B-CLL1 und 14) einschließlich der Kontrollzellen gezeigt.

Probe	Naive B-CLL Zellen		hCD40L-aktivierte B-CLL Zellen		Probe		
	% CD23/19 Expression	MFI [Median]	% CD23/19 Expression	MFI [Median]		% CD23/19 Expression	MFI [Median]
B-CLL1	8,50	4,5	9,30	2,4	PBMCs	0,40	1,5
B-CLL2	10,2	3,1	9,40	2,8	Tonsillen	0,40	1,3
B-CLL3	16,8	4,2	18,8	2,7	Mec-1	11,0	2,7
B-CLL4	32,2	3,4	20,9	3,0	Raji	58,6	1,9
B-CLL5	30,8	2,0	14,1	1,3	Ramos	81,2	3,1
B-CLL6	10,6	3,0	5,10	2,6	K562	1,70	0,6
B-CLL7	38,5	4,5	19,4	6,7	RCC-26	0,70	0,9
B-CLL8	20,8	2,8	6,20	2,0	RCC-53	0,30	0,5
B-CLL9	21,9	1,7	11,3	3,3	HeLa	1,20	0,8
B-CLL10	14,5	1,9	27,2	2,1	Jurkat	0,90	0,5
B-CLL11	27,6	4,9	7,00	2,0	HT29	0,70	0,5
B-CLL12	56,0	2,5	5,90	2,0	Mg-63	0,50	0,3
B-CLL13	7,80	1,3	7,60	1,5	Saos-2	1,00	0,5
B-CLL14	56,4	3,2	22,0	2,5	MCF-7	0,90	0,7
B-CLL15	20,8	3,8	15,3	3,1			
B-CLL16	58,5	4,4	6,40	1,3			
B-CLL17	7,70	1,3	5,10	1,9			
B-CLL18	9,50	2,8	18,6	1,7			

Tabelle 13. FACS-Analysen zur CD23-Expression auf B-CLL Zellen. In FACS-Messungen wurde die CD23-Expression (Median) und die zugehörige MFI (mean fluorescence intensity) in HLA-A0201⁺ naiven und CD40L-stimulierten B-CLL Zellen (n = 18), PBMCs (n = 6) und tonsilläre B-Zellen (n = 4) HLA-A0201⁺ gesunder Spender, Mec-1 (n = 2), Raji (n = 2) und Ramos (n = 2) verifiziert. Alle B-CLL Proben enthielten mehr als 95% CD5⁺/CD19⁺ Zellen. Die CD23-Expression wurde ebenso in weiteren Zelllinien untersucht: K562, RCC-26, RCC-53, HeLa, HT29, Mg-63, Saos-2 und MCF-7.

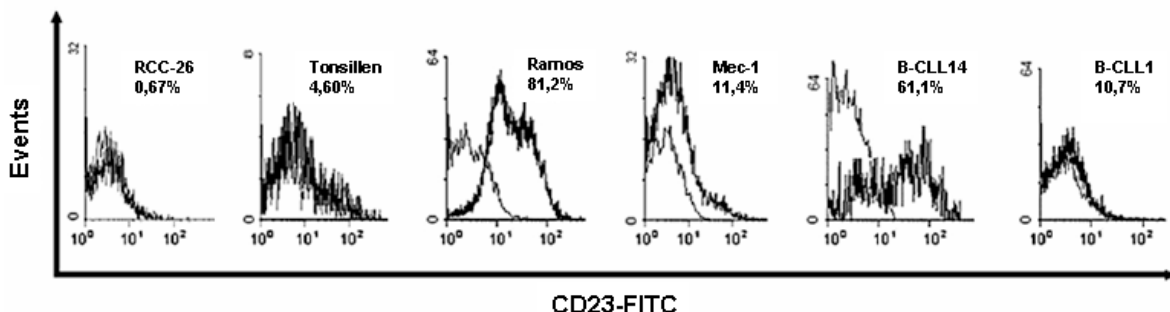


Abbildung 22. Durchflußzytometrische Analysen der CD23-Expression in primären B-CLL und Kontrollzellen. In jedem Histogramm entspricht die dünne Linie der Isotypkontrolle und die dicke der CD23-Expression. Der Prozentsatz an positiven Zellen ist definiert als die Fraktion jenseits der 99% Region der Kontrollzellen. Dieser ist für jede Zelllinie (RCC-26, Tonsilläre B-Zellen, Ramos, Mec-1) und zwei repräsentative B-CLL Proben (B-CLL1 (vorbehandelt) and B-CLL14 (unbehandelt) angegeben.

4.4.2 Generierung CD23-spezifischer CTL-Antworten *in vitro* mit Hilfe Peptid-beladener DCs

Die Antigen-spezifischen CTLs wurden mit HLA-A0201-positiven, autologen, gesunden DCs stimuliert und auf ihre Erkennung von CD23-abgeleiteten Peptiden beurteilt. Diese DCs wurden mit den identifizierten, HLA-A0201-bindenden, antigenen CD23-Peptiden L41, A33 und F232 gepulst. Die zytotoxische Kapazität der expandierten T-Zellen wurde nach 4-6 Wochen in Standard [⁵¹Cr]-release Assays untersucht. Wie in **Abbildung 23A** zu sehen ist, zeigten die nach mehreren *in vitro* Restimulationen erhaltenen T-Zellen eine Peptid-spezifische Lyse bei T2-Zellen, die mit den synthetischen CD23-Peptiden beladen waren. Die CTLs lysierten jedoch weder Zielzellen, die mit dem Kontrollpeptid I540S beladen waren, noch T2-Zellen ohne Peptid. Auch K562 Zellen wurden im Allgemeinen nicht erkannt, nur im Falle der F232-spezifischen CTLs konnte eine Lyse im höchsten E:T Verhältnis detektiert werden (42,1% Lyse, E:T = 20:1). T-Zellen zeigten die höchste lytische Aktivität gegen das CD23-Peptid L41 (50,4% Lyse bei E:T = 40:1) und F232 (22,6% Lyse bei E:T = 20:1). Für A33 wurde eine Lyse von 18,5% lysis (E:T = 40:1) erreicht.

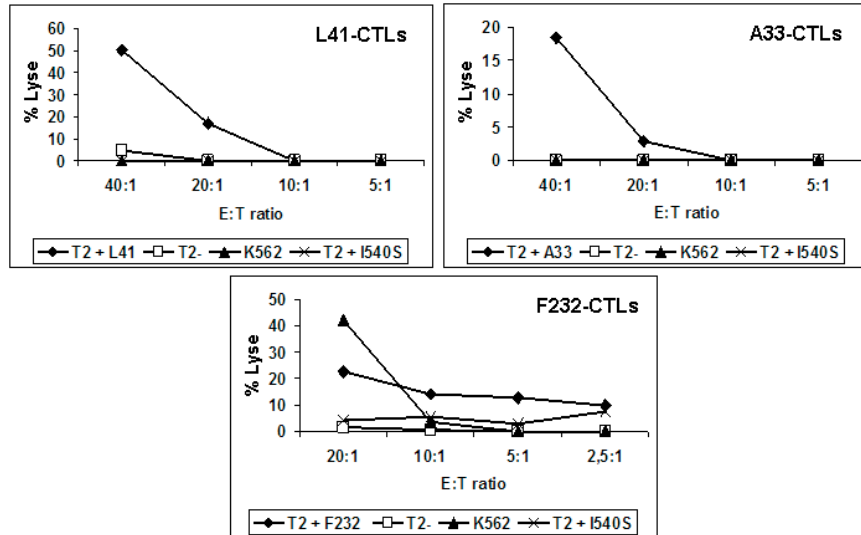
Ferner wurde die Lyse von naiven, primären, unmodifizierten HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL Zellen (n = 4; B-CLL11 und B-CLL16 - 18; E:T = 20:1 - 5:1, **Abbildung 23B**) der CD23-spezifischen T-Zellen demonstriert. Eine spezifische Lyse wurde in 24,8% ± 13,1% der Zielzellen mit den L41-spezifischen T-Zellen (n = 4) und in 35,2% ± 21,2% (n = 3; B-CLL11, 17, 18) der Zellen mit den A33-spezifischen CTLs gefunden. Die Reaktionen zeigten eine abnehmende Lyse mit geringeren E:T Verhältnissen von 10:1 bzw. 5:1 (L41: 4,5% ± 9,0% und 2,3% ± 4,5%; A33: 22,8% ± 18,5% und 4,1% ± 7,1%). Tonsilläre B-Zellen (n = 2) wurden nicht erkannt (0% Lyse für alle E:T Verhältnisse).

4.4.2.1 Erkennung B-zellulärer Tumorzelllinien durch CD23-spezifische CTLs

Im gleichen [⁵¹Cr]-release Assay wurde die Lysefähigkeit der *in vitro* induzierten CD23-spezifischen CTLs in Bezug auf Tumorzelllinien (Lymphom- und Leukämiezelllinien B-zellulären Ursprungs) getestet. Der Nachweis für eine MHC-I-Restriktion der generierten CTLs wurde durch den W6/32 Antikörper erbracht. Die Tumorzelllinien Ramos^{HLA-A2+,CD23+}, Raji^{HLA-A2-,CD23+}, Mec-1^{HLA-A2-,CD23+}, RCC-26^{HLA-A2+,CD23-}, RCC-53^{HLA-A2+,CD23-} und tonsilläre B-Zellen^{HLA-A2+,CD23-} wurden den CD23-spezifischen CTLs als Zielzellen präsentiert. Die für L41 und A33 spezifischen *in vitro* induzierten CTLs lysierten HLA-A0201⁺ und CD23⁺ Ramos Zellen (L41: 11 - 33% Lyse; A33: 6,9 - 16,7% Lyse; E:T Verhältnisse 5:1 - 40:1) und durch Zugabe von W6/32 konnten die CTLs inaktiviert werden, was für eine MHC-I-Restriktion spricht (L41: 0,2 - 1,7% Lyse; A33: 0,3 - 0% Lyse; E:T = 5:1 - 40:1). HLA-A0201⁺/CD23⁻ RCC-26, RCC53 und tonsilläre B-Zellen wurden nicht spezifisch von den CD23-spezifischen CTLs erkannt (L41: Bereich: 0 - 3% Lyse; A33: Bereich: 0 - 2,3% Lyse; E:T = 5:1 - 40:1). Ebenso wurden

CD23-exprimierende Raji^{HLA-A0201}- und Mec-1^{HLA-A0201}- nur unspezifisch lysiert (L41: Raji: 0%, Mec-1: 6,0 - 1,7% Lyse; A33: Raji: 0 - 3,5% Lyse, Mec-1: 0,4 - 0% Lyse; E:T = 5:1 - 40:1; **Abbildung 24**).

(A)



(B)

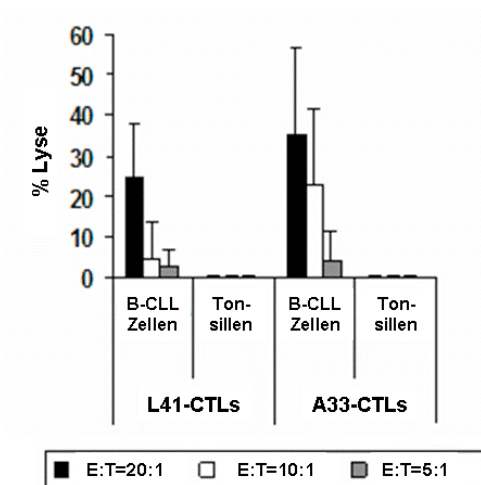


Abbildung 23. Generierung CD23-spezifischer CTLs mit Peptid-beladenen DCs *in vitro*.

Aus autologen Monozyten generierte DCs wurden mit den synthetischen CD23-abgeleiteten Peptiden gepulst, um eine CTL Antwort *in vitro* zu induzieren. Die zytotoxische Kapazität der induzierten T-Zellen wurde in Standard [⁵¹Cr]-release Assays untersucht. (A) Die T-Zellen erkannten nur T2-Zellen, die mit den richtigen Peptiden beladen waren (◆), jedoch lysierten sie nicht die mit dem I540S-Kontrollpeptid beladenen Zielzellen (x). Auch wurden T2-Zellen ohne Peptid (□) und die NK-Zielzelllinie K562 (▲) nicht erkannt. E:T = Effektor zu Target Verhältnis. (B) Die generierten T-Zellen waren ebenfalls in der Lage, HLA-A0201⁺/CD23⁺ primäre B-CLL Zellen (n = 4; B-CLL11, 16 bis 18) zu lysieren, aber nicht HLAA0201⁺ tonsilläre B-Zellen (E:T = 20:1 - 5:1).

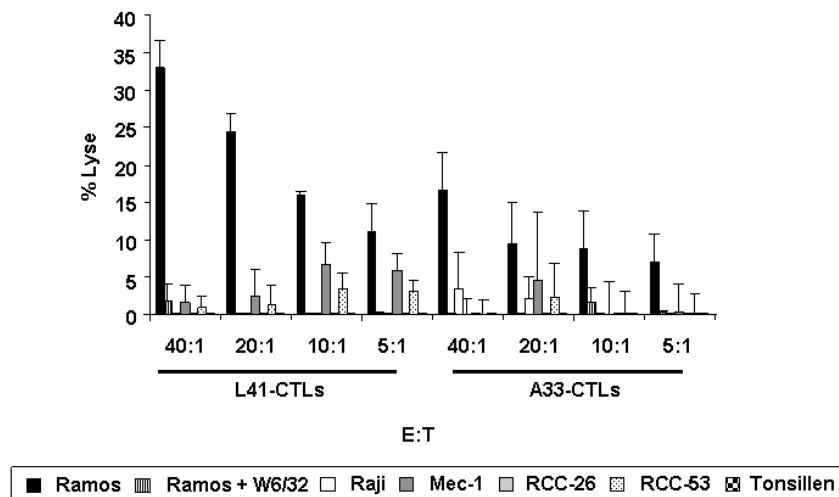
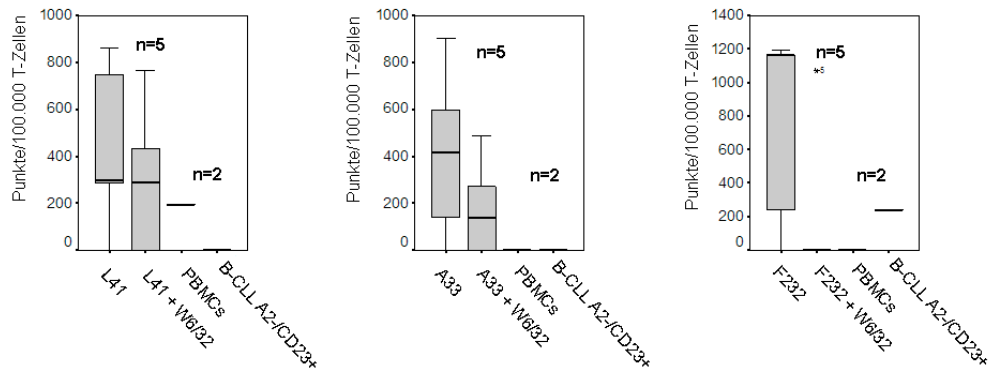


Abbildung 24. CD23-spezifische CTLs erkennen Tumorzelllinien B-zellulären Ursprungs. Im [⁵¹Cr]-release Assay wurden die *in vitro* generierten L41- und A33-spezifischen CTLs auf ihre Lysefähigkeit in Anwesenheit von Tumorzelllinien (B-zelluläre Lymphom- und Leukämiezelllinien) getestet (E:T = 40:1 - 5:1). L41- und A33-CTLs lysierten spezifisch HLA-A0201⁺/CD23⁺ Ramos Zellen, was durch die Blockierung der Reaktionen mit W6/32 gezeigt werden konnten. Andere Zielzellen (tonsilläre B-Zellen, Raji, Mec-1, RCC-26 und -53) wurden nicht oder nur unspezifisch erkannt.

4.4.2.2 Naive B-CLL Zellen werden effizient von *in vitro* generierten, gesunden CD23-spezifischen CTLs erkannt

Im Folgenden wurden die erhaltenen MHC-I-restringierten CTLs der gesunden Spender hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, HLA-A0201⁺ CD23-überexprimierende primäre humane B-CLL Zellen zu erkennen. Hierzu wurden die oben beschriebenen Antigen-spezifischen CTLs in IFN- γ -ELISPOT Assays mit naiven B-CLL Zellen inkubiert (**Abbildung 25**). Die MHC-I-Restriktion wurde wiederum mit dem W6/32 Antikörper verifiziert. Fünf Patienten mit unterschiedlicher CD23-Expression (B-CLL11, 14, 16 - 18; siehe **Tabelle 13**) wurden ausgewählt, um die Reaktivität der CD23-spezifischen CTLs zu testen. Als Kontrollen wurden zwei nicht-maligne HLA-A0201⁺ PBMCs und zwei HLA-A0201⁻/CD23⁺ B-CLL Patienten verwendet.

(A)



(B)

		HLA-A2+/CD23+ B-CLL Zellen	HLA-A2+/CD23+ B-CLL Zellen + W6/32	PBMCs	HLA-A2-/CD23+ B-CLL Zellen
L41-CTLs	B-CLL11	288	0		
	B-CLL14	865	769		
	B-CLL16	0	0	192	0
	B-CLL17	298	288		
	B-CLL18	750	432		
A33-CTLs	B-CLL11	0	0		
	B-CLL14	903	139		
	B-CLL16	139	0	0	0
	B-CLL17	416	486		
	B-CLL18	597	270		
F232-CTLs	B-CLL11	1191	0		
	B-CLL14	0	0		
	B-CLL16	238	0	0	238
	B-CLL17	1166	0		
	B-CLL18	1166	1071		

Abbildung 25. CD23-spezifische CTLs von gesunden Spendern erkennen spezifisch naive HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL Zellen. T-Zellen von gesunden Spendern wurden durch autologe DCs als APCs expandiert, die mit CD23-Peptiden (L41, A33, and F232) gepulst waren. Die Boxplots (A) und die exakten Werte (B) repräsentieren die Ergebnisse der IFN- γ -ELISPOT Assays, in denen die CD23-spezifischen CTLs in Gegenwart verschiedener Zielzellen untersucht wurden: Fünf HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL Patientenproben (B-CLL11, 14, 16 - 18), die Kontrollzellen PBMCs von gesunden HLA-A0201⁺ Spendern (n = 2) und zwei HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL Patienten. Die Zahl der detektierten Punkte wurde gepoolt, um die Immunogenität der drei CD23-Peptide und die MHC-I-Restriktion (W6/32) der T-Zellen zu zeigen. Alle drei CTLs erkannten spezifisch naive HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL Zellen, was durch die Blockierung der Reaktionen mit W6/32 verifiziert wurde. Die Kontrollzellen (HLA-A0201⁺ PBMCs und HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLLs) wurden nicht oder unspezifisch erkannt. Die y-Achse zeigt die gezählten Punkte/100.000 T-Zellen, was den IFN- γ -sezernierenden T-Zellen entspricht.

Die L41-spezifischen CTLs der gesunden Spender erkannten 4 aus 5 der untersuchten B-CLL Proben (B-CLL11, 14, 17 und 18) mit 288 bis 865/100.000 (Median: 298/100.000) spezifischen Punkten im IFN- γ -ELISPOT Assay. Die T-Zellen reagierten in MHC-I-restringierter Weise, wie gezeigt durch die Blockierung mit W6/32, jedoch waren diese Reaktionen nicht statistisch signifikant (Wilcoxon Test: $Z = -1,826$, $p < 0,068$; Mann-Whitney U Test: $p < 0.486$). Die Kontrollen (HLA-A0201⁺ PBMCs und HLA-A0201⁺/CD23⁺ B-CLL

Patienten) wurden nur in geringem Maße erkannt (0 bis 192/100.000 T-Zellen, Median: 0/100.000; Mann-Whitney U Test: beide: $p < 0,029$). CTLs spezifisch für A33 waren ebenfalls in der Lage in MHC-I-restringierter Weise auf vier Proben (B-CLL14, 16-18) zu reagieren (139 bis 903/100.000 T-Zellen, Median: 416/100.000; Wilcoxon Test: $Z = -1,604$, $p < 0,109$; Mann-Whitney U Test: $p < 0,200$), wo hingegen HLA-A0201/CD23⁺ Patientenproben und PBMCs keine T-Zellantwort induzierten (0/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test: beide: $p < 0,100$). Mit F232-spezifischen CTLs konnte eine IFN- γ -Sekretion in 4/5 B-CLL Proben (B-CLL11, 16 - 18; 288 - 1191/100.000 CD23-spezifische T-Zellen, Median: 1166/100.000) induziert und spezifisch mit W6/32 blockiert werden. (Wilcoxon Test: $Z = -1,826$, $p < 0,068$; Mann-Whitney U Test: $p < 0,057$). PBMCs wurden nicht (0/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test: $p < 0,029$) und HLA-A0201/CD23⁺ B-CLL Patienten nur in geringem Ausmaß (238/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test: beide: $p < 0,114$) von den F232-spezifischen CTLs erkannt.

4.4.3 Autologe T-Zellexpansion von B-CLL Patienten

4.4.3.1 Naive B-CLL Zellen als Antigen-präsentierende Zellen

4.4.3.1.1 CD23-spezifische T-Zellexpansion durch autologe B-CLL Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die CD23-spezifischen T-Zellen von B-CLL Patienten Tumorzellen erkennen können. Unter Verwendung von B-CLL Zellen als APCs war es möglich, T-Zellen in 5/11 getesteten Fällen (B-CLL11, 14, 16 - 18) T-Zellen zu expandieren. Nach 14 bis 21 Tagen *in vitro* Kultur wurden IFN- γ -ELISPOT Assays durchgeführt, um die CD23-spezifischen T-Zellen zu beurteilen.

T2-Zellen wurden als APCs verwendet und mit den HLA-A0201-bindenden, CD23-entstammenden Peptiden L41, A33 und F232 oder dem Mix der drei Peptide, M3 genannt, beladen. Als Negativkontrolle wurden die T2-Zellen mit MAGE-3 gepulst. In Anwesenheit von T2-Zellen als APCs wurden nach 2 bis 3 Wochen *in vitro* Kultur im IFN- γ -ELISPOT Assay 60 bis 4320/100.000 (Median: 276/100.000) CD3⁺ CD23-spezifische T-Zellen detektiert. In allen getesteten Patienten (5/5) konnte eine MHC-I-Restriktion (W6/32) gezeigt werden (alle: Wilcoxon Test: $Z = -2,666$; $p < 0,008$; Wilcoxon Test für T2: L41: $Z = -2,201$; $p < 0,028$; A33: $Z = -2,023$; $p < 0,043$; F232: $Z = -1,826$; $p < 0,068$). Die Anzahl der unspezifischen Reaktionen, die durch MAGE-3 induziert wurden, war niedrig (Median: 0; Bereich: 0 - 15 Punkte/100.000 T-Zellen) und signifikant geringer als bei Zugabe der CD23-Peptide (Wilcoxon Test: $Z = -2,666$; $p < 0,008$). Dieses Experiment liefert den Beweis, dass T-Zellen von B-CLL Patienten alle drei CD23-entstammenden Peptide in MHC-I-restringierter Weise erkennen (**Tabelle 14**, linke Seite). Danach wurden die expandierten T-Zellen auf ihre Erkennung von

primären Tumorzellen, die CD23 überexprimierten hin getestet und mit autologen, naiven B-CLL Zellen als APCs im IFN- γ -ELISPOT Assay koinkubiert. Die CD23-Peptide bzw. der Mix M3 wurden auf die B-CLL Zellen geladen. Es wurden 14 bis 330 Punkte (Median: 67/100.000 T-Zellen) gefunden, die mit dem W6/32 blockiert werden konnten und damit MHC-I-restringiert waren (alle: Wilcoxon Test: Z = -2,521; p < 0,012; Wilcoxon Test für naive B-CLL Zellen: L41: Z = -2,023; p < 0,043; A33: Z = -1,826; p < 0,068). Die Zahl der spezifischen T-Zellen, die in Anwesenheit der B-CLL Zellen detektiert wurden war niedriger, als bei den T2-Zellen (Mann-Whitney U Test: p < 0,003). HLA-A0201⁻, aber CD23-überexprimierende B-CLL Zellen (n = 2) und HLA-A0201⁺ nicht-maligne Zellen (tonsilläre B-Zellen und PBMCs, je: n = 2) wurden nur auf Hintergrundniveau erkannt (Mann-Whitney U Test: Z = -3,959, p < 0,001; **Tabelle 14**, rechte Seite).

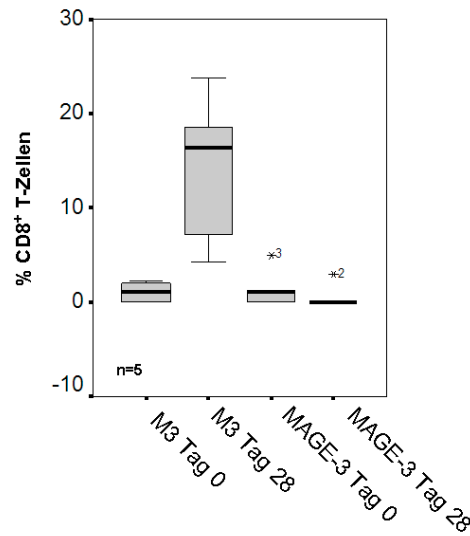
Patient	Peptid	Elispot Tag 14-21		Elispot Tag 21-28				
		T2 + Peptid	T2 + Peptid + W6/32	Naive B-CLL Zellen gepulst mit L41-F232 oder M3	Naive B-CLL Zellen gepulst mit L41-F232 oder M3 + W6/32	HLA-A0201- CD23+ B-CLL Zellen	HLA-A0201+ gesunde Spender; tonsilläre B-Zellen	HLA-A0201+ gesunde Spender; PBMCs
B-CLL11	L41	60	0	L41 49	21	0	0	0
	A33	323	0					
	F232	229	0					
	MAGE-3	15	n.d.					
B-CLL14	M3	4320	780	L41 149	0	0	n.d.	0
	MAGE-3	0	n.d.	A33 115	33			
				F232 33	0			
B-CLL16	M3	965	305	L41 258	0	16	65	0
	L41	334	0	A33 330	234			
	MAGE-3	0	n.d.					
B-CLL17	L41	123	41	M3 14	0	0	0	n.d.
	A33	200	18					
	MAGE-3	0	n.d.					
B-CLL18	M3	2440	800	A33 84	42	0	41	0
	MAGE-3	0	n.d.					

Tabelle 14. Spezifische Erkennung CD23-abstammender Peptide, die auf T2-Zellen und naiven B-CLL Zellen präsentiert werden, durch autologe expandierte T-Zellen von B-CLL Patienten. T-Zellen von fünf B-CLL Patienten (B-CLL11, 14, 16 - 18) wurden mit Hilfe von autologen, naiven, ungepulsten B-CLL Zellen expandiert. IFN- γ -ELISPOT Assays wurden an Tag 14-21 mit T2 (linke Seite) und and Tag 21-28 mit naiven, autologen B-CLL Zellen (rechte Seite) durchgeführt. Beide Zelltypen wurden mit den HLA-A0201-bindenden CD23-Peptiden (L41, A33 und F232) oder dem Mix M3 oder dem Kontrollpeptid MAGE-3 beladen, um die Anzahl der CD23-spezifischen T-Zellen zu ermitteln. Die MHC-I-Restriktion der T-Zellen wurde durch Zugabe des W6/32 Antikörpers untersucht. Gezeigt ist die Anzahl der CD23-spezifischen Punkte pro 100.000 T-Zellen. HLA-A0201⁻, CD23-überexprimierende B-CLL Zellen und nicht-maligne Zellen von HLA-A0201⁺ gesunden Spendern (PBMCs (n = 2), tonsilläre B-Zellen (n = 2)) wurden nicht spezifisch erkannt. n.d. = nicht detektiert.

Zusätzlich wurde die Vorläuferfrequenz von CD23-spezifischen CTLs mit naiven B-CLL Zellen als APCs in IFN- γ -ELISPOT Assays untersucht, jedoch konnte keine spezifische Reaktion entdeckt werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.3.1.2 CD23-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen
Zur weiteren Festigung der IFN- γ -ELISPOT Analysen wurden die expandierten T-Zellen mit HLA-A2-Dimer/Peptidkomplexen gefärbt. Die Daten für CD23- und MAGE-3-spezifische HLA-A2-Komplexe wurden an Tag 28 erhoben. Färbungen der HLA-A2-Dimer/Komplexe mit dem Lösungsmittel DMSO dienten als Hintergrundswerte und wurden von den experimentellen Werten abgezogen. Die Raten der mit dem unverwandten MAGE-3 beladenen dimeren Komplexe waren niedrig (Median: 0%, Bereich: 0 bis 2,9%). Im Gegensatz dazu wurden die CD23-Peptide (M3) von bis zu 23,8% (Median: 16,3%) der an Tag 28 lebenden CD8⁺ T-Zellen erkannt (**Abbildung 26A**, Tag 28), was signifikant höher war, als die Reaktivität gegen MAGE-3 (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). Insgesamt nahm die relative Anzahl der CD23-erkennenden T-Zellen signifikant innerhalb 4 Wochen *in vitro* Kultur zu (Wilcoxon Test: $Z = -2,023$; $p < 0,043$). In **Abbildung 26B** sind die Dimerfärbungen der T-Zellen von drei repräsentativen Patienten (B-CLL16 - 18) nach Stimulation aufgeführt, inklusive der Kontrollen (Dimer beladen mit DMSO und MAGE-3).

(A)



(B)

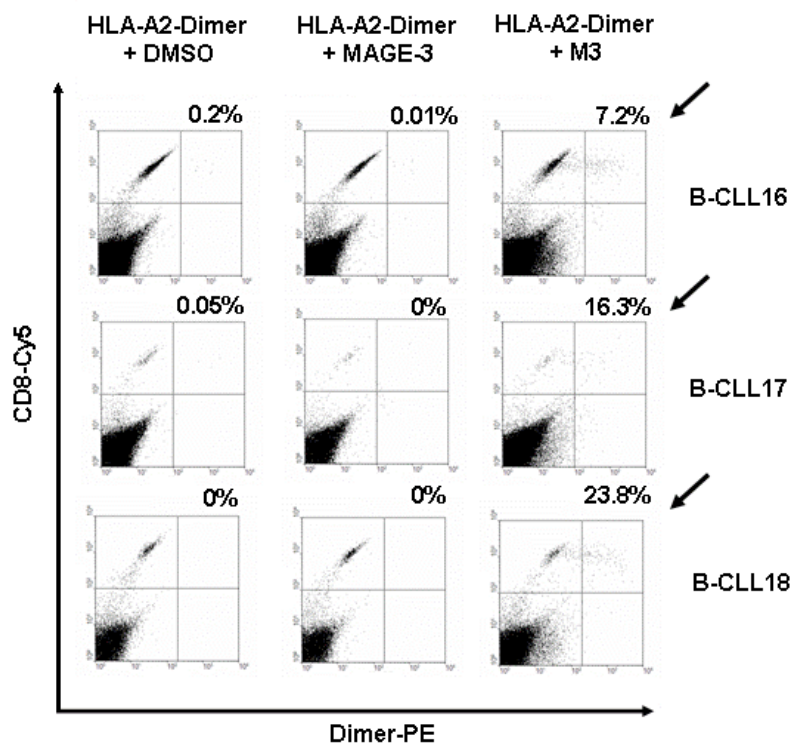


Abbildung 26. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen CD8⁺ T-Zellen von B-CLL Patienten vor (Tag 0) und nach vier Wochen *in vitro* Stimulation (Tag 28). (A) Gezeigt sind die HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen der fünf getesteten B-CLL Proben an Tag 0 und nach 28 Tagen *in vitro* Kultur. Die Detektion der CD23-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde durch den Peptidmix M3 verifiziert. Der Prozentsatz der MAGE-3-beladenen HLA-A2-Komplexe wurde ebenfalls untersucht. Nach 4 Wochen Stimulation nahm die CD23-spezifische Reaktivität zu und war signifikant höher als die gegen die Kontrollen (MAGE-3; n = 3, B-CLL16 - 18). (B) Die Dimerfärbungen der Proben B-CLL16 bis 18 an Tag 28 sind hier graphisch dargestellt. Die beiden ersten Histogramme repräsentieren die Kontrollen (Dimer beladen mit DMSO und MAGE-3), die letzten Histogramme zeigen den prozentualen Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die mit den CD23-Peptiden (M3)/Dimeren im oberen rechten Quadranten reagierten.

4.4.3.2 CD40L-stimulierte B-CLL Zellen (CD40L-B-CLLs) als Antigen-präsentierende Zellen

4.4.3.2.1 CD23-spezifische T-Zellexpansion durch autologe CD40L-B-CLLs

Im Folgenden wurde das Potential von CD40L-B-CLLs als APCs bei der autologen T-Zellexpansion überprüft. Dabei wurden die in den vorherigen Abschnitten untersuchten fünf B-CLL Patienten (B-CLL11, 14, 16 - 18), die mit naiven B-CLL Zellen stimuliert wurden, verwendet. Außerdem wurden fünf weitere Proben (B-CLL2, 6, 7, 12 und 15) untersucht, die nicht mit naiven B-CLL expandiert werden konnten. Wie bereits beschrieben, wurden naive B-CLL Zellen durch CD40L Stimulation aktiviert, wobei sich die Expression der Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle signifikant erhöhte ($Z = -2,521$; $p < 0,012$; Abschnitt 4.2.4). Diese aktivierten leukämischen B-Zellen wurden auf ihre Expansionsfähigkeit bei T-Zellen untersucht. Alle in diesem Experiment verwendeten APCs wurden durch CD40L Stimulation aktiviert und werden als "CD40L", "CD40L B-CLL Zellen" oder „CD40L-B-CLLs“ benannt. Während der T-Zellstimulation wurden die CD40L B-CLL Zellen entweder Peptid-ungepulst (CD40L-U) oder Peptid-beladen (CD40L-P) zugegeben. Nach 21 Tagen *in vitro* Kultur wurden die CD23-Spezifität und MHC-I-Restriktion (W6/32) der T-Zellen in IFN- γ -ELISPOT Assays mit Peptid-beladenen APCs analysiert (**Abbildung 27**).

Unter Verwendung von CD40L-aktivierten, aber ungelulsten B-CLL Zellen (CD40L-U) als APCs (B-CLL11, 14, 16 bis 18) wurden nach Expansion CD23-spezifische, MHC-I-restringierte T-Zellen gegen alle fünf Patientenproben (Wilcoxon test: $Z = -2,666$; $p < 0,008$) im IFN- γ -ELISPOT Assay gefunden (**Abbildung 27A**). Das L41-Peptid wurde in 3/5 Patienten (B-CLL16, 17 und 18) mit 35 bis 331/100.000 T-Zellen (Median: 100) detektiert, wohingegen das A33-Peptid nur in einem Fall (B-CLL11) eine T-Zellreaktion hervorbrachte (36/100.000 T-Zellen). Das F232-Peptid wurde als das immunogenste der drei Peptide identifiziert, da alle fünf Proben F232-spezifische T-Zellen induzierten (17 - 534/100.000, Median: 59/100.000). Tonsilläre B-Zellen^{HLA-A0201+}, MAGE-3 gepulste, CD40L-aktivierte B-CLLs und HLA-A0201/CD23⁺ B-CLL Zellen wurden nur im Bereich der Hintergrundwerte erkannt (Bereich: 0 bis 32/ 100.000 T-Zellen, Median: 0; Mann-Whitney U Test ($n = 3$): $Z = -4,498$, $p < 0,001$). Die Anzahl der CD23-spezifischen T-Zellen, die in naiven (Median: 67/100.000 T-Zellen) und denen, die in CD40L-B-CLLs (Median: 59/100.000 T-Zellen) detektiert wurden, unterschied sich nicht signifikant ($p < 0,841$; **Abbildung 27B**).

Untersuchungen von autologen T-Zellen der Patienten B-CLL2, 6 und 12, die mit CD40L-U Zellen expandiert wurden, zeigten ebenfalls eine CD23-spezifische, MHC-I-restringierte T-Zellantwort in allen Fällen (Wilcoxon Test: $Z = -2,220$; $p < 0,026$; Bereich: 23 bis 58/100,000 CD23-spezifische T-Zellen, Median: 25/100.000). Auch hier wurden die Kontrollzellen (HLA-A0201/CD23⁺ B-CLL Zellen ($n = 2$), MAGE-3 gepulste, CD40L-aktivierte B-CLLs

oder HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen) wurden nicht von Patienten T-Zellen erkannt (Bereich: 0 - 4/100.000 T-Zellen, Median: 0; Mann-Whitney U Test (n = 3): Z = -3,917, p < 0,001; **Abbildung 27C**). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Peptid-beladenen CD40L B-CLL Zellen (CD40L-P) als APCs bezüglich einer CD23-spezifischen, MHC-I-restringierten T-Zellexpansion erhalten (Wilcoxon Test: Z = -2,201; p < 0,028). Das L41-Peptid wurde in einem Patienten mit 98/100.000 T-Zellen erkannt, F232 T-Zellreaktionen wurden in 2/3 Fällen (Bereich: 114 - 154/100.000 T-Zellen; Median: 134) gefunden und das A33-Peptid war in allen analysierten Patienten reaktiv (53 - 212/100.000 T-Zellen, Median: 67/100.000). Tonsilläre B-Zellen von gesunden Spendern (n = 2), HLA-A0201⁻/CD23⁺ B-CLL Zellen (n = 2) und MAGE-3-beladene, CD40L-aktivierte (n = 2) wurden nur in geringem Maße erkannt (Bereich: 0 bis 8/100.000 T-Zellen; Mann-Whitney U Test (n = 3): Z = -3,867, p < 0,001; **Abbildung 27C**). Der Anstieg an CD23-spezifischen T-Zellen im Vergleich von ungepulsten zu Peptid-beladenen APCs war signifikant (Mann-Whitney U Test: p < 0,009).

Für die zwei restlichen B-CLL Proben (CLL7 und 15), in denen keine T-Zellen mit naiven B-CLL Zellen expandiert wurden, konnte auch keine T-Zellenexpansion mit Hilfe von CD40L B-CLL Zellen erlangt werden.

Obwohl 10/18 Patienten auf spezifische T-Zellreaktionen getestet wurden, sind die restlichen 7/18 B-CLL Proben, die ebenfalls auf ihre CD23-Expression untersucht worden waren (**Tabelle 13**), aus verschiedenen Gründen nicht auf ihre T-Zellexpansion analysiert worden. Entweder waren keine ausreichenden Mengen an Tumorzellen und/oder autologen T-Zellen verfügbar, da die Patienten starben, nicht mehr bereit waren zur weiteren Abgabe von Proben oder nicht mehr zur Verfügung standen (B-CLL1, 3, 4, 5, 8, 9, 10 und 13).

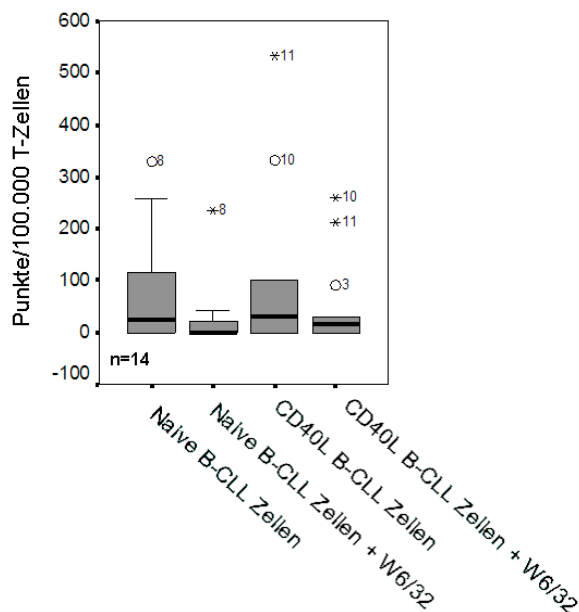
4.4.3.2.2 CD23-spezifische HLA-A2-Dimer/Peptid Färbung der expandierten T-Zellen nach Stimulation mit CD40L-stimulierten B-CLL Zellen

Diese T-Zellen wurden an Tag 0 und Tag 28 mit HLA-A2-Dimer/Peptidkomplexen gefärbt, die spezifisch für CD23 (M3) und MAGE-3 waren, um die IFN- γ -ELISPOT-Analysen zu bestätigen. Zusätzlich fand die Bestimmung der Vorläuferfrequenz CD23-spezifischer T-Zellen an Tag 0 statt, die CD23 ohne Stimulation erkannten.

(A)

Patient	CD40L-U APCs		CD40L-aktivierte HLA-A0201-CD23+ B-CLL Zellen	HLA-A0201+ tonsilläre B-Zellen	CD40L-aktivierte B-CLL Zellen + MAGE-3
	CD40L-aktivierte B-CLL Zellen gepulst mit L41-F232	CD40L-aktivierte B-CLL Zellen gepulst mit L41-F232 + W6/32			
B-CLL11	A33 36 F232 100	28 90	0	0	0
B-CLL14	F232 30	15	0	10	0
B-CLL16	L41 35 F232 59	18 30	0	11	6
B-CLL17	L41 331 F232 534	259 212	8	32	0
B-CLL18	L41 100 F232 17	16 8	6	0	0

(B)



(C)

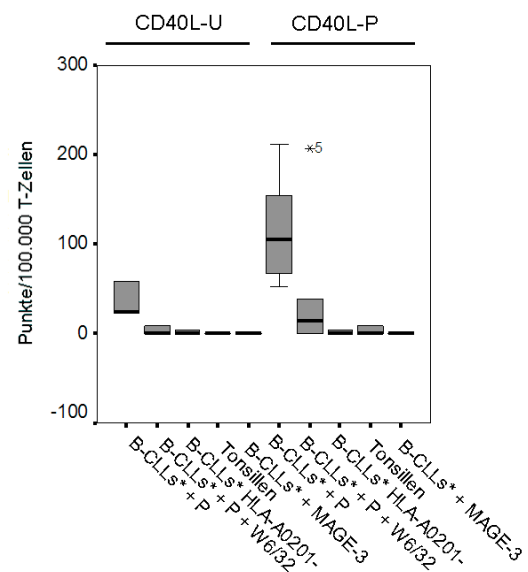


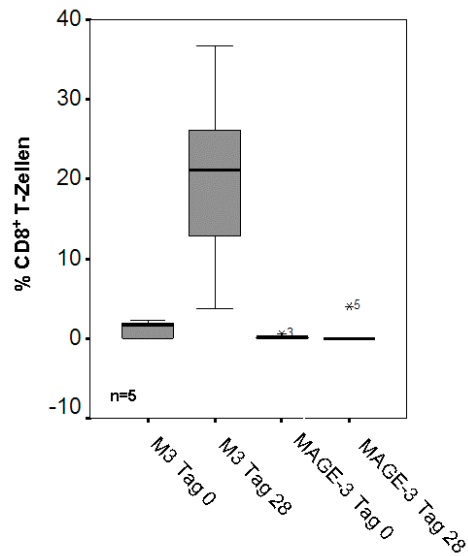
Abbildung 27. CD23-spezifische T-Zellexpansion durch autologe CD40L-aktivierte B-CLL Zellen. B-CLL Proben (B-CLL11, 14, 16 - 18) wurden mit autologen, unbeladenen (CD40L-U) und zusätzlich für die Proben B-CLL2, 6 und 12, mit CD40L-aktivierten, Peptid-beladenen B-CLL Zellen (CD40L-P) als Stimulatoren expandiert. An Tag 21 wurden IFN- γ -ELISPOT Assays mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen (L41, A33 und F232 oder M3) durchgeführt. Die MHC-I-Restriktion wurde durch Blockierung mit W6/32 getestet. Aufgeführt ist die Anzahl an CD23-spezifischen Punkten pro 100.000 T-Zellen. **(A)** Die Werte der detektierten CD23-spezifischen T-Zellen der Patienten B-CLL11, 14 und 16 - 18 in Anwesenheit von CD40L-U Zellen als APCs während der Expansion sind hier aufgeführt. Gegen

(Fortsetzung Abbildung 27.) die Kontrollzellen konnten Reaktionen nur auf Hintergrundniveau gefunden werden (HLA-A0201/CD23⁺ B-CLL Zellen (n = 2), gesunde HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen (n = 2) oder MAGE-3-beladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen (n = 2). **(B)** Die Zahl der detektierten CD23-spezifischen T-Zellen der Patienten B-CLL11, 14 und 16 - 18 mit naiven Zellen im Vergleich zu CD40L B-CLL Zellen als APCs sind graphisch dargestellt. **(C)** T-Zellen von B-CLL2, 6 und 12 wurden mit autologen CD40L-U und CD40L-P als Stimulatoren expandiert. Wiederum zeigten die CD23-spezifischen T-Zellen gegen die Kontrollzellen nur Reaktionen auf Hintergrundniveau (HLA-A0201/CD23⁺ B-CLL Zellen (n = 2), gesunde HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen (n = 2) oder MAGE-3-beladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen (n = 2)). CD40L B-CLL = CD40L-aktivierte B-CLL Zellen. Alle verwendeten APCs wurden durch CD40L-Stimulation aktiviert und sind mit "CD40L" gekennzeichnet. Während der T-Zellstimulation waren die CD40L-B-CLL Zellen entweder ungepulst (CD40L-U) oder mit den Peptiden beladen (CD40L-P).

Die CD23-spezifische T-Zellvorläuferfrequenz (**Abbildung 28A**, Tag 0) der Patienten, die eine CTL-Antwort durch ihre naiven B-CLL Zellen induzieren konnten (B-CLL11, 14, 16 - 18), lag zwischen 0 und 2,2% (Median: 1,6%). Deren T-Zellen erkannten das Kontrollpeptid MAGE-3 nur gering (0 - 0,5%; Median: 0,1%). Die Färbungen mit CD23-Peptid-beladenen HLA-A2-Dimeren der lebenden CD8⁺ T-Lymphozyten ergaben zwischen 3,7 bis 36,8% (Median: 21,1%) CD23-spezifischer T-Zellen nach 28 Tagen in Kultur (**Abbildung 28A**, Tag 28). Die Kontrollfrequenz der MAGE-3-spezifischen CD8⁺ T-Zellen war niedrig (Median: 0%, Bereich: 0 - 4%). Der Anteil der CD23-erkennenden CTLs war signifikant höher als der, der MAGE-3 spezifischen T-Zellen (Wilcoxon Test: Z = -2,023; p < 0,043). Als Beispiel sind die Histogramme der mit den CD23-spezifischen Dimeren reaktiven CD8⁺ T-Zellen von drei Patienten (B-CLL16 - 18) gezeigt (**Abbildung 28B**). Unter Verwendung von CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als APCs wurde die Zahl der CD23-spezifischen T-Zellen während der Stimulatoren von Tag 0 bis Tag 28 signifikant vermehrt (Wilcoxon Test: Z = -2,023; p < 0,043).

Für die Patientenproben, in denen eine autologe T-Zellexpansion nur durch CD40L-aktivierte B-CLL Zellen möglich war (B-CLL2, 6 und 12), konnte keine zusätzliche Dimer/Peptid Färbung durchgeführt werden, da alle an Tag 21 verfügbaren T-Zellen in die IFN- γ -ELISPOT Assays eingesetzt worden waren.

(A)



(B)

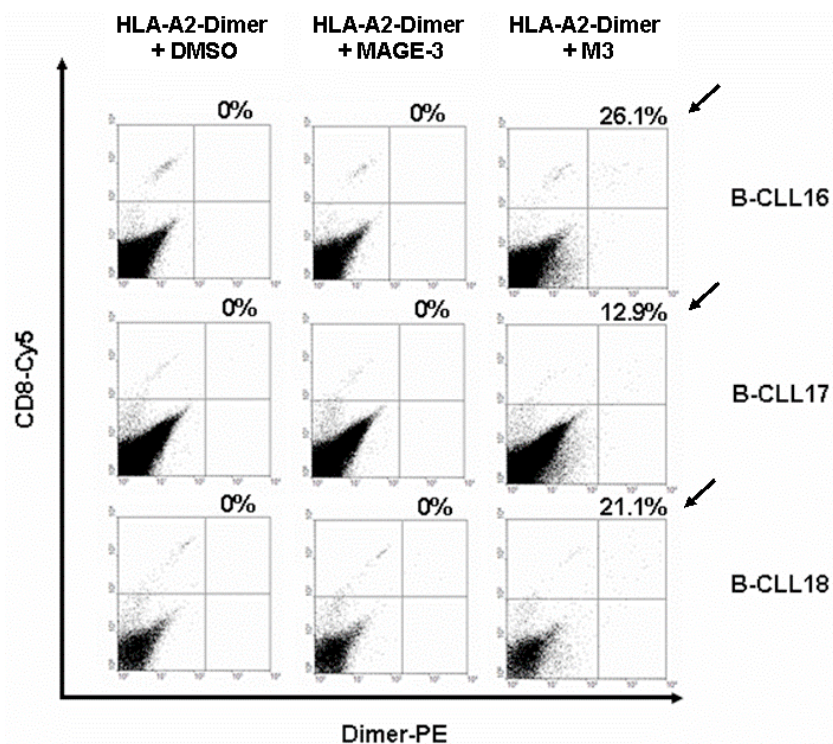


Abbildung 28. HLA-A2-Dimer/Peptid Färbungen von CD23-Peptiden-erkennenden Patienten T-Zellen vor und nach 28 Tagen *in vitro* Kultur mit ungeladenen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen. (A) Autologe T-Zellen von Patienten, bei denen eine T-Zell-expansion mit naiven autologen B-CLL Zellen erfolgreich war (B-CLL11, 14, 16 - 18), wurden ebenfalls mit unbeladenen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen als Stimulatorzellen (CD40L-U) stimuliert. Die im Boxplot angegebenen Zahlen repräsentieren die % CD8⁺ T-Zellen an Tag 0 und Tag 28, die reaktiv waren mit HLA-A2-Dimer/Peptid Komplexen (spezifisch für CD23-Peptide als Mix M3 oder MAGE-3). CD8⁺/HLA-A2-Dimer/CD23⁺ T-Zellen wurden deutlich innerhalb 4 Wochen Stimulation vermehrt. **(B)** Die Dimerfärbungen der T-Zellen an Tag 28 von den Patienten B-CLL16 - 18 sind aufgeführt. Im letzten Histogramm sind die % der CD8⁺ T-Zellen gezeigt, die mit den CD23-Peptiden (M3)/Dimeren reagierten.

4.5 Zytokinprofile der naiven und CD40L-aktivierten B-CLL Zellen

Wie schon in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, war es sehr interessant, dass sich autologe, Antigen-spezifische T-Zellen mit Hilfe von naiven, autologen, unmanipulierten B-CLL Zellen erfolgreich expandieren ließen, obwohl von naiven B-CLL Zellen bekannt ist, dass sie weniger gute APCs darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass es möglich war CTLs von B-CLL Patienten mit autologen malignen B-Zellen zu stimulieren, wurden die Zytokinprofile der Patienten untersucht. Hier wurden zwei Gruppen unterschieden. Die erste, deren Patienten Antigen-spezifische T-Zellen mit naiven B-CLL Zellen generieren konnten (B-CLL11, 14, 16 - 18; naiv +) und die zweite, bei denen dies nicht erfolgreich war (B-CLL2, 3, 6 und 12; naiv -). Hierbei sollte geklärt werden, ob und in welcher Hinsicht sich die sezernierten Zytokine der beiden Gruppen unterschieden.

Naive und CD40L-stimulierte B-CLL Zellen wurden für 72h in Medium kultiviert, die Überstände gesammelt und mittels CBA (Cytokine Bead Array, Abschnitt 3.2.5.5) analysiert. Sechs Beadpopulationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten sind dabei an spezifische Captureantikörper für die T_H1/T_H2 -Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ gekoppelt. Die Überstände wurden mit diesen inkubiert, mit einem PE-konjugiertem Antikörper detektiert und im Durchflußzytometer gemessen. Als Hintergrundwerte wurden das Medium allein bzw. die Feeder-Zellen verwendet, bei denen jedoch keines der Zytokine detektiert wurde.

Bei der Untersuchung der Zytokinprofile zeigte sich, dass TNF- α , IL-10, IL-4 und IL-2 in beiden Gruppen in vergleichbaren Konzentrationen zu finden waren (naiv+/naiv-: TNF- α : $3,4 \pm 3,2/1,3 \pm 2,6$ pg/ml; IL-10: $5,7 \pm 6,5/4,0 \pm 2,7$ pg/ml; IL-4: $12,8 \pm 8,7/10,5 \pm 7,5$ pg/ml; IL-2: $4,5 \pm 7,0/3,7 \pm 4,4$ pg/ml; **Tabelle 15**). Die Zytokine IFN- γ und IL-6 wurden vorwiegend von den Patientenproben sezerniert, bei denen eine T-Zellstimulation mit naiven B-CLL Zellen positiv war (naiv+/naiv-: IFN- γ : $9,5 \pm 13,0/0 \pm 0$ pg/ml; IL-6: $44,8 \pm 80,3/7,8 \pm 6,3$ pg/ml; **Tabelle 15**).

Zusätzlich wurden die Überstände der naiven Proben B-CLL7 und 15 untersucht. Bei diesen Proben konnten weder mit naiven, noch mit CD40L-aktivierten B-CLL Zellen autologe T-Zellen stimuliert werden (naiv-/CD40L-; **Tabelle 15**). Hier waren nur IL-10, IL-6 und IL-4 detektierbar (IL-10: $2,5 \pm 3,5$ pg/ml; IL-6: $6,3 \pm 8,9$ pg/ml; IL-4: $12,3 \pm 2,4$ pg/ml), wobei die Werte von IL-10 und IL-4 vergleichbar waren mit denen der anderen beiden Gruppen.

Ebenfalls wurden die Konzentration der sechs Zytokine in CD40L-aktivierten B-CLL Zellen der beiden ersten Gruppen bestimmt (**Tabelle 16**). Durch die CD40L-Stimulation wurde die Sekretion von TNF- α und IL-10 deutlich erhöht und lieferte in beiden Gruppen vergleichbare Werte (naiv+/naiv-: TNF- α : $285,4 \pm 362,0/278,3 \pm 1,6$ pg/ml; IL-10: $546,4 \pm 271,4/462,4 \pm 173,7$ pg/ml). Bei IL-4 und IL-2 konnte in keiner der beiden Gruppen eine Zunahme festgestellt werden (naiv+/naiv-: IL-4: $12,0 \pm 7,2/15,4 \pm 7,3$ pg/ml; IL-2: $3,7 \pm 5,1/3,1 \pm 4,4$ pg/ml),

verglichen mit den naiven Zellen (beide Mann-Whitney U Test: $p = 1.000$). Unterschiedliche Zytokinmengen konnten jedoch bei IFN- γ detektiert werden. Die IFN- γ -Sekretion war in der zweiten Gruppe um den Faktor 2,5 höher, als in der ersten (naiv+/naiv-: IFN- γ : $255,6 \pm 203,9/646,3 \pm 367,0$ pg/ml). IL-6 wurde in diesem Setting nicht detektiert.

Durchschnittlich war die Zytokinmenge von IFN- γ , TNF- α und IL-10 in den CD40L-aktivierten Proben signifikant höher, als bei den naiven B-CLL Zellen (Median: 55,8-fach, Bereich: 11,6 - 95,3-fach; alle Mann-Whitney U Test: $p < 0.008$).

[pg/ml]	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
Patienten naiv +	9,5 ± 13,0	3,4 ± 3,2	5,7 ± 6,5	44,8 ± 80,3	12,8 ± 8,7	4,5 ± 7,0
Patienten naiv -	0 ± 0	1,3 ± 2,6	4,0 ± 2,7	7,8 ± 6,3	10,5 ± 7,5	3,7 ± 4,4
Patienten naiv - /CD40L -	0 ± 0	0 ± 0	2,5 ± 3,5	6,3 ± 8,9	12,3 ± 2,4	0 ± 0

Tabelle 15. Zytokinprofile naiver B-CLL Zellen. Naive B-CLL Zellen wurden für 72h in Medium kultiviert, die Überstände gesammelt und mit Hilfe von CBA-Messungen im FACS untersucht. Dabei wurden die T_H1/T_H2-Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 und IL-2 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in pg/ml folgender drei Gruppen: Patienten naiv + (B-CLL11, 14, 16 - 18), Patienten naiv - (B-CLL2, 3, 6, 12) und Patienten naiv - /CD40L - (B-CLL7 und 15).

[pg/ml]	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
Patienten naiv + CD40L+	255,6 ± 203,9	285,4 ± 362,0	546,4 ± 271,4	n.d.	12,0 ± 7,2	3,7 ± 5,1
Patienten naiv - CD40L+	646,3 ± 367,0	278,3 ± 1,6	462,4 ± 173,7	n.d.	15,4 ± 7,3	3,1 ± 4,4

Tabelle 16. Zytokinprofile der CD40L-aktivierten B-CLL Zellen. CD40L-stimulierte B-CLL Zellen wurden ebenfalls für 72h in Kultur genommen, deren Überstände gesammelt und die T_H1/T_H2-Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 und IL-2 im FACS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in pg/ml der zwei Patientengruppen (naiv +/CD40L + und naiv -/CD40L +). n.d. = nicht detektiert.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Daten und kritische Beurteilung

In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit hTERT, CD23 und CD229 als TAAs bei der B-CLL fungieren können. Expressionsdaten zeigten, dass naive B-CLL Zellen und eine B-Zell-abstammende Lymphomzelllinie hTERT, CD23 und CD229 überexprimieren und hTERT-, CD23- und CD229-entstammende HLA-A0201-bindende Peptide in einer MHC-restringierten Weise auf ihrer Oberfläche präsentieren, die eine Expansion von autologen T-Lymphozyten erlaubten. Die expandierten CD8⁺ T-Zellen erkannten spezifisch hTERT-, CD23- und CD229-entstammende Peptide auf naiven B-CLL und CD40L-aktivierten B-CLL Zellen, wohingegen normale HLA-A0201⁺ B-Zellen und HLA-A0201⁻/Antigen⁺ B-CLL Zellen keine Reaktion zeigten. Ferner konnte der Beweis erbracht werden, dass zum einen T-Zellen in den B-CLL Patienten vorhanden sind, die die drei Antigene erkennen (Dimerfärbung) und zum anderen diese auch funktional sind, da sie spezifisch mit IFN- γ -Sekretion auf die Erkennung des jeweiligen Antigens reagierten. Interessanterweise konnten naive B-CLL Zellen autologe T-Zellexpansion stimulieren, was möglicherweise durch das von den B-CLL Zellen sezernierten T_H1-Zytokinprofil ermöglicht wurde.

5.1.1 Erfüllung der TAA-Kriterien

Eine kritische Voraussetzung für eine effektive Krebstherapie stellt die Identifizierung von Tumor-spezifischen Antigenen oder TAAs dar. Diese Antigene sollten (I) Peptidsequenzen haben, die an MHC-Moleküle binden. (II) Sie sollten von den Tumorzellen prozessiert und auf MHC-Molekülen präsentiert werden. (III) Zusätzlich sollten sie im Tumor überexprimiert sein, was eine Erkennung durch T-Zellen ermöglicht und folglich eine Tumor-spezifische Immunantwort nach sich zieht (Rosenberg 1997, Vonderheide et al 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die mittels Algorithmen identifizierten nonameren Peptide der Moleküle hTERT (I540, E555 und R865), CD23 (L41, A33 und F232) und CD229 (Ly2, Ly3 und Ly4) eine vergleichbare Bindungskapazität zu den HLA-A0201-bindenden Peptiden IMP und Mage-3 zeigten (T2-Bindungstest; Van der Bruggen *et al* 1994, Vonderheide *et al* 1999, Würtzen *et al* 2002). Dabei erwiesen die Peptide F232 (1,90), Ly2 und Ly3 (1,73 bzw. 1,71) und I540 (1,61) die stärkste HLA-A2-Affinität. Für die hTERT-Peptide wurde dies bereits in anderen Publikationen gezeigt (Vonderheide *et al* 1999) und die erhobenen Daten wurden durch die der Literatur bestätigt. Die Bindung der gewählten Peptide an MHC-I, genauer HLA-A2, wurde durch diese Experimente für die bereits beschriebenen hTERT-Peptide bestätigt und die neu identifizierten CD229- und CD23-Peptide verifiziert. Das Kriterium der MHC-Bindung ist damit für die in dieser Arbeit selektierten Peptide erfüllt.

Das Merkmal der Überexpression/Tumor-spezifischen Expression der drei Moleküle wurden aufgrund ihrer zellulären Lokalisierung mit unterschiedlichen Methoden detektiert: hTERT mit Hilfe RT-PCR (mRNA; nukleäres Protein) und CD23 bzw. CD229 mittels Durchflußzytometrie (Oberflächenproteine). Bei allen drei Antigenen konnte eine signifikante Überexpression in naiven B-CLL Zellen (hTERT: 10/17, CD23 und CD229: 18/18 mit einer medianen Expression von 20,8% bzw. 63,2%) im Vergleich zu normalen gesunden Zellen (PBMCs, tonsilläre B-Zellen, Granulozyten) festgestellt werden. Diese exprimierten die Moleküle nur schwach oder waren hTERT-, CD229- und CD23-negativ. Nach CD40L-Aktivierung der B-CLL Zellen konnte hTERT in 13/17 B-CLL Patienten, CD23 (Median: 10,4%) und CD229 (Median: 29,1%) in allen Patienten detektiert werden. Im Fall von CD23 und Ly9 war eine verringerte Expression im Vergleich zu den naiven Proben festzustellen, jedoch konnte dennoch eine Überexpression bezogen auf die gesunden Kontrollzellen detektiert werden. Diese Daten sind somit mit denen der Literatur vergleichbar (De la Fuente *et al* 2001, Sarfati *et al* 1992 & 1993, Vonderheide *et al* 2004). Die reduzierte Antigenexpression der malignen Zellen nach CD40L-Aktivierung scheint ungewöhnlich. Theoretisch würde man davon ausgehen, dass die mRNA- und Proteinsynthese durch die CD40L-Stimulation verstärkt wird. Im naiven Zustand befinden sich ca. 98% der B-CLL Zellen im ruhenden Status und nur ca. 2% der Zellen treten in den Zellzyklus ein (Damle *et al* 2007). Durch die Stimulation wird der Anteil proliferierender Zellen erhöht und die translationelle Maschinerie muss somit auch zur Synthese anderer Proteine zur Verfügung stehen (Buhmann *et al* 1999, Mayr *et al* 2006). Die Expression von CD23 und CD229 bleibt insgesamt aber erhöht, so dass das Kriterium der Überexpression dennoch gegeben ist. Des Weiteren mag eine Stimulation für 72 h zwar optimal für die Aufregulation der Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle sein, jedoch nicht für CD23 und Ly9. Im Vergleich dazu konnte im Fall von hTERT eine Zunahme der mRNA Menge festgestellt werden. Insgesamt kann jedoch weder die mRNA-, noch die Proteinexpression eine konkrete Aussage über die prozessierten und präsentierten Peptide der einzelnen Antigene geben. Es kann lediglich die Expression eines Antigens verifiziert werden. Die Peptide, die auf den MHC-I-Molekülen präsentiert werden, korrespondieren nicht mit der Proteinkonzentration innerhalb der Zelle bzw. an der Zelloberfläche, jedoch zur Proteinsyntheserate. Während 30% aller neu synthetisierten Proteine innerhalb von 10 min nach Synthese degradiert werden, produzieren Proteine mit einem schnellen „turnover“ mehr degradierte Peptide, die dann bereit sind für die Präsentation auf MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche (Yewdell 2002, Yewdell *et al* 1996). Gleiches gilt für die Korrelation der mRNA- und Proteinmenge (el-Mahdani *et al* 1997).

Weitere Eigenschaften für ein Tumorantigen stellen die Immunogenität und die endogene Präsentation der ausgewählten Peptide dar. Durch die *in vitro*-Generierung von hTERT-, CD23- und CD229-spezifischen CTLs von gesunden Spendern mit Peptid-beladenen DCs

konnte nach 4 - 6 Wochen Kultur gezeigt werden, dass die gewählten nonameren Peptide immunogen sind, da sie eine Expansion CD8⁺ T-Zellen ermöglichten und die erhaltenen CTLs spezifisch für die jeweiligen Peptide waren: Die höchste spezifische lytische Aktivität im [⁵¹Cr]-release Assay wurde gegen T2-Zellen beladen mit E555, I540, Ly4, R865, L41, Ly2, F232, Ly3 und A33 erreicht. Des Weiteren konnten die CTLs sowohl die HLA-A0201⁺/Antigen⁺ B-Zell-abgeleitete Lymphomzelllinie Ramos in [⁵¹Cr]-release Assays lysieren (absteigende Lyseeffizienz: R865, L41, I540, Ly2, A33, Ly3 und E555), als auch primäre naive unmodifizierte Antigen-positive B-CLL Zellen (absteigende Lyseeffizienz: CD23 (A33, L41), CD229 (Ly2, Ly4, Ly3) und hTERT (R865, E555, I540)). Diese Ergebnisse sprechen für eine endogene Präsentation und Immunogenität der verschiedenen Peptidantigene auf den B-CLL Zellen bzw. der Lymphomzelllinie. Auch die MHC-I-Restriktion konnte in diesen Experimenten belegt werden, da die Reaktionen in Anwesenheit des anti-MHC-I-Antikörpers W6/32 blockiert und gesunde HLA-A0201⁺ B-Zellen bzw. HLA-A0201⁺/Antigen⁻ und HLA-A0201⁻/Antigen⁺ Zellen nicht erkannt wurden. Diese Daten konnten für CD23 und Ly9 zusätzlich mit IFN- γ -ELISPOT Assays belegt werden. Hier zeigten die Peptide eine leicht andere Reihenfolge ihrer Immunogenität: F232 (4/5 B-CLL Proben, Median: 1166/100.000), Ly2 (4/5 getesteten B-CLL Proben, Median: 786/100.000), Ly4 (5/5 Patienten, Median: 420/100.000), L41 (4 aus 5, Median: 298/100.000), A33 (drei Proben aus fünf, Median: 416/100.000). HLA-A0201⁺ tonsilläre B-Zellen und PBMCs, wie auch HLA-A0201⁻/Antigen⁺ B-CLL Patienten wurden im Gegensatz nicht von den Antigen-spezifischen CTLs erkannt. Des Weiteren zeigte sich wie erwartet, dass die IFN- γ -Sekretion der spezifischen T-Zellen in Anwesenheit der Peptid-beladenen T2-Zellen, die ausschließlich die jeweiligen Peptide präsentierten, signifikant höher war, als in Gegenwart naiver B-CLL Zellen, die neben den Tumorantigenen auch andere endogene Peptide präsentierten. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen zum einen daran, dass es sich bei den generierten CD8⁺ T-Zellen um heterogene polyklonale Populationen handelt, und zum anderen an den „read-out“ Systemen ([⁵¹Cr]-release Assay (lytische CTL-Aktivität durch Perforin/Granzym B), IFN- γ -ELISPOT Assays (IFN- γ -Sekretion)), die unterschiedliche Mechanismen der T-Zellen abfragen. Dennoch lieferten beide Systeme den Beweis, dass die generierten CTLs funktional sind.

Die nonameren Peptide für die beiden potentiellen TAAs CD23 und CD229 wurden mittels Algorithmen identifiziert. Da die Vorhersage über Prozessierung und Bindung der Peptide nur theoretisch maximal ist, musste die Bindungskapazität der Peptide mittels T2-Bindungsassays untersucht werden. Die HLA-A0201-Bindung ist zwar eine Voraussetzung für ein antigenes Epitop, jedoch liefert deren Stärke keine Information über ihre Immunogenität oder deren tatsächliche natürliche Prozessierung. Durch die Reaktivität der T-Zellen gegen Peptid-beladene T2-Zellen konnte die Immunogenität gezeigt werden, die endogene

Prozessierung und Präsentation über die *in vitro* T-Zellstimulation in Anwesenheit von naiven und CD40L-aktivierten B-CLL Zellen. Ein Beispiel für die Diskrepanz zwischen Peptidbindung und Immunogenität stellt Ly4 dar, das eine schwächere Bindungskapazität verglichen mit Ly2 und Ly3 hat, jedoch eine vergleichbare Immunogenität und Präsentation bei den T-Zellstimulationen aufwies.

Insgesamt konnte der Beweis erbracht werden, dass hTERT-, CD23- und CD229-abstammende Epitope in ausreichender Menge auf HLA-A0201-Molekülen von primären B-CLL Zellen präsentiert werden und immunogen sind, da sie in der Lage sind, eine spezifische T-Zellantwort zu induzieren, was die Moleküle zu potentiell repräsentativen TAAAs bei der B-CLL macht (Rosenberg 1997).

5.1.2 Autologe T-Zellstimulation - naive B-CLL Zellen als APCs

Interessanterweise zeigte sich, dass B-CLL Zellen in der Lage waren, autologe T-Zellen zu expandieren, die spezifisch und funktionell waren für die drei Antigene. Zum einen, wies die IFN- γ -Sekretion der generierten CTLs von gesunden Individuen gegen naive unmodifizierte B-CLL Zellen auf eine HLA-A0201-restringierte und effiziente Peptidpräsentation auf den B-CLL Zellen in den IFN- γ -ELISPOT Assays hin (CD229: 66 bis 1500 Punkte, Median: 156/100.000 T-Zellen; hTERT: 67 bis 278 spezifische T-Zellen, Median: 221/100.000; CD23: 14 bis 330 Punkte; Median: 67/100.000 T-Zellen). Zum anderen konnten naive, unmodifizierte B-CLL Zellen als APCs autologe Antigen-spezifische T-Zellen von B-CLL Patienten expandieren. Dies wurde anhand einer T-Zellproliferation innerhalb 4 Wochen *in vitro* Stimulation in bis zu 5/11 getesteten Patienten gezeigt (Zunahme CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen: bis zu 7,5-fach). Nur Peptide, die endogen auf der Zelloberfläche von B-CLL Zellen präsentiert werden, können T-Zellen stimulieren. Diese Daten werden durch die HLA-A0201-Dimer/Peptid Färbung unterstützt, da bis zu 52,2% (CD229), 25,9% (hTERT) und 23,8% (CD23) der expandierten CD8⁺ T-Zellen die Antigen-abstammenden Peptide spezifisch in den HLA-A0201-Dimer/Peptidfärbungen erkannten und bis zu 1,5% (CD229), 0,28% (hTERT) und 0,33% (CD23) aller expandierten T-Zellen spezifisch gegen die Peptide der drei Antigene in den IFN- γ -ELISPOT Assays reagierten.

Der Unterschied in den Werten, die mit den beiden Methoden detektiert wurden resultiert aus den unterschiedlichen Prinzipien der HLA-A0201-Dimer/Peptid Färbung (phänotypische Messung der T-Zellen, die dasselbe Antigen-spezifische TCR-Motiv tragen) und dem IFN- γ -ELISPOT Assay (Identifizierung der funktionellen, IFN- γ -sezernierenden Antigen-spezifischen T-Zellen). Dies geht einher mit kürzlich veröffentlichten Studien, die gezeigt haben, dass nur ein kleiner Teil der T-Zellen, die positiv in der Dimerfärbung waren, auch im IFN- γ -ELISPOT Assay reagierten (Clay *et al* 2001).

In allen B-CLL Patienten, die auf ihre Stimulatorqualitäten in der autologen T-Zellstimulation getestet wurden, konnten hTERT-, CD229- und CD23-spezifische T-Zellen an Tag 0 in den Dimerfärbungen detektiert werden. Es konnte jedoch keine Vorläuferfrequenz gegen T2-Zellen oder naive B-CLL Zellen ohne eine Prästimulation der Patienten T-Zellen *in vitro* im IFN- γ -ELISPOT gefunden werden. Dies legt den Schluss nahe, dass Antigen-spezifische T-Zellen im peripheren Blut von B-CLL Patienten vorhanden waren, diese jedoch nicht auf den Kontakt mit ihren Antigenen IFN- γ sezernieren konnten. Ich stelle daher die Hypothese auf, dass diese T-Zellen keine naiven Vorläuferzellen waren, sondern bereits *in vivo* voraktiviert wurden. *In vivo* verbleiben diese in einem Ruhezustand, der durch die Stimulation unter *in vitro* Bedingungen überwunden wird. Die Unterschiede der erhobenen Daten sind auch hier durch die unterschiedlichen Detektionsmethoden begründet.

5.1.3 Autologe T-Zellstimulation - CD40L-stimulierten B-CLL Zellen als APCs

In den Experimenten, die aktivierte B-CLL Zellen als Stimulatoren prüfen sollten, wurde die APC-Kapazität der Tumorzellen durch eine Stimulation auf CD40L-exprimierenden Feeder-Zellen verstärkt, bevor sie mit den T-Lymphozyten koinkubiert wurden. Wie bereits beschrieben, kann dies die gestörte APC-Fähigkeit der naiven B-CLL Zellen durch die erhöhte Expression der Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle auf den B-CLL Zellen wiederherstellen (Kato *et al* 1998, Mayr *et al* 2005, Schultze *et al* 1997). Bei 6 bzw. 5/11 B-CLL Proben (55%; CD229 und CD23) bzw. 5/8 B-CLL Proben (63%; hTERT) waren naive B-CLL Zellen nicht in der Lage autologe T-Zellen zu expandieren, was auf ihre verminderte APC-Qualität zurückzuführen ist (Angelopoulou *et al* 1999, Jewell & Yong 1997). Diese Patientenproben wurden zusätzlich nach CD40L-Aktivierung der B-CLL Zellen in Hinblick auf eine mögliche autologe T-Zellexpansion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei den vier bzw. drei (CD229 bzw. CD23) untersuchten Patienten die Aktivierung der Stimulatorzellen in einer autologen T-Zellaktivierung und -expansion innerhalb 4 Wochen *in vitro* Stimulation resultierte. Im Falle von hTERT konnten bei fünf der untersuchten Patienten hTERT-spezifische CTL-Reaktionen gegen autologe, CD40L-aktivierte B-CLL Zellen erfolgreich stimuliert und expandiert werden. Des Weiteren wurden Proben untersucht, mit denen eine Stimulation mittels naiver B-CLL Zellen erfolgreich war. Mit naiven B-CLL Zellen als APCs (n = 2) wurden vor allem die Peptide E555 und R865 als antigene hTERT-Determinanten erkannt, bei den CD40L-aktivierten Zellen hauptsächlich I540. Man könnte annehmen, dass durch die Aktivierung der malignen Zellen mittels CD40L eine veränderte hTERT-Protein-/Peptidpräsentation aufgrund einer Verschiebung des immunogenen Profils der Zelle (z.B. Expression unterschiedlicher Splicevarianten je nach Aktivierungsstatus) zur Folge hat. Für die CD229- und CD23-Peptide zeigte sich, dass die Aktivierung der APCs durch die Feeder-Zellen keine Zunahme der T-Zellantwort erreichen konnte. Bei CD23 fiel diese

vergleichbar mit der der naiven B-CLL Zellen aus, für Ly9 eher geringer. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die maximale Peptidpräsentation der Antigene bereits auf den naiven B-CLL Zellen erreicht war und die Aktivierung der malignen B-Zellen zu keiner verstärkten Peptidpräsentation führte (bzw. zu einer reduzierten). Im Gegensatz dazu konnte durch exogene Zugabe der CD23-Peptide während der Stimulationsperiode die Zahl der CD23-spezifischen CTLs signifikant gesteigert werden.

Eine ineffiziente T-Zellstimulation in diesen Fällen konnte zum einen durch das verbesserte APC-Expressionsprofil der B-CLL Zellen ausgeschlossen werden (Abschnitt 4.2.4, **Abbildung 11**). Zum anderen, zeigte das Zytokinprofil der B-CLL Zellen nach CD40L-Stimulation eine signifikant höhere IFN- γ , TNF- α und IL-10 Sekretion im Vergleich zu den naiven Zellen, was ebenfalls auf eine effiziente CD40-Aktivierung hinweist (**Tabelle 16**).

In den restlichen untersuchten Fällen war es nicht möglich autologe T-Zellen zu expandieren, wahrscheinlich aufgrund größerer T-Zelldefekte bei diesen Patienten (Mayr *et al* 2006). Wie schon erwähnt, könnte ein möglicher Grund hierfür die ineffektive Aktivierung nach CD40L-Stimulation sein, die in ca. 10% aller B-CLL Fälle vorkommt (Granziero *et al* 2001, Scrivener *et al* 2001).

5.1.4 Naive B-CLL Zellen als APCs: Mögliche Mechanismen

Die erfolgreiche T-Zellexpansion in Gegenwart von naiven B-CLL Zellen bei den Patienten B-CLL11, 14, 16 bis 18 (mit Ausnahme von hTERT, bei dem nur B-CLL14, 16 und 18 in die Untersuchungen eingeschlossen wurden) stellte ein unerwartetes Phänomen dar. Die Frage stellte sich daher, in wieweit sich diese B-CLL Zellen von denjenigen unterschieden, bei denen keine T-Zellexpansion mit unmanipulierten B-CLL Zellen möglich war.

Es ist bekannt, dass naive, unmanipulierte B-CLL Zellen keine guten Antigen-präsentierenden Zellen darstellen. Eine mögliche Erklärung wäre ein Unterschied im APC-Profil der beiden Gruppen, jedoch war dieses in beiden vergleichbar niedrig (geringe Expression von ICAM-1 (CD58), LFA-3 (CD54)), B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86)).

In der Literatur ist beschrieben, dass B-CLL Zellen eine Reihe an verschiedenen Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- α , IL-4 und IL-2 sezernieren können (Ghia & Caligaris-Cappio 2000, Meinhardt *et al* 1999, Mu *et al* 1997, Scrivener *et al* 2003). Zytokinanalysen ergaben, dass IFN- γ und IL-6 von Patientenproben sezerniert wurden, bei denen eine T-Zellstimulation mit naiven B-CLL Zellen positiv war (**Tabelle 15**). Es ist bekannt, dass eine IFN- γ -Sekretion die Expression von MHC-Molekülen auf Tumorzellen induziert, was eine verbesserte Erkennung durch die T-Zellen ermöglicht (Propper *et al* 2003). Ferner bildet das von den B-CLL Zellen durch die IFN- γ -Sekretion vermittelte T_H1-Milieu eine Umgebung, die die T-Zellen besser stimulieren kann. In Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass eine höhere Ansprechrate auf immuntherapeutische Ansätze erzielt wurde, wenn bereits ein T_H1-Milieu

im Empfänger vorzufinden war (Ikeda *et al* 2004, Shankaran *et al* 2001). Dies könnte das Nichtansprechen der B-CLL T-Zellen *in vivo* erklären. So könnte eine mögliche Strategie dieses Defizit auszugleichen, die Etablierung eines T_H1-Milieus sein, vergleichbar mit meinem *in vitro* Ansatz, der zur T-Zellstimulation IL-2 und IL-7 verwendete. Es ist ebenfalls bekannt, dass B-CLL Zellen IL-6 sezernieren. Die Werte in der Gruppe, in der eine T-Zellexpansion mit naiven Zellen möglich war, waren erhöht im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Laut Literatur liegen die IL-6 Werte im Bereich bereits bekannter Studien (Lai *et al* 2002, Patten *et al* 2008). Dies lässt die Vermutung zu, dass diese B-CLL Zellen ein für die T-Zellen geeignetes Milieu zur Verfügung stellen konnten, die eine Proliferation förderte.

Autologe T-Zellen sind in der Lage, spezifisch einen antigenen Stimulus zu erkennen und darauf zu reagieren (Proliferation), der von ungepulsten naiven B-CLL Zellen vermittelt wird. Die MHC-Restriktion der T-Zellen bezüglich der antigenen Epitope ist eine Voraussetzung. Normalerweise werden T-Zellen, die reaktiv gegen Selbst-Antigene sind, im Thymus durch negative Selektion eliminiert (Kappler *et al* 1987). Jedoch ist dieser Prozess unvollständig und hinterlässt Niedrig-afide T-Zellen, die autoreaktiv sind gegen Selbstantigene (Stockinger 1999). Daher stelle ich die Hypothese auf, dass nach einer geeigneten Voraktivierung/Stimulation T-Zellen von B-CLL Patienten in der Lage sein sollten, spezifisch auf Antigene zu reagieren, die auch von B-CLL Zellen *in vivo* präsentiert werden.

Neben der Zytokinsekretion gibt es einen weiteren Erklärungsansatz für das Phänomen. Statt des klassischen CD28/B7-Kostimulationswegs müssen bei der B-CLL ein oder mehrere alternative Signalwege involviert sein, wie ICOS/LICOS, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD70 und CD26, die eine T-Zellaktivierung doch möglich machen. Diese Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorbekämpfung und der Immunität (Bauvois *et al* 1999, Bristol *et al* 1992, Palma *et al* 2004, Ranheim *et al* 1995, Tanaka *et al* 1993, Wallin *et al* 2001, Zuberek *et al* 2003).

5.2 Potential der Antigene hTERT, CD23 und CD229 in der Immuntherapie und Ausblick

5.2.1 Vergleich der untersuchten Antigene

In **Tabelle 17** sind die Experimente der *in vitro* CTL-Generierung der elf untersuchten B-CLL Patienten in Gegenwart autologer naiver und CD40L-aktivierter B-CLL Zellen gegen die drei Antigene hTERT, CD229 und CD23 zusammengefasst. Wie schon erwähnt, lassen sich die untersuchten Patienten anhand der CTL-Generierung in Anwesenheit der verschiedenen Stimulatorzellen (naive, unbeladene CD40L-aktivierte (CD40L-U) und Peptid-beladene CD40L-aktivierte (CD40L-P) B-CLL Zellen) in 3 Gruppen einteilen: (I) erfolgreiche CTL-

Generierung mit naiven und CD40L-U B-CLL Zellen (B-CLL11, 14, 16 - 18), (II) erfolgreiche CTL-Generierung nur in Gegenwart von CD40L-U und CD40L-P B-CLL Zellen (B-CLL2, 3, 6, 12) und (III) keine CTL-Generierung (B-CLL7, 15). Wie in den vorhergehenden Abschnitten diskutiert, fand die Unterteilung anhand dieser Patientencharakteristika statt.

Für die Evaluierung des möglichen Potentials der drei untersuchten Antigene ist nicht nur die Quantität der Patienten entscheidend (T-Zellreaktionen in 69% (CD229), 39% (CD23) und 33% (hTERT)), sondern auch die Qualität der generierten T-Zellantworten. In **Tabelle 18** sind die Reaktivitäten der autologen T-Zellen nach *in vitro* Stimulation zusammengefasst. Anhand der Anzahl und Häufigkeit der detektierten Antigen-spezifischen T-Zellen für jedes Peptid zeigt sich, dass CD229 das Antigen mit dem größten Potential darstellt, gefolgt von CD23. hTERT bildet das Schlusslicht, u.a. bedingt durch die geringe Zahl der getesteten Fälle. Für die beiden „neuen“ Antigene erwiesen sich Ly2 (CD229) und L41 (CD23) als die Peptide mit dem größten immunogenen Potential. Insgesamt wurde eine höhere T-Zellantwort mit naiven B-CLL Zellen detektiert, was ebenfalls an der Qualität der B-CLL Zellen zu liegen schien und in Analogie zu den erhobenen Expressionsdaten steht.

In den meisten Veröffentlichungen wurden vor allem intrazelluläre Proteine auf ihre Antigenität untersucht und nur wenige Publikationen beschäftigten sich mit Oberflächenmolekülen als Antigene (z.B. CD19, CD20, CD168; Giannopoulos *et al* 2006, Grube *et al* 2004, Voss *et al* 2000). Anhand der beiden Oberflächenmoleküle CD229 und CD23 konnte hier gezeigt werden, dass auch diese als TAAs ein gutes Potential haben, z.T. ein höheres, als ein intrazelluläres Antigen, wie z.B. hTERT in meinem Fall.

CD23 ist ein wichtiges Schlüssel-molekül bei der B-Zellaktivierung und beim B-Zellwachstum, das bei der B-CLL überexprimiert und in die Proliferation der leukämischen B-Zellen involviert ist (Fournier *et al* 1994, Sarfati *et al* 1993). Die Identifizierung von CD23-entstammenden Peptiden als TAAs bei der B-CLL öffnet einige neue Wege, dieses Molekül für therapeutische Eingriffe bei dieser Krankheit einzusetzen. Neben den laufenden klinischen Testphasen, die den ersten gegen das Oberflächen-CD23 gerichtete monoklonalen Antikörper Lumiliximab (IDEC-152) testen (Cheson 2006), sollen adoptive T-Zellstrategien untersucht werden, die CD23-Peptid-spezifische T-Zellen verwenden. Neben der T-Zell-expansion von CD23-spezifischen CTLs könnten auch chimäre T-Zellrezeptoren, die selektiv CD23-entstammende Peptidepitope erkennen, eine vielversprechende Alternative darstellen. Dies wurde schon für andere Tumorantigene gezeigt, bei denen eine potente Anti-Tumorantwort demonstriert werden konnte (Hombach *et al* 1998 & 1999). Ferner würden humane rekombinante Antikörper mit MHC-restringierten T-Zellrezeptoren ähnlicher Spezifität, die CD23-abstammende Peptide erkennen, das Spektrum therapeutischer Möglichkeiten erweitern. Für einige andere Tumorantigene, wie zum Beispiel das Melanom-differenzierungsantigen gp100 und auch hTERT, wurden bereits solche Antikörper

entwickelt, die diese Tumor-assoziierten MHC-Peptidkomplexe mit der gleichen Spezifität wie der T-Zellantigenrezeptor erkannten (Denkberg *et al* 2002, Lev *et al* 2002). Nicht zuletzt könnte eine CD23-spezifische T-Zellantwort auch für ein Immunmonitoring einer Antigen-spezifischen T-Zellinduktion im Kontext von Vakzinierungsstrategien ausgenutzt werden, die CD40L-stimulierte oder CD40L-transduzierte B-CLL Zellen verwenden (Wierda *et al* 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Einsatz von CD40L-transduzierten B-CLL Zellen eine signifikant höhere T-Zellantwort im Vergleich zu CD40L-stimulierten B-CLL Zellen induzieren konnten, wobei mehrere B-CLL-assoziierte Tumorantigene (Fibromodulin, MDM2, Survivin, p53 und KW-13) analysiert wurden (Mayr (1) *et al* 2005).

In Bezug auf die B-CLL ist CD229 nur wenig untersucht. Die Daten in dieser Arbeit zeigten, dass Ly9 bei der B-CLL eine größere Relevanz hat, als bislang angenommen. Die Identifizierung von CD229-entstammenden Peptiden als TAAs bei der B-CLL öffnet auch hier einige neue Wege, dieses Molekül für therapeutische Eingriffe bei dieser Krankheit einzusetzen. Obwohl die Funktion von CD229 noch unklar ist, sind andere Mitglieder der SLAM-Familie (d.h. CD2, CD48, CD58 und CD150) in die Adhäsionsreaktionen zwischen T-Zellen und akzessorischen Zellen durch homophile Interaktionen miteinander involviert und fungieren als Liganden oder Rezeptoren (Fraser *et al* 2002, Rudd *et al* 1999, Sandrin *et al* 1996). Des Weiteren fungieren Mitglieder der CD150-Familie als Kostimulationsmoleküle, regulieren die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität. Es wurde gezeigt, dass CD150 als Koaktivator auf T- und B-Zellen agiert und hohe Werte an CD150 auf T_H1-Zellen bei Mäusen zu finden waren (Wang *et al* 2001). So könnte eine verstärkte CD229-Expression auf den B-CLL Zellen einen Einfluss auf die Expression der anderen SLAM-Mitglieder, wie z.B. CD48 oder CD150, zur Folge haben, was in einer T-Zellaktivierung resultieren könnte (Graham *et al* 2006).

In vitro konnten hTERT-spezifische T-Zellen gegen Tumoren verschiedenen Ursprungs generiert werden (Arai *et al* 2001, Minev *et al* 2000, Schreurs *et al* 2005, Schroers *et al* 2002; Vonderheide *et al* 1999 & 2001). Besondere Beachtung erfährt dabei das auch hier untersuchte HLA-A0201-restringierte Peptid I540, da es das als erstes *in vitro* definierte immunogene hTERT-Peptid darstellt. Das Potential dieses Peptids wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wurde beschrieben, dass Vakzinierungen von Krebspatienten mit I540 funktionale Anti-Tumor CD8⁺ T-Zellen in diesen Patienten induzieren konnten (Brust- und Prostatakarzinom; metastasiertes Prostatakarzinom; Nicht-kleines Lungenkarzinom; Brunsvig *et al* 2006, Su *et al* 2005, Vonderheide *et al* 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in den meisten Krebspatienten I540-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten zirkulieren (Filaci *et al* 2006). Im Gegensatz dazu gibt es andere Studien aus denen hervorgeht, dass I540 nicht auf der Oberfläche von Tumorzellen (Melanom und Kolon) präsentiert wird (Ayyoub *et al* 2001) und dass Immunisierungen von Krebspatienten mit

diesem Peptid spezifische T-Zellen induzierten, die die Tumorzellen *in vivo* nicht erkannten (Parkhurst *et al* 2004, Purbhoo *et al* 2007). In Analogie zu diesen Daten lassen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zum einen den Schluss zu, dass I540 eher nicht die Erwartungen erfüllen kann als TAA bei der B-CLL zu fungieren, und zum anderen weshalb wahrscheinlich bis dato nur klinische Studien bei soliden Tumoren durchgeführt wurden und nicht bei Lymphom- oder Leukämiepatienten.

Probe	CD229		CD23			hTERT	
	Naive B-CLL Zellen	CD40L-U B-CLL Zellen	Naive B-CLL Zellen	CD40L-U B-CLL Zellen	CD40L-P B-CLL Zellen	Naive B-CLL Zellen	CD40L-U B-CLL Zellen
B-CLL11	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
B-CLL14	+	+	+	+	n.d.	+	+
B-CLL16	+	+	+	+	n.d.	+	+
B-CLL17	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
B-CLL18	+	+	+	+	n.d.	+	n.d.
B-CLL2	-	+	-	+	+	-	+
B-CLL3	-	+	-	n.d.	n.d.	-	+
B-CLL6	-	+	-	+	+	n.d.	n.d.
B-CLL12	-	+	-	+	+	-	+
B-CLL7	-	-	-	-	n.d.	-	-
B-CLL15	-	-	-	-	n.d.	-	-

Tabelle 16. Zusammenfassung der *in vitro* CTL-Generierung gegen CD229, CD23 und hTERT in Gegenwart von naiven und CD40L-stimulierten B-CLL Zellen. CD40L-U = unbeladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen; CD40L-P = Peptid-beladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen; n.d. = nicht detektiert; + = erfolgreiche CTL-Generierung; - = keine CTL-Generierung.

Probe	CD229		CD23			hTERT	
	naiv	CD40L-U	naiv	CD40L-U	CD40L-P	naiv	CD40L-U
B-CLL11	Ly2 125 Ly3 125 Ly4 130	Ly3 10 Ly4 35	L41 49	A33 36 F232 100	n.d.	n.d.	n.d.
B-CLL14	Ly2 233 Ly3 167 Ly4 100	Ly2 31 Ly4 7	L41 149 A33 115 F232 33	F232 30	n.d.	E555 200 R865 67	I540 88 I540 167
B-CLL16	Ly2 238 Ly3 161 Ly4 296	Ly2 38	L41 258 A33 330	L41 35 F232 59	n.d.	R865 278	
B-CLL17	Ly2 1000 Ly3 1500	n.d.	M3 14	L41 331 F232 534	n.d.	n.d.	n.d.
B-CLL18	Ly2 151 Ly3 77 Ly4 66	Ly2 18 Ly4 72	A33 84	L41 100 F232 17	n.d.	E555 242	n.d.
B-CLL2	-	Ly2 15 Ly3 456 Ly4 55	-	L41 58	L41 98 A33 67	-	I540 68
B-CLL3	-	Ly2 20	-	n.d.	n.d.	-	I540 117 E555 58
B-CLL6	-	Ly2 46	-	A33 23	A33 53 F232 154	n.d.	n.d.
B-CLL12	-	Ly3 71	-	A33 25	A33 212 F232 114	-	I540 241

Tabelle 17. Zusammenfassung der *in vitro* CTL-Reaktivitäten gegen die CD229-, CD23- und hTERT-abstammenden Peptide in Gegenwart von naiven und CD40L-stimulierten B-CLL Zellen (IFN- γ -ELISPOT). CD40L-U = unbeladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen; CD40L-P = Peptid-beladene CD40L-aktivierte B-CLL Zellen; n.d. = nicht detektiert.

5.2.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente liefern starke Beweise dafür, dass sich vor allem CD229 und CD23 als neue TAAs für das Design von T-Zellbasierten immuntherapeutischen Strategien, wie klinische Vakzinierungen oder adoptiven T-Zelltransfer von CD229- bzw. CD23-exprimierenden Erkrankungen, insbesondere der B-CLL, eignen.

Bevor jedoch eine klinische Anwendung in Betracht gezogen werden kann, müssten noch größere Patientenzahlen auf die Generierbarkeit von autogenen CD8⁺ T-Zellen mit verschiedenen APCs untersucht und die Stimulation der T-Zellen optimiert werden. Des Weiteren könnte durch den gleichzeitigen Einsatz von CD229- und CD23-spezifischen T-Zellen eine breitere und effektivere T-Zellantwort erzielt werden. Für weitere Studien könnte die Effektivität der T-Zellaktivierung durch die Verwendung von Peptidmischen der

jeweiligen Antigene gesteigert werden. Die bislang favorisierten HLA-A0201-restringierten hTERT-Peptide, v.a. I540, scheinen jedoch nicht ganz die Erwartungen erfüllen zu können. Die katalytische Untereinheit der Telomerase stellt in Bezug auf die B-CLL jedoch immer noch ein vielversprechendes Tumorantigen da. Neu identifizierte, MHC-I-restringierte Peptide können vielleicht in naher Zukunft die Anforderungen besser erfüllen.

6 Zusammenfassung

Eine kritische Voraussetzung für eine effektive Krebstherapie stellt die Identifizierung von Tumor-spezifischen oder Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) dar. Diese Antigene sollten Peptidsequenzen besitzen, die an MHC-Moleküle binden. Auch sollten diese von Tumorzellen prozessiert und auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Ein weiteres TAA-Kriterium stellt die Überexpression im Tumor dar, was eine Erkennung durch T-Zellen ermöglicht und folglich eine Tumor-spezifische Immunantwort nach sich ziehen soll.

Bei der B-chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) wurden bislang nur wenige Tumorantigene identifiziert, die als potentielle Zielstrukturen für eine Generierung einer spezifischen T-Zellantwort in Frage kommen. Daher sind die Bestrebungen groß, neue B-CLL-assoziierte Antigene zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden die Moleküle hTERT, CD23 und CD229 hinsichtlich ihrer Möglichkeiten untersucht, als TAAs bei der B-CLL zu fungieren. Die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), stellt ein universelles Tumorantigen dar, das in einer Vielzahl verschiedener Krebstypen, einschließlich hämatopoetischer Erkrankungen, exprimiert wird, jedoch nicht oder nur in geringem Maße bei adulten, gesunden, differenzierten Zellen detektierbar ist. Der humane Niedrig-Affinitätsrezeptor für IgE, auch bekannt als CD23, ist auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen zu finden. Bei der B-CLL wird CD23 konstitutiv exprimiert und atypisch auf den malignen B-Zellen reguliert im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten. Dies hat eine starke Überexpression des Moleküls zur Folge. Das Humane Ly9 oder CD229, das Homolog zum murinen Ly9, ist ein Mitglied der SLAM- (signaling lymphocyte activation molecule) Familie, die Signalrezeptoren repräsentieren. CD229 interagiert mit Antigen-spezifischen Rezeptoren und vermittelt so die Zelladhäsion zwischen Lymphozyten und anderen Zellen. Die Überexpression von CD229 auf hämatopoetischen Zellen wurde in einer Publikation beschrieben, die gezeigt hat, dass 12/15 B-CLL Patienten positiv für das Molekül waren.

Ein Merkmal eines Tumorantigens/TAAs stellt die Überexpression in einem Tumor im Vergleich zum Normalgewebe dar. Alle drei Antigene wurden bezüglich ihres Expressionsprofils untersucht, und es konnte eine eindeutige Überexpression verglichen mit normalen Zellen nachgewiesen werden (RT-PCR, FACS-Analysen). Die Immunogenität und MHC-Restriktion (hier HLA-A0201) der ausgewählten Peptide wurde mit Hilfe *in vitro* generierter zytotoxischer T-Zellen (CTLs) von gesunden Spendern gezeigt, die Antigen-spezifisch durch Stimulation mit autologen, Peptid-beladenen Dendritischen Zellen (DCs) expandiert wurden. Die endogene Prozessierung und Präsentation der potentiellen Tumorantigene, genauer der verschiedenen hTERT-, CD23- und CD229-entstammenden Peptide, konnte mit Hilfe Antigen-spezifischer CTLs von gesunden Spendern nachgewiesen werden, da diese spezifisch die HLA-A0201⁺ B-Zell-abstammende Zelllinie Ramos, HLA-A0201⁺ naive B-CLL

Zellen und Peptid-beladene T2-Zellen in MHC-I-restringierter Weise erkannten (IFN- γ -ELISPOT Assays, [^{51}Cr]-release Assay). Diese Experimente lassen auf eine natürliche Prozessierung und Präsentation der hTERT-, CD23- und CD229-entstammenden Peptide via HLA-A0201 auf den B-CLL Zellen schließen. Des Weiteren konnten autologe hTERT-, CD23- and CD229-spezifische T-Zellen von B-CLL Patienten in Gegenwart von autologen CD40L-aktivierten B-CLL Zellen und interessanterweise auch durch autologe, naive, maligne B-Zellen expandiert werden, die einen deutlichen Anti-leukämischen Effekt zeigten (IFN- γ -ELISPOT Assays, Dimerfärbungen). Ein möglicher Grund für die Generierung einer T-Zellantwort mit autologen naiven B-CLL Zellen als Stimulatoren scheinen das von den B-CLL Zellen vermittelte Mikromilieu (Zytokinprofil) darzustellen.

Anhand der Quantität und Qualität der erzielten CTL-Reaktivitäten gegen die drei unterschiedlichen Moleküle zeigte sich, dass vor allem die Oberflächenmoleküle CD229 und CD23 als neue TAAs bei der B-CLL geeignet scheinen. hTERT ist ebenfalls in der Lage, eine Antigen-spezifische T-Zellreaktion zu induzieren, jedoch mit geringerer Effizienz.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD229 und CD23 natürlich prozessiert und als TAAs bei der B-CLL präsentiert werden, die die Expansion autologer Tumor-spezifischer T-Zellen erlauben. Daher stellen sie geeignete Zielstrukturen für T-Zellbasierte, immuntherapeutische Strategien und ein Immunmonitoring bei dieser hämatologischen Erkrankung dar. Für hTERT gilt dies jedoch nur bedingt.

7

Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AICD	Activation Induced Cell Death
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell
ATCC	American Type Culture Collection
B-CLL	B-Chronisch Lymphatische Leukämie
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolxylphosphat
β_2 M	beta ₂ -Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCS	Zellkulturüberstand
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	Kodierende Sequenz
⁵¹ Cr	Chrom-51
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CyA	Cyclosporin A
DC	Dendritische Zelle
σ	Standardabweichung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ds	double-stranded
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fas	CD95/APO-1
FasL	Fas-Ligand
FCS	Foetales Kälberserum
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
°C	Grad Celsius
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Gy	Gray
h	Stunde
hCD40L	humaner CD40-Ligand
HLA	Human lymphocyte antigen
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
hTERT	humane Telomerase Reverse Transcriptase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICOS	Inducible co-stimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
λ	lambda, Wellenlänge in nm
l	Liter
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
M	molar
MACS	Magnetic cell sorting system
mAk	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
μ l	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter

mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
NaAc	Natrimacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PC-5	Phycoerythrin cyanine 5
PCR	Polymerase chain reaction
p(dN) ₆	Random primer bestehend aus sechs dNTPs
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
%	Prozent
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
sec	Sekunde
ss	single-stranded
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Transporter associated with antigen-processing
TCR	T-Zell Rezeptor
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumor necrosis factor
U	Unit (Einheit für Enzymaktivitäten)
V	Volt
w/v	Weight per volume

8 Literatur

- Adhikary D, Behrends U, Boerschmann H, Pfünder A, Burdach S, Moosmann A, Witter K, Bornkamm GW, Mautner J. Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. PLoS ONE. 2007; 2: e583.
- Agular-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to *in vitro* survival and clinical progression. Int J Cancer. 1996; 69: 114-119.
- Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. Cancer Immunol Immunother. 2004; 53: 844-854.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature. 1998; 392: 86-89.
- Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, Minuzzo S, Vallario A, Zamarchi R, Fregonese A, Calderazzo F, Faldella A, Aragno M, Camaschella C, Amadori A, Caligaris-Cappio F. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999; 93: 2327-2335.
- Allen DC, Foster H, Orchin JC, Biggart JD. Immunohistochemical staining of colorectal tissues with monoclonal antibodies to ras oncogene p21 product and carbohydrate determinant antigen 19-9. J Clin Pathol. 1987; 40: 157-162.
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science. 1996; 274: 94-96.
- Andersen MH & Thor SP. Survivin - a universal tumor antigen. Histol Histopathol. 2002; 17: 669-675.
- Anderson WF. Human gene therapy. Nature. 1998; 392: 25-30.
- Anether G, Marschitz I, Tinhofer I, Greil R. Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD154 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002; 99: 722-723.
- Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pangalis GA. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. Semin Hematol. 1999; 36: 178-197.
- Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. Blood. 2001; 97: 2903-2907.
- Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, et al. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. Eur J Immunol. 2001; 31: 2642-2651.

- Baccarani M, Cavo M, Gobbi M, Lauria F, Tura S. Staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1982; 59: 1191-1196.
- Bachmann MF, Sebзда E, Kundig TM, Shahinian A, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS. T cell responses are governed by avidity and costimulatory thresholds. *Eur J Immunol*. 1996; 26: 2017-2022.
- Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol*. 1998; 160: 5239-5245.
- Batata A & Shen B. Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia: A study of 242 cases. *Cancer*. 1992; 70: 2436-2443.
- Bauvois B, De Meester I, Dumont J, Rouillard D, Zhao HX, Bosmans E. Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*. 1999; 79: 1042-1048.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr Biol*. 1998; 8: 177-180.
- Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, Benko FA, Sternas LA, Pennington R, Watson TM, Reynolds CW, Gause BL, Duffey PL, Jaffe ES, Creekmore SP, Longo DL, Kwak LW. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med*. 1999; 5: 1171-1177.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature*. 1998; 393: 478-480.
- Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+ CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005; 106: 2018-2025.
- Biagi E, Marin V, Giordano Attianese GM, Dander E, D'Amico G, Biondi A. Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2007; 92: 381-388.
- Biagi E, Yvon E, Dotti G, Amrolia PJ, Takahashi S, Popat U, Marini F, Andreeff M, Brenner MK, Rousseau RF. Bystander transfer of functional human CD40 ligand from gene-modified fibroblasts to B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Hum Gene Ther*. 2003; 14: 545-559.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piquet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, BElabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic

- lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198-206.
- Blackburn EH. Telomerases. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61: 113-129.
- Bohlen H, Hopff T, Manzke O, Engert A, Kube D, Wickramanayake PD, Diehl V, Tesch H. Lysis of malignant B cells from patients with B-chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells activated with CD3 x CD19 bispecific antibodies in combination with bivalent CD28 antibodies. *Blood*. 1993; 82: 1803-1812.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*. 1997; 276: 1719-1724.
- Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altes A, Besalduch J, Ribera JM, Montserrat E. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone on the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*. 2002; 119: 976-984.
- Bristol LA, Sakaguchi K, Appella E, Doyle D, Takacs L. Thymocyte costimulation antigen is CD26 (dipeptidyl peptidase IV). Costimulation of granulocyte, macrophage, and T lineage cell proliferation via CD26. *J Immunol*. 1992; 149: 367-372.
- Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, et al. Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55: 1553-1564.
- Bubenik J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? Review. *Int J Oncol*. 2004; 25: 487-491.
- Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood*. 1999; 93: 1992-2002.
- Buhmann R, Simoes B, Stanglmaier M, Yang T, Faltin M, Bund D, Lindhofer H, Kolb HJ. Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2009; 43: 383-397.
- Caligaris-Cappio F & Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 399-408.
- Caligaris-Cappio F, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoret MG, Ghia P, Bertero MT, Novarino A, Bergui L. The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 1993; 19: 601-613.

- Caligaris-Cappio F, Granziero L, Geuna M, Guida G, Gottardi R, Ghia P. Towards a better understanding of the biology of B-chronic lymphocytic leukaemia. In Sixth Meeting of the European Haematology Association Educational Book. 2001; 102-106.
- Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: A malignancy of anti-self B-cells. *Blood*. 1996; 87: 2615-2620.
- Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Med*. 1997; 3: 984-989.
- Cantwell MJ, Sharma S, Friedmann T, Kipps TJ. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1996; 88: 4676-4683.
- Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996; 184: 863-871.
- Carreno BM & Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 29-53.
- Carter LL, Zhang X, Dubey C, Rogers P, Tsui L, Swain SL. Regulation of T cell subsets from naïve to memory. 1998; 21: 181-187.
- Catovsky D, Fooks J, Richard S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia – the importance of age, sex, and response to treatment and survival. A report from the MRC CLL1 trial. *Br J Haematol*. 1989; 72: 141-149.
- Catovsky D. Immunophenotypic analysis of chronic lymphoid leukemias. *Rev Clin Exp Hematol*. 1997; 1: 3-14.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. *J Exp Med*. 1994; 180: 1263-1272.
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 565-594.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 4609-4614.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National cancer institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996; 87: 4990-4997.
- Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55: 188-196.

- Cheson BD. Therapy for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia: A reevaluation. *Sem. Hematol.* 1998; 35: 14-21.
- Chiorazzi N & Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 841-894.
- Christian BA & Lin TS. Antibody Therapy for CLL. *Semin Hematol.* 2008; 45: 95-103. Review.
- Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1127-1135.
- Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood.* 1998; 91: 4342-4349.
- Crespo M, Vosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman MI, Marce S, Lopez Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1764-1775.
- Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymph.* 1999; 33: 33-45.
- Crossen PE. Genes and chromosomes in chronic B-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997; 94: 44-51.
- Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature.* 2003; 421: 282-287.
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 1992; 256: 1550-1552.
- Czar MJ, Kersh EN, Mijares LA, Lanier G, Lewis J, Yap G, Chen A, Sher A, Duckett CS, Ahmed R, Schwartzberg PL. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 7449-7454.
- Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods.* 1988; 110: 29-36.
- Dal Porto JD, Johansen TE, Catipovic B, Parfiit DJ, Tuveson D, Gether U, Kozlowski S, Fearon DT, Schneck JP. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T-cells at nanomolar concentrations. *PNAS.* 1993; 90: 6671-6675.

- Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007; 110: 3352-3359.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen S, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman S, Schulman P, Vinciguerra V, Rai K, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1840-1847.
- De la Fuente MA, Tovar V, Villamor N, Zapater N, Pizcueta P, Campo E, Bosch J, Engel P. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood*. 2001; 97: 3513-3520.
- De Lange T. Telomeres and senescence: ending the debate. *Science*. 1998; 279: 334-335.
- De Lima M, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in the young patient. *Semin Oncol*. 1998; 25: 107-127.
- De Rossi G, Zarcone D, Mauro F, Cerruti G, Tenca C, Puccetti A, Mandelli F, Grossi CE. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood*. 1993; 81: 2679-2687.
- Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Omedé P, Scatolini M, Jaksic O, Chiorino G, Efremov D, Malavasi F. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007; 110: 4012-4021.
- Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *PNAS*. 1998; 95: 8245-8250.
- Denkberg G, Cohen CJ, Lev A, Chames P, Hoogenboom HR, Reiter Y. Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 9421-9426.
- Di de Totero D, Piazza T, Fabbi M, Ferrini S. Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2007; 56: 1323-1334.
- Di Somma MM, Somma F, Montani MS, Mangiacasale R, Cundari E, Piccolella E. TCR engagement regulates differential responsiveness of human memory T cells to Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J Immunol*. 1999; 162: 3851-3858.
- Dighiero G & Binet JL. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther*. 1996; 38: 41-61.
- Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet J, Travarde P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med*. 1998; 338: 1506-1514.

- Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580-1589.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med*. 2000; 343: 1910-1916.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. 1999; 77: 266-281.
- Domingo A, González-Barca E, Castellsagué X, Fernandez-Sevilla A, Grañena A, Crespo N, Ferrán C. Expression of adhesion molecules in 113 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship with clinico-prognostic features. *Leuk Res*. 1997; 21: 67-73.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *PNAS*. 1993; 90: 3539-3543.
- Dreger P & Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk*. 2002; 16: 985-992.
- Drenou B, Le Friec G, Bernard M, Pangault C, Grosset JM, Lamy T, Fauchet R, Amiot L. Major histocompatibility complex abnormalities in non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*. 2002; 119: 417-424.
- Eisterer W, Hilbe W, Stauder R, Bechter O, Fend F, Thaler J. An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br J Haematol*. 1996; 93: 661-669.
- el-Mahdani N, Vaillant JC, Guiguet M, Prevot S, Bertrand V, Bernard C, Parc R, Bereziat G, Hermelin B. Overexpression of p53 mRNA in colorectal cancer and its relationship to p53 gene mutation. *Br J Cancer*. 1997; 75: 528-536.
- Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 813-821. Review.
- Esser MT, Haverstick DM, Fuller CL, Gullo CA, Braciale VL. Ca²⁺ signalling modulates cytolytic T lymphocyte effector functions. *J Exp Med*. 1998; 187: 1057-1067.
- Eynon EE & Parker DC. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med*. 1992; 175: 131-138.
- FCLLG = French cooperative group on chronic lymphocytic leukemia, Johnson S, Smith AG, Löffler H, Ösby E, Juliusson G, Emmerich B, Wyld PJ, Hiddemann W. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicine

- and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*. 1996; 347: 1432-1438.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995; 269: 1236-1241.
- Filaci G, Fravega M, Setti M, Traverso P, Millo E, Fenoglio D, Negrini S, Ferrera F, Romagnoli A, Basso M, Contini P, Rizzi M, Ghio M, Benatti U, Damonte G, Ravetti JL, Carmignani G, Zanetti M, Indiveri F. Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood*. 2006; 107: 1505-1512.
- Fisch P, Meuer E, Pende D, Rothenfusser S, Viale O, Kock S, Ferrone S, Fradelizi D, Klein G, Moretta L, Rammensee HG, Boon T, Coulie P, van der Bruggen P. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 3368-3379.
- Foa R, Giovarelli M, Fierro MT, Bonferroni M, Forni G. Autocrine or paracrine models of cytokine production and utilization in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1988; 30: 339-341.
- Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med*. 1996; 2: 167-168.
- Foster AE, Brenner MK, Dotti G. Adoptive T-cell immunotherapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008; 21: 375-389.
- Fournier S, Delespesse G, Rubio M, Biron G, Sarfati M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1992; 89: 1312-1321.
- Fournier S, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Role for low-affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukemic B-cell proliferation. *Blood*. 1994; 84: 1881-1886.
- Francia Di Celle P, Mariani S, Riera L, Stacchini A, Reato G, Foa R. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*. 1996 87: 4382-4389.
- Fraser CC, Howie D, Morra M, Qiu Y, Murphy C, Shen Q, Gutierrez-Ramos JC, Coyle A, Kingsbury GA, Terhorst C. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics*. 2002; 53: 843-850.
- Freedman AS. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990; 4: 405-429.
- Frolkis M, Fischer MB, Wang Z, Lebkowski JS, Chiu CP, Majumdar AS. Dendritic cells reconstituted with human telomerase gene induce potent cytotoxic T-cell response against different types of tumors. *Cancer Gene Ther*. 2003; 10: 239-249.

- Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, von Kooten C, Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med*. 1995; 182: 1265-1273.
- Gatfield J, Lammert E, Nickolaus P, Münz C, Rothenfusser S, Fisch P, Stevanović S, Schild H, Rammensee HG, Arnold D. Cell lines transfected with the TAP inhibitor ICP47 allow testing peptide binding to a variety of HLA class I molecules. *Int Immunol*. 1998; 10:1665-1672.
- Geary WA, Frierson HF, Innes DJ, Normansell DE. Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol*. 1993; 6: 155-161.
- Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, Tinggaard-Pedersen N, Hansen MM, Hansen NE, Holm M, Christensen BE, Drivsholm A, Nielsen JB, Thorling K, Andersen E, Larsen JK, Anderson PK. The bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. *Eur J Haematol*. 1996; 57: 292-300.
- Ghia P & Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*. 2000; 79: 157-173.
- Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, Scielzo C, Caligaris-Cappio F. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003; 101: 1262-1269.
- Giannopoulos K & Schmitt M. Targets and strategies for T-cell based vaccines in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47: 2028-2036.
- Giannopoulos K, Li L, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Dmoszynska A, Hus I, Greiner J, Renner C, Döhner H, Schmitt M. Expression of RHAMM/CD168 and other tumor-associated antigens in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Oncol*. 2006; 29: 95-103.
- Gitelson E, Hammond C, Mena J, Lorenzo M, Buckstein R, Berinstein NL, Imrie K, Spaner DE. Chronic lymphocytic leukemia-reactive T-cells during disease progression and after autologous tumor cell vaccines. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 1656-1665.
- Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab *in vitro*: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. 2000; 95: 3900-3908.
- Goller ME, Kneitz C, Mehringer C, Muller K, Jelley-Gibbs DM, Gosselin EJ, Wilhelm M, Tony HP. Regulation of CD23 isoforms on B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2002; 26: 795-802.
- Gordan JD & Vonderheide RH. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy*. 2002; 4: 317-327.

- Gottardi D, Alfarano A, De Leo AM, Stacchini A, Aragno M, Rigo A, Veneri D, Zanotti R, Pizzolo G, Caligaris-Cappio F. In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br J Haematol.* 1996; 94: 612-618.
- Graham DB, Bell MP, McCausland MM, Huntoon CJ, van Deursen J, Faubion WA, Crotty S, McKean DJ. Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol.* 2006; 176: 291-300. Erratum in: *J Immunol.* 2006; 176: 3841.
- Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001; 97: 2777-2783.
- Greider CW & Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am.* 1996; 274: 92-97.
- Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation and cancer. *PNAS.* 1998; 95: 90-92.
- Greider CW. Telomerase biochemistry and regulation. In *Telomeres*, Blackburn EH, Greider CW (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1995; 35-68.
- Grewal IS & Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 111-135.
- Gricks CS, Zahrieh D, Zauls AJ, Gorgun G, Drandi D, Mauerer K, Neuberg D, Gribben JG. Differential regulation of gene expression following CD40 activation of leukemic compared to healthy B cells. *Blood.* 2004; 104: 4002-4009.
- Grossman Z & Singer A. Tuning of activation thresholds explains flexibility in the selection and development of T cells in the thymus. *PNAS.* 1996; 93: 14747-14752.
- Grube M, Rezvani K, Wiestner A, Fujiwara H, Sconocchia G, Melenhorst JJ, Hensel N, Marti GE, Kwak LW, Wilson W, Barrett JA. Autoreactive, cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from normal B-cell differentiation antigens in healthy individuals and patients with B-cell malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1047-1056.
- Guerder S & Matzinger P. A fail-safe mechanism for maintaining self tolerance. *J Exp Med.* 1992; 176: 553-564.
- Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia.* 2007; 21: 2442-2451.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas

- (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 1996; 274: 1363-1366.
- Hallek M (1), Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 93: 1732-1737.
- Hallek M (German CLL Study Group). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*. 2008; 19: 51-53. Review.
- Hallek M, Bergmann M, Brittinger G, Döhner H, Dreger P, Herold M, Hopfinger G, Jäger U, Knauf W, Nerl C, Rummel M, Schmitt B, Wendtner CM, Emmerich B. „Chronische lymphatische Leukämie und verwandte Leukämien: aktuelle Therapiekonzepte“. *Internist*. 2002; 43: 1245-1254.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D *et al*. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008.
- Hallek M, Schmitt B, Emmerich B, Stein H. Chronische lymphatische Leukämie: Wandel der diagnostischen und therapeutischen Konzepte. *Medizinische Klinik III der Ludwig Maximilians-Universität München*. 1999; 1-28.
- Hallek M. Immunochemotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide (FC) improves response rates and progression-free survival (PFS) of previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2008; 112 (11) 125 (ASH 2008, Abstract #325).
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1848-1854.
- Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006; 33: 230-239.
- Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Balliere's Clin Haematol*. 1987; 1: 449-491.
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmayer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993; 82: 1820-1828.
- Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*. 1997; 11: 3109-3115.

- Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages-arrested development and cell death. *Cell*. 1993; 72: 325-335.
- Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 1985; 3: 31-58.
- Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C, Garrett T, Fetell M, Reiss R, Bank A, Antman K. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 165-172.
- Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM Brouwer M, Baars P, van Lier RA. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol*. 1993; 151: 2426-2435.
- Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T, Yoda J, Ikeda H, Hirata K, Yamanaka N, Sato N. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 1731-39.
- Hishii M, Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, Pandolfi F. Studies of the mechanism of cytolysis by tumour-infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 1999; 116: 388-394.
- Hombach A, Heuser C, Sircar R, Tillmann T, Diehl V, Pohl C *et al.*. An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3-zeta-independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30. *Cancer Res*. 1998; 58: 1116-1119.
- Hombach A, Koch D, Sircar R, Heuser C, Diehl V, Kruis W *et al.*. A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther*. 1999; 6: 300-304.
- Huang MR, Olsson M, Kallin A, Pettersson U, Totterman TH. Efficient adenovirus-mediated gene transduction of normal and leukemic hematopoietic cells. *Gene Ther*. 1997; 4: 1093-1099.
- Huard B & Karlsson L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 1665-1675.
- Hulkkonen J, Vilpo L, Hurme M, Vilpo J. Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities. *Leukemia*. 2002; 16: 178-185.
- Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98: 181-186.

- Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, Suzuki Y, Wakita D, Takeshima T, Nishimura T. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 2004; 95: 697-703.
- Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumor antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 669-674.
- Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Chused TM, Schwartz RH. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *PNAS.* 1987; 84: 5409-5413.
- Jenkins MK. The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity.* 1994; 1: 443-446.
- Jenning CD & Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of haematologic malignancy. *Blood.* 1997; 90: 2863-2892.
- Jewell AP, Yong KL. Regulation and function of adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Haematol.* 1997; 97: 67-72.
- Johnson TL, Lloyd RV, Thor A. Expression of ras oncogene p21 antigen in normal and proliferative thyroid tissues. *Am J Pathol.* 1987; 127: 60-65.
- Johnston PB & Kay NE. Pathogenesis of impaired cellular immune function in CLL. In Faguet GB (ed.) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Molecular Genetics, Biology, Diagnosis and Management.* Totowa, NJ: Humana Press. 2004; 109-121.
- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today.* 1990; 11: 211-216.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T-cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* 1987; 49: 273-280.
- Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ. Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1133-1141.
- Kay NE & Kaplan ME. Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: analysis of activation events. *Blood.* 1986; 67: 578-581.
- Kay NE & Pittner BT. IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44: 897-903.
- Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in the next decade: where do we go from here? *Sem Hematol.* 1998; 35: 27-33.
- Keating MJ (1). *Chronic Lymphocytic Leukemia.* *Sem Hematol.* 1999; 26: 107-114.
- Keating MJ. Improving the complete remission rate in chronic lymphocytic leukemia. In *American Society of Hematology Education Program Book, Hematology,* 1999; 262-269.
- Keene JA & Forman J. Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1982; 155: 768-782.

- Kiessling R, Kono K, Petersson M, Wasserman K. Immunosuppression in human tumor-host interaction: role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules. Springer Semin Immunopathol. 1996; 18: 227-242.
- Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. Hum Mol Genet. 1997; 6: 2011-2019.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Science. 1994; 266: 2011-2015.
- Kingsbury GA, Feeney LA, Nong Y, Calandra SA, Murphy CJ, Corcoran JM, Wang Y, Prabhu Das MR, Busfield SJ, Fraser CC, Villeval JL. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. J Immunol. 2001;166: 5675-5680.
- Kipps TJ & Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. Blood. 1993; 81: 2475-2487.
- Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Beutler E, *et al*, editor. Williams hematology. New York: McGraw-Hill, 1995; 1017.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. Blood. 1998; 91: 3379-3389.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med. 2001; 194: 1625-1638.
- Knospe WH, Loeb V Jr, Huguley CM Jr. Proceedings: Bi-weekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 1974; 33: 555-562.
- Kokhaei P, Palma M, Hansson L, Osterborg A, Mellstedt H, Choudhury A. Telomerase (hTERT 611-626) serves as a tumor antigen in B-cell chronic lymphocytic leukemia and generates spontaneously antileukemic, cytotoxic T cells. Exp Hematol. 2007; 3: 297-304.
- Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. Nat Genet. 1998; 19: 182-186.
- Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, Hansson J, Masucci G, Wasserman K, Nakazawa T, Anderson P, Kiessling R. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-

- specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 1308-1313.
- Kono K, Takahashi A, Amemiya H, Ichihara F, Sugai H, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Frequencies of HER-2/neu overexpression relating to HLA haplotype in patients with gastric cancer. *Int J Cancer.* 2002; 98: 216-220.
- Koren HS, Ax W, Freund-Moelbert E. Morphological observations on the contact-induced lysis of target cells. *Eur J Immunol.* 1973; 3: 32-37.
- Kovacs-Bankowski M & Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 1995; 267: 243-246.
- Krackhardt AM, Witzens M, Harig S, *et al.* Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX. *Blood.* 2002; 100: 2123-2131.
- Kretz-Rommel A & Bowdish KS. Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: new concepts in blocking immune suppression. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 5-15.
- Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, Frederickson S, Maruyama T, Wild MA, Nolan MJ, Wu D, Springhorn J, Bowdish KS. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2007; 178: 5595-5605.
- Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 329-334.
- Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2002; 95: 1071-1075.
- Lankester AC, Schijndel GM, Pakker NG, Van Oers RH, van Lier RA. Antigen receptor function in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Lymph.* 1996; 24: 27-33.
- Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behaviour. *Cell.* 1999; 96: 1-4.
- Latour S, Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev.* 2003; 192: 212-24. Review.
- Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood.* 1987; 69: 929-936.
- Lens SM, Baars PA, Hooibrink B, van Oers MH, van Lier RA. Antigen presenting cell-derived signals determine expression levels of CD70 on primed T-cells. *Immunology.* 1997; 90: 38-45.

- Lens SM, Tesselaar K, van Oers MH, van Lier RA. Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol.* 1998; 10: 491-499.
- Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C. Randomized comparison of fludarabine, CAP and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood.* 2001; 98: 2319-2325.
- Lev A, Denkberg G, Cohen CJ, Tzukerman M, Skorecki KL, Chames P *et al.* Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T-cell epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res.* 2002; 62: 3184-3194.
- Li H, Katik I, Liu JP. Uses of telomerase peptides in anti-tumor immune therapy. *Methods Mol Biol.* 2007; 405: 61-86.
- Linnet MS & Blattner WA. The epidemiology of chronic lymphocytic leukemia. In *Chronic Lymphocytic Leukemia*, Polliack A, Catovsky D (eds). Harwood Academic Publisher: Chur. 1988; 11-32.
- Liotta LA & Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001; 411: 375-379.
- Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler CJ, Black KL, Yu JS. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 4980-4986.
- Löffler A, Gruen M, Wuchter C, Schriever F, Kufer P, Dreier T, Hanakam F, Baeuerle PA, Bommert K, Karawajew L, Dörken B, Bargou RC. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia.* 2003; 17: 900-909.
- Lúcio PJ, Faria MT, Pinto AM, da Silva MR, Correia Júnior ME, da Costa RJ, Parreira AB. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica.* 1998; 83: 104-111.
- Mackus WJ, Frakking FN, Grummels A, Gamadia LE, De Bree GJ, Hamann D, Van Lier RA, Van Oers MH. Expansion of CMV-specific CD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003; 102: 1057-1063.
- Mahanty S, Mollis SN, Ravichandran M, Abrams JS, Kumaraswami V, Jayaraman K, Ottesen EA, Nutman TB. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J Infect Dis.* 1996; 173: 769-773.

- Mainou-Fowler T & Prentice AG. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1996; 21: 369-377.
- Massaia M, Attisano C, Beggiato E, Bianchi A, Pileri A. Correlation between disease activity and T-cell CD3 zeta chain expression in a B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1994; 88: 886-888.
- Masucci MG, Zhang QJ, Gavioli R, De Campos-Lima PO, Murray RJ, Brooks J, Griffin H, Ploegh H, Rickinson AB. Immune escape by Epstein-Barr virus (EBV) carrying Burkitt's lymphoma: *in vitro* reconstitution of sensitivity to EBV-specific cytotoxic T cells. *Int Immunol*. 1992; 4: 1283-1292.
- Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996; 92: 382-388.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994; 8: 1640-1645.
- Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. Autoimmune haemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic and prognostic features. *Blood*. 2000; 95: 2786-2792.
- Mavromatis BH & Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1874-1881.
- Mavromatis BH & Cheson BD. Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2004; 18: 137-148.
- Mayr C (1), Bund D, Schlee M, Moosmann A, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes. *Blood*. 2005; 105: 1566-1573.
- Mayr C, Kofler DM, Büning H, Bund D, Hallek M, Wendtner CM. Transduction of CLL cells by CD40 ligand enhances an antigen-specific immune recognition by autologous T cells. *Blood*. 2005; 106: 3223-3226.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 742-751.
- McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, Ravey EP, Qin F, Bowdish KS. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *PNAS*. 2006; 103: 1041-1046.

- Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med.* 1999; 77: 282-293.
- Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. *In vivo* measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005; 115: 755-764.
- Messmer D, Telusma G, Wasil T, Messmer BT, Allen S, Rai KR, Chiorazzi N. Dendritic cells from chronic lymphocytic leukemia patients are normal regardless of Ig V gene mutation status. *Mol Med.* 2004; 10: 96-103.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 1997; 90: 785-795.
- Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 4796-4801.
- Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol Today.* 1998; 19: 153-157.
- Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R, Moretta L. Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol.* 2000; 61: 44-50.
- Molica S & Levato D. What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica.* 2001; 86: 8-12.
- Molica S, Dattilo A, Giulino C, Levato D, Levato L. Increased bcl-2/bax ratio in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with a progressive pattern of disease. *Haematologica.* 1998; 83: 1122-1124.
- Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 1999; 62: 117-122.
- Monaghan SA, Peterson LC, James C, Marszalek L, Khoong A, Bacht DJ, Karpus WJ, Goolsby CL. Pan B-cell markers are not redundant in analysis of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cytometry.* 2003; 56: 30-42.
- Montserrat E & Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: Present status. *Ann Oncol* 1995; 6: 219-235.

- Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Brit J Hematol.* 1986; 62: 567-575.
- Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1988; 30: 359-361.
- Morrison VA, Rai KR, Peterson B, Kolitz JE, Sheperd L, Larson RA, Schiffer CA. Impact of therapy with chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and leukemia Group B9011. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3611-3621.
- Mu X, Kay NE, Gosland MP, Jennings CD. Analysis of blood T-cell cytokine expression in B-chronic lymphocytic leukemia: evidence for increased levels of cytoplasmatic IL-4 in resting and activated CD8 T-cells. *Br J Haematol.* 1997; 96: 733-735.
- Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2004; 28: 487-494.
- Nakamura TM & Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell.* 1998; 92: 587-590.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997; 277: 955-959.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998; 4: 328-332.
- Newman RA, Peterson B, Davey FR, Brabyn C, Collins H, Brunetto VL, Duggan DB, Weiss RB, Royston I, Millard FE *et al.* Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: A cancer and leukemia group B study. *Blood.* 1993; 82: 1239-1246.
- Nijman HW, Houbiers JG, Vierboom MP, van der Burg SH, Drijfhout JW, D'Amaro J, Kenemans P, Melief CJ, Kast WM. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1993; 23: 1215-1219.
- Noppen C, Schaefer C, Zajac P, Schutz A, Kocher T, Kloth J, Heberer M, Colonna M, De Libero G, Spagnoli GC. C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 1134-1142.

- O'Brien S, Kantarjian H, Thomas D, Cortes J, Giles F, Wierda W, Koller C, Ferrajoli A, Browning M, Lerner S, Albitar M, Keating M. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003; 98: 2657-2663.
- O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, Koller C, Cortes J, Giles FJ, Lerner S, Keating M. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 1414-1420.
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counter-attack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today*. 1999; 20: 46-52.
- Oduncu F, Nerl C, Meinhardt G, Danhauser-Riedl S, Langenmayer I, Schneller F, Hallek M, Emmerich B. *Lymphozytische Lymphome und Immunozytom. Manual Maligne Lymphome*. 2000; 57-75.
- Opfermann JT, Ober BT, Narayanan R, Ashton-Rickardt PG. Suicide induced by cytolytic activity controls the differentiation of memory CD8 (+) T lymphocytes. *Int Immunol*. 2001; 13: 411-419.
- Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V_H genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*. 1997; 89: 4153-4160.
- Oughton JA & Kerkvliet NI. Novel phenotype associated with *in vivo* activated CTL precursors. *Clin Immunol*. 1999; 90: 323-333.
- Pallasch CP, Ulbrich S, Brinker R, Hallek M, Uger RA, Wendtner CM. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk Res*. 2009; 33: 460-464.
- Palma C, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, Goso C. CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer*. 2004; 108: 390-398.
- Palma M, Adamson L, Hansson L, Kokhaei P, Rezvany R, Mellstedt H, Osterborg A, Choudhury A. Development of a dendritic cell-based vaccine for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57: 1705-1710.
- Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Expression and function of the Fas antigen in B-chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia*. 1995; 9: 1227-1232.
- Pangalis GA, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos ThP, Siakantaris MP, Kittas Ch. B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenstrom's macroglobulinemia: A clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. *Semin Hematol*. 1999; 36: 104-114.

- Pangalis GA, Boussiotis VA, Kittas Ch. Malignant disorders of small lymphocytes. Small lymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: their clinical and laboratory relationship. *Am J Clin Pathol.* 1993; 99: 402-408.
- Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Mitsoulis-Mentzikoff C, Matsouka-Alexandridis P, Anagnostopoulos N, Rombos I, Fessas P. Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis. *Cancer.* 1984; 54: 702-708.
- Parkhurst MR, Riley JP, Igarashi T, Li Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Immunization of patients with the hTERT: 540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 4688-4698.
- Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, Hamblin TJ, Devereux S. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood.* 2008; 111: 5173-5181.
- Pawelec G, Adibzadeh M, Solana R, Beckman I. The T cell in the ageing individual. *Mech Ageing Dev.* 1997; 93: 35-45.
- Prehn RT & Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst.* 1957; 18: 769-778.
- Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavasu P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 84-92.
- Purbhoo MA, Li Y, Sutton DH, et al. The HLA A*0201-restricted hTERT(540-548) peptide is not detected on tumor cells by a CTL clone or a high-affinity T-cell receptor. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 2081-2091.
- Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y, Gastman BR, Bell MC, Whiteside TL. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2579-2588.
- Raghoebier S, van Krieken JH, Kluin-Nelemans JC, Gillis A, van Ommen GJ, Ginsberg AM, Raffeld M, Kluin PM. Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood.* 1991; 77: 1560-1564.
- Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Sheperd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, CHeson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with Chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine.* 2000; 343: 1750-1757.

- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46: 219-234.
- Ramakrishnan S, Eppenberger U, Mueller H, Shinkai Y, Narayanan R. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. *Cancer Res*. 1998; 58: 622-625.
- Rammensee HG, Friede, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: 1st listing. *Immunogenetics*. 1995; 41: 178-228.
- Ranheim EA & Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*. 1993; 177: 925-935.
- Ranheim EA, Cantwell MJ, Kipps TJ. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995; 85: 3556-3565.
- Raphael B, Andersen JW, Silber R, Oken M, Moore D, Bennett J, Bonner H, Hahn R, Knospe WH, Mazza J *et al*. Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 1991; 9: 770-776.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351: 893-901.
- Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 291-330.
- Ravandi F & O'Brien S. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55: 197-209.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins in deregulation of apoptosis and chemoresistance in B-CLL. *Hematol Cell Ther*. 1997; 39: 22-24.
- Reittie JE, Yong KL, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1996; 22: 83-90.
- Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med*. 1993; 177: 265-272.
- Reusch U, Le Gall F, Hensel M, Moldenhauer G, Ho AD, Little M, Kipriyanov SM. Effect of tetravalent bispecific CD19xCD3 recombinant antibody construct and CD28 costimulation on lysis of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells. *Int J Cancer*. 2004; 112: 509-518.

- Rezvan MR, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Lewin N, Avila-Carino J, Osterborg A, Wigzell H, Mellstedt H. Autologous T lymphocytes may specifically recognize leukaemic B cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000; 111: 608-617.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 1998; 393: 474-478.
- Riker AI, Kammula US, Panelli MC, Wang E, Ohnmacht GA, Steinberg SM, Rosenberg SA, Marincola FM. Threshold levels of gene expression of the melanoma antigen gp100 correlate with tumor cell recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer.* 2000; 86: 818-826.
- Robak T. Cladribine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2001; 40: 551-64.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994; 180: 83-93.
- Romero X, Benitez D, March S, Vilella R, Miralpeix M, Engel P. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens.* 2004; 64: 132-144.
- Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today.* 1997; 18: 175-182.
- Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Morey M, Gomis F, Alcala A, Gutierrez M, Maldonado J, Gonzalez C, Giralt M, Hernandez Metz L, Cabrera A, Fernandez-Ranada JM. Bone marrow histologic pattern- the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood.* 1984; 64: 642-648.
- Rozman C, Montserrat E, Vinolas V. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer.* 1988; 61: 279-283.
- Rudd PM, Wormald MR, Stanfield RL, Huang M, Mattsson N, Speir JA, DiGennaro JA, Fetrow JS, Dwek RA, Wilson IA. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol.* 1999; 293: 351-366.
- Rummel MJ, Käfer G, Pfreundschuh M, Jäger E, Reinhardt U, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. Fludarabine and epirubicin in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a German multicenter phase II study. *Ann Oncol.* 1999; 10: 183-188.
- Sampalo A & Brieva JA. Humoral immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: role of CD95/CD95L in tumoral damage and escape. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43: 881-884.
- Sandrin MS, Gumley TP, Henning MM, Vaughan HA, Gonez LJ, Trapani JA, McKenzie IF. Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J Immunol.* 1992; 149: 1636-1641.

- Sandrin MS, Henning MM, Lo MF, Baker E, Sutherland GR, McKenzie IF. Isolation and characterization of cDNA clones for Humly9: the human homologue of mouse Ly9. *Immunogenetics*. 1996; 43: 13-19.
- Santos K, Duke CM, Dewhurst S. Amplicons as vaccine vectors. *Curr Gene Ther*. 2006; 6: 383-392.
- Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996; 88: 4259-4264.
- Sarfati M, Fournier S, Wu CY, Delespesse G. Expression, regulation and function of human Fc epsilon RII (CD23) antigen. *Immunol Res*. 1992; 11: 260-272.
- Sarfati M. CD23 and chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 1993; 19: 591-599.
- Sato T, Sato N, Takahashi S, Koshiba H, Kikuchi K. Specific cytotoxicity of a long-term cultured T-cell clone on human autologous mammary cancer cells. *Cancer Res*. 1986; 46: 4384-4389.
- Sawitsky A, Rai KR, Glidewell O, Silver RT. Comparison of daily versus intermittent chlorambucil and prednisone therapy in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1977; 50: 1049-1059.
- Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Beyer J, Sayer HG, Kroger N, Hensel M, Scheffold C, Held TK, Höffken K, Ho AD, Kienast J, Neubauer A, Zander AR, Fauser AA, Ehninger G, Siegert W. Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukaemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group. *J. Clin. Oncol*. 2003; 21: 2747-2753.
- Schmidt SM, Schag K, Muller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grunebach F, Brossart P. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood*. 2003; 102: 571-576.
- Schneck JP, Slansky JE, O'Herrin SM, Greten TF. Monitoring antigen-specific T-cells using MHC-Ig dimers. *Curr Protoc Immunol*. 2001; Chapter 17: Unit 17.2.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998; 393: 480-483.
- Schreurs MW, Kueter EW, Scholten KB, Kramer D, Meijer CJ, Hooijberg E. Identification of a potential human telomerase reverse transcriptase-derived, HLA-A1-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54: 703-712.
- Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res*. 2002; 62: 2600-2605.

- Schuler M, Rochlitz C, Horowitz JA, Schlegel J, Perruchoud AP, Kommos F, Bolliger CT, Kauczor HU, Dalquen P, Fritz MA, Swanson S, Herrmann R, Huber C. A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 2075-2082.
- Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, *et al.* CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2757-2765.
- Schultze JL, Nadler LM, Gribben JG. B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev.* 1996; 10: 111-127.
- Schultze JL. Why do B cell lymphoma fail to elicit clinically sufficient T cell immune responses? *Leuk Lymphoma.* 1999; 32: 223-236.
- Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 39-46. Review.
- Schwonzen M, Pohl C, Steinmetz T, Seckler W, Vetten B, Thiele J, Wickramanayake D, Diehl V. Immunophenotyping of low grade B-cell lymphoma in blood and bone marrow: Poor correlation between immunophenotype and cytological/histological classification. *Br J Haematol.* 1993; 83: 232-239.
- Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44: 383-389.
- Scrivener S, Kaminski ER, Demaine A, Prentice AG. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *Br J Haematol.* 2001; 112: 959-964.
- Sebti Y, Le Friec G, Pangault C, Gros F, Drenou B, Guilloux V, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol.* 2003; 64: 1093-1101.
- Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood.* 2004; 103: 1202-1210. Review.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001; 410: 1107-1111.
- Shen G, Zhang Y, Zhu H, Yang J, Wang X. Preparation and characterization for bispecific antibodies of anti-CD3 x anti-idiotypic to B cell lymphocytic leukemia. *J Tongji Med Univ.* 1999; 19: 166-169.
- Shinde S, Wu Y, Guo Y, Niu Q, Xu J, Grewal IS, Flavell R, Liu Y. CD40L is important for induction of but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second

- costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *J Immunol.* 1996; 157: 2764-2768.
- Shinohara N, Watanabe M, Sachs DH, Hozumi N. Killing of antigen-reactive B cells by class II-restricted, soluble antigen-specific CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Nature.* 1988; 336: 481-484.
- Siegel S, Wagner A, Kabelitz D, Marget M, Coggin J Jr, Barsoum A, Rohrer J, Schmitz N, Zeis M. Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood.* 2003; 102: 4416-4423.
- Skinnider LF, Tan L, Schmidt J, Armitage G. Chronic lymphocytic leukemia: A review of 745 cases and assessment of clinical staging. *Cancer* 1982; 50: 2951-2955.
- Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signalling and function. *Immunol Res.* 1999; 19: 1-24.
- Soderberg O. Growth and survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Med Oncol.* 1998; 15: 73-78.
- Soloski MJ. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13: 154-162.
- Soruri A, Fayyazi A, Gangl S, Griesinger C, Albrecht CA, Schlott T. *In vitro* generation of cytolytic T cells against human melanoma cells overexpressing HDM2. *Anti-cancer Res.* 2004; 24: 2141-2151.
- Spaner DE, Hammond C, Mena J, Shi Y. Effect of IL-2R beta-binding cytokines on costimulatory properties of chronic lymphocytic leukaemia cells: implications for immunotherapy. *Br J Haematol.* 2004; 127: 531-542.
- Stanglmaier M, Faltin M, Ruf P, Bodenhausen A, Schröder P, Lindhofer H. Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels. *Int J Cancer.* 2008; 123: 1181-1189.
- Stevenson FK & Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood.* 2004; 103: 4389-4395.
- Stevenson FK, Hamblin TJ, Stevenson GT, Tutt AL. Extracellular idiotypic immunoglobulin arising from human leukemic B lymphocytes. *J Exp Med.* 1980; 152: 1484-1496.
- Stevenson FK, Zhu D, King CA, Ashworth LJ, Kumar S, Hawkins RE. Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immunol Rev.* 1995; 145: 211-228.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia.* 2002; 16: 993-1007.

- Stilgenbauer S. Risk classification of chronic lymphocytic leukemia based on genetics. In Sixth Meeting of the European Haematology Association, Educational Book. 2001; 107-109.
- Stockinger B. T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol.* 1999; 71: 229-265.
- Stuhler G & Walden P. Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1993; 23: 2279-2286.
- Su Z, Dannull J, Yang BK, et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol.* 2005; 174: 3798-3807.
- Takahashi S, Rousseau RF, Yotnda P, Mei Z, Dotti G, Rill D, Hurwitz R, Marini F, Andreeff M, Brenner MK. Autologous antileukemic immune response induced by chronic lymphocytic leukemia B cells expressing the CD40 ligand and interleukin 2 transgenes. *Hum Gene Ther.* 2001; 12: 659-670.
- Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Hansasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Rickinson AB, Callan MFC. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol.* 1999; 162: 1827-1835.
- Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4586-4590.
- Taylor DD, Bender DP, Gercel-Taylor C, Stanson J, Whiteside TL. Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. *Br J Cancer.* 2001; 84: 1624-1629.
- Taylor DD, Edwards RP, Case CR, Gercel-Taylor C. Modulation of CD3-zeta as a marker of clinical response to IL-2 therapy in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2004; 94: 54-60.
- Tchirkov A, Chaleteix C, Magnac C, Vasconcelos Y, Davi F, Michel A, Kwiatkowski F, Tournilhac O, Dighiero G, Travade P. hTERT expression and prognosis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2004; 15: 1476-1480.
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Ann Rev Immunol.* 2006; 24: 65-97.
- Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia.* 2007; 21: 965-972.
- Townsend SE & Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science.* 1993; 259: 368-370.

- Travis LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84: 1422-1427.
- Trentin L, Cerutti A, Zambello R, Sancetta R, Tassinari C, Facco M, Adami F, Rodeghiero F, Agostini C, Semenzato G. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood.* 1996; 87: 3327-3335.
- Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, Young G, Doss D, Schlossman R, Anderson KC. Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother.* 2001; 24: 263-271.
- Trojan A, Schultze JL, Witzens M, Vonderheide RH, Ladetto M, Donovan JW, Gribben JG. Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. *Nat Med.* 2000; 6: 667-672.
- Valmori D, Pittet MJ, Vonarbourg C, Rimoldi D, Liènard D, Speiser D, Dunbar R, Cerundolo V, Cerottini JC, Romero P. Analysis of cytolytic T lymphocyte response of melanoma patients to the naturally HLA-A0201-associated tyrosinase peptide 368-376. *Cancer Res.* 1999; 59: 4050-4055.
- Van den Eynde J & Van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9: 684-693.
- Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, Ceuppens JL. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia.* 1997; 11: 572-580.
- Van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boel P, De Smet C, Traversari C, Townsend A, Boon T. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 3038-3043.
- Van Kooten C, Rensink I, Aarden L, van Oers R. Cytokines and intracellular signals involved in the regulation of B-CLL proliferation. *Leuk Lymphoma.* 1993; 12: 27-33.
- Van Pel P, van der Bruggen PG, Coulie VG, Brichard B, Lethe B, van den Enynde C, Uyttenhove JC, Renauld and T. Boon, Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev.* 1995; 145: 229-250.
- Veillette A & Latour S. The SLAM family of immunecell receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15: 277-285. Review.
- Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 56-66. Review.
- Veillette A. SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *J Exp Med.* 2004; 199: 1175-1178. Review.

- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 1999; 283: 680-682.
- Visan I, Goller M, Berberich I, Kneitz C, Tony HP. Pax-5 is a key regulator of the B cell-restricted expression of the CD23a isoform. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 1163-1173.
- Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC, Butler MO, Schultze JL, Nadler LM. Characterization of HLA3-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 3343-3348.
- Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 828-839.
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999; 10: 673-679.
- Voss RH, Lotz C, Cellary A, Theobald M. Targeting p53, hdm2, and CD19: vaccination and immunologic strategies. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25: 43-45.
- Wadhwa P & Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006; 33: 240-249.
- Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ. Normal human CD4+ memory T-cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol*. 1998; 161: 5284-5295.
- Wallin JJ, Liang L, Bakardjiev A, Sha WC. Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J Immunol*. 2001; 167: 132-139.
- Wang N, Morra M, Wu C, Gullo C, Howie D, Coyle T, Engel P, Terhorst C. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics*. 2001; 53: 382-394.
- Waselenko JK, Flynn JM, Byrd JC. Stem-cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the time for designing randomized studies has arrived. *Semin Oncol*. 1999; 26: 48-61.
- Wattel E, Vanrumbeke M, Abina MA, Cambier N, Preudhomme C, Haddada H, Fenaux P. Differential efficacy of adenoviral mediated gene transfer into cells from hematological cell lines and fresh hematological malignancies. *Leukemia*. 1996; 10: 171-174.
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*. 1997; 17: 498-502.

- Wendtner CM, Kofler DM, Mayr C, Bund D, Hallek M. The potential of gene transfer into primary B-CLL cells using recombinant virus vectors. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45: 897-904.
- Wendtner CM, Kofler DM, Theiss HD, Kurzeder C, Buhmann R, Schweighofer C, Perabo L, Danhauser-Riedl S, Baumert J, Hiddemann W, Hallek M, Büning H. Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Blood*. 2002; 100: 1655-1661.
- Weng NP, Hathcock KS, Hodes RJ. Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity*. 1998; 9: 151-157.
- Whiteside TL & Parmiani G. Tumor-infiltrating lymphocytes: their phenotype, functions and clinical use. *Cancer Immunol Immunother*. 1994; 39: 15-21.
- Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*. 1999; 93: 3587-3600.
- Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000; 96: 2917-2924.
- Williams AF & Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*. 1988; 6: 381-405.
- Wu C, Nguyen KB, Pien GC, Wang N, Gullo C, Howie D, Sosa MR, Edwards MJ, Borrow P, Satoskar AR, Sharpe AH, Biron CA, Terhorst C. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol*. 2001; 2: 410-414.
- Wu RS, Kobie JJ, Besselsen DG, Fong TC, Mack VD, McEarchern JA, Akporiaye ET. Comparative analysis of IFN-gamma B7.1 and antisense TGF-beta gene transfer on the tumorigenicity of a poorly immunogenic metastatic mammary carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2001; 50: 229-240.
- Würtzen PA, Claesson MH. A HLA-A2 restricted human CTL line recognizes a novel tumor cell expressed p53 epitope. *Int J Cancer*. 2002; 99: 568-572.
- Yen Chong S, Lin YC, Czarneski J, Zhang M, Coffman F, Kashanchi F, Raveche E. Genes Immun. Cell cycle effects of IL-10 on malignant B-1 cells. *Genes Immun*. 2001; 2: 239-247.
- Yewdell J. To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol Immunol*. 2002; 39: 139-146.
- Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol*. 1996; 157: 1823-1826.
- Yokota A, Yukawa K, Yamamoto A, Sugiyama K, Suemura M, Tashiro Y, Kishimoto T, Kikutani H. Two forms of the low-affinity Fc receptor for IgE differentially mediate

endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmic domains. PNAS. 1992; 89: 5030-5034.

Zomas AP, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Seon BK, Catovsky D. Expression of the immunoglobulin-associated protein B29 in B-cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Leukemia. 1996; 10: 1966-1970.

Zuberek K, Ling V, Wu P, Ma HL, Leonard JP, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. Comparable in vivo efficacy of CD28/B7, ICOS/GL50, and ICOS/GL50B costimulatory pathways in murine tumor models: IFN γ -dependent enhancement of CTL priming, effector functions, and tumor specific memory CTL. Cell Immunol. 2003; 225: 53-63.

Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, Dono M, Cosulich E, Ferrarini M. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. Blood. 1996; 88: 1365-1374.

Anhang

Inhalte dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

1. Bund D, Mayr C, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. Human Ly9 (CD229) as novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) recognized by autologous CD8+ T cells. *Exp Hematol.* 2006; 34: 860-869.
2. Bund D, Mayr C, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. CD23 is recognized as tumor-associated antigen (TAA) in B-CLL by CD8+ autologous T lymphocytes. *Exp Hematol.* 2007; 35: 920-930.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Michael Hallek, der mir die Möglichkeit gegeben hat, ein interessantes immunologisches Thema mit klinischem Bezug zu bearbeiten, für seine kontinuierliche Betreuung, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die vielen Anregungen,

Herrn Professor Dr. Clemens Wendtner, für die Einführung in das Thema, für die vielen interessanten fachlichen Diskussionen, seine vielen Anregungen und dafür, dass er bei Fragen und Problemen jederzeit zur Verfügung stand,

Herrn Professor PD. Dr. Haralabos Zorbas, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat,

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Hallek, vor allem Dr. Christian Kurzeder, Dr. David Kofler und Doreen Westhaus, danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und für die gute Laune,

Frau Dr. Christine Mayr, die mich bei meiner Arbeit ebenfalls sehr unterstützt, mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und ohne die die Arbeit im Labor bei weitem nicht so viel Spaß gemacht hätte,

Frau Dr. Christine Falk und Dr. Elfriede Nössner und Babs Mosetter, die mich bei immunologischen Problemen aller Art beraten und unerschöpfliche Hilfsbereitschaft in sämtlichen Fragestellungen sehr unterstützt haben,

allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für die praktische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion, die zum guten Arbeitsklima beigetragen haben,

Alexander fürs Korrekturlesen und seine motivierende Unterstützung,

meinen Eltern, meiner Schwester und Andrea.

