

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Induktion von CLL-spezifischen CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten mit Hilfe von RNA transfizierten dendritischen Zellen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Garyfalia Tsakou

aus Palioura (Griechenland)

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtersatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stefanovic

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Dendritische Zellen	3
1.3 Chronisch lymphatische Leukämie (CLL).....	4
1.4 Tumorimmunologie.....	6
1.4.1 Tumor-escape Mechanismen	6
1.4.2 Tumorantigene.....	7
1.4.3 Spezifische Immuntherapie.....	7
1.5 Zielsetzung.....	9
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Geräte.....	10
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	11
2.1.3 Reagenzien.....	12
2.1.4 Tumorzelllinien.....	18
2.2 Methoden	18
2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl	18
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen	18
2.2.3 RNA-Isolierung und Quantifizierung.....	19
2.2.4 Unspezifische Amplifikation von RNA	19
2.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	20
2.2.6 <i>Ex-vivo</i> Generierung von dendritischen Zellen	21
2.2.7 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)	21
2.2.8 Isolierung von Zellen durch magnetische Zellsortierung	22
2.2.9 Durchflusszytometrie	23
2.2.10 <i>Chromium</i> [⁵¹ Cr]-Release-Assay.....	24
2.2.11 Elektroporation von DC.....	26
2.2.12 Induktion CLL-spezifischer T-Helferzellen	27
2.2.13 [³ H]-Thymidin-Proliferationsassay	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1 FACS-Analysen	29
3.1.1 Phänotyp der <i>ex vivo</i> generierten DC von CLL-Patienten.....	29
3.1.2 Reinheit der isolierten B-Zellen	30
3.2 Induktion CLL-spezifischer CTL mit Hilfe RNA-transfizierter DC.....	32

3.3 Exprimierte Antigene in der CLL sind unter den leukämischen Zellen verteilt	34
3.4 Induktion CLL-spezifischer T-Zellen mit Hilfe amplifizierter mRNA.....	36
3.5 Induktion von CD4⁺ T-Lymphozyten mit Hilfe RNA-transfizierter DC ..	38
4. DISKUSSION	40
4.1. Welche Ergebnisse konnte diese Arbeit zur Verfügung stellen?.....	41
4.2. Probleme und Grenzen dieser Arbeit	43
4.3. Vakzinierungsstudien	43
4.4. Ausblick	44
5 ZUSAMMENFASSUNG	45
6 LITERATURVERZEICHNIS	46
7 DANKSAGUNG	54
8 LEBENSLAUF	55

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des Immunsystems	2
1.2	Dendritische Zellen	3
1.3	Ausstrich des peripheren Blutes mit der typischen Morphologie der leukämischen Tumorzellen bei der CLL	4
1.4	Gesamtumor-RNA Konzept	9
3.1	Exemplarische FACS-Analyse reifer DC des Patienten #1 mit CLL	29
3.2	Analyse der Reinheit der isolierten B-Zellen des Patienten #2	31
3.3	Induktion autologer CLL-spezifischer CTL-Antworten mit RNA-transfizierten DC	33
3.4	Crossreaktivität der induzierten leukämischen CTL	34
3.5	Spezifität der induzierten CTL-Antwort mit aus CLL gewonnenen RNA-transfizierten DC	35
3.6	CTL-Induktion <i>in vitro</i> mit amplifizierter CLL-RNA	37
3.7	Induktion proliferativer T-Helferzell-Antwort mit CLL-RNA transfizierten DC	39

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplimentäre Desoxyribonukleinsäure
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Diamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagen-Colony stimulating-Faktor
HLA	humane Leukozytenantigene
IL	Interleukin
MACS	magnetic associated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAE	Tris Essigsäure-EDTA

TAP	<u>t</u> ransporter associated with <u>a</u> ntigen <u>p</u> rocessing
TBS	Tris buffered saline
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Körpers ist ein höchst komplexes, regulatorisches Netzwerk, bestehend aus unterschiedlichen Geweben und Zelltypen, die über Botenstoffe oder über direkten Zell-Kontakt miteinander kooperieren. Es hat die Aufgabe, den Körper vor schädigenden pathogenen Keimen (Bakterien, Viren), Pilzen, Protozoen und Metazoen zu schützen. Eine Immunreaktion können auch organische Makromoleküle, fremde eukaryontische Zellen oder maligne körpereigene Zellen auslösen. Das Immunsystem ist in der Lage, solche Pathogene zu erkennen und setzt zu deren Vernichtung eine spezifische Reaktionskaskade in Gang.

Das adaptive Immunsystem kann durch zwei Wirkmechanismen charakterisiert werden, die humorale und die zellvermittelte Reaktion (Abb 1.1). Die B-Lymphozyten sind durch Synthese und Freisetzung von Antikörpern für die humorale Antwort verantwortlich. Die adaptive zellvermittelte Immunantwort dagegen wird hauptsächlich von den T-Lymphozyten gesteuert und übernommen. Die T-Lymphozyten entstehen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Vorläuferzellen wandern in den Thymus, wo sie zu Thymozyten heranreifen und sich dann zu verschiedenen T-Zell-Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausdifferenzieren. So haben die CD4⁺-T-Helfer-Zellen eine regulatorische Funktion, indem sie z.B. durch Sezernierung von Botenstoffen (Zytokinen) B-Zellen aktivieren können und auf diese Weise eine spezifische Immunreaktion auslösen. CD8⁺-zytotoxische-T-Zellen erkennen in erster Linie zelluläre Antigene z.B. einer Virus-infizierten Zelle oder von malignen Zellen, mit dem Ziel der spezifischen Lyse dieser Zellen. CD8⁺-zytotoxische-T-Zellen besitzen durch die von ihnen produzierten Zytokine eine Reihe weiterer regulatorischer Eigenschaften. So

aktivieren sie über freigesetzte Zytokine auch Makrophagen und führen sie zu den Infektionsherden.

B- und T-Zellen arbeiten im Immunsystem eng zusammen. Nach Aktivierung der T-Zellen durch deren Kontakt mit dem MHC-Peptid-Komplex auf der Antigen-präsentierenden Zelle über den T-Zell-Rezeptor treten diese in engen Kontakt mit B-Zellen. Die T-Zellen bilden Zytokine und exprimieren Moleküle (CD40 Ligand) zur Aktivierung der B-Zellen und regen diese zur Reifung zu Plasmazellen und damit zur Bildung von Antikörpern an (35).

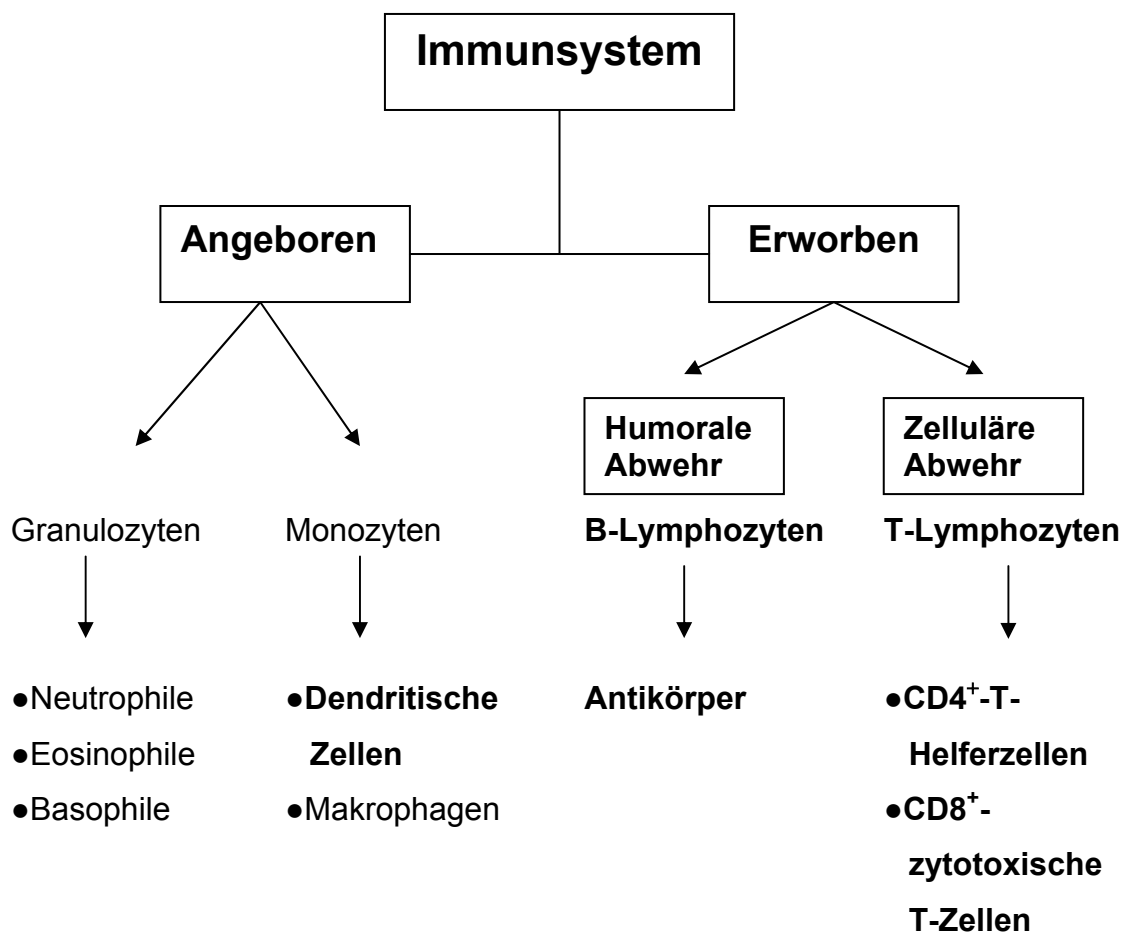


Abb 1.1: Aufbau des Immunsystems

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind höchst potente antigenpräsentierende Zellen (APC) mit der Fähigkeit zur Induktion und Aufrechterhaltung einer primären Immunantwort (2,9,14). DC entstehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks und können in fast jedem Gewebe gefunden werden, wo sie als sogenannte unreife DC vorliegen (17).

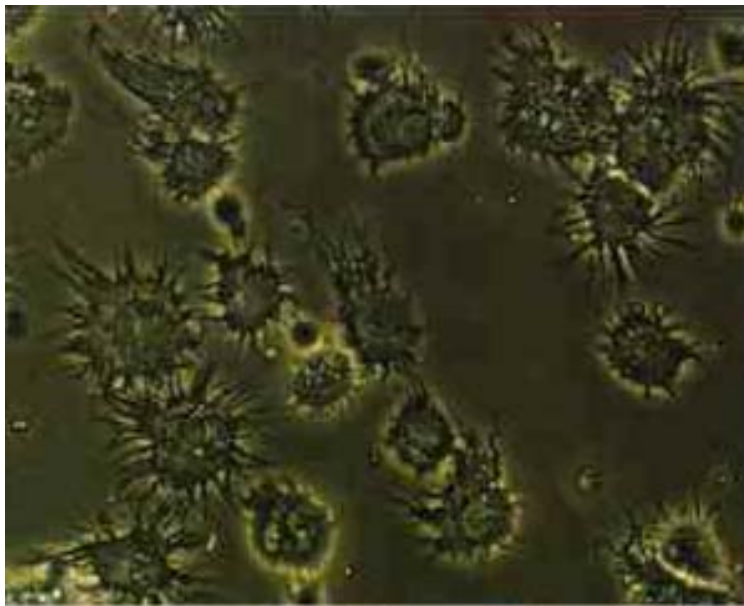


Abb. 1.2 Dendritische Zellen (Eckhart Kämpgen, www.uni-wuerzburg.de).

Diese unreifen DC sind durch ihre Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, charakterisiert. Durch Interaktion der DC mit Pathogenen, Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 oder durch CD40-Ligation verändern sich Phänotyp, Funktion und Verhalten der DC. Es kommt zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80, CD86), zur Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-12) und somit zur Ausreifung der DC. Reife DC sind nicht mehr in der Lage Antigene aufzunehmen, zeichnen sich jedoch durch eine erhöhte T-Zell-stimulierende Wirkung aus und wandern zu den regionalen Lymphknoten, wo sie in den T-Zell-Regionen eine primäre Immunantwort induzieren (2) .

1.3 Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist eine leukämisch verlaufende Sonderform des niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphoms, die mit einem Anteil von 30% die häufigste Leukämie der Erwachsenen darstellt. Sie ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, die häufiger Männer als Frauen betrifft.

Die Erkrankung ist durch die unkontrollierte Proliferation und Akkumulation eines entarteten B-Zell-Klons (eine T-Zell CLL ist mit 3% sehr selten) charakterisiert. Die malignen Lymphozyten proliferieren langsam und haben eine verlängerte Lebensdauer.

Initial sind die Patienten meist asymptomatisch. Die ersten Symptome können sich in Leistungsminderung, Müdigkeit, Lymphknotenschwellung, Autoimmunphänomenen und Infektionen äußern. Die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark führt im Verlauf der Krankheit zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit zunehmender Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie. Die Diagnose der B-CLL lässt sich aus dem Differentialblutbild und der Immunphänotypisierung stellen (63).

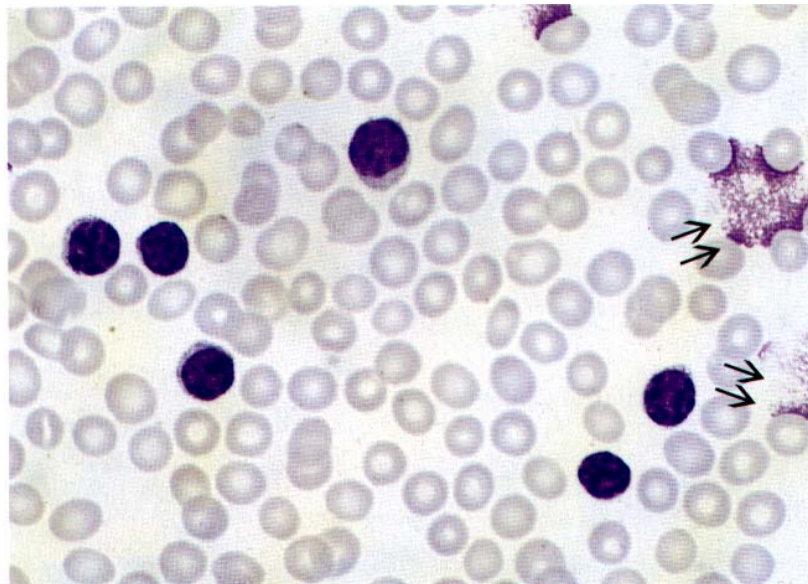


Abb. 1.3: Ausstrich des peripheren Blutes mit der typischen Morphologie der leukämischen Tumorzellen bei der CLL. Die am rechten oberen Bildrand markierten Kernrümmer werden Gumprecht'sche Kernschatten genannt (P. Mitrou, F. Länger; Atlas der Knochenmark-Neoplasien)

Die CLL bleibt größtenteils unheilbar trotz bedeutender Fortschritte in unserem Verständnis der Pathologie und Behandlung der CLL und deren Varianten (20,46,57,69). Mit neuen Medikamenten wie Purinanaloga (37,38,70) sowie monoklonalen Antikörpern Rituximab (23,47,52) und Campath-1H (30,58,61) konnten eindrucksvolle Ansprechraten bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder refraktären indolenten Lymphomen erzielt werden. Aggressive Behandlungen mit kurativer Absicht wie die Hochdosischemotherapie (22,28,59,72) oder die allogene Stammzelltransplantation (39,40,48,50) für selektive Hochrisiko-CLL-Patienten werden zur Zeit in randomisierten klinischen Studien untersucht. Nach dem Erreichen einer kompletten klinischen und molekularen Remission treten trotz allem bei den meisten Patienten Rezidive auf und es bleibt unklar, ob diese Patienten tatsächlich geheilt werden können.

Es gibt mehrere Aspekte, weswegen die CLL einen attraktiven Kandidaten für die Anwendung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien darstellt. Die CLL ist eine Erkrankung mit einem langsamen Tumorwachstum, das die Zeit für die Induktion einer Immunantwort gegen die malignen Zellen mittels Vakzinierung zur Verfügung stellt (20,46,69). Trotz einer Reihe von Defekten und Alterationen, die in T-Zellen von CLL-Patienten charakterisiert wurden (41,45,65,75), wurde kürzlich demonstriert, dass autologe zytotoxische und proliferative T-Zell-Antworten gegen CLL-Zellen *in vitro* generiert werden können, und dass diese T-Zellen die malignen Zellen lysieren (42,43,49). Laut diesen Berichten scheint es möglich zu sein, dass ein potenter Stimulus und eine gesteigerte Antigenpräsentation durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen die beobachteten T-Zell-Alterationen und mögliche Toleranzmechanismen, die bei CLL-Patienten beschrieben wurden, überwinden können. Weiterhin gibt es Berichte, die zeigen, dass es bei der CLL zu einem immunologisch durch T-Zellen vermittelten Graft-Versus-Leukämie Effekt kommt, was die Immunogenität der Erkrankung belegt (40,49,64).

1.4 Tumorimmunologie

1.4.1 Tumor-escape Mechanismen

Ausgangspunkt der Tumoren ist eine entartete Zelle, die unkontrolliert proliferiert. Anschließend können weitere Mutationen in den Tochterzellen der entarteten Zelle entstehen, was als Tumorprogression bezeichnet wird (1). Durch Mutationen oder Überexpression von bestimmten Proteinen werden von den malignen Zellen Peptide aus diesen Antigenen auf den HLA-Molekülen präsentiert, die von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden können. Diese CTL führen dann durch Freisetzung von Granzym A und B sowie Perforinen zum apoptotischen Tod der Tumorzellen. Dennoch gelingt es Tumoren, sich zu vermehren, weil sie verschiedene Mechanismen entwickeln können, um dem Immunsystem zu entgehen. Man spricht von sogenannten „Immunescape“-Mechanismen. Bei manchen Tumorzellen bestehen Defekte in der Antigenprozessierung, z.B. durch die Blockierung des TAP-Transporters, so dass die Peptide nicht ins endoplasmatische Retikulum gelangen und somit auch nicht an die MHC-Moleküle binden können. Bei vielen Tumorzellen sind die MHC-Moleküle vermindert oder fehlen gänzlich. Zudem sind Tumorzellen durch die fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle keine professionellen APC (4,51). Eine weitere Strategie ist die Einstellung der Synthese des Tumorantigens oder auch die Produktion immunsuppressiver Substanzen wie IL-6, IL-10 oder TGF- β (16,19,73,74).

1.4.2 Tumorantigene

Tumorzellen entstehen zwar aus körpereigenen Zellen, präsentieren aber auf ihrer Oberfläche „fremde“ Antigene. Diese Tumorantigene können in verschiedene Klassen eingeteilt werden: tumorspezifische Antigene, gewebsspezifische Antigene (Differenzierungsantigene), Antigene embryonalen Ursprungs (Cancer-testis Antigene), onkovirale Proteine und überexprimierte Antigene (7,8).

Tumorspezifische Antigene entstehen aus Onkogenprodukten oder mutierten Tumorsuppressor-Genen, wie z.B. ras und p53, durch Mutation entstandene Antigene oder Immunglobuline maligner B-Zellen (26).

Zu den Antigenen embryonalen Ursprungs gehören die Produkte der Genfamilien MAGE, GAGE und BAGE, die mit Ausnahme von Testis und Plazenta im gesunden Gewebe nicht exprimiert werden (5,6,8).

Gewebsspezifische Antigene existieren unter anderem für Melanome, wie z.B. MelanA/MART, gp75 oder Tyrosinase (7,8).

Es gibt Tumoren wie das Zervixkarzinom, die viral induziert sein können, in diesem Fall häufig mit einer HPV-Infektion (humanes Papilloma-Virus 16 und 18). In diesen Tumoren werden entsprechende virale Proteine gefunden (26).

In die letzte Kategorie gehören Proteine, die in manchen Tumoren überexprimiert sind wie HER-2/neu oder MUC-1 (12,14,25).

1.4.3 Spezifische Immuntherapie

Bisherige Therapiemaßnahmen für Tumorpatienten, die überwiegend aus Chemotherapie bestehen, sind mit vielen Nebenwirkungen verbunden und versprechen langfristig keine Heilung, so auch bei der CLL. Ziel der Immuntherapie ist es, eine tumorspezifische Immunantwort gegen die entarteten Zellen zu induzieren.

Die Entwicklung von Protokollen für die *ex vivo* Generierung von DC (11, 76) führte in den letzten Jahren zur Evaluation einer Vielzahl von potentiellen Vakzinierungsstrategien für die Behandlung von Krebserkrankungen. Ein weit verbreiteter Ansatz besteht in der Beladung von DC mit synthetischen aus sogenannten tumorassoziierten Antigenen (TAA) abgeleiteten Peptiden (13,15,77). Diese Strategie setzt allerdings die Charakterisierung des Tumorantigens voraus und ist darüber hinaus durch die Abhängigkeit der Peptide vom jeweiligen HLA-Haplotyp der Patienten limitiert. Bisher sind nur wenige Target-Antigene wie Survivin oder MUC-1 in CLL-Zellen charakterisiert worden (27,66). Zusätzlich wurden sogenannte Gesamttumor-Vakzinierungsstrategien („whole tumor strategies“) ohne das Wissen von speziellen Tumorantigenen entwickelt. Hierbei erfolgt die Antigenbeladung der DC entweder über deren Inkubation mit absterbenden Tumorzellen („apoptotic bodies“, nekrotische Zellen), Zelllysaten, Hitzeschockproteinen oder Exosomen (18,32,68). Alternativ können rekombinante Viren oder Liposomen benutzt werden, um TAA in die Prozessierung und Präsentation der DC zur Induktion protektiver Anti-Tumor-Immunantwort einzuführen (10,33,71).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass DC, welche mit einer für ein bestimmtes TAA kodierenden mRNA oder mit Tumor-RNA transfiziert worden waren, in der Lage sind, antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten zu induzieren (3,29,31,53-55). Darüber hinaus führt eine zusätzliche Induktion von CD4⁺-T-Helferzellen gegen HLA-Klasse-II-restringierte Epitope möglicherweise zu einer Verstärkung und Verlängerung der ausgelösten Immunantwort. Während Gesamttumor-Vakzinierungsstrategien, die absterbende Tumorzellen oder Tumorzelllysate einsetzen, durch den Bedarf an großen Mengen von Tumormaterial limitiert sind, steht der Ansatz mit RNA-transfizierten DC auch für Patienten mit geringer Tumormasse oder mit minimaler Resttumorerkrankung zur Verfügung, da vor kurzem gezeigt werden konnte, dass aus wenigen Tumorzellen gewonnene RNA *in vitro* amplifiziert und anschließend ohne Verlust der biologischen Aktivität eingesetzt werden kann (3,29).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Effizienz analysiert werden, mit der RNA-transfizierte DC *in vitro* Leukämie-spezifische T-Zell-Antworten induzieren. Zudem soll untersucht werden, ob aus Monozyten stammende DC, transfiziert mit Gesamttumor-RNA oder PCR-amplifizierter RNA aus CLL-Zellen, in der Lage sind, potente autologe CD8⁺- (Abb.1.1) und CD4⁺-T-Zell-Antworten hervorzurufen. Anhand von Chrom[⁵¹Cr]-Release-Assays und Proliferationsassays soll diese CD8- und CD4-gerichtete Immunität untersucht und charakterisiert werden.

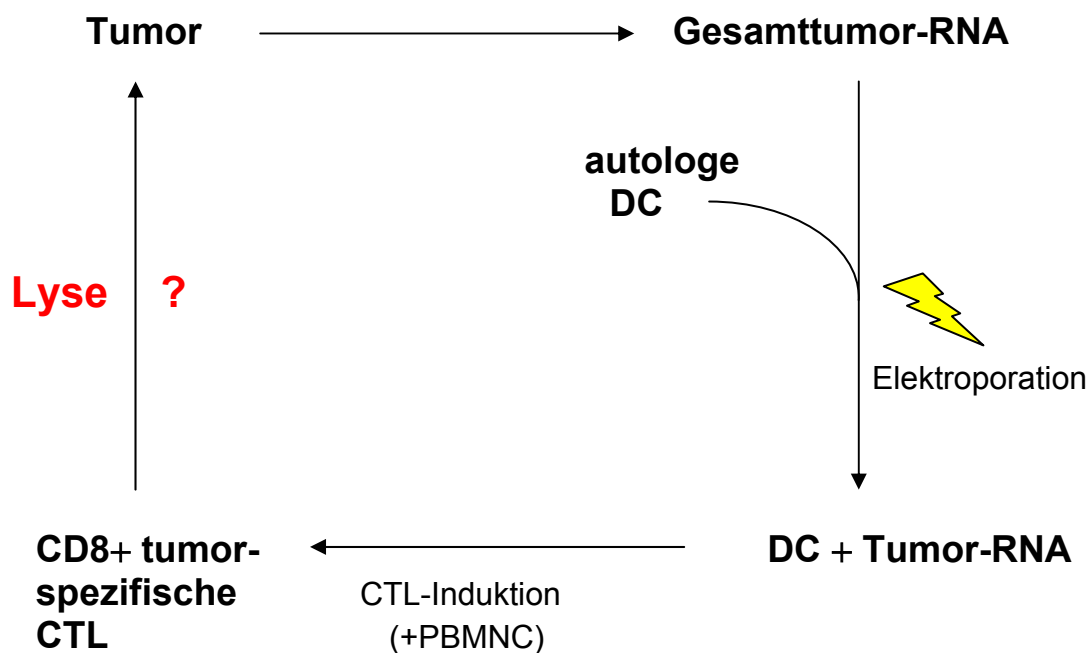


Abb.1.4: Gesamttumor-RNA Konzept.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, UK
Brutschrank NuAire™ US AutoFlow	NuAire™ Inc., Plymouth, USA
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Elektroporationsgerät Easyject Plus™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Gefrierschrank –85°C UF 300	Napco, Winchester, USA
Kühlschrank Kombination 4°C und –20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Mikropipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus MO21	Olympus Optical GmbH, Hamburg, Deutschland
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	Pekin Elmer Life Science, Wellesley, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Bioscience AG, Baar, Schweiz
Reinluftbank Heraeus Hera Safe HS 18/2	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Wasserbad GFL	Memmert, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatte Falcon® Multiwell™ 353046	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
24-Well-Zellkulturplatte Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte (Flach- und Rundboden) Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Blue Max™, 50 ml Bleu Cups	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon® 5 ml Polystyrene Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Handschuhe SafeSkin Satin Plus®	Kimberly Clark, Roswell, USA

Luma Plate™ -96	Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande
Nunc™ Cryo Tube™	Nalge Nunc Internat., Rochester, USA
Pipetten Serological Pipet 2 ml Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Pipettenspitzen blau 1,0 ml und gelb 0,2 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland
TC-Tube Cellstar®, steril, 14 ml, 16,0/100 mm Screw Cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon® TissueCulture Flask 0.2 µl Vented Blue Plug Seal Cup 70 ml, 275 ml	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA

2.1.3 Reagenzien

2.1.3.1 Antikörper

Produkt	Hersteller
anti-HLA-Klasse I W6/32	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
anti-HLA-Klasse II Tü 39	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
Maus-IgG-FITC	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland

anti-CD1a-FITC	Dako Diagnostic GmbH, Hamburg, Deutschland
anti-CD3-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD4-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD5-FITC	BD Pharmingen, Hamburg, Deutschland
anti-CD14-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD19-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD86-FITC	BD Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Maus-IgG-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD3-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD8-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD19-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD56-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD80-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD86-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-HLA-DR-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.3.2 Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien, die nicht extra aufgeführt werden, wurden von den Firmen Merck (Hohenbrunn, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma (St. Louis, USA) bezogen.

Produkt	Hersteller
⁵¹ Cr-Natrium-chromat Stammlösung Europe, 370 mBq/10 mCi	Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland
DMSO	Serva, Heidelberg, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co, St.Louis, USA
³ H-Thymidine	Amhersham Life Science, Buckingham, UK
Triton X-100	Roth Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA 25200	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3.3 Kits

Produkt	Hersteller
MACS Anti Fitc Multisort Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS B-Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD4+ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
mMessage mMACHINE T7 Kit	Ambion, Huntingdon, UK
QIAQuick PCR Purifikation Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy™ Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland

2.1.3.4 Medien und Zytokine

Produkt	Hersteller/ Zusammensetzung
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Medium RP10	ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-Mercapto- ethanol, Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 mg/ml Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Medium X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO ₄) Penicillin/Streptomycin 100 ml	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Zytokine: GM-CSF Leukomax	Novartis, Basel, Schweiz
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.3.5 Puffer

Produkt	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer	5% Glycerin, 166,7 μ M EDTA, 0.025% Bromphenolblau
FACS-Puffer	0,5% BSA in PBS
MACS-Puffer	0,5% BSA 2mM EDTA in PBS
TAE	40 mM Tris, 13 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3.6 Peptide

Peptid	Bereitgestellt von:
Abgeleitet von Telomerase: ILAKFLHWL	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
Abgeleitet von MUC1: LLLLTVLTV	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
Abgeleitet von Survivin: ELTLGEFLKL	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland
Abgeleitet von Adipophilin ADFP (adipose differentiation- related protein): SVASTITGV	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Deutschland

2.1.4 Tumorzelllinien

Bei den Experimenten wurde zur Überprüfung der NK-Zellen-Aktivität die Tumorzelllinie K562 (Proerythroblastenleukämie) eingesetzt, die in RP10-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau gemischt. Die Farbstoffmoleküle können die intakte Zellmembran nicht durchdringen und ermöglichen so die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Die ungefärbten Zellen wurden in 16 Quadranten einer Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl/ml ergibt sich wie folgt:

(Gezählte Zellen in 16 Quadranten) x 10⁴ x 2 Zellen/ml

Der dimensionslose Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau. Bei weiterer Verdünnung durch Zugabe von Medium muss der entsprechende Faktor zusätzlich berücksichtigt werden.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde jeweils 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml RP10-Medium unter Zusatz von 10% DMSO in Kryo-Röhrchen überführt und bei - 80°C eingefroren und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend mit RP10-Medium gewaschen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

2.2.3 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die Isolierung von Tumor-RNA erfolgte unter Einsatz des RNeasy Maxi Kits entsprechend dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll zur Isolierung von RNA aus tierischen Zellen (Rneasy Maxi Handbook, Qiagen). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von RNA an eine Siliciumdioxid-Membran (Säulenchromatographie). DNA und andere Zellbestandteile werden mit mehreren Puffern abgewaschen und die RNA schließlich mit Wasser eluiert. Pro Säule können bis zu 6 mg RNA isoliert werden.

Die Bestimmung der Reinheit der Proben erfolgte durch spektralphotometrische Messung (RNA/DNA Calculator Gene Quant II). Die RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

2.2.4 Unspezifische Amplifikation von RNA

Die unspezifische Amplifikation von RNA wurde abgesehen von wenigen unten ausgeführten Modifikationen nach der von Boczkowski beschriebenen Methode durchgeführt (29). Für die First-Strand-cDNA-Synthese und die Long-Distance-(LD)-PCR wurde der SMART PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) benutzt. Abweichend von dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll wurde ein den Bakteriophagenpromotor T7 enthaltendes Oligonukleotid als Template-Switch-Oligo verwendet (5'-CGCGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGG-3').

Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Nach Reaktionsende werden die First-Strand-cDNA enthaltenden

Ansätze durch Zugabe von 90 µl TE Puffer verdünnt und dann in die LD-PCR zur Amplifikation eingesetzt. Die 100 µl-Reaktionsansätze enthielten 10 µl der verdünnten First-Strand-cDNA, 20 pmol des mit dem Kit gelieferten CDS-PCR-Primers sowie 20 pmol selbst entworfenen T7-PCR-Primers (5'- GCGCGCGCTAATACGACTCACTAT-3'). Die LD-PCR wurde entsprechend dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: initiale Denaturierung bei 95°C, 20 Zyklen bei 95°C für 15 s, 60°C für 30 s, 68°C für 7 min, Schlussexension bei 68°C für 10 min. Das LD-PCR-Produkt wurde anschließend mit dem QIAQuick PCR Purification Kit nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll aufgereinigt. Für die nachfolgende *in vitro* Transkription des LD-PCR-Produktes wurde das mMESSAGE mMACHINE T7 Kit (Ambion, Huntingdon, UK) verwendet.

2.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Das verwendete Blut stammt von CLL-Patienten der Medizinischen Klinik Tübingen. Zur Auftrennung des Blutes wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Das eingesetzte Ficoll hat dabei eine größere Dichte als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) und eine geringere als die von Erythrozyten und Granulozyten. Beim Zentrifugieren bildet sich auf dem Ficoll eine weiße Schicht von PBMNC, die leicht abgenommen werden kann.

Je 12 ml Ficoll wurden in sechs 50 ml-Röhrchen vorgelegt. Das frische Heparin-Blut wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt und dieses Gemisch vorsichtig dem Ficoll überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in der Zentrifuge Heraeus 1.0 R (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: 1900 rpm, RT, 20 min, ohne Bremse. Die sich nun abzeichnende weiße Schicht zwischen Ficoll und Serum beinhaltete die PBMNC und wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Es folgte ein zweimaliges Waschen der PBMNC mit 40 ml

PBS durch Zentrifugation bei 1400 rpm, RT, 5min. Das sich dabei bildende Zell-Pellet wurde in X-Vivo Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.6 Ex-vivo Generierung von dendritischen Zellen

Für die Isolierung von Monozyten wurden je 1×10^7 PBMNC in Sechs-Well-Zellkulturplatten in einem Volumen von 3 ml X-Vivo Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dabei adhären die Monozyten spezifisch an den Kunststoff der Zellkulturplatten. Anschließend wurden die Platten mehrmals mit PBS gespült. Die im Überstand befindlichen nicht adhären Zellen (NAZ) wurden - wie auch die nicht verwendeten PBMNC - in Kryoröhrchen à 1×10^7 /ml RP10-Medium unter Zugabe von 10% DMSO bei - 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die adhären Monozyten wurden in je 3 ml RP10-Medium pro well kultiviert und durch Zugabe der Zytokine IL-4 (1000 IU/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) an Tag 0, 2, 4 und 6 zu dendritischen Zellen differenziert. Zusätzlich wurden die DC durch Zugabe von TNF- α (10 ng/ml) an Tag 6 zur Reifung gebracht.

Der Phänotyp der DC wurde nach sieben Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Anschließend konnten die ausgereiften DC zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt werden.

2.2.7 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)

Durch Transfektion dendritischer Zellen mit Gesamttumor-RNA aus CLL-Lymphozyten können spezifische CTL induziert werden. Dazu werden transfizierte DC mit autologen PBMNC co-kultiviert. Die DC prozessieren und präsentieren die MHC-gebundenen Peptide den spezifischen naiven T-Zellen

über deren T-Zell-Rezeptor. Es kommt nach Aktivierung der T-Zellen zu deren klonalen Expansion.

Zur Induktion wurden 5×10^5 transifizierte DC mit $2,5 \times 10^6$ autologen PBMNC pro well inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit autologen DC, die mit CLL-RNA transfiziert waren, restimuliert. An den Tagen 1, 3, 5 wurden den Kulturen 2 ng/ml IL-2 zugegeben. Nach jeweils sieben Tagen wurden weitere Restimulationen durchgeführt. An Tag 5 nach der letzten Restimulation erfolgte dann der Einsatz der CTL in einem Chromium [^{51}Cr]-Release-Assay.

2.2.8 Isolierung von Zellen durch magnetische Zellsortierung

B-Zellen wurden aus den über Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen PBMNC mittels MACS-Technologie (magnetisch assoziierte Zellsortierung) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Das Prinzip der Isolation beruht auf einer Antikörper-Bindung an Oberflächen-Moleküle der zu isolierenden Zellen. Die Antikörper sind an magnetische Partikel gekoppelt, die dann über eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, isoliert werden können. Antikörper-markierte Zellen verbleiben in der Säule, während nicht-markierte Zellen durchfließen. Die markierten Zellen können nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld von der Säule eluiert werden. Es ist auch möglich, all diejenigen Zellpopulationen zu markieren, die man von der zu isolierenden abtrennen möchte, so dass die gewünschten Zellen im Durchfluss zu finden sind (*untouched isolation*). Für die Isolation von B-Zellen und CD4^+ -Zellen wurden genau diese Depletionsverfahren verwendet. Im Falle eines Patienten, der nicht in totaler Remission war und in dessen Peripherblut unter den B-Zellen sich noch viele maligne $\text{CD5}^+\text{CD19}^+$ -Zellen befanden, wurde eine weitere Auftrennung der nicht malignen B-Zellen nach dem MACS-Prinzip durchgeführt, in dem die $\text{CD5}^+\text{CD19}^+$ Zellen über eine positive Isolation von den $\text{CD5}^-\text{CD19}^+$ getrennt wurden.

Die Reinheit der Zellpopulationen nach der Isolation wurde durchflusszytometrisch analysiert und betrug ungefähr 95%. Die CLL-Zellen und die nicht malignen B-Zellen wurden bei - 80°C kryokonserviert und vor ihrem Einsatz im ⁵¹Cr- oder Proliferationsassay in RP10-Medium für 24 Stunden inkubiert.

2.2.9 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden spezifische Antikörper, die an Oberflächenantigene binden können, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Die Zellsuspension wird im Durchflusszytometer durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom von einzelnen Zellen entsteht. Dieser wird von einem Laserstrahl erfasst. Durch die Streuung des Lichtes können Rückschlüsse auf die Granularität und Größe gezogen werden. Durch die Anregung des Lasers werden Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt. Somit ist eine Einteilung der Zellen nach Markierung, Größe und Granularität möglich.

Die zu charakterisierenden Zellen wurden in einem 13 ml-Zentrifugenröhrchen mit FACS-Puffer gewaschen, der Überstand nach der Zentrifugation verworfen und die Zellen im Restpuffer resuspendiert. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurden 200 µg Maus-IgG (Becton Dickinson) in einer Konzentration von 0,2 mg/ml zur Zellsuspension gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer verdünnt und auf verschiedene FACS-Röhrchen verteilt. Pro Messung wurden etwa $1-2 \times 10^5$ Zellen benötigt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 1500 rpm wurde erneut der Überstand verworfen und die Zellen durch Vortexen im Restpuffer resuspendiert. Es wurde jeweils Zweifachfärbung durchgeführt, d.h. die Zellen wurden mit einem PE- und einem FITC-konjugierten Antikörper (jeweils 10 µl) gegen CD86, CD40 (PharMingen, Hamburg, Deutschland), CD4, CD5, CD8, CD14, CD19, CD20, CD54, CD80, HLA-DR (Becton Dickinson), CD83 (Coulter-Immunotech, Hamburg, Deutschland) oder CD1a (OKT; Ortho Diagnostic System, Seattle, WA) inkubiert. Die Röhrchen wurden hierzu für 15 min im

Dunklen bei Raumtemperatur belassen. Nach einem Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer pro Röhrchen wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Beckton Dickinson) analysiert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgt mit der Software CellQuest (Becton Dickinson).

2.2.10 Chromium⁵¹Cr]-Release-Assay

Der *Chromium⁵¹Cr]-Release-Assay* dient der Überprüfung der Zytotoxizität von Effektorzellen (CTL). Dabei werden sogenannte *Targets* (Zielzellen) mit radioaktivem Chrom⁵¹Cr] ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) inkubiert, das von den Zielzellen inkorporiert wird. Daraufhin wird das restliche freie Chrom abgewaschen und die markierten Zielzellen mit den Effektorzellen ko-kultiviert. Werden die *Targets* von den CTL erkannt und lysiert, so tritt Chrom⁵¹Cr] aus. Die Überstände werden abgenommen und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen. Die Tumorzelllinie K562 wurde zum Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität im *Chromium⁵¹Cr]-Release-Assay* eingesetzt. Zellen dieser CML-Linie exprimieren keine MHC-Klasse-I Moleküle und können auf Grund dessen von NK erkannt und zerstört werden. Werden die als *Targets* eingesetzten Zellen im *Chromium⁵¹Cr]-Release-Assay* nicht lysiert, so kann davon ausgegangen werden, dass die Zytotoxizität in diesem Experiment auf die eingesetzten CTL zurückzuführen ist.

Die eingesetzten *Targets* wurden am Tag des Tests je nach Assay mit der entsprechenden RNA elektroporiert oder für zwei Stunden im Brutschrank mit dem entsprechenden Peptid in einer Konzentration von 50 µg/ml beladen und anschließend für eine Stunde mit radioaktivem Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) inkubiert. Gleichzeitig wurden alle anderen Zellen, die als *Targets* dienten auch mit Chrom⁵¹Cr] markiert. Das freie Chrom⁵¹Cr] wurde abgewaschen und die Zielzellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro well in 100 µl RP10 Medium auf 96-Well-Platten verteilt. Dabei wurde von jeder Zelllinie eine Reihe (entspricht

12 wells) belegt. In der Zwischenzeit werden die spezifischen CTL mit kaltem PBS von den Platten gelöst, gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Entsprechend der Anzahl an Zielzellen wurden CTL-Verdünnungsreihen hergestellt. Diese wurden zu den ersten 6 wells der *Target*-Zellen in den 96-well-Platten pipettiert. Jede Verdünnungsreihe begann mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ CTL in 100 μ l RP10 Medium und diese wurde dann von well zu well im Verhältnis 1:3 mit Medium verdünnt. Daraus resultierte folgendes Effektor- zu *Target*-Zellen Verhältnis (E:T): 30:1 im ersten well, 10:1 im zweiten, 3:1 im dritten, gefolgt von 1:1, 0,3:1, 0,1:1 im vierten bis sechsten well. Zur Ermittlung der spontanen Chrom^[51Cr]-Freisetzung durch die *Targets* wurden in 3 wells nur *Targets* in 100 μ l RP10 Medium gegeben.

Zur Ermittlung der maximalen Chrom^[51Cr]-Freisetzung wurden 3 wells mit *Targets* in je 100 μ l 2% Triton X-100, welches die Zellmembranen zerstört, gefüllt. Nach vierstündiger Inkubation der Platten bei 37°C mit 5% CO₂, wurden pro well 50 μ l des Überstands abgenommen und auf *Luma Plates*TM -96 (Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande) überführt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte am folgenden Tag nach vollständiger Eintrocknung der Überstände im Betacounter (1205 Betaplate liquid scintillation counter, Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland). Die prozentuale spezifische Lyse wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$100 \times (\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})$$

2.2.10.1 Cold Target Inhibition

Zur Überprüfung der Antigen-spezifität der Lyse wurden *Cold-Target-Inhibition Chromium*^[51Cr]-*Release-Assays* durchgeführt. Dabei wurden entsprechende nicht Chrom^[51Cr]-markierte Zielzellen (*Cold Target*) im Überschuss zum Ansatz mit Chrom^[51Cr]-markierten Zielzellen (*Hot Target*) gegeben. Da die *Cold Targets* in hohem Überschuss im Ansatz vorhanden waren, wurden praktisch nur sie von den spezifischen CTL lysiert, d.h. die *Hot Targets* blieben erhalten und somit wurde auch kein Chrom^[51Cr] freigesetzt.

Parallel dazu wurde noch ein Ansatz durchgeführt, bei dem die Zellen mit einem irrelevanten Peptid/RNA beladen wurden (*Cold Target*) und somit von den spezifischen CTL nicht erkannt und lysiert wurden. Die eingesetzten Chrom^[51Cr]-markierten *Hot Targets* wurden jedoch erkannt und Chrom^[51Cr] wurde freigesetzt.

2.2.10.2 Antikörper-Blockierung im *Chromium*^[51Cr]-Release-Assay

Um die HLA-Klasse I Restriktion der spezifischen CTL nachzuweisen, wurden Ansätze mit blockierenden Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden Chrom^[51Cr]-markierte *Targets* in 1 ml Medium mit einem gegen HLA-Klasse I gerichteten Antikörper (W6/32) in einer Konzentration von 20 µg/ml inkubiert. Der an das HLA-Klasse I-Molekül bindende Antikörper verhindert das Erkennen des MHC-Peptid-Komplexes durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor der CTL und dadurch die Lyse der *Targets*. Zur Kontrolle wurde parallel ein Ansatz mit Maus-IgG durchgeführt. Dieser sollte die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch spezifische CTL nicht blockieren und dadurch eine Lyse zulassen.

2.2.11 Elektroporation von DC

Die Elektroporation ist eine Methode zur Transfektion von Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden DC mit RNA elektroporiert, die wie unter 2.2.3 beschrieben aus malignen CLL-Zellen isoliert wurde. Als Kontrolle wurde ein EGFP (enhanced green fluorescent protein) *in-vitro*-Transkript eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Dr. med. Martin R. Müller, Tübingen, Deutschland).

Unreife DC wurden am Tag 6 zweimal mit serumfreiem X-Vivo 20-Medium gewaschen und in einer Dichte von 2×10^7 DC/ml Medium resuspendiert. Anschließend werden 200 µl der vorbereiteten Zellsuspension in eine 4 mm-Küvette gegeben und 10 µg der zu transfizierenden CLL-RNA hinzupipettiert. Für die unmittelbar danach durchgeführte Elektroporation wurde das Gerät

Easyject Plus unit Elektroporationsgerät (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit der nachfolgend genannten Einstellung verwendet:

Spannung 300 V, Widerstand 1540 Ω , Kapazität 150 μF , Impulszeit 231 ms.

Nach der Elektroporation wurden die DC unverzüglich wieder in RP-10 Medium transferiert und mit Zugabe von Zytokinen IL-4 (1000 IU/ml), GM-CSF (100 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.12 Induktion CLL-spezifischer T-Helferzellen

Die CD4⁺-T-Zellen wurden mit Hilfe des CD4⁺ T Cell *Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert. Dendritische Zellen wurden wie oben beschrieben *in vitro* generiert und an Tag 6 mit 10 μg CLL-RNA elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die DC für 24 Stunden in RP-10 Medium mit 10 ng/ml TNF- α inkubiert um zu reifen. Für die T-Helfer-Zell-Induktion wurden $2,5 \times 10^6$ CD4⁺ Lymphozyten mit 5×10^5 autologen DC (transfiziert mit CLL-RNA) co-kultiviert. An Tag 7 und 14 nach der T-Zellinduktion erfolgte jeweils eine Restimulation. Dabei wurden 5×10^5 autologe DC (transfiziert mit CLL-RNA) zu den Kulturen gegeben. Zur Wachstumsstimulation erfolgte eine Zugabe von 2 ng/ml IL-2 jeden zweiten Tag. Die Antigen-spezifität der induzierten T-Helferzellen wurde an Tag 20 nach der T-Zellinduktion (Tag 6 nach der zweiten Restimulation) in einem [³H]-Thymidin-Proliferationsassay wie unten dargestellt untersucht.

2.2.13 [³H]-Thymidin-Proliferationsassay

Beim Proliferationsassay wird die klonale Expansion der CD4⁺ Lymphozyten nach Stimulation verschiedener Effektorzellen gemessen. Nach 5 Tagen wird dem Assay [³H]-Thymidin zugegeben, das in der DNA der proliferierenden Zellen eingebaut wird. Die Quantifizierung erfolgte nach 16 h im Szintillationszähler.

Alle Effektorzellen wurden gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen in 100 μ l in X-Vivo-Medium resuspendiert. Bestimmte Effektorzellen, wie B-Zellen und CLL-Zellen, wurden mit γ -Strahlung einer Intensität von 30 Gy bestrahlt, um eine weitere Proliferation dieser Zellen zu verhindern. Pro Effektorzellen wurden je 1×10^5 Zellen in 4 wells einer 96-well-Platte ausplattiert. Je 2×10^5 der CLL-spezifischen CD4⁺-T-Zellen wurden in 100 μ l X-Vivo-Medium zu diesen Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden CD4⁺-T-Zellen ohne Effektoren verwendet. Die Blockierung der HLA-Klasse I- und der HLA-Klasse II-Moleküle wurde durch Inkubation der dendritischen Zellen für 1 h bei 37°C vor dem Assay mit den Antikörpern W6/32 (20 μ g/ml, anti-HLA-Klasse I) und Tü39 (20 μ g/ml, anti-HLA-Klasse II) erwirkt. Der Ansatz wurde für 5 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde je well Thymidin der Aktivität 14,8 kBq zugegeben, für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und zuletzt durch ein Zellerntegerät auf ein Filterpapier überführt und anschließend getrocknet. Danach wurde der Filter mit Szintillationsflüssigkeit befeuchtet und eingeschweißt. Die Strahlung wurde in einem Szintillator quantifiziert.

3. Ergebnisse

3.1 FACS-Analysen

3.1.1 Phänotyp der *ex vivo* generierten DC von CLL-Patienten

Der Phänotyp der für die T-Zell-Induktion verwendeten *ex vivo* generierten DC wurde standardmäßig im Durchflusszytometer analysiert. In Abb. 3.1 ist exemplarisch der Phänotyp der DC des Patienten #1 mit CLL dargestellt.

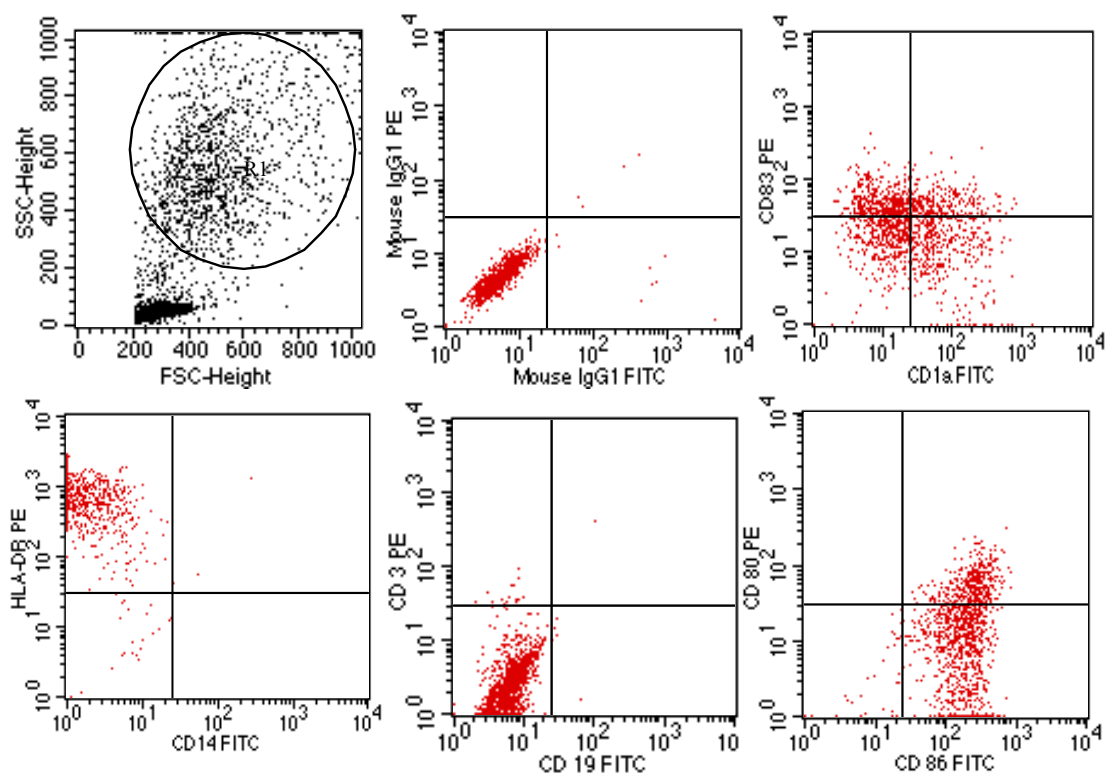


Abb. 3.1: Exemplarische FACS-Analyse reifer DC des Patienten #1 mit CLL. Die DC wurden aus adhärennten Monozyten durch Kultivierung in RP-10 Medium mit GM-CSF und IL-4 generiert. Zur Ausreifung wurden diese DC ab Tag 6 zusätzlich für 24 h mit TNF- α inkubiert. In der obigen Abbildung wird die FACS-Analyse der reifen DC vom Patient #1 nach 7 Tagen in Kultur gezeigt.

Die FACS-Analysen wurden durchgeführt, um verschiedene Zellen, die aus unterschiedlichen Verfahren aus dem heparinisierten Blut der Patienten mit CLL isoliert wurden, nach ihrer Größe und Granularität einzuteilen und ihre Reinheit zu bestimmen. Es wurde meist eine Zweifachfärbung durchgeführt, d.h. die Zellen wurden mit einem PE- und einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD86, CD40 (PharMingen, Hamburg, Deutschland), CD4, CD5, CD8, CD14, CD19, CD20, CD54, CD80, HLA-DR (Becton Dickinson), CD83 (Coulter-Immunotech, Hamburg, Deutschland) oder CD1a (OKT; Ortho Diagnostic System, Seattle, WA) markiert, je nachdem welche Zellen man analysieren wollte. Meist hat man mit den DC an Tag 7 nach der Dichtegradientenzentrifugation eine FACS-Analyse (Abb.3.1) durchgeführt mit folgendem DC-Panel (Tab.3.1).

Tab 3.1: Zur FACS-Analyse von DC verwendete monoklonale Antikörper

Tube	FITC-konjugierte Antikörper	PE-konjugierte Antikörper
1	Maus IgG	Maus IgG
2	CD1a	CD83
3	CD14	HLA-DR
4	CD19	CD3
5	CD86	CD80

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, exprimieren die *in vitro* generierten DC CD1a (DC-typische Marker); CD83 (Marker für reife DC) sowie kostimulatorische Moleküle CD80 und CD86. Erwartungsgemäß sind DC im Gegensatz zu Monozyten CD14-negativ.

3.1.2 Reinheit der isolierten B-Zellen

Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde standardmäßig die Reinheit der aus dem Blut der Patienten isolierten B-Zellen überprüft (Abb.3.2). Maligne B-Zellen unterscheiden sich durch die Expression von CD5 von gesunden Zellen, was eine Isolierung dieser Zellen mit Hilfe eines CD5-Antikörpers ermöglichte. Dies

war der Fall, wenn der Patient sich nicht in kompletter Remission befand. In Abb. 3.2 ist exemplarisch die Reinheit gesunder ($CD19^+CD5^-$) und maligner ($CD19^+CD5^+$) B-Zellen des Patienten #2 dargestellt. Diese Aufreinigung konnte mittels MACS[®]-Technologie durchgeführt werden.

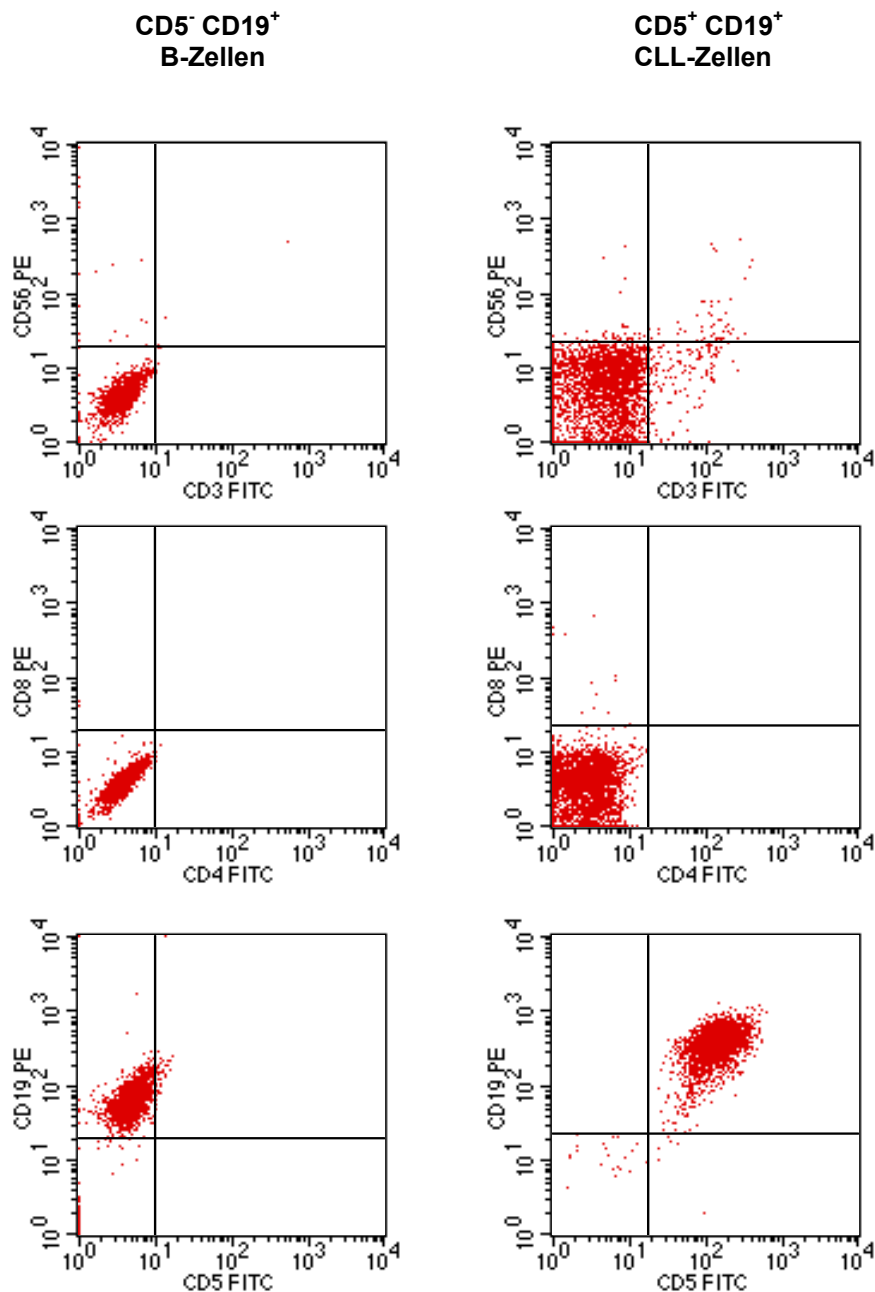


Abb 3.2: Analyse der Reinheit der isolierten B-Zellen des Patienten #2. CD19⁺ B-Zellen wurden mit Hilfe des *B-cell isolation kit* isoliert. Die malignen CD5⁺CD19⁺ wurden nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten CD5-Antikörper von den CD5⁻CD19⁺ B-Zellen mit Hilfe des *AntiFITC Multisort Kit* isoliert, nachdem die CD19⁺ Fraktion mit einem FITC-konjugierten AntiCD5-Antikörper markiert wurde.

3.2 Induktion CLL-spezifischer CTL mit Hilfe RNA-transfizierter DC

Für die *in vitro* Induktion autologer CTL gegen CLL-Zellen wurden DC von CLL-Patienten mit aus autologen leukämischen Lymphozyten isolierter RNA transfiziert und als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. Nach einer Restimulation wurden diese CTL in einem *Chromium*[⁵¹Cr]-Release-Assay eingesetzt (siehe Abb. 3.3).

Die CTL lysierten die malignen autologen CLL-Zellen, während die nicht malignen isolierten autologen B-Lymphozyten nicht erkannt wurden. Die Lyse der CLL-Zellen konnte mit einem monoklonalen Antikörper gegen HLA Klasse I verhindert werden. Damit wird demonstriert, dass die zytolytische Aktivität der *in vitro* induzierten CTL HLA-Klasse I-restringiert ist, und dass die T-Zell-Epitope auch bei den leukämischen Zellen im Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Es erfolgte keine Lyse der K562-Zellen, was darauf hinweist, dass die induzierte zytolytische Aktivität nicht NK-Zell-vermittelt war.

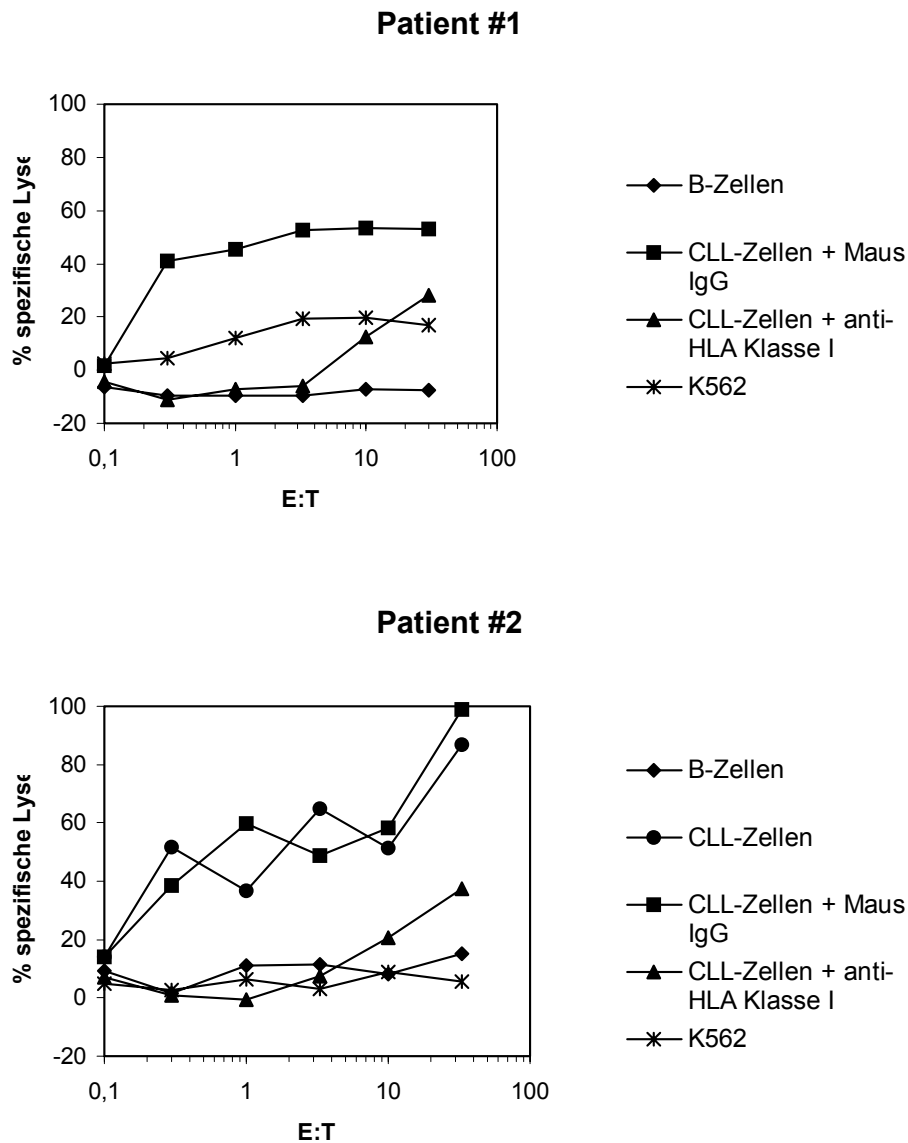


Abb. 3.3: Induktion autologer CLL-spezifischer CTL-Antworten mit RNA-transfizierten DC. Unreife, aus PBMC von zwei Patienten mit CLL (Patient #1 und #2) generierte DC wurden mit 10 μ g Gesamttumor-RNA elektroporiert, die aus malignen B-Zellen isoliert wurde. Nach Ausreifung der DC durch Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α für 24 h wurden diese als APC für eine *in vitro*-Induktion von CTL eingesetzt. Die zytotoxische Aktivität wurde am Tag 5 nach der Restimulation mittels eines ^{51}Cr -Release-Assays bestimmt. Als Targets wurden autologe leukämische Zellen oder nicht-maligne B-Zellen eingesetzt. Die Blockierung der HLA-Klasse I-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 wurde benutzt um die HLA-Klasse I-Restriktion zu analysieren. K562-Zellen wurden eingesetzt, um eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität auszuschließen.

3.3 Exprimierte Antigene in der CLL sind unter den leukämischen Zellen verteilt

Um festzustellen, ob die Epitope, die von den CTL-Linien des Patienten #1 erkannt werden, auch von malignen Zellen anderer Patienten exprimiert und präsentiert werden, wurden in einem Chrom^[51Cr]-Release-Assay autologe DC als Targets benutzt, die mit Gesamttumor-RNA anderer leukämischer Zellen mehrerer Patienten transfiziert wurden (siehe Abb. 3.4). Die CTL lysierten effizient die mit autologer CLL-RNA transfizierten DC. Die CTL waren auch imstande, autologe DC, die mit Tumor-RNA von drei anderen CLL-Patienten und einem AML-Patienten transfiziert wurden, zu erkennen, was darauf hinweist, dass die Spezifität der mit CLL-RNA generierten CTL gegen unterschiedliche Antigene gerichtet ist. Die als Negativkontrolle verwendeten DC, die mit EGFP-RNA transfiziert worden waren, wurden nicht lysiert.

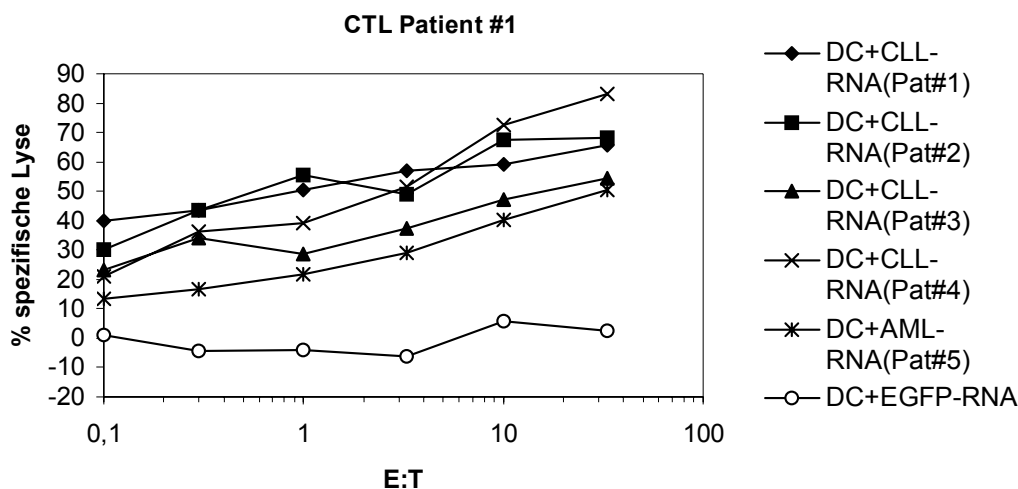


Abb. 3.4: Crossreaktivität der induzierten leukämischen CTL. Unreife, aus Monozyten gewonnene DC, generiert aus peripherem Blut von Patient #1, wurden mit 10 µg Gesamttumor-RNA aus CLL-Zellen elektroporiert. Nach Ausreifung der DC unter Inkubation in 10 ng/ml TNF- α für 24 h wurden diese als APC für eine *in vitro*-Induktion von CTL eingesetzt. Die zytotoxische Aktivität der CTL wurde an Tag 5 nach der letzten Restimulation mittels eines ⁵¹Cr-Release-Assays bestimmt. Als Targets wurden aus Monozyten abstammende DC mit autologer CLL-RNA, mit RNA von drei anderen CLL-Patienten (Patienten #2 - #4) und mit RNA von einem AML-Patienten (Patient #5) transfiziert. Elektroporierte DC mit EGFP-RNA, wurden als Kontrolle eingesetzt.

Um die Spezifität der *in vitro* induzierten CTL genauer zu analysieren, wurden als Targets autologe mit verschiedenen HLA-A2-restringierten Peptiden beladene DC eingesetzt. Die verwendeten Peptide stammten aus Tumorassoziierten Antigenen, die bekanntlich in CLL bzw. in anderen hämatologischen Malignitäten exprimiert werden. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt ist, haben die CTL die Target-Zellen, die mit einem aus dem Protein Survivin abstammenden Peptid beladen wurden, erkannt, während sie die DC, die mit anderen Peptiden beladen waren, nicht lysierten. Das weist darauf hin, dass die gegen Survivin gerichtete Toxizität zur CTL-Antwort gegen CLL-Zellen beitragen könnte.

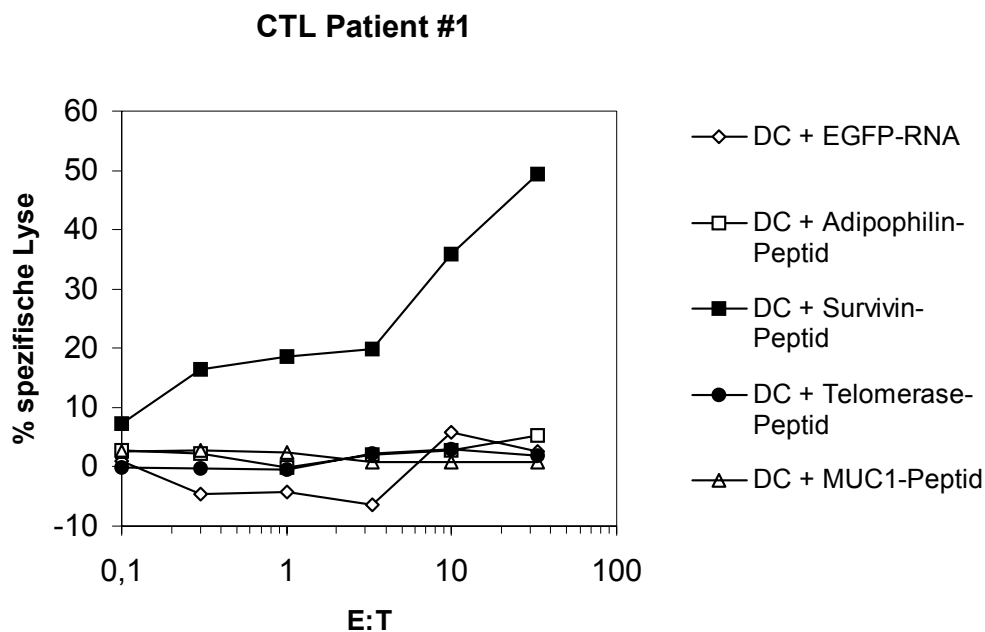


Abb. 3.5: Spezifität der induzierten CTL-Antwort mit aus CLL gewonnenen RNA-transfizierten DC. Die Feinspezifität der induzierten CTL mit RNA-transfizierten DC wurde analysiert, indem autologe DC des Patienten #1 gepulst mit HLA-A2-bindenden Peptiden aus Adipophilin, Survivin, MUC1 und Telomerase als Targets eingesetzt wurden. Mit EGFP-mRNA elektroporierte DC fungierten als Negativkontrolle.

3.4 Induktion CLL-spezifischer T-Zellen mit Hilfe amplifizierter mRNA

Eine Limitation der nativen Tumor-Methoden in den Vakzinierungsstudien ist die Verfügbarkeit der Tumor-Proben, besonders bei Patienten mit geringer Tumorlast. In letzter Zeit wurde gezeigt, dass dieses Hindernis umgangen werden kann, indem man amplifizierte mRNA benutzt. Diese Methode wurde hier eingesetzt, um CLL-spezifische CTL *in vitro* zu generieren. Aus Monozyten gereifte DC wurden sowohl mit nativer Tumor-RNA autologer CLL-Zellen als auch mit amplifizierter mRNA elektroporiert und als APC für die CTL-Induktion benutzt.

Wie in Abbildung 3.6 dargestellt ist, sind keine Unterschiede beim Lyseverhalten der mit den unterschiedlichen RNA-Proben induzierten CTL zu finden. Die Spezifität dieser CTL wurde durch *cold target inhibition* überprüft. Die Lyse der autologen mit Chrom^[51Cr] beladenen CLL-Zellen (*'hot' targets*) konnte durch die Zugabe von CLL-Zellen (*'cold' targets*) blockiert werden, aber nicht durch die Zugabe von nicht malignen peripheren mononukleären Zellen (PBMNC), was die Spezifität der CTL gegen die CLL-Zellen belegt.

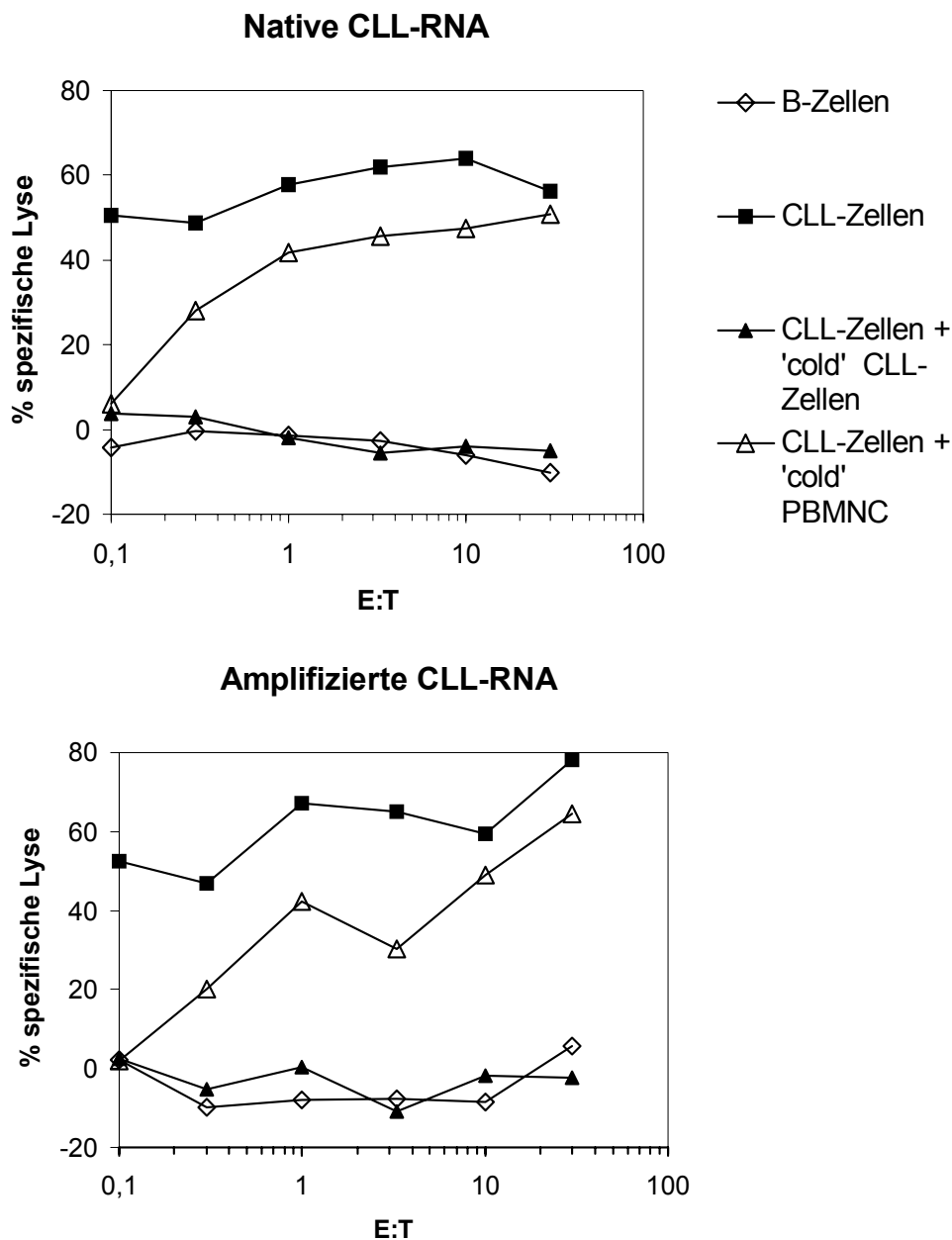


Abb. 3.6: CTL Induktion *in vitro* mit amplifizierter CLL-RNA. Die *in vitro*-Induktion der CTL erfolgte mit autologen DC, die mit nativer Gesamtumor-RNA oder amplifizierter CLL-mRNA isoliert aus autologen CLL-Zellen elektroporiert wurden. Die zytotoxische Aktivität der CTL wurde mittels eines *Chromium*⁵¹*Cr*-Release-Assay bestimmt. Als Targets wurden autologe leukämische Zellen oder B-Zellen eingesetzt. Im *Cold-Target-Inhibition*-Assay wurde die Spezifität der CTL bestimmt. Die Lyse der autologen CLL-Zellen (mit *Chrom*⁵¹*Cr* beladen, 'hot targets') konnte mit Zugabe von nicht beladenen autologen CLL-Zellen ('cold targets') geblockt werden, aber nicht mit Zugabe von nicht malignen autologen PBMNC.

3.5 Induktion von CD4⁺ T-Lymphozyten mit Hilfe RNA-transfizierter DC

Als nächstes wurde untersucht, ob durch RNA transfizierte DC in der Lage sind, CLL-spezifische CD4⁺-T-Zellen zu induzieren. CD4⁺-T-Lymphozyten wurden mittels MACS-Technologie (magnetic associated cell sorting) isoliert und mit autologen DC stimuliert, die mit RNA autologer CLL-Zellen transfiziert worden waren. ³H-Thymidin-Proliferationsassays wurden nach zwei Restimulationen durchgeführt und zeigten ein CLL-spezifisches Proliferationsmuster, wie in Abbildung 3.7 dargestellt ist. Die induzierte CLL-spezifische Proliferation konnte mit gegen HLA-Klasse II gerichteten Antikörpern blockiert werden, aber nicht mit Antikörpern gegen HLA-Klasse I, was die HLA-Klasse II-Restriktion der induzierten T-Zellpopulation belegt.

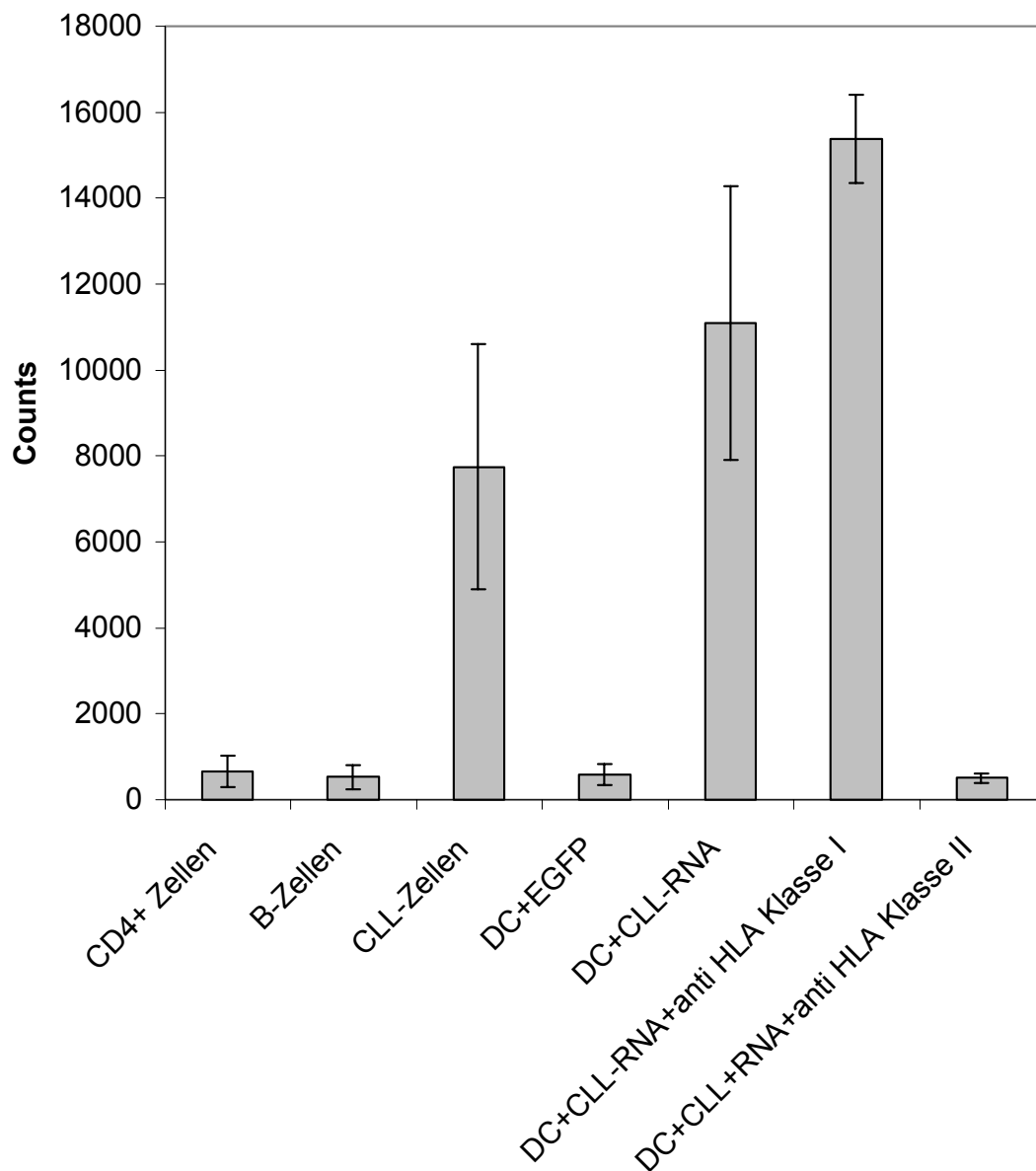


Abb. 3.7: Induktion proliferativer T-Helferzell-Antwort mit CLL-RNA-transfizierten DC. Die Isolation der CD4+ T-Lymphozyten erfolgte über MACS-Technologie. Für die anschließende T-Helferzellinduktion wurden mit CLL-RNA transfizierte DC mit autologen CD4+ T-Lymphozyten koinkubiert. Zwei Restimulationen durch mit autologer RNA transfizierte DC wurden an den Tagen 7 und 14 nach der T-Zellinduktion durchgeführt. Die Bestimmung der induzierten Proliferation erfolgte am Tag 20 nach der Induktion über einen ^3H -Proliferationstest. Autologe CLL-Zellen, B-Lymphozyten oder mit CLL-RNA elektroporierte DC fungierten in dem Test als Stimulatoren. Unstimulierte CD4+ T-Zellen und mit mit irrelevanter EGFP-RNA elektroporierten DC stimulierte CD4+ T-Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Blockierung der HLA-Moleküle wurde durch Inkubation der DC mit den Antikörpern W6/32 (HLA-Klasse I) und Tü39 (HLA-Klasse II) für 1 h vor dem Proliferationsassay bewirkt.

4. Diskussion

Die heutigen Therapieansätze der CLL, die vor allem auf der Chemotherapie basieren, verbessern sich zwar laufend, bieten jedoch weiterhin keine dauerhafte Heilung. Die wichtigsten Probleme der konventionellen Chemotherapie bei malignen Erkrankungen sind Mangel an Spezifität der zytostatischen Substanzen, Auftreten von Resistenzentwicklungen und Verbleib residueller Tumor-Zellen nach der Primärtherapie. Diese können in vielen Fällen ein Rezidiv verursachen. Die selektive Behandlung maligner Erkrankungen mit weniger generalisierten Nebenwirkungen und Elimination residueller Tumorzellen sind derzeit ein wichtiges Ziel der Krebsforschung.

Die Immuntherapie hat sich zu einer zusätzlichen Behandlungsmethode entwickelt, die erfolgreich in der Primär- und Rezidivbehandlung bösartiger Tumoren eingesetzt werden könnte. In der Immuntherapie wird generell versucht, die körpereigenen Immunreaktionen gegenüber den Krebszellen so zu beeinflussen, dass der Körper selbst gegen den Tumor vorgehen kann.

Immuntherapeutische Strategien mit Immunmodulatoren (Interferone und Interleukine), monoklonalen Antikörpern in nativer Form oder nach Konjugation mit einem Toxin (Immunotoxin), einem Radionuklid (Radioimmunkonjugat) oder mit einem weiteren Antikörper (bispesifischer Antikörper) stellen hierbei sehr vielsprechende Optionen dar. Ein Beispiel hierfür ist Herceptin, ein Antikörper gegen das Tumorantigen Her-2/neu, der bereits erfolgreich in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird (13, 21, 24, 44, 60, 67).

In dieser Arbeit wurde mit der Generierung spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch dendritische Zellen ein weiterer Ansatz verfolgt. Der Angriff gegen den Tumor erfolgt dabei auf zellulärer Ebene. Dendritische Zellen werden als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt und mit maligner RNA beladen. Dies führt zur Induktion spezifischer T-Lymphozyten, die maligne Zellen erkennen und lysieren sollen.

4.1. Welche Ergebnisse konnte diese Arbeit zur Verfügung stellen?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Tumor-RNA transfizierte DC in der Lage sind, autologe CLL-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren. Aus Monozyten eines CLL-Patienten generierte DC wurden dabei mit autologer CLL-RNA transfiziert und als APC benutzt, um zytotoxische und proliferative T-Zell-Antworten zu induzieren.

Die *in vitro* generierten zytotoxischen T-Zellen zeigten eine Leukämie-spezifische Lyse von autologen malignen Zellen während die nicht-malignen autologen B-Lymphozyten und DC nicht erkannt wurden. Die Spezifität der beobachteten zytotoxischen Aktivität konnte in *cold target inhibition assays* bestätigt werden. Die Lyse der CLL-Zellen konnte mit einem monoklonalen Antikörper gegen HLA-Klasse I-Moleküle geblockt werden, was darauf hinweist, dass HLA-Klasse I-restringierte Epitope präsentiert und von autologen CTL erkannt wurden. Um weiterhin die Durchführbarkeit und den möglichen Gebrauch der RNA-Transfektion im Einsatz bei minimal-residualen Erkrankungen zu analysieren, wurde eine Methode etabliert, die isolierte Tumor-RNA zu amplifizieren (53). In Übereinstimmung mit vorherigen Studien (18, 53) wurde gezeigt, dass mit der Benutzung dieses Verfahrens autologe CLL-spezifische CTL Antworten *in vitro* generiert werden können.

Ein weiterer interessanter und wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die Elektroporation der DC mit Gesamttumor-RNA auch HLA-Klasse II-vermittelte T-Zellantworten hervorrufen können. Diese Ergebnisse belegen, dass von Patienten mit CLL funktionell aktive DC und T-Lymphozyten generiert werden können, die in der Lage sind, autologe leukämische Zellen zu erkennen, trotz der bisher beschriebenen immunologischen Alterationen und Defizienzen bei Patienten mit CLL (41, 45, 65, 75). Das deutet darauf hin, dass effiziente Bereitstellung und Prozessierung der Antigene und deren Präsentation durch professionelle APC die immunologischen Defekte in der CLL auf der Ebene der Antigenpräsentation und der Effektorfunktionen überwinden können.

Interessanterweise, stellte sich im Rahmen weiterer Untersuchungen mit CLL-Zellen unterschiedlicher Patienten heraus, dass die CTL-Linien, die nach mehreren Restimulationen mit RNA-transfizierten DC generiert wurden, nicht nur die autologen CLL-Zellen erkennen können, sondern auch maligne leukämische Zellen, die von anderen HLA-A2⁺ CLL-Patienten stammen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zumindest manche der Antigene, die zu der beobachteten Lyse geführt haben, auch von diesen Zellen exprimiert wurden und somit gemeinsame Antigene („shared antigens“) darstellen.

Daher wurde in folgenden Experimenten die Spezifität der *in vitro* induzierten CTL analysiert mit Hilfe von autologen DC, die mit HLA-A2-bindenden Peptiden beladen wurden. Die Peptide stammen aus Tumor-assoziierten Antigenen, die bekanntlich von einer großen Auswahl von malignen Zellen exprimiert werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass die polyklonalen CTL-Linien, die mit Gesamttumor-RNA-transfizierten DC induziert wurden, mit Survivin-Peptid beladene Zellen erkennen konnten, während die Zellen, die mit Telomerase- und MUC 1-Peptiden beladen waren, nicht lysiert wurden. Das deutet darauf hin, dass die gegen Survivin-Peptid gerichtete zytotoxische Aktivität zu der beobachteten lytischen Aktivität der CTL-Linien beigesteuert hat. Es konnte vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass autologe Survivin-spezifische CTL, die in der Lage waren, autologe maligne Zellen zu erkennen, in CLL-Patienten induziert werden können. Das weist darauf hin, dass Survivin ein interessantes Tumorantigen ist, das für die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren in der Behandlung von CLL geeignet sein könnte.

Zusammenfassend erlauben die vorliegenden Daten den Schluss, dass CLL-spezifische autologe CD8- und CD4-vermittelte T-Zellantworten mit Hilfe von mit Gesamttumor-RNA transfizierten DC *in vitro* induziert werden können .

4.2. Probleme und Grenzen dieser Arbeit

Es muss beachtet werden, dass alle Experimente *in vitro* durchgeführt wurden, so dass sich die Ergebnisse nur begrenzt auf das komplexe Immunsystem eines Menschen übertragen lassen.

Um eine aktive Vakzinierung gegen Tumorzellen spezifisch wirksam zu machen, ist die Expression Tumor-assoziiertes Antigene eine wichtige Voraussetzung. Im Vergleich zu anderen Neoplasien sind bei der CLL jedoch nur wenige bekannt. Da in dieser Arbeit keine spezifischen definierten TAA sondern die gesamte Tumor-RNA für die Beladung der DC benutzt wurde, wäre es möglich, durch diese Vakzine Immunantworten gegen körpereigene Antigene zu induzieren, da die verschiedenen Codierungsabschnitte der malignen RNA zur Zeit nicht bekannt sind, wie auch die Wahrscheinlichkeit, dass manche davon sich auch auf der gesunden RNA befinden könnten.

4.3. Vakzinierungsstudien

Es sind schon mehrere vielversprechende Ergebnisse bei Vakzinierungsstudien beschrieben worden. Eine der ersten Studien wurde 1998 mit 16 Patienten, die an metastasiertem Melanom erkrankt waren, durchgeführt. Nestle und Mitarbeiter setzten damals aus Melanomen abgeleitete HLA-Klasse I bindende Peptide und Tumorzell-lysate in die Vakzinierung ein. Autologe DC wurden damit beladen und in die Lymphknoten der Patienten injiziert. Bei 5 von 16 Patienten wurde ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet, darunter 2 Komplettremissionen mit über 15 Monaten Dauer (56).

In einer weiteren Studie wurden 35 Nierenzellkarzinompatienten mit DC, die mit Tumorlysate beladen waren, intravenös oder intradermal geimpft. 27 Patienten haben die Studie komplett durchlaufen, davon konnte bei 2 eine Totalremission erzielt werden, bei einem Patienten eine Teilremission und bei 7 waren stabile Erkrankungen zu verzeichnen (33).

In einer Untersuchung mit Patientinnen, die an Mamma- und Ovarial-Karzinom in fortgeschrittenem Stadium erkrankt waren, haben Brossart und Mitarbeiter *in vitro* generierte autologe DC mit HER-2/neu- oder MUC-1-Peptiden beladen. Diese führten *in vivo* zur Induktion Antigen-spezifischer CTL in 5 von 10 Patientinnen. Bei einer Patientin mit metastasiertem Mamma-Karzinom wurde die Rückbildung subkutaner Metastasen beobachtet.

Beim Multiplen Myelom oder follikulären B-Zell-Lymphom konnte gezeigt werden, dass autologe DC, die mit den Idiotypimmunglobulinen der malignen Zellen beladen wurden, eine Immunantwort induzieren können, die sich gegen den Tumor richtet. Bei 4 Patienten mit follikulärem B-Zell-Lymphom waren nach der i.v. Vakzination eine Vollremission und eine Teilremission zu verzeichnen. Bei einem Patienten konnten sogar anschließend keine molekularbiologischen Hinweise auf die Erkrankung gefunden werden. Bei einer anderen Studie mit 12 Patienten mit Multiplen Myelom trat bei 2 eine Totalremission auf, die 17 bzw. 30 Monate lang anhielt (34,62).

Bei keiner der Studien wurden schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet, die zum Therapieabbruch führten. Die Nebenwirkungen in den Studien beschränkten sich auf Temperaturanstieg, Frösteln, Kopfschmerzen, Übelkeit und ein lokales Erythem an der Einstichstelle.

4.4. Ausblick

Eine Zunahme der chronisch lymphatischen Leukämie ist durch eine verlängerte Lebenserwartung der Bevölkerung anzunehmen. Die bisherigen Therapieansätze bieten aber weiterhin keine dauerhafte Heilung. Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe von mit Gesamttumor-RNA transfizierten DC spezifisch autologe CD8- und CD4-vermittelten T-Zellantworten *in vitro* zu induzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten die experimentelle Grundlage zur Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien in der CLL bilden, die in Zukunft die Basis einer weit anwendbaren Immuntherapie darstellen könnten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effizienz RNA-transfizierter DC, *in vitro* Leukämie-spezifische autologe T-Zellantworten zu generieren, analysiert und es konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten stammende DC, transfiziert mit Gesamttumor-RNA oder PCR-amplifizierter RNA aus CLL-Zellen, die Möglichkeit haben potente autologe zytotoxische und proliferative T-Zellantworten hervorzurufen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl funktionelle DC als auch funktionelle T-Zellen aus dem peripheren Blut der CLL-Patienten generiert werden konnten. Die DC der CLL-Patienten waren in der Lage CD8- und CD4-gerichtete Immunantworten zu induzieren. Die induzierten CTL und T-Helferzellen erkannten autologe unstimulierte CLL-Zellen und DC, die mit aus autologen malignen Zellen isolierter RNA transfiziert wurden, aber nicht die autologen nicht-malignen B-Lymphozyten oder mit irrelevanter RNA transfizierte DC. Darüber hinaus erkannten diese CTL autologe mit RNA aus verschiedenen CLL-Patienten transfizierte DC, was darauf hindeutet, dass die zytotoxische Aktivität gegen bestimmte Antigene gerichtet ist, die in vielen malignen leukämischen Zellen exprimiert werden. Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass mit CLL-RNA transfizierte DC die bei CLL-Patienten bisher beschriebenen Immundefekte und Alterationen überwinden können, und dass es eine vielversprechende Option repräsentiert, CLL-spezifische Immuntherapien zu entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im November 2003 im Journal Blood unter dem Titel „Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells“ publiziert.

6 Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. Third edition. 1994.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
3. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lysterly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res*. 2000;60:1028-1034.
4. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;690:42-49.
5. Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*. 1995;2:167-175.
6. Boon T, Cerrotini JC, van der Eynde B, van der Bruggen P, van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol*. 1994;12:337-365.
7. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;183:725-729.
8. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*. 1997;18:267-268.
9. Brossart P, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood*. 1997;90:1594-1599.
10. Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol*. 1997;158:3270-3276.
11. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, et al. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998;92:4238-4247.

12. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee H-G, Kanz L, Brugger W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*. 1999;93:4309-4317.
13. Brossart P, Stuhler G, Flad T, et al. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. 1998;58:732-736.
14. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*. 2001;29:1247-1255.
15. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2000;96:3102-3108.
16. Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*. 2001;98:2992-2998.
17. Cella M, Salusto F, Lanzavecchia A. Origin maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:10-16.
18. Chang JW, Peng M, Vaquerano JE, et al. Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies. *Anticancer Res*. 2000;20:1329-1336.
19. Cook G, Campbell JD, Carr CE, Boyd KS, Franklin IM. Transforming growth factor beta from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2responsiveness in T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 1999;66:981-988.
20. Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1999;86:2684-2682.
21. Dillman RO. Magic bullets at last! Finally, approval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer!!! *Cancer Biother Radiopharm*. 1997;12:223-225.

22. Dreger P, von Neuhoff N, Kuse R, et al. Early stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: a chance for cure? *Br J Cancer*. 1998;77:2291-2297.
23. Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, et al. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;101:3413-3415
24. Ferrara F, Rametta V, Mele G, Antinolfi I, Mettievier V, Cimino R. Recombinant inteferon 2A as maintenance treatment for patients. *Am J Hematol* 1992;41:45-49.
25. Fisk B, Blevins BL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*. 1995;181:2109-2117.
26. Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999;11:263-270.
27. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 97:2777-2783.
28. Gribben JG. Bone marrow transplantation for low-grade B-cell malignancies. *Curr Opin Oncol*. 1997;9:117-121.
29. Grünebach F, Müller MR, Nencioni A, Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther*. 2003;10:367-374.
30. Hale G, Dyer MJ, Clark MR, et al. Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet*. 1988;2:1394-1399.
31. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest*. 2002;109:409-417.
32. Herr W, Ranieri E, Olson W, Zarour H, Gesualdo L, Storkus WJ. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood*. 2000;96:1857-1864.
33. Höftl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramona R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH, Thurnher M. Immunotherapie of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Canc Res*. 2002;8:3369-3376.

34. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2:52-58.
35. Janeway CA, Travers P. *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag. 2. Auflage. 1997
36. Kaplan JM, Yu Q, Piraino ST, et al. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol.* 1999;163:699-707.
37. Keating MJ. Fludarabine phosphate in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 1990;17:49-62.
38. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood.* 1998;92:1165-1171.
39. Khouri I, Champlin R. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med.* 1996;125:780.
40. Khouri IF, Keating M, Korbling M, et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol.* 1998;16:2817-2824.
41. Kneitz C, Goller M, Wilhelm M, et al. Inhibition of T cell/B cell interaction by B-CLL cells. *Leukemia.* 1999;13:98-104.
42. Krackhardt AM, Harig S, Witzens M, Broderick R, Barrett P, Gribben JG. T-cell responses against chronic lymphocytic leukemia cells: implications for immunotherapy. *Blood.* 2002;100:167-173.
43. Krackhardt AM, Witzens M, Harig S, et al. Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX. *Blood.* 2002; 100:2123-2131.
44. Manzke O, Titzer S, Tesh H, Diehl V, Bohlen H. CD3 x CD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation for locoregional treatment of low-malignancy non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer* 1997;80:2706-2711.
45. Matutes E, Wechsler A, Gomez R, Cherchi M, Catovsky D. Unusual T-cell phenotype in advanced B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1981;49:635-642.

46. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999;94:448-454.
47. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
48. Mehta J, Powles R, Singhal S, et al. T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation from a partially HLA-mismatched unrelated donor for progressive chronic lymphocytic leukemia and fludarabine-induced bone marrow failure. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:881-883.
49. Mehta J, Powles R, Singhal S, Iveson T, Treleaven J, Catovsky D. Clinical and hematologic response of chronic lymphocytic and prolymphocytic leukemia persisting after allogeneic bone marrow transplantation with the onset of acute graft-versus-host disease: possible role of graft-versus-leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:371-375.
50. Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, et al. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Ann Intern Med*. 1996;124:311-315.
51. Moller P, Hammerling GJ. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumour immunity. *Cancer Surv*. 1992;13:101-127.
52. Montserrat E. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2003;30:34-39.
53. Müller MR, Grünebach F, Kayser K, et al. Expression of Her-2/neu on Acute Lymphoblastic Leukemias: Implications for the Development of Immunotherapeutic Approaches. *Clin Cancer Res*. 2003;9:3448-3453
54. Müller MR, Grünebach F, Nencioni A, Brossart P. Transfection of Dendritic Cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T-Cell Immunity against Breast Carcinomas and reveals the Immunodominance of presented T-Cell Epitopes. *J Immunol*. 2003;170:5892-5896.

55. Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.* 1998;16:364-369.
56. Nestle FO, Alijagic S, Giliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccinations of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998;4:328-332.
57. O'Brien S, Del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1995;85:307-318.
58. Osterborg A, Fassas AS, Anagnostopoulos A, Dyer MJ, Catovsky D, Mellstedt H. Humanized CD52 monoclonal antibody Campath-1H as first-line treatment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1996;93:151-153.
59. Pavletic ZS, Bierman PJ, Vose JM, et al. High incidence of relapse after autologous stem-cell transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Ann Oncol.* 1998;9:1023-1026.
60. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* 1993;329:1219-1224.
61. Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, et al. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol.* 2002;20:3891-3897.
62. Reichart VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engelmann EG, Blume KG, Levy R. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cells transplantation for multiple myeloma. *Blood.* 1999;93:2411-2419.
63. Renz-Polster H, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin.* Urban und Fischer Verlag. 2. Auflage. 2001
64. Rondon G, Giralt S, Huh Y, et al. Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:669-672.
65. Rossi E, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Heffernan AM, Catovsky D. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1996;10:494-497.

66. Schmidt SM, Schag K, Müller MR, et al. 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.
67. Schnell R, Vitteta E, Schindler J, et al. Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in Hodgkin's lymphoma 1998;30:25-37.
68. Scott-Taylor TH, Pettengell R, Clarke I, et al. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500:265-279.
69. 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.
70. Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A, Chun HG, Cheson BD. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J Clin Oncol*. 1997;15:458-465.
71. Specht JM, Wang G, Do MT, et al. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med*. 1997;186:1213-1221.
72. Sutton L, Maloum K, Gonzalez H, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for advanced B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1998;12:1699-1707.
73. Tada T, Hu FY, Kishimoto H, Furutani-Seiki M, Asano Y. Molecular events in the T cell-mediated suppression of the immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;636:20-27.
74. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1486-1490.
75. Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol*. 1996;171:68-73.
76. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2588-2592.

77. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, et al. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:87-97.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. med. Peter Brossart besonders herzlich für die Überlassung dieses Themas danken. Durch seine hervorragende Betreuung war jedes Problem in der methodischen Arbeit zu bewältigen und ich bin sehr froh, dass ich in seiner Arbeitsgruppe mitwirken durfte.

Spezieller Dank gilt Dr. med. Martin Müller für die Vermittlung der ersten Labortechniken und für viele wertvolle Hinweise. Durch seine intensive Betreuung war diese Arbeit überhaupt erst möglich.

Sylvia Stephan und Bruni Schuster danke ich für die technische Unterstützung, die gute Organisation des Labors und die gute Laune.

Bei Dr. Silke Appel bedanke ich mich sehr fürs Korrekturlesen und die Beantwortung aller Fragen während der praktischen Phase dieser Arbeit.

Vielen Dank an alle Beteiligten der Arbeitsgruppe, die zusammen eine sehr herzliche Atmosphäre geschaffen haben, so dass jeder Tag im Labor mir Spaß bereitet hat.

Ebenfalls möchte ich meinem Freund Thomas Ott für die vielen aufbauenden und aufheiternden Worte danken. Nicht zu vergessen ist seine wertvolle Hilfe am Computer.

Meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle für die lustigen Stunden während meiner Studienzeit danken, besonders Iro Nikolaidou, die mich vom ersten Tag meines Studiums an begleitet und unterstützt hat.

Abschließend danke ich von Herzen meiner Familie für die stetige Fürsorge. Besonderer Dank gilt meinen Eltern Panagiota und Anastassios, die durch ihre Liebe und ihre Unterstützung mir das Studium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name: Tsakou
Vorname: Garyfalia
Geburtsdatum: 01.06.1980
Geburtsort: Palioura (Griechenland)
Nationalität: griechisch

Schulischer Werdegang:

1986-1987 9.Grundschule Amarousiou, Athen
1987-1990 Sechseckschule,Grundschule, Hochdahl
1990-1992 Gymnasium Hochdahl, Hochdahl
1992-1995 Griechisches Gymnasium Düsseldorf, Düsseldorf
1995-1998 Griechisches Lyzeum Düsseldorf, Düsseldorf
September 1998 Abiturprüfung, Athen

Studium:

1998-2000 Biologie, Universität Athen
Seit April 2000 Medizin, Universität Tübingen
April 2002 Ärztliche Vorprüfung, Tübingen
März 2003 Erstes Staatsexamen, Tübingen
April 2005 Zweites Staatsexamen, Tübingen
Mai 2006 Drittes Staatsexamen, Ostfildern