

T-Zell-*priming* außerhalb sekundärer lymphatischer Gewebe

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
David Schrama
aus
Karlstadt

Würzburg im November 2004

Eingereicht am: 26.11.2004

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter: Prof. Dr. J.C. Becker

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Tag des Promotionskolloquiums: 20.07.05

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	T-ZELLBIOLOGIE	1
1.2.1	<i>Die Entwicklung der T-Zellen</i>	<i>1</i>
1.2.2	<i>T-Zellrezeptor.....</i>	<i>3</i>
1.2.3	<i>Zirkulation von T-Lymphozyten</i>	<i>8</i>
1.2.4	<i>Priming.....</i>	<i>9</i>
1.2.5	<i>Expansion von T-Lymphozyten.....</i>	<i>11</i>
1.2.6	<i>Homing</i>	<i>11</i>
1.3	DAS MALIGNNE MELANOM	13
1.3.1	<i>Ätiologie</i>	<i>13</i>
1.3.2	<i>Therapie und immunologisches Modell</i>	<i>16</i>
1.4	IN SITU-METHODEN ZUR DARSTELLUNG VON T-ZELLANTWORTEN	18
1.4.1	<i>Kartierung des T-Zellrezeptorrepertoires.....</i>	<i>19</i>
1.4.2	<i>In situ-Detektion von spezifischen T-Zellrezeptorreaktivitäten</i>	<i>23</i>
1.5	FRAGESTELLUNG	24
1.6	VORÜBERLEGUNGEN UND MODELLSYSTEME	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1	VERSUCHSTIERE UND MATERIAL	28
2.1.1	<i>Versuchstiere</i>	<i>28</i>
2.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>28</i>
2.1.3	<i>Kits</i>	<i>29</i>
2.1.4	<i>DGGE-Primer</i>	<i>30</i>
2.1.5	<i>Puffer, Lösungen und Medien</i>	<i>33</i>
2.1.6	<i>Gele und Elektrophoresebedingungen</i>	<i>35</i>
2.1.7	<i>Antikörper.....</i>	<i>38</i>
2.1.8	<i>Fusionsprotein.....</i>	<i>39</i>
2.2	METHODEN.....	39
2.2.1	Zellkultur	39
2.2.1.1	Zellzahlbestimmung.....	39
2.2.1.2	Zellkulturführung.....	40
2.2.2	<i>Tierexperimente, DC-Vakzinierung und Probengewinnung</i>	<i>41</i>
2.2.2.1	<i>Induktion von Lungenmetastasen bzw. subkutanen Tumoren</i>	<i>41</i>
2.2.2.2	<i>Lymphotoxintherapie.....</i>	<i>41</i>
2.2.2.3	<i>Entnahme von Tumorbiopsien aus Mäusen</i>	<i>41</i>
2.2.2.4	<i>Gewinnung von murinen Tumor infiltrierender Lymphozyten (TIL).....</i>	<i>42</i>
2.2.2.5	<i>Gewinnung von murinen PBL aus der Milz</i>	<i>42</i>
2.2.2.6	<i>Patienten und DC-Vakzinierungsprotokoll</i>	<i>43</i>
2.2.2.7	<i>PBL-Gewinnung aus humanem Blut</i>	<i>44</i>
2.2.2.8	<i>Isolierung von spezifischen T-Zellen.....</i>	<i>45</i>
2.2.3	<i>In situ-Nachweismethoden</i>	<i>45</i>
2.2.3.1	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....</i>	<i>45</i>
2.2.3.2	<i>Immunhistologie</i>	<i>46</i>
2.2.3.2.1	<i>Indirekte Immunhistochemie.....</i>	<i>46</i>
2.2.3.2.2	<i>Direkte Immunhistochemie</i>	<i>47</i>
2.2.3.2.3	<i>Immunhistochemische Doppelfärbung.....</i>	<i>47</i>
2.2.3.3	<i>Immunfluoreszenzfärbungen</i>	<i>48</i>
2.2.3.4	<i>Elektronenmikroskopie</i>	<i>49</i>
2.2.4	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>50</i>
2.2.4.1	<i>RNA-Isolierung.....</i>	<i>50</i>
2.2.4.2	<i>cDNA-Synthese</i>	<i>51</i>

2.2.4.3	TCR Repertoire Analyse.....	51
2.2.4.3.1	Murine Analyse.....	52
2.2.4.3.2	Humane Analyse.....	54
2.2.4.4	Vergleichende TCR Repertoire Analyse.....	55
2.2.4.5	Quantitative TCR Repertoire Analyse.....	55
2.2.4.6	Real time PCR für CCL18 und CXCL12.....	56
2.2.5	Funktionelle Analysen.....	57
2.2.5.1	Zytotoxizitäts-Assay.....	57
2.2.5.2	ELISPOT.....	58
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	DAS MURINE ZYTOKIN-FUSIONSPROTEIN MODELL.....	60
3.1.1	Funktionalitätsüberprüfung.....	60
3.1.1.1	Antitumorale Antworten.....	60
3.1.2	Morphologische und phänotypische Charakterisierung.....	65
3.1.2.1	Immunhistologische Charakterisierung des Zellinfiltrats subkutaner Tumore....	65
3.1.2.2	High Endothelial Venule Charakteristika.....	68
3.1.3	T-Zellcharakterisierung.....	70
3.1.3.1	Überexpression von TCR BV-Familien unter ch14.18-LT α -Fusionsprotein-therapie.....	70
3.1.3.2	Diversifikation des TCR Repertoires im Verlauf der ch14.18-LT α -Fusionsprotein-Behandlung.....	73
3.1.3.3	Tumorspezifität der TIL.....	76
3.2	DAS HUMANE VAKZINIERUNGSMODELL.....	78
3.2.1	Funktionalitätsüberprüfung.....	79
3.2.1.1	Klinischer Verlauf.....	79
3.2.2	Morphologische und phänotypische Charakterisierung.....	80
3.2.2.1	Immunhistologische Charakterisierung der Vakzinierungsstellen.....	80
3.2.3	Funktionelle Charakterisierung.....	84
3.2.3.1	Überexpression von Chemokinen.....	84
3.2.3.2	Oligoklonales T-Zellinfiltrat.....	86
3.2.3.3	Für die Vakzinierungsstellen spezifische T-Zellklone.....	88
3.2.3.4	Spezifitätsnachweis der T-Zellen.....	89
3.2.3.5	Zirkulation eines T-Zellklons zwischen Vakzinierungsstelle und Metastase.....	92
4	DISKUSSION.....	95
4.1	DAS MURINE MODELL.....	95
4.2	DAS HUMANE MODELL.....	104
4.3	VERKNÜPFUNG DER BEIDEN MODELLE.....	109
4.4	DIE ROLLE DER SEKUNDÄREN LYMPHATISCHEN GEWEBE.....	110
4.5	AUSBLICK.....	111
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
6	SUMMARY.....	116
7	ABKÜRZUNGEN.....	118
8	LITERATUR.....	121
9	PUBLIKATIONEN.....	135
10	DANKSAGUNG.....	138
11	LEBENS LAUF.....	140

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 141

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Je komplexer ein Organismus ist, desto vielfältiger sind die Gefahren für ihn. Neben exogenen Bedrohungen, beispielsweise durch Viren, Bakterien, Parasiten und sonstige Erreger besteht auch eine endogene Gefahr, die Entstehung von Tumoren. Um diesen Gefahren entgegenzutreten, entwickelten die unterschiedlichsten Organismen u.a. das Immunsystem. Ab der Evolutionsstufe von Wirbeltieren mit Kiefer lässt sich das Immunsystem in eine angeborene und eine erworbene Immunität unterteilen (Du Pasquier and Flajnik 1999; Nonaka 2001). Die angeborene Immunität bildet mit physiologischen (z.B. pH-Wert) und anatomischen Barrieren (z.B. Haut), Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killer (NK)-Zellen und Entzündungsreaktionen die erste Abwehrfront. Die erworbene Immunität ist hingegen erst in zweiter Linie aktiv, dabei aber durch eine spezifische Erkennung von Antigenen, zunehmende Effektivität während einer Immunantwort und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert. Die spezifische Antwort wird in eine humorale und zelluläre Immunantwort unterteilt. Erstere wird vornehmlich durch B-Lymphozyten, letztere durch T-Lymphozyten vermittelt (zusammengefasst aus (Parkin and Cohen 2001) und (Janeway and Travers 1995)).

1.2 T-Zellbiologie

1.2.1 Die Entwicklung der T-Zellen

T-Lymphozyten sind sowohl in der Regulation und Exekutive von Immunantworten beteiligt. Sie gehen wie alle zellulären Bestandteile des Blutes aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor. Sowohl Zell-Zellkontakte, als auch lösliche Faktoren, insbesondere Zytokine, die in speziellen Mikroumgebungen produziert werden, beeinflussen die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen (Baird et al. 1999). Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern zur Reifung in den Thymus und durchlaufen

während Proliferation und Differenzierung einzelne Stadien, in denen sie durch phänotypische Charakteristika unterschieden werden (zusammengefasst aus (Norment and Bevan 2000)) (Abb. 1): Den Vorläuferzellen, die das Knochenmark verlassen, fehlen noch die meisten Oberflächenmoleküle, die für reife T-Zellen charakteristisch sind; beispielsweise sind die Gene für den T-Zellrezeptor (TCR) noch nicht rearrangiert. Im Thymus angelangt beginnen die Zellen mit der Expression des ersten T-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls, des CD2 (beim Menschen; Thy-1 bei der Maus). Am Ende dieser Phase tragen die unreifen Thymozyten bereits mehrere Marker von reifen T-Zellen, exprimieren jedoch noch nicht den CD3:T-Zellrezeptor-Komplex, CD4 oder CD8. Wegen der fehlenden Expression von CD4 und CD8 werden diese Zellen als doppelt negative Thymozyten bezeichnet. Die Expression der funktionellen β -Kette des T-Zellrezeptor, d.h. die Rekombination der Gene für die β -Kette, ist eine Voraussetzung für den Übergang von doppelt negativen zu doppelt positiven Thymozyten, die sowohl CD8 als auch CD4 exprimieren (Mallick et al. 1993). Im Anschluss werden die Gene für die α -Kette rearrangiert. Eine andere, prozentual unterrepräsentierte T-Lymphozyten-Gruppe, die den $\gamma\delta$ -TCR aufweist, erfährt das Rearrangieren schon früher. Dabei führt das Rearrangement der TCR $\gamma\delta$ -Gene vor denen der $\alpha\beta$ -Gene zu einer frühen Divergenz der beiden T-Zelllinien (Livak et al. 1999), was auch „Sequential-Modell“ genannt wird. Im Weiteren wird vornehmlich auf die $\alpha\beta$ T-Zellen eingegangen.

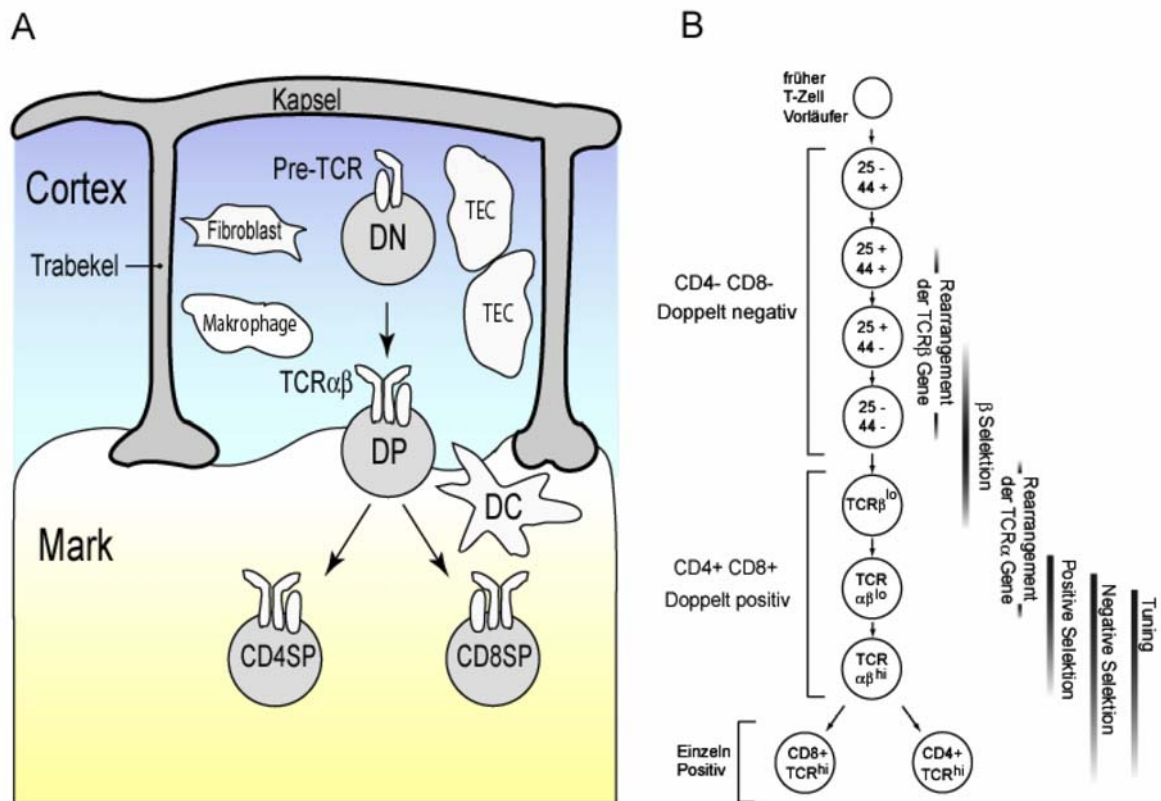


Abbildung 1. T-Zellentwicklung. Während der Wanderung durch den Thymus durchlaufen die Thymozyten verschiedene Stadien (A) und einen geregelten Ablauf verschiedener Prozesse (B). DC (Dendritische Zelle), DN (doppelt negativ), DP (doppelt positiv), SP (einzeln positiv), TEC (Thymusepithelzellen), 25 (CD25; α -Kette des IL2 Rezeptors), 44 (CD44)

1.2.2 T-Zellrezeptor

Die an der Membran gebundenen TCR Heterodimere, entweder aus α - und β - oder aus γ - und δ -Ketten bestehend, werden aufgrund ihrer Strukturdomänenähnlichkeit zu der Immunoglobulinsuperfamilie gezählt (Garcia et al. 1999). Die Gene, die für den $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ TCR kodieren, werden jedoch ausschließlich von den T-Lymphozyten exprimiert. Die Organisation dieser Gene in der Keimbahn ist aber jener der Immunoglobuline sehr ähnlich, d.h. sie sind in *variable* (V), *diversity* (D) und *joining* (J) Gen-Cluster aufgetrennt. Während der T-Zellreifung müssen diese Gensegmente, die für den variablen Bereich des TCR kodieren, durch somatische Rekombination rearrangiert werden. Diese variable Domäne, die durch Rekombination von Gensegmenten aus V, D und J für TCR- β oder - δ

bzw. V und J Gen-Cluster für TCR- α oder - γ entsteht, wird durch RNA-Spleicing mit dem konstanten Bereich der jeweiligen Kette verknüpft (Abb. 2A). Jedes V, D und J Segment wird von konservierten, nicht-kodierenden Heptamer- und Nonamer-DNA-Sequenzen, so genannten *recognition signal sequences* (RSS) umgeben, die entweder durch einen 12bp oder 23bp langen Spacer getrennt sind (Nemazee 2000). Die Verknüpfung erfolgt nach einer 12/23-Regel: ein 12bp RSS wird mit einem 23bp RSS eines anderen Segmentes verknüpft (Abb. 2B und 2C).

Die Diversität der resultierenden TCR β -Ketten wird dadurch erhöht, dass die Rekombination nicht genau verläuft. Zusätzlich wird die Vielfältigkeit der rekombinierten Gene durch Addition von P- (entstehen durch aufgebrochene Haarnadelstrukturen) und N-Nukleotiden (werden durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase angehängt) beim Rekombinationsablauf erhöht (Abb. 3).

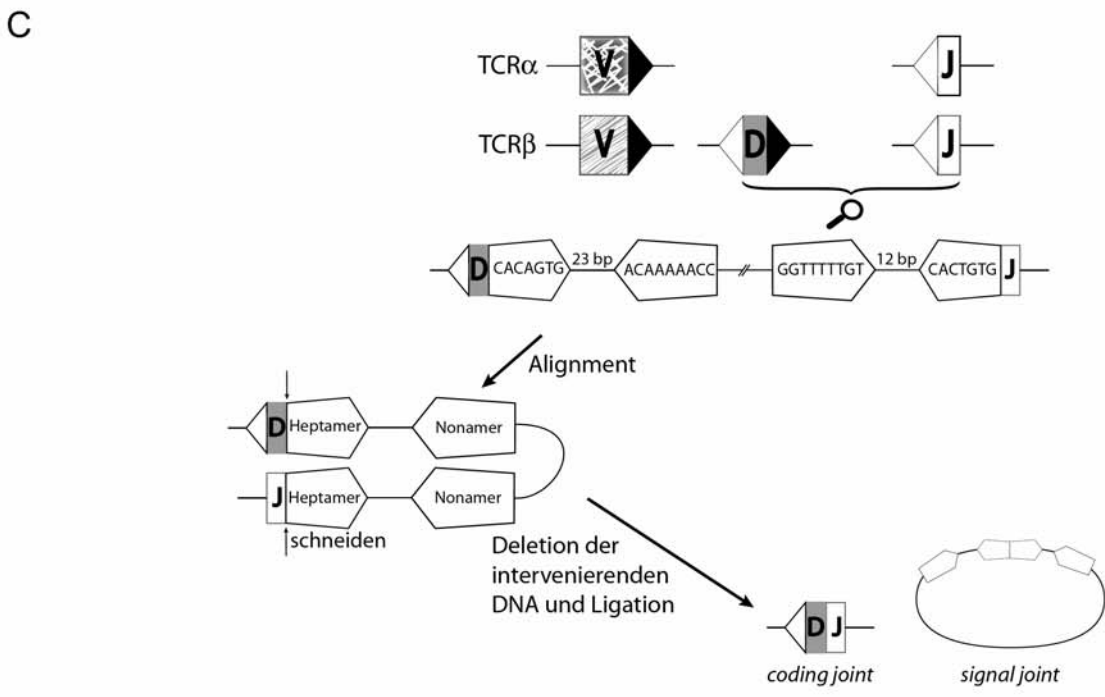
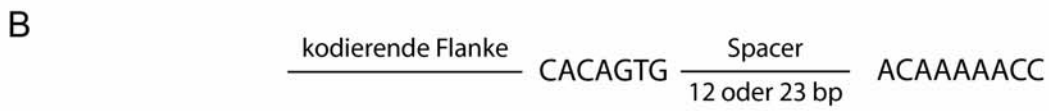
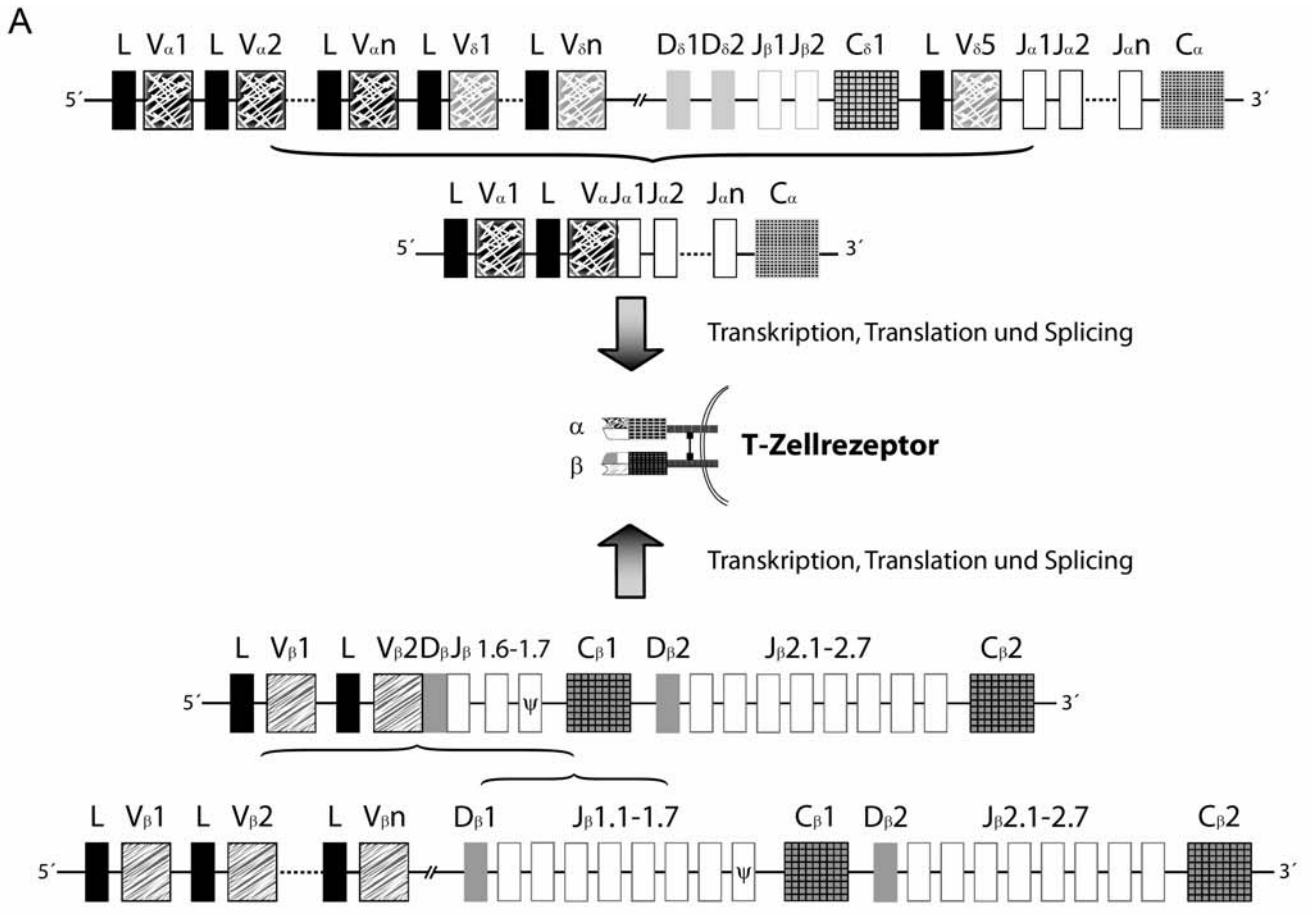


Abbildung 2. Anordnung der α und β Gensegmente des TCR und Rekombination. Die TCR- α - und - β -Loci sind beispielhaft für den Menschen graphisch dargestellt. Im Menschen sind es 47 *variable* (V), 2 *diversity* (D) und 13 *joining* (J) für TCR β und 42 V und 61 J Gensegmente für TCR α . In der Maus gibt es 28 V, 2 D, 12 J für TCR β und 70-100 V und 50 J Segmente für TCR α . (A). Durch somatische Rekombination und RNA Splicing entsteht der $\alpha\beta$ TCR. L (Leader Sequenz). Aufbau einer *recognition signal sequence* (RSS). Konservierte heptamer und nonamer Sequenzen werden durch 12 oder 23 bp lange Spacer getrennt (B). Die somatische Rekombination folgt der 12/23 Regel, d.h. es werden nur Segment verknüpft, die unterschiedliche lange Spacer besitzen. Aus der Rekombination resultieren ein *coding joint* mit den rearrangierten Gensegmenten und ein *signal joint*, welches die ausgeschnittene DNA und die RSS enthält (C).

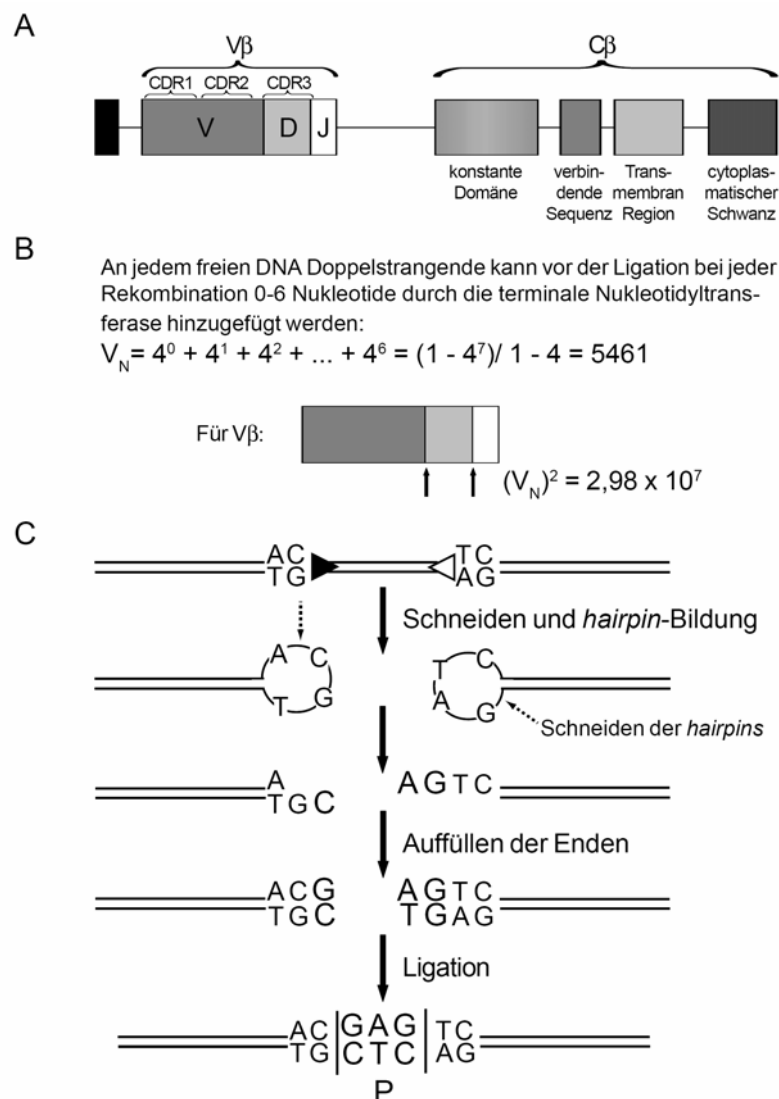


Abbildung 3. Zustandekommen der β -Ketten Vielfältigkeit des TCR. Die hohe Zahl der unterschiedlichen β -Ketten der TCR entsteht durch die Rekombination unterschiedlicher Gensegmente (für die humanen β -Kette bestehen 1222 Rekombinationsmöglichkeiten der Gensegmente) (A), dem Anhängen von N-Nucleotiden durch die terminale Nucleotidyltransferase (B) und P-Nucleotiden bei der Rekombination (C).

In der Maus besteht der TCR- β -Lokus aus mindestens 28 V, 2 D und 12 J, der TCR- α -Lokus aus 70–100 V und 50 J (Petrie et al. 1995), im Menschen aus 47 V, 2 D und 13 J (β -Lokus) bzw. 42 V und 61 J (α -Lokus) Gensegmenten (Arstila et al. 1999). Der Ablauf der somatischen Rekombination verläuft immer nach dem gleichen Muster. Dabei wird für die $\alpha\beta$ T-Zellen zuerst D mit J und danach DJ mit V für die β -Kette rekombiniert. Nur wenn diese Rekombination in einer funktionellen Kette resultiert, werden V und J der α -Kette rekombiniert. Entstand durch die erste Rekombination jedoch eine nicht-funktionelle β -Kette, werden die Gensegmente der β -Kette auf dem homologen Chromosom kombiniert. Diese so genannte allelische Exklusion beruht auf der Bindung der pre-TCR α -Kette an die funktionelle β -Kette (von Boehmer et al. 1999). Falls beide Rekombination der β -Ketten Gensegmente erfolglos war, werden die Zellen ausgesiekt (Mallick et al. 1993). Diese allelische Exklusion besteht für die α -Ketten nicht, so dass 20% der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten zwei produktive α -Kettenrearrangements besitzen, d.h. einzelne Zellen teilweise zwei mRNAs von kombinierten α -Gensegmenten aufweisen. Wesentlich ist weiterhin, dass für die α -Ketten durch aufeinander folgende Rearrangements *out-of-frame* Konfigurationen korrigiert werden (Petrie et al. 1995).

Nach erfolgreichem TCR-rearrangement und der Expression des $\alpha\beta$ -TCR erfolgt noch im CD4/CD8 doppelt positiven Stadium die positive und die negative Selektion der einzelnen T-Zell-Spezifitäten. Die positive Selektion ist ein aktiver Prozess, der die Eliminierung von Selbst-*major histocompatibility complex* (MHC)-erkennenden Thymozyten durch Apoptose verhindert; die negative Selektion ist die Deletion oder Inaktivierung von autoreaktiven Thymozyten. Als Grundlage für diese Selektionen wird ein quantitatives Modell angenommen: viele TCR-Peptid/MHC-Interaktionen werden zusammengefügt, um einen Signalgradienten zu bilden, welcher das Zellschicksal bestimmt. Die Summe vieler schwacher oder weniger starker TCR-Ligandbindungen liefert ein ausreichendes Signal,

um eine integrierte Signalkaskade zu induzieren, die den Schwellenwert für die positive Selektion erreicht; stärkere Signale führen zu einer Überschreitung des Negativen-Selektions-Schwellenwertes (zusammengefasst aus (Sebzda et al. 1999)). Nach der positiven Selektion wird die Expression desjenigen Korezeptormoleküles beendet, welcher mit dem anderen, nicht-erkannten MHC-Molekül assoziieren würde; es resultieren also CD4 oder CD8 positive Zellen. CD3 wird in diesen einzeln positiven Zellen stark exprimiert und die Zellen verlassen den Thymus um in die Peripherie zu wandern und ein Teil des T-Zell-Repertoires zu werden. Die weitere Entwicklung und Funktion der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wird durch Signalwege reguliert, welche linienspezifische Zelloberflächen-Moleküle, intrazelluläre Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren beinhalten (Kuo and Leiden 1999).

1.2.3 Zirkulation von T-Lymphozyten

Um ihre Aufgaben erfüllen zu können, müssen T-Lymphozyten über Blut und Lymphe durch den Körper zirkulieren (Abb. 4). Solange sie noch nicht in Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen gekommen sind, werden sie als naiv bezeichnet. Phänotypisch sind naive T-Zellen durch die Expression von CD44^{lo}, CD45RA⁺ (für den Menschen; CD45RB^{hi} für murine T-Zellen) und CD62L⁺ (L-Selektin) charakterisiert. Der erste Kontakt naiver T-Zellen mit Antigenen erfolgt in der Regel in den peripheren lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und Peyersche Plaques (Warnock et al. 2000). Sofern diese Antigenerkennung im richtigen Kontext erfolgt (*priming* siehe 1.2.4) werden die Zellen aktiviert und differenzieren zu Effektor- und Gedächtniszellen. Gedächtnis-T-Zellen sind durch eine Expression von CD44^{hi} und CD45R0⁺ (für den Menschen; CD45RB^{lo} bei der Maus) charakterisiert (Westermann and Pabst 1996; Rogers et al. 2000). Sie werden in *central memory* (CD62L^{hi}) und *effector memory* (CD62L^{lo}) subklassifiziert (Sallusto et al. 1999).

efferenen Lymphbahnen. Die Verweildauer wird maßgeblich vom lymphatischen Endothel beeinflusst (Young 1999). Zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen (*priming*) kommt es nur, wenn sie über den TCR und den entsprechenden Korezeptor einen Peptid/MHC-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) binden. Zusätzlich bedarf es noch eines zweiten, kostimulierenden Signals, welches z.B. durch die Interaktion der kostimulierenden Oberflächenmoleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Oberfläche der APCs mit CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen zustande kommt (Watts and DeBenedette 1999). Das kostimulatorische Signal bewirkt eine Amplifizierung der TCR-vermittelten Signale sowie die Aktivierung antiapoptotischer Prozesse, welche wesentlich sind, um den so genannten „*activation induced cell death*“ zu verhindern (Lanzavecchia and Sallusto 2000).

Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der APCs sind die dendritischen Zellen (DC). DC werden durch inflammatorische Chemokine wie IL-8, CCL3 (*macrophage inflammatory protein-1- α* [MIP-1 α]), CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1* [MCP-1]) und CCL5 (*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted* [RANTES]) aus dem Blut oder aus einer residenten Lokalisation zu Entzündungsherden geführt, wo sie Antigene aufnehmen. Dabei erfolgt auch die Initiierung der Differenzierung zur reifen DC. Der zweite Teil der DC-Wanderung, von entzündeten Geweben in lymphatische Gefäße und von dort in T-Zellareale, wird durch andere Chemokine, wie z.B. CCL19 und CCL21, geregelt und erfolgt über afferente lymphatische Gefäße (Cyster 1999). Im T-Zellareal der Lymphknoten treffen naive T-Zellen auf antigenbeladene APCs. Letzteres wird durch die Produktion von naive T-Lymphozyten anziehenden Chemokinen wie z.B. CCL19 und CCL18 (*dendritic cell-derived-C-C chemokine* [DC-CK1] \triangleq PARC) durch reife DC beschleunigt.

1.2.5 *Expansion von T-Lymphozyten*

Über die *in vivo*-Expansion von T-Zellen nach deren initialer Aktivierung im Lymphknoten ist noch nicht viel bekannt, da geeignete Nachweismethoden bislang fehlen. Theoretisch hängt diese Expansion von drei Komponenten ab: (i) der Frequenz an naïven Vorläufern, (ii) der Expansionsrate und (iii) dem Zeitpunkt der Rekrutierung (Bouso and Kourilsky 1999). Die benötigte Dauer der T-Zell/APC-Interaktion für eine Aktivierung ist dabei von dem Differenzierungsstatus der T-Zelle abhängig; naïve Zellen benötigen längere Kontakte als Gedächtniszellen. Dagegen postuliert das kürzlich beschriebene - aber noch immer kontrovers diskutierte - *serial encounter* Modell, dass naïve T-Zellen eine Reihe von kurzlebigen Signalen aus mehreren Begegnungen mit der gleichen oder mit verschiedenen DC sammeln können (Gunzer et al. 2000). Insgesamt zeigte sich, dass eine Expansion von T-Zellen bevorzugt dort stattfindet, wo die Antigenmenge am größten ist (Flynn et al. 1998). Gleichzeitige kostimulatorische Signale erleichtern die T-Zellaktivierung, indem sie die benötigte Kontaktzeit für die Festlegung des Schicksals der T-Zelle verkürzen (Iezzi et al. 1998).

1.2.6 *Homing*

Mit *homing* wird die gerichtete Wanderung von Lymphozyten in ein ausgewähltes Gewebe bezeichnet. Für naïve T-Zellen ist dies das Einwandern in den Lymphknoten über spezielle postkapillare Venolen. Die Transmigration beinhaltet vier Schritte: i) initialer Kontakt, ii) Aktivierung der T-Zellen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, iii) Aktivierungsabhängige Anheftung der T-Zellen und iv) Diapedese (Butcher and Picker 1996).

Nach Differenzierung der naïven T-Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen ändert sich das *homing*-Verhalten. Während naïve Zellen vorwiegend über die HEV durch lymphatische Gewebe zirkulieren, wandern Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen selektiv über den peripheren extravaskulären Weg in nicht-lymphatisches Gewebe wie Haut, Darm

und Lunge (Burastero et al. 1998). Dabei wandern Gedächtnis-Lymphozyten jeweils bevorzugt in ein bestimmtes Gewebe. Diese relativ spezifische Wanderung wird durch unterschiedliche Expression von *homing*-Rezeptoren erreicht. Es wurden zwei unterschiedliche Modelle vorgeschlagen, die sich nicht im Endergebnis, dem spezifischen *homing* der Gedächtniszellen, aber im Weg zu diesem Ergebnis unterscheiden. Das *instructional*-Modell geht davon aus, dass bereits während des *priming* den naiven T-Zellen eingeprägt wird, woher das Antigen initial stammt, sie somit zu Zellen mit einem spezifischen *homing*-Phänotyp differenzieren, welcher ihnen die Migration zum Ursprungsort des Antigens erleichtert (Abb. 5A). Das *selective*-Modell hingegen nimmt an, dass verschiedene *homing*-Phänotypen wahllos von aktivierten, naiven T-Zellen erworben werden (Abb. 5B). Bei beiden Modellen entwickeln sich nur dann Gedächtniszellen, wenn sie nach dem *homing* auf die relevanten Antigene treffen. Beim *selective*-Modell sterben jene T-Zellen ab, die zu Geweben wandern, in denen sich kein Antigen befindet (Davenport et al. 2000).

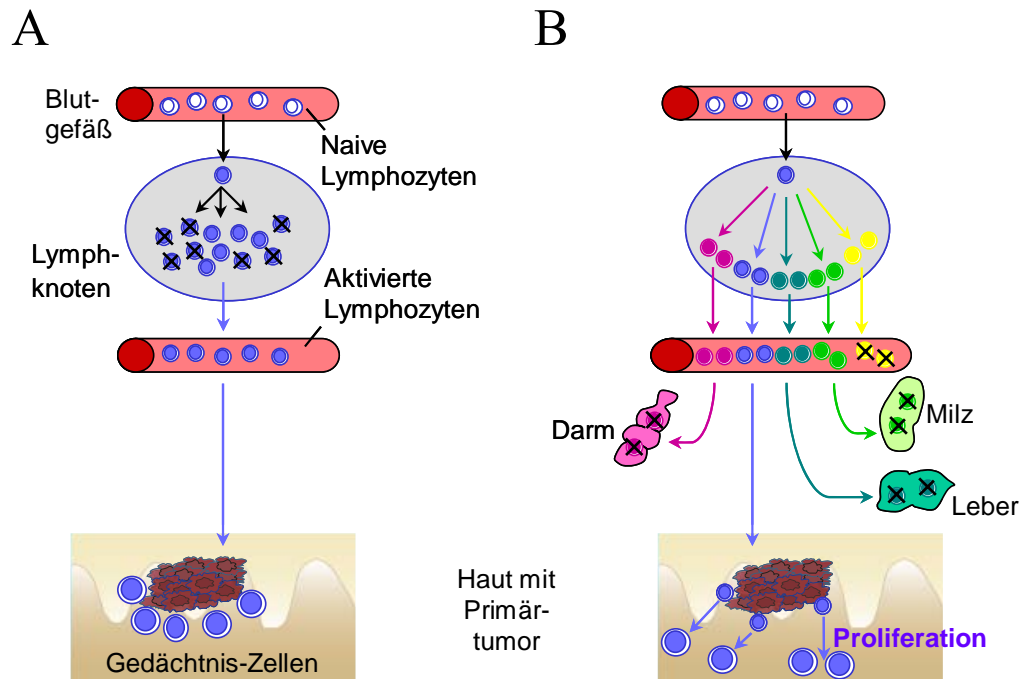


Abbildung 5. Instructional und selective homing Modell. Sowohl im *instructional* (A) als auch im *selective* (B) *homing* Modell wandern naive T-Zellen aus dem Blut in die Lymphknoten, die den Ort der immunologischen Herausforderung drainieren. Dort werden sie nach Antigenerkennung aktiviert. Im Instruktionsmodell hat die Lokalisation des Antigens einen direkten Einfluss auf die T-Zellen, d.h. den Zellen wird ein Phänotyp aufgeprägt, der sie zum *homing* an die entsprechende Lokalisation befähigt. Nach der Immunantwort wird ein kleiner Teil zu Ort-spezifischen rezirkulierenden Gedächtniszellen (A). Im Selektionsmodell führt die Aktivierung von naiven T-Zellen zu einer zufälligen Verteilung von verschiedenen *homing*-Rezeptoren, was deren Wanderung zu unterschiedlichen Orten, wie Leber, Niere und Darm ermöglicht. Zellen, die zu dem Ort des Antigens wandern und dort erneut dem Antigen begegnen, proliferieren und differenzieren zu Ort-spezifischen Gedächtniszellen. Zellen, die keinem Antigen mehr begegnen und somit nicht weiter stimuliert werden, erfahren einen programmierten Zelltod (schwarze Kreuze) (B).

1.3 Das maligne Melanom

1.3.1 Ätiologie

Das Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor, der von Melanozyten ausgeht (Abb. 6).

Die Häufigkeit des Melanoms in Deutschland nimmt noch immer stetig zu (Garbe 2000).

In Amerika ist das Melanom die Krebserkrankung mit der höchsten Zuwachsrate (Goldstein and Goldstein 2001). Als *extrinsic*-Haupttrisikofaktor gilt die ultraviolette

Strahlung (Marks 2000). In Analogie zum Kolonkarzinom wurde für die Entstehung und Progression des Melanoms folgende fünf klinische Entitäten modellhaft als Zwischenschritte postuliert: (1) Nävus mit normalen Melanozyten; (2) dysplastischer Nävus mit zytologischen Atypien, (3) radiale Wachstumsphase des primären Melanoms; (4) vertikale Wachstumsphase des primären Melanoms mit metastatischer Fähigkeit und (5) Metastase (zusammengefasst aus (Li and Herlyn 2000)).

In den letzten Jahren konnten einige Gene, die bei der Pathogenese des Melanoms eine Rolle spielen, identifiziert werden. Besonders wichtig scheinen dabei die Gene RAS und BRAF, die beide den MAPK Signaltransduktionsweg aktivieren. So ist NRAS in 20-30% und BRAF in 40-62% der Melanome mutiert (Daniotti et al. 2004). Diese Mutation scheinen sich praktisch gegenseitig auszuschließen, so dass einer dieser Gene in bis zu 90% der Melanome mutiert ist (Omholt et al. 2003; Daniotti et al. 2004). Nachdem diese Mutationen bereits in der radialen Wachstumsphase der primären Tumore zu beobachten waren, scheinen sie ein frühes Ereignis in der Pathogenese darzustellen (Omholt et al. 2003). Da diese Mutationen aber auch in beinahe 90% der Nävi auftreten (Kumar et al. 2004), scheint die Aktivierung des MAPK Signatransduktionswegs zwar eine notwendige aber keine hinreichende Voraussetzung für die Melanomentwicklung zu sein. Interessanterweise spielt bei einem anderen Melanommodell, das des Aquarienfisches der Gattung *Xiphophorus*, die Überexpression der konstitutiv aktivierten Rezeptor Tyrosinase Kinase Xmrk (*Xiphophorus melanoma inducing receptor kinase*) eine entscheidende Rolle. Bei diesem Modell entwickeln Hybride aus *X. maculatus* und *X. helleri* nach Rückkreuzung spontane Melanome, welche durch den Ausfall des Regultorgenes für Xmrk induziert werden (Wellbrock et al. 2002). Dabei gibt es sowohl die proto-onkogene Form von Xmrk, INV-Xmrk, welches offensichtlich in allen Fischen exprimiert wird und das onkogene ONK-Xmrk, welches nur in Fischen der Gattung *Xiphophorus* auftritt, deren Nachkommen Tumoren entwickeln können (Dimitrijevic et al. 1998). Das ONK-Xmrk

entwickelte sich vermutlich im Lauf der Evolution durch Genverdopplung aus dem Proto-Onkogen (Schartl et al. 1994) und häufte Mutationen an, die zu einer konstitutiv aktivierten Form führten (Wellbrock et al. 1997). Die Signalwege über die Xmrk wirken umfassen den MAP Kinase Weg, SRC Kinasen, PI3 Kinase und Stat5 (Wellbrock et al. 2002). Analog zu den Ergebnissen beim humanen Melanom findet sich eine konstitutive MAP Kinase Aktivierung sowohl in benignen als auch malignen Läsionen, was auf eine frühe Beteiligung des MAP Kinase Signalwegs bei der Xmrk induzierten Pigmentzellentransformation schließen lässt.

Ein großer Unterschied zwischen Nävus und Melanom im Menschen stellt die genetische Stabilität dar. So weisen Nävi quasi keine chromosomalen Abberationen auf, während Melanome zahlreiche Abberationen aufweisen (Bastian 2003). Neben den Onkogenen BRAF und NRAS sind Tumorsuppressorgene wie PTEN und TP53 oder die CDKN2A Locus Produkte p16 und p14 an der Pathogenese des Melanoms beteiligt. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust jeder dieser Tumorsuppressoren einen die Entwicklung des Melanoms begünstigenden genetischen Hintergrund darstellt (Walker and Hayward 2002). Daher ist es auch nicht überraschend, dass beinahe alle Melanome CDKN2A Mutationen aufweisen (Daniotti et al. 2004). Für TP53 Mutationen variieren die Frequenzen zwischen 10 und 25%. Ferner ist die Expression des Tumorsuppressors PTEN vermindert, je nach Studie zwischen 15 und 50% der Melanome (Zhou et al. 2000; Daniotti et al. 2004).



Abbildung 6. Klinisches Bild eines Melanoms. Dargestellt ist ein superfiziell spreitendes Melanom mit Regressionszone.

1.3.2 Therapie und immunologisches Modell

Die Möglichkeit, ein Melanom zu heilen, besteht bisher nur dann, wenn der Tumor in einer frühen Wachstumsphase erkannt und komplett operativ entfernt werden kann (Duran et al. 1999). Eine Heilung von Patienten im Stadium der Fernmetastasierung (Stadium IV) ist bisher nicht möglich. Nur in Ausnahmefällen können lang anhaltende, komplette Remissionen erzielt werden. Zur palliativen Behandlung werden operative, strahlen- und chemotherapeutische sowie immunmodulierende Strategien allein oder in Kombination verfolgt (Dummer et al. 1998).

Für die Immunogenität des Melanoms gibt es sowohl klinische, wie z.B. Spontanregressionen von Primärtumoren, als auch histologische Hinweise, wie peri- und intratumorale Infiltrate aus T-Lymphozyten und Makrophagen (thor Straten et al. 1996; Mihm, Jr. et al. 1996). Aufgrund der Zugänglichkeit von Primärtumoren und Metastasen und der Möglichkeit der *in vitro*-Expansion sowohl des Tumors, als auch spezifischer, gegen den Tumor gerichteter T-Zellen, eignet sich das Melanom hervorragend als Modell für Untersuchungen von Immunantworten gegen solide Tumoren. Ferner sind für das Melanom mittlerweile eine Reihe verschiedener Antigene, so genannte melanomassoziierte Antigene (MAA) bekannt, die von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden. MAA werden in drei Hauptgruppen unterteilt: (1) tumorassoziierte keimbahnspezifische

Antigene (wie MAGE, BAGE, GAGE und PRAME); (2) Melanozytendifferenzierungsantigene (wie Tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp100, TRP1 und TRP2) und (3) mutierte oder anormal exprimierte Antigene (wie MUM-1, CDK4, beta-catenin, gp100-in4, p15 und N-acetylglucosaminyltransferase V) (Kirkin et al. 1998). Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung von Therapieansätzen, die auf eine Modulation der Immunantwort abzielen, wobei im Folgenden nur auf zwei eingegangen werden soll.

Die Verfügbarkeit rekombinanter immunmodulatorischer Zytokine in pharmakologisch wirksamen Mengen ermöglichte es, Zytokine als Therapeutikum einzusetzen und ihre Wirkungsweise empirisch zu charakterisieren. Dabei wurde deutlich, dass die systemische Gabe von Zytokinen deren parakrinen Wirkungsmechanismus außer Acht lässt (Pardoll 1995). Forni und Kollegen zeigten, dass die Injektion physiologischer Mengen von Interleukin-2 (IL2) direkt in Tumore deren Wachstum unterdrücken kann (Forni et al. 1987). Einige der zur Bekämpfung von bösartigen Tumoren geeignete Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) α , können aufgrund ihrer Nebenwirkungen nicht systemisch verabreicht werden (Eggermont et al. 1996). Hohe Konzentrationen von Zytokinen im Tumormikroenvironment bei niedrigen Systemkonzentrationen können aber auch durch eine gerichtete Zytokingabe erreicht werden. Eine Möglichkeit der gerichteten Zytokintherapie besteht in der Kopplung des Zytokins an einen tumorspezifischen Antikörper (Becker et al. 1996b; Reisfeld et al. 1997). Die Spezifität des Antikörpers bewirkt, dass sich das Zytokin in dem Antigen-exprimierenden Gewebe (d.h. an den Tumoren) anreichert.

Die Vakzinierung mit DC beruht auf deren Rolle als *sentinels*: in der Peripherie nehmen sie Proteine auf, wandern in die Lymphknoten, wo sie nach Prozessierung der Proteine Peptide als Peptid/MHC-Komplexe den T- und B-Lymphozyten präsentieren (Banchereau

et al. 2000) und damit eine Immunantwort der erworbenen Immunität initiieren (siehe 1.2.4). Für eine DC-Vakzinierung werden autologe DC vom Patienten aus dessen Blut gewonnen, diese entweder mit MAA-Peptiden oder Tumorlysat beladen und nachfolgend dem Patienten injiziert (Abb. 7). Mehrere Studien konnten bereits einen therapeutischen Erfolg dieser Therapie zeigen (Turner et al. 1999; Timmerman and Levy 1999).

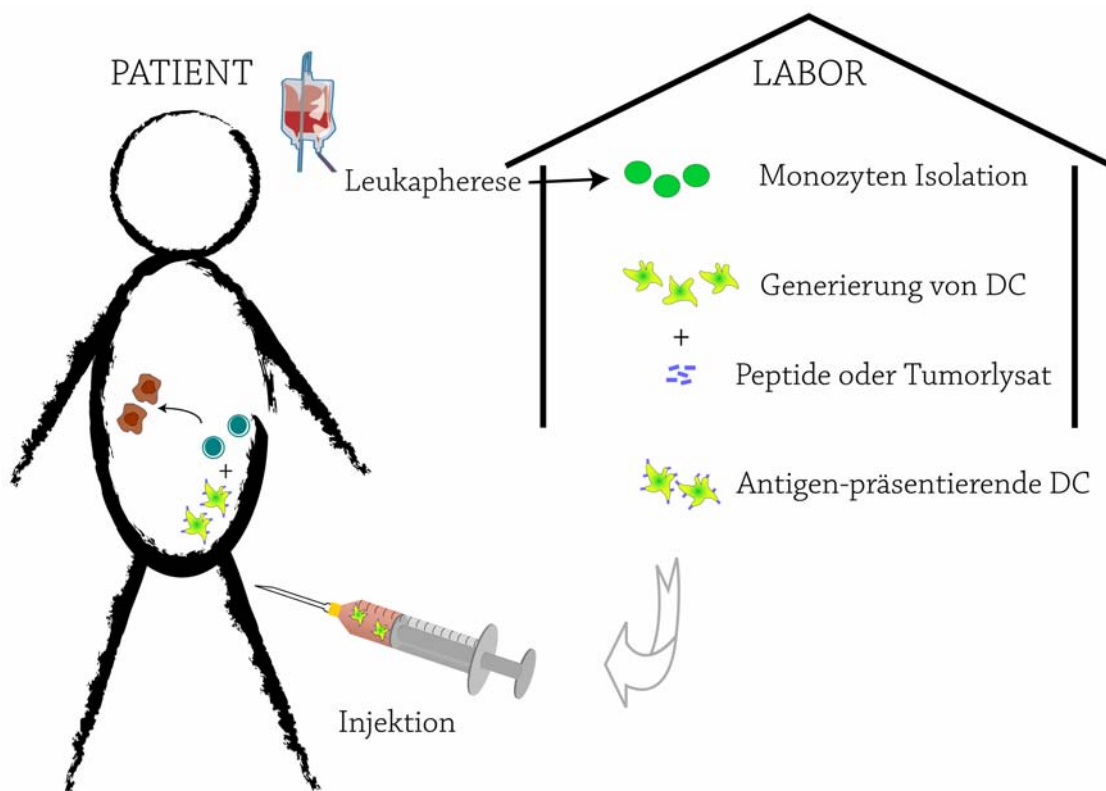


Abbildung 7. Schematische Darstellung einer therapeutischen DC Vakzinierung. Aus dem Leukapheresat eines Tumorpatienten werden im Labor Monozyten isoliert, die anschließend *in vitro* zu DC kultiviert werden. Nachdem die DC gereift sind, werden sie mit Tumorpeptiden oder Onkolytat beladen und dem Patienten injiziert. Dort führt die Präsentation der Peptide durch reife DC zu einer Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen, die möglichst Tumorzellen aufspüren und diese zerstören.

1.4 *In situ*-Methoden zur Darstellung von T-Zellantworten

Für die vorliegende Arbeit war es nötig, Methoden anzuwenden, die es erlauben ohne *in vitro*-Expansion die Klonalität und die Spezifität von T-Zellen nachzuweisen um methodische Artefakte zu vermeiden (Thor Straten et al. 2000). Diese *ex vivo*- bzw. *in situ*-

Methoden sind die T-Zellrezeptorkartierung und Peptid/MHC-Multimerfärbung zur Darstellung spezifischer TCR.

1.4.1 Kartierung des T-Zellrezeptorrepertoires

Die Methode der Elektrophorese in einem denaturierenden Gradientengel (DGGE) erlaubt eine Auftrennung von DNA-Molekülen nach deren Basenzusammensetzung. Für die Auftrennung ist dabei die Schmelztemperatur, die sich aus der Sequenz ergibt, entscheidend, und nicht wie bei der herkömmlichen Elektrophorese, ausschließlich die Größe der DNA. Zusammen mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder dem Restriktionsenzymverdau wurde diese Methode initial zur Detektion von Mutationen eingesetzt (Guldberg et al. 1998; Muyzer 1999).

Das Prinzip der DGGE liegt im sequenzabhängigen Schmelzen (*melting*) von DNA (Lerman et al. 1984). DNA besitzt in wässriger Lösung bei Temperaturen unter 60°C eine doppelsträngige, helikale Konformation. Diese wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der gegenüberliegenden Stränge sowie Interaktionen von benachbarten Basen in der Helix des gleichen Stranges aufrechterhalten. Bei einer Temperaturerhöhung trennen sich die beiden Stränge und nehmen eine einzelsträngige, wahllos gedrehte Konformation ein. Dieser Vorgang verläuft nicht linear, sondern folgt einer sequenzabhängigen Schmelzkurve. Diese kommt dadurch zustande, dass einzelne Segmente, so genannte *melting*-Domänen, die aus 25-300 Basenpaaren bestehen, bei unterschiedlichen Temperaturen schmelzen. Eine Basenänderung innerhalb der DNA führt zu einer veränderten Schmelztemperatur (T_m), da die Schmelzeigenschaften eines DNA-Moleküls vorrangig von der Basenzusammensetzung abhängen.

Um unterschiedliche T_m von ähnlichen DNA-Sequenzen wie z.B. PCR-Amplifikaten zu detektieren, bedient man sich eines Tricks: Da das Schmelzen der DNA auch durch chemische Substanzen induziert werden kann, lässt man die DNA-Moleküle

elektrophoretisch in einem Gel laufen, das bei konstanter Polyacrylamidkonzentration einen ansteigenden Gradienten an denaturierenden Chemikalien, zumeist Harnstoff und Formamid, aufweist (Guldberg et al. 1998). Die DNA wandert zuerst mit einer konstanten Geschwindigkeit, die durch ihre Größe bestimmt wird bis zu dem Punkt im Gel, bei dem die Konzentration der denaturierenden Chemikalien genau mit dem Schmelzpunkt der instabilsten *melting domain* übereinstimmt. Da nur diese *melting domain* destabilisiert wird, führt dies zur Bildung eines dreiarmigen Zwischenmoleküls, das mit einer sehr geringen Geschwindigkeit im Gel wandert. Kleine Änderungen in der T_m dieser Domäne - ein einzelner Basenaustausch kann bereits in einem Unterschied der T_m von bis zu 1°C resultieren - führen dazu, dass sich das DNA-Molekül bei einer anderen Konzentration an denaturierenden Chemikalien schmilzt und somit an einer anderen Position im Gel zum liegen kommt. Dies ist die Grundlage für die physikalische Trennung von Wildtyp- und mutierter DNA. Da die Konzentrationen an denaturierenden Chemikalien für eine DNA-Schmelzung alleine nicht ausreichen, befindet sich das Gel in einem Elektrophorese-Pufferbad mit einer konstanten Temperatur, die mit $56\text{-}60^\circ\text{C}$ knapp unter der T_m der instabilsten DNA Domäne liegt. (Muyzer 1999).

Im Allgemeinen basieren Untersuchungen des TCR-Repertoires auf einer reversen Transkriptase (RT)-PCR, gefolgt von einer Einzelstrang-Konformationspolymorphismusanalyse (Yamamoto et al. 1992), einer PCR-Heteroduplexanalyse (Wack et al. 1996) oder der CDR3-Größenbestimmung (Pannetier et al. 1993). Die Vorteile der im Weiteren eingesetzten DGGE-basierten Methode sind Zeitersparnis, hohe Sensitivität und die Möglichkeit, die gewonnenen einzelnen Produkte weiterzuverarbeiten.

Im ersten Schritt müssen für jede Familie (24 beim Menschen; 18 bei der Maus) der V Region der β Kette des TCR Primer ausgewählt werden, so dass die PCR-Reaktion zu Produkten führt, die geeignete Schmelzeigenschaften besitzen. Wie zuvor dargestellt

sollten die zu erwartenden Sequenzunterschiede in einer instabilen *melting domain* (kleine T_m) liegen. Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Produkte auch eine stabile *melting domain* besitzen (große T_m), die so genannte *high melting domain*. Fehlt den PCR-Produkten die *high melting domain*, würde es bei ausreichender Konzentration an denaturierenden Chemikalien zu einer vollständigen Entwindung der DNA kommen und die Einzelstränge würden im Gel mit hoher Geschwindigkeit weiter wandern. Durch das Anheften einer 30-60 Basenpaare langen, GC reichen Sequenz (*GC-clamp*) an das 5' Ende eines Primers (Sheffield et al. 1989) kann eine *high melting domain* in das resultierende Produkt eingeführt werden. Sowohl für die humanen, als auch murinen TCRBV-Familien wurden bereits geeignete Primer etabliert (thor Straten et al. 1998a; thor Straten et al. 1998b; Schrama et al. 2001a).

In einer polyklonalen T-Zellpopulation sollten sich alle TCR DNA-Sequenzen bezüglich ihrer Schmelzeigenschaften unterscheiden, was einen Schmier im DGGE zur Folge hat. Jede Population von klonal expandierten T-Zellen stellt sich im Gel als klare Bande dar, sofern dieser Klon 0,1% der $\alpha\beta$ -T-Zellen ausmacht (Abb. 8) (thor Straten et al. 1998a).

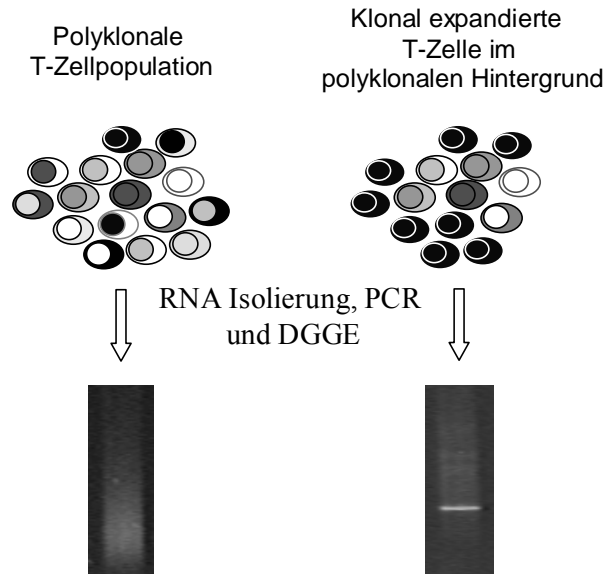


Abbildung 8. Analyse von T-Zellpopulationen mit klonotypischer Kartierung. Nachdem die RNA der T-Zellpopulation isoliert, cDNA generiert, mit den jeweiligen BV Primern amplifiziert und in einem denaturierenden Gradienten Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurde, lässt sich eine polyklonale Ausgangspopulation als Schmier und eine klonal expandierte T-Zelle als Bande erkennen.

Eine TCR-Repertoire-Analyse läuft folgendermaßen ab: Zunächst wird aus der zu untersuchenden Probe die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer PCR-Reaktion werden dann die einzelnen TCR β -variable-Ketten-Familien amplifiziert. Nach dem Auftrennen der Produkte im DGGE und anschließender Ethidiumbromidfärbung, wird das Ergebnis unter dem Transilluminator sichtbar gemacht. Ein wesentlicher Punkt bei der PCR-Reaktion ist die optimale Größenordnung der Amplifikation: wird zu stark amplifiziert, so kommt es im DGGE-Gel zu unspezifischen, aber für jede TCR beta *variable* (BV)-Familie typischen Produkten. Ob nun eine Reaktion zu stark amplifiziert ist, kann bereits im Agarosegel überprüft werden. Die PCR-Produkte sollten sich entsprechend ihrer Größe als eine Bande im Gel finden. Sind mehrere Banden in einer BV-Familie sichtbar, so liegt eine Überamplifikation vor. In manchen Fällen, vor allem bei der Untersuchung kleiner Proben, ist eine Vor-Amplifikation nötig. Dabei geht der

"eigentlichen" PCR mit den *GC-clamp* Primer eine *nested* (human) bzw. *semi-nested* (Maus) PCR mit geringer Zyklenzahl voraus.

Mittels DGGE können nur qualitative Aussagen getroffen werden, z.B. ob eine klonale Expansion einzelner T-Zellen besteht oder ob identische Klone in unterschiedlichen Proben enthalten sind. Um quantitative Aussagen treffen zu können, z.B. ob das TCR-Repertoire in unterschiedlichen Proben gravierend variiert, wird ein vom DGGE abgelöster Ansatz verfolgt (thor Straten et al. 1996): Zuerst wird für jede Probe eine PCR-Reihe mit Primern für die konstante Region der TCR β -Ketten durchgeführt, um herauszufinden, bei welcher Zyklenzahl man sich noch im exponentiellen Bereich der PCR befindet. Die Proben werden dann mit der entsprechenden Zyklenzahl mit den Primern für die einzelnen TCR BV-Familien und dem konstanten Teil, welcher am 5'-Ende radioaktiv markiert ist, amplifiziert. Die Produkte werden anschließend in einem normalen Polyacrylamidgel aufgetragen und das getrocknete Gel mit Hilfe eines Phosphor-Imagers ausgewertet. Es wird das Verhältnis von jeder einzelnen TCR BV-Familie zur Summe aller Familien berechnet, d.h. der prozentuale Anteil jeder Familie am gesamten Repertoire.

1.4.2 *In situ*-Detektion von spezifischen T-Zellrezeptorreaktivitäten

Die Methode zur *in situ*-Detektion von tumorantigenspezifischen T-Zellen basiert auf immunhistologischen Verfahren. Anstelle eines Antikörpers werden jedoch multimerisierte Peptid/HLA-Komplexe verwendet. Die Generation dieser Multimere erfolgt durch die Bindung mehrerer biotinylierter Peptid/MHC Klasse I-Komplexe an ein Dextranmolekül über konjugiertes Streptavidin-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Abb. 9). Im Unterschied zu klassischen Tetrameren aus Peptid/MHC Komplexen, welche sehr rigide sind und somit nur lebende Zellen bei denen ein TCR *clustering* möglich ist mit ausreichender Affinität binden, sind die Dextramere sehr flexibel und können auch fixierte Zellen binden (Andersen et al. 2001b).

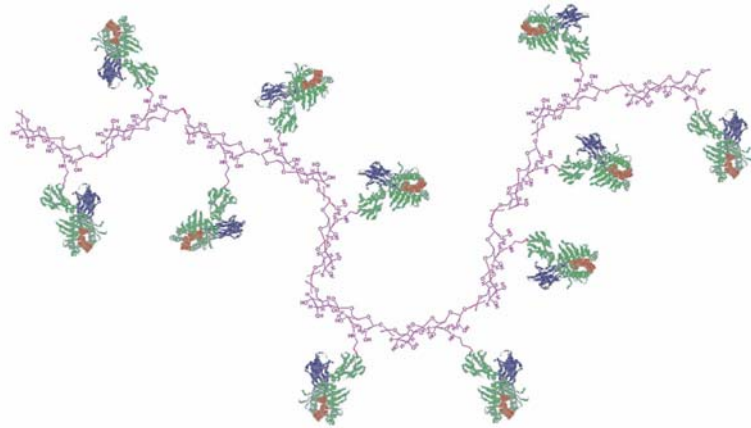


Abbildung 9. Aufbau eines Dextramers. Peptide/MHC Klasse I Multimere basieren auf Dextranmoleküle, welche Streptavidin und den Fluoreszenzfarbstoff FITC enthalten. Sie entstehen durch die kovalente Bindung des Biotins der Peptid/MHC Klasse I Monomere mit dem Streptavidin des Dextranmoleküls.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch gezielte Veränderungen des Mikromillieus eine Induktion von T-Zellantworten auch außerhalb von sekundärem lymphatischem Gewebe erfolgen kann. Es wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, ob das *priming* von naïven T-Zellen nur in spezialisiertem Gewebe stattfindet, oder ob sich Situationen hervorrufen lassen, in denen dieses *priming* auch in nicht-spezialisiertem Geweben möglich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden ein murines Modellsystem sowie humanes Untersuchungsmaterial immunologisch charakterisiert.

1.6 Vorüberlegungen und Modellsysteme

Die Wahl der genutzten Modellsysteme basieren auf zwei Beobachtungen: Erstens, die wichtige Rolle von Lymphotoxin- α (LT α) bei der Neogenese von Lymphknoten (Fu and Chaplin 1999) und zweitens, die zentrale Aufgabe von dendritischen Zellen als „*nucleation-site*“ bei der Organisation von lymphatischen Strukturen in entzündetem Gewebe (Sallusto and Lanzavecchia 1999).

Die Lymphotoxine sind eine Subfamilie der TNF-Ligandenfamilie (Bazzoni and Beutler 1996). $LT\alpha$ existiert als lösliche und membran-gebundene Form. Die lösliche Form ist ein Homotrimer und bindet an beide TNF-Rezeptoren (TNFR1, CD120a und TNFR2, CD120b), wohingegen die membranständige Form von $LT\alpha$ ein Heterotrimer [$LT\alpha_1\beta_2$] ist, welches mit dem Transmembranprotein Lymphotoxin- β ($LT\beta$) einen Komplex bildet und ausschließlich an den $LT\beta$ -Rezeptor bindet. $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta R$ -Interaktion scheint für die Lymphknotenentwicklung im Wesentlichen verantwortlich zu sein (Futterer et al. 1998; Matsushima et al. 2001), obwohl die $LT\alpha_3/TNFR1$ -Interaktion zum Erhalt einzelner Lymphknoten in $LT\beta$ *knock-out* Mäusen ausreichend ist (Koni et al. 1997). Um die Veränderungen zu untersuchen, die durch eine Anreicherung von $LT\alpha$ in der Mikroumgebung eines Tumors hervorgerufen werden, wurde ein bereits zuvor etabliertes Tumormodell herangezogen. Die läsionale Anreicherung von $LT\alpha$ erfolgte über ein Antikörper- $LT\alpha$ -Fusionsprotein. Der Vorteil dieses Vorgehens gegenüber einer peri/intraläsionalen Injektion liegt in der Vermeidung von Verletzungsartefakten. Zudem ist damit das Modell flexibler und verlässlicher, unabhängig von der Zugänglichkeit des Tumors und von der Genauigkeit der Injektion. Die Antikörper- $LT\alpha$ -Fusionsproteine werden durch genetische Fusion des Zytokins an das carboxyterminale Ende eines Antikörpers hergestellt und bewahren sowohl Antigenbindung, als auch Zytokinaktivität der jeweiligen Komponenten (Gillies et al. 1991; Gillies et al. 1993). Aufgrund der Antikörperkomponente reichert sich das injizierte Fusionsproteine dort an, wo das Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet ist, exprimiert wird (Becker et al. 1996a; Becker et al. 1996b). Als Modellorganismus wurde die C57Bl/6J Maus verwendet, als Antigenquelle die syngene B78-D14 Melanomzelllinie. Diese Melanomzelllinie wurde durch Transfektionen der Melanomlinie B16 mit den Genen, die für β -1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und α -2,8-Sialyltransferase kodieren, erzeugt und exprimiert konstitutiv die

Disialoganglioside GD₂ und GD₃ (Haraguchi et al. 1994). Als Fusionsprotein wurde ch14.18-LT α verwendet (Abb. 10). Der Antikörperanteil des Fusionsproteins enthält die Antigenbindungsstellen des murinen anti-GD₂ Antikörpers 14.18 (Gillies et al. 1991).

Die zweite Fragestellung, ob dendritische Zellen in der Lage sind, eine klonale Expansion von T-Zellen außerhalb sekundärer lymphatischer Gewebe zu induzieren, ließe sich in der Maus nur schwer klären, da die Gewinnung von murinen DC ohne *in vitro*-Artefakte, wie das Kultivieren mit fötalem Kälberserum (FCS), äußerst schwer zu handhaben ist. Diese Probleme wurden im humanen System bereits vor einigen Jahren gelöst, so dass sich die Verwendung von humanen DC anbot. Die Möglichkeit entsprechendes Patientenmaterial zu untersuchen, ergab sich aufgrund von bereits vorhandenen Gewebeproben die von Stadium IV Melanompatienten gewonnen wurden, welche im Rahmen von Studien DC-Vakzinierungen erhielten. Mit Zustimmung der Patienten wurden Hautbiopsien von Vakzinierungsstellen entnommen, um diese immunologisch zu charakterisieren. Bei den Vakzinierungsstellen handelt es sich um ein artifizielles Modell, in dem reife DC, die normalerweise nur im Lymphknoten vorkommen, in die Haut injiziert werden; somit war es möglich, die durch DC hervorgerufenen Änderungen dieses Mikromilieus direkt zu studieren.

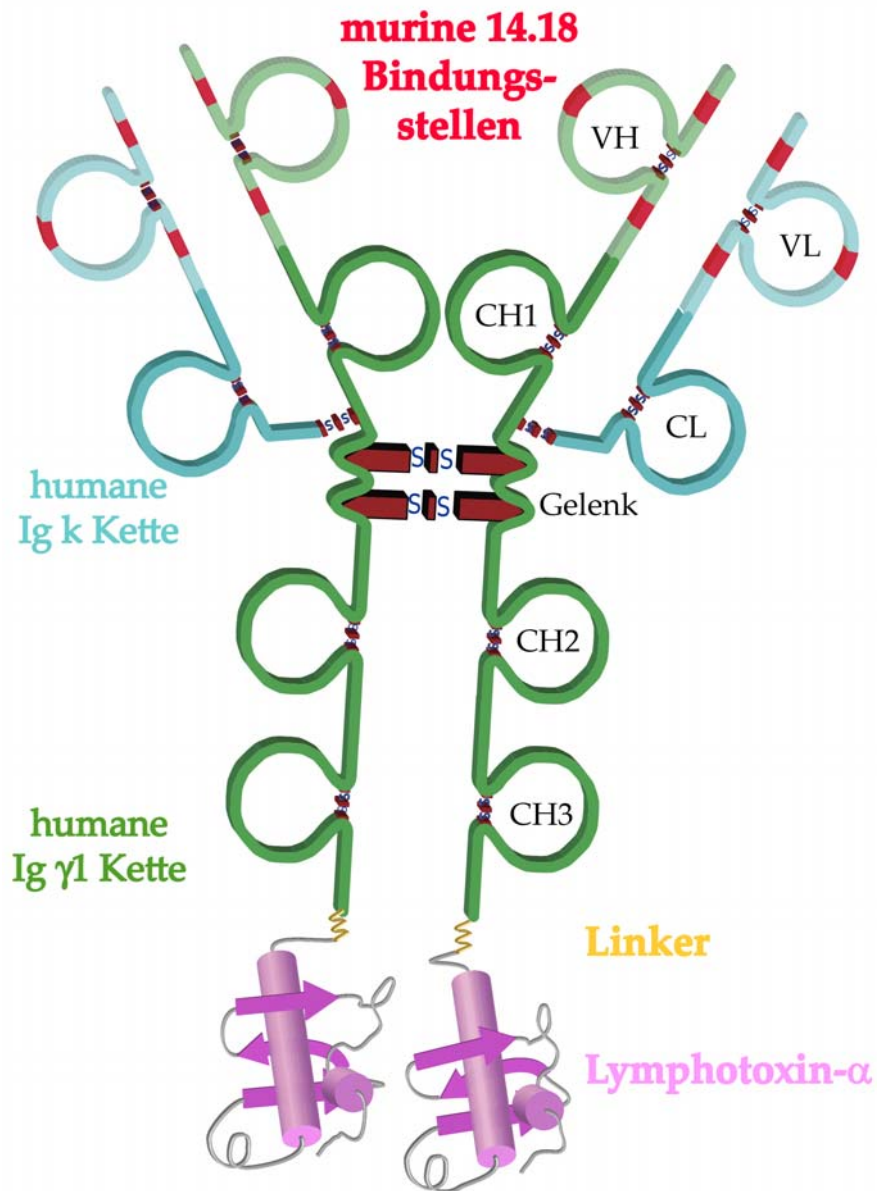


Abbildung 10. Schematische Darstellung des ch14.18-LT α Fusionproteins. Jeweils ein LT α Molekül ist über einen Linker an das Carboxylende der schweren Kette des humanen Immunglobulin (Ig) γ 1 Rückrats gebunden. Die Antigen-spezifität des Fusionsproteins stammt von den Antigenbindungsstellen des murinen Antikörpers 14.18.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse verwendet. Diese stammen von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) und wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Alle Experimente wurden den gültigen Anforderungen für Tierversuche gerecht.

2.1.2 Chemikalien

Die im Labor routinemäßig vorhandenen und benutzten Chemikalien besaßen pro Analyse Qualität und wurden von den Firmen Merck, Amersham-Pharmacia, Roche, Roth und Sigma bezogen. Im Folgenden sind Chemikalien aufgelistet, die nicht routinemäßig verwendet werden:

Ethidiumbromid	Sigma
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP	Amersham-Pharmacia
Cresol Red	Sigma
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma
TEMED	Invitrogen
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma
Formamid	Sigma
Acrylogel 5 solution 'Electran'	Promochem

2.1.3 Kits

5' DNA Terminus Labeling System	Invitrogen
Animal Research Kit ARK (Biotinylierung von Antikörper)	Dako
Gentra Purescript RNA Isolierungskit	Biozym
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
Seqdirect PCR cleaning Kit	Q Biogene
Streptavidin-Biotin HRP/AEC Detektionskit (#K5003)	Dako

2.1.4 DGGE-Primer

Tabelle 1. Murine DGGE-Primer für BV-Familien

Primer	Sequenz (5' → 3')
MBV1	CGGTGCCCAGTCGTTTTATAC
MBV2	CACACGGGTCACTGATACGGAG
MBV3	CACCTTGCAGCCTAGAAATTCAG
MBV4	CTGCCTCAAGTCGCTTCCAAC
MBV5	TGARATGAACATGAGTGCCTTGG
MBV6	TTCTCTCACTGTGACATCTGCCC
MBV7	AAGGATACAGGGTCTCACGGAAG
MBV8	TTGGCTTCCCTCTCTCAGACA
MBV9	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGG
MBV10	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGG
MBV11	GCCCAATCAGTCGCACTCAAC
MBV12	ATGGTGGGGCTTTCAAGGATC
MBV13	CTGTGAGGCCTAAAGGAACTAAC
MBV14	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC
MBV15	CCATCAGTCATCCCAACTTATCC
MBV16	CTCTCAAATCCAACCCACAGC
MBV17	ATTCTCAGCTAAGTGTTCCCTCGA
MBV18	CGGCCAAACCTAACATTCTC
MBC	TGGAGTCACATTTCTCAGATC
MBC-GC	GCCGCCCGCCGCTCGCCCGCCGCGCCCCTGCCCGCCGC CCCCGCCCGCGCTGGAGTCACATTTCTCAGATC
Beta konstant down	GCTACCTTCTGGCACAATCCTC
Beta konstant up	TAGGCATTTTCCAGGTCACAAG
MBC4 (für semi-nested)	GGGTAGCCTTTTGTGGTTTGC

Tabelle 2. Humane Voramplifikations-Primer für BV-Familien

Primer	Sequenz (5' → 3')
BV1	CCGCACAACAGTTCCTGACTTGC
BV2	TTCATGCTGATGGCAACTTCCAAT
BV6	MAGRATGTARMKCTCAGGTGTGAT
BV7	TAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAAC
BV8	TGAAGATCCAGCCCTCAGAACCC
BV9	AACAGGACTCTAAGAAATTTCTGAAG
BV10	CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC
BV13A	CACTGAGATGTACCCAGGATATGA
BV13B	TGCAGTGTGCCCAGGATATGA
BV14	GGGCTGGGCTTAAGGCAGATCTAC
BV16	GATGAGTCCGGTATGCCCAACAATC
BV17	CCCCAAAGTACCTGTTCAGAAA
BV21	GAYGATTCACAGTTGCCTAAGGA
BV22	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA
BV23	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCCA
BV24	ATCCAGGAGGCCGAACACTTC
BC4	CCCGTAGAACTGGACTTGACAGCGG

Tabelle 3. Humane DGGE-Primer für BV-Familien

Primer	Sequenz (5' → 3')
HBV1	GCGCGCGCGCGCACTCTGAACTAAACCTGA
HBV2	TCAACCATGCAAGCCTGACC
HBV3	CGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCC
HBV4	TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTA
HBV5A	CTGAGATGAATGTGAGCACCTTG
HBV5B	CTGAGCTGAATGTGAACGCCTTG
HBV6A	AGATCCAGCGCACAGAGCG
HBV6B	AGATCCAGCGCACASAGCA
HBV7	GCCAAGTCGCTTCTCACCTG
HBV8	TGAAGATCCAGCCCTCAGAACCC
HBV9	TCTCACCTAAATCTCCAGACAAAG
HBV10	CCACGGAGTCAGGGGACACA
HBV11	TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA
HBV12A	GAGAATTTCTCCTCACTCTGG
HBV12B	GACCTCCCCCTCACTCTGG
HBV13A	CTCAGGCTGCTGTCTGGCTG
HBV13B	CTCAGGCTGGAGTTGGCTG
HBV14	AGGGTACAAAGTCTCTCGAAAAG
HBV15	CAGGCACAGGCTAAATTCTCC
HBV16	GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGCGAAGTGGAGGATT CTGGAGT
HBV17	GAAGGGTACAGCGTCTCTCGG
HBV18	TTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGG
HBV19	TCTCAATGCCCAAGAACGCAC
HBV20	AGGTGCCCAAGAATCTCTCAG
HBV21	GCGCGCGCGCGCGCGCGCTCAAAGGAGTAGACTCCACT CTC
HBV22	AGATCCGGTCCACAAAGCTG
HBV23	ATTCTGAACTGAACATGAGCTCCT
HBV24	ATCCAGGAGGCCGAACACTTC
HBCup	GGGTAGAGCAGACTGTGGC
HBCdown	CTTTCTCTTGACCATGGCC
HBC-GC	CGGCGCCGCCCGCCGCTCGCCCGCCGCGCCCTGCCCG CCGCCCGCCCGACCGCGGGTGGGAACAC

2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

- 6% Polyacrylamid, 0% Denaturgenz:

75 ml 40% Acrylamid

20 ml 25 x TAE (A1-Biotech)

ad 500 ml H₂O

- 6% Polyacrylamid, 80% Denaturgenz:

75 ml 40% Acrylamid

20 ml 25 x TAE (A1 Biotech)

168 g Urea

160 ml Formamid

ad 500 ml H₂O

- 5 x Dye für PCR:

10 ml Cresol Red

6 g Succrose

- 10 x PCR Puffer für murine Primer:

200 mM Tris-HCl (pH 8,4)

20 mM MgCl₂

500 mM KCl

0.5 µg BSA

- 10 x PCR Puffer für humane Primer:

100 mM Tris-HCL (pH 9,2)

35 mM MgCl₂

250 mM KCl

5% Formamid

- PBS (*phosphate buffered salt solution*):
 - Dulbecco's: ohne Kalzium, Magnesium und Natriumkarbonat (Invitrogen)
- 1 x TAE (Tris-Acetate/EDTA)
 - 40 mM Tris-Acetate
 - 1 mM EDTA
- FastBlue (Rezept nach Dako)
 - 1 mg Naphthol-AS-MX-phosphat (N 4875, Sigma) in 100 μ l N,N-Dimethylformamid lösen
 - 4,9 ml Tris/HCL-Puffer (100 mM, pH 8,5)
 - 1 mg Fast Blue BB-Salz (F3378, Sigma)
 - 5 Tropfen 5 mM Levamisol-Lösung (X 3021, Dako)
 - Lösung mit 0,45 μ m Filter (#10462100, Schleicher & Schuell) filtrieren
- Hämatoxylin (nach Mayer)
 - 1 g Hämatoxylin (Sigma) in 1000 ml H₂O lösen
 - 0,2 g Natriumjodat (Sigma)
 - 50 g Kalialaun (Merck)
 - 100 ml von dieser Stammlösung werden mit 5 g Chloralhydrat (Merck) und 0,1 g Zitronensäure (Merck) versetzt und vor Gebrauch filtriert
- Kompletmedium (CM) (für murine *peripheral blood lymphocytes* (PBL) und RMA-S):
 - 500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat [2 g/l] (PAN)
 - 50 ml FCS (Invitrogen)
 - 5 ml Penicillin [10000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml] (PAN)
 - 6 ml Natriumpyruvat [100 mM] (PAN)

- 5 x Cacodylatpuffer

53,5 g Natrium-Cacodylat Trihydrat (Fluka)

ad 500 ml H₂O

- Zellkulturmedium (für D14-B78):

500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat [2 g/l] (PAN)

50 ml FCS (Invitrogen)

5 ml Penicillin [10000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml] (PAN)

6 ml Natriumpyruvat [100 mM] (PAN)

Geneticin (G418) [Endkonzentration: 400 µg/ml] (PAN)

Hygromycin B [Endkonzentration: 50 µg/ml] (Sigma)

2.1.6 Gele und Elektrophoresebedingungen

- Kleines Agarosegel; 2%ig (für bis zu 2 x 20 Proben; 12 x 14 cm; 20iger Kämme; BRL Horizon 1114; Gibco)

2 g Agarose

ad 100 ml 1 x TAE

Durch Aufkochen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 15 µl Ethidiumbromid zugegeben und die Agaroselösung in den abgeklebten Gelschlitten gegossen. Die Elektrophorese (Power Supply EPS 600; Amersham-Pharmacia) erfolgte bei 130 V und 300 mA für 30 min.

- Großes Agarosegel; 2%ig (für bis zu 3 x 36 Proben; 20 x 25 cm; 36iger Kämme; Gator Gelssystem A2; Peqlab)

6 g Agarose

ad 300 ml 1 x TAE

Nach Zugabe von 50 µl Ethidiumbromid zur abgekühlten Agaroselösung wurde diese in den Steckgelschlitten gegossen. Die Elektrophorese (Power Supply EPS 600) erfolgte für 55 min bei 250 V und 300 mA.

- DGGE Gel (für maximal 25 Proben; 16 x 16 cm; 25iger Kämme, 1 mm Spacer und Kämme)

Zunächst wurden die Glasplatten gründlich mit 80%igem Ethanol und anschließend PhotoFlo (Kodak; 1:600 mit Wasser verdünnt) gereinigt und zusammengebaut (Protean II xi System; Biorad). Die Reinigung mit PhotoFlo sorgt für einen relativ geraden Lauf der Proben und das bessere Ablösen des Gels vom Glas. Danach wurden in je einem Falkonröhrchen folgende Lösungen angesetzt und gemixt:

20%iges Detergenz

10,5 ml 6% Polyacrylamid, 0% Denaturgenz (siehe Punkt 2.1.5)

3,5 ml 6% Polyacrylamid, 80% Denaturgenz (siehe Punkt 2.1.5)

50 µl 20% APS (d.h. 2 g APS, ad 100 ml H₂O)

6 µl TEMED

80%iges Detergenz

14 ml 6% Polyacrylamid, 80% Denaturgenz

50 µl 20% APS

6 µl TEMED

Mit Hilfe des Gradientenformers (Biorad) wurde das Gel so gegossen, dass sich ein Gradient einstellt, der von 20% Denaturgenz oben bis 80% am Boden des Gels verläuft. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Taschen mit 1 x TAE ausgespült. Vor dem Beladen mit jeweils 10 µl PCR-Produkt wurden die Taschen nochmals mit 56°C warmen TAE Puffer ausgespült, um mögliche Harnstoffbarrieren zu entfernen. Die Elektrophorese (Power Pac 300; Biorad) wurde bei 160 V und

300 mA in 56°C warmem TAE Puffer (Decode System; Biorad) für 270 min durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in einer Wanne mit Ethidiumbromidlösung (200 µl Ethidiumbromid/l H₂O) gefärbt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator transferiert und das Ergebnis mittels des Easy Image Systems (Herolab) dokumentiert.

- Polyacrylamidgel für semi-quantitative PCR (12 x 14 cm; 20iger Kämme, 1 mm Spacer und Kämme)

Die Glasplatten (Biorad) wurden mit 80%igem Ethanol gereinigt und entsprechend der Anleitung des Herstellers zusammengebaut. Die Gellösung wurde wie folgt in ein Falkontube pipettiert und anschließend wurde das Gel gegossen:

22 ml 6% Polyacrylamid

79 µl 20% APS

9,5 µl TEMED

Die Elektrophorese (Power Supply EPS 600) erfolgte für 50 min bei 300 V, 290 mA und 5 W.

2.1.7 Antikörper

Tabelle 4. Anti-humane Antikörper

Zielstruktur	Isotyp	Klon/Nummer	Verdünnung	Firma
CD3	Maus Polyklonal	#A 0452	1:800	Dako
CD8	Maus IgG1	HIT8A	1:400	BD
CD45RA	Maus IgG2b	HI 100	1:5000	BD
CD62L	Maus IgG1	Dreg-56	1:250	BD
CD83	Maus IgG1	HB15e	1:2000	BD
PNAd	Ratte IgM	MECA-79	1:500	BD
TCA-4	Ziege IgG	BAF366	1:150	R&D Systems
VB12.1	Maus IgG2b	S511	1:100	HybriDomus
VB14	Maus IgG1	CAS1.1.3	1:100	HybriDomus

Tabelle 5. Anti-murine Antikörper

Zielstruktur	Isotyp	Klon/Nummer	Verdünnung	Firma
CD4	Ratte IgG2A	RM4-5	1:1000	BD
CD8	Ratte IgG2A	53-6.7	1:400	BD
CD45R/B220	Ratte IgG2A	RA3-6B2	1:800	BD
CD62L	Ratte IgG2A	MEL-14	1:500	BD
MHC-Klasse II	Ratte IgG2B	M5/114	1:20 des Zell- Überstands	ATCC
PNAd	Ratte IgM	MECA-79	1:500	BD
TCA-4	Ziege Polyklonal	# AF 457	1:150	R&D Systems
H2-K ^b /H2-D ^b	Maus IgG2A	28-8-6		BD

2.1.8 Fusionsprotein

Die Antikörper-LT α -Fusionsproteine und das rekombinante lösliche LT α (sLT α) wurden freundlicherweise von Ralph Reisfeld (The Scripps Research Institute, San Diego) zur Verfügung gestellt. Ursprünglich wurden die Konstrukte von Stephan Gillies hergestellt (Gillies et al. 1991). Sie basieren auf der genetischen Fusion eines Antikörpers mit der cDNA eines Zytokins. Der Antikörper des ch14.18-LT α -Fusionsproteins ist ein Chimär, d.h. er wurde aus der cDNA für die variable Region des murinen Antikörpers 14.18, der gegen das Gangliosid GD₂ gerichtet ist, und der cDNA für die menschliche γ 1 schwere Kette und die κ leichte Kette generiert. Durch Fusion einer synthetischen Sequenz, die für das humane LT α kodiert, an das Carboxylende des humanen γ 1 Gens entstand das Konstrukt für das ch14.18-LT α -Fusionsprotein (Gillies et al. 1991). Dieses Konstrukt wurde in den Vektor pdHL2 eingefügt, welcher das Gen für die Dehydrofolatereduktase enthält. Der resultierende Expressionsvektor wurde in Sp2/0-Ag14 Zellen transfiziert und erfolgreich transfizierte Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und mittels 100 nM Methotrexate selektiert. Das Fusionsprotein wurde über eine Protein A-Sepharoseaffinitätssäule aufgereinigt. Das andere verwendete Fusionsprotein, das ch225-LT α , besitzt ebenfalls einen chimären Antikörper, der jedoch gegen den humanen EGF-Rezeptor gerichtet ist (Reisfeld et al. 1996).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl lebender Zellen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau, welches sich in tote Zellen einlagert. Bei 10facher Vergrößerung wurden

unter dem Mikroskop die ungefärbten Zellen in 2 x 16 Quadranten gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

2.2.1.2 Zellkulturführung

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im CO₂-Brutschrank (HeraCell; Heraeus).

Die murine Melanomzelllinie B78-D14 wurde bereits ausführlich beschrieben (Haraguchi et al. 1994). Sie stammt von der B16 Zelllinie ab, in die Gene, die für β -1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und α -2,8-Sialyltransferase kodieren, transfektiert wurden. B78-D14 exprimiert konstitutiv die Disialoganglioside GD₂ und GD₃.

Beide Zelllinien (B16 und B78-D14) wurden in großen Zellkulturflaschen (175 cm²; Nunc) in 25 ml entsprechendem Medium kultiviert. Sobald der Zellrasen konfluent war wurden die Zellen 2-mal mit PBS (10 ml) gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,05%/0,02% in PBS; PAN) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, indem sie für 5 min in den Brutschrank gestellt wurden und die Trypsinisierung mit doppelter Menge CM abgestoppt wurde. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 187 g (Rotanta/RP; Hettich) erfolgte die Aussaat mit einer Zellzahl von $\sim 2 \times 10^4/\text{cm}^2$ mit frischem Medium in neue Kulturflaschen.

Zellen für die Induktion von Tumoren wurden nach dem Abstoppen der Trypsinierung mit CM mit PBS auf 50 ml verdünnt und zentrifugiert (10 min bei 187 g). Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Pellet in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert (10 min bei 187 g). Danach wurde die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Zelldichte in PBS eingestellt.

2.2.2 *Tierexperimente, DC-Vakzinierung und Probengewinnung*

2.2.2.1 Induktion von Lungenmetastasen bzw. subkutanen Tumoren

Für die Induktion von Lungenmetastasen wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ B78-D14 Zellen (in 500 μ l PBS/0,01%BSA) in die laterale Schwanzvene von C57BL/6J Mäuse injiziert. Um zu verhindern, dass die injizierten Tumorzellen eine Lungenembolie hervorrufen, wurden die Mäuse durch Halothaninhalation (Hoechst-Roussel) anästhesiert und die Zellen über einen Zeitraum von mindestens zwei Minuten gespritzt. Die Induktion von subkutanen Tumoren erfolgte durch s.c. Injektion von $2,5 \times 10^6$ B78-D14 Zellen.

2.2.2.2 Lymphotoxintherapie

Rekombinantes LT α oder das Antikörper-Fusionsprotein ch14.18-LT α wurde täglich über einen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen in den jeweils angegebenen Mengen durch intraperitoneal (i.p.) (Lungenmetastasen) bzw. intravenös (i.v.) (subkutane Tumore) Injektionen verabreicht.

2.2.2.3 Entnahme von Tumorbiopsien aus Mäusen

Für die Anästhesie der Mäuse wurde 2,5%iges Avertin, welches i.p. (15 μ l/g Körpergewicht) appliziert wurde, verwendet. Dieses wurde folgendermaßen hergestellt: zu 1 g 2,2,2-Tribromoethanol wurden 1,25 ml 2-Methyl-2-Butanol (beide von Fluka) gegeben, das Gemisch bei 37°C erwärmt und bis zur vollständigen Lösung vorsichtig geschüttelt. Nachfolgend wurde auf 40 ml Gesamtvolumen mit dest. Wasser aufgefüllt, das 2,5%ige Avertin aliquotiert und bis zu seiner Verwendung bei -20°C eingefroren. Sobald die Mäuse anästhesiert waren, wurde mit einer Biopsiestanze (\varnothing 3mm; Stiefel) ein Stück des subkutanen Tumors entnommen und die Wunde anschließend mit nicht resorbierbaren Fäden (monofilament Glycomer 631, BIOSYN) genäht. Insgesamt wurden so jeder Maus in

einem zeitlichen Abstand von jeweils einer Woche 3 Proben entnommen. Am Tag 21 wurden die Mäuse getötet und zusätzlich die inguinalen Lymphknoten entfernt.

2.2.2.4 Gewinnung von murinen Tumor infiltrierender Lymphozyten (TIL)

Die subkutanen Tumore der Mäuse wurden unter sterilen Kautelen entfernt und in 5 ml warmes CM (RPMI 1640 mit 10% FCS) transferiert. Danach wurde in einer Petrischale der Tumor vom umliegenden, gesunden Gewebe getrennt. Nach Zugabe von 2,7 ml RPMI, 300 µl Kollagenase D und 30 µl DNase (beide Boehringer-Mannheim) wurden die Tumorstückchen bei 37°C für 2,5 h verdaut. Anschließend wurden sowohl das Sieb (Prüfsieb mit 100 µm Porendurchmesser) als auch eine Glas-Petrischale mit CM gespült, die verdauten Stückchen auf das Sieb gegeben und mit dem Kolben einer sterilen Spitze in die Petrischale passiert. Das Sieb wurde noch 2-mal mit CM gespült und die Zellen in 14 ml Medium in einem 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation bei 187 g für 8 min wurde der Überstand dekantiert, die Zellen in Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, die Zellen in Medium aufgenommen und gezählt. In ein 15 ml Röhrchen wurde dann 2 ml Lympholyte-M (Linaris) vorgelegt und mit 5 ml Zellsuspension (Konzentration: maximal 10×10^6 Zellen/ml Medium) überschichtet. Die Interphase wurde nach 20-minütiger Zentrifugation bei 747 g abgenommen und die sich darin befindenden Lymphozyten 3-mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 187 g, 10 min). Schließlich wurden die Zellen mit einer Konzentration von $1-5 \times 10^5$ /ml CM und 1000 i.E. Proleukin (Chiron)/ml Medium kultiviert.

2.2.2.5 Gewinnung von murinen PBL aus der Milz

Nach Entnahme der Milz wurde diese mit Hilfe des Mattrandes von autoklavierten Objektträgern (Marienfeld) zerrieben. Die Kapsel der Milz wurde verworfen, die Zellen in Hank's (PAA) aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen transferiert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 187 g zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt und in

insgesamt 5 ml Hank's aufgenommen. Anschließend wurden 2 ml Lympholyte M mit diesen Zellen überschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 747 g wurde die Interphase mit den Lymphozyten abgenommen und die Zellen in Hank's aufgenommen. Die Zellen wurden danach für 10 min bei 187 g zentrifugiert, 2-mal mit CM gewaschen und gezählt. Anschließend wurden sie in CM mit 1000 i.E. Proleukin/ml Medium in einer Konzentration von 1×10^6 /ml kultiviert.

2.2.2.6 Patienten und DC-Vakzinierungsprotokoll

Sechs Melanompatienten (alle männlich) erklärten sich bereit, an einer DC-basierten Vakzinierungstherapie teilzunehmen und Hautbiopsien von Vakzinierungsstellen für immunologische Charakterisierungen zur Verfügung zu stellen. Das Therapieprotokoll, die Patientenaufklärung sowie das Einverständnisformular wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und gebilligt (Studie wurde im Rahmen des Projekt #70-2592 der Deutschen Krebshilfe gefördert). Mittels HLA-Typisierung konnten bei Patient #1 die Klasse-I-Spezifitäten HLA-A1 und -A2, bei Patient #3 die Spezifitäten HLA-A3 und -B44 und bei Patient #4 die HLA-A2 und -A3 nachgewiesen werden. Die Patienten #2 und #6 waren HLA-A2, Patient #5 HLA-B44 positiv (siehe auch Tabelle 8).

Die Vakzinierungen erfolgten im Rahmen einer klinischen Studie. Das ausführliche Vakzinierungsprotokoll, die Ergebnisse der routinemäßigen Immuncharakterisierungen und der klinische Verlauf wurde vor kurzem publiziert (Andersen et al. 2001a). Mehr als 90% der für die Vakzinierungen verwendeten Zellen wiesen den für reife dendritischen Zellen charakteristischen Phänotyp HLA-DR⁺⁺⁺, CD86⁺⁺⁺, CD40⁺, CD25⁺, CD14⁻ auf. Zusätzlich exprimierten > 80% der Zellen CD83. Für das Beladen der DC wurden folgende in GMP-Qualität synthetisierten Peptide (Clinalfa, Laeufelfingen, Schweiz) verwendet: für die Patienten #1 und #2 das HLA-A2 restringierte Melanomepitop MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRALV), ein modifiziertes gp100₂₀₉₋₂₁₇ Epitop (IMDQVPFSV), oder ein

modifiziertes MART-1₂₆₋₃₅ Peptidanalogue (ELAGIGILTV), für Patient #1 zusätzlich das HLA-A1 restringierte MAGE-3₁₆₈₋₁₇₅ (EVDPIGHLY) Peptid, für Patient #3 das HLA-A3 restringierte gp100₁₇₋₂₅ (ALLAVGATK) oder das HLA-B44 restringierte Tyrosinase₁₉₂₋₂₀₀ (SEIWRDIDF) Epitop, für Patient #4 das HLA-A2 restringierte Tyrosinase₂₁₄₋₂₂₂ Peptid (FLLRWEQEI), für Patient #5 das HLA-B44 restringierte MAGE-3₁₆₇₋₁₇₅ Epitop (MEVDPIGHLY) und für Patient #6 das HLA-A2 restringierte Survivin 1M2 (LMLGEFLKL). Das Onkolysat wurde nach einem etablierten Protokoll aus autologen Melanomzellen gewonnen (Grabbe et al. 1991). Pro Injektionsstelle wurden 5×10^6 DC intradermal verabreicht. Die Patienten erhielten bis zu 30×10^6 DC pro Impfung, da sie bis zu 6 Injektionen erhielten. Hautbiopsien von den Vakzinierungsstellen wurden 24 und 48 Stunden nach Injektion der DC entnommen und kryokonserviert. Die Herstellung der DC, das Beladen der Zellen, die Impfung der Patienten und die Entnahme der Biopsien wurden von der Arbeitsgruppe um OA. Dr. E. Kämpgen an der Hautklinik durchgeführt. Ein Teil des kryokonservierten Patientenmaterials wurde mir im Rahmen der Kontrolle des Impferfolges freundlicherweise für die immunologische Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

2.2.2.7 PBL-Gewinnung aus humanem Blut

Zunächst wurde Heparinblut mit gleicher Menge PBS-Puffer verdünnt (aus 1 ml Blut könne ca. 10^6 Zellen isoliert werden). In 50 ml Falkontubes wurden 20 ml Ficoll (Biochrom) vorgelegt, mit gleicher Menge verdünntem Blut vorsichtig überschichtet und nachfolgend bei 747 g (Hettich, Rotanta RP) für 30 min zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt, in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben und mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurde bei 187 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und die Zellen durch zweimaliges

Wiederholen dieser Prozedur gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.8 Isolierung von spezifischen T-Zellen

Die Isolation humaner MAA-reaktiver spezifischer T-Zellen erfolgte über Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe, welche an magnetische Kügelchen (*beads*) gekoppelt wurden. T-Zellen, die einen TCR tragen, der spezifisch an den entsprechenden Peptid/MHC-Klasse-I-Komplex bindet, wurden mit Hilfe eines Magneten von den übrigen T-Zellen getrennt. Dazu wurden 5×10^6 Streptavidin-konjugierte *beads* (M280 Dynabeads; Dynal) 2-mal mit je 200 μ l kaltem PBS gewaschen, indem das Eppendorf Reaktionsgefäß in den Magneten gestellt und die Flüssigkeit abgenommen wurde. Anschließend wurden die *beads* zusammen mit 0,5 μ g des Peptid/HLA-A*0201 Monomers in einem Volumen von 200 μ l bei RT für 15 min inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS und die Inkubation von *beads* und PBL in einem Verhältnis von 1:10 bei 4°C für eine Stunde. Die Abtrennung der Zellen, an denen *beads* gebunden waren, erfolgte für 3 min im magnetischen Feld (positive Selektion). Nachfolgend wurden diese nochmals 2-mal mit PBS gewaschen.

Analog erfolgte auch die Isolation muriner CD8⁺ Zellen; anstelle der Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe wurde jedoch ein biotinylierter anti-CD8 Antikörper verwendet. 2×10^7 *beads* wurden mit 2 μ g des Antikörpers gekoppelt. Die Inkubation von *beads* und PBL erfolgte in einem 1:1 Verhältnis.

2.2.3 *In situ-Nachweismethoden*

2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um einen schnellen Überblick über das Gewebe zu erhalten, wurden Kryostatschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt dabei die Kerne blau, Eosin das Zytoplasma rot. Hierzu wurden die Schnitte für 10 min in Hämatoxylinlösung gestellt.

Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation in H₂O wurden die Schnitte in *Aqua dest.* gespült und für 1 min mit 1% Eosin Y (Sigma) gegengefärbt. Bevor die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, absolutes Ethanol und absolutes Xylol) durchliefen, wurden sie kurz in *Aqua dest.* gespült. Schließlich wurden die Schnitte in Hyper-Mount (Shandon) eingedeckt.

2.2.3.2 Immunhistologie

Von dem zu untersuchendem Material wurden mittels eines Kryostaten (Cryostat 1720 Digital; Leitz) Gefrierschnitte von 6 µm Dicke hergestellt. Diese wurden nach dem Trocknen für 10 min in Aceton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit einem spezifischen Blocking Puffer (Dako) und unspezifische Bindungsstellen an kollagenen Elementen mit 5% speziesspezifischem Serum blockiert. Das verwendete Serum entsprach dabei der jeweiligen Tierspezies des verwendeten primären biotinylierten Antikörpers bzw. des Sekundär- oder Brückenantikörpers. Alle Inkubationen erfolgten bei RT.

2.2.3.2.1 Indirekte Immunhistochemie

Für folgende Antikörper wurde die indirekte Immunhistologie über einen Brückenantikörper durchgeführt: CD3, CD8, CD45RA, CD83, Vβ12.1, Vβ14 anti-Human und MHC-Klasse-II anti-Maus. Für die anti-Human-Antikörper stammten der Brückenantikörper und die Detektionsreagenzien aus dem Streptavidin-Biotin *horseradish peroxidase* (HRP)/3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) Detektionskit; für den MHC-Klasse-II-Antikörper wurde ein biotinylierter anti-Ratte-Brückenantikörper (#554014, BD) verwendet.

Für die Einzelfärbungen wurden die Schnitte für 30 min mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert. Die optimale Verdünnung des jeweiligen Antikörpers wurde zuvor mittels Titration bestimmt; diese Verdünnungen sind in den Tabellen 4 und 5

angegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Brückenantikörper. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 30 min mit Streptavidin-HRP inkubiert, nachfolgend erneut mit PBS gewaschen und mit AEC als Chromogen für 15 min beschichtet. Anschließend wurde die Farbreaktion mit *Aqua dest.* abgestoppt und die Zellkerne durch Inkubation mit Hematoxylin (Dako) für 1 min gefärbt. Die Schnitte wurden dann mit Wasser gespült, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Aquatex (MERCK) eingedeckt.

2.2.3.2.2 Direkte Immunhistochemie

Da der Primärantikörper bereits biotinyliert ist, entfällt bei der direkten Immunhistologie die Inkubation mit dem Brückenantikörper (vgl. 2.2.3.2.1). Mit Ausnahme von CD62L anti-Human und anti-Maus und PNAd anti-Maus wurden die Antikörper bereits in biotinylierter Form erworben. Für die zuvor erwähnten Antikörper erfolgte die Biotinylierung mittels des ARK Kits (Dako) laut Herstellerprotokoll. Für den PNAd anti-Human-Antikörper erfolgte eine Inkubation mit Envision-HRP (#K4004, Dako) anstelle von Streptavidin-HRP, wodurch die Biotinylierung dieses Antikörpers entfiel.

2.2.3.2.3 Immunhistochemische Doppelfärbung

Die Doppelfärbung dient der gleichzeitigen Darstellung von zwei Antigenen auf einen Schnitt. Zellen die beide Antigene gleichzeitig exprimieren erscheinen in einer Mischfarbe. Bei der Doppelfärbung wurde nach 45-minütiger Inkubation mit einem unmarkierten Primärantikörper die Objektträger zwei Mal mit Tris Puffer gewaschen, bevor ein alkalische Phosphatase (AP) markierter Antikörper (Kaninchen anti-Maus, #D0314, Dako bzw. Ziege anti-Ratte, #62-9522, Zymed) für 45 min auf die Schnitte gegeben wurde. Nach dem Waschen mit Tris Puffer erfolgte die Farbreaktion mit FastBlue für 20 min. Nach erneutem Waschen mit Tris Puffer wurden die Schnitte für 45 min mit dem zweiten biotinylierten Primärantikörper inkubiert, nachfolgend mit Tris Puffer gewaschen und für

45 min mit Streptavidin-HRP überschichtet. Im Anschluss an das Waschen mit Tris Puffer wurde als Chromogen AEC für 15 min aufgetragen und die Farbreaktion mit *Aqua dest.* abgestoppt. Schließlich erfolgte das Eindecken mit Aquatex.

2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Methode zur *in situ*-Detektion von tumorantigenspezifischen T-Zellen basiert auf immunhistologischen Verfahren. Anstelle eines Antikörpers werden jedoch multimerisierte Peptid/HLA-Komplexe verwendet (siehe 1.4.2). Das FITC-konjugierte Dextran wurde freundlicherweise von Herrn Lars Østergaard Pedersen (Kopenhagen) zur Verfügung gestellt. Die Peptid/MHC Komplexe wurden z.T. ebenfalls von Herrn Lars Østergaard Pedersen zur Verfügung gestellt, z.T. von Proimmune (Oxford) erworben. Die im Folgenden beschriebenen Färbungen bzw. Arbeitsschritte wurden aufgrund der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen im Dunkeln durchgeführt. Zur Fertigstellung der Dextramere wurden folgende Mengen an biotinylierten Peptid/HLA-A2 Komplexen zu Dextran-FITC gegeben: 0,87 µl Survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 (wobei an Position 97 anstelle eines Threonin ein Methionin synthetisiert wurde), 0,55 µl MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉/HLA-A*0201, 1 µl MART-1₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 bzw. gp100₂₀₉₋₂₁₇/HLA-A*0201 jeweils pro 0,5 µl Dextran-FITC. Nach 10-minütiger Vorinkubation wurden die jeweiligen Ansätze in 100 µl PBS/0,1% BSA aufgenommen.

Von dem zu untersuchenden Gewebe wurden 6 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet, am nächsten Tag zuerst für 5 min in Aceton fixiert und anschließend nochmals für 30 min bei RT getrocknet. Die nachfolgende Inkubation mit 75 µl des jeweiligen Dextramers erfolgte bei 4°C für 75 min. Ungebundene Dextramere wurden anschließend durch zweimaliges kurzes Waschen mit PBS entfernt. Die Präparate wurden mit Vectashield (Vector) eingedeckt.

Für Doppelfärbungen zur Darstellung weiterer Antigene neben dem spezifischen TCR wurden die Schnitte nach Fixieren und Trocknen zunächst mit dem Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Cy3-markierten Antikörper für 45 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mit PBS wurde die oben beschriebene Dextramerfärbung angeschlossen.

Im Anschluss an die Färbung konnten die Präparate unter dem Konfokal-Mikroskop (TCS 4D, Leica) betrachtet und dokumentiert werden.

2.2.3.4 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde unter der Assistenz von U. Eifert durchgeführt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Gewebe mit 3% Glutaraldehyd und 1,7 mM CaCl₂ in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) bei 4°C vorfixiert. Danach wurden die Proben mehrmals in Cacodylatpuffer mit 3% Saccharose bei 4°C gewaschen. Die weitere Fixation erfolgte für 1 h bei 4°C in 2% Osmium(VIII)-oxid und 1% Kaliumferrocyanid (beide Sigma) in Cacodylatpuffer. Anschließend wurde zuerst mit Cacodylatpuffer und danach mit Natriumacetatpuffer (pH 5,2) gewaschen, bevor die Gewebe für 1 h in 1% Uranylacetat in Natriumacetatpuffer inkubiert wurden. Die Dehydratation der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 2 x absolut). Für das Einbetten der Gewebe wurde das Epoxidharz Embed 812 (EM Sciences) verwendet. Dazu wurden die dehydrierten Proben zuerst für 10 min in Propenoxid (Sigma) und anschließend für jeweils 1 h in 1:2 und 1:1 Embed zu Propenoxid inkubiert. Bevor am nächsten Tag das Gewebe in reines Embed eingestellt wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht in 2:1 Embed zu Propenoxid. Die Aushärtung der Proben erfolgte für mehrere Tage bei 60°C. Danach wurden Dünnschnitte angefertigt und unter einem Leo 969 Elektronenmikroskop (Leo Elektronenmikroskopie GmbH) analysiert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA aus Gewebeproben wurde der Gentra RNA Isolierungskit mit geringem modifiziertem Protokoll des Herstellers verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis vorgenommen. Die Zentrifugationen erfolgten bei 4°C und 16000 g (Biofuge Fresco; Heraeus).

Zuerst wurden von den zu analysierenden, kryokonservierten Proben 15-20 5 µm dünne Schnitte mit dem Kryostaten angefertigt, welche in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt wurden. Diese wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung auf Trockeneis gelagert. Für die Isolierung von RNA aus PBL wurden in der Regel 3×10^6 Zellen verwendet. In die Eppendorf Reaktionsgefäße wurde 300 µl *Cell Lysis Solution* gegeben und solange pipettiert, bis alle Gewebsschnitte bzw. alle Zellen zerkleinert waren. Nach Zugabe von 100 µl *Protein-DNA Precipitation Solution* und einer Inkubation von 5 min auf Eis erfolgte eine 6-minütige Zentrifugation. Der RNA-haltige Überstand wurde in ein neues, mit 300 µl Isopropanol gefülltes Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert und durch Rotation gemischt. Anschließend wurde für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und der letzte Tropfen an einem Tuch abgetupft. Das Pellet wurde mit 150 µl 4°C kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet 5 min bei RT in einem Vakuum-Konzentrator (Concentrator 5301; Eppendorf) getrocknet. Schließlich erfolgte die Resuspension des RNA Pellets in 20-30 µl *RNA Hydration Solution*. Die RNA wurde bei -80°C gelagert, bis sie für die RT-PCR eingesetzt wurde.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen), welche durch Expression eines mutierten, klonierten MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase Gens hergestellt wird. Neben dem Enzym wird vom Hersteller auch 5 x First-Strand Buffer und 100 mM DTT bereitgestellt.

Für die cDNA Synthese wurde zuerst pro 10 µl cDNA folgender Mix auf Eis angesetzt:

1,9 µl H₂O

2,0 µl 5 x First-Strand Buffer

1,0 µl DTT (100mM)

0,5 µl dNTP (jede Base 10 mM) (Pharmacia)

0,5 µl Oligo(dT) Primer (10 pmol/µl) (Invitrogen)

0,5 µl Random Primer (20 pg/µl) (Invitrogen)

0,6 µl Superscript II (200 Units/µl) [als letztes]

Pro 10µl cDNA wurden dann die 7 µl dieses Mixes mit 3 µl RNA der Probe in ein PCR Reaktionsgefäß gemischt. Üblicherweise wurden 50 µl (für murine) oder 60 µl cDNA (für humane Proben) für jede Probe angesetzt.

Der Ansatz wurde in eine PCR-Maschine (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) transferiert und durchlief folgende Inkubationsschritte: 30 min bei 42°C, 30 min bei 45°C, 2 min bei 72°C und anschließend bei 4°C gehalten bis die cDNA aus der PCR-Maschine entnommen wurde. Die generierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 TCR Repertoire Analyse

Die TCR Repertoire Analyse dient der Klonalitätsbestimmung von T-Zellen innerhalb einer Probe. Damit lässt sich also bestimmen, ob innerhalb einer TCR BV-Familie die T Zellen polyklonal sind oder ob eventuell klonal expandierte T Zellen präsent sind. Die β-Ketten der murinen T Zellen lassen sich in 18 Familien unterteilen, wobei nur 16

klonotypisch kartiert wurden, da die Familien 17 und 18 stark unterrepräsentiert sind, die β -Ketten der humanen T Zellen in 24 Familien unterteilen. Die angewandte Methode basiert auf einer Amplifikation der TCR β -Ketten und Auftrennung dieser Amplifikate aufgrund ihrer Schmelzeigenschaften im denaturierenden Gel (siehe 1.4.1).

Sowohl für etwaige Voramplifikationen als auch für die eigentlichen Amplifikationen der einzelnen TCRBV-Ketten-Familien wurde jeweils ein Mastermix in einem Eppendorf Reaktionsgefäß hergestellt.

2.2.4.3.1 Murine Analyse

Für die TCR Repertoire Analysen von murinem Ausgangsmaterial wurde folgender Mastermix angesetzt. Die Primer (Invitrogen) sind in Tabelle 1 angegeben, der Puffer und das Dye unter Punkt 2.1.5 beschrieben:

13 μ l H₂O

1 μ l Primer BV (5 pmol/ μ l)

1 μ l Primer MBC4 (für Voramplifikation) bzw. MBC-GC (für DGGE PCR) (5 pmol/ μ l)

6 μ l 5 x Dye

3 μ l 10 x PCR Puffer

Falls geringes Ausgangsmaterial vorhanden ist, erfolgte eine Voramplifikation vor der „eigentlichen“ DGGE PCR, dessen Amplifikate auf dem denaturierenden Gel aufgetragen wurden. Bei der Voramplifikation handelte es sich um eine semi-nested PCR, da die BV Primer die gleichen für Voramplifikation und „eigentliche“ DGGE PCR sind und nur anstelle des MBC-GC Primers der MBC4 Primer verwendet wurde. Die Zugabe der Dye-Lösung erhöht die Effizienz der PCR und ermöglicht das direkte Auftragen des PCR-Produkts in ein Agarosegel.

Zu 24 μl Mastermix wurde auf Eis jeweils 1 μl cDNA bzw. Voramplifikat und anschließend 5 μl Hot Start Mix (4,6 μl H_2O ; 0,15 μl dNTP [jede Base 10 mM] und 0,25 μl AmpliTaq DNA Polymerase [5U/ μl ; Applied Biosystems]) pipettiert. Die Proben wurden nachfolgend direkt vom Eis in die PCR-Maschine (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) bei 94°C gestellt. Das thermale Profil gestaltete sich folgendermaßen:

94°C	60''	
60°C	30''	ein Zyklus
72°C	40''	
<hr/>		
94°C	30''	
60°C	30''	33-43 Zyklen
72°C	40''	
<hr/>		
4°C	∞''	hold

Für die Voramplifikation wurden insgesamt 20-25 Zyklen amplifiziert, für die „eigentliche“ DGGE-PCR 35-43 Zyklen.

Nach der PCR wurden die Produkte im Agarosegel kontrolliert, ob sie nicht unter- oder überamplifiziert waren, d.h. ob sie sich im Gel als einzelne Bande darstellten. War dies der Fall, wurden jeweils 10 μl des Produkts auf ein DGGE-Gel aufgetragen (siehe 2.1.6). Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter dem UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

2.2.4.3.2 Humane Analyse

Prinzipiell ist der Verlauf der murinen und der humanen TCR Repertoire Analyse gleich. Deswegen werden hier nur die Unterschiede dargestellt. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

- 13 μl H₂O
- 1 μl Primer BV (10 pmol/ μl)
- 1 μl Primer BC4 (für Voramplifikation) bzw. BC-GC (für DGGE PCR)
(10 pmol/ μl)
- 6 μl 5 x Dye
- 3 μl 10 x PCR Puffer

Die Primer sind in den Tabellen 2 und 3 ersichtlich. Bei den humanen Analysen handelte es sich bei der Voramplifikation z.T. um eine nested PCR, da BC4 anstelle HBC-GC und teilweise andere BV-Primer (nur die unterschiedlichen Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet) verwendet wurden. Für die humanen Familien BV5, 6 und 12 wurden beide Primer im gleichen Mastermix eingesetzt, für BV13A und BV13B wurden dagegen zwei Mastermixe angesetzt (bei der Voramplifikation jedoch auch beide in einem Mix).

Das thermale Profil gestaltete sich folgendermaßen:

94°C	60''	ein Zyklus
65°C	30''	
72°C	40''	
94°C	30''	10 Zyklen touchdown
65°C (-0,5°C/Zyklus)	30''	
72°C	40''	
94°C	30''	24-32 Zyklen
60°C	30''	
72°C	40''	
4°C	∞ ''	hold

2.2.4.4 Vergleichende TCR Repertoire Analyse

Der Nachweis identischer Klone in unterschiedlichen Proben erfolgte durch die komparative klonotypische Kartierung und der anschließenden Sequenzierung von Amplikons mit identischer Schmelztemperatur. Dazu wurden jeweils 10 µl der DGGE-PCR-Produkte der gleichen Familie nebeneinander auf ein DGGE-Gel aufgetragen. Banden, die nach der Elektrophorese auf der gleichen Höhe liegen, deuten auf Produkte identischer T-Zellklone hin. Zur Überprüfung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA durch Inkubation in 50 µl H₂O eluiert, gegebenenfalls erneut amplifiziert und analog der Herstellerprotokolle mittels des Qiaquick *purification* Kit konzentriert und unter Verwendung des Seqdirect PCR *cleaning* Kits aufgereinigt. Die Sequenzierung der Produkte erfolgte durch die Firma Seqlab (Göttingen).

2.2.4.5 Quantitative TCR Repertoire Analyse

Während die vorhergehenden Methoden nur eine qualitative Aussage über die Präsenz von klonal expandierte T-Zellen erlaubt, ermöglicht der semiquantitative Ansatz zusätzlich eine Abschätzung des Ausmaßes dieser Expansion. Für diese Analyse wurden die jeweiligen Proben zuerst mit den BC-Primern (Beta konstant *down/up*; gleicher Ansatz wie für DGGE-PCR) bei unterschiedlichen Zyklenzahlen amplifiziert und anschließend im kleinen Agarosegel aufgetragen. Mit Hilfe des Ergebnisses wurde dann die Zyklenzahl bestimmt, bei der die PCR sich noch im exponentiellen Bereich befindet. Im Weiteren wurde mit dieser Zyklenzahl gearbeitet. Die Mastermixe entsprachen denen von Punkt 2.2.4.3.1, jedoch wurde der MBC-Primer (Tabelle 1) verwendet, der mit Hilfe des 5' DNA *Terminus Labeling* System (Invitrogen; *Forward Reaction* Protokoll) und [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP radioaktiv markiert worden war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 2 h bei 80°C Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde dann mit Hilfe eines InstantImager (Packard)

ausgewertet, welcher freundlicherweise vom Institut für Toxikologie zur Verfügung gestellt wurde.

2.2.4.6 Real time PCR für CCL18 und CXCL12

Die relative Expression der Chemokine CCL18 (Pubmed Accession # NT_010799) und CXCL12 (*stromal cell-derived factor-1* [SDF-1]; Pubmed Accession # AL137026) wurde mittels *real time* PCR und der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode bestimmt. Die Primer und die *Probes* wurden mit Hilfe der Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems) entworfen (Tabelle 6). Primer und *Probe* wurden von der Firma Applied Biosystems synthetisiert. Als endogene Kontrolle diente das *housekeeping* Gen GAPDH (Fertigmix; Applied Biosystem). Die Effizienzen der PCRs betragen 92% für CCL18, 90,25% für CXCL12 und 95,3% für GAPDH.

Tabelle 6. Primer für *real time* PCR für CCL18 und CXCL12

	CCL18	CXCL12
<i>Forward primer</i>	CCTCCTGGCAGATTCCACAA	CCAGAGCCAACGTCAAGCAT
<i>Reverse primer</i>	TGATGTATTTCTGGACCCACTTCTT	TGCACACTTGTCTGTTGTTGTTCTT
<i>Probe</i> (5' FAM; 3' TAMRA markiert)	CCAAGCCAGGTGTCATCCTCCTAACCA	TGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCT

Die Ansätze pro Reaktion für CCL18 und CXCL12 waren:

- 10,0 µl 2 x Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems)
- 1,2 µl 5µM Forward Primer (Endkonzentration: 300 nM)
- 1,2 µl 5µM Reverse Primer (Endkonzentration: 300 nM)
- 0,4 µl Probe (Endkonzentration: 100 nM)
- 6,2 µl H₂O
- 1,0 µl cDNA

Für GAPDH:

10,0 µl 2 x Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems)

2,0 µl 10 x GAPDH Mix (enthält die Primer und die Probe)

7,0 µl H₂O

1,0 µl cDNA

Der Mastermix enthält folgende Komponenten: AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, AmpErase® uracil-N-glycosylase, welche durch das Entfernen von eingebauten Uracil aus doppelsträngigen Nukleinsäuren *cross-over*-Kontamination verhindern kann, dNTPs mit dUTP, eine passive Referenz und optimierten Puffer. Die Amplifikationen erfolgten im GeneAmp SDS 5700 (Applied Biosystems) mit dem Standardprogramm:

50°C	2'	<i>hold</i>
95°C	10'	<i>hold</i>
<hr/>		
95°C	15''	
60°C	60''	43 Zyklen

Die 2-minütige Inkubation bei 50°C dient der AmpErase-Reaktion, die 10 min bei 95°C dienen einerseits der Deaktivierung dieses Enzyms und andererseits der Aktivierung der Polymerase. Die Reaktionen wurden in Triplets durchgeführt. Die Menge an Chemokin, normalisiert zu GAPDH und relativ zu normaler Haut, wurde mit $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet mit $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ Chemokin, Probe}} - C_{T \text{ GAPDH, Probe}}) - (C_{T \text{ Chemokin, Haut}} - C_{T \text{ GAPDH, Haut}})$. Dabei ist C_T als der Zyklus definiert, bei dem der Schwellenwert an Fluoreszenz überschritten wird.

2.2.5 Funktionelle Analysen

2.2.5.1 Zytotoxizitäts-Assay

Um die Lyse von Zielzellen durch cytotoxische T-Lymphozyten nachzuweisen, wurde der ⁵¹Chrom Release-Assay eingesetzt. Dabei werden zu radioaktiv markierten Zielzellen die Effektorzellen dazugegeben. Die von den Zielzellen freigesetzte Radioaktivität ist

schließlich ein Maß für die Effektivität der Effektorzellen. Zuerst wurden dafür die jeweiligen Zielzellen mit $^{51}\text{Chrom}$ markiert, indem 1×10^6 Zellen in ein 50 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt, mit serumfreien Medium (RPMI 1640) gewaschen, für 5 min bei 187 g zentrifugiert und das Zellpellet mit 100 μl serumfreien Medium, welches 50 μCi $^{51}\text{Chrom}$ enthielt, aufgenommen wurden. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen 2-mal mit serumfreien Medium gewaschen und schließlich in 25 ml Medium aufgenommen (Konzentration: 4000 Zellen/100 μl).

Im Folgenden wurden entsprechende Mengen an Milzzellen bzw. TIL in 96 *well* V-Boden Mikroplatten (Nunc) in 50 μl Medium vorgelegt, so dass nach Zugabe von 4000 Zielzellen Verhältnisse von 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 von Zielzellen zu Effektorzellen vorlagen. Zusätzlich wurden jeweils 8 *wells* zur Bestimmung der spontanen und maximalen Freisetzung des Chroms vorbereitet, in denen statt der Effektorzellen 50 μl Medium bzw. 50 μl des Detergens Triton-X zugegeben wurden. Nach 4 Stunden wurden aus jedem *well* 80 μl vom Überstand abgenommen, in ein *Counter*-Röhrchen gegeben und die jeweils darin enthaltene Radioaktivität in einem γ -*Counter* gemessen. Die prozentuale, spezifische Zytotoxizität errechnet sich aus: $[E-S/(M-S)] \times 100$ mit E = durchschnittliche experimentelle Freisetzung, S = durchschnittliche spontane Freisetzung und M = durchschnittliche maximale Freisetzung. Diese Experimente wurden im Institut für Virologie und Immunologie (Dr. Fred Lühder) durchgeführt.

2.2.5.2 ELISPOT

Im ELISPOT *Assay* wird die Fähigkeit von T-Zellen gemessen, auf ein bestimmtes Antigen mit der Ausschüttung von Interferon (IFN)- γ zu reagieren. Dazu wurden zuerst 96 *well*-Filterplatten (MultiScreen-IP; Millipore) mit einem murinen Anti-IFN γ -Antikörper (Becton Dickinson; mit PBS auf 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt) beschichtet [75 $\mu\text{l}/\text{well}$] und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit 6 x 200 μl PBS

gewaschen und mit 200 μ l CM für 2 Stunden bei 37°C inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden Zellen verdünnt, so dass die gewünschten Zellzahlen in 100 μ l Medium vorlagen. Als Antigenpräsentierenden Zellen für murine Assays dienten RMA-S-Zellen, welche durch Inkubation mit 0,5 μ l Peptid (TRP2₁₈₁₋₁₈₈; 2 mM) pro 5×10^4 Zellen für 45 min bei RT beladen wurden. RMA-S-Zellen sind eine TAP-defiziente T-Zell-Lymphomazelllinie, die aus der C57BL/6J-Maus erzeugt worden ist und H2-K^b exprimiert. Nach Abkippen des *Blocking*-Mediums wurden 100 μ l der jeweiligen Zellkonzentrationen zusammen mit 100 μ l beladenen oder unbeladenen RMA-S-Zellen (5×10^4) in jedes *well* pipettiert. Die Platten wurden über Nacht in den Brutschrank gestellt und danach wurde jedes *well* 6-mal mit 200 μ l Wasch-Puffer (PBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit jeweils 75 μ l des zweiten Antikörpers, einen biotinylierten anti-Maus IFN- γ -Antikörper (Becton Dickinson), bei RT. Dieser wurde zuvor mit Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA und 0,02% NaN₃) auf 0,75 μ g/ml verdünnt. Nach erneutem Waschen mit Wasch-Puffer (6 x 200 μ l) wurden 75 μ l Streptavidin (Calbiochem; 1:1000 mit Verdünnungspuffer verdünnt) zu jedem *well* zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte 6-mal mit 200 μ l Wasch-Puffer und einmal mit 200 μ l Substrat-Puffer (0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 M Tris-HCL [pH 9,5]) gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte nach Zugabe von 75 μ l frisch angesetztem Substrat (10 ml Substrat-Puffer + 44 ml NBT [Nitroblautetrazoliumchlorid; Invitrogen] + 33 μ l BCIP [Bromchlorindolylphosphat; Invitrogen]) bei RT für 2-20 min. Die Farbreaktion wurde mit Wasser abgestoppt.

3 Ergebnisse

3.1 Das murine Zytokin-Fusionsprotein Modell

3.1.1 Funktionalitätsüberprüfung

3.1.1.1 Antitumorale Antworten

Wie bereits unter Punkt 1.6 beschrieben, basiert das eingesetzte murine Tumormodell auf dem C57BL/6J Mausstamm, der B78-D14 Melanomzelllinie und dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein. Als Antigen für die zu initiiierende Immunantwort und als Ziel für das Fusionsprotein dienten experimentelle Metastasen, welche durch Injektion von B78-D14 Melanomzellen induziert wurden. Durch i.v. Injektion in die Schwanzvene konnten Lungenmetastasen, durch s.c. Injektion subkutane Tumore induziert werden, wobei jeweils $2,5 \times 10^6$ B78-D14 Zellen injiziert wurde. Die i.v. Injektion führte nach 7 Tagen zu Mikrometastasen die über die ganze Lunge verteilt waren; nach 28 Tagen war die Oberfläche der Lunge mit makroskopisch sichtbaren Metastasen übersät. Die subkutanen Tumoren hatten nach 14 Tagen ein Volumen von ca. 40 μ l.

Sowohl in einem syngenem (Becker et al. 1996a), als auch in einem xenogenem Tumormodell (Reisfeld et al. 1996) wurde die therapeutische Wirkung von Antikörper-IL2- bzw. -LT α -Fusionsproteinen beobachtet. Daher sollte die therapeutische Effizienz des ch14.18-LT α -Fusionsproteins die Funktionalität des angewandten Modells belegen und gegebenenfalls auch die optimale Dosis an Fusionsprotein aufzeigen. Zu diesem Zweck wurden Mäusen drei Tage nach der Induktion von Lungenmetastasen unterschiedliche Mengen an ch14.18-LT α -Fusionsprotein i.p. injiziert, wobei die Behandlungsdauer 5 Tage betrug. Bereits bei der Gruppe, die mit 16 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelt wurde, konnte eine Reduktion in der Anzahl der Tumorfoci auf den Lungenoberflächen beobachtet werden. Bei 32 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein waren 7 der 8 Mäuse 35 Tage

nach Tumorinduktion tumorfrei. Dieser therapeutische Effekt spiegelte sich auch im durchschnittlichen Gewicht der Lungen wider (Tabelle 7, Abb. 13C und D). Dieses Ergebnis konnte selbst durch eine Steigerung auf 64 μg nicht verbessert werden. Als Kontrollen dienten rekombinantes sLT α , der Antikörper ch14.18 und das ch225-LT α -Fusionsprotein, dessen Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet ist. In all diesen Kontrollgruppen konnte kein Antitumoreffekt nachgewiesen werden (Tabelle 7; Abb. 13 A und B). In den darauf folgenden Experimenten wurde die Kontrollgruppe mit 10 ng sLT α behandelt. Da die Fähigkeit, L929 Zellen - eine TNF sensitive Zelllinie - zu lysieren mehr als 1000fach höher für sLT α als für das Fusionsprotein war, besaßen 10 ng sLT α somit eine höhere lytische Aktivität als die eingesetzten Mengen an Fusionsprotein.

Ein weiterer Beleg für die Funktionalität des etablierten Modells stellt das verlängerte Überleben von ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäusen im Vergleich zu den Mäusen, die mit sLT α behandelt wurden, dar. Jeweils 6 Mäuse einer Gruppe erhielten 3 Tage nach Induktion von Lungenmetastasen für 5 Tage 10 ng sLT α bzw. 32 μg ch14.18-LT α -Fusionsprotein i.p. injiziert. In der Kontrollgruppe lebte an Tag 62 keine Maus mehr, wohingegen in der mit 32 μg ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Gruppe alle Mäuse lebten und insgesamt über die Dauer des Experiments nur eine Maus starb, und zwar an Tag 85 (Abb. 11).

Tabelle 7. Effekt von ch14.18-LT α -Fusionsprotein auf Lungenmetastasen

Behandlung und Dosis ^a	Zahl der Foci ^b	Gewicht der Lungen [g]
10 ng sLT α	79, 101, >200, >200, >200, >200, >200, >200	0,60 \pm 0,13
32 μ g ch14.18	86, 134, 142, >200, >200, >200, >200, >200	0,54 \pm 0,11
32 μ g ch225-LT α	49, 71, 102, 148, >200, >200, >200, >200	0,48 \pm 0,14
16 μ g ch14.18-LT α	0, 74, 89, >200, >200, >200, >200, >200	0,42 \pm 0,11
32 μ g ch14.18-LT α	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 8	0,22 \pm 0,04
64 μ g ch14.18-LT α	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 43	0,29 \pm 0,08

^a Die Behandlung wurde am Tag 3 nach der Tumorinduktion initiiert und mit der angegebenen täglichen Dosis und Substanz 5 Tage fortgeführt

^b Jede Gruppe setzte sich aus 8 Mäusen zusammen. 35 Tage nach der Tumorinduktion wurden die Mäuse getötet und die Zahl der Foci auf den Lungen bestimmt

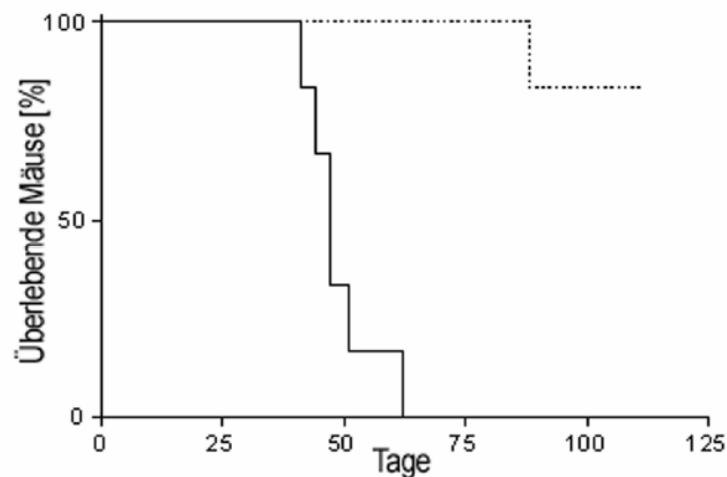


Abbildung 11. Überlebenskurve für Mäuse mit Lungenmetastasen. Jede Gruppe bestand aus 6 Mäusen, die von Tag 3 bis einschließlich Tag 7 entweder mit 10 ng sLT α (durchgezogen schwarz) oder 32 μ g ch14.18-LT α Fusionsprotein (gestrichelt grau) behandelt wurden. Das Experiment wurde am Tag 112 beendet und die Überlebensrate als Kaplan-Meier Kurve dargestellt.

Der therapeutische Effekt des ch14.18-LT α -Fusionsproteins war jedoch nicht nur auf Lungenmetastasen beschränkt, sondern auch bei subkutanen Tumoren zu beobachten. Drei Gruppen, bestehend aus jeweils 8 Mäusen, wurden 14 Tage nach der Induktion von subkutanen Tumoren 7 Tage lang mit i.v. Injektionen von 10 ng sLT α bzw. 32 μ g oder 64 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelt. Die makroskopische Betrachtung am Tag 28 zeigte, dass die Tumore der Tiere, die mit 64 μ g Fusionsprotein behandelt wurden, im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe flach und nekrotisch waren (Abbildung 12A). Diese Beobachtung wurde auch durch die kontinuierliche Bestimmung des Tumorumfanges der einzelnen Gruppen bestätigt. Während das Tumorumfang der Kontrollgruppe stetig anstieg, führte die Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein zuerst zu einem verlangsamten Anstieg und schließlich sogar zu einer Reduktion des Tumorumfanges. Ab Tag 28 stieg das Tumorumfang dieser Gruppen wieder an (Abbildung 12B); dies war jedoch Rezidiven einzelner Individuen zuzuschreiben. So blieben 5 der Mäuse, die 64 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein pro Tag erhalten hatten, bis zum Ende des Experiments tumorfrei (Abbildung 12C).

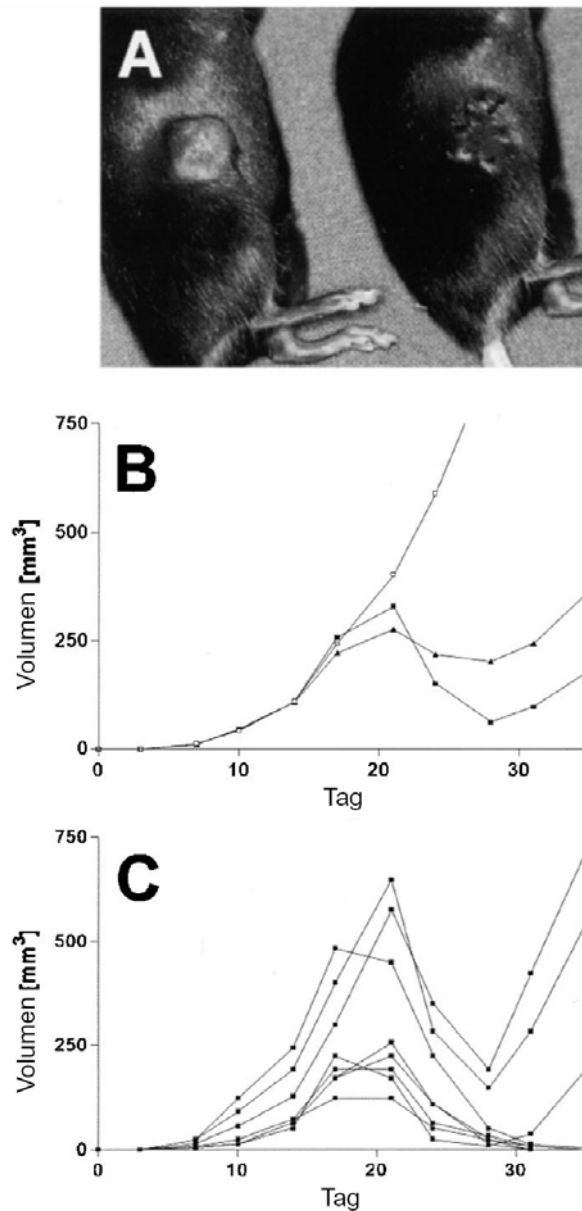


Abbildung 12. Anti-Tumor Effekt auf subkutane Metastasen. 14 Tage nach Induktion von subkutanen Tumoren erhielten C57BL/6J Mäuse 7 Tage lang 10 ng sLT α bzw. 32 oder 64 μ g ch14.18-T α Fusionsprotein. Am Tag 28 wurde die makroskopische Erscheinung einer 10 ng sLT α behandelten (links) und einer 64 μ g Fusionsprotein behandelten Maus (rechts) festgehalten (A). Das durchschnittliche Tumolvolumen (pro Gruppe 8 Mäuse) wurde für die Behandlung mit 10 ng sLT α (offene Kreise), 32 μ g (geschlossene Dreiecke) bzw. 64 μ g Fusionsprotein (geschlossene Vierecke) über die Zeit gemessen (B). Für letztere Gruppe sind zusätzlich die einzelnen Tumolvolumen dargestellt (C).

3.1.2 Morphologische und phänotypische Charakterisierung

3.1.2.1 Immunhistologische Charakterisierung des Zellinfiltrats subkutaner Tumore

Nachdem der therapeutische Effekt des Fusionsproteins die Funktionalität des Modells belegt hatte, wurden die subkutanen Tumoren immunhistologisch untersucht um zu prüfen, ob das Fusionsprotein in der Lage war, eine Veränderung der Immunreaktion hervorzurufen. Besonderes Augenmerk galt dabei der Charakterisierung der immunologisch relevanten Zellen wie T-, B- und dendritischen Zellen. In den Tumoren der Kontrollgruppe waren nur vereinzelt Vertreter der oben genannten Zelltypen zu beobachten (Abb. 13E und G). Im Gegensatz dazu zeigten die Tumore der mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäuse ein starkes inflammatorisches Infiltrat. In den Tumoren konnten sowohl CD4⁺ Zellen, welche über den ganzen Tumor verteilt waren, als auch CD8⁺ Zellen, welche bevorzugt in der Tumorperipherie lokalisiert waren (Abb. 13F und H), nachgewiesen werden. Die immunhistologische Detektion der B-Zellen mittels eines anti-CD45R/B220-Antikörpers zeigte am Tag 21, d.h. nach Abschluss der Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein, kleinere Zellaggregate (Abb. 13I und J). Am Tag 28 hatten sich in den meisten der analysierten Proben B-Zellen in einer Weise am Tumor angrenzend angereichert, wie sie für Lymphknoten charakteristisch ist (Abb. 13K-M). Zusätzlich konnte durch Doppelfärbungen eine Anreicherung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen neben diesen B-Zellaggregaten beobachtet werden (Abb. 13I-L). Um zu überprüfen, ob die zelluläre Zusammensetzung am Tumor der von lymphoiden Gewebe entspricht, wurden die Tumore mit einem Antikörper gegen MHC Klasse II-Moleküle gefärbt, mit dem die Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen überprüft werden sollte. Es zeigte sich, dass MHC Klasse II⁺ Zellen über den ganzen Tumor verteilt vorkamen und die meisten eine dendritische Morphologie besaßen (Abb. 13P). Damit aber ein *priming* von T-Zellen am Tumor und somit außerhalb sekundärer lymphatischer

Gewebe erfolgen kann, müßten naïve T-Zellen im Tumor detektierbar sein, die durch die Expression von L-Selektin charakterisiert sind. Immunhistologische Färbungen mit einem anti-L-Selektin-Antikörper zeigten nun, dass L-Selektin⁺ Zellen tatsächlich über den ganzen Tumor verteilt und teilweise direkt an Endothelzellen lokalisiert waren (Abb. 13N und O).

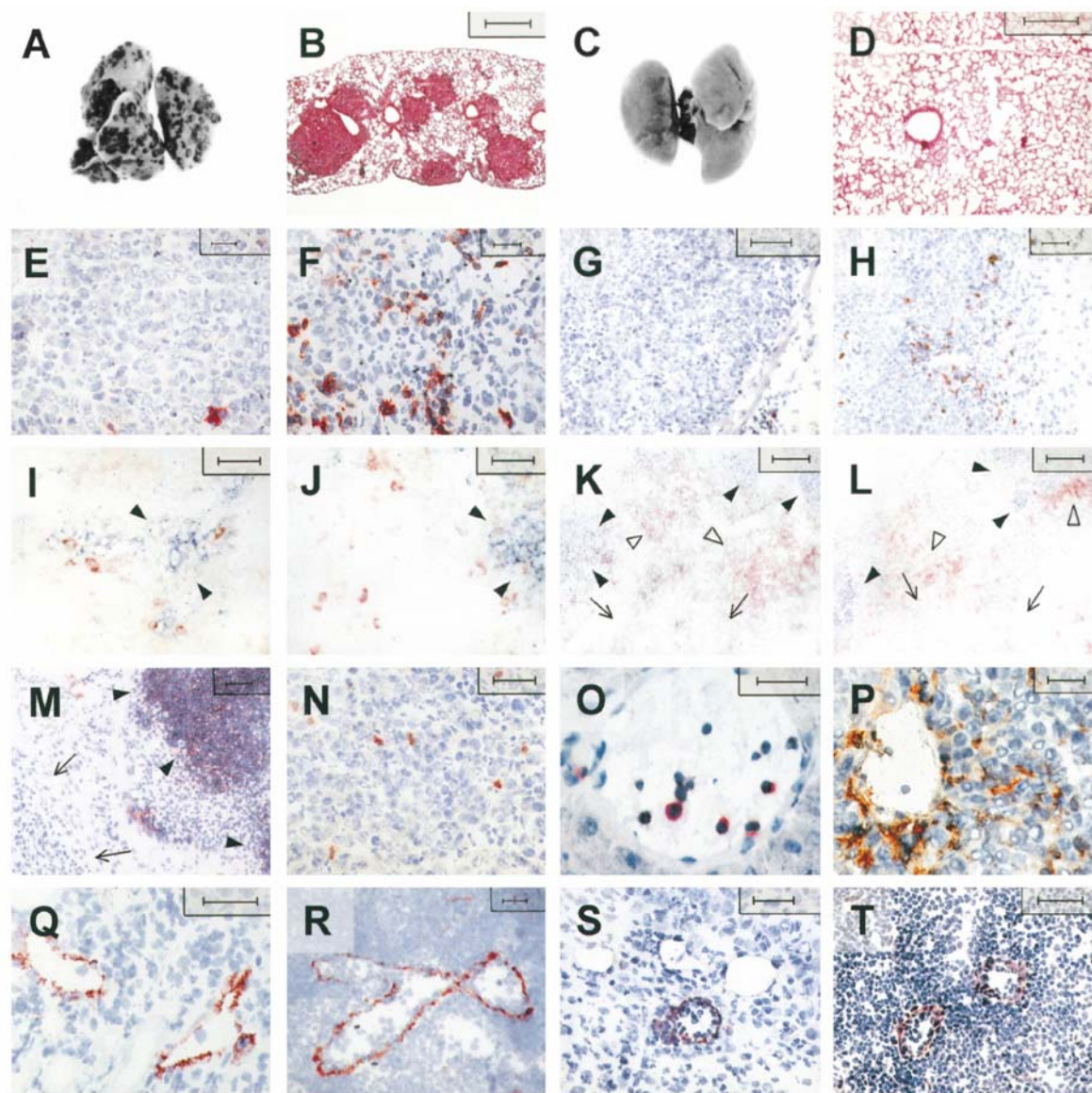


Abbildung 13. Makroskopische, histologische und immunhistologische Darstellung von Tumorzuständen. Lungenmetastasen (A-D) wurden durch i.v. und subkutane Tumore (E-Q und S) durch s.c. Injektion von $2,5 \times 10^6$ B78-D14 Zellen induziert. Lungenmetastasen wurde von Tag 3 bis 7 mit 10 ng sLT α (A und B) oder 32 μ g ch14.18-LT α Fusionprotein behandelt. Subkutane Tumore wurden von Tag 14 bis 21 mit 10 ng sLT α (E und G) oder 32 μ g ch14.18-LT α Fusionprotein behandelt (F, H, I-Q und S). Am Tag 35 wurden die Lungen entfernt, ihre makroskopische Erscheinung dokumentiert (A und C) und Kryostatenschnitte anschließend Hämatoxylin-Eosin gefärbt (B und D). Subkutane Tumore wurden 21 Tage (E-J, N-Q und S) oder 28 Tage (K-M) nach der Tumorinduktion entfernt. Zusätzlich wurden Lymphknoten von Tumorfreenen Mäusen entfernt (R und T). Kryostatenschnitte wurden mit Antikörper gegen CD4 (E und F), CD8 (G und H), CD45RB/B220 (M), CD62L (N und O), MHC Klasse II (P), PNA (Q und R) und TCA4 (S und T) gefärbt. Doppelfärbungen wurden mit Antikörper gegen CD45RB/B220 (I-L, blau) zusammen mit anti-CD4 (I und K, rot) oder anti-CD8 (J und L, rot) Antikörper durchgeführt. In (I-M) sind B-Zellaggregate durch gefüllte Pfeilspitzen, T-Zellaggregate durch offene Pfeilspitzen und der Tumor durch Pfeile angezeigt (K-M). Skalierung: 25 μ m (O), 100 μ m (G-J, M und T), 200 μ m (D, K und L), 400 μ m (B) und 50 μ m (alle anderen).

3.1.2.2 High Endothelial Venule Charakteristika

Naïve T-Zellen verlassen durch spezielle Venen, den HEV, die Blutbahn. Normalerweise sind diese nur in lymphatischen Organen zu finden. Ein Charakteristikum von HEV ist die Expression von *peripheral node addressin* (PNAd), dem Ligand für L-Selektin. Die Interaktion von T-Zelle und *high endothelial* Zelle über L-Selektin-PNAd führt zum Rollen der T-Zellen auf den HEV, einen notwendigen Schritt für die Extravasation der Zellen und ihren Eintritt in das lymphatische Organ. Da in den mit Fusionsprotein behandelten Tumoren L-Selektin⁺ Zellen nachzuweisen waren, wurden die Tumore hinsichtlich des Auftretens von HEV untersucht, indem diese mit anti-PNAd Antikörper immunhistochemisch gefärbt wurde. Dabei zeigte sich, dass ca. 30% der Blutgefäße in den Tumoren mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelte Mäuse PNAd exprimierten (Abb. 13Q). Das PNAd erstreckte sich über die gesamte Innenseite der Blutgefäße und glich damit der PNAd-Färbung von HEV in Lymphknoten (Abb. 13R). In Tumoren der Kontrollgruppe fanden sich hingegen keine PNAd⁺ Blutgefäße (Daten nicht gezeigt). Der zweite Schritt der Migration von naiven T-Lymphozyten aus dem Blut in lymphatische Organe ist eine Aktivierung der T-Zellen durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, den CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7), dessen Ligand TCA-4 (CCL21) ist. TCA-4 ist ein sezerniertes Molekül, welches wahrscheinlich durch Bindung der COOH-Terminus-Bindungsstelle an sulfierte Glycosaminoglykane, die in HEV geballt vorkommen, immobilisiert wird (Stein et al. 2000). Immunhistologische Färbungen mit einem anti-TCA4 Antikörper zeigten ähnliche Färbemuster für Blutgefäße in Tumoren von ch14.18-LT α behandelten Mäusen und HEV in Lymphknoten, wobei teilweise die Intensität der Färbung in den behandelten Tumoren geringer war als in den Lymphknoten (Abb. 13S und T). Dagegen war TCA-4 in den Tumoren der Kontrollgruppe nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Akkumulation von ch14.18-LT α -Fusionsprotein im Tumormikroenvironment scheint somit HEV ähnliche Strukturen zu induzieren, welches die wesentliche Grundlage für die *de novo* Entwicklung lymphatischen Gewebes darstellt. Um das Vorhandensein von HEV nach ch14.18-LT α Therapie zu verifizieren, wurden die Tumore elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Endothelzellen der Tumore der Kontrollgruppe ein flaches Erscheinungsbild besaßen (Abb. 14A) während sich in den Tumoren der mit ch14.18-LT α behandelten Mäuse kubisch geformte Endothelzellen fanden (Abb. 14B), wie sie für HEV charakteristisch sind (Girard and Springer 1995). Höhere Vergrößerungen zeigten weiter Lymphozyten auf, die durch die Endothelwand transmigrierten (Abb. 14C), wobei der Kontakt zwischen den Lymphozyten und den Endothelzellen durch Mikrovilli hergestellt wurde (Abb. 14D). Diese Charakteristika werden für HEV gefordert (Shah et al. 2002).

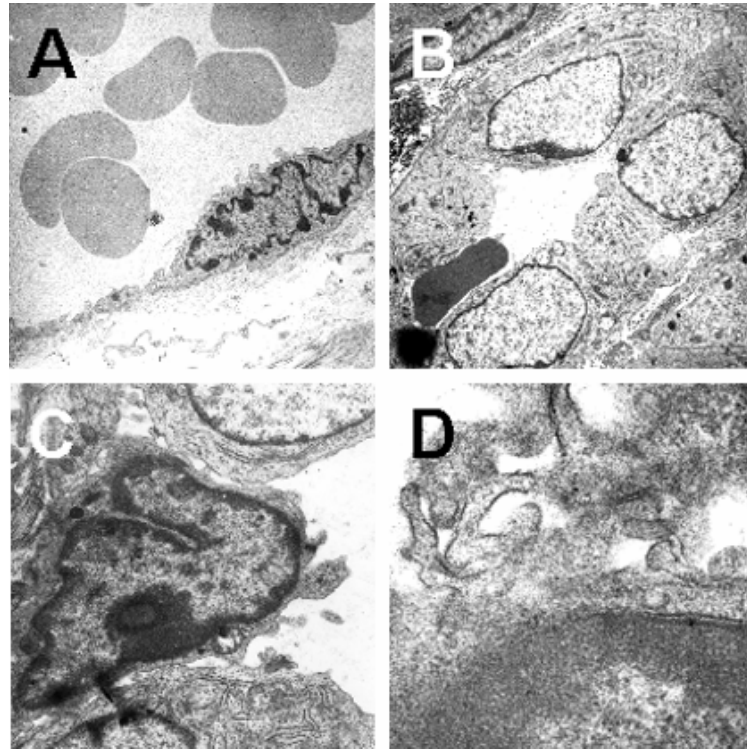


Abbildung 14. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Blutgefäße. 14 Tage nach der Induktion von subkutanen Metastasen wurden die Mäuse 7 Tage entweder mit 10 ng sLT α (A) oder 64 μ g ch14.18-LT α behandelt (B-D). Am Tag 28 wurden die Tumore exzidiert. Vergrößerungen: x3000 (A und B), x12000 (C) und x24000 (D).

3.1.3 T-Zellcharakterisierung

3.1.3.1 Überexpression von TCR BV-Familien unter ch14.18-LT α -Fusionsprotein-therapie

Mit dem Vorkommen von HEV, naiven T-Zellen, APCs und Antigen in den Tumoren der mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäuse sind alle Voraussetzungen für das *priming* von T-Zellen gegeben. Falls ein solches *priming* tatsächlich *in loco* stattfinden würde, sollte die Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein zu Änderungen im Gebrauch des T-Zellrepertoires der TIL führen. Daher wurde die relative Expression jeder BV-Familie in den TIL vor und nach Therapie bestimmt. Die semiquantitative Analyse erfolgte mit spezifischen Primern für jede der 18 murinen TCR BV-Familien. Den Mäusen wurden jeweils drei s.c. Tumore induziert und sie erhielten von Tag 8 bis 14 täglich

entweder 10 ng sLT α oder 64 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein. An Tag 7, 14 und 21 wurde jeweils ein Tumor entfernt und an Tag 21 zusätzlich der drainierende Lymphknoten. In Abbildung 15B ist beispielhaft das TCR-Repertoire der TIL einer mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Maus dargestellt. Während in diesen Mäusen im Verlauf eine zunehmende Bevorzugung einiger weniger TCR BV-Familien gefunden wurde, in diesem Fall BV 3, 5, 8 und 11, ergab die Analyse des drainierenden Lymphknotens keine signifikante Überexpression irgendeiner BV-Familie. Ebenso waren in den Kontrollmäusen an Tag 21 keine BV-Familien überexprimiert (Abb. 15A). Um zu untersuchen, ob den beobachteten quantitativen Veränderungen eine klonale Expansion einzelner T-Zellen zugrunde liegt, wurden die überexprimierten Familien mittels klonotypischer Kartierung untersucht. Diese Analyse deckte in der Tat klonale Expansionen von T-Zellen in den überexprimierten Familien auf. Somit scheint die Überexpression dieser Familien durch eine klonale Expansion von einzelnen T-Zellen hervorgerufen zu sein (Abb. 15B eingefügtes Bild).

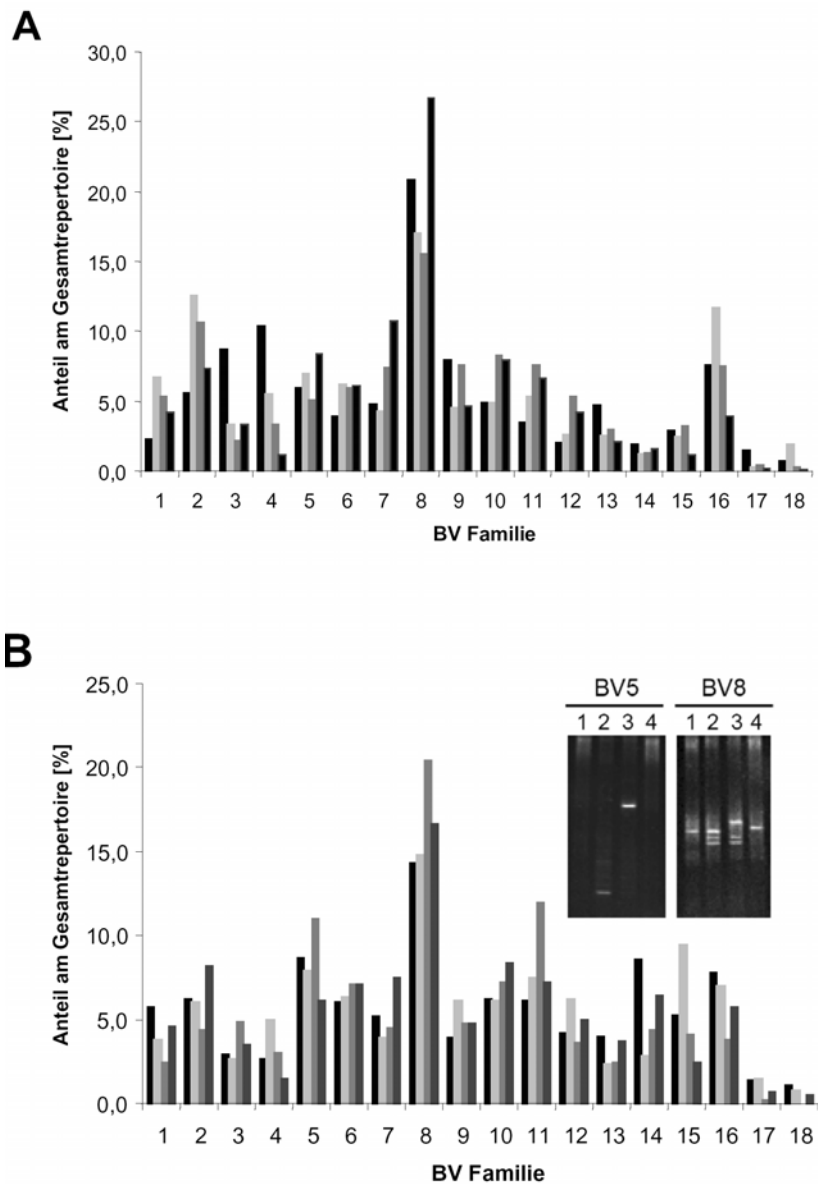


Abbildung 15. Relative Expression der TCR BV-Familien 1-18 im Tumorgewebe. Den Mäusen wurden durch s.c. Injektion von jeweils $2,5 \times 10^6$ B78-D14 Melanomzellen 3 subkutane Tumore induziert. Von Tag 8 bis Tag 14 wurden sie entweder mit 10 ng sLT α (A) oder mit 64 μ g ch14.18-LT α (B) behandelt. Am Tag 7 (schwarz) und 14 (hellgrau) wurde jeweils ein Tumor entfernt und am Tag 21 der letzte Tumor (grau) und zusätzlich der dränierende Lymphknoten (dunkelgrau). Die Expression jeder BV-Familie wurde als prozentualer Anteil am Gesamtrepertoire bestimmt. Das im Diagramm eingefügte Bild zeigt den klonalen Ursprung der überexprimierten Familien BV 5 und BV 8 des Tumors am Tag 21 auf.

3.1.3.2 Diversifikation des TCR Repertoires im Verlauf der ch14.18-LT α -Fusionsprotein-Behandlung

Da klonale Expansionen von T-Zellen nicht auf überexprimierten TCR BV-Familien beschränkt sind (thor Straten et al. 1999), wurden die BV-Familien 1-16 innerhalb eines Tumors über den Verlauf der Behandlung mit sLT α bzw. ch14.18-LT α -Fusionsprotein hinsichtlich ihrer klonalen Zusammensetzung analysiert. Die Familien BV 17 und 18 wurden nicht berücksichtigt, da diese jeweils weniger als 1% des Gesamtrepertoires ausmachen; aufgrund der hohen Sensitivität der angewandten Methode bestünde damit die Gefahr, dass einzelne Zellen innerhalb dieser Familien als T-Zellklone misinterpretiert würden. Die 7-tägige Verabreichung von 10 ng sLT α bzw. 64 μ g ch14.18-LT α -Fusionsprotein wurde 8 Tage nach der s.c. Injektion der B78-D14 Melanomzellen begonnen. Biopsien jeweils desselben Tumors wurden an Tag 7, 14 und 21 entnommen. An Tag 21 wurden den Mäusen zusätzlich die inguinalen Lymphknoten entfernt. Diese Proben wurden jeweils klonotypisch kartiert. Dabei zeigte sich, dass die TIL unabhängig von der Art der Behandlung einen oligoklonalen Gebrauch des TCR-Repertoires zeigten (Abb 16C und D), während in den Lymphknoten ein polyklonales TCR-Repertoire vorlag (Abb. 16A und B). Die Zahl der T-Zellklone in den Biopsien variierte in den einzelnen TCR BV-Familien. So waren in manchen Familien nur 1 oder 2 Klone detektierbar, z.B. BV 5 und 6, in anderen dagegen bis zu 7, wie z.B. für BV 8 (Abb. 16D). Die vergleichende klonotypische Kartierung der im Verlauf entnommenen Biopsien aus dem Tumor zeigte die Dynamik der T-Zellantwort auf. Wie Abbildung 17 darstellt, konnten nicht nur die Persistenz und das Erscheinen neuer Klone beobachtet werden, sondern auch das Verschwinden einzelner Klone während der Therapie. Abbildung 18 verdeutlicht diese Dynamik; es wird das Verhältnis der Anzahl an Klonen an Tag 14 und 21 zu Tag 7 für die BV-Familien 1-16 dargestellt. Die klonotypische Kartierung der mit ch14.18-LT α -

Fusionsprotein behandelten Mäusen zeigte in den meisten Familien eine Zunahme der T-Zellklone auf, wobei der relative Anstieg zwischen 1,2 und 7 variierte (Abb. 18B). Konsequenterweise nahm die Gesamtzahl der T-Zellklone im Verlauf der Behandlung; im gezeigten Beispiel das 1,17fache am Tag 14 und 2,25fache am Tag 21 im Vergleich zu Tag 7 (Daten nicht gezeigt). In den Mäusen, die mit sLT α behandelt wurden, ergab sich zwar auch ein diverses Bild der TCR Repertoire Nutzung der TIL (Abb. 18A), doch resultierte daraus keine Zunahme der Gesamtzahl der T-Zellklone.

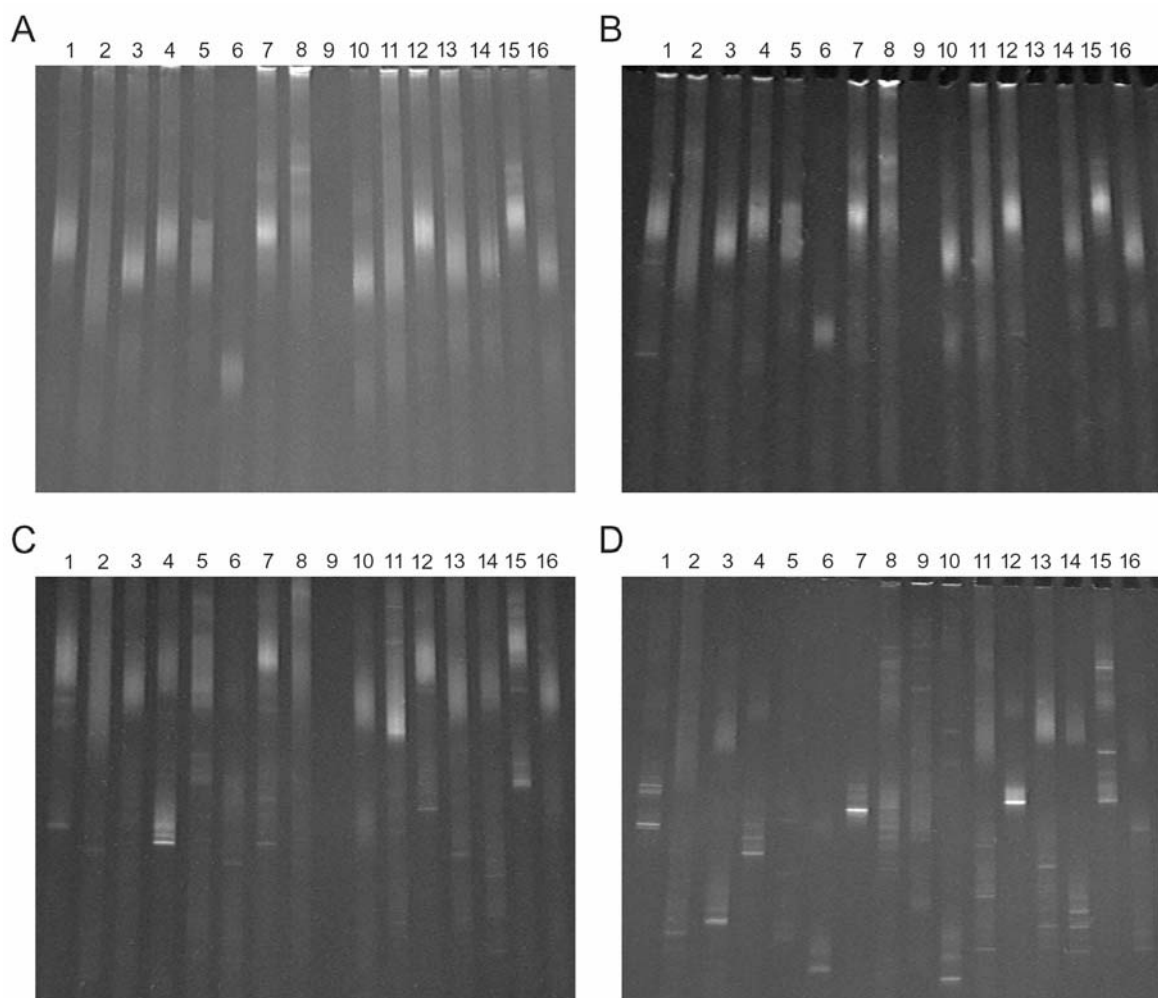


Abbildung 16. Klonotypische Karten. Von Tag 8 bis Tag 14 nach der Induktion von subkutanen Tumoren in der rechten Flanke wurden die Mäuse mit 10 ng sLT α (A-C) oder 64 μ g ch14.18-LT α (D) behandelt. Am Tag 21 wurden die inguinalen Lymphknoten (A und B) und Tumorpiopsien entnommen. Von den Proben wurden klonotypische Kartierungen mittels RT-PCR/DGGE durchgeführt.

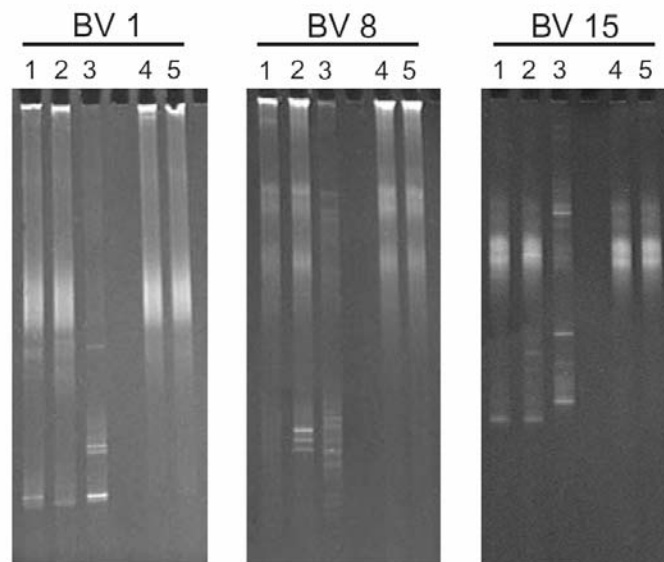


Abbildung 17. Vergleichende klonotypische Kartierung. Von Tag 8 bis Tag 14 nach der Induktion von subkutanen Tumoren in der rechten Flanke wurden die Mäuse mit $64 \mu\text{g}$ ch14.18-LT α behandelt. Am Tag 7 (1), 14 (2) und 21 (3) wurden Tumorbiopsien und am Tag 21 zusätzlich die inguinalen Lymphknoten (4 [links]; A und 5 [rechts]) entnommen. Bei der vergleichenden klonotypischen Kartierung wurden die einzelnen Familien aller Proben derselben Maus verglichen, wie für BV 1, 8 und 15 dargestellt.

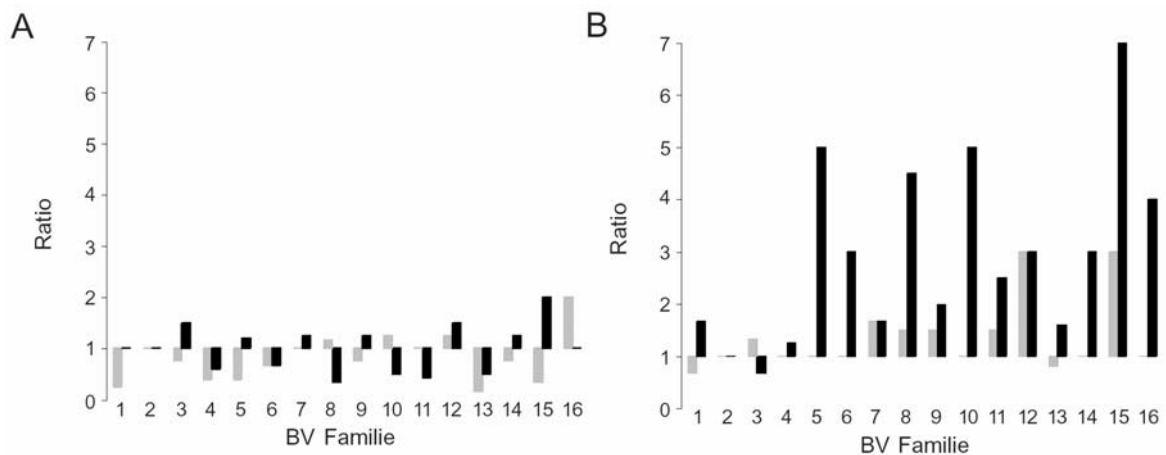


Abbildung 18. Dynamik der T-Zellklone der TIL. Mäuse mit subkutanen Tumoren wurden ab Tag 8 für 7 Tage entweder mit 10 ng sLT α (A) oder mit $64 \mu\text{g}$ ch14.18-LT α (B) behandelt. Am Tag 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Biopsie des Tumors entnommen und die Anzahl der T-Zellklone mittels klonotypischer Kartierung bestimmt. Anschließend wurde die relative Veränderung von Tag 14 (grau) bzw. Tag 21 (schwarz) der einzelnen BV-Familien zu Tag 7 errechnet.

3.1.3.3 Tumorspezifität der TIL

Die Interpretation der Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen und der klonotypischen Kartierungen deuten auf eine Zunahme eines oligoklonalen T-Zellinfiltrats durch die Therapie mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein hin. Sofern dieser Effekt in der Tat auf ein lokales *priming* zurückzuführen ist, sollten diese T-Zellen gegen Antigene des Tumors gerichtet sein. Um dies zu überprüfen wurden PBL und TIL hinsichtlich ihrer Fähigkeit, B78-D14 Zellen zu lysieren, untersucht. PBL und TIL von Mäusen, die mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelt wurden, lysierten die Zielzellen wesentlich effizienter als PBL und TIL von sLT α -behandelten Mäusen (Abb. 19A und B). Dieser Effekt war MHC Klasse I-abhängig, da durch Zugabe von gegen H2-K^b/H2-D^b gerichteten Antikörpern diese Lyse inhibiert wurde.

Einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der durch die gerichtete LT α Therapie induzierte T-Zellantwort ergab sich aus der ELISPOT Analyse. In diesem Test wird die Fähigkeit von T-Zellen, auf ein bestimmtes Antigen mit der Ausschüttung von Zytokinen, in der Regel von Interferon- γ , zu reagieren, gemessen. Als Antigen diente ein Peptid des *Tyrosinase related protein 2* (TRP2) und zwar das Epitop₁₈₁₋₁₈₈. Der ELISPOT zeigte, dass sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Mäusen, die Fusionsprotein erhalten hatten, eine Reaktivität der PBL und TIL gegenüber TRP2₁₈₁₋₁₈₈ vorhanden ist. Dies ist nicht verwunderlich, da bereits zuvor gezeigt wurde, dass B78-D14-Zellen eine spontane Immunantwort hervorrufen (Moerch et al. 2000). Zwischen der Kontrollgruppe und der mit Fusionsprotein behandelten Gruppe bestand jedoch ein quantitativer Unterschied. So war die Reaktivität in den ch14.18-LT α behandelten Tieren mindestens dreifach so hoch wie in der Kontrollgruppe. Für die PBL der mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäuse wurden pro 10⁵ CD8⁺ Zellen mehr als 200 TRP2₁₈₁₋₁₈₈-spezifische Zellen detektiert, aber weniger als 40 in der entsprechenden Anzahl von PBL von sLT α -behandelten Tiere (Abb.

19C). In TIL lag der Anteil an TRP2-reaktiven T-Zellen mit fast 300 Spots pro 10^4 CD8⁺ Zellen der ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäuse über eine log Stufe höher als in PBL. In der Kontrollgruppe wurden in der entsprechenden Anzahl von TIL nur ca. 90 TRP2 reaktive Zellen nachgewiesen (Abb. 19D). Die relativ hohe Hintergrundaktivität im ELISPOT der TIL lässt sich durch kontaminierende Melanomzellen bei der TIL-Gewinnung und der damit verbundenen Präsentation von T-Zell-spezifischen Peptiden erklären.

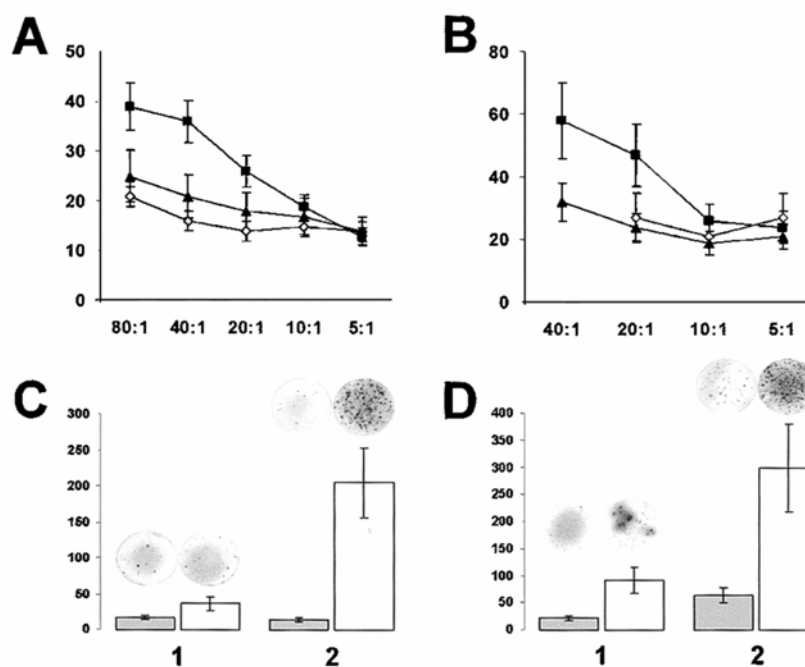


Abbildung 19. Nachweis spezifischer cytotoxischer und IFN- γ produzierender T Zellen. Der Anteil an durch PBL (A) bzw. TIL (B) lysierten B78-D14 Melanomzellen wurde im ⁵¹Chrom *release assay* bei verschiedenen Effektor-Zielzellen Verhältnissen gemessen. Die Effektorzellen stammten aus Mäusen mit subkutanen Tumoren, die entweder mit 10 ng sLT α (offene Rauten) oder 64 μ g ch14.18-LT α (geschlossene Vierecke) behandelt worden waren. Für Effektorzellen aus einer ch14.18-LT α behandelten Maus wurde der Assay auch in Anwesenheit von anti-H2K^b und anti-H2D^b Antikörpern (geschlossene Dreiecke) durchgeführt. Der ELISPOT für PBL (C) wurde mit 10^5 , für TIL (D) mit 10^4 CD8⁺ Zellen durchgeführt. Die Zellen stammten aus Tumor-tragende Mäuse die 10 ng sLT α (1) oder 64 μ g ch14.18-LT α (2) erhalten hatten. Vor Einsatz im ELISPOT Assay wurden die Zellen für 5 Tage *in vitro* stimuliert. Im ELISPOT wurde die spezifische Reaktivität der Zellen gegen TRP2₁₈₁₋₁₈₈ im Kontext von H2K^b getestet. Jeder Spot repräsentiert eine IFN- γ produzierende Zelle. Der Graph stellt die Zahl der Spots dar, wobei die grauen Säulen die durchschnittliche Zahl IFN- γ produzierender Zellen ohne Anwesenheit des TRP2₁₈₁₋₁₈₈ Epitopes (Hintergrund), die weißen Säulen bei Anwesenheit des Peptids darstellen.

3.2 Das humane Vakzinierungsmodell

Die Injektion des ch14.18-LT α -Fusionsproteins führte zu zahlreichen Veränderungen, die auf ein *priming* von Tumor-spezifischen T-Zellen direkt am Tumor hinweisen. Es wurde eine Induktion von HEV, welche die Migration von naiven T-Zellen in das Tumorgewebe ermöglichen, sowie eine verstärkte Infiltration immunkompetenter Zellen, d.h. DC, T- und B-Zellen, beobachtet. Diese Veränderungen sind auf LT α zurückzuführen, welches eine große Rolle in der Lymphknoten-neogenese spielt. Ob dieser Effekt direkt oder indirekt über APC vermittelt wird, war Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit. Da DC die wichtigsten Vertreter der APC darstellen und ihnen zusätzlich eine große Rolle bei der Induktion und dem Erhalt von HEV zugeschrieben wird, wurden diese als die zu untersuchende Population ausgewählt. Diese Untersuchungen konnten jedoch nicht in der Maus durchgeführt werden, da (i) murine DC äußerst schwierig in der Abwesenheit von FCS kultivierbar sind, FCS-kultivierte DC aber eine dominante unspezifische Immunantwort hervorrufen (Eggert et al. 2002) und (ii) für die Maus eine wesentliche Methode für die Spezifitätsuntersuchung von T-Zellen nicht vorhanden war, nämlich die *in situ*-Tetramerfärbung. Es bot sich deshalb an, Biopsien von Injektionsstellen von reifen humanen DC von Melanompatienten immunologisch zu charakterisieren. Diese Injektionsstellen sind dadurch charakterisiert, dass der größte Teil der injizierten DC dort verbleibt (Eggert et al. 1999; Lappin et al. 1999). Die Biopsien stammen von Patienten, die im Rahmen von therapeutischen Studien Peptid-beladene DC als anti-Tumor Impfung erhielten. Bei dieser Therapie werden autologe DC aus dem Blut der Patienten generiert, mit tumorspezifischen Antigenen beladen und anschließend dem Patienten injiziert. Diese Arbeiten wurden in der Hautklinik von der Arbeitsgruppe um Dr. E. Kämpgen durchgeführt, die auch den Patienten die Biopsien der Vakzinierungsstellen entnahmen und sie freundlicherweise zur immunologischen Charakterisierung zur Verfügung stellte.

3.2.1 *Funktionalitätsüberprüfung*

3.2.1.1 Klinischer Verlauf

Der klinische Verlauf des Patienten diene als Kontrolle, ob die angewandte DC basierte Impfung einen immunologischen Effekt hervorruft. An dieser Stelle soll exemplarisch anhand des klinischen Verlaufs eines Patienten auf das Vakzinierungsprotokoll eingegangen werden (Abb. 20). Nach erfolgloser Chemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) erhielt ein 61 jähriger Patient mit metastasiertem Melanom (Stadium IV) drei Zyklen DC Vakzinierungen im Rahmen einer klinischen Studie. Der Patient wurde mündlich und schriftlich über mögliche Risiken und Nutzen sowie dem experimentellen Charakter der Behandlung aufgeklärt. Der Patient erklärte sich nicht nur zur Teilnahme an der Studie bereit, sondern erlaubte auch das Blut-, Haut- und Tumorproben wissenschaftlich untersucht werden. Im ersten Zyklus wurden die DC nur mit Mage-3₁₆₈₋₁₇₅, im zweiten mit MAGE-3₁₆₈₋₁₇₅, MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, einem modifizierten gp100₂₀₉₋₂₁₇ Epitop und einem modifizierten MART-1₂₆₋₃₅ Peptidanalogs und im dritten zusätzlich noch mit Onkolysat beladen. Ab Ende des zweiten Zyklus erhielt der Patient zusätzlich IL2 in 2 wöchigen Abständen. Die Therapie führte zu einer Stabilisierung der Krankheit; der Patient war länger als 15 Monate nach Therapiebeginn noch am Leben, obwohl die durchschnittliche Lebenserwartung in diesem Stadium nur 6 Monate beträgt. Insgesamt war bei den meisten Patienten unter der DC-Vakzinierungstherapie eine Stabilisierung der Krankheit und eine verlängertes Gesamtüberleben zu beobachten (Andersen et al. 2001a; Berger et al. 2004). Diese lebensverlängernde Wirkung der DC-Vakzinierungen sowie der Nachweis erhöhter Zahlen von zirkulierenden Antigen spezifischen T-Zellen (Schaed et al. 2004) deuten darauf hin, dass die Injektion der DC in der Tat einen immunstimulatorischen Effekt bewirkt.

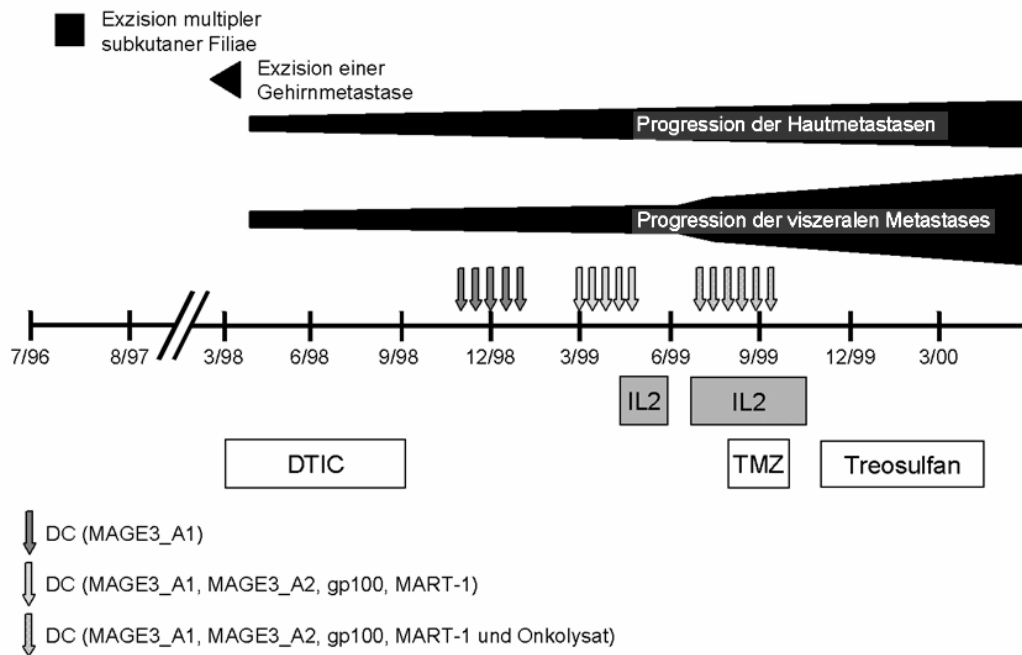


Abbildung 20. Klinischer Verlauf und Therapie von Patient #1. Der Patient erhielt nach erfolgloser Dacarbazin (DTIC) Therapie 3 Zyklen Vakzinierungen (Pfeile) mit Peptid-beladenen DC, ab dem zweiten Zyklus zusätzlich IL2. Nachdem während des dritten Zyklus die viszerale Metastasen stark progredient waren, erhielt er Temozolomid (TMZ) und später Treosulfan.

3.2.2 Morphologische und phänotypische Charakterisierung

3.2.2.1 Immunhistologische Charakterisierung der Vakzinierungsstellen

Wie bereits unter 3.2 beschrieben, haben zahlreiche Studien gezeigt, dass nur ein geringer Teil der injizierten DC von der Injektionsstelle zum drainierenden Lymphknoten wandern. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen der Vakzinierungsstellen mit einem anti-CD83-Antikörper bestätigten diese Beobachtung. Reife, CD83⁺ DC waren in der gesamten Biopsie präsent (Abb. 21A und B). DC können nicht nur naiven T-Zellen Antigene präsentieren, sondern sie sind auch wesentlich für die Induktion und dem Erhalt von HEV. Immunhistologische Färbungen zur Darstellung von HEV-Charakteristika belegen die PNAd-Expression und TCA-4-Präsentation in einigen Blutgefäßen der Vakzinierungsstellen (Abb. 21C und D). Zwar war die Intensität der TCA-4-Färbung in den Vakzinierungsstellen geringer als sie in der Regel in Lymphknoten

beobachtet werden, doch entsprach sie der im Mausmodell beobachteten Intensität für das induzierte lymphatische Gewebe. Es wurde kein Unterschied beobachtet ob beladene oder unbeladene DC injiziert wurden.

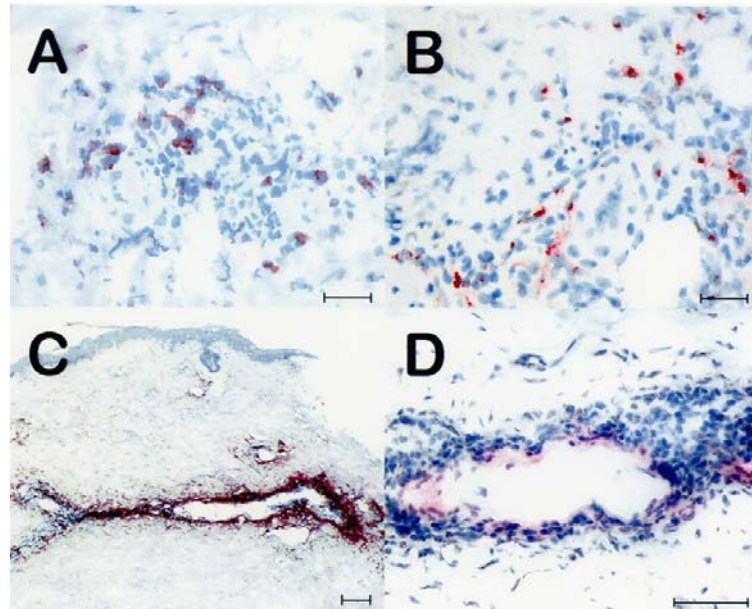


Abbildung 21. Immunhistologische Charakterisierung der Vakzinierungsstelle. Hautbiopsien wurden von Vakzinierungsstellen entnommen, in denen entweder unbeladene DC (A, C und D) oder Onkolysat beladene DC injiziert worden waren. Kryostatschnitte wurden mit anti-CD83 (A und B), anti-PNAd (C) oder anti-TCA-4 (D) gefärbt. Skalierung: 100 μm (A und B), 150 μm (D) und 200 μm (C).

Bereits in der HE Färbung der untersuchten DC Injektionsstellen fiel ein relativ dichtes Entzündungsinfiltrat auf, welches sich z.T. aus CD3 positiven T-Zellen zusammensetzte (Daten nicht gezeigt). Da neben naiven T-Zellen auch antigenerfahrene *central memory* T-Zellen L-Selektin als *homing*-Rezeptor nutzen, wurde das T-Zellinfiltrat diesbezüglich genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich das Infiltrat in den Vakzinierungsstellen sowohl aus L-Selektin⁺/CD45RA⁻ Zellen als auch L-Selektin/CD45RA doppelt positiven Zellen zusammensetzte (Abb. 22A und B). Die erste Population stellt wahrscheinlich die antigenerfahrenen *central memory*, die zweite naive T-Zellen dar. Hier wurde auch erstmalig ein Unterschied zwischen den Injektionsstellen mit beladenen und unbeladenen

DC deutlich. Zwar war unabhängig von der Beladung der DC ein CD3⁺ T-Zellinfiltrat in den Injektionsstellen vorhanden, doch war das Ausmaß des Infiltrats bei Injektion von DC, die mit Onkolysat oder einem Cocktail an Peptiden beladen waren, wesentlich größer als bei Injektion von unbeladenen DC (Abb. 22C und D; Tabelle 8). Doppelfärbungen mit anti-CD3- und anti-CD83-Antikörper demonstrierten die enge Nachbarschaft von T-Zellen und DC (Abb. 22E und F).

Tabelle 8. T-Zellinfiltrat in den Vakzinierungsstellen

Pa- tient	HLA Phäno- -typ ^a	Antigen ^b	T-Zell- infiltrat ^c	Anteil der CD8 ⁺ T Zellen die mit den HLA-A2 restringierten Epitop reagieren ^d [%]				Zahl der T- Zellklone ^e
				MART-1	gp-100	Mage-3	Survivin	
#1	A1, A2	kein	o	0,5	0	0		9 ^f
		gp-100	++	0	12	0		10
		Mage-3	+					8
		Onkolysat	++	6		5		29 ^f
#2	A2	kein	o					2
		Mage-3	+	0		10		6
		Onkolysat	++	4,5		0		n.a. ^g
#3	A3, B44	Tyrosinase	++					25
		gp-100	+		0			22
#4	A2, A3	Tyrosinase	+	0	0	0		17
#5	B44	Mage-3	++					3
#6	A2	Survivin	o	0	0	0	10	5

^a nur die für die Vakzinierung relevanten HLA Phänotypen sind angegeben

^b die Peptidsequenz des jeweiligen Epitops ist unter Punkt 2.2.2.6 beschrieben

^c das Ausmaß des T-Zellinfiltrats wurde nach den Richtlinien von Clark et al. (Clark, Jr. et al. 1989) als stark (++), mittelstark (+) und schwach (o) beurteilt

^d die Frequenz der MAA reaktiven T-Zellen wurde durch die Auswertung von mindestens 20 Gesichtsfeldern bestimmt; freigelassene Felder zeigen an, dass diese Analyse für die entsprechende Probe nicht durchgeführt wurde

^e entsprechend der Anzahl an Banden in den denaturierenden Gradientengelen

^f die dazugehörigen Bilder des denaturierenden Gradientengels sind in Abb. 24 dargestellt

^g aufgrund der begrenzten Probengröße konnten nicht alle Analysen für diese Biopsie durchgeführt werden

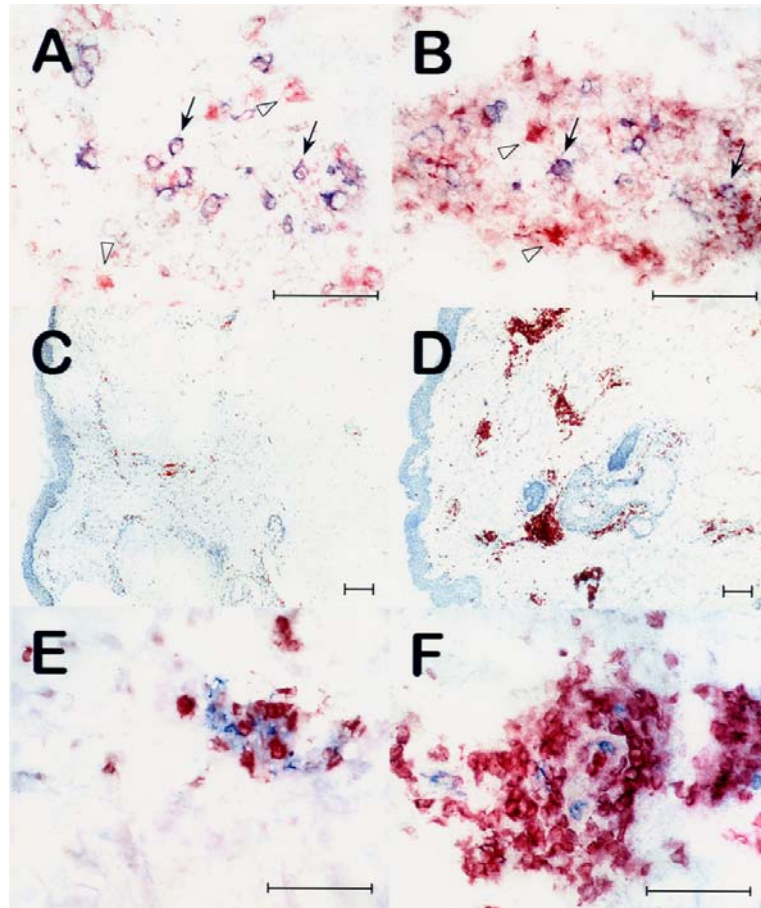


Abbildung 22. T-Zellinfiltrat in Vakzinierungsstellen. Hautbiopsien wurden aus Injektionsstellen, in denen unbeladene (A, C und E) oder Onkolysat-beladene DC injiziert worden waren (alle anderen), gewonnen und immunhistologisch untersucht. Antikörper gegen CD62L (A und B; offene Pfeilspitzen) und CD3 (C-F) wurden durch eine rote Farbe, die gegen CD45RA (A und B) und CD83 (E und F) mit einer blauen Farbe detektiert. Doppelt positive Zellen erscheinen violett (schwarze Pfeile). Skalierungen: 200 μm (C und D) und 50 μm (alle anderen).

3.2.3 Funktionelle Charakterisierung

3.2.3.1 Überexpression von Chemokinen

Die selektive Wanderung von T-Zellen, das so genannte *homing*, ist von der Anwesenheit von Chemokingradienten und der Expression relevanter Rezeptoren abhängig. Zu den relevanten Chemokinen, die das *homing* von T-Zellen beeinflussen, gehören beispielsweise CCL18 (DC-CK1) und CXCL12 (SDF-1). Während CXCL12 chemotaktisch auf Lymphozyten und Monozyten wirkt, zieht CCL18 bevorzugt naive T-Zellen an. Eine relative Quantifizierung mittels *real time* PCR und unter Nutzung der $\Delta\Delta C_T$ Berechnung ergab, dass 48h nach Injektion von DC diese beiden Chemokine in der Haut verglichen mit normaler, unbehandelter Haut überexprimiert waren. Tabelle 9 zeigt die Berechnung für die relative Expression dieser Chemokine in drei verschiedenen Vakzinierungsstellen. Die relative Expression zur unbehandelten Haut variierte dabei von 22,2 – 102,9 für CCL18 und von 11,8 – 82,1 für CXCL12 (Abb. 23). Es wurden allerdings nur drei Vakzinierungsstellen quantitativ analysiert, da diese Analysen viel Ausgangsmaterial, d.h. große Biopsien, erforderten.

Tabelle 9. Berechnung der relativen Expression von CCL18 und CXCL12 in Vakzinierungsstellen

Probe ^a	C _T CCL18 ^b	C _T GAPDH ^b	Δ C _T ^c	ΔΔ C _T ^d	Rel. CCL18 ^e
Haut	39,21 ± 0,36	27,605 ± 0,08	11,605 ± 0,37	0 ± 0,37	1,0
1	30,43 ± 0,13	23,3 ± 0,03	7,13 ± 0,13	-4,475 ± 0,13	22,2
2	35,52 ± 0,53	29,26 ± 0,30	6,26 ± 0,16	-5,345 ± 0,61	40,6
3	26,08 ± 0,08	21,16 ± 0,34	4,92 ± 0,35	-6,685 ± 0,35	102,9

Probe ^a	C _T CXCL12 ^b	C _T GAPDH ^b	Δ C _T ^c	ΔΔ C _T ^d	Rel. CXCL12 ^e
Haut	38,05 ± 0,44	33,94 ± 0,39	4,11 ± 0,58	0 ± 0,58	1,0
1	42,21 ± 0,62	41,66 ± 0,63	0,55 ± 0,88	-3,56 ± 0,88	11,8
2	38,4 ± 0,02	40,65 ± 0,26	-2,25 ± 0,26	-6,36 ± 0,26	82,1
3	25,34 ± 0,01	26,02 ± 0,29	-0,68 ± 0,29	-4,79 ± 0,29	27,7

^a Die Vakzinierungsstellen wurden Patient #3 (1, 2) bzw. Patient #4 (3) 48 h nach Injektion von MAA beladenen DC entnommen. Die DC waren mit dem HLA-A3 restringiertem gp100₁₇₋₂₅ (1), dem HLA-B44 restringierten Tyrosinase₁₉₂₋₂₀₀ (2) oder dem HLA-A2 restringierten Tyrosinase₂₁₄₋₂₂₂ Epitop (3) beladen. Als Referenz diente normale Haut

^b Der Mittelwert aus dreifach Messungen. C_T entspricht dem Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Produkts einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die Standardabweichung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\sqrt{\frac{1}{n-1} + \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

^c Δ C_T gibt die Differenz aus dem C_T des Chemokins und der endogene Kontrolle, d.h. GAPDH, an. Die Standardabweichung errechnet sich aus:

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

^d ΔΔ C_T ist die Differenz aus ΔC_T der jeweiligen Probe und Δ C_T der Referenz, der normalen Haut. Die Standardabweichung ist dieselbe wie für ΔC_T, da mit einer festgelegten Konstante subtrahiert wird.

^e Die relative Expression (Rel.) des Chemokins im Verhältnis zur normalen Haut errechnet sich aus: $2^{-\Delta\Delta C_T}$

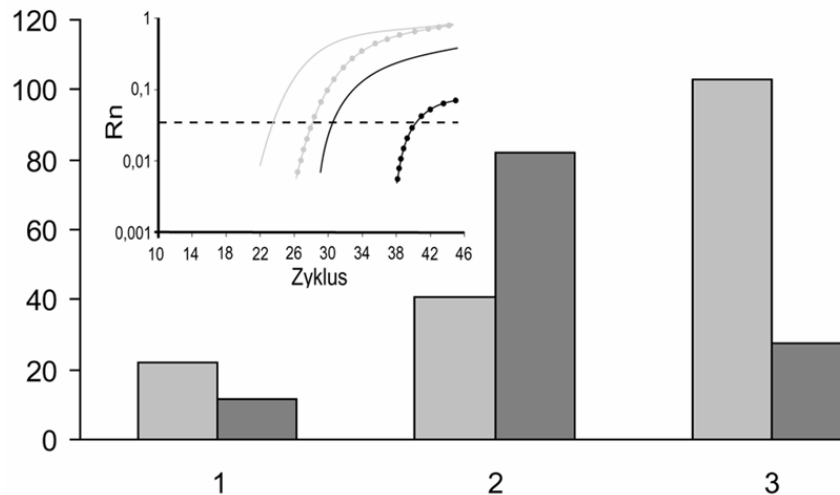


Abbildung 23. Relative Quantifizierung von CCL18 und CXCL12 in den Vakzinierungsstellen. Mittels quantitativer PCR wurde die Expression von *messenger* RNA, die für die Chemokine CCL18 (hellgrau) und CXCL12 (dunkelgrau) und das *housekeeping* Gen GAPDH kodiert, in Vakzinierungsstellen bzw. unbehandelter Haut bestimmt. Die Vakzinierungsstellen wurden 48 h nach der Injektion von gp100₁₇₋₂₅ (1), Tyrosinase₁₉₂₋₂₀₀ (2) oder Tyrosinase₂₁₄₋₂₂₂ (3) beladenen DC entnommen. Die Berechnung der relativen Expression der Chemokine in den Vakzinierungsstellen im Vergleich zur unbehandelten Haut ist in Tabelle 9 dargestellt. Das eingefügte Bild zeigt PCR Graphen für CCL18 (schwarz) und GAPDH (grau) von der Haut (Kreise) und Probe 1 (Linie). Die gestrichelte schwarze Linie stellt den Fluoreszenz-Schwellenwert dar, Rn ist die detektierte Fluoreszenz.

3.2.3.2 Oligoklonales T-Zellinfiltrat

In den Vakzinierungsstellen waren aufgrund der Präsenz von reifen, antigenbeladenen DC, T-Zellen sowie einem T-Zellen anlockenden Chemokinmilieu alle Voraussetzungen für eine antigenspezifische *in loco* Expansion von T-Zellen gegeben. Solch eine Expansion sollte in einem oligoklonalen T-Zellinfiltrat resultieren, wohingegen eine unspezifische Entzündung durch ein polyklonales T-Zellinfiltrat charakterisiert wäre. Klonotypische Kartierungen der T-Zellinfiltrate mittels RT-PCR/DGGE für die humanen BV-Familien 1-24 ergaben für die Vakzinierungsstellen mit beladenen DC tatsächlich klonal expandierte T-Zellen, die unterschiedlichen BV-Familien zugeordnet werden konnten (Abb. 24B; Tabelle 8). Dagegen waren in der Injektionsstelle von unbeladenen DC nur wenige Banden detektierbar (Abb. 24A Tabelle 8). Die hohe Sensitivität der angewandten Methode, die

eine klonale Expansion von 0,1% aller $\alpha\beta$ T-Zellen nachzuweisen vermag (Thor Straten et al. 1998a), birgt jedoch die Gefahr, dass einzelne T-Zellen als Klone missinterpretiert werden. Obwohl das Ausmaß des T-Zellinfiltrats (Abb. 22 und Tabelle 8) diese Möglichkeit für die Vakzinierungsstellen von beladenen DC bereits verringerte, wurden die Biopsien mit Antikörpern, die sich gegen TCR BV-Familien richten für die klonale Expansionen nachgewiesen waren, immunhistologisch aufgearbeitet. Abbildung 24 zeigt repräsentative Färbungen mit Antikörpern gegen V β 12 und V β 14 neben der klonotypischen Karte der jeweiligen Biopsie. V β 12 und V β 14 wurden ausgewählt, da in den Injektionsstellen für die BV12-Familie mehrere T-Zellklone, für die BV14-Familie dagegen nur 2 T-Zellklone detektiert wurden. Die Färbungen der Biopsien, die beladene DC enthielten, wiesen zahlreiche T-Zellen mit dem entsprechenden BV-Familien-TCR auf (Abb. 24B). In den Injektionsstellen von unbeladenen DC fanden sich dagegen nur einzelne T-Zellen der jeweiligen BV-Familie (Abb. 24A). Es ist davon auszugehen, dass somit die bei der klonotypischen Kartierung sichtbaren einzelnen Banden in den Injektionsstellen unbeladener DC gering expandierte oder gar einzelne T-Zellen entsprechen.

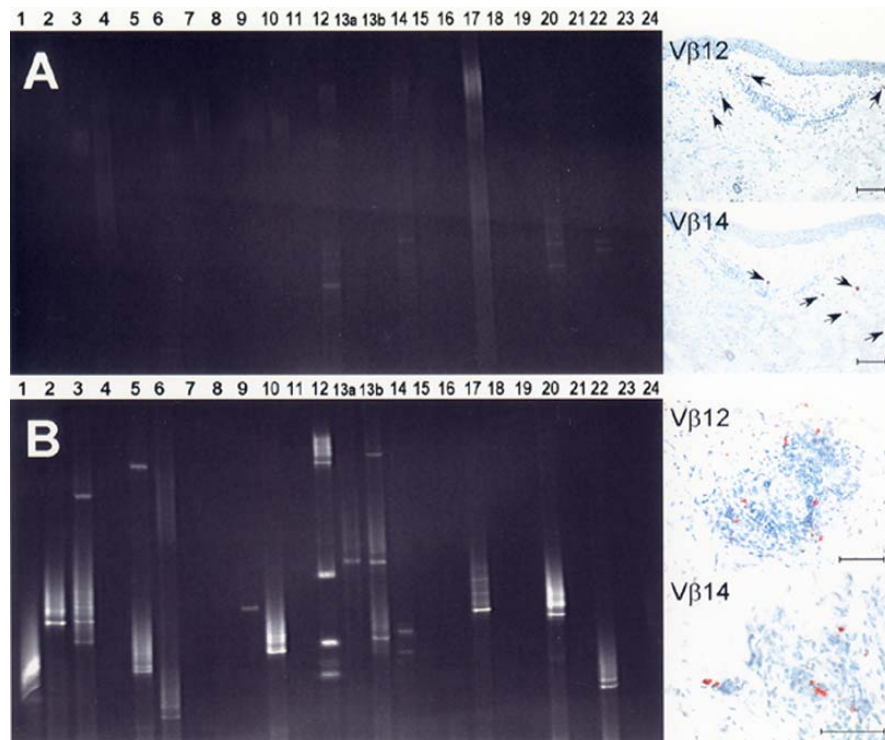


Abbildung 24. Klonotypische Karten von Injektionsstellen. Hautbiopsien die dem Patienten #1 48 h nach der Injektion von unbeladenen (A) oder Onkolysat beladenen DC (B) entnommen worden waren, wurden klonotypisch analysiert. Innerhalb der klonotypischen Karte deutet jede Bande auf eine klonal expandierte T-Zelle hin. Um die Durchführbarkeit der Methode zu kontrollieren, wurde das Ausmaß an T-Zellen der BV-Familien durch immunhistochemische Färbungen analysiert. Beispielhaft sind die Färbungen für VB12 und VB14 dargestellt. Skalierung der immunhistochemischen Färbungen: 150 μ m.

3.2.3.3 Für die Vakzinierungsstellen spezifische T-Zellklone

Für die Präsenz der beobachteten T-Zellklone in den Vakzinierungsstellen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: entweder gingen sie durch *in loco* Expansionen hervor oder aber sie wurden aus dem peripheren Blut rekrutiert. Würde letztere Möglichkeit zutreffen, so sollten die Klone bereits im Blut, zumindest nach Anreicherung von antigen-spezifischen T-Zellen, mit Hilfe der klonotypischen Kartierung detektierbar sein. Aus diesem Grund wurden die klonotypischen Karten von (1) PBL, die einen Tag vor Vakzinierung gewonnen wurden, (2) MAA-spezifischen T-Zellen, die aus diesen PBL isoliert wurden und (3) Biopsien der Vakzinierungsstellen 24h nach Injektion von DC, die mit

entsprechenden MAA Peptiden beladen wurden, verglichen. Die MAA spezifischen T-Zellen wurden von den PBL mit Hilfe von MAA/HLA-A*0201 Monomeren, die an magnetische Kügelchen gekoppelt waren, abgetrennt. Wie in Abbildung 25 exemplarisch für gp100₂₀₉₋₂₁₇ spezifische T-Zellen dargestellt, stimmten die TCR BV Transkripte der klonal expandierten T-Zellen aus dem Blut zwar teilweise mit denen der gp100₂₀₉₋₂₁₇ spezifischen T-Zellfraktion überein. Es waren jedoch niemals identische T-Zellklone in den Vakzinierungsstellen und den PBL bzw. MAA-spezifischen T-Zellen nachweisbar.

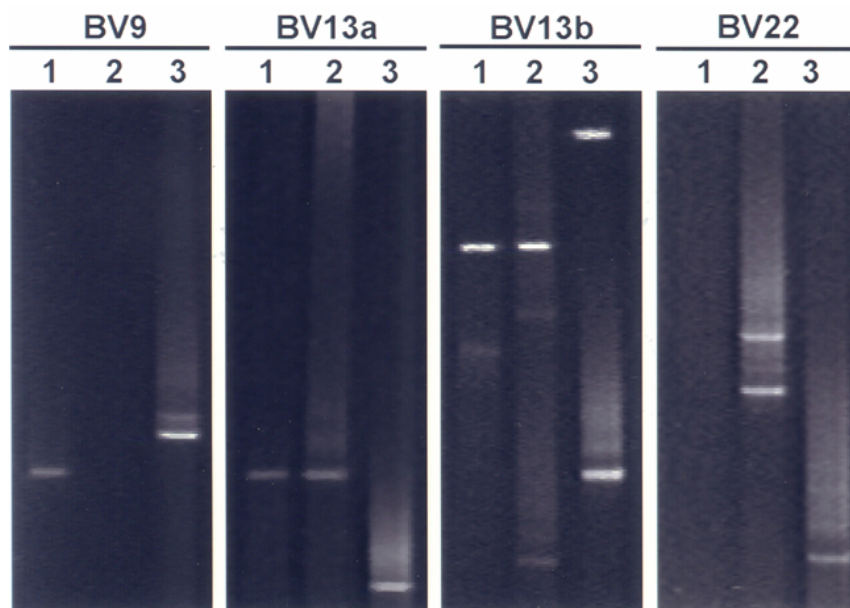


Abbildung 25. T-Zellklone innerhalb der Vakzinierungsstellen stimmen nicht mit zirkulierenden Klonen überein. Vergleichende klonotypische Kartierung von PBL (1), gp100₂₀₉₋₂₁₇-spezifischen T-Zellen isoliert aus diesen PBL (2) und einer Vakzinierungsstelle in denen gp100₂₀₉₋₂₁₇ beladene DC injiziert worden waren. Die PBL wurden Patienten #1 24 h vor, die Hautbiopsie 24 h nach der Vakzinierung entnommen. Identische T-Zellklone befinden sich auf der gleichen Höhe im Gel.

3.2.3.4 Spezifitätsnachweis der T-Zellen

Eine *in loco* Expansion von MAA spezifischen T-Zellen sollte mit einer Vermehrung von T-Zellen einhergehen, deren TCR das von den DC präsentierte Antigen erkennen. Die klassischen Spezifitätsnachweise wie ELISPOT und Zytotoxizitäts-Assay lassen sich jedoch aufgrund der stark begrenzten Menge an Untersuchungsmaterial nicht durchführen.

Die Spezifität des T-Zellinfiltrats wurde stattdessen durch die *in situ*-Färbung mit Peptid/HLA-A*0201 Multimeren bestimmt. Durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen spezifische TCR BV-Familien und MAA/HLA-A*0201 Multimere ließen sich drei Zellpopulationen unterteilen, wie Abbildung 26 für MART-1₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 spezifische T-Zellen darstellt. In einer Vakzinierungsstelle mit Onkolysat beladenen DC konnten (i) BV12⁻ und MART-1/HLA-A*0201 reaktive (Abb. 26A), (ii) BV12⁺ und MART-1/HLA-A*0201 reaktive (Abb. 26B) und (iii) BV12⁺ und MART-1/HLA-A*0201 nicht-reaktive Zellen (Abb. 26C) unterschieden werden. Eine nicht-spezifische Interaktion von MART-1₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 Multimeren mit allen Mitgliedern der BV12 Familie konnte somit ausgeschlossen werden. Vielmehr waren einige der BV12⁺ T-Zellen Mage-3₂₇₁₋₂₇₉/HLA-A*0201 oder gp100₂₀₆₋₂₁₇/HLA-A*0201 spezifisch (Abb. 26D und 26E). Die MAA/HLA-A*0201 spezifischen T-Zellen waren teilweise in kleinen Gruppen angeordnet, was eine lokale Expansion vermuten lässt. In den Injektionsstellen von mit nur einem Peptid beladenen DC fanden sich nur MAA/HLA-A*0201 spezifische T-Zellen, deren Spezifität jedoch auf das präsentierte Antigen beschränkt war. So fanden sich z.B. in einer Vakzinierungsstelle von gp100₂₀₆₋₂₁₇ beladenen DC gp100₂₀₆₋₂₁₇/HLA-A*0201 spezifische T-Zellen aber keine Mage-3₂₇₁₋₂₇₉/HLA-A*0201 spezifischen (Abb. 27). Die Frequenz MAA spezifischer T-Zellen variierte von 0,5 bis 12% der CD8⁺ Zellen (Tabelle 8). Diese Frequenz war abhängig von dem Antigen, das für das Beladen der DC verwendet wurde. Die höchsten Frequenzen wurden beobachtet, wenn die DC nur mit einem Peptidepitop beladen waren. Dagegen waren die Frequenzen der individuellen MAA/HLA-A*0201 reaktiven T-Zellen deutlich geringer sofern Onkolysat beladene DC injiziert wurden. In diesen Fall waren in der Regel MART-1₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 reaktive T-Zellen mit der höchsten Frequenz vertreten.

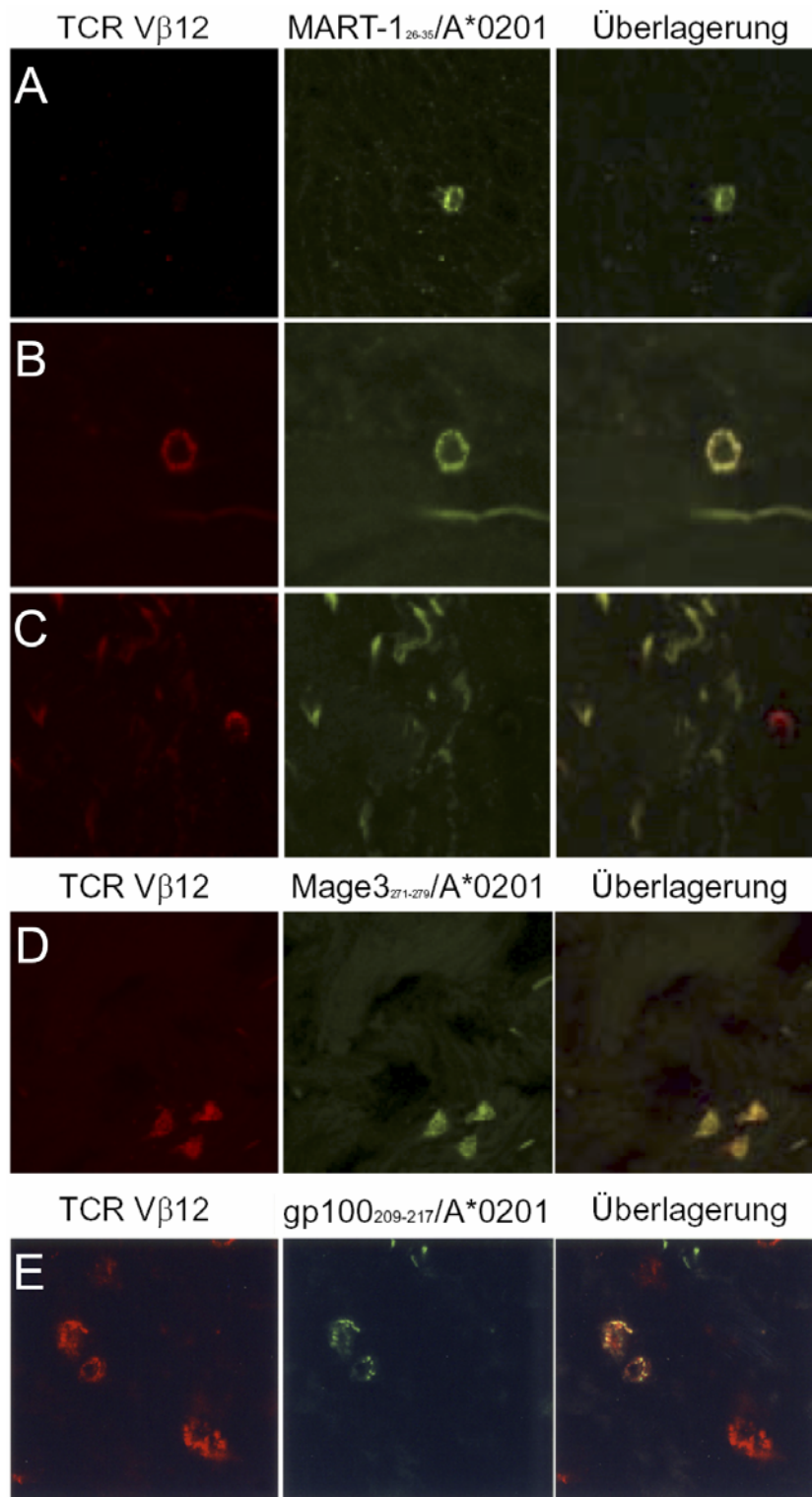


Abbildung 26. Spezifität der infiltrierenden Lymphozyten. Kryostatschnitte von Hautbiopsien, die 24 h nach der Injektion von Onkolysat-beladenen DC entnommen waren, wurden mit anti-TCR β V12 Antikörper (rot) und MAA/HLA-A*0201 Multimeren (grün) gefärbt. Die MAA, die für die Herstellung der Multimere verwendet wurden, waren das MART-1₂₆₋₃₅ (A-C), das Mage-3₂₇₁₋₂₇₉ (D) oder das gp100₂₀₉₋₂₁₇ Peptid (E). Die Bilder in der rechten Spalte stellen die digitale Überlagerung der einzelnen Farbkanäle dar. Doppelt positive Zellen erscheinen gelb.

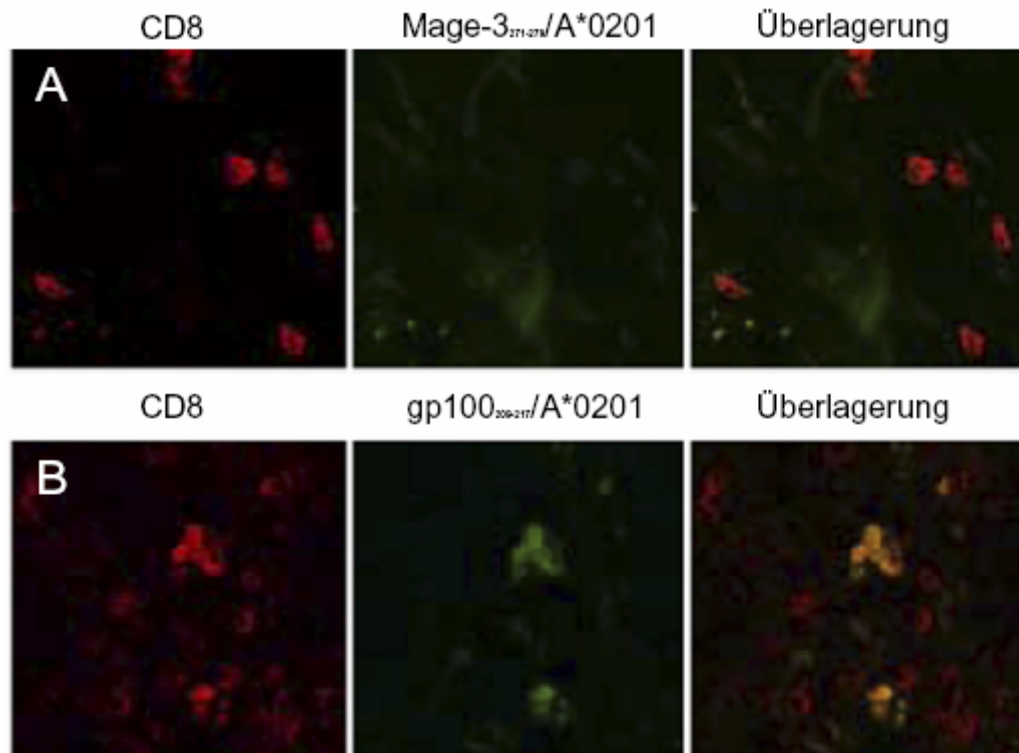


Abbildung 27. Spezifität der T-Zellen gegenüber dem präsentierten Antigen. Doppelfärbungen von Kryostatschnitten einer Hautbiopsie, die 48 h nach der Injektion von gp100 beladenen DC entnommen worden war. Die Schnitte wurden mit anti-CD8 Antikörper (rot) und entweder MAGE-3/HLA-A*0201 (A) oder gp100/HLA-A*0201 (B) Multimere (grün) gefärbt. Die Farbkanäle sind rechts überlagert dargestellt.

3.2.3.5 Zirkulation eines T-Zellklons zwischen Vakzinierungsstelle und Metastase

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass zumindest eine lokale Expansion von MAA spezifischen T-Zellen in den Vakzinierungsstellen erfolgte. Daher stellt sich die Frage, ob diese T-Zellen auch eine funktionelle Rolle innehaben, d.h. an der Immunantwort gegen Tumore beteiligt sind. ELISPOT-Analysen des Blutes von Impfpatienten hatten bereits die Induktion einer spezifischen Immunantwort durch DC-Vakzinierungen gezeigt (Andersen et al. 2001a). Jedoch können diese Analysen keinen Aufschluss über den Ort der Induktion dieser Zellen geben: dieser könnte entweder in den Vakzinierungsstellen oder aber auch in den Lymphknoten, zu denen ein geringer Teil der injizierten DC wandert, liegen. Die Funktionalität der T-Zellklone der Vakzinierungsstellen sollte daher anhand von der vergleichenden klonotypischen Kartierung untersucht werden. Dazu wurden die

klonotypischen Karten der Vakzinierungsstellen und mehrerer subkutaner Metastasen einer Patientin verglichen. Abbildung 28 stellt sowohl Verlauf und Therapie dieser Patientin als auch die klonotypische Karte der Vakzinierungsstelle dar. Tatsächlich zeigte sich, dass sich einer der neun detektierten T-Zellklone der Vakzinierungsstelle in zwei der 7 Metastasen, die nach jener Vakzinierung exzidiert wurde, wieder fand (Abb. 28C). Somit liegt Nahe, dass zumindest ein Teil der T-Zellen, welche sich in den Vakzinierungsstellen nachweisen lassen, in der Lage sind zu Tumormanifestationen zu wandern.

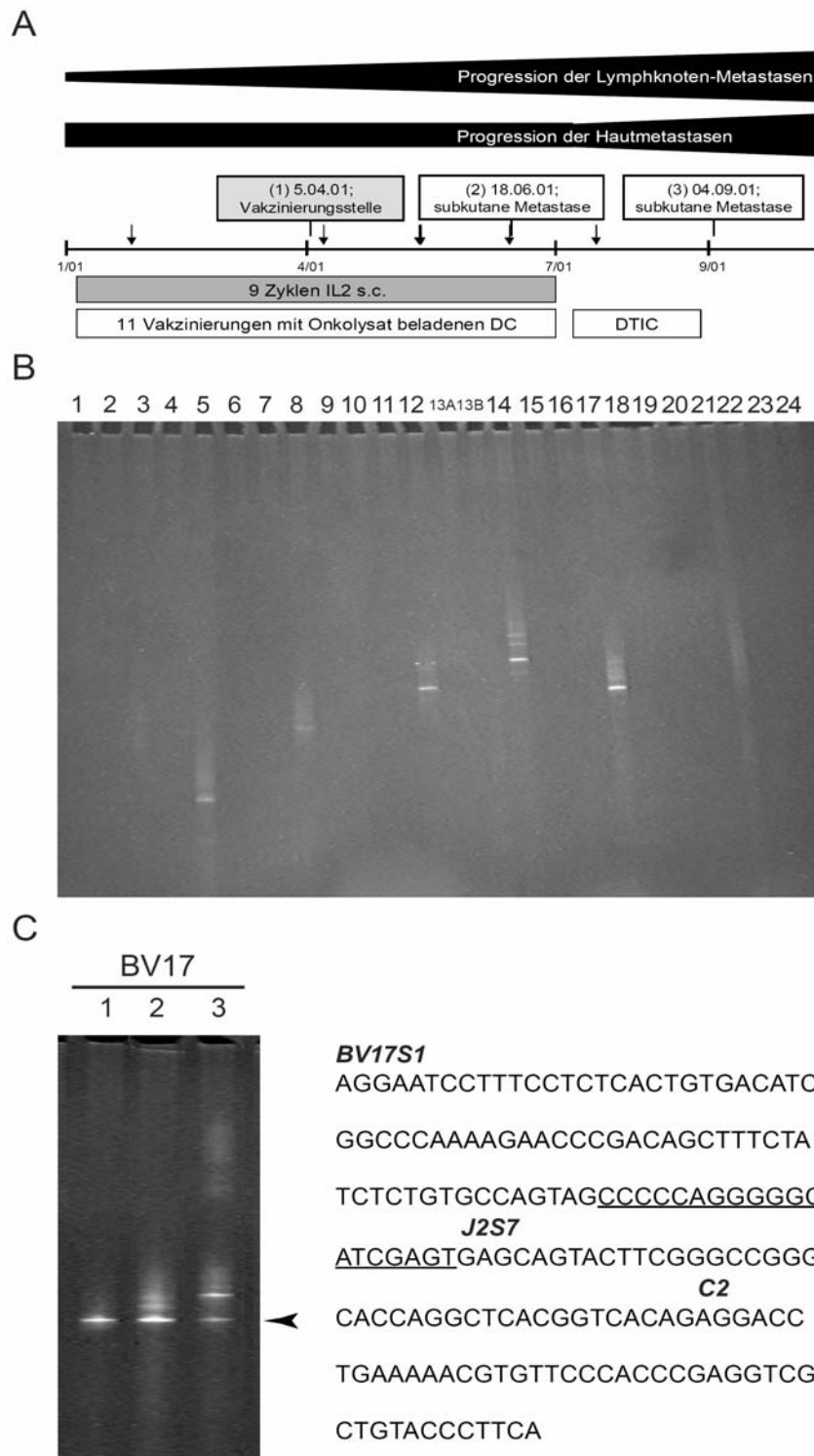


Abbildung 28. Identischer T-Zellklon in Vakzinierungsstelle und späteren Metastasen. Klinischer Verlauf, Therapie und Entnahmezeitpunkte für Vakzinierungsstelle und Metastasen (A). Der Melanompatientin wurden eine Vakzinierungsstelle und mehrere Metastasen entnommen, deren Entnahmezeitpunkte entweder als Kästen oder als Pfeile dargestellt sind. Die Vakzinierungsstelle wurde klonotypisch kartiert (B). Der Vergleich der klonotypischen Karten ergab für BV17 einen identischen Klon in der Vakzinierungsstelle und in zwei der Metastasen. Die *junctional diversity* Region der Sequenz dieses Klones ist unterstrichen und die genomischen Segmente angegeben.

4 Diskussion

Naïve T-Zellen werden in T-Zellarealen sekundärer lymphatischer Gewebe durch Ausbildung von immunologischen Synapsen mit antigenpräsentierenden DC stimuliert (Banchereau et al. 2000; Bromley et al. 2001). Das T-Zell-*priming* kann jedoch auch außerhalb lymphatischen Gewebes, z.B. *in vitro* durch Kokultivierung von T-Zellen und DC (van Stipdonk et al. 2001; Langenkamp et al. 2002), stattfinden. Daher stellte sich die Frage, ob ein *priming* von T-Zellen *in vivo* ausschließlich in sekundären lymphatischen Geweben oder aber auch unter bestimmten Bedingungen außerhalb dieser Organe erfolgen kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Fragestellung in zwei Modellen zu untersuchen. Das Mausmodell basiert auf Anreicherung von LT α am Tumor, das humane auf intrakutaner Injektion autologer, reifer, antigenbeladener DC bei Melanompatienten.

4.1 Das murine Modell

Wie unter 1.6 und 3.1.1.1 dargestellt, basierte das murine Modell auf bekannten Einzelkomponenten. Die therapeutische Wirksamkeit eines LT α -Fusionsproteins wurde zuvor lediglich in einem xenogenem human-murinen Modell untersucht, welches auf einer i.v. Injektion von humanen Melanomzellen in immundefizienten Mäusen basierte (Reisfeld et al. 1996). Trotz eines direkten zytotoxischen Effekt des Fusionsproteins auf die Melanomzellen *in vitro*, konnte dieser *modus operandi* für die *in vivo*-Situation aufgrund der fehlenden Wirksamkeit in *severe combined immune deficiency* (SCID) Mäusen ausgeschlossen werden. Offensichtlich ist für eine antitumorale Wirksamkeit der LT α -Fusionsproteine die Anwesenheit von asialo-GM1⁺ Zellen wesentlich. T-Zellen spielten in diesem Modell keine ausschlaggebende Rolle, da in athymischen Nacktmäusen das LT α -Fusionsprotein einen deutlichen Antitumoreffekt zeigte. Es ist aber wesentlich herauszustellen, dass in SCID- und Nacktmäusen eine erhöhte NK-Zellaktivität beobachtet werden kann, so dass diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf immunkompetente Mäuse

übertragen werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen immunhistologischen und funktionellen Ergebnisse deuten auf einen T-Zell-vermittelten therapeutischen Effekt des LT α -Fusionsproteins hin. Diese Vermutung wurde in Zusammenarbeit mit dem Reisfeld-Labor durch *Flow Cytometry*-Auswertung des Tumordinfiltrats bestätigt, welches in der Kontrollgruppe größtenteils aus NK-Zellen bestand, aber in den mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäusen einen viel höheren Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufwies (Schrama et al. 2001b). Neben den bereits erwähnten Unterschieden der NK-Zellaktivität in den verschiedenen Mausstämmen kann die unterschiedliche Rekrutierung von Effektorzellen in den Modellen, d.h. T-Zellen im syngenem und B- und NK-Zellen im xenogenem Modell, auch der Tatsache zugeschrieben werden, dass wahrscheinlich im xenogenem Modell eine Art Transplantationsabwehr abläuft (Brouard et al. 1999). So sind NK-Zellen die relevante Population der mononukleären Zellen, die für die Abstoßung von parentalem Knochenmark in F1 Hybridmäusen, der so genannten Hybridresistenz, verantwortlich sind (Suzue et al. 2001). Ebenso kann die Effizienz der Transplantation von humanen Stammzellen in Mäuse durch die Depletion von NK-Zellen gesteigert werden (Yoshino et al. 2000).

Im syngenem Modell konnte nach der Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein neben einem ausgeprägten Zellinfiltrat auch eine Kompartimentalisierung dieses peritumoralen Infiltrats in B- und T-Zellareale beobachtet werden. Solch eine Anordnung kennt man von sekundären lymphatischen Organen (Vinuesa and Cook 2001), die außerdem HEV aufweisen (Kraal et al. 1987), welche eine schnelle und selektive Transmigration von Lymphozyten aus dem Blut ermöglichen. Diese Blutgefäße exprimieren PNA_d und präsentieren TCA-4. Die Expression des Adhäsionsmoleküls PNA_d, das die Adhäsion von Lymphozyten an HEV durch Interaktion mit L-Selektin vermittelt (Salmi et al. 1998), ist dabei normalerweise ebenso auf HEV beschränkt

(Premier and Meeusen 1998) wie die Präsentation von TCA-4. Die konstitutive Präsentation dieses Chemokines in HEV erfolgt über Bindung an einem COOH-Terminus von sulfurierten Glycosaminoglykane, welche in der Glycokalix von HEV vorkommen (Stein et al. 2000). TCA-4 dient den CCR7 Rezeptoren auf naïven T-Zellen als Ligand und führt so zu einer Hochregulierung von LFA-1, welches einen notwendigen Schritt für die Transmigration von T-Lymphozyten darstellt (Stein et al. 2000). HEV stellen eine wichtige Voraussetzung für das *priming* naiver T-Zellen dar, welche nur über diese speziellen Gefäße aus dem Blut in das Gewebe wandern können (Weninger et al. 2001). So konnte gezeigt werden, dass durch Blockierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen und L-Selektin das *homing* von naïven Lymphozyten in Lymphknoten verhindert werden kann. Ferner war die Zirkulation von naïven T-Zellen durch Gewebe, in denen der Eintritt durch HEV kontrolliert wird, für die Initiierung einer primären Immunantwort notwendig (Bradley et al. 1998). In den Tumoren von mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäusen konnten sowohl PNAd exprimierende als auch TCA-4 präsentierende Blutgefäße nachgewiesen werden. Einen weiteren Beleg für die Präsenz von HEV in den Tumoren der mit LT α -Fusionsprotein behandelten Mäusen stellten elektronenmikroskopische Aufnahmen dar, die die für HEV charakteristische kuboide Form von Endothelzellen einiger Blutgefäße belegten. Somit scheint die Behandlung mit dem LT α -Fusionsprotein HEV am Tumor zu induzieren.

Über die Induktion von HEV ist bislang nur wenig bekannt. *In vitro*-Analysen zeigten, dass TNF α einen stimulierenden Effekt auf Endothelzellen hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. PNAd und ICAM-1, und der Freisetzung von Zytokinen besitzt (Shah et al. 2002). Somit könnte TNF α , welches vom inflammatorischen Infiltrat sezerniert wird, zur Aktivierung und Differenzierung der Endothelzellen beitragen. Aufgrund des hohen lokalen Spiegels an LT α dürften aber auch LT α_3 /TNFRI und/oder

LT α_3 /TNFR II -Interaktionen eine wesentliche Rolle spielen, da LT α_3 an dieselben Rezeptoren wie TNF α bindet (Loetscher et al. 1990). Interessanterweise zeigten Tierexperimente, dass die transgene Expression von LT α zwar alleine schon zu einer Expression des Adhäsionsmoleküls MadCAM (*mucosal addressin cellular adhesion molecule*) führt, jedoch für die Expression von PNAd auf den HEV das Heterotrimer LT $\alpha_1\beta_2$ essentiell ist (Drayton et al. 2002). Dies bedeutet, dass neben LT α_3 auch LT $\alpha_1\beta_2$ während der Neogenese des lymphatischen Gewebes präsent gewesen sein sollte, da PNAd exprimierende Blutgefäße in den Tumoren der mit ch14.18-LT α behandelten Mäuse nachgewiesen wurden. Das Fusionsprotein verfügt über eine Plasmin-Schnittstelle im Linker zwischen Antikörper und Zytokin. Daher kann sich LT α_3 leicht am Tumor bilden, da Tumorzellen für ihre Invasivität und metastatische Aktivität einige tumorassoziierte Proteasen, wie z.B. Plasmin, benötigen (de Groot et al. 2001), und Plasma hohe Spiegel an Plasminogen – dem Zymogen von Plasmin – aufweist (Dano et al. 1985). Analog kann LT α mit LT β , welches von aktivierten Lymphozyten produziert wird (Takemura et al. 2001; Agyekum et al. 2003), einen heterotrimeren Komplex bilden.

Eine weitere Voraussetzung für ein lokales *priming* ist die Präsenz naiver T-Zellen. Ein Markermolekül, das vornehmlich auf naiven T-Zellen vorkommt, ist L-Selektin. Tatsächlich fanden sich L-Selektin⁺ Zellen über den ganzen Tumor verteilt, wobei einige in engem Kontakt mit Endothelzellen standen. Beim überwiegenden Teil dieser Zellen wird es sich um naive T-Zellen handeln, obwohl auch *central memory* T-Zellen L-Selektin exprimieren. Jedoch sollte die Anzahl von *central memory* T-Zellen zu diesem frühen Krankheitszeitpunkt, d.h. 21 Tage nach Tumorinduktion, noch relativ gering sein, weil sich diese nach dem Modell der nicht-linearen Differenzierung erst zum Ende einer Immunantwort entwickeln (Weninger et al. 2002). Andererseits zeigen zwei aktuelle Ergebnisse, dass ein zweistündiger Kontakt zwischen naiver T-Zelle und antigenbeladener

DC ausreicht, um eine klonale Expansion der T-Zelle zu erreichen. Diese Expansion läuft anscheinend nach einem bestimmten Programm, das erstmals keines weiteren Antigenkontaktes bedarf und nach ca. 8 Zellteilungen in die Differenzierung zu Effektorzellen mündet (Kaech and Ahmed 2001; van Stipdonk et al. 2001). Dabei ist aber zu beachten, dass die in diesen Experimente eingesetzten DC mit viralen- bzw. Fremdartigen optimal beladen waren. Immunantworten gegen Tumorantigene sind aber in der Regel deutlich schwächer (Speiser et al. 1997; Klenerman et al. 2002). Insgesamt scheint es also sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den L-Selektin⁺ Zellen vornehmlich um naive T-Zellen handelt. Die Ergebnisse des humanen Modells bekräftigen dies, da in den Vakzinierungsstellen einige der L-Selektin⁺ Zellen einen naiven Phänotyp besaßen.

Einen Hinweis auf ein *priming* direkt am Tumor stellt der Anstieg an T-Zellklonen im Verlauf der Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein dar. Dieser Anstieg ist vermutlich sowohl auf ein verbessertes *priming* als auch auf eine verbesserte Rekrutierung und Expansion von T-Zellen zurückzuführen. So proliferieren transferierte, transgene zytotoxische T-Zellen nur an den Orten, an denen das relevante Antigen präsent ist (Shrikant and Mescher 1999). Gleichermaßen dominieren virusspezifische T-Zellen nur dann die lokalen T-Zellpopulationen, wenn sich das Virus dort repliziert (Flynn et al. 1998). Zwar lässt sich nicht bestimmen an welchem Ort (Tumor oder Lymphknoten) die expandierende T-Zelle *geprimt* wurde, doch nachdem durch die Induktion von tertiärem lymphatischen Gewebe am Tumor alle Voraussetzungen für ein *priming in loco* gegeben sind, kann es nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der T-Zellklone am Tumor *geprimt* wurde. So ließen sich auch keine identischen Klone im Tumor und im Lymphknoten nachweisen. Nachdem die Behandlung mit dem Fusionsprotein eng mit einer Tumorrückbildung assoziiert ist, bestünde auch die Möglichkeit, dass die Zunahme der T-Zellklone ein sekundärer Effekt ist, der die immunologische Abwehr widerspiegelt. Jedoch ergaben getrennte Analysen regressiver und progressiver Abschnitte von

Melanomläsionen keinen Unterschied in der Anzahl an klonotypischen T-Zellen (thor Straten et al. 1996), so dass die immunologische Zerstörung des Tumors wohl nicht an die Anwesenheit einer höheren Anzahl an klonotypischen T-Zellen gebunden ist. Zusätzlich ist anzumerken, dass die letzte Probe für die klonotypische Kartierung am Tag 21 entnommen wurde, ein Zeitpunkt, an dem das Tumorwachstum gerade zu stagnieren anfing.

Für den klinischen Erfolg der Therapie scheint die Induktion eines lymphatischen Gewebes am Tumor mit der Möglichkeit des *priming* und Expansion tumorspezifischer T-Zellen verantwortlich zu sein. Die ELISPOT-Ergebnisse zeigen, dass die induzierte T-Zellantwort generell gegen den Tumor gerichtet ist; die T-Zellen der mit ch14.18-LT α -Fusionsprotein behandelten Mäuse reagierten z.B. gegen das Melanozytendifferenzierungsantigen TRP2 (Bloom et al. 1997) mit der Ausschüttung von IFN- γ . Damit unterscheidet sich der Wirkungsmechanismus des LT α -Fusionsproteins von dem eines IL2-Fusionsproteins, welches im gleichem syngenen Mausmodell erfolgreich verwendet wurde (Becker et al. 1996c). Zwar wurde auch dort ein T-Zell-vermittelter Antitumoreffekt beobachtet, jedoch beruhte dieser auf der Verstärkung einer bereits bestehenden Immunantwort (thor Straten et al. 1998b). Die Behandlung mit LT α -Fusionsprotein führte dagegen wahrscheinlich nicht nur zu einer Steigerung der bereits existierenden Immunantwort sondern, wie sich in der klonotypischen Kartierung zeigte, auch zu einer Induktion von T-Zellen. Ob es sich bei diesen T-Zellen tatsächlich um „neue“ oder aber um solche handelt, deren Expansionsgrad vor Therapie unterhalb der Nachweisgrenze der eingesetzten Methode lag, lässt sich mit den derzeit bekannten Methoden nicht klären. Jedoch verhindert ein starkes T-Zellinfiltrat, wie es in den behandelten Tumoren zu beobachten war, eher den Nachweis eines T-Zellklons. Die Nachweisgrenze liegt bei mindestens 0,1% des T-Zellpools. Dementsprechend sollten selbst geringe Expansionen in den Tumoren der Kontrolltiere,

die ein relativ kleines T-Zellinfiltrat besitzen, nachgewiesen werden können (Moerch et al. 2000).

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit dem ch14.18-LT α -Fusionsprotein lymphatisches Gewebe am Tumor induzierte. In diesem Gewebe könnten anschließend naive T-Zellen aktiviert worden sein, die den Tumor teilweise bzw. gänzlich zerstörten. Eine Bestätigung für diese Hypothese stellen die Ergebnisse eines transgenen LT α Mausmodells dar. Bei diesem Modell stand LT α unter einem Ratten-Insulin-Promotor (RIP), welcher zu einer Expression des Transgens in den Beta-Zellen des Pankreas und im proximalen Tubulus der Niere führte. Die konstitutive Expression von LT α an diesen Orten führte zu einer chronischen Entzündung, bei der es sich um eine Lymphknoten-neogenese handelt (Kratz et al. 1996). Dabei ähnelte das Infiltrat - mit APCs, T- und B-Zellen - der zellulären Zusammensetzung im Lymphknoten. Ebenso waren die chronisch inflammatorischen Läsionen durch T- und B-Zellareale, primäre und sekundäre Follikel und morphologische und antigenrelevante Merkmale von HEV charakterisiert. Zusätzlich waren diese „Organe“ in der Lage, Immunantworten zu induzieren und am Immunoglobulinklassenswitch mitzuwirken (Kratz et al. 1996). Solch ein neu induziertes Gewebe wird auch als tertiäres lymphatisches Gewebe bezeichnet (Ruddle 1999). Die Induktion des lymphatischen Gewebes scheint unabhängig von den infiltrierenden Lymphozyten und der Präsenz von LT β zu sein und nur aus der konstitutiven Expression von LT α zu resultieren (Kratz et al. 1996). Dies steht im Kontrast zu der Entwicklung peripherer und mesenterialer Lymphknoten, da für diese LT $\alpha_1\beta_2$ notwendig zu sein scheint (Drayton et al. 2002). Die zelluläre Zusammensetzung des Infiltrats wird jedoch durch die Anwesenheit von LT β beeinflusst (Sacca et al. 1998; Cuff et al. 1999). So sind die tertiären lymphatischen Gewebe von LT β knock-out Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen durch einen höheren Anteil an Gedächtniszellen charakterisiert (Sacca et al. 1998). Dies

könnte daran liegen, dass *central memory* T-Zellen zusätzlich zu dem von den naiven T-Zellen bekannten CCR7-abhängigen *homing*, über ein CCR7-unabhängiges *homing* in die peripheren Lymphknoten verfügen (Scimone et al. 2004). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass das $LT\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer *downstream* von Zytokinen wie CCL21, CCL19 und der IL2 Familie wirkt. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass auch die ektope Expression von CCL21 und CCL19 die Induktion von lymphoiden Gewebe bewirkt (Luther et al. 2002). Neben der Rolle bei der Lymphoneogenese besitzt $LT\alpha$, wie auch andere Mitglieder der TNF Superfamilie, ein großes Wirkungsspektrum. Produziert von NK, T und B Zellen bindet es als Homodimer an TNFRI und TNFRII, wobei TNFRI auf allen Zellen und TNFRII auf Endothelzellen und Immunzellen exprimiert wird. Durch diese Rezeptoren und mit wechselnden Partnern kann $LT\alpha$ Apoptose, Proliferation, Überleben und Differenzierung von Zellen regulieren. Die Komplexität dieser unterschiedlichen Kaskaden wird darin ersichtlich, dass nicht alle Zellen, die TNFRI exprimieren auch tatsächlich auf TNF ($TNF\alpha$ und $LT\alpha$ [$TNF\beta$]) mit einer Modulation des Wachstums reagieren, jedoch TNF in allen Zellen zu NF- κ B Aktivierung führt. $LT\beta$ wird zwar von mehreren Zellen produziert, d.h. DC, Makrophagen, NK, T und B Zellen, wobei jedoch dessen Rezeptor, $LT\beta$ R, nur von NK, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen exprimiert wird. Zudem scheint $LT\beta$ im Vergleich zu $LT\alpha$ jedoch mit weniger Signalkaskaden zu interagieren (zusammengefasst aus (Gaur and Aggarwal 2003)).

Sowohl durch $LT\alpha$ -Fusionsproteinbehandlung als auch im RIP-LT-Modell werden also funktionelle tertiäre lymphatische Gewebe induziert. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Flexibilität des Fusionsproteinmodells; ein tertiäres lymphatisches Gewebe kann in jedem antigenexprimierenden Gewebe induziert werden. Darüber hinaus wurde in unserem Modell nur kurzzeitig hohe $LT\alpha$ -Konzentrationen am Tumor bewirkt, da das Fusionsprotein 5 Tage verabreicht wurde und es eine ungefähre terminale Halbwertszeit

von 4 h besitzt (Gillies et al. 1993; Kendra et al. 1999), während im RIP-LT-Modell eine stetige Expression des $LT\alpha$ über Wochen besteht (Kratz et al. 1996). Nachdem Tumore jedoch Immunreaktionen hervorrufen, die denen von Entzündungen und Wundheilung stark ähneln (Balkwill and Mantovani 2001), scheint im vorliegenden Modell eine kurzfristige $LT\alpha$ Expression auszureichen, um ein tertiäres lymphatisches Gewebe zu induzieren. Dies könnte z.T. auch auf einen positiven *feedback loop*, wie er z.B. für $CD3^- CD4^+$ Vorläuferzellen in sich entwickelnden lymphatischen Organe vorgeschlagen wurde (Muller and Lipp 2003), basieren.

Bemerkenswert ist nicht nur, dass ein *priming* außerhalb sekundärer lymphatischer Gewebe stattfindet, sondern auch der resultierende klinische Effekt. Die Induktion eines tertiären lymphatischen Gewebes und das damit verbundene T-Zell *priming* direkt am Tumor sollte dazu führen, dass (i) durch die Präsenz von Tumorantigenen eine größere Anzahl Tumor-reaktiver T-Zellen induziert werden (Flynn et al. 1998), (ii) die Zeit zwischen *priming* und Expansion reduziert wird und (iii) die T-Zellantworten schneller auf Antigenveränderungen des Tumors reagieren können. Besonders wichtig ist dabei der Kontakt von Tumorzellen und T-Zellen. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Induktion zytotoxischer T-Zellen vom Eindringen der Tumorzellen in den Lymphknoten abhängig war. Tumore, die nicht in sekundäre lymphatische Gewebe eindringen oder aber von T-Zellen getrennt waren, wurden vom Immunsystem ignoriert (Ochsenbein et al. 2001). Diese Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein des direkten *priming*, d.h. den direkten Kontakt zwischen Tumorzelle und $CD8^+$ T-Lymphozyt, hin. Ein peritumorales lymphatisches Gewebe könnte somit wesentlich zur Induktion einer T-Zellantwort durch direktes *priming* beitragen.

4.2 Das humane Modell

Ob *in vivo* ein T-Zell *priming* außerhalb sekundärer lymphatischer Organe auch bereits durch einzelne Zellpopulationen erreicht werden kann war Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit. Der interessanteste Kandidat waren dabei DC, da ihnen eine entscheidende Rolle beim T-Zell *priming* zukommt (Marland et al. 1996). Da es zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten noch nicht möglich war, murine DC in großen Mengen FCS-frei zu gewinnen und zu kultivieren war das Mausmodell zur Überprüfung dieser Fragestellung ungeeignet.

Eine Möglichkeit, den Einfluss von antigenpräsentierenden, reifen DC auf T-Zellen außerhalb sekundärer lymphatischer Organe zu untersuchen, bot sich durch die Aufarbeitung von Vakzinierungsstellen von Melanompatienten. Von Experimenten in der Maus war bereits bekannt, dass nur ein geringer Teil der injizierten DC die Vakzinierungsstelle verläßt und zum Lymphknoten wandert (Eggert et al. 1999). Arbeiten im Menschen bestätigten diese Beobachtung: weniger als 10% der injizierten DC wandern in den regionären Lymphknoten (E. Kämpgen, persönliche Kommunikation), wobei der durchschnittliche Wert in einer größer angelegten Studie bei nur 1,8% lag (De Vries et al. 2003). Dementsprechend konnte mittels immunhistochemischer Färbungen die Präsenz von zahlreichen DC in den Injektionsstellen nachgewiesen werden. Außerdem fanden sich phänotypische Veränderungen wie z.B. die Expression von PNAd und Präsentation von TCA-4 in einigen Blutgefäßen. Dies war aber unabhängig von einer Beladung der DC mit Antigenen. Es liegt also Nahe, dass diese Veränderungen durch die Produktion diverser Zytokine in den DC hervorgerufen wurden. Diese Produktion hängt vom Reifungsgrad der DC und nicht von der Präsentation antigenbeladener MHC Klasse I-Moleküle ab. So exprimieren reife DC z.B. die Zytokine IFN- α , IFN- β , G-CSF, IL-1, IL-6 und IL-12 (Chen et al. 2001; Montoya et al. 2002) und die Lymphozyten anziehenden Chemokine CCL18

(DC-CK1), CCL19 (ELC), CCL22 (MDC) und CCL17 (TARC) (Vissers et al. 2001). Die Überexpression der Chemokine CCL18 und CXCL12 in den Vakzinierungsstellen im Vergleich zur normalen, unbehandelten Haut konnten wir in unseren Arbeiten bestätigen. Für die Rolle der DC als *nucleation site* bei der Organisation lymphatischer Strukturen im entzündeten Gewebe wird die Expression dieser Lymphozyten-anziehenden Chemokine als wesentlich betrachtet (Sallusto and Lanzavecchia 1999). Des Weiteren wird schon seit längerem vermutet, dass DC an der Initiation und dem Erhalt von HEV beteiligt sind (Girard and Springer 1995).

Ein Unterschied zwischen antigenbeladenen und unbeladenen DC zeigte sich erst bei der Analyse der T-Zellinfiltrate der jeweiligen Injektionsstellen. So war die Zahl der infiltrierenden T-Zellen, die durch antigenbeladene DC hervorgerufen wurde, wesentlich höher als in den Injektionsstellen von unbeladenen DC. Zudem waren MAA-reaktive T-Zellen nur in den Vakzinierungsstellen mit antigenbeladenen DC nachweisbar. Dieser quantitative und qualitative Unterschied beruht vermutlich darauf, dass nur für die Vakzinierungsstellen mit antigenbeladenen DC eine weitere Voraussetzung für das *priming* von T-Zellen gegeben war, nämlich die Präsentation von Antigenen. Diese führte wahrscheinlich zum *priming* und anschließender Proliferation von naiven antigenspezifischen T-Zellen bzw. Proliferation von antigenspezifischen Gedächtniszellen. Beide Zellpopulationen, d.h. antigenenerfahrene *central memory* und naive T-Zellen, konnten wir immunhistochemisch in den Vakzinierungsstellen identifizieren.

Neben dem stärkeren T-Zellinfiltrat lassen kleinere Anhäufungen von T-Zellen gleicher Spezifität vermuten, dass eine *in loco* Proliferation in den Vakzinierungsstellen mit antigenbeladenen DC stattfindet. Diese Hypothese wird durch die vergleichenden klonotypischen Kartierungen von Blut, spezifischen T-Zellen, welche aus diesem Blut isoliert waren, und der Vakzinierungsstelle bestätigt. So ließen sich keine identischen

Klone in den T-Zellpopulationen des Blutes und der Vakzinierungsstelle nachweisen. Damit ist es eher unwahrscheinlich, dass die Akkumulation der T-Zellklone in den Vakzinierungsstellen auf einer Rekrutierung von Klonen aus dem Blut beruht. Die Detektion von Ansammlungen spezifischer T-Zellen bereits 24 h nach der Injektion der DC scheint zwar relativ rasch, doch haben neuere Arbeiten gezeigt, dass während einer primären viralen Immunreaktion die Divisionsrate von CD8⁺ T-Zellen zwischen 8 und 24 h variiert (Murali-Krishna et al. 1998) und dass T-Zellen schon nach weniger als 2 h Kontakt mit APCs zu proliferieren beginnen (van Stipdonk et al. 2001). Interessanterweise scheint jedoch die Länge des Kontaktes vor der Zellteilung für das Schicksal der T-Zelle entscheidend zu sein. So führen kürzere Kontakte zu Toleranz, während längere Kontakte zu einer Aktivierung und gesteigerten Proliferation der T-Zellen führen (van Stipdonk et al. 2003). Für sekundäre Proliferationen von zytotoxischen T-Lymphozyten scheint außerdem die Präsenz von CD4⁺ T_{Helfer}-Zellen unabdingbar zu sein (Janssen et al. 2003). Eine weitere Erklärung für die rasche Proliferation MAA-reaktiver T-Zellen stellt das kürzlich vorgestellte *serial encounter* Modell der T-Zellaktivierung dar. Dieses Modell geht davon aus, dass die T-Zelle eine Reihe von spezifischen Antigenkontakten mit der gleichen oder verschiedenen DC aufsummieren muss, bevor sie aktiviert wird; die Aktivierung ist demnach sowohl von der Frequenz als auch von der Dauer des Antigenkontaktes abhängig (Gunzer et al. 2000). In den Vakzinierungsstellen findet sich eine hohe Zahl an DC, die identische Epitope präsentieren, was folglich äußerst günstig für eine rasche Aktivierung von T-Zellen ist.

Aus klinischer Sicht ist eine lokale Immunantwort, die auf die Vakzinierungsstellen begrenzt ist, für die Kontrolle des Tumors nicht ausreichend. Ob Vakzinierungspatienten eine systemische Antwort aufgebaut haben, kann mittels Analyse von PBL entweder durch direkten Nachweis tumorspezifischer T-Zellen mit Hilfe von Tetramerfärbungen oder Messung antigenspezifischer Ausschüttung von Zytokinen mittels ELISPOT nachgewiesen

werden. Mehrere Arbeitsgruppen konnten inzwischen zeigen, dass eine spezifische T-Zellantwort durch Vakzinierung mit tumorantigenbeladenen DC induzierbar ist (stellvertretend (Thurner et al. 1999; Pittet et al. 2001a)). In 5-20% der behandelten Patienten war zudem eine Tumorregression zu beobachten, die jedoch nicht immer mit der Detektion spezifischer T-Zellen korrelierte (Coulie and Bruggen 2003). Die Aussagefähigkeit der Charakterisierung der immunologischen Reaktivität des Blutes als Surrogatmarker bleibt daher weiterhin umstritten. So konnten wir einerseits in einem Melanompatienten die Persistenz von tumorspezifischen T-Zellklonen im Blut nachweisen, die jedoch nicht in der Lage waren, in die Metastasen des Patienten zu wandern (Schrama et al. 2001a). Andererseits konnten wir zeigen, dass die immunologische Reaktivität des Blutes und der Metastasen übereinstimmt und deren Verlauf auch mit dem klinischen Bild korreliert, so dass die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort zu verminderter Tumorlast des Patienten führte, wohingegen der Stillstand der Immunantwort mit einer Tumorprogression assoziiert war (Berger et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir auch bei der Untersuchung unseres aktuellen Patientenkollektives. Zwei der Patienten wurden intensiv immunologisch untersucht, wobei die Vakzinierung mit der Induktion bzw. Verstärkung einer tumorspezifischen Immunantwort einherging, die mit einer Stabilisierung der Krankheit assoziiert war. Der Zusammenbruch dieser spezifischen Immunantwort korrelierte jedoch mit der Progression des Melanoms (Andersen et al. 2001a). Der Ursprung der T-Zellantwort lässt sich jedoch im Menschen nicht endgültig klären: (i) eine Verstärkung bereits existierender Antworten, d.h. der Proliferation antigenempfindlicher Zellen, (ii) der lokalen Reaktionen in den Vakzinierungsstellen, (iii) DC, die in den Lymphknoten gelangen, oder (iv) einer Kombination dieser Möglichkeiten. Interessanterweise scheint die Effektivität von DC-Vakzinierungen größer, wenn diese intranodal statt dermal appliziert werden (De Vries et al. 2003). Somit scheint das

mögliche *in loco priming* ineffizienter als reguläres T-Zell *priming* im Lymphknoten zu sein.

Der Nachweis eines identischen Klons in der Vakzinierungsstelle und einer zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Metastase ist ein klares Indiz, dass die immunologische Reaktion in den Vakzinierungsstellen an der nachfolgenden Immunantwort gegen das Melanom beteiligt ist. Interessanterweise war dieser Klon in Metastasen, die vor der Vakzinierung entnommen waren, nicht nachweisbar. Zwar lässt sich hieraus nicht ableiten, ob der Klon das Ergebnis einer Proliferation einer antigenerfahrenen T-Zelle oder eines *in loco primings* war, jedoch verdeutlicht es, dass die immunologische Reaktion in den Vakzinierungsstellen nicht unbedeutend ist. Vielmehr scheinen die dort angereicherten T-Zellen in der Lage zu sein, Metastasen zu infiltrieren und erfüllen somit eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunantwort.

Die Frequenzen der MAA/HLA-A*0201 spezifischen T-Zellen in den Vakzinierungsstellen variierte von 0,5 – 12% der CD8⁺ Zellen, wobei bei polyvalenten Impfungen die Frequenz der MART-1/HLA-A*0201 spezifischen T-Zellen immer am höchsten war. Sogar in einer der Injektionsstellen mit unbeladenen DC waren MART-1/HLA-A*0201 spezifische T-Zellen detektierbar. Dies dürfte in den unterschiedlichen Ausgangsfrequenzen der jeweiligen T-Zellpopulationen begründet liegen, denn das Ausmaß einer Immunantwort ist zumindest theoretisch von der Frequenz geeigneter T-Zellen abhängig (Bousso and Kourilsky 1999). MART-1/MHC Klasse I spezifische T-Zellen sind bereits im Blut vieler gesunder Menschen nachweisbar (Pittet et al. 1999). Dementsprechend ist die relativ hohe Frequenz an MART-1/MHC Klasse I spezifischen T-Zellen in den Vakzinierungsstellen bzw. in Melanompatienten im generellen (Pittet et al. 2001b) nicht unerwartet. Da es sich bei den spezifischen T-Zellinfiltraten der Vakzinierungsstellen zum Teil auch um antigenerfahrene T-Zellen

handelt, sollte auch der Status dieser Zellen die Zusammensetzung des Infiltrats beeinflussen; die beobachtete Frequenz sollte mit dem Anteil an anergischen (Rivoltini et al. 2002) und klonal *exhausted* T-Zellen (Kesmir and De Boer 2003) reziprok korrelieren. Wir konnten in Patienten im Laufe einer Behandlung beobachten, dass sowohl die Frequenz von tumorspezifischen T-Zellen im Blut (von einer Zunahme am Beginn bis zu einem Einbruch am Ende der Behandlung) (Berger et al. 2004) als auch bei gleich bleibender Frequenz die Reaktivität der induzierten spezifischen Zellen variieren kann (Terheyden et al. 2003). Zusätzlich beeinflussen immunsupprimierende regulatorische T-Zellen, welche im Blut von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden vermehrt sind (Wolf et al. 2003), den Ausgang der *in vivo* DC/T-Zell Interaktion. Diese Überlegungen verdeutlichen die Komplexität der immunologischen Vorgänge in den geimpften Tumorpatienten. Diese Komplexität spiegelt sich dann auch in der hohen Variabilität der lokalen Reaktionen an den Vakzinierungsstellen wieder.

4.3 Verknüpfung der beiden Modelle

Nachdem in beiden hier vorgestellten Modellen ein *priming* von T-Zellen außerhalb von sekundärem lymphatischem Gewebe erfolgen kann, stellt sich die Frage, ob – obwohl in unterschiedlichen Spezies beobachtet – eine Verbindung zwischen den Modellen hergestellt werden kann. In der Tat konnte kürzlich gezeigt werden, dass *LT β R signaling* durch *LT $\alpha_1\beta_2$* für das *homing* von DC in der Milz notwendig ist (Wu et al. 1999). Dabei spielt der Chemokinrezeptor CCR7, dessen Expression während der Reifung der DC hochreguliert wird (Chen et al. 2001), und die damit verbundene chemotaktische Reaktion auf die Chemokine CCL19 und CCL21 eine große Rolle. CCL19 und CCL21 werden überwiegend in den T-Zellarealen von sekundären lymphatischen Organen exprimiert (Gretz et al. 2000; Luther et al. 2000). In der Milz von *LT α ^{-/-}*, *LT β ^{-/-}* und *LT β R^{-/-}* Mäusen ist die für diese Chemokine kodierende mRNA kaum nachweisbar und im Vergleich zu

normalen Mäusen ist die Anzahl von reifen DC stark verringert (Abe et al. 2003). Es besteht also ein positiver *feedback*: endothelial exprimiertes CCL21 ist nicht nur für das *homing* von naïven T-Zellen verantwortlich, sondern zieht ebenso reife DC an. Dadurch kommen beide Populationen in physischen Kontakt, wodurch eine Aktivierung der naïven T-Zellen bewirkt wird. Interessanterweise führt die Aktivierung von naïven CD4⁺ Zellen zur Induktion von LT $\alpha_1\beta_2$, welches wiederum die Expression von CCL21 und anderen Lymphozyten-anziehender Chemokine verstärkt (Weninger et al. 2003).

Analog lässt sich aber auch eine Verbindung ausgehend von der Injektion von reifen DC herstellen. Wie bereits erwähnt, wandert nur ein geringer Teil der injizierten DC in den Lymphknoten, der Großteil verbleibt in den Vakzinierungsstellen. Da reife DC CCL19 exprimieren (Katou et al. 2003), bewirkt dies die Attraktion von naïven T-Zellen. In den T-Zellarealen der Lymphknoten sind z.B. reife, CCL19 exprimierende DC von T-Zellen umgeben, die einen naïven Phänotyp aufweisen (Katou et al. 2003). Über den Kontakt zwischen reifen DC und naïven T-Zellen kommt es wiederum zur Aktivierung der naïven T-Zellen und damit zur Expression von LT $\alpha_1\beta_2$.

4.4 Die Rolle der sekundären lymphatischen Gewebe

Sowohl *in vitro*-Experimente (van Stipdonk et al. 2001; Langenkamp et al. 2002) als auch die hier präsentierten Ergebnisse demonstrieren, dass für ein *priming* von T-Zellen scheinbar nur der Kontakt geeigneter APCs und T-Zellen notwendig ist. *In vivo* koordinieren lymphatische Gewebe das Zusammentreffen von APCs, T- und B-Zellen. Dadurch ermöglichen und/oder beschleunigen sie die Induktion zellulärer und humoraler Immunantworten. Die ihnen dafür zur Verfügung stehenden wichtigsten „Werkzeuge“ sind spezielle Gefäße und die Expression von Chemokinen. Lymphknoten besitzen z.B. HEV, über die naïve T-Lymphozyten aus der Blutbahn übertreten können, und efferente und afferente Lymphgefäße, die den Eintritt von APCs und Lymphozyten erlauben. Die

Steuerung von APCs und T-Zellen zu T-Zellarealen innerhalb der sekundären lymphatischen Gewebe erfolgt über konstitutiv exprimierte Chemokine (Cyster 1999; von Andrian and Mackay 2000). Die sekundären lymphatischen Organe agieren sozusagen als „*meeting points*“ für APCs und T-Zellen und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass eine antigenbeladene APC auf eine T-Zelle mit dem geeigneten TCR trifft (Young 1999).

Das „Monopol“ der sekundären lymphatischen Organe für die Induktion von Immunantworten kann aber durch tertiäres lymphatisches Gewebe durchbrochen werden. Dies ist nicht nur im murinen Modell erkennbar, sondern lässt sich vielmehr auch bei chronischen Entzündungen wie Hepatitis C-Infektionen, Hashimoto-Thyreoiditis oder rheumatoider Synovitis beobachten (Freni et al. 1995; Imal and Yamakawa 1996; Takemura et al. 2001) Jedoch ist anzumerken, dass die Induktion von lymphatischen Geweben strikt reguliert wird. Erst eine länger anhaltende Entzündung im Gewebe scheint eine lymphatische Differenzierung, welche z.B. zu einer Entriegelung von positiven *feedback loops* führen, zu bewirken.

4.5 Ausblick

Die Induktion von tertiärem lymphatischem Gewebe ist strikt reguliert und tritt nur unter pathologischen Bedingungen, insbesondere Autoimmunkrankheiten auf (Olszewski 2002). Modifikationen des LT α -Fusionsproteins, so dass deren Spezifität verändert wird und somit LT α zielgerichtet in den unterschiedlichsten Geweben angereichert werden kann, ermöglicht es Mausmodelle für Autoimmunerkrankungen zu etablieren, welche mit der Induktion von tertiärem lymphatischem Gewebe assoziiert sind. Im bestehenden Mausmodell kann jedoch bereits untersucht werden, was mit dem induzierten lymphatischen Gewebe erfolgt, sollte die ursprüngliche Antigenquelle, d.h. der Tumor, komplett zerstört sein. Ein Grund für die strikte Regulierung von lymphatischem Gewebe

könnte darin bestehen, dass die Induktion von Autoimmunantworten durch tertiäres lymphatisches Gewebe erleichtert wird, nachdem diese an Stellen entstehen, die über andere zelluläre Zusammensetzungen als die sekundär lymphatischen Organe verfügen. Daher ist es interessant zu sehen, ob nach der Zerstörung des Tumors gegebenenfalls eine Autoimmunreaktion induziert wird, oder ob sich durch das Abklingen der Tumorimmunantwort das tertiäre lymphatische Gewebe zurückbildet.

Beim humanen Modell stellt sich die Frage, welchen Anteil die Immunreaktion in der Vakzinierungsstelle an der systemischen Immunreaktion gegen den Tumor besitzt. Diese Frage lässt sich jedoch wie oben ausgeführt im Menschen nicht klären. Jedoch ist die Gewinnung und Kultivierung von FCS-freien DC in der Maus verbessert worden (Eggert et al. 2002), so dass sich nun entsprechende Mausmodelle etablieren lassen. Somit kann den aufgeworfenen Fragen nachgegangen werden, indem z.B. wildtyp DC in syngenen *LT α knock-out* Mäuse injiziert werden. Dieser Mausstamm ist durch das Fehlen von peripheren Lymphknoten charakterisiert (Matsumoto et al. 1999). Damit sollte nur die Immunantwort, welche sich an der Vakzinierungsstelle abspielt, für den Erfolg der Behandlung verantwortlich sein. Ausgehend von diesem Modell könnte durch die Verwendung von DC aus unterschiedlichen *knock-out* Mausstämmen ein Anforderungsprofil für die injizierten DC erstellt werden.

5 Zusammenfassung

T-Zellimmunantworten werden normalerweise durch folgenden Weg initiiert: unreife dendritische Zellen nehmen Antigen in der Peripherie auf, wandern in die sekundären lymphatischen Organe, wobei sie auf ihrem Weg sowohl reifen als auch das Antigen prozessieren. In den sekundären lymphatischen Organen angekommen, präsentieren sie als reife dendritische Zellen den T-Zellen die Antigene in Form von Peptiden zusammen mit kostimulierenden Molekülen. Dadurch rufen sie eine spezifische T-Zellantwort hervor. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob nicht Situationen herbeigeführt werden können, die ein T-Zell *priming* außerhalb der sekundären lymphatischen Organe erlauben. Dazu wurden ein murines Modell, bei dem das Zytokin Lymphotoxin- α spezifisch am Tumor angereichert wurde, und ein humanes Modell, bei dem reife, antigenbeladene DC intradermal appliziert wurden, untersucht.

Im murinen Modell zeigte sich, dass die gerichtete Anreicherung von Lymphotoxin- α am Tumor zu dessen Zerstörung führte, welche durch T-Zellen vermittelt wurde, und mit der Induktion eines tertiären lymphatischen Gewebes am Tumor assoziiert war. Dieses tertiäre lymphatische Gewebe war durch die Kompartimentalisierung von T- und B-Zellen und der Präsenz von *high endothelial venules* charakterisiert und besaß zudem mit dendritischen Zellen und naiven T-Zellen alle Voraussetzungen für ein *in loco priming*. Dementsprechend konnte in der Folge der gerichteten Lymphotoxin- α Therapie im Tumor ein Anstieg am T-Zellinfiltrat, welches sich oligoklonal zusammensetzte, beobachtet werden. *In vitro* Experimente verdeutlichte die Tumorspezifität der Therapie-induzierten T-Zellantwort, da die T-Zellen auf ein Tumorantigen mit der Ausschüttung von Interferon- γ reagierten und die Tumorzellen lysierten.

Im humanen Modell wurden Hautbiopsien von Melanompatienten untersucht, denen im Rahmen einer klinischen Studie autologe, *in vitro* generierte und antigenbeladene DC

intradermal appliziert wurden. Die Patienten erlaubten die Entnahme von Hautbiopsien aus den Injektionsstellen für wissenschaftliche Untersuchungen. Eine Induktion bzw. Verstärkung einer spezifischen T-Zellantwort durch die Vakzinierung mit antigenbeladenen dendritischen Zellen konnte bereits in zahlreichen Arbeiten und auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv gezeigt werden. Bei der Analyse der Injektionsstellen zeigt sich, dass ein großer Teil der injizierten dendritischen Zellen in der Vakzinierungsstelle verharren und dass diese unabhängig von einer Beladung mit Antigen zu einer Induktion von *high endothelial venules* Charakteristika führte. Waren die dendritischen Zellen mit Antigen beladen, so führte dies zu einem stärkeren T-Zellinfiltrat in den Injektionsstellen, wobei sowohl naive als auch *central memory* T-Zellen nachgewiesen wurde. Diese Zellen wurden vermutlich durch die Überexpression der DC-CK1 und SDF1 Chemokinen in den Injektionsstellen, die chemotaktisch auf T-Zellen wirken, angezogen. Das Infiltrat in den Injektionsstellen war oligoklonal und wies tumorspezifische T-Zellen auf. Nachdem diese T-Zellklone im Blut der Patienten vor der Vakzinierung nicht nachweisbar waren, müssen sie zumindest in den Injektionsstellen expandiert sein. Interessanterweise konnte einer dieser Klone in Metastasen nachgewiesen werden, die **nach** der Vakzinierung dem Patienten entfernt wurden.

In beiden Modellen wurde also durch die Manipulation des Mikromilieus, d.h. Lymphotoxin- α Anreicherung am Tumor bzw. Injektion von reifen dendritischen Zellen in die Haut, Strukturen wie z.B. *high endothelial venules* induziert, die ein *in loco priming* ermöglichen sollten. Dementsprechend riefen diese Veränderungen ein Tumorantigen-spezifisches Infiltrat hervor. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass T-Zell *priming* auch außerhalb sekundärer lymphatischer Organe erfolgen kann. Prinzipiell scheint also nur der Kontakt von reifen, antigenbeladenen dendritischen Zellen mit den entsprechenden antigenspezifischen, naiven T-Zellen entscheiden zu sein. Die Möglichkeit des *in vitro primings* bekräftigt diese These. *In vivo* erfolgt dieses Aufeinandertreffen normalerweise in

den sekundären lymphatischen Organen, doch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Veränderungen des Mikromilieus diesen Kontakt auch in anderen Geweben ermöglicht.

6 Summary

Cellular immune responses are initiated by direct interaction of naïve T cells with professional antigen presenting cells, i.e., dendritic cells. In general, this interaction takes place in secondary lymphoid organs: immature dendritic cells capture antigen in the periphery, and while homing to the secondary lymphoid organs they mature and process the antigen. In these organs they present peptides derived from the antigen together with co-stimulatory molecules to the naïve T cells and thereby initiate an antigen-specific T cell response. In the present work we tested if situations can be created allowing priming outside secondary lymphoid organs. To this end, a murine model in which lymphotoxin- α was specifically accumulated at the tumor site and a human model where *in vitro* generated, matured and antigen pulsed dendritic cells were injected intradermal into the patients were investigated.

In the murine model the accumulation of lymphotoxin- α at the tumor site led to the eradication of the tumor. This therapeutic success was mediated by T cells and associated with the induction of a tertiary lymphoid tissue characterized by compartmentalized T and B cell aggregates and the presence of high endothelial venules. Moreover, with dendritic cells and naïve T cells present in these tissues requirements for *in loco* priming were fulfilled. Indeed, targeted lymphotoxin- α enlarged the T cell-infiltrate within the tumor. *In vitro* assays demonstrated the tumor-specificity of the therapy-induced infiltrate.

In the human model skin biopsies taken from melanoma patients receiving dendritic cell based vaccination and participating at a clinical I study were investigated. The patients provided informed consent to participate in this experimental procedure and to donate skin biopsies for immunological monitoring. Skin biopsies were taken from the injection sites in which autologous, *in vitro* generated, matured and antigen-pulsed dendritic cells were injected. Several reports including one about patients from the present patient cohort

demonstrated the induction and/or enhancement of tumor specific T cell responses subsequent to dendritic cells based vaccination therapy. Our analysis demonstrated that most of the injected dendritic cells were entrenched at the injection site. The mere presence of mature dendritic cells in the skin caused the induction of high endothelial venules. In case the dendritic cells were pulsed with antigen the T cell infiltrate was enlarged and consisted both of naïve and central memory T cells. These cells were presumably attracted by the overexpression of the T cell attractant chemokines DC-CK1 and SDF-1 leading to an oligoclonal T cell infiltrate composed partially of tumor specific T cells. As T cell clones detected within the injections sites were not present among the peripheral blood lymphocytes, these clones were at least expanded in the injection sites. Notably, one clone could be detected in metastases of one patient excised after the vaccination.

In both models manipulation of the microenvironment, i.e. targeting lymphotoxin- α to the tumor or injecting mature dendritic cells into the skin, respectively, induced structures like high endothelial venules which should enable *in loco* priming. Accordingly, these changes induced a tumor antigen specific T cell infiltrate. Thus, these results imply that T cells can be primed outside of secondary lymphoid tissues. Generally, the contact between mature, antigen presenting dendritic cells and the respective antigen specific T cells should be the only necessity for priming. Notably, the possibility of *in vitro* priming sustains this thesis. *In vivo* secondary lymphoid organs enable this contact. The present work, however, demonstrates that this contact can also take place in different tissue caused by manipulation of the respective microenvironment.

7 Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammonium Persulfat
BSA	bovines Serum Albumin
BV	beta variable [variables Gensegment der β Kette des TCR]
CCR7	CC-Chemokin-Rezeptor 7
CM	Komplettmedium
D	<i>diversity</i>
DC	Dendritische Zelle
DC-CK1	<i>dendritic cell-derived C-C chemokine 1 (CCL18)</i>
DGGE	Denaturierendes Gradientengel Elektrophorese
ELC	<i>Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine (CCL19)</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	<i>high endothelial venules</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin

IL2	Interleukin-2
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
J	<i>joining</i>
LT α	Lymphotoxin- α (auch Tumornekrosefaktor β)
LT β	Lymphotoxin- β
MAA	Melanomassoziierte Antigene
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2)</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1-α (CCL3)</i>
NK Zellen	natürliche Killerzellen
PBL	<i>peripheral blood lymphocyte</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salt</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNAd	<i>peripheral node addressin</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted (CCL5)</i>
RIP	Ratten Insulin Promotor
RSS	<i>recognition signal sequence</i>
RT-PCR	reversen Transkriptase-PCR
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1 (CXCL12)</i>

sLT α	lösliches Lymphotoxin- α
TCA-4	<i>thymus-derived chemotactic agent 4</i> (CCL21)
TCR	T-Zellrezeptor
TIL	Tumor infiltrierender Lymphozyt
T _m	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
V	<i>variable</i>

8 Literatur

- Abe, K.; Yarovinsky, F.O.; Murakami, T.; Shakhov, A.N.; Tumanov, A.V.; Ito, D.; Drutskaya, L.N.; Pfeffer, K.; Kuprash, D.V.; Komschlies, K.L. and Nedospasov, S.A. 2003. Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. *Blood* 101(4):1477-83.
- Agyekum, S.; Church, A.; Sohail, M.; Krausz, T.; Van Noorden, S.; Polak, J. and Cohen, J. 2003. Expression of lymphotoxin-beta (LT-beta) in chronic inflammatory conditions. *J. Pathol.* 199(1):115-21.
- Andersen, M.H.; Keikavoussi, P.; Bröcker, E.B.; Schuler-Thurner, B.; Jonassen, M.; Sondergaard, I.; Straten, P.P.; Becker, J.C. and Kämpgen, E. 2001a. Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: Cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int. J. Cancer* 94(6):820-4.
- Andersen, M.H.; Pedersen, L.; Capeller, B.; Bröcker, E.B.; Becker, J.C. and thor Straten, P. 2001b. Spontaneous Cytotoxic T-Cell Responses against Survivin-derived MHC Class I-restricted T-Cell Epitopes in Situ As Well As ex Vivo in Cancer Patients. *Cancer Res* 61(16):5964-8.
- Arstila, T.P.; Casrouge, A.; Baron, V.; Even, J.; Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286(5441):958-61.
- Baird, A.M.; Gerstein, R.M. and Berg, L.J. 1999. The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 11(2):157-66.
- Balkwill, F. and Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357(9255):539-45.
- Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.J.; Pulendran, B. and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Bastian, B.C. 2003. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene* 22(20):3081-6.
- Bazzoni, F. and Beutler, B. 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334(26):1717-25.
- Becker, J.C.; Pancook, J.D.; Gillies, S.D.; Furukawa, K. and Reisfeld, R.A. 1996a. T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. *J Exp Med* 183(5):2361-6.

- Becker, J.C.; Pancook, J.D.; Gillies, S.D.; Mendelsohn, J. and Reisfeld, R.A. 1996b. Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93(7):2702-7.
- Becker, J.C.; Varki, N.; Gillies, S.D.; Furukawa, K. and Reisfeld, R.A. 1996c. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93(15):7826-31.
- Berger, T.G.; Haendle, I.; Schrama, D.; Luftl, M.; Bauer, N.; Pedersen Ls, L.O.; Schuler-Thurner, B.; Hohenberger, W.; Straten, P.P.; Schuler, G. and Becker, J.C. 2004. Circulation and homing of melanoma-reactive T cells to both cutaneous and visceral metastases after vaccination with monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Cancer* 111(2):229-37.
- Bloom, M.B.; Perry-Lalley, D.; Robbins, P.F.; Li, Y.; el Gamil, M.; Rosenberg, S.A. and Yang, J.C. 1997. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J. Exp. Med.* 185(3):453-9.
- Bousso, P. and Kourilsky, P. 1999. A clonal view of alphabeta T cell responses. *Semin Immunol* 11(6):423-31.
- Bradley, L.M.; Malo, M.E.; Fong, S.; Tonkonogy, S.L. and Watson, S.R. 1998. Blockade of both L-selectin and alpha4 integrins abrogates naive CD4 cell trafficking and responses in gut-associated lymphoid organs. *Int. Immunol.* 10(7):961-8.
- Bromley, S.K.; Burack, W.R.; Johnson, K.G.; Somersalo, K.; Sims, T.N.; Sumen, C.; Davis, M.M.; Shaw, A.S.; Allen, P.M. and Dustin, M.L. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375-96.
- Brouard, S.; Gagne, K.; Blancho, G. and Soulillou, J.P. 1999. T cell response in xenorecognition and xenografts: a review. *Hum. Immunol.* 60(6):455-68.
- Burastero, S.E.; Rossi, G.A. and Crimi, E. 1998. Selective differences in the expression of the homing receptors of helper lymphocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 89(2):110-6.
- Butcher, E.C. and Picker, L.J. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272(5258):60-6.
- Chen, Z.; Dehm, S.; Bonham, K.; Kamencic, H.; Juurlink, B.; Zhang, X.; Gordon, J.R. and Xiang, J. 2001. DNA array and biological characterization of the impact of the maturation status of mouse dendritic cells on their phenotype and antitumor vaccination efficacy. *Cell Immunol.* 214(1):60-71.
- Clark, W.H., Jr.; Elder, D.E.; Guerry, D.; Braitman, L.E.; Trock, B.J.; Schultz, D.; Synnestvedt, M. and Halpern, A.C. 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81(24):1893-904.

- Coulie, P.G. and Bruggen, P. 2003. T-cell responses of vaccinated cancer patients. *Curr. Opin. Immunol.* 15(2):131-7.
- Cuff, C.A.; Sacca, R. and Ruddle, N.H. 1999. Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LTalpha3 and LTalphabeta in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. *J Immunol* 162(10):5965-72.
- Cyster, J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286(5447):2098-102.
- Cyster, J.G. 2000. Leukocyte migration: scent of the T zone. *Curr Biol* 10(1):R30-R33.
- Daniotti, M.; Oggionni, M.; Ranzani, T.; Vallacchi, V.; Campi, V.; Di Stasi, D.; Torre, G.D.; Perrone, F.; Luoni, C.; Suardi, S.; Frattini, M.; Pilotti, S.; Anichini, A.; Tragni, G.; Parmiani, G.; Pierotti, M.A. and Rodolfo, M. 2004. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 23(35):5968-77.
- Dano, K.; Andreasen, P.A.; Grondahl-Hansen, J.; Kristensen, P.; Nielsen, L.S. and Skriver, L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266.
- Davenport, M.P.; Grimm, M.C. and Lloyd, A.R. 2000. A homing selection hypothesis for T-cell trafficking. *Immunol. Today* 21(7):315-7.
- de Groot, F.M.; Damen, E.W. and Scheeren, H.W. 2001. Anticancer prodrugs for application in monotherapy: targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors. *Curr. Med. Chem.* 8(9):1093-122.
- De Vries, I.J.; Krooshoop, D.J.; Scharenborg, N.M.; Lesterhuis, W.J.; Diepstra, J.H.; Van Muijen, G.N.; Strijk, S.P.; Ruers, T.J.; Boerman, O.C.; Oyen, W.J.; Adema, G.J.; Punt, C.J. and Figdor, C.G. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63(1):12-7.
- Dimitrijevic, N.; Winkler, C.; Wellbrock, C.; Gomez, A.; Duschl, J.; Altschmied, J. and Schartl, M. 1998. Activation of the Xmrk proto-oncogene of Xiphophorus by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* 16(13):1681-90.
- Drayton, D.L.; Chan, K.; Lesslauer, W.; Lee, J.; Ying, X.Y. and Ruddle, N.H. 2002. Lymphocyte traffic in lymphoid organ neogenesis: differential roles of LTalpha and LTalphabeta. *Adv. Exp. Med. Biol.* 512:43-8.
- Du Pasquier L, Flajnik M. 1999. Origin and evolution of the vertebrate immune system. In: Paul.W.E., editor. *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p 605-50.

- Dummer, R.; Nestle, F.O.; Hofbauer, G.; Boni, R. and Burg, G. 1998. Therapie des kutanen Melanoms. *Ther. Umsch.* 55(8):509-14.
- Duran, G.E.; Santolaya, R. and Requena, T. 1999. Treatment of malignant melanoma. *Ann. Pharmacother.* 33(6):730-8.
- Eggermont, A.M.; Schraffordt, K.H.; Klausner, J.M.; Kroon, B.B.; Schlag, P.M.; Lienard, D.; van Geel, A.N.; Hoekstra, H.J.; Meller, I.; Nieweg, O.E.; Kettelhack, C.; Ben Ari, G.; Pector, J.C. and Lejeune, F.J. 1996. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann. Surg.* 224(6):756-64.
- Eggert, A.O.; Becker, J.C.; Ammon, M.; McLellan, A.D.; Renner, G.; Merkel, A.; Bröcker, E.B. and Kämpgen, E. 2002. Specific peptide-mediated immunity against established melanoma tumors with dendritic cells requires IL-2 and fetal calf serum-free cell culture. *Eur. J. Immunol.* 32(1):122-7.
- Eggert, A.O.; Schreurs, M.W.; Boerman, O.C.; Oyen, W.J.; de Boer, A.J.; Punt, C.J.; Figdor, C.G. and Adema, G.J. 1999. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res.* 59(14):3340-5.
- Flynn, K.J.; Belz, G.T.; Altman, J.D.; Ahmed, R.; Woodland, D.L. and Doherty, P.C. 1998. Virus-specific CD8⁺ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. *Immunity* 8(6):683-91.
- Forni, G.; Giovarelli, M.; Santoni, A.; Modesti, A. and Forni, M. 1987. Interleukin 2 activated tumor inhibition in vivo depends on the systemic involvement of host immunoreactivity. *J. Immunol.* 138(11):4033-41.
- Freni, M.A.; Artuso, D.; Gerken, G.; Spanti, C.; Marafioti, T.; Alessi, N.; Spadaro, A.; Ajello, A. and Ferrau, O. 1995. Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C: occurrence, immunohistochemical characterization, and relation to markers of autoimmunity. *Hepatology* 22(2):389-94.
- Fu, Y.X. and Chaplin, D.D. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17:399-433.
- Futterer, A.; Mink, K.; Luz, A.; Kosco-Vilbois, M.H. and Pfeffer, K. 1998. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9(1):59-70.
- Garbe, C. 2000. Zunehmende Häufigkeit des malignen Melanoms. *Hautarzt* 51(7):518.
- Garcia, K.C.; Teyton, L. and Wilson, I.A. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 17:369-97.

- Gaur, U. and Aggarwal, B.B. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 66(8):1403-8.
- Gillies, S.D.; Young, D.; Lo, K.M.; Foley, S.F. and Reisfeld, R.A. 1991. Expression of genetically engineered immunoconjugates of lymphotoxin and a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody. *Hybridoma* 10(3):347-56.
- Gillies, S.D.; Young, D.; Lo, K.M. and Roberts, S. 1993. Biological activity and in vivo clearance of antitumor antibody/cytokine fusion proteins. *Bioconjug Chem* 4(3):230-5.
- Girard, J.P. and Springer, T.A. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* 16(9):449-57.
- Goldstein, B.G. and Goldstein, A.O. 2001. Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am. Fam. Physician* 63(7):1359-68, 1374.
- Grabbe, S.; Bruvers, S.; Gallo, R.L.; Knisely, T.L.; Nazareno, R. and Granstein, R.D. 1991. Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J. Immunol.* 146(10):3656-61.
- Gretz, J.E.; Norbury, C.C.; Anderson, A.O.; Proudfoot, A.E. and Shaw, S. 2000. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J Exp. Med.* 192(10):1425-40.
- Guldberg, P.; Gronbak, K.; Aggerholm, A.; Platz, A.; thor, S.P.; Ahrenkiel, V.; Hokland, P. and Zeuthen, J. 1998. Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulphite denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 26(6):1548-9.
- Gunzer, M.; Schafer, A.; Borgmann, S.; Grabbe, S.; Zanker, K.S.; Bröcker, E.B.; Kämpgen, E. and Friedl, P. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity.* 13(3):323-32.
- Haraguchi, M.; Yamashiro, S.; Yamamoto, A.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Lloyd, K.O. and Shiku, H. 1994. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8- sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10455-9.
- Iezzi, G.; Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8(1):89-95.
- Imal, Y. and Yamakawa, M. 1996. Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. *Pathol. Int.* 46(11):807-33.
- Janeway C, Travers P. 1995. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Janssen, E.M.; Lemmens, E.E.; Wolfe, T.; Christen, U.; von Herrath, M.G. and Schoenberger, S.P. 2003. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421(6925):852-6.
- Kaech, S.M. and Ahmed, R. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* 2(5):415-22.
- Katou, F.; Ohtani, H.; Nakayama, T.; Nagura, H.; Yoshie, O. and Motegi, K. 2003. Differential expression of CCL19 by DC-Lamp⁺ mature dendritic cells in human lymph node versus chronically inflamed skin. *J Pathol.* 199(1):98-106.
- Kendra, K.; Gan, J.; Ricci, M.; Surfus, J.; Shaker, A.; Super, M.; Frost, J.D.; Rakhmilevich, A.; Hank, J.A.; Gillies, S.D. and Sondel, P.M. 1999. Pharmacokinetics and stability of the ch14.18-interleukin-2 fusion protein in mice. *Cancer Immunol Immunother* 48(5):219-29.
- Kesmir, C. and De Boer, R.J. 2003. Clonal exhaustion as a result of immune deviation. *Bull. Math. Biol.* 65(3):359-74.
- Kirkin, A.F.; Dzhandzhugazyan, K. and Zeuthen, J. 1998. The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 15(1):19-32.
- Klenerman, P.; Cerundolo, V. and Dunbar, P.R. 2002. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nat. Rev. Immunol.* 2(4):263-72.
- Koni, P.A.; Sacca, R.; Lawton, P.; Browning, J.L.; Ruddle, N.H. and Flavell, R.A. 1997. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6(4):491-500.
- Kraal, G.; Duijvestijn, A.M. and Hendriks, H.H. 1987. The endothelium of the high endothelial venule: a specialized endothelium with unique properties. *Exp. Cell Biol.* 55(1):1-10.
- Kratz, A.; Campos-Neto, A.; Hanson, M.S. and Ruddle, N.H. 1996. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 183(4):1461-72.
- Kumar, R.; Angelini, S.; Snellman, E. and Hemminki, K. 2004. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J. Invest Dermatol.* 122(2):342-8.
- Kuo, C.T. and Leiden, J.M. 1999. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 17:149-87.
- Langenkamp, A.; Casorati, G.; Garavaglia, C.; Dellabona, P.; Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2002. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *Eur. J Immunol.* 32(7):2046-54.

- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12(1):92-8.
- Lappin, M.B.; Weiss, J.M.; Delattre, V.; Mai, B.; Dittmar, H.; Maier, C.; Manke, K.; Grabbe, S.; Martin, S. and Simon, J.C. 1999. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology* 98(2):181-8.
- Lerman, L.S.; Fischer, S.G.; Hurley, I.; Silverstein, K. and Lumelsky, N. 1984. Sequence-determined DNA separations. *Annu Rev Biophys Bioeng* 13:399-423.
- Li, G. and Herlyn, M. 2000. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today* 6(4):163-9.
- Livak, F.; Tourigny, M.; Schatz, D.G. and Petrie, H.T. 1999. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 162(5):2575-80.
- Loetscher, H.; Pan, Y.C.; Lahm, H.W.; Gentz, R.; Brockhaus, M.; Tabuchi, H. and Lesslauer, W. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61(2):351-9.
- Luther, S.A.; Bidgol, A.; Hargreaves, D.C.; Schmidt, A.; Xu, Y.; Paniyadi, J.; Matloubian, M. and Cyster, J.G. 2002. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 169(1):424-33.
- Luther, S.A.; Tang, H.L.; Hyman, P.L.; Farr, A.G. and Cyster, J.G. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 97(23):12694-9.
- Mallick, C.A.; Dudley, E.C.; Viney, J.L.; Owen, M.J. and Hayday, A.C. 1993. Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 73(3):513-9.
- Marks, R. 2000. Epidemiology of melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 25(6):459-63.
- Marland, G.; Bakker, A.B.; Adema, G.J. and Figdor, C.G. 1996. Dendritic cells in immune response induction. *Stem Cells* 14(5):501-7.
- Matsumoto, M.; Iwamasa, K.; Rennert, P.D.; Yamada, T.; Suzuki, R.; Matsushima, A.; Okabe, M.; Fujita, S. and Yokoyama, M. 1999. Involvement of distinct cellular compartments in the abnormal lymphoid organogenesis in lymphotoxin-alpha-deficient mice and alymphoplasia (*aly*) mice defined by the chimeric analysis. *J. Immunol.* 163(3):1584-91.

- Matsushima, A.; Kaisho, T.; Rennert, P.D.; Nakano, H.; Kurosawa, K.; Uchida, D.; Takeda, K.; Akira, S. and Matsumoto, M. 2001. Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp. Med.* 193(5):631-6.
- Mihm, M.C., Jr.; Clemente, C.G. and Cascinelli, N. 1996. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 74(1):43-7.
- Moerch, U.; Schrama, D.; Guldborg, P.; Seremet, T.; Zeuthen, J.; Becker, J.C. and thor Straten, P. 2000. Comparative delineation of T cell clonotypes in coexisting syngeneic B16 melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 49(8):426-32.
- Montoya, M.; Schiavoni, G.; Mattei, F.; Gresser, I.; Belardelli, F.; Borrow, P. and Tough, D.F. 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99(9):3263-71.
- Muller, G. and Lipp, M. 2003. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr. Opin. Immunol.* 15(2):217-24.
- Murali-Krishna, K.; Altman, J.D.; Suresh, M.; Sourdive, D.J.; Zajac, A.J.; Miller, J.D.; Slansky, J. and Ahmed, R. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 8(2):177-87.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2(3):317-22.
- Nemazee, D. 2000. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 18:19-51.
- Nonaka, M. 2001. Evolution of the complement system. *Curr. Opin. Immunol.* 13(1):69-73.
- Norment, A.M. and Bevan, M.J. 2000. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin. Immunol.* 12(5):445-55.
- Ochsenbein, A.F.; Sierro, S.; Odermatt, B.; Pericin, M.; Karrer, U.; Hermans, J.; Hemmi, S.; Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411(6841):1058-64.
- Olszewski, W.L. 2002. De novo lymph node formation in chronic inflammation of the human leg. *Ann N. Y. Acad Sci* 979:166-77.
- Omholt, K.; Platz, A.; Kanter, L.; Ringborg, U. and Hansson, J. 2003. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 9(17):6483-8.

- Pannetier, C.; Cochet, S.; Darche, A.; Casrouge, A.; Zoller, M. and Kourilsky P. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4319-23.
- Pardoll, D.M. 1995. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 13:399-415.
- Parkin, J. and Cohen, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270):1777-89.
- Petrie, H.T.; Livak, F.; Burtrum, D. and Mazel, S. 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J Exp Med* 182(1):121-7.
- Pittet, M.J.; Speiser, D.E.; Lienard, D.; Valmori, D.; Guillaume, P.; Dutoit, V.; Rimoldi, D.; Lejeune, F.; Cerottini, J.C. and Romero, P. 2001a. Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8+ T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin. Cancer Res.* 7(3 Suppl):796s-803s.
- Pittet, M.J.; Speiser, D.E.; Valmori, D.; Rimoldi, D.; Lienard, D.; Lejeune, F.; Cerottini, J.C. and Romero, P. 2001b. Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8+ T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients. *Int. Immunopharmacol.* 1(7):1235-47.
- Pittet, M.J.; Valmori, D.; Dunbar, P.R.; Speiser, D.E.; Lienard, D.; Lejeune, F.; Fleischhauer, K.; Cerundolo, V.; Cerottini, J.C. and Romero, P. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp. Med.* 190(5):705-15.
- Premier, R.R. and Meeusen, E.N. 1998. Lymphocyte surface marker and cytokine expression in peripheral and mucosal lymph nodes. *Immunology* 94(3):363-7.
- Reisfeld, R.A.; Becker, J.C. and Gillies, S.D. 1997. Immunocytokines: a new approach to immunotherapy of melanoma. *Melanoma Res* 7 Suppl 2:S99-106.
- Reisfeld, R.A.; Gillies, S.D.; Mendelsohn, J.; Varki, N.M. and Becker, J.C. 1996. Involvement of B lymphocytes in the growth inhibition of human pulmonary melanoma metastases in athymic nu/nu mice by an antibody- lymphotoxin fusion protein. *Cancer Res* 56(8):1707-12.
- Rivoltini, L.; Carrabba, M.; Huber, V.; Castelli, C.; Novellino, L.; Dalerba, P.; Mortarini, R.; Arancia, G.; Anichini, A.; Fais, S. and Parmiani, G. 2002. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol. Rev.* 188:97-113.

- Rogers, P.R.; Dubey, C. and Swain, S.L. 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164(5):2338-46.
- Ruddle, N.H. 1999. Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol Res* 19(2-3):119-25.
- Sacca, R.; Cuff, C.A.; Lesslauer, W. and Ruddle, N.H. 1998. Differential activities of secreted lymphotoxin-alpha3 and membrane lymphotoxin-alpha1beta2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. *J Immunol* 160(1):485-91.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189(4):611-4.
- Sallusto, F.; Lenig, D.; Forster, R.; Lipp, M. and Lanzavecchia, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-12.
- Salmi, M.; Hellman, J. and Jalkanen, S. 1998. The role of two distinct endothelial molecules, vascular adhesion protein-1 and peripheral lymph node addressin, in the binding of lymphocyte subsets to human lymph nodes. *J Immunol* 160(11):5629-36.
- Schaed, S.; Otto, K.; Opitz, A.; Bröcker, E.B.; Becker, J.C. and Kämpgen, E. 2004. Antigen specific immune responses of melanoma patients following vaccination with peptide loaded dendritic cells as second line therapy are indicative of a prolonged survival. 31st annual meeting of the ADF Dresden.
- Schartl, A.; Dimitrijevic, N. and Schartl, M. 1994. Evolutionary origin and molecular biology of the melanoma-inducing oncogene of Xiphophorus. *Pigment Cell Res.* 7(6):428-32.
- Schrama, D.; Andersen, M.H.; Terheyden, P.; Schroder, L.; Pedersen, L.O.; thor Straten, P. and Becker, J.C. 2001a. Oligoclonal T-cell receptor usage of melanocyte differentiation antigen-reactive T cells in stage IV melanoma patients. *Cancer Res.* 61(2):493-6.
- Schrama, D.; thor Straten, P.; Fischer, W.H.; McLellan, A.D.; Bröcker, E.; Reisfeld, R.A. and Becker, J.C. 2001b. Targeting of Lymphotoxin-alpha to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. *Immunity* 14(2):111-21.
- Scimone, M.L.; Felbinger, T.W.; Mazo, I.B.; Stein, J.V.; von Andrian, U.H. and Weninger, W. 2004. CXCL12 Mediates CCR7-independent Homing of Central Memory Cells, But Not Naive T Cells, in Peripheral Lymph Nodes. *J. Exp. Med.* 199(8):1113-20.

- Sebzda, E.; Mariathasan, S.; Ohteki, T.; Jones, R.; Bachmann, M.F. and Ohashi, P.S. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17:829-74.
- Shah, A.; Unger, E.; Bain, M.D.; Bruce, R.; Bodkin, J.; Ginnetti, J.; Wang, W.C.; Seon, B.; Stewart, C.C. and Evans, S.S. 2002. Cytokine and adhesion molecule expression in primary human endothelial cells stimulated with fever-range hyperthermia. *Int. J Hyperthermia* 18(6):534-51.
- Sheffield, V.C.; Cox, D.R.; Lerman, L.S. and Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1):232-6.
- Shrikant, P. and Mescher, M.F. 1999. Control of syngeneic tumor growth by activation of CD8+ T cells: efficacy is limited by migration away from the site and induction of nonresponsiveness. *J Immunol* 162(5):2858-66.
- Speiser, D.E.; Miranda, R.; Zakarian, A.; Bachmann, M.F.; McKall-Faienza, K.; Odermatt, B.; Hanahan, D.; Zinkernagel, R.M. and Ohashi, P.S. 1997. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J. Exp. Med.* 186(5):645-53.
- Stein, J.V.; Rot, A.; Luo, Y.; Narasimhaswamy, M.; Nakano, H.; Gunn, M.D.; Matsuzawa, A.; Quackenbush, E.J.; Dorf, M.E. and von Andrian, U.H. 2000. The CC Chemokine Thymus-derived Chemotactic Agent 4 (TCA-4, Secondary Lymphoid Tissue Chemokine, 6Ckine, Exodus-2) Triggers Lymphocyte Function-associated Antigen 1-mediated Arrest of Rolling T Lymphocytes in Peripheral Lymph Node High Endothelial Venues. *J Exp Med* 191(1):61-76.
- Suzue, K.; Reinherz, E.L. and Koyasu, S. 2001. Critical role of NK but not NKT cells in acute rejection of parental bone marrow cells in F1 hybrid mice. *Eur. J Immunol.* 31(11):3147-52.
- Takemura, S.; Braun, A.; Crowson, C.; Kurtin, P.J.; Cofield, R.H.; O'Fallon, W.M.; Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. 2001. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* 167(2):1072-80.
- Terheyden, P.; Schrama, D.; Pedersen, L.O.; Keikavoussi, P.; Andersen, M.H.; Bröcker, E.B.; Kämpgen, E.; thor Straten, P. and Becker, J.C. 2003. Loss of functional activity in MART-1/HLA-A2-reactive T cells over the course of Melanoma progression. *Scandinavian Journal of Immunology* in press.
- thor Straten, P.; Barfoed, A.; Seremet, T.; Saeterdal, I.; Zeuthen, J. and Guldberg, P. 1998a. Detection and characterization of alpha-beta-T-cell clonality by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Biotechniques* 25(2):244-50.

- thor Straten, P.; Becker, J.C.; Seremet, T.; Bröcker, E.B. and Zeuthen, J. 1996. Clonal T cell responses in tumor infiltrating lymphocytes from both regressive and progressive regions of primary human malignant melanoma. *J Clin Invest* 98(2):279-84.
- thor Straten, P.; Guldberg, P.; Gronbaek, K.; Hansen, M.R.; Kirkin, A.F.; Seremet, T.; Zeuthen, J. and Becker, J.C. 1999. In situ T cell responses against melanoma comprise high numbers of locally expanded T cell clonotypes. *J Immunol* 163(1):443-7.
- thor Straten, P.; Guldberg, P.; Seremet, T.; Reisfeld, R.A.; Zeuthen, J. and Becker, J.C. 1998b. Activation of preexisting T cell clones by targeted interleukin 2 therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15):8785-90.
- thor Straten, P.; Kirkin, A.F.; Siim, E.; Dahlstrom, K.; Drzewiecki, K.T.; Seremet, T.; Zeuthen, J.; Becker, J.C. and Guldberg, P. 2000. Tumor infiltrating lymphocytes in melanoma comprise high numbers of T-cell clonotypes that are lost during in vitro culture. *Clin. Immunol.* 96(2):94-9.
- Turner, B.; Haendle, I.; Roder, C.; Dieckmann, D.; Keikavoussi, P.; Jonuleit, H.; Bender, A.; Maczek, C.; Schreiner, D.; von den, D.P.; Bröcker, E.B.; Steinman, R.M.; Enk, A.; Kämpgen, E. and Schuler, G. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190(11):1669-78.
- Timmerman, J.M. and Levy, R. 1999. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* 50:507-29.
- van Stipdonk, M.J.; Hardenberg, G.; Bijker, M.S.; Lemmens, E.E.; Droin, N.M.; Green, D.R. and Schoenberger, S.P. 2003. Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat. Immunol.* 4(4):361-5.
- van Stipdonk, M.J.; Lemmens, E.E. and Schoenberger, S.P. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2(5):423-9.
- Vinuesa, C.G. and Cook, M.C. 2001. The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: implications for immunodeficiency and immunopathology. *Curr. Mol. Med.* 1(6):689-725.
- Vissers, J.L.; Hartgers, F.C.; Lindhout, E.; Teunissen, M.B.; Figdor, C.G. and Adema, G.J. 2001. Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc. Biol.* 69(5):785-93.
- von Andrian, U.H. and Mackay, C.R. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J Med.* 343(14):1020-34.

- von Boehmer, H.; Aifantis, I.; Feinberg, J.; Lechner, O.; Saint-Ruf, C.; Walter, U.; Buer, J. and Azogui, O. 1999. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 11(2):135-42.
- Wack, A.; Montagna, D.; Dellabona, P. and Casorati, G. 1996. An improved PCR-heteroduplex method permits high-sensitivity detection of clonal expansions in complex T cell populations. *J Immunol* 196:181-92.
- Walker, G.J. and Hayward, N.K. 2002. Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J. Invest Dermatol.* 119(4):783-92.
- Warnock, R.A.; Campbell, J.J.; Dorf, M.E.; Matsuzawa, A.; McEvoy, L.M. and Butcher, E.C. 2000. The Role of Chemokines in the Microenvironmental Control of T versus B Cell Arrest in Peyer's Patch High Endothelial Venues. *J Exp Med* 191(1):77-88.
- Watts, T.H. and DeBenedette, M.A. 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* 11(3):286-93.
- Wellbrock, C.; Gomez, A. and Scharl, M. 1997. Signal transduction by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk in melanoma formation of Xiphophorus. *Pigment Cell Res.* 10(1-2):34-40.
- Wellbrock, C.; Gomez, A. and Scharl, M. 2002. Melanoma development and pigment cell transformation in xiphophorus. *Microsc. Res. Tech.* 58(6):456-63.
- Weninger, W.; Carlsen, H.S.; Goodarzi, M.; Moazed, F.; Crowley, M.A.; Baekkevold, E.S.; Cavanagh, L.L. and von Andrian, U.H. 2003. Naive T Cell Recruitment to Nonlymphoid Tissues: A Role for Endothelium-Expressed CC Chemokine Ligand 21 in Autoimmune Disease and Lymphoid Neogenesis. *J Immunol.* 170(9):4638-48.
- Weninger, W.; Crowley, M.A.; Manjunath, N. and von Andrian, U.H. 2001. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 194(7):953-66.
- Weninger, W.; Manjunath, N. and von Andrian, U.H. 2002. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 186(1):221-33.
- Westermann, J. and Pabst, R. 1996. How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells? *Immunol Today* 17(6):278-82.
- Wolf, A.M.; Wolf, D.; Steurer, M.; Gastl, G.; Gunsilius, E. and Grubeck-Loebenstien, B. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 9(2):606-12.
- Wu, Q.; Wang, Y.; Wang, J.; Hedgeman, E.O.; Browning, J.L. and Fu, Y.X. 1999. The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 190(5):629-38.

- Yamamoto, K.; Sakoda, H.; Nakajima, T.; Kato, T.; Okubo, M.; Dohi, M.; Mizushima, Y.; Ito, K. and Nishioka, K. 1992. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis. *Int Immunol* 4:1219-23.
- Yoshino, H.; Ueda, T.; Kawahata, M.; Kobayashi, K.; Ebihara, Y.; Manabe, A.; Tanaka, R.; Ito, M.; Asano, S.; Nakahata, T. and Tsuji, K. 2000. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant*. 26(11):1211-6.
- Young, A.J. 1999. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin Immunol* 11(2):73-83.
- Zhou, X.P.; Gimm, O.; Hampel, H.; Niemann, T.; Walker, M.J. and Eng, C. 2000. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am. J. Pathol.* 157(4):1123-8.

9 Publikationen

MOERCH, U.; **SCHRAMA, D.**; GULDBERG, P.; SEREMET, T.; ZEUTHEN, J.; BECKER, J.C. UND THOR STRATEN, P.(2000): Comparative delineation of T cell clonotypes in coexisting syngeneic B16 melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 49(8):426-32.

BECKER, J.C.; VETTER, C.S.; **SCHRAMA, D.**; BRÖCKER, E.B. UND THOR STRATEN, P. (2000): Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. *Eur. J. Immunol.* 30(12):3699-706.

SCHRAMA, D.; ANDERSEN, M.H.; TERHEYDEN, P.; SCHRODER, L.; PEDERSEN, L.O.; THOR STRATEN, P. UND BECKER, J.C. (2001): Oligoclonal T-cell receptor usage of melanocyte differentiation antigen-reactive T cells in stage IV melanoma patients. *Cancer Res.* 61(2):493-6.

SCHRAMA, D.; THOR STRATEN, P.; FISCHER, W.H.; MCLELLAN, A.D.; BRÖCKER, E.B.; REISFELD, R.A. UND BECKER, J.C. (2001): Targeting of lymphotoxin-alpha to the tumor elicits an efficient immune response associated with induction of peripheral lymphoid-like tissue. *Immunity* 14(2):111-21.

THOR STRATEN, P.; GULDBERG, P.; **SCHRAMA, D.**; ANDERSEN, M.H.; MOERCH, U.; SEREMET, T.; SIEDEL, C.; REISFELD, R.A. UND BECKER, J.C. (2001): In situ cytokine therapy: redistribution of clonally expanded T cells. *Eur. J. Immunol.* 31(1):250-8.

SCHRAMA, D.; THOR STRATEN, P.; BRÖCKER, E.B.; REISFELD, R.A. UND BECKER, J.C. (2002): Cytokine fusion protein treatment. *Recent Results Cancer Res.* 160:185-94.

SCHRAMA, D.; FUCHS, E.; BRÖCKER, E.B.; THOR STRATEN, P. UND BECKER, J.C. (2002): Identical T-cell receptor transcripts in multiple melanoma metastases. *Cancer Res.* 62(20):5664-7.

NANDA, I.; **SCHRAMA, D.**; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARTL, M. UND SCHMID, M. (2002): Distribution of telomeric (TTAGGG)_(n) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111(4):215-27.

SCHRAMA, D.; PEDERSEN, L.O.; KEIKAVOUSSI, P.; ANDERSEN, M.H.; THOR STRATEN, P.; BRÖCKER, E.B.; KÄMPGEN, E. UND BECKER, J.C. (2002): Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 119(6):1443-8.

SCHRAMA, D.; EGGERT, A.A.; BRÖCKER, E.B.; PEDERSEN, L.O.; THOR STRATEN, P. UND BECKER, J.C. (2003): Immunological consequences of the sentinel lymph-node biopsy--lessons from a melanoma patient. *Lancet Oncol.* 4(7):446-7.

TERHEYDEN, P.; **SCHRAMA, D.**; PEDERSEN, L.O.; ANDERSEN, M.H.; KÄMPGEN, E.; THOR STRATEN, P. UND BECKER, J.C. (2003): Longitudinal analysis of MART-1/HLA-A2-reactive T cells over the course of melanoma progression. *Scand. J. Immunol.* 58(5):566-71.

THOR STRATEN, P.; **SCHRAMA, D.**; ANDERSEN, M.H. UND BECKER, J.C. (2004): T-cell clonotypes in cancer. *J. Transl. Med.* 2(1):11.

SCHRAMA, D.; XIANG, R.; EGGERT, A.O.; ANDERSEN, M.H.; PEDERSEN, L.O.; KÄMPGEN, E.; SCHUMACHER, T.N.; REISFELD, R.A. UND BECKER, J.C. (2004): Shift from systemic to site-specific memory by tumor-targeted IL-2. *J. Immunol.* 172(10):5843-50.

BERGER, T.G.; HAENDLE, I.; **SCHRAMA, D.**; LÜFTL, M.; BAUER, N.; PEDERSEN, L.O.; SCHULER-THURNER, B.; HOHENBERGER, W.; THOR STRATEN, P.; SCHULER, G. UND BECKER, J.C. (2004): Circulation and homing of melanoma-reactive T cells to both cutaneous and visceral metastases after vaccination with monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Cancer* 111(2):229-37.

EGGERT, A.O.; ANDERSEN, M.H.; VOIGT, H.; **SCHRAMA, D.**; KÄMPGEN, E.; THOR STRATEN, P. UND BECKER, J.C. (2004): Characterization of mouse MAGE-derived H-2K(b)-restricted CTL epitopes. *Eur. J. Immunol.* 34(11):3285-90.

Konferenzbeiträge:

SCHRAMA, D.; FISCHER, W.; MERKEL, A.; REISFELD, R.A.; BRÖCKER, E.B.; AND BECKER, J.C. (1999): Targeting of lymphotoxin to melanoma metastases results in tumor eradication. *30igste Jahrestagung der DGfI*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; ANDERSEN M.H.; TERHEYDEN P.; PEDERSEN, L.O.; SCHRADER, L.; THOR STRATEN, P.; AND BECKER, J.C. (2000): Oligoclonal TCR usage of melanocyte differentiation antigen-reactive T cells. *Joint annual meeting of the german and dutch societies of immunology*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2000): Eine Antikörpergesteuerte Anreicherung von Lymphotoxin am Tumor führt zu einem starken T-Zellinfiltrat und Zerstörung des Tumors. *10te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Onkologie*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; REISFELD, R.A. AND BECKER, J.C. (2000): Targeted lymphotoxin results T-cell mediated melanoma eradication. *27te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; REISFELD, R.A.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2001): Targeting of lymphotoxin- α to the tumor microenvironment elicits an efficient immune response by induction of a peripheral lymphoid-like tissue. *28te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; FUCHS, E.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2002): Detection of identical T cells in multiple metastases of melanoma patients. *The 1st Tegernsee conference on immunotherapy of solid cancer*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; FUCHS, E.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2002): Nachweis rezirkulierender T-Zellen in multiplen Metastasen von Melanom Patienten. *12te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Onkologie*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; PEDERSEN, L.O.; KEIKAVOUSSI, P.; BRÖCKER, E.B.; KÄMPGEN, E. AND BECKER, J.C. (2002): Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *29te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2003): Die Lymphknotenbiopsie: Freund oder Feind? *13te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Onkologie*. Ausgewählt als Poster und als Kurzvortrag

SCHRAMA, D.; FUCHS, E.; BRÖCKER, E.B. AND BECKER, J.C. (2003): Detection of identical T cells in multiple metastases of melanoma patients. *12ter internationaler AEK Krebskongress*. Ausgewählt als Poster

SCHRAMA, D.; THOR STRATEN, P.; SCHUMACHER, T.N.M.; REISFELD, R.A. AND BECKER, J.C. (2003): Dependence of functional lymphoid tissue on lymphotoxin α : consequences for site specific immunotherapy. *34igste Jahrestagung der Dgfl*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; EGGERT, A.A.O. AND BECKER, J.C. (2004): Dependence of functional lymphoid tissue on lymphotoxin α . *31te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; TERHEYDEN, P.; OTTO, K.; LÜHDER, F. AND BECKER, J.C. (2004): NKG2D/ULBP-1 Interaktion bei der durch dendritische Zellen-vermittelten T-Zellaktivierung. *14te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Onkologie*. Ausgewählt als Vortrag

SCHRAMA, D.; COSMAN, D.; LÜHDER, F. AND BECKER, J.C. (2004): NKG2D/ULBP-1 interaction for DC-mediated T cell activation. *Joint annual meeting of the dutch and german societies of immunology*. Ausgewählt als Vortrag

10 Danksagung

Der Weg zur vorliegenden Dissertation begann eines nachts bei der Mainpost, bei der ich als Zeitungspacker meine finanzielle Situation aufzubessern versuchte. In jener Nacht stöberte ich also die Samstagszeitung durch und entdeckte die Anzeige von PD. Dr. Jürgen C. Becker, der eine Doktorandenstelle in der Erforschung von Immunantworten gegen das maligne Melanom ausgeschrieben hatte.

Diese Anzeige führte mich in die Hautklinik, in der ich unter der Anleitung von Jürgen die vorliegende Arbeit anfertigen durfte. Mein besonderer Dank gilt dementsprechend Jürgen und Dr. Wolfgang Fischer für die Überlassung des Themas. Zudem möchte ich Jürgen für die Anregungen, Hilfestellungen und für seine positive Sicht der Dinge danken, die für meine Inspiration und für das Fortschreiten meiner Arbeit unentbehrlich waren.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. Scharl, da er sich als Vertreter der Biologischen Fakultät für die Betreuung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

An dieser Stelle sei der Leiterin der Hautklinik, Frau Prof. Dr. E.-B.Bröcker, gedankt, die sich stets um die Behebung aufkommender Probleme gekümmert und mit vielen wertvollen Kommentaren zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Großer Dank gilt natürlich dem erweiterten Becker-Labor. Da sind einmal die ehemaligen und aktuellen „Mädels“, die fleißigen Bienchen des Labors, d.h. Angela, Barbara, Claudia S., Eva, Katharina, Katrin und Ramona. Bei ihnen möchte ich mich herzlich für die ständige Hilfsbereitschaft, für die Tipps bei der praktischen Arbeit und für das gute Arbeitsklima bedanken. Desweiteren gilt mein Dank der vor kurzem dazugestoßenen „Biologenfraktion“ bestehend aus Chris, Heike, Roland und Valeska, die nicht nur zum guten Arbeitsklima beigetragen haben, sondern auch stets für interessante und aufschlussreiche Diskussionen zur Verfügung standen und stehen. Gleiches gilt selbstverständlich auch für die Mitarbeiter, die ihre Forschung neben der Klinikarbeit

bestreiten. Dafür meinen großen Respekt und vielen Dank an Andreas, Claudia V. und Patrick.

Mein Dank gilt ebenso Ecki, Kerstin und Petra, die mir insbesondere bei meinen klinischen Untersuchungen eine große Hilfe waren. Kerstin war außerdem eine wichtige Stütze für mich bei Grammatik- und Rechtschreibfragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Kopenhagener-Labor. Per und Mads waren nicht nur stets hilfsbereite Ansprechpartner bezüglich DGGE-PCR und T-Zellen waren, sondern bei meinen Besuchen in Kopenhagen schafften es Per S., Mads, Per G., Tina und all die anderen, dass man sich sofort heimisch fühlte. Somit sind sie der Beweis, dass erfolgreiche Forschung auch in einem lockeren, entspannten Arbeitsumfeld möglich ist. Dem anderen Kooperationspartner, dem Labor von Ralph Reisfeld, möchte ich auch für seine Unterstützung danken.

Ein generelles Dankeschön an all jene, Kollegen, Freunde und Sportkameraden, die hier nicht namentlich erwähnt sind, aber auch für das Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Dank auch an meine Familie, Susi, Jann und Marten, die es meistens geschafft haben, sogar den deprimierendsten Labortag zu vergessen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Tierpflegerin Susan Schellworth-Scherz für die Pflege der Mäuse. Dank auch dem IZKF Würzburg, der DFG und der Mildred Scheel Stiftung, die für die finanzielle Absicherung des Projekts und meiner Arbeitskraft gesorgt hatten.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern, deren finanzielle Unterstützung mein Studium und damit auch diese Arbeit erst ermöglicht hat, bei meiner Schwester und meinem Bruder für den gewährten Rückhalt bedanken.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: David Franciscus Jacobus Schrama
 Geburtsdatum: 2. Mai 1972
 Geburtsort: Karlstadt
 Staatsangehörigkeit: Niederländisch
 Familienstand: verheiratet
 2 Kinder

Schulbildung

1978-1982 Grundschole Karlstadt-Karlburg
 1982-1989 Johann-Schöner-Gymnasium Klasse 5-11
 1989/1990 Seniorjahr an der Oak Hills High School Cincinnati mit
 Diplomabschluss
 1990-1992 Kollegstufe Johann-Schöner Gymnasium Karlstadt
 Mai 1992 Abitur

Hochschulausbildung

1992-1998 Studium der Biologie an der Bayrischen Julius-Maximilians-
 Universität Würzburg
 Dezember 1997 Diplom mit dem Hauptfach Genetik und den Nebenfächern
 Mikrobiologie und Zell- und Entwicklungsbiologie
 1998 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der
 Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M.
 Schmid mit dem Thema:
 (TTAGGG)_n-Telomersequenzen in Vogelchromosomen
 Juli 1999 Beginn der Promotionsarbeit in der Hautklinik Würzburg
 unter Anleitung von PD Dr. Jürgen C. Becker mit dem
Thema:
 T-Zell-*priming* außerhalb sekundärer lymphatischer Gewebe

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

David Schrama