

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und
Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät

Direktor: Prof. Dr. med. C. Schafmayer

Expansion, Charakterisierung und Funktionalität autologer
T- und B-Lymphozyten für die Immuntherapie
gastrointestinaler Tumoren

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades:

Doktor der Medizin der Universität Rostock

Vorgelegt von:

Johanna Luise Schmitz, geb. am 15.06.1998 in Düren - Birkesdorf

Rostock, den 08.02.2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005066

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Gutachtende:

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, Universität Rostock, Molekulare
Onkologie und Immuntherapie

Prof. Cécile Gouttefangeas, Universität Tübingen, Institut für Immunologie

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Universität Rostock, Institut für Immunologie

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Das Kolorektale Karzinom.....	10
1.1.1	Genetische Ursachen des Kolorektalen Karzinoms	11
1.2	Das Pankreaskarzinom.....	13
1.3	Immunvermittelte Tumorabwehr	14
1.3.1	Phänotypisierung der Lymphozyten	14
1.3.2	Grundlagen des Immunsystems	17
1.3.3	Kostimulatorische Marker	20
1.3.4	Immunevasion der Tumorzellen und therapeutische Immunmodulation.....	21
1.4	Protokolle zur Etablierung von B- und T-Zellpopulationen	23
1.4.1	Das <i>Rapid Expansion Protocol</i>	23
1.4.2	EBV-B-Zell-Transformation	24
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Material	27
2.1.1	Proben	27
2.1.2	Laborgeräte	29
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.5	Antikörper.....	32
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Aufarbeitung von Tumor- und Blutproben	34
2.2.2	Zellkultur	34

Einleitung

2.2.3	Färbeprotokoll durchflusszytometrische Messungen	36
2.2.4	Isolation der peripheren Lymphozyten aus Blutproben	39
2.2.5	T-Zell-Isolierung.....	39
2.2.6	Das <i>Rapid Expansion Protocol</i> für T Zellen.....	40
2.2.7	EBV-B-Zell-Transformation	42
2.2.8	MHC I/II Stimulation der Tumorzellen	43
2.2.9	Degranulierungstests der T-Zellen	43
2.2.10	Auftaukontrolle	44
2.2.11	Therapie der Mykoplasmen-kontaminierten B-LCLs.....	45
2.2.12	Statistik	45
2.2.13	DNA-Fingerprint	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Selektion der Patientinnen und Patienten	46
3.2	T-Zellen.....	46
3.2.1	Das <i>Rapid Expansion Protocol</i>	46
3.2.2	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Expansion.....	50
3.2.3	Das <i>T cell Isolation Kit</i>	59
3.3	Tumorzellen	60
3.3.1	MHC-Expression der Tumorzelllinien.....	60
3.3.2	Degranulierungstests der T-Zellen	61
3.4	<i>B-lymphoblastoid cell lines</i>	64
3.4.1	Quantitative Erfassung der B-Zell-Transformation.....	64
3.4.2	Expression der kostimulatorischen Marker und Immunglobuline	65
3.4.3	Doppelter Ansatz der B-Zell-Transformation.....	69
3.4.4	Subpopulationen der immortalisierten B-Zellen	70
3.4.5	Stimulation mit CD40L und Interleukin-4	72

Einleitung

3.4.6	Therapie der Mykoplasmen-kontaminierten B-LCLs.....	72
3.4.7	DNA-Fingerprint	73
4	Diskussion	74
4.1	Immuntherapie bei KRK und Pankreas-CA	74
4.2	T-Zellen.....	75
4.2.1	Verlust des CD3-Markers der T-Zellen	75
4.2.2	CD4/CD8 doppelt-positive und doppelt-negative CD3 ⁺ T-Zellen.....	76
4.2.3	Verteilung der T-Zell-Subpopulationen.....	77
4.2.4	Optimierungsmöglichkeiten und Modifizierungen des REP	78
4.2.5	Vor- und Nachteile einer Separation der PBLs vor der Expansion	81
4.3	Aussagekraft der Degranulierungstests.....	83
4.4	<i>B-lymphoblastoid cell lines</i>	86
4.4.1	Variabilität des Wachstumsverhaltens der B-LCLs	86
4.4.2	Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs.....	88
4.4.3	Analyse der funktionalen Subpopulationen der B-LCLs	89
4.4.4	Auswirkung der Mykoplasmen auf die B-Zell-Transformation	91
4.5	Einfluss des molekularen Subtyps auf die Wirksamkeit der Immuntherapie	92
5	Ausblick	94
6	Zusammenfassung.....	96
7	Thesen.....	97
8	Abkürzungsverzeichnis.....	98
9	Abbildungsverzeichnis.....	102
10	Tabellenverzeichnis	104
11	Anhang	105
11.1	Abbildungen Ergebnis-Teil.....	105
11.1.1	CD3 ⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe	105

Einleitung

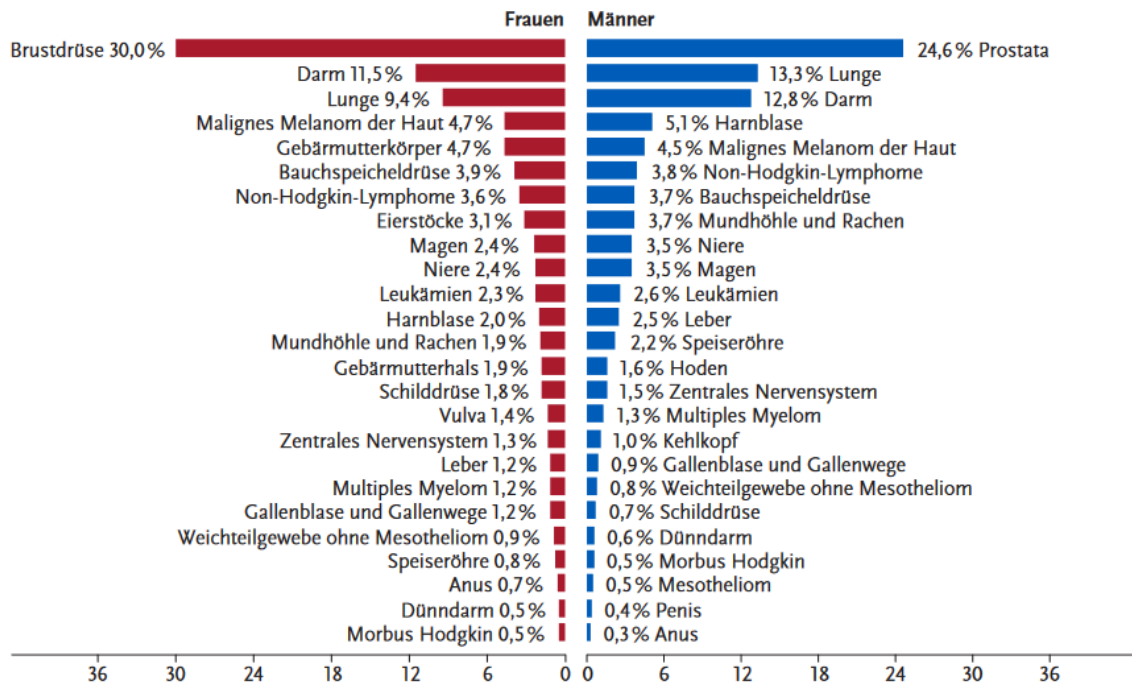
11.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen.....	106
11.1.3	T-Zell-Subpopulationen.....	107
11.1.4	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen der Degranulierungstests.....	109
11.1.5	Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs der Kontrollgruppe.....	110
11.1.6	Durchflusszytometrische Analyse der kostimulatorischen Marker der B-LCLs	111
11.1.7	Expression der Immunglobuline auf den B-LCLs der Kontrollgruppe.....	112
11.1.8	Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen der B-LCLs.....	113
11.2	Danksagung.....	114
12	Literaturverzeichnis.....	115

1 Einleitung

1.1 Das Kolorektale Karzinom

Darmkrebs ist weltweit für 8% aller Todesfälle verantwortlich (Stand 2017).¹ 2018 betrug die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) in Deutschland bei Männern 33.920 und bei Frauen 26.710. Durch die Erkrankungen wurden 24.250 Todesfälle verursacht, wobei die relative Überlebensrate bei annäherungsweise 60% lag. Wie der Abbildung (Abb.) 1 zu entnehmen ist, bildet Darmkrebs bei Frauen die zweithäufigste Tumorlokalisation nach Brustkrebs und bei Männern die dritthäufigste Lokalisation nach Prostata- und Lungenkrebs. Die Lebenszeitprävalenz beträgt 6%. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen beträgt der Anteil des KRK an den Krebsneuerkrankungen zirka 12%. Da das Erkrankungsrisiko bis in das hohe Alter ansteigt, ist das vorherrschende Patientenkollektiv bei Diagnosestellung jenseits der sechsten Lebensdekade.² Ein gesteigertes Erkrankungsrisiko ist assoziiert mit einem erhöhten Lebensalter, Rauchen, dem übermäßigen Konsum von Alkohol und einen „westlichen“ Ernährungsstil. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang vor allem der Verzehr von viel rotem und/oder stark verarbeiteten Fleisch und einer ballaststoffarmen Ernährung. Neben chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, dem metabolischen Syndrom oder kolorektalen Adenomen, führen auch genetische Mutationen und eine positive Familienanamnese zu einer Risikosteigerung.³ Im Rahmen der Primärprävention werden ab dem 50. Lebensjahr Früherkennungsmaßnahmen wie Koloskopien oder Testung auf okkultes Blut im Stuhl empfohlen.⁴ Als Therapieoption steht vor allem die Operation bei potentiell kurablen KRK im Vordergrund, gegebenenfalls begleitet von einer adjuvanten Chemotherapie.³

Einleitung



1. Abb. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland; Stand 2018, ohne nicht-melanotischen Hautkrebs.⁵

1.1.1 Genetische Ursachen des Kolorektalen Karzinoms

2-5% aller KRK lassen sich auf eine genetische Ursache zurückführen. Dabei wird zwischen dem Lynch-Syndrom (LS), vormals *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* Syndrom (HNPCC-Syndrom), und den polypösen Syndromen unterschieden.¹ Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) führt eine Mutation des adenomatösen polyposis coli Gens (APC) zur malignen Entartung von Darmpolypen.^{3,6} Ein Großteil der genetisch bedingten KRK sind jedoch auf das LS zurückzuführen (2-4% aller KRK, Stand 2018)⁷. Diese weisen eine hohe Penetranz, einen frühzeitigen Beginn und eine Assoziation mit weiteren extra-intestinalen Tumoren vor.⁸ Das LS geht mit einem Lebenszeitrisiko für Kolonkarzinome von etwa 50-80% einher. Es wird autosomal dominant vererbt und basiert auf Keimbahn-Mutationen der DNA-Basenfehlpaarungsreparatur-Gene (*DNA-Mismatch-Repair-Gene*, MMR-Gene). Dadurch kommt es zum Ausbleiben der Korrektur von Fehlbasenpaarungen bei der DNA-Replikation. Defekte des MMR-Systems betreffen insbesondere die Mikrosatelliten-DNA-Abschnitte. Mikrosatelliten, oder auch *short tandem repeats*, sind repetitive DNA-Abschnitte bestehend

Einleitung

aus ein bis sechs Basenpaaren. Sie sind meistens nicht kodierend und machen 0,5% des menschlichen Genoms aus. Dabei erreichen sie eine Länge von 100-400 Basenpaaren. Die Anzahl der Motivwiederholungen ist sehr variabel.⁹ Bei der Replikation kommt es in diesen DNA-Abschnitten häufiger zu zusätzlich eingebauten einzelnen Basen und folglich zu Fehlbasenpaarungen. Werden diese nicht entfernt, häufen sich Baseninsertionen in den nachkommenden Zellen, welche ohne Korrektur zu Mutationen führen können und damit eine Tumorentstehung begünstigen.⁶ Seit 2020 rät das britische *National Institute for Health and Care Excellence* zu einer MSI/MMR-Testung bei erstdiagnostiziertem KRK um die Erfassung des Lynch Syndroms zu verbessern.¹⁰

Zur Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität können bis zu zehn Marker verwendet werden, darunter die Mononukleotidmarker BAT25, BAT26 und weitere Dinukleotidmarker. Eine hochfrequente Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H, *high*) wird bei Vorliegen von >30% instabiler Marker definiert und eine niederfrequente Instabilität (MSI-L, *low*) bei einem Anteil von 10-30% instabiler Marker. Bei Prozentwerten <10% instabiler Marker wird der Tumor als MSS (mikrosatellitenstabil) klassifiziert und lässt auf ein intaktes MMR-System schließen.¹¹ Auffällig ist, dass Tumore mit MSI und dMMR (Mismatch-Reparatur-Gen-Defizienz) seltener metastasieren und Stadien mit Fernmetastasen weniger häufig auftreten.^{12,13} Laut Dietmaier et al. kann die Testung auf MSI und dMMR nicht nur als Biomarker für die Krebsrisikodiagnostik und Prognose, sondern auch für das Ansprechen auf Immuntherapien mit Immuncheckpointinhibitoren (ICI) verwendet werden.¹² Spontan auftretende KRK weisen ebenfalls in 15% eine Mikrosatelliteninstabilität auf.¹⁴

Neben der MMR-Defizienz spielt die POLE-Mutation (Polymerase ϵ) eine relevante Rolle in der Entstehung des KRK. Betroffen ist die Exonukleasedomäne der DNA-Polymerase ϵ . Diese ist verantwortlich für die kontinuierliche DNA-Synthese am Leitstrang.¹⁵ Mutationen des POLE-Gens führen zu einer fehlerhaften Korrekturlesefunktion des Enzyms und beeinflussen die Tumorentstehung durch resultierende DNA-Doppelstrangbrüche.^{16,15} Eine hohe Tumormutationslast (*tumor mutational burden*, TMB) bei POLE-Varianten kann in 2,9% der MSS KRK nachgewiesen werden.¹⁷ Die TMB beschreibt die Anzahl der Mutationen eines Tumors (s. Kapitel 1.3.4).¹⁸ Palles et al. konnten einen Zusammenhang zwischen spezifischen heterozygoten Keimbahnvariationen der Polymerase ϵ und dem Auftreten von KRK nachweisen.¹⁹ Ob die Tumorentstehung bei kombinierter POLE-Mutation und dMMR-

Systemen auf die fehlerhafte DNA-Polymerase-Korrekturlesefunktion der POLE-Mutation oder auf Veränderungen im MMR-System zurückzuführen sind, ist jedoch unklar.¹⁵ Tendenziell sind POLE-Veränderungen bei KRK, auch bei hoher TMB, häufiger mit einem MSS Status assoziiert.²⁰

1.2 Das Pankreaskarzinom

2018 lag die Neuerkrankungsrate für Pankreaskarzinome bei Männern und Frauen in Deutschland insgesamt bei ca. 19.020 Fällen. Annähernd genauso hoch war die Anzahl der Sterbefälle. Auch die relative 5-Jahres-Überlebensrate von 10% verdeutlicht die ungünstige Prognose. Sowohl die absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, als auch die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberate nahmen besonders ab einem Lebensalter von 65 Jahren zu. Obwohl das Pankreaskarzinom nur einen Anteil von 3,8% bei Frauen und 3,4% bei Männern der jährlichen Krebsneuerkrankungen ausmacht, hat es neben dem Mesotheliom die ungünstigste Prognose und ist die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland.⁵ Die Inzidenz steigt jährlich um 0,5-1%. Prognostisch wird sich die Tumorerkrankung bis 2030 zur zweithäufigsten Ursache für karzinombedingte Sterbefälle in den USA entwickeln.²¹

Zirka 60-70% der Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist ein Großteil der Karzinome bereits metastasiert und hat die Lymphknoten infiltriert.²² Histologisch sind 90% der Pankreaskarzinome pankreatische duktale Adenokarzinome (PDAC). Die meisten Patientinnen und Patienten werden mit unspezifischen Symptomen in fortgeschrittenem, nicht resektablem Stadium vorgestellt.²³ Die operative Versorgung ist momentan die einzige Therapie mit kurativer Intention, wobei hohe Rückfallquoten und ein geringes Gesamtüberleben zu verzeichnen sind.²⁴ Zur Verlängerung des progressionsfreien Intervalls werden zudem zytotoxische Chemotherapien eingesetzt.²⁵ Eine Therapie mit ICI zeigte bei Pankreaskarzinomen bisher kaum klinischen Erfolg. Hoffnung bereiten erste erfolgsversprechende Studien mit einer Kombinationstherapie aus Immuntherapie, Radiotherapie und/oder Chemotherapie.²⁶

Neben anderen Lebensstil-Faktoren wie ausgeprägtem Alkoholkonsum oder einem hohen Konsum an stark verarbeitetem Fleisch, fruktosehaltigen Säften und saturierten Fetten, besteht die größte ursächliche Assoziation mit Zigarettenrauchen.^{27,28} Des Weiteren spielen

chronische Pankreatiden, Adipositas und langjähriger Diabetes mellitus Typ zwei eine Rolle in der kanzerogenen Entstehung.²⁹⁻³¹ Auf Grund der Lebensstil-bezogenen Aspekte stieg die Inzidenz von PDAC in den USA ebenfalls in der jüngeren Bevölkerung der unter 30-jährigen an.²⁸ Die höchste altersbezogene Inzidenz findet sich in Europa und Nordamerika, die geringste in Afrika und Südasien.³² In unter 10% der Fälle sind genetische Faktoren für das PDAC ursächlich. Prädisponierende Faktoren bilden hierbei pathologische Keimbahnvariationen. Relevante Mutationen treten in DNA-Reparaturgenen wie BRCA1/2 (= *breast cancer gene 1/2*) und ATM (= *ataxia telangiectasia syndrome*) auf.³³ In unter 1% der Fälle ist die Erkrankung mit dem LS assoziiert und beruht auf genetischen MMR-Defekten.³⁴

1.3 Immunvermittelte Tumorabwehr

1.3.1 Phänotypisierung der Lymphozyten

1.3.1.1 T-Zellen

Eine Einteilung der T- und B-Zellen in Subtypen ist durch die Darstellung charakteristischer CD-Marker (CD=*Cluster of differentiation*) auf der Zelloberfläche möglich. T-Zellen lassen sich neben der Klassifizierung zu CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, folgenden Subgruppen zuordnen: Naive T-Zellen (T_N), T-Effektorzellen (T_{EFF}), T-Effektorgedächtniszellen (T_{EM}), Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und Stammzell-T-Gedächtniszellen (T_{SCM}).³⁵ Naive T-Zellen entstehen durch positive und negative Selektion im Thymus. Sie zirkulieren als reife Zellen zwischen den sekundären lymphatischen Organen und präsentieren auf ihrer Zelloberfläche CD62L. Durch das Fehlen von CD95 und CD45RO können sie von Gedächtniszellen unterschieden werden. Regulatorische CD4⁺ T-Zellen besitzen immunsuppressive Funktionen um überschießende oder unangemessene Immunantworten einzudämmen.³⁶

Nach Antigenkontakt differenzieren naive Zellen zum Großteil zu T_{EFF}-Zellen. Diese migrieren in entzündete Gewebe und üben dort zytotoxische Funktionen aus. Nach Beseitigung des Antigens, gehen 90-95% in Apoptose über. Die übrigen Zellen entwickeln sich zu T-Gedächtniszellen. In Abgrenzung zu naiven Zellen präsentieren Effektorzellen den CD95-Marker. Dieser fungiert zum einen als kostimulatorischer Aktivierungsmarker und zum anderen

Einleitung

als Induktor der Apoptose über Aktivierung der Caspase 8.³⁷ Wie Rosenberg et al. in humanen und Mausstudien nachgewiesen haben, ist die alleinige Präsenz von tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Effektorzellen auf Grund der hohen Apoptoserate zur Tumorbekämpfung nicht ausreichend.³⁸ Für eine fortbestehende antigenspezifische Immunreaktion werden Gedächtniszellen benötigt. Lanzavecchia et al. konnten bereits 1999 CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen in T_{EM} und T_{CM} einteilen.³⁹

T_{CM} sind CD45RO⁺ Gedächtniszellen, welche konstitutiv CCR7 (*C-C chemokine receptor 7*) und CD62L exprimieren. Diese Rezeptoren sind ebenfalls charakteristisch für CD45RO⁻/CD45RA⁺ naive T-Zellen und werden zum Übertritt in den Extravasalraum, zum Knochenmark und zur Migration in die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe (SLO) benötigt.^{40,41} Bei Antigenkontakt migrieren sie aus den SLO und es kommt zur Sekretion von IL-2 mit Proliferation und Differenzierung zu T_{EFF} oder T_{EM}.^{39,37} Als Effektorzellen sezernieren sie INF- γ oder IL-4. Verglichen mit naiven T-Zellen, reagieren T_{CM} schneller auf Antigenkontakt, sind weniger von Cofaktoren abhängig und exprimieren verstärkt CD40L. Dadurch können sie effektiver mit dendritischen Zellen (DC) und B-Zellen interagieren.⁴²

CD45RO⁺ T_{EM} haben ihre konstitutive Präsentation von CCR7 verloren, exprimieren CD62L heterogen und besitzen spezifische Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle zur Infiltration in entzündetes Gewebe.⁴³ Vornehmlich zirkulieren sie im Blut und im peripheren Gewebe, da ihnen die Rezeptoren zum Eintritt in die SLO fehlen. Bei Antigenkontakt kommt es zu einer schnellen Effektorfunktion mit Sekretion großer Mengen an zytolytischen Molekülen wie Granzym B und Perforin. Nach Antigenstimulation *in vivo* oder anti-CD3/CD28-Aktivierung *in vitro* produzieren sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ Zellen IFN- γ , IL-4 und IL-5.^{42,39}

Einen geringeren Anteil der im peripheren Blut zirkulierenden PBMCs bilden die T_{SCM}.⁴⁴ Sie sind besonders langlebig, gering differenziert und zeigen eine für Gewebestammzellen typische molekulare Signatur.⁴⁵ Dieser Stammzell-ähnliche Phänotyp bietet die Möglichkeit der Selbsterneuerung und der Generierung potenter Tochterzellen.⁴⁶ Die CD95⁺ T_{SCM} sind CD45RO⁻ und CD62L⁺.⁴⁴ Durch ihre geringe Beeinflussbarkeit und der Fähigkeit bei Antigenkontakt potente Effektorfunktionen auszuüben, können sie langanhaltende Immunantworten erzeugen und sind deshalb von besonderem Interesse für die Immuntherapie in Krebserkrankungen. Da sie nur zu geringen Teilen im peripheren Blut vorkommen, wird an

Protokollen zur Generierung von T_{SCM} aus T_N verstärkt geforscht.⁴⁷ Für weitere Ausführungen zu der T-Zell-Tumorzell-Interaktion s. Kapitel 1.3.2.

1.3.1.2 B-Zellen

Die meisten Studien über die Funktion von humanen B-Zell-Subklassen, berufen sich auf die phänotypische durchflusszytometrische Analyse der Marker IgD, CD27, CD24, CD38, kombiniert mit dem universellen B-Zell-Marker CD19.⁴⁸ B-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen. Der Beginn der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist ein streng regulierter Prozess. Wenn eine B-Zelle einen funktionalen, nicht autoreaktiven B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor* = BCR) etabliert hat, differenziert sie zur reifen, naiven B-Zelle. Diese Zellen exprimieren den BCR als IgM oder IgD Molekül und zirkulieren durch den Körper. Im Erwachsenen befinden sich 50% der zirkulierenden B-Zellen in diesem Stadium.⁴⁹ Naive B-Zellen werden charakterisiert als CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻.⁵⁰ Die Aktivierung von B-Zellen kann T-Zell-abhängig und T-Zell-unabhängig stattfinden. Die T-Zell-unabhängige Immunantwort erfolgt bei starker Stimulation des BCR und führt letztendlich zur Differenzierung in IgM-sekretierende Plasmazellen.⁵¹ Diese Plasmazellen produzieren Antikörper mit einer geringen Affinität und entwickeln sich meistens nicht zu Gedächtniszellen.⁴⁹ Zur T-Zell-abhängigen Immunantwort ist eine Begegnung der Antigen-exponierten B-Zelle mit ihrer zugehörigen antigenspezifischen CD4⁺ T-Helferzelle erforderlich.⁵² Werden die B-Zellen über ihren MHCII-Rezeptor in der Peripherie aktiviert, präsentieren sie die Marker CD19, MHCII, CD80/86 und migrieren zu den SLO.^{49,50} In den SLO treffen sie auf ihre antigenspezifische T-Helfer-Zelle (T_H) und können sich zu kurzlebigen IgM-sekretierenden Plasmazellen entwickeln.⁴⁹ CD19, CD20, CD27 und CD38 gelten als Schlüsselmarker der Plasmazell-/Plasmablasten-Differenzierung.⁵³ Bereits 1997 konnte nachgewiesen werden, dass die langfristige B-Zell-Immunantwort aus Plasmazellen und den von ihnen sezernierten Antikörpern entsteht, während die kurzfristige reaktive Immunantwort durch Gedächtnis-B-Zellen erfolgt.⁵⁴

Gedächtnis-B-Zellen entstehen in Keimzentrums-Reaktionen im Zuge der T-Zell-abhängigen Immunantwort und unterscheiden sich von naiven B-Zellen durch eine längere Lebensspanne, eine stärkere und schnellere Immunantwort bei Stimulation und Präsentation von somatisch mutierten Immunglobulinen. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche CD19, CD27 und IgD.⁵⁰ Erst bei sekundärem Antigenkontakt proliferieren sie und differenzieren zu Plasmazellen.⁵⁴ Annäherungsweise 40% der humanen B-Zellen im peripheren Blut sind B-Gedächtniszellen

unterschiedlicher Subklassen. Gedächtnis-B-Zellen schützen den Organismus teilweise für Dekaden vor Krankheiten durch Reinfektionen mit bereits bekannten Pathogenen.⁴⁹ Neben dem Vorkommen im Blutkreislauf zur Abwehr von Pathogenen, lassen sich Plasmazellen auch in Tumordinfiltraten detektieren. Dort können sie, selbst bei zahlenmäßig geringer Präsenz, große Mengen an Zytokinen und Antikörpern produzieren. Ausgelöst durch diese Antikörper kommt es durch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependend cellular cytotoxicity* = ADCC) zur Komplementaktivierung, Aktivierung natürlicher Killerzellen mit gesteigerter phagozytischer Aktivität und verstärkter Antigenpräsentation dendritischer Zellen. Auch können B-Zellen durch ihre Antigenpräsentation die antigen-spezifische Immunantwort der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Tumorumgebung beeinflussen.⁵⁵

1.3.2 Grundlagen des Immunsystems

Im Folgenden werden einige grundlegende Aspekte der Funktionsweise des menschlichen Immunsystems hinsichtlich der antigenvermittelten Immunantwort durch T- und B-Zellen näher erläutert. Generell wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden. Während das angeborene Immunsystem die unspezifische frühe Reaktion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, dem Komplementsystem und der akute Phase Proteinen beinhaltet, ist das erworbene Immunsystem für die spezifische, verzögerte Reaktion von T- und B-Lymphozyten verantwortlich. Das adaptive, erworbene Immunsystem ist in der Lage durch seine Gedächtnisfunktion auf sich wiederholende Reize antigenspezifisch zu reagieren. Die zielgenaue Reaktion des adaptiven Immunsystems beruht auf den antigenspezifischen Rezeptoren der T- und B-Zellen.⁴¹

Bei Bindung ihres spezifischen Antigens über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und Expression der kostimulatorischen Signale, kommt es zur Expansion naiver T-Zellen und einer Besiedelung des entzündeten Gewebes.³⁶ Unterstützt wird die Reifung der T-Zellen durch die Bindung des TCR mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex I (*major histocompatibility complex I, MHC I*).⁵⁶ Bei Interaktion mit und Aktivierung der T-Zellen spielen MHC Klasse I und II eine entscheidende Rolle. MHC I findet sich auf zellkernhaltigen Zellen und präsentiert intrazelluläre Peptide des Zellstoffwechsels. Erkannt wird MHC I von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen.³⁶ Veränderte oder abnormale Peptide aktivieren die CD8⁺ T-Zellen zur Eliminierung der Zielzelle.⁴⁵ Handelt es sich

Einleitung

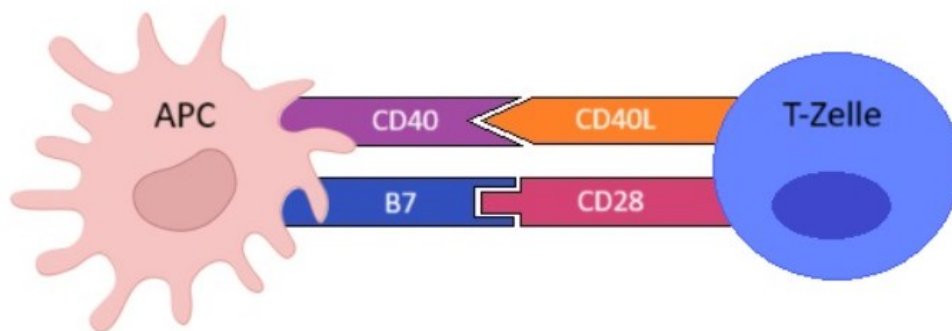
bei der Zielzelle um eine Tumorzelle, kommt es zur Zellyse mittels Perforin oder FAS-vermittelter Apoptose-Induktion.⁵⁷ Da die persistierende Tumor-Immunität ebenfalls durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird, resultiert ein Mangel dieser Zellgruppe in einer Tumorprogression.⁵⁸

Eine weitere wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen die natürlichen Killerzellen. Sie machen 5-20% der Lymphozyten aus und sind den herkömmlichen Lymphozyten sehr ähnlich. Da sie Rezeptoren des angeborenen Immunsystems besitzen, sind sie nicht antigenspezifisch. Einerseits haben sie die Fähigkeit antigenunabhängig Perforine und Granzyme zur Zellyse zu sekretieren, andererseits können sie im Rahmen des ADCC gezielt Antikörper-opsonierte Zielzellen töten. Eine weitere Besonderheit der natürlichen Killerzellen besteht darin, auch bei verminderten oder gänzlich fehlender MHC-I-Präsentation mit Zytotoxizität reagieren zu können. Deshalb ist ihre Rolle in der Tumorbekämpfung und bei Viruserkrankungen entscheidend.⁵⁹ Die Präsentation extrazellulärer Antigene durch MHC-II auf der Zelloberfläche professioneller antigenpräsentierender Zellen (z.B. dendritischer Zellen oder B-Zellen) führt zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen sind so in der Lage körperfremde Antigene zu erkennen und nach ihrer Aktivierung Effektorzellen zu koordinieren und die Immunantwort durch Sekretion von Zytokinen zu modulieren.³⁶

Neben der CD8/MHC-I und der CD4/MHC-II Interaktion werden kostimulatorische Signale zur Aktivierung der T-Zellen benötigt. Grundsätzlich lassen sich die kostimulatorischen Signale zwei großen Unterfamilien zuordnen: der Immunglobulin-Superfamilie und der TNF-Familie. Zu ersterer zählt der TCR und Immunglobuline mit Rezeptorfunktion wie beispielsweise CD28, welche bei Bindung intrazelluläre Signalwege anstoßen. Zu der zweiten Superfamilie zählen die Tumornekrosefaktoren (TNF) mit ihren zugehörigen Rezeptoren. Innerhalb dieser Gruppe gelten CD40 und sein Ligand CD40L (=CD154) als Hauptregulatoren der Immunantwort.⁶⁰ Bei TCR-Bindung kommt es durch die membrangebundenen Corezeptoren zur Initiierung von intrazellulären Signalkaskaden der Zellaktivierung. Die häufigsten Corezeptoren sind CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40, CD28, CTLA-4 und CD40L. Entzündungsmediatoren führen zu einer verstärkten Expression dieser Moleküle und somit zu einer schnelleren Aktivierung der T-Zellen.⁴⁰ Die Aktivierung der B-Zellen beginnt bei Bindung ihres zugehörigen Pathogens vornehmlich in lymphatischen Geweben.⁶¹ Bei Bindung eines Antigens durch den BCR wird die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD86, CD80, Adhäsionsmoleküle (z.B.

Einleitung

ICAM1 oder ICAM2), Migrationsrezeptoren und Zellzyklus-stimulierenden Genen initiiert.⁵² CD86 und CD80, welche auch als B7-Moleküle bezeichnet werden, entsprechen den Liganden des wichtigsten kostimulatorischen Rezeptors der T-Zellen (CD28), siehe Abb. 2. Die Effektivität von antigenpräsentierenden Zellen (APC) ist zurückzuführen auf die Expression der CD80/CD86 Moleküle auf ihrer Zelloberfläche.⁶² Diese Interaktion ist auch für T-Zellen entscheidend, da sie bei fehlender Aktivierung in ein „Anergie“-Stadium verfallen können. Somit kann eine produktive Immunantwort mit Proliferation, IL-2-Sekretion und T-Effektorzell-Funktionen nur erfolgen, wenn Signal eins, Antigen-Bindung und Signal zwei, CD28 Bindung durch CD80/86 erfolgt.⁶⁰ Durch das zweite Signal wird zudem die Ausbildung des CD40L auf der T-Helferzelle initiiert.⁶³ CD40 wird von reifen, naiven und B-Keimzentrumzellen exprimiert. Neben weiteren extrinsischen Signalen bestimmt der Umfang der CD40L-CD40 Bindung die B-Zell-Entwicklung in vielen Differenzierungsstadien.⁶⁴ Die Interaktion von CD40 mit dem CD40-Liganden führt zum Klassenwechsel der B-Zellen, einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle und der Etablierung von B-Gedächtniszellen.⁵¹ Die Interaktion von T- und B-Zellen (bzw. Antigenpräsentierenden Zellen) wird exemplarisch in der zweiten Abbildung dargestellt.



2. Abb. Interaktion zwischen CD4⁺ T-Helferzelle und APC (Antigenpräsentierende Zelle) durch die kostimulatorischen Moleküle CD40/CD40L und B7/CD28. Voraussetzung ist eine Aktivierung des TCR durch MHCII und Antigenkontakt.

Einleitung

Bei Interaktion von B-Zellen mit ihren zugehörigen T-Zellen erfolgt der Klassenwechsel des BCR von IgM/IgD zu IgG, IgA oder IgE. Nach der Etablierung langlebiger Gedächtniszellen und erfolgtem Immunglobulin-Klassenwechsel, produzieren diese bei wiederholtem Kontakt IgG-Antikörper als direkte Immunreaktion.⁴¹ Eine Mindestanzahl an Zellteilungen ist dabei sowohl Voraussetzung für einen Klassenwechsel des BCR, als auch für die Differenzierung zu Plasmazellen.^{66,67}

1.3.3 Kostimulatorische Marker

Ebenso wichtig für eine produktive B-Zell/T-Zell-Interaktion sind die kostimulatorischen Moleküle ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*, intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1), ICAM-2, CD58 und CD50. ICAM-1 (CD54) gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und vermittelt T-Zell-T-Zell-, T-Zell-Zielzell- und T-Zell-B-Zell-Interaktionen. Unter den vielzähligen Liganden bildet LFA-1 (*leucocyte function associated molecule*) auf aktivierten T-Zellen den Hauptliganden.⁶⁸ Wird ICAM-1 als einziges kostimulatorisches Molekül auf APC präsentiert, kann es eine antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung auslösen. Zusätzliche Zellinteraktionen, wie beispielsweise zwischen CD28 und CD80, werden jedoch für eine optimale Immunantwort ebenfalls benötigt.⁶⁹ Die Expression von ICAM-1 kann, ebenso wie die von CD80, durch die Bindung von CD40/CD40L stimuliert werden.⁷⁰ ICAM-1 und ICAM-2 (CD102) werden verstärkt auf aktivierten Lymphozyten präsentiert.⁷¹

CD58 (LFA-3) ist ein Oberflächenmolekül, welches an CD2 auf T-Zellen bindet. Die CD58-Expression sinkt mit zunehmendem Reifungsstadium von B-Zellen im Knochenmark und wird besonders von B-Zellen in frühen Stadien exprimiert.⁷² Des Weiteren lässt sich CD58 nach einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Nachweis des LMP1 Gens (*Epstein-Barr virus latent membrane protein 1*) auf B-Zellen nachweisen und steht im Verdacht die direkte EBV-adressierte T-Zell-Antwort hervorzurufen.⁷³ CD50 (ICAM-3) kann auf >98% der Lymphozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden und wird durch LFA-1 gebunden. Während alle CD3⁺ T-Zellen ICAM-3 exprimieren, sind 18% der CD19⁺ B-Zellen ICAM-3.⁷⁴

1.3.4 Immunevasion der Tumorzellen und therapeutische Immunmodulation

Trotz der hochkomplex abgestimmten Immunreaktionen haben Tumorzellen einige Strategien entwickelt, sich der Immunantwort zu entziehen. Die Tumorbekämpfung beruht zum großen Teil auf der Erkennung von Tumorantigenen durch CD8⁺ T-Zellen und der Ausübung zytotoxischer Effektorfunktionen. Das Antigenrepertoire der Tumorzellen wird bestimmt durch die Diversität der MHC I Allele auf der Tumorzelloberfläche, genomischer Instabilität und mutagenen Veränderungen der Peptidprozessierung während der Karzinogenese. Des Weiteren kann dieses Repertoire durch die Immunzellen selber moduliert werden.⁷⁵

Zu den häufigsten Mechanismen der Tumorevasion zählt die verminderte Expression von MHC I auf der Zelloberfläche von Tumorzellen.⁷⁵ Daraus resultiert eine geringere Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen oder der Verlust der klonalen Antigenerkennung. Eine starke Expression von MHC I auf Tumorzellen wird hingegen häufig bei immunologisch aktiven Tumoren beobachtet⁷⁶, da dies mit einer vermehrten Infiltration von Immunzellen, Interferon- γ -Sekretion (IFN- γ) und einer gesteigerten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen einhergeht.⁷⁷ Ebenso führen Interferone, besonders IFN- γ , durch verstärkte Transkription der schweren Kette des MHC I-Moleküls in Tumorzellen zu einer vermehrten Expression von MHC I-Komplexen.⁷⁶

Eine spezifische Aktivierung von Immunzellen kann außerdem durch Tumorantigene erfolgen. Dies sind Antigene, welche auf Tumorzellen entweder überexprimiert oder spezifisch vorkommen.⁷⁸ Sie finden sich sowohl im Serum, als auch in der unmittelbaren Tumorumgebung und können zur frühzeitigen Detektion, als prognostische Marker, Zielobjekte der Immuntherapie oder zur Tumor-Vakzinierung dienen.⁵⁵ Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion von Tumorzellen ist die Expression immunsuppressiver Moleküle, sogenannter Immuncheckpointliganden, auf der Zelloberfläche. Zu den bekanntesten Vertretern der *Immuncheckpoints* zählen CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) und PD-1 (*Programmed Death-1*). CTLA-4 (CD152) führt zu einer Terminierung der T-Zell-Aktivierung.⁷⁰ Bei Bindung von CTLA-4 an CD80/86 kommt es zur Sekretion immunsuppressiver Zytokine und einer Reduktion der T-Zell-Immunantwort.⁷⁵ Strukturell ähnelt es CD28, besitzt jedoch eine höhere Bindungsaffinität zu CD80/86.⁷⁰

PD-1 gehört ebenfalls zur CD28-Familie der Immunmodulatoren. Bei Aktivierung wird PD-1 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert. Die Bindung von PD-1 an seine Liganden PD-L1

(B7-H1) oder PD-L2 (B7-DC) resultiert in einer Dephosphorylierung von Signalmolekülen des TCR, sodass die T-Zell-Sensitivität bei persistierender Antigenstimulation abnimmt und die T-Zell-Antwort inhibiert wird.⁷⁹ PD-L1 wird unter anderem von Colon- und Pankreaskarzinomen verstärkt exprimiert und hemmt die T-Zell-vermittelte Tumorbekämpfung.²⁶ Die Expression von PD-L1 auf der Oberfläche von Tumorzellen oder Immunzellen gilt als wichtiger prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine Immuncheckpointtherapie mit PD-1-Blockade.⁸⁰ Die Immuncheckpointtherapie ist mittlerweile bei Tumoren des oberen Gastrointestinaltrakts oder bei hepatozellulären Karzinomen im Behandlungsschema etabliert.⁸¹

Tumore mit einer höheren TMB produzieren durch Akkumulation von DNA-Mutationen wie Insertionen und Deletionen vermehrt Neoantigene.^{82,83} Dies ist auch bei dMMR Tumoren der Fall.⁸⁴ Diese Neoantigene können durch MHC-Präsentation auf der Zelloberfläche der Tumorzellen von aktivierten T-Zellen erkannt werden.^{82,83} Da es sich bei Neoantigenen um Proteine handelt, welche durch Neumutationen entstanden sind, lösen sie keine Toleranzreaktion der T-Zellen aus und können vom Immunsystem als körperfremd erkannt werden. So ist eine Adressierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen möglich.⁸⁵ Neoantigene erzeugen auf diese Weise potente, individuelle und spezifische anti-tumorale Immunreaktionen.⁸⁶ Die T-Zell-Reaktivität gegen Tumor-Neoantigene gilt als Ursache für den klinischen Erfolg von Immuntherapien wie der CTLA-4- oder PD-1-Blockade.⁸⁷ Durch die Bindung von CTLA-4 oder PD-1 können Tumorzellen die Aktivierung der T-Zellen beeinflussen. Bei Blockade der Tumorevasionsmechanismen sind T-Zellen wieder in der Lage Neoantigene zu erkennen. Somit gilt eine hohe TMB als Prädiktor für den Erfolg einer Immuntherapie.⁸²

Bezüglich der Wirksamkeit der Immuncheckpointblockade spielt ebenfalls die genetische Aberration des Tumors eine wichtige Rolle.⁷² dMMR KRK weisen im Vergleich zu MMR-kompetenten KRK, 10- bis 100-mal mehr somatische Mutationen auf.⁸⁸ Le et al. konnten nachweisen, dass MSI mit einer erhöhten Mutationsrate in Tumoren vergesellschaftet ist und Patientinnen und Patienten mit dMMR Tumoren klinisch besser auf eine PD-1-Blockade mit Pembrolizumab ansprechen als solche mit MMR-kompetenten Tumoren.⁸⁹ Womöglich als Resultat der hohen TMB, kommt es bei dMMR Tumoren ebenfalls zu einer gesteigerten Dichte an intratumoralen T-Zellen. In vielen Tumorarten ist eine gesteigerte T-Zellinfiltration ebenfalls mit einer erhöhten Ansprechrate auf die ICI-Therapie assoziiert.⁸³

1.4 Protokolle zur Etablierung von B- und T-Zellpopulationen

1.4.1 Das *Rapid Expansion Protocol*

Die adoptive T-Zell-Therapie (*adoptive cell therapy*, ACT) bildet als Teil der Immuntherapie eine neue und vielversprechende Option der Tumorbehandlung mit langfristiger Rückfallvermeidung und geringerer Toxizität im Vergleich zu herkömmlichen Therapien. Bei der ACT werden große Mengen tumor-spezifischer T-Zellen des peripheren Blutes *in vitro* expandiert und dem Patienten mit IL-2 in hohen Dosen reinfundiert. Die T-Zellen lassen sich aus natürlich erzeugten tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen oder Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten (TIL) generieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in der genetischen Modifizierung autologer zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen. Die genetisch modifizierten T-Zellen besitzen tumor-spezifische Antigen-Rezeptoren, wie die chimären Antigenrezeptoren (CARs) oder modifizierte T-Zell-Rezeptoren. Diese werden aus kultivierten B- und T-Zell-Klonen generiert.⁹⁰⁻⁹³ Weitere Tumorimmuntherapien beinhalten die Verwendung von ICI, monoklonalen Antikörpern, Tumor-Vakzinierung und Immunsystem-Modulatoren.⁹⁴

Rosenberg et al. erreichten 2011 durch Transfer von unmodifizierten T-Zellen aus Tumordinfiltraten eine partielle oder vollständige Tumorregression bei Erkrankten mit metastasiertem Melanom.⁹² Wurden an Stelle von TIL, *in vitro* expandierte T-Zellen des peripheren Blutes verwendet, konnte zwar ebenfalls eine Tumorregression induziert werden,⁹⁵ jedoch war die Immunantwort verglichen mit den Ergebnissen bei Transfusion von TIL weniger stark ausgeprägt.^{95,91} In beiden Fällen korrelierte die Tumorreaktivität mit der Persistenz der transferierten T-Zellen im Blut.^{91,95} Generell zeigte sich eine geringe Vorhersagbarkeit bezüglich des *in vivo*-Überlebens der transfundierten T-Zellen im individuellen Patienten. Durch die chronische Stimulation der patienteneigenen tumorreaktiven T-Zellen durch Tumorantigene *in vivo*, kann es zu einer gesteigerten Expression regulatorischer Moleküle wie PD-1,⁹⁶ sowie zu einer verstärkten Differenzierung zu kurzlebigen T-Effektorzellen kommen. Beide Effekte können die Fähigkeit zur Proliferation und das Langzeitüberleben von T-Zellen nach ACT einschränken.⁹⁷

Eine robuste und langlebige Immunreaktion konnte bei Transfusion von T-Gedächtniszellen, wie T_{CM} oder T_{SCM} erzielt werden. Das liegt an der Fähigkeit der T_{CM} sich auch bei ACT *in vivo* zu

reproduzieren und weitere Gedächtnis- und Effektorzellen zu generieren.⁹⁸ In Primaten-Studien konnte nachgewiesen werden, dass vorselektierte T_{CM} -Klone nach Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus und anschließender *in vitro*-Expansion mit ACT, über Jahre nach Transfer *in vivo* persistieren und diverse therapeutisch wirksame Gedächtnis-Subgruppen bilden können.⁹⁹ Dabei ist ein gering-differenzierter Phänotyp der T-Zellen notwendig um *in vivo* eine gesteigerte Proliferation, längere Persistenz und erhaltene Effektorfunktionen der Zellen zu ermöglichen.⁹⁸ Kürzlich publizierte Studien wiesen nach, dass stärker differenzierte Gedächtnis-T-Zellen keine langanhaltende Tumor-Immunität bewirken konnten.¹⁰⁰ Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Separierung in T-Zell-Subgruppen und eine gezielte Expansion für eine erfolgreiche ACT.

Zur Generierung ausreichender Mengen an T-Zellen ist die *ex vivo*-Expansion entscheidend. Das ursprüngliche von Dudley et al. beschriebene „*Rapid Expansion Protocol*“ (REP) beinhaltet eine Expansion von TIL unter Verwendung von anti-CD3-Antikörper, Interleukin-2 und bestrahlten PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen, *periphere blood mononuclear cells*), welche innerhalb von 14 Tagen zu einer 1000-fachen Expansion der T-Zellen führte.¹⁰¹ Um den klinischen Erfolg der expandierten T-Zellen nach ACT *in vivo* zu prognostizieren, formulierten Liu et al. zwei essentielle Voraussetzungen: Erstens die Generierung großer Mengen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen und zweitens ein gesteigertes Proliferationspotential auch Wochen nach REP.¹⁰² Ein kritischer Faktor des REP bezüglich der klinischen Anwendbarkeit besteht in der benötigten Menge an T-Zell-stimulierenden PBMCs, der umfänglichen Laborzeit und der Kostenintensität der *ex vivo* Expansion.^{91,103,104} Eine gezielte Expansion von T_{SCM} und T_{CM} ist zudem von großer Relevanz um den Erfolg der ACT zu steigern.⁹⁸

1.4.2 EBV-B-Zell-Transformation

Das EBV gehört zur Gruppe der humanen Herpesviren und kann beim Menschen zu einer Reihe verschiedener Erkrankungen führen. Dazu zählen die infektiöse Mononukleose, das Burkitt Lymphom, Nasopharynxkarzinome und autoimmune Erkrankungen wie der systemische Lupus erythematoses.¹⁰⁵ Die durch EBV infizierten B-Zellen werden normalerweise auf Grund der Präsentation viraler Proteine und einen Phänotypwechsel durch das Immunsystem *in vivo* erkannt und eliminiert, sodass die meisten Infektionen beim Menschen asymptomatisch

Einleitung

verlaufen. Bei einer latenten Infektion der B-Zellen verbleibt die virale DNA intrazellulär als Episom.¹⁰⁶ Das EBV wurde erstmals in Zelllinien aus Burkitt-Lymphomen nachgewiesen. Bei dem Burkitt-Lymphom handelt es sich um eine Tumorerkrankung des Kindesalters, welche endemisch im tropischen Regenwaldgebiet Afrikas vorkommt. EBV führt bei den B-Zellen von Erkrankten mit Burkitt-Lymphomen zu einer chromosomalen Translokation des C-MYC Protoonkogens, juxtapositional zu dem Genabschnitt der Immunglobuline. Die konstitutive Aktivierung von C-MYC führt auch in Abwesenheit des EBV zur Proliferation der B-Zellen. Wie andere kanzerogene DNA-Viren, schädigt EBV die zwei vorrangigen Tumorsuppressorgene, TP53 und das Retinoblastomgen, wodurch der Übergang vom G1-Status in die S-Phase erfolgt. Obwohl es sich beim EBV um ein Virus mit mutagenem Potential handelt, führt die Latenz des Virus *per se* nicht zur Ausbildung einer Tumorerkrankung. Das liegt an der Fähigkeit des Immunsystems transformierte Zellen zu erkennen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass sich eine durch EBV induzierte Lymphozytenproliferation nur unter immunsupprimierten Konditionen entwickelt.¹⁰⁶

Durch die EBV-Transformation kann das Virus *in vitro* zur Etablierung von immortalisierten B-Zelllinien genutzt werden. Bei Infektion mit EBV kommt es zur Proliferation und anschließender Etablierung von B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCL) *in vitro*.^{73,107} Diese B-LCLs können bei *in vitro* Experimenten als antigenpräsentierende Zellen verwendet werden. Bereits 1968 konnten Pope et al. erstmalig B-LCL-Zelllinien aus EBV-transformierten Lymphozyten generieren.¹⁰⁸ Wie tiefgreifend die genetischen Veränderungen sind, die durch das EBV ausgelöst werden, zeigten auch Gerber et al., indem sie eine Veränderung des Chromosomensatzes nach EBV-Infektion nachwiesen. Bei einem anfänglich unauffälligem männlichen Karyotyp, waren nach sechs Wochen 90% der Zellen mit 47 Chromosomen ausgestattet und nach 12 Wochen zeigten 6% der infizierten Zellen 48 Chromosomen. Des Weiteren gaben ihre Forschungsergebnisse einen Hinweis auf die häufig auftretenden Schwierigkeiten einer EBV-Transformation. Sie beschrieben, dass die Anzahl der vitalen B-Lymphozyten nach EBV-Transformation innerhalb von 10-14 Tagen stetig abnahmen und Zellkulturen mit einer hohen EBV-Konzentration nach 18 Tagen vollständig zum Erliegen kamen.¹⁰⁷

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Hinblick auf das Tumorgeschehen und die Inzidenzen von Tumorerkrankungen in Deutschland ist weitere Forschung an immunologischen Behandlungsstrategien dringend erforderlich. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum aktuellen Wissensstand der T- und B-Zell-vermittelten Immuntherapie von Colon- und Pankreaskarzinomen. Im Zuge der Grundlagenforschung ist die Etablierung von Protokollen zur Generierung adäquater Mengen an funktionalen T-Zellen und die Etablierung langlebiger B-Zelllinien ein wichtiger Bestandteil. Ein Schwerpunkt bildet dabei die Zeit- und Kosteneffizienz der Protokolle zur Erleichterung der Durchführbarkeit.

Ziel der Arbeit ist zum einen die Etablierung eines modifizierten REP zur Expansion funktionaler, tumorreaktiver T-Zellen von Patientinnen und Patienten mit Colon- und Pankreaskarzinomen. Durch die Färbung von Oberflächenmarkern erfolgte der Vergleich von T-Zell-Subpopulationen vor und nach Durchführung des REP. Die Funktionalität und Reaktivität der T-Zellen durch unspezifische Stimulation und durch Kontakt mit Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Degranulationstests analysiert. Des Weiteren wurden EBV-B-Zell-Transformationen zur Generierung stabiler B-LCLs aus PBLs vorgenommen. Geplant war hier im Verlauf ebenfalls eine Untersuchung der Subpopulationen. Zur Testung der Voraussetzungen der B-LCLs zur adäquaten Stimulation von T-Zellen wurden außerdem die kostimulatorischen Marker nach EBV-Transformation analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proben

Die verwendeten Proben stammen von Patientinnen und Patienten der Universitätsmedizin Rostock als Teil der HROC-Sammlung der BioBank Rostock (BBR, AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie), s. Tabelle 1. Die Kontrollgruppe bildeten Personen ohne Pankreas- oder Kolonkarzinomerkrankungen. Sie setzt sich zusammen aus BC1, FB, HROM14, HROC211, HROC158 und HROC152. Die Akronyme BC1 und FB bezeichnen Biomaterialien oder Zellpopulationen gesunder Spender. Der Nachweis des genetischen Subtyps oder der vorliegenden Mutation (MSS, POLE, MSI, Lynch, POLD) erfolgte entweder durch die Pathologie der Universitätsmedizin Rostock oder wurde vom kommerziellen Anbieter Centogene AG durchgeführt.

Teilweise stammen die Patientenproben aus der PiCOP-Studie (Peptidbasierte Immunisierungsstrategien bei Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs), welche Verbundprojekte zwischen der Universitätsmedizin Rostock und Greifswald und den Biotec-Unternehmen Miltenyi Biotec GmbH und Centogene AG beinhaltet. Diese Proben wurden nach der in Kapitel 2.2.4. dargestellten Methode aufbereitet und kryokonserviert im Gasüberstand eines Flüssigstickstoff-Tanks gelagert.

Material und Methoden

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Name	Carcinom	Molekularer Subtyp	Anatomische Lage	Geschlecht	Alter
HROP88	PDAC	MSS	Caput Pankreas	m	70
HROP92	PDAC	MSS	Caput Pankreas	m	59
HROP101	Pancreatic, ductal	MSS	Pankreas, nicht näher bezeichnet	f	77
HROC69	Adenocarcinom	POLE, MSS	Rechtes Kolon	m	66
HROC198	Adenocarcinom	POLE, MSS	Rechtes Kolon	m	69
HROC252	Adenocarcinom	POLD, MSI-H, LS	Linkes Kolon/ Sigma/Rektum	m	56
HROC283	Adenocarcinom	POLE, MSS	Sigma	f	59
HROC324	Adenocarcinom	POLE, MSI-H, LS	Rechtes Kolon	f	56
HROC357	Adenocarcinom	POLE, MSS	Transverses Kolon	f	50
HROC400	Adenocarcinom	MSI-H	Rechtes Kolon	f	78
HROC402	Adenocarcinom	MSS	Lebermetastase, Primarius: Rectum Karzinom	f	69
HROC403	Adenocarcinom	MSI	Lebermetastase	m	78
HROC405	Adenocarcinom	MSS	Sigma	f	84
HROC407	Adenocarcinom	MSI-H	Rechtes Kolon	f	88
HROC419	Adenocarcinom	MSI-H	Rechtes Kolon	f	94
HROC425	Adenocarcinom	MSS	Rechtes Kolon	m	91
HROC427	Adenocarcinom	MSI	Rechtes Kolon	f	80
HROC428	Adenocarcinom	MSS	Sigma	m	78
HROC429	Adenocarcinom	MSS	Sigma	f	49
HROC458	Endometriumcarcinom	MSS	Sigma	f	82
HROC477	Adenocarcinom	MSS	Sigma	m	61
HROC499	Adenocarcinom	MSS	Lebermetastase, Primarius: Linkes Colon	m	83
HROC501	Adenocarcinom	MSS	Sigma	m	51
BC1	Gesunder Spender	-	-	m	69
FB	Gesunder Spender	-	-	m	36
HROM14	Mammakarzinom	PIK3CA, TP53, HR+	Rechte Mamma	f	39
HROC211	Sigma elongatum	-	-	f	81
HROC158	Kolonpolypen	-	Kolon	m	94
HROC152	Rektumpolypen	-	Rektum	f	64

Material und Methoden

2.1.2 Laborgeräte

CO ₂ -Brutschrank Inc246	Memmert GmbH; Schwabach
Durchflusszytometer FACSVers	BD Bioscience; Dummer
Etikettendrucker	Brady; Egelsbach
Heizblock	Haep Labor Consult; Bovenden
Heizplatte LGH	Präzitherm; Düsseldorf
Kühlschrank	Liebherr; Ochsenhausen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld; Lauda Königshofen
Pipetboy accu-jet pro	BRAND GmbH; Wertheim
Pipetten	Gilson; Frankreich, Villiers-le-Bel
Quadro MACS	Miltenyi; Bergisch Gladbach
Sterilwerkbank Safeflow 1.2	NUNC
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr; Ochsenhausen
Tiefkühlschrank (-80°C)	Kryotec-Kryosafe GmbH; Hamburg
Vakuumpumpe VacuSafe	INTEGRA Biosciences GmbH; Biebertal
Wasserbad WiseBath®	WITEG; Wertheim
Zentrifugen: Megafuge 1.0 R	Heraeus; Hanau
Rotina 38 1.8 Vision	Hettich GmbH; Tuttlingen
Multifuge 3 S-R Plus	Thermo Fisher Scientific; Darmstadt

Material und Methoden

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel Gläser; Braunschweig
Einwegpipetten Cellstar®	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Einmalhandschuhe	Hartmann; Heidenheim
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Objektträger	Menzel Gläser; Braunschweig
Parafilm	Bemis; Neenah Wisconsin
Pasteurpipetten	Fisher Scientific; Schwerte
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, GreinerBio-One™; Kremsmünster
Polypropylen-Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, GreinerBio-One™; Kremsmünster
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, GreinerBio-One™; Kremsmünster
Zellkulturflaschen Cellstar®	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, GreinerBio-One™; Kremsmünster
Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen Cellstar® 15ml	GreinerBio-One™; Kremsmünster
Zentrifugenröhrchen Cellstar® 50ml	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht

Material und Methoden

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Amphotericin B (Stocklösung 100mg/ml)	Dermapharm AG; Grünwald
Brefeldin A	MedChem Express; Monmouth Junction, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich; Darmstadt
Ciprofloxacin	Fresenius SE & Co. KGaA; Bad Homburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH.; Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech; Aidenbach
Dulbecco's PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAN Biotech; Aidenbach
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN Biotech; Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech; Aidenbach
Human CD40-Ligand Mutimer Kit	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAN Biotech; Aidenbach
IFN- γ Immukin [®]	Boehringer Ing.; Ingelheim am Rhein
IL-2 Proleukin [®]	Clinigen; Inc. Yardley, USA
IL-4	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Ipilimumab	Apotheke der Universitätsmedizin Rostock
L-Glutamin (200 mM)	PAN Biotech; Aidenbach
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Minocyclin	Ratiopharm GmbH; Ulm
OKT3	Überstand Hybridom (Zelllinie)
Pan T cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach

Material und Methoden

Pembrolizumab	Apotheke der Universitätsmedizin Rostock
Penicillin G (Stocklösung 10 ⁵ U/ml)	PAN Biotech; Aidenbach
RPMI 1640 mit L – Glutamin	PAN Biotech; Aidenbach
Streptomycin (Stocklösung 0,325 g/ml)	Fatol Arzneimittel GmbH; Schiffweiler
Tc TransAct	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
TexMACS	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Trypanblau	Sigma-Aldrich; Darmstadt
Trypsin	PAN Biotech; Aidenbach
Ursomutin	Serumwerk Bernburg AG; Bernburg
Zombie NIR	Bio Legend; San Diego, USA

2.1.5 Antikörper

CD3 PerCP	BioLegend; San Diego, USA
CD4 FITC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD8 APC/Cy7	BioLegend; San Diego, USA
CD8 APC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
CD19 FITC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD20 PerCP	Bio Legend; San Diego, USA
CD24 BV 785	Bio Legend; San Diego, USA
CD27 BV 421	Bio Legend; San Diego, USA
CD28	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD38 PE-Cy7	Bio Legend; San Diego, USA
CD40 APC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD40 APC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe

Material und Methoden

CD40L Multimer Kit	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
CD45/Ro APC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD50 FITC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD54 APC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD58 PE	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD62L PE	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
CD80 PE	Bio Legend; San Diego, USA
CD86 PE	BioLegend; San Diego, USA
CD86 PE-Cy7	BioLegend; San Diego, USA
CD95 PE/Cy7	BioLegend; San Diego, USA
CD102 FITC	BioLegend; San Diego, USA
CD107a FITC	BioLegend; San Diego, USA, Miltenyi Biotec; San Diego, USA
CD137 PE	Miltenyi Biotec; San Diego, USA
IgA APC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
IgD APC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
IgG APC	Southern Biotech; Birmingham, USA
IgM APC	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
IFN- γ PE	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
MHCI/HLA-ABC APC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
MHCI BV 510	Bio Legend; San Diego, USA
MHCII/HLA-DR + DP FITC	Immuno Tools GmbH; Friesoythe
MHCII PE	Immuno Tools GmbH; Friesoythe

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung von Tumor- und Blutproben

Wie bereits von Mullins et al. beschrieben, wurden Blut- und Tumorproben von Patientinnen und Patienten der Universitätsmedizin mithilfe von standardisierten Protokollen aufgearbeitet.¹⁰⁹ Die Proben umfassten Serumproben, PBLs (*peripheral blood lymphocytes*), Tumorgewebe (*vital* und *snap*), sowie Normalgewebe. Die Aufarbeitung der Blutproben zu PBLs wird im Folgenden unter Kapitel 2.2.4 näher beschrieben. Aus dem Tumorgewebe wurde mittels laborintern standardisierter Abläufe Zellkulturen etabliert. Dokumentiert wurden persönliche Patientendaten, Tumorklassifikation, molekulare Typisierung und klinisches *Outcome* in anonymisierter Form. Die Proben der Biobank sind folgendermaßen benannt: HRO (Hansestadt Rostock), C (Colon) oder P (Pankreas) oder M (Mamma), Nummer (fortlaufende Patientenummer). Metastasen werden mit „Met“ und einer Nummerierung gekennzeichnet. Für alle verwendeten Proben wurde eine Einwilligungserklärung unterschrieben und die Aufarbeitung erfolgte nach der Genehmigung der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Rostock (Referenznummer II HV 43/2004 und A 45/2007) nach Richtlinien der Deklaration von Helsinki.¹¹⁰

2.2.2 Zellkultur

Grundlegend erfolgte die Kultivierung der Immun- und Tumorzellen unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre. Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet, wobei das *PlasmoTest-Mycoplasma Detection Kit* von Invivogen zur Anwendung kam. Positiv getestete Kulturen wurden einer antibiotischen Behandlung unterzogen (s. Kapitel 2.2.11).

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde zuerst 50µl der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer Zellkammer gezählt. Hierbei konnten die lebenden Zellen von apoptotischen Zellen mittels Trypanblau-Färbung unterschieden werden. Mit Hilfe der ausgezählten Quadranten wurde ein Durchschnitt gebildet, welcher mit dem

Material und Methoden

Verdünnungsfaktor und 10.000 multipliziert wurde um die Zellanzahl in Millionen pro Milliliter zu berechnen.

Für die Kryokonservierung und Langzeitlagerung wurde die benötigte Zellmenge bei 1.200rpm für sieben Minuten zentrifugiert, das Medium abgenommen, die Zellen in 1,5ml Kryokonservierungsmedium resuspendiert und in Röhrchen zur Kryokonservierung pipettiert. Das Kryokonservierungsmedium bestand aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Röhrchen für die Kryokonservierung wurden im Anschluss mit Hilfe eines Gefrierbehälters um -1°C pro Minute auf -80°C runtergekühlt. Anschließend konnten sie zur längerfristigen Lagerung in einen Flüssigstickstofftank überführt werden.

Es wurden jeweils 15×10^6 T-Zellen, 5×10^6 B-Zellen und 3×10^6 Tumorzellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Zur Verwendung der kryokonservierten Proben für Experimente wurden diese in einem Wasserbad bei 37°C oder bei Raumtemperatur aufgetaut, in Zellkulturmedium resuspendiert und zentrifugiert. Nach Zentrifugation bei 1.200rpm für zehn Minuten konnte der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10ml frischem Medium aufgenommen und ausgesät werden. Auf die Kultivierung der T-Zellen wird im Folgenden in dem Kapitel 2.2.6 Das *Rapid Expansion Protokoll* näher eingegangen.

Die B-Zell-Populationen wurden bei einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in stehenden Kulturflaschen kultiviert. Das Zellkulturmedium für B-Zellen bestand aus 500ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), mit einem Zusatz von 50ml fetalem Kälberserum (FCS), 2,34g Glutamin mit 10IE/ml Penicillin, 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B (im Folgenden mit P/S/A abgekürzt)⁵⁷.

Die Tumorzellen wurden mit Tumorzellmedium (500ml DMEM mit 50ml/500ml FCS und 2,34g/500ml L-Glutamin) kultiviert und entsprechend ihrer Konfluenz ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde zuerst das Nährmedium abgesaugt und die adhärennten Zellen einmal mit PBS (*phosphate Puffered saline*; phosphatgepufferte Saline) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschengrund wurden 0,5-2ml Trypsin hinzugegeben und für fünf bis zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnten die Zellen in Nährmedium aufgenommen und für Experimente verwendet oder mittels Kryokonservierung aufbewahrt werden.

2.2.3 Färbeprotokoll durchflusszytometrische Messungen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht in der Isolierung von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom und Darstellung ihrer Zelleigenschaften durch Laser und fluoreszierende Antikörper durch Absorption und Streuung. Das vorwärts gestreute Licht (*forward scatter* = FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße, während das seitwärts gestreute Licht (*side scatter* = SSC) die Granularität darstellt. Durch die Bindung von fluoreszierenden Antikörpern an intra- oder extrazelluläre Epitope können zellspezifische Marker detektiert werden.

Generell wurden pro Probe 200.000-500.000 Zellen bei 300g für zehn Minuten zentrifugiert und das Medium abgenommen. Danach wurde das Zellpellet in 500µl PBS resuspendiert. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 300g für zehn Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen in 100µl Färbelösung (PBS mit Antikörpermenge entsprechend Herstellerangaben) gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 20-30 Minuten bei 4°C und vor Licht geschützt, wurden die Zellen bei 400g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 200µl PBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 400g für fünf Minuten. Danach wurden die Zellen in 250µl PBS aufgenommen und mit einem FACSVerse gemessen. Analysiert wurden die Daten mit der Software FCSalyzer 0.9.18-alpha (Sven Mostböck, Wien, Österreich; <https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

2.2.3.1 Durchflusszytometrische Messung der T-Zellen

Jede Probe enthielt 500.000 T-Zellen in 100µl PBS. Gefärbt wurde mit 4µl folgender Antikörper-Markierung: CD3-PerCP, CD4-FITC, CD8-APC/Cy7, CD45/Ro-APC, CD62L-PE und CD95-PE/Cy7 (PerCP=Peridinin-Chlorophyll-Protein, FITC=Fluorescein-Isothiocyant, APC=Allophycocyanin, Cy=Cyanin, PE=Phycoerythrin).

Zur Etablierung des Protokolls und Definition der *Gates* wurden Einzel-, Komplettfärbungen und ungefärbte Proben von HROM14 und zweier gesunder Spender (TcFB und TcBC1) verwendet. In Tabelle 2 ist die Definition der T-Zell-Subtypen dargestellt. Die Menge an T-Zellen eines bestimmten Phänotypes wurde als Prozentsatz von allen CD3⁺ T-Zellen ermittelt. Eine Datenauswertung mit der Darstellung der *Gates* ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.2, Abb. 24). Durch die Auswahl der Antikörper konnten verschiedene T-Zell-Subpopulationen an Tag null und Tag sieben der Expansion verglichen werden.

Tabelle 2: Definition T-Zell-Subpopulationen

T-Zell-Subpopulationen	CD-Marker
CD4 ⁺ T-Effektorzellen (T _{EFF})	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD62L ⁻ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁻
CD4 ⁺ Zentrale T-Gedächtniszellen (T _{CM})	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁺
CD4 ⁺ T-Effektorgedächtniszellen (T _{EM})	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD62L ⁻ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁺
CD4 ⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen (T _{SCM})	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁻
CD4 ⁺ Naive T-Zellen (T _N)	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁻ , CD45RO ⁻
CD8 ⁺ T-Effektorzellen (T _{EFF})	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD62L ⁻ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁻
CD8 ⁺ Zentrale T-Gedächtniszellen (T _{CM})	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁺
CD8 ⁺ T-Effektorgedächtniszellen (T _{EM})	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD62L ⁻ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁺
CD8 ⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen (T _{SCM})	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁺ , CD45RO ⁻
CD8 ⁺ Naive T-Zellen (T _N)	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD62L ⁺ , CD95 ⁻ , CD45RO ⁻

2.2.3.2 Durchflusszytometrische Messung der T-Zellen der Degranulierungstests

Nach Stimulation der T-Zellen im Rahmen der Degranulierungstests, wurden die Zellen zur Färbung zuerst mit 100µl PEB (PBS mit 5% bovinem Serum Albumin) gewaschen und mit 300g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden sie in 50µl PEB resuspendiert. Nach der Zugabe von 50µl *Inside Fix* des *Miltenyi Inside Stain Kits*, wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine weitere Waschung der Zellen mit PEB. Schließlich wurden sie mit 200µl *Inside Perm* des *Miltenyi Inside Stain Kits* resuspendiert und mit 300g für fünf Minuten zentrifugiert.

Danach erfolgte die Färbung mit 92µl *Inside Perm*, 4µl anti-IFN-γ-Antikörper (PE) und 4µl anti-CD8-Antikörper (APC). Nach der Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 2-8°C, wurde 200µl PEB hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Probe mit 300g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 200µl PEB resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur (BD). Zur Kalibrierung des Gerätes und zur Anpassung der *Gates* bei der FACS Auswertung wurden ungefärbte Proben der jeweiligen Zelllinie verwendet. Eine beispielhafte Darstellung der Einteilung der FACS *Plots* ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.4, Abb. 28).

2.2.3.3 Durchflusszytometrische Messung der kostimulatorischen Marker der B-LCLs

Für die Charakterisierung der kostimulatorischen Marker der B-LCLs mittels Durchflusszytometrie wurde das gleiche Färbeprotokoll verwendet wie für die Analyse der Subpopulationen der T-Zellen (s. Kapitel 2.2.3.1). Gefärbt wurde mit CD50-FITC, CD58-PE, CD54-APC, CD86-PE-Cy7, CD102-FITC, CD40-APC, MHCII-PE, IgM-APC, IgG-APC und IgA-APC. Zur Kalibrierung und zur Etablierung der *Gates* wurden Einzelfärbungen und ungefärbte Proben von HROC357 verwendet. Eine beispielhafte Darstellung der Einteilung der FACS *Plots* ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.6, Abb. 30)

2.2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen der B-LCLs

Gefärbt wurden die immortalisierten Zelllinien Bc HROP101, HROC425, HROC477, Tumor-infiltrierende-B-Lymphozyten, BPLs eines Spender *Buffy Coats*, B-LCLs des Spenders FB und Vollblut. Zur Kalibrierung des FACS Gerätes und zur Erstellung des *Panels* wurden B-LCLs des gesunden Spenders (Bc FB) und *Beads* mit Komplettfärbung, Einzelfärbung und ungefärbte Proben verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse wurde durchgeführt mit einem Cytex Aurora. Verwendet wurde die Software FCSalyzer 0.9.18-alpha. Pro Probe wurden $0,5 \times 10^6$ B-LCLs oder PBLs erst mit PBS gewaschen und danach mit jeweils $3 \mu\text{l}$ der Antikörper für CD27 (BV421), MHCI (BV480), MHCII (BV605), CD24 (BV785), CD19 (FITC), CD80/86 (PE), CD20 (PerCP), CD38 (PE/Cy7) und IgD (APC) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt, inkubiert. Nach der Zugabe von 1-2ml PEB-Puffer (PBS mit 0,5% Bovines Serum Albumin (BSA) und 2mM EDTA) und Zentrifugation bei 400g für fünf Minuten, konnten die Zellen in PEB resuspendiert und analysiert werden. In der nachfolgenden Tabelle (s. Tabelle 3) sind die CD-Marker zur Differenzierung der B-Zell-Subtypen dargestellt. Eine beispielhafte Darstellung der Einteilung der FACS *Plots* ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.8, Abb. 32).

Tabelle 3: Definition B-Zell-Subpopulationen

B-Zell-Subpopulation	CD-Marker
Aktivierte B-Zellen	CD19 ⁺ , CD80/86 ⁺ , MHCI ⁺
Gedächtnis-B-Zellen	CD19 ⁺ , CD27 ⁺ , IgD ⁺
Naive B-Zellen	CD19 ⁺ , IgD ⁺ , CD27 ⁻
Plasmazellen	CD19 ^{dim} , CD38 ⁺ , CD20 ^{dim}
Regulatorische B-Zellen	CD19 ⁺ , CD24 ⁺ , CD27 ⁺ , CD38 ⁺ , CD20 ⁻

2.2.4 Isolation der peripheren Lymphozyten aus Blutproben

Die Isolierung der PBLs aus Vollblut erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurden 20ml heparinisiertes Vollblut mit 15ml PBS in einem 50ml Polypropylen-Röhrchen verdünnt und 15ml Pancoll unterschichtet. Nach 15 Minuten ungebremster Zentrifugation bei 2.500rpm bildeten die Lymphozyten einen weißen Interphasering auf dem Pancoll. Nach Abnahme dieses Ringes wurden die Lymphozyten mit PBS gewaschen, erneut bei 1.800rpm für 15 Minuten zentrifugiert und zur Kryokonservierung in Kryokonservierungsmedium aufgenommen oder zur T-Zell-Isolierung weiterverwendet.

2.2.5 T-Zell-Isolierung

Zur Isolation der T-Zellen aus den vorbereiteten PBLs kam das *Pan T Cell Isolation Kit* von Miltenyi mit magnetischer Separation zur Anwendung. Dabei wurden alle Lymphozyten, außer den T Zellen, mit Antikörpern und magnetischen Markern (=Beads) versehen. Die Markierung erfolgte durch Biotin-gebundene monoklonale Antikörper für CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a (Glycophorin A). Als magnetische *MicroBeads* wurden monoklonale anti-Biotin Antikörper (IgG1) und anti-CD61 Antikörper verwendet. Durch diese Markierung blieben alle Nicht-T-Zellen bei Durchlaufen einer Säule entlang eines magnetischen Feldes an einer Matrix haften, während die T-Zellen am Ende der Säule abgefangen werden konnten.

Zuerst wurden die bereits isolierten peripheren Lymphozyten bei Raumtemperatur aufgetaut, mit MACS Puffer (*Magnetic Activated Cell Sorting*) gewaschen, bei 300g für 10min zentrifugiert

und der Überstand verworfen. Zur Herstellung des MACS Puffer wurden 500ml PBS mit 2ml 500mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und 25ml FCS mittels einer Vakuum-Pumpe steril filtriert und bei 4°C gelagert. Pro 10^7 Zellen wurde 40µl MACS Puffer verwendet, 10µl des Pan T-Zell Biotin Antikörpers hinzugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 30µl MACS Puffer und 20µl Anti-Biotin MicroBeads zugefügt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren, wurde das Zellpellet in 500µl MACS Puffer resuspendiert. Nachdem die Säule im *Quadro MACS Separator* mit Puffer äquilibriert wurde, konnte die Zellsuspension separiert und die Zellen ohne Markierung aufgefangen werden. Im Anschluss wurde die Säule viermal mit 3ml MACS Puffer nachgespült. Nachdem die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt wurde, konnten alle Nicht-T-Zellen aus der Matrix extrahiert werden. Diese wurden für die B-Zell-Transformation eingesetzt (s. Kapitel 2.2.7). Die isolierten T-Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Messung analysiert (s. Kapitel 2.2.3.1), mit Hilfe des *Rapid Expansion Protocols* expandiert (s. Kapitel 2.2.6) oder zur Lagerung kryokonserviert (s. Kapitel 2.2.2).

Da es durch die Isolierung zu einem quantitativen Verlust von durchschnittlich 40% der Zellen im Vergleich zum Ausgangswert an PBLs kam, wurden einige T-Zell-Expansionen und EBV-B-Zell-Transformationen direkt mit PBLs durchgeführt. Dies betraf die Proben HROC402, HROC458, HROC69, HROC400, HROC403, HROC427 und HROC407. Quantitativ wurde dafür ein Anteil von 30% T-Zellen innerhalb einer Lymphozyten-Population als laborinterner Standard angenommen und das Protokoll angepasst.

2.2.6 Das *Rapid Expansion Protocol* für T Zellen

Die T-Zell Expansion erfolgte mit *Rapid Expansion Medium*, das sich aus TexMACS Medium, 3% humanem AB-Serum (Blutgruppe AB) und 3.000U/ml Interleukin-2 (IL-2) zusammensetzte. Des Weiteren wurden für die Expansion von 10^6 T-Zellen, 200×10^6 bestrahlte PBLs gesunder Spender benötigt. Diese wurden aus Vollblut isoliert (s. Kapitel 2.2.4) und mit Hilfe einer Gamma-Strahlenanlage (40 Gray, IBL 637) bestrahlt. Die Bestrahlung führte zu einer Hemmung der Proliferation der PBLs in der Kokultur aus T-Zellen und PBLs.

Kultiviert wurden die isolierten T-Zellen in *Rapid Expansion Medium* mit P/S/A und den bestrahlten PBLs, sowie 0,1% OKT3-Überstand für fünf Tage. Der Anti-CD3-Antikörper aus dem

Überstand der OKT3-Hybridomzelllinie und IL-2 führten zur Aktivierung und zur Expansion der T-Zellen. IL-2 regt die Zellproliferation während der Entwicklung der naiven T-Zellen an und ist essentiell für eine funktionale Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen.¹¹¹ Hohe Dosen von IL-2 über einen kurzen Zeitraum stärken die T-Zell-Proliferation, fördern die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen¹¹² und tragen durch Reduktion der Aktivierungsschwelle zu einer gesteigerten Zytotoxizität von CD8⁺T-Zellen bei.^{41,113}

An Tag Null des *REP* wurden 500.000 T-Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (s. 2.2.3.1). Am fünften Tag wurden $\frac{3}{4}$ des Mediums durch REP-Medium ohne OKT3 ersetzt, um eine dauerhafte Aktivierung und zytotoxischen Stress zu vermeiden. Nach sieben Tagen wurden die Zellen gezählt und der Wachstumsfaktor berechnet ($q = a_{n+1} / a_n$, wobei a_n und a_{n+1} für die Zellzahlen zweier aufeinanderfolgender Zeitpunkte stehen). Der kumulative Wachstumsfaktor ergibt sich bei Multiplikation des errechneten Wertes mit dem Ausgangswert. Des Weiteren erfolgte erneut eine durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen (s. Kapitel 2.2.3.1). Die isolierten und expandierten T-Zellen wurden an Tag sieben mittels Kryokonservierung eingelagert.

Das ursprüngliche Protokoll sieht eine Expansionsdauer von zwei Wochen vor. Um zu testen, ob eine Kultivierung von einer Woche ebenfalls ausreichen würde, wurden die T-Lymphozyten von TcBC1, TcFB und TcHROM14 für zwei Wochen expandiert. Durch den kumulativen Wachstumsfaktor konnten Aussagen über das Wachstumsverhalten der T-Zell-Populationen an den einzelnen Tagen getroffen werden. Die erste Zählung wurde an Tag sieben durchgeführt und für die Dauer der Kultivierung täglich wiederholt. Außerdem wurde durch die Verwendung verschiedener Zellkulturmedien vom Standardprotokoll abgewichen. Neben TexMACS Medium wurden bei den T-Zellen von HROC402 und HROC400 die Standardzellkulturmedien IMDM und DMEM verwendet.

2.2.7 EBV-B-Zell-Transformation

Für die EBV-Transformation wurde die B95/8-Zelllinie des Lisztaffen (*cotton-top tamarin*) verwendet, welche hohe Titer des EBV in Kultur sezerniert. Das EBV gilt als Auslöser der Transformation von B-Zellen zu immortalisierten B-LCLs. Voraussetzung hierfür ist die Imitation des Überlebenssignals am B-Zell-Rezeptor durch das EBV. Es wurden $5-10 \times 10^6$ B95/8 Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einer stehenden T75-Zellkulturflasche kultiviert. Verwendet wurde das gleiche Medium wie für die Kultur der B-LCLs (s. Kapitel 2.2.2). Zeigte sich eine Abdunkelung und Intensivierung der Gelbfärbung des Mediums, konnte der durch Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten entstandene Überstand entnommen werden. Dieser wurde dann mit Hilfe eines Filters mit 0,2µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C für maximal vier Wochen gelagert. Bei erneutem Farbumschlag des Zellkulturmediums konnte der Ablauf wiederholt werden. Danach wurden 10ml der filtrierten Überstände gemischt und erneut filtriert. Zur Herstellung des Transformationsmedium wurden 20ml des gemischten und filtrierten Überstandes mit 8ml FCS, 20ml des Zellkulturmediums für B-LCLs und 0,1% Cyclosporin A zusammengeführt. Durch Cyclosporin A wird die Produktion von IL-2 und weiterer proinflammatorischer Zytokine gehemmt und somit die Aktivierung von T-Zellen inhibiert.

Zur Generierung immortalisierter B-Zelllinien wurden die Nicht-T-Zellen nach der T-Zell-Isolierung in Transformationsmedium suspendiert. Eine Woche später wurde DMEM mit P/S/A hinzugegeben. Die Nicht-T-Zellen wurden für sechs bis acht Wochen im Transformationsmedium kultiviert, währenddessen sie sichtbare Zellaggregate ausbildeten. Bei einer sehr hohen Gesamtmenge an Nicht-T-Zellen wurde die B-Zell-Transformation als doppelter Ansatz kultiviert. Die Kennzeichnung der Ansätze erfolgte mit fortlaufender Nummerierung in Klammern (z.B. Bc HROC198 (1)). Nach Ausbildung der Zellaggregate wurden die B-LCLs hinsichtlich ihrer kostimulatorischen Marker (CD50, CD58, CD54, CD86, CD102, MHC II, CD40, IgM, IgG und IgA) analysiert (s. Kapitel 2.2.3.3). Des Weiteren wurde ihre Zugehörigkeit zu B-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (s. Kapitel 2.2.3.4).

2.2.7.1 Stimulation der B-LCLs durch IL-4 und CD40L

Um das Wachstum der Zelllinien anzuregen, wurden Bc HROP88 und Bc HROP92 mit Interleukin-4 (IL-4) und CD40-Ligand stimuliert. Dafür wurde IMDM Medium mit 0,1% IL-4 und 5% AB Serum versetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation von 4µl/ml CD40-Ligand mit 4µl/ml *Cross-Linking Antibody* für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der vorbereitete Human CD40-Ligand dem IMDM Medium hinzugegeben. Für sechs Tage wurden 300.000 B-LCLs von HROP88 und 500.000 B-LCLs von HROP92 in jeweils 1ml des hergestellten Mediums kultiviert. Dann wurde erneut IMDM Medium mit IL-4-Antikörper, AB-Serum und CD40-Ligand vorbereitet und die Zellen für weitere 14 Tage kultiviert. Am Ende der Stimulation erfolgte eine Zählung der Zellen und die Resuspension in 5ml DMEM Medium mit P/S/A.

2.2.8 MHC I/II Stimulation der Tumorzellen

Um die Expression von MHCI und MHCII zu steigern, wurden die Zelllinien HROC357, HROC499, HROC499Met1, HROC252 und HROC69 mittels IFN-γ stimuliert. An Tag null wurden zweimal 300.000 Tumorzellen in 3ml Medium ausgesät. Nach der Adhäsion der Tumorzellen am Flaschengrund wurde an Tag eins jeweils ein Ansatz mit 200U/ml IFN-γ behandelt. Nach 48h Inkubationszeit wurden die behandelten und unbehandelten Zellen mit dem bereits erwähnten Färbeprotokoll (s. Kapitel 2.2.3) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur analysiert. Bei der Färbung wurde ein APC-gekoppelter Antikörper für MHCI und ein FITC-gekoppelter Antikörper für MHCII von ImmunoTools eingesetzt. Des Weiteren wurde pro Zellpopulation eine ungefärbte Probe zur Kalibrierung verwendet.

2.2.9 Degranulierungstests der T-Zellen

Mit Hilfe des Degranulierungstests wurden die expandierten T-Zellen hinsichtlich ihrer Aktivität und Funktionalität analysiert. Zur Granulation angeregt wurden die T-Zellen durch *TransAct*, patientengleiche Tumorzellen mit und ohne ICI. Bei *TransAct* handelt es sich um ein T-Zellen stimulierendes Reagenz von Miltenyi Biotec. Eingesetzt wurden die Tumorzellen von HROC252Tu2, HROC357, HROC69, HROC499 und HROC499Met1.

Vor Beginn des Degranulierungstests wurden die Tumorzellen zwei Tage mit 200U/ml IFN- γ behandelt, um eine erhöhte MHCII-Expression zu induzieren. Kultiviert wurden die Tumorzellen in DMEM mit P/S/A, 10%AB Serum und 300U/ml IL-2. Für den Degranulierungstest wurde eine 96-Well Platte mit anti-CD28 beschichtet. Dafür wurden pro Well 50 μ l einer Lösung aus 5 μ g/ml anti-CD28 mit PBS appliziert, der Deckel mit Parafilm befestigt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der anti-CD28-Antikörper erzeugt kostimulatorische Signale zum Überleben und zur Aktivierung der T-Zellen. Bei dem ersten Degranulierungstest der Zellpopulationen HROC499 und HROC499Met1 wurden 100.000 T-Zellen und 50.000 Tumorzellen pro Well verwendet. Bei allen folgenden Degranulierungstests wurde die doppelte Menge an T-Zellen und Tumorzellen verwendet. Pro Well wurden die T-Zellen und Tumorzellen in 100 μ l DMEM (mit P/S/A und 10% AB Serum) mit anti-CD107a-FITC-Antikörper ausgesät. Angewandt wurden Antikörper von Miltenyi oder BioLegend in entsprechender Konzentration nach Herstellerangaben. Der CD107a-Marker kennzeichnet die Degranulation von T-Zellen. Drei Wells enthielten ausschließlich T-Zellen, drei Wells T-Zellen mit jeweils 2 μ l *TransAct*, drei Wells T-Zellen mit Tumorzellen und drei Wells T-Zellen mit Tumorzellen und 20 μ g/ml Pembrolizumab und 10 μ g/ml Ipilimumab (*Immunecheckpoint-Inhibitoren*). Dann wurden die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 μ g/ml Brefeldin A zu allen Wells hinzugegeben und erneut für 4h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Zellen hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenmarker am FACSCalibur analysiert werden.

2.2.10 Auftaukontrolle

Da das Ziel der Protokolletablierung des *Rapid Expansion Protocols* die Generierung einer möglichst großen Anzahl funktionaler und robuster T-Zellen darstellte, wurde eine Auftaukontrolle von zuvor expandierten und kryokonserviert gelagerten T-Zellen durchgeführt. So konnte ermittelt werden, wie viele T-Zellen den Prozess des Einfrierens und Auftauens überlebten. Gezählt wurde jeweils eine kryokonservierte Probe der T-Zellpopulationen Tc HROC499, Tc HROC69, Tc HROC252, Tc HROC69 und Tc HROC357. Als Ausgangswert konnte eine Zellzahl von 15×10^6 T-Zellen pro kryokonservierter Probe angenommen werden. Die Auswahl der T-Zellpopulationen kann als Stichprobe der Grundgesamtheit gewertet werden.

2.2.11 Therapie der Mykoplasmen-kontaminierten B-LCLs

Zur Behandlung der B-LCLs von Mykoplasmen wurde ein Protokoll mit einer Kombinationstherapie aus Ursomutin und Minocyclin verwendet. Für die Therapie wurden die Zellen zuerst in drei verschiedene Populationsgrößen (10.000 Zellen, 50.000 Zellen und 100.000 Zellen) eingeteilt. Für die Kombinationstherapie wurden die Zellen für vier Tage mit 10µg/ml Ursomutin und im Anschluss für drei Tage mit 5µg/ml Minocyclin kultiviert. Dies wurde zweimal durchgeführt. Mit dem Wechsel des Antibiotikums erfolgte auch die Erneuerung des Kulturmediums (DMEM mit 10% FCS).

2.2.12 Statistik

Zur Testung der Signifikanz wurden gepaarte T-Tests mit zweiseitiger Verteilung durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei einem Grenzwert von $p=0,05$.

Um den Grad des linearen Zusammenhangs zu bestimmen, wurden Korrelationskoeffizienten verwendet. Ein Wert Richtung +1 spricht für einen positiv gerichteten Zusammenhang, während ein Wert Richtung -1 auf eine negative Beeinflussung hindeutet. Steuert der Koeffizient Richtung null, ist kein Zusammenhang nachweisbar.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Excel der Version von 2016 durchgeführt. Bei Darstellung von Mittelwerten in Diagrammen, wird auch die zugehörige Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Messungen zur Berechnung des Mittelwertes ist unter den Diagrammen zu finden.

2.2.13 DNA-Fingerprint

Durchgeführt wurde der DNA-Fingerprint bei den Zelllinien Bc HROC198 (1), Bc HROC252, Bc HROC324, Bc HROC405 (1) und (2), Bc HROC425, Bc HROC477 und Bc HROC501. Es konnten nicht alle verwendeten B-LCLs analysiert werden, da für die Testung eine Mindestmenge von einer Million Zellen und ein Vergleichswert benötigt wurden. Durchgeführt wurde die DNA-Fingerprint-Analyse aus den B-Zellpellets nach laborinternem Standardverfahren von Hr. Matthias Krohn.

3 Ergebnisse

3.1 Selektion der Patientinnen und Patienten

Ein Aspekt einer erfolgreichen Immuntherapie besteht in der Selektion der Patientinnen und Patienten vor Therapiebeginn. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keine Korrelation zwischen dem Patientenalter und einer erfolgreichen T-Zell-Expansion oder B-Zell-Transformation. Der Korrelationsfaktor r zwischen dem Alter der Patientinnen und Patienten und dem kumulativen Wachstumsfaktor der T-Zellen betrug $r=-0,009$ und bezüglich des kumulativen Wachstumsfaktors der B-LCLs $r=-0,15$. Dies verdeutlicht, dass das Lebensalter der Patientinnen und Patienten keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Lymphozyten *in vitro* ausübte. Es konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Tumorgroße und dem Wachstumsverhalten der T-Zellen oder B-LCLs nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen der Tumorgroße und dem Wachstumsfaktor der T-Zellen ergab $r=0,2$. Bei den B-LCLs betrug er $r=0,5$. Bezüglich der B-LCLs zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Wachstumsfaktor der B-LCLs und der Kultivierungsdauer mit EBV-sezernierenden Zellen ($r=-0,16$) oder dem Wachstumsverhalten der patientengleichen T-Zellen ($r=0,09$).

3.2 T-Zellen

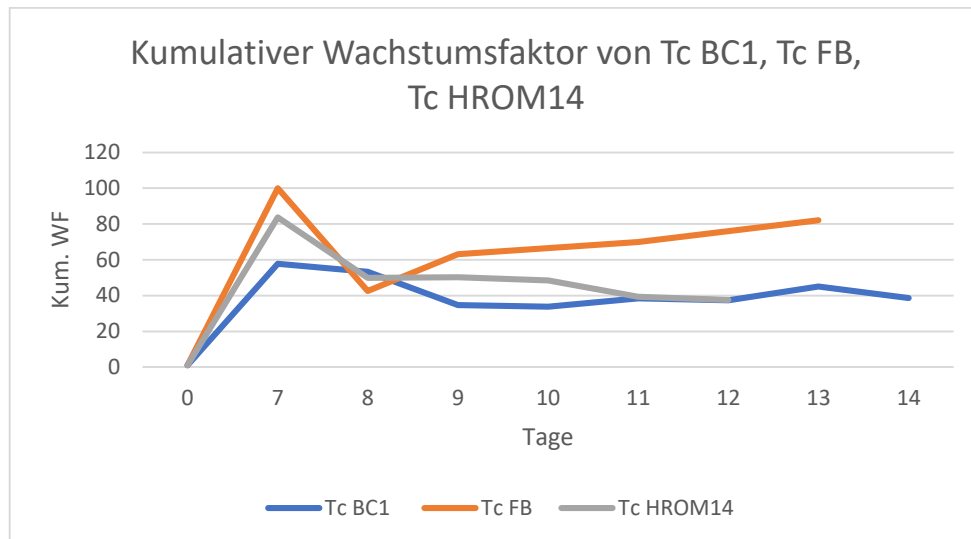
3.2.1 Das *Rapid Expansion Protocol*

3.2.1.1 Verkürzung des *Rapid Expansion Protocols*

Das *REP* gilt als Goldstandard der T-Zell-Expansion *in vitro*.^{114,101} Zur Steigerung der Kosten- und Zeiteffizienz wurde das Protokoll von 14 Tagen auf sieben Tage Expansionsdauer gekürzt. Dafür wurde das Wachstumsverhalten der T-Zell-Kontroll-Populationen von Tc BC1, Tc HROM14 und Tc FB im Standard REP für 14 Tage beobachtet. Gezählt wurden die Zellen hierfür an Tag null, Tag sieben und jedem darauffolgenden Tag bis Tag 14. Wie der Abb. 3 zu entnehmen ist, wiesen alle Populationen ihr stärkstes Wachstumsverhalten innerhalb der ersten sieben Tage in Kultur auf. Am achten Tag sank der kumulative Wachstumsfaktor bei Tc

Ergebnisse

BC1 um 8%, bei Tc FB um 58% und bei Tc HROM14 um 60%. Aufgrund fallender Zellzahlen im REP wurde die Expansion der Tc HROM14 nach 12 Tagen abgebrochen. Anhand dieser Daten erfolgte die weitere Durchführung des Protokolls in gekürzter Form mit einer Expansionsdauer von einer Woche.

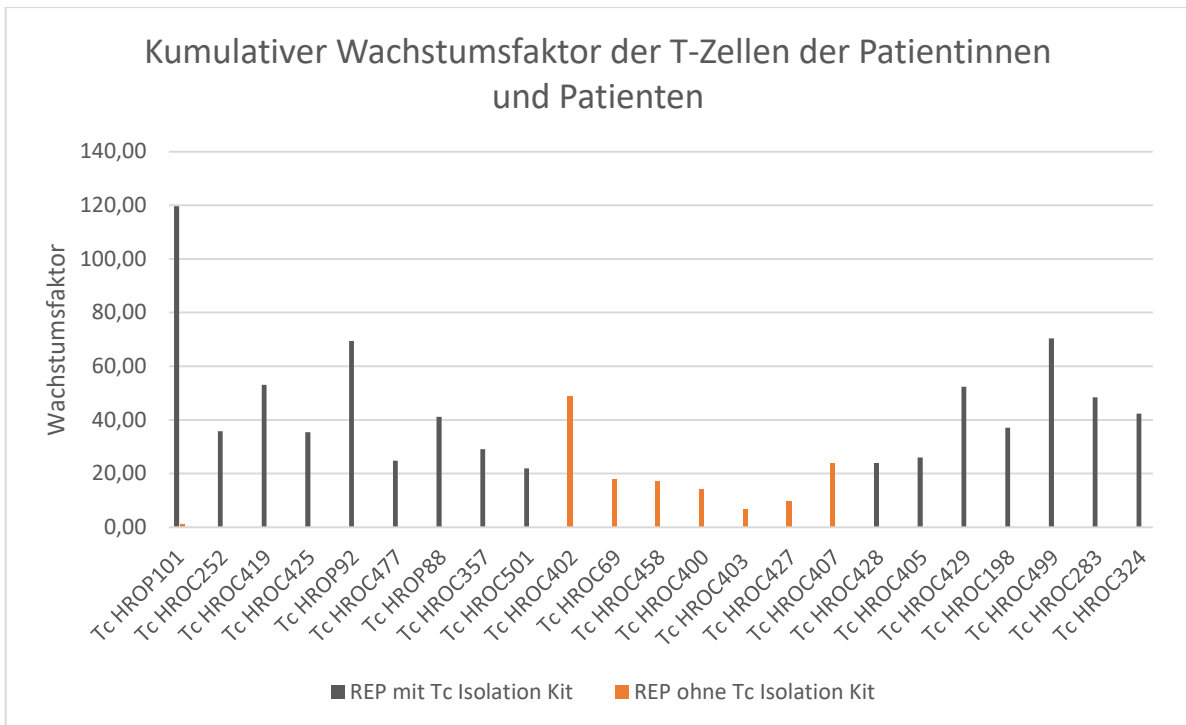


3. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen von Tc BC1, Tc FB und Tc HROM14 der Kontrollgruppe nach REP Kultur für 12-14 Tage

3.2.1.2 Quantitative Erfassung der T-Zell-Expansion

Bezogen auf die absolute Ausgangs- und Endmenge an T-Zellen konnten innerhalb der Patienten-Gruppe im Mittel $152,6 \times 10^6$ T-Zellen (± 86) aus $5,4 \times 10^6$ Ausgangszellen ($\pm 3,9$) durch das siebentägige REP generiert werden. Die größte Anzahl an expandierten T-Zellen ließen sich bei Tc HROC283 (339×10^6), Tc HROC501 (306×10^6) und Tc HROP92 (300×10^6) verzeichnen. Eine Korrelation zwischen dem Mikrosatellitenstatus des Patienten-Tumors und dem Wachstumsverhalten der T-Zellen konnte nicht festgestellt werden ($r = -0,24$). Der kumulative Wachstumsfaktor betrug im Mittel 37,8. Die starke Variabilität des Wachstumsverhaltens der T-Zellen wird auch durch eine Standardabweichung des Wachstumsfaktors von 24,9 deutlich. Die T-Zellpopulation von HROP101 wies mit einem kumulativen Wachstumsfaktor von 119,6 das stärkste Wachstumsverhalten auf (s. Abb. 4). Auf die Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens zwischen den mit Hilfe des *Tc Isolation Kits* separierten und den nicht-isolierten T-Zellen wird in einem separaten Abschnitt eingegangen.

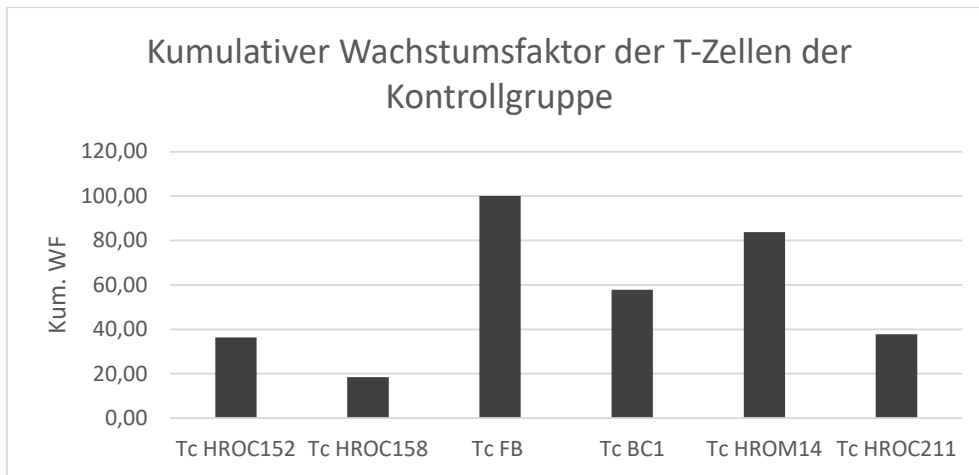
Ergebnisse



4. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen der Patientinnen und Patienten, berechnet aus den Werten von Tag null und Tag sieben des REP; die CD3⁺ T-Zellen der Populationen, welche ohne vorherige Isolation expandiert wurden, werden in orange dargestellt

Bei den T-Zellen der Kontrollgruppe betrug die Differenz zwischen der Anzahl an Tag null und Tag sieben im Mittelwert $212,4 \times 10^6$ bei einer Standardabweichung von 108. Die größte absolute Zunahme ließ sich dabei bei Tc HROC152 verzeichnen. Diese T-Zellpopulation erreichte an Tag sieben einen absoluten Wert von 423×10^6 . Bei der Kontrollgruppe zeigte sich ein mittlerer kumulativer Wachstumsfaktor von 55,7 der T-Zellpopulation mit einer Standardabweichung von 31,1 nach siebentägiger Durchführung des REP. Hierbei verzeichnete Tc FB mit 100 den größten kumulativen Wachstumsfaktor, gefolgt von Tc HROM14 mit 83,8 (s. Abb. 5).

Ergebnisse



5. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen der Kontrollgruppe, berechnet aus den Werten von Tag null und Tag sieben des REP

3.2.1.3 Medium-Austausch

Hinsichtlich der Effizienz von Laborkosten bei Anwendung des REP wurden die unterschiedlichen Medien IMDM (PAN Biotech), DMEM (PAN Biotech) und TexMACS (Miltenyi) untersucht. IMDM und DMEM gelten als Standardzellkulturmedien, wobei IMDM besonders zur Proliferation sehr dichter Zellpopulationen verwendet wird. Das TexMACS Medium von Miltenyi wurde hingegen speziell zur Expansion von T-Zellen entwickelt.

Die T-Zellen von HROC402 wurden bei Ansatz des REP mit DMEM P/S/A kultiviert. Im Laufe der Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel auf IMDM. Die Population wies mit einem Wachstumsfaktor von 49 eine erfolgreiche Expansion auf. Damit übertraf sie den Mittelwert der Wachstumsfaktoren der T-Zell-Populationen der Patientinnen und Patienten (WF=38).

Von den $12,3 \times 10^6$ T-Zellen von HROC400 wurde die Hälfte mit TexMACS und die andere Hälfte mit IMDM Medium kultiviert. Nach sieben Tagen war die Population in IMDM Medium auf $79,5 \times 10^6$ T-Zellen expandiert. Der Wachstumsfaktor betrug 6,4. Die Population, welche mit TexMACS Medium kultiviert wurde, verzeichnete einen Wachstumsfaktor von 7,8 und erreichte eine Zellgröße von 96×10^6 Zellen. Somit führte die Verwendung von TexMACS Medium verglichen mit IMDM Medium in diesem Fall zu einem geringfügig besseren Expansionsergebnis. Im Zuge der Optimierung des REP bezüglich der Kosteneffizienz bleibt in Zukunft zu testen, ob ein Wechsel des Mediums von TexMACS hin zu IMDM oder DMEM auch bei einer größeren Anzahl an getesteten T-Zellen vergleichbare Ergebnisse erzielt.

3.2.1.4 Auftaukontrolle

Bei einer Stichprobe der Grundgesamtheit wurde eine Auftaukontrolle durchgeführt, um die Robustheit der T-Zellen zu testen. Dabei wurde eine Probe von zuvor expandierten und kryokonservierten T-Zellen aufgetaut und gezählt. Als Ausgangswert konnte pro kryokonservierter Probe eine Zellzahl von 15×10^6 T-Zellen angenommen werden. Die gezählten Zellzahlen lebender T-Zellen nach dem Auftauen können Tabelle 4 entnommen werden. Die Diskrepanz der geringeren Anzahl an Zellen kann auf eine vermehrte Rate toter Zellen zurückgeführt werden. Die höheren Werte lassen sich dadurch erklären, dass durch starke Zellaggregatbildung und resultierender Ungenauigkeiten bei der Zellzählung mehr als 15×10^6 Zellen eingefroren worden waren.

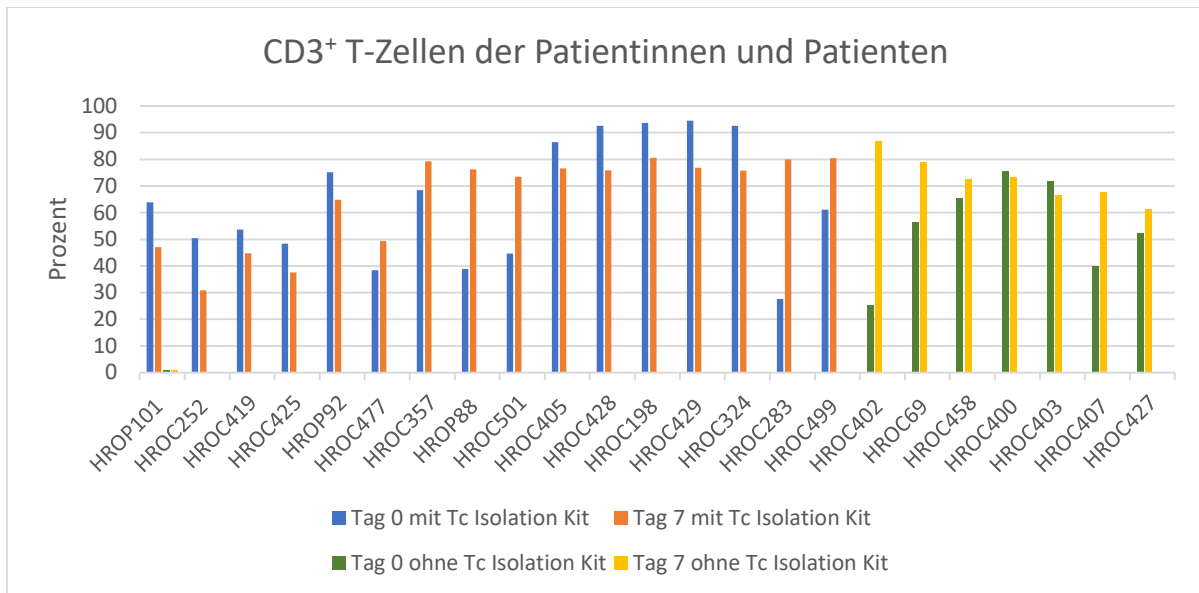
Tabelle 4: Anzahl lebender T-Zellen nach Kryokonservierung

Zellprobe	Zellzahl
Tc HROC499	$6,15 \times 10^6$
Tc HROC69	$16,97 \times 10^6$
Tc HROC252	$18,06 \times 10^6$
Tc HROC357	$5,98 \times 10^6$

3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Expansion

Die phänotypische Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt. CD3 wird von allen T-Zellen des Immunsystems exprimiert und eignet sich zur Definition der Population als T-Zellen. Abbildung sechs zeigt die prozentuale Verteilung der CD3⁺ T-Zellen an Tag null und Tag sieben des REP im Vergleich. Unterschieden wurden hierbei die Populationen, welche mit oder ohne vorherige Isolation durch das *Tc Isolation Kit* expandiert wurden. Im Mittel waren an Tag null des REP 62% der untersuchten Zellen CD3⁺. Innerhalb der untersuchten Populationen schwankte dieser Wert stark ($\pm 21,3$). Das Maximum bildete Tc HROC429 mit 94% CD3-Expression und das Minimum Tc HROC402 mit 25% CD3⁺ T-Zellen. An Tag sieben stieg der Mittelwert der CD3⁺ T-Zellen auf 68% ($\pm 15,3$).

Ergebnisse



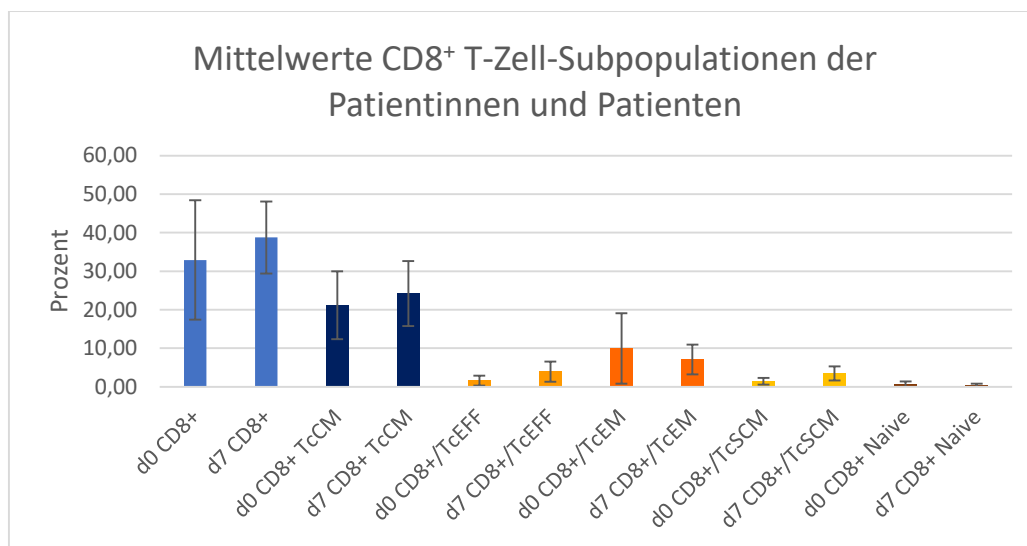
6. Abb. Prozentualer Anteil der CD3⁺ T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation an Tag null und Tag sieben des REP; Analyse mittels Durchflusszytometrie; Darstellung der fraktionierten Populationen an Tag null (blau) und Tag sieben (orange), sowie der unfraktionierten Populationen an Tag null (grün) und Tag sieben (gelb)

Im Vergleich dazu lag der Mittelwert der CD3-exprimierenden Zellen der Personen ohne Tumorerkrankung in der Kontrollgruppe bei 96% an Tag null ($\pm 2,9$; $p < 0,001$) und sank zu Tag sieben auf 77% ($\pm 3,3$; $p = 0,016$). Innerhalb der Kontrollgruppe wurden alle Zellpopulationen vor Durchführung der Expansion isoliert. Eine Graphik der prozentualen Verteilung der CD3⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.1, Abb. 23).

Im Anschluss wurden die CD3⁺ T-Zellpopulation hinsichtlich der Expression von CD4 oder CD8 in T-Helferzellen oder zytotoxischen T-Zellen unterteilt. Mittels der Oberflächenmarker CD62L, CD45RO und CD95 konnten die T-Zellen in Naive T-Zellen (T_N), T-Effektorzellen (T_{EFF}), T-Effektorgedächtniszellen (T_{EM}), Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und Stammzell-T-Gedächtniszellen (T_{SCM}) eingeteilt werden (für die genaue Definition s. Kapitel 2.2.3.1). Als Positiv- und Negativkontrollen dienten gefärbte und ungefärbte Proben von Tc FB und Tc BC1 der Kontrollgruppe. Im Folgenden werden zuerst die Mittelwerte der T-Zellpopulationen der Personen mit Pankreas- und Kolonkarzinom näher betrachtet. Die prozentuale Verteilung bezieht sich auf die Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen. Auf Grund großer Standardabweichungen und interindividuellen Schwankungen ließen sich die einzigen signifikanten Unterschiede

Ergebnisse

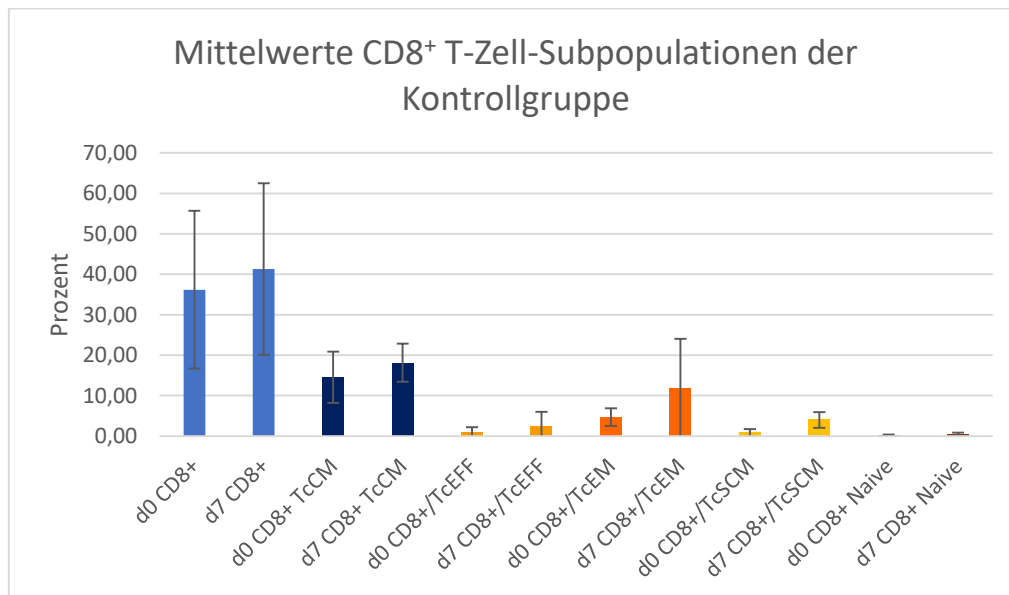
innerhalb der Populationen der CD8⁺ T-Effektorzellen und der CD8⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen in der Patientenkohorte feststellen. Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, nahmen von Tag null zu Tag sieben die CD8⁺ T-Effektorzellen von durchschnittlich 1,6% ($\pm 1,3$) an Tag null auf zirka 4% ($\pm 2,6$) an Tag sieben zu ($p=0,001$). Bei den CD8⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen ließ sich eine Vermehrung der Population von 1,4% ($\pm 0,9$) auf 3,5% ($\pm 1,8$) verzeichnen ($p=0,0002$).



7. Abb. Prozentuale Verteilung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen der Patientinnen und Patienten anteilig an allen CD3⁺ T-Zellen im Durchschnitt an Tag null und Tag sieben des REP (d=day, n=23); p-Werte im Vergleich von Tag null zu Tag sieben: CD8⁺ T_{EFF} $p=0,001$, CD8⁺ T_{SCM} $p=0,0002$

Ergebnisse

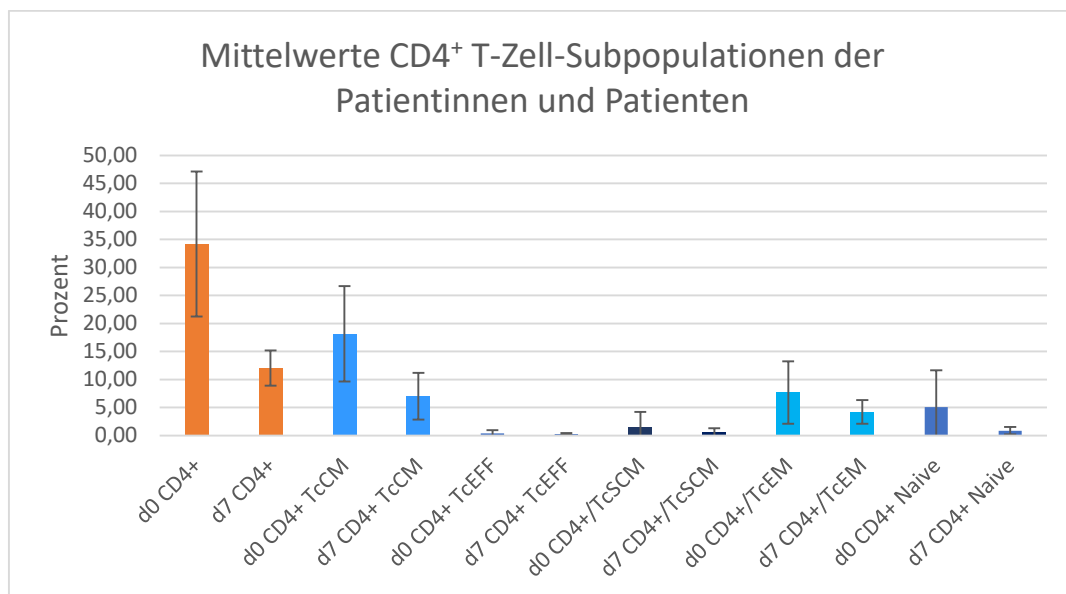
Die Expansionsergebnisse der CD8⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe wiesen ebenfalls signifikante Unterschiede bei den T-Effektorzellen und den Stammzell-T-Gedächtniszellen vor (s. Abb. 8). Die T-Effektorzellen zeigten eine Vermehrung durch das REP von 1% ($\pm 1,2$) an Tag null zu 2,5% ($\pm 3,5$) an Tag sieben ($p=0,04$). Bei den Stammzell-T-Gedächtniszellen konnte ein Anstieg der Population von 1% ($\pm 0,9$) an Tag null zu 4% ($\pm 1,9$) an Tag sieben verzeichnet werden ($p=0,01$).



8. Abb. Prozentuale Verteilung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe anteilig an allen CD3⁺ T-Zellen im Durchschnitt an Tag null zu Tag sieben des REP (d=day, n=5); p-Werte im Vergleich von Tag null zu Tag sieben: CD8⁺ T_{EFF} $p=0,04$, CD8⁺ T_{SCM} $p=0,01$

Ergebnisse

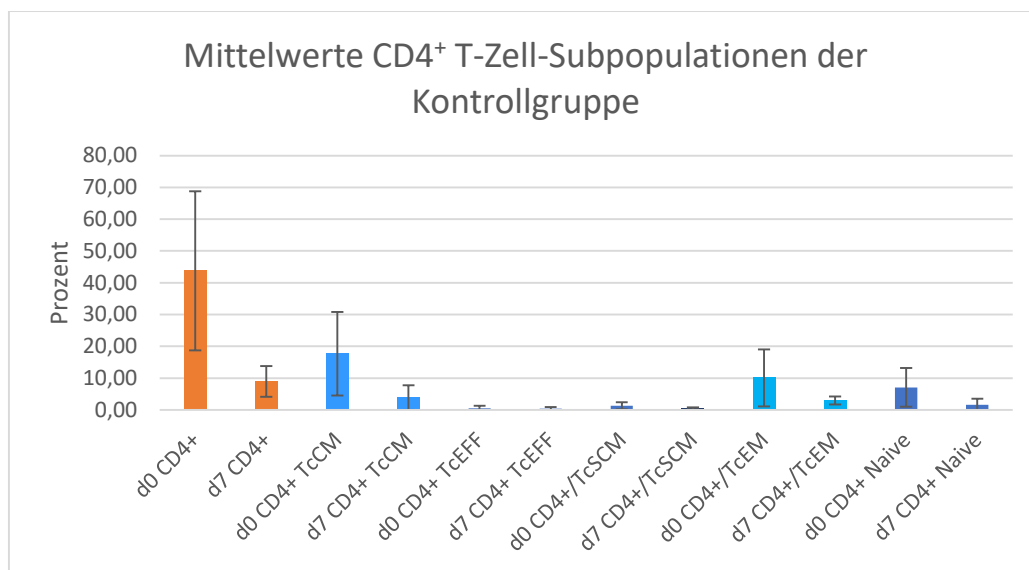
Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen nahm hingegen durch das REP im Durchschnitt um 22% ab (s. Abb. 9). Im Mittelwert betrug er an Tag null 34% ($\pm 12,9$) und an Tag sieben 12% ($\pm 3,1$). Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen verringerte sich insbesondere der Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen und der naiven CD4⁺ T-Zellen. Die zentralen CD4⁺ T-Gedächtniszellen fielen durchschnittlich von 18% ($\pm 8,5$) an Tag null zu 7% ($\pm 4,2$) an Tag sieben ab. Die CD4⁺ Naiven T-Zellen sanken von 5% ($\pm 6,6$) an Tag null zu 0,7% ($\pm 0,7$) an Tag sieben. Auch hier schwankten die übrigen Subpopulationen eher geringfügig hinsichtlich ihres prozentualen Anteils im Laufe des REP. Alle Subpopulationen erreichten bei Vergleich der Daten von Tag null und Tag sieben ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$, mit Ausnahme der Daten der CD4⁺ T-Effektorzellen.



9. Abb. Prozentuale Verteilung der CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen der Patientinnen und Patienten anteilig an allen CD3⁺ T-Zellen im Durchschnitt an Tag null und Tag sieben des REP (d=day, n=23); p-Werte im Vergleich von Tag null zu Tag sieben $p < 0,05$ (mit Ausnahme von T_{EFF})

Ergebnisse

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, zeigte sich im Durchschnitt bei den CD4⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe von Tag null zu Tag sieben ein Rückgang des prozentualen Anteils von 44% (± 25) auf 9% ($\pm 4,8$). Ebenso nahm der Prozentsatz der CD4⁺ zentralen T-Gedächtniszellen an der Gesamt-CD3⁺-T-Zellpopulation ab. Während dieser an Tag null etwa 18% ($\pm 13,1$) betrug, fiel er zu Tag sieben auf 4% ($\pm 3,9$) ab. Jedoch erreichte nur die Gesamtpopulation der CD4⁺-T-Zellpopulation das Signifikanzniveau.



10. Abb. Prozentuale Verteilung der CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen der Kontrollen anteilig an allen CD3⁺ T-Zellen im Durchschnitt an Tag null und Tag sieben des REP (d=day, n=23); p-Werte im Vergleich von Tag null zu Tag sieben: CD4⁺ p=0,03

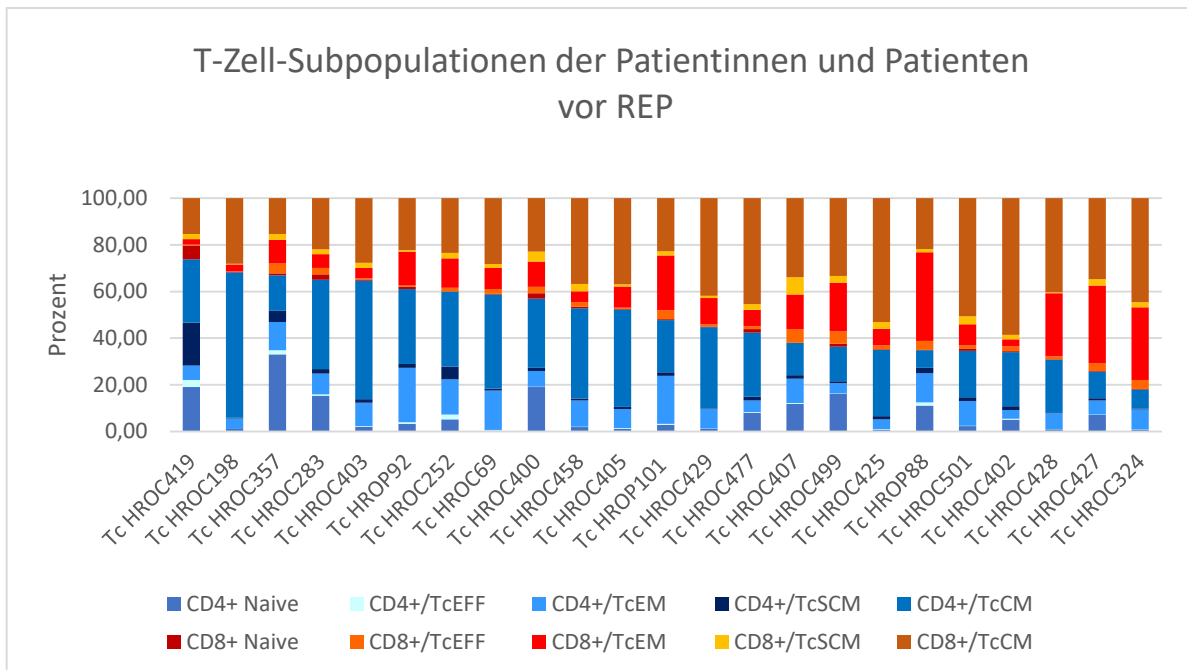
Das Überwiegen der CD8⁺ T-Zellpopulation an Tag sieben wird außerdem durch den CD4/CD8-Quotienten verdeutlicht, welcher normalerweise bei Werten >1 liegt. Während dieser an Tag null in der Patientenkohorte 0,9 betrug, fiel er zu Tag sieben auf 0,3 ab. In der Kontrollgruppe ließ sich dieses Verhältnis ebenfalls beobachten (Tag null: 1,2 und Tag sieben: 0,2).

Bei Betrachtung der Prozentwerte und Diagramme ist zu erkennen, dass die CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen nicht die Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen darstellen. Da lediglich die CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ in T-Zell-Subpopulationen eingeteilt wurden, konnten die CD4/CD8-doppelt-

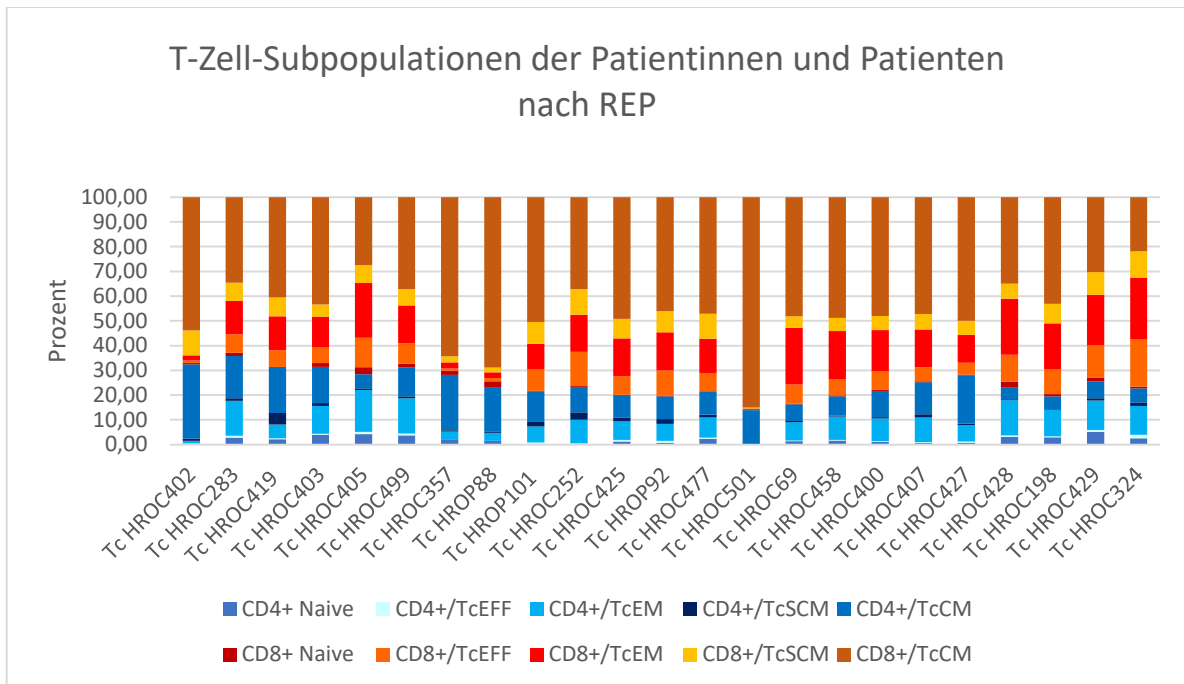
Ergebnisse

negativen und CD4/CD8-doppelt-positiven nicht im weiteren Panel berücksichtigt werden. Dies wird im Folgenden Gegenstand der Diskussion sein. Eine beispielhafte Auswertung der FACS *Plots* mit Darstellung der *Gating*-Strategie zur Bestimmung der Subpopulationen ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.2, Abb. 24). Ebenso sind im Anhang die prozentualen Verteilungen der CD3⁺ T-Zell-Subpopulationen der einzelnen Patientinnen und Patienten im Vergleich von Tag null zu Tag sieben des REP dargestellt (s. Kapitel 11.1.3, Abb. 25 und Abb. 26, für Angaben zur Kontrollgruppe s. Abb. 27).

Die Diagramme im Folgenden (s. Abb. 11 und Abb. 12) stellen die Veränderungen der prozentualen Verteilung der T-Zell Subpopulationen durch das REP dar, bezogen auf die CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen der einzelnen Patientinnen und Patienten. Die CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen bilden die Grundgesamtheit, ohne Berücksichtigung der doppel-positiven oder doppel-negativen T-Zellen.



11. Abb. Prozentuale Verteilung der T-Zell-Subpopulationen der Patientenkohorte vor Durchführung des REP an Tag null; Analyse der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen



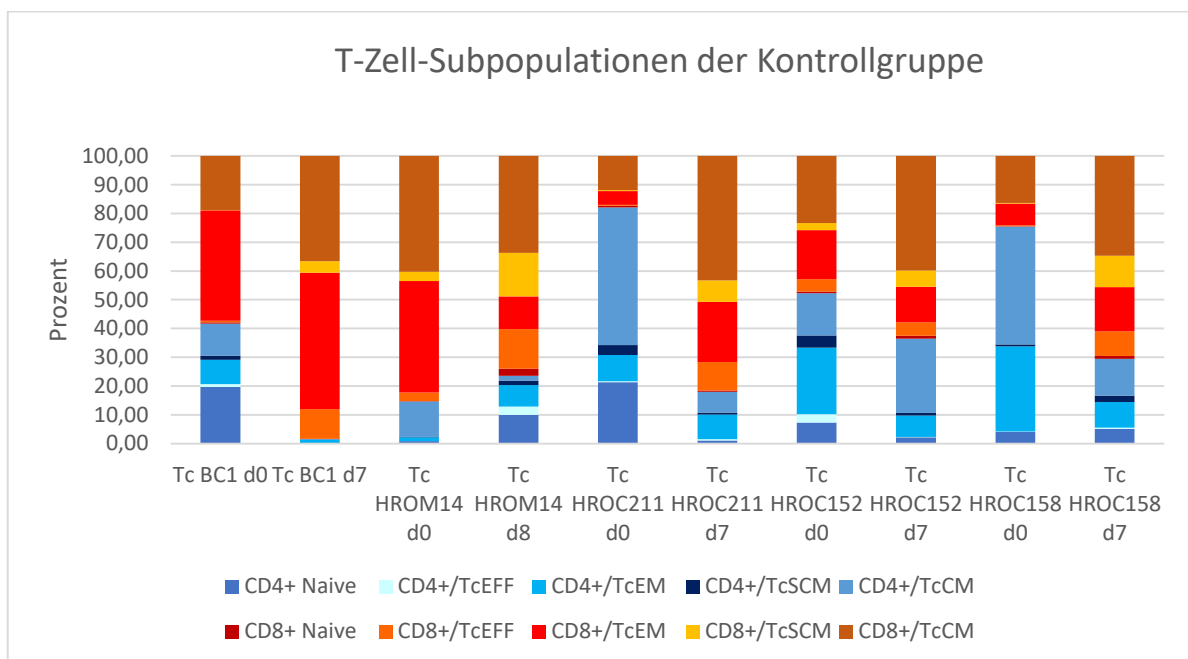
12. Abb. Prozentuale Verteilung der T-Zell-Subpopulationen der Patientenkohorte nach Durchführung des REP an Tag sieben; dargestellt werden nur die CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺ T-Zellen; signifikant mit p<0,05 sind die Datenpaare für CD4⁺ T_N, CD4⁺ T_{CM}, CD8⁺ T_{EFF}, CD8⁺ T_{SCM} und CD8⁺ T_{CM}

Die Auswertung im Folgenden bezieht sich nur auf die CD3⁺CD4⁺ T-Zellen und die CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Im Durchschnitt ließen sich an Tag null annähernd 28% (±13,4) als CD4⁺ zentrale T-Gedächtniszellen identifizieren. Weitere große Anteile bildeten die CD4⁺ Naiven T-Zellen mit zirka 7% (±8,2) und die CD8⁺ zentralen T-Gedächtniszellen mit 33% (±11,8). Nicht nur bei Betrachtung der Grundgesamtheit an CD3⁺ T-Zellen, sondern auch bei Analyse der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Subpopulationen konnte eine Signifikanz der Veränderungen durch das REP nachgewiesen werden. Bei den CD4⁺ T-Zellen konnte ein Rückgang der zentralen T-Gedächtniszellen auf zirka 12% (±6,2; p<0,001) und der naiven CD4⁺ T-Zellen auf zirka 2% (±1,4; p=0,006) an allen CD3⁺CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Ebenso kam es zu einer Vermehrung der zentralen CD3⁺CD8⁺ T-Gedächtniszellen auf etwa 46% (±13,4; p=0,003), eine Verdreifachung der prozentualen Anteile der CD3⁺CD8⁺ T-Effektorzellen (p<0,001) und der CD3⁺CD8⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen (p<0,001) von Tag null zu Tag sieben an allen CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zur Auswertung der prozentualen Verteilung der Subgruppen

Ergebnisse

der $CD3^+$ Zellen der Grundgesamtheit, erwies sich die quantitative Veränderung durch das REP der $CD3^+CD8^+$ T_{CM} als signifikant.

Bei den T-Zellen der Kontrollgruppe konnte ein ähnliches Phänomen verzeichnet werden (s. Abb. 13). Statistisch signifikant war der Anstieg der $CD8^+$ T-Effektorzellen von zirka 2% an Tag null zu 9% an Tag sieben ($p=0,01$) und der $CD8^+$ Stammzell-T-Gedächtniszellen von 1% an Tag null zu 9% an Tag sieben ($p=0,01$) an allen $CD3^+CD8^+$ T-Zellen.



13. Abb. T-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe an Tag null und Tag sieben des REP ($d=day$); prozentuale Verteilung der Subpopulationen anteilig an den $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen; signifikant mit $p<0,05$ sind die Datenpaare für $CD8^+$ T_{EFF} und $CD8^+$ T_{SCM}

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Expansion zu einem Abfall der $CD4^+$ naiven T-Zellen und der $CD4^+$ zentralen T-Gedächtniszellen gekommen ist, sich die $CD8^+$ T-Effektorzellen, $CD8^+$ Stammzell-T-Gedächtniszellen und $CD8^+$ zentralen T-Gedächtniszellen jedoch vermehrt haben.

3.2.3 Das *T cell Isolation Kit*

Die Ergebnisse der magnetischen Zellsortierung lassen sich anhand der Kriterien des Zellverlusts durch die Isolation, des Wachstumsverhaltens der Zellen und des Anteils an CD3⁺ Zellen einordnen. Ohne vorherige T-Zell-Isolation kultiviert wurden die Lymphozyten von HROC402, HROC69, HROC458, HROC400, HROC403, HROC407 und HROC427. Bei Einsatz des *Tc Isolation Kits* von Miltenyi wurden durch die Separation große Diskrepanzen in der Zellzahl beobachtet. Verglichen wurden hierbei die Zellzahlen vor und nach der Isolation durch die magnetische Säule. Innerhalb der Patientenkohorte bildete die Summe aus T-Zellen und Nicht-T-Zellen nach der Separation mengenmäßig lediglich 62% der zuvor ermittelten Zellzahl an PBLs. In der Kontrollgruppe betrug die Diskrepanz vor und nach der Isolation im Mittel 48%.

Die T-Zellen, welche zuvor separiert wurden, wiesen einen durchschnittlichen Wachstumsfaktor von 45,7 und eine Zunahme von $165,4 \times 10^6$ T-Zellen nach siebentägigem REP auf. Die T-Zell-Populationen, welche ohne vorherige Separation von den übrigen PBLs expandiert und mittels CD3-Färbung am Durchflusszytometer als T-Zellen charakterisiert wurden, verzeichneten einen geringeren kumulativen Wachstumsfaktor von 19,8 und ebenfalls ein geringeres durchschnittliches Wachstum von $123,4 \times 10^6$ Zellen.

Nur an Hand des Wachstumsfaktors der T-Zellen lässt sich der Erfolg des *Pan Tc Isolation Kits* allerdings nicht beurteilen. Innerhalb der zuvor isolierten T-Zell-Population betrug der Mittelwert an CD3⁺ Zellen 64% ($\pm 22,5$) an Tag null und 66% ($\pm 17,3$) an Tag sieben. Bei den Populationen, welche ohne den Separationsschritt kultiviert wurden, waren durchschnittlich 55% ($\pm 17,8$) der Zellen an Tag null und 72% ($\pm 8,5$) an Tag sieben CD3⁺. Somit lag der Anteil an CD3⁺ Zellen innerhalb der zuvor isolierten T-Zellpopulation an Tag null nur geringfügig über dem der T-Zellen, die direkt aus den PBLs expandierten wurden.

Die B-LCLs, welche zuvor mit Hilfe des *Isolation Kits* in T-Zellen und Nicht-T-Zellen separiert wurden, haben sich in der Kultur durchschnittlich um $27,8 \times 10^6$ Zellen vermehrt ($\pm 29,7$) und erreichten einen mittleren Wachstumsfaktor von 12,3 ($\pm 17,7$). Der Wachstumsfaktor der B-LCLs, welche ohne vorherige Separation kultiviert wurden, betrug 2,4 ($\pm 0,6$) und sie vermehrten sich durchschnittlich um $0,7 \times 10^6$ ($\pm 1,4$) Zellen. Auch die kostimulatorischen Marker wurden durch die B-LCLs, welche vorher nicht separiert wurden, inkonstant dargestellt.

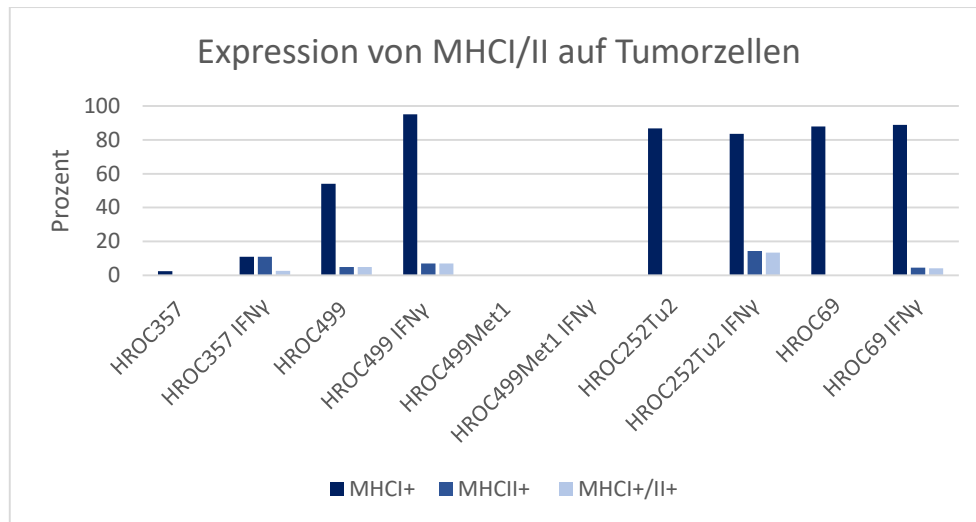
3.3 Tumorzellen

3.3.1 MHC-Expression der Tumorzelllinien

In diesem Experiment wurde mittels IFN- γ die Expression von MHCI und MHCII auf den Tumorzelllinien stimuliert, welche im späteren Verlauf für die Degranulationstests relevant war. Während weniger als 3% der unbehandelten Tumorzellen von HROC357 MHCI und MHCII exprimierten, wiesen nach Stimulation mit IFN- γ über 10% der Zellen MHCI oder MHCII auf ihrer Oberfläche vor (s. Abb. 14). Bei den Tumorzellen von HROC499 führte die Stimulation mit IFN- γ zu einer Steigerung des prozentualen Anteils der MHCI-exprimierenden Zellen um 57%. Die MHCII-Expression wurde nur geringfügig beeinflusst. HROC499Met1 zeigte durch Stimulation mit IFN- γ jedoch weder Veränderungen hinsichtlich der Expression von MHCI, noch von MHCII. Sowohl in der unstimulierten als auch in der stimulierten Probe exprimierten <1% der Zellen diese Marker.

Im Kontrast dazu wurde bei HROC252Tu2 eine starke MHC-Expression detektiert. Hier waren in beiden Populationen über 80% der Zellen positiv für MHCI. Während in der unbehandelten Population MHCII und MHCI/II doppelt positive Zellen kaum vertreten waren, führte die Stimulation bei 14% der Zellen zur Präsentation von MHCII und 13% waren MHCI/II doppelt positiv. Bei HROC69 kam es durch die INF- γ -Behandlung nur hinsichtlich der MHCII-Expression zu deutlichen Unterschieden. MHCI wurde sowohl in der stimulierten als auch in der unstimulierten Population von zirka 88% der Zellen exprimiert. Während ohne Stimulation <1% der Zellen MHCII exprimierten, stieg dieser Wert durch die Stimulation auf einen prozentualen Anteil von 5%. Von den stimulierten Zellen waren 4% MHCI/II doppelt positiv.

Ergebnisse



14. Abb. Durchflusszytometrische Analyse der MHC I/II Expression von IFN- γ stimulierten und unstimulierte Tumorzellen von HROC357, HROC499, HROC499Met1, HROC252Tu2, HROC69

3.3.2 Degranulierungstests der T-Zellen

Zur Prüfung der Aktivität und Funktionalität der expandierten T-Zellen wurde die Fähigkeit zur Freisetzung zytotoxischer Granula wie Perforin und Granzym in einem Degranulierungstest untersucht. Analysiert wurden die Marker CD107a, CD8 und IFN- γ . Der IFN- γ -Nachweis gibt Auskunft über die zytolytische Kapazität der T-Zelle durch Sekretion von Granzymen und der Hochregulation des IL-2 Rezeptors. IFN- γ wird von aktivierten CD8⁺ Zellen produziert und fördert die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T_{H1}-Zellen. Außerdem hemmt es die Aktivität regulatorischer T-Zellen.¹¹⁵ IFN- γ kann verstärkt bei immunologisch aktiven Tumoren nachgewiesen werden.⁵³ CD107a (LAMP-1=*lysosomal-associated membrane protein-1*) gilt als Marker für die Degranulation von CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation, welcher mit der Sekretion von Zytokinen und Zytolyse korreliert.^{116,117} CD8⁺/CD107a⁺/IFN- γ ⁺-Zellen identifizieren demnach zytotoxische T-Zellen, die durch den Kontakt mit autologen Tumorzellen spezifisch aktiviert wurden und daraufhin zytotoxische Granula freigesetzt haben.

Der Degranulierungstest wurde durchgeführt mit den Tumorzellen und T-Zellen von HROC69, HROC252, HROC357, HROC499 und HROC499Met1. Zytometrisch untersucht wurden unstimulierte T-Zellen, T-Zellen stimuliert mit *TransAct*, T-Zellen stimuliert mit autologen Tumorzellen und T-Zellen stimuliert mit autologen Tumorzellen und Immunchekpoint-

Ergebnisse

Inhibitoren (s. Abb. 15). Hier kamen anti-CTLA4 und anti-PD1 zum Einsatz. Eine beispielhafte Darstellung der *Gating*-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.4, Abb. 28). Wie in Abb. 15 dargestellt, betrug der Anteil der dreifach positiven Zellen von Tc HROC69 bei der unstimulierten Population 3% ($\pm 2,3$) und 4% ($\pm 0,3$) bei den mit *TransAct* stimulierten Zellen. Wurden die T-Zellen durch Tumorzellen oder durch Tumorzellen mit *Immuncheckpoint*-Inhibitoren aktiviert, stieg der Anteil der dreifach positiven Zellen auf 6% ($\pm 1,6$) und 5% ($\pm 2,4$). Auf Grund eines p-Wertes von 0,4 kann keine signifikante Veränderung zwischen der Stimulation mit Tumorzellen und der mit zusätzlicher *Immuncheckpoint*-Blockade nachgewiesen werden.

Innerhalb der unstimulierten T-Zellpopulation betrug die Rate der dreifach positiven T-Zellen 6% ($\pm 5,4$) bei den T-Zellen von HROC252. Bei den mit *TransAct* stimulierten Zellen waren es 3,4% (± 1), bei den mit Tumorzellen inkubierten Zellen 2% ($\pm 1,2$) und bei den mit *Immuncheckpoint*-Inhibitoren 1% ($\pm 0,2$). Auch hier konnte keine Signifikanz bezüglich der Wirkungsweise der ICI nachgewiesen werden ($p=0,2$).

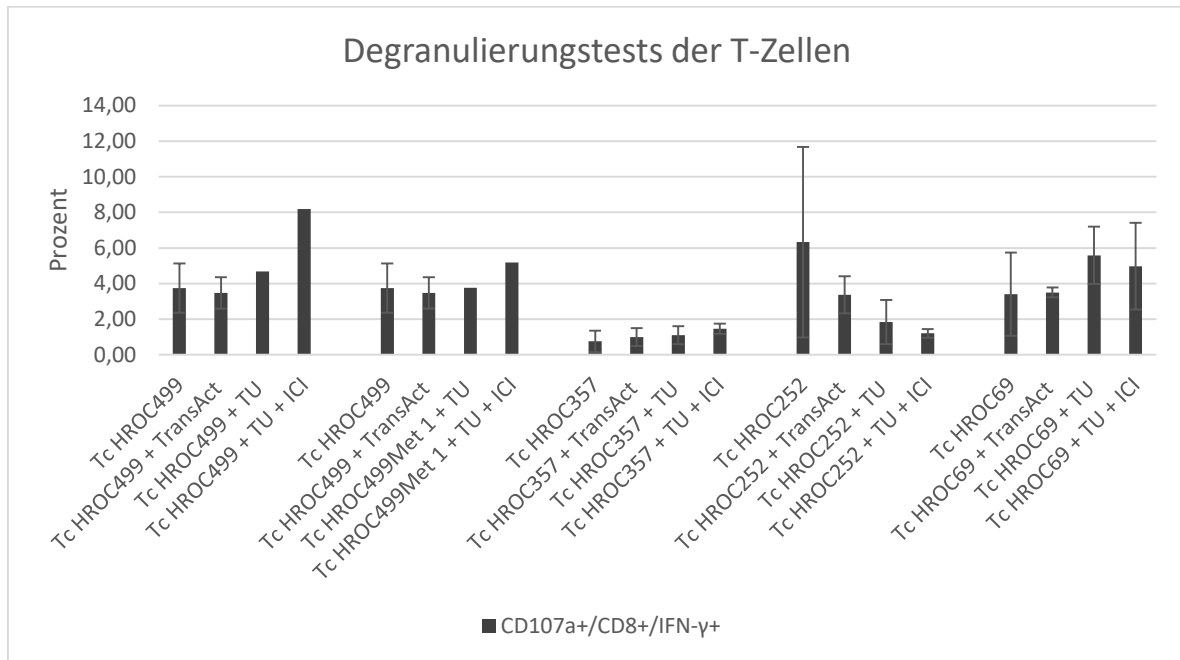
Von den Tc HROC357 waren 0,8% ($\pm 0,6$) der unstimulierten Population dreifach positiv. Durch Stimulation mit *TransAct* stieg der Anteil auf 1% ($\pm 0,5$) und bei Kultivierung mit Tumorzellen auf 1,1% ($\pm 0,5$). Den größten Anteil mit 1,5% ($\pm 0,3$) verzeichnete die Population, die mit ICI behandelt wurde. Der Unterschied zwischen den mit Tumorzellen und den mit Tumorzellen und *Immuncheckpoint*-Inhibitoren kultivierten T-Zellen war jedoch nicht signifikant ($p=0,2$).

Die T-Zellen von HROC499 waren innerhalb der unstimulierten Population zu 4% ($\pm 1,4$) und in der mit *TransAct* stimulierten Population zu 3,5% ($\pm 0,9$) CD107a⁺/CD8⁺/IFN- γ ⁺. Bei Kultivierung der T-Zellen mit den Tumorzellen des Primarius stieg der Anteil der aktivierten Zellen auf 5% und bei Hinzugabe von *Immuncheckpoint*-Inhibitoren auf 8%. Die T-Zellen, welche durch die Metastase dieser Tumorzelllinie stimuliert wurden, waren zu 4% dreifach positiv. Dieser Anteil vergrößerte sich auf 5% durch die Blockade der *Immuncheckpoints*. Da eine Erhebung von Vergleichswerten bei quantitativ geringer Zellzahl nicht möglich war, kann eine Signifikanz durch Berechnung des p-Wertes nicht nachgewiesen werden.

Die Diskrepanz in der Anzahl an eingesetzten T-Zellen und den durchflusszytometrischen Messwerten nach der Färbeprozedur, zeigte einen starken Zellverlust an T-Zellen im Laufe

Ergebnisse

des Degranulationstests. Bei den T-Zellen von HROC499 und HROC499Met1 war der Zellverlust so groß, dass die Zellmengen nur für jeweils eine Messung ausreichten.

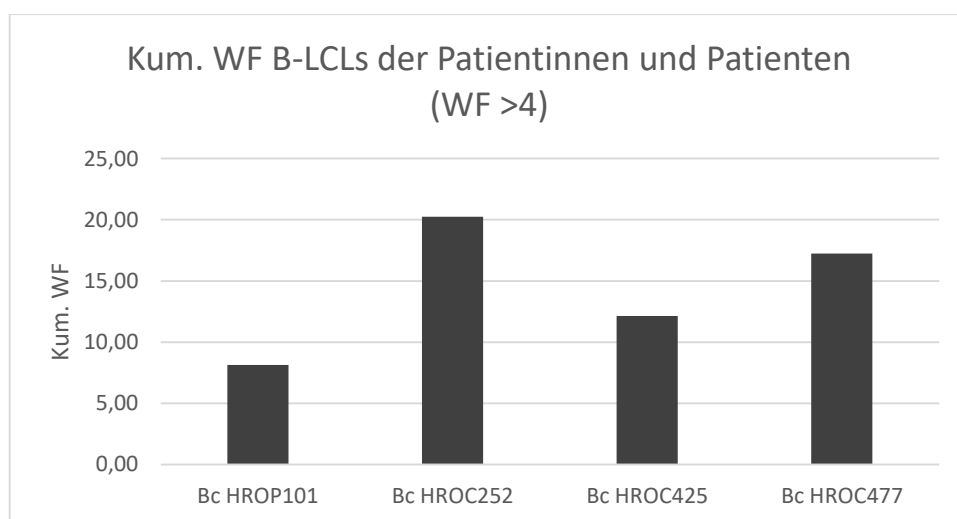


15. Abb. Degranulierungstest der expandierten T-Zellen; Durchflusszytometrische Messung der Expression von CD8, CD107a und IFN- γ ; dargestellt ist der prozentuale Anteil an dreifach-positiven Zellen; Mittelung aus drei Messungen pro Stimulationsart (n=3); bei Tc HROC499 und Tc HROC499Met1 erfolgte nur eine Messung in den Kategorien TU und TU+ICI; Tc=T-Zellen, TU=Tumorzellen, ICI=Immuncheckpoint-inhibitoren

3.4 *B-lymphoblastoid cell lines*

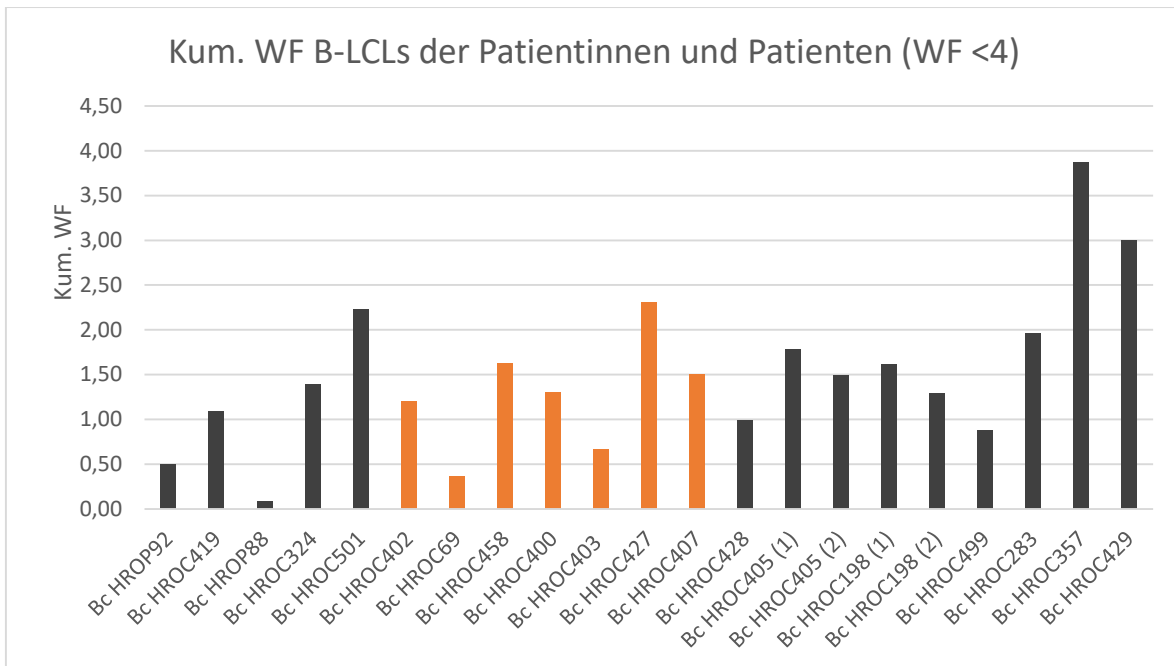
3.4.1 Quantitative Erfassung der B-Zell-Transformation

Zur besseren Vergleichbarkeit untereinander wurden die B-LCLs innerhalb der Gruppe der Patientinnen und Patienten in langsam und schnell wachsende Populationen aufgeteilt. Da der Mittelwert der Gesamtpopulation bei 3,6 lag, wurde als Grenzwert ein Wachstumsfaktor von vier gewählt. Der mittlere Wachstumsfaktor der schnell wachsenden Populationen (n=4) lag bei 14,4 mit einer Standardabweichung von 4,7. Die schnell wachsenden Zellpopulationen zeichneten sich ebenfalls durch die Ausbildung vieler und großer Zellaggregate in der Kulturflasche aus. Diese Populationen waren Bc HROP101, Bc HROC252, Bc HROC425 und Bc HROC477 (s. Abb. 16). Die B-LCLs der langsam wachsenden Populationen (n=20) vermehrten sich mit einem mittleren Wachstumsfaktor von 1,5 ($\pm 0,9$) (s. Abb. 17). Besonders die B-LCLs, welche ohne Isolation durch das *Pan Tc Isolation Kit* kultiviert wurden, wiesen geringere Wachstumstendenzen mit einem durchschnittlichen kumulativen Wachstumsfaktor von 1,3 ($\pm 0,6$) vor. In der Kontrollgruppe konnte im Mittelwert ein Wachstumsfaktor von 2 mit einer Standardabweichung von 1,5 erreicht werden. Eine Graphik mit den Angaben der Kontrollgruppe ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.5, Abb. 28). Eine Korrelation zwischen dem Mikrosatellitenstatus der Patienten-Tumore und dem Wachstumsverhalten der B-LCLs konnte nicht festgestellt werden ($r=0,13$).



16. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der schnell wachsenden B-LCLs (WF >4) der Patientinnen und Patienten nach EBV-B-Zell-Transformation

Ergebnisse



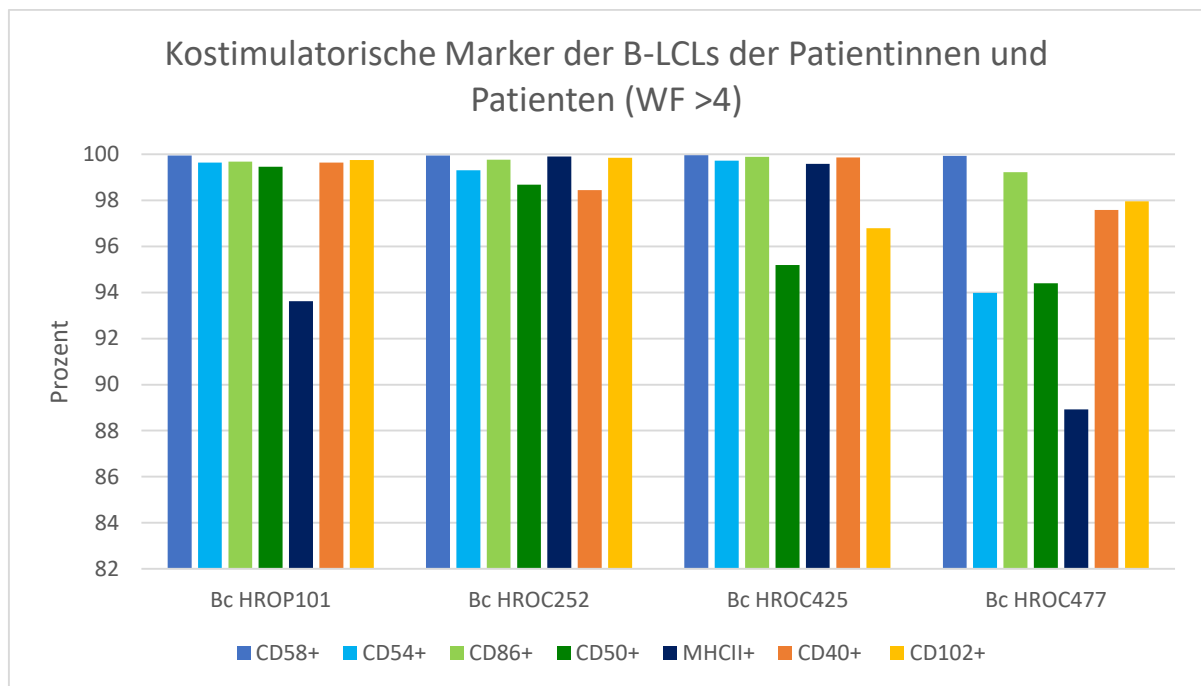
17. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der langsam wachsenden B-LCLs (WF <4) der Patientinnen und Patienten nach EBV-B-Zell-Transformation; in orange dargestellt sind die Populationen, welche ohne vorherige Isolierung kultiviert wurden; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz der B-Zell-Transformationen

3.4.2 Expression der kostimulatorischen Marker und Immunglobuline

Um Aussagen über die Funktionalität der B-LCLs treffen zu können, wurden diese hinsichtlich der Expression ihrer kostimulatorischen Marker untersucht. Diese sind notwendig für eine erfolgreiche B-Zell-abhängige T-Zell-Aktivierung und beeinflussen somit das zytotoxische Potential des Immunsystems. Gefärbt wurden die Marker CD58, CD54, CD86, CD50, MHCII, CD40, CD102. Eine beispielhafte Darstellung der *Gating*-Strategie ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.6, Abb. 30). Auffällig war der Zusammenhang zwischen schnellem Wachstumsverhalten mit sichtbaren Zellaggregaten in der EBV-Kultivierung und einer deutlichen Expression der kostimulatorischen Marker. Eine Korrelation zwischen einer starken Expression der kostimulatorischen Marker und dem Mikrosatellitenstatus der Tumorzellen konnte nicht nachgewiesen werden ($r=0,09$).

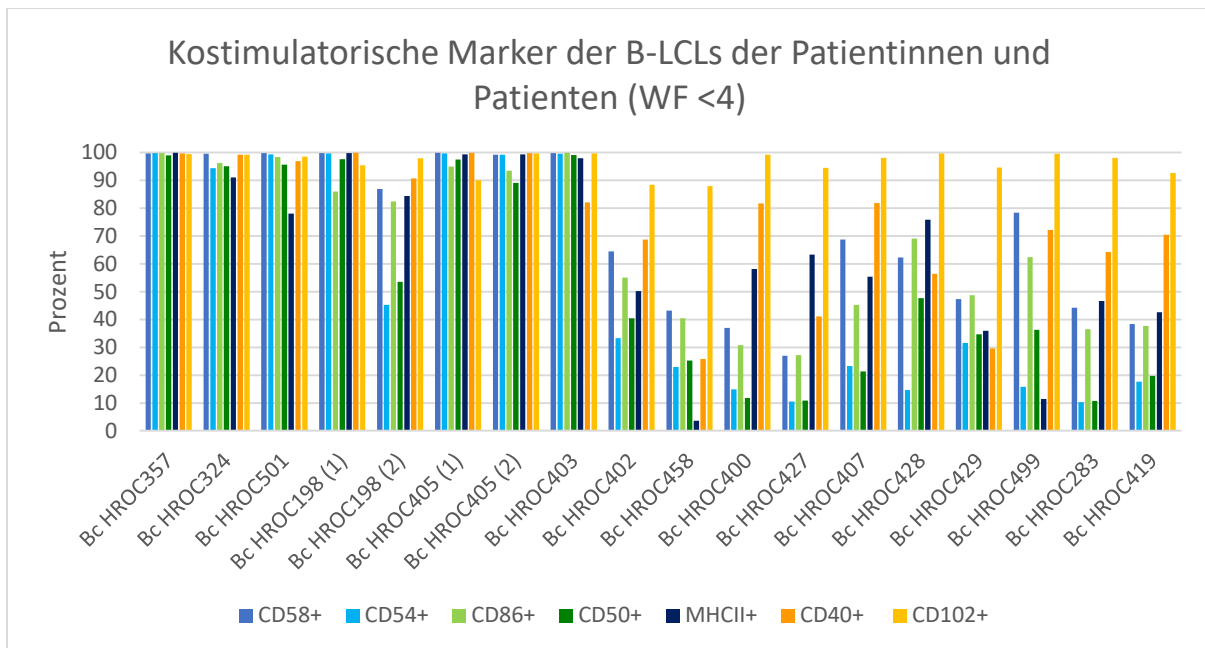
Ergebnisse

Die mittleren Expressionsraten von CD40, CD102 und CD86 betragen innerhalb der schnell wachsenden Population 99%. CD54 wurde von 98% der Zellen exprimiert und CD50 von ungefähr 97%. Auch der MHCII-Marker erreichte im Mittelwert Expressionsraten von über 95%. CD58 wurde hingegen lediglich von 79% präsentiert (s. Abb. 18).



18. Abb. Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs mit WF>4 der Patientinnen und Patienten; Analyse mittels Durchflusszytometrie der B-LCLs nach EBV-Transformation

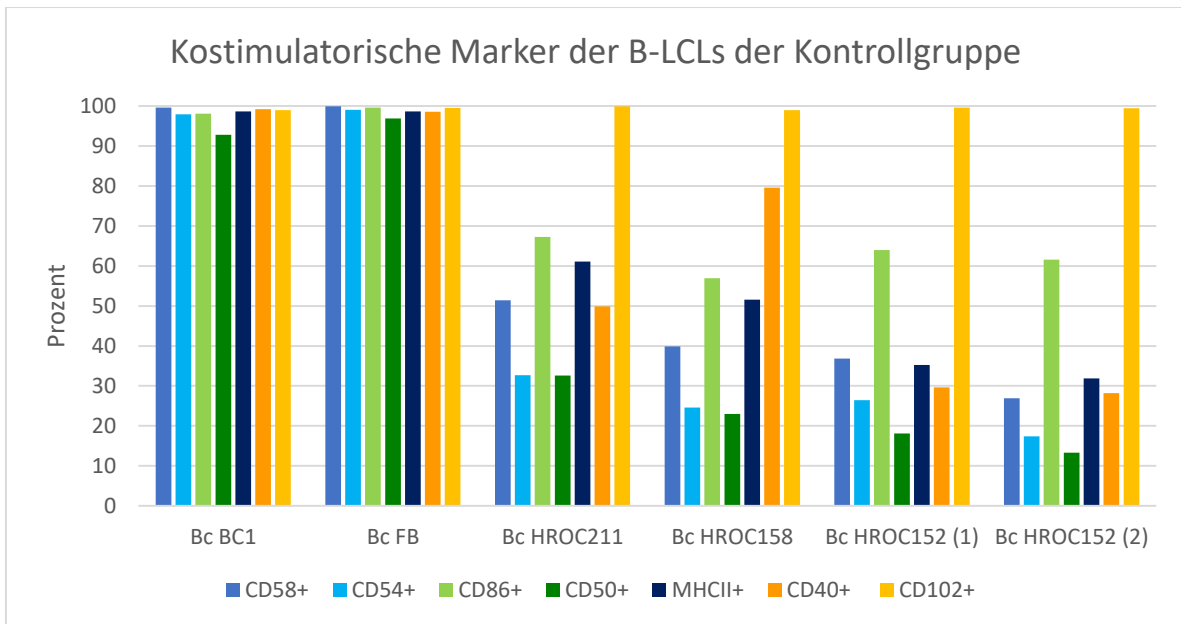
Bei den langsamer wachsenden Zellpopulationen mit einem kumulativen Wachstumsfaktor <4, erreichte der Marker CD102 mit 96% die größte mittlere Expressionsrate. CD58 wurde durchschnittlich zu 72% und CD40 zu 76% exprimiert. CD54, CD86, CD50 und MHCII wiesen geringere mittlere Expressionsraten vor: CD54 wurde im Durchschnitt von 52% der Zellen präsentiert, CD86 von 67%, CD50 von 55% und MHCII von 66% (s. Abb. 19). Innerhalb der langsamer wachsenden B-LCLs bildete Bc HROC357 eine Ausnahme mit Expressionsraten von über 99% der untersuchten CD-Marker. Bc HROC357, Bc HROC324, Bc HROC198 (1), Bc HROC403, Bc HROC405 (1) und Bc HROC405 (2) verzeichneten eine konstantere Expression der kostimulatorischen Marker als die übrigen Populationen mit einem Wachstumsfaktor von <4 (s. Abb. 19).



19. Abb. Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs mit WF <4 der Patientinnen und Patienten; Analyse mittels Durchflusszytometrie der B-LCLs nach EBV-Transformation; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz der B-Zell-Transformationen

Innerhalb der Kontrollgruppe wiesen Bc BC1 und Bc FB die stabilsten Expressionsraten der kostimulatorischen Marker mit Prozentwerten über 90% vor. Bc HROC211, Bc HROC158 und Bc HROC152 präsentierten nur CD102 zu über 98%. MHCII wurde von diesen Zelllinien im Mittel von 45% der Zellen exprimiert, CD50 zu 22%, CD86 zu 62%, CD54 zu 25% und CD58 zu 39% (s. Abb. 20). Während Bc HROC211 und Bc HROC158 MHCII und CD40 zu 50-70% präsentierten, konnten diese Marker bei Zellkulturflaschen von Bc HROC152 nur auf einem Drittel der Zellen nachgewiesen werden. Obwohl Bc HROC211 und Bc HROC152 (1) einen größeren Wachstumsfaktor während der EBV-Transformation vorwiesen, exprimierten sie die kostimulatorischen Marker zu geringeren prozentualen Anteilen verglichen mit Bc FB.

Ergebnisse

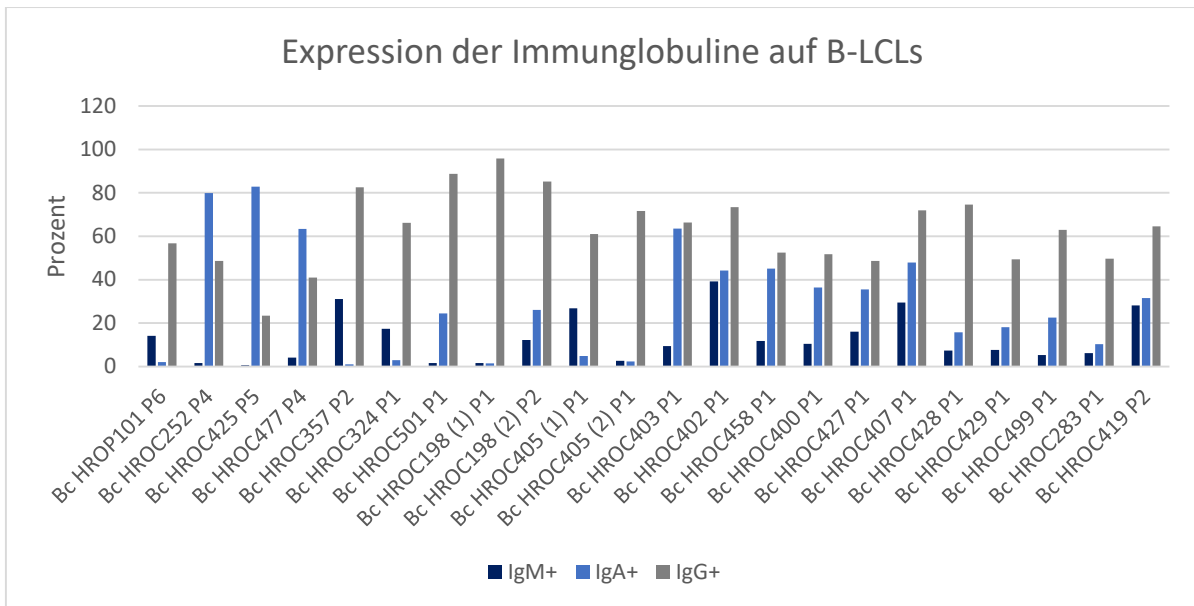


20. Abb. Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs der Kontrollgruppe; Durchflusszytometrische Analyse nach EBV-Transformation; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz der B-Zell-Transformationen

Des Weiteren wurde die Expression der Immunglobuline auf der Oberfläche der B-LCLs getestet. Gefärbt wurden hier IgM, IgG und IgA (s. Abb. 21). Innerhalb der langsam wachsenden Population präsentierten durchschnittlich 24% der Zellen IgA ($\pm 18,7$), 68% IgG ($\pm 14,3$) und 15% IgM ($\pm 11,5$). Im Vergleich dazu exprimierten die Zellen der schnell wachsenden Population im Mittel zu 57% IgA ($\pm 37,8$), zu 42% IgG ($\pm 14,3$) und zu 5% IgM ($\pm 6,2$).

Generell war IgA unter den Immunglobulinen am variabelsten ausgeprägt. Innerhalb der schnell wachsenden Populationen wurde es beispielsweise von Bc HROP101 lediglich zu 2% exprimiert, während es von 83% der Zellen von Bc HROC425 dargestellt wurde. Auffällig war, dass die Expression von IgA besonders bei den B-LCLs höherer Passagen stärker ausgeprägt war, als bei denen niedrigerer Passagen. Während die B-LCLs der Kontrollgruppe, mit Ausnahme von BcFB, IgA im Durchschnitt zu 14% ($\pm 9,3$), IgG zu 43% ($\pm 23,9$) und IgM zu 8% ($\pm 4,5$) präsentierten, exprimierten die Zellen von Bc FB zu 93% IgA, zu 70% IgG und zu 91% IgM. Besonders die B-LCLs von BC1 wiesen kaum IgM oder IgA auf ihren Zelloberflächen auf. Eine Graphik der prozentualen Verteilung der Kontrollgruppe ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 11.1.7, Abb. 31).

Ergebnisse



21. Abb. Expression der Immunglobuline auf den B-LCLs nach EBV-Transformation der Patientinnen und Patienten; Messung mittels Durchflusszytometrie der Expression von IgM, IgA und IgG; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz von B-Zell-Transformationen; P=Passage

3.4.3 Doppelter Ansatz der B-Zell-Transformation

Von den Nicht-T-Zellen der Populationen HROC405, HROC198 und HROC152 wurden zwei Kulturflaschen angesetzt für die EBV-B-Zell-Transformation. Grund dafür waren große Zellzahlen an Nicht-T-Zellen nach der Isolation aus PBMCs. Pro Kultur-Flasche wurden $11,5 \times 10^6$ Nicht-T-Zellen von Bc HROC405 eingesetzt. Im ersten Ansatz vergrößerte sich die Population mit einem kumulativen Wachstumsfaktor von 1,8 in einem Beobachtungszeitraum von acht Wochen. Die Zellpopulation des zweiten Ansatzes vermehrte sich mit einem Wachstumsfaktor von 1,5. Generell war die Expression der Oberflächenmarker sehr ähnlich, nur bei IgM zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. IgM wurde von 27% der Zellpopulation des ersten Ansatzes und von 3% der Zellen des zweiten Ansatzes exprimiert.

Von Bc HROC198 wurden ebenfalls zwei Kulturflaschen angesetzt. Hier wies der erste Ansatz einen kumulativen Wachstumsfaktor von 1,6 und der zweite Ansatz von 1,3 auf. Auch bei Analyse der kostimulatorischen Marker zeigten sich Unterschiede. CD54 wurde von den Zellen

Ergebnisse

mit verringerter Wachstumstendenz zu 45% exprimiert und von denen mit stärkerem Wachstum zu 99%. Deutliche Differenzen konnten auch in der Expression von CD50 nachgewiesen werden. Die Zellen des zweiten Ansatzes präsentierten diesen Marker zu 54% und die des ersten Ansatzes zu 98%. Des Weiteren wurde IgA von Bc HROC198 (1) von 1,5% der Zellen exprimiert und von Bc HROC198 (2) von 26% der Zellen.

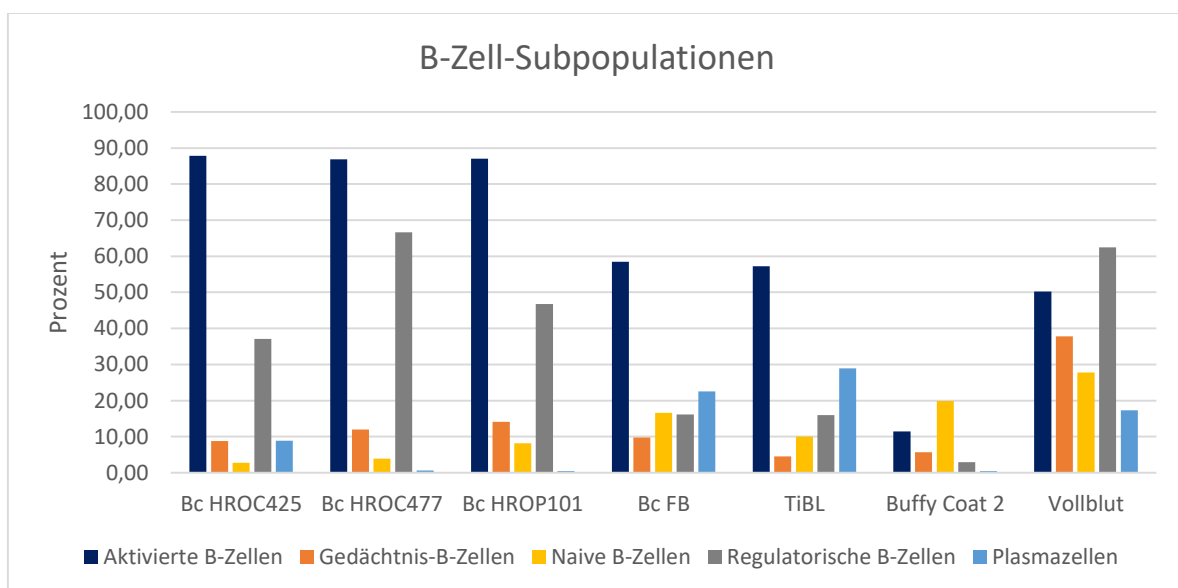
Bei Bc HROC152 unterschieden sich bereits die Wachstumsfaktoren der verschiedenen Ansätze deutlich. Die Population des ersten Ansatzes vermehrte sich mit einem Faktor von 2,3, während sich die Population des zweiten Ansatzes mit einem Faktor von 0,5 verringerte. Stärkere Unterschiede hinsichtlich der Expression der kostimulatorischen Marker konnten bei den B-LCLs von HROC152 nur bei IgG nachgewiesen werden. Während 43% der Zellen von Bc HROC152 (1) IgG exprimierten, wurde IgG von Bc HROC152 (2) nur von etwa 3% der Zellen präsentiert.

3.4.4 Subpopulationen der immortalisierten B-Zellen

In einem weiteren FACS Panel wurden die B-Zellpopulationen hinsichtlich ihres Aktivitätsstatus in Subpopulationen eingeteilt. Hierbei sind insbesondere die aktivierten B-Zellen von entscheidender Bedeutung, da diese die Möglichkeit der T-Zell-Aktivierung besitzen. Aktivierte B-Zellen zeichnen sich durch die Expression von CD80/86 und MHCII auf ihrer Zelloberfläche aus. Verglichen wurden die B-LCLs von HROC425, HROC477, HROP101 mit B-Zellen zweier gesunder Spender Bc BC2 (BC=*Buffy Coat*) und Bc FB, Tumor infiltrierenden B-Lymphozyten (TiBc) und Vollblut eines gesunden Spenders. Ausgewählt wurden die B-LCLs auf Grund ihres Wachstumsfaktors >8 . EBV-transformiert waren die B-LCLs der Patientinnen und Patienten und von Bc FB. Geplant war die Verwendung der Tumor-infiltrierenden B-Lymphozyten als Vergleichskontrolle zur Darstellung einer ausgeprägten Expression der CD-Marker. Gefärbt wurden die Marker CD19, MHCII, CD80/86, CD27, IgD, CD20, CD38 und CD24. Die *Gating*-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse ist im Anhang zu finden (s. Kapitel 11.1.8, Abb. 32). Die B-LCLs von HROC425, HROP101 und HROC477 erreichten einen Anteil an aktivierten B-Zellen von annähernd 87% (s. Abb. 22). In der Vollblut-Probe konnte mit 38% die höchste Rate an Gedächtniszellen verzeichnet werden. Naive B-Zellen traten in allen Populationen zu weniger als 30% auf. Plasmazellen bildeten 29% der Tumor-infiltrierenden-B-Zellen, während

Ergebnisse

sie in den Proben von Bc HROC477, Bc HROP101 und Bc BC2 zu unter 1% vertreten waren. In der Vollblut-Probe und bei Bc HROC477 konnten mehr als 60% der Zellen den regulatorischen B-Zellen zugeteilt werden, während diese in der Probe von BC2 zu weniger als 3% auftraten. Generell lässt sich zusammenfassen, dass die Tumor-erfahrenen B-Zellen von HROC425, HROC477 und HROP101 insbesondere die Aktivitätsmarker CD80/86 und MHCII regelhaft exprimierten. Einen großen prozentualen Anteil bildeten ebenfalls die regulatorischen B-Zellen. Auffällig war, dass sich die Rate an lebenden B-Zellen auf unter 60% belief, während sie in den Vergleichspopulationen nahezu 100% erreichte. Auch die EBV-transformierte Population von Bc FB verzeichnete eine Rate von 98% lebenden Zellen. Während die verwendeten PBLs von BC2 zwar einerseits eine Rate an lebenden Zellen von annähernd 100% erreichten und auch 81% der Zellen CD19 exprimierten, kamen die übrigen Marker nur sehr schwach zur Darstellung. Da die meisten Marker, sowohl bei den gesunden Spendern, als auch in der Patientenkohorte nur sehr gering exprimiert wurden, wurde diese Färbung nicht bei allen B-Zellkulturen durchgeführt.



22. Abb. Analyse der B-Zell-Subpopulationen von EBV-transformierten B-LCLs, sowie PBLs von BC2, TiBc und Vollblut; Durchflusszytometrische Analyse der Marker CD19, MHCII, CD80/86, IgD, CD20, CD38, CD24 und CD27

3.4.5 Stimulation mit CD40L und Interleukin-4

CD40L und IL-4 sorgen als Signal zwischen T_{H2}- und B-Zellen für die Proliferation und Aktivierung der B-Zellen. Da nach acht Wochen Kultivierung der B-LCLs von HROP88 und HROP92 mit dem Transformationsmedium keine Zellaggregate sichtbar waren, sollten die Zelllinien auf diese Weise verstärkt zum Wachstum angeregt werden. Die Zellkulturflasche von Bc HROP92 enthielt nach acht Wochen der EBV-Transformation $0,5 \times 10^6$ Zellen bei einer Ausgangsmenge von 10^6 und Bc HROP88 enthielt $0,3 \times 10^6$ Zellen bei einer Ausgangsmenge von $3,8 \times 10^6$ Zellen. Die Zelllinien wurden zweimal mit CD40L Multimer und IL-4 in IMDM Serum stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation und weiteren vier Wochen in Kultur mit DMEM P/S/A ohne Transformationsmedium erreichte Bc HROP92 eine finale Populationsgröße von $1,6 \times 10^6$ B-LCLs und HROP88 von $2,2 \times 10^6$ B-Zellen. Durch die weiterhin geringe Menge an B-LCLs war keine Färbung der kostimulatorischen Marker möglich.

3.4.6 Therapie der Mykoplasmen-kontaminierten B-LCLs

Da bei einem laborinternen Routinescreening auf Mykoplasmen die verwendete B 95/8 Zellkultur als positiv getestet wurde, erfolgte eine Kombinationstherapie mit Minocyclin und Ursomutin bei drei verschiedenen Zellkonzentrationen. Nach Beendigung der Therapie wurde der Zellüberstand erneut auf Mykoplasmen getestet. Verwendet wurde das gleichen Testverfahren, bei dem die Proben zuvor als Mykoplasmen-positiv aufgefallen waren. Aus den negativ getesteten Zellpopulationen wurde eine neue Kulturflasche angesetzt, welche zwei Wochen später bei einer folgenden Testung auf Mykoplasmen erneut als negativ beurteilt wurde.

Im Verlauf wurde eine Stichprobe an B-LCLs der Kohorte der Patientinnen und Patienten auf Mykoplasmen getestet und als positiv gewertet. Als Erklärung könnte herangezogen werden, dass diese Zellpopulationen vor Durchführung der Mykoplasmen-Therapie mit den kontaminierten B95/8-Zellüberstand kultiviert worden waren. Eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Mykoplasmen und dem Wachstumsfaktor der B-LCLs konnte nicht festgestellt werden ($r=-0,44$).

3.4.7 DNA-Fingerprint

Des Weiteren konnte ein DNA Fingerprint von acht B-Zell-Populationen die richtige Patientenzugehörigkeit nachweisen. Diese Populationen können als Stichprobe der Grundgesamtheit der immortalisierten B-Zelllinien betrachtet werden. Unterstützend für diese Aussage gilt, dass regelmäßig alle weiteren B-LCLs als laborinterner Standard einer DNA-Fingerprint-Analyse unterzogen werden. Dabei wird die Testung von CLS (*Central Laboratory Services*) oder einem Koordinationspartner durchgeführt. Bisher konnte keine Verwechslung festgestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Immuntherapie bei KRK und Pankreas-CA

Auch beim KRK und Pankreas-CA wird es dem Immunsystem durch eine Kombination aus Immunevasions- und Immunsuppressionsmechanismen der Tumorzellen erschwert, diese als körperfremd zu erkennen und anzugreifen. Hier setzt die moderne Immuntherapie an.¹¹⁸ Bei Patienten mit fortgeschrittenem dMMR metastasierten kolorektalen Karzinom ist die Immuntherapie mit Immuncheckpointinhibitoren wie PD-1 und CTLA-4 bereits etablierte Standardtherapie.⁸³ Auch Patientinnen und Patienten mit operablen dMMR KRK und MMR-kompetenten Tumoren profitieren von einer neoadjuvanten Immuntherapie.¹¹⁹ Während besonders Patientinnen und Patienten mit MSI mutierten Tumoren von einer ICI-Therapie profitieren, führt die ACT auch bei solchen mit MSS mutierten Tumorzellen zu einem verlängerten Gesamtüberleben ohne Tumorprogression.¹²⁰

Im Gegensatz dazu erwiesen sich Pankreaskarzinome bisher als immun-kalte Tumoren mit einer geringen Ansprechbarkeit auf Immuntherapien in klinischen Studien. Gegenstand der aktuellen Forschung bilden klinische Studien mit ICI, Tumor-Vakzinierung, ACT und einer Kombinationstherapie aus Chemotherapie oder *targeted therapy* mit monoklonalen Antikörpern. Die reduzierte Immunogenität lässt sich bei Pankreaskarzinomen auf eine geringere TMB zurückführen.²⁶ Zudem bildet die Tumormikroumgebung mit einer Fülle an Fibroblasten, pankreatischen Sternzellen und Immunzellen eine physikalische Barriere, welche die Effektivität von Immuntherapien einschränkt.²⁶ Durch die erschwerten Bedingungen bei Pankreaskarzinomen ist die Erforschung von Resistenzmechanismen und die Entwicklung neuer Strategien der Immuntherapie dringend notwendig.⁸¹

Bei Betrachtung der hohen Bevölkerungsinzidenz von Darmkrebs und der schlechten Prognose von Pankreaskarzinomen besitzt die Forschung an Therapieoptionen, insbesondere an Immuntherapien, eine große Relevanz. Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Erforschung von Expansionsmechanismen funktionaler Immunzellen. Dies beinhaltet die Vermehrung und funktionelle Analyse von T-Zellen, sowie die Etablierung immortalisierter B-Zelllinien von Patientinnen und Patienten mit KRK und Pankreaskarzinomen.

4.2 T-Zellen

4.2.1 Verlust des CD3-Markers der T-Zellen

Bei der Definierung von T-Zell-Subpopulationen ist der CD3-Marker von entscheidender Bedeutung. Dieser Marker ist spezifisch für T-Zellen aller Entwicklungsstadien. Wie in Kapitel 3.2.2. bereits aufgeführt, ließ sich der CD3-Marker innerhalb der vor Expansion fraktionierten Zellpopulationen durchschnittlich von 64% der Zellen an Tag null und 66% an Tag sieben darstellen.

Ein Ausbleiben der CD3/CD28-Stimulation kann bei T-Zellen zu einem Arrest im Ruhemodus mit geringer Proliferation, mangelnder Differenzierung und Fehlen des Phänotyp-Wechsels führen.^{118,121} Ein Verlust des CD28-Markers durch chronische T-Zell-Aktivierung wurde bereits in der Literatur beschrieben.¹²² Eine verringerte Expression des CD3-Markers bei T-Zellen auf Grund der Dauerstimulation durch die Tumorerkrankung der Patientinnen und Patienten kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Bei Vergleich mit den T-Zellpopulationen der Kontrollgruppe zeigte sich, dass die Rate an CD3⁺ T-Zellen bei den Patientinnen und Patienten mit Tumorerkrankung signifikant geringer war ($p < 0,05$). Allerdings führte auch das REP bei den T-Zellen der Kontrollgruppe zu einem Rückgang der CD3-Expression. So sank der Anteil der CD3⁺ T-Zellen von >90% an Tag null, auf 70-80% an Tag sieben. Die dauerhafte Stimulation des CD3/TCR, entweder durch die Tumorerkrankung der Patientinnen und Patienten *in vivo* oder durch das REP bei den T-Zellen der Kontrollgruppe *in vitro*, könnte folglich zu einer verminderten Expression geführt haben.

Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten der CD3⁻ Zellen an Tag null des REP besteht in einer inkompletten Separation der T-Zellen von den übrigen PBLs durch das *Pan Tc Isolation Kit*, sodass auch Nicht-T-Zellen in das REP miteinbezogen wurden. Da die Einteilung in T-Zellen und Nicht-T-Zellen im Rahmen des *Isolation Kits* von Miltenyi nicht an Hand der CD3-Expression erfolgte, besteht die Möglichkeit, dass auch CD3⁻ Zellen als T-Zellen definiert wurden. Dies würde allerdings nicht die signifikanten Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollkohorte erklären. Eine aberrante Expression oder ein vollständiger Verlust des CD3-Moleküls auf T-Zellen durch Tumorerkrankungen konnte bisher nur bei peripheren T-Zell-Lymphomen oder im Rahmen einer CAR-T-Zell-Therapie festgestellt werden.¹²³ Somit bleibt

die Einflussnahme von Tumorzellen auf die Expression des CD3-Markers und die Folgen für die Aktivierbarkeit und Funktionalität von T-Zellen Gegenstand zukünftiger Forschung. Eine fehlerhafte Bindung des Antikörpers im Färbeprozess kann ausgeschlossen werden, da bei einigen Zelllinien mehr als 90% der T-Zellen CD3 exprimierten.

4.2.2 CD4/CD8 doppelt-positive und doppelt-negative CD3⁺ T-Zellen

Auch im Hinblick auf die Expression anderer CD-Marker konnten Auffälligkeiten festgestellt werden. Wie ebenfalls in den Diagrammen der durchflusszytometrischen Analysen zu erkennen ist, stellten die CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen nicht die Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen dar. Ein Teil der CD3⁺ T-Zellen präsentierte sich als CD4/CD8-doppelt-negativ oder CD4/CD8-doppelt-positiv.

Doppelt-negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) bilden normalerweise 3-5% der T-Lymphozyten im peripheren Blut. Anders als konventionelle CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen besitzen sie Funktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems und können wie regulatorische T-Zellen, T-Helfer-Zellen oder zytotoxische T-Zellen fungieren. Bei Infiltration von soliden, malignen Tumoren, wie Pankreaskarzinomen, überwiegen ihre zytotoxischen Effekte und sie produzieren IFN- γ , Perforin und Granzym B.⁹⁴ Bei *Xenograft*-Modellen von Pankreastumoren konnten allogene gesunde doppelt-negative T-Zellen das Tumorstadium effektiv reduzieren. Dies erfolgte TCR-, Antigen- und Spender-unabhängig. Auch ließen sich tumorinhibierende Effekte bei Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika oder Immuncheckpointinhibitoren bei hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren nachweisen. Doppelt-negative T-Zellen eignen sich zudem für eine ACT, da sie einfach zu akquirieren, expandieren und konservieren sind. So konnte bereits eine partielle Remission von Tumorerkrankungen durch doppelt-negative T-Zellen erzielt werden.⁹⁴ Das Expansionspotential dieser Zellpopulation in *Rapid Expansion* Protokollen zur Generierung ausreichender Mengen für eine ACT und die Anwendbarkeit in klinischen Studien sind interessante Aspekte und sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven Zellen im menschlichen Blut betragen für gewöhnlich <1% der zirkulierenden T-Zellen in gesunden Individuen, während sie am Rand von Infektionen oder bei malignen Erkrankungen vermehrt zu finden sind. Dies ist auch bei Pankreaskarzinomen der

Fall.¹²⁴ Dass der Anteil an doppelt positiven Zellen sehr variabel ist, konnte auch eine Studie von Menard et al. nachweisen, bei der mehr als 30% der TIL von Patientinnen und Patienten mit Nierenzellkarzinom die Marker CD4 und CD8 exprimierten.¹²⁵ Auch die Funktion der doppelt positiven Zellen wird bestimmt durch die Art der Erkrankung und/oder der lokalen Umgebung.¹²⁴ Sie können zytotoxische, proliferative und suppressive Funktionen ausüben.¹²⁶ Die Arbeitsgruppe von Schad et al. wies nach, dass Antigenstimulation einzel-positive Zellen dazu veranlasst zu polyfunktionalen doppelt-positiven Zellen zu differenzieren. Doppelt-positive Zellen, welche sich aus CD4- oder CD8-einzel-positiven Zellen durch Antigenstimulation entwickeln, besitzen starke zytolytische Kapazitäten und sind in der Lage von MHC I oder MHC II präsentierte Antigene zu erkennen.¹²⁴ Da auch geringe Mengen an zytolytischen T-Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Tumor-Eradikation leisten können, ist die Rolle der doppelt-positiven Zellen nicht zu vernachlässigen.

Für die vorliegende Arbeit ist das Wissen um die Funktion von doppelt negativen und doppelt positiven CD3⁺ T-Zellen sehr relevant, weil sich ihr Anteil durch das REP vergrößerte. Da von diesen Zellen ebenfalls ein signifikanter Beitrag in der Tumorbekämpfung erwartet werden kann, ist eine gesteigerte Expansion dieser Subgruppen als positiv zu bewerten. Weitere Forschung bezüglich des quantitativen Auftretens von doppelt positiven und doppelt negativen CD3⁺ T-Zellen in Expansionsprotokollen, ihrer Funktion *in vivo* und ihre Rolle bei der Tumorbekämpfung wird dringend benötigt.

4.2.3 Verteilung der T-Zell-Subpopulationen

Viele Expansionsprotokolle Antigen-spezifischer T-Zellen erfordern eine längerfristige *ex vivo* Expansion und fördern letztendlich einen differenzierten Effektorzell-Phänotyp, der auf Grund seiner Kurzlebigkeit nur eine reduzierte Anwendbarkeit bei der ACT finden kann.¹²⁷ Powell et al. konnten bei Durchführung eines 14-tägigen REP von TIL *in vitro* T-Zellen eines gering differenzierten Phänotyps generieren. Diese T-Zellen verzeichneten ebenfalls ein verlängertes Überleben *in vivo*, differenzierten zu Gedächtniszellen und persistierten als T_{EM}.⁹⁷

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei Verkürzung der Expansionsdauer auf sieben Tage ebenfalls die Generierung großer Mengen an funktionalen, überlebensfähigen T-Zellen gelingt. Durch das REP konnte eine signifikante Verringerung des Anteils der CD4⁺ T-Zellen,

insbesondere CD4⁺ zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und CD4⁺ naive T-Zellen (T_N), und eine Vermehrung der Anteile an CD8⁺ T-Effektorzellen (T_{EFF}), CD8⁺ zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und CD8⁺ Stammzell-T-Gedächtniszellen (T_{SCM}) erzielt werden. Während T_{EFF} *in vivo* nur geringe Expansionsraten nach ACT vorwies⁴⁷, tragen insbesondere CD8⁺ T_{SCM} und T_{CM} bei Transfusion zu einer langlebigen und robusten Immunreaktion bei. Dies liegt an ihrer Fähigkeit nach ACT *in vivo* weitere Gedächtnis- und Effektorzellen zu generieren.⁹⁸ Bezüglich des antitumoralen Effekts von transfundierten T-Zell-Subpopulationen konnte in Mausstudien folgende Rangordnung nachgewiesen werden: T_{SCM} > T_{CM} > T_{EM}.¹²⁸ Auch bei Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenem Melanom, welche mit ICI therapiert wurden, korrelierte ein gesteigerter Anteil von T-Gedächtniszellen an den Gesamt-CD8⁺ T-Zellen im Blut mit einem positiven prädiktiven Wert für Therapieansprechen und Gesamtüberleben.¹²⁹ Während sich die Zunahme der CD8⁺ T_{EFF}, T_{CM} und T_{SCM} Zellen als signifikant erwies, wurden durch das REP nicht signifikant weniger T_{EM} generiert. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit der generierten Subpopulationen erbrachte das verkürzte REP somit erfolgsversprechende Ergebnisse.

4.2.4 Optimierungsmöglichkeiten und Modifizierungen des REP

Viele der momentan verwendeten Protokolle zur Expansion von T-Lymphozyten benötigen hohe Labor- und Zeitressourcen (>45 Tage), sowie eine große Anzahl an PBLs.¹³⁰ Eine Verkürzung der Expansionsdauer, sowie eine Einsparung von Laborressourcen würden die klinische Anwendbarkeit deutlich steigern. Martkamchan et al. wiesen nach, dass eine Verkürzung der Kultivierung ebenfalls zu gesteigerten Expansionsergebnissen führen kann. Bei Verwendung von IL-2 in Dosen von 1000 U/ml über einem Zeitraum von mehr als sieben Tagen in Expansionskultur, detektierten sie eine vermehrte Rate an Zelluntergängen. Eine Änderung der IL-2 Dosierung innerhalb der ersten sieben Tage der Expansion bewirkte keine Unterschiede im Expansionserfolg.¹³¹

Die von Dudley et al. 2003 beschriebene 1.000-fache Expansion bei Kultivierung von TIL mit anti-CD3-Antikörper, Interleukin-2 und bestrahlten PBLs für 14 Tage,¹⁰¹ konnte bei Durchführung des verkürzten REP von T-Zellen weder bei den Zellen der Patientinnen und Patienten, noch bei denen der Kontrollgruppe erreicht werden. In beiden Kohorten erwies sich

der Wachstumsfaktor als sehr variabel. Im Durchschnitt betrug er 38 (± 25) bei den Tumorfällen und 56 (± 31) in der Kontrollkohorte. Allerdings konnte auch das *Tc Expansion Kit* von Miltenyi laut Herstellerangaben nach 14 Tagen lediglich eine T-Zell-Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen um das 10fache vorweisen.¹³² Somit erreichte das verkürzte REP dieser Arbeit vergleichbare Expansionsergebnisse nach nur sieben Tagen. Eine Stimulation mit TransAct durch das Miltenyi Stimulations-Kit erreichte nach 14 Tagen eine T-Zell-Expansion um das 110fache.¹³³ Dieses Stimulations-Kit förderte jedoch insbesondere einen Effektorzell-Phänotyp, welcher eine geringe klinische Anwendbarkeit besitzt. Das CD3/CD28 Dynabead Modell von ThermoFischer führte nach 14 Tagen zu einer Expansion der T-Zellen um das ca. 100fache. Bei Kultivierung für 18 Tage konnte die Expansionsraten der CD3⁺ T-Zellen auf über 1000 gesteigert werden. Das CD3/CD28 Dynabead Modell stimulierte zu Beginn jedoch insbesondere einen CD4-Phänotyp. Für eine gesteigerte Expansion von CD8⁺ T-Zellen wurde hingegen eine Kultivierungsdauer von 18 Tagen benötigt.¹³⁴ Dies verdeutlicht einerseits die Variabilität des Expansionserfolgs bei T-Zell-Expansionen, selbst bei Verwendung von Stimulations-Kits, und spricht andererseits die Empfehlung aus, weitere Kits wie das CD3/CD28 Dynabead Modell bei verkürzter Kultivierungsdauer zu testen.

Graef et al. resümierten allerdings, dass für den Erfolg der ACT das regenerative Potential und die Langlebigkeit der transferierten Zellen *in vivo* eine entscheidendere Rolle spielt, als die bloße Quantität.⁹⁸ Da für die Grundlagenforschung jedoch beträchtliche Zellmengen benötigt werden, sollten weitere Optimierungsmöglichkeiten des REP mit einer zuverlässigen Generierung großer Zellmengen weiter erforscht werden.

Ein Beispiel dafür wäre die Hinzugabe von *Transforming-Growth-Factor- β* (TGF- β) zu Beginn der Expansion der TIL. Liu et al. konnten so den prozentualen Anteil an CD8⁺ T-Zellen und insbesondere der Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen steigern, bei quantitativ vergleichbaren Ergebnissen. Des Weiteren konnte die IFN- γ Produktion vergrößert, die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen unterstützt und die Zellproliferation auch nach Ende der Expansionsdauer angeregt werden. Gleichzeitig wurde die Expansion der CD4⁺ T-Zellen reduziert.^{102,101}

Ein relevanter Aspekt in der Generierung von T-Zellen zur Grundlagenforschung besteht zudem in der Robustheit und Widerstandsfähigkeit der Zellen. Hierfür wurde untersucht, wie die expandierten Zellen auf Lagerung in Kryokonservierung reagieren. Generell zeigten sich bei

Diskussion

einigen Zellpopulationen starke Abweichungen zwischen den Zellzahlen vor und nach der Kryokonservierung. Zum Teil können die Abweichungen auf Ungenauigkeiten bei der Ermittlung der konkreten Zahl durch die starke Bildung von Zellaggregaten entstanden sein, zum anderen Teil scheint der Prozess des Einfrierens und Auftauens bei manchen Zelllinien zum verstärkten Zelluntergang der expandierten Zellen geführt zu haben.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Anteil der CD8⁺ T-Zellen der eingefrorenen T-Zellen an Tag sieben des REP mit dem Anteil der CD8⁺ T-Zellen nach dem Auftauen und Untersuchung im Degranulationstest übereinstimmte. An Tag sieben des REP betrug der Anteil an CD8⁺ T-Zellen von Tc HROC252 43%, von Tc HROC357 37%, von Tc HROC69 46% und von den Tc HROC499 32%. Nach Kryokonservierung und Messung der CD8⁺ T-Zellen der unstimulierten Kontrollproben im Degranulationstest, betrug der Anteil der CD8⁺ T-Zellen der Tc HROC252 15%, der Tc HROC357 30%, der Tc HROC69 15% und der Tc HROC499 13%. Während sich somit der Anteil der CD8⁺ T-Zellen mancher Zelllinien nahezu halbierte, war die Reduktion bei anderen Zelllinien weniger stark ausgeprägt. Der Umstand, dass durchschnittlich dennoch weniger CD8⁺ T-Zellen im Degranulationstest detektiert werden konnten, kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann der Degranulationstest selber als Stressfaktor zu einem Untergang an CD8⁺ T-Zellen geführt haben, zum anderen könnte ein Zellverlust im Färbeprozess oder der Kryokonservierung für eine reduzierte Zellzahl verantwortlich gewesen sein.

Neben der Funktionalität der Zellen spielt auch die Ressourceneffizienz eine entscheidende Rolle in der Durchführung des REP. Eine Möglichkeit der Kostenreduktion besteht im Austausch von TexMACS Medium durch IMDM. Am Beispiel von Tc HROC400 konnte gezeigt werden, dass eine Expansion mit IMDM vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die Arbeitsgruppe von Xu et al. testete sechs verschiedene Zellkulturmedien, unter anderem IMDM, bezüglich ihrer Effekte auf die Expansion von T-Zellen. Obwohl die T-Zellexpansion für gewöhnlich in Serum-haltigen Medium durchgeführt wird, erzielten sie bei der Verwendung von Serum-freien Zellkulturmedien bessere Expansionsergebnisse. Dies führten sie auf komplexe Serumbestandteile zurück, die die Zellfunktion behindern. Dennoch rieten sie von der Expansion mit IMDM nicht ab. Da sie ebenfalls zu dem Schluss kamen, dass die CD3/CD28 Stimulation einen größeren Einfluss auf die *in vitro* Expansion humaner T-Zellen ausübt als die

Wahl des Zellkulturmedium, spricht nichts gegen eine Verwendung von IMDM an Stelle von TexMACS bei zukünftigen T-Zell-Expansionen.¹¹⁸

4.2.5 Vor- und Nachteile einer Separation der PBLs vor der Expansion

Ein weiterer Diskussionspunkt bezüglich der Durchführung des REP ist die Separation der T-Zellen von den übrigen PBLs vor der Expansion. Die unfraktionierten T-Zellpopulationen entwickelten sich mit einem geringeren kumulativen Wachstumsfaktor, als die Zellpopulationen, welche vor der Expansion in T-Zellen und Nicht-T-Zellen separiert wurden. Zu beachten ist an dieser Stelle, dass bei den unfraktionierten Populationen die Zuteilung zur Gruppe der T-Zellen an Hand der CD3-Färbung erfolgte. Deshalb wurden in die Kalkulation des Wachstumsfaktors der T-Zell-Gruppe bei den unfraktionierten Populationen ausschließlich CD3⁺ Zellen miteinbezogen. Bei den fraktionierten Populationen wurde die Einteilung in T-Zellen und Nicht-T-Zellen im Rahmen der vorherigen Isolation durch das *Pan Tc Isolation Kit* vorgenommen. Da bei Verwendung des *Kits* keine Selektion anhand der CD3-Expression stattfand, wurden auch CD3⁻ Zellen der T-Zell-Gruppe zugeordnet und flossen so in die Berechnung des Wachstumsfaktors mit ein (s. Kapitel 4.2.1). Werden nur die CD3⁺ Zellen betrachtet, überwogen an Tag null die fraktionierten Populationen mit einem Anteil an 64% CD3⁺ Zellen (ohne Separation: 55%) und an Tag sieben die Populationen ohne Separation mit einem Anteil von 72% CD3⁺ T-Zellen (mit Separation: 66%). Dies geht einher mit Ergebnissen anderer Studien, welche ebenfalls bei unfraktionierten Zellkulturen größere Expansionserfolge verzeichneten, als bei zuvor isolierten Kohorten.¹³¹

Die Arbeitsgruppe von Martkamchan et al. erzielte bei der Expansion von PBLs gesunder Probandinnen und Probanden einen prozentualen Anteil von 58% CD3⁺ T-Zellen an Tag null. Sie verwendeten ein Expansionsprotokoll mit CD3/CD28-*Beads* und 100U/ml IL-2. Innerhalb der Zellpopulationen, welche ohne Isolation ebenfalls als PBLs expandiert wurden, konnte in der hier vorliegenden Arbeit ein vergleichbarer Wert an Tag null mit 56% CD3⁺ T-Zellen erreicht werden. Durch die Expansion erreichten Martkamchan et al. nach drei Wochen einen prozentualen Anteil von 72-99,9% CD3⁺ T-Zellen. Es zeigte sich dabei stark schwankende Wachstumsfaktoren mit Werten zwischen >1.000 und <100. Die prozentualen Anteile der CD3⁺ T-Zellen und die Wachstumsfaktoren waren dabei stark von der Konzentration der

Diskussion

verwendeten stimulierenden *Beads* abhängig.¹³¹ Nach einer Woche konnte in der vorliegenden Arbeit durch das REP in der unfraktionierten Population ein Anteil an 74% CD3⁺ T-Zellen mit einem Wachstumsfaktor von 20 (± 14) generiert werden. Martkamchan et al. wiesen nach einer Woche in der am stärksten stimulierten Population eine maximale Expansionsrate um das Achtfache vor. Dies verdeutlicht, dass der Anteil an funktionalen, expansionsfähigen CD3⁺ T-Zellen dieser Arbeit charakteristisch für die Expansion von PBLs ist und sich auch die Wachstumsgeschwindigkeit mit der anderer Arbeitsgruppen vergleichen lässt. Die Arbeitsgruppe von Martkamchan et al. gaben allerdings zu bedenken, dass sowohl die Stimulation des TCR durch die Konzentration an Antigenen und kostimulatorischen Molekülen, als auch die Affinität des TCR zu MHC Molekülen die T-Zell-Expansion stärker beeinflussen, als eine Separation der PBLs.¹³¹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Wachstumsfaktor ein unzuverlässiger Marker zur Beurteilung des Vorteils der Isolation der T-Zellen von den übrigen PBLs vor Durchführung des REP darstellt. Bezüglich der prozentualen Einteilung in T-Zell-Subgruppen konnten weder an Tag null, noch an Tag sieben, signifikante Unterschiede zwischen den fraktionierten und unfraktionierten Zellpopulationen festgestellt werden. B-Zellen, welche aus der Gesamtpopulation der PBLs transformiert wurden, verzeichneten jedoch im Gegensatz zu den zuvor isolierten Kulturen einen geringeren kumulativen Wachstumsfaktor mit einer reduzierten Expression der kostimulatorischen Marker. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Auftrennung der PBLs in T-Zellen und Nicht-T-Zellen durch das *Pan Tc Isolation Kit* von Miltenyi das Wachstumsverhalten der B-Zell-Populationen fördert, für die T-Zell-Expansion jedoch weniger relevant zu sein scheint.

Von entscheidender Bedeutung sind in diesem Fall jedoch die logistischen Aspekte hinsichtlich der Zellzahl und der Menge an TexMACS Zellkulturmedium. Bei Isolation mit Hilfe des *Isolation Kits* kam es zu einem verstärkten Zellverlust durch die magnetische Säule, während bei der Durchführung des REP ohne vorherige Isolation auf Grund größerer Zellzahlen mehr TexMACS Medium benötigt wird.

Zur Verwendung des *Isolation kits* kann geraten werden, wenn Ressourcen an Zellkulturmedium gespart werden sollen. Besteht jedoch eine geringere Menge an Patienten-PBLs, ist eine Expansion ohne vorherige Separation der T-Zellen von Vorteil, um den durch die Isolation entstehenden Zellverlust zu reduzieren. Da das Immunsystem der meisten

Patientinnen und Patienten mit Tumorerkrankungen bereits geschwächt ist, kann so das limitierte Biomaterial optimal genutzt werden.

4.3 Aussagekraft der Degranulierungstests

Der Degranulierungstest und die vorherige Analyse der MHCI- und MHCII-Expression auf den Tumorzellen gibt Auskunft über die Tumorzell-T-Zell-Interaktion. Eine schwache MHC-Expression als Tumorevasionsmechanismus resultierte in einer geringeren Präsentation tumorspezifischer Peptide und beinhaltet somit ein verringertes Potential zur T-Zell-Aktivierung.⁷⁵ Dies führte im Degranulierungstest zu einer verminderten Anzahl aktivierter, dreifach positiver T-Zellen. Die Tumorzellen von HROC357 und HROC499Met1 zeigten ohne Stimulation mit IFN- γ eine geringe Expression der MHCI-Moleküle bei fehlender MHC-II-Expression. Bei der Metastase von HROC499 ließ sich die MHC-Expression auch durch Stimulation nicht induzieren. Da in beiden Fällen ein geringes Potential zur T-Zell-Aktivierung bestand, können diese Kokulturen als Negativkontrolle im Hinblick auf die Tumorzell-abhängige T-Zell-Aktivierung betrachtet werden.

Bei vorhandener Antigenpräsentation der Tumorzellen über MHCI/MHCII wurde die Degranulation und somit die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen getestet. Als reaktionsfähige, aktivierte T-Zellen wurden CD8/IFN- γ /CD107a dreifach positive T-Zellen bezeichnet. Da es sich bei den eingesetzten T-Zellen um periphere T-Zellen und nicht um Tumor-infiltrierende T-Zellen handelte, konnte nur eine geringe Tumorantigenerkennung durch die T-Zellen erwartet werden. Aussagen zur Wirksamkeit der ICI beziehen sich nur auf die im vorliegenden Experiment verwendeten ICI anti-CTLA4 und anti-PD1. Um den Anteil an peripheren T-Zellen mit TCR gegen Tumorantigene zu erhöhen, sollten in zukünftigen Untersuchungen weitere tumorspezifische stimulierende Peptide oder Tumorzellysate eingesetzt werden.

Im Degranulierungstest der Tc HROC499 konnte ein größerer prozentualer Anteil an CD107a/CD8/IFN γ dreifach-positiven Zellen bei den Zellen verzeichnet werden, die mit ICI behandelt wurden, im Vergleich zu den T-Zellen, die ohne Tumorzellen, mit TransAct oder nur mit Tumorzellen kultiviert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Immunevasionsstrategien der Tumorzellen durch die ICI adressiert werden konnten. Im Falle von Tc HROC499 hat das verkürzte REP somit funktionsfähige und tumorreaktive T-Zellen generiert.

Diskussion

Bei der Metastase von Tc HROC499 wiesen die durch Tumorzellen stimulierte Population und die unstimulierte Population einen vergleichbaren Anteil an dreifach positiven T-Zellen auf. Dies lässt sich auf den bereits erwähnten Umstand der fehlenden MHC-Expression zurückführen, wodurch eine tumorzellbedingte Stimulation der T-Zellen nicht erfolgen konnte. Die Funktionsfähigkeit der Tc HROC499 wurde bereits im Degranulationstest mit Tumorzellen von HROC499 nachgewiesen. In der mit ICI behandelten Kokultur konnte eine vermehrte Rate an dreifach positiven aktivierten T-Zellen verzeichnet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Metastase der Tumorzelllinie HROC499 neben der ausbleibenden MHC-Expression weitere Tumorevasionsmechanismen ausgebildet hat, welche durch die verwendeten ICI adressiert werden konnten.

Bei den T-Zellen von HROC357 konnten, unabhängig von der Stimulationsweise, wenig dreifach-positive Zellen detektiert werden. Dies kann auf eine allgemeine Erschöpfung der T-Zellen hinweisen. Eine mögliche Ursache für die Erschöpfung besteht in der Kryokonservierung. Diese führte ebenfalls bei weniger robusten Zelllinien zu einer erhöhten Rate an Zelluntergängen (s. Kapitel 2.2.10). Die geringe Rate an aktivierten T-Zellen lässt sich möglicherweise in der durch Tumorzellen stimulierten Population ebenfalls auf die schwache MHC-Expression der Tumorzellen zurückführen. Jedoch verzeichnete die Gruppe, die mit ICI therapiert wurde, den größten Anteil aktivierter T-Zellen. Da der Anteil der aktivierten T-Zellen in der Kokultur, den Anteil an aktivierten T-Zellen ohne Stimulation übertraf, lässt sich schlussfolgern, dass auch eine geringe MHC-Expression ausreichen kann um T-Zellen zu aktivieren und die hemmende Wirkung der Tumorzellen durch ICI aufzuheben. Im Hinblick auf die Funktionalität des REP lässt sich schlussfolgern, dass funktionale und tumorreaktive T-Zellen generiert werden konnten.

Bei den Tc HROC69 konnte durch die Stimulation mit Tumorzellen ein größerer Anteil an aktivierten T-Zellen verzeichnet werden, als durch Stimulation mit *TransAct* oder in der unstimulierten Population. Folglich ließen sich durch das REP auch bei dieser Zelllinie funktionsfähige und auf Tumorzellen-reagierende T-Zellen generieren. Die Tumorzelllinie scheint zudem keine Tumorevasionsmechanismen ausgebildet zu haben, welche von den hier verwendeten ICI adressiert werden konnten. Dies lässt sich an einer gleichbleibenden Rate an dreifach positiven T-Zellen erkennen, welche durch die Verwendung der ICI nicht gesteigert werden konnte.

Diskussion

Im Degranulierungstest von Tc HROC252 war der Anteil an aktivierten T-Zellen durch Kontakt mit Tumorzellen geringer, verglichen mit der unstimulierten T-Zellpopulation. Auch eine Behandlung mit ICI vergrößerte den Anteil an aktivierten T-Zellen nicht. Eine mögliche Erklärung besteht in einer generellen Hemmung der T-Zellen durch die Tumorzellen mit der Etablierung weiterer nicht-adressierter Immunevasionsmechanismen. Über die Funktionalität der T-Zellen kann nur begrenzt Auskunft gegeben werden, da angenommen werden muss, dass der hemmende Einfluss der Tumorzellen zu stark war.

Ein Kritikpunkt in der Durchführung des Degranulierungstests besteht darin, dass das *TransAct* als Positivkontrolle nicht die maximale Stimulation der T-Zellen bewirkte und in Zukunft eine andere Positivkontrolle verwendet werden sollte. Generell kam es zu einem großen T-Zellverlust bei der Durchführung der Degranulierungstests. Ob dies an immunsuppressiven Mechanismen des Tumors oder an einem erhöhten Stressfaktor durch die Kokultur, der Kryokonservierung oder dem Färbeprotokoll liegt, bleibt unklar.

Da die ICI der Degranulierungstests von Tc HROC357, Tc HROC252 und Tc HROC69 keine signifikante Wirkung zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen neben der Expression von PD-L1 und der Induktion eines Anergie-Status der T-Zellen über CTLA4 weitere Strategien entwickelt haben, der Immunantwort zu entkommen. Ein Beispiel dafür wäre die gesteigerte Expression von IDO (=idoleamine-2,3-dioxygenase). Dies ist ein Enzym des Tryptophan Stoffwechsels, welches bei Expression auf Tumorzellen eine Antigen-spezifische Toleranz von T-Zellen auslöst.¹³⁵ Auch kann eine vermehrte Produktion von TGF- β (=Transforming growth factor- β)¹³⁶ oder die Expression des *Immunecheckpoints* FGL1 (=Fibrinogen-like-Protein 1), welches an LAG3 (=Lymphocyte activation gene 3) auf T-Zellen bindet,¹³⁷ zu einer Hemmung der Immunfunktion führen. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht somit die Limitation der bisher verwendeten ICI-Therapie und den Bedarf an tiefergehender Forschung von Tumorevasionsmechanismen und deren Umgehung.

Ein Hinweis auf die Weiterentwicklung der Tumorzellen besteht ebenfalls in dem Verlust von MHCI/MHCII in HROC357 und HROC499Met1, ohne Stimulation mit IFN- γ . Bei HROC252Tu2 und HROC69 war MHCI regelhaft exprimiert und MHCII wurde bei Stimulation mit IFN- γ präsentiert. Jedoch kann die fehlende Wirksamkeit der ICI als Hinweis auf die Entwicklung weiterer Immunevasionsstrategien der Tumorzellen gewertet werden. Bei konstanter MHC-Expression wäre andernfalls die Wirksamkeit von ICI zu erwarten gewesen.

Ein interessanter Aspekt besteht zudem in der fehlenden Expression von MHCI oder MHCII der Metastase der Tumorzelllinie HROC499 als einzige der untersuchten Tumorzelllinien. Dies ließ sich auch nicht durch Stimulation mit IFN- γ induzieren. Der Verlust der HLA-Moleküle symbolisiert eine durch Selektionsdruck entstandene Veränderung der Metastase im Vergleich zum Primarius. Ein ähnliches Phänomen beobachteten Verdegaal et al. 2016 bei Patientinnen und Patienten mit Melanomen und Cervixkarzinomen. Hier exprimierten die Metastasen nach einer Therapie mit ACT ein reduziertes Repertoire an Neoantigenen im Vergleich zum Primarius.¹³⁸ Weitere Beispiele für eine signifikante Reduktion oder kompletten Verlust der Sensitivität für IFN- γ bei fehlender MHCI-Expression nach Stimulation konnte in der Literatur bei Patientinnen und Patienten mit Melanomen oder Lungenkarzinomen gefunden werden.¹³⁹ Wie jedoch der Degranulierungstest aufzeigte, war eine Aktivierung der T-Zellen auch bei Verlust der MHCI und MHCII Moleküle möglich. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in Zytokin-induzierten Killerzellen liegen, welche eine Untergruppe der T-Zellen darstellen, die auch ohne eine TCR-MHC-Interaktion zytotoxische Effekte ausüben können.¹²⁰

4.4 *B-lymphoblastoid cell lines*

4.4.1 Variabilität des Wachstumsverhaltens der B-LCLs

Ein häufig auftretendes Problem in der Grundlagenforschung von B-Zellen ist der relative Zellmangel. Dies liegt daran, dass die meisten Experimente mit humanen Zellen auf bereits verfügbaren PBLs beruhen, in denen B-Zellen lediglich 5-10% ausmachen.⁴⁸ Da B-Zellen jedoch einen sehr wertvollen Beitrag zur immunologischen Tumorabwehr leisten, ist die Etablierung langlebiger B-Zelllinien entscheidend für die Erforschung von Immuntherapien.

Neben dem zahlenmäßig geringen Auftreten von B-Zellen im peripheren Blut ist zudem der stark schwankende Expansionserfolg in Zellkulturen problematisch in der Generierung großer Zellmengen. Eine große Variabilität im Wachstumsverhalten der Populationen der B-Zell-Transformation zeigte sich in dieser Arbeit nicht nur innerhalb der Patientenkohorte, sondern auch in der Kontrollgruppe. Dies macht die Tumorerkrankung als Erklärung für das verminderte Wachstumspotential der B-LCLs *in vitro* unwahrscheinlich. Die Unvorhersehbarkeit des Wachstumsverhaltens verdeutlichte sich außerdem in den unterschiedlich stark ausgeprägten

Diskussion

Wachstumsverhalten verschiedener Zellkulturansätze von B-LCLs eines Patienten. Unabhängig von der großen individuellen und interindividuellen Schwankungsbreite erreichten die schnell wachsenden B-Zell-Populationen einen mittleren Wachstumsfaktor von 14,4 ($\pm 4,7$) und die langsamer wachsenden Populationen von 1,5 ($\pm 0,9$) (s. Kapitel 3.4.1). Gründe für die reduzierten Wachstumsgeschwindigkeiten könnten in der zwischenzeitlichen Kryokonservierung der PBLs, der Kontamination mit Mykoplasmen oder der Einnahme von Medikamenten bestehen.

In der Arbeitsgruppe von Henderson et al. gelang die Etablierung stabiler B-LCLs nur bei zirka 10% der EBV-transformierten Zellen. Zudem bestätigten sie, dass sich eine Kultivierung der B-LCLs in Abwesenheit von T-Zellen positiv auf die B-Zell-Transformation auswirkte.¹⁴⁰ Dies geht einher mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich der Separation von B- und T-Zellen vor Durchführung der EBV-B-Zell-Transformation.

Eine Erklärung für die variablen und teilweise geringen Expansionserfolge bot die Arbeitsgruppe von Gerber et al. durch den Nachweis der tiefgreifenden genetischen Veränderungen bis hin zu Änderungen im Chromosomensatz, die durch das EBV ausgelöst wurden. Zur Generierung immortalisierter B-Zelllinien testeten sie fünf doppelte Ansätze mit jeweils 40×10^6 Zellen des peripheren Blutes eines gesunden EBV⁻ Spenders mit zwei verschiedenen Konzentrationen an EBV-haltigen Reagenzien und drei Kontrollansätzen. Eine Abnahme der vitalen Zellen innerhalb der ersten 10-14 Tagen konnte in allen Ansätzen festgestellt werden, wobei die Populationen mit einer hohen EBV-Konzentration nach 18 Tagen zum Erliegen kam und die Populationen mit den Kontrollansätzen nach 40-45 Tagen in Kultur folgten. Die Ansätze mit einer geringeren EBV-Konzentration erreichten nach 24 Tagen eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml und es kam zur Ausbildung von Zellaggregaten. Hier war die Generierung einer immortalisierten B-Zelllinie durch die EBV-Transformation erfolgreich.¹⁰⁷ Dieses Experiment verdeutlicht ebenso wie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die Variabilität des Expansionserfolges von EBV-B-Zell-Transformationen. Eine Generierung großer Zellmengen gelingt somit nicht zuverlässig. In Zukunft werden sowohl Stimulanzien benötigt, um die B-Zell-Expansion im Rahmen der EBV-Transformation zu steigern, als auch neue Ansätze, die eine Langzeitkultivierung und Expansion von B-Zellen ermöglichen.

Eine Möglichkeit der Stimulation der B-Zellen während der EBV-Transformation besteht in der Verwendung von Phytohämagglutinin oder Lipopolysacchariden, welche von Henderson et al.

mit Erfolg durchgeführt wurde.¹⁴⁰ Trotz der Forschungsergebnisse von Ranheim et al., welche eine unterstützende Funktion von IL-4 für die CD40-Bindung mit einer verstärkten CD80- und ICAM-1-Expression und einer gesteigerten Proliferation postulierten, konnte ein wachstumsfördernder Effekt durch Stimulation mit IL-4 und CD40L in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.⁷⁰

4.4.2 Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs

Auffällig war der Zusammenhang zwischen ausgeprägtem Wachstumsverhalten der B-LCLs und der kontinuierlichen Expression der kostimulatorischen Marker. Ein geringes Wachstumsverhalten ging mit einer inhomogenen Expression der CD-Marker und der untersuchten Immunglobuline einher. Eine verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80, Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM1 oder ICAM2), Migrationsrezeptoren und Zellzyklus-stimulierenden Genen kann besonders bei antigenerfahrenen B-Zellen beobachtet werden.⁵² Auf Grund der geringen Expression der kostimulatorischen Marker der langsam wachsenden B-Zellpopulationen lässt sich schlussfolgern, dass diese ebenfalls eine geringe Kapazität besitzen, T-Zellen zu aktivieren und eine adäquate Immunantwort zu generieren. Bei den B-LCLs mit ausgeprägtem Wachstumsverhalten und einer starken Expression der kostimulatorischen Marker ist davon auszugehen, dass durch die EBV-B-Zell-Transformation funktionale B-LCLs generiert werden konnten, die theoretisch zur T-Zell-Aktivierung fähig sind. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Wachstumsverhalten und der Expression der kostimulatorischen Marker besteht, bleibt unklar. Interessanterweise kam es zu einer unterschiedlich starken Expression der kostimulatorischen Marker bei den immortalisierten B-Zelllinien, von denen zwei unterschiedliche Ansätze eines Patienten kultiviert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Marker erst im Laufe der Kultivierung entwickelt haben und nicht durch die Ausgangszellen determiniert wurden.

Problematisch in der Durchführung war, dass die B-LCLs teilweise nach unterschiedlich langer Kultivierung gefärbt wurden. Dies gilt es in Zukunft zu vereinheitlichen, da die Expressionsraten ebenfalls von der Kultivierungsdauer abhängen könnten. Bei der Durchführung zukünftiger EBV-Transformationen wäre zudem der Nachweis von CD23 auf den B-LCLs ein interessanter

Aspekt, da Studien ergaben, dass sich nur aus Zellen, welche das EBV-Antigen und CD23 exprimieren, stabile B-LCL-Zelllinien entwickeln.⁷³

Wie Studienergebnisse der Arbeitsgruppe von Zachova et al. nachwiesen, unterliegt auch die Expression der Immunglobuline starken Schwankungen.¹⁰⁵ Dennoch kann das Vorhandensein von IgA und IgG als Hinweis für einen Isotypwechsel der sezernierten Antikörper durch somatische Hypermutation gewertet werden, da das primäre Antikörperrepertoire der ersten Phase der Immunantwort aus IgM besteht. Übereinstimmend damit lässt sich feststellen, dass B-Zelllinien mit einer höheren Passagenzahl häufiger IgA als IgG auf ihrer Oberfläche exprimierten und IgM kaum darstellbar wurde. Ein Isotypwechsel der B-Zellen findet nur nach Antigenstimulation und einer Wechselwirkung zwischen CD40 auf B-Zellen und CD40L auf aktivierten T-Helferzellen in den Keimzentren statt. Daraus ergibt sich, dass B-LCLs, welche IgG oder IgA sezernieren, CD40 zumindest temporär auf ihrer Oberfläche exprimiert und *in vivo* einen Klassenwechsel durchlaufen haben. Dies trifft auf alle untersuchten B-LCLs in dieser Arbeit zu. Ein nachträglicher Verlust des CD40-Markers ist durch die EBV-Transformation oder die Kultivierung möglich und daran zu erkennen, dass der Anteil der Zellen, die IgG oder IgA exprimieren innerhalb einer Population größer ist als der Anteil der CD40⁺ Zellen.⁵⁹ Dieses Expressionsmuster konnte bei den Zelllinien Bc HROC402, Bc HROC458, Bc HROC427, Bc HROC428 und Bc HROC429 festgestellt werden. Als ursächlicher Stressor kann EBV für das reduzierte Wachstumsverhalten ($WF < 4$) und den Verlust des CD40-Markers nicht ausgeschlossen werden. Dies verdeutlicht die Größe des Einflussfaktors von EBV auf die B-LCLs und stellt die Frage, wie stark sich die B-Zellen durch die Kultivierung mit EBV verändern und ob eine realistische Schlussfolgerung auf die Verhältnisse *in vivo* zulässig ist.

4.4.3 Analyse der funktionalen Subpopulationen der B-LCLs

Zur weiteren Untersuchung der EBV-transformierten B-LCLs wurden diese mittels Durchflusszytometrie auf die Zugehörigkeit zu Subpopulationen analysiert. Ziel war die Untersuchung der B-LCLs auf generelle Funktionalität und die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung. Abhängig von der Tumorumgebung der B-Zellsubgruppe und den sezernierten Antikörpern können tumorinfiltrierende B-Zellen protumorale oder antitumorale Effekte ausüben. In B-Zell-defizienten Mäusen zeigte sich, im Vergleich zu Wildtyp Mäusen oder B-Zell-defizienten

Diskussion

Mäusen mit adoptiv transferierten B-Zellen, ein verlangsamtes Tumorwachstum bei kolorektalen Karzinomen.¹⁴¹ Die protumeralen Effekte der B-Zellen lassen sich auf die Subgruppe der immunsupprimierenden regulatorischen B-Zellen zurückführen. Auch Mauri et al. wiesen kürzlich nach, dass regulatorische B-Zellen (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) aus dem peripheren Blut bei CD40-Aktivierung die Differenzierung und Zytokinproduktion von T_H1 supprimieren können.¹⁴² Diese Aspekte verdeutlichen die Relevanz der Analyse der B-Zellsubgruppen.

Eine inkonstante Expression der typischen B-Zellmarker wie IgD, CD19 und CD27 in EBV-transformierten und nicht-transformierten B-Zellpopulationen erschwerte in dieser Arbeit die Subgruppen-Einteilung. Auch in der Literatur finden sich stark schwankende prozentuale Angaben bezüglich der Einteilung der B-Zell-Subpopulationen. In der Arbeitsgruppe von Zachova et al. traten hauptsächlich B-Gedächtniszellen und Plasmazellen innerhalb der Population der EBV⁺ B-LCLs auf, während naive Zellen kaum nachgewiesen werden konnten.¹⁰⁵ Eine andere Studie verzeichnete 22% Gedächtnis-B-Zellen und <1% regulatorische B-Zellen anteilig an allen CD19⁺EBV⁻ B-Zellen gesunder PBLs.⁵³ Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen wichen stark von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ab, in welcher EBV⁺ und EBV⁻ B-Zellen verwendet wurden.

Auffällig war, dass die EBV⁺ B-LCLs von Patientinnen und Patienten mit Tumorerkrankung eine geringere Resilienz vorwiesen, als die EBV⁺ B-LCLs gesunder Spender. Bei den B-LCLs von Tumorerkrankten konnte lediglich eine Rate von 60% lebender Zellen verzeichnet werden, während die Populationen EBV-transformierter B-LCLs gesunder Spender aus annähernd 100% lebender Zellen bestanden. Dies legt nahe, dass die Resilienz der B-LCLs hauptsächlich durch die Tumorerkrankung und nicht durch die EBV-Exposition bestimmt wird.

Auf Grund der inkonstanten Expression der charakteristischen CD-Marker für die Einteilung in Subpopulationen, dem großen Anteil toter Zellen und der hohen Expressionsraten der Aktivierungsmarker CD80/86 und MHCII der B-LCLs der Patientinnen und Patienten mit Tumorerkrankung wurde dieses Färbeprotokoll nicht bei allen B-Zellkulturen durchgeführt und stattdessen erfolgte die Färbung der kostimulatorischen Marker zur funktionalen Analyse der transformierten B-LCLs.

4.4.4 Auswirkung der Mykoplasmen auf die B-Zell-Transformation

Die Kontamination von Zellpopulationen mit Mykoplasmen ist das mit Abstand häufigste Problem in Zellkulturen. So kam es auch in der vorliegenden Arbeit zu einem Befall mit Mykoplasmen in mehreren Kulturen von B-LCLs. Trotz antibiotischer Behandlung konnte die Kontamination nicht vollständig unterbunden werden. Uphoff und Drexler beschrieben 2002, dass 15-35% aller tierischen und humanen Zellkulturen von Mykoplasmen kontaminiert waren, wovon der Großteil (47%) von *Mycoplasma fermentans* betroffen war, gefolgt von *M. hyorhinis* und *M. orale*.¹⁴³ Eine Beeinflussung durch die Interaktion mit den Bakterien im Wachstumsverhalten der B-LCLs oder bei der Expression der CD-Marker während der EBV-B-Zell-Transformation kann nicht ausgeschlossen werden.

Eine Studie von Zhang et al. wies jedoch nach, dass manche Unterarten von *Mycoplasma fermentans* die Immortalisierung von EBV-positiven B-Lymphozyten steigern können. So führten Infektionen mit *M. fermentans in vitro* zu einem gesteigerten Überleben von PBLs gesunder Spender, welche ohne spezifische Wachstumsfaktoren nicht länger als zwei Wochen überdauern hätten. Eine spontane Proliferation von EBV⁺ B-Zellpopulationen und der Etablierung von B-LCLs ist selten. Im Vergleich zu spontan immortalisierten PBLs, wiesen mit Mykoplasmen infizierte PBLs prominente Veränderungen des Karyotyps mit Chromosomenaberrationen oder Translokation ohne Beeinflussung der Expression der typischen B-Zell-Marker auf.¹⁴⁴ Ein mitogenes Potenzial kann mehreren Studien zu Folge bei vielen Mykoplasma-Spezies nachgewiesen werden.¹⁴⁵ Interessanterweise konnten ab dem Zeitpunkt der Ausbildung von Zellaggregaten in den B-LCL-Kulturen, keine lebendigen Mykoplasmen nachgewiesen werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass es keine kontinuierliche Präsenz von Mykoplasmen benötigt um eine Mykoplasmen-vermittelte Zelltransformationen zu induzieren. Zhang et al. resümierten, dass eine Infektion mit *M. fermentans* als potenter Promoter die Wahrscheinlichkeit der Immortalisation von EBV-positiven B-Lymphozyten erhöhen kann.¹⁴⁴ Auch Biberfeld et al. berichteten, dass *M. fermentans* humane B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Produktion unspezifischer Antikörper aktivieren kann.¹⁴⁶ Auch führte eine Infektion mit *M. pulmonis* zu einer gesteigerten Expression von MHCII auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, was mit einer verstärkten T-Zell-Aktivierung und Immunantwort assoziiert ist.¹⁴⁷

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine Kontamination mit Mykoplasmen für EBV-positive B-LCLs nicht nur nachteilig auswirkt, sondern auch einen gesteigerten Expansionserfolg mit einem größeren Potenzial zur T-Zell-Aktivierung bedeuten kann.

4.5 Einfluss des molekularen Subtyps auf die Wirksamkeit der Immuntherapie

In dieser Arbeit übte der Mikrosatellitenstatus keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der peripheren Immunzellen in Kultur oder die Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs aus. Bezogen auf die klinische Praxis könnte dies bedeuten, dass der Mikrosatellitenstatus kein Ausschlusskriterium für die Durchführung und den Erfolg von ACT oder anderen Immuntherapien darstellt. Ebenso wenig konnten die ermittelten Korrelationen der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass sich Lebensalter oder Tumorgröße auf den Expansionserfolgen von Immunzellen *in vitro* auswirken.

Durch das REP konnte bei den T-Zellen der Patientinnen und Patienten mit Pankreaskarzinom ein überdurchschnittlich starkes Wachstum mit einer Vermehrung der CD8⁺ T-Zellen verzeichnet werden. Obwohl sich diese Faktoren tendenziell förderlich auf den Erfolg von Immuntherapien auswirken, hatten Therapien mit ICI in klinischen Studien bisher wenig Erfolg. Dies ist darauf zurück zu führen, dass Pankreastumore als immunologisch kalte Tumore gelten und somit kaum von T-Zellen adressiert werden können.⁸¹

In klinischen Studien führte eine Therapie mit ICI bei MSI-H/dMMR mutierten KRK zu einem Überlebensvorteil.^{148,120} Eine Beeinflussung des Immunsystems durch den MSI-H/dMMR Subtyp scheint jedoch auf die Tumorumgebung limitiert zu sein, da sich keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der peripheren Immunzellen in Kultur oder eine Veränderung der T-Zell-Subpopulationen erkennen ließ. Auch eine veränderte Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs konnte nicht festgestellt werden. Auffällig war allerdings, dass die T-Zellpopulationen mit den größten Wachstumsfaktoren (HROP101, HROC499 und HROP92) von Patientinnen und Patienten mit MSS Tumoren generiert wurden.

Der MSI-H/dMMR Status, die TMB, der Anteil an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und die PD-L1 Expression gelten laut Literatur als prädiktive Biomarker für eine erfolgreiche ICI-Therapie. Mukherji et al. bezeichneten die molekulare Testung des MSI-H Status ebenfalls als

Diskussion

einen akkuraten und prädiktiven Vorhersagewert für das klinische Ansprechen auf eine ICI-Therapie.^{81,12} Bei *in vitro* Degranulierungstests der vorliegenden Arbeit beeinflusste der untersuchte molekulare Subtyp (MSS, MSI, POLE, POLD) allerdings nicht die Wirksamkeit der ICI. Entgegen der Ergebnisse von Chalabi et al., welche von einem Nichtansprechen auf die Kokultur bei pMMR/MSS Tumoren berichteten, waren die ICI bei den MSS Tumorzelllinien HROC357, HROC499 und HROC499Met1 in dieser Arbeit wirksam. Da die ICI bei der MSI Zelllinie HROC252Tu2 und der MSS Zelllinie HROC69 nicht zu einer Steigerung der T-Zell-Aktivierung führten, kann geschlossen werden, dass weitere molekulare Subtypen, Mutationen oder immunmodulatorischen Effekte die Reaktivität der T-Zellen beeinflussen haben.

5 Ausblick

Wie auch die vorliegende Arbeit verdeutlicht, handelt es sich bei der T- und B-Zell-vermittelten Tumorbekämpfung um ein sehr komplexes Themenfeld mit vielen einflussnehmenden Variablen. Um in Zukunft die Forschung an weiteren Aspekten der Immuntherapie zu erleichtern, leistet diese Arbeit einen wertvollen Beitrag zur Grundlagenforschung an Expansionsprotokollen funktionaler Immunzellen.

Mit Hilfe des verwendeten REP gelang die Expansion funktionsfähiger T-Lymphozyten bei einer verkürzten Kultivierungsdauer von sieben Tagen an Stelle von 14 Tagen. Dies ermöglicht die Einsparung erheblicher Zeit- und Laborressourcen bei zukünftigen Forschungsprojekten. Durch das REP wurden vor allem CD8⁺ T-Zellen mit einem T_{CM}, T_{SCM} und T_{EFF} Phänotyp gefördert. Insbesondere T_{CM} und T_{SCM} erzielten bei Anwendung in einer ACT die größten Therapieerfolge. Eine zusätzliche Stimulation des CD28-Markers oder die Hinzugabe von TGF- β könnten zu einer Steigerung der Expression bei Durchführung des verkürzten REP beitragen. Interessante Aspekte zukünftiger Forschung bestehen außerdem in dem bisher unbekanntem Potential der CD3⁻ T-Zellen, der CD4/CD8 doppelt positiven und CD4/CD8 doppelt negativen T-Zellen.

Die Ergebnisse der Degranulierungstests verdeutlichen die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Tumor- und T-Zellen und zeigen auf, dass noch nicht alle Aspekte der Interaktion hinreichend erforscht sind. Die bisher bekannten Tumorevasionsstrategien und die in dieser Arbeit untersuchten genetischen Variationen konnten die beobachteten Phänomene der Degranulierungstests nicht ausreichend erklären. Dennoch wiesen die Degranulierungstests nach, dass durch das verkürzte REP funktionsfähige und auf Tumorzellen reagierende T-Zellen generiert werden konnten. Damit möglichst viele Patienten von einer Immuntherapie profitieren, sollte der hemmende Einfluss der Tumormikroumgebung auf T-Zellen intensiver erforscht werden.

Die sehr variablen Expansionsergebnisse der B-LCLs der vorliegenden Arbeit spiegeln den Stand der Wissenschaft und verdeutlichen die Limitation der EBV-Transformation bei Expansion von B-LCLs. Da einige der immortalisierten B-Zellen eine starke Expression der kostimulatorischen Marker aufwiesen, wäre zukünftig die Funktionalität dieser B-LCLs zur Aktivierung von T-Zellen *in vitro* zu testen. Eine zusätzliche Stimulation mit Phytohämagglutinin oder Lipopolysacchariden während der EBV-Transformation sind zudem Möglichkeiten den

Ausblick

Expansionserfolg zu steigern. Dennoch besteht großer Bedarf an weiteren innovativen Ideen zur Etablierung immortalisierter B-Zellen *in vitro* – ob zur Grundlagenforschung oder zum Einsatz im Rahmen einer Immuntherapie.

6 Zusammenfassung

Im Hinblick auf die Inzidenz von KRK und Pankreaskarzinomen in Deutschland ist die Erforschung von immuntherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten von großer Relevanz. Der quantitative Expansionserfolg der verkürzten Durchführung des REP war mit Resultaten anderer Forschungsgruppen vergleichbar, erwies sich jedoch als sehr variabel. Bei einer limitierten Anzahl an PBLs sollte auf eine T-Zell-Separation vor Expansion verzichtet werden, um den Zellverlust durch die Isolation zu reduzieren. Durch das in dieser Arbeit verwendete Protokoll wurden insbesondere CD8⁺ T-Zellen mit einem T_{CM}⁻, T_{SCM}⁻ und T_{EFF}⁻ Phänotyp gefördert, während es zu einer Verminderung der CD4⁺ naiven T-Zellen und der CD4⁺ zentralen T-Gedächtniszellen kam. Die gesteigerte Expansion von CD8⁺ T_{SCM} und T_{CM} gilt als vorteilhaft im Hinblick auf eine etwaige Anwendbarkeit im Rahmen einer ACT. Somit kann zu einer Anwendung des Protokolls in verkürzter Form geraten werden.

Die Durchführung von Degranulierungstests wies nach, dass es sich bei fast allen untersuchten expandierten T-Zellpopulationen um funktionale und auf Tumorzellen-reagierende Zellen handelte. Dies kann als Erfolg des REP gewertet werden, dessen definiertes Ziel die Expansion von tumorreaktiven T-Zellen darstellte. Während bei einigen Tumorzelllinien die verwendeten ICI zu einer gesteigerten Rate an aktivierten T-Zellen führten, muss bei ausbleibender Wirksamkeit bei anderen Zelllinien darauf geschlossen werden, dass bisher unbekannte hemmende Einflüsse der Tumorzellen eine Rolle gespielt haben. Der molekulare Subtyp der Tumorzellen scheint sich nur auf die Immunzellen der direkten Tumorumgebung auszuwirken, da sich kein Effekt auf das Expansionsverhalten der peripheren Immunzellen, der Expression kostimulatorischer Marker oder der Verteilung der Subgruppen verzeichnen ließ.

Bei den B-LCLs war ein ausgeprägtes Wachstumsverhalten mit einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Marker assoziiert. Dies kann als Hinweis auf die Fähigkeit zur B-Zell-abhängigen T-Zell-Aktivierung der B-LCLs nach Immortalisierung gewertet werden. Durch die EBV-Transformation der B-Zellen konnten jedoch weder bei Patientinnen und Patienten, noch in der Kontrollpopulation stabile Expansionserfolge erzielt werden. Um zukünftig die einzelnen Subpopulationen der B-Zellen und ihre Rolle in der Tumorbekämpfung genauer untersuchen zu können, ist weitere Grundlagenforschung in der Protokolletablierung zur Expansion langlebiger B-Zelllinien erforderlich.

7 Thesen

1. Ein auf sieben Tage verkürztes REP generiert funktionsfähige, auf Tumorzellen reagierende T-Zellen, welche in einer Immuntherapie eingesetzt werden können.
2. Eine dauerhaft anhaltende Stimulation kann bei T-Zellen zum Verlust ihres CD3-Markers auf der Zelloberfläche führen.
3. Die durch das REP generierten CD8⁺ T_{CM} und CD8⁺ T_{SCM} führen bei ACT zu einer langlebigen und robusten Immunreaktion *in vivo*.
4. Die EBV-B-Zell-Transformation ist eine unzuverlässige Methode um stabile Zelllinien immortalisierter B-LCLs zu generieren.
5. Eine Separation der PBLs vor Durchführung der EBV-Transformation fördert die Expansion der B-LCLs und die Ausbildung der kostimulatorischen Marker. Zudem können Ressourcen an Labormaterial eingespart werden.
6. Bei begrenzter Menge an Biomaterial von Patientinnen und Patienten ist eine Expansion ohne Isolation vorteilhaft um den entstehenden Zellverlust zu reduzieren.
7. B-LCLs mit einer hohen Expansionsrate exprimieren verstärkt kostimulatorische Marker und besitzen deshalb ein erhöhtes Potenzial zur T-Zell-Aktivierung.
8. Eine Kontamination der B-LCLs mit Mykoplasmen wirkt sich nicht zwangsläufig negativ auf die B-Zell-Transformation aus, sondern kann ebenfalls das Wachstum fördern.
9. Auch bei ausbleibender MHC-Expression können T-Zellen durch Tumorzellen aktiviert und die Tumorevasionsmechanismen durch ICI adressiert werden.
10. Bei fehlender Wirksamkeit der eingesetzten ICI ist die Ausbildung anderweitiger Tumorevasionsmechanismen wahrscheinlich.
11. Der Mikrosatellitenstatus stellt kein Ausschlusskriterium für die Durchführung und den Erfolg von ACT oder anderen Immuntherapien dar.
12. Eine Beeinflussung des Immunsystems durch den MSI-H/dMMR Subtyp ist auf die unmittelbare Tumorumgebung limitiert.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Adoptive T-Zell-Therapie
ADCC	<i>Antibody-dependend cellular cytotoxicity</i>
APC	Adenomatöse polyposis coli; Antigenpräsentierende Zelle; Allophycocyanin
ATM	Ataxia telangiectasia Syndrom
BC	<i>Buffy Coat</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
B-LCL	B-lymphoblastoide Zelllinie
BRCA1/2	<i>Breast cancer gene 1,2</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
CAR	Chimere Antigenrezeptoren
CCR7	C-C chemokine receptor 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CLS	<i>Central Laboratory Services</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
Cy	Cyanin
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälber Serum
FGL-1	<i>Fibrinogen-like-Protein 1</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
Ggf.	Gegebenenfalls
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolorektes Karzinom; Synonym: Lynch-Syndrom
HR	Hormonrezeptor
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IDO	Idoleamine-2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
KRK	Kolorektales Karzinom
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LFA-1	<i>Leucocyte function associated molecule 1</i>
LMP1	<i>Epstein-barr virus latent membrane protein 1</i>
LS	Lynch-Syndrom
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>

Abkürzungsverzeichnis

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
dMMR	<i>Mismatch-Repair-Deficiency</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabil
P	Passage
PBL	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PiCOP-Studie	Studie zu peptidbasierten Immunisierungsstrategien bei Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs
POLE	DNA-Polymerase ϵ
POLD	DNA-Polymerase δ
P/S/A	Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B
Rb-Protein	Retinoblastom-Protein
REP	<i>Rapid expansion protocol</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T _{CM}	Zentrale T-Gedächtniszellen
T _{EFF}	T-Effektorzellen
T _{EM}	T-Effektorgedächtniszellen

Abkürzungsverzeichnis

T _N	Naive T-Zellen
T _{SCM}	Stammzell-T-Gedächtniszellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIL	Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten
TMB	Tumormutationslast; <i>Tumor mutational burden</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
z.B.	Zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

1. Abb.	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland.....	11
2. Abb.	Interaktion zwischen CD4 ⁺ T-Helferzelle und APC durch die kostimulatorischen Moleküle CD40/CD40L und B7/CD28.	19
3. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen von Tc BC1, Tc FB und Tc HROM14 nach REP Kultur für 12-14 Tage.....	47
4. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen der Patientinnen und Patienten nach REP für sieben Tage	48
5. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der T-Zellen der Kontrollgruppe nach REP für sieben Tage	49
6. Abb.	Prozentualer Anteil der CD3 ⁺ T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation an Tag null und Tag sieben des REP; Analyse mittels Durchflusszytometrie	51
7. Abb.	Prozentuale Verteilung der CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen der Patientinnen und Patienten anteilig an allen CD3 ⁺ T-Zellen an Tag null und Tag sieben des REP	52
8. Abb.	Prozentuale Verteilung der CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe anteilig an allen CD3 ⁺ T-Zellen an Tag null zu Tag sieben des REP	53
9. Abb.	Prozentuale Verteilung der CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen der Patientinnen und Patienten anteilig an allen CD3 ⁺ T-Zellen an Tag null und Tag sieben des REP	54
10. Abb.	Prozentuale Verteilung der CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe anteilig an allen CD3 ⁺ T-Zellen an Tag null und Tag sieben des REP	55
11. Abb.	Prozentuale Verteilung der T-Zell-Subpopulationen der Patientenkohorte vor Durchführung des REP	56
12. Abb.	Prozentuale Verteilung der T-Zell-Subpopulationen der Patientenkohorte nach Durchführung des REP	57
13. Abb.	Prozentuale Verteilung der T-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe an Tag null und Tag sieben des REP	58
14. Abb.	Durchflusszytometrische Analyse der MHCI/II Expression von IFN- γ stimulierten und unstimulierte Tumorzellen von HROC357, HROC499, HROC499Met1, HROC252Tu2, HROC69	61

Abbildungsverzeichnis

15. Abb.	Degranulierungstest der expandierten T-Zellen und Tumorzellen von HROC357, HROC499, HROC499Met1, HROC252Tu2, HROC69; Durchflusszytometrische Messung der Expression von CD8, CD107a und IFN- γ der T-Zellen	63
16. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs (WF >4) der Patientinnen und Patienten nach EBV-B-Zell-Transformation	64
17. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs (WF <4) der Patientinnen und Patienten nach EBV-B-Zell-Transformation	65
18. Abb.	Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs mit WF>4 der Patientinnen und Patienten	66
19. Abb.	Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs mit WF <4 der Patientinnen und Patienten	67
20. Abb.	Prozentuale Angabe der Expression der kostimulatorischen Marker der B-LCLs der Kontrollgruppe	68
21. Abb.	Expression der Immunglobuline auf B-LCLs nach EBV-Transformation der Patientinnen und Patienten	69
22. Abb.	Analyse der B-Zell-Subpopulationen von EBV-transformierten B-LCLs, sowie PBLs von BC2, TiBc und Vollblut.....	71
23. Abb.	Prozentualer Anteil an CD3 ⁺ T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation an Tag null und Tag sieben des REP	105
24. Abb.	<i>Gating-Strategie</i> der durchflusszytometrischen Analyse der Subpopulationen der T-Zellen	106
25. Abb.	Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an allen CD3 ⁺ T-Zellen der Patientinnen und Patienten an Tag null und Tag sieben des REP	107
26. Abb.	Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der CD3 ⁺ T-Zellen der Patientinnen und Patienten an Tag null und Tag sieben des REP	107
27. Abb.	Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der CD3 ⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe an Tag null und Tag sieben des REP	108
28. Abb.	<i>Gating-Strategie</i> der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellen der Degranulierungstests	109
29. Abb.	Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs der Kontrollgruppe nach EBV-Transformation.....	110

Tabellenverzeichnis

30. Abb.	<i>Gating-Strategie</i> der durchflusszytometrischen Analyse der Expression der kostimulatorischen Marker und Immunglobuline der B-LCLs nach EBV-Transformation.....	111
31. Abb.	Expression der Immunglobuline auf den B-LCLs der Kontrollgruppe nach EBV-Transformation.....	112
32. Abb.	<i>Gating-Strategie</i> der durchflusszytometrischen Analyse der Subpopulationen der B-LCLs	113

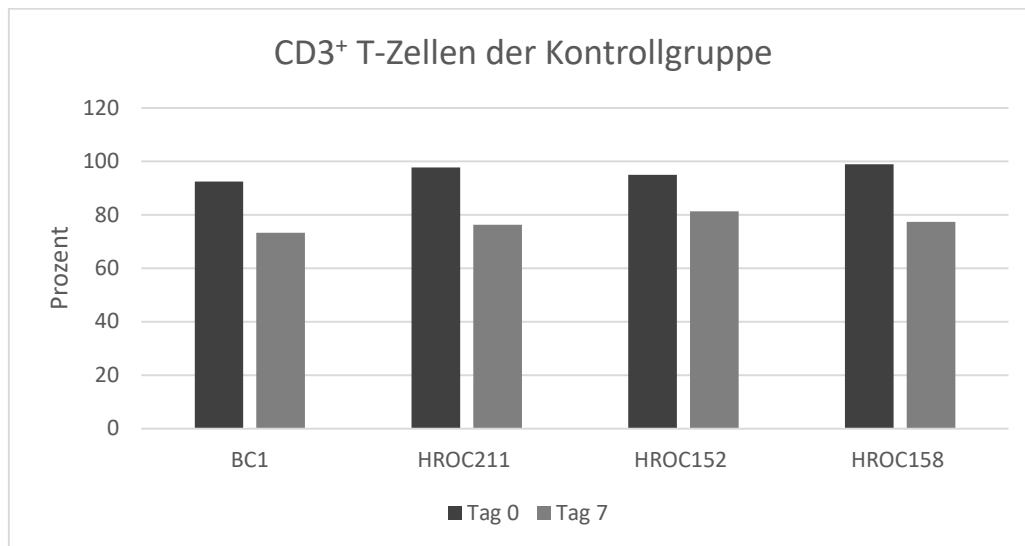
10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Zelllinien	28
Tabelle 2:	Definition T-Zell-Subpopulationen	37
Tabelle 3:	Definition B-Zell-Subpopulationen.....	39
Tabelle 4:	Anzahl lebender T-Zellen nach Kryokonservierung.....	47

11 Anhang

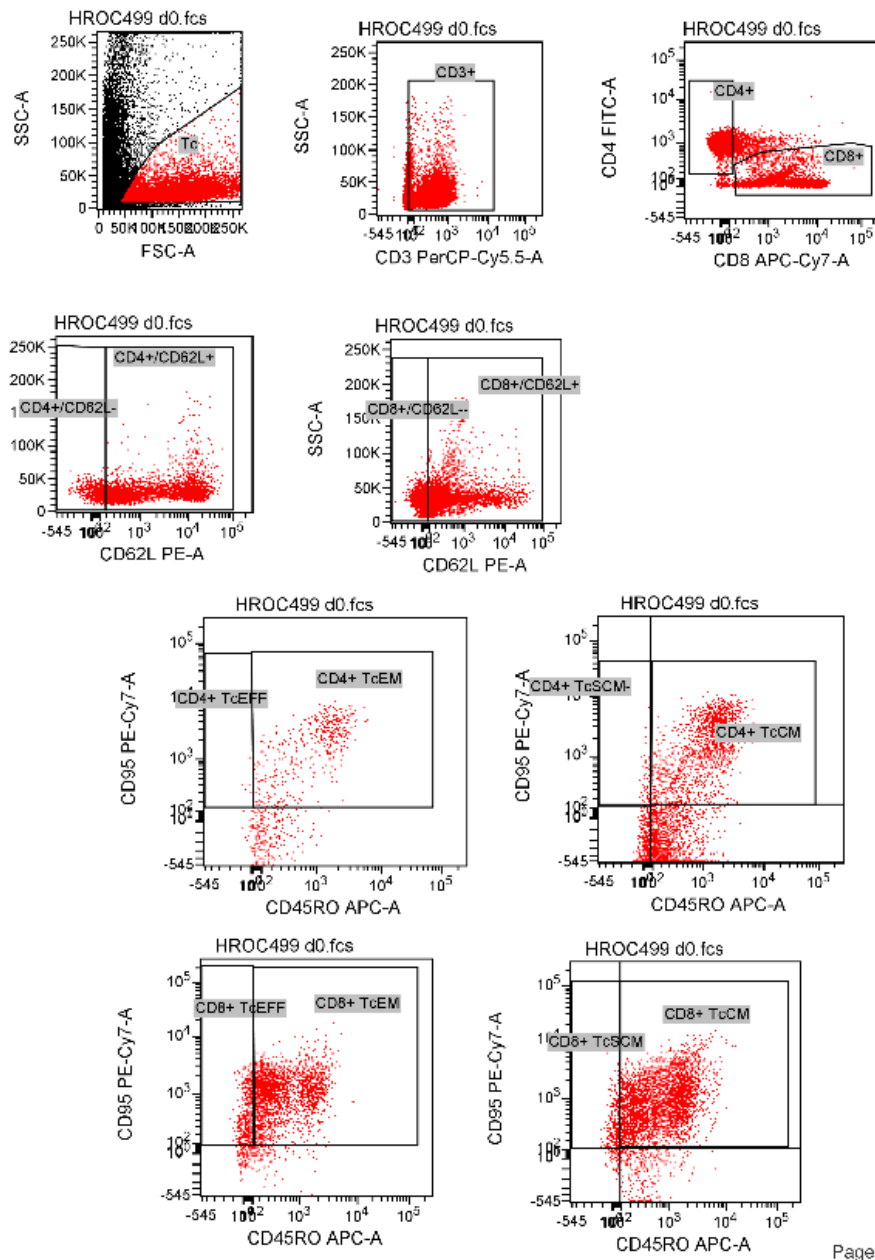
11.1 Abbildungen Ergebnis-Teil

11.1.1 CD3⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe



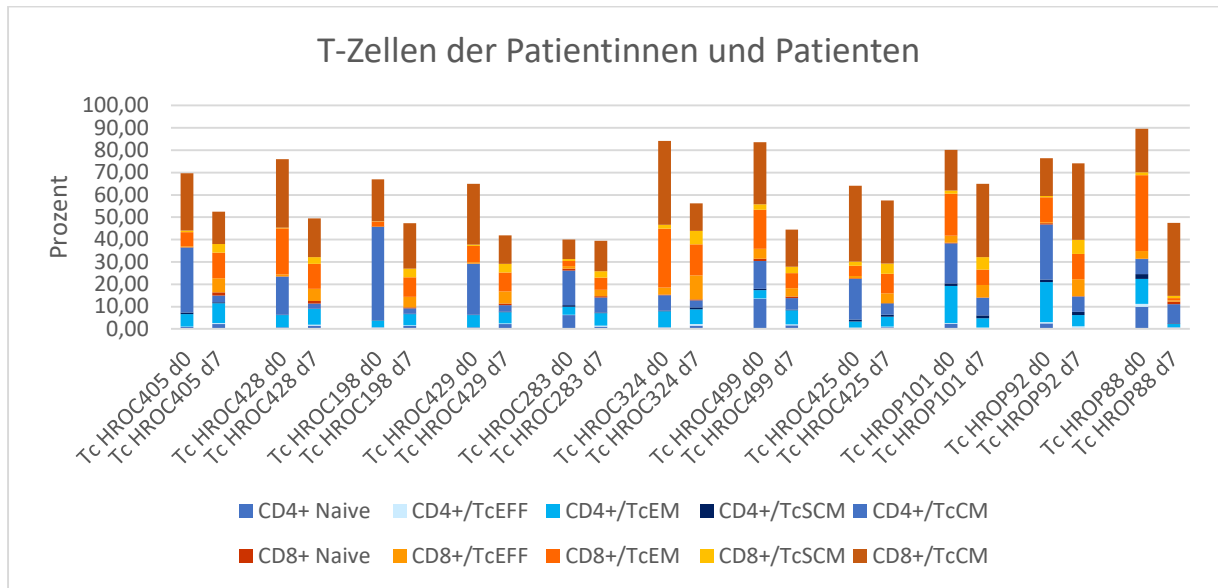
23. Abb. Prozentualer Anteil an CD3⁺ T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation an Tag null und Tag sieben des REP der Kontrollgruppe ohne Tumorerkrankung; Analyse mittels durchflusszytometrischer Analyse des CD3-Markers

11.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen

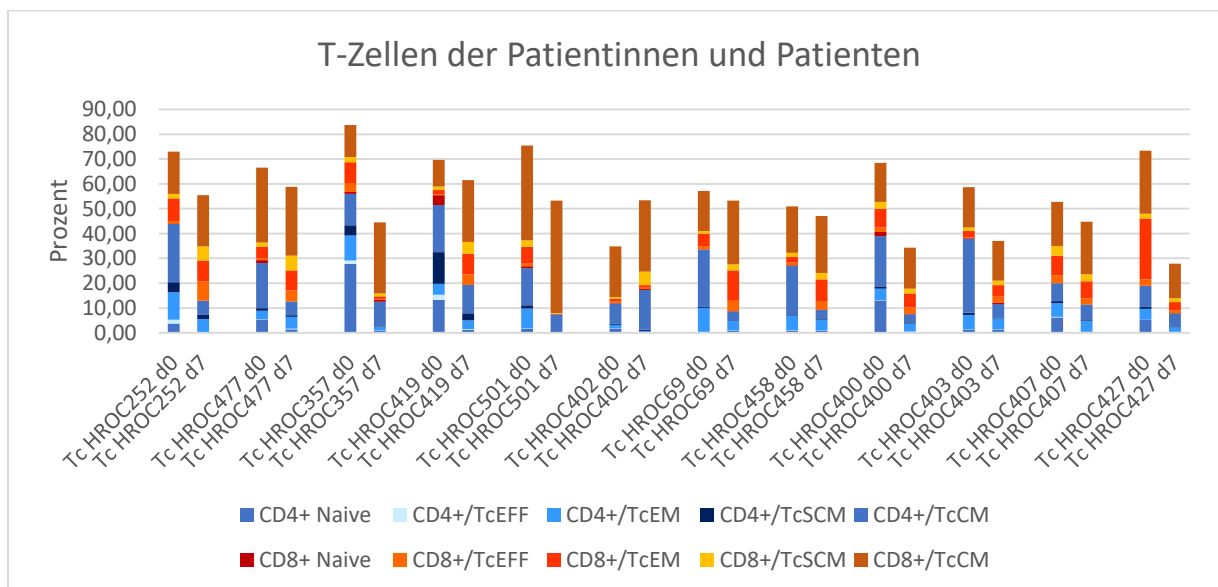


24. Abb. Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen der T-Zellen am Beispiel von HROC499 an Tag null am FACSVerse; Färbung der Marker CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RO und CD9; Darstellung der *Gating*-Strategie

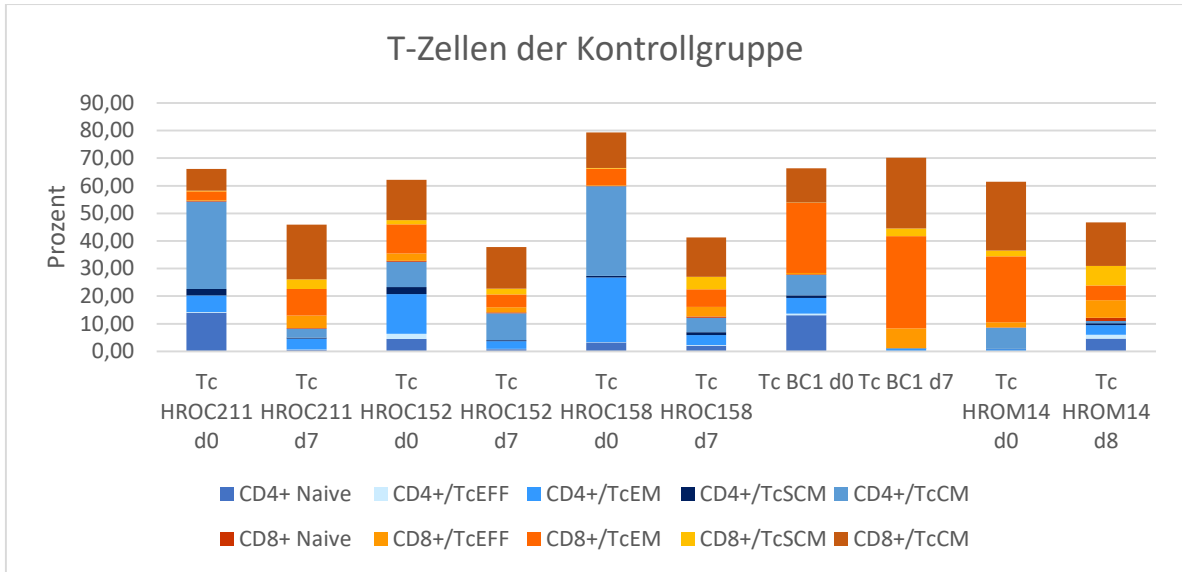
11.1.3 T-Zell-Subpopulationen



25. Abb. Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen der Patientinnen und Patienten; durchflusszytometrische Analyse der CD-Marker CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RO und CD95 an Tag null und Tag sieben des REP (d=day)

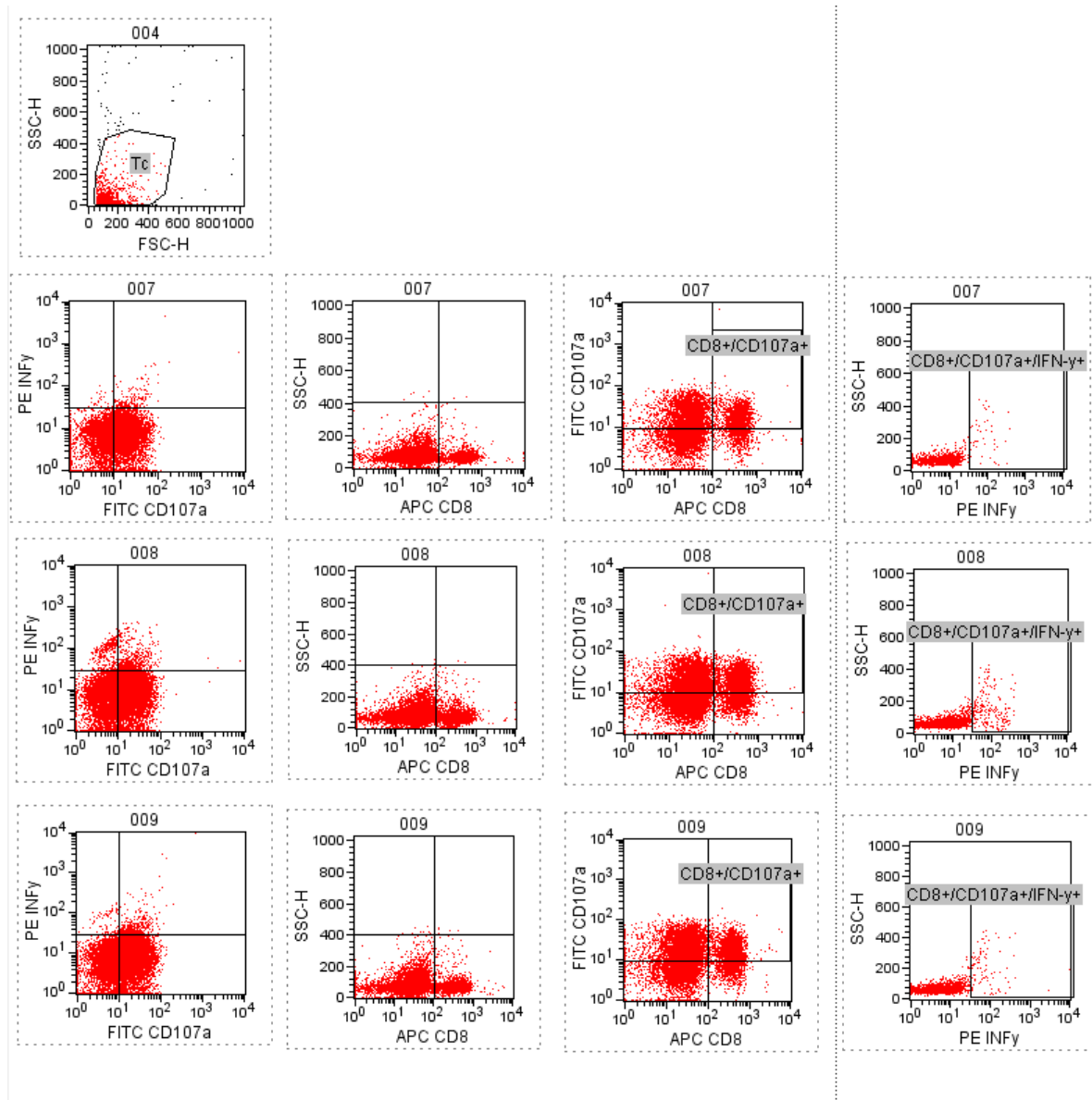


26. Abb. Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen der Patientinnen und Patienten; durchflusszytometrische Analyse der CD-Marker CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RO und CD95 an Tag null und Tag sieben des REP (d=day)



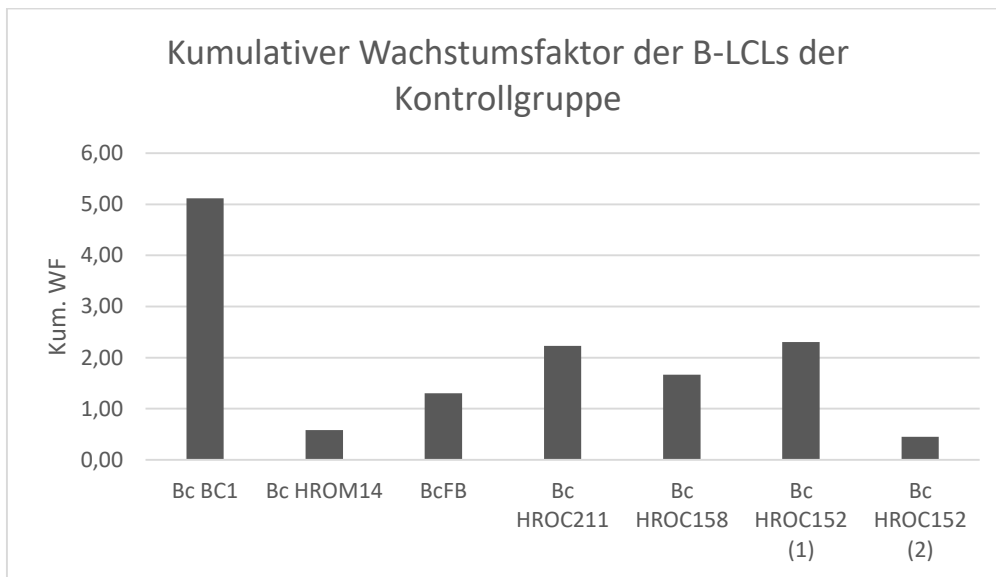
27. Abb. Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe an Tag null und Tag sieben des REP; Analyse mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RO und CD95 (d=day)

11.1.4 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen der Degranulationstests



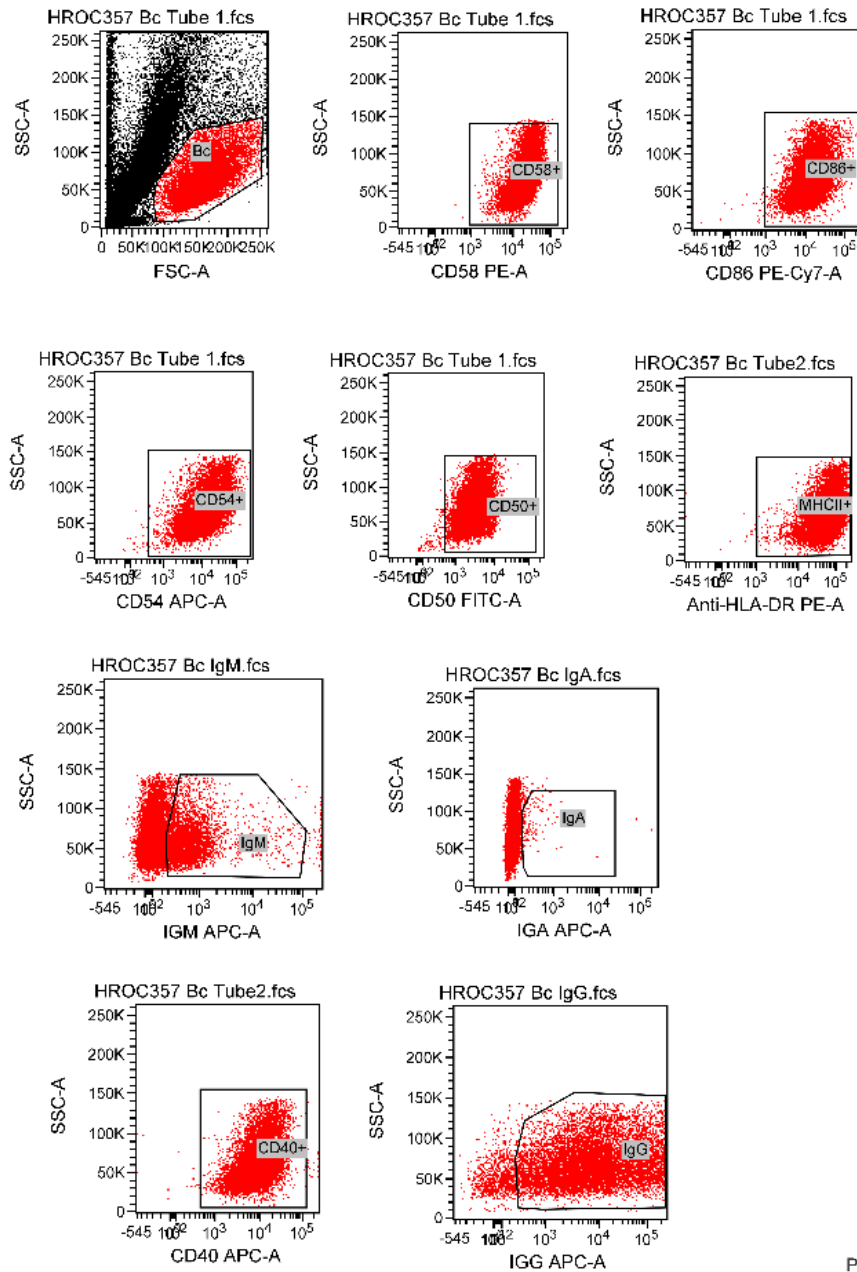
28. Abb. Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen nach Durchführung der Degranulationstests am Beispiel von Tc HROC357 am FACSCalibur; Färbung der Expression von CD107a, CD8 und IFN- γ ; Darstellung der Gating-Strategie

11.1.5 Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs der Kontrollgruppe



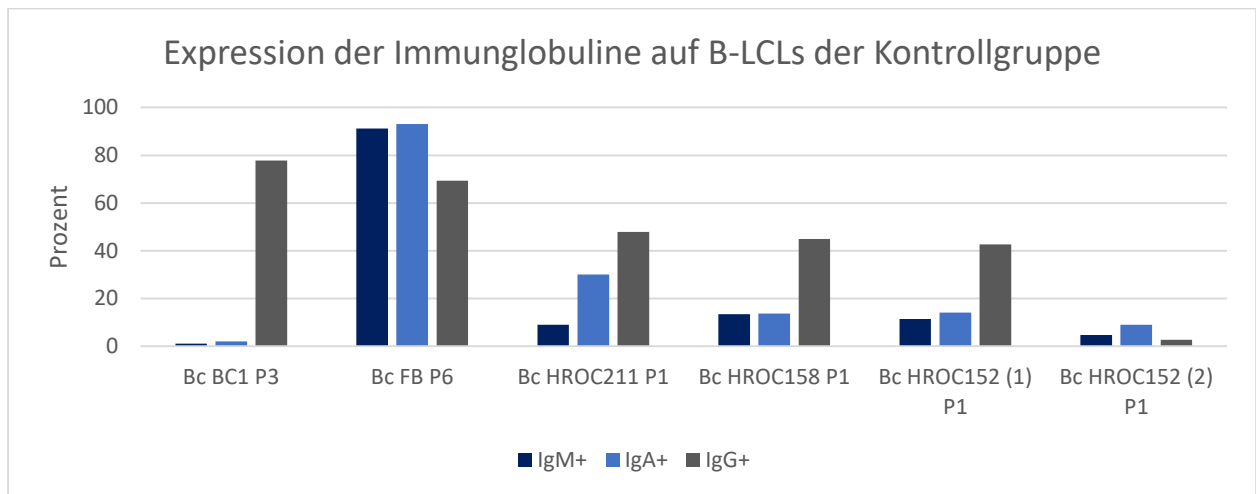
29. Abb. Kumulativer Wachstumsfaktor der B-LCLs der Kontrollgruppe nach EBV-Transformation; Ermittlung des Wachstumsfaktors nach acht Wochen; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz von Bc HROC152

11.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der kostimulatorischen Marker der B-LCLs



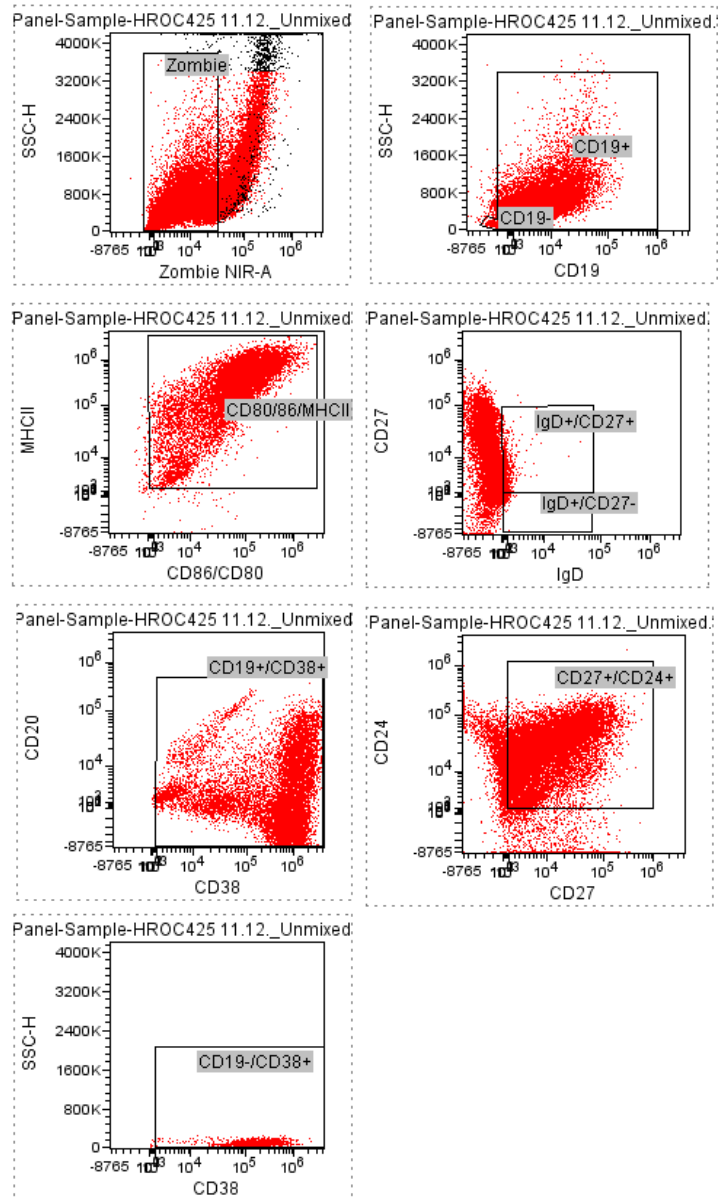
30. Abb. Durchflusszytometrische Analyse der Expression der kostimulatorischen Marker und Immunglobuline der B-LCLs nach EBV-Transformation am Beispiel von Bc HROC357 am FACSVerse; Färbung der Marker CD58, CD86, CD54, CD50, CD40, HLA-DR, IgM, IgA, IgG; Darstellung der *Gating*-Strategie

11.1.7 Expression der Immunglobuline auf den B-LCLs der Kontrollgruppe



31. Abb. Expression der Immunglobuline auf den B-LCLs der Kontrollgruppe nach EBV-Transformation; Messung mittels durchflusszytometrischer Analyse am FACSVerse; Färbung der Oberflächenexpression von IgM, IgA und IgG; (1) und (2) kennzeichnen den doppelten Ansatz der B-Zell-Transformationen von Bc HROC152; P=Passage

11.1.8 Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen der B-LCLs



32. Abb. Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen der B-LCLs nach EBV-B-Zell-Transformation am Beispiel von Bc HROC425 am FACSAurora; Färbung der Marker CD19, CD38, CD27, CD24, CD20, IgD, MHCII und CD80/86; Darstellung der *Gating-Strategie*; Zombie-Färbung zur Differenzierung von toten und lebenden Zellen

11.2 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Hr. PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher für die Bereitstellung des Themas und die Durchführung der experimentellen Arbeit in dem Labor der MOI bedanken. Auch seine fachliche Betreuung und Unterstützung, sowie die Korrektur der schriftlichen Arbeit weiß ich sehr zu schätzen.

Für die individuelle Betreuung und Einarbeitung, für die Beantwortung all meiner Fragen und ihre grenzenlose Geduld bedanke ich mich ganz besonders bei Fr. Dr. rer. hum. Sandra Schwarz. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können!

Ein großer Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitenden der Biobank der Universität Rostock für die Bereitstellung der Proben und Patientendaten. Allen voran möchte ich mich bei Hr. Mathias Krohn für seine kompetente und zugewandte Art bedanken. Besonders zu Beginn meiner Einarbeitung standen er und Fr. Dr. Christina Mullins mir stets geduldig und mit Rat und Tat zur Seite.

Meine Zeit im Labor des MOI war ebenfalls geprägt von dem kollegialen Miteinander und der gegenseitigen Unterstützung durch die anderen Doktorandinnen und Doktoranden und allen weiteren Mitarbeitenden des Labors. Auch dafür möchte ich meinen Dank ausdrücken!

Für das Angebot des methodischen Begleitseminars für Promovierende in der klinischen Forschung und die Beantwortung sämtlicher statistischer Fragen bedanke ich mich bei PD Dr. rer. medic. Andreas Hahn. Ebenfalls danken möchte ich M. Sc. Wendy Bergmann und M. Sc. Micheal Müller für die ausführliche Beratung und Unterstützung im Umgang mit den FACS-Geräten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Paul für die umfassende Unterstützung danken, die sie mir jederzeit entgegengebracht haben!

12 Literaturverzeichnis

1. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, Leng WWJ de, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*. 2018;50(1):49–59 doi:10.1016/j.pathol.2017.09.004.
2. (RKI). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c18_c20_darm.pdf?__blob=publicationFile.
3. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74(2):106–33 doi:10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
4. Onkologie L. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom.
5. (Robert Koch-Institut). Krebs in Deutschland für 2017/2018.
6. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
7. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5783–88 doi:10.1200/JCO.2008.17.5950.
8. Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg Clin North Am*. 2015;95(5):1067–80 doi:10.1016/j.suc.2015.05.004.
9. Rassow J, Netzker R, Hauser K. Duale Reihe Biochemie. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2022.
10. (National Institute for Health and Care Excellence). Molecular testing strategies for Lynch syndrome in people with colorectal cancer.
11. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):153–62 doi:10.1038/nrclinonc.2009.237.
12. Dietmaier W, Büttner R, Rüschoff J. Mikrosatelliteninstabilität : Aktueller Überblick über Methoden und Anwendungen [Microsatellite instability : Review of methods and applications]. *Pathologe*. 2019;40(3):313–27 doi:10.1007/s00292-019-0610-7.
13. Lamberti C, Kruse R, Ruelfs C, Caspari R, Wang Y, Jungck M, Mathiak M, Malayeri HR, Friedl W, Sauerbruch T, et al. Microsatellite instability-a useful diagnostic tool to select

- patients at high risk for hereditary non-polyposis colorectal cancer: a study in different groups of patients with colorectal cancer. *Gut*. 1999;44(6):839–43
doi:10.1136/gut.44.6.839.
14. Buecher B, Cacheux W, Rouleau E, Dieumegard B, Mitry E, Lièvre A. Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Dig Liver Dis*. 2013;45(6):441–49 doi:10.1016/j.dld.2012.10.006.
 15. Magrin L, Fanale D, Brando C, Fiorino A, Corsini LR, Sciacchitano R, Filorizzo C, Dimino A, Russo A, Bazan V. POLE, POLD1, and NTHL1: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. *Oncogene*. 2021;40(40):5893–5901 doi:10.1038/s41388-021-01984-2.
 16. Rayner E, van Gool IC, Palles C, Kearsley SE, Bosse T, Tomlinson I, Church DN. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):71–81 doi:10.1038/nrc.2015.12.
 17. Fabrizio DA, George TJ, Dunne RF, Frampton G, Sun J, Gowen K, Kennedy M, Greenbowe J, Schrock AB, Hezel AF, et al. Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition. *J Gastrointest Oncol*. 2018;9(4):610–17
doi:10.21037/jgo.2018.05.06.
 18. Jardim DL, Goodman A, Melo Gagliato D de, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021;39(2):154–73
doi:10.1016/j.ccell.2020.10.001.
 19. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, Kemp Z, Spain SL, Guarino E, Guarino Almeida E, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013;45(2):136–44 doi:10.1038/ng.2503.
 20. Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol*. 2013;230(2):148–53 doi:10.1002/path.4185.
 21. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*. 2021;326(9):851–62 doi:10.1001/jama.2021.13027.
 22. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(4):547–60 doi:10.1016/j.path.2016.05.003.

23. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7–33 doi:10.3322/caac.21654.
24. Del Chiaro M, Segersvärd R, Lohr M, Verbeke C. Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today? *WJG.* 2014;20(34):12118–31 doi:10.3748/wjg.v20.i34.12118.
25. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, La Fouchardière C de, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1817–25 doi:10.1056/NEJMoa1011923.
26. Schizas D, Charalampakis N, Kole C, Economopoulou P, Koustas E, Gkotsis E, Ziogas D, Psyrris A, Karamouzis MV. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. *Cancer Treat Rev.* 2020;86:102016 doi:10.1016/j.ctrv.2020.102016.
27. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, Negri E, Li D, Risch HA, Olson SH, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol.* 2012;23(7):1880–88 doi:10.1093/annonc/mdr541.
28. Sung H, Siegel RL, Rosenberg PS, Jemal A. Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. *The Lancet Public Health.* 2019;4(3):e137-e147 doi:10.1016/S2468-2667(18)30267-6.
29. Wang Y-T, Gou Y-W, Jin W-W, Xiao M, Fang H-Y. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer.* 2016;16:212 doi:10.1186/s12885-016-2241-1.
30. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, English DR, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giles GG, et al. Alcohol Intake and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis of Fourteen Cohort Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):765–76 doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0880.
31. Kirkegård J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2017;112(9):1366–72 doi:10.1038/ajg.2017.218.
32. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *WJG.* 2016;22(44):9694 doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694.

33. Hu C, LaDuca H, Shimelis H, Polley EC, Lilyquist J, Hart SN, Na J, Thomas A, Lee KY, Davis BT, et al. Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precision Oncology*. 2018(2):1–28 doi:10.1200/PO.17.00291.
34. Hu ZI, Hellmann MD, Wolchok JD, Vyas M, Shia J, Stadler ZK, Diaz LA, O'Reilly EM. Acquired resistance to immunotherapy in MMR-D pancreatic cancer. *J. immunotherapy cancer*. 2018;6(1) doi:10.1186/s40425-018-0448-1.
35. Han J, Khatwani N, Searles TG, Turk MJ, Angeles CV. Memory CD8+ T cell responses to cancer. *Semin Immunol*. 2020;49:101435 doi:10.1016/j.smim.2020.101435.
36. Dimeloe S, Burgener A-V, Grählert J, Hess C. T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology*. 2017;150(1):35–44 doi:10.1111/imm.12655.
37. Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8+ and CD4+ T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;341:63–124 doi:10.1016/bs.ircmb.2018.05.007.
38. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol*. 2005;175(9):6169–76 doi:10.4049/jimmunol.175.9.6169.
39. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708–12 doi:10.1038/44385.
40. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*. 1999;99(1):23–33 doi:10.1016/s0092-8674(00)80059-8.
41. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001;357(9270):1777–89 doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
42. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745–63 doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.

Literaturverzeichnis

43. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):24–35 doi:10.1038/nri3567.
44. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011;17(10):1290–97 doi:10.1038/nm.2446.
45. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(10):671–84 doi:10.1038/nrc3322.
46. Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell.* 2011;145(6):851–62 doi:10.1016/j.cell.2011.05.033.
47. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J Immunother.* 2012;35(9):651–60 doi:10.1097/CJI.0b013e31827806e6.
48. Stewart A, Ng JC-F, Wallis G, Tsioligka V, Fraternali F, Dunn-Walters DK. Single-Cell Transcriptomic Analyses Define Distinct Peripheral B Cell Subsets and Discrete Development Pathways. *Front Immunol.* 2021;12:602539 doi:10.3389/fimmu.2021.602539.
49. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells. *Leukemia.* 2016;30(12):2283–92 doi:10.1038/leu.2016.226.
50. B cells (human) | MACS Handbook | Resources | Miltenyi Biotec | USA [Internet] [cited 2023 May 23]. Available from: https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/macshandbook/human-cells-and-organs/human-cell-types/b-cells-human.html?queryContent=facet.filter.Content_type%3DMACS%2BHandbook.
51. Jacquot S. CD27/CD70 Interactions Regulate T Dependent B Cell Differentiation. *IR.* 2000;21(1):23–30 doi:10.1385/IR:21:1:23.
52. Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney JF. Blood Dendritic Cells Interact with Splenic Marginal Zone B Cells to Initiate T-Independent Immune Responses. *Immunity.* 2002;17(3):341–52 doi:10.1016/s1074-7613(02)00389-8.
53. Quách TD, Rodríguez-Zhurbenko N, Hopkins TJ, Guo X, Hernández AM, Li W, Rothstein TL. Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. *J Immunol.* 2016;196(3):1060–69 doi:10.4049/jimmunol.1501843.

54. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997;388(6638):133–34 doi:10.1038/40540.
55. Sharonov GV, Serebrovskaya EO, Yuzhakova DV, Britanova OV, Chudakov DM. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):294–307 doi:10.1038/s41577-019-0257-x.
56. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011;12(6):478–84 doi:10.1038/ni.2018.
57. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2021;12:636568 doi:10.3389/fimmu.2021.636568.
58. Zangemeister-Wittke U, Kyewski B, Schirmacher V. Recruitment and activation of tumor-specific immune T cells in situ. CD8+ cells predominate the secondary response in sponge matrices and exert both delayed-type hypersensitivity-like and cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol*. 1989;143(1):379–85.
59. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Trans. L. Seidler. 9th ed. Berlin, Germany: Springer Spektrum; 2018.
60. Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell–B-cell interactions. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2004;30(1):175–91 doi:10.1016/S0889-857X(03)00111-X.
61. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*. 2019;177(3):524–40 doi:10.1016/j.cell.2019.03.016.
62. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116–26 doi:10.1038/nri727.
63. Bretscher P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunology Today*. 1992;13(2):74–76 doi:10.1016/0167-5699(92)90138-W.
64. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, Kawakami E, Yamashita K, Suzuki K, Okada T, et al. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity*. 2018;48(4):702-715.e4 doi:10.1016/j.immuni.2018.03.027.
65. Ahmad Mir M, Albaradie RS, Alharbi ARO. *Costimulation immunotherapy for autoimmunity, transplantation and lymphomas*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc; 2014.

66. Hodgkin PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J Exp Med*. 1996;184(1):277–81 doi:10.1084/jem.184.1.277.
67. Tangye SG, Ferguson A, Avery DT, Ma CS, Hodgkin PD. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol*. 2002;169(8):4298–4306 doi:10.4049/jimmunol.169.8.4298.
68. Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J*. 1998;11(4):949–57 doi:10.1183/09031936.98.11040949.
69. Dubey C, Croft M, Swain SL. Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol*. 1995;155(1):45–57.
70. Ranheim EA, Kipps TJ. Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell Immunol*. 1995;161(2):226–35 doi:10.1006/cimm.1995.1031.
71. Zaretsky I, Atrakchi O, Mazor RD, Stoler-Barak L, Biram A, Feigelson SW, Gitlin AD, Engelhardt B, Shulman Z. ICAMs support B cell interactions with T follicular helper cells and promote clonal selection. *J Exp Med*. 2017;214(11):3435–48 doi:10.1084/jem.20171129.
72. Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):119–24 doi:10.1309/X5VV6FKJQ6MUBLPX.
73. Megyola C, Ye J, Bhaduri-McIntosh S. Identification of a sub-population of B cells that proliferates after infection with Epstein-Barr virus. *Virology*. 2011;8:84.
74. Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA, Tyler X, Mayne K, Gatter KC, Mason DY. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol*. 1994;47(2):143–47 doi:10.1136/jcp.47.2.143.
75. Shklovskaya E, Rizos H. MHC Class I Deficiency in Solid Tumors and Therapeutic Strategies to Overcome It. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13) doi:10.3390/ijms22136741.
76. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C, Chang H, Lovitch SB, Horak C, Weber JS, et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med*. 2018;10(450) doi:10.1126/scitranslmed.aar3342.

77. Gide TN, Quek C, Menzies AM, Tasker AT, Shang P, Holst J, Madore J, Lim SY, Velickovic R, Wongchenko M, et al. Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell*. 2019;35(2):238-255.e6 doi:10.1016/j.ccell.2019.01.003.
78. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23–34 doi:10.1056/NEJMoa1504030.
79. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, Tata P, Gupta S, Zilliox MJ, Nakaya HI, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol*. 2011;186(7):4200–4212 doi:10.4049/jimmunol.1001783.
80. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–67 doi:10.1038/nature14011.
81. Mukherji R, Debnath D, Hartley ML, Noel MS. The Role of Immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Curr Oncol*. 2022;29(10):6864–92 doi:10.3390/curroncol29100541.
82. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34 doi:10.1186/s13073-017-0424-2.
83. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, Lopez-Yurda M, Grootsholten C, Beets GL, Snaebjornsson P, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med*. 2020;26(4):566–76 doi:10.1038/s41591-020-0805-8.
84. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):54 doi:10.1186/s13045-019-0738-1.
85. Yu Y, Zhang J, Ni L, Zhu Y, Yu H, Teng Y, Lin L, Xue Z, Xue X, Shen X, et al. Neoantigen-reactive T cells exhibit effective anti-tumor activity against colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(1):1–11 doi:10.1080/21645515.2021.1891814.

86. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:173–200 doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053402.
87. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348(6230):124–28 doi:10.1126/science.aaa1348.
88. Timmermann B, Kerick M, Roehr C, Fischer A, Isau M, Boerno ST, Wunderlich A, Barmeyer C, Seemann P, Koenig J, et al. Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PLoS One.* 2010;5(12):e15661 doi:10.1371/journal.pone.0015661.
89. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509–20 doi:10.1056/NEJMoa1500596.
90. Jiang X, Xu J, Liu M, Xing H, Wang Z, Huang L, Mellor AL, Wang W, Wu S. Adoptive CD8+ T cell therapy against cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Lett.* 2019;462:23–32 doi:10.1016/j.canlet.2019.07.017.
91. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002;298(5594):850–54 doi:10.1126/science.1076514.
92. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4550–57 doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
93. Busch DH, Fräßle SP, Sommermeyer D, Buchholz VR, Riddell SR. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Semin Immunol.* 2016;28(1):28–34 doi:10.1016/j.smim.2016.02.001.
94. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, Yao J. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol.* 2022;13:816005 doi:10.3389/fimmu.2022.816005.

95. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16168–73 doi:10.1073/pnas.242600099.
96. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, Wunderlich JR, Mixon A, Farid S, Dudley ME, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2246–59 doi:10.1172/JCI73639.
97. Powell DJ, Dudley ME, Robbins PF, Rosenberg SA. Transition of late-stage effector T cells to CD27⁺ CD28⁺ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood*. 2005;105(1):241–50 doi:10.1182/blood-2004-06-2482.
98. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, Drexler I, Höfer T, Riddell SR, Busch DH. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity*. 2014;41(1):116–26 doi:10.1016/j.immuni.2014.05.018.
99. Berger C, Jensen MC, Lansdorf PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008;118(1):294–305 doi:10.1172/JCI32103.
100. Klebanoff CA, Scott CD, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Cruz AC, Ouyang C, Ramaswamy M, Roychoudhuri R, Ji Y, Eil RL, et al. Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J Clin Invest*. 2016;126(1):318–34 doi:10.1172/JCI81217.
101. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*. 2003;26(4):332–42 doi:10.1097/00002371-200307000-00005.
102. Liu S, Etto T, Rodríguez-Cruz T, Li Y, Wu C, Fulbright OJ, Hwu P, Radvanyi L, Lizée G. TGF-β1 induces preferential rapid expansion and persistence of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2010;33(4):371–81 doi:10.1097/CJI.0b013e3181cd1180.
103. Yee C, Thompson JA, Roche P, Byrd DR, Lee PP, Piepkorn M, Kenyon K, Davis MM, Riddell SR, Greenberg PD. Melanocyte destruction after antigen-specific

- immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med.* 2000;192(11):1637–44 doi:10.1084/jem.192.11.1637.
104. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol.* 2007;34(6):524–31 doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.002.
105. Zachova K, Kosztyu P, Zadrazil J, Matousovic K, Vondrak K, Hubacek P, Kostovcikova K, Tlaskalova Hogenova H, Mestecky J, Raska M. Multiparametric flow cytometry analysis of peripheral blood B cell trafficking differences among Epstein-Barr virus infected and uninfected subpopulations. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2020;164(3):247–54 doi:10.5507/bp.2019.052.
106. Klein G, Klein E, Kashuba E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(1):67–73 doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.146.
107. Gerper P, Whang-Peng J, Monroe JH. Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;63(3):740–47 doi:10.1073/pnas.63.3.740.
108. Pope JH, Horne MK, Scott W. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer.* 1968;3(6):857–66 doi:10.1002/ijc.2910030619.
109. Mullins CS, Micheel B, Matschos S, Leuchter M, Bürtin F, Krohn M, Hühns M, Klar E, Prall F, Linnebacher M. Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research. *Cancers (Basel).* 2019;11(10) doi:10.3390/cancers11101520.
110. Shang Y, Zhang X, Lu L, Jiang K, Krohn M, Matschos S, Mullins CS, Vollmar B, Zechner D, Gong P, et al. Pharmaceutical immunoglobulin G impairs anti-carcinoma activity of oxaliplatin in colon cancer cells. *Br J Cancer.* 2021;124(8):1411–20 doi:10.1038/s41416-021-01272-6.
111. Mitchell DM, Ravkov EV, Williams MA. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol.* 2010;184(12):6719–30 doi:10.4049/jimmunol.0904089.
112. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 2014;192(12):5451–58 doi:10.4049/jimmunol.1490019.

113. Abbas AK, Trotta E, R Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*. 2018;3(25) doi:10.1126/sciimmunol.aat1482.
114. Eerkens AL, Vledder A, van Rooij N, Foijer F, Nijman HW, Bruyn M de. Rapid and efficient generation of antigen-specific isogenic T cells from cryopreserved blood samples. *Immunol Cell Biol*. 2022;100(4):285–95 doi:10.1111/imcb.12538.
115. Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(3) doi:10.1101/cshperspect.a028480.
116. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15–22 doi:10.1016/j.jim.2004.08.008.
117. PE anti-human CD107a LAMP-1 Antibody anti-CD107a - H4A3. Available from: [https://www.biolegend.com/en-us/products/pe-anti-human-cd107a-lamp-1-antibody-4967?pdf=true&displayInline=true&leftRightMargin=15&topBottomMargin=15&filename=PE%20anti-human%20CD107a%20\(LAMP-1\)%20Antibody.pdf&v=20220826123057](https://www.biolegend.com/en-us/products/pe-anti-human-cd107a-lamp-1-antibody-4967?pdf=true&displayInline=true&leftRightMargin=15&topBottomMargin=15&filename=PE%20anti-human%20CD107a%20(LAMP-1)%20Antibody.pdf&v=20220826123057).
118. Xu H, Wang N, Cao W, Huang L, Zhou J, Sheng L. Influence of various medium environment to in vitro human T cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018;54(8):559–66 doi:10.1007/s11626-018-0273-3.
119. Kanani A, Veen T, Søreide K. Neoadjuvant immunotherapy in primary and metastatic colorectal cancer. *Br J Surg*. 2021;108(12):1417–25 doi:10.1093/bjs/znab342.
120. Juat DJ, Hachey SJ, Billimek J, Del Rosario MP, Nelson EL, Hughes CCW, Zell JA. Adoptive T-Cell Therapy in Advanced Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Oncologist*. 2022;27(3):210–19 doi:10.1093/oncolo/oyab038.
121. Moretta A, Ciccone E, Pantaleo G, Tambussi G, Bottino C, Melioli G, Mingari MC, Moretta L. Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunol Rev*. 1989;111:145–75 doi:10.1111/j.1600-065x.1989.tb00545.x.
122. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397(6716):263–66 doi:10.1038/16717.

123. Satoh T, Kayano H, Takahashi N, Tsukasaki K, Yasuda M. Diagnostic utility of the aberrant immunohistochemical expression of CD3 molecules for peripheral T-cell lymphomas. *Ann Diagn Pathol.* 2022;60:152013
doi:10.1016/j.anndiagpath.2022.152013.
124. Schad SE, Chow A, Mangarin L, Pan H, Zhang J, Ceglia N, Caushi JX, Malandro N, Zappasodi R, Gigoux M, et al. Tumor-induced double positive T cells display distinct lineage commitment mechanisms and functions. *J Exp Med.* 2022;219(6)
doi:10.1084/jem.20212169.
125. Menard LC, Fischer P, Kakrecha B, Linsley PS, Wambre E, Liu MC, Rust BJ, Lee D, Penhallow B, Manjarrez Orduno N, et al. Renal Cell Carcinoma (RCC) Tumors Display Large Expansion of Double Positive (DP) CD4+CD8+ T Cells With Expression of Exhaustion Markers. *Front Immunol.* 2018;9:2728 doi:10.3389/fimmu.2018.02728.
126. Overgaard NH, Jung J-W, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):31–38
doi:10.1189/jlb.1RU0814-382.
127. Rosenberg SA, Yang JC, Robbins PF, Wunderlich JR, Hwu P, Sherry RM, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Restifo NP, Filie A, et al. Cell transfer therapy for cancer: lessons from sequential treatments of a patient with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2003;26(5):385–93 doi:10.1097/00002371-200309000-00001.
128. Klebanoff CA, Gattinoni L, Palmer DC, Muranski P, Ji Y, Hinrichs CS, Borman ZA, Kerkar SP, Scott CD, Finkelstein SE, et al. Determinants of successful CD8+ T-cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5343–52 doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0503.
129. Tietze JK, Angelova D, Heppt MV, Reinholz M, Murphy WJ, Spannagl M, Ruzicka T, Berking C. The proportion of circulating CD45RO+CD8+ memory T cells is correlated with clinical response in melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer.* 2017;75:268–79 doi:10.1016/j.ejca.2016.12.031.
130. Rasmussen A-M, Borelli G, Hoel HJ, Lislud K, Gaudernack G, Kvalheim G, Aarvak T. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. *J Immunol Methods.* 2010;355(1-2):52–60 doi:10.1016/j.jim.2010.02.004.

131. Martkamchan S, Onlamoon N, Wang S, Pattanapanyasat K, Ammaranond P. The Effects of Anti-CD3/CD28 Coated Beads and IL-2 on Expanded T Cell for Immunotherapy. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(5):821–28 doi:10.17219/acem/35771.
132. Miltenyi Tc Expansion Kit.
133. T Cell TransAct™, human | Polyclonal stimulation | Stimulation reagents | MACS Cell Culture and Stimulation | Products and services | Deutschland [Internet] [cited 2023 Jul 21]. Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/t-cell-transact-human.html#130-111-160>.
134. Dynabeads™ humaner T-Activator CD3/CD28 zur Expansion und Aktivierung von T-Zellen [Internet] [cited 2023 Jul 21]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11161D>.
135. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol*. 2016;37(3):193–207 doi:10.1016/j.it.2016.01.002.
136. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X. Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022;21(1):104 doi:10.1186/s12943-022-01569-x.
137. Shi J, Hou S, Fang Q, Liu X, Liu X, Qi H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity*. 2018;49(2):264-274.e4 doi:10.1016/j.immuni.2018.06.012.
138. Verdegaal EME, Miranda NFCC de, Visser M, Harryvan T, van Buuren MM, Andersen RS, Hadrup SR, van der Minne CE, Schotte R, Spits H, et al. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature*. 2016;536(7614):91–95 doi:10.1038/nature18945.
139. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7556–61 doi:10.1073/pnas.95.13.7556.
140. Henderson E, Miller G, Robinson J, Heston L. Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Virology*. 1977;76(1):152–63 doi:10.1016/0042-6822(77)90292-6.
141. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho H-M, Newman CL, Shin S-U, Nechustan H, Challita-Eid PM, Segal BM, Yi KH, et al. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B

- cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer*. 2005;117(4):574–86 doi:10.1002/ijc.21177.
142. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129–40 doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009.
143. UPHOFF CC, DREXLER HG. COMPARATIVE PCR ANALYSIS FOR DETECTION OF MYCOPLASMA INFECTIONS IN CONTINUOUS CELL LINES. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2002;38(2):79 doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2.
144. Zhang S, Tsai S, Wu TT, Li B, Shih JW-K, Lo S-C. Mycoplasma fermentans infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture. *Blood*. 2004;104(13):4252–59 doi:10.1182/blood-2004-04-1245.
145. Naot Y. In vitro studies on the mitogenic activity of mycoplasmal species toward lymphocytes. *Rev Infect Dis*. 1982;4 Suppl:S205-9 doi:10.1093/clinids/4.supplement_1.s205.
146. Biberfeld G. Activation of human lymphocyte subpopulations by Mycoplasma pneumoniae. *Scand J Immunol*. 1977;6(11):1145–50 doi:10.1111/j.1365-3083.1977.tb00353.x.
147. Simecka JW, Ross SE, Cassell GH, Davis JK. Interactions of mycoplasmas with B cells: antibody production and nonspecific effects. *Clin Infect Dis*. 1993;17 Suppl 1:S176-82 doi:10.1093/clinids/17.supplement_1.s176.
148. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2207–18 doi:10.1056/NEJMoa2017699.