

Aus dem Institut für Klinische Hämostaseologie  
und Transfusionsmedizin,  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Eichler

**Validierung der Herstellung und Qualitätsprüfung autologer dendritischer  
Zellen für die adjuvante Immuntherapie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2015

vorgelegt von: Dorothee Luise Hartmann  
geb. am: 04. Juli 1990 in Erbach (Odenw)

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1) Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1.1) Zusammenfassung .....	1
1.2) Abstract .....	2
<b>2) Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1) Bösartige Neoplasien des zentralen Nervensystems .....	3
2.1.1) WHO-Klassifikation primärer Hirntumore .....	3
2.1.2) Höhergradig-maligne Gliome .....	3
2.2) Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs)) .....	4
2.2.1) Somatische Zelltherapeutika .....	4
2.3) Immuntherapie maligner Neoplasien .....	5
2.3.1) Somatische Zelltherapie maligner Neoplasien .....	5
2.4) Dendritische Zellen .....	6
2.4.2) Herstellungsmöglichkeiten humaner dendritischer Zellen .....	7
2.4.3) Anwendungsmöglichkeiten dendritischer Zellen .....	7
2.5) Ziele der Arbeit .....	8
<b>3) Material und Methodik .....</b>	<b>10</b>
3.1) Materialien und Geräte .....	10
3.1.1) Reagenzien .....	10
3.1.2) Puffer und Lösungen .....	12
3.1.3) Geräte .....	14
3.1.4) Verbrauchsmaterial .....	16
3.1.5) Humanes Probenmaterial .....	17
3.1.5.1) Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) .....	17
3.1.5.2) Differenzierung der DZs aus PBMCs .....	18
3.1.5.3) Tumorgewebe .....	18
3.1.6) Zellkulturmedien – Labormaßstab .....	19

3.1.7)	Antikörper .....	19
3.1.7.1)	Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometer .....	19
3.1.7.2)	Antikörper zur Analyse mittels Western Blot .....	20
3.1.8)	Zytokine und Chemokine .....	20
3.1.9)	PCR-Primer .....	23
3.2)	Methodik .....	24
3.2.1)	Arbeiten mit humanen Zell- und Gewebeproben .....	24
3.2.2)	Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	25
3.2.2.1)	Neubauer-Zählkammer .....	26
3.2.2.2)	CASY TTC-150 .....	26
3.2.2.3)	MoxiZ .....	26
3.2.2.4)	Sysmex KX-21N .....	27
3.2.2.5)	TruCount-Single Platform Methode mit FACSCalibur .....	27
3.2.3)	Chargenkontrolle der Zytokine .....	30
3.2.4)	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der dendritischen Zellen .....	32
3.2.5)	Bio-Assay zur Chargenkontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung .....	34
3.2.6)	Herstellung von vollständig avitalisiertem Tumorlysat (TL) .....	36
3.2.7)	Proteingehaltbestimmung des Tumorlysates .....	37
3.2.8)	Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates .....	38
3.2.8.1)	Trypanblau-Färbung des Tumorlysates und Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer .....	38
3.2.8.2)	ATP-Assay .....	38
3.2.8.3)	Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150 .....	39
3.2.8.4)	Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3 .....	39
3.2.9)	Migrations-Assay .....	40
3.2.10)	Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen .....	41
3.2.11)	Analyse der Aufnahm von FITC-markiertem Tumorlysat durch die dendritischen Zellen .....	43
3.2.12)	PCR-Analyse der Expression von Interferon- $\gamma$ in CD8-positiven T-Zellen .....	44

3.2.12.1)	Test der Primer und Optimierung der PCR-Bedingungen .....	45
3.2.12.2)	RNA-Isolation und Reverse Transkription .....	47
3.2.12.3)	Quantitative Real-Time PCR .....	49
<b>4)</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
4.1)	Validierung von Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	51
4.1.1)	Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen .....	51
4.1.1.1)	Reproduzierbarkeit der Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen .....	51
4.1.1.2)	Präzision der Zellzahlbestimmung der PBMC-Kulturen .....	52
4.1.2)	Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen .....	53
4.1.2.1)	Reproduzierbarkeit der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen .....	53
4.1.2.2)	Präzision der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen .....	54
4.1.3)	Vitalitätsbestimmung der Zellkulturen .....	55
4.1.3.1)	Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen .....	55
4.1.3.2)	Präzision der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen .....	56
4.1.3.3)	Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen .....	57
4.1.3.4)	Präzision der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen .....	58
4.2)	Chargenkontrolle Zytokine .....	59
4.3)	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der dendritischen Zellen ....	61
4.4)	Bio-Assay zur Qualitätskontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung .....	64
4.5)	Proteingehaltbestimmung des Tumorlysates .....	66
4.6)	Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates .....	66
4.6.1)	Trypanblau-Färbung des Tumorlysates .....	66
4.6.2)	ATP-Assay zur Validierung des Avitalitätsnachweises des Tumorlysates mittels Trypanblau-Färbung .....	69
4.6.3)	Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150 .....	70
4.6.4)	Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3 .....	70
4.7)	Migrations-Assay .....	71
4.8)	Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen .....	72

4.9)	Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem Tumorlysat durch die dendritischen Zellen .....	73
4.10)	PCR-Analyse der Expression von Interferon- $\gamma$ in CD8-positiven T-Zellen .....	74
4.10.1)	Test der Primer und Optimierung der PCR-Bedingungen .....	74
4.10.2)	Quantitative Real-Time PCR .....	76
<b>5)</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
5.1)	Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	79
5.2)	Wareneingangskontrolle Zytokine .....	80
5.3)	Durchflusszytometrische Immunphäotypisierung der dendritischen Zellen .....	81
5.4)	Bio-Assay zur Qualitätskontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung .....	83
5.5)	Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates .....	85
5.6)	Migrations-Assay .....	87
5.7)	Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen .....	88
5.8)	Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem Tumorlysat durch die dendritischen Zellen .....	89
5.9)	qRT-PCR-Analyse der Expression von Interferon- $\gamma$ in CD8-positiven T-Zellen ....	90
<b>6)</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
<b>7)</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
<b>8)</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>9)</b>	<b>Anlagen</b> .....	<b>108</b>
<b>10)</b>	<b>Publikationen / Danksagung</b> .....	<b>115</b>
<b>11)</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
Acc	Acceleration (Beschleunigung)
AMG	Arzneimittelgesetz
AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
APC	Allophycocyanin
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BMG	Bundesministerium für Gesundheit und Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokin Ligand (C-C Subfamilie)
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CE-Diameter	Durchmesser des flächengleichen Kreises
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Cycle Threshold (deutsch: Schwellenwert-Zyklus)
cTL	vollständig avitalisiertes Tumorlysat
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
Dec	Deceleration (Abbremsung))
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EMA	European Medicines Agency

EU	Europäische Union
f	forward Primer
FACS	FACS Calibur (Durchflusszytometer)
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht
g	relative centrifugal force (relative Zentripetalbeschleunigung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Faktor
Gy	Gray
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz- Virus
HLA	Human leucocyte antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
HSA	Humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
LRSC	Leukozyten-Reduktionskammer
ITC	unbearbeitetes Tumorlysat
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline

PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
Poly (I:C)	Polyinosinic-polycytidylicacid
pTL	unvollständig avitalisiertes Tumorlysat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	Region
r	reverse Primer
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCID-X1	X-linked severe combined immunodeficiency
sek	Sekunde
sog.	sogenannt
SPF	Single Platform Methode
SSC	Seitwärts-Streulicht
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TL	Tumorlysat
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
U	Units
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
V	Volt
VarK	Variationskoeffizient (%)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem



# 1) Zusammenfassung

## 1.1) Zusammenfassung

Am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes wurde 2012 ein Forschungsprojekt initiiert, um die Herstellungserlaubnis für dendritische Zellen zur adjuvanten Immuntherapie von höhergradigen Gliomen zu erlangen.

Gliome sind die häufigsten primären Hirntumore, wobei die höhergradig-malignen Glioblastome unter diesen den größten Anteil ausmachen. Die Standardtherapie dieser Tumorentität ist die Kombination aus Operation und Radiochemotherapie. Unter dieser Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit der Patienten bei 14,6 Monaten. Auf Grund der nicht zufriedenstellenden Therapieergebnisse beschäftigen sich viele Studien mit alternativen Therapiemöglichkeiten, unter anderem auch mit Arzneimitteln für neuartige Therapien. Zu diesen zählen auch somatische Zelltherapeutika, wie beispielsweise dendritische Zellen zur adjuvanten Immuntherapie.

Um somatische Zelltherapeutika zur Anwendung am Patienten herstellen zu dürfen, muss dem herstellenden Labor durch die zuständige Landesaufsichtsbehörde eine Herstellungserlaubnis erteilt werden. Diese Herstellungserlaubnis wird beim saarländischen Ministerium für Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie beantragt und durch dieses erteilt. Zuvor müssen zahlreiche Verfahrensschritte im Herstellungsprozess etabliert sowie validiert werden und Funktionstests mit den generierten dendritischen Zellen durchgeführt werden. Alle hierbei gewonnenen Ergebnisse werden in Form eines Validierungsberichtes der zuständigen Behörde vorgelegt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Etablierung und Validierung unterschiedlicher Methoden zur Erlangung der Herstellungserlaubnis beizutragen. Hierzu wurden verschiedenste Untersuchungen an Proben der DZ-Kulturen durchgeführt, die sowohl Sicherheit als auch Qualität des Herstellungsprozesses und des zellulären Produktes gewährleisten sollen.

## 1.2) Abstract

In 2012 the Institute for Clinical Hemostaseology and Transfusion Medicine of the University of the Saarland started a research project to obtain the permission for the manufacturing of dendritic cells for adjuvant immunotherapy of malignant glioma.

Gliomas are the most frequent primary brain tumors and the high-grade glioblastomas account for the largest part of these. The standard course of therapy for high-grade glioblastoma is the combination of operation, radio- and chemotherapy. Under this therapy the mean survival time for a patient amounts to 14,6 month. Due to these poor treatment outcomes, many studies are concerned with alternative therapy approaches for this tumor entity, as for example with Advanced Therapy Medical Products. These also include somatic cell based therapeutics, such as dendritic cells for adjuvant immunotherapy.

To be authorized to produce somatic cell based therapeutics for human use the producer has to obtain the permission of manufacturing. This permission is applied at the Ministry for Social Affairs, Health Care, Women and Family of the Saarland. To obtain this permission, numerous procedural steps have to be proved as well as established and performance tests have to be carried out with the manufactured dendritic cells. All results gained at this were submitted to the competent authority in form of a validation report.

The object of this research was to contribute to the obtainment of permission for the manufacturing by validation and establishment of different methods. For this purpose different investigations on the dendritic cells were carried out to prove quality and safety of the manufacturing process as well as the manufactured product.

## 2) Einleitung

### 2.1) Bösartige Neoplasien des zentralen Nervensystems

Die bösartigen Neoplasien des zentralen Nervensystems, allen voran die hochgradig malignen Gliome, stellen Tumoren dar, für die es bisher keine zufriedenstellenden Therapiestrategien gibt.

Deutschlandweit machen sie insgesamt ca. 1,5% aller Krebsneuerkrankungen und 2,6% aller Krebssterbefälle aus (Robert Koch-Institut 2012), bei den unter 15-Jährigen sind sie die zweithäufigste durch bösartige Neoplasien bedingte Todesursache (Kaatsch et al. 2012).

#### 2.1.1) WHO-Klassifikation primärer Hirntumore

Nach der WHO-Klassifikation werden die primären Hirntumore nach histologischen Kriterien (morphologische, histogenetische und immunhistochemische Kriterien) und davon ausgehend nach ihrer Malignität eingeteilt (Schlegel 2012). Zur Einteilung der Malignität gibt es vier Grade, wobei WHO-Grad I differenzierte Tumoren mit niedriger Wachstumstendenz, WHO-Grad II noch benigne Tumoren, WHO-Grad III maligne Tumoren und WHO-Grad IV hochmaligne und entdifferenzierte Tumoren darstellen (Schlegel 2012). Die Prognosen der unterschiedlichen Tumoren lassen sich grob anhand der WHO-Grade abschätzen, wobei diese umso schlechter sind, je höher der WHO-Grad ist (mittlere Überlebenszeit nach Diagnose für WHO-Grad II 5 Jahre, für WHO Grad IV unter einem Jahr) (Louis et al. 2007).

#### 2.1.2) Höhergradig-maligne Gliome

Die häufigsten primären Hirntumoren sind Gliome, wobei wiederum unter diesen die Glioblastome (WHO-Grad IV) den größten Anteil ausmachen (Schlegel 2012). Für das Glioblastom gibt die Deutsche Gesellschaft für Neurologie in ihrer Leitlinie die Standardtherapie aus einer Kombination von operativer Tumorresektion und adjuvanter Radiochemotherapie mit Temozolomid an (Weller 2012). Unter dieser Therapie liegt die mittlere Überlebenszeit von Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme erkranken, bei 14,6 Monaten (Stupp et al. 2009). Im Falle eines Rezidivs sind erneute Operation, Bestrahlung sowie eine erneute Chemotherapie möglich (Schlegel 2012).

Vergleicht man diese Prognose für Patienten mit der Erstdiagnose Glioblastom mit Daten aus den Jahren 1973-1991, in denen Patienten im Alter von 21-64 Jahren im Mittel noch 10,8

Monate nach Diagnose überlebten (Davis et al. 1998) zeigt sich, dass sich in einem Zeitraum von 20 Jahren die Prognose von Glioblastom-Patienten nur wenig verbessert hat. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit zur Erforschung und Etablierung neuer Therapiestrategien zur Behandlung höhergradig-maligner Gliome. Eine Option stellen hierbei die Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs)) dar.

## 2.2) Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs))

Zur Gruppe der ATMPs zählen Gentherapeutika, somatische Zelltherapeutika und biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte (Richtlinie 2001/83/EG; Verordnung (EG) Nr. 1394/2007). Unter kombinierten ATMPs versteht man die Kombination eines ATMPs mit einem oder mehreren Medizinprodukten (Richtlinie 2001/83/EG; Verordnung (EG) Nr. 1394/2007).

Mögliche Einsatzgebiete für Gentherapeutika sind beispielweise maligne Tumoren, X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) oder auch familiäre Stoffwechselerkrankungen (Wirth et al. 2010). Biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte lassen sich unter anderem im Bereich Knorpelregeneration (LeBaron et al. 2000), Muskelregeneration (Yan et al. 2007), oder auch Hautregeneration (Green et al. 1979) einsetzen. Für die somatischen Zelltherapeutika sind Morbus Parkinson (Kim et al. 2006) oder auch bösartige Neoplasien (Disis et al. 2014) potenzielle Anwendungsgebiete.

### 2.2.1) Somatische Zelltherapeutika

Gemäß der Richtlinien der EU ist unter somatischer Zelltherapie „die Verwendung von autologen, allogenen oder xenogenen lebenden Körperzellen am Menschen zu verstehen, deren biologische Eigenschaften durch eine Bearbeitung derart verändert wurden, dass auf metabolischem, pharmakologischem und immunologischem Weg eine therapeutische, diagnostische oder präventive Wirkung erzielt wird“ (Richtlinie 2001/83/EG).

Als „biotechnologisch bearbeitet“ gelten Zellen, wenn sie wenigstens eine der folgenden Bedingungen erfüllen:

Die Zellen oder Gewebe wurden substantiell bearbeitet, so dass sie biologische Merkmale, physiologische Funktionen oder strukturelle Eigenschaftenerfüllen, die für die beabsichtigte Regeneration, Wiederherstellung oder den Ersatz relevant sind.

Die Zellen oder Gewebe sind nicht dazu bestimmt, im Empfänger im Wesentlichen dieselbe(n) Funktion(en) auszuüben wie im Spender (Verordnung 1394/2007/EG).

## 2.3) Immuntherapie maligner Neoplasien

Die unterschiedlichen Ansätze zur Immuntherapie maligner Neoplasien, wie die Stimulation des Immunsystems mittels Interferonen oder auch der Einsatz von spezifischen Antikörpern zielen darauf ab, eine Immunreaktion gegen die Neoplasie zu induzieren.

Ohne Stimulation des Immunsystems durch Immuntherapien tritt eine solche Immunreaktion nicht oder nur teilweise auf. Grund hierfür sind die sogenannten Immun-Escape-Mechanismen maligner Tumorzellen. Diese hemmen die vollständige Elimination der Tumorzellen durch das Immunsystem.

Zu den Immune-Escape-Mechanismen zählen beispielsweise die verminderte oder durch Mutation veränderte Expression von MHC-I-Molekülen (Korkolopoulou et al. 1996), die Expression von immunsuppressiven Molekülen (Bodmer et al. 1989, Kidiyoor et al. 2014), die Induktion von regulatorischen T-Zellen (CD4+ und CD25+) (Kono et al. 2006), die Induktion der Apoptose aktiver T-Zellen durch die Tumorzellen (O'Connell et al. 1996) oder auch die Freisetzung von Oberflächen-Antigenen, durch welche Tumorzellen zytotoxische Zellen und spezifische Antikörper neutralisieren können (Alexander 1974).

Durch unspezifische Stimulation des Immunsystems mittels Pathogenen oder Zytokinen soll eine Immunreaktion gegen die Neoplasie hervorgerufen werden, welche ohne Stimulation mitunter auf Grund der Immune-Escape-Mechanismen nicht auftritt. Unter anderem wird hierzu Interferon-alpha eingesetzt (Jradi et al. 2012, Herold 2012, Ljungberget al. 2013).

Monoklonale Antikörper können zum einen durch ihre Bindung an Tumorzellen eine Elimination dieser Zellen durch das Immunsystem (EMA 2009) induzieren. Zum anderen können sie durch Bindung am Zielantigen eine pharmakologische Wirkung erzielen (EMA 2008).

Durch die Impfung mit Tumor-assoziierten-Antigenen soll eine Immunreaktion spezifisch gegen diese Antigene induziert werden (Schwartzentruber et al. 2011, Walter et al. 2013).

### 2.3.1) Somatische Zelltherapie maligner Neoplasien

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion einer immunologischen Reaktion gegen maligne Neoplasien stellen somatische Zelltherapeutika dar.

Das Ziel ist, durch die Applikation dieser Zellpopulationen ebenfalls eine Immunantwort des Empfänger-Immunsystems gegen die Neoplasie zu induzieren. Hierbei sollen die verwendeten Zellen direkt oder indirekt eine zytotoxische Immunreaktion gegen die Tumorzellen induzieren, ohne dass gesunde Körperzellen beeinträchtigt werden. Es gibt verschiedene Zellarten, die zur somatischen Zelltherapie maligner Neoplasien eingesetzt werden können bzw. deren Einsatz in Studien erprobt wird. Eingesetzt werden können T-Zellen (Rosenberg et al. 2011, Disis et al. 2014), natürliche Killer-Zellen (Ni et al. 2012), dendritische Zellen (DZ) oder auch Mischungen aus unterschiedlichen Zellen des Immunsystems (Sims 2012).

## 2.4) Dendritische Zellen

Im Mai 1973 beschrieb R.M. Steinman als Erster die dendritische Zelle als eine neuartige Zellpopulation. Er entdeckte sie bei mikroskopischen Untersuchungen von verschiedenen lymphatischen Organen von Mäusen (Steinman et al. 1973).

Die dendritischen Zellen bilden eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und liegen nahezu ubiquitär im Körper vor. Die Differenzierung der DZs kann sowohl aus myeloischen als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen erfolgen (Shortman et al. 2007).

Die klassische Vorstellung zur Funktion der DZs ist die Folgende:

Pathogene werden durch die DZs erkannt, phagozytiert und prozessiert, wobei die DZs nach Antigenaufnahme in die nächstgelegenen Lymphknoten migrieren. Hier präsentieren sie die prozessierten Antigene gekoppelt an major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle. Die im Lymphknoten vorliegenden naiven T-Zellen werden durch die DZ aktiviert, falls diese ein T-Zell-spezifisches Antigen präsentieren (Steinman 1991).

Die alleinige Bindung des T-Zell-Rezeptors an das mit Antigen beladene MHC-Molekül reicht für die Aktivierung nicht aus. Für die T-Zell-Aktivierung ist neben der Erkennung des Antigens noch ein zweites ko-stimulatorisches Signal nötig, das durch weitere Oberflächenmoleküle der DZ ausgelöst wird (Banchereau et al. 1998).

Die DZ macht im Zuge dieses Mechanismus einen Reifungsprozess durch, in dessen Folge Antigenaufnahme und -prozessierung herunter reguliert werden. Stattdessen werden Adhäsions- und Ko-stimulatorische Moleküle vermehrt gebildet (Cella et al. 1997). Diese

Reifungsschritte der DZs werden unter anderem durch Entzündungsfaktoren vermittelt (Cella et al. 1997).

Bleibt dieser Reifungsprozess aus, bzw. bindet eine T-Zelle an eine unreife DZ, so werden vermehrt regulatorische T-Zellen induziert oder T-Helferzellen aktiviert, bei den zytotoxischen T-Zellen wird entweder eine Anergie oder Apoptose induziert, was vermutlich der Vermittlung von immunologischer Toleranz gegenüber apathogenen Antigenen dient (Mahnke et al. 2002). Zudem spielen die DZs nach Ergebnissen unterschiedlicher Studien auch eine Rolle in der Aktivierung bzw. der Funktion von natürlichen Killerzellen (Fernandez et al. 1999) und auch von B-Zellen (Sornasse et al. 1992).

Dieses komplexe Aufgabenfeld der Vermittlung zwischen angeborener und erworbener Immunität und der Induktion von Immunreaktion oder Toleranz gegen verschiedene Antigene wird nicht durch eine homogene DZ-Gruppe erfüllt, sondern durch heterogene DZ-Subtypen. Sie unterscheiden sich in Lokalisation, Migrationsverhalten, Funktion und Entstehung (Shortman et al. 2007).

Auf Grund der Fähigkeit zur Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen Pathogene, werden dendritische Zellen in verschiedenen Studien zur somatischen Zelltherapie eingesetzt. Hierbei zielt man nicht, wie beim Einsatz von T- oder NK-Zellen, auf eine direkte zytotoxische Wirkung ab, sondern auf die spezifische Stimulation des Immunsystems durch die DZs.

#### 2.4.2) Herstellungsmöglichkeiten humaner dendritischer Zellen

DZs können aus unterschiedlichen Ausgangszellen unter verschiedenen Kulturbedingungen differenziert werden. Als Ausgangszellen können beispielweise aufgereinigte CD34-positive Zellen (Bernhard et al. 1995), leukämische Blasten (Moldenhauer et al. 2004) oder auch Monozyten (Zhou et al. 1996) eingesetzt werden.

#### 2.4.3) Anwendungsmöglichkeiten dendritischer Zellen

Mögliche therapeutische Anwendungsmöglichkeiten der DZs sind Infektionskrankheiten (Garcia et al. 2011, Schön et al. 2001, Agallou et al. 2011) oder auch maligne Neoplasien (Hsu et al. 1996, Salcedo et al. 2006, Brossart et al. 2000).

Wie in 2.1.2) beschrieben, gibt es bisher zur Therapie maligner Gliome keine zufriedenstellenden Therapieansätze. Zahlreiche Studien beschäftigen sich daher mit

alternativen Therapiestrategien, unter anderem mit dem Einsatz von DZs zur somatischen Zelltherapie. Dabei bestehen unter den einzelnen Studien zum Teil erhebliche Unterschiede, sowohl was das Probandenkollektiv betrifft als auch in den Therapieplänen, im Herstellungsprozess der DZs und auch in den untersuchten Endpunkten der Studien (Yu et al. 2001, Kobayashi et al. 2003, De Vleeschouwer et al. 2008, Ardon et al. 2010).

Gründe dafür bestehen unter anderem darin, dass bisher noch nicht belegt ist, welcher Herstellungsprozess zur Gewinnung der DZs optimal ist (eingesetzte Zytokine, Aufbereitung des Tumorgewebes), welche Dosis an DZs den Patienten pro Behandlung appliziert werden soll und wie oft und mit welcher Therapie die Anwendung von DZs am besten kombiniert werden sollte (Van Gool et al. 2009).

Auf Grund der unterschiedlichen DZ-Präparationen, Behandlungspläne und Patientenkollektive lassen sich die Studienergebnisse nur unter Vorbehalt vergleichen. Was jedoch aus den Studien hervorgeht ist, dass die Behandlung von Patienten mit malignen Gliomen mit autologen DZs prinzipiell durchführbar ist und es dabei nur selten zu schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen kommt.

## 2.5) Ziele der Arbeit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Herstellung von dendritischen Zellen sind Gegenstand eines klinisch orientierten Forschungsprojektes am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes.

In einem ersten Schritt werden Arbeiten zur Erlangung der Herstellungserlaubnis für Methoden der Herstellung und Prüfung von dendritischen Zellen zur adjuvanten Immuntherapie von höhergradigen Gliomen durchgeführt.

Hierbei werden dendritische Zellen aus autologen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) differenziert und mit Lysat aus autologem Tumorgewebe inkubiert (s. Anlage 1). Diese so ausgereiften dendritischen Zellen werden als Vakzine dem Patienten subkutan appliziert, um eine tumorspezifische Immunreaktion im Patienten zu induzieren.

Das gesamte Validierungsprojekt ist wie folgt gegliedert:

1. Die präklinische Validierung von Methoden und Verfahrensschritten zur Herstellung und Qualitätsprüfung.



2. Auf den Ergebnissen und Erfahrungen der präklinischen Validierung aufbauend erfolgt die klinische Validierung, bei der die Verfahrensprozesse zur Herstellung und Prüfung dendritischer Zellen in klinischem Maßstab unter Reinraumbedingungen validiert werden.

Die Ergebnisse dieser ersten beiden Teilabschnitte des Projektes dienen dazu, die arzneimittelrechtliche Herstellungserlaubnis nach §13 des Arzneimittelgesetzes zu erlangen.

Die Herstellungserlaubnis wird beim saarländischen Ministerium für Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie beantragt. Um die Herstellungserlaubnis zu erlangen, müssen zahlreiche Verfahrensschritte im Herstellungsprozess validiert und Funktionstests mit den generierten dendritischen Zellen durchgeführt werden. Dabei muss die Herstellung der DZs nachweislich nach dem Verfahren der „Guten Herstellungspraxis“ erfolgen.

Gegenstand dieser Arbeit sind die Etablierung und Validierung verschiedener Methoden sowohl im Bereich der präklinischen als auch der klinischen Validierung. Hierzu werden unterschiedliche Untersuchungen an Proben der DZ-Kulturen durchgeführt, die die Sicherheit und die Qualität des Produktes gewährleisten sollen.

Zum Einen werden hierfür Methoden etabliert und validiert, welche zur Bestimmung von Zellzahl und -vitalität eingesetzt werden. Des Weiteren werden Methoden zur Prüfung der im Herstellungsprozess eingesetzten Produkte etabliert (Chargenkontrollen der im Herstellungsprozess eingesetzten Zytokine und Zellkulturmedien).

Zur Prüfung der Sicherheit des Produktes wird das Verfahren zur Herstellung des Tumorlysates etabliert und in Bezug auf die Avitalisierung aller Tumorzellen validiert.

Um die Qualität des Produktes zu prüfen, werden Methoden zur phänotypischen Charakterisierung (durchflusszytometrische Charakterisierung der DZs) und zum Nachweis der Funktionalität der DZs etabliert (Prüfung des Migrationsverhaltens der DZs, Analyse der Phagozytose-Fähigkeit der DZs, Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR zur Prüfung der Induktion einer T-Zell-Aktivierung).

### 3) Material und Methodik

#### 3.1) Materialien und Geräte

##### 3.1.1) Reagenzien

*Tabelle 1: Verwendete Reagenzien.*

Reagenz	Artikelnr.	Hersteller
0,9% Natriumchlorid (NaCl) 1000ml, Ecotainer, steril	3570160	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
6x DNA Loading Dye	RO611	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Agarose-Tabletten, 0,5g Agarose/Tablette	HP67.2	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham Enhanced chemiluminescent (ECL) Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN2132	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BC-Assay Protein Quantification Kit	UP40840A	Interchim, Montluçon, Frankreich
Bovines Serum Albumin (BSA) Protease Free	K41-012	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Brilliant II SYBR Green QPCR Master-Mix	600548	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA
CASY ton	05651808 001	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland/Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
CellGro-Zellkulturmedium, Serum-free Dendritic Cell Medium	20801	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
CellTiter-Glo	G7570	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Cellwash	349524	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,5	A994.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) 0,5M	0281-5G	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
DNA Stain Clear G	39804.02	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
dNTP Set	R0192	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), liquid, Size: 500 ml, ohne Calcium, Magnesium	H21-002	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol	11007482	Biesterfeld Chemiedistribution, Friedrichsthal, Deutschland
Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure (EDTA) ≥99 %	CN06.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EZ-Vision Three	N313-Kit	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
FACSFlow	342003	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Fetal bovine Serum (FBS), EU approved, Heatinactivated	A15-104	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Flouresceinisothiocyanate-dextran (FITC-Dextran)	46945-100MG-F	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GeneRuler 100bp DNA Ladder	SM0242	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
GeneRuler 50bp DNA Ladder	SM0373	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glukose (40%)	3848086	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Humanes Serum Albumin (HSA)	A7979	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Milchpulver, Milk NonfatPowdered (Proteomics)	M203-10G	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
M-MuLV Reverse Transkriptase, RNase H+	EP0352	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Natriumchlorid ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO	3957.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	106495	Merck Millipore, Millipore GmbH, Schwallbach, Deutschland
Nuklease-freies, steril gefiltertes, sterilisiertes DEPC-behandeltes Wasser	T143.3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NuPageAntioxidant	NP0005	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Oberflächen-Desinfektionsmittel	133 402	Schülke& Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	P11-010	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
PHA-P	L1668	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyinosinic-polycytidylicacid (Poly (I:C))	tlr-pic	Invivogen, San Diego, Kalifornien, USA
Protein-Ladder (PageRulerPrestained Protein Ladder 10-170kDa)	26616	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Random Hexamer Primer	SO142	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	EO0381	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
RPMI 1640 w/o L- Glutamine, Liquid; L-Glutamin 200 mM	E15-039	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37% reinst	501012	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Stickstoff flüssig	I4100RB	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland

TAE (Tris-Acetate-EDTA) Buffer, 25X	0796-1,6L	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
Taq DNA Polymerase (recombinant) (5U/ $\mu$ l)	EPO402	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tris-Glycin SDS RunningBuffer (10x)	LC2675	Novex-Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tris-Glycin Transfer Buffer (25X)	LC3675	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
TrisPufferan $\geq$ 99,9 %, Ultra Qualität	5429.2	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%, 250ml	93595	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 3.1.2) Puffer und Lösungen

Die pH-Werte der Puffer und Lösungen wurden, wenn angegeben, mit NaOH bzw. HCl eingestellt.

#### 0,5M EDTA:

- 18,61g EDTA + 100ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- pH 8,0 einstellen
- Lagerung: 5°C

#### BCA-Reagenz:

- Im BC-Assay Protein Quantification Kit sind 2 Lösungen (A & B) enthalten, die im Verhältnis 50 Teile Lösung A zu 1 Teil Lösung B gemischt werden sollen
- 4900 $\mu$ l BCA-Lösung A + 100 $\mu$ l BCA-Lösung B
- keine Lagerung, Sofortverbrauch

#### Blocking-Puffer (5%):

- 2,5g Milchpulver + 50ml TBS
- Lagerung: 5°C (maximal 2 Tage)

#### DTT 0,5M:

- 77,125mg DTT + 1ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung: 5°C

#### ECL-Entwickler:

- Im Set sind zwei Lösungen (A & B) enthalten, die im Verhältnis 1:1 angesetzt werden sollen
- 1ml Lösung A + 1ml Lösung B

- Keine Lagerung der 1:1-Mischung möglich; Einzellösungen: 5°C

Lauf-Puffer:

- 100ml Tris-Glycin SDS RunningBuffer (10x) + 900ml H<sub>2</sub>O(millipore)
- Lagerung: RT

NaOH 5M:

- 250mg NaOH + 50ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung: RT

NaOH 10mM:

- 100µl 5M NaOH + 50ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung RT

PBS-Puffer:

- 100ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10X) + 900ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- pH 7,2 einstellen
- Lagerung: RT

PBS/EDTA 1mM mit 0,5%BSA:

- 492ml PBS + 1ml EDTA (0,5M) + 7,1ml BSA 35%
- Lagerung: 5°C

Poly I:C:

- 1µl der Fertiglösung sollen in 1ml Medium 20ng ergeben
- geliefert: 10µg Poly I:C
- Herstellung der Stammlösung (2mg/ml): 10µg Poly I:C + 5000µl H<sub>2</sub>O (millipore)
- Aliquotierung: 10µl Stammlösung + 990µl H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung: 5°C

Protein-Probenpuffer:

- 75µl NuPageAntioxidant + 30µl 0,5M DTT

TAE-Puffer (1x):

- 40ml TAE-Puffer (25x) + 960ml Aqua dest.
- Lagerung: RT

### TBS-Puffer 25x und TBS-Puffer 1x

- TBS-Puffer 25x: 12,8g Tris + 87,6g NaCl + 1l H<sub>2</sub>O (millipore)
- pH 8,0 einstellen
- TBS-Puffer 1x: 100ml TBS + 900ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung: RT

### Transfer-Puffer:

- 40ml Tris-Glycin Transfer Buffer (25X) + 960ml H<sub>2</sub>O (millipore)
- Lagerung: RT

### 3.1.3) Geräte

*Tabelle 2: Verwendete Geräte.*

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec DX-65	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland
Automatischer Hämatologie-Analysator	Sysmex KX-21N	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
Bestrahlungseinrichtung	Gamma Bestrahlungsanlage OB 29/4	STS Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig, Deutschland
Blotting-Kammer	X-Cell II Blot Module	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Brutschrank	Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Chemo-Lumineszenz-Detektor	GeneGnome5	Syngene Europe office, Cambridge, United Kingdom
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einzel-Zelle für Spektralphotometer	nanoCellAccessory	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Elektrophorese-Kammer, PCR	EasyPhor Medi Gelelektrophorese Kammer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elektrophorese-Kammer, Western Blot	X-Cell Sure Lock	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Elektrophorese-Netzgerät, PCR	Consort EV261	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektrophorese-Netzgerät, Western Blot	Power Source 250V	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ni	Kabushiki-gaisha Nikon; Chiyoda, Tokio, Japan
Gel Dokumentations-System	GenoSmart	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt,

		Deutschland
Gewebe-Dissoziator	Gentlemacs	MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Heizblock	Blockthermostate digital, 230V	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Kryoeinfriergerät	Mr. Frosty	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Kühl-Gefrier-Kombination	MP360 CS	DometicS.à.r.l, Hosingen, Luxemburg
Lumineszenz-Photometer	Mikroplatten-Reader MPL1	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	Varigomag Maxi Direkt	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Multichannel-Pipette 20-200µl	PipetmanNeo P8x200N, 20 - 200 µL	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 0,2-2 µl	PIPETMAN P2, 0.2–2 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 200-1000 µl	PIPETMAN P1000, 200–1000 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 20-200 µl	PIPETMAN P200, 20–200µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 2-20 µl	PIPETMAN P20, 2–20µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Real-Time PCR-Detektions-System	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Schüttelgerät	Polymax 1040 kombiniert mit Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwallbach, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Spektralphotometer	BioMate 3S Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tiefkühlschrank	UF 755G	DometicS.à.r.l, Hosingen, Luxemburg
Vortexer	Lab Dancer S40	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q	Merck Millipore, Millipore GmbH, Schwallbach, Deutschland
Wasserbad	TW 8	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	Zählkammer nach Neubauer	VWR International GmbH, Vertriebszentrum Rhein-Main Darmstadt, Deutschland
Zell-Counter	CASY 150-TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland/Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Zellzählgerät	MoxiZ Mini Automated Cell Counter	ORFLO Technologies, Hailey, Idaho, USA

Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	HeraeusFresco 21Cetrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

### 3.1.4) Verbrauchsmaterial

*Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.*

Artikel	Artikelnr.	Hersteller
6.5mm Transwell with 5.0µm Pore Polycarbonate Membrane Insert	3421	Corning Life Sciences, New York City, New York, USA
96 Well PCR-Platte, PP, weiß, halber Rand, für RT PCR	669285	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Abdeckfolie, EASYseal	676001	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CASY cups	056517940 01	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland/Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Cellulose Chromatography Papers, 3MM Chromatography Sheets, 46 x 57 cm, 100/pk	3030-917	Whatman, GEHealthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Costar 24 Well Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment Multiple Well Plates	3473	Corning Life Sciences, New York City, New York, USA
Cryo.S Einfrierröhrchen 2ml	122280	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
C-Tube	130-093- 237	MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Einmal-Kanüle, 0,9x40mm (G20) - gelb	30005	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Friedrichsthal Deutschland
Einmal-Spritze, 20ml	30004	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Friedrichsthal Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Reagiergefäße1,5 ml	72.690.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Fluoro- &Luminoplatte, 96-Well, weiß	PAA31396X	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gewebekulturschale, mit Nocken, 35mmx10mm, steril	627160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kassetten für MoxiZ, Typ M	MXC001	ORFLO Technologies Hailey, Idaho, USA
Kassetten für MoxiZ, Typ S	MXC002	ORFLO Technologies Hailey, Idaho, USA
M-Tube	130-093- 236	MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multiply-PCR-Gefäß	72.737.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Novex 4–12% Tris-Glycine Mini Gels, 1mm, 10 Wells	EC6075BOX	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Zellkulturschale, CellStarCell	628160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,



Culture Dishes, 35x10mm		Deutschland
Zellkulturschale, CellstarCell Culture Dishes, 60x15mm	627160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten-Spitzen 10µl, Nachfüll-easy load	771280	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten-Spitzen 1000µl, lose	70.762.100	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Spitzen 200µl, lose	70.7605.02	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	LC2005	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
RNeasy Plus Mini Kit	74134	Quiagen NV, Hilden, Deutschland
Sponge Pad for Blotting (Blot-Schwämme)	EI9052	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sterile Röhre 15ml, 120x17mm, PP, steril,	62.554.512	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Sterile Röhre 50ml 114 x 28mm,pp	62.547.254	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Steriles Einmal-Skalpell	5518059	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
TruCount-Röhrchen	340334	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Flasche (Cell Culture Flask) 75cm <sup>3</sup>	658175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.5) Humanes Probenmaterial

Für die im Folgenden aufgelisteten Nutzungen von humanen Zell-und Gewebeproben wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes ein positiver Bescheid erteilt (Kennnr. 185/12 und Kennnr. 146/12).

#### 3.1.5.1) Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Die Blutkomponenten zur präklinischen Validierung wurden aus Leukozyten-Reduktionskammern (LRSC) von Thrombozytenspenden gewonnen, die am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin durchgeführt wurden. Diese Zellen fallen als Restprodukt im Schlauchsystem nach Thrombozytenapherese an. Bezeichnet wurden die gewonnenen PBMCs je mit dem Namen des LRSC-Kegels, aus dem sie gewonnen wurden.

Diese PBMCs waren Ausgangsmaterial für die Generierung von DZs im Labormaßstab. Die Bezeichnung der DZs läuft analog zu denen der PBMCs. Tab. 4 zeigt die eingesetzten PBMC und DZ-Proben.

*Tabelle 4: Verwendete PBMCs und DZs.*

<b>PBMC-LRSC-Proben</b>	<b>DZ-LRSC-Proben</b>
PBMC-LRSC 23	DZ-LRSC 35
PBMC-LRSC 58	DZ-LRSC 42
PBMC-LRSC 59	DZ-LRSC 57

Zur klinischen Validierung wurden die PBMCs durch Apherese (Spectra Optia Apheresis System, TerumoBCT Inc, Lakewood, Colorado, USA) und Aufreinigung (ElutraCell Separation System, TerumoBCT Inc, Lakewood, Colorado, USA) gewonnen. Insgesamt wurden 4 Spender apheresiert (Validierungslauf 1-4). Die gewonnenen Proben wurden wie folgt benannt: DZ Vx Tag y (V für Validierungslauf, x für den Spender, y für den Tag der Zellkultivierung, in dem sich die Zellen befinden). Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte im Reinraumbereich. Überschüssige Zellen aus der Kultivierung wurden in sterile 50ml-Röhrchen überführt, aus dem Reinraum geschleust und als Rückstellproben für Forschungszwecke bei -35°C kryokonserviert oder direkt verwendet. Eingesetzt wurden Zellen aller Validierungsläufe (DZ V1-V4) sowie in allen Zellkulturstadien (Tag 0, Tag 7 und Tag 9).

### 3.1.5.2) Differenzierung der DZs aus PBMCs

Die dendritischen Zellen für die klinische Anwendung werden aus autologen, d.h. patienteneigenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) differenziert und mit Lysat aus autologem Tumorgewebe inkubiert.

Diese so ausgereiften dendritischen Zellen werden dem Patienten als Vakzine subkutan appliziert, um eine tumorspezifische Immunreaktion zu induzieren.

Die Differenzierung der DZs aus PBMCs erfolgt nach einem 9-tägigen Plan. Von Tag 0 bis 7 werden die Zellen mit IL-4 und GM-CSF stimuliert. Auf diese Weise entstehen unreife DZs. An Tag 7 kommen zusätzlich IL-1 $\beta$  und TNF-  $\alpha$  sowie ein Tumorlysate (TL) zur Differenzierung in reife DZs hinzu. Diese ist an Tag 9 abgeschlossen (s. Anlage 1).

### 3.1.5.3) Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde im Rahmen von Routine-Operationen in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen, pathologisch im Institut für Allgemeine und spezielle Pathologie und Neuropathologie untersucht, zu Forschungszwecken kryokonserviert und zur Validierung zur Verfügung gestellt.

### 3.1.6) Zellkulturmedien - Labormaßstab

#### RPMI-Zellkultur-Medium

- 450ml RPMI-Medium + 50ml FBS + 5ml L-Glutamin + 3,5ml Penicillin/Streptomycin
- Lagerung bei 5°C

#### Einfrier-Medium

- 5ml DMSO (10%) + 40ml FBS (20%) + 5,56ml 40%-Glukose (5%)
- Lagerung: -35°C

### 3.1.7) Antikörper

#### 3.1.7.1) Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometer

Alle eingesetzten Antikörper, welche von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland hergestellt wurden sind in Tab. 5 aufgelistet.

*Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometer.*

<b>Artikel</b>	<b>Artikelnr.</b>
CD11c- PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon B-ly6	555392
CD14-APC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon MφP9	345787
CD16-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon 3G8	555407
CD19-FITC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon HIB19	555412
CD1a-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon SK9	333167
CD274-FITC, monoklonal, Maus, anti-human, KlonMIH1	558065
CD3-APC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon SK7	345767
CD45-FITC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon 2D1	345808
CD56-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon B159	555516
CD80-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon L307.4	340294
CD83-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon HB15e	556855
CD86-FITC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon 2331 (FUN-1)	555657
HLA-DR-FITC, monoklonal, Maus, anti-human, Klon G46-6	347400

Anti-CCR7 ist hergestellt von R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA (vollständige Artikelbezeichnung: CCR7-PE, monoklonal, Maus, anti-human, Klon 150503, Artikelnr. FAB197P).

### 3.1.7.2) Antikörper zur Analyse mittels Western Blot

Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur Analyse mittels Western Blot.

Artikel	Artikelnr.	Hersteller
Anti-GM-CSF, (human) Kaninchen, Klon pk, unkonjugiert	CYT-26608	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-IL-1 $\beta$ , Kaninchen, Klon H-153 (200 $\mu$ g/ml)	sc-7884	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TexasUSA
Anti-IL-4 (human), Kaninchen, Klon pk, unkonjugiert	CYT-26623	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Rabbit-IgG (H+L), Ziege, peroxidase-konjugiert (15mg/ml)	111-035-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Alaska, USA
Anti-TNF- $\alpha$ (human), Kaninchen, Klon pk, unkonjugiert	CYT-26676	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Herstellung der Stammlösungen der Antikörper:

- Anti-GM-CSF, Anti IL-4 und Anti-TNF-  $\alpha$  (Zielkonzentration:0,1mg/ml):  
geliefert: 100 $\mu$ g  
100 $\mu$ g Antikörper + 1000 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (millipore)

### 3.1.8) Zytokine und Chemokine

Tabelle 7: Verwendete Zytokine und Chemokine.

Zytokin	Artikelnr.	Chargennr.	Hersteller
GM-CSF-Referenz-Zytokin*	1012-050	1012KC31	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
Il-1 $\beta$ -Referenz-Zytokin*	1011-050	1011HG11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
IL-4-Referenz-Zytokin*	1003-050	1003JD34	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human CCL21 (CCL-21)	300-35	0311130H1511	Pepro Tech GmbH, Hamburg, Deutschland
Recombinant Human Chemokin (C-C) Ligand 19 (CCL-19)	#300-29B	0908105I1211	Pepro Tech GmbH, Hamburg, Deutschland
Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Faktor (rh GM-CSF)	1412-050	1412JC11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interferon alpha (rh INF-a)	300-02A	081CY28K1307	Pepro Tech GmbH, Hamburg, Deutschland

Recombinant Human Interferon gamma (rh INF- $\gamma$ )	300-02	041027C06 12	Pepto Tech GmbH, Hamburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin-1 beta (rh IL-1 $\beta$ )	1011-050	1011HG11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin-4 (rh IL-4)	1403-050	1403IJ11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Tumor Necrosis Faktor alpha (rhTNF- $\alpha$ )	1406-050	1406JC11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland
TNF- $\alpha$ -Referenz-Zytokin*	1006-050	1006JD11	CellGenix GmbH/MetreonBioproducts GmbH, Freiburg, Deutschland

(\* Die N-Terminale-Sequenzierung der Referenz-Zytokine erfolgte durch die Firma Eurosequence B.V, Groningen, Niederlande.)

Ansetzen / Aliquotierung der Referenz-Zytokine: 10 $\mu$ l je Aliquot in der Konzentration 2 $\mu$ g/ml

Geliefert wurden die Referenz-Zytokine Zytokine in Pulverform, je 50 $\mu$ g.

Herstellung der Stammlösung (20 $\mu$ g/ml): 50 $\mu$ g Referenz-Zytokin + 2500 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung: je 20 $\mu$ l Stammlösung in ein Einfrierröhrchen

Lagerung: -35°C

Die Zytokine rh GM-CSF, rh IL1- $\beta$ , rh IL-4 und rh TNF- $\alpha$  wurden alle so angesetzt, dass 1 $\mu$ l der Zytokin-Stammlösung in 1ml Medium 1000U/ml ergeben

- Aliquotierung rh GM-CSF:

Geliefert: 50 $\mu$ g rh GM-CSF in Pulverform (8000U/ $\mu$ g)

Herstellung der Stammlösung (125 $\mu$ g/ml): 50 $\mu$ g rh GM-CSF + 400 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung: je 20 $\mu$ l Stammlösung in ein Einfrierröhrchen

Lagerung: -35°C

- Aliquotierung rh IL-4:

Geliefert: 50 $\mu$ g rh IL-4 in Pulverform (5000U/ $\mu$ g)

Herstellung der Stammlösung (200 $\mu$ g/ml): 50 $\mu$ g rh IL-4 + 250 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung: je 20 $\mu$ l Stammlösung in ein Einfrierröhrchen

Lagerung: -35°C

- Aliquotierung rh IL-1 $\beta$ :

Geliefert: 50µg rh IL1-β in Pulverform (9000U/µg)

Herstellung der Stammlösung (111µg/ml): 50µg rh IL1-β + 450µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung: je 20µl Stammlösung in ein Einfrierröhrchen

Lagerung: -35°C

- Aliquotierung rh TNF- α:

Geliefert: 50µg rh TNF- α in Pulverform (10000U/µg)

Herstellung der Stammlösung (100µg/ml): 50µg rh TNF- α + 500µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung: je 20µl Stammlösung in ein Einfrierröhrchen

Lagerung: -35°C

Ansetzen / Aliquotierung der Interferone:

- INF-a: Zielkonzentration: 1µl aus dem Aliquot in 1ml Medium soll 3000U/ml ergeben

Geliefert: 100µg INF-a in Pulverform (180000U/µg)

Herstellung der Stammlösung (166µg/ml): 100µg INF-a + 600µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Aliquotierung (16,6µg/ml): 10µl Stammlösung + 90µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Lagerung: -35°C

- INF-γ: Zielkonzentration: 1µl aus dem Aliquot in 1ml Medium soll 1000U/ml ergeben

Geliefert: 100µg INF-a in Pulverform (200000U/µg)

Herstellung der Stammlösung (50µg/ml): 100µg INF-a + 2000µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Lagerung: -35°C

### 3.1.9) PCR-Primer

Tabelle 8 zeigt die zur konventionellen und zur quantitativen Real-Time PCR eingesetzten Primer.

*Tabelle 8: Primer-Sequenzen der zur konventionellen und zur qRT-PCR eingesetzten Primer.*

Primer	Sequenz (5' → 3')	Größe des DNA-Fragments (bp)
β-Actin forward Primer (f) β-Actin reverse Primer (r)	GGATGCAGAAGGAGATCACTG CGATCCACACGGAGTACTTG	90
CD8 (f) CD8 (r)	CCCTGAGCAACTCCATCATGT GTGGGCTTCGCTGGCA	62
GAPDH (f) GAPDH (r)	CTGGGCTACACTGAGCACC AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	101
INF-γ1 (f) INF-γ1 (r)	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTTT AGCTCTGCATCGTTTTGGGTTT	117
INF-γ2 (f) INF-γ2 (r)	CTAATTATTCGGTAACTGACTTGA ACAGTTCAGCCATCACTTGA	75
INF-γ3 (f) INF-γ3 (r)	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA TCGCTCCCTGTTTTAGCTGC	93
RNA-Polymerase (f) RNA-Polymerase (r)	GGAGATTGAGTCCAAGTTCA GCAGACACACCAGCATAGT	134
TBP (f) TBP (r)	CGGAGAGTTCTGGGATTGT GGTTCGTGGCTCTCTTATC	161

Die Primersequenzen wurden mittels der Primerdesign-Software „Emboss“

([www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html) (2012) und „Blast“

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) entworfen und überprüft. Um die Amplifikation von

genomischer DNA zu vermeiden, wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt. Somit

wird gewährleistet, dass ausschließlich mRNA amplifiziert wird. Hergestellt wurden sie durch

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland).

Geliefert wurden die Primer in Pulverform mit unterschiedlichen Stoffmengen. Für jeden

Primer wurde ein Ausgangsstock der Konzentration 100µM hergestellt:

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH):

forward Primer: geliefert 20,5nmol

Berechnung:  $20,5\text{nmol}/x = 100\mu\text{mol/l} \rightarrow x=205\mu\text{l}$

Stock: 20,5nmol Primer + 205µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 24,19nmol Primer + 241,9µl (Nuklease-frei)

β-Actin:

forward Primer: Stock: 23,03nmol Primer + 230,3µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 22,13nmol Primer + 221,3µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

CD8:

forward Primer: Stock: 16,56nmol Primer + 165,6µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 20,64nmol Primer + 206,4µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

INF-γ1

forward Primer: Stock: 18,90nmol Primer + 189,0µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 17,78nmol Primer + 177,8µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

INF-γ2:

forward Primer: Stock: 19,45nmol Primer + 194,5µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 20,45nmol Primer + 204,5µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

INF-γ3:

forward Primer: Stock: 20,54nmol Primer + 205,4µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 19,70nmol Primer + 197,0µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

RNA-Polymerase:

forward Primer: Stock: 19,87nmol Primer + 198,7µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 15,64nmol Primer + 156,4µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

TATA-Box-Bindeprotein (TBP):

forward Primer: Stock: 17,54nmol Primer + 175,4µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

reverse Primer: Stock: 18,87nmol Primer + 188,7µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

Für jeden Primer wurden dann je zwei Aliquote hergestellt, eines mit der Konzentration 10µM und eines mit 1µM:

10µM-Aliquot: 10µl Primer-Stock + 90µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

1µM-Aliquot: 1µl Primer-Stock + 99µ H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)

## 3.2) Methodik

### 3.2.1) Arbeiten mit humanen Zell- und Gewebeproben

Die Arbeiten mit humanen Zell- und Gewebeproben wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Diese wurde vor Arbeitsbeginn mit Oberflächen-Desinfektionsmittel Antifect FF desinfiziert. Mit allen Materialien und Geräten, die unter die Sicherheitswerkbank eingebracht wurden, wurde analog verfahren. Alle Verbrauchsmaterialien, Puffer und Medien, die nicht steril geliefert wurden, wurden vor



Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert. Alle Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Inkubation der Zellkulturen im Brutschrank erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 Grad Celsius (°C) und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>). Kryokonservierte Zellen wurden rasch im Wasserbad (37°C) aufgetaut, bis nur noch ein Eiskern in der Probenmitte sichtbar war. Der übrige Auftauprozess fand nach Zugabe von 3ml RPMI-Medium unter RT statt. Diese Zellsuspension wurde für 5 Minuten (min), 300xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in das Medium aufgenommen, welches zur Versuchsfortführung benötigt wurde (Mediumwechsel). Bei Versuchsansätzen, bei denen Zellen über einen Tag kultiviert wurden, erfolgte nach 24 Stunden ein weiterer Mediumwechsel, um Reste des Einfrier-Mediums und avitale Zellen zu entfernen. Zum Einfrieren wurden die Zellkulturen für 5min, 300xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in gekühltes Einfrier-Medium resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen überführt und im Tiefkühlschrank bei -80°C über Nacht eingefroren.

Adhärente Zellen wurden wie folgt von den Wänden der Kulturgefäße gelöst („gesplittet“): Der Überstand der Zellkultur wurde abgenommen und in ein steriles 50ml Röhrchen überführt. In das Kulturgefäß wurden 5ml 5°C kaltes PBS/EDTA 1mM mit 0,5%BSA vorgelegt, das Behältnis wurde geschwenkt und 5min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kulturgefäße mikroskopisch auf noch adhärente Zellen untersucht. Waren diese noch zahlreich vorhanden, wurde das Kulturgefäß seitlich mit der Handfläche leicht angeschlagen, um die Zellen zu lösen. Nach erneuter mikroskopischer Kontrolle wurden 6ml warmes (15min bei 37°C im Wasserbad) Zellkulturmedium hinzugegeben durch mehrmaliges Aufziehen mittels Pipette gemischt. Dieser Überstand wurde auch in das sterile 50ml Röhrchen überführt und bei 200xg für 10min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in das Medium aufgenommen, welches zur Versuchsfortführung benötigt wurde.

### 3.2.2) Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zur Validierung der Zellzahlbestimmung wurden 5 Zellzählmethoden miteinander verglichen: MoxiZ, SysmexKX-21N, CASY TTC-150, Neubauer-Zählkammer und die TruCount-Single Platform Methode am Durchflusszytometer FACSCalibur (FACS SPF). Die 5 Messmethoden wurden zum einen bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und zum anderen

bezüglich der Präzision analysiert. Als Standard-Methode galt die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.

Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und SPF am FACS ermöglichen zudem die Bestimmung der Vitalität der Zellen in einer Probe. Die drei Methoden wurden zum einen bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und zum anderen bezüglich der Präzision analysiert. Als Standard-Methode galt die Vitalitätsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.

#### 3.2.2.1) Neubauer-Zählkammer

Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer werden die Zellen einer Probe zunächst mit dem Avitalfarbstoff Trypanblau inkubiert. Dieser kann intakte Zellmembranen vitaler Zellen nicht penetrieren, d.h. lediglich avitale Zellen werden blau angefärbt. Nach der Färbung werden die Proben lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer ausgewertet, wobei die Zahlen der vitalen und avitalen Zellen sowie die Gesamtzellzahl bestimmt werden können (Pappenheimer 1917, Strober 2001).

#### 3.2.2.2) CASY TTC-150

Das CASY TTC-150 ist ein elektronisches Zellzahlgerät, das die Zellzahl einer Probe anhand der Widerstandsänderung bestimmt. Die Probe wird hierzu in eine Kapillare angesaugt, an die ein definierter Strom angelegt ist. Fließend Zellen durch die Kapillare, stellen sie einen elektrischen Widerstand dar. Diese Widerstandsänderung ist proportional zur Zellgröße und wird vom CASY TTC-150 detektiert (Roche Diagnostics GmbH 2010). Zudem sind in dieser Messung auch Zellgrenzen für tote Zellen definiert. Somit liefert das CASY TTC-150 Informationen über die Zellzahl, die Zellgröße und die Vitalität der Zellkultur (Glauner 2006). Die Auswertung erfolgte mit der Software CASY Excel 2.4.

#### 3.2.2.3) MoxiZ

Das MoxiZ ist ebenfalls ein elektronisches Zellzahlgerät, das die Zellzahl einer Probe durch Widerstandsänderung bestimmt. Die Zellproben werden auf eine Kapillare aufgetragen und anschließend durch diese gesaugt. Hierbei strömen sie an einer Messzone vorbei, an welche ein definierter Strom angelegt ist. Hierbei erzeugt jede vorbeiströmende Zelle eine

Widerstandsänderung, welche proportional zu ihrer Größe ist (Orflo Technologies 2012). So können Zellzahl und -größe der in der Probe enthaltenen Zellen bestimmt werden.

#### 3.2.2.4) Sysmex KX-21N

Auch der Sysmex KX-21N ist ein elektronisches Zellzahlgerät. Zellen einer Probe werden in eine Kapillare gesaugt, an welche ein definierter Strom angelegt ist. Die Zellen erzeugen beim durchströmen der Kapillare einen elektrischen Widerstand, der proportional zu ihrer Größe ist. Mittels integrierter Software wird die Anzahl der weißen Blutzellen (white blood cells (WBC)) in Lösung bestimmt (Sysmex Deutschland GmbH 2014).

#### 3.2.2.5) TruCount-Single Platform Methode mit FACSCalibur

Die Zellzahlbestimmung mit FACS erfolgte nach der SPF. Hierbei werden sogenannte TruCount-Röhrchen zur durchflusszytometrischen Messung eingesetzt, die eine vom Hersteller exakt angegebene Anzahl an fluoreszierenden Polystyrol-Partikeln enthalten. Diese Gesamtzahl von Partikeln, multipliziert mit dem Verhältnis von gemessenen Partikeln zu gemessenen Zellen, ergibt die absolute Zellzahl der Probe, wobei durch gezielte Färbung von Zell-Oberflächenmolekülen genau definierte Zellpopulationen in ihrer Zahl detektiert werden können (Nicholson et al. 1997). Abgesehen von dem Zusatz der Partikel und dem zusätzlichen Berechnungsschritt, handelt es sich hierbei um eine gewöhnliche durchflusszytometrische Messung. Das heißt, dass die Zellen in einer Trägersubstanz (FACSFlow) durch Ansaugen in eine Kapillare einzeln aufgetrennt und an einem Laser vorbei transportiert werden. Anhand der Streuung des Laser-Strahls und durch zusätzliche Markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern können die in den Proben enthaltenen Zellen auf Größe, Granularität, Expression verschiedener Moleküle, Zellzahl und Vitalität hin analysiert werden (BD Biosciences 2009). Die Auswertung erfolgt per Computer, wobei die Auswertungsgrundlage für jeden Versuch individuell angelegt wird

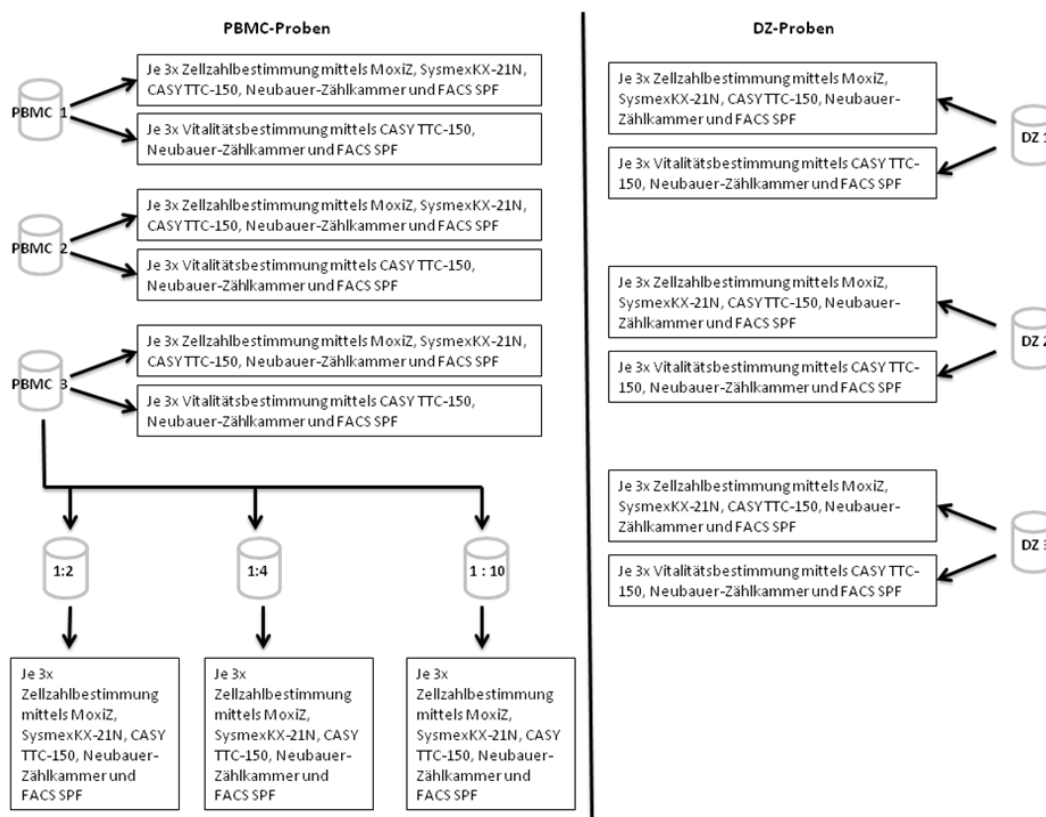
Zur Zellzahl und -Vitalitätsbestimmung wurden drei kryokonservierte PBMC-Proben (PBMC-LRSC 23,58 und 59) und drei kryokonservierte DZ-Proben (DZ-LRSC 35, 42 und 57) verwendet (s. Abb.1: PBMC 1-3 und DZ 1-3). Alle Proben wurden wie unter 3.2.1) beschrieben aufgetaut und je in 1ml RPMI-Zellkulturmedium aufgenommen.

Wie in Abb. 1 gezeigt, wurde die Zellzahl jeder Probe (PBMC 1-3 und DZ 1-3) mit allen genannten Methoden (MoxiZ, SysmexKX-21N, CASY TTC-150, Neubauer-Zählkammer, FACS SPF) je dreifach bestimmt. Ebenso wurde die Vitalität der Zellen in allen Proben (PBMC 1-3 und DZ 1-3) mittels CASY TTC-150, Neubauer-Zählkammer und FACS SPF je dreifach bestimmt.

Zusätzlich wurde von einer PBMC-Probe (PBMC 3) eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:2, 1:4, 1:10). Auch hier wurde die Zellzahl jeder Verdünnungsstufe je dreifach mit allen genannten Methoden (MoxiZ, SysmexKX-21N, CASY TTC-150, Neubauer-Zählkammer, SPF) bestimmt.

Analysiert wurden zum einen die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (Zellzahl und Vitalität) für das jeweilige Gerät. Als reproduzierbar galten die Methoden, wenn der Variationskoeffizient der Messergebnisse  $< \pm 25\%$  betrug.

Des Weiteren wurde die Messpräzision analysiert. Als Standard-Methode galt die Messung mittels Neubauer-Zählkammer. Als präzise galten die analysierten Methoden, wenn ihre Messergebnisse (Zellzahl und Vitalität)  $< \pm 25\%$  von der Standard-Methode abwichen.



**Abb. 1: Fließdiagramm zur Darstellung des Ablaufes der Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.**

Für die Messung im CASY TTC-150 wurden je 10µl Probe in 10ml CASY ton suspendiert. Für die Messung mittels MoxiZ wurde eine zusätzliche 1:10 Verdünnung aller Proben mit PBS-Puffer durchgeführt (10µl Probe + 90µl H<sub>2</sub>O (millipore)). Grund dafür war, dass im Vorfeld Messungen unverdünnter Proben häufig das Ergebnis „Warning: Concentration to high!“ lieferten. Der Hersteller gibt an, dass die Werte dann nicht mehr präzise sind. Daraufhin mussten die Messungen mit verdünnter Zellsuspension wiederholt werden. Im Sysmex KX-21N konnten die Proben ohne weitere Bearbeitung gemessen werden. Die Trypanblau-Färbung der Zellen zur Auszählung in der Neubauer-Zählkammer wurde wie folgt angesetzt: 40µl Probe + 160µl PBS-Puffer+200µl Trypanblau-Lösung. 10µl gefärbter Probe wurden in die Zählkammer pipettiert. Jede Probe wurde dreifach von drei unabhängigen Untersuchern ausgezählt. Dazu wurden alle 64 Quadrate der Neubauer Zählkammer ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel: gezählte Zellen x 10 (Verdünnungsfaktor) x 10<sup>5</sup>. Für die FACS SPF wurden die Proben für 5min, 300xg bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 50µl Cellwash resuspendiert. Die TruCount-Röhrchen wurden mit folgenden Antikörpern beladen:

- 10µl CD45-FITC
- 5µl CD14-APC
- 5µl CD11c-PE.

Anschließend wurden 50µl Probe hinzugefügt und die TruCount-Röhrchen im Vortexer geschüttelt. Nach 20min Inkubation bei 5°C im Dunkeln, wurden die Proben mit 430µl Cellwash auf 500µl aufgefüllt. Zuletzt wurden 10µl 7-Aminoactinomycin (7 AAD) hinzugeben und die Proben 5min im Dunkeln inkubiert. 7-AAD ist ein Avitalfarbstoff, das heißt er färbt lediglich abgestorbene Zellen an. Dann wurden die Messungen am FACSCalibur durchgeführt. Die Messeinstellungen und Auswertung erfolgten mit der Software „BD CellQuest Pro“ (Version 4.0.2). Als PBMCs wurden alle im Dot-Blot Vorwärts-Streulicht (FSC) gegen Seitwärts-Streulicht (SSC) sichtbaren Zellen gewertet. Um die DZs zu analysieren, wurden die großen, granulierten (FSC und SSC hoch), CD11c-positiven, CD45-positiven und CD14-niedrig-positiven bis -negativen Zellen gewertet.

Zur Differenzierung in vitale bzw. avitale Zellen wurden die erfassten Zellpopulationen für die PBMCs/DZs auf das 7-AAD-Signal hin untersucht. 7-AAD-positive Zellen wurden als avital, die 7-AAD-negativen als vital gewertet. Die genaue Auswertungsgrundlage für die SPF und die Definitionen und Verknüpfungen der Auswertungsregionen im Dot-Blot sind in Anlage 3 dargestellt.

Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mit Microsoft Office Excel 2007.

### 3.2.3) Chargenkontrolle der Zytokine

Alle Chargen der zur DZ-Differenzierung eingesetzten Zytokine wurden mittels Western Blot auf ihre Reinheit überprüft. Als Kontrollen dienten H<sub>2</sub>O (millipore) (Negativkontrolle), Protein Ladder (Größenmarker) und Referenz-Zytokine (Positivkontrolle, durch den Hersteller N-terminal sequenziert). Zudem wurden von Zytokin und Referenz-Zytokin Verdünnungsreihen eingesetzt (5ng, 10ng, 15ng und 20ng Zytokin).

Alle Zytokine und Referenz-Zytokine wurden auf die Konzentration 2µg/ml eingestellt:

Referenz Zytokine (2µg/ml): 10µl Stammlösung-Referenz-Zytokin (20µg/ml) + 90µl H<sub>2</sub>O (millipore)

rh GM-CSF (2µg/ml): 2µl rh GM-CSF-Stammlösung (125µg/ml) + 123µl H<sub>2</sub>O (millipore)

rh IL-1β: (2µg/ml): 2µl rh IL-1β-Stammlösung (111µg/ml) + 109µl H<sub>2</sub>O (millipore)

rh IL-4: (2µg/ml): 2µl rh IL-4-Stammlösung (200µg/ml) + 198µl H<sub>2</sub>O (millipore)

rh TNF- α: (2µg/ml): 2µl rh TNF- α -Stammlösung (100µg/ml) + 98µl H<sub>2</sub>O (millipore)

Negativkontrolle, Zytokin und Referenz-Zytokin wurden 1:1 mit Protein-Probenpuffer gemischt: je 30µl Probe bzw. Positiv- oder Negativkontrolle + 30µl Protein-Proben-Puffer.

Diese Ansätze wurden bei 90°C über 5min im Heizblock erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und dann auf Eis gelegt. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene DTT diente als Reduktionsmittel, um mögliche Disulfidbrücken in der Sekundärstruktur der Proteine zu spalten.

Der Protein-Probenpuffer enthielt zudem das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die Proteine binden. Durch diese Bindung werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, sodass alle in Lösung befindlichen Proteine eine negative Ladung aufweisen.

Nach diesem Prozess liegen alle in Lösung befindlichen Proteine negativ geladen in ihrer Primärstruktur vor, sodass die im elektrischen Feld der Elektrophorese der Größe der

Primärstruktur nach in Richtung Kathode wandern. Die Wanderungsstrecke ist umso weiter, je kleiner das Protein ist.

Nach dem Abkühlen wurden die Proben wie Tab. 9 zeigt auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen, das zuvor mit Lauf-Puffer überschichtet wurde:

*Tab.9: Beladung des Elektrophorese-Gels zur Chargenkontrolle der Zytokine mittels Western Blot.*

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	H <sub>2</sub> O	Referenz-Zytokin				Marker	Zytokin			
		5ng (=5µl)	10ng (=10µl)	15ng (=15µl)	20ng (=20µl)		5ng (=5µl)	10ng (=10µl)	15ng (=15µl)	20ng (=20µl)

Die einzusetzenden Proteinmengen entsprechen den in Tab. 12 angegeben Volumina aus dem Ansatz aus Protein und Protein-Probenpuffer.

Die Elektrophorese lief unter folgenden Einstellungen: 125V, Laufzeit 1,5h.

Danach wurde das Gel in den Western Blot eingesetzt. Die dazu eingesetzte PVDF-Membran wurde wegen ihres hydrophoben Charakters zuvor 1min. in Methanol geschwenkt, um sie hydrophil zu machen, mit H<sub>2</sub>O (millipore) abgewaschen und dann erst zusammen mit den Blot-Schwämmen in den Transfer-Puffer gelegt. Zudem wäscht das Methanol das Natriumdodecylsulfat (SDS, enthalten im Lauf-Puffer) von den Proteinen, sodass diese besser an der Blot-Membran haften können. Schwämme, Membran und Gel wurden in der Blot-Kammer arrangiert, ohne dass sie austrockneten. Die Kammer wurde mit Transfer-Puffer (auch hier ist Methanol enthalten, sodass die Proteine besser auf die PVDF-Membran übertragen werden) überschichtet und der Blot lief 1h bei 25V.

Anschließend wurde die PVDF-Membran geblockt, d.h. mit Proteinen unspezifisch gesättigt. Dazu wurde sie mit Blocking-Puffer überdeckt und 1h bei RT geschwenkt, anschließend direkt gefärbt, oder ggf. über Nacht bei 5°C mit Blocking-Puffer überdeckt gelagert.

Zur Färbung der Proteinbanden wurde der Blocking-Puffer abgeschüttet und der jeweilige primäre Antikörper zugegeben. Dieser wurde zuvor 1:1000 mit Blocking-Puffer verdünnt: 5µl primärer Antikörper + 5ml Blocking-Puffer. Die Membran wurde für 1h (GM-CSF und IL-4), 2h (IL-1β) oder 3h (TNF- α) bei RT unter Schütteln mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend dreifach wie folgt gewaschen: 5min in TBS-Puffer bei RT Schütteln.

Anschließend wurde der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben. Auch dieser wurde zuvor mit Blocking-Puffer verdünnt (1:10000): 4µl sekundärer Antikörper + 40µl Blocking-Puffer. Nach drei Waschschrritten analog zu den vorausgegangenen erfolgte die Detektion der Protein-Banden. Hierzu wurde die Membran abgetupft und dann 5min mit ECL-Entwickler bei RT inkubiert. Dieser Entwickler enthält unter anderem Lumigen PS-3, das durch die Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, zu Acridinium-Ester umgewandelt wird. Dieser reagiert mit Peroxid in einer Chemolumineszenz-Reaktion unter Emission von Licht. Die Detektion der Lichtsignale und die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgten mit dem Chemolumineszenz-Detektor GeneGnome5. Die Aufnahmeeinstellungen wurden mit der Gene Tools Software vorgenommen. Zusammengestellt wurden die Bild-Dokumente mit Microsoft Windows Version 6.1 Paint und Microsoft Office PowerPoint 2007.

#### 3.2.4) Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der dendritischen Zellen

Um nachweisen zu können, dass im Laufe des Herstellungsprozesses reife DZs aus den Ausgangszellen von monozytären Zellen von Tag 0 differenziert werden können, sollte eine durchflusszytometrische Analyse etabliert werden, mit welcher zum einen die DZs charakterisiert und zum anderen ihre Reifung dokumentiert werden kann. Zudem ist es mit dieser Methode möglich, die Vitalität der Zellkulturen unter Verwendung von 7-AAD (s. 3.2.2.5) zu bestimmen. Analysiert wurde die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD 83, CD 86, HLA-DR, CCR7, CD1a und CD247.

Zur Analyse der Marker CD80, CD 83, CD 86 und HLA-DR wurden für jede Probe 4 FACS-Röhrchen vorbereitet und im Anschluss mit  $1-2 \times 10^5$  Zellen, die in 200µl Cellwash gelöst wurden, beladen:

- Röhrchen 1 : ohne Zusatz
- Röhrchen 2 : 20µl CD86-FITC  
20µl CD80-PE  
5µl CD14-APC
- Röhrchen 3: 5µl HLA-DR-FITC  
10µl CD83-PE  
5µl CD14-APC
- Röhrchen 4: 5µl CD19-FITC



5µl CD16-PE  
5µl CD56-PE  
5µl CD3-APC

Jedes Röhrchen wurde im Vortexer gemischt.

Nach einer Inkubation von 30min im Dunkeln bei 5°C wurden die Proben wie in 3.2.2.5 gewaschen, mit 7-AAD versetzt und 5min im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte die Analyse mittels FACS. Die Messung wurde mit den Zellen aus DZ V1-V4 Tag0, 7, 9 sowie nach Kryokonservierung der reifen DZs durchgeführt.

Zur Analyse der Marker CCR7, CD1a und CD247 wurden für jede Probe 4 FACS-Röhrchen vorbereitet und im Anschluss mit  $1-2 \times 10^5$  Zellen, die in 200µl Cellwash gelöst wurden, beladen:

Röhrchen 1 : ohne Zusatz  
Röhrchen 2 : 20µl CD274-FITC  
20µl CD1a-PE  
5µl CD14-APC  
Röhrchen 3: 5µl HLA-DR-FITC  
5µl CD14-APC  
Röhrchen 4: 5µl HLA-DR-FITC  
20µl CCR7-PE  
5µl CD14-APC.

Jedes Röhrchen wurde im Vortexer gemischt.

Nach einer Inkubation von 30min im Dunkeln bei 5°C wurden die Proben wie in 3.2.2.5 gewaschen, mit 7-AAD versetzt und 5min im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte die Analyse mittels FACS. Die Messung wurde mit den Zellen aus DZ V1-V4 Tag0, 7 und 9 durchgeführt. Wie unter 3.2.2.5) für die FACS SPF erläutert, wurde auch zur Analyse der Oberflächenmarker eine Auswertungsgrundlage mit der Software CellQuest Pro angefertigt. Zusätzlich wurden Histogramme angelegt, um die Ausprägung der eingesetzten Oberflächenmarker durch die erfassten Zellpopulationen genauer untersuchen zu können. Alle im Färbeprotokoll enthaltenen Marker (CD86, CD80, HLA-DR, CD83, CCR7, CD1a und CD247) wurden in einem Histogramm dargestellt. In diesen Histogrammen werden die zuvor

definierten Zellepopulationen abgebildet. Die Histogramme gaben zum einen an, wie viel Prozent der Zellen positiv für den jeweiligen Marker waren, zum anderen die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) für jeden Marker. Diese gibt den Mittelwert des Fluoreszenzsignals pro Zelle an, die für den gemessenen Marker positiv ist, oder anders ausgedrückt, wie stark die Marker je Zelle im Mittel ausgeprägt waren.

Zur Analyse der DZs/Monozyten wurden die großen, granulierten Zellen (FSC und SSC hoch) und vitalen Zellen (7-AAD-negativ) erfasst. Zur Differenzierung zwischen Monozyten und DZs wurde CD14 eingesetzt: Als Monozyten wurden CD14-hoch-positive Zellen der erfassten Population gewertet, als DZs die CD14-niedrig positiven bis negativen Zellen. Für diese Zellpopulationen wurde die Expression der Marker CD80, CD83, CD86 und HLA-DR anhand von Histogrammen ausgewertet. Zur Analyse der Lymphozyten und NK-Zellen wurden die kleinen, wenig granulierten (FSC und SSC niedrig) und vitalen Zellen (7-AAD-negativ) erfasst. Als T-Zellen wurden die CD3-positiven Zellen dieser Population gewertet, als NK- und B-Zellen die CD3-negativen. Diese konnten anhand der Expression der Marker CD16/56 (NK-Zellen) und CD19 (B-Zellen) differenziert werden. Die genaue Auswertungsgrundlage für diese FACS-Messung ist in Anlage 4 dargestellt. Die Zusammenfassung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007.

### 3.2.5) Bio-Assay zur Chargenkontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung

Der Bio-Assay diente zur Qualitätskontrolle des CellGro-Zellkulturmediums. Dieses wurde zur klinischen Validierung der Herstellung von DZs eingesetzt und ist nach Herstellerangaben besonders zur Differenzierung von DZs geeignet.

Für den Bio-Assay wurden DZs aus V1 und V2 je Tag 0 in verschiedenen Medien über 48h unter Zusatz verschiedener Zytokine im Brutschrank inkubiert (sog. FastDC) (Dauer 2003). Anschließend wurden die Zellen auf die Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker hin untersucht, um mögliche Unterschiede der Differenzierung in den unterschiedlichen Medien feststellen und so die bessere Eignung des CellGro-Zellkulturmediums zur Herstellung von DZs nachweisen zu können. Die Chargen 0619X und 0882A des CellGro-Zellkulturmediums wurden überprüft. Es wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Zum einen die gleiche Anzahl an Zellen in PBS-Puffer, die ebenfalls nach dem Fast-DC Protokoll kultiviert wurden. Zum anderen die gleiche Anzahl von Zellen, die ohne Zusatz von Zytokinen in RPMI-Zellkultur-

Medium mitgeführt wurden. Jeder Ansatz wurde dreifach hergestellt. Eingesetzt wurden Zellen von DZ V1 und V2 Tag0.

Tag 0: Die Ansätze wurden wie folgt auf zwei 6-Well-Platten aufgetragen:

2ml Medium (PBS oder CellGro-Zellkulturmediums)+ 20µl HSA (1%)+  $1,15 \times 10^6$  Zellen + 2µl IL-4 (1000U/ml) + 2µl GM-CSF (1000U/ml) je Well. Anschließend wurden sie über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Kontrolle mit 2ml RPMI-Zellkultur-Medium +  $1,15 \times 10^6$  Zellen wurde in Zellkultur-Flasche ohne Zusatz von Zytokinen für 48h im Brutschrank inkubiert.

Tag1: Je Well wurden folgende Zytokine zugefügt:

2µl rh TNF  $\alpha$  (1000U/ml) + 2µl Poly I:C (20ng/ml) + 2µl INF- $\alpha$  (3000U/ml) + 2µl INF  $\gamma$  (1000U/ml) + 4µl rh IL-1 $\beta$  (2000U/ml). Die Proben wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Tag2: Das komplette Probenvolumen aus jedem Well wurde entnommen, abzentrifugiert (10min, 200g, Acc9, Dec9 bei RT) und jedes Pellet in 650µl Cellwash resuspendiert.

Diese Ansätze wurden zur durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt:

50µl für die SPF (s.3.2.2.5)

600µl für die Analyse der Oberflächenmarker:

Röhrchen 1: 200µl Zellsuspension

Röhrchen 2: 5 µl CD86-FITC

10 µl CD80-PE

5 µl CD14-APC

200µl Zellsuspension

Röhrchen 3: 5 µl HLA-DR-FITC

10 µl CD83-PE

5 µl CD14-APC

200µl Zellsuspension.

Diese drei Ansätze wurden im Vortexer gemischt und 30min abgedunkelt bei 5°C inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Dazu wurde jeder Probe 1ml Cellwash zugesetzt.

Nach dem Zentrifugieren (5min, 300g, Acc9, Dec9, bei RT) wurde der Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde zweifach durchgeführt.

Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde zweifach durchgeführt.

Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde zweifach durchgeführt.

Abschließend wurden zu jedem Ansatz 500µl Cellwash und 20µl 7-AAD

hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 5min, abgedunkelt bei 5°C wurden die Proben im FACS analysiert.

Wie unter 3.2.4) für die Immunphänotypisierung der DZs, wurde auch für den Bio-Assay eine Auswertungsgrundlage mit der Software CellQuest Pro angefertigt. Zur Analyse der DZs/Monozyten wurden die großen, granulierten (FSC und SSC hoch) und vitalen Zellen (7-AAD-negativ) erfasst. Zur Differenzierung zwischen Monozyten und DZs wurde CD14 eingesetzt: Als Monozyten wurden die CD14-hoch-positiven Zellen der erfassten Population gewertet, als DZs die CD14-schwach positiven bis negativen Zellen.

Die genaue Auswertungsgrundlage für diese FACS-Messung ist in Anlage 5 dargestellt. Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mit Microsoft Office Excel 2007.

### 3.2.6) Herstellung von vollständig avitalisiertem Tumorlysat (TL)

Die Avitalisierung des TL beinhaltet 4 Bearbeitungsschritte:

1. Manuelle Zerkleinerung mit Skalpell:

In eine 60x15mm Zellkulturschale wurden 1ml NaCl vorgelegt. Das Tumorgewebe wurde darin manuell mit dem Einmal-Skalpell zerkleinert. Die Tumorfragmente wurden in ein M-Tube überführt. Die Petrischale wurde mit 1-2ml NaCl nachgespült. Dieser Überstand wurde ebenfalls in das M-Tube überführt.

2. Aufarbeitung im automatischen Gewebe-Dissoziator GentleMACS:

Der Inhalt des M-Tubes wurde mit NaCl auf 10 ml aufgefüllt.

Dieses wurde dann in den automatischen Gewebe-Dissoziator überführt und im Programm „Protein\_01\_01 M-Tube“ für 2min standardisiert zerkleinert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation des M-Tubes für 5min, 8000g, Acc9, Dec9 bei 4°C.

Das TL wurde dann auf 6 Einfrier-Röhrchen verteilt.

3. 6x Einfrieren und Auftauen:

Die Einfrier-Röhrchen wurden für 3min in flüssigen Stickstoff gegeben.

Dann wurden sie im Thermoblock (50°C) aufgetaut.

Dieser Schritt wurde 6-mal durchgeführt.

4. Bestrahlung:

Die TL-Proben wurden mit einer Strahlendosis von 60Gy bestrahlt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die TL-Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

### 3.2.7) Proteingehaltbestimmung des Tumorlysates

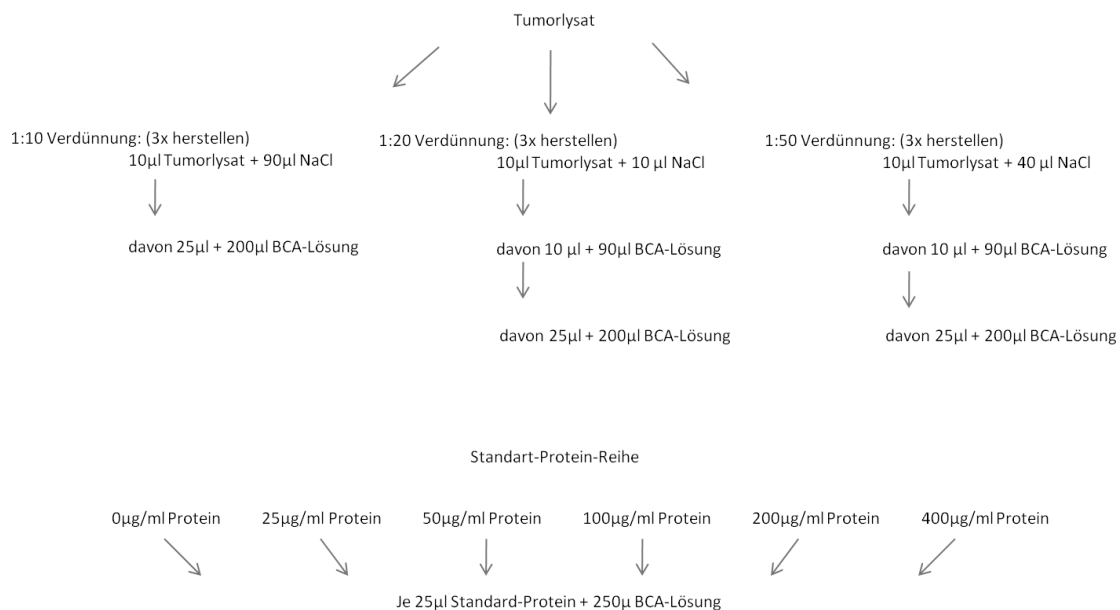
Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels spektralphotometrischer Messung. Hierzu wurde ein BC-Assay verwendet, bei dem es durch die Proteine in alkalischem Medium zur Reduktion von zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen kommt (Interchim 2015). Diese werden durch einen Chelat-Liganden gebunden. Der dadurch entstehende Komplex ist violett, mit einer maximalen Absorption bei  $562\text{nm}$ .

TL und Standard-Protein-Reihe (im BC-Assay Protein Quantification Kit enthalten) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und im Vortexer geschüttelt.

Vom TL wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10, 1:20, 1:50). Die Standard-Proteinreihe enthielt Proteinkonzentrationen von  $0\mu\text{g/ml}$ - $400\mu\text{g/ml}$ .

Gemischt wurden die Proben wie vom Hersteller angegeben:  $25\mu\text{l}$  Probe +  $200\mu\text{l}$  BCA-Lösung.

Abb. 2 zeigt, wie die Protein-Proben mit BCA-Reagenz angesetzt wurden.



**Abb. 2: Fließdiagramm zur Herstellung der Proben für die spektralphotometrische Bestimmung des Proteingehaltes des TL.**

Vor der Messung, die mit der NanoCell erfolgte, wurden die Proben für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Als Leerwert diente NaCl.

Das Photometer erstellte anhand der Standard-Proteinreihe eine Eichgrade und bestimmte anhand dieser die Proteinkonzentrationen jeder TL-Verdünnung. Jede TL-Verdünnung wurde

dreifach bestimmt. Die Bereinigung des Verdünnungsfaktors sowie die Berechnung des Proteingehaltes anhand des arithmetischen Mittels der einzelnen Verdünnungsstufen wurden mit Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt.

### 3.2.8) Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates

Zum Nachweis der Avitalität wurde das TL nach Trypanblau-Färbung mit der Neubauer Zählkammer ausgezählt sowie mittels ATP-Assay, CASY TTC-150 und Morphologi G3 analysiert. Grund dafür war, wie in 4.6.1 beschrieben, dass die alleinige Auszählung mittels Neubauer Zählkammer nicht eindeutig war und diese Methode validiert werden sollte. Hierzu wurde das hergestellte TL zusätzlich durch einen ATP-Assay, mittels Analyse am CASY TTC-150 und durch die Firma Malvern Instruments mittels Morphologi G3 (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) analysiert.

#### 3.2.8.1) Trypanblau-Färbung des Tumorlysates und Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer

Das kryokonservierte TL wurde bei RT aufgetaut. Zur Auszählung in der Neubauer Zählkammer wurden 30µl TL mit 30µl Trypanblau für 3min bei RT inkubiert und anschließend wurden 10µl in der Neubauer Zählkammer ausgewertet. Hierzu wurde es von drei unabhängigen Untersuchern ausgezählt, wobei bei 10-facher Vergrößerung alle 64 Quadranten der Zählkammer überprüft wurden. Ungefärbte Zellen wurden als vital gezählt, trypanblau gefärbte Zellen als avital.

Als Kontrolle wurde eine Probe TL mitgeführt, welche unvollständig avitalisiert (pTL) wurde. Im Vergleich zur Herstellung des vollständig avitalisierten TL (cTL) (s. 3.2.6) wurde bei der Herstellung des pTL die Gewebdissoziation im C-Tube mit dem Programm „tumor\_brain\_01\_01“ durchgeführt. Zudem wurden das Einfrieren und Auftauen sowie die Bestrahlung der Proben ausgelassen.

#### 3.2.8.2) ATP-Assay

Beim ATP-Assay wird in einer Chemolumineszenz-Reaktion ATP nachgewiesen. Als Energieträger des Zellstoffwechsels eignet sich der ATP-Assay zur Detektion metabolisch aktiver Zellen, wobei die Nachweisgrenze laut Herstellerangabe beim ATP-Gehalt von 50

HEK-293 Zellen liegt (Promega Corporation 2012). Durch Zugabe des ATP-Assay Reagenz CellTiter-Glo zur Zellsuspension werden die Zellen lysiert und somit das in den Zellen enthaltene ATP freigesetzt. Die im Reagenz enthaltene Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch eine Reaktion in Gang, bei der es zur Emission von Licht kommt. Hierbei ist die Lichtmenge proportional zum in der Zellsuspension enthaltenen ATP.

Der ATP-Assay wurde auf einer 96-Well-Platte durchgeführt, wobei die Wells je mit 100µl Probe + 100µl CellTiter-Glo beladen wurden. Als Proben wurden vitale PBMCs (LRSC 58) in steigender Zellzahl (10 PBMCs, 25 PBMCs, 50 PBMCs, 100 PBMCs,  $1 \times 10^3$  PBMCs,  $1 \times 10^4$  PBMCs und  $1 \times 10^5$  PBMCs), cTL (T6933) mit steigendem Proteingehalt (0,5ng TL, 1,25ng TL, 2,5ng TL, 5ng TL, 50ng TL, 500ng TL, 5µg TL) und Mischungen dieser beiden eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 5µg pTL eingesetzt.

Alle Proben wurden auf die 96-Well-Platte aufgetragen und mit 100µl CellTiter-Glo versetzt. Die 96-Well-Platte wurde 2min bei RT geschwenkt, anschließend weitere 8min bei RT inkubiert.

Die Detektion der Lichtsignale erfolgte im Lumineszenz-Photometer. Die emittierte Lichtmenge pro Well wurde hierbei als relative Licht-Einheiten pro Sekunde (Relative Light Units/Second (RLU/s)) gemessen. Die Rohdaten übermittelte das Lumineszenz-Photometer in tabellarischer Form. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2007.

### 3.2.8.3) Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150

Das CASY TTC-150 ist ein elektronisches Zellzahlgerät, das die Zellzahl und Vitalität einer Probe anhand der Widerstandsänderung bestimmt (s. 3.2.2.2). Je 10µl cTL wurden in 10ml CASY ton suspendiert und anschließend mittels CASY TTC-150 gemessen. Als Kontrolle wurde unbearbeitetes Tumorlysat mitgeführt (ITC). Zusätzlich wurden ITC- und cTL-Proben lichtmikroskopisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der Software CASY Excel 2.4.

### 3.2.8.4) Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3

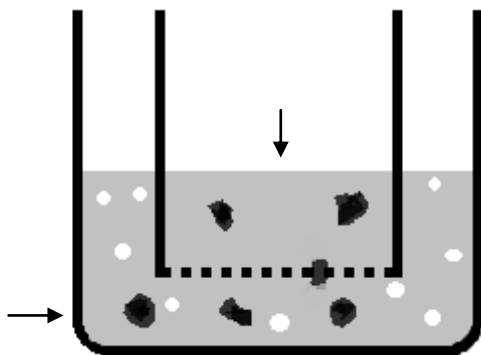
Beim Morphologi G3 (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany) handelt es sich um ein Mikroskop, das automatisch die Größe, Gestalt, Transparenz und Anzahl von Partikeln der Größe von 0,5-1000 µm einer Probe erfasst und auswertet (Malvern Instruments 2008, Müller et al. 2015). Untersucht wurden cTL- (generiert aus T 7015) - und ITC (aus T6891)-

Proben. Die Größe der in den Proben enthaltenen Partikel wird hierbei als „Durchmesser des flächengleichen Kreises“ (Circle equivalent, (CE) –Diameter) in  $\mu\text{m}$  ermittelt, d.h. zum zweidimensionalen Bild eines Partikels wird ein flächengleicher Kreis berechnet. Der Durchmesser dieses Kreises entspricht dem CE-Wert (Müller et al. 2015). Die Auswertung erfolgte automatisch mit der geräteinternen Software Morphologi Ver. 7.41.

### 3.2.9) Migrations-Assay

Zum Nachweis der Migrationsfähigkeit der DZs wurde ein Transwell-Assay durchgeführt. Dieser wurde sowohl im Labormaßstab, als auch im klinischen Maßstab eingesetzt. Das Prinzip des Assays ist in Abb. 3 gezeigt. Durch den Membran-Einsatz wird das Well in zwei Kompartimente geteilt. Zu Beginn werden die Zellen (schwarz) in das obere Kompartiment ( $\downarrow$ ) gegeben. Anschließend wird das untere Kompartiment ( $\rightarrow$ ) mit Chemokinen (weiß) versetzt. Die hierbei eingesetzten Chemokine CCL-19 und -21 induzieren Migration von DZs in das lymphatische System über die Bindung am CCR7-Rezeptor (Saeki et al. 1999, Jang et al. 2006).

Nach einer definierten Inkubationszeit wird das Medium des unteren Kompartiments entnommen und die darin enthaltenen Zellen analysiert. Als Negativkontrollen dienen Transwell-Ansätze ohne Zugabe von Chemokinen.



**Abb. 3: Aufbau des Transwell-Assay:** unteres Kompartiment ( $\rightarrow$ ), Medium (grau), oberes Kompartiment ( $\downarrow$ ), Zellen (schwarz) und Chemokine (weiß). Oberes und unteres Kompartiment sind durch eine Membran getrennt (.....).

Eingesetzt wurden Zellen von DZ V1-V4 je von Tag 9 vor und nach Kryokonservierung. Je  $1 \times 10^6$  DZs wurden in 1ml RPMI-Zellkultur-Medium aufgenommen.

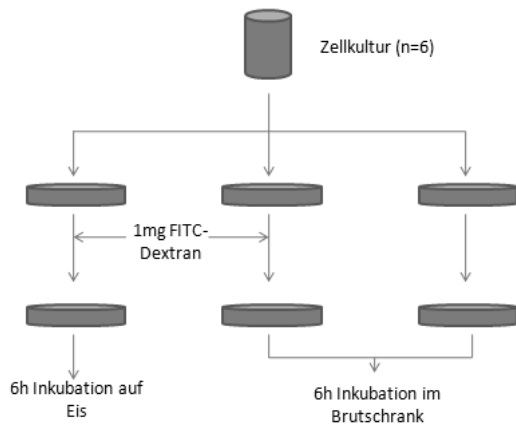
In die Wells einer 24-Well-Platte wurden 600 $\mu\text{l}$  RPMI-Zellkultur-Medium vorgelegt, die Transwell-Membranen eingesetzt und mit je 100 $\mu\text{l}$  der DZ-Ansätze beladen ( $=1 \times 10^5$  DZs pro



Membran). Anschließend wurden je 6µl CCL-19 und 6µl CCL-21 (je 250ng/ml Endkonzentration pro Well) in das untere Kompartiment gegeben. Als Negativkontrollen dienten die gleichen Ansätze ohne Zugabe von CCL-19 und CCL-21. Jede Probe wurde dreifach angesetzt (n=24). Die 24-Well-Platte wurde für 3h im Brutschrank inkubiert (37 Grad Celsius (°C), 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die Transwell-Membranen verworfen. Je Well wurden 500µl Überstand in ein FACS-Röhrchen überführt und die Zellzahl mit FACS gemessen. Auswertungsgrundlage war ein Dot-Blot, der alle gemessenen Partikel in FSC und SSC über einen Zeitraum 2min erfasste. Alle Ereignisse, die in dieser Zeit gemessen wurden, wurden als migrierte DZs gewertet. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007. Berechnet wurde das Verhältnis der migrierten DZs ohne Stimulation zu denen mit Stimulation als „relative Migration“. Hierbei wird der spontanen Migration der Wert eins zugeordnet und die gerichtete Migration als Vielfaches davon berechnet.

3.2.10) Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen  
Um zu analysieren, ob und in welchem Ausmaß die generierten unreifen und reifen DZs in der Lage sind unterschiedliche Moleküle aufzunehmen, wurde die intrazelluläre Aufnahme von Dextran-Molekülen, die mit FITC markiert wurden (FITC-Dextran), durchflusszytometrisch analysiert.

Eingesetzt wurden Zellen von DZ V1 und V4 je von Tag 7 und 9 (n=4). Je Zellkultur wurden  $3 \times 10^5$  Zellen gelöst in 1ml RPMI-Zellkulturmedium auf einer Zellkulturplatte ausgesät, wobei pro Zellkultur drei Ansätze hergestellt wurden. Diese wurden 48h im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden zwei der drei Ansätze mit je 20µl FITC-Dextran (=1mg/ml) versetzt. Der Ansatz ohne FITC-Dextran und einer mit FITC-Dextran wurden dann für 6h im Brutschrank inkubiert, der Zweite mit FITC-Dextran wurde auf Eis (Negativkontrolle) mitgeführt. Abb. 12 zeigt ein Fließdiagramm der hergestellten Proben.



**Abb. 4: Fließdiagramm zur Herstellung der Proben für die Analyse der Aufnahme von FITC-gekoppelten Dextran Molekülen.**

Nach der Inkubation wurden die Zellen gesplittet (s. 3.2.1). Dann erfolgte ein Waschschrift, um nicht-aufgenommenes FITC-Dextran zu entfernen. Hierzu wurde der Überstand nach dem Splitten verworfen und das Pellet in 3ml PBS-Puffer resuspendiert. Nach 10min Zentrifugation mit 300g, Acc9, Dec9 bei RT wurde das Pellet in 200µl Cellwash aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden zuvor wie folgt gefüllt:

Röhrchen 1:

200µl aus dem Ansatz ohne Dextran-FITC.

Röhrchen 2:

5 µl CD14-APC

5 µl CD11c-PE

200µl aus dem Ansatz mit FITC-Dextran, der im Brutschrank inkubiert wurde.

Röhrchen 3:

5 µl CD14-APC

5 µl CD11c-PE

200µl aus dem Ansatz mit FITC-Dextran, der auf Eis inkubiert wurde.

Jede Probe wurde mit dem Vortexer gemischt und anschließend für 20min abgedunkelt bei 5°C inkubiert. Dann wurden die Proben wie in 3.2.4) gewaschen, mit 7-AAD versetzt und 5min im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte die Analyse mittels FACS.

Als DZs wurden die großen, granulierten (FSC und SSC hoch), vitalen (7-AAD-negativ) sowie CD11c-positiven und CD14-niedrig-positiv bis -negativen Zellen erfasst.

Für diese Zellpopulation wurde ein Histogramm für den MFI von FITC-Dextran dargestellt.

Die genaue Beschreibung der Auswertung ist der Anlage 6 zu entnehmen.

Die Zusammenfassung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007.

### 3.2.11) Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem Tumorlysate durch die dendritischen Zellen

Unreife und reife DZs aus V4 Tag 7 und 9 wurden aufgetaut (s. 3.2.1). Jede Probe wurde halbiert und die Zellen nach Zentrifugation in 1ml Zellkulturmedium gelöst. Die Zellzahlen wurden bestimmt und anschließend die folgenden Anzahlen an Zellen ausgesät:

je  $2 \times 10^6$  Zellen in 4ml Zellkultur-Medium auf eine 60x15mm Zellkulturschale  
und je  $6 \times 10^5$  Zellen in 2ml auf eine 35x10mm Zellkulturschale.

Die Zellen wurden ohne weitere Zusätze über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Das Koppeln des TL mit FITC erfolgte nach Herstellerangaben: 250µg-Tumor-Protein (=63,55µl TL) des TL T7015 wurden mit 50µl FITC Labeling Kit gemischt. Dieser Ansatz wurde in ein Dialyseröhrchen überführt, dessen Dialysemembran im Deckel wurde zuvor mit PBS-Puffer benetzt. Das Röhrchen wurde kopfüber in PBS-Puffer gestellt, sodass die Ebene der Membran unter der Flüssigkeitsoberfläche lag. Mittels Magnetrührer wurde die Flüssigkeit in Bewegung gehalten. Die Dialyse lief über Nacht bei RT.

Am Folgetag wurden die Zellen auf den Zellkulturplatten gesplittet (s. 3.2.1), in 1ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahlen wurden bestimmt.

Die Zellen von den kleinen Zellkulturplatten wurden wieder auf solche ausgesät, nachdem das Volumen auf 2ml aufgefüllt wurde (+1ml Zellkultur-Medium). Die Zellen der mittleren Zellkulturplatten wurden in insgesamt 4ml Zellkulturmedium gelöst (+3ml Zellkultur-Medium) und es wurden je 50µl FITC-markiertes TL pro  $1 \times 10^6$  Zellen zugefügt.

Anschließend wurden diese Ansätze auf mittlere Zellkulturplatten ausgesät und für 1:30h im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden zu den Zellen von Tag 7 je

1µl/ml IL-4 (1000U/ml)  
1µl/ml GM-CSF (1000U/ml)  
1µl/ml TNF-  $\alpha$  (1000U/ml)  
2µl/ml IL-1 $\beta$  (2000U/ml) hinzugefügt.

Alle Ansätze wurden für zwei Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen gesplittet (s. 3.2.1).

Dann erfolgte ein Waschschriff, um nicht-aufgenommenes FITC-TL zu entfernen. Hierzu wurden die Überstände nach dem Spliffen verworfen und die Pellets in 3ml PBS-Puffer gelöst. Nach 10min Zentrifugation mit 300g, Acc9, Dec9 bei RT wurde jedes Pellet in 200µl Cellwash gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden zuvor wie folgt gefüllt:

- Röhrchen 1: 200µl aus dem Ansatz ohne TL-FITC
- Röhrchen 2: 5 µl CD14-APC  
200µl aus dem Ansatz mit TL-Dextran.

Die Proben wurden mittels Vortexer gemischt, für 20min abgedunkelt bei 5°C inkubiert, gewaschen (s. 3.2.4), mit 7-AAD versetzt und 5min im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte die Analyse mittels FACS analog zu der in 3.2.10). Als DZs wurden die großen, granulierten (FSC und SSC hoch), vitalen (7-AAD-negativ) sowie CD11c-positiven und CD14-niedrig-positiv bis -negativen Zellen erfasst.

Für diese Zellpopulation wurde ein Histogramm für den MFI von FITC-Dextran dargestellt. Die genaue Beschreibung der Auswertung ist der Anlage 6 zu entnehmen.

Die Zusammenfassung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007.

Zusätzlich zu der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen auch fluoreszenzmikroskopisch auf ihre intrazelluläre Aufnahme von TL hin untersucht.

### 3.2.12) PCR-Analyse der Expression von Interferon-γ in CD8-positiven T-Zellen

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der DZs hinsichtlich der Stimulation von T-Zellen soll ein funktioneller Assay etabliert werden, mit dem nachgewiesen werden kann, dass die reifen, mit TL beladenen DZs im lebenden Organismus eine Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen induzieren können. Aktivierte CD8-positive T-Zellen sezernieren neben anderen Zytokinen auch INF-γ. Dieses ist ein Indikator für die Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen (Bach et al. 1997). Um die erhöhte INF-γ-mRNA Expression messen zu können, sollte ein PCR- sowie darauf basierend ein qRT-PCR-Verfahren etabliert werden, anhand dessen die erhöhte INF-γ-Produktion der T-Zellen sensitiv nachgewiesen werden kann und somit auch die Aktivierung der T-Zellen durch DZs.

Zur Etablierung der Methode wurden die PCR-Bedingungen variiert, zum einen um zu testen, ob mit den designten Primern die gewünschten PCR-Produkte synthetisiert werden und zum anderen, um die optimalen Primer- Konzentrationen, Nukleinsäure-Konzentrationen,

verwendeten Marker sowie Geräteeinstellungen zu erfassen. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde anschließend eine qRT-PCR etabliert.

Alle im Folgenden unter 3.2.12 beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben auf Eis und im separaten PCR-Arbeitsbereich.

### 3.2.12.1) Test der Primer und Optimierung der PCR-Bedingungen

Als mögliche House-Keeping-Gene wurden primär GAPDH und  $\beta$ -Actin mitgeführt und im Verlauf zusätzlich TBP und RNA-Polymerase eingesetzt. House-Keeping-Gene werden dauerhaft in Zellen exprimiert, ohne dass Aktivitätsänderungen der Zelle ihre Expression beeinflussen. Anders ausgedrückt liegt in jeder CD8-positiven Zelle die gleiche Menge mRNA für die House-Keeping-Gene vor. Unterschiede in der Effizienz der Nukleinsäure-Isolierung und damit der eingesetzten Nukleinsäuren in der PCR können anhand der Expression House-Keeping-Gene korrigiert werden. Diese Korrekturberechnung wird als Normalisierung auf das House-Keeping-Gen bezeichnet. Zudem wurden CD8 und INF- $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2 und - $\gamma$ 3 als Zielgene getestet. Um die designten Primer zu testen und das PCR-Protokoll zu optimieren wurden mehrere PCRs mit wechselnden cDNA-Mengen, Annealing-Temperaturen, PCR-Zyklen und Primer-Konzentrationen durchgeführt. Die eingesetzte cDNA wurde zu Beginn der Versuchsreihe freundlicherweise durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. Eva Schwarz (FR2.5 Biophysik Universität des Saarlandes), zur Verfügung gestellt. Im Verlauf wurde sie, wie in 3.2.12.2) beschrieben erst aus RNA durch reverse Transkription hergestellt. Die PCR-Produkte wurden nach Zusatz eines Detektions-Reagenz mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zur Anode der Elektrophorese-Kammer. Unter einem UV-Detektor wurden die Banden detektiert. Als Kontrolle für die Größe diente ein Marker, als Negativkontrolle ein PCR-Ansatz ohne cDNA. Ausgangspunkt war das folgende PCR-Schema:

- Master Mix: Probe

1 $\mu$ l cDNA + 1 $\mu$ l forward Primer (aus 10 $\mu$ M-Ansatz  $\rightarrow$  500nM) + 1 $\mu$ l  
reverse Primer (aus 10 $\mu$ M-Ansatz  $\rightarrow$  500nM) + 2 $\mu$ l Taq-Puffer (1x) +  
0,5 $\mu$ l dNTPs (0,25mM) + 0,125 $\mu$ l Taq-Polymerase (0,5U)  
 $\rightarrow$  mit H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) auf 20 $\mu$ l-Gesamtvolumen einstellen

- Master Mix: Negativkontrolle:

Analog zum Master Mix Probe, jedoch 1µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) statt cDNA einsetzen

- PCR-Einstellungen:

Angepasst an die berechneten Angaben der designten Primer wurde die Anlagerungs-Temperatur so gewählt, dass die möglichst nahe an den empfohlenen Temperaturen aller Primer lag.

1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Anlagerung	60°C	30 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. Finale Elongation	72°C	10 min
6. Halten	4°C	

Schritte 2.-4. wurden 27-mal wiederholt, d.h. 28 Zyklen wurden durchlaufen

- Gelelektrophorese:

- 3,4µl DNA-DYE zu jeder PCR-Probe geben (Proben ggf. bis zur Versuchsfortsetzung einfrieren (-35°C))
- Gel gießen: 100ml TAE-Puffer + 2g Agarose erhitzen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht, 5min bei RT abkühlen lassen, Detektor-Substanz zugeben (6µl DNA-Stain oder 25µl Ezvision (wurde Ezvision verwendet, musste zu 10mµl Marker noch 1,7µl Ezvion hinzugefügt werden), in Gelkammer mit eingesetztem Kamm gießen und erstarren lassen (ca. 20min)
- Gelkammer in Elektrophorese-Kammer einsetzen, mit TAE-Puffer (1x) überschichten, Kamm entfernen, Proben auftragen (10µl Probe + DNA-DYE, 8µl Marker)
- Laufzeit 40min, Spannung: 120V

Zwei unterschiedliche DNA-Größenmarker (100bp und 50bp) wurden eingesetzt, wobei sich hinsichtlich der Auswertbarkeit der Ergebnisse kein Unterschied feststellen ließ, so dass sie im Verlauf alternierend eingesetzt wurden. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Gel Dokumentations-System. Die Beschriftung der Bilder erfolgte mit Microsoft Office PowerPoint 2007.

Die gewonnenen Ergebnisse zur Optimierung der PCR-Bedingungen waren Grundlage für folgende Veränderungen am PCR-Protokoll:

PCR-Zyklen: (28,35) optimale PCR-Ergebnisse mit 45 Zyklen

cDNA-Menge: (1µl, 2µl) optimal 1,5µl

Anlagerungs-Temperatur: (60°C, 59°C, 58,5°C, 58°C) optimal 58,5°C

Primer-Konzentration: (50nm bis 300nm) optimal (nach zusätzlich durchgeführter quantitativer Real-Time PCR) 300nm forward und reverse Primer.

### 3.2.12.2) RNA-Isolation und Reverse Transkription

Zur Isolation von RNA aus CD8-positiven T-Zellen (zur Verfügung gestellt durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. Eva Schwarz) wurde das RNA-Isolations-Kit RNeasy Plus Mini Kit verwendet.

Kryokonservierte Zellen wurden vor der RNA-Isolation nach dem Auftauen über Nacht im Brutschrank inkubiert und ggf. am Isolationstag für 2h im Brutschrank mit 1µg Phytohämagglutinin (PHA)/ml stimuliert.

Die RNA-Isolation erfolgte nach Hersteller-Protokoll:

1. Zelllyse: Zellen ( $10^6$ ) zentrifugieren (5min, 300g, Acc9, Dec9 bei RT ),Überstand wegnehmen und Pellet in 350µl RLTPlus lösen (Guanidine-Isothiozyanat-Puffer (inaktiviert auch die RNase), im Kit enthalten), vortexen
2. Homogenisieren:  
dazu wurden die Zellen in zwei Gruppen (je  $10^5$  Zellen) geteilt welche durch zwei unterschiedliche Methoden mechanisch homogenisiert wurden: Gruppe „N“: 5-mal Zellsuspension durch 20G-Kanüle mit einer Einweg-Spritze aufsaugen-ablassen; Gruppe „G“ durch Lyse im Gewebe-Dissoziator (Gentle macs) im M-Tube(Programm: RNA\_01)
3. DNA-Entfernung: DNA-Eliminierungssäule (im Kit enthalten) auf 2ml Tube (im Kit enthalten) setzen, Lysat auf Membran geben, 30Sek, 8000g zentrifugieren, Membran verwerfen, Durchfluss weiterverwenden
4. 350µl 70% Ethanol (70ml Ethanol + 30µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) zum Durchfluss hinzufügen, gut mischen
5. RNA-Gewinnung:
  - a. RNA-Säule auf 2ml Tube setzen, max. 700µl Durchfluss hinzu geben, Tube gut verschließen, 15Sek. 8000g (10000rpm) zentrifugieren; Durchfluss verwerfen, Tube wiederverwenden

- b. 700µl RW1-Puffer (im Kit enthalten) in die RNA-Säule geben, gut verschließen, 15Sek. mind. 8000g (10000rpm) zentrifugieren, Durchfluss verwerfen, Tube wiederverwenden
- c. 500µl RPE-Puffer (im Kit enthalten) in RNA-Säule gebe gut verschließen, 15Sek. 8000g (10000rpm) zentrifugieren, Durchfluss verwerfen, Tube wiederverwenden
- d. 500µl RPE-Puffer (im Kit enthalten) in RNA-Säule geben gut verschließen, 2Min. 8000g (10000rpm) zentrifugieren
- e. RNA-Säule auf neues 2ml Tube setzen, 1Min. Full-Speed zentrifugieren
- f. RNA-Säule auf 1,5 ml Tube setzen, 30-50µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) direkt auf die Membran geben, 1min 8000g (10000rpm) zentrifugieren, Säule verwerfen, RNA im Tube

Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurden spektralphotometrisch mit der Nano Cell bestimmt.

Anschließend wurde die isolierte RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben:

2 µg RNA	}	mit H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei) auf 11µl einstellen,
+ 1µl Random-Hexamer Primer		10min bei 70°C inkubieren, kurz auf Eis

Dann wurden 9µl aus folgendem Master Mix hinzu gegeben: 4µl M-MuLV Reaktionspuffer (=250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT)+ 2µl dNTPs (1mM) + 1µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20U) + 0,5µl RNase Inhibitor (20 U) + 1,5 µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei)→Gesamtvolumen 20µl je Probe „+RT“.

Als Kontrolle wird je eine Probe ohne Reverse Transkriptase (1µl H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) statt reverser Transkriptase einsetzen) mitgeführt „no RT“.

Die reverse Transkription lief dann mit folgenden Einstellungen weiter: 10 min 20°C, 59 min bei 37°C, 5 min bei 95°C und abschließend 10min Abkühlen bei 4°C. Gelagert wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -35°C oder zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80°C).



### 3.2.12.3) Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR ist eine Echtzeit-Darstellung der Amplifikation der cDNA-Synthese. Hierbei wurden die PCR Ansätze (je 25 µl) in eine 96 Well PCR-Platte pipettiert, in welche ein Farbstoff (Brillant SYBR Green) vorgelegt wurde. Dieser lagert sich in DNA-Doppelstränge ein und emittiert in dieser Form unter Anregung mit UV-Licht ein Fluoreszenz-Signal.

Dieses Signal wird am Ende jedes PCR-Zyklus mit dem qRT-PCR-Detektions-System detektiert und mit der CFX-Manager Software 3.1 ausgewertet.

Mit jedem PCR-Zyklus, bei dem exponentiell zunehmend cDNA gebildet wird, steigt auch das Fluoreszenz-Signal exponentiell an. Hierbei gilt, dass das Fluoreszenz-Signal umso früher, d.h. mit einer geringeren PCR-Zyklus-Zahl, einen Schwellenwert übertrifft, je mehr cDNA-Matrize in der Probe zu Beginn der Reaktion enthalten ist.

Der Wert für den PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenz-Signal den Schwellenwert übertrifft, nennt man „Cycle Threshold“ (CT, deutsch: Schwellenwert-Zyklus). Es gilt: Je niedriger der CT-Wert, umso höher war der cDNA- (bzw. RNA-) Gehalt des Zielgens in den Ausgangszellen. Anhand dieser CT-Werte kann eine quantitative Analyse der Genexpression der untersuchten Zellen erfolgen.

Um die Ergebnisse verschiedener qRT-PCRs vergleichen zu können, muss noch ein Rechenschritt erfolgen, der dazu dient, mögliche Fehler bezüglich des cDNA-Gehaltes in den verschiedenen qRT-PCR-Ansätzen zu minimieren. Denn bei der Zusammenstellung der qRT PCR-Ansätze wird trotz gleicher Volumina nicht zwangsläufig dieselbe cDNA-Menge in alle Ansätze gegeben. Daher muss noch die sog. Normalisierung mit berechnet werden.

Hierzu werden sog. House-Keeping-Gene bei jeder qRT PCR mitgeführt. Diese werden von Zellen gleicher Art kontinuierlich exprimiert. Hypothetisch wäre also der CT-Wert der House-Keeping-Gene von stimulierten und unstimulierten T-Zellen bei exakt gleicher Menge an eingesetzter cDNA gleich. Die CT-Werte der übrigen Gene werden um den Faktor bereinigt, in dem sich die CT-Werte der House-Keeping-Gene unterscheiden. Dann erst können sie miteinander verglichen werden.

Die Berechnung der relativen Genexpression unter Berücksichtigung der Normalisierung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$2^{\Delta CT\text{-Probe} - \Delta CT\text{-Kontrolle}} = \text{relative Genexpression,}$$

wobei  $\Delta CT = CT\text{-Zielgen} - CT\text{-Normalisierungsgen}$ .

Die relative Genexpression sagt aus, um welchen Faktor das Zielgen in der Probe mehr als in der Kontrolle exprimiert wurde.

Die folgenden Angaben stellen das Ausgangsprotokoll der qRT-PCR dar. In Anlehnung an 3.2.12.1) wurde das Protokoll verändert.

Pro Well werden 1µl cDNA (Probe „+RT“, Positivkontrolle (cDNA erhalten von AG Schwarz), „noRT“-Kontrolle oder Nuklease-freies H<sub>2</sub>O als Blank) eingesetzt. Diese cDNA Proben wurden zuvor 1:10 verdünnt (1µlcDNA + 9µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O). Getestet wurde auch der Einsatz 1:5 verdünnter cDNA (0,3µl cDNA + 2,7µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O). Hinzu kommen 24µl Master Mix: 12,5µl Brilliant SYBR Green QPCR Master mix (enthält DNA-Polymerase, Salz, Magnesium, dNTPs und optimierter Reaktions-Puffer) + 0,6µl forward Primer aus 10nM-Ansatz (300nM) + 0,6µl reverse Primer aus 10mM-Ansatz (300nM) →mit H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) auf 24µl auffüllen.

Als PCR-Einstellungen wurden die optimalen Einstellungen aus 3.2.11.2 übernommen:

1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Anlagerung	58,5°C	30 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. Finale Elongation	72°C	10 min
6. Abkühlen	4°C	
7. Schmelzkurvenanalyse	In 1°C Schritten bis 95°C	
8. Halten	4°C	

Schritte 2.-4. wurden 44-mal wiederholt, d.h. 45-Zyklen wurden durchlaufen

Die graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgten mit Microsoft Office Excel 2007.

## 4) Ergebnisse

### 4.1) Validierung von Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

#### 4.1.1) Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen

##### 4.1.1.1) Reproduzierbarkeit der Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen

Alle Methoden außer MoxiZ (VarK 36,2%) liefern reproduzierbare Messergebnisse (VarK <math>\pm 25\%</math>, s. Tab. 11, grau hinterlegt), wobei CASY TTC-150 unter diesen die beste Reproduzierbarkeit zeigt (VarK 2,7%; Neubauer-Zählkammer 7,5% VarK, Sysmex KX-21N 24,9% VarK und FACS SPF 7,5% VarK).

*Tabelle 10: Reproduzierbarkeit der PBMC-Zählung der 5 unterschiedlichen Zählmethoden.*

	PBMC LRSC 58 (n=3)			PBMC LRSC 59 (n=3)			PBMC LRSC 23 (n=3)			Mittlerer Variationskoeffizient (%)
	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	
MoxiZ	6,3	3,5	55,7	8,5	3,1	36,2	4,7	0,8	16,7	36,2
Sysmex KX-21N	25,8	1,6	6,0	13,9	1,8	13,2	8,1	4,5	55,5	24,9
CASY TTC-150	16,2	0,4	2,1	15,9	0,29	1,8	9,5	0,4	4,0	2,7
FACS SPF	13,2	0,6	4,6	6,9	0,4	5,1	2,8	0,3	11,2	6,9
Neubauer-Zählkammer	15,4	1,5	9,4	8,7	0,2	2,0	3,2	0,4	11,1	7,5

*Tabelle 11: Reproduzierbarkeit der Zellzählungs-Ergebnisse der PBMC-Verdünnungsreihe gemessen mit 5 unterschiedlichen Methoden.*

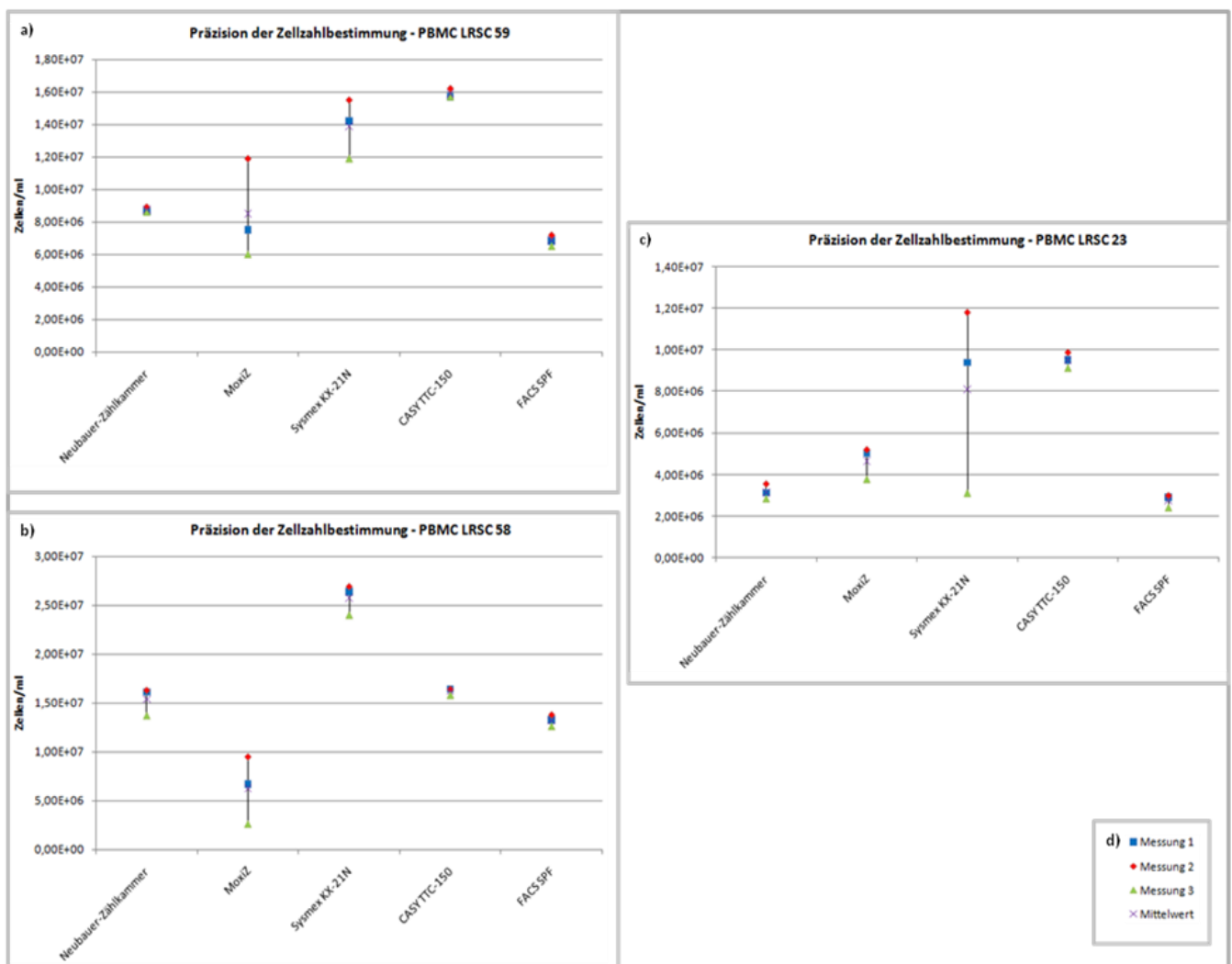
	1:1 - Verdünnung (n=3)			1:2 - Verdünnung (n=3)			1:4 - Verdünnung (n=3)			1:10 - Verdünnung (n=3)			Mittlerer Variationskoeffizient (%)
	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardabweichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationskoeffizient (%)	
MoxiZ	3,2	5,5	172,6	1,8	2,4	132,8	-	-	-	-	-	-	152,7
Sysmex KX-21N	1,5	0,9	63,4	1,6	0,4	21,7	1,6	0	0	1,7	0,6	34,6	29,9
CASY TTC-150	1,4	0,1	8,9	2,6	0,5	18,8	5,2	4,9	94,5	6,5	1,6	24,4	36,7
FACS SPF	7,0	0,1	12,3	0,4	0,1	25,9	0,2	0,1	33,2	0,1	0,0	24,2	23,9
Neubauer-Zählkammer	1,1	0,6	52,6	0,7	0,1	18,4	0,9	0,6	71,4	1,4	1,0	71,3	53,4

Bei der Analyse der Verdünnungsreihe liefert nur die Messung mittels FACS SPF reproduzierbare Ergebnisse (VarK 23,9%, Tab. 11, grau hinterlegt). Bei allen anderen

Methoden ist der  $VaK > \pm 25\%$  (Neubauer-Zählkammer 53,4% VarK; MoxiZ 152,7% VarK; Sysmex KX-21N 29,9% VarK; Casy TTC-150 36,7% VarK).

#### 4.1.1.2) Präzision der Zellzahlbestimmung der PBMC-Kulturen

Die Messergebnisse von FACS SPF und MoxiZ weichen weniger von der Standard-Methode ab als die von CASY TTC-150 und Sysmex KX-21N (s. Abb. 5).



**Abb. 5: Analyse der Präzision der Zellkulturbestimmung der PBMC-Proben gemessen mit MoxiZ, Sysmex KX-21N, CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer.** Für jede PBMC-Kultur (PBMC LRSC 58 (a), 59 (b) und 23 (c)) sind die Einzelmesswerte (n=3) (Messung 1 blau, Messung 2 rot, Messung 3 grün) gemessen mit der jeweils angeführten Methode, der Mittelwert (x) (Legende d) sowie die Spannweite der Einzelmessungen (I) gezeigt.

Tabelle 12: Präzision der unterschiedlichen Methoden zur Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen in Bezug zur Standard-Methode Neubauer Zählkammer.

	PBMC LRSC 58 Mittelwert (10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	PBMC LRSC 59 Mittelwert (10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	PBMC LRSC 23 Mittelwert (10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	Mittelwert Abweichung von Standard- Methode (%)
Neubauer- Zählkammer	15,4	-	8,7	-	3,2	-	-
MoxiZ	6,3	59,4	8,5	3,0	4,7	47,6	36,7
Sysmex KX- 21N	25,8	67,7	13,9	58,8	8,1	156,3	94,3
CASY TTC- 150	16,2	5,4	15,9	81,8	9,5	200,7	96,0
FACS SPF	13,2	14,1	6,9	21,6	2,8	12,9	16,2

Aus Tab. 12 geht hervor, dass mittels FACS SPF die Zellzahl von PBMC-Kulturen im Vergleich zur Standard-Methode präzise gemessen werden kann (mittlere Abweichung 16,2%, grau hinterlegt). Bei den anderen Methoden ist die mittlere Abweichung von der Standard-Methode größer als  $\pm 25\%$  (MoxiZ 36,7%; Sysmex KX-21N 94,3%; CASY TTC-150 96,0%).

Auffällig ist, dass die Methoden untereinander zum Teil deutliche Unterschiede in der ermittelten Zellzahl aufweisen. Beispielsweise wurden für die Probe PBMC LRSC 58 Zellzahlen von im Mittel  $6,3 \times 10^6$  PBMCs/ml (gemessen mit MoxiZ) bis  $25,8 \times 10^6$  PBMCs/ml (gemessen mit Sysmex KX 21N) ermittelt.

#### 4.1.2) Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen

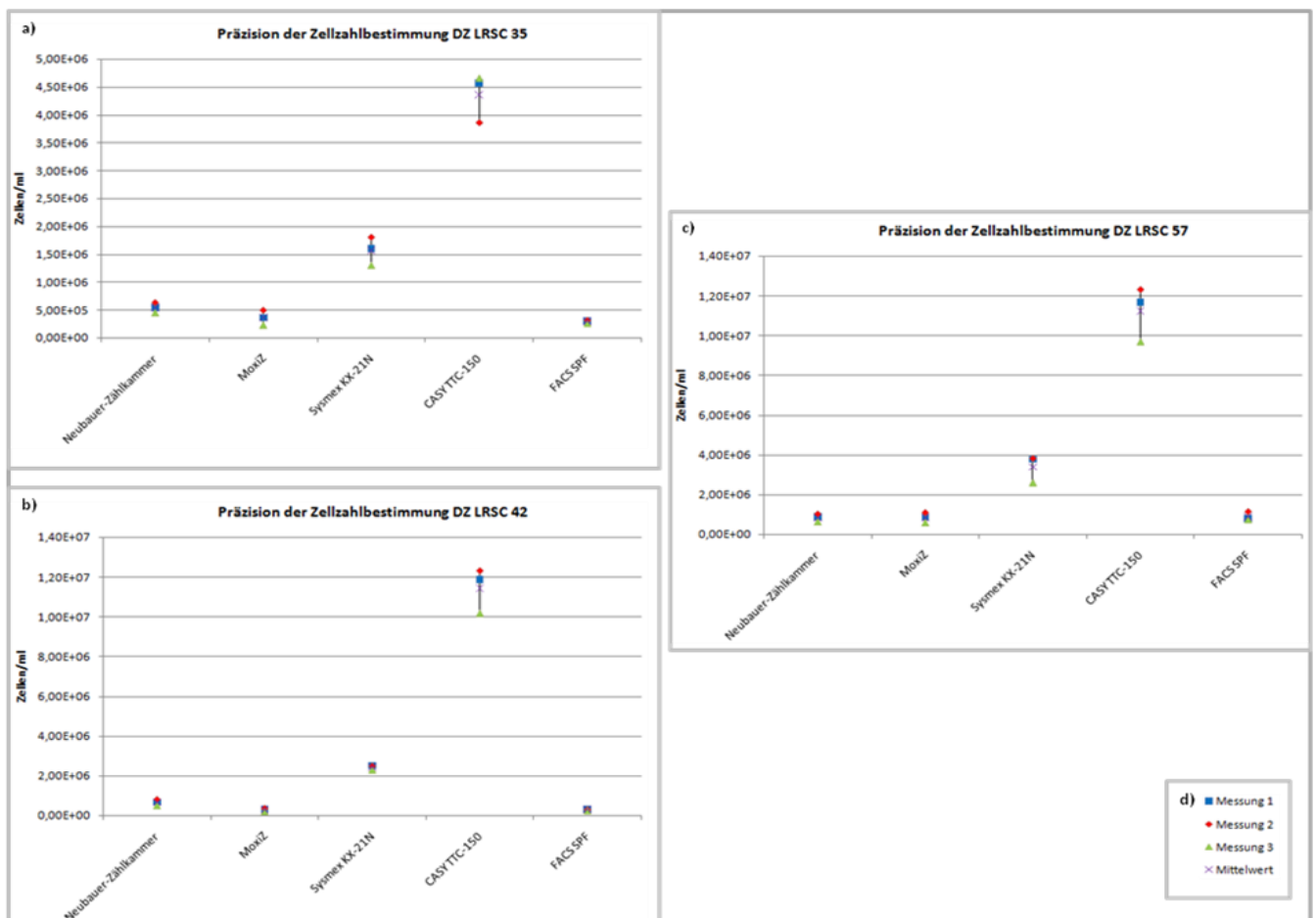
##### 4.1.2.1) Reproduzierbarkeit der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen

Tabelle 13: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Zellzählung von DZ-Proben gemessen mittels Neubauer-Zählkammer, MoxiZ, Sysmex KX-21N, Casy TTC-150 und FACS SPF.

	DZ LRSC 35 (n=3)			DZ LRSC 42 (n=3)			DZ LRSC 57 (n=3)			Mittlerer Variationsko- effizient (%)
	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardab- weichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardab- weichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Standardab- weichung (x10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	Variationsko- effizient (%)	
MoxiZ	0,4	0,1	36,4	0,3	0,1	30,8	0,9	0,3	29,5	32,2
Sysmex KX-21N	1,6	0,3	16,1	2,4	0,1	4,8	3,4	0,7	20,4	13,7
CASY TTC-150	4,4	0,4	10,1	11,5	1,1	9,7	11,2	1,4	12,1	10,6
FACS	0,3	0,0	8,8	0,3	0,0	12,2	0,9	0,2	23,5	14,8
Neubauer- Zählkammer	0,5	0,1	16,3	0,7	0,2	23,5	0,9	0,2	22,8	20,9

Wie aus Tab. 13 hervorgeht, liefern alle eingesetzten Messmethoden bei der Zellzahlbestimmung der DZs reproduzierbare Ergebnisse (Neubauer-Zählkammer 20,88% VarK; CASY TTC-150 10,64% VarK; Sysmex KX-21N 13,73% VarK; FACS SPF 14,83 VarK, grau hinterlegt), außer MoxiZ (VarK 32,24%).

#### 4.1.2.2) Präzision der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen



**Abb. 6: Analyse der Präzision der Zellkulturbestimmung der DZ-Proben gemessen mit MoxiZ, Sysmex KX-21N, CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer.** Für jede DZ-Kultur (DZ LRSC 35 (a), 42 (b) und 57 (c)) sind die Einzelmesswerte (n=3) (Messung 1 blau, Messung 2 rot, Messung 3 grün) gemessen mit der jeweils angeführten Methode, der Mittelwert (x) (Legende d) sowie die Spannweite der Einzelmessungen (I) gezeigt.

Anhand der Abb. 6 ist zu erkennen, dass die Messergebnisse von FACS SPF und MoxiZ weniger von der Standard-Methode abweichen als die von CASY TTC-150 und Sysmex KX-21N.

Aus Tab. 14 geht hervor, dass keine der Methoden im Vergleich zur Standard-Methode präzise Messergebnisse liefert (VarK  $\geq \pm 25\%$ ). Die höchste Übereinstimmung weisen MoxiZ (30,1% mittlere Abweichung) und FACS SPF (36,6% mittlere Abweichung) auf.

*Tabelle 14: Präzision der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen mittels MoxiZ, Sysmex KX-21N, Casy TTC-150 und FACS SPF Vergleich zur Standard-Methode Neubauer-Zählkammer.*

	DZLRSC 35 Mittelwert (10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	DZLRSC 42 (Mittelwert 10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	DZLRSC 57 Mittelwert (10 <sup>6</sup> Zellen/ml) (n=3)	Abweichung von Standard- Methode (%)	Mittelwert Abweichung von Standard- Methode (%)
Neubauer- Zählkammer	0,5	-	0,7	-	0,9	-	-
MoxiZ	0,4	33,2	0,3	57,1	0,9	0,1	30,1
Sysmex KX- 21N	1,6	190,5	2,4	269,6	3,4	302,4	254,2
CASY TTC- 150	4,4	709,6	11,5	1641,8	11,2	1229,4	1193,6
FACS SPF	0,3	46,6	0,3	57,9	0,9	5,4	36,6

Auffällig ist, dass die Methoden untereinander zum Teil deutliche Unterschiede in der ermittelten Zellzahl aufweisen. Beispielsweise wurden für die Probe DZ LRSC 42 Zellzahlen von im Mittel  $0,3 \times 10^6$  DZs/ml (gemessen mit MoxiZ) bis  $11,5 \times 10^6$  PBMCs/ml (gemessen mit CASY TTC-150) ermittelt.

#### 4.1.3) Vitalitätsbestimmung der Zellkulturen

##### 4.1.3.1) Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen

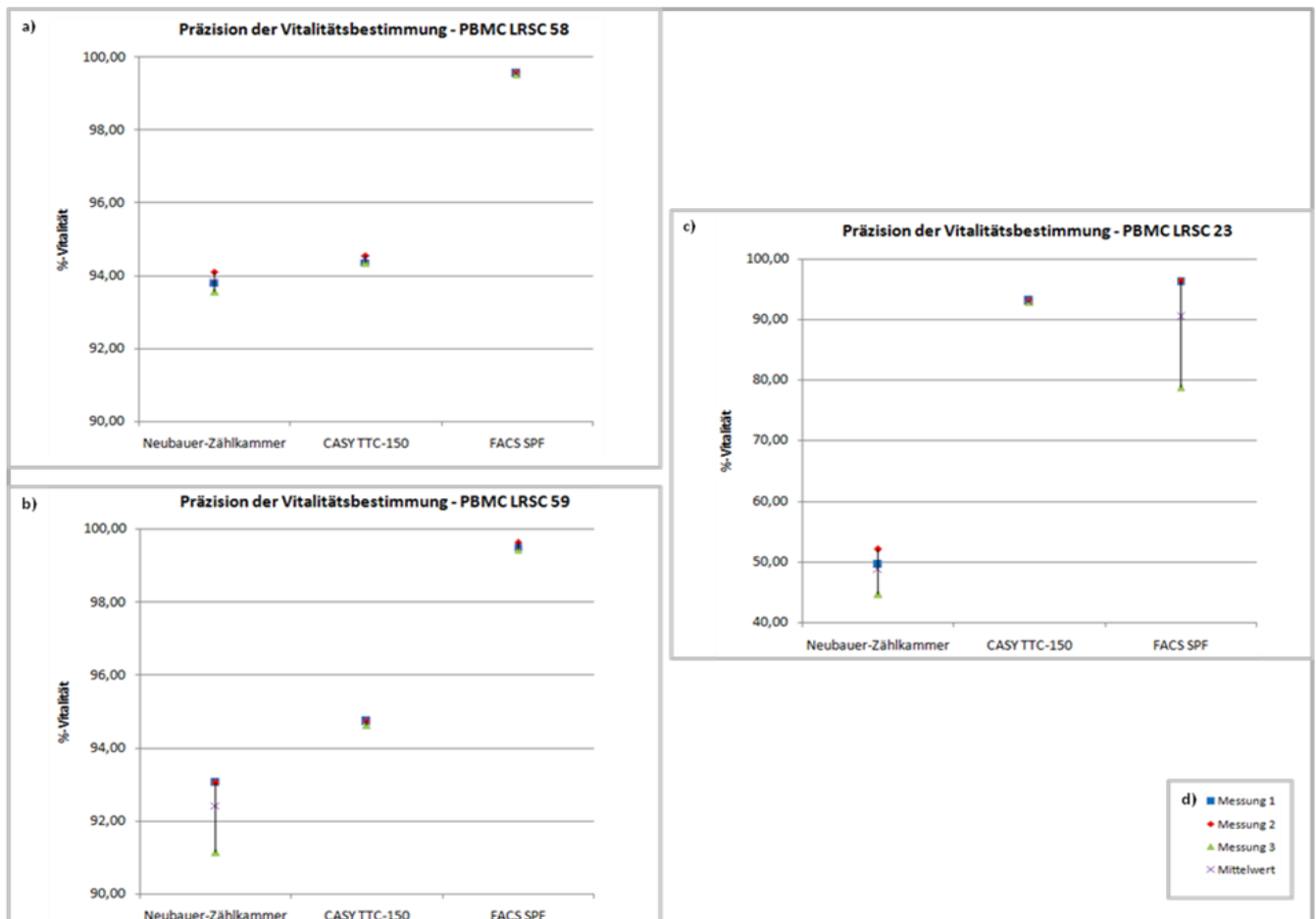
*Tabelle 15: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Proben gemessen mit Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF.*

	PBMC LRSC 58 (n=3)			PBMC LRSC 59 (n=3)			PBMC LRSC 23 (n=3)			Mittlerer Variationsko- effizient (%)
	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	
CASY TTC- 150	94,4	0,1	0,1	94,7	0,1	0,1	93,0	0,1	0,1	0,1
FACS SPF	99,6	0,0	0,0	99,5	0,1	0,1	90,4	10,1	11,1	3,8
Neubauer- Zählkammer	93,8	0,3	0,3	92,4	1,1	1,2	48,8	3,8	7,8	3,1

Bei der Bestimmung der Vitalität der PMBCs liefern alle drei Methoden reproduzierbare Ergebnisse (VarK  $\leq \pm 25\%$ ) (s. Tab. 15, grau hinterlegt), wobei die höchste Reproduzierbarkeit

mit CASY TTC-150 erzielt wird (VarK 0,1%) (Neubauer-Zählkammer VarK 3,1%) und FACS SPF VarK 3,8%).

#### 4.1.3.2) Präzision der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen



**Abb. 7: Analyse der Präzision der Vitalitätsbestimmung der PBMC-Proben gemessen mit CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. Für jede PBMC-Kultur (PBMC LRSC 58 (a), 59 (b) und 23 (c)) sind die Einzelmesswerte (n=3) (Messung 1 blau, Messung 2 rot, Messung 3 grün) gemessen mit der jeweils angeführten Methode, der Mittelwert (x) (Legende d) sowie die Spannweite der Einzelmessungen (I) gezeigt.**

Anhand der Abb. 7 ist zu erkennen, dass die Messergebnisse von CASY TTC-150 weniger von der Standard-Methode abweichen als die von FACS SPF.

Aus Tab. 16 geht hervor, dass keine der Methoden im Vergleich zur Standard-Methode präzise Messergebnisse liefert (VarK  $\geq 25\%$ ). CASY TTC-150 liefert etwas präzisere Ergebnisse (mittlere Abweichung 31,3%) als FACS SPF (mittlere Abweichung 33,0%).



Auffällig ist, dass in der Vitalitätsbestimmung der Probe PBMC LRSC 23 mit der Standard-Methode eine Vitalität von im Mittel 48,8% gemessen wird. Die beiden anderen Methoden weichen hier um ca. 90% von der Standard-Methode ab. In den Messungen der beiden anderen Kulturen (PBMC LRSC 58 und 59) zeigen sich hingegen nur Abweichungen von max. 7,7% zur Standard-Methode.

*Tabelle 16: Präzision der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen gemessen mittels CASY TTC-150 und FACS SPF in Bezug zur Standard-Methode Neubauer-Zählkammer.*

	PBMC LRSC 58 Mittelwert (%- Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	PBMC LRSC 59 Mittelwert (%-Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	PBMC LRSC 23 Mittelwert (%-Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	Mittelwert Abweichung von Standard- Methode (%)
Neubauer- Zählkammer	93,8	-	92,4	-	48,8	-	-
CASY TTC- 150	94,4	0,7	94,7	2,5	93,0	90,7	31,3
FACS SPF	99,6	6,1	99,5	7,7	90,4	85,3	33,0

#### 4.1.3.3) Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen

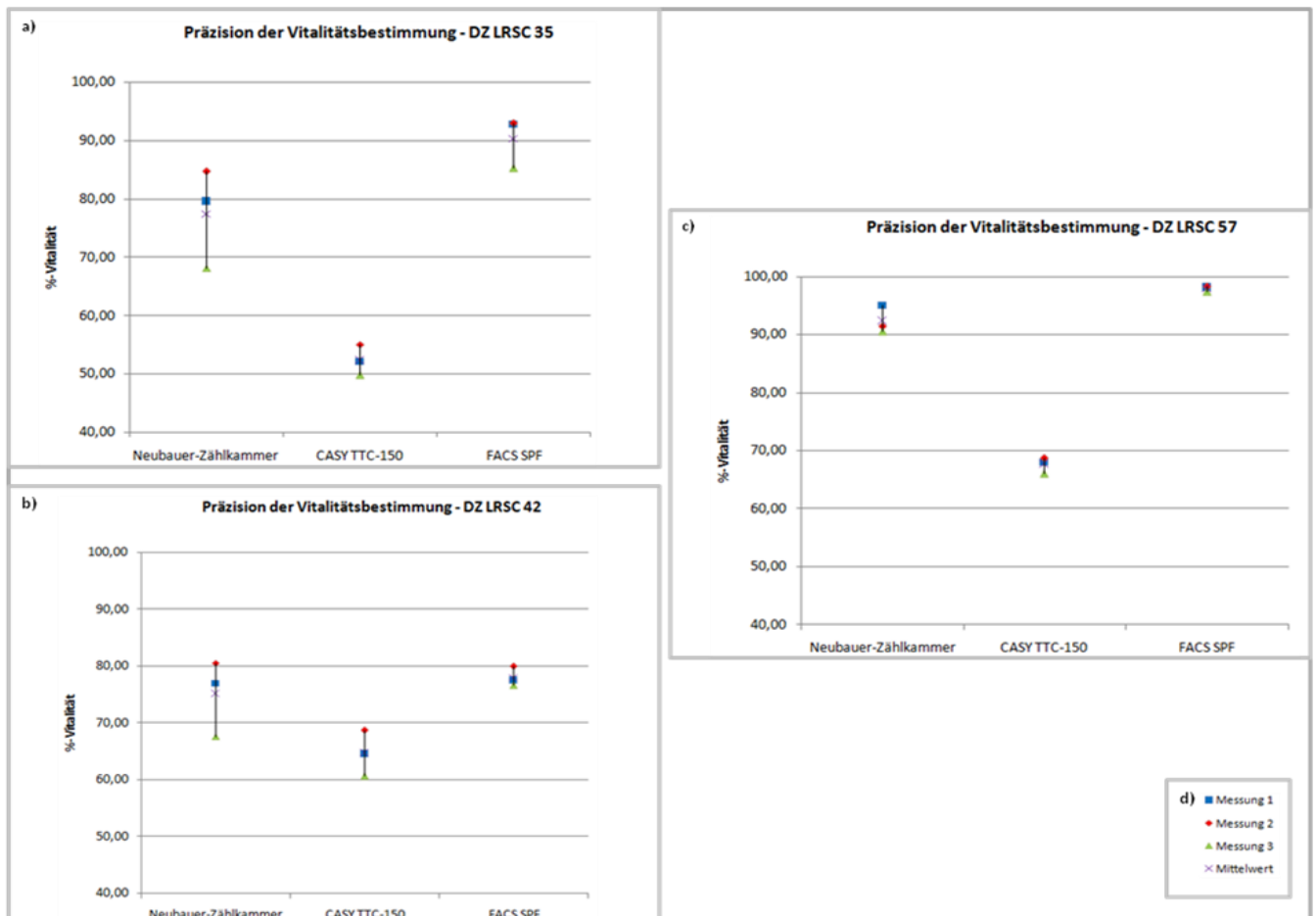
Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF liefern hinsichtlich der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen reproduzierbare Ergebnisse (VarK <math>\pm 25\%</math>) (s. Tab. 17, grau hinterlegt), wobei FACS SPF die höchste Reproduzierbarkeit (VarK 2,6%) zeigt (Neubauer-Zählkammer VarK 7,5% und CASY TTC-150 VarK 4,4%).

*Tabelle 17: Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen gemessen mit Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF.*

	DZ LRSC 35 (n=3)			DZ LRSC 42 (n=3)			DZ LRSC 57 (n=3)			Mittlerer Variationsko- effizient (%)
	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	Mittelwert (%-Vitalität)	Standardab- weichung (%-Vitalität)	Variationsko- effizient (%)	
CASY TTC-150	52,4	2,6	5,0	64,7	4,0	6,2	67,6	1,4	2,1	4,4
FACS SPF	90,4	4,4	4,9	78,1	1,8	2,3	97,9	0,5	0,5	2,6
Neubauer- Zählkammer	77,5	8,5	10,9	75,1	6,7	9,0	92,4	2,4	2,6	7,5

#### 4.1.3.4) Präzision der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen

Anhand der Abb. 8 ist zu erkennen, dass die Messergebnisse von FACS SPF weniger von der Standard-Methode abweichen als die von CASY TTC-150.



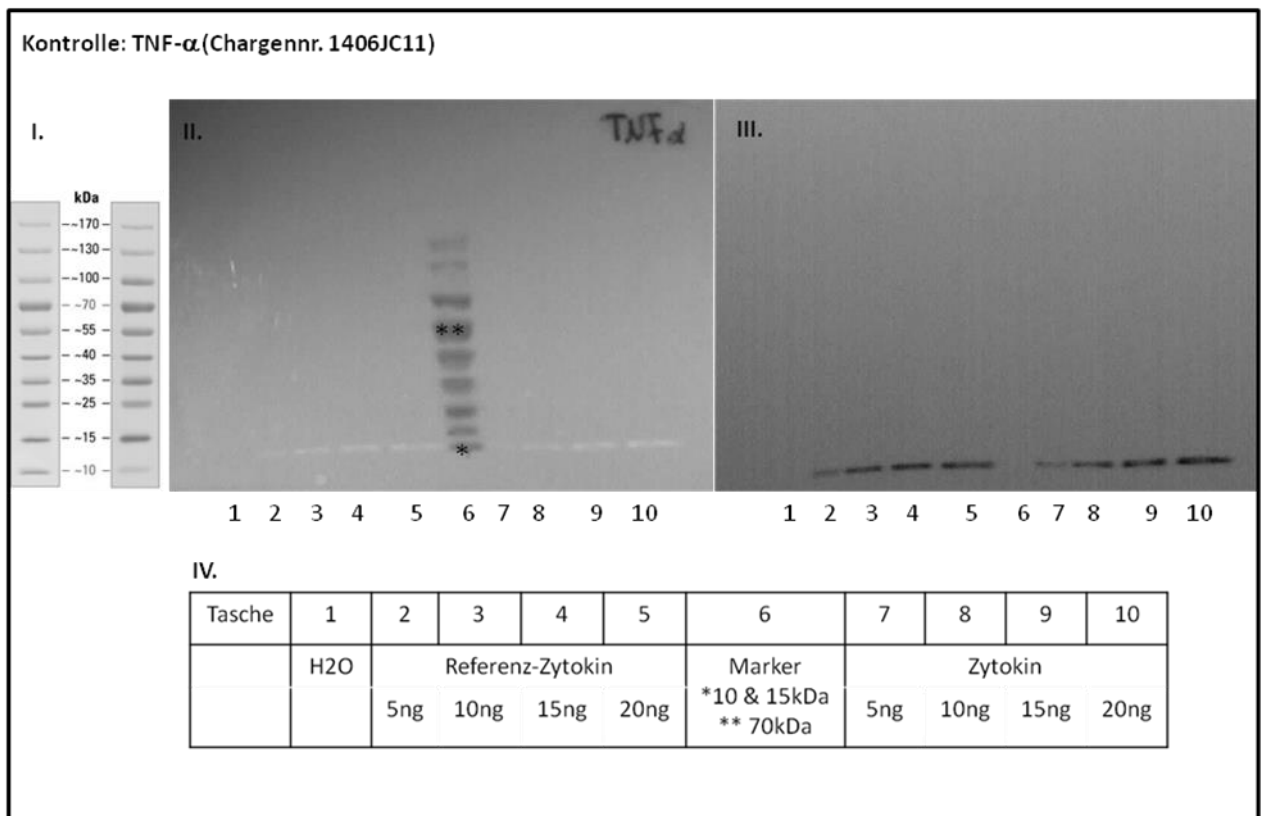
**Abb. 8: Analyse der Präzision der Vitalitätsbestimmung der DZ-Proben gemessen mit CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer.** Für jede DZ-Kultur (DZ LRSC 35 (a), 42 (b) und 57 (c)) sind die Einzelmesswerte (n=3) (Messung 1 blau, Messung 2 rot, Messung 3 grün) gemessen mit der jeweils angeführten Methode, der Mittelwert (x) (Legende d) sowie die Spannweite der Einzelmessungen (I) gezeigt.

Aus Tab. 18 geht hervor, dass FACS SPF und CASY TTC-150 im Vergleich zur Standard-Methode präzise Messergebnisse liefern (VarK  $\leq \pm 25\%$ , grau hinterlegt). FACS SPF liefert präzisere Ergebnisse (mittlere Abweichung 9,0%) als CASY TTC-150 (mittlere Abweichung 24,4%).

Tabelle 18: Präzision der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen gemessen mittels Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF.

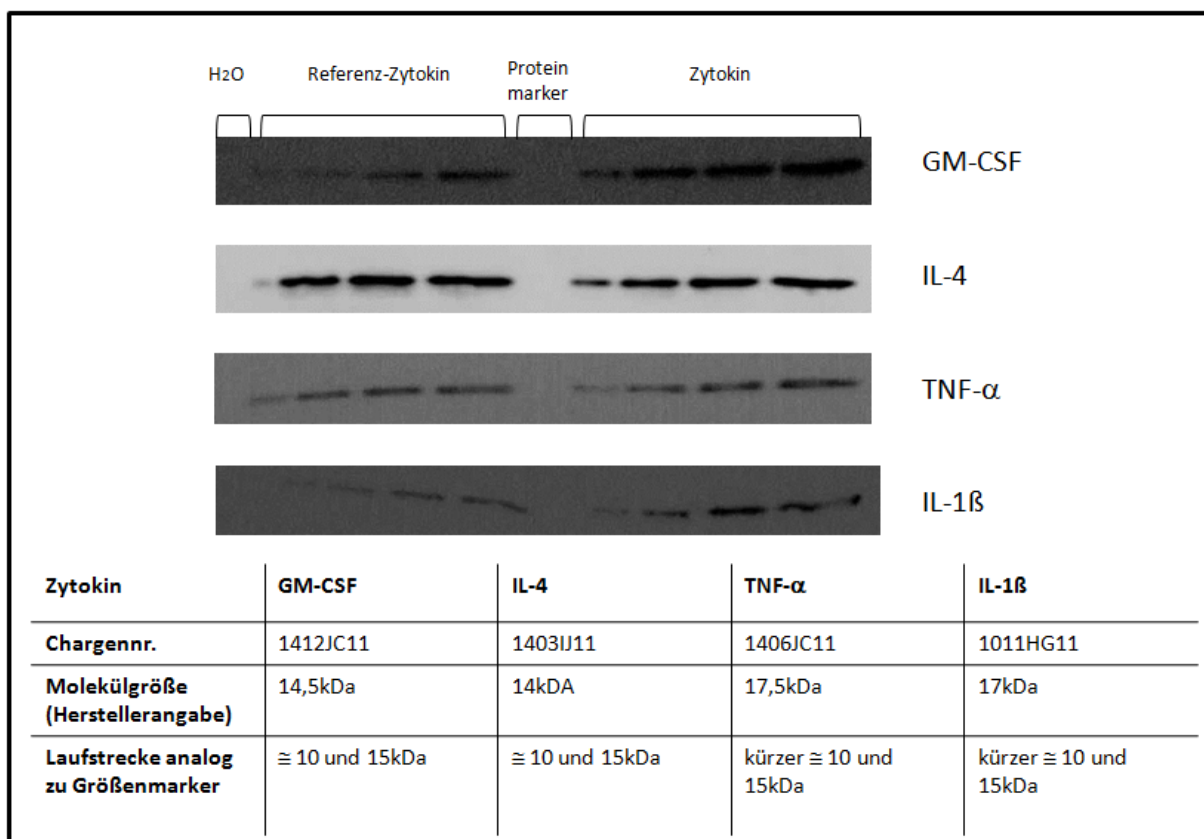
	DZLRSC 35 Mittelwert (%- Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	DZLRSC 42 Mittelwert (%-Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	DZLRSC 57 Mittelwert (%-Vitalität)	Abweichung von Standard- Methode (%)	Mittelwert Abweichung von Standard- Methode (%)
Neubauer- Zählkammer	77,5	-	75,1	-	92,4	-	-
CASY TTC- 150	52,4	32,4	64,7	13,9	67,6	26,8	24,4
FACS SPF	90,4	16,6	78,1	3,4	97,9	6,0	9,0

#### 4.2) Chargenkontrolle Zytokine



**Abb. 9: Ergebnisse der Chargenkontrolle von TNF- $\alpha$  (Chargenr. 1406JC11) analysiert mittels Western Blot.** Die Abbildung zeigt die Zusammenstellung von Marker und Western Blot-Ergebnis der Chargenkontrolle. I. Zeigt das vom Hersteller angegebene Auftrennungsmuster des Größenmarkers Nr. 26616 (nach: <http://www.piercenet.com/product/pageruler-prestained-protein-ladder-10-170k>). II. zeigt die Fotodokumentation der Western Blot-Membran belichtet mit weißem Licht. Hier sind der Marker deutlich, die Probenbanden schwach erkennbar. III. zeigt die Fotodokumentation der unbelichteten Western Blot-Membran. IV. zeigt die Beladung der Spuren (1-10).

Abb. 9 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Chargenkontrolle für TNF- $\alpha$ : Die Banden der Referenz- und Zytokine liegen in der Laufstrecke über denen der Größenmarker von 10kDa und 15kDa (diese Banden hatten sich bei Beendigung der Elektrophorese noch nicht aufgetrennt). Dies entspricht den Herstellerangaben zur Molekülgröße des TNF- $\alpha$  von 17,5kDa. Signale anderer Molekülgröße, welche auf eine Verunreinigung der Zytokine hinweisen könnten, finden sich nicht. Semiquantitativ zeigt sich, dass sich die Signale der in steigender Konzentration eingesetzten Zytokine bzw. Referenz-Zytokine proportional verhalten. Somit ist davon auszugehen, dass in den Zytokin-Proben die gleichen Wirkstoffmengen enthalten sind, wie in den Positivkontrollen.



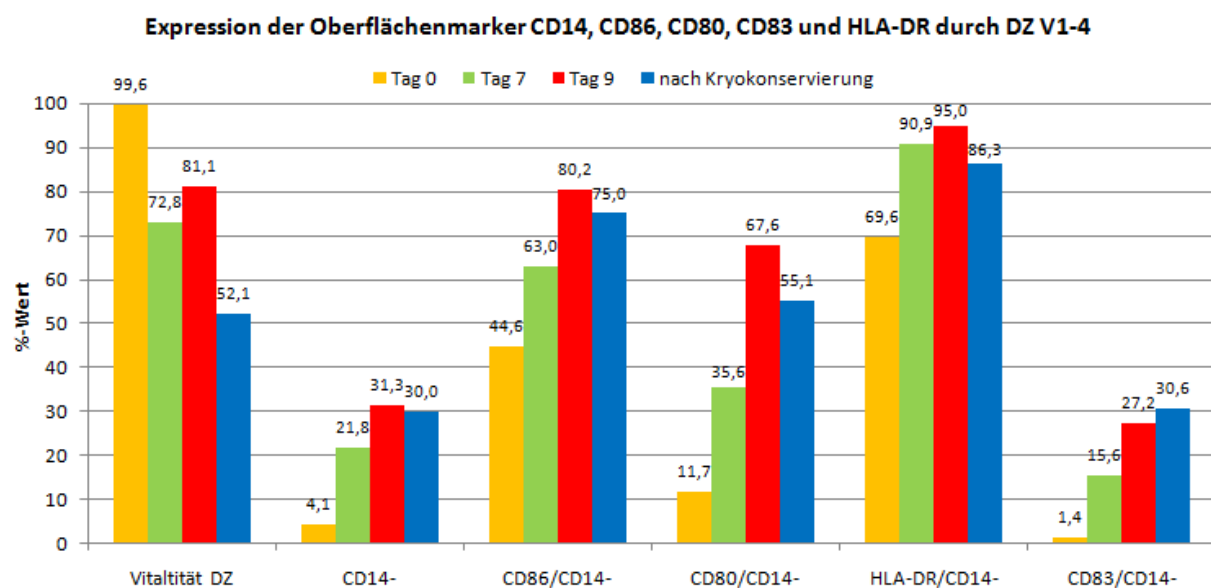
**Abb. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Chargenkontrolle mittels Western Blot aller zur DZ-Differenzierung benötigter Zytokine (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ).** Zytokine und Referenz-Zytokine verhalten sich hinsichtlich der Wanderungstrecke im elektrischen Feld und in der Verdünnungsreihe gleich (s. Bildausschnitte). Die Wanderungstrecke der Zytokine entspricht den Herstellerangaben bzgl. der jeweiligen Molekülgröße in Da (s. Tabelle).

Auch die Ergebnisse der Prüfung der übrigen Zytokine (GM-CSF, IL-4 und IL-1 $\beta$ ) lieferten bezüglich Molekülgröße, Vergleichbarkeit zum Referenz-Zytokin, semiquantitative Analyse

der enthaltenen Wirkstoffmengen und der Reinheit der Probe gleiche Ergebnisse. In Abb. 10 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Wanderungstrecke der jeweiligen Zytokine im Vergleich zum Marker entspricht jeweils dem vom Hersteller angegebenen Molekulargewicht. Hinsichtlich der Signalintensität und Wanderungstrecke gleichen sich Zytokin und Referenz-Zytokin in allen Verdünnungsstufen. Zusätzliche Banden konnten nicht detektiert werden.

#### 4.3) Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der dendritischen Zellen

Zur Immunphänotypisierung wurden die generierten DZs durchflusszytometrisch auf die Expression der Marker CD14, CD80, CD 83, CD 86, HLA-DR CCR7, CD1a und PD-L1 (=CD247) hin analysiert (s. Abb. 11-13).

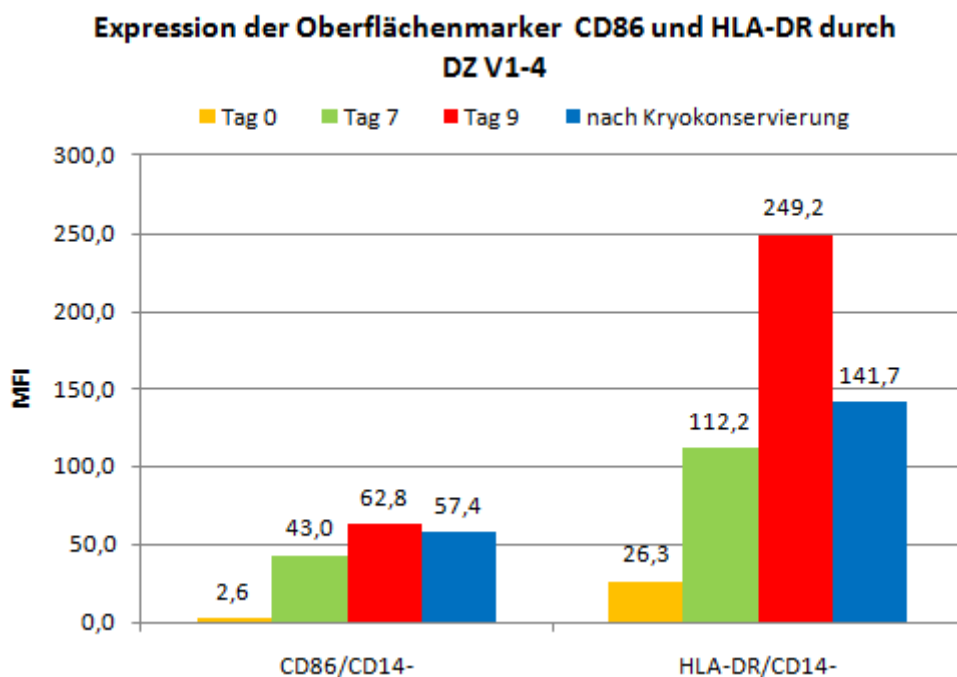


**Abb. 11: Ergebnisse der FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83 und HLA-DR.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler DZs für die Tage 0 (gelb), 7 (grün), 9 (rot) und nach Kryokonservierung (blau). Zusätzlich ist der Prozent-Anteil CD14-negativer Zellen (DZs) angezeigt sowie der Prozentanteil der CD14-negativen Zellen, welche zusätzlich für die Marker CD86, CD80, HLA-DR und CD83 positiv sind.

Aus Abb. 11 geht hervor, dass die Zellen an allen Zellkulturtagen und auch nach Kryokonservierung eine hohe Vitalität aufweisen. Mit zunehmender Zellkulturdauer steigt der Anteil der CD14-negativen Zellen (DZs) (Tag 0 4,1%; Tag 9 31,3%). Die Expression der Reifungsmarker CD86, CD80, HLA-DR und CD83 durch die CD14-negativen Zellen (DZs) steigt

mit zunehmender Zellkulturdauer. Da die Ausgangszellen (Tag 0) für die Marker CD86 und HLA-DR zu hohen Anteilen (44,6 %; 69,6%) positiv sind, wurde zusätzlich der MFI (s. 3.2.4) für diese Marker bestimmt. Abb. 12 zeigt die MFI-Werte der CD14-negativen Zellen (DZs) der Tage 0, 7, 9 und nach Kryokonservierung.

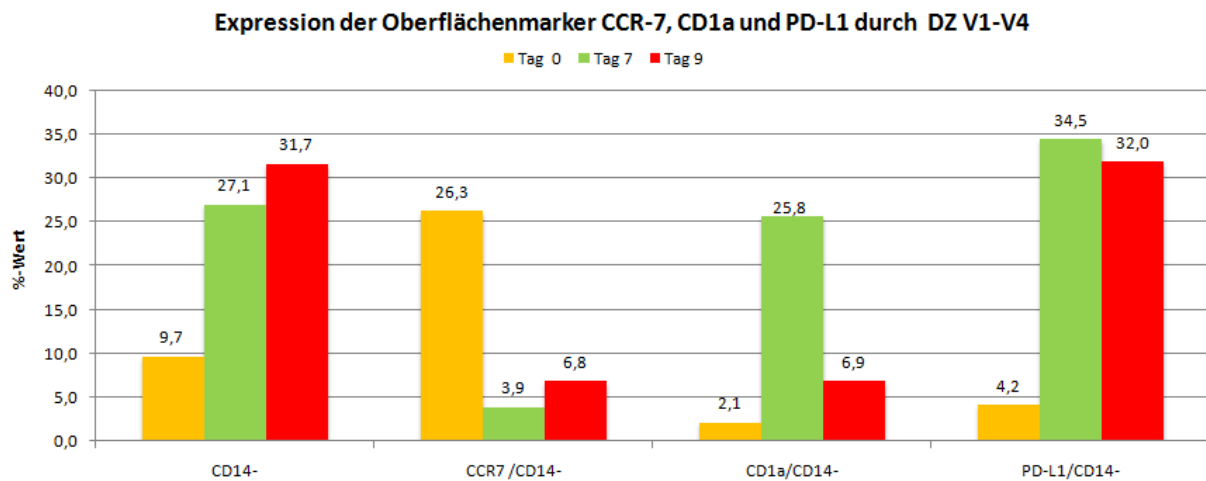
Hierdurch wird verdeutlicht, dass die CD14-negativen Zellen (DZs) die Marker CD86 und HLA-DR deutlich stärker exprimieren als die monozytären Zellen (Tag 0) (MFI CD86 Tag 0 2,6 gegenüber Tag 9 62,8; MFI HLA-DR Tag 0 26,3 gegenüber Tag 9 249,2), wenngleich der Prozentanteil der für diese Marker positiven Zellen (s. Abb. 11) primär einen weniger deutlichen Unterschied anzeigt. Zudem zeigt sich, dass der Phänotyp der exprimierten Oberflächenmarker auch nach Kryokonservierung stabil ist.



**Abb. 12: Ergebnisse der FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR.** Dargestellt ist der MFI der Marker CD86 und HLA-DR für die CD14-negativen Zellen (DZs). Untersucht wurden DZs von Tag 0 (gelb), 7 (grün), 9 (rot) und nach Kryokonservierung (blau).

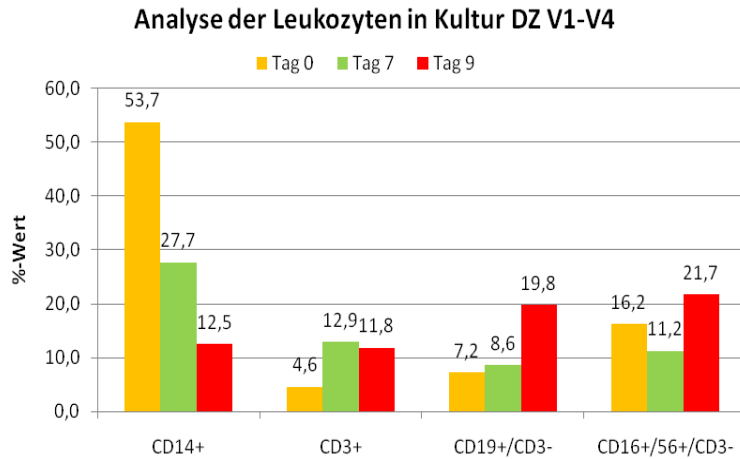
Abb. 13 zeigt die Mittelwerte der Expression der Oberflächenmarker CCR7, CD1a und PD-L1 durch die DZs aus V1-V4 je von Tag 0, 7 und 9. Der Gehalt CD14-negativer Zellen (DZs) steigt von Tag 0 (9,7%) bis Tag 9 (31,7%) kontinuierlich an. Diese CD14-negativen Zellen (DZs) exprimieren zu den folgenden Prozentanteilen die Marker CCR7, CD1a und PD-L1:

CCR7 ist an Tag 0 am stärksten (26,3%) und an den Tagen 7 (3,9%) und 9 (6,8%) schwächer ausgeprägt. CD1a ist an Tag 7 (25,8%) am höchsten und an den Tagen 9 (6,9%) und 0 (2,1%) schwächer ausgeprägt. PD-L1 ist an Tag 7 (34,5%) stärker ausgeprägt als an Tag 0 und 9 (Tag 0 4,2%; Tag 9 32,0%).



**Abb. 13: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmarker CCR7, CD1a und PD-L1 gemessen an DZs von V1-V4, je von Tag 0 (gelb), Tag 7 (grün) und Tag 9 (rot). Dargestellt ist der gemittelte Prozentanteil der in der Probe enthaltenen DZs (CD14-negativ) sowie der Prozentanteil der DZs (CD14-negative Zellen) die für die Marker CCR7, CD1a und PD-L1 positiv sind.**

Wie in 3.2.8) beschrieben wurden zusätzlich auch die Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen in den Kulturen analysiert (s. Abb. 14). Hier zeigt sich, dass durch die Apherese (s.3.1.5.1) die CD14-positiven Zellen mit einem Anteil von über 50% aus dem Spenderblut isoliert werden können. Ihre Anzahl nimmt während der 9 Tage Zellkultur deutlich ab (53,7% auf 12,5%). Die übrigen Leukozyten machen über die gesamte Kulturdauer maximal etwa ein Fünftel der Zellen in Kultur aus.



**Abb. 14: Ergebnisse der FACS-Analyse der übrigen Zell-Populationen in den DZ-Proben.** Analysiert wurden die Monozyten (CD14+), Lymphozyten (CD3-positive T-Zellen, CD3-negative und CD19-positive B-Zellen) und NK-Zellen (CD3-negativ und CD16/56-positiv) in den Zellkulturen DZ V1-V4 Tag 0 (gelb), 7 (grün) und 9 (rot).

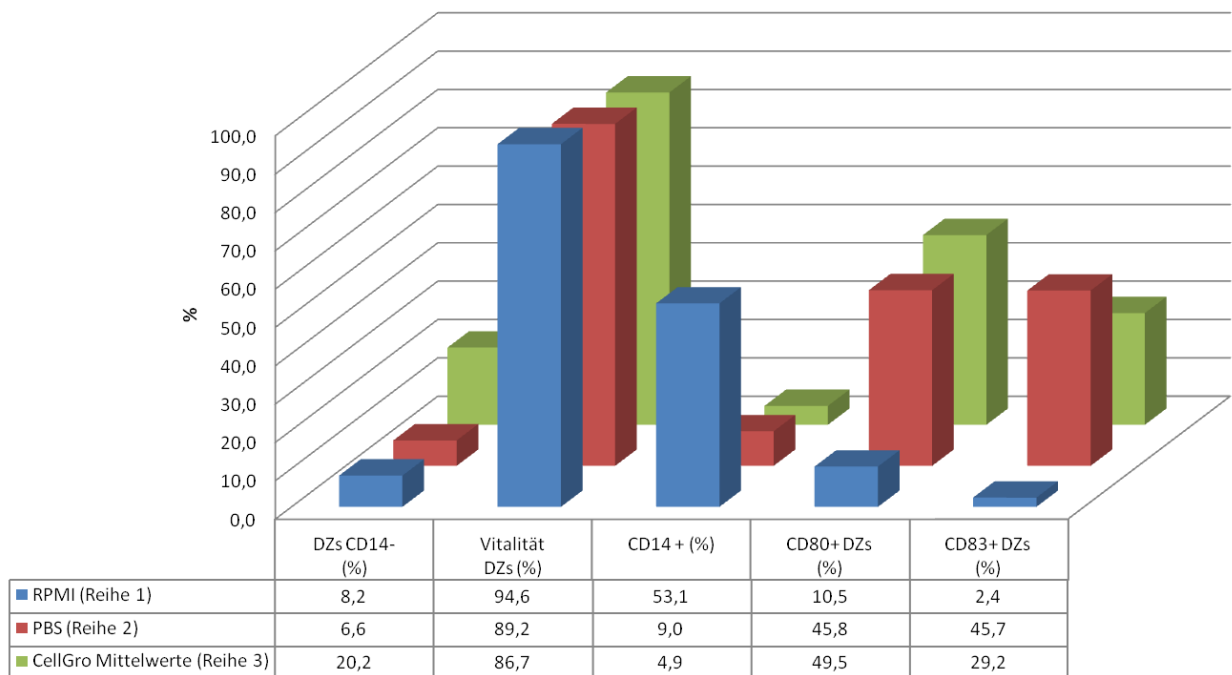
#### 4.4) Bio-Assay zur Qualitätskontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung

In Abb. 15 sind die Mittelwerte der Ergebnisse des Bio-Assay für die beiden angegebenen Chargen des CellGro-Zellkulturmediums dargestellt. Der höchste Gehalt an DZs nach Kultur wird im CellGro-Zellkulturmedium gemessen (20,2%). Im Vergleich dazu ist der DZ-Gehalt nach Kultur in den Vergleichsmedien (RPMI-Zellkultur-Medium 8,2%; PBS 6,6%) deutlich geringer. Auch CD14 ist im Vergleich zu den Vergleichsmedium (RPMI 53,1%; PBS 9,0%) geringer ausgeprägt. Die Vitalität der DZs nach Kultur im CellGro-Zellkulturmedium (86,7%) und die Expression der Reifungsmerker CD 80 (49,5%) und CD83 (29,2%) sind hoch.

Betrachtet man die Ergebnisse im Einzelnen (s. Tab. 19) fällt auf, dass bei Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen zur Prüfung einer Charge des Zellkulturmediums die Messergebnisse variieren, wobei die Ergebnisse ermittelt mit der gleichen Zellpopulation und unterschiedlichen CellGro-Chargen weniger unterschiedlich sind, als die ermittelt mit unterschiedlichen Zellpopulationen und der gleichen CellGro-Charge. So sind z.B. nach 48h-Zellkultur der Zellen aus DZ V1 31,1% (CellGro Chargennr. 1069X) bzw. 24,4% (CellGro Chargennr. 0882A) CD80-positiv. Die Zellen der Probe DZ V2 sind zu 68,3% bzw. 74,2% (CellGro Chargennr. 1069X bzw. 0882A) CD80 positiv (s. Tab. 19, grau hinterlegt).



Bio-Assay: Mittelwerte der Chargennr. 1069X und 0882A



**Abb. 15: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse des Bio-Assay.** Die Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD80 und CD83 sowie die Vitalität der DZs nach 48h Zellkultur in drei unterschiedlichen Medien wurden durchflusszytometrisch ermittelt: RPMI-Zellkultur-Medium (Reihe 1, blau), PBS (Reihe 2, rot) und CellGro-Zellkulturmedium (Reihe 3, grün).

*Tabelle 19: Ergebnisse des Bio-Assays von zwei Chargen des Zellkulturmediums (Chargennr. 1069X und 0882A) erhoben mit zwei Zellkulturen (DZ V1 und V2). Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelmessungen (n=3) für die angegebenen Messparameter.*

DZ-Kultur	Messparameter	CellGro 1069X	CellGro 0882A
<b>DZ V1 Tag 0</b>	DZs CD14- (%)	7,6	11,5
	Vitalität DZs (%)	71,3	93,1
	CD14 + (%)	2	2
	CD80+ DZs (%)	31,1	24,4
	CD83+ DZs (%)	11	29,3
<b>DZ V2Tag 0</b>	DZs CD14- (%)	29,1	32,4
	Vitalität DZs (%)	94	88,3
	CD14 + (%)	8,2	7,5
	CD80+ DZs (%)	68,3	74,2
	CD83+ DZs (%)	36,5	39,8

#### 4.5) Proteingehaltbestimmung des Tumorlysates

Tabelle 20: Ergebnisse der spektralphotometrischen Proteingehaltbestimmung für T6933.

T6933 (500mg in 10ml NaCl)				
Verdünnung	1:10	1:20	1:50	
1. Messung (µg/ml)	329,2	232,2	194,8	
2. Messung (µg/ml)	354,2	241,7	201	
3. Messung (µg/ml)	269,8	394,8	188,5	
Mittelwert (µg/ml)	351,1	289,6	194,8	
Verdünnungsfaktor bereinigt (µg/ml)	3511	5791	9738	→Proteingehalt 6347µg/ml

Wie aus Tab. 20 hervorgeht, enthält das TL T6933 6347µg Protein /ml. Anhand dieser Konzentration ist es möglich zu berechnen, welche Volumina TL eingesetzt werden müssen, um eine definierte Menge an TL-Proteinen zu erhalten.

Die Berechnung lautet wie folgt:

6347µg Protein enthalten in 1ml TL

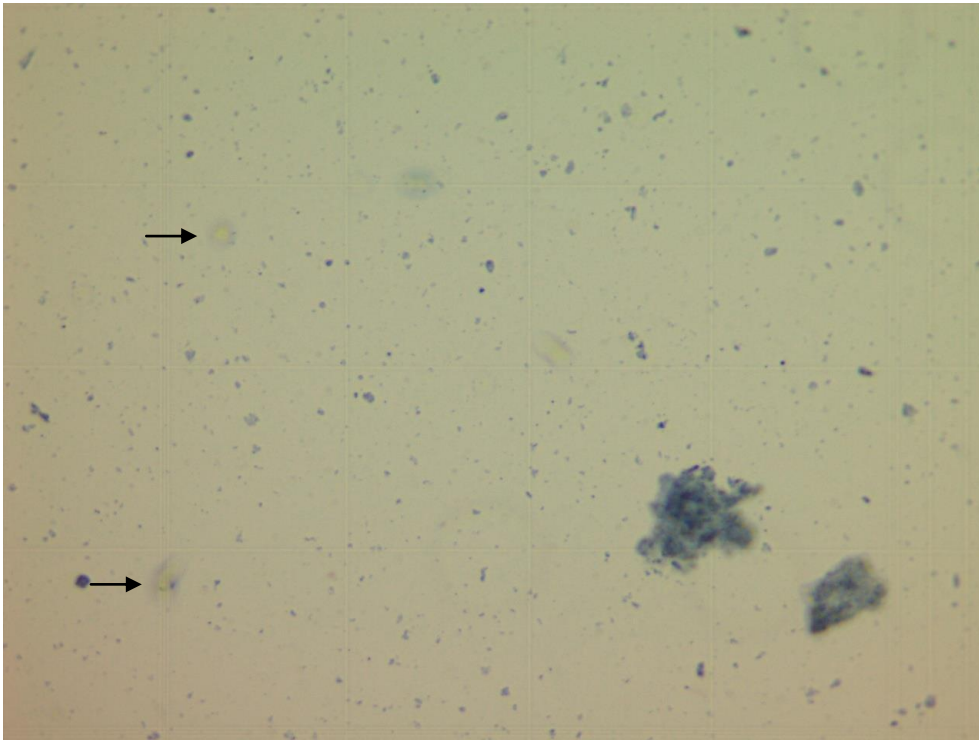
1µg Protein enthalten in 1/6347ml TL

xµg Protein enthalten in  $x \cdot (1/6317)$ ml TL.

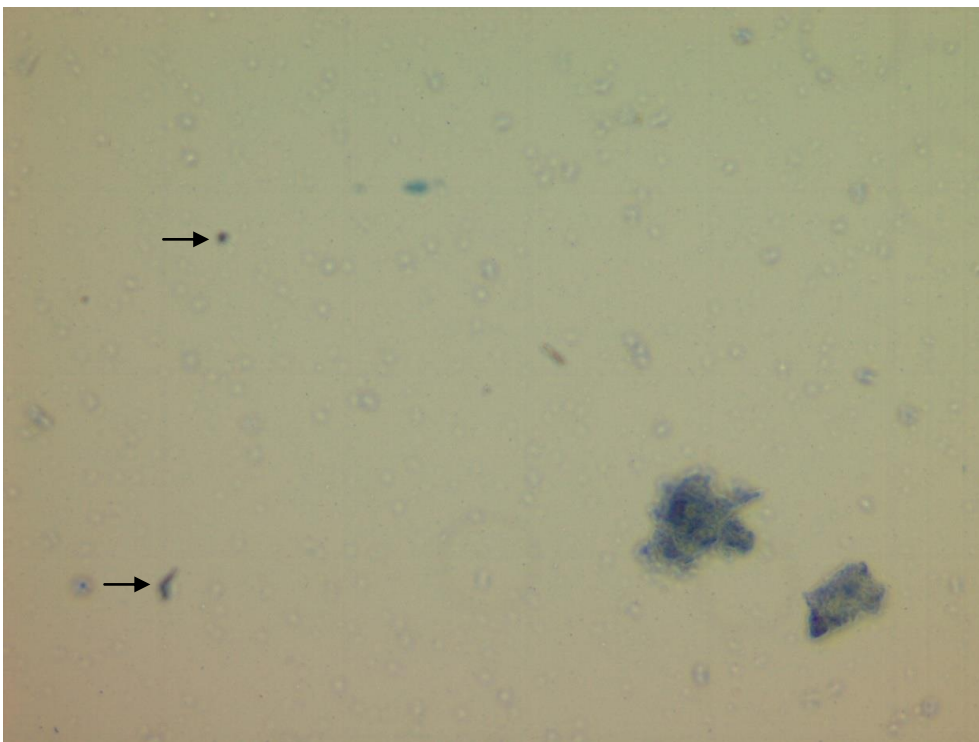
#### 4.6) Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates

##### 4.6.1) Trypanblau-Färbung des Tumorlysates

Die Abb. 16 zeigt exemplarisch die fotografische Aufnahme eines Quadranten der Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung des TL T6933. Es zeigten sich mikroskopisch zahlreiche inhomogene Fragmente. Die Abgrenzung zwischen Gewebs- und Zellfragment bzw. kompletter Zelle fiel beim Auszählen schwer, was sich auch in den z.T. erheblichen Unterschieden der Zählergebnisse (s. Tab. 21) zeigt. Zudem erscheinen in der Aufnahmeebene der Abb. 16 einige Strukturen (→) als ungefärbt und klar abgrenzbar und könnten so als „vitale Zelle“ gewertet werden. Änderte man jedoch am Mikroskop die Ebene des Präparates (Abb. 17), so erschienen auch diese Strukturen(→) bläulich und sind somit als „avital“ zu werten.



**Abb. 16: Fotografische Aufnahme eines Quadranten der Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung des TLT6933 zum Avitalitätsnachweis. Die schwarzen Pfeile (→) zeigen auf klare, d.h. nicht trypanblau-gefärbte, gut abgrenzbare Strukturen.**

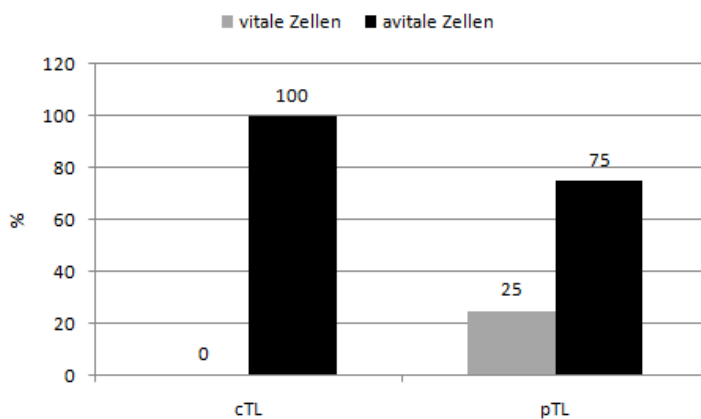


**Abb. 17: Fotografische Aufnahme des gleichen Quadranten wie in Abb. 23 der Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung des TLT6933 zum Avitalitätsnachweis, jedoch in veränderter Ebene. Die zuvor als möglicherweise ungefärbte Zellen (→) gewerteten Strukturen erscheinen in dieser Ebene blau-gefärbt.**

Tabelle 21: Auszählungsergebnisse des trypanblau-gefärbten TL T6933 in der Neubauer-Zählkammer, ermittelt von drei unabhängigen Untersuchern.

T6933		Quadrant				Mittelwert	10 <sup>6</sup> Zellen/ml	% -vital
		1	2	3	4			
Untersucher 1	vital	0	0	0	0	0	0,0	
	avital	301	434	428	410	393,3	7,9	
	gesamt	301	434	428	410	393,3	7,9	0
Untersucher 2	vital	0	0	0	0	0	0,0	
	avital	353	341	299	274	316,8	6,3	
	gesamt	353	341	299	274	316,8	6,3	0
Untersucher 3	vital	0	0	0	0	0	0,0	
	avital	35	31	30	33	32,3	0,7	
	gesamt	35	31	30	33	32,3	0,7	0

Die Ergebnisse der Auszählung variieren von  $6,45 \times 10^5$  bis  $7,87 \times 10^6$  Zellen/ml, wobei kein Untersucher vitale Zellen detektieren konnte (s. Tab. 21). Die Avitalität des TL T6933 liegt somit bei 100%. Im Vergleich dazu wurden, wie aus Abb. 18 hervorgeht, bei der Auswertung des pTL im Mittel 25% vitale Zellen durch drei unabhängige Untersucher detektiert.



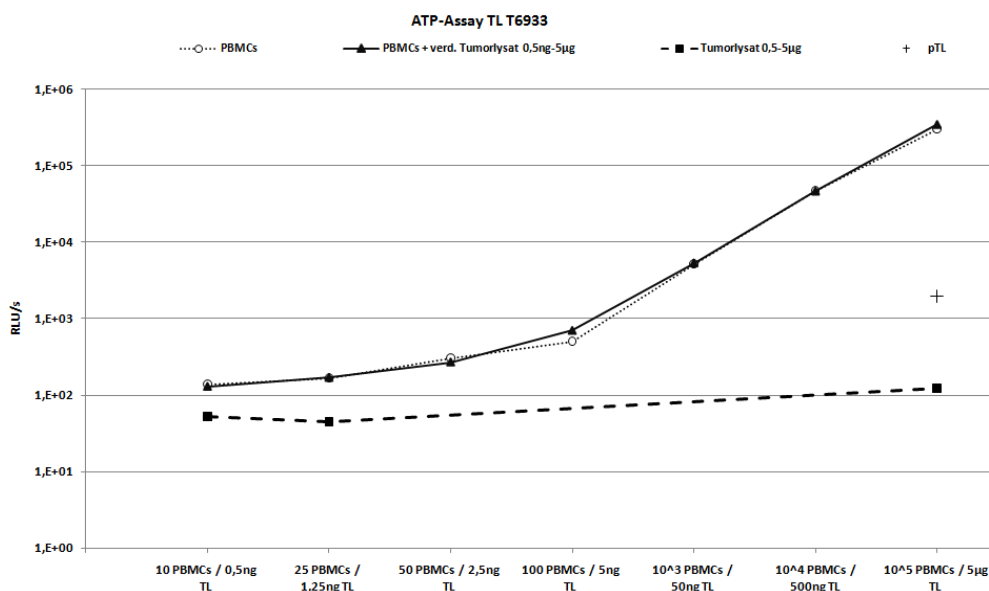
**Abb. 18: Auswertungsergebnisse der Trypanblaufärbung des cTL und pTL.** Dargestellt sind die Mittelwerte der durch drei unabhängige Untersucher ausgezählten vitalen/avitalen Zellen im cTL und pTL. Im cTL konnten keine, im pTL 25% vitale Zellen detektiert werden.

Um die Trypanblau-Färbung als Methode zum Nachweis der Avitalität des TL zu validieren, wurde wegen der z.T. sehr unterschiedlichen Auszählungsergebnisse und der

Schwierigkeiten der eindeutigen Dokumentation drei weitere Methode hinzugezogen – ein ATP-Assay, die Analyse mittels CASY TTC-150 und mittels Morphologi G3.

#### 4.6.2) ATP-Assay zur Validierung des Avitalitätsnachweises des Tumorlysates mittels Trypanblau-Färbung

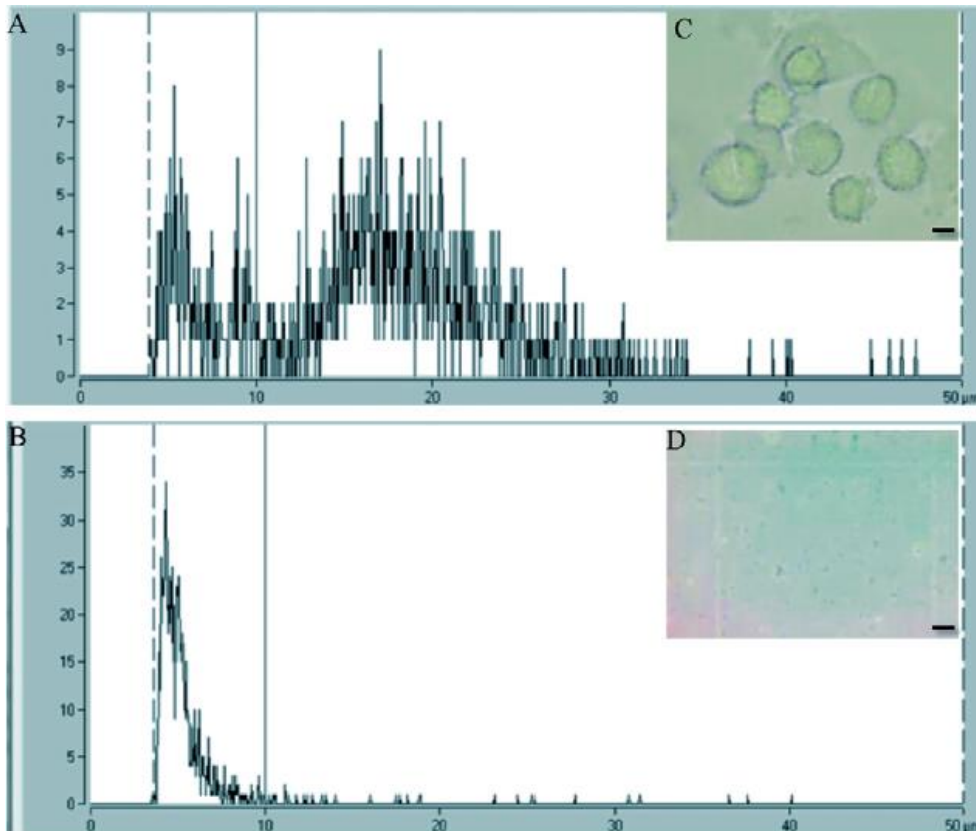
Abb. 19 zeigt die Ergebnisse des ATP-Assay. Die RLU/s-Signale des TL liegen für alle eingesetzten Proteinmengen (0,5ng bis 5g) unter dem RLU/s-Signal von 10 PBMCs und somit weit unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze des Assay (ATP-Gehalt von 50 HEK-293 Zellen (Promega Corporation 2012)). Die emittierte Lichtmenge der PBMCs allein und in Kombination mit TL zeigte keinen Unterschied, die Kurven überlappen. Das Signal steigt hier zudem proportional mit den eingesetzten PBMCs an. Das Signal des pTL liegt deutlich über dem des cTL bei gleicher Proteinkonzentration. Dies zeigt, dass im TL keine ATP-enthaltenden Zellen mehr vorhanden sind oder anders ausgedrückt, dass keine metabolisch aktiven Zellen im TL vorliegen. Die PBMCs hingegen liegen als metabolisch aktive Zellen vor.



**Abb. 19: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ATP-Assay.** Der ATP-Gehalt der TL (■) liegt bei allen eingesetzten TL-Mengen (0,5ng-5µg) unter der Nachweisgrenze des Assay (ATP-Gehalt von 50 HEK-293 Zellen). Der ATP-Gehalt der PBMCs (○) steigt mit zunehmender Zellzahl (10-10<sup>5</sup> PBMCs) an. Der ATP-Gehalt des Gemisches von TL und PBMCs (▲) steigt mit zunehmender Zellzahl (10-10<sup>5</sup> PBMCs) und TL-Mengen (0,5ng-5µg) an. Die Signale von PBMCs allein (○) und dem Gemisch aus PBMCs und TL (▲) sind kongruent. Das Signal des pTL (+) liegt deutlich über dem des cTL bei gleicher Proteinkonzentration (5µg).

#### 4.6.3) Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150

Die Analyse mittels CASY TTC-150 (s. Abb.20) ergab für die ITC-Probe, dass 87,5% der enthaltenen Partikel über 10 $\mu\text{m}$  groß waren (vital). Die in der cTL-Probe enthaltenen Partikel waren zu 78,7% kleiner als 10 $\mu\text{m}$  (avital). Lichtmikroskopisch zeigen sich im cTL zahlreiche inhomogene Fragmente, im ITC liegen große, runde und scharf begrenzte Strukturen vor.

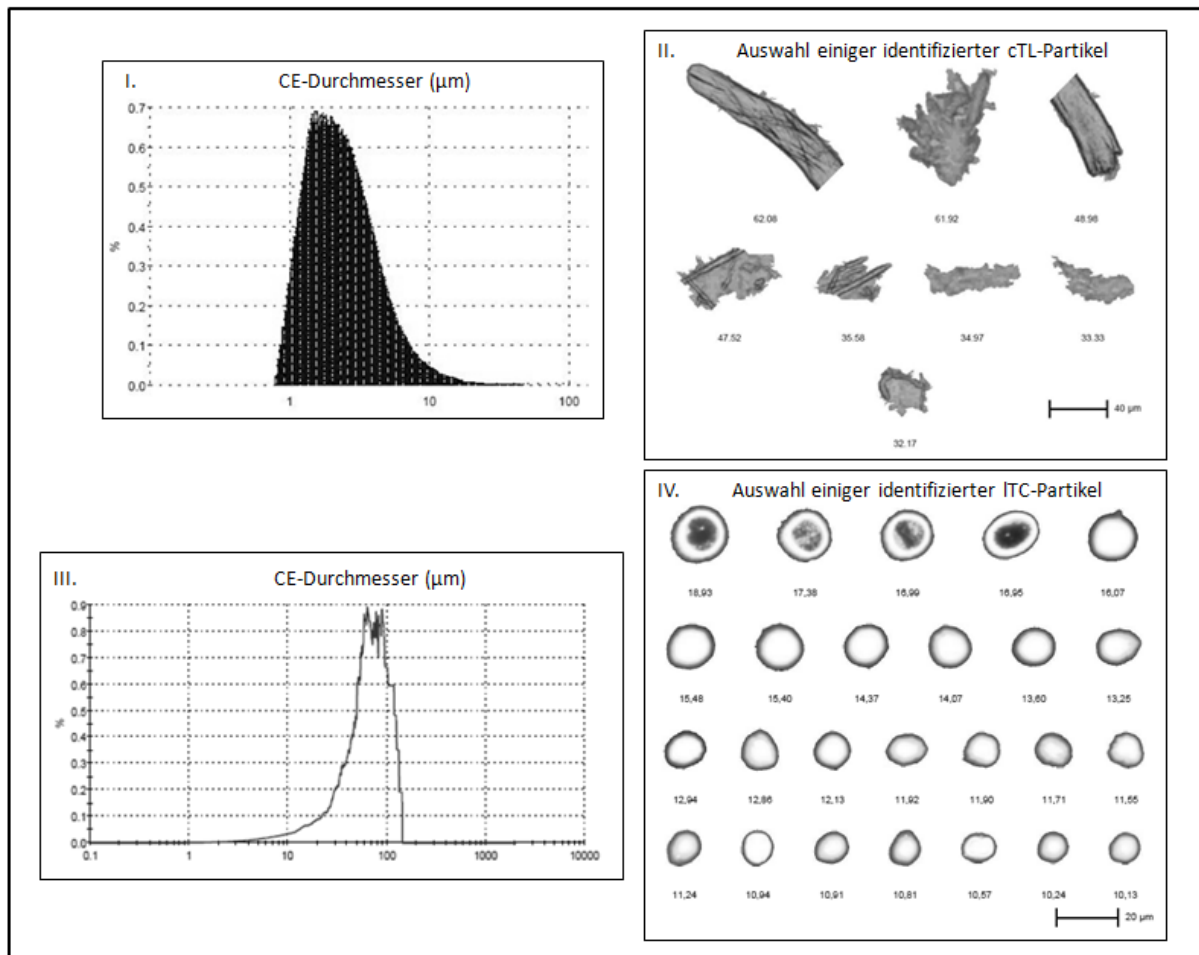


**Abb. 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150.** Dargestellt sind die Ergebnisse CASY TTC-150-Messung des ITC (A) und des cTL (B). Die gestrichelte Senkrechte stellt die Grenze zwischen Zelltrümmern (links der gestrichelten Senkrechten) und toten Zellen (rechts der gestrichelten Senkrechten) dar. Die durchgehende Senkrechte stellt die Grenze zwischen toten Zellen (links der durchgehenden Senkrechten) und lebenden Zellen (rechts der durchgehenden Senkrechten) dar. Zusätzlich sind lichtmikroskopische Aufnahmen von ungefärbten Proben des ITC (C) und des cTL (D) dargestellt (Messkala=10 $\mu\text{m}$ ).

#### 4.6.4) Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3

Die Analyse mittels Morphologi G3 (s. Abb. 21) ergab, dass im cTL über 95% der Partikel einen CE-Durchmesser  $\leq 10\mu\text{m}$  aufweisen. Der größte erfasste CE-Durchmesser lag bei 62,1 $\mu\text{m}$ . Die Partikel im ITC waren deutlich größer, mit CE-Werten bis 138 $\mu\text{m}$ . Anhand der

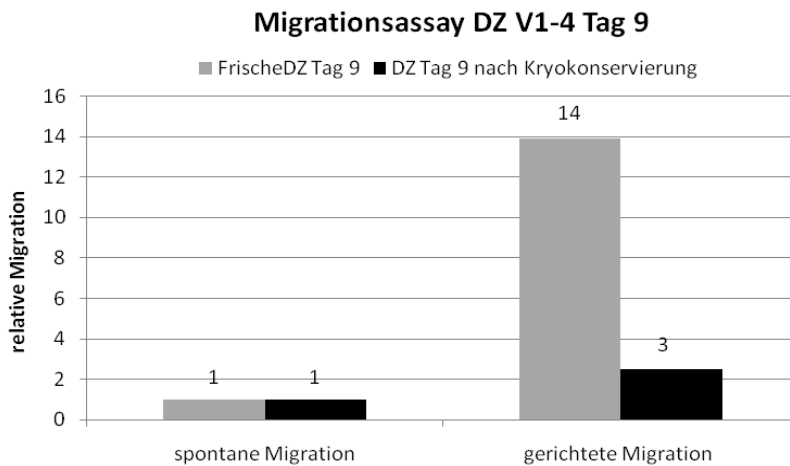
Bilder einiger ausgewählter Partikel zeigt sich zudem, dass die ITC-Partikel relativ rund und homogen sind und eine gleichmäßige Oberfläche aufweisen. Die cTL-Partikel dagegen sind deutlich inhomogen und weisen unregelmäßige Oberflächen auf.



**Abb.21: Ergebnisse der Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3.** Dargestellt ist die Größen-Verteilung (CE-Durchmesser) aller in den cTL-(I.) und ITC-(III.) Proben enthaltenen Partikel. Zudem sind Bilder einiger ausgewählter Partikel aus den cTL-(II.) und ITC-(IV.) Proben dargestellt.

#### 4.7) Migrations-Assay

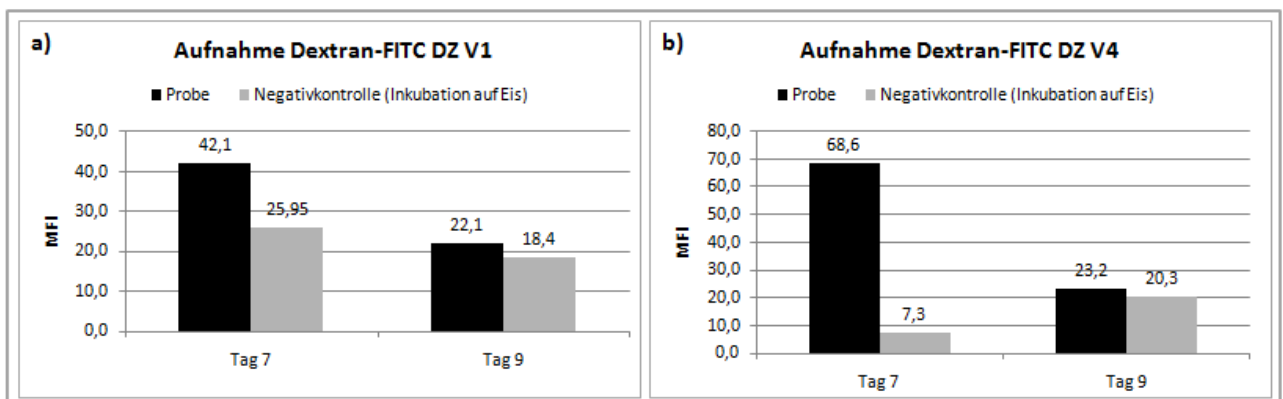
Die DZs zeigen unter Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Stimulation ein erhöhtes Migrationsverhalten (s. Abb. 22). Hierbei weisen die DZs nach Kryokonservierung im Vergleich zu den frischen DZs eine verringerte gerichtete Migration auf, welche jedoch trotzdem der Endproduktspezifikation der Vakzine entspricht (s. Anlage 2).



**Abb. 22: Ergebnisse des Migrations-Assay mit Zellen aus DZ V1-4 Tag 9.** Die Abbildung zeigt das Verhältnis spontan migrierter DZs (ohne Chemokin-Stimulation, links) zu den gerichtet migrierten DZs (mit Chemokin-Stimulation, rechts) als relative Migration je vor Kryokonservierung (schwarze Balken) und nach Kryokonservierung (graue Balken).

#### 4.8) Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen

Aus Abb. 23 geht hervor, dass die unreifen DZs (Tag 7) deutlich mehr Dextran-FITC-Moleküle aufnehmen, als die reifen DZs (Tag 9): Der MFI von FITC ist bei DZ V1 (Abb. 23 a)) Tag 7 (42,1) fast doppelt so hoch wie an Tag 9 (22,1); bei DZ V4 (Abb. 23 b)) Tag 7 (68,6) ist er fast dreimal so hoch wie an Tag 9 (23,2).

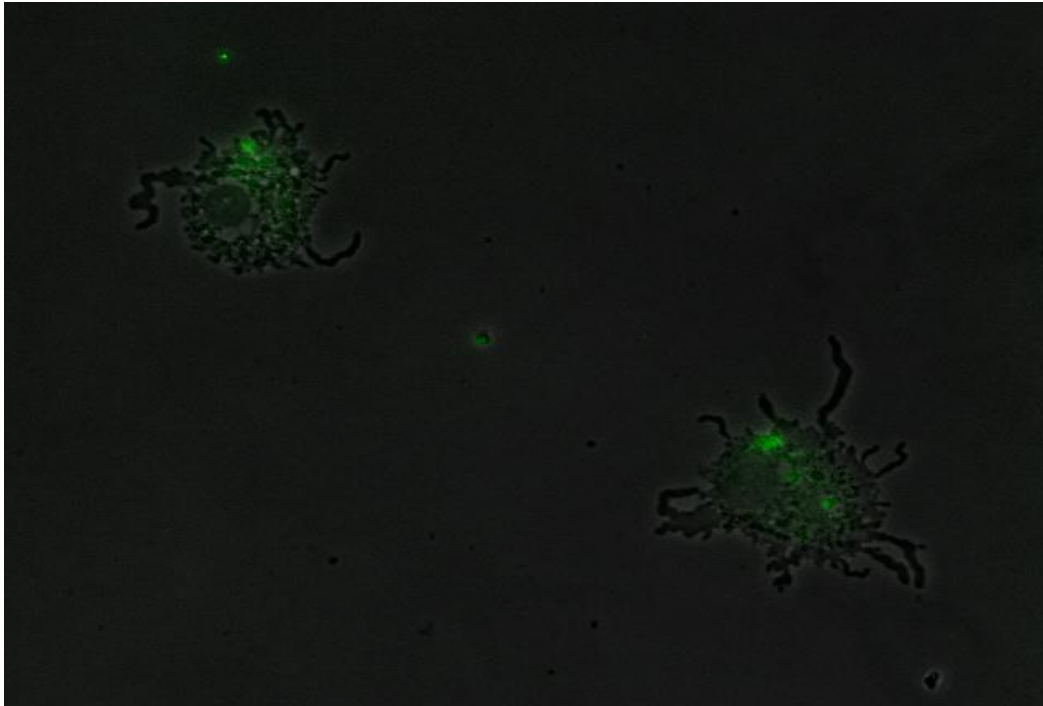


**Abb. 23: Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Aufnahme von Dextran-FITC durch Zellen von DZ V1(a) und DZ V4 (b) Tag 7 und Tag 9.** Dargestellt ist die MFI von FITC sowohl der Proben (schwarz), als auch der Negativkontrollen (grau).

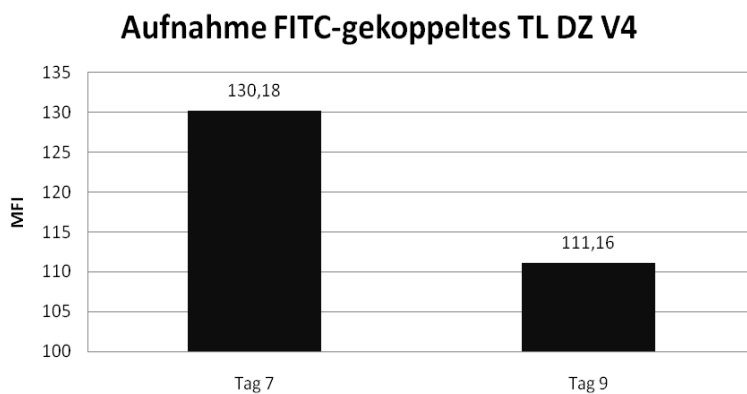


#### 4.9) Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem Tumorlysat durch die dendritischen Zellen

Aus Abb. 24 geht hervor, dass die unreifen DZs (Tag 7) das FITC-gekoppelte TL nach intrazellulär aufnehmen. Abb. 25 zeigt, dass die unreifen DZs (Tag 7, MFI 130,18) eine höhere Aufnahme von TL-FITC aufweisen, als die reifen DZs (Tag 9, MFI 111,16).



**Abb.24: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Aufnahme von FITC-markiertem TL durch die DZs.** Gezeigt sind DZs von V4 Tag 7 nach Aufnahme von FITC (grünes Signal)-gekoppeltem TL in 40x Vergrößerung.



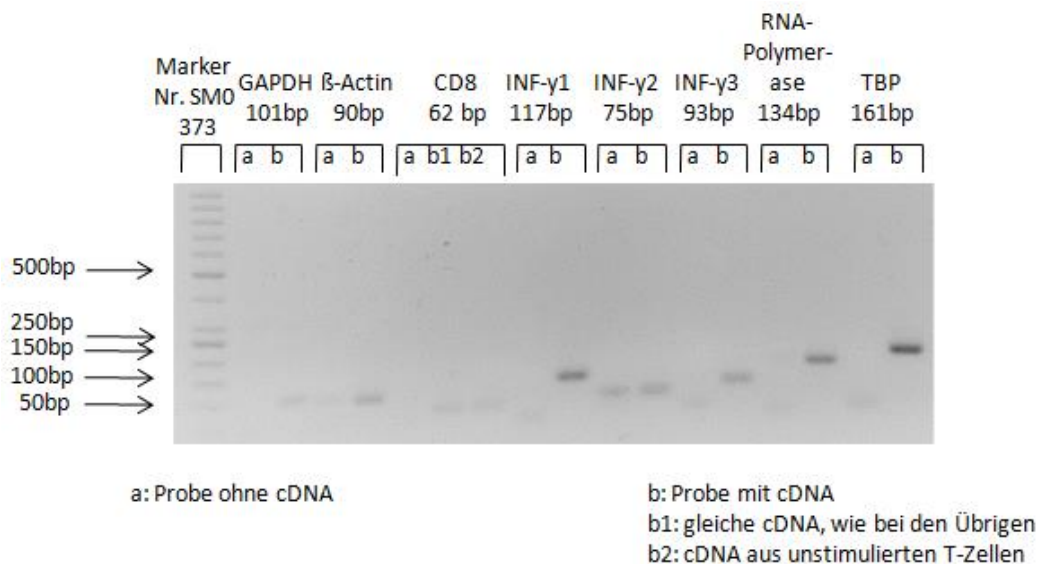
**Abb. 25: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem TL.** Gezeigt ist die MFI für FITC der Zellen von DZ V4 Tag 7 (unreife DZs) und Tag 9 (reife DZs) nach Inkubation mit FITC-markiertem TL.

## 4.10) PCR-Analyse der Expression von Interferon- $\gamma$ in CD8-positiven T-Zellen

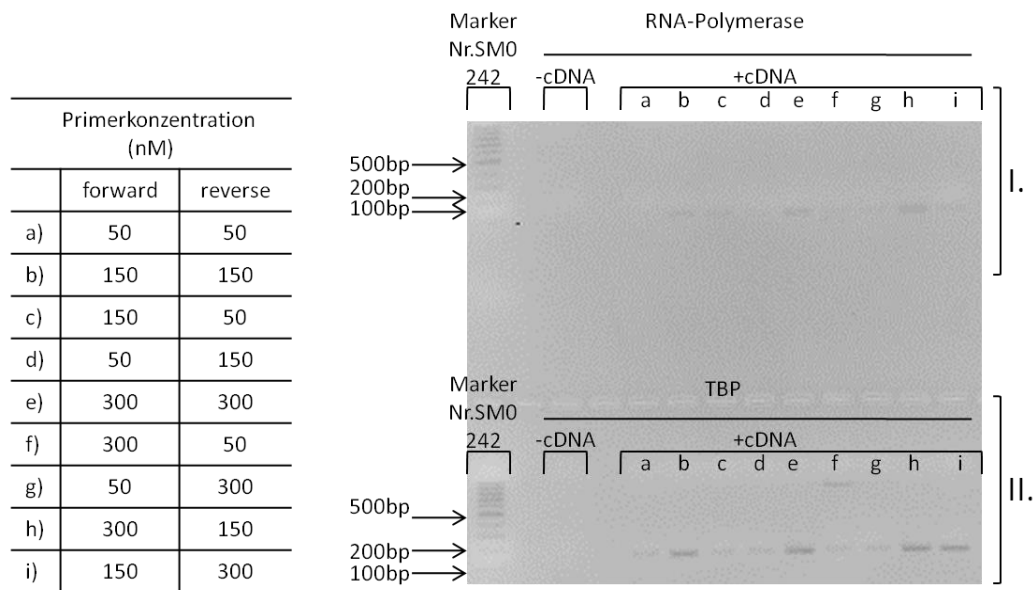
### 4.10.1) Test der Primer und Optimierung der PCR-Bedingungen

Aus Abb.26 geht hervor, dass für alle Ziel- und House-Keeping-Gene Banden in den Proben-Spuren (b) detektierbar sind, deren Länge der Länge der Zielgene entspricht, wobei GAPDH (Spur 3) und CD8 (in beiden Proben (b1 und b2) Spur 7 und 8) sehr schwache Signale aufweisen. Die Negativkontrolle von INF- $\gamma$ 2 (Spur 11) ist wiederholt positiv (das Primerpaar wurde zuvor neu angesetzt). Dies lässt auf unspezifische Bindungen rückschließen, sodass dieses Primerpaar zur weiteren Analyse nicht mehr eingesetzt wurde. Auch GAPDH und  $\beta$ -Actin wurden im Verlauf nicht weiter eingesetzt, da ihre Signale deutlich schwächer waren, als die von RNA-Polymerase und TBP. Die Ergebnisse der vorangegangenen Optimierungsschritte sind nicht dargestellt.

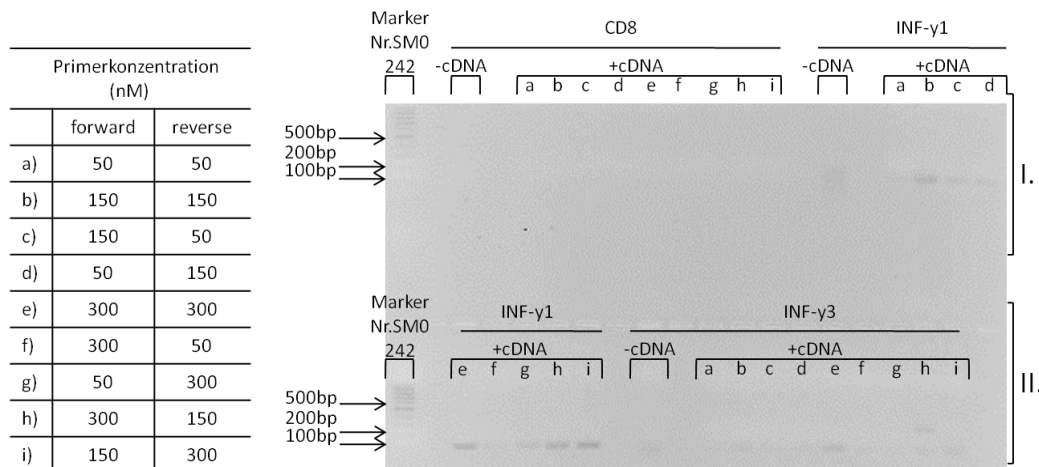
Abb. 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung zur Optimierung der Primer-Konzentrationen. Zusammengefasst zeigte sich hier, dass für alle untersuchten Zielgene außer CD8 die Ansätze b) (je 150nM Primer) und e) (je 300nM Primer) gut detektierbare Banden liefern und somit zur PCR eingesetzt werden können.



**Abb. 26: Gel-Dokumentation der PCR zur Etablierung einer PCR-Methode zum Nachweis der Expression von INF- $\gamma$  durch CD8 positive T-Zellen.** Spur 1: DNA-Marker SMO 373. Spur 2-5 und 9-18: Negativkontrollen (a) und Proben (b) für die obenstehenden Primer (GAPDH,  $\beta$ -Actin, INF- $\gamma$ 1, INF- $\gamma$ 2, INF- $\gamma$ 3). Spur 6-8: Negativkontrolle (a) und Probe mit gleicher cDNA (b1) wie bei den zuvor genannten Primern, sowie mit cDNA unstimulierter CD8-positiver Zellen (b2) für CD8. Die Größenangaben der Marker-Banden und die der Amplifikationsprodukte sind nach Herstellerangaben bzw. nach Angaben der designten Primer beschriftet.



**Abb. 27: Gel-Dokumentation der PCR zur Optimierung der einzusetzenden Primer-Konzentrationen (1).** Die Spuren für RNA-Polymerase (I.) enthalten folgende Proben: Spur 1: DNA-Marke SM0242. Spur 3: Negativkontrolle. Spur 5-13: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen (a-i). Die Spuren für TBP (II.) enthalten folgende Proben: Spur 1: DNA-Marke SM0242. Spur 3: Negativkontrolle. Spur 5-13: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen (a-i). Die Primer-Konzentrationen (forward und reverse Primer) variieren, wie in der linksstehenden Tabelle angegeben (a-i). Die Größenangaben der Marker-Banden sind nach Herstellerangaben beschriftet.



**Abb. 28: Gel-Dokumentation der PCR zur Optimierung der einzusetzenden Primer-Konzentrationen (2).** Spur 1: Marker SM0 242. Spur 3: Negativkontrolle CD8. Spur 5-13: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen CD8(a-i). Spur 15: Negativkontrolle INF- $\gamma$ 1. Spur 17-20: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen INF- $\gamma$ 1 (a-d). In der unteren Gel-Reihe (II.) sind folgende Proben aufgetragen: Spur 1: Marker SM0 242. Spur 3-7: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen INF- $\gamma$ 1 (e-i). Spur 9: Negativkontrolle INF- $\gamma$ 3. Spur 11-19: Proben mit variierenden Primer-Konzentrationen INF- $\gamma$ 3 (a-i). Die Primer-Konzentrationen (forward und reverse Primer) variieren, wie in der linksstehenden Tabelle angegeben (a-i). Die Größenangaben der Marker-Banden sind nach Herstellerangaben beschriftet.

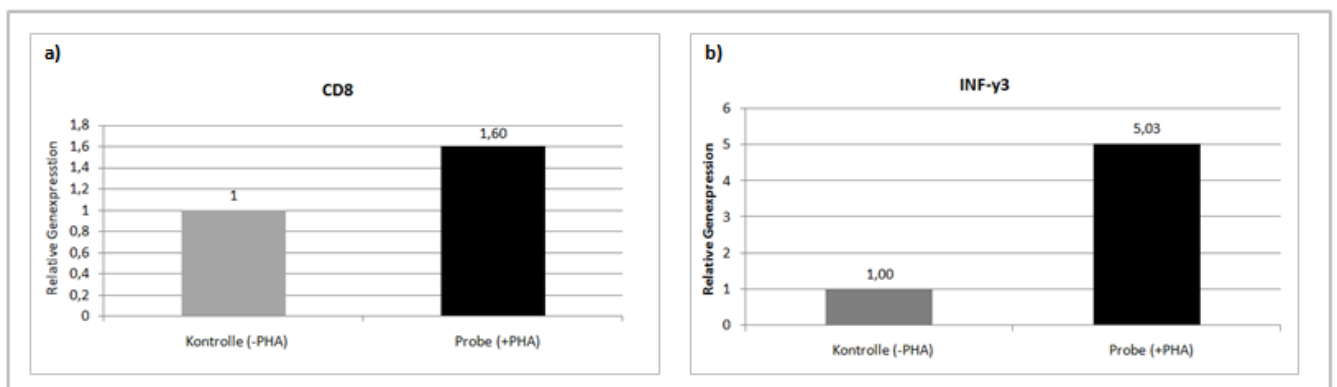
#### 4.10.2) Quantitative Real-Time PCR

Tabelle 22: Ergebnis der qRT-PCR, in welcher cDNA, gewonnen aus mit PHA stimulierten (Probe) und unstimulierten (Kontrolle) T-Zellen, als Matrize eingesetzt wurde.

Zielgen	CT-Wert Probe	CT-Wert Kontrolle	Blank
GAPDH	24,6	24,9	positiv
$\beta$ -Actin	22,3	23,4	positiv
CD8	26,2	27,2	negativ
INF-y1	31,9	37,3	positiv
INF-y2	32,3	35,0	positiv
INF-y3	31,7	36,2	negativ
PNA-Polymerase	26,7	26,9	positiv
TBP	29,1	29,4	negativ

Basierend auf dem optimierten PCR-Protokoll aus 4.11.1) wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um zu prüfen, ob diese nach dem optimierten PCR-Protokoll durchgeführt werden kann. Tab. 22 zeigt die CT-Ergebnisse der qRT PCR (eingesetzte cDNA-Menge 1 $\mu$ l (1:10 mit H<sub>2</sub>O (Nuklease-frei) verdünnt); Anlagerungs-Temperatur 58,5°C; PCR-Zyklen 45; Primer-Konzentration (forward und reverse Primer) je 500nM).

In Abb. 29 sind die „relativen Genexpressionen“ von CD8 und INF-y3 normiert auf TBP dargestellt. Dabei wird der Expression des Zielgens in unstimulierten Zellen der Wert 1 zugeordnet, und die Expression in den stimulierten Zellen als Vielfaches davor berechnet.



**Abb. 29: Ergebnis der CD8 (a) und INF-y3 (b) Expression stimulierter und unstimulierter T-Zellen gemessen mit einer qRT-PCR mit CD8-spezifischen Primern. Als Matrize diente cDNA isoliert aus stimulierten (+PHA) und unstimulierten (-PHA) T-Zellen. Die Abbildung zeigt das Verhältnis der relativen CD8- (a) bzw. INF-y3- (b) Expression von unstimulierten (grau) gegenüber stimulierten T-Zellen (schwarz), wobei die relative Expression der Probe als Vielfaches der Kontrolle dargestellt ist.**

Die Ergebnisse der übrigen Gene (GAPDH,  $\beta$ -Actin RNA-Polymerase, INF- $\gamma$ 1 und 2) wurden aufgrund der positiven Negativkontrollen (s. Tab.22, grau hinterlegt) nicht in die Berechnung mit einbezogen.

Im Vergleich von unstimulierten (Kontrolle (-PHA)) und stimulierten (Probe (+PHA)) T-Zellen zeigte sich, dass die stimulierten T-Zellen 1,6-fach stärker CD8 exprimieren als die unstimulierten T-Zellen. Die Expression von INF- $\gamma$ 3 stieg unter Stimulation mit PHA in den T-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten T-Zellen um den Faktor 5,0 an.

Zusammengefasst zeigt sich zum einen, dass die angewendeten PCR-Einstellungen, die nach den Ergebnissen aus 4.10.1) als optimal gewertet wurden, auch zur qRT-PCR verwendet werden können. Zum anderen zeigt sich, dass die qRT-PCR eine geeignete sensitive Methode ist, um die Stimulation von T-Zellen anhand der erhöhten CD8- und INF- $\gamma$ 3-Expression nachzuweisen.

In 4.10.1) wurden die Ergebnisse der Optimierung der Primer-Konzentration für die PCR mit anschließender Gelelektrophorese vorgestellt. Hierbei waren sowohl mit je 150nM oder 300nM Primer (forward und reverse) gleich gute Ergebnisse zu erzielen. Daher wurden diese Konzentrationen zur weiteren Optimierung der qRT-PCR-Protokolle auch vergleichend in einer qRT-PCR eingesetzt. Wie aus Tab. 23 hervorgeht, wurden bei Verwendung von 300nM Primer-Konzentration für RNA-Polymerase 3 PCR-Zyklen weniger benötigt (grau hinterlegt) als bei 150nM. Bei CD8, INF- $\gamma$ 3 und TBP beträgt der Unterschied der CT-Werte nur ca. 1.

*Tabelle 23: Ergebnis der qRT PCR zur Optimierung der Primer-Konzentrationen.*

Zielgen	150nM Primer CT-Wert	300nM Primer CT-Wert	$\Delta$ CT
<b>CD8</b>	37,0	37,8	0,8
<b>INF-<math>\gamma</math>1</b>	33,7	34,8	1,1
<b>INF-<math>\gamma</math>3</b>	36,3	37,0	0,7
<b>RNA-Polymerase</b>	34,3	31,1	3,2
<b>TBP</b>	34,7	34,8	0,1

Auch die einzusetzende cDNA-Menge wurde, wie bereits in 4.11.1) zur Optimierung des PCR-Protokolls, in einer weiteren qRT-PCR zur Optimierung variiert. Hierzu wurden die gleiche cDNA (1 $\mu$ l) entweder 1:5, oder 1:10 verdünnt eingesetzt. Aus Tab. 24 geht hervor, dass die CT-Werte aller Zielgene bei Einsatz von 1:5 verdünnter cDNA niedriger sind als bei 1:10 Verdünnung ( $\Delta$ CT 0,5-2,2, s. Tab. 23 grau hinterlegt).

Tabelle 24: Ergebnis der qRT PCR zur Optimierung der einzusetzenden cDNA-Menge.

Zielgen	cDNA 1:5 verdünnt CT-Wert	cDNA 1:10 verdünnt CT-Wert	$\Delta$ CT
<b>CD8</b>	24,2	25,8	1,6
<b>INF-<math>\gamma</math>1</b>	33,2	33,7	0,5
<b>INF-<math>\gamma</math>3</b>	32,0	34,2	2,2
<b>RNA-Polymerase</b>	26,6	28,3	1,7
<b>TBP</b>	29,4	30,7	0,7

Zusammenfassend ergaben sich anhand dieser gewonnenen Ergebnisse folgende Optimierungen für das qRT- PCR-Protokoll: cDNA-Menge 1 $\mu$ l 1:5 verdünnt; Anlagerungs-Temperatur 58,5°C; PCR-Zyklen 45; Primer-Konzentration (forward und reverse Primer) 300nM.

## 5) Diskussion

### 5.1) Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die exakte Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität von Zellkulturen ist bei der Herstellung eines somatischen Zelltherapeutikums auf unterschiedlichen Ebenen der Herstellung und Anwendung der DZs ein kritischer Schritt: Die Vergleichbarkeit gewonnener Studienergebnisse hängt unter anderem davon ab, ob die eingesetzte Dosis eines Wirkstoffes unter den Probanden vergleichbar ist. Auch ist die exakte Bestimmung der Zellzahl für die Herstellung von DZs relevant, um definierte Mengen an Reagenzien oder anderen zur Differenzierung nötigen Stoffen bezogen auf eine definierte Zellzahl einsetzen zu können (Agallou et al. 2011, Wang et al. 2014). So werden beispielsweise nach dem Herstellungsprotokoll unserer Arbeitsgemeinschaft 50µg Tumorlysat pro  $1 \times 10^6$  DZs bei der Differenzierung reifer DZs eingesetzt (s. Anlage 1). Falsch bestimmte Zellzahlen könnten dazu führen, dass zu wenig Tumorlysat eingesetzt würde und somit nicht ausreichend Substrat zur Differenzierung aller in der Kultur enthaltenen Zellen zur Verfügung stünde. Zudem ist nach §15 der AMWHV ein Arzneimittel, welches kein Fertigarzneimittel darstellt, u.a. hinsichtlich der enthaltenen biologischen Einheiten zu kennzeichnen (Bundesministerium für Gesundheit und Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMG) 2014).

Zur Validierung wurden fünf Methoden der Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer, MoxiZ, SysmexKX-21N, Casy TTC-150, TruCount-Single Platform Methode mit FACSCalibur) und drei zur Bestimmung der Vitalität (Neubauer-Zählkammer, Casy TTC-150, TruCount-Single Platform Methode mit FACSCalibur) überprüft. Als Standard-Methode diente die Neubauer-Zählkammer, die zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität ubiquitär eingesetzt wird (Aune et al. 2004, O'Neil et al. 2013, Chan et al. 2014). Zudem wird sie in zahlreichen Studien als Vergleichsmethode bei der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung herangezogen (Mascotti et al. 2000, Szabo et al. 2004, Chan et al. 2014). Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Färbung wird in der Literatur kritisch diskutiert, beispielsweise auf Grund der Subjektivität der Auszählung (Szabo et al. 2004, Chan et al. 2014) und der möglichen Färbe-Artefakte. Auch werden die Instabilität der Färbung (Mascotti et al. 2000) und die Abhängigkeit der Färbung von der Integrität der Zellmembran (Dankberg et al. 1976, Strober 2001) kritisiert. Dies ist eine mögliche Erklärung für die in

4.1.3.1 beschriebene Abweichung der Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung der Probe PBMC LRSC 23 zwischen der Standard-Methode und den beiden Vergleichsmethoden (CASY TTC-150 und FACS SPF). So könnte es im Zuge des Einfrier- und/oder Auftauprozesses dieser Probe zu Störungen der Integrität der Zellmembranen der in der Probe enthaltenen Zellen gekommen sein, welche zu einer Durchlässigkeit für den Trypanblau-Farbstoff geführt hat. Auffällig waren auch die zum Teil deutlichen Abweichungen der im Mittel bestimmten Zellzahlen gemessen mit den 5 unterschiedlichen Methoden, sowohl bei der Analyse der PBMC-, als auch der DZ-Kulturen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür liegt, wie von Nicholson et al. beschrieben, darin, dass die Methoden sich hinsichtlich der Detektion und Identifikation der Zellen unterscheiden: Bei der Bestimmung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmen mehrere unabhängige Untersucher die Zellzahl einer Probe subjektiv. Casy TTC-150, MoxiZ und Sysmex KX-21N sind elektronische Zellzahlgeräte (s. 3.2.2.2-4). Die TruCount-Single Platform Methode mit FACSCalibur (s. 3.2.2.5) ermittelt durchflusszytometrisch die absoluten Zellzahlen einer Probe.

Zusammenfassend zeigt sich anhand der gewonnenen Ergebnisse der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (s. 4.1), dass im Vergleich zur Standard-Methode Neubauer-Zellkammer keine der untersuchten Methoden zur Auswertung aller eingesetzten Zellsubtypen geeignet ist. FACS SPF kann zur präzisen Zellzahlbestimmung von PBMC-Proben eingesetzt werden. Zudem werden mittels FACS SPF die besten Ergebnisse bei der DZ-Zellzahlbestimmung im Vergleich zur Standard-Methode ermittelt. Bei der Bestimmung der Vitalität von PBMC-Proben können mittels CASY TTC-150 die besten Ergebnisse im Vergleich zur Standard-Methode ermittelt werden. Bei der Bestimmung der Vitalität von DZ-Proben können FACS SPF und CASY TTC-150 präzise Werte ermittelt werden, wobei FACS SPF eine höhere Präzision aufweist als CASY TTC-150.

## 5.2) Wareneingangskontrolle Zytokine

Nach §23 der AMWHV müssen unter anderem eingehende Materialien, welche im Herstellungsprozess eingesetzt werden, vor ihrer Verwendung geprüft und freigegeben werden, und die zur Prüfung angewandten Verfahren sind zu validieren (BMG 2014). Die im Herstellungsprozess der DZs verwendeten Zytokine stellen solche zu prüfenden Materialien dar, und die Eignung des zur Prüfung eingesetzten Western Blots ist somit nachzuweisen.



Die geprüften Zytokine aus dem Wareneingang zeigten im Vergleich zum Größenmarker und dem Referenz-Zytokin ein ihrer angegebenen Länge entsprechendes Wanderungsverhalten in der Elektrophorese. Zudem zeigte sich in der semiquantitativen Analyse bzgl. der enthaltenen Stoffmenge kein Unterschied zwischen Zytokin und Referenz-Zytokin. Insgesamt konnten die eingegangenen Zytokin-Chargen anhand dieser Ergebnisse identifiziert und auch semiquantitativ auf die nach Herstellerangaben enthaltenen Zytokin- Mengen analysiert werden. Verunreinigungen der Chargen durch andere Proteine konnten ausgeschlossen werden. Insgesamt zeigt sich hier, dass mit dem Western Blot eine Methode etabliert werden konnte, mit welcher die eingehenden Zytokine geprüft werden können.

Bei kritischer Betrachtung kann die Frage aufkommen, warum nicht alle eingesetzten Chargen der Zytokine anhand einer N-terminalen Sequenzierung eindeutig identifiziert werden, so wie man es im hier angeführten Verfahren mit den Referenz-Zytokinen handhabt. Eine derartige Prüfung aller Chargen durch ein externes Unternehmen (s. 3.1.8), wäre aus logistischer und finanzieller Sicht extrem aufwändig und ist daher für einen effizienten Herstellungsprozess im Routinebetrieb nicht geeignet.

### 5.3) Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der dendritischen Zellen

Nach §14 der AMWHV müssen auch die Endprodukte des Herstellungsprozesses vor ihrer Verwendung geprüft und freigegeben werden, die für die Prüfung angewandten Verfahren sind zu validieren (BMG 2014).

Eine Methode zur Prüfung der generierten DZs stellt die durchflusszytometrische Analyse der hergestellten Zellen dar, um diese anhand definierter Oberflächenproteine als DZs deklarieren zu können. Diese Methode wird regelhaft zur Überprüfung von DZ-Kulturen eingesetzt, wobei zu beachten ist, dass die eingesetzten Oberflächenproteine zwischen den Publikationen variieren (Brossart et al. 2000, Kugler et al. 2000, Yu et al. 2001, Salcedo et al. 2006, De Vleeschouwer et al. 2008). Zur durchflusszytometrischen Analyse der hergestellten DZs (s. 4.3) wurde die Expression der Marker CD14, CD 83, CD 80, CD86, HLA-DR, CCR7, CD1a und PD-L1 analysiert.

CD14, CD83, CD80, CD86 und HLA-DR werden in den oben genannten Publikationen (Brossart et al. 2000, Kugler et al. 2000, Yu et al. 2001, Salcedo et al. 2006, De Vleeschouwer et al. 2008) häufig als Reifungsmarker eingesetzt. CD14 gilt als Marker für Monozyten und wird von DZs nicht exprimiert, bzw. bei der Differenzierung von DZs auf monozytären Zellen herunter reguliert (Steinmann 1991). CD 83 gilt als Oberflächenmarker von DZs (Zhou et al. 1996), CD80 und CD86 als ko-stimulatorische Moleküle, die von DZs gebildet werden (Peters et al. 1996). HLA-DR ist ein MHC-Klasse-II Molekül und wird von DZs vermehrt gebildet, wobei die Expression bei der Reifung der DZs zunimmt (Steinmann 1991).

Die durchflusszytometrische Analyse (s. 4.3) der im Validierungsprozess differenzierten DZs ergab hinsichtlich der Marker CD14, CD83, CD80, CD86 und HLA-DR vergleichbare Ergebnisse: Mit zunehmender Zellkulturdauer steigt der Anteil CD14-negativer Zellen (DZs), welche zudem die Reifungsmarker CD83, CD80, CD86 und HLA-DR immer stärker exprimieren. Auch konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp der DZs hinsichtlich der Expression dieser Oberflächenmarker auch nach Kryokonservierung stabil bleibt. Dies ist wichtig, da die DZ-Chargen durch das Tieffrieren konserviert werden sollen, ohne ihren Phänotyp zu verändern.

CCR7, CD1a und PD-L1 werden in der Literatur weniger häufig als Reifungsmarker der DZs herangezogen. CCR7 ist an der Signaltransduktion zur Induktion der Migration von DZs beteiligt (Saeki et al. 1999). Die Expression von CCR7 ist abhängig von den Reifungs-Stimuli, mit welchen die Differenzierung der DZs induziert wird und kann beispielsweise durch Prostaglandin E2 (Scandella et al. 2002) oder durch CD40-Ligand (Sozzani et al. 1998) beeinflusst werden. Auch die Ergebnisse aus 4.3) zeigen eine vermehrte Expression von CCR7 reifer gegenüber unreifer DZs. Die höchste Expression von CCR7 wurde jedoch für die Zellen von Tag 0 ermittelt. In den genannten Publikationen werden keine Angaben zur CCR7-Expression der Ausgangszellen gemacht, sodass hier ein Vergleich nicht möglich ist.

CD1a ist ein Marker-Protein für Langerhans-Zellen (Fithian et al. 1981), von anderen DZ-Untergruppen wird es in variablem Maß exprimiert (Mizumoto et al. 2004). Zhou et al. analysierten DZs, die aus monozytären Zellen differenziert wurden, unter anderem hinsichtlich der Expression von CD1a. Sie stellten fest, dass DZs primär unter Stimulation mit GM-CSF und IL-4 CD1a exprimieren. Nach längerer Kultur mit TNF- $\alpha$  nahm die CD1a-Expression der DZ-Zellkultur wieder ab. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in 4.3) erfasst

werden. Der höchste Anteil an CD1a-positiven Zellen liegt jeweils bei DZs von Tag 7 (unreife DZs) vor.

PD-L1 (CD274) wird ebenfalls von DZs exprimiert und wirkt als Ko-Faktor auf aktivierte T-Zellen und spielt vermutlich bei der Vermittlung von Toleranz und der Vermeidung von Autoimmunität und einer überschießenden Immunreaktion eine Rolle (Freeman et al. 2000). Bezüglich der Expression von PD-L1 durch DZs konnte beobachtet werden, dass PD-L1 während der Reifung vermehrt exprimiert wird, wobei die Expression von den Reifungs-Stimuli beeinflusst wird (Freeman et al. 2000, Yamazaki et al. 2002). Vergleichbare Ergebnisse konnten in unserem Herstellungsprozess (s. 4.3) gewonnen werden: Die PD-L1-Expression lag bei den angeführten Untersuchungen nach 7 bzw. 9 Tagen Zellkultur unter Zytokin-Stimulation über der von Tag 0.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der durchflusszytometrischen Analyse der im Herstellungsprozess generierten Zellen eine Methode etabliert werden konnte, mit welcher es möglich ist, die hergestellten Zellen anhand definierter Oberflächenmarker als DZs zu charakterisieren. Wie aus Anlage 2 hervorgeht, wurden Freigabekriterien für die DZ-Chargen für die Marker CD14, CD80, 83, HLA-DR und CD86 definiert. CCR7, CD1a und PD-L1 wurden nicht als Freigabekriterien finaler DZ-Chargen herangezogen, da für diese nur wenige vergleichbare Publikationen vorliegen. Ob und in welchem Maß das Expressionsverhalten diese Oberflächenproteine für das beschriebene DZ-Projekt reproduzierbar ist, wird sich erst beim Vergleich größerer Anzahlen von DZ-Chargen zeigen.

#### 5.4) Bio-Assay zur Qualitätskontrolle des Zellkulturmediums der klinischen Validierung

Wie bereits in 5.2). für die Zytokine beschrieben, muss nach §23 der AMWHV auch jede Charge des im Herstellungsprozess eingesetzten Zellkulturmediums durch ein geeignetes Verfahren geprüft werden. Im klinischen Maßstab wird zur Herstellung der DZs ein nach Herstellerangaben GMP-konformes und zur Kultivierung von DZs anwendbares Serum-freies Zellkulturmedium eingesetzt (CellGro-Zellkulturmedium). Dieses Medium ist zur Kultivierung von DZs geeignet (Napoletano et al. 2007, Fučíková et al. 2011) und wurde bereits in vielen

Studien als DZ-Kulturmedien eingesetzt (Jarnjak-Jankovic et al. 2007, Hildenbrand et al. 2008, Muthuswamy et al. 2010).

Zur Prüfung des Zellkulturmediums wurde der in 3.2.4) beschriebene Bio-Assay eingesetzt. Hierbei zeigte sich (s. 4.4), dass nach 48h Differenzierung im CellGro-Zellkulturmedium der Anteil CD14-positiver deutlich Zellen abnahm und dass der höchste Gehalt an DZs (CD14-negative Zellen) nach 48h Kultur im CellGro-Zellkulturmedium vorlag. Diese CD14-negativen Zellen wiesen eine hohe Vitalität und eine hohe Expression der Reifungsmarker CD83, CD80, CD86 und HLA-DR (s. 5.3) auf.

Ein Vergleich zu anderen Publikationen, in denen DZs innerhalb von 48h Stunden differenziert werden, wird dadurch erschwert, dass andere Medien und/oder Reifungs-Stimuli im Fast-DC-Protokoll eingesetzt wurden als in 3.2.5) beschrieben (Dauer et al. 2003, Kvistborg et al. 2009, Jarnjak-Jankovic et al. 2007). Dauer et al konnten eine erhöhte Expression von CD83, CD80, HLA-DR, CD86 und einen Rückgang der CD14-Expression als Ausdruck der DZ-Reifung ermitteln, wobei sie RPMI-Medium und andere Reifungs-Stimuli verwendeten. Jarnjak-Jankovic et al. setzten CellGro-Medium, jedoch andere Reifungs-Stimuli ein. Sie konnten nach 48h ebenfalls eine erhöhte Expression der Marker HLA-DR, CD83 und CD86 messen, CD14 wurde jedoch weniger stark herunter reguliert. Kvistborg et al. verwendeten AIMV-Medium und andere Reifungs-Stimuli und konnten nach 48h Zellkultur eine niedrige CD14-Expression und die Expression der DZ-Marker HLA-DR, CD83, CD80 und CD86 ermitteln. Übereinstimmend mit den genannten Publikationen konnte ein Rückgang der CD14-Expression (Dauer et al. 2003, Kvistborg et al. 2009). und eine Zunahme der Marker CD80, CD83, CD86 und HLA-DR (Dauer et al. 2003, Kvistborg et al. 2009, Jarnjak-Jankovic et al. 2007) nach 48h Zellkultur in den geprüften Chargen des CellGro-Mediums ermittelt werden (s. 4.4).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass unter Verwendung der geprüften Chargen des CellGro-Zellkulturmediums reife DZs mit dem gewünschten Expressionsprofil definierter Oberflächenmarker hergestellt werden können.

Basierend auf den in 4.4) gewonnenen und zusätzlich durch die Arbeitsgruppe ermittelten Ergebnissen wurden Sollwerte für die Expression der genannten Oberflächenmarker definiert, die die Grundlage für zukünftige Chargenkontrollen des CellGro-Mediums darstellen.

Zu beachten ist, dass zur Überprüfung der Chargen unterschiedliche Zellkulturen eingesetzt wurden, um daraus eine Basis an Daten zu gewinnen, die es erlaubt, Sollwerte zur Chargenkontrolle zu definieren. Betrachtet man die Einzelergebnisse der Chargenkontrollen und der unterschiedlichen Zellkulturen, zeigen sich zwei Aspekte. Die gewonnenen Ergebnisse für die unterschiedlichen CellGro-Chargen liegen unter Verwendung derselben DZ Kultur deutlich enger zusammen als die der unterschiedlichen DZ-Kulturen. Zudem schwanken die Ergebnisse zwischen den einzelnen CellGro-Chargen unter Verwendung einer gleichen Zellkultur. Möglicherweise wäre es daher angezeigt, diesen Bio-Assay mit einer standardisierten Zellkultur durchzuführen, um Ergebnisse zu erhalten, die nicht bedingt durch die Variabilität der Ausgangszellen beeinflusst werden können. Jedoch sollen DZ aus monozytären Zellen unterschiedlicher Individuen möglichst effektiv unter Verwendung eines Mediums hergestellt werden. Somit müssen Sollwerte festgelegt werden, die nicht auf einer Zelllinie basieren. Neben der Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen im Bio-Assay könnte eine mögliche Erklärung für die Schwankungen zwischen den CellGro-Chargen auch darin liegen, dass die im Medium enthaltenen Reagenzien Schwankungen unterliegen können. Beispielsweise enthält es aus humanem Plasma gewonnenes Transferrin und Albumin. Für das Transferrin-Gen sind unterschiedliche Polymorphismen bekannt, die die Funktion des Transferrins beeinflussen können (Hussain et al. 2002) und ebenso für das Albumin-Gen (Minchiotti et al 2008).

Zusammenfassend zeigt sich, dass mit dem Bio-Assay eine Methode etabliert werden konnte, mit welcher die eingesetzten CellGro-Chargen hinsichtlich ihrer Eignung zur Kultivierung von DZs in unserem Herstellungsprozess geprüft werden können.

## 5.5) Nachweis der Avitalität des hergestellten Tumorlysates

Ein kritischer Schritt in Bezug auf die Sicherheit der mit Tumorlysat beladenen DZs ist die vollständige Avitalisierung des verwendeten Tumorgewebes. Blieben vitale Tumorzellen nach dem Herstellungsprozess des TL aus dem Tumorgewebe zurück, bestünde die Gefahr, dass Patienten vitale Tumorzellen appliziert würden. Dies könnte zu iatrogen verursachten Metastasen führen. Daher ist es unerlässlich, dass durch die Aufbereitung des Tumorgewebes (s. 3.2.6) eine nachweisbar vollständige Avitalisierung stattfindet. Das

Tumorlysat ist somit als Ausgangs- bzw. Zwischenprodukt im Herstellungsprozess der DZs zu werten. Nach §14 der AMWHV müssen Ausgangsstoffe und Zwischenprodukte menschlicher Herkunft ebenso wie die Endprodukte vor Verwendung durch eine validierte Methode geprüft werden (BMG 2014).

Als Nachweismethode der Avitalisierung dient in vielen Publikationen die Färbung avitaler Zellen mit Trypanblau und die anschließende Auswertung mittels Neubauer-Zählkammer (Chakraborty et al. 1998, Schnurr et al. 2001, De Vleeschouwer et al. 2008, Dong et al. 2014).

Bei der Auswertung ergaben sich Probleme beim Einsatz dieser Methode (s. 4.6.1). Einerseits variierten die Auszählergebnisse der drei Untersucher zum Teil erheblich, andererseits war die eindeutige Dokumentation hinsichtlich der unterschiedlichen Mikroskop-Einstellungen bei der Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer erschwert. Da diese Methode wie oben beschrieben regelmäßig zum Avitalitätsnachweis eingesetzt wird und Vorteile hinsichtlich der einfachen Durchführbarkeit und des geringen Materialbedarfs an TL (30µl) mit sich bringt, wurde sie zusätzlich mit drei weiteren Methoden überprüft, um sie als sicheres und valides Verfahren nachweisen und einsetzen zu können.

Zum einen wurde ein ATP-Assay durchgeführt (s. 3.2.8.2). ATP-Assays werden in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen zum Nachweis vitaler Zellen eingesetzt, beispielsweise in der Mikrobiologie zum Nachweis vitaler Mikroorganismen und deren Ansprechen auf Antimikrobiotika (Chen et al. 1994) oder in der Onkologie zum Test der Chemosensitivität von Tumorzellen (Möllgrad et al. 2000). Die Analyse des TL mittels ATP-Assay bestätigte das Ergebnis der Trypanblau-Färbung (s. 4.6.2), jedoch hat auch diese Methode Schwächen. Weyermann et al. verglichen vier Methoden zum Nachweis zytotoxischer Effekte, unter denen der ATP-Assay der sensitivste war. Allerdings betonten sie die möglichen Störfaktoren dieser Lumineszenz-Reaktion durch die Proben selbst oder auch die zeitliche Abschwächung des Lumineszenz Signals, welche die Ergebnisse beeinflussen können (Weyermann et al. 2005). Zudem liegt die Nachweisgrenze des ATP-Assay bei einem ATP-Gehalt von 50 HEK-293 Zellen (Promega Corporation 2012), d.h. vitale Zellen mit geringerem ATP-Gehalt als 50HEK-293 Zellen würden durch den ATP-Assay nicht erkannt.

Auf Grund dieser möglichen Schwächen des ATP-Assay, die dazu führen könnten, dass Proben fälschlicherweise als avital gemessen würden, wurden die Avitalität des TL zusätzlich durch zwei weitere Methoden geprüft. Es wurde eine Partikel-Analyse des TL mittels CASY

TTC-150 (s. 4.6.3) durchgeführt und eine Probe des TL wurde durch die Firma Malven Instruments mittels Morphologi G3 (s. 4.6.4) analysiert. Morphologi G3 detektierte ausschließlich Fragmente und nicht-zelluläre Strukturen (Müller et al. 2015), die Messung mittels CASY TTC-150 lieferte analoge Ergebnisse.

Somit konnte die vollständige Avitalisierung des Tumorgewebes anhand der Morphologie (Morphologi G3, CASY TTC-150, Neubauer-Zählkammer) und anhand funktioneller Kriterien (Desintegrität der Zellemembran (Trypanblau Färbung), Sistieren des Zellmetabolismus (ATP-Assay)) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der gewonnenen Ergebnisse sagen, dass die Herstellung des Tumorlysates nach vorgestelltem Protokoll nachweisbar zur vollständigen Avitalisierung des Tumorgewebes führt. Zudem unterstreichen die Ergebnisse des ATP-Assay, der Analyse mit Morphologi G3 und mit CASY TTC-150, dass der Avitalitäts-Nachweis mittels Neubauer-Zählkammer valide ist.

## 5.6) Migrations-Assay

Im Rahmen der Guten Herstellungspraxis sind neben Produktqualitätsprüfungen von ATMPs auch Prüfungen hinsichtlich der Funktionalität in Form von sog. Wirksamkeitsprüfungen (Potency-Assays) durchzuführen (BMG 2006). Anhand des Potency-Assay soll die biologische Aktivität gemessen werden, welche dem Produkt zugeschrieben wird (Committee For Human Medicinal Product 2007). Bezüglich der Vakzine bedeutet das nachzuweisen, dass diese in vivo eine tumorspezifische Immunreaktion induziert. Diese nachzuweisen ist jedoch erst möglich, nachdem die Vakzine in vivo appliziert wurde. Um die Potency der generierten DZs schon vor Applikation zeigen zu können, wurden daher Testungen mit den DZs durchgeführt, anhand derer wichtige den DZs zugeschriebene Fähigkeiten schon in vitro nachgewiesen werden sollen. Zu bedenken ist, dass es sich bei diesen Testungen um in vitro Modelle zum Nachweis einzelner den DZs zugeschriebenen Fähigkeiten handelt und somit die Ergebnisse lediglich als Indikatoren, aber nicht als Nachweis der endgültigen Wirksamkeit der DZs angesehen werden dürfen.

Wie in 2.4 beschrieben, besitzen DZs die Fähigkeit, nach der Aktivierung in der Peripherie eines Organismus in Lymphknoten zu migrieren und dort T-Zellen zu stimulieren. Diese Migrationsfähigkeit müssen auch die in vitro generierten und in der DZ-Vakzine eingesetzten DZs aufweisen: Nach lokaler intradermaler Applikation am Patienten sollen sie in das lymphatische System des Patienten migrieren, um hier eine tumorspezifische Immunreaktion zu induzieren. Die Migrationsfähigkeit ist somit ein wichtiger Teil der Qualität und Funktionalität der Vakzine und kann als ein Indikator der Wirksamkeit (Potency) der generierten DZs in vitro eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck wurden Transwell-Assays mit unterschiedlichen DZ-Kulturen durchgeführt (s. 3.2.9). Dieses Verfahren wird zum Nachweis der gerichteten Migration unterschiedlicher Zellpopulationen seit den 1970ern eingesetzt (Boyden 1962), auch als Nachweis-Methode der Migration von DZs (Saeki et al. 1999, Jang et al. 2006). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die frischen DZs, als auch die kryokonservierte DZs migrationsfähig sind (s. 4.7). Dies ist wichtig, da die Vakzine durch Einfrieren konserviert werden.

Der Migrations-Assay stellt somit ein geeignetes Verfahren zum Nachweis der Migrationsfähigkeit der generierten DZs dar und konnte als Potency-Assay im Herstellungsprozess etabliert werden.

## 5.7) Analyse der Aufnahme von Dextran-Molekülen durch die dendritischen Zellen

Wie in 5.6) beschrieben, sind im Rahmen der Guten Herstellungspraxis Wirksamkeitsprüfungen zum Nachweis der biologischen Aktivität eines ATMPs durchzuführen (BMG 2006). Neben der Migrationsfähigkeit (s. 5.6) ist auch die Fähigkeit zur Aufnahme extrazellulärer Moleküle eine in vitro nachweisbare Eigenschaft der DZs. DZs wirken als Antigen-präsentierende Zellen (s. 2.4). Sie nehmen im Zuge dieser Funktion unterschiedliche Moleküle auf. Kommt es durch Faktoren des umgebenden Milieus (z.B. Entzündungsmediatoren) zur Stimulation, reifen die DZs. Sie prozessieren und präsentieren die internalisierten Antigene vor allem T-Zellen, aber auch anderen Zellen des Immunsystems. Die Aufnahme von extrazellulären Molekülen wird während der Reifung der



DZs herunter reguliert (Cella et al. 1997, Albert et al. 1998, Sallusto et al. 1998, Nobes et al. 2000).

Um die prinzipielle Fähigkeit zur Aufnahme von extrazellulären Molekülen der DZs nachzuweisen, wurde geprüft, ob und in welchem Maß die generierten unreifen und reifen DZs extrazelluläre Dextran-Moleküle internalisieren. Diese Methode wurde bereits in anderen Publikationen eingesetzt, um die Aufnahme extrazellulärer Moleküle durch die DZs zu untersuchen, wobei gezeigt wurde, dass die unreifen DZs stärker extrazellulärer Moleküle aufnehmen als die reifen DZs (Sallusto et al. 1995, Nobes et al. 2000, Zhang et al. 2004). Wie aus 4.9) hervorgeht, weisen die hergestellten DZs ein zu den genannten Publikationen vergleichbares Aufnahmeverhalten auf. Die Aufnahme von FITC-markiertem Dextran ist bei den unreifen DZs deutlich höher als bei den reifen DZs. Die verstärkte Aufnahme extrazellulärer Moleküle durch die unreifen DZs ist hinsichtlich der Herstellung der Vakzine ein wichtiger Aspekt, denn im Herstellungsprozess werden die unreifen DZs unter Zytokin-Stimulation an Tag 7 mit TL beladen (s. Anlage 1), also in der Phase der Differenzierung, in welcher sie eine hohe Tendenz zur Antigen-Aufnahme aufweisen.

Um nachzuweisen, dass auch die Aufnahme des TL effektiv stattfindet, wurde, wie in 3.2.12) beschrieben, auch die Aufnahme des TL durch die DZs untersucht.

## 5.8) Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem Tumorlysate durch die dendritischen Zellen

Wie oben beschrieben, ist die generelle Fähigkeit der unreifen DZs zur Aufnahme von extrazellulären Molekülen in der Literatur unstrittig (s. 5.7). Ein kritischer Schritt bei der Herstellung der DZ-basierten Vakzine ist die Beladung der unreifen DZs mit TL. Solche „kritischen Aktivitäten“ sind im Rahmen der Guten Herstellungspraxis zu prüfen (BMG 2006). Daher wurde die intrazelluläre Aufnahme des FITC-gekoppelten TL durchflusszytometrisch und zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie geprüft.

Ähnliche Methoden zum Nachweis der Internalisierung von avitalen Zellen wurden bereits in anderen Publikationen eingesetzt, wobei die avitalen Zellen hier mit PKH-26 gekoppelt wurden und die Aufnahme avitalisierter PKH-26-positiver Zellen durch die DZs mittels

Durchflusszytometer detektiert wurde (Albert et al. 1998, Jenne et al. 2000). Albert et al. konnten zeigen, dass unreife DZs deutlich mehr avitale Zellen aufnehmen, als reife DZs.

Die zusätzlich fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde hinzugezogen, um nachweisbar darstellen zu können, dass das TL nach intrazellulär in die DZs aufgenommen (Sallusto et al. 1995, Song et al. 2011).

Wie aus 4.10) hervorgeht, konnte mikroskopisch dargestellt werden, dass die DZs das TL nachweisbar internalisieren. Zusätzlich zeigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse, dass, vergleichbar mit der Aufnahme von Dextran-Molekülen, die unreifen DZs mehr TL aufnehmen, als die reifen DZs. Die Beladung der unreifen DZs an Tag 7 mit dem TL findet anhand dieser beiden Methoden nachweislich statt.

## 5.9) qRT-PCR-Analyse der Expression von Interferon- $\gamma$ in CD8-positiven T-Zellen

Wie in 2.4) beschrieben, bilden die DZs eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. T-Zellen und NK-Zellen, die durch immunologische oder Entzündungsfaktoren stimuliert werden, synthetisieren unter anderem INF- $\gamma$  (Bach et al. 1997).

Diese INF- $\gamma$ -Freisetzung durch spezifische T-Zellen macht man sich unter anderem in der medizinischen Diagnostik zunutze, beispielsweise in der Tuberkulosediagnostik, um die Sensibilisierung von T-Zellen gegenüber Tuberkuloseantigenen nachzuweisen (Diel et al. 2007) oder auch in der Zytomegalie-Diagnostik (Costa et al. 2011). In Bezug auf die DZ-Vakzine ist die Induktion einer spezifischen T-Zell-Reaktion gegen den Tumor die erwünschte Konsequenz der Vakzinierung. Die Fähigkeit der generierten DZs, eine T-Zell-Aktivierung zu induzieren, ist somit ein wichtiger Aspekt der Funktionalität bzw. der biologischen Wirksamkeit (Potency) der Vakzine und stellt in Bezug auf das Herstellungsverfahren eine Option zur Etablierung eines weiteren Potency-Assays dar.

Zum Nachweis der Induktion einer T-Zell-Aktivierung durch DZs wurden in verschiedenen Studien zum Teil unterschiedliche Methoden eingesetzt. Zum einen wurden hierfür Enzyme, Linked Immunosorbent Assays, eingesetzt (Schön et al. 2001, Agallou et al. 2011, Wang et al. 2014). Brossart et al. ermittelten die vermehrte INF- $\gamma$ -Produktion durchflusszytometrisch

durch die intrazelluläre Färbung der INF- $\gamma$ -Moleküle mit fluoreszenz-markierten Antikörpern. Eine weitere Methode zum Nachweis der Expression definierter Gene ist die quantitative Real-Time PCR. Sie wird in zahlreichen naturwissenschaftlichen Bereichen eingesetzt, beispielsweise zur Bestimmung der Viruslast bei Patienten mit chronischen viralen Infektionen (Wagner et al. 2000) oder im biotechnologischen Bereich, um die Transfektion von Genen in Pflanzen nachzuweisen (Ingham et al. 2001).

Ziel der in 3.2.12) beschriebenen Versuche war es, eine qRT-PCR zu etablieren, mit welcher die INF- $\gamma$ -Expression der T-Zellen im Sinne eines Potency-Assays analysiert werden kann. Die hierbei eingesetzte qRT-PCR mit SYBR-Green ist ein Verfahren hoher Sensitivität, dessen Spezifität durch Schmelzkurvenanalyse überprüft werden kann (Holzapfel et al. 2007).

Die Ergebnisse aus 4.11.2) zeigen, dass es gelungen ist, ein quantitatives Real-Time PCR-Verfahren zu etablieren, mit welchem die CD8- und INF- $\gamma$ -Expression von stimulierten und unstimulierten T-Zellen ermittelt werden kann.

Zusammenfassend konnten im Zuge dieser Arbeit Daten für das Validierungsprojekt der Herstellung und Qualitätsprüfung autologer dendritischer Zellen für die adjuvante Immuntherapie gewonnen und unterschiedliche Methoden, welche im Herstellungs- und Prüfprozess eingesetzt werden, etabliert werden: Die Validierung der zur Herstellung eingesetzten Geräte (Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung), die Validierung der Sicherheit der Herstellung des Tumorlysates (Avitalitätsnachweis), die Etablierung von Methoden zur Kontrolle der Ausgangsstoffe und des Endproduktes (Zytokine, Zellkulturmedium, durchflusszytometrische Charakterisierung der DZs) sowie die Etablierung von Potency-Assays zum Nachweis der Funktionalität der DZs (Migrationsassay, Aufnahme von extrazellulärer Partikel bzw. TL, qRT-PCR-Analyse der Expression von INF- $\gamma$ ). Die gewonnenen Ergebnisse sind zum Teil in den Endproduktspezifikationen für die DZs festgehalten und müssen erfüllt sein, um die Vakzine für die Anwendung am Patienten freigeben zu dürfen (s. Anlage 2).

Die zuständige Landesaufsichtsbehörde erteilte nach eingehender Prüfung des erfolgreich abgeschlossenen Validierungsprojektes dem Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Homburg (Saar) im Sommer 2014 die Herstellungserlaubnis für dendritische Zellen zur adjuvanten Immuntherapie.

## 6) Literaturverzeichnis

1. Agallou M, Margaroni M, Karagouni E (2011). Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 29:5053-5064.
2. Albert ML, Pearce SFA, Francisco LM, Sauter B, Roy P (1998). Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via  $\alpha_v\beta_5$  and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. *J Exp Med* 188:1359-1368.
3. Alexander P (1974). Proceedings: Escape from Immune Destruction by the Host through Shedding of Surface Antigens: Is this a Characteristic Shared by Malignant and Embryonic Cells? *Cancer Res* 34:2077-2082.
4. Ardon H, De Vleeschouwer S, Van Calenbergh F, Cleas L, Kramm CM, Rutkowski S et al. (2010). Adjuvant Dendritic Cell-based Tumor Vaccination for Children With Malignant Brain Tumors. *Pediatr Blood Cancer* 54:519-525.
5. Aune MW, Becker JL, Brugnara C, Canfield W, Dorfman DM (2004) Automated Flow Cytometric Analysis of Blood Cells in Cerebrospinal Fluid: Analytic Performance. *Am J Clin Pathol* 121:690-700.
6. Bach EA, Aguet M, Schreiber D (1997). The INF- $\gamma$  Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu Rev Immunol.* 15:563-91.
7. Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52.
8. BD Biosciences (2009). BD FACSCalibur.  
[http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur\\_brochure.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf). (2014)
9. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA (1995). Generation of Immunostimulatory Dendritic Cells from Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells of the Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cancer Res* 55:1099-1104.
10. Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, De Tribolet N, Heid I et al. (1989). Immunosuppression and Transforming Growth Factor- $\beta$  In Glioblastoma – Preferential Production of Transforming Growth Factor- $\beta_2$ . *J Immunol* 143:3222-3229.
11. Boyden SV (1962). The Chemotactic Effect Of Mixtures Of Antibody And Antigen On Polymorphonuclear Leucocytes. *J. Exp. Med* 115:453-466.

12. Brossart P, Wirth S, Stuhler G, Recihhardt VL; Kanz L, Wolfram Brugger (2000).  
Induction of cytotoxic T-Lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108.
13. Bundesgesundheitsministerium (BMG) (2006). Anlage 3 zur Bekanntmachung des Bundesministeriums für Gesundheit zu § 2 Nr. 3 der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung vom 27. Oktober 2006 (Banz. S. 6887) - Leitfaden der Guten Herstellungspraxis Teil II.  
[http://www.bmg.bund.de/fileadmin/redaktion/pdf\\_gesetze/bekanntmachungen/GMG-Leitfaden2.pdf](http://www.bmg.bund.de/fileadmin/redaktion/pdf_gesetze/bekanntmachungen/GMG-Leitfaden2.pdf). (2014)
14. Bundesministerium für Gesundheit und Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMG) (2014). Verordnung über die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft (Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung - AMWHV). <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/amwhv/gesamt.pdf>. (2015)
15. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10-16.
16. CellGro (2012). Data Sheet CellGro / CellGenix GMP Serum-free Dendritic Cell Medium (DC).  
[http://www.cellgenix.com/fileadmin/published\\_content/3\\_downloads/5.3\\_DS\\_Medium\\_GMP/Data\\_Sheet\\_GMP\\_DC\\_ME-DS-2001a.pdf](http://www.cellgenix.com/fileadmin/published_content/3_downloads/5.3_DS_Medium_GMP/Data_Sheet_GMP_DC_ME-DS-2001a.pdf)GMP. (2014)
17. Chakraborty NG, Sporn JR, Tortora AF, Kurtzman SH, Yamase H et al. (1998) Immunization with tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting-cell-based vaccine in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 47:58-64.
18. Chan LLY, Cohen DA, Kuksin D, Paradis BD, Qiu J (2014). Automated Enumeration and Viability Measurement of Canine Stromal Vascular Fraction Cells Using Fluorescence-Based Image Cytometry method. *J Fluorescence* 24:983-989.
19. Chen F, Cushion MT (1994). Use of an ATP Bioluminescent Assay To Evaluate Viability of *Pneumocystis carinii* from Rats. *J Clin Microbiol* 32:2791.

20. Committee For Human Medicinal Product (2007). Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003898.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003898.pdf). (2014)
21. Costa C, Astegiano S, Terlizzi ME, Sidoti F, Curtoni A (2011). Evaluation and Significance of Cytomegalovirus-Specific Cellular Immune Response in Lung Transplant Recipients. *Transplant Proc* 43:1159-1161.
22. Dankberg F, Persidsky MD (1976). A Test of Granulocyte Membrane Integrity and Phagocytic Function. *Cryobiology* 13:430-432.
23. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K et al. (2003). Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J Immunol* 170:4069-4076.
24. Davis FG, Freels J, Grutsch J, Barlas S, Brem S (1998). Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis is based on surveillance, epidemiology and end results (SEER) data 1973-1991. *J Neurosurg* 88:1-10.
25. De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, Van Calenbergh F, Van Loon J, Goffin J et al. (2008). Postoperative Adjuvant Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Patients with relapsed Glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14:3098-3104.
26. Diel R, Froßbohm M, Loytved G, Haas W, Hauer B (2007). Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* 61:440-455.
27. Disis ML, Dang Y, Coveler AL, Marzbani E, Kou ZC, Childs JS et al. (2014). HER-2/neu vaccine-primed autologous T-cell infusions for the treatment of advanced stage HER-2/neu expressing cancers. *Cancer Immunol Immunother* 63:101-9.
28. Dong B, Dai G, Xu L, Zhang Y, Ling L, Sun L et al. (2014) Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes. *Mol Med Rep* 10:2827-34.
29. EMA (2008). Herceptin: EPAR summary for the public.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000278/WC500049819.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000278/WC500049819.pdf). (2014)
30. EMA (2009). MabThera: EPAR summary for the public.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000165/WC500025815.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000165/WC500025815.pdf). (2014)

31. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5:405-411.
32. Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio et al. (1981). Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2541-2544.
33. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T et al. (2000). Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 192:1027-34
34. Fučíková J, Rožková D, Ulčová H, Budinský V, Sochorová K et al. (2011) Poly I:C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *J Transl Med* 9:223.
35. Garcia F, Climent N, Assoumou L, Gil C, Gonzales N, Alcami J et al. (2011). A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 203:473-478.
36. Glauner B (2006). Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *BioSpektrum* 04/2006:394-396.
37. Green H, Kehinde O, Thomas J (1979). Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5665-5668.
38. Herold G und Mitarbeiter (2012). *Innere Medizin*. Ausgabe 2012:79, 83-84.
39. Hildenbrand B, Lorenzen D, Sauer B, Hertkorn C, Freudenberg MA et al. (2008). INF- $\gamma$  Enhances TH1 Polarisation of Monocyte-derived Dendritic Cells Matures with Clinical-grade Cytokines Using Serum-free Conditions. *Anticancer Res* 28:1467-76.
40. Holzapfel B, Wickert L (2007). Methoden und Anwendungsgebiete-Die quantitative Real-Time-PCR. *Biologie in unserer Zeit* 37:120-126.
41. Hsu, FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Cerwinski D, Taisi B et al. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2:52-58.
42. Hussain RI, Ballard CG, Edwardson JA, Morris CM (2002). Transferrin gene polymorphism in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett* 317:13-6.
43. Ingham DJ, Beer S, Money S, Hansen G (2001). Quantitative Real-Time PCR Assay for Determining Transgene Copy Number in Transformed Plants. *Biotechniques* 31:132-140.



44. Interchim (2015) BC Assay: Protein Assay Kit.  
<http://www.interchim.fr/ft/4/40840A.pdf>. (2015)
45. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T et al. (2006) CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes. *J. Immunol* 176:803-810.
46. Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Sæbøe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G (2007). A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer* 7:119.
47. Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C (2000). Dendritic Cells Containing Apoptotic Melanoma Cells Prime Human CD8+ T Cells for Efficient Tumor Cell Lysis. *Cancer Res* 60:4446-4452.
48. Jradi Z, Eigentler TK, Grabe C (2012). Adjuvante Therapie des malignen Melanoms. *Arzneimitteltherapie* 30: 46-52.
49. Kaatsch P, Spix J (2012). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2011 (1980-2010). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz: 12,24.
50. Kidiyoor A, Schettini J, Besmer DM, Rego SL, Nath S, Curry JM et al. (2014). Pancreatic cancer cells isolated from Muc1-null tumors favour the generation of a mature less suppressive MDSC population. *Front Immunol* 5:67.
51. Kim SU, Park IN, Kim TH, Kim KS, Chio HB, Hong SH et al. (2006). Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathology* 26:129-140.
52. Kobayashi T, Yamanaka R, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Yoshida S, Tanaka R et al. (2003). Tumor mRNA-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8+ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother* 52:632-637.
53. Kono K, Kawaide H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N et al. (2006). CD4(+)CD25<sup>high</sup> regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 55:1064-1071.
54. Korkolopoulou K, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73:148-153.

55. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zöller G, Zobywalski A, Brossart B et al. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6:332-336.
56. Kvistborg P, Boegh M, Pedersen AW, Claesson, Zocca MB (2009). Fast generation of dendritic cells. *Cell Immunol* 260:56-62.
57. Le Baron RG, Athanasiou KA (2000). Ex vivo Synthesis of articular cartilage. *Biomaterials* 21:2575-2587.
58. Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F (2013). Guidelines on Renal Cell Carcinoma. [http://www.uroweb.org/gls/pdf/10\\_Renal\\_Cell\\_Carcinoma\\_LR.pdf](http://www.uroweb.org/gls/pdf/10_Renal_Cell_Carcinoma_LR.pdf). (2014)
59. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
60. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80:477-483.
61. Malvern Instruments (2008). Malvern Material relationships – Automated Imaging Advanced Particle Characterization. <http://www.malvern.com/de/Assets/MRK1900.pdf>. (2015)
62. Mascotti K, McCullough J, Burger SR (2000). HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and promodim iodide. *Transfusion* 40:693-696.
63. Minchiotti L, Galliano M, Kargh-Hansen U, Peters TJr (2008). Mutations and Polymorphisms of the Gene of the Major Human Blood Protein, Serum Albumin. *Hum Mutat* 29:1007-16.
64. Mizumoto N, Takashima A (2004). CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest* 113:658-660.
65. Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, Holland G, Boccuni P, Scheinberg DA et al. (2004). Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol* 76:623-33.
66. Möllgrad L, Tidefelt U, Sundman-Engberg B, Löfgren C, Paul C (2000). In vitro chemosensitivity testing in acute non lymphocytic leukemia using the bioluminescence ATP-Assay. *Leuk Res* 24:445-52.

67. Müller I, Hartmann D, Oertel J, Keck CM, Eichler H (2015). Static Image Analysis as New Approach for the Characterization of Tumor Cell Lysate Used in Dendritic Cell Vaccine Preparation. *Transfus Med Hemother* 42:122-128.
68. Muthuswamy R, Mueller-Berghaus J, Haberkorn U, Reinhart TA, Schadendorf D et al. (2010). PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood* 116:1454-1459.
69. Napoletano C, Pinto D, Bellati F, Taurino F, Rahimi H et al. (2007) A Comparative Analysis of Serum and Serum-free Media for Generation of Clinical Grade DCs. *J Immunother* 30:567-576.
70. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Grabi N, Cerwenka A (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 209:2351-65.
71. Nicholson JKA, Stein D, Mui T, Mack R, Hubbard M, Denny T (1997). Evaluation of a Method for Counting Absolute Numbers of Cells with a Flow Cytometer. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:309-13.
72. Nobes C, Marsh M (2000). Dendritic cells: New roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr Biol* 10:R739-41.
73. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T Cell Killing by Colon Cancer Cells Expressing Fas Ligand. *J Exp Med* 184:1075-1082.
74. O'Neil E, Burton S, Horney B, MacKenzie A (2013) Comparison of white and red blood cell estimates in urine sediment with hemocytometer and automated counts in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 42:78-84.
75. Orflo Technologies (2012). MoxiZ Brochure.  
[http://shop.orflo.com/product\\_p/mxz001.htm](http://shop.orflo.com/product_p/mxz001.htm). (2015)
76. Pappenheimer AM (1917). Experimental Studies upon Lymphocytes: I. The Reactions of Lymphocytes under various experimental conditions. *J Exp Med* 25:633-50.
77. Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F (1996). Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 17:273-8.
78. Promega Corporation (2012). Technical Bulletin CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay.  
<https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%20glo%20luminescent%20cell%20viability%20assay%20protocol.pdf>. (2015)

79. Richtlinie 2001/83/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftscodex für Humanarzneimittel, Amtsblatt Nr. L 331 vom 28/11/2001:67-128, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0083:DE:HTML>. (2014)
80. Richtlinie 2003/94/EG DER KOMMISSION vom 8. Oktober 2003 zur Festlegung der Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate. Amtsblatt Nr. L262/22 vom 14.10.2003); <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0094&qid=1396346541352&from=DE>.
81. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. 8:19, 28, 48, 96.
82. Roche Diagnostics GmbH (2010). CASY Model TTC - Cell Counter and Analyzer. [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/applied\\_science/biochemical-reagents-custom-biotech/cell-analysis/05966680001\\_EN\\_EA\\_Product-brochure-CASY-TTC.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/applied_science/biochemical-reagents-custom-biotech/cell-analysis/05966680001_EN_EA_Product-brochure-CASY-TTC.pdf) (2015)
83. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ et al. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17:4550-7.
84. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST (1999). Cutting Edge: Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine (SLC) and CC Chemokine Rezeptor 7 (CCR7) Participate in the Emigration Pathway of Mature Dendritic Cells from the Skin to Regional Lymph Nodes. *J Immunol* 162:2472-5.
85. Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, Vereecken P, Massicard S, Duriau D et al. (2006). Vaccination of melanoma Patients using dendritic cells loaded with allogenic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother* 55:819-829.
86. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995). Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J Exp Med* 182:389-400.
87. Scandella E, Men Y, Gellissen S, Förster R, Groettrup M (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100:1354-61.

88. Schlegel U (2012) Hirntumoren. In: Berlit P (2012). *Klinische Neurologie*. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag GmbH:688, 697.
89. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M et al. (2001) Tumor Cell Lysate-pulsed Human Dendritic Cells Induce a T-Cell Response against Pancreatic Carcinoma Cells: an in Vitro Model for the Assessment of Tumor Vaccines. *Cancer Res* ;61:6445-50.
90. Schön E, Harandi AM, Nordström I, Holmgren J, Eriksson K (2001). Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Reprod Immunol* 50: 87-104.
91. Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J et al. (2011). gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 364:2119-2127.
92. Shortman K, Naik SH (2007). Steady State and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7:19-30.
93. Sims RB (2012). Development of sipuleucel-T: Autologous cellular immunotherapy for the treatment of metastatic castrate resistant prostate cancer. *Vaccine* 30:4394-7.
94. Song YC, Chou AH, Hommuan A, Huang MH, Chiang SK (2011). Presentation of lipopeptide by dendritic cells induces anti-tumor responses via an endocytosis-independent pathway in vivo. *J Leukoc Biol* 90:323-32.
95. Sornasse T, Flamand V, Becker G, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K et al. (1992). Antigen-pulsed Dendritic Cells Can Efficiently Induce an Antibody Response in Vivo. *J Exp Med* 175:15-21.
96. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G et al. (1998). Cutting Edge: Differential Regulation of Chemokine Receptors During Dendritic Cell Maturation: A Model for Their Trafficking Properties. *J Immunol* 161:1083-6.
97. Steinman RM (1991). The Dendritic Cell System And Its Role In Immunogenicity. *Annu.Rev. Immunol* 9:271-96.
98. Steinman RM, Cohn ZA (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantification, tissue distribution. *J Exp Med* 173:1142-62.

99. Strober W (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 21:3B:A.3B.1–.3B.2;  
  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.ima03bs21/full> (2015).
100. Stupp R, Hegi MW, Mason WP, van de Bent MJ, Taphoortn MJB, Janzer RC et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10:459-66.
101. Sysmex Deutschland GmbH (2014) SOP KX-21N. <http://www.sysmex.de/media-center/sop-kx-21n-12290.html>. (2015)
102. Szabo SE, Monroe SL, Fiorino S, Bitzam J, Loper K (2004). Evaluation of an Automated Instrument for Viability and Concentration Measurements of Cryopreserved Hematopoietic Cells. *Lab Hematol* 10:109-111.
103. Van Gool S, Maes W, Ardon H, Verschure T, Van Cauter S, De Vleeschouwer S (2009). Dendritic Cell Therapy of High-Grade Gliomas. *Brain Pathol* 19:694-712.
104. Verordnung 1394/2007/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 13. November 2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004, Amtsblatt Nr. L 324 vom 10/12/2007:121-137, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:01:DE:HTML>. (2014)
105. Wagner HJ, Jabs W, Smets F, Wessel M, Fischer L (2000). Real-Time Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR) for the Monitoring of Epstein-Barr Virus (EBV) Load on Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Klin Padiatr* 212:206-210.
106. Walter S, Weinschenk T, Reinhardt C, Sing-Jasuja H (2013). Single-dose cyclophosphamid synergizes with immune responses to the renal cancer vaccine IMA901. *Oncoimmunology* 2:e22246.
107. Wang HL, Xu H, Lu WH, Zhu L, Yu YH, Hing FZ (2014). In vitro and in vivo evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV 16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 289:155-62.

108. Weller M (2012). Hirntumoren. In: Hans-Christoph Diener, Christian Weimar (2012) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag. Online Version: <http://www.dgn.org/leitlinien-online-2012/inhalte-nach-kapitel/2379-II-76-2012-gliome.html>. (2014)
109. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288:369-76.
110. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S (2013). History of gene therapy. *Gene* 525:162-9.
111. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J Immunol* 169:5538-54.
112. Yan W, Fotadar U, George S, Proce R, Terracio L (2007). Tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Eng* 13:2781-90.
113. Yu SJ, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN, Lee PK (2001). Vaccinations of Malignant Glioma Patients with Peptide-pulsed Dendritic Cells Elicits Systemic Cytotoxicity and Intracranial T-cell Infiltration. *Cancer Res* 61:842-7.
114. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L et al. (2004). Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev* 13:263-71.
115. Zhou LJ, Tedder TF (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2588-92.

## 7) Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Fließdiagramm zur Darstellung des Ablaufes der Validierung der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	28
Abb. 2: Fließdiagramm zur Herstellung der Proben für die spektralphotometrische Bestimmung des Proteingehaltes des TL. ....	37
Abb. 3: Aufbau des Transwell-Assay. ....	40
Abb. 4: Fließdiagramm zur Herstellung der Proben für die Analyse der Aufnahme von FITC-gekoppelten Dextran Molekülen. ....	42
Abb. 5: Analyse der Präzision der Zellkulturbestimmung der PBMC-Proben gemessen mit MoxiZ, Sysmex KX-21N, CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. ....	52
Abb. 6: Analyse der Präzision der Zellkulturbestimmung der DZ-Proben gemessen mit MoxiZ, Sysmex KX-21N, CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. ....	54
Abb. 7: Analyse der Präzision der Vitalitätsbestimmung der PBMC-Proben gemessen mit CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. ....	56
Abb. 8: Analyse der Präzision der Vitalitätsbestimmung der DZ-Proben gemessen mit CASY TTC-150, FACS SPF und der Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. ....	58
Abb. 9: Ergebnisse der Chargenkontrolle von TNF- $\alpha$ (Chargennr. 1406JC11) analysiert mittels Western Blot. ....	59
Abb. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Chargenkontrolle mittels Western Blot aller zur DZ-Differenzierung benötigter Zytokine (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ ). ....	60
Abb. 11: Ergebnisse der FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD83 und HLA-DR. ....	61
Abb. 12: Ergebnisse der FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR. ....	62



Abb. 13: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmarker CCR7, CD1a und PD-L1 gemessen an DZs von V1-V4, je von Tag 0 (gelb), Tag 7 (grün) und Tag 9 (rot).	63
Abb. 14: Ergebnisse der FACS-Analyse der übrigen Zell-Populationen in den DZ-Proben.	64
Abb. 15: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse des Bio-Assay.	65
Abb. 16: Fotografische Aufnahme eines Quadranten der Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung des TLT6933 zum Avitalitätsnachweis.	67
Abb. 17: Fotografische Aufnahme des gleichen Quadranten wie in Abb. 23 der Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung des TLT6933 zum Avitalitätsnachweis, jedoch in veränderter Ebene.	67
Abb. 18: Auswertungsergebnisse der Trypanblaufärbung des cTL und pTL.	68
Abb. 19: Graphische Darstellung der Ergebnisse des ATP-Assay.	69
Abb. 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse Analyse des Tumorlysates mittels CASY TTC-150.	70
Abb.21: Ergebnisse der Analyse des Tumorlysates mittels Morphologi G3.	71
Abb. 22: Ergebnisse des Migrations-Assay mit Zellen aus DZ V1-4 Tag 9.	72
Abb. 23: Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Aufnahme von Dextran-FITC durch Zellen von DZ V1(a) und DZ V4 (b) Tag 7 und Tag 9.	72
Abb.24: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Aufnahme von FITC-markiertem TL durch die DZs.	73
Abb. 25: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Aufnahme von FITC-markiertem TL.	73
Abb. 26: Gel-Dokumentation der PCR zur Etablierung einer PCR-Methode zum Nachweis der Expression von INF- $\gamma$ durch CD8 positive T-Zellen.	74
Abb. 27: Gel-Dokumentation der PCR zur Optimierung der einzusetzenden Primer-Konzentrationen (1).	75
Abb. 28: Gel-Dokumentation der PCR zur Optimierung der einzusetzenden Primer-Konzentrationen (2).	75
Abb. 29: Ergebnis der CD8 (a) und INF- $\gamma$ (b) Expression stimulierter und unstimulierter T-Zellen gemessen mit einer qRT-PCR mit CD8-spezifischen Primern.	76

## 8) Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1:    Verwendete Reagenzien. ....	10
Tab. 2:    Verwendete Geräte. ....	14
Tab. 3:    Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	16
Tab. 4:    Verwendete PBMCs und DZs. ....	18
Tab. 5:    Verwendete Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometer. ....	19
Tab. 6:    Verwendete Antikörper zur Analyse mittels Western Blot. ....	20
Tab. 7:    Verwendete Zytokine und Chemokine. ....	20
Tab. 8:    Primer-Sequenzen der zur konventionellen und zur qRT-PCR eingesetzten Primer. ....	23
Tab. 9:    Beladung des Elektrophorese-Gels zur Chargenkontrolle der Zytokine mittels Western Blot. ....	31
Tab. 10:   Reproduzierbarkeit der PBMC-Zählung der 5 unterschiedlichen Zellzähl-Methoden. ....	51
Tab. 11:   Reproduzierbarkeit der Zellzählungs-Ergebnisse der PBMC- Verdünnungsreihe gemessen mit 5 unterschiedlichen Methoden. ....	51
Tab. 12:   Präzision der unterschiedlichen Methoden zur Zellzahlbestimmung von PBMC-Kulturen in Bezug zur Standard-Methode Neubauer Zählkammer. ....	53
Tab. 13:   Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Zellzählung von DZ-Proben gemessen mittels Neubauer-Zählkammer, MoxiZ, Sysmex KX-21N, Casy TTC-150 und FACS SPF. ....	53
Tab. 14:   Präzision der Zellzahlbestimmung von DZ-Kulturen mittels MoxiZ, Sysmex KX-21N, Casy TTC-150 und FACS SPF Vergleich zur Standard- Methode Neubauer-Zählkammer. ....	55
Tab. 15:   Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Proben gemessen mit Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF. ....	55
Tab. 16:   Präzision der Vitalitätsbestimmung von PBMC-Kulturen gemessen mittels CASY TTC-150 und FACS SPF in Bezug zur Standard-Methode Neubauer-Zählkammer. ....	57

Tab. 17:	Reproduzierbarkeit der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen gemessen mit Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF. ....	57
Tab. 18:	Präzision der Vitalitätsbestimmung von DZ-Kulturen gemessen mittels Neubauer-Zählkammer, CASY TTC-150 und FACS SPF. ....	59
Tab. 19:	Ergebnisse des Bio-Assays von zwei Chargen des Zellkulturmediums (Chargenr. 1069X und 0882A) erhoben mit zwei Zellkulturen (DZ V1 und V2). ....	65
Tab. 20:	Ergebnisse der spektralphotometrischen Proteingehaltbestimmung für T6933. ....	66
Tab. 21:	Auszählungsergebnisse des trypanblau-gefärbten TL T6933 in der Neubauer-Zählkammer, ermittelt von drei unabhängigen Untersuchern. ....	68
Tab. 22:	Ergebnis der qRT-PCR, in welcher cDNA, gewonnen aus mit PHA stimulierten (Probe) und unstimulierten (Kontrolle) T-Zellen, als Matrize eingesetzt wurde. ....	76
Tab. 23:	Ergebnis der qRT PCR zur Optimierung der Primer-Konzentrationen. ....	77
Tab. 24:	Ergebnis der qRT PCR zur Optimierung der einzusetzenden cDNA-Menge. ....	78

## 9) Anlagen

### **Anlage 1:** Differenzierung und Ausreifung der Dendritischen Zellen aus Monozyten

Nach der Isolation werden die CD14+ Monozyten zentrifugiert (400xg, 15min, RT) und auf eine Zellkonzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit CellGro-Medium resuspendiert. Pro Teflonbeutel werden 80 ml dieser Zellsuspension ( $=1,2 \times 10^8$  Monozyten), supplementiert mit 1000U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF, gegeben. Die Kultur der Zellen erfolgt im Reinraumbrutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit für 48h. Alle Brutschränke sind mit einer Alarmaufschaltung an die Gebäudeleittechnik angeschlossen sowie mit einer kontinuierlichen Temperaturüberwachung ausgerüstet. Am Morgen von Tag +2 werden 20ml frisches Cell-Gro Medium (inkl. 1Vol%H-Serum), supplementiert mit 1000U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF, zugegeben. Eine sterile Probe daraus wird zur Sterilitätskontrolle und zur Testung auf Mycoplasmen und Endotoxine verwendet. Danach werden die Zellen für weitere 48h im Brutschrank kultiviert. Am Morgen von Tag +4 werden 20ml frisches Cell-Gro Medium, supplementiert mit 1000U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF, zugegeben. Danach werden die Zellen für weitere 48h im Brutschrank kultiviert. Am Morgen von Tag +6 werden 1000U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF zugegeben. Danach werden die Zellen für weitere 24h im Brutschrank kultiviert. Am Morgen von Tag +7 wird der Zellkulturbeutel aus dem Brutschrank entnommen, manuell vorsichtig bearbeitet um leichte Adhärenzen der Zellen zu lösen und bei 400xg, 15 min, RT zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgepresst und das Zellpellet in mind. 20 ml CellGro-Medium (inkl. 0,01% H-Serum) resuspendiert. Aus dieser gewaschenen Zellsuspension wird eine sterile Probe gezogen und daraus Zellzahl, Vitalität und Phänotyp der Charge bestimmt. Nach Bestimmung der Zellzahl wird das Produktvolumen auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und erstmalig Tumorlysat (50 µg pro  $1 \times 10^6$  Zellen) aufgetaut, gevortext und zugegeben. 2h und 4h nach Zugabe des Tumorlysat-Cocktails werden nochmals 10ml CellGro-Medium (bei höheren Zellmengen je 50% des Startvolumens) supplementiert mit 0,1 und 1% Humanserum verzögert zugesetzt. Dieser Proteingradient hat eine weitere ausdifferenzierende Wirkung auf die zu diesem Zeitpunkt noch halbreifen Dendritischen Zellen. Bei der zweiten Zugabe von CellGro (inkl. 0,1Vol% HSA) werden auch die entsprechenden Mengen an IL-1 $\beta$  (2000 U/ml) und TNF $\alpha$  (1000 U/ml), IL4 (1000 U/ml) und GM-CSF (1000 U/ml) zugegeben. Die verzögerte Zugabe der Ausreifungs-Zytokine soll den DZ Zeit geben, das Tumorlysat zu

phagozytieren und zu prozessieren, bevor der Ausreifungsprozess in Gang kommt. Danach werden die Zellen für weitere 48h im Brutschrank kultiviert. Am Morgen des Tag +9 wird der DZ-Beutel manuell bearbeitet, um evtl. leichte Adhärenzen zu lösen. Die Zellen werden zentrifugiert (300xg, 15 min, RT) und der Mediumüberstand wird abgezogen. Aus dem abgezogenen Mediumüberstand wird die Sterilprobe angefertigt (aerobe & anaerobe Kultur, Mycoplasmen-PCR, Endotoxine). Das Zellpellet wird in restl. Medium resuspendiert und die Beutel werden gepoolt. Die Zellen werden in ein 50ml-Falcon transferiert und zentrifugiert (300xg, 15 min, RT). Das Pellet wird in Humanalbumin 5 % resuspendiert. Aus der gewaschenen Zellsuspension wird eine Probe gezogen und daraus Zellzahl, Vitalität und Phänotyp der Charge bestimmt. Die Probe wird in 5 Aliquots geteilt (zusätzlich ein repräsentatives Aliquot): 1 Aliquot mit  $>2 \times 10^7$  DC/2-4 ml und 4 Aliquots mit  $>5 \times 10^7$  DC/2-4 ml. Die Freigabekriterien/Spezifikationen sind dem FB-CT-FE-046 zu entnehmen. Diese Zellsuspension stellt das biologische Endprodukt der DZ-Herstellung dar. An dieser Stelle erfolgt auch die vorläufige Freigabe der Charge (FB-CT-FE-035 Prüf- und Freigabeprotokoll zur Herstellung autologer DC), da ein Aliquot des Präparates mit Konzentration von  $>2 \times 10^7$  DC/2-4 ml sofort intradermal dem Patienten verabreicht werden soll. Vakzin und Umverpackung wird etikettiert. Der Rest des Präparates (Aliquots mit  $>5 \times 10^7$  DC/2-4 ml) wird sofort kryokonserviert.

## Anlage 2: Endspezifikation Autologe Dendritische Zellen

Autologe Dendritische Zellen zur Tumorstimmung (Zellsuspension in 0,9%iger NaCl-Lösung mit 0,5% vol/vol HSA)

Prüfparameter	Spezifikation	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
Deklaration	Autologe Dendritische Zellen zur Tumorstimmung; Hersteller, Vermerk: klinisches Prüfmuster! Chargenbezeichnung, Haltbarkeit, Identität (Name, Vorname, Geburtsdatum, Spendernummer) Gehalt vitale DC, Volumen	100%	nach Herstellung*, vor Freigabe und vor Abgabe
Identität	Name, Vorname, Geburtsdatum, Spendernummer	100%	am Zwischenprodukt vor/während Verarbeitung am Endprodukt vor Freigabe
ABO, Rh-(D)	bestimmt / deklariert	100%	am Spenderblut vor Freigabe (Identitätssicherung)
irreguläre Antikörper	bestimmt / deklariert	100%	am Spenderblut vor Freigabe (Identitätssicherung)
Rh-Formel	bestimmt/ deklariert	100%	am Spenderblut vor Freigabe (Identitätssicherung)
HBs-Antigen	negativ	100%	am Spenderblut vor Freigabe
Anti-HCV-Antikörper	negativ	100%	am Spenderblut vor Freigabe
Anti-HIV-1/2-Antikörper	negativ	100%	am Spenderblut vor Freigabe
Anti-Treponema pallidum-Antikörper	bestimmt / deklariert	100%	am Spenderblut vor Freigabe
Packungsvolumen Gesamt-Vakzine pro Patient	≤ 10 Kryo-Röhrchen à 0,2 - 0,5 ml	100%	nach Herstellung*
Anteil vitale DC Definition: CD45 <sup>+</sup> / CD11c <sup>+</sup> / CD14 <sup>low/-</sup> / 7AAD <sup>-</sup>	≥ 70 %	100%	vor Kryokonservierung
Gehalt vitale DC Definition: CD45 <sup>+</sup> / CD11c <sup>+</sup> / CD14 <sup>low/-</sup> / 7AAD <sup>-</sup>	pro Einzel-Vakzine: 2 x 10 <sup>6</sup> - 2 x 10 <sup>7</sup> pro Patient (Gesamt-Vakzine): 8 x 10 <sup>6</sup> - 8 x 10 <sup>7</sup>	100%	vor Kryokonservierung
Reifungsgrad DC Definition: Anteil CD3 <sup>+</sup> Zellen und CD19 <sup>+</sup> Zellen an vitalen Zellen	bestimmt/ deklariert	100%	vor Kryokonservierung
Reifungsgrad DC Definition: CD80 <sup>+</sup> Zellen an vitalen Zellen	bestimmt/ deklariert	100%	vor Kryokonservierung
Prüfparameter	Spezifikation	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
Reifungsgrad DC Definition: Zunahme MFI auf DC gegenüber Monozyten	CD86 ≥ 2-fach HLA-DR ≥ 5-fach	100%	vor Kryokonservierung
Funktionalität DC Definition: Zunahme gerichtete Migration frischer DC gegenüber unspezifischer Motilität	≥ 3-fach	100%	vor Kryokonservierung

Mikrobiologische Kontrolle	Bakterien: anaerobe und aerobe Kultur negativ oder negativ bei Abgabe (für vorläufige Freigabe Tag +9) Mykoplasmen: NAT negativ	100%	vor Kryokonservierung und nach Herstellung*
Endotoxin	< 1,5 EU/ml	100%	vor Kryokonservierung und nach Herstellung*
Visuelle Kontrolle	keine Verfärbungen, keine sichtbaren Aggregate Behältnis unversehrt / keine Undichtigkeiten	100%	vor Kryokonservierung, nach Herstellung* und vor Abgabe
Anteil vitale Zellen Definition: CD45 <sup>+</sup> / 7AAD <sup>-</sup>	≥ 50 %	100%	am kryokonservierten Endprodukt vor Freigabe
Gehalt vitale Zellen Definition: CD45 <sup>+</sup> / 7AAD <sup>-</sup>	pro Einzel-Vakzine: 2 x 10 <sup>6</sup> - 2 x 10 <sup>7</sup> pro Patient (Gesamt-Vakzine): 8 x 10 <sup>6</sup> - 8 x 10 <sup>7</sup>	100%	am kryokonservierten Endprodukt vor Freigabe
Phänotyp DC Definition: CD86 <sup>+</sup> / 7AAD <sup>-</sup> Zunahme MFI auf DC gegenüber Monozyten	bestimmt/ deklariert	100%	am kryokonservierten Endprodukt vor Freigabe

\* Angabe der zeitlichen Vorgaben:

nach Herstellung: innerhalb von maximal 7 Tagen nach Ende der Herstellung

**Anlage 3:** Auswertungsgrundlage für die FACS SPF: Definitionen und Verknüpfungen der Auswertungsregionen im Dot-Blot

Region	Verknüpfte Regionen	Messparameter	Zellpopulation
R1	-	FSC, SSC	alle Zellen im Dot-Blot sichtbaren Zellen
R2	-	FSC, SSC	große, granuliert Zellen (FSC und SSC hoch)
R3	-	SSC, 7-AAD	Vitale Zellen (7-AAD niedrig)
R5	-	SSC, 7-AAD	TruCount-Partikel
R4	R2+R3	CD11c, CD45	alle großen, granulären (R2) und gleichzeitig vitalen (R3) Zellen die zudem CD11c und CD45 positiv (R4) sind
R6	R2+R3	SSC, CD45	CD45 hoch-positive, vitale, große, und granuliert Zellen; zum Ausschluss von CD45 niedrig-positiven Granulozyten
R10	R5	Zeit, FSC	Ausschluss Partikel-Konglomerate
R8	R2+R3+R4+R6	CD11c, CD14	CD14 hoch positive Zellen und zudem R2, R3, R4 und R6 = Monozyten
R9	R2+R3+R4+R6	CD11c, CD14	CD14 niedrig positive & negative Zellen und zudem R2, R3, R4 und R6 = DZs
	R1+R3	alle vitalen Zellen	vitale PBMCs

Die Grenze des CD14-Signals zwischen hoch und niedrig positiv wurde für jede DZ-Herstellungsreihe individuell definiert. Ausgangswert (hoch-positiv) stellten die Monozyten der jeweiligen DZ-Herstellungsreihe an Tag 0 dar.

Um die avitalen Zellen zu erfassen, wurde die Region R3 auf die 7-AAD positiven Zellen (ohne R5=Partikel mit zu erfassen) gelegt. Alle mit R3 verknüpften Regionen zeigten dann automatisch die avitalen Zellen an und man konnte diese anhand der übrigen Parameter analog zu den Vitalen charakterisieren.



**Anlage 4:** Auswertungsgrundlage für die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarker an dendritischen Zellen

Region	Verknüpfte Regionen	Messparameter	Zellpopulation
R1	-	FSC, SSC	Große, granulierte Zellen (DZ-Region)
R2	-	FSC, SSC	Kleine, wenig granulierte Zellen (Lymphozyten-Region)
R3	R1	SSC, 7-AAD	Vitale Zellen aus R1 (7-AAD niedrig)
R4	R1+R3	CD14; 7-AAD	Lebende (R3), große und granulierte Zellen (R1), die CD14-negativ sind = DZs
R5	R2	SSC, 7-AAD	Vitale Zellen aus R2 (7-AAD niedrig)
R6	R2+R5	CD3, 7-AAD	Lebende (R5), kleine und wenig granulierte Zellen (R2), die CD3-positiv sind = T-Zellen

Für die Zellen der Region R4 (lebende (R3), große und granulierte Zellen (R1), die CD14-negativ sind = DZs) wurden Histogramme für die Marker CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD1a, CD274 (=PD-L1) und CCR7 dargestellt.

Durch verschieben der Region R4 auf die CD14-positiven Zellen (Monozyten), konnten die Monozyten auf die Expression der Oberflächenmarker hin analysiert werden.

Zur Analyse der in der Ausgangszellkultur enthaltenen Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurden die Zellen aus R6 (lebende (R5), kleine und wenig granulierte Zellen (R2), die CD3-positiv sind (T-Zellen) ausgewertet. Durch verschieben der Region R6 auf die CD3-negativen Zellen (NK- und B-Zellen), konnten diese auf die Expression der Oberflächenmarker CD16/56 (NK-Zellen) und CD19 (B-Zellen) hin analysiert werden.

**Anlage 5:** Definitionen und Verknüpfungen der Auswertungsregionen im Dot-Blot als Auswertungsgrundlage für den Bio-Assay

Region	Verknüpfte Regionen	Messparameter	Zellpopulation
R1	-	FSC, SSC	Große, granulierte Zellen (DZ-Region)
R3	R1	SSC, 7-AAD	Vitale Zellen aus R1 (7-AAD niedrig)
R4	R1+R3	CD14; 7-AAD	Ausschluss CD14-positiver Zellen = DZs

Zusätzlich wurden Histogramme angelegt, um die Ausprägung der eingesetzten Oberflächenmarker genauer untersuchen zu können.

Alle im Färbeprotokoll enthaltenen Marker (CD86, CD80, HLA-DR und CD83) wurden in einem Histogramm dargestellt. In diesen Histogrammen werden alle Zellen abgebildet, die in einer zuvor definierten Region, hier R4 (große, vitale, granuliert CD14-negative Zellen) gemessen wurden. Die Histogramme gaben zum einen an, wie viel Prozent der Zellen in R4 positiv für den jeweiligen Marker waren. Zum anderen die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) für jeden Marker. Diese gibt den Mittelwert des Fluoreszenzsignals pro Zelle an, die für den gemessenen Marker positiv ist, oder anders ausgedrückt, wie stark die Marker je Zelle im Mittel ausgeprägt waren.

Durch verschieben von R4 auf die CD14-positiven Zellen, konnte auch diese Population (Monozyten) auf ihre Oberflächenmarker hin analysiert werden.

**Anlage 6:** Auswertungsgrundlage für die durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme FITC-gekoppelter Dextran-Moleküle und des FITC-gekoppelten TL

Region	Verknüpfte Regionen	Messparameter	Zellpopulation
R1	-	FSC, SSC	Große, granuliert Zellen (DZ-Region)
R3	R1	SSC, 7-AAD	Vitale Zellen aus R1(7-AAD niedrig)
R7	R1+R3	CD14; CD11c	Lebende (R3), große und granuliert Zellen (R1), die CD14-negativ und CD11c-positiv sind = DZs

Für die Zellen der Region R7 wurde ein Histogramm für den MFI von FITC-Dextran dargestellt.

## 10) Publikationen / Danksagung

### **Abstract**

Müller I, Hartmann D, Oertel J, Keck CM, Eichler H (2015). Static Image Analysis as New Approach for the Characterization of Tumor Cell Lysate Used in Dendritic Cell Vaccine Preparation. *Transfus Med Hemother* 42:122-128.

### **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Eichler für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die damit verbundene Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe Klinische Zelltherapie am Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin zu forschen, danken.

Bei Frau Dr. Isabelle Müller bedanke ich mich für die sowohl fachlich hervorragende als auch menschlich überaus angenehme Betreuung und Unterstützung in allen Phasen dieser Promotionsarbeit.

Frau Cora Ecker danke ich für die Einführung in die unterschiedlichen Arbeitstechniken, allen voran bei der Arbeit mit dem FACSCalibur.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Eva Schwarz und allen beteiligten Mitarbeitern am Institut für Biophysik Universität des Saarlandes für die Unterstützung und Bereitstellung der Materialien und Geräte bei der Durchführung der qRT-PCR.

## 11) Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Dorothee Luise Hartmann

Geburtsdatum: 04.07.1990

Geburtsort: 64711 Erbach (Odenw)

Adresse: Mainstraße 40

64739 Höchst (Odenw)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung/ Studium

1996 – 2000 Besuch der Grundschule Höchst

2000 – 2002 Besuch der Ernst-Göbel-Schule, Höchst

2002 – 2009 Besuch des Gymnasiums Michelstadt, Abschluss: Abitur (1,5)

2009 – 2015 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes,

Universitätsklinikum Homburg (Saar)

2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „sehr gut“ (1,5)

2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“

2014-2015: Praktisches Jahr (Universitätsklinikum Homburg, Saar)

## **Praktika**

Schulisches Praktikum: Pathologisches Institut der Universitätsklinik Mannheim (2008)

Pflegepraktikum: Kreiskrankenhaus Groß-Umstadt (2009); Klinik für  
Allgemeinchirurgie

Famulaturen:	August 2012	Kreiskrankenhaus Groß-Umstadt; Klinik für Allgemeinchirurgie
	Februar 2013	Dr. W. Eldracher, Allgemeinmediziner
	August 2013	Drs. R. u. E. Büchler, Allgemeinmediziner
	Februar 2014	Kreiskrankenhaus Erbach, Klinik für Innere Medizin