

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

Etablierung eines Immun-Monitoring-Assays für die dendritische Zellvakzinierung bei Glioblastom

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017**

vorgelegt von: Dominik Altherr
geb. am: 31.03.1992 in Landstuhl

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
Abstract.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Das Glioblastom.....	7
1.1.1 Aktuelle Standardtherapie des Glioblastoms	7
1.1.2 Die dendritische Zell-Vakzinierung	8
1.2 Immunologische Grundlagen.....	9
1.2.1 Dendritische Zellen	9
1.2.2 Tumorantigene	10
1.2.3 Zytotoxische T-Zellen (CTL).....	12
1.2.4 Prinzip der dendritischen Zell-Vakzinierung	13
1.3 Aktuelle Monitoring-Verfahren der Immunantwort.....	13
1.4 Zielsetzung.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Reagenzien:.....	16
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.3 Geräte.....	19
2.1.4 Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.5 Humanes Probenmaterial	23
2.1.5.1 PBMCs.....	23
2.1.5.2 Tumorgewebe und Tumorzelllinien:	25
2.1.5.3 RNA von gesundem Hirngewebe.....	25
2.1.6 Zellkulturmedien.....	26
2.1.7. Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometrie:.....	26
2.1.7.1 Antikörper	26
2.1.7.2 Dextranere.....	27
2.1.8 Zytokine:	28
2.1.9 Peptide:.....	29
2.1.10 PCR-Primer.....	30
2.2 Methoden	33
2.2.1 Allgemeines.....	33
2.2.2 Zellbiologische Methoden:	34
2.2.2.1 Zell-Kultivierung	34
2.2.2.1.1 Bestimmung von Zellzahlen	34
2.2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	34

2.2.2.2 Zell-Gewinnung	35
2.2.2.2.1 Monozyten-Isolation aus einer Leukoreduktionskammer.....	35
2.2.2.2.2 Monozyten-Isolation aus EDTA-Blut von GBM-Patienten.....	37
2.2.2.2.3 Differenzierung isolierter Monozyten zu DCs.....	38
2.2.2.2.4 PBMC- bzw. CD8 ⁺ -T-Zell-Kultivierung bis Tag 9 nach Isolation	41
2.2.2.2.5 Co-Kultivierung der dendritischen Zellen und PBMCs/CD8 ⁺ T-Zellen.....	42
2.2.2.2.6 Kultivierung und Stimulation der Zellen DC-vakzinierter Patienten	44
2.2.2.2.7 Tumorlysat-Gewinnung / Tumorlysat-Herstellung (Avitalisierung).....	46
2.2.3 Immunologische Methoden.....	47
2.2.3.1 Immunfluoreszenz-Markierung für die Durchflusszytometrie (FACS).....	47
2.2.3.2 Peptidspezifische Polymer-Färbung	49
2.2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS).....	50
2.2.3.3.1 Auswertung am Gerät mit der Software CellQuest Pro	53
2.2.3.4 CD8-T-Zellen-Panel an Tag 9 der Kultivierung	53
2.2.3.5 DZ-Panel an Tag 9 der Kultivierung.....	53
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	55
2.2.4.1 RNA-Isolation.....	55
2.2.4.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration.....	56
2.2.4.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	57
2.2.4.4 PCR	58
2.2.4.4.1 Qualitative PCR	58
2.2.4.4.2 Agarosegelelektrophorese	59
2.2.4.4.3 Semi-quantitative PCR.....	60
2.2.4.4.4 Quantitative PCR	61
3. Ergebnisse	64
3.1 GBM-Tumorproteine	64
3.1.1 Semi-quantitativer Vergleich der GBM-Protein-Expression	64
3.1.2 Absolute und relative Häufigkeit der GBM-Proteine und deren Überexpression	66
3.1.2.1 Untersuchung der Pankreaszellen	66
3.2 Zellreifung und Kultivierung	67
3.2.1 Monitoring von Zellwachstum und Zellreife	67
3.3 Immunmonitoring mittels Real-Time-PCR.....	70
3.3.1 Aktivierung von T-Zellen durch DCs: Immunogenes Potenzial des GBM-Tumorlysates.....	71
3.3.1.1 Immunogenes Potenzial des Tumorlysates sowie der Tumorpeptide bei gesunden Blutspendern	74
3.3.1.2 Immunogenes Potenzial des Tumorlysates sowie der Tumorpeptide bei DC- vakzinierter GBM-Patienten.....	75
3.4 Immunmonitoring mittels Durchflusszytometrie.....	76
3.4.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen der CD8 ⁺ -T-Zellen von GBM-Patienten unter	

Standardtherapie.....	76
3.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen der CD8 ⁺ -T-Zellen von GBM-Patienten nach DC-Vakzinierung	79
4. Diskussion.....	81
4.1 GBM-Tumorpeptide.....	81
4.1.1 Expressions-Muster der GBM-Tumorpeptide.....	81
4.1.2 Semi-quantitativer Vergleich der GBM-Peptid-Expression.....	83
4.1.3 Mögliche Optimierungen der PCR-Analyse der Tumorgewebeprobe.....	83
4.2 Zellreifung und Kultivierung	84
4.3 Immunmonitoring mittels Real-Time-PCR.....	85
4.3.1 Bedeutung der Real-Time-PCR innerhalb des vorgestellten Assays	86
4.4 Immunmonitoring mittels Durchflusszytometrie.....	86
4.4.1 Immunogenität der GBM-Tumorpeptide	86
4.4.2 Optimierung der Durchflusszytometrie	88
4.4.3 Ergebnisse DC-vakzinierter GBM-Patienten.....	88
4.4.4 Bedeutung der kombinierten Multimer- und IFN- γ -Färbung im vorgestellten Assay und deren Erweiterbarkeit.....	89
4.4.5 Weitere Anwendungsmöglichkeiten des Assays	90
4.5 Zusammenfassung und Ausblick	91
4.5.1 Ausblick	92
5. Anhang	94
5.1 Bisherige DC-Vakzinierungsstudien	94
5.2 Tumorprotein-Expression.....	97
5.3 Aktuelle CTL-Monitoring-Verfahren.....	98
6. Literaturverzeichnis	100
7. Abkürzungen und Glossar.....	106
8. Publikation und Danksagung	108
8.1 Publikation	108
8.2 Kongressbeitrag	109
8.2 Danksagung.....	109

Zusammenfassung

Das Glioblastom gilt als häufigste maligne hirneigene Neoplasie des erwachsenen Menschen. Unter bisheriger Standardtherapie können betroffene Patienten mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 14,6 Monaten rechnen.

Die dendritische Zell-Vakzinierung ist eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Tumoren wie dem Glioblastom, die nachweislich zu einer Verlängerung der mittleren Überlebensdauer führt. Obwohl eine immer größere Anzahl an Studien und Behandlungen diese Methode nutzt, mangelt es an Möglichkeiten, die immunologischen Abläufe im Rahmen der Therapie zu analysieren und zu bewerten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Monitoring-Assay zu etablieren, um die immunologische Antwort von Patienten im Rahmen der DC-Vakzinierung zu messen.

Der Monitoring-Assay konzentriert sich dabei auf die Analyse von T-Zellen als Haupt-Effektorzellen der Anti-Tumor-Antwort im Rahmen der Immuntherapie mit dendritischen Zellen. Die T-Zellen wurden durch eine Kombination von Real-Time-PCR und Durchflusszytometrie untersucht. Die Real-Time-PCR diente zur sensitiven Messung der IFN- γ -Expression, welche im Falle einer immunologischen Aktivierung ansteigt. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der T-Zellen wurden neben der Analyse von Zell-Oberflächenmolekülen auch intrazelluläre Moleküle untersucht und mit einer Multimer-Färbung auch tumorantigen-spezifische T-Zellen erfasst. Somit erlaubte der Assay sowohl eine phänotypische als auch eine funktionelle Beurteilung der T-Zellen.

Zur Etablierung des Verfahrens wurden Zellen von gesunden Blutspendern, Glioblastom-Patienten unter Standardtherapie und Glioblastom-Patienten, die mit der dendritischen Zellvakzinierung behandelt wurden, vergleichend untersucht. Außerdem wurden mehrere Peptide bezüglich ihrer Immunogenität analysiert, um ihren Stellenwert als Ziel-Antigene im Rahmen der DC-Vakzinierung beurteilen zu können.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der vorgestellte Monitoring-Assay dazu geeignet ist, die immunologischen Abläufe der DC-Vakzinierung zu messen und die Immunogenität einzelner Ziel-Antigene zu beurteilen.

Abstract

Glioblastoma is the most frequent and the most aggressive brain tumor in adults. Under standard course of therapy patients have a mean survival time of 14.6 months.

Dendritic cell vaccination is a new therapeutic option for cancer, such as glioblastoma, which showed an improvement in mean survival time in clinical trials.

Although a growing number of studies and applications of the DC-vaccination have been published, there is still need for assays to analyse and evaluate the immunological response caused by the therapeutic approaches.

Our study aimed to establish a monitoring assay which makes it possible to measure the tumor-specific immunological response of DC-vaccinated patients.

T cells are mainly responsible for the elimination of tumor cells. Therefore, the established monitoring assay focuses on analysing T cells.

The cells were characterised by a combination of real-time-PCR and flow cytometry. IFN- γ expression as a measure of immunological response was analysed with sensitive real-time-PCR. Flow cytometry was used to measure molecules on the cell surface as well as intracellular. Additionally, multimer staining was performed to identify tumor-peptide specific T cells.

As a combination of these methods, the monitoring assay made it possible to evaluate the phenotype and function of T cells.

To establish the monitoring assay, cells from healthy blood donors, glioblastoma patients under standard course of therapy and glioblastoma patients who underwent DC-vaccination have been analysed. Additionally, several peptides have been analysed and their possibility to generate a cytotoxic immune response has been evaluated.

Altogether, a monitoring assay for patients under DC-vaccination was successfully established. We were able to demonstrate that this assay is suitable to measure the cellular immune response of DC-vaccinated patients. In addition, the assay helps in evaluating possible new antigens to be included for this therapy.

1. Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Das Glioblastom ist ein maligner Hirntumor und gilt mit einer Inzidenz von 2,9 bis 3,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr als die häufigste bösartige hirneigene Neoplasie des erwachsenen Menschen (Horn: Biochemie des Menschen 2009). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 61,3 Jahren, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Ohgaki et al. 2005). Wie alle Hirntumore wird auch das Glioblastom nach der WHO-Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems (Louis et al. 2007) eingeteilt. WHO-Grad I beschreibt in diesem Zusammenhang histologisch gutartige Tumore, die in der Regel durch operative Entfernung kurabel sind. Als Grad II sind infiltrativ wachsende, zu Rezidiven neigende Tumore klassifiziert, die jedoch noch als histologisch gutartig zu betrachten sind und die Überlebenszeit des Patienten nicht wesentlich einschränken. Mit Grad III hingegen werden Tumore bezeichnet, die sich histologisch als bösartig darstellen und die die Überlebenszeit des Patienten reduzieren. Grad IV schließlich beschreibt die histologisch bösartigsten Tumore, die eine deutliche Reduktion der Überlebenszeit für den Patienten bedeuten. Zu diesen WHO-Grad IV Tumoren wird das Glioblastom mit einer sehr schlechten Prognose und bisher nur unzureichend wirksamen Therapieoptionen gezählt (Louis et al. 2007). Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung ist abhängig von mehreren Faktoren wie dem Alter des Patienten, der Behandlung und dem Karnofsky-Index. Ohne Behandlung ist jedoch von einer mittleren Überlebenszeit von ca. 3 Monaten auszugehen (Dt. Gesellschaft für Neurologie: Leitlinie für Diagnostik und Therapie – Gliome 2014).

1.1.1 Aktuelle Standardtherapie des Glioblastoms

Galt zunächst die alleinige operative Therapie als Standardbehandlung des Glioblastoms (Vuorinen et al. 2003, Stummer et al. 2006, 2008, 2012 und Kreth et al. 2013), wurde sie rasch um eine zusätzliche Strahlentherapie mit 60 Gy erweitert (Laperriere et al. 2002). In der Kombination konnte dabei ein medianes Überleben von 12,1 Monaten erreicht werden (Stupp et al. 2005). Der aktuelle therapeutische Standard der Glioblastombehandlung ergänzt diese Kombination noch um die adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid (für gewöhnlich 6 Zyklen). Dieses Therapie-Schema wird in der Literatur auch „Stupp-Schema“ genannt. Die zusätzliche Behandlung mit

Temozolomid bewirkt eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit auf 14,6 Monate. Die 2-Jahres-Überlebensrate beträgt 26 Prozent (Stupp et al. 2005).

Die trotz Therapie als sehr schlecht zu beurteilende Prognose der Erkrankung ist Grund für den Bedarf an neuen Möglichkeiten der Glioblastom-Behandlung.

1.1.2 Die dendritische Zell-Vakzinierung

Die dendritische Zell-Vakzinierung, die als zellbasierte immunmodulierende Therapie zu den Arzneimitteln für neuartige Therapien zählt (Advanced Therapy Medicinal Product, ATMP) und deren Funktionsweise in den folgenden Kapiteln erläutert wird, stellt eine vielversprechende Ergänzung zu der bisherigen Standard-Therapie bei Patienten mit Malignomen dar. So wurden Untersuchungen zur Anwendungen der DC-Therapie des Prostatakarzinoms (Kantoff et al. 2010), des malignen Melanoms (Hong et al. 2010 und Rosenberg et al. 2011), des Nierenzellkarzinoms (Su et al. 2003) und anderer Tumore (Mocellin et al. 11&12/2004) durchgeführt. Die Wirksamkeit der DC-Therapie für die Glioblastom-Tumorthherapie wurden inzwischen in vielen Studien mit teilweise ermutigenden Ergebnissen untersucht. Hierzu seien im Folgenden beispielhaft mehrere Arbeiten aufgeführt.

Phuphanich et al. (2013) zeigte, dass Patienten, die nach Behandlung mit der Standard-Therapie zusätzlich mit der dendritischen Zell-Vakzinierung therapiert wurden, ein medianes Überleben von 38,4 Monaten aufwiesen. Chang et al. (2014) verglich Patienten, die mit der dendritischen Zelltherapie behandelt wurden, mit einer Kontrollgruppe und stellte fest, dass das mediane Überleben der ATMP-behandelten Patienten 520 Tage im Vergleich zu 380 Tagen betrug. Außerdem schnitt die behandelte Patientengruppe mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 18,8% im Vergleich zu 0% in der Kontrollgruppe deutlich besser ab. Prins et al (2011) konnte in seiner Arbeit bei DC-behandelten Patienten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 31,4 Monaten zeigen, genauso wie Cho et al. (2012) eine durchschnittliche Überlebenszeit von 32 Monaten nachwies. Eine Übersicht über die weiteren durchgeführten Studien zur DC-Therapie und die dort gemessenen medianen Überlebenszeitspannen sind in *Kap. 5.1* tabellarisch zusammengefasst.

Trotz dieser Erfolg versprechenden Daten herrscht bisher ein deutlicher Mangel an Wissen über die im Rahmen der DC-Vakzinierung ablaufenden Immunphänomene, nicht zuletzt wegen fehlender Surrogat-Marker zum Monitoring der induzierten Immunantwort.

1.2 Immunologische Grundlagen

Um die Funktionsweise der DC-Vakzinierung und der immunologischen Anti-Tumorbehandlung nachvollziehen zu können, werden im Folgenden die hierfür relevanten physiologischen Immunabläufe geschildert.

1.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die sich aus unterschiedlichen Vorgängerzellen (u.a. Monozyten, lymphoiden und myelozytären Vorläuferzellen) entwickeln können (Guilliams et al. 2014). Sie kommen ubiquitär im Körper vor, finden sich in großer Anzahl jedoch vor allem in Oberflächengeweben, wie den Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts oder des respiratorischen Systems sowie der Haut (Gwendalyn et al. 2005), wo die Unterform der Langerhanszellen auch ursprünglich erstmals von Paul Langerhans 1867 identifiziert wurde. Als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität sind die unreifen dendritischen Zellen dazu in der Lage, Pathogene (Bestandteile von Viren, Bakterien, etc.) mittels PRP-Rezeptoren wie beispielsweise den Toll-like-Rezeptoren zu erkennen und zu phagozytieren. Nach der Aufnahme solcher Antigene verlassen die dendritischen Zellen die peripheren Oberflächengewebe und wandern Chemokin-gesteuert in den nächstgelegenen Lymphknoten bzw. in die Milz oder die Tonsillen ein (Cyster 1999). Phagozytierte Antigene werden im Zellinneren zu Peptiden prozessiert und dann über MHC-Klasse II-Moleküle an der Zelloberfläche der dendritischen Zellen präsentiert. Zusammen mit der Ausschüttung co-stimulatorischer Zytokine sind die dendritischen Zellen so in der Lage, für ein selektives Peptid spezifische T-Zellen zu aktivieren (Banchereau und Steinman 1998).

Aufgrund der Heterogenität der dendritischen Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte Zell-Oberflächenmoleküle genutzt, um zu dokumentieren, dass mit reifen dendritischen Zellen gearbeitet wurde. Dabei kamen die Reifungsmarker CD14, 80, 83, 86 und HLA-DR zum Einsatz. Die hier aufgeführten Marker werden beispielsweise auch in den Publikationen von Brossart et al. 2000, De Vleeschouwer et al. 2008, Kugler et al. 2000, Salcedo et al. 2006 und Yu et al. 2001 genutzt. CD14 ist dabei ein Oberflächenmolekül, das als charakteristisch für Monozyten gilt, auf dendritischen Zellen jedoch nicht ausgebildet wird bzw. dessen Expression im Laufe der Reifung der Zellen herunterreguliert wird (Steinman RM 1991). CD83 ist ein klassisches Oberflächenmolekül von dendritischen Zellen (Zhou et al. 1996), und CD80 sowie

CD86 co-stimulatorische Moleküle, welche DCs bilden (Peters et al. 1996). HLA-DR ist auf DCs verstärkt ausgeprägt und ist ein MHC-Klasse-II Molekül. Seine Expression nimmt im Laufe der Zellreifung der DCs zu (Steinman 1991).

1.2.2 Tumorantigene

Um T-Zellen zu aktivieren und eine Immunantwort auszulösen, sind einerseits die MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zellen notwendig und andererseits entsprechende Antigene, die von den dendritischen Zellen phagozytiert, prozessiert und dann als Peptide in einer Bindungstasche des MHC-II-Moleküls anderen Zellen präsentiert werden.

Physiologisch übernehmen die dendritischen Zellen in der Regel die Aufgabe, körperfremde Peptide (Bestandteile von Bakterien, Viren, etc.) über ihre MHC-II-Moleküle zu präsentieren und somit eine Immunantwort gegen Infektionskrankheiten im Körper auszulösen. Im Falle der therapeutischen Nutzung der dendritischen Zellen im Rahmen der DC-Vakzinierung finden jedoch körpereigene Antigene Verwendung. Diese Antigene sind Proteine und/oder Peptide, die in den Tumorzellen, zum Teil aber auch in gesunden Zellen der Patienten gebildet werden. Belädt man die dendritischen Zellen mit diesen Peptiden und präsentieren sie diese wiederum auf ihrer Oberfläche, wird eine Immunantwort ausgelöst und T-Zellen werden aktiviert.

Obwohl die dendritische Zell-Therapie zur Tumorbehandlung bei Glioblastom-Patienten bereits in einer Vielzahl von Fällen durchgeführt wurde (vgl. *Tabelle 5.1*), ist noch immer wenig darüber bekannt, welche Peptide nach Präsentation mittels MHC-II-Komplex der dendritischen Zellen eine T-Zell-Immunantwort gegen den Tumor auslösen bzw. mit welchen Peptiden dies möglicherweise effizienter möglich ist (Dutoit et al. 2012). Des Weiteren ist die Protein-Expression in Glioblastom-Tumorzellen sehr patientenspezifisch (Dutoit et al. 2012). Dieser Umstand verdeutlicht, wie wichtig die patientenindividuelle Beurteilung der Immunogenität einzelner Peptide ist.

In Arbeiten von Dutoit et al. 2012 wurden mittels Flüssigchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie über 6000 Peptide identifiziert, die von Glioblastom-Tumorzellen exprimiert und auf deren Oberfläche präsentiert werden. Aus diesen 6000 Peptiden wurden 10 ausgewählt, die weitergehend untersucht wurden und die in *Tabelle 1.1* aufgeführt sind. Auf Basis dieser publizierten Daten wurde für das Forschungsprojekt davon ausgegangen, dass diesen Peptiden eine Schlüsselrolle im Zusammenhang mit der Glioblastom-Tumorerkrankung zukommt (vgl. „*Funktion*“ in *Tabelle 1.1*). Daher wurden im Verlauf des etablierten Monitoring-Assays diese 10 Peptide näher untersucht und ihre immunologische Rolle im Rahmen der DC-Vakzinierung analysiert.

Tabelle 1.1: Tumorproteine bei Glioblastom, basierend auf Duoit et al. 2012, Hu et al. 2008, Chekenya et al. 1999 & 2004, Yang et al. 2004, Mita et al. 2007, Liang et al. 2005, Sensi et al. 1998, Soh et al. 2007, Ulbricht et al. 2003, Kim et al. 2000 und Herold-Mende et al. 2000

Protein	Verwendete Abkürzungen	Bedeutung für Tumorzellen	Funktion
Brevican	BCA	Tumor-Invasion, Stammzell-assoziert	Gehirn-spezifisches Molekül der extrazellulären Matrix
Chitinase 3-like 2	CHI	Unklare Funktion	-
Chondroitin sulphate proteoglycan 4	CSPG4	Neovaskularisation	Transmembranäres Proteoglykan
Fatty acid-binding protein 7, brain	FABP7	Mit gesteigerter Tumorzell-motilität sowie kürzerer Überlebenszeit der Patienten bei Expression in den Tumorzellen assoziiert	Zytoplasmatisches Protein, involviert in den Fettsäure-metabolismus
Insulin-like growth factor 2 messenger RNA-binding protein 3	IGF2BP3	Bei Expression mit kürzerer Überlebenszeit assoziiert	Kontrolle der mRNA Translation
Neuroigin 4, X-linked	NLGN4X	Tumor-Entstehung und Tumor-Invasion	Zelladhäsion
Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	Tumor-Entstehung, Tumor-Invasion und Tumorwachstum sowie bei Expression assoziiert mit kürzerer Überlebenszeit	Beteiligt am β -Catenin-Signalweg
Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	PTP ₁₉₅₋₂₀₃ und PTP ₁₃₄₇₋₁₃₅₅	Tumor-Entstehung	Transmembran-Protein
Tenascin C	TNC	Angiogenese, Tumorproliferation	Glykoprotein der extrazellulären Matrix

1.2.3 Zytotoxische T-Zellen (CTL)

T-Zellen (= T-Lymphozyten) sind Teil des zellulären Anteils der adaptiven Immunabwehr (Horn: Biochemie des Menschen 2009 und Klinker et al.: Physiologie 2010). Sie werden im Knochenmark gebildet und reifen anschließend im Thymus aus. Dort durchlaufen sie Selektionsschritte, um ausschließlich solche T-Zellen zu erhalten, die körperfremde Antigene erkennen können. Die entscheidende Rolle bei der Erkennung solcher Antigene spielt der T-Zellrezeptor. Durch die Bindung an ein von einem MHC-Molekül präsentierten Antigen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, nach welchem ein T-Zellrezeptor nur ein spezifisches Antigen erkennt, und mit Hilfe mehrerer co-stimulatorischer Rezeptoren (CD3, CD4, CD8, ...) werden Signalwege gestartet, welche die T-Zelle aktivieren (Horn: Biochemie des Menschen 2009 und Klinker et al.: Physiologie 2010).

Dabei sind zytotoxische T-Zellen dadurch charakterisiert, dass sie CD8-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche tragen und in der Regel Antigene im Zusammenhang mit MHC-I-Molekülen erkennen. Werden zytotoxische T-Zellen durch das Erkennen von spezifischen Antigenen, die eine Zelle auf ihrer Oberfläche präsentieren, aktiviert, schütten sie Perforine und Granzyme aus. Diese Moleküle lösen in der Zielzelle die Apoptose aus und töten sie somit ab. Des Weiteren wird auch Interferon- γ freigesetzt, das in den umliegenden Zellen für eine gesteigerte Präsentation von Peptiden über die MHC-I-Moleküle sorgt und somit die Erkennung weiterer erkrankter Zellen durch zytotoxische T-Zellen erleichtert (Horn: Biochemie des Menschen 2009 und Klinker et al.: Physiologie 2010).

Für den Nachweis, dass mit reifen T-Zellen gearbeitet wurde, diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Konversion der Zell-Oberflächenmoleküle CD45Ra zu CD45Ro sowie CD8 und CD71 während der Zellkultivierung. Hierzu gilt, dass naive T-Zellen hauptsächlich CD45Ra auf der Zelloberfläche tragen, wohingegen nach Antigenkontakt dieses Molekül herunterreguliert und stattdessen CD45Ro exprimiert wird (Dutton et al. 1998). Mit der Expression von CD71 verhält es sich ähnlich, da auch dieses Molekül nach Aktivierung der T-Zelle vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Caruso et al. 1997).

Im Zusammenhang mit der dendritischen Zellvakzinierung bei Glioblastom-Patienten konnte bisher gezeigt werden, dass die durch dendritische Zellen stimulierten T-Zellen der Patienten das Tumorgewebe infiltrieren (Liau et al. 2005 und Yu et al. 2001).

Als entscheidende Effektorzellen sind zytotoxische T-Zellen daher von großem Interesse zur Beurteilung und Analyse der immunologischen Abläufe im Rahmen der dendritischen Zellvakzinierung.

1.2.4 Prinzip der dendritischen Zell-Vakzinierung

Zytotoxische T-Zellen erkennen mittels des auf ihrer Oberfläche sitzenden T-Zell-Rezeptors von dendritischen Zellen durch MHC-II-Moleküle präsentierte Antigene. Im Zusammenspiel mit Co-Rezeptoren werden hierbei die T-Zellen aktiviert. Bei der DC-Vakzinierung macht man sich diese Mechanismen zunutze, in dem autologe dendritische Zellen der Patienten mit Tumorantigenen beladen werden. In bisherigen Studien (vgl. *Tabelle 5.1*) wurden hierzu meistens Tumorlysat und/oder einzelne tumorassoziierte Peptide als Antigene genutzt. Die so behandelten dendritischen Zellen werden anschließend den Patienten – je nach Studienkonzeption nach unterschiedlichen Schemata – reinjiziert und lösen dann eine T-Zell vermittelte Immunantwort aus, die gegen den Tumor gerichtet sein soll. Sowohl eine T-Zell-Aktivierung als auch tumor-infiltrierende CTLs konnten in diesem Zusammenhang wiederholt nachgewiesen werden. (vgl. *Tabelle 5.1*)

1.3 Aktuelle Monitoring-Verfahren der Immunantwort

Bisher existiert kein standardmäßig verwendeter Assay zum Monitoring von zytotoxischen T-Zellen und der Immunantwort im Rahmen der DC-Vakzinierung. Alle aktuell Verwendung findenden Verfahren bieten unterschiedliche Vor- und Nachteile, die bei der Analyse gegeneinander abgewogen werden müssen. Basierend auf den Publikationen von Egli et al 2012 und Fernández-Ruiz et al. 2014 werden im Folgenden die Eigenschaften der Analyseverfahren dargestellt.

Das Zytokin-Profilung bietet die Möglichkeit zur funktionalen Analyse, während phänotypische Gesichtspunkte der Zellen nicht berücksichtigt werden können. Bei hoher Sensitivität bietet das Verfahren die Möglichkeit, auch geringe Probenmengen zu untersuchen. Größter Nachteil ist jedoch die große Datenmenge, die bei der Analyse entsteht und die einer speziellen Auswertung bedarf.

Die Real-Time-PCR ermöglicht ebenfalls eine funktionale Analyse ohne phänotypische Charakterisierung der untersuchten Zellen. Durch die hohe Sensitivität und durch während der Reaktion ablaufende Amplifikationsschritte sind auch geringe Probenmengen zur Analyse ausreichend. Allerdings ist das Verfahren arbeitsintensiv.

Der ELISPOT-Assay erlaubt wie die beiden zuvor erwähnten Verfahren die funktionale Analyse ohne phänotypische Charakterisierung der untersuchten Zellen. Bei zwar hoher Sensitivität sind jedoch aufgereinigte PBMCs zur Analyse notwendig. Auch die geringe technische Standardisierung ist zu den Nachteilen des Verfahrens zu zählen.

Die intrazelluläre Zytokin-Färbung und anschließende Messung mittels Durchflusszytometrie ermöglicht im Gegensatz zu den zuvor genannten Verfahren nicht nur eine funktionale, sondern

auch eine phänotypische Untersuchung von Zellen. Vorteilhaft ist die große Spannbreite an Zell-Phänotypen, beispielsweise Effektor- oder regulatorische T-Zellen, die erfasst werden können. Außerdem können Co-Rezeptoren und die Zytokin-Expression der Zellen gemessen werden. Als Nachteile stehen diesen vielfältigen Analysemöglichkeiten jedoch ein hoher Arbeitsaufwand und eine geringe technische Standardisierung gegenüber.

Die Multimer-Färbung für Zellen mit definierten HLA-Antigenen mittels Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, bei hoher Spezifität antigenrestringierte Zellen zu erkennen. Das Verfahren ist jedoch ebenfalls arbeitsintensiv, zudem hat es nur eine geringe technische Standardisierung sowie die Notwendigkeit einer zuvor erfolgten HLA-Typisierung.

Eine ausführlichere tabellarische Übersicht über die Verfahren bietet *Tabelle 5.3* im Anhang.

1.4 Zielsetzung

Die DC-Vakzinierung als Behandlungsmethode des Glioblastoms und anderer Tumorerkrankungen war in den vergangenen Jahren Gegenstand klinischer Studien. Dabei traten die immunologischen Prozesse im Rahmen dieser Therapie immer mehr in den Fokus der Untersuchungen. Jedoch gibt es noch keine standardmäßig verwendete Möglichkeit, diese Abläufe zu analysieren. Aus diesem Grund widmet sich die vorliegende Arbeit zwei zentralen Themengebieten.

- 1.) Der Etablierung eines Immun-Monitoring-Assays, mit dem es möglich ist, die immunologische Antwort des Patienten im Rahmen der DC-Vakzinierung zu messen.
- 2.) Die Untersuchung mehrerer Proteine bzw. Peptide bezüglich ihrer Immunogenität und ihres Stellenwertes als Ziel-Antigene der DC-Vakzinierung.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden autologe dendritische Zellen gesunder Blutspender, nach aktuellem Standard therapierter Glioblastom-Patienten und DC-vakzinierter Patienten, auf ihre Wirksamkeit, mit der sie eine Immunantwort auslösen, untersucht und miteinander verglichen. Beurteilt wurde dies durch die Untersuchung von zytotoxischen T-Zellen, die durch diese dendritischen Zellen stimuliert wurden. Als Analyseverfahren wurden dabei Real-Time-PCR und Durchflusszytometrie mit intrazellulärer Zytokin-Färbung in Kombination mit Dextramer-Färbung genutzt. Als Zeichen der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen wurde hierzu vor allem die Expression von IFN- γ gewertet, sowie das durch die Dextramerfärbung untersuchte Vorhandensein von peptidspezifischen T-Zellen (Clay et al. 2001 und Pulaski et al. 2002).

Des Weiteren wurden mittels PCR Glioblastom-Gewebeproben auf die Expression und

Überexpression im Vergleich zu gesundem Gehirngewebe der in *Tabelle 1.1* genannten spezifischen tumor-assoziierten Proteine untersucht.

Durch die Kombination dieser Analyse-Verfahren sollen alle relevanten Aspekte der Immunreaktion von Glioblastom-Patienten erfasst und die Lücken, die bei Verwendung einzelner Analyse-Verfahren auftreten, geschlossen werden.

Insgesamt soll es durch die Verwendung des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Monitoring-Assays möglich sein, die Mechanismen der DC-Vakzinierung besser zu verstehen, die patientenspezifische Immunantwort individuell zu beurteilen, sowie die Immunogenität einzelner Antigene zu untersuchen und zu bewerten. Darüber hinaus soll dieser Assay langfristig dazu beitragen, die DC-Vakzinierung durch Veränderungen im Rahmen der Kultivierung oder Zusammensetzung der genutzten Antigene zu optimieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien:

Tabelle 2.1: Reagenzien

Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose-Tabletten	HP 67.3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	700464	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA), Protease Free	K41-012	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Brilliant II SYBR Green QPCR Master-Mix	600828	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA
Calibrite 3 Beads (unlabeled, FITC, PE, PerCP)	340486	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Calibrite Beads APC	340487	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CASY ton	5651808001	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Cellwash	349524	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Dasatinib	9052 S	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Dextran 40	9227.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (= DMSO)	A994.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6x)	RO611	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
DNase I Solution (2500U/ml)	90083	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
dNTP Mix	R0192	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco	11504496	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Calcium, Magnesium	H21-002	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Essigsäure (CH ₃ COOH)	700879	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	P075.3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	CN06.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EZ-Vision Three	N313-KIT	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
Facs Clean	340345	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Facs Flow	342003	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Facs Rinse	340346	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetal bovine Serum (= FBS), Heat inactivated	A15-104	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Ficoll Paque Premium	11743219	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
GeneRuler 100bp DNA Ladder	SM0242	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Glukose (40%)	3159304	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
GolgiStop	554724	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (1X)	11530476	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	701095	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamine	M11-004	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	L2630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NaCl	703009	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	106495	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser (steam sterilised, DEPC treated)	T143.3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	104005	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Penicillin / Streptomycin (100x)	P11-010	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Phytohemagglutinin (= PHA)	232-718-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Random-Hexamer Primer	SO142	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Reverse Transkriptase (inkl. Reaktionspuffer)	EP0441	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RiboLock Rnase Inhibitor	EO0381	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37% reinst.	701661	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Saponin	4185.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TAEExPuffer (25x)	0796-1.6L	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
Taq DNA Polymerase, recombinant	EP0402	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	93595	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden die Zusammensetzung, Lagerungsbedingungen sowie – falls nötig – der mit NaOH bzw. HCL eingestellte pH-Wert aller benutzten Puffer aufgeführt.

PBS (Phosphat-buffered saline)-Puffer:

- 100 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) + 900 ml H₂O
- pH: 7,2
- Lagerung: bei Raumtemperatur

PBS mit 0,5% BSA:

- 100 ml PBS + 1,43 ml BSA (35%)
- Lagerung: bei +5 °C

Permeabilisationspuffer (Saponin 0,1%):

- 100 ml PBS mit 0,5% BSA + 0,1 g Saponin
- Lagerung: bei +5 °C

EDTA 0,5M:

- 18,61 g EDTA + 100 ml H₂O (millipore)
- Lagerung: bei +5 °C

PBS mit 0,5% BSA und 1 mM EDTA (= PBS/BSA/EDTA):

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

Gel-Elektrophorese-Puffer (1x TAE):

- 40 ml 25x TAE-Puffer + 960 ml H₂O (millipore)
- Lagerung: bei Raumtemperatur

Erythrozytenlyse-Puffer:

- 155 mM NH₄Cl (0,829g in 100 ml H₂O) + 10 mM KHCO₃ (0,1 g in 100 ml H₂O) + 0,1 mM EDTA (0,0038g in 100 ml H₂O) oder 20 µl 0,5 M EDTA-Stocklösung, man mit H₂O (millipore) auf 100 ml auffüllt
- pH: 7,3
- anschließend steril filtrieren (mit einem 0,2 µm Filter)
- Lagerung: bei +5 °C

die

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.2: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec DX-65	Systec GmbH, Wettberg, Linden, Deutschland
Bestrahlungsanlage	Gamma Bestrahlungsanlage	STS Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig, Deutschland

Brutschrank	Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine	AF-80	Hubbard Systems, Gt. Blakenham, Ipswich, Suffolk, United Kingdom
Elektrophorese-Netzgerät	Consort EV261	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Lichtmikroskop	Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gel-Dokumentations-System	GenoSmart	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gel-Elektrophoresekammer	EasyPhor Gelelektrophoresekammer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Gewebe-Dissoziator	gentleMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Hämatologieanalysator (Zellzählgerät)	Sysmex KX-21C	Sysmex Corporation, Wakinohama-kaigandori, Chuo-ku, Kobe, Japan
Heizblock	Blockthermostate, digital (230V)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kryo-Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	MP360 CS	Dometic S.à r.l, Hosingen, Luxemburg
Laborabzug	Delta System 30	Wesemann GmbH, Syke, Deutschland
Magnetrührer	Variomag Maxi Direct	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Mikrowelle	700 Watt; 17 L Innenraum; Severin	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Multipette	Multipette Stream	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Zählkammer nach Neubauer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR-Cycler	Mastercycler Personal 5332	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
pH-Messgerät	pH-Messgerät Inolab PH 7310	WTW (Wissenschaftliche Technische Werkstätten GmbH), Weilheim, Deutschland
Pipette 0,2-2 µl	Pipetman P2; 0,2-2 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA

Pipette 2-20 µl	Pipetman P20; 2-20 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 20-200 µl	Pipetman P200; 20-200 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipette 200-1000 µl	Pipetman P1000; 200-1000 µl	Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipettierhelfer	Accu Jet 1060	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Real-Time-PCR-Detektionssystem	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Spektralphotometer	BioMate 3S	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C)	UF 755 G	Dometic S.à r.l, Hosingen, Luxemburg
Vortex-Schüttler (Reagenzschüttler)	Lab Dancer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	Modell AY1501	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	TW8	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zellzählgerät	Casy TTC	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Zellzählgerät	Moxi Z	Orflo Technologies, Ketchum, Idaho, USA
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterial

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
96 Well PCR-Platte, PP, weiß, halber Rand, für RT PCR	669285	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CASY cups	5651794001	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

CD137 MicroBead Kit, human	130-093-476	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Citrat-S-Monovette	04.1922.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Combitips (für Eppendorf Multipette)	30089456	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Cryo.S (Einfrier-Röhrchen, 2 ml)	122280	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
EDTA-S-Monovette	01.1621.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Spritze, 20 ml	30004	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Friedrichsthal Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Reagiergefäße 1,5 ml	72.690.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhre 15 ml	62.542.512	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhre 50 ml	62.547.254	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
gentleMACS M-Tubes	130-093-236	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kassetten für MoxiZ, Typ M	MXC001	Orflo Technologies, Ketchum, Idaho, USA
Kassetten für MoxiZ, Typ S	MXC002	Orflo Technologies, Ketchum, Idaho, USA
Microseal 'B' Film (Adhäsiv-Folie)	MSB1001	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Multiply-PCR-Gefäß	72.737.002	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Oberflächen-Desinfektionsmittel	133 402	Schülke& Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Parafilm	701478	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß (PCR micro test tube)	04-010-1000	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Pipetten-Spitzen 1000 µl	70.762.100	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Spitzen 200 µl	70.760.502	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Spitzen 20 µl	70.1116.100	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Spitzen mit Filter 0,1-2,5 µl	70.1130.212	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
QIAshredder	79654	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland

Rneasy Plus Micro Kit (50)	74034	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Serologische Pipette, 10 ml (steril)	86.1254.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette, 5 ml (steril)	86.1253.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Steriles Einmal-Skalpell	5518059	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter (Filtropur S 0,2)	62.547.254	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
T Cell Activation/Expansion Kit, human	130-091-441	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
TruCount-Röhrchen	340334	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur Microplatte, 96 Well	655180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 175cm ² (mit Filter)	660175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 25cm ² (mit Filter)	690175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75cm ² (mit Filter)	658175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale (Petrischale)	628160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.5 Humanes Probenmaterial

Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes hat ihre Zustimmung zur Nutzung aller im Folgenden aufgeführten humanen Proben erteilt. (185/12 und 164/12)

2.1.5.1 PBMCs

Es wurden PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells; dt: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) sowohl gesunder Blutspender als auch eines an Glioblastom erkrankten Patienten untersucht.

- Gesunde Spender:

Insgesamt flossen die Untersuchungsdaten von 6 anonymisierten Proben gesunder Spender in die vorliegende Arbeit ein. Die Proben wurden dabei aus den Leukoreduktionskammern

gewonnen, die bei der regulären Apheresespende von Thrombozyten als Abfallprodukte anfallen.

Die Zellspenden wurden dabei nach einem fortlaufenden System („CTL 1“ bis „6“) benannt.

- Glioblastom-Patienten:

Insgesamt konnten acht an einem Glioblastom erkrankte Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg nach dem heutigen Standard behandelt wurden, für die Umsetzung der vorliegenden Arbeit gewonnen werden. Die Patienten wurden hierzu in die MVZ-Ambulanz des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin einbestellt, wo ihnen im Rahmen einer Blutentnahme ca. 160-200 ml Blut in EDTA-Blutentnahmeröhrchen abgenommen wurden.

Auch diese Proben wurden nach einem anonymisierten fortlaufenden System (GBM-Patient 1 bis 8) benannt.

- Zellproben DC-vakzinierter Patienten:

Von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Eyrich an der Universitätsklinik Würzburg wurden Proben von kryokonservierten PBMCs von fünf vakzinieren Glioblastom-Patienten zur Verfügung gestellt.

Sie wurden mit „Patient WÜ 0238, 0239, 0249, 0271 und 0275“ bezeichnet.

Das Behandlungsschema zur DC-Vakzinierung, nach dem bei diesen Patienten vorgegangen wurde, basierte auf der Patientengruppe „Cohort D“, wie sie im Artikel „Brain tumor immunotherapy: what have we learned so far?“ (Van Gool 2015) beschrieben ist.

Kurz nach der neurochirurgischen Tumorsektion wurden die Patienten bis 3 Tage vor der DC-Vakzinierung mit Cyclophosphamid behandelt. Die Leukapherese erfolgte 7 Tage nach dem Absetzen perioperativer Steroide. 9 Tage nach der Leukapherese begann die intradermale Injektion der dendritischen Zellen, die bis zu 4 Mal in einwöchigem Abstand durchgeführt wurde. Die Haut an der Einstichstelle wurde dabei mit Imiquimod vorbehandelt. Intradermale Tumorlysate-Boost-Impfungen wurden dreimal im Abstand von jeweils einem Monat verabreicht und anschließend vierteljährlich so lange fortgeführt, bis das gesamte Tumorlysate-Material aufgebraucht war.

2.1.5.2 Tumorgewebe und Tumorzelllinien:

Das Tumorgewebe von Glioblastom-Patienten wurde bei Routine-Operationen in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes entfernt. Ein Teil der Proben wurde im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie und Neuropathologie untersucht und ein weiterer Teil unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Insgesamt wurde mit 15 Gewebeproben gearbeitet, die zunächst zu einem Tumorlysate verarbeitet wurden.

Die Proben wurden nach einem anonymisierenden und fortlaufenden System benannt. Gearbeitet wurde mit den Proben „Tumorlysate (im weiteren Verlauf = TL) 6891, 6902, 6933, 7015, 7030, 7035, 7080, 7133, 7219, 7323, 7431, 7441, 7505, 7520 und 116110“.

Außerdem wurden zwei kultivierte Tumorzelllinien untersucht. Zum einen die immortalisierte Glioblastom-Zelllinie U87, zum anderen die primäre Tumorzelllinie 7317 (im weiteren Verlauf „TZL 7317“), die von der Klinik für Neurochirurgie zur Verfügung gestellt wurden. Die Herstellungsmethoden dieser Zelllinie wurden bereits publiziert (Lerner et al. 2014).

Zur Kultivierung der TZL 7317 wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium benutzt, das zusätzlich 10% FBS und 1% nicht-essentielle Aminosäuren sowie 1% Penicillin/Streptomycin enthielt (Kulturbedingungen: 37 °C und 5% CO₂).

Das Medium wurde zweimal wöchentlich ausgetauscht.

Des Weiteren wurden Zellen untersucht, die aus Pankreasgewebe gewonnen und von der AG Thiel aus der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.5.3 RNA von gesundem Hirngewebe

Um Vergleiche zwischen Glioblastom-Gewebe zu gesundem Hirngewebe ziehen zu können, wurde die RNA gesunden Hirngewebes der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bestellt (qPCR Human Reference Total RNA; Artikelnr. 636690).

2.1.6 Zellkulturmedien

Folgende Zellkulturmedien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Zellkultivierung eingesetzt.

RPMI-Zellkultur-Medium:

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

RPMI-Medium mit 5% AB-Serum:

- 475 ml RPMI-Medium + 25 ml gepooltes humanes AB-Serum

Das humane AB-Serum wurde aus gepooltem Serum gesunder Blutspender des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin nach folgendem Protokoll selbst hergestellt: Zwischenlagerung von 200 ml Vollblut aus Blutspende bei +22 °C bzw. bei +4 °C. Anschließende Zentrifugation zur Separation und Serumgewinnung aus der Vollblutspende. Das in Applikatoren verpackte Serum wurde dann an unser Labor übergeben und dort in Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine Inaktivierung bei 56 °C im warmen Wasserbad und eine Zentrifugation, bevor es bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert wurde.

Einfrier-Medium:

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

2.1.7. Antikörper zur Analyse mittels Durchflusszytometrie:

2.1.7.1 Antikörper

Alle genutzten Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

hergestellt.

Tabelle 2.4: Antikörper

Antikörper	Artikelnummer
7 AAD	555815
CCR7 PE	FAB197P
CD14 APC	345787
CD14 FITC	345784
CD209 DC SIGN APC	551545
CD3 APC	345767
CD335 NKP46 PE	557991
CD45 RA PE	555489
CD45 RA PE-Cy7	560675
CD45 RO PE	561889
CD4 FITC	561005
CD71 PE	555537
CD8 FITC	561947
CD80 PE	340294
CD83 PE	556855
CD86 FITC	555657
HLA DR FITC	347400
IFN- γ PE (Mouse Anti-Human)	554552
Isotyp-Kontrolle PE	554680

2.1.7.2 Dextramere

Alle Dextramer-Moleküle wurden von der Firma Immudex, Kopenhagen, Dänemark hergestellt.

Tabelle 2.5: Dextramere

Dextramer
Chitinase 3-like 2 (CHI), Dextramer-HLA 2A in APC
Chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4), Dextramer-HLA 2A in APC
Insulin-like growth factor 2 messenger RNA-binding protein 3 (IGF2BP3), Dextramer-HLA 2A in APC
Neuronal cell adhesion molecule (NRCAM), Dextramer-HLA 2A in APC
Protein tyrosine phosphatase receptor-type Z polypeptide 1 (PTP), Dextramer-HLA 2A in APC
Tenascin C (TNC), Dextramer-HLA 2A in APC

Negativ Kontroll Dextramer
NI3233 in APC, General/neg.Control-APC
WB2666 in APC, negative control dextramer for A*0201 Dextramers

Die Dextramer-Moleküle, die als Negativ-Kontrolle genutzt wurden, imitierten keine gängigen Peptid-Strukturen, sondern trugen an ihrer Stelle Non-Sense-Antigene, so dass nur unspezifische Bindungen zwischen Dextramer und T-Zell-Rezeptor entstehen konnten.

2.1.8 Zytokine:

Tabelle 2.6: Zytokine

Zytokin	Artikelnummer	Hersteller
Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (rh GM-CSF)	1412-050	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interferon- γ (IFN- γ)	300-02	PeptoTech Germany, Hamburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin 1 beta (rh IL-1 β)	1411-050	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin 2 (rh IL-2)	1420-050	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin 4 (rh IL-4)	1403-050	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Interleukin 7 (rh IL-7)	1410-010	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Recombinant Human Tumor Necrosis Factor alpha (rh TNF- α)	1406-050	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland

Die einzelnen Zytokine wurden in Pulverform geliefert, zu einer Stammlösung angesetzt und anschließend aliquotiert, um sie bei -35 °C in Kryoröhrchen zu lagern. Tabelle 2.7 gibt eine Übersicht über die Vorgehensweise:

Tabelle 2.7: Ansetzen der Zytokine

Ausgangskonzentration	Herstellung einer Stammlösung	Aliquotierung
GM-CSF \rightarrow 8000 U/ μ g	Zielkonzentration: 125 μ g/1000 μ l Vorgehen: 50 μ g GM-CSF + 400 μ l H ₂ O (millipore)	à 20 μ l
INF- γ \rightarrow 200000 U/ μ g	Zielkonzentration: 50 μ g/1000 μ l Vorgehen: 100 μ g INF- γ + 2000 μ l H ₂ O (millipore)	à 20 μ l

IL-1 beta → 9000 U/μg	Zielkonzentration: 111 μg/1000 μl Vorgehen: 50 μg IL-1 beta + 450 μl H ₂ O (millipore)	à 20 μl
IL-2 → 8000 U/μg	Zielkonzentration: 5 μg/1000 μl Vorgehen: 50 μg IL-2 + 9990 μl H ₂ O (millipore) + 10 μl CH ₃ COOH	25 Aliquots à 100 μl, 5 à 500 μl und 5 à 1 ml
IL-4 → 5000 U/μg	Zielkonzentration: 200 μg/1000 μl Vorgehen: 50 μg IL-4 + 250 μl H ₂ O (millipore)	à 20 μl
IL-7 → 50000000 U/μg	Zielkonzentration: 10 μg/1000 μl Vorgehen: 50 μg IL-7 + 5000 μl H ₂ O (millipore)	à 20 μl
TNF-α → 10000 U/μg	Zielkonzentration: 100 μg/1000 μl Vorgehen: 50 μg TNF-α + 500 μl H ₂ O (millipore)	à 20 μl

2.1.9 Peptide:

Die sechs im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastom-Tumorpeptide wurden bei der Firma Immudex (Kopenhagen, Dänemark) bestellt. Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst und anschließend bei -35 °C aufbewahrt. Sowohl das Ursprungprotein als auch die Accession number, Position und Aminosäuresequenz sind in *Tabelle 2.8*, die auf *Dutoit et al., 2012* basiert, aufgeführt.

Tabelle 2.8: Peptide (nach Dutoit et al., Brain 2012)

Peptid-Code	Quell-Protein	Accession number	Position	Sequenz
CHI ₁₀₋₁₈	Chitinase 3 like 2 (CHI3L2)	NP_003991	10–18	SLWAGVVVL
CSP ₂₁₋₂₉	Chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4)	NP_001888	21–29	TMLARLASA
IGF2BP3 ₅₅₂₋₅₆₀	Insulin-like growth factor 2 messenger RNA-binding protein 3 (IGF2BP3)	NP_006538	552–560	KIQEILTQV
NRCAM ₆₉₂₋₇₀₀	Neuronal cell adhesion molecule (NRCAM)	NP_001032209	692–700	GLWHHQTEV
PTP ₁₉₅₋₂₀₃	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type,Z polypeptide 1 (PTP)	NP_002842	195–203	AIIDGVESV
TNC ₃₋₁₁	Tenascin C (TNC)	NP_002151	3–11	AMTQLLAGV

2.1.10 PCR-Primer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten Primer sind in *Tabelle 2.9* mit ihrer Sequenz (5' zu 3'), der Basenpaarlänge und ihren jeweiligen Lieferungsbedingungen aufgelistet.

Tabelle 2.9: PCR-Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Größe des DNA-Fragmentes (Basenpaare)	gelieferte Stoffmenge (nmol)	H₂O Zugabe für 100 μM (in μl)
Proteine				
BCA (for)	TGGAAGGAGACA GCTCAGAGG	21	26	260
BCA (rev)	CGGGACAGGAAA GTCCACTTG	21	24	240
CHI (for)	GGCCAAGCTCCTA CTACAATG	21	22	220
CHI (rev)	GACTCTGTGATGG GTCCAGC	20	24	240
CSPG4 (for)	CTTTGACCCTGAC TATGTTGGC	22	25	250
CSPG4 (rev)	TGCAGGGCGTCCAG AGTAGA	19	19	190
FABP7 (for)	GCACATTCAAGAA CACGGAGA	21	20	200
FABP7 (rev)	CACATCACCAAAA GTAAGGGTCA	23	20	200
IGF2BP3 (for)	ACCGAAATATCCC GCCTCATTTAC	24	24	240
IGF2BP3 (rev)	GCAGTTTCCGAGT CGAGTGTTCA	23	23	230
NLGN4X (for)	GGTTTACCGCCAA TTTGGATACT	23	22	220
NLGN4X (rev)	CCGTGGGCACGTA GATGTT	19	25	250
NRCAM (for)	TCCAACCATCACC CAACAGTC	21	27	270
NRCAM (rev)	TGAGTCCCATTAC GGGTCCAG	21	39	390

PTP (for)	GCTTTGATGCGGA CCGATTTT	21	24	240
PTP (rev)	ACGACTAACACTT TCGACTCCA	22	24	240
TNC (for)	GCCCCTGATGTTA AGGAGCTG	21	36	360
TNC (rev)	GGCCTCGAAGGT GACAGTT	19	22	220
Housekeeping-Gene				
RNA-Polymerase (for)	GGAGATTGAGTCC AAGTTCA	134	19,87	198,7
RNA-Polymerase (rev)	GCAGACACACCA GCATAGT	134	15,64	156,4
TBP (for) (=Tata-Box-Binding- Protein)	CGGAGAGTTCTGG GATTGT	161	17,54	175,4
TBP (rev) (=Tata-Box-Binding- Protein)	GGTTCGTGGCTCT CTTATC	161	18,87	188,7
Zell- Oberflächenmolekül				
CD8 (for)	CCCTGAGCAACTC CATCATGT	62	16,56	165,6
CD8 (rev)	GTGGGCTTCGCTG GCA	62	20,64	206,4
Immun-Proteine				
IFN- γ (for)	TCGGTAACTGACT TGAATGTCCA	93	20,54	205,4
IFN- γ (rev)	TCGCTTCCCTGTT TTAGCTGC	93	19,7	197

Alle Primer wurden mit Hilfe der Website Primerbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>, Stand 2014) ausgewählt und anschließend mit den Programmen „Blast“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand 2014) und „Emboss“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa>, Stand 2014) überprüft. So konnten passende Sequenzen, die zugleich Intron-überspannend sind, ausgewählt werden, um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden. Alle Tumorprotein-Primer wurden von der Firma Invitrogen bzw. Thermo Fisher

Scientific (Schwerte, Deutschland) hergestellt, wohingegen die Primer für die Housekeeping-Proteine und die Immun-Proteine von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) stammen.

Ansetzen und Aliquotierung der Primer:

Alle Primer wurden in Pulverform und in unterschiedlichen Stoffmengen geliefert. Daher wurden alle individuell angesetzt und jeweils eine Stammlösung des Primers mit einer Konzentration von 100 μM hergestellt. Die entsprechenden Stoffmengen und das zum Erreichen der Zielkonzentration hinzugefügte Volumen nuklease-freien Wassers sind ebenfalls in *Tabelle 2.9* abzulesen.

Beispielhafter Ansatz für BCA (for):

Zielkonzentration = 100 $\mu\text{mol/l}$

Von Hersteller gelieferte Stoffmenge = 26 nmol

$$100 \mu\text{mol/l} = 26 \text{ nmol} * x$$

$$\rightarrow 26 \text{ nmol} / 100.000 \text{ nmol/l} = x$$

$$\rightarrow x = 260 \mu\text{l}$$

Analog wurde mit den restlichen Primern verfahren.

Anschließend wurden der Stammlösung 1-2 Aliquots entnommen und damit jeweils eine Konzentration von 10 μM hergestellt:

\rightarrow 10 μl der Stammlösung + 90 μl nuklease freies Wasser

Danach wurden die Aliquots, ebenso wie die Stammlösung, bei $-35 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellte Monitoring-Ansatz zur Bewertung der Immunantwort in Glioblastom-Patienten kombiniert mehrere Zell-Analyseverfahren zu einem gemeinsamen Ansatz.

Abbildung 2.1 fasst dabei den gesamten Assay-Ablauf von der Gewinnung des humanen Probenmaterials über die Kultivierung der Zellen bis zu den einzelnen Analyse-Schritten, die im Folgenden ausführlicher vorgestellt werden, zusammen.

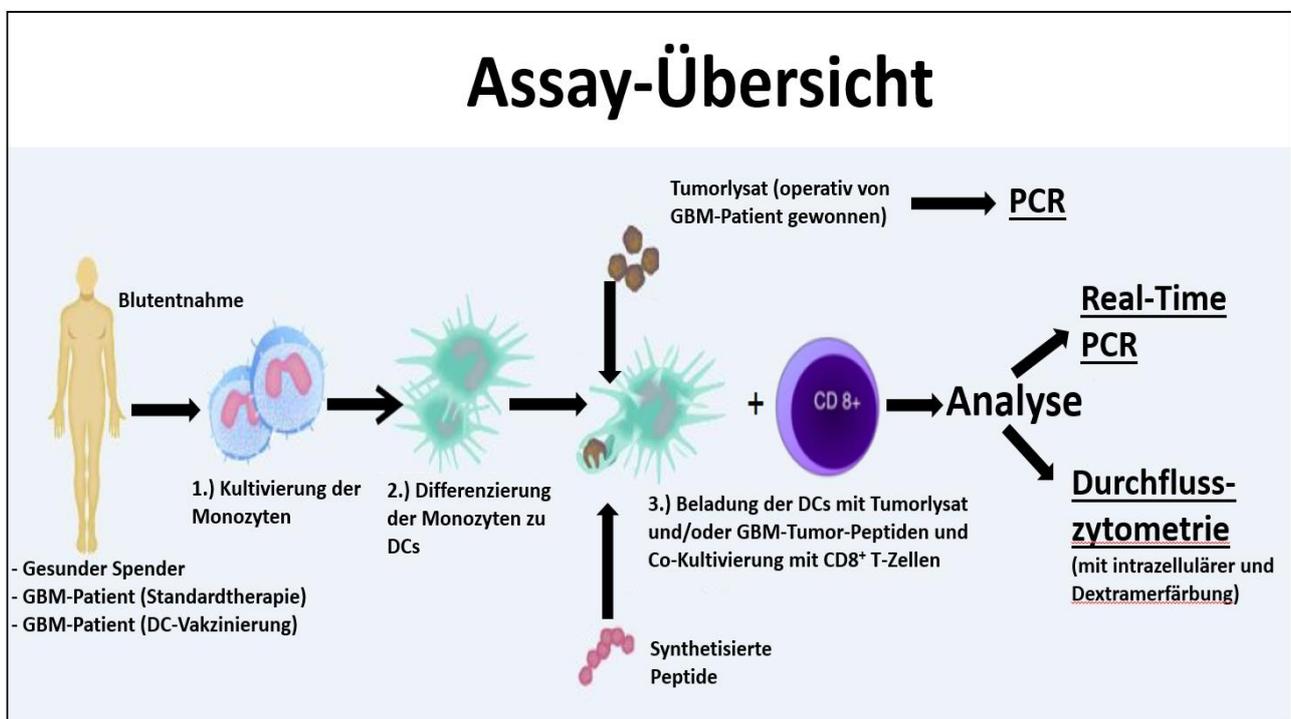


Abbildung 2.1: Probengewinnung, Zellkultivierung und Analyse-Schritte

(Die Abbildung basiert auf „https://www.j-immunother.com/english/immuno-Cell/img/kind_img04.png“ und „<http://www.clker.com/cliparts/g/n/L/j/C/c/cd8-t-cell-md.png>“)

2.2.2 Zellbiologische Methoden:

2.2.2.1 Zell-Kultivierung

2.2.2.1.1 Bestimmung von Zellzahlen

Zur Zellzahl-Bestimmung kamen die Geräte CASY TTC (Weiss et al. 2016), Moxi Z (Dittami et al. 2012) und Sysmex KX 21N (Ike et al. 2010) zum Einsatz. Diese basieren auf der elektrischen Zellzahl-Messung, bei der die Zellen einer Probe durch eine Kapillare gesaugt werden und dabei ein von außen angelegtes elektrisches Feld durchqueren. Dabei ist ein Widerstand messbar, aus dem die Geräte unter anderem Zellgröße, Vitalität und Zellkonzentration ableiten können.

2.2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

- Kryokonservierung von Zellen:

Zur Kryokonservierung von Zellen, die sich bereits in Zellkulturflaschen befanden, wurden sowohl die Zellen im Überstand als auch die adhärenierten Zellen berücksichtigt. Daher wurde der Überstand in ein Falcon-Röhrchen überführt und die Zellkulturflasche anschließend zweimalig mit PBS gespült, wobei die dadurch gelösten Zellen ebenfalls in dem Falcon-Röhrchen aufgenommen wurden. Danach wurden die noch adhärenierten Zellen mit 5 ml PBS/EDTA/BSA bei 4 °C enzymatisch gelöst und danach ebenfalls rasch in Medium in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen.

Nach einem Zentrifugationsschritt (300 g für 3 min) wurde das Zellpellet in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Dabei wurde immer ein Aliquot zur Zellzahl-Messung entnommen.

Die Zellen wurden anschließend abhängig von der Zellzahl in der gewünschten Konzentration in jeweils ca. 1-1,5 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen pipettiert und dann bei -80 °C gelagert.

- Auftauen von Zellen:

Die bei -80 °C in Einfrier-Medium gelagerten Zellen wurden im Kryoröhrchen im Wasserbad rasch aufgetaut, bis noch ein kleiner Eiskern vorhanden war und das Volumen in ein mit 9,5 ml RPMI-Medium vorbereitetes Falcon-Röhrchen pipettiert.

Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und ein Aliquot zur Zellzahl-Messung entnommen.

Danach wurde die jeweils gewünschte Zellkonzentration eingestellt und die Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Zell-Gewinnung

2.2.2.2.1 Monozyten-Isolation aus einer Leukoreduktionskammer

Die Isolation von PBMCs aus einer Leukoreduktionskammer wurde mit Material von gesunden Blutspendern durchgeführt. Die Leukoreduktionskammern fallen bei der Thrombozytapherese-Spende als Abfallprodukt an und konnten nach positivem Ethikvotum für die Forschung eingesetzt werden.

Die Isolation fand dabei nach folgendem Protokoll statt:

- Der Depletionsfilter der Leukoreduktionskammer wurde mit einer 20 ml-Spritze mit HBSS gegen die Laufrichtung durchgespült und das Volumen in 50 ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen.
- In weiteren 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Ficoll vorgelegt und mit 30 ml des eben gewonnenen HBSS-Blut-Gemisches beladen.
- Anschließend wurden die Röhrchen bei 400 g 30 Minuten lang zentrifugiert (Beschleunigung 1, Bremse 0).
- Nach der Zentrifugation erhielt man in den Falcon-Röhrchen folgende Auftrennung (von oben nach unten): Plasma, PBMC-Schicht, Ficoll-Schicht, Granulozyten und Erythrozytenpellet.
 - Zunächst wurde die obere Plasma-Schicht bis ca. 1 cm oberhalb der PBMC-Schicht abgenommen und verworfen.
 - Anschließend wurde die PBMC-Schicht der einzelnen Röhrchen in neue 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, wobei jeweils ca. 8 ml pro Röhrchen eingesetzt wurden. Diese 8 ml wurden mit 42 ml HBSS auf 50 ml aufgefüllt.
- Es folgte eine Zentrifugation mit 200 g für 5 Minuten (Einstellungen der Zentrifuge: Beschleunigung = 9, Bremse = 9)
- Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und anschließend eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden je nach vorhandener Erythrozytenmenge 1 ml bis 10 ml

Erythrozytenlyse-Puffer für 60 bis 120 Sekunden genutzt, in dem das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet resuspendiert wurde.

- Nach den 60 bis 120 Sekunden wurde das Gesamtvolumen in den Falcon-Röhrchen mit HBSS wieder auf 50 ml aufgefüllt und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert.

- Bei allen folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet und die Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt.

- Der durch Zentrifugation erhaltene Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 20 ml kaltem PBS mit 0,5% BSA und 1mM EDTA resuspendiert.

- Danach wurde bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das verbliebene Pellet in 30 ml RPMI-Zellkultur-Medium (450 ml RPMI, 50 ml FBS, 3,5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Glutamin) aufgenommen. In diesem Schritt wurde zusätzlich auch eine Zellzählung mittels Sysmex KX-21C und Casy TTC durchgeführt, wobei man idealerweise eine Zellzahl von ca. $1,2 \times 10^8$ Zellen erhielt.

- Die Zellen wurden danach für 2 Stunden bei 37 °C und bei 5% CO₂ in Zellkulturflaschen inkubiert.

- Der Überstand in den Zellkulturflaschen inklusive aller nicht adhärenen Zellen wurde dann entweder als PBMCs weiterkultiviert oder zur T-Zell-Aufreinigung an eine andere Arbeitsgruppe (AG-Hoth, Biophysik der Universität des Saarlandes in Homburg) weitergegeben.

- Es folgten 2 Waschschrte mit warmem PBS.

- Anschließend wurden die PBMCs in RPMI-Medium mit 5% AB-Serum und unter der Zugabe von 14 µl IL-2 pro ml Medium (=70 ng/ml, 20 U) und 0,5 µl IL-7 pro ml Medium (= 5 ng/ml) weiterkultiviert.

- Die noch in der 175cm²-Kulturflasche adhärenen Monozyten wurden in 20 bis 30 ml RPMI-Zellkultur-Medium und unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF (je 1 µl/ml Medium, 1000 U/ml) für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem DC-Differenzierungsprotokoll (*Kap. 2.2.2.2.3*) weiterkultiviert.

2.2.2.2.2 Monozyten-Isolation aus EDTA-Blut von GBM-Patienten

Die Monozyten-Isolation erfolgte aus EDTA-Blut bei zur Blutentnahme einbestellten Glioblastom-Patienten. Den GBM-Patienten wurden zwischen 160 und 200 ml Blut in EDTA-Blutentnahme-Röhrchen entnommen. Eine erste Blutbild-Messung wurde mit dem Sysmex KX-21C und dem Casy TTC durchgeführt.

Anschließend wurden aus dieser Blutprobe die PBMCs nach folgendem Protokoll isoliert:

- Das EDTA-Blut wurde mit HBSS im Verhältnis 2 zu 1 verdünnt (zu je 100 ml Blut wurden 50 ml HBSS gegeben).
- In weiteren 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Ficoll vorgelegt und dann mit 30 ml des eben hergestellten HBSS-Blut-Gemisches beladen.
- Anschließend wurden die Röhrchen bei 400 g 30 Minuten lang zentrifugiert (Beschleunigung 1, Bremse 0).
- Nach der Zentrifugation erhielt man in den Falcon-Röhrchen folgende Auftrennung (von oben nach unten): Plasma, PBMC-Schicht, Ficoll-Schicht, Granulozyten und Erythrozytenpellet.
 - Zunächst wurde die obere Plasma-Schicht bis ca. 1 cm oberhalb der PBMC-Schicht abgenommen und verworfen.
 - Anschließend wurde die PBMC-Schicht der einzelnen Röhrchen in neue 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, wobei jeweils ca. 8 ml pro Röhrchen eingesetzt wurden. Diese 8 ml wurden mit 42 ml HBSS auf 50 ml aufgefüllt.
- Es folgte eine Zentrifugation mit 300 g für 10 Minuten (Einstellungen der Zentrifuge: Beschleunigung = 9, Bremse = 9)
- Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und anschließend eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden je nach vorhandener Erythrozytenmenge 1 ml bis 10 ml Erythrozytenlyse-Puffer für 60 bis 120 Sekunden genutzt, in dem das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet resuspendiert wurde.
- Nach den 60 bis 120 Sekunden wurde das Gesamtvolumen in den Falcon-Röhrchen mit HBSS wieder auf 50 ml aufgefüllt und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert.

- Bei allen folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet und die Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt.
- Der durch Zentrifugation erhaltene Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in HBSS resuspendiert.
- Danach wurde bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das plättchenreiche Plasma abgenommen und verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in 20 ml kaltem PBS mit 0,5% BSA und 1mM EDTA aufgenommen.
- Erneut wurde bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das verbliebene Pellet in 20 ml RPMI-Zellkultur-Medium (450 ml RPMI, 50 ml FBS, 3,5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Glutamin) resuspendiert.
- Danach wurde eine Zellzählung mittels Sysmex KX-21C und Casy TTC durchgeführt und idealerweise eine Zellzahl von $1,2 \times 10^8$ Zellen in 30 ml RPMI-Zellkultur-Medium eingestellt.
- Die Zellen wurden danach für 2 Stunden bei 37 °C und bei 5% CO₂ in Zellkulturflaschen inkubiert.
- Der Überstand in den Zellkulturflaschen (inklusive aller nicht adhärenen Zellen) wurde dann entweder als PBMCs weiterkultiviert oder zur CD8-Zell-Aufreinigung an eine andere Arbeitsgruppe (AG-Hoth, Biophysik der Universität des Saarlandes in Homburg) weitergegeben.
- Es folgten 2 Waschschrirte mit warmem PBS.
- Anschließend wurden die PBMCs in RPMI-Medium mit 5% AB-Serum und unter der Zugabe von 14 µl IL-2 pro ml Medium (70 ng/ml, 20 U) und 0,5 µl IL-7 pro ml Medium (5 ng/ml) weiterkultiviert.
- Die noch in der 175cm²-Kulturflasche adhärenen Monozyten wurden in 20 bis 30 ml RPMI-Zellkultur-Medium und unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF (je 1 µl/ml Medium, 1000 U/ml) für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem DC-Differenzierungsprotokoll (*Kap. 2.2.2.2.3*) weiterkultiviert.

2.2.2.2.3 Differenzierung isolierter Monozyten zu DCs

Nach der Isolation von Monozyten aus der Leukoreduktionskammer (Zellen stammen von gesunden Spendern) oder aus EDTA-Blut (Blut/Zellen stammen von GBM-Patienten) wurden die Monozyten

in 175cm²-Zellkulturflaschen in 20 bis 30 ml RPMI-Zellkultur-Medium und unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF (je 1 µl/ml Medium, 1000 U/ml) für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurden sie nach folgendem Protokoll zu dendritischen Zellen ausdifferenziert:

Tag 2: Das Zell-Medium wurde durch 30 ml frisches RPMI-Medium mit 5 prozentigem AB-Serum-Anteil ausgetauscht und unter der Zugabe von 30 µl IL-4 (1000 U/ml) und 30 µl GM-CSF (1000 U/ml) für weitere 48 Stunden in der 175cm²-Zellkulturflasche inkubiert.

Tag 4: Es wurden weitere 10 ml RPMI-Medium (mit 5% AB-Serum-Anteil) hinzugegeben und ein neues Gesamtvolumen von 40 ml eingestellt. Die Zytokinmenge wurde dementsprechend ebenfalls durch die Zugabe von 40 µl IL-4 und 40 µl GM-CSF (je 1000 U/ml) neu eingestellt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert.

Tag 6: Die Zytokine wurden aufgesättigt, indem erneut 40 µl IL-4 und 40 µl GM-CSF (je 1000 U/ml) hinzugegeben wurden. Danach folgte eine Inkubation für 24 Stunden.

Tag 7: Die in Kultur befindlichen Zellen wurden vereint, indem das Medium entnommen und in Falcon-Röhrchen überführt wurde. Die noch am Plastik der Kulturflasche adhärenen Zellen wurden mit PBS/BSA/EDTA bei 4 °C enzymatisch von ihrem Untergrund gelöst und dann ebenfalls – nach Zugabe von zusätzlichem RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil, um den enzymatischen Effekt zu stoppen – mit den restlichen, sich schon im Medium befindenden Zellen in Falcon-Röhrchen vereint.

Anschließend wurde zentrifugiert (300 g für 5 min) und das Zellpellet in 3 ml RPMI-Medium, das 0,1% AB-Serum enthielt, resuspendiert. Ein kleines Aliquot wurde entnommen und die vorliegende Zellzahl mittels Moxi Z oder Casy TTC bestimmt.

Je nach Versuchsplanung wurden nun verschiedene Gruppen gebildet, die jeweils idealerweise 1,5x10⁶ Zellen umfassten, die unterschiedlich weiterbehandelt wurden. Grundsätzlich wurde dabei immer mindestens eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, die wie folgt aussahen:

- Positivkontrolle: Idealerweise wurden 1,5x10⁶ Zellen verwendet.

Zu diesen wurde hinzugegeben:

- 50 µg Tumorlysat pro 1x10⁶ Zellen

- 1 µg bzw. 1 µl Tumorpeptid pro ml Medium

- 1 µl IFN-γ (1000 U/ml) und 1 µl LPS pro ml Medium

- an Zytokinen: je 1 µl IL-4 (1000 U/ml), je 1 µl GM-CSF (1000 U/ml), je 1 µl TNF-α (1000 U/ml) und je 2 µl IL-1β (2000 U/ml) pro ml Medium

Je nach Fragestellung wurde die Positivkontrolle auch dahingehend variiert, dass die dendritischen Zellen ausschließlich mit Tumorlysat oder mit Tumorpeptiden beladen wurden, wenn in den Test-Gruppen analog verfahren wurde.

- Negativkontrolle: (= unbeladene dendritische Zellen)

Idealerweise wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Zu diesen wurde lediglich die entsprechende Menge Medium mit, sowie je 1 µl IL-4 (1000 U/ml) und je 1 µl GM-CSF (1000 U/ml) pro ml Medium hinzugegeben.

- Test-Gruppe: Je nach Versuchsplanung unterschieden sich die einzelnen Test-Gruppen voneinander.

Idealerweise wurden auch hier $1,5 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Je nach Planung wurden dann entweder 50 µg Tumorlysat pro 1×10^6 Zellen oder 1 µg bzw. 1 µl Tumorpeptid pro ml Medium hinzugefügt. In einigen Testansätzen wurden auch beide Stimuli verwendet.

Außerdem wurden an Zytokinen auch hier je 1 µl IL-4 (1000 U/ml), je 1 µl GM-CSF (1000 U/ml), je 1 µl TNF-α (1000 U/ml) und je 2 µl IL-1β (2000 U/ml) pro ml Medium verwendet.

Da am Ende von Tag 7 die Zellen in insgesamt 7 µl Medium kultiviert wurden, wurden insgesamt folgende Zytokin-Mengen zugegeben: 7 µl IL-4 (1000 U/ml), 7 µl GM-CSF (1000 U/ml), 7 µl TNF-α (1000 U/ml), 14 µl IL-1β

Außerdem wurden in den entsprechenden Gruppen auch je 7 µl Tumorpeptid, 7 µl IFN-γ (1000 U/ml) und 7 µl LPS verwendet.

Nach der Erstellung der unterschiedlichen Gruppen wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach diesen 2 Stunden wurden weitere 3 ml RPMI-Medium zugegeben, dieses Mal jedoch mit einer 0,5-prozentigen Konzentration an AB-Serum. Anschließend erfolgte eine weitere

zweistündige Inkubation vor dem für Tag 7 letzten Protokoll-Schritt. Dieser beinhaltete die Zugabe von 1 ml RPMI-Medium mit einer darin befindlichen Konzentration von 5% AB-Serum. Danach wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert.

Tag 9: Es wurde die Zellzahl der in Kultur befindlichen dendritischen Zellen bestimmt und pro an Tag 7 erstellter Gruppe idealerweise eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ vitale dendritische Zellen pro ml Medium eingestellt.

Des Weiteren wurde an dieser Stelle ein Aliquot entnommen, um weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen der dendritischen Zellen durchzuführen. (siehe Kap. 2.2.3.5)

Die für die augenblicklich geplante Versuchsreihe nicht benötigten restlichen Zellen wurden für die spätere Verwendung kryokonserviert.

Die an dieses Protokoll anschließende Stimulation der PBMC bzw. CD8-Zellen und die Co-Kultivierung mit den dendritischen Zellen ist im folgenden Kap. 2.2.2.2.4 beschrieben.

2.2.2.2.4 PBMC- bzw. CD8⁺-T-Zell-Kultivierung bis Tag 9 nach Isolation

Nachdem die PBMCs an Tag 0 des Kultivierungsprotokolls aus der Leukoreduktionskammer oder aus EDTA-Blut eines GBM-Patienten gewonnen worden waren, wurden sie in RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil und unter der Zugabe von 14 μ l IL-2 (= 70 ng/ml, 20 U) pro ml Medium und 0,5 μ l IL-7 (= 5 ng/ml) pro ml Medium weiterkultiviert.

Ebenso wurde mit den CD8-positiven T-Zellen verfahren, falls diese zuvor (von der AG Hoth der Biophysik der Universität des Saarlandes in Homburg) aus den PBMCs isoliert worden waren.

Danach wurden die Zellen zeitlich parallel zum Protokoll zur Ausdifferenzierung der dendritischen Zellen aus Monozyten folgendermaßen weiterkultiviert:

Tag 4: Das RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil wurde durch frisches Medium ausgetauscht und 14 μ l IL-2 pro ml Medium (= 70 ng/ml, 20 U) sowie 0,5 μ l IL-7 (= 5 ng/ml) pro ml Medium wurden hinzugefügt.

Tag 7: Es erfolgte wie schon an Tag 4 ein Medium-Wechsel und die erneute Zugabe der Zytokine in gleicher Konzentration.

Tag 9: Die Zellzahl wurde mittels Moxi Z oder Casy TTC bestimmt und idealerweise eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil hergestellt.

Außerdem wurde ein Aliquot zur weiterführenden durchflusszytometrischen Untersuchung (*siehe Kap. 2.2.3.4*) entnommen und die überschüssigen Zellen kryokonserviert.

2.2.2.2.5 Co-Kultivierung der dendritischen Zellen und PBMCs/CD8⁺ T-Zellen

Nachdem die dendritischen Zellen und die PBMCs/CD8⁺-T-Zellen nach der Isolation zunächst jeweils getrennt voneinander kultiviert wurden, erfolgte an Tag 9 der Beginn der Co-Kultivierung.

Tag 9: Wie schon in den vorhergehenden *Kap. 2.2.2.2.3* und *2.2.2.2.4* beschrieben, wurde jeweils die Zellzahl bestimmt und eine Konzentration von 1×10^6 PBMCs bzw. CD8⁺-T-Zellen und $2,5 \times 10^5$ vitale dendritische Zellen pro ml Medium eingestellt.

Danach folgte die Stimulation der CD8-Zellen/PBMCs durch die dendritischen Zellen. Dabei wurden die Gruppen (Positiv- und Negativkontrolle, sowie meist mehrere Test-Gruppen), die an Tag 7 des Protokolls zur Differenzierung der dendritischen Zellen aus Monozyten erstellt wurden, berücksichtigt und streng voneinander getrennt kultiviert.

In jeder Gruppe wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1 zu 4 (dendritische Zellen zu CD8⁺-T-Zellen/PBMCs) eingesetzt. Dabei wurden 96-Well-Platten zur Kultivierung genutzt und pro Well ein Gesamtvolumen von 200 µl eingestellt.

Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.

Tag 11: Pro Well der 96-Well-Platte wurden 50 µl RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil zugegeben, so dass ein neues Gesamtvolumen von 25 µl pro Well eingestellt wurde. Außerdem wurde wieder darauf geachtet, die entsprechende Zytokin-Konzentration einzustellen. Hierzu wurden 3,5 µl Il-2 (= 70 ng/ml, 20 U) und 0,1 µl IL-7 (= 5 ng/ml) pro Well zugegeben.

Bei lichtmikroskopischer Kontrolle sollten zu diesem Zeitpunkt bereits so genannte „Cluster sich teilender T-Zellen“ zu erkennen sein.

Tag 16: Die PBMCs bzw. die CD8⁺-T-Zellen wurden restimuliert.

Hierzu wurden die Zellen der einzelnen Gruppen (Positiv-, Negativ- und die Testgruppen), die in den Schritten zuvor über mehrere Wells einer 96-Well-Platte verteilt worden waren, wieder zusammengeführt. Auch hier wurde wieder darauf geachtet, die einzelnen Gruppen

voneinander getrennt zu behandeln.

Die so vereinigten Zellen wurden bei 300 g für 4 Minuten zentrifugiert und dann das Zellpellet in frischem RPMI-Medium mit 5% AB-Serum-Anteil aufgenommen. Hierbei wurde ein Volumen von 150 µl pro Well benutzt.

Außerdem wurden ebenfalls die Zytokine IL-2 (3,5 µl pro Well, =70 ng/ml, 20 U) und IL-7 (0,1 µl pro Well, = 5 ng/ml) wieder zugegeben.

- Restimulation: Für die Restimulation wurde den entsprechenden Gruppen Tumorlysat und/oder Tumor-Peptide (jeweils 1 µl/ml) zugegeben.

Außerdem wurden 50 µl autologe dendritische Zellen pro Well hinzugegeben (Zellkonzentration 5×10^5 pro ml), so dass ein Gesamtvolumen von 200 µl pro Well der 96-Well-Platte entstand.

Tag 21: Mittels Durchflusszytometrie und Real-Time-PCR wurde eine abschließende Untersuchung der PBMCs bzw. der CD8⁺-T-Zellen durchgeführt.

Vor den analytischen Messungen bzw. vor Beginn der Durchführung der entsprechenden Analyse-Protokolle wurden ca. 7 Stunden vorher die Zellen jedoch wie bereits an Tag 16 des Protokolls noch einmal restimuliert.

- Restimulation: Für die Restimulation wurden wieder 50 µl dendritische Zellen (in einer Konzentration von 5×10^5 pro ml) pro Well verwendet.

Außerdem wurde zu den entsprechenden Gruppen erneut Tumorlysat und/oder Tumor-Peptide (jeweils 1 µl/ml) zugegeben.

6 Stunden bevor die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse das entsprechende Färbeprotokoll durchliefen, wurde Golgi-Stop in einer Konzentration von 3,35 µl pro ml Medium hinzugegeben. Golgi-Stop blockiert den Transport von Proteinen wie beispielsweise IFN-γ in der Zelle und führt zu deren Akkumulation. Somit wird deren intrazelluläre Konzentration gesteigert, was bei einer Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der durchflusszytometrischen Untersuchung zu einer Verstärkung des vorhandenen Signals führt.

2 Stunden vor der abschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung wurde Dasatinib (0,25 µl pro Well) zugegeben. Dieser Proteinkinase-Inhibitor reduziert die T-Zell-Rezeptor-Internalisierung von T-Zellen und sorgt somit für eine höhere T-Zell-Rezeptor-Anzahl an

der Zelloberfläche. Dies führt im Rahmen der Dextramer-Färbung, wo spezifische T-Zell-Rezeptoren fluoreszenzmarkiert werden, zu einer Steigerung des messbaren Signals in der Durchflusszytometrie. (Lissina et al. 2009)

Danach folgte entweder die Markierung der Zellen mittels fluoreszierender Antikörper und die durchflusszytometrische Analyse oder die Isolation der RNA aus den Zellen. Die RNA wurde dann anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und per Real-Time-PCR untersucht.

Bei den Versuchsansätzen, die mittels Real-Time-PCR untersucht wurden, wurde kein Golgi-Stop zur Blockierung des intrazellulären Proteintransportes zugegeben, da die Analyse hier auf mRNA-Ebene ablief.

2.2.2.2.6 Kultivierung und Stimulation der Zellen DC-vakzinierter Patienten

Vorbereitung:

Die Zellen der DC-vakzinieren GBM-Patienten, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eyrich (Universitätsklinik Würzburg) zur Verfügung gestellt wurden, wurden zunächst aufgetaut. Sobald sich die letzten Eiskristalle gelöst hatten, wurden die Zellen sofort in ein Falcon-Röhrchen überführt, in dem 9,5 ml einer auf Eis gekühlten Waschlösung vorbereitet war.

Waschlösung: 5 ml 10-prozentiges Dextran (25 g/250 ml) (Gesamtkonz. in 9,5 ml = 5%), 400 µl 20-prozentiges Humanalbumin (Gesamtkonz. in 9,5 ml = 2,5%), 4,6ml 0,9-prozentiges NaCl sowie 10 U/ml DNase)

1. Gruppe: Stimulation mit CD3/CD28-Beads

- Tag 0: Die Zellen werden gemäß der Herstellerangabe des T-Cell-Activation/Expansion-Kits (Firma Miltenyi Biotec, Deutschland) mit CD3/CD28-Beads stimuliert und anschließend für 48 Stunden bei 37 °C und bei 5% CO₂ kultiviert. Hierzu wurde eine 96-Well-Platte genutzt und die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 in 200 µl pro Well gegeben.
- Tag 2: Nach 48 Stunden wurden die Zellen zu zwei gleichen Teilen aufgeteilt und weiterkultiviert, wobei 70 ng/ml IL-2 hinzugefügt wurden.

- Tage 7 bis 12: Es erfolgte vor der Messung eine Restimulation der Zellen für 6 Stunden mit Tumorlysate, Tumorpeptiden, IL-2, Dasatinib und Golgi-Stop, wobei analog zum Prozedere in *Kap. 2.2.2.2.5* an Tag 21 vorgegangen wurde.

Danach folgte das Durchlaufen der Färbeprotokolle (*Kap. 2.2.3.1*) und die Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie und Real-Time-PCR.

2. Gruppe: Stimulation mit bestrahlten PBMCs/DCs

Die zur Stimulation genutzten allogenen PBMCs wurden aufgetaut. Anschließend wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml hergestellt und die Zellen mit 30 Gy bestrahlt.

- Tag 1: Die PBMCs der DC-vakzinierten GBM-Patienten wurden im Verhältnis 1:4 mit bestrahlten PBMCs/DCs gemeinsam kultiviert. Dabei wurden je nach Versuchsablauf Tumorlysate und/oder Tumorpeptide (jeweils 1 μ l/ml) hinzugefügt und IL-2 in einer Konzentration von 70 ng/ml dazugegeben.
- Tage 7 bis 12: Auch bei dieser Gruppe erfolgte analog zur ersten eine Restimulation.

3. Gruppe: Stimulation mit bestrahlten PBMCs/DCs & PHA

Das Vorgehen in dieser Gruppe entsprach dem Umgang mit den Zellen der zweiten Gruppe. Allerdings wurde zusätzlich Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 10 μ g/ml an den Tagen 1 und 7 bis 12 zugegeben.

4. Gruppe: Stimulation mit CD137-Beads

Die für Gruppe 4 verwendeten PBMCs wurden zunächst in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro ml RPMI-Medium (mit 5-Prozent AB-Serum-Anteil) in je 150 μ l Volumen in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden Tumorlysate und/oder Tumorpeptide (jeweils 1 μ l/ml) zugegeben und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Danach fand die magnetische Separation der Zellen nach den Herstellerangaben des CD137-MicroBead-Kits (Firma Miltenyi Biotec, Deutschland) statt.

Tage 7 bis 12: Auch diese Gruppe wurde im Zeitraum der Tage 7 bis 12 – wie bereits mehrfach beschrieben – für 6 Stunden vor der anschließenden Zellfärbung und Analyse mit Tumorlysate und/oder Tumorpeptiden, Dasatinib, Golgistop und IL-2 restimuliert.

5. Gruppe: Native PBMC-Antwort

Als Kontrollgruppe wurden auch native PBMCs des entsprechenden Patienten aufgetaut und

unter vergleichbaren Bedingungen wie die restlichen Gruppen kultiviert. Auch diese Zellen wurden dann an den Tagen 7 bis 12 mittels Durchflusszytometrie und Real-Time-PCR untersucht.

2.2.2.2.7 Tumorlysat-Gewinnung / Tumorlysat-Herstellung (Avitalisierung)

1.) Homogenisierung:

Das bei routinemäßigen Operationen gewonnene Tumorgewebe wurde für 30 Minuten bei 45 °C inkubiert, um Heat-Shock-Proteine zu zerstören, und dann in eine sterile Petrischale gegeben, in der 1 ml 0,9% NaCl vorgelegt war. Darin wurde das Gewebe mit einem sterilen Einmalskalpell mechanisch zerkleinert.

Die Tumorfragmente wurden anschließend in ein steriles M-Tube gegeben und das Gesamtvolumen auf 10 ml mit 0,9% NaCl aufgefüllt. Danach erfolgte die zweiminütige standardisierte Zerkleinerung im gentleMACS-Gewebedissoziator mit dem Programm „Protein_01.01 M-Tube“.

Es folgte die Entnahme des M-Tubes und die Zentrifugation bei 400 g und 4 °C für 5 Minuten.

Nachdem das Lysat dann über einen 70 µm Filter weiter homogenisiert wurde, wurden die aus den Vorgängerschritten resultierenden 10 ml Tumorhomogenat auf sechs 2 ml fassende Kryoröhrchen verteilt.

2.) Avitalisierung:

Das Tumorhomogenat wurde in einem Gefäß mit flüssigem Stickstoff für 3 Minuten eingefroren und anschließend in einem Thermoblock bei 50 °C rasch wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde insgesamt sechsmal durchgeführt.

Danach wurden die Proben mit insgesamt 60 Gy bestrahlt (2x30 Gy für jeweils 995 sec).

Bis zur weiteren Verwendung wurde das Tumorlysat bei -80 °C konserviert.

3.) Trypanblau-Färbung:

Die Trypanblau-Färbung dient zur Bestimmung vitaler bzw. avitaler Zellen im Tumorlysat.

Hierzu wurden jeweils 30 µl Tumorhomogenat und 30 µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

10 µl des Gemischs wurden anschließend in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und bei 10-

facher Vergrößerung alle 64 Quadranten von zwei unabhängigen Untersuchern unter dem Mikroskop ausgezählt.

Helle, leuchtende Zellen wurden dabei als lebend und dunkelblau gefärbte Zellen als tot gewertet.

Um die vollständige Avitalität des Tumorslysats nachzuweisen, durften keine lebenden Zellen mehr vorhanden sein.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Immunfluoreszenz-Markierung für die Durchflusszytometrie (FACS)

Zur durchflusszytometrischen Auswertung der mit den dendritischen Zellen co-kultivierten T-Zellen wurde zunächst ein umfangreiches Färbeprotokoll durchlaufen, in dessen Rahmen die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurden.

Färbeprotokoll:

Sowohl PBS/Cell-Wash als auch der Permeabilisierungspuffer wurden während des gesamten Protokolls mit Eis gekühlt.

1.) Vor Beginn der Färbeschritte wurde die vorhandene Zellzahl mittels Moxi Z oder Casy TTC bestimmt und dann idealerweise eine Zellzahl von 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro zu messendem TruCount-Röhrchen eingestellt. Allerdings waren bei vielen Versuchsdurchläufen weniger Zellen vorhanden, so dass sie in einer niedrigeren Konzentration auf die zu untersuchenden Ansätze aufgeteilt worden sind.

2.) Anschließend wurden die Zellen für 4 Minuten bei 300 g in die Zentrifuge gegeben, der Überstand danach verworfen und die Zellpellets in den TruCount-Röhrchen beibehalten.

3.) Danach wurde das Zellpellet in 500 µl Cell-Wash oder PBS mit 0,5% BSA aufgenommen und dann erneut für 4 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

4.) Die Zellpellets wurden in 200 µl PBS wieder resuspendiert.

5.) Pro Probe wurden dann 10 µl AB-Serum zugegeben, so dass eine Konzentration von insgesamt 5% AB-Serum erreicht wurde. Das AB-Serum diente dem Zweck unspezifische Bindungen zu blockieren.

- 6.) Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- 7.) Danach fand die Dextramer-Färbung statt, und je 10 µl des entsprechenden Dextramers bzw. des Kontroll-Dextramers wurden in den entsprechenden Probenansatz gegeben und mit dem Vortex-Reagenzschüttler gemischt.
- 8.) Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Dunkeln innerhalb des Brutschranks.
- 9.) Danach wurden die entsprechenden Mengen der extrazellulär bindenden Antikörper, d. h. der Antikörper, die Oberflächenmoleküle binden, zugegeben und mit dem Vortex-Reagenzschüttler gemischt.
- 10.) Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- 11.) Danach folgten zwei Wiederholungen eines Waschschrilles. Hierzu wurden die Probenansätze zentrifugiert (4 min, 300 g) und der Überstand verworfen. 500 µl Cell-Wash oder PBS mit 0,5% BSA wurden zugegeben, um das Zellpellet zu resuspendieren, dann wurde erneut zentrifugiert (4 min, 300 g). Der dadurch entstandene Überstand wurde wieder verworfen und es folgte eine Wiederholung der Zugabe von 500 µl Cell-Wash oder PBS mit 0,5% BSA sowie die erneute Zentrifugation (4 min, 300 g) und das Verwerfen des Überstandes.
- 12.) In diesem Schritt wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das zuvor durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet in 1 ml vier-prozentiger Para-Form-Aldehyd-Lösung resuspendiert und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert.
- 13.) Danach wurden die Probenansätze zentrifugiert (4 min, 300 g), der Überstand verworfen und 500 µl Cell-Wash oder PBS mit 0,5% BSA zugegeben.

An dieser Stelle war eine Unterbrechung des Protokolls bis zum nächsten Tag möglich, falls erst zu diesem Zeitpunkt die Möglichkeit bestanden hätte, die Proben durchflusszytometrisch zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen bei 5 °C gelagert. Allerdings wurde diese Möglichkeit im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur ein einziges Mal genutzt.

14.) In diesem Schritt erfolgte die Permeabilisierung der Zellen, um eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen.

- Die Proben wurden zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets in jeweils 50 µl Permeabilisationspuffer (100 ml PBS mit 0,5% BSA + 0,1g Saponin) aufgenommen.

- Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.

15.) Danach wurden die Antikörper, die intrazellulär binden sollten (für gewöhnlich die Antikörper für IFN- γ bzw. die Isotyp-Kontrolle), in entsprechender Menge zu den zu untersuchenden Proben

zugegeben und der Inhalt der TruCount-Röhrchen mit dem Vortex-Reagenzschüttler gemischt.

16.) Es folgte eine 40-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.

17.) Anschließend wurden die Probenansätze zentrifugiert (4 min, 300 g) und der Überstand verworfen. Erneut folgten zwei Waschschrte. Die Proben wurden hierzu in 500 µl Permeabilisationspuffer aufgenommen, zentrifugiert (4 min, 300 g) und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde anschließend ein zweites Mal durchgeführt.

18.) Die Zellpellets der Probenansätze wurden danach in 200 µl Cell-Wash oder PBS mit 0,5% BSA aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 5 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.3.2 Peptidspezifische Polymer-Färbung

Neben der Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, die entweder Oberflächenmoleküle oder auch intrazelluläre Zellbestandteile durchflusszytometrisch darstellbar machen, wurde mit der Polymer-Färbung noch eine weitere Farbe-Methode genutzt. Die Polymer-Färbung, im Rahmen des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Monitoring Ansatzes „Dextramer-Färbung“ genannt, erlaubte die präzise Bestimmung peptid-spezifischer T-Zellen. Die Polymer-Moleküle bestehen dabei aus zwei funktionell bedeutsamen Abschnitten, dem MHC-Peptid-Komplex und dem „Fluorescent-Tag“, d. h. der Fluoreszenzmarkierung. Diese beiden Abschnitte werden durch eine „Coiled-Coil-Struktur“ miteinander verbunden (vgl. *Abbildung 2.2*).

Der MHC-Peptid-Komplex imitiert den auf Zellen natürlich vorkommenden MHC-Komplex, der spezielle Peptide an Zellen des Immunsystems präsentiert. Im Falle des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Monitoring-Ansatzes wurden sechs Peptide ausgewählt und exakt dafür passende Dextramer-Moleküle erstellt, die einen MHC-Komplex imitieren, der eines dieser sechs Peptide präsentiert. Diese künstlichen MHC-Komplexe sind in der Lage, an den T-Zellrezeptor von CD8 positiven T-Zellen zu binden. Die durch den künstlichen MHC-Komplex präsentierten Peptide erlauben also eine genaue Zuordnung von T-Zellen, die spezifisch auf ein Peptid reagieren bzw. den entsprechenden T-Zellrezeptor hierzu auf ihrer Oberfläche tragen.

Der Fluorescent-Tag erlaubt die durchflusszytometrische Darstellung bzw. Erfassung der mit den Polymer-Molekülen markierten Zellen, wie dies auch bei standardmäßig zum Einsatz kommenden Fluoreszenz-Antikörpern der Fall ist.

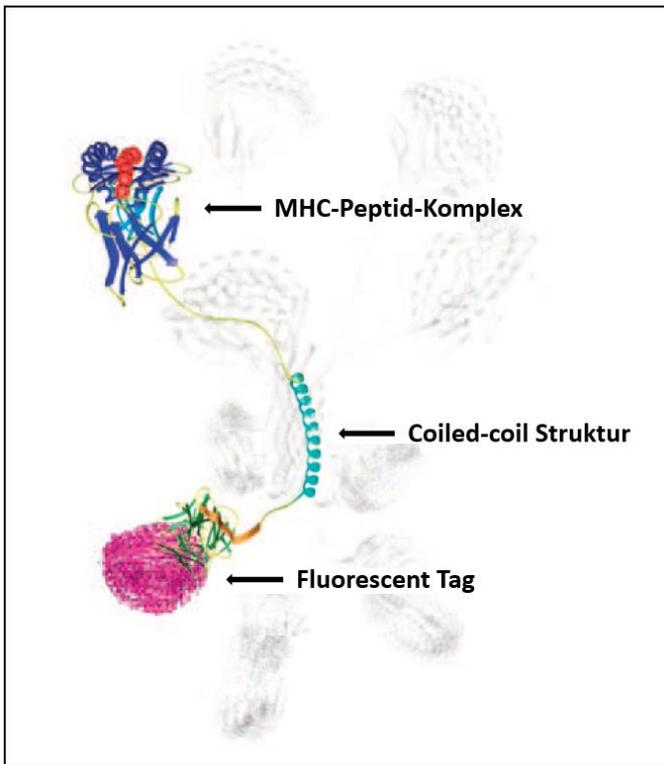


Abbildung 2.2: Beispielhaftes Polymer-Molekül

(Bild-Quelle: angepasst nach „Proimmune, Pro5 MHC Pentamer Handbook, S.3“)

2.2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen und beruht auf der Emission optischer Signale, die eine Zelle erzeugt, wenn sie einen Laserstrahl durchquert. Einzelne Zellen einer Probe werden nacheinander durch den Laserstrahl geführt und das entstehende Streulicht von Detektoren ausgewertet.

So lassen sich anhand des „Forward Scatter“ (Vorwärtsstreulicht“), der ein Maß für das Volumen der Zelle darstellt, und des „Side Scatter“ („Seitwärtsstreulicht“), welcher ein Maß für die Granularität, der Größe und Struktur des Zellkerns und der Menge an zellulären Vesikeln darstellt, viele Zellen voneinander unterscheiden. Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen können rasch Informationen über eine Zellpopulation gewonnen werden.

Forward Scatter und Side Scatter können hierbei und auch in dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten Monitoring-Ansatz durch die Nutzung fluoreszenzmarkierter Antikörper ergänzt werden, die an spezielle Moleküle der Zellen binden und dann Licht emittieren, das während der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls erfasst wird.

Eine Übersicht der genutzten Antikörper gibt *Tabelle 2.10*.

Tabelle 2.10: Verwendetes Volumen von Antikörpern und Polymer-Molekülen (FACS)

Antikörper	Zur Färbung eingesetztes Volumen pro TruCount-Röhrchen eines Ansatzes bzw. pro 10⁵ Zellen
7 AAD	20 µl
CCR7 PE	15 µl
CD14 APC	5 µl
CD14 FITC	5 µl
CD209 DC SIGN APC	5 µl
CD3 APC	5 µl
CD335 NKP46 PE	5 µl
CD45 RA PE	20 µl
CD45 RA PE-Cy7	10 µl
CD45 RO PE	10 µl
CD4 FITC	20 µl
CD71 PE	20 µl
CD8 FITC	15 µl
CD80 PE	10 µl
CD83 PE	10 µl
CD86 FITC	5 µl
HLA DR FITC	5 µl
IFN-γ PE (Mouse Anti-human)	0,25 µl
Isotyp-Kontrolle PE	0,25 µl
Polymer-Moleküle	
Dextramere	10 µl
Negativ-Ko. Dextramer	10 µl

Aus der Kombination verschiedener Antikörper und den während der Zellkultivierung gebildeten Untersuchungsgruppen ergaben sich die durchflusszytometrischen Assays.

Ein beispielhafter Versuchsansatz ist in *Tabelle 2.11* beschrieben. Ein solcher Ansatz wurde dann auf alle Gruppen (Positiv- und Negativ-Kontrolle genauso wie die verschiedenen Test-Gruppen),

die im Rahmen der Zellkultivierung gebildet worden waren, angewandt, um Vergleiche zwischen den unterschiedlich behandelten Zellpopulationen ziehen zu können.

Tabelle 2.11: Beispielhafter Versuchsansatz bei der Durchflusszytometrie

	FITC	PE	PerCp	APC
1. Röhrchen	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt
2. Röhrchen			7AAD	CD3
3. Röhrchen	CD8	Isotyp-Kontrolle	7AAD	CD3
4. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 1 = CHI
5. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 2 = CSPG4
6. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 3 = IGF2BP3
7. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 4 = NRCAM
8. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 5 = PTP
9. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Dextramer 6 = TNC
10. Röhrchen	CD8	IFN- γ	7AAD	Neg. Kontroll-Dextramer
11. Röhrchen - nur von einer Gruppe	CD8	CD71	7AAD	Dextramer 6 = TNC
12. Röhrchen - nur von einer Gruppe	CD8	CD45Ro	7AAD	CD3

Das FACS-Calibur-Gerät (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ist in der Lage, fluoreszierende Antikörper auf vier Kanälen gleichzeitig zu erkennen. Daher wurden Antikörper genutzt, die an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, nämlich FITC (Fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PerCp (Peridinin) und APC (Allophycocyanin), gekoppelt waren.

Die vom Gerät auf diese Weise gesammelten Daten wurden mit der Software CellQuest Pro in Graphen dargestellt, in denen jeweils ein Parameter an der Abszisse und ein Parameter an der Ordinate dargestellt waren. In diesen Graphen war es möglich, eine beliebige Region dargestellter Zellen auszuwählen, d. h. ein Gate um sie zu legen, und diese Subpopulation von Zellen dann in weiteren Sequenzen von Graphen/Gates genauer zu differenzieren.

2.2.3.3.1 Auswertung am Gerät mit der Software CellQuest Pro

Wie am Beispiel in *Tabelle 2.11* zu sehen, wurden bei der durchflusszytometrischen Analyse mehrere Negativ-Kontrollen mitgeführt, die auf der einen Seite dazu dienen, falsch-positive Signale zu vermeiden, auf der anderen Seite jedoch auch zur korrekten Auswertung der Zell-Analyse genutzt werden.

So wurden bei dem hier dargestellten Assay zum Nachweis peptidspezifischer Zellen zuerst über Forward Scatter und Side Scatter die T-Zell-Population der Probe dargestellt, in dieser wiederum die CD3-positiven und CD8-positiven Zellen herausgefiltert und diese näher betrachtet.

Anschließend erfolgte die Einstellung eines Basiswertes für die Signalstärke von IFN- γ über die Isotyp-Kontrolle. Genauso wurde ein Basiswert für die Signalstärke der Dextramere über die Negativ-Dextramer-Kontrolle festgelegt.

So konnten schließlich CD8-positive T-Zellen mittels der Dextramer-Fluoreszenzsignale gleichzeitig sowohl auf die Expression von IFN- γ als auch auf ihre Peptidspezifität gezielt untersucht werden.

2.2.3.4 CD8-T-Zellen-Panel an Tag 9 der Kultivierung

Um einen Vergleichswert nicht-stimulierter PBMCs oder T-Zellen, also weder mit dendritischen Zellen, mit Tumorlysat/-peptid, mit IFN- γ , noch mit LPS behandelte Zellen, für die abschließende durchflusszytometrische Analyse an Tag 21 des Assay-Protokolls heranziehen zu können, wurden die T-Zellen an Tag 9 des Assays ebenfalls untersucht. Dabei wurden jeweils die gleichen Oberflächen und intrazellulären Marker analysiert, die auch an Tag 21 bestimmt wurden.

Anschließend erfolgte die Auswertung mittels der Software CellQuest Pro sowie Microsoft Excel.

Der so gewonnene Ausgangswert unstimulierter Zellen erlaubte dann später einen Vergleich mit den stimulierten Zellen und eine Aussage über die immunologische Aktivierung der T-Zellen im Verlauf des Assays.

2.2.3.5 DZ-Panel an Tag 9 der Kultivierung

Um die Reifung dendritischer Zellen aus den monozytären Ausgangszellen von Tag 0 des Kultivierungsprotokolls nachzuweisen und gleichzeitig die Vitalität der Zellkulturen zu bestimmen,

wurde in Vorarbeiten innerhalb unseres Labors ein durchflusszytometrischer Assay erstellt. Dieser wurde an Tag 9 des Kultivierungsprotokolls an einem Zell-Aliquot durchgeführt und umfasste die Analyse der Zelloberflächenmarker CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR sowie den Avitalitätsmarker 7AAD.

Die entsprechenden Zellen und fluoreszenz-markierten Antikörper wurden wie folgt auf vier verschiedene TruCount-Röhrchen verteilt:

Röhrchen 1: 1-2x10⁵ Zellen in 200 µl Cellwash
Zellen ungefärbt

Röhrchen 2: 1-2x10⁵ Zellen in 200 µl Cellwash
Zellen ungefärbt + 7AAD

Röhrchen 3: 1-2x10⁵ Zellen in 200 µl Cellwash
5 µl CD86-FITC
10 µl CD80-PE
5 µl CD14-APC

Röhrchen 4: 1-2x10⁵ Zellen in 200 µl Cellwash
5 µl HLA-DR-FITC
10 µl CD83-PE
5 µl CD14-APC

Um falsch-positive Signale auszuschließen bzw. zu minimieren, wurden zuerst die entsprechende Zellkonzentration eingestellt und anschließend 5 µl gepooltes AB-Serum zu je 100 µl Cellwash zugegeben, bevor die Zellen für 20 Minuten bei 5 °C im Dunkeln inkubiert wurden.

Dann wurden die entsprechenden Antikörper hinzugegeben und die Zellen für weitere 30 Minuten bei 5 °C im Dunkeln inkubiert.

Danach folgte zweimal ein Waschschrift, bei dem die Zellen bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet mit 1-2 ml Cellwash resuspendiert wurden.

Die Zellen in dem entsprechenden Röhrchen zur Vitalitätsanalyse wurden mit 7-AAD gefärbt, dann für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor anschließend die Analyse mittels Durchflusszytometrie

erfolgte.

Zur Analyse wurden wie bei allen anderen durchflusszytometrischen Verfahren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, die Software CellQuest Pro und Microsoft Excel benutzt. Die Differenzierung zwischen Monozyten und dendritischen Zellen wurde bei diesem Assay mittels des Markers CD14 getroffen, wobei CD14-positive Zellen als Monozyten gewertet wurden, CD14-negative Zellen entsprechend als dendritische Zellen. Die Reifungsmarker HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 wurden ebenfalls bewertet und flossen genauso wie die durch 7AAD angezeigte Vitalität/Avitalität in die Beurteilung der in Kultur befindlichen dendritischen Zellen ein.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolation

Ausgangsmaterial zur RNA-Isolation waren entweder operativ gewonnene und avitalisierte Glioblastom-Gewebeproben oder eine primäre Glioblastom-Zelllinie.

Zur RNA-Gewinnung wurden, soweit möglich, 5mg Tumorlysat eingesetzt. War nicht ausreichend Material vorhanden, wurde versucht, möglichst viel davon zu nutzen.

Zunächst wurde das Tumorlysat abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Pellet in 700 µl einer Lösung aus 1 ml RLTplus und 10 µl β-Mercapto-Ethanol aufgenommen. Danach wurde das Pellet mittels eines Qia-Shredders homogenisiert.

Zur anschließenden Isolation der Gesamt-RNA wurde ein RNA-Isolationskit (Qiagen RNeasy Plus Micro Kit) gemäß Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde in folgenden Punkten von den im Herstellerprotokoll gemachten Angaben abgewichen, um eine bessere RNA-Ausbeute zu erhalten:

- In den Schritten 1 bis 3 wurde mit Volumina von 700 µl RLT-Plus und 700 µl 70%-Ethanol statt jeweils 350 µl gearbeitet. Da hierdurch jedoch ein zu großes Volumen für Schritt 4 entstand, da eine Rneasy-MinElute-Column weniger als 700 µl fasst, wurde Schritt 4 zweimal durchgeführt, so dass das gesamte Volumen durch die Säule gelaufen ist.

Bei den anschließenden Schritten wurde mit den im Herstellerprotokoll angegebenen Volumina weitergearbeitet.

- In Schritt 7 wurde für 5 Minuten statt wie vorgesehen 2 Minuten bei über 8000g zentrifugiert.

- In Schritt 9 wurde, nachdem die 14 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt wurden, ein zusätzlicher Inkubationsschritt von 10 Minuten bei Raumtemperatur eingefügt, bevor dann der finale Zentrifugationsschritt stattfand.

2.2.4.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Um Reinheit und Konzentration der isolierten RNA zu messen, wurde die optische Dichte mit Hilfe des Spektralphotometers BioMate 3S bestimmt. Dabei wurde jeweils bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm und 280 nm in Dreifach-Ansätzen gemessen. Als Kontrolle diente dabei nuklease-freies Wasser, da die RNA zuvor bei der Isolation mit eben diesem von der Säule eluiert worden ist.

Als Indiz der Reinheit sollte der Quotient aus den bei 260 nm und 280 nm gemessenen Werten zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Quotienten kleiner als 1,6 lassen auf eine Kontamination der RNA schließen. Eine Extinktion von 1 bis 260 nm entspräche etwa 40 µg RNA.

Anschließend an die Messung wurden die drei erhobenen Werte gemittelt und mit Hilfe des Mittelwerts das Volumen berechnet, in welchem 2 µg RNA enthalten sind.

Beispiel:

gemessene Konzentrationen: (1) 384,0 µg/ml

(2) 384,5 µg/ml

(3) 336,0 µg/ml

Arithmetischer Mittelwert: $[(1) + (2) + (3)] / 3 = (4)$; hier $\rightarrow \approx 368,17 \mu\text{g/ml}$

2 µg RNA sind dementsprechend enthalten in: $1000 \mu\text{l} / (4) * 2 \approx 5,43 \mu\text{l}$

2.2.4.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die isolierte RNA wurde nach folgendem Protokoll durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde auf Eis gearbeitet.

- 2 µg RNA wurden 1 µl Random-Hexamer-Primer zugesetzt und mit nuklease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt.

Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 70 °C im PCR-Cycler wurde das Gemisch kurz auf Eis gestellt.

- Anschließend wurden 9 µl aus folgendem Mastermix hinzugefügt:

Volumen	Reagenz
4 µl	M-MuLV-Reaktionspuffer
2 µl	dNTPs (1mM)
1 µl	M-MuLV-Reverse-Transkriptase (20 U)
0,5 µl	RNAse-Inhibitor (20 U)
1,5 µl	H ₂ O (nuklease frei)

Gesamtvolumen: 20 µl je Probe

Für die Negativkontrolle wurde die Reverse-Transkriptase im Mastermix durch H₂O ersetzt. Die jeweiligen Proben wurden als „no-RT“ bezeichnet.

- Die reverse Transkription lief dann mit folgenden Geräteeinstellungen weiter:

- 1.) 10 min bei 20 °C
- 2.) 59 min bei 37 °C
- 3.) 5 min bei 95 °C
- 4.) 10 min bei 4 °C (Abkühlen)

- Bis zur weiteren Nutzung wurde die cDNA entweder bei -35 °C oder im Falle der längerfristigen Lagerung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.4 PCR

2.2.4.4.1 Qualitative PCR

Bei der qualitativen PCR wurde wie bei der cDNA-Synthese auf Eis gearbeitet.

- Zu 1 μ l cDNA wurden 19 μ l des folgenden Mastermixes hinzugegeben:

Volumen	Reagenz
1 μ l	forward Primer (10 μ M bzw. Gesamtkonzentration im Mastermix = 500 nM)
1 μ l	reverse Primer (10 μ M bzw. Gesamtkonzentration im Mastermix = 500 nM)
2 μ l	Taq Puffer
0,5 μ l	dNTPs (0,25 mM)
0,125 μ l	Taq DNA Polymerase (0,5 U)
14,375 μ l	H ₂ O (nuklease frei)

Es wurde immer darauf geachtet, eine Negativ-Kontrolle mitzuführen, wobei die eingesetzte cDNA durch 1 μ l H₂O ersetzt worden ist. Des Weiteren wurde auch immer die No-RT-Kontrolle der cDNA-Synthese mitgeführt und gezeigt, dass in diesen Ansätzen keine reverse Transkription abgelaufen war.

- Die eigentliche PCR-Reaktion lief dann unter folgenden Bedingungen ab:

- 1.) Initiale Denaturierung 95 °C für 5 min
- 2.) Denaturierung 95 °C für 30 sec
- 3.) Annealing 58,5 °C für 30 sec
- 4.) Elongation 72 °C für 60 sec
- 5.) Finale Elongation 72 °C für 10 min
- 6.) „Hold“ 4 °C → bis zur Entnahme und Weiterverarbeitung oder Lagerung bei -35 °C

Abgewichen wurde hiervon nur für die Untersuchung der Expression des Proteins FABP7, da sich hier eine Annealing-Temperatur von 64 °C von Vorteil erwiesen hat. Niedrigere Temperaturen führten häufig zu falsch-positiven H₂O-Kontrollen, während höhere Temperaturen eine Anlagerung

der Primer nicht mehr gewährleisteten, was wiederum falsch-negativen Ergebnissen entspricht. Dies wird noch einmal ausführlicher im Ergebnis- und Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit besprochen.

2.2.4.4.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auswertung der qualitativen PCR wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Hierzu wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer (Gel-Elektrophorese-Puffer) 2g Agarose gelöst und in der Mikrowelle für ca. 1,5 min erhitzt, um ein zweiprozentiges Gel zu erhalten.

Nachdem das Gemisch erkaltet war, wurden 25 µl EZ-Vision hinzugegeben und das Gel in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, wo es aushärten konnte.

Nach der Auspolymerisierung wurden das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm entfernt.

Zu den zuvor durch die PCR gewonnenen DNA-Proben (20 µl je Probe) wurden 4 µl DNA-Loading-Dye (6x) gegeben.

Zu 10 µl eines 100-Basenpaaren-Markers (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) wurden 2 µl EZ-Vision gegeben, um einen Referenzmarker zu schaffen.

Sowohl die DNA-Proben inklusive des zugegebenen Loading-Dye als auch der Referenzmarker wurden anschließend in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Danach wurde eine Spannung von 120 Volt für ca. 45 min angelegt, um die DNA-Fragmente aufzutrennen.

Nach der abgelaufenen Agarosegelelektrophorese wurden die einzelnen DNA-Fragmente der Proben mittels des GenoSmart-Gel-Dokumentationssystems unter UV-Licht sichtbar gemacht und per Kamerabild dokumentiert. Dies ist aufgrund des EZ-Vision, das einen Komplex mit der DNA-Probe bildet, möglich. Das so erstellte Bild wurde schließlich mit der Software Microsoft Powerpoint ausgewertet.

2.2.4.4.3 Semi-quantitative PCR

Die semi-quantitative PCR wurde durchgeführt, um beurteilen zu können, ob in GBM-Tumor-Gewebe spezifische Proteine im Vergleich zu gesundem Hirn-Gewebe unterschiedlich stark exprimiert werden.

Als Ausgangsmaterial hierzu diente cDNA von gesundem Hirngewebe (Clontech, Frankreich) und cDNA, die aus Tumorlysat oder einer primären GBM-Tumorzelllinie gewonnen wurde.

Die PCR-Reaktion lief exakt wie in *Kap. 2.2.4.4.1* beschrieben ab. Allerdings wurde vor dem eigentlichen semi-quantitativen Vergleich ein Zwischenschritt durchgeführt, um das korrekte cDNA-Volumen zu bestimmen, das als Ausgangsmaterial für die PCR diente.

Hierzu wurde die Expression eines Housekeeping-Proteins (RNA-Pol oder TBP) sowohl in der cDNA, die aus gesundem Gewebe stammte, als auch in den Proben von Tumorpatienten getestet und miteinander verglichen. Es wurde dabei eine Verdünnungsreihe der cDNA aus gesundem Gewebe mit der Expressionsstärke des Housekeeping-Proteins in den Tumorpatienten-Proben verglichen.

Nach Durchführung der PCR sowie der Agarosegelelektrophorese und deren Auswertung mittels der Software Microsoft Powerpoint wurde die am besten miteinander korrelierende Bandenstärke der „gesunden“ und der Tumorpatient-cDNA im Agarosegel ausgewählt, *siehe Abbildung 2.3*.

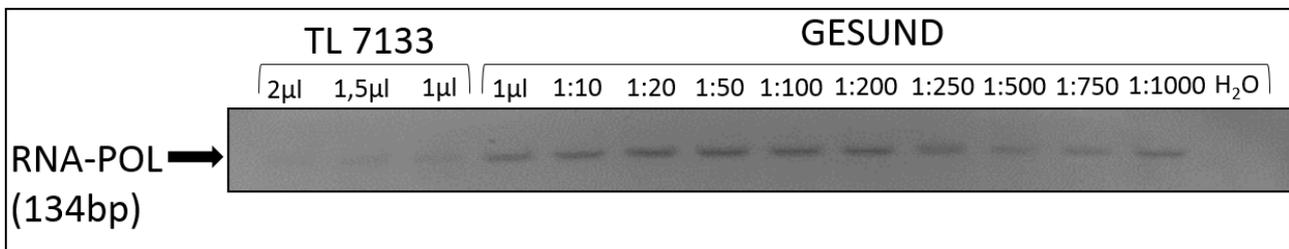


Abbildung 2.3: Abgleich der Expressionsstärke von RNA-Pol im Tumorlysat 7133

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Bandenstärken zwischen der Verdünnungsreihe der cDNA, die aus gesundem Gewebe stammte, und den unterschiedlichen eingesetzten Volumina der cDNA des TL 7133. In diesem Beispiel bestand die beste Korrelation der Expression des Housekeeping-Proteins RNA-Pol zwischen 1 µl cDNA des TL7133 und der Verdünnung 1:750 der cDNA, die aus gesundem Gewebe stammte.

Mit dieser Paarung aus verdünnter cDNA aus gesundem Gewebe und einem entsprechenden Volumen Tumorpatient-cDNA wurde dann die semi-quantitative PCR durchgeführt. Auch hier wurde wieder das Housekeeping-Protein mitgeführt und so viele der für die vorliegende Arbeit

ausgewählten Proteine wie möglich mit der vorhandenen Menge an cDNA untersucht.

Waren die Banden des Housekeeping-Proteins im Agarosegel gleich stark, konnte aus dem Intensitätsunterschied bei den Banden der untersuchten Tumorproteine geschlossen werden, ob ein Protein im gesunden Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe weniger stark, gleich stark oder stärker exprimiert wurde, *siehe Abbildung 2.4.*

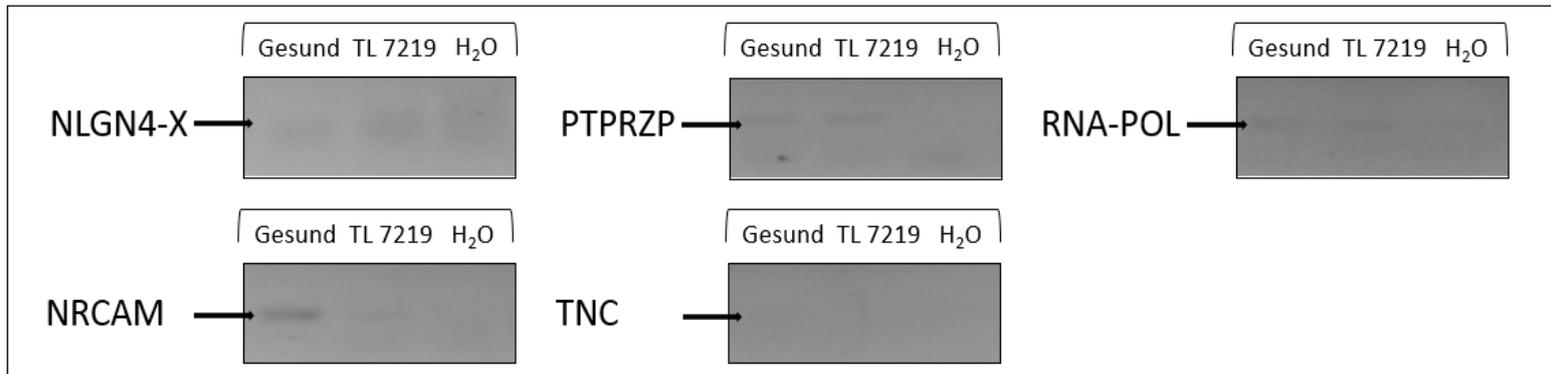


Abbildung 2.4: Semi-quantitativer Vergleich Proteinexpression – Gesund mit Tumorgewebe
Gezeigt wird der semi-quantitative Vergleich der Tumorlysat-cDNA 7219 (1,5 µl eingesetzt) mit cDNA aus gesundem Gewebe (1:1500 verdünnt). Die Bandenstärke bei RNA-Pol ist nahezu identisch, wodurch man folgendes schließen kann (von links nach rechts, wobei NLGN4X wegen einer Verunreinigung in der H₂O-Kontrolle nicht verwertet wurde): NRCAM wird sowohl im gesunden Gewebe (stärker) als auch im Tumorgewebe (schwächer) exprimiert, PTP wird sowohl im gesunden Gewebe als auch im Tumorgewebe nahezu gleich stark exprimiert und TNC wird – in diesem Beispiel – von keinem der beiden Gewebe exprimiert.

2.2.4.4.4 Quantitative PCR

Um die intrazelluläre IFN- γ -Konzentration der CD8⁺-T-Zellen quantitativ bestimmen zu können, wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt. Diese erlaubt die Messung der cDNA-Amplifikation in Echtzeit. Die hierfür benötigte cDNA bzw. auch die RNA wurde dabei analog zu den Protokollen in *Kap. 2.2.4.1 und folgenden*, welche die Tumorlysat-Untersuchung beschreiben, hergestellt bzw. gewonnen.

Die cDNA und die No-RT-Kontrolle wurden jeweils mit dem Farbstoff „Brillant II SYBR Green QPCR Master-Mix“ und den entsprechenden Gen-spezifischen Primern in die Wells einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Der SYBR-Green-Farbstoff ist ein Zyanin-Farbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, sich also in DNA-Doppelstränge einlagert. Der so entstandene Komplex

absorbiert Licht der Wellenlänge 494 nm und emittiert unter UV-Bestrahlung Licht der Wellenlänge 521 nm. Dieses emittierte Lichtsignal wird von dem qRT-PCR-Detektionssystem CFX96-Touch Real-Time-PCR-Detection-System am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen und mit Hilfe der CFX-Manager-Software 3.1 ausgewertet.

Ein beispielhafter Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

- 12,5 µl „Brillant II SYBR Green QPCR Master-Mix“
- 0,75 µl Forward-Primer (300 nm)
- 0,75 µl Reverse-Primer (300 nm)
- 10 µl H₂O

Zu diesem 24-µl-Master-Mix wurde dann 1 µl cDNA, zuvor im Verhältnis 1:5 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt, um eine Konzentration von 50-100 ng cDNA/µl zu erhalten, zugegeben. Entsprechend wurde auch mit der No-RT-Kontrolle bzw. einer Wasser-Kontrolle (Blank) verfahren.

Die PCR-Reaktion lief dann in folgenden Schritten ab:

- 1.) Initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min
- 2.) Denaturierung bei 95 °C für 30 sec
- 3.) Annealing bei 58,5 °C für 30 sec
- 4.) Elongation bei 72 °C für 60 sec
- 5.) Finale Elongation bei 72 °C für 10 min
- 6.) Abkühlen und „Hold“ bei 4 °C → bis zur Entnahme der Proben

Die Schritte 2 bis 4 wurden dabei 44 Mal ausgeführt.

Für jeden PCR-Zyklus gilt dabei, dass die cDNA-Menge exponentiell zunimmt und somit auch das Fluoreszenz-Signal exponentiell stärker wird. Je mehr cDNA ursprünglich eingesetzt wird, desto eher wird ein PCR-Zyklus erreicht, bei dem ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird.

Dieser PCR-Zyklus heißt „Cycle Threshold“ (CT, dt.: „Schwellenwert-Zyklus“). Der CT-Wert ermöglicht die quantitative Analyse der Gen-Expression, beispielsweise von IFN- γ , in den gewünschten Zellen.

Um die Ergebnisse der Real-Time-PCR miteinander vergleichen zu können, wurden die gemessenen CT-Werte in Relation zu CT-Werten eines House-Keeping-Gens gesetzt. Darunter versteht man ein Gen, dessen Genprodukt in miteinander vergleichbaren Zellen, also etwa in stimulierten und unstimulierten T-Zellen, im gleichen Maße gebildet wird. In diesem Monitoring-Ansatz wurden hierfür TBP oder RNA-Pol gewählt.

Durch diese Vorgehensweise ergibt sich der sogenannte Δ -CT-Wert (Delta-CT-Wert):

$$\rightarrow \Delta\text{-CT} = \text{CT-Zielgen (hier: IFN-}\gamma\text{)} - \text{CT-House-Keeping-Gen (hier: TBP oder RNA-Pol)}$$

Die relative Gen-Expression wurde dann nach der sogenannten Δ - Δ -CT-Methode nach folgender Formel angegeben:

$$\rightarrow \text{Relative Gen-Expression} = 2^{-(\Delta\text{-CT} - \Delta\text{-CT der Kontrollgruppe})}$$

Die relative Genexpression gibt den Faktor an, um den das Zielgen mehr in der Probe als in der Kontrolle exprimiert wurde. In dem hier beschriebenen Monitoring-Ansatz wurden Anstiege der IFN- γ -Expression um mehr als den Faktor 1,5 im Vergleich zur Kontrolle als relevant angesehen und somit als Hinweis für eine spezifische Immun-Antwort gegen das Tumorlysat gewertet.

Die Auswertung der so erhaltenen Daten erfolgte in Microsoft Excel 2007.

3. Ergebnisse

3.1 GBM-Tumorproteine

Es wurden 15 Tumor-Gewebeproben, eine immortalisierte Gliom-Zelllinie und primäre Glioblastom-Zellen auf die Expression der mRNA von neun ausgewählten Proteinen untersucht. Zusätzlich wurde die RNA gesunden Gehirngewebes sowie von Pankreaszellen untersucht. Die Expression der Tumorprotein-mRNA war von Patient zu Patient sehr variabel und jede der untersuchten Gewebeproben wies eine individuelle Zusammensetzung auf. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass einige Proteine bzw. deren mRNA häufiger als andere exprimiert werden, was in *Tabelle 3.1* dargestellt ist. Die Proteine BCA, CHI, IGF2BP3 und PTP werden in über 80% der untersuchten Proben ausgebildet. FABP7 und NRCAM in über 90% und NLGN4X sogar in 100% der Fälle. TNC hingegen lediglich in 25% der Proben, wohingegen CSPG4 in keiner der untersuchten Tumorlysate-Proben mit einer konventionellen PCR nachgewiesen werden konnte. Lediglich im gesunden Gewebe und in der Tumorzelllinie U87 war dieses Protein zu identifizieren. Für die einzelnen Proteine und Tumorgewebeproben sind die Untersuchungsergebnisse in *Tabelle 5.2, siehe Anhang*, aufgeschlüsselt.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass acht von neun der untersuchten Protein-mRNAs regelmäßig in Glioblastom-Tumorgewebe zu finden sind. Sieben dieser Proteine dabei in über 80% der Fälle (*vgl. Tabelle 3.1*).

3.1.1 Semi-quantitativer Vergleich der GBM-Protein-Expression

Es konnte gezeigt werden, dass alle neun untersuchten Proteine auch in gesundem Hirngewebe vorkommen, *vgl. Tabelle 5.2 im Anhang*. Daher wurde die Fragestellung untersucht, ob die Proteine in Tumorgewebe häufiger vorkommen, also stärker exprimiert werden, als in gesundem Gewebe.

Beispielhaft sind in *Abb. 3.1* Ergebnisse zweier solcher Vergleichs-Untersuchungen aufgeführt. Die Tumor-Protein-Expression der GBM-Patienten 4 und 5 wurden dabei jeweils mit der Expression in gesundem Gehirngewebe verglichen.

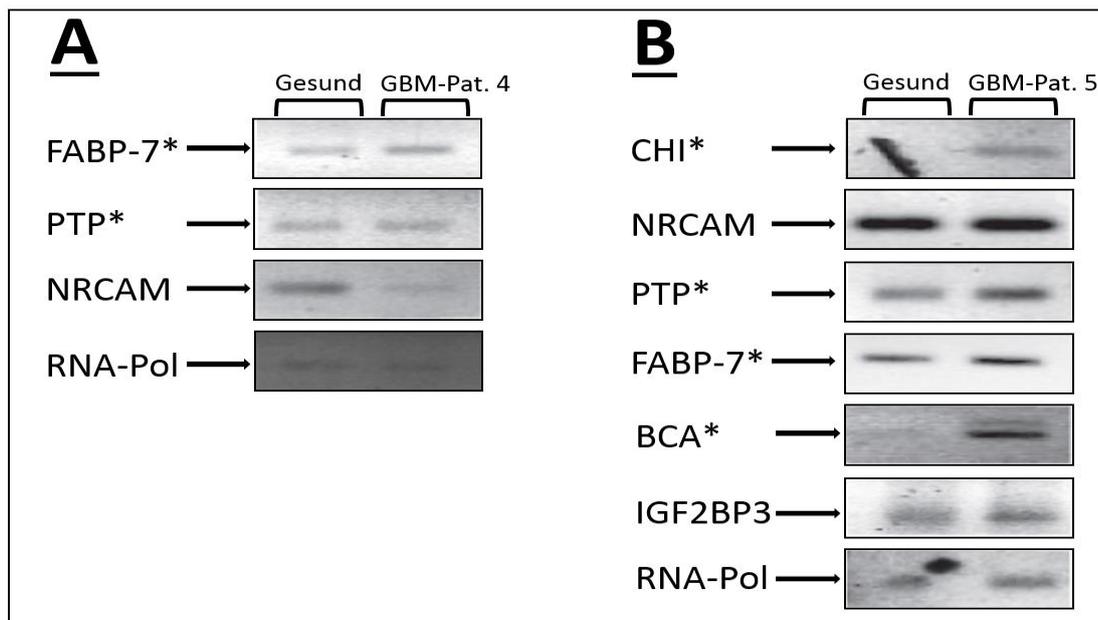


Abbildung 3.1: Semi-quantitativer Vergleich der GBM-Protein-Expression (Gel-Elektrophorese)

Abb. A – Gezeigt ist das Untersuchungsergebnis der cDNA von GBM-Patient 4 (entspricht TL 7219) für die Expression der Proteine FABP7, PTP und NRCAM. Abb. B – Zu sehen ist das Untersuchungsergebnis der cDNA von GBM-Patient 5 (entspricht TL 116110) bezüglich der Expression der Proteine CHI, NRCAM, PTP, FABP7, BCA und IGF2BP3. Eine Überexpression im Vergleich zum Gesunden wurde jeweils mit „*“ gekennzeichnet.

Sowohl in Abb 3.1 A als auch B ist erkennbar, dass die Bandenstärke des House-Keeping-Proteins RNA-Pol beim gesunden Probenmaterial gleich stark ausgeprägt ist wie im untersuchten Tumorlysat der GBM-Patienten. Dies erlaubt den Vergleich der Expressionsstärke der restlichen untersuchten Proteine.

Aus den in Abb. 3.1 dargestellten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass im Tumorlysat bei GBM-Patient 4 (Abb. 3.1 A) sowohl FABP7 als auch PTP stärker exprimiert werden als im Gesunden und dass es sich bei dem Protein NRCAM genau umgekehrt verhält. Hier ist die detektierte Bande im gesunden Gewebe wesentlich deutlicher ausgeprägt. Dies spricht dafür, dass die Expression des Proteins im Gesunden stärker ist als im Tumorlysat.

Bei GBM-Patient 5 (Abb. 3.1 B) werden die Proteine CHI, PTP, FABP7 und BCA stärker exprimiert als im gesunden Probenmaterial. NRCAM und IGF2BP3 zeigen eine etwa gleiche Bandenintensität im Gesunden und im Tumorlysat auf, was für eine vergleichbar starke Expression der beiden Proteine spricht.

Insgesamt wurden pro GBM-Tumor-Protein bis zu sieben Tumorlysate untersucht und die

Expressionsstärken mit der RNA bzw. cDNA aus gesundem Gewebe verglichen.

3.1.2 Absolute und relative Häufigkeit der GBM-Proteine und deren Überexpression

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die durch die Untersuchung der Gewebeproben gewonnenen Daten. Es konnte gezeigt werden, dass es spezifische Proteine in Glioblastom-Tumoren gibt, die in mehreren Patienten wiederzufinden sind. Gleichzeitig wurden unter diesen Proteinen einige identifiziert, die im Vergleich zu gesundem Hirngewebe deutlich überexprimiert waren.

So werden auf mRNA-Level BCA, FABP7 und PTP in 100%, IGF2BP3 in 75% und CHI in 67% der untersuchten Proben überexprimiert. Dies macht diese Proteine zu vielversprechenden Kandidaten als mögliche Ziel-Antigene für entsprechend stimulierte T-Zellen im Rahmen der dendritischen Zellvakzinierung.

Tabelle 3.1: Absolute und relative Häufigkeit der GBM-Protein-Expression im Tumorgewebe, sowie absolute und relative Häufigkeit der Überexpression.

GBM-Protein	mRNA Expression in Patienten		mRNA Überexpression	
	In x von x Proben (total)	%	In x von x Proben (total)	%
BCA	9/11	82	3/3	100
CHI	13/16	81	4/6	67
CSPG4	0/14	0	0/7	0
FABP7	10/11	91	3/3	100
IGF2BP3	10/12	83	3/4	75
NLGN4X	8/8	100	nicht getestet	0
NRCAM	15/16	94	0/7	0
PTP	14/16	87,5	7/7	100
TNC	3/12	25	0/1	0

3.1.2.1 Untersuchung der Pankreaszellen

In den Pankreaszellen konnte keine Expression der Glioblastom-Protein-mRNA nachgewiesen werden.

3.2 Zellreifung und Kultivierung

Im Rahmen des Assays zum Immunmonitoring von GBM-Patienten ist es wichtig, die Kulturbedingungen zu kontrollieren, unter denen die zu untersuchenden Zellen wachsen und reifen. Das Ziel besteht nicht nur darin, schon frühzeitig eventuellen Optimierungsbedarf bei den Kultivierungsprotokollen feststellen zu können, sondern es geht vor allem um die Sicherstellung, dass bei der späteren Co-Kultivierung dendritischer Zellen und PBMCs mit reifen Zellen gearbeitet wird. Nur so kann sichergestellt werden, dass die in vivo Verhältnisse der Patienten möglichst genau abgebildet werden. Im vorliegenden Kapitel werden die Ergebnisse des Monitorings der Zellreifung von DCs und PBMCs sowohl auf der Basis der Durchflusszytometrie als auch auf der Basis der Lichtmikroskopie wiedergegeben.

3.2.1 Monitoring von Zellwachstum und Zellreife

Wie in Vorarbeiten in unserem Labor bereits etabliert, wurden das Zellwachstum und die Zellreifung der in Kultur befindlichen Zellen analog zur Qualitätskontrolle der Herstellungserlaubnis für dendritische Zellen als Impfstoff im Institut überwacht. So unterlagen die in Kultur befindlichen Zellen über die gesamten 21 Tage (9 Tage getrennte Kultur der DCs und PBMCs, danach eine 12 tägige Co-Kultivierung) einem Monitoring.

- Dendritische Zellen:

Monozyten wurden aus PBMCs von gesunden Blutspendern oder GBM-Patienten isoliert und anschließend für neun Tage kultiviert. Die Reifung zu dendritischen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

In *Abb. 3.2* sind die dabei gesammelten Daten der dendritischen Zellen graphisch dargestellt. Es wurde ein Vergleich zwischen unreifen und reifen, d. h. über neun Tage kultivierten Zellen angestellt. Hierzu wurde die Expression der Zell-Oberflächenmoleküle auf co-stimulatorische bzw. DC-spezifische Moleküle, deren verstärkte Expression auf eine Reifung der Zellen schließen lässt, untersucht. CD14 wird während der Reifung dendritischer Zellen aus Monozyten herunterreguliert, wohingegen eine Hochregulation der restlichen untersuchten Marker CD86, CD80, HLA-DR und CD83 erfolgen sollte. Wie *Abb. 3.2* zeigt, konnten diese Veränderungen bezüglich der Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden, und die Zellen wiesen an Tag 9 der Kultivierung die Merkmale reifer dendritischer Zellen auf.

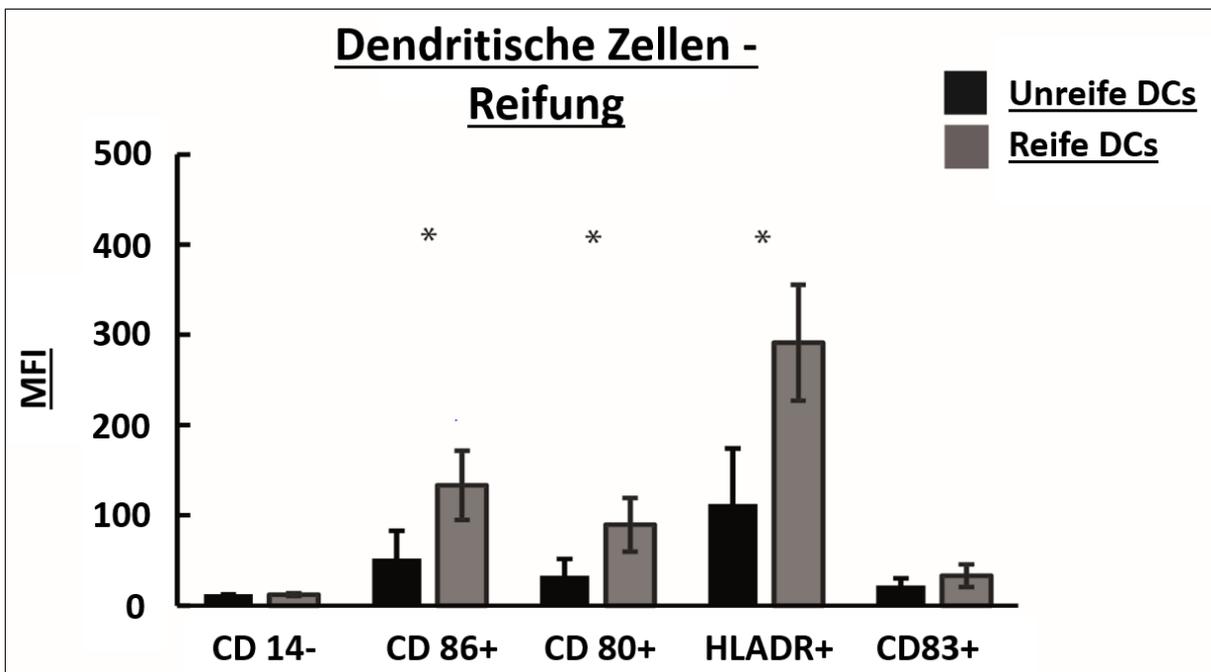


Abbildung 3.2: Zellreifung der dendritischen Zellen

Die Abbildung zeigt den durchflusszytometrisch untersuchten Vergleich der Oberflächenmolekül-Expression von unreifen und reifen dendritischen Zellen (= nach 9 Tagen Kultur). Angegeben ist hierzu die MFI (Mean Fluorescent Intensity). CD14 bleibt auf einem vergleichbar niedrigen Expressions-Niveau, wohingegen die anderen Moleküle CD86, CD80, HLADR und CD83 hochreguliert werden. In die Darstellung flossen die Untersuchungsergebnisse von n=3 GBM-Patienten ein (GBM-Patienten 1, 2 und 4).

- CD8-positive T-Zellen:

Wie bei den dendritischen Zellen wurde auch der Phänotyp der CD8-positiven T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD71 und CD45Ro analysiert.

Wie Abb. 3.3 zeigt, konnten beide Marker sowohl auf den noch naiven T-Zellen, d. h. vor der Co-Kultivierung, als auch auf den T-Zellen nach der Co-Kultivierung nachgewiesen werden. Dabei bleibt die Expression von CD71 auf vergleichbarem Niveau, wohingegen ein Anstieg der Expression von CD45Ro beobachtet werden konnte.

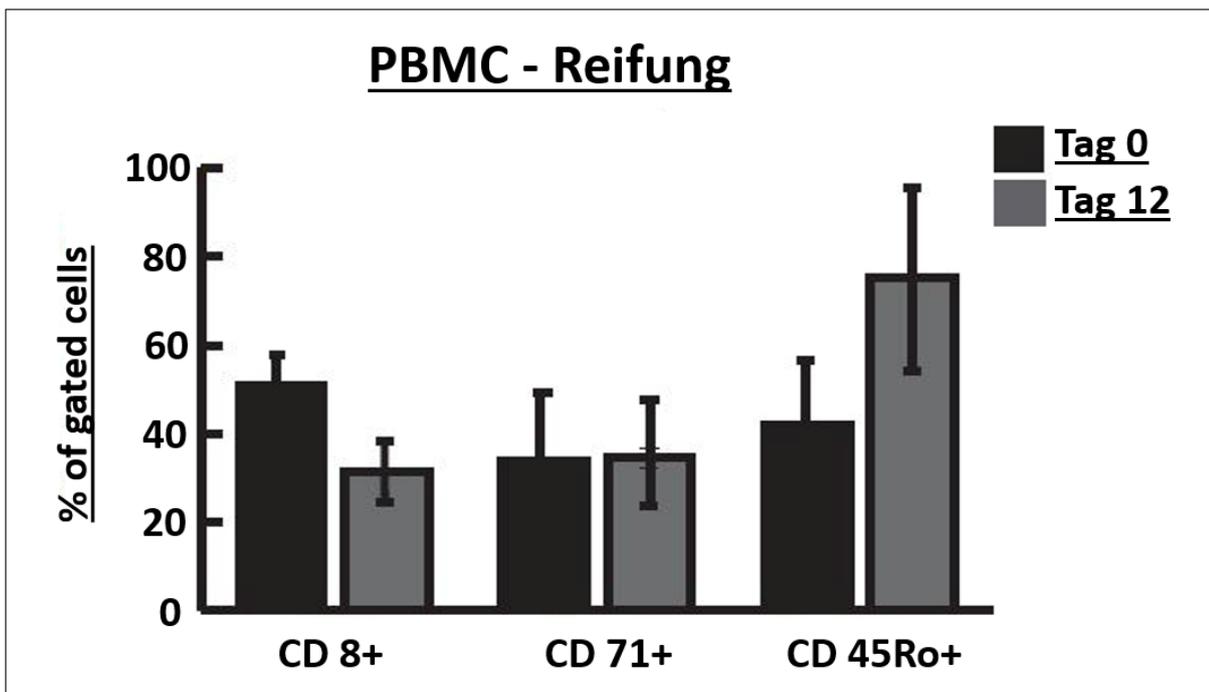


Abbildung 3.3: Zellreifung der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung von PBMCs an Tag 0 im Vergleich zu Tag 12 der Co-Kultivierung von PBMCs und DCs. In die Darstellung flossen die Untersuchungsergebnisse von n=5 GBM-Patienten ein (GBM-Patienten 1, 2, 4, 6 und 7).

- Lichtmikroskopische Kontrollen:

Neben der Durchflusszytometrie wurden das Wachstum und die Interaktion der in Kultur befindlichen Zellen miteinander auch lichtmikroskopisch verfolgt.

Abb. 3.4 zeigt exemplarisch CD8-positive Zellen,

- die mit Tumorlysat-beladenen dendritischen Zellen stimuliert wurden (Bild A);
- die mit dendritischen Zellen co-kultiviert und als Positivkontroll-Gruppe mit IFN- γ sowie LPS stimuliert wurden (Bild B);
- die mit unbeladenen dendritischen Zellen co-kultiviert wurden und entsprechend als Negativkontrolle dienten (Bild C).

Dabei sind in den Bildern A und B deutlich die von den stimulierten T-Zellen gebildeten Sphären zu erkennen, die sich in der Negativkontrolle nicht in dieser Form zeigen.

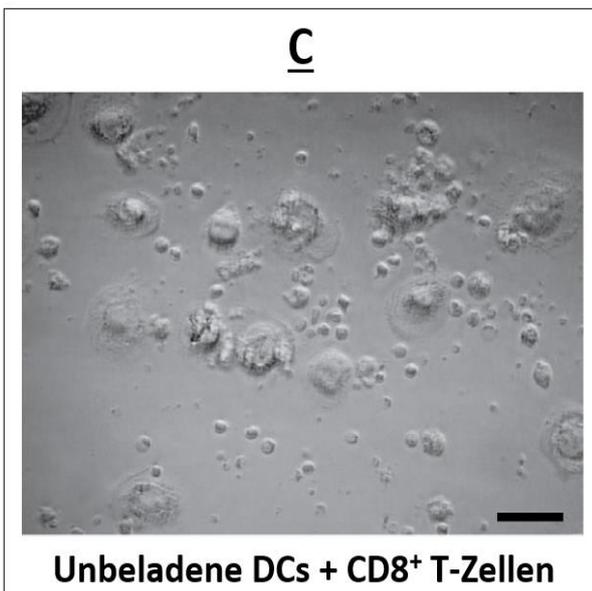
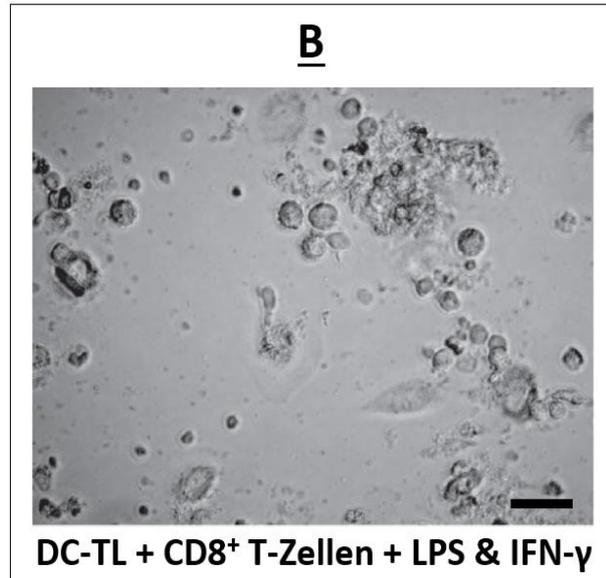
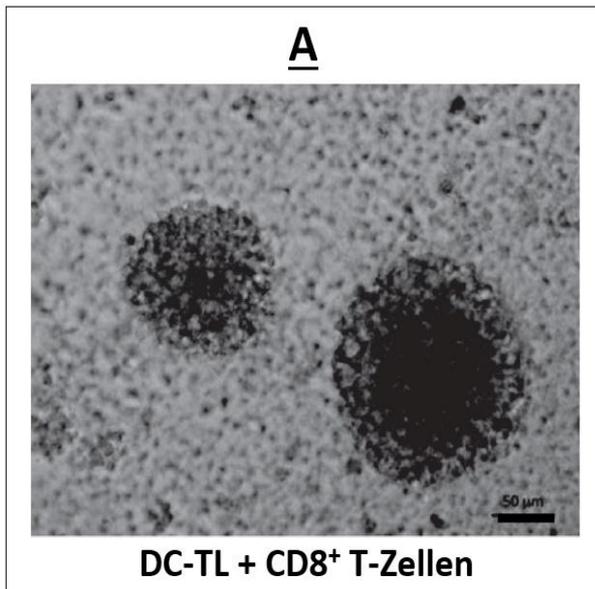


Abbildung 3.4:
Lichtmikroskopische Beobachtung der Zellreifung
 Gezeigt sind lichtmikroskopische Kontrollen der in Kultur befindlichen Zellen an Tag 12 der Co-Kultivierung von CD8⁺-T-Zellen mit DCs in 96-Well-Zellkultur-Platten. (Maßstab = 50 μm)
 Bild A: Co-Kultivierung von CD8⁺-T-Zellen und TL beladenen DCs; Bild B: Co-Kultivierung von CD8⁺-T-Zellen und DCs, die mit IFN-γ und LPS stimuliert wurden; Bild C: Co-Kultivierung von CD8⁺-T-Zellen und unbeladenen DCs

3.3 Immunmonitoring mittels Real-Time-PCR

Im folgenden Kapitel ist die mittels Real-Time-PCR untersuchte Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen dargestellt. Über die gemessene IFN-γ Expression der T-Zellen, als Ausdruck einer Aktivierung, wird die Immunogenität der Tumorslysate bzw. auch der einzelnen Proteine beurteilbar. Hierzu wurden die Zellen gesunder Blutspender, unter Standardtherapie befindlicher GBM-Patienten und DC-vakzinierter Patienten untersucht.

3.3.1 Aktivierung von T-Zellen durch DCs: Immunogenes Potenzial des GBM-Tumorlysates

Um das immunogene Potenzial der mit Tumorlysate und/oder Tumorpeptiden beladenen dendritischen Zellen zu evaluieren, wurde auf dem mRNA-Level die Fähigkeit der DCs überprüft, eine IFN- γ -Expression in CD8⁺-T-Zellen zu induzieren. Dies wurde bei Zellen gesunder Blut-Spender, unter Standardtherapie befindlicher GBM-Patienten und DC-vakzinierter Patienten *in vitro* untersucht.

Hierzu wurden die T-Zellen nach der Co-Kultivierung von DCs und PBMCs bzw. CD8⁺-T-Zellen mittels Real-Time-PCR untersucht. Die so gewonnenen Erkenntnisse für GBM-Patienten unter Standardtherapie sind in *Abb. 3.5* dargestellt. In die Grafik eingeflossen sind die Daten von n=5 Glioblastom-Patienten (GBM-Patienten 1, 2, 3, 4 und 6).

Zu erkennen ist dabei die mehr als 4,4-fache Steigerung der IFN- γ -mRNA-Expression bei CD8⁺-T-Zellen, die mit Tumorlysate beladenen dendritischen Zellen co-kultiviert, d. h. stimuliert worden sind, im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe, die mit unbeladenen dendritischen Zellen co-kultiviert wurde.

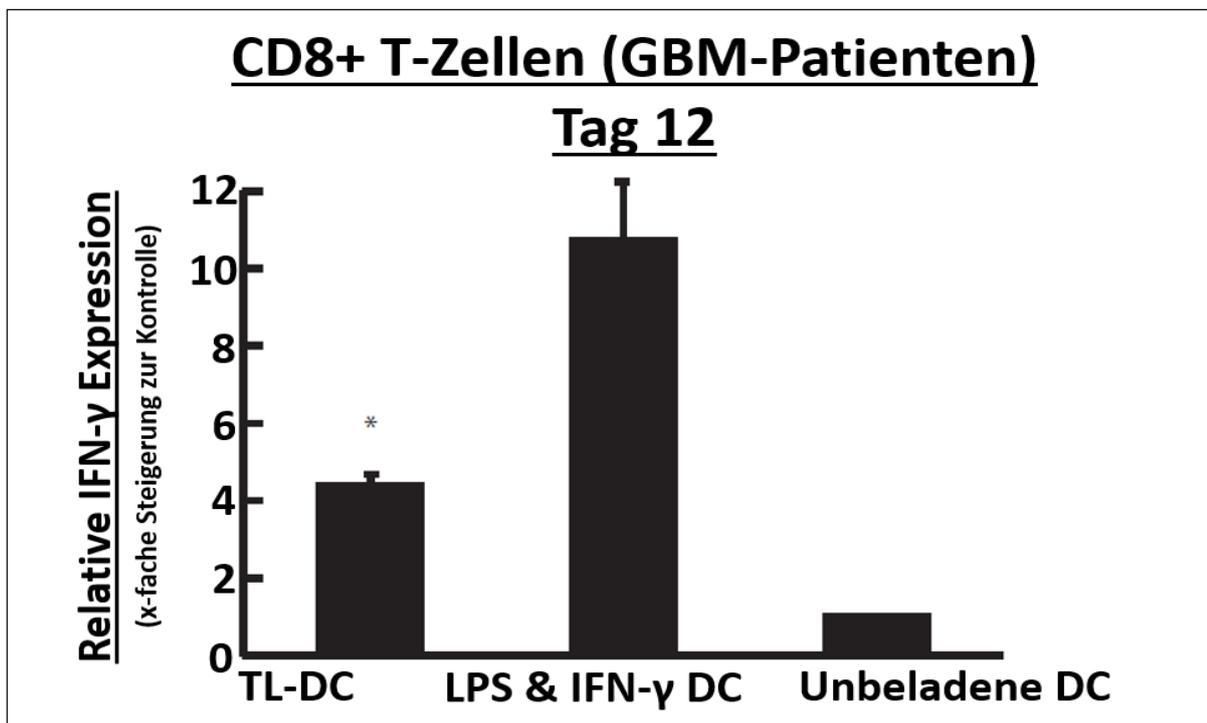


Abbildung 3.5: IFN- γ -Expression der CD8⁺-T-Zellen bei GBM-Patienten unter Standardtherapie
Gezeigt ist die mittels Real-Time-PCR untersuchte IFN- γ -mRNA-Expression von CD8⁺-T-Zellen nach 12 Tagen Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen. In 3 Gruppen: Links: TL-DC (mit Tumorlysate beladene dendritische Zellen); Mitte: LPS & IFN- γ DC (Positivkontrolle \rightarrow Stimulation mit IFN- γ und LPS); Rechts: unbeladene DC (Negativkontrolle \rightarrow unbeladene dendritische Zellen) An der Ordinate wird die x-fache relative IFN- γ -mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angezeigt. In die Abb. gingen Daten von n=5 Patienten (GBM-Patienten 1, 2, 3, 4 und 6) ein. Das IFN- γ -Signal wurde auf das TBP-Signal (Housekeeping-Gen) normalisiert und dann die relative

Expression nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode bestimmt.

Wie in Abb. 3.5 für mit Tumorlysat beladene dendritische Zellen gezeigt, wurde bei einigen Assay-Läufen auch die Immunogenität einzelner Tumorpeptide untersucht. Abb. 3.6 zeigt die Ergebnisse eines Versuchslaufs, in dem dendritische Zellen mit dem CHI-Tumorpeptid beladen wurden. Anschließend fand die 12-tägige Co-Kultivierung mit PBMCs statt, danach erfolgte die Bestimmung der IFN- γ -mRNA-Expression von CD8⁺-T-Zellen.

Es ist eine deutliche Zunahme der IFN- γ -Expression um den Faktor 4,79 im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen.

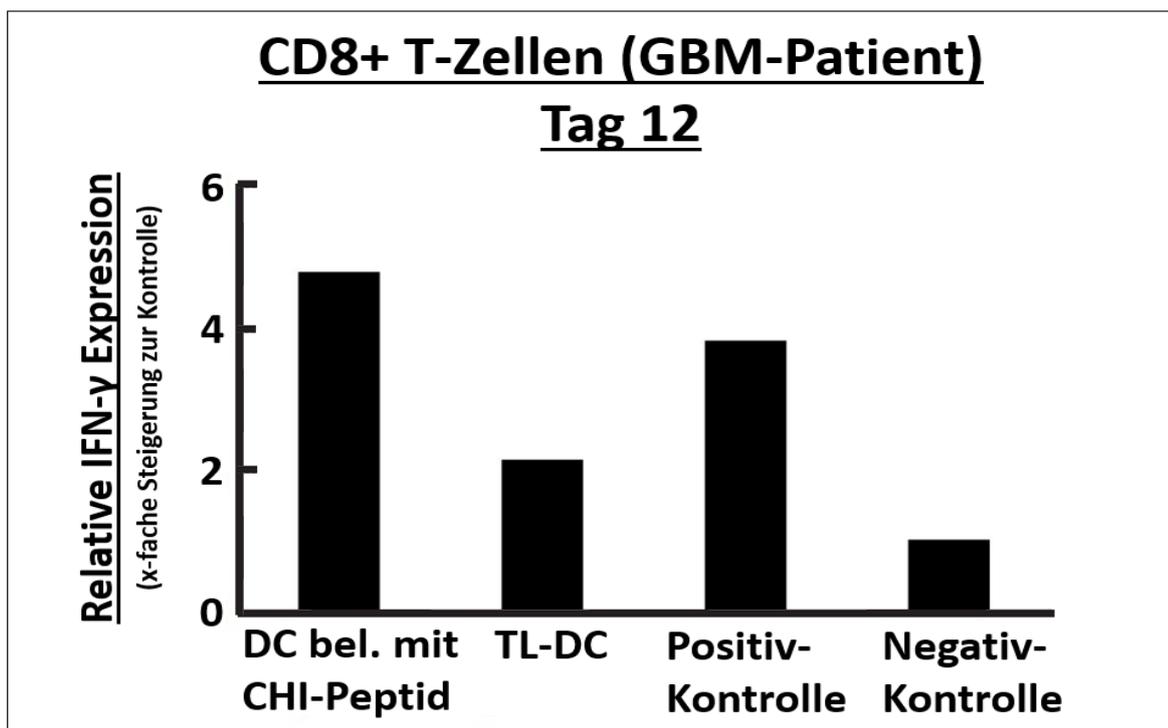


Abbildung 3.6: Immunogenität des CHI-Peptids bei GBM-Patienten unter Standardtherapie
Die Abbildung zeigt die mittels Real-Time-PCR untersuchte IFN- γ -mRNA Expression von CD8-positiven T-Zellen nach 12 Tagen Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen. Die Daten stammen von GBM-Patient 1. In vier Gruppen von links nach rechts: 1.) CD8⁺-T-Zellen + CHI-Peptid beladene dendritische Zellen; 2.) CD8⁺-T-Zellen + Tumorlysat-beladene dendritische Zellen; 3.) Positivkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + DCs und Stimulation mit IFN- γ & LPS; 4.) Negativkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + unbeladene dendritische Zellen. An der Ordinate wird die x-fache relative IFN- γ -mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angezeigt. Das IFN- γ -Signal wurde auf das TBP-Signal (Housekeeping-Gen) normalisiert und dann die relative Expression nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode bestimmt.

Abb. 3.7 zeigt die Ergebnisse eines vergleichbaren Assay-Laufs für das NRCAM-Peptid. Peptid-beladene DCs wurden für 12 Tage mit PBMCs co-kultiviert und anschließend die IFN- γ -Expression der T-Zellen mittels Real-Time-PCR untersucht.

Hier konnte eine ca. 6,3-fache Steigerung der IFN- γ -Expression im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden.

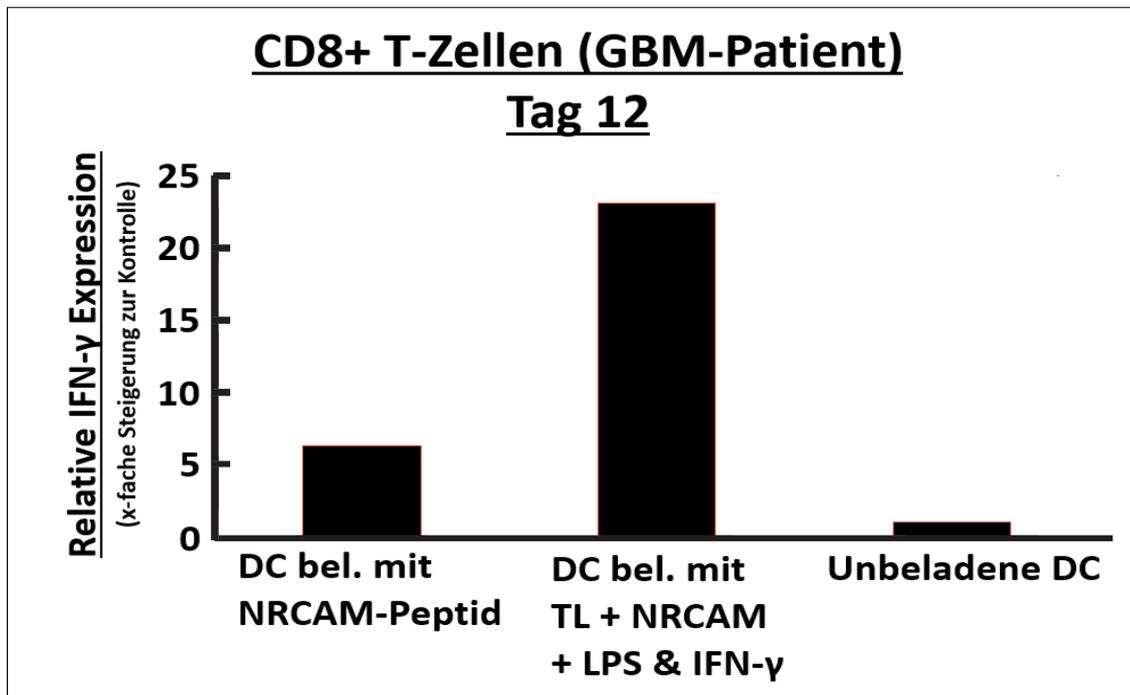


Abbildung 3.7: Immunogenität NRCAM-Peptid bei GBM-Patienten unter Standardtherapie
Die Abbildung zeigt die mittels Real-Time-PCR untersuchte IFN- γ -mRNA-Expression von CD8-positiven T-Zellen nach 12 Tagen Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen. Die Daten stammen von GBM-Patient 2. In drei Gruppen von links nach rechts: 1.) CD8⁺-T-Zellen + NRCAM-Peptid beladene dendritische Zellen; 2.) Positivkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + Tumorlysat und NRCAM beladene dendritische Zellen + IFN- γ & LPS; 3.) Negativkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + unbeladene dendritische Zellen. An der Ordinate wird die x-fache relative IFN- γ -mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angezeigt. Das IFN- γ -Signal wurde auf das TBP-Signal (Housekeeping-Gen) normalisiert und dann die relative Expression nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode bestimmt.

Fasst man die Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchung der Zellen von GBM-Patienten unter Standardtherapie zusammen, so kann man festhalten, dass das immunogene Potenzial dendritischer Zellen, die mit Tumorlysat beladen wurden, wie auch von DCs, die mit einzelnen Peptiden beladen wurden, nachgewiesen werden konnte.

3.3.1.1 Immunogenes Potenzial des Tumorlysates sowie der Tumorpeptide bei gesunden Blutspendern

Wie die Zellen von GBM-Patienten wurden auch die Zellen gesunder Blutspender untersucht und die IFN- γ -Expression nach zwölf Tagen Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen mittels Real-Time-PCR bestimmt.

Im Vergleich zu den CD8-positiven T-Zellen von GBM-Patienten, deren Untersuchungsergebnisse bereits in *Abb. 3.5* gezeigt worden sind, ergab sich ein sehr ähnliches Bild bei der Untersuchung der Zellen von gesunden Spendern (n=4). Auch wenn, wie in *Abb. 3.8* zu sehen ist, die Steigerung der IFN- γ -Expression anhand der gemessenen Absolutwerte weniger deutlich war, zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Expression in den CD8⁺-T-Zellen, die mit Tumorlysats-beladenen DCs co-kultiviert wurden. Relativ zur Negativkontrolle (CD8-pos. Zellen + unbeladene DCs) war diese sogar stärker ausgeprägt als dies bei den GBM-Patienten der Fall war.

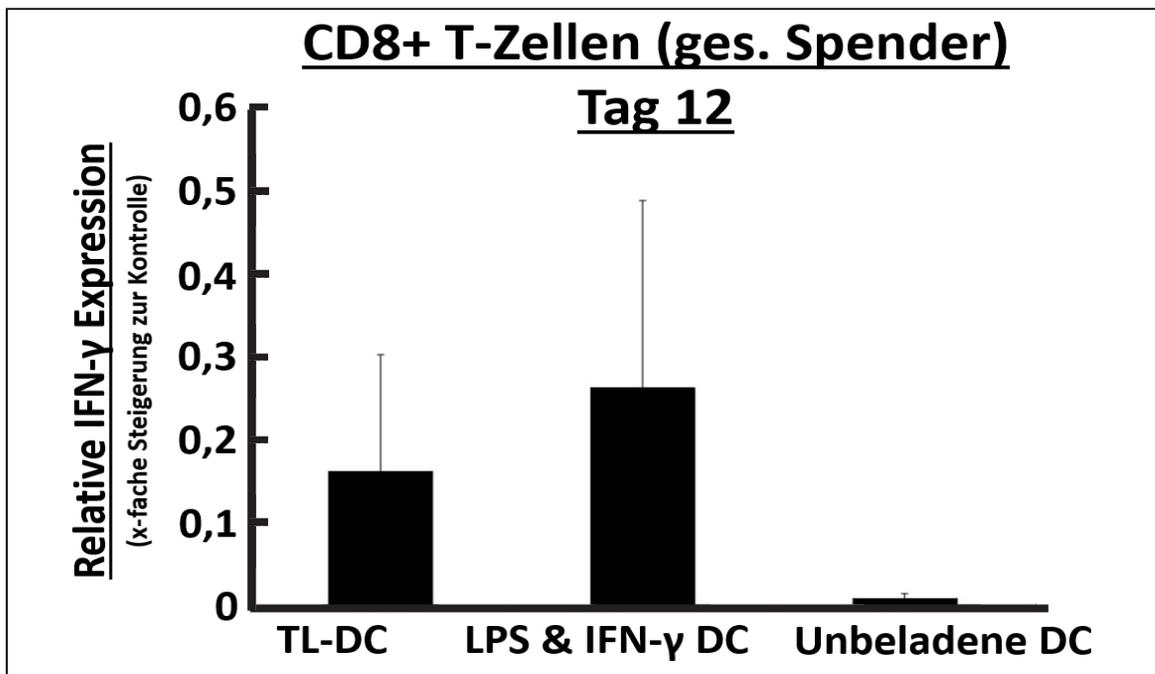


Abbildung 3.8: IFN- γ -Expression der CD8⁺-T-Zellen bei gesunden Blutspendern
Die Abb. zeigt die mittels Real-Time-PCR untersuchte IFN- γ -mRNA-Expression von CD8-positiven T-Zellen nach zwölf Tagen Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen. In 3 Gruppen von links nach rechts: 1.) CD8⁺-T-Zellen + Tumorlysats-beladene dendritische Zellen; 2.) Positivkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + dendritische Zellen und Stimulation mit IFN- γ und LPS; 3.) Negativkontrolle: CD8⁺-T-Zellen + unbeladene dendritische Zellen. An der Ordinate wird die x-fache relative IFN- γ -mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angezeigt. In die Abbildung gingen Daten von n=4 gesunden Blutspendern (CTL 2, 3, 4 und 6) ein. Das IFN- γ -Signal wurde auf das TBP-Signal (Housekeeping-Gen) normalisiert und dann die relative Expression nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode bestimmt.

3.3.1.2 Immunogenes Potenzial des Tumorlysates sowie der Tumorpeptide bei DC-vakzinierten GBM-Patienten

Die CD8⁺-T-Zellen eines GBM-Tumorpatienten, der mit der dendritischen Zellvakzinierung behandelt wurde, wurden mittels Real-Time-PCR auf eine IFN- γ -Expressionssteigerung nach Stimulation untersucht, *siehe Abb. 3.9*.

Hierbei war festzustellen, dass eine deutlich stärkere IFN- γ Expression (>18-fach) im Vergleich zu unstimulierten PBMCs zu erkennen war, als dies bei den Zellen gesunder Spender oder GBM-Patienten unter Standardtherapie der Fall gewesen war. Dies wurde als Zeichen dafür gewertet, dass in den nach bisheriger Standardtherapie behandelten GBM-Patienten keine klinisch bedeutsame Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst wird, wohingegen die DC-Vakzinierung hierzu in der Lage ist.

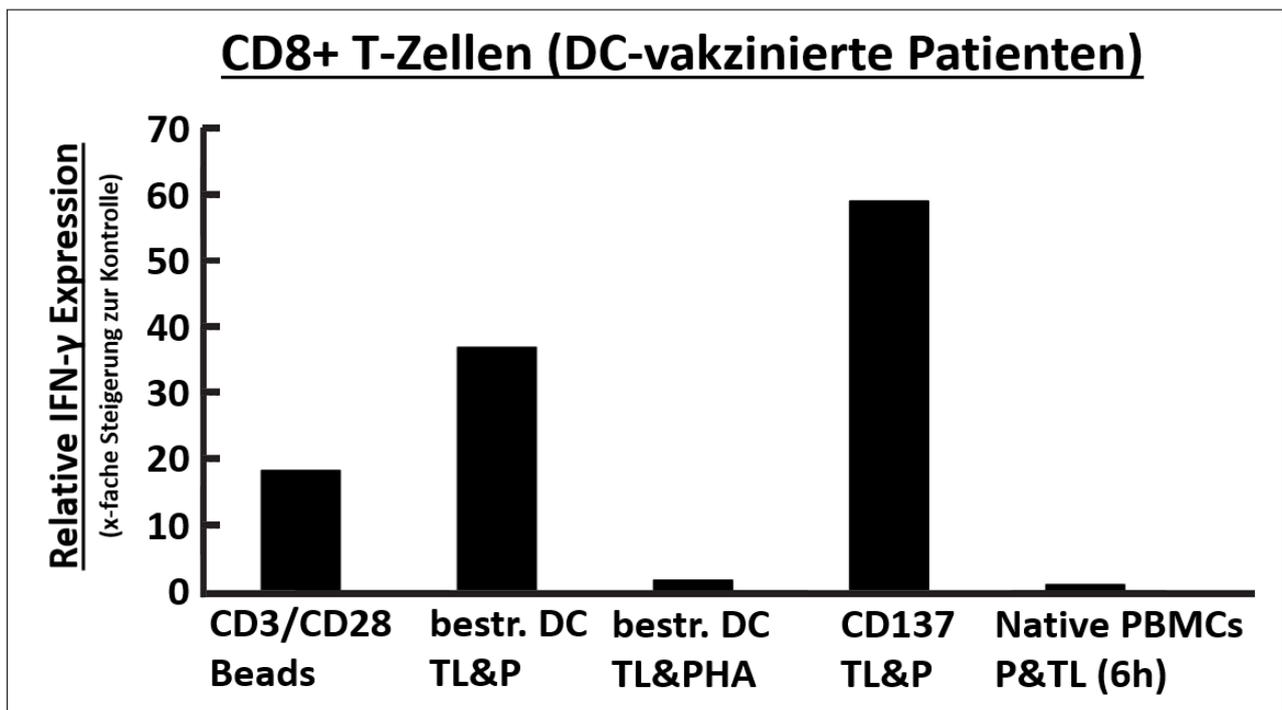


Abbildung 3.9: IFN- γ -Expression CD8⁺-T-Zellen bei GBM-Patienten nach DC-Vakzinierung
Die Abbildung zeigt die mittels Real-Time-PCR untersuchte IFN- γ -mRNA-Expression von PBMCs des DC-vakzinierten GBM-Patienten "Patient WÜ 0238". Die fünf dargestellten PBMC-Gruppen wurden unterschiedlich stimuliert. Von links nach rechts: 1.) PBMCs + Stimulation mit CD3/CD28-Beads; 2.) PBMCs + bestrahlte DCs, die mit Tumorlysate und Tumorpeptiden beladen wurden; 3.) PBMCs + bestrahlte DCs, die mit Tumorlysate beladen wurden + Phytohaemagglutinin (PHA); 4.) ursprünglich PBMCs, aus denen mittels CD137-Beads magnetisch die T-Zellen isoliert wurden. Stimulation der T-Zellen mit Tumorlysate und GBM-Peptiden; 5.) Native PBMCs als Kontrollgruppe. An der Ordinate wird die x-fache relative IFN- γ -mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angezeigt. Das IFN- γ -Signal wurde auf das TBP-Signal (Housekeeping-Gen) normalisiert und dann die relative Expression nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode bestimmt.

3.4 Immunmonitoring mittels Durchflusszytometrie

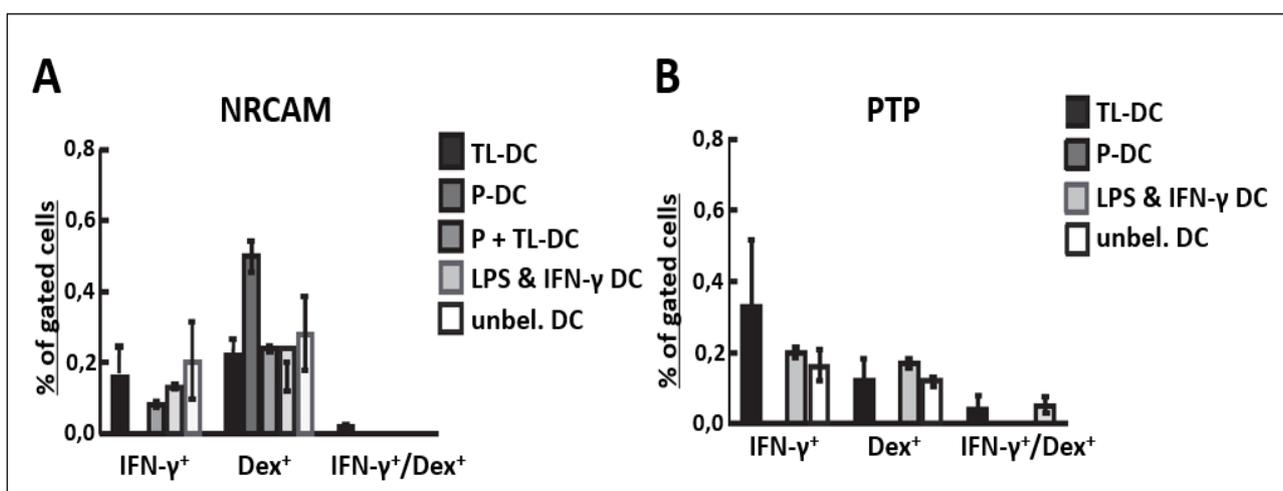
Im Folgenden werden die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Untersuchungsergebnisse der T-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen gezeigt. Neben der Messung der intrazellulären IFN- γ -Expression der T-Zellen wurde auch deren Peptidspezifität mittels Dextramer-Färbung gemessen. Die kombinierte Messung von IFN- γ und des Dextramer-Signals erlaubt eine noch gezieltere Untersuchung der Immunogenität der einzelnen Peptide/Proteine. Es wurden Zellen von GBM-Patienten unter Standardtherapie und eines DC-vakzinierten GBM-Patienten untersucht.

3.4.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen der CD8⁺-T-Zellen von GBM-Patienten unter Standardtherapie

Die Funktion der in dieser Arbeit untersuchten CD8⁺-T-Zellen wurde nicht nur auf IFN- γ als unspezifischem Marker für eine Immun-Aktivierung, sondern des Weiteren auch gezielt auf Peptidspezifität untersucht, um so die Fragestellung zu beantworten, gegen welche Tumorproteine sich diese Immun-Aktivierung richtet.

Durch die Kombination der beiden Parameter IFN- γ und Peptidspezifität, die mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurden, war es möglich, die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen sowohl durch Tumorlysat-beladene als auch durch Peptid-beladene dendritische Zellen zu zeigen, *siehe Abb. 3.10*.

Zudem konnte die Immunogenität der einzelnen Peptide beurteilt werden, die im Rahmen des Projektes mit den angewandten Assays untersucht wurden.



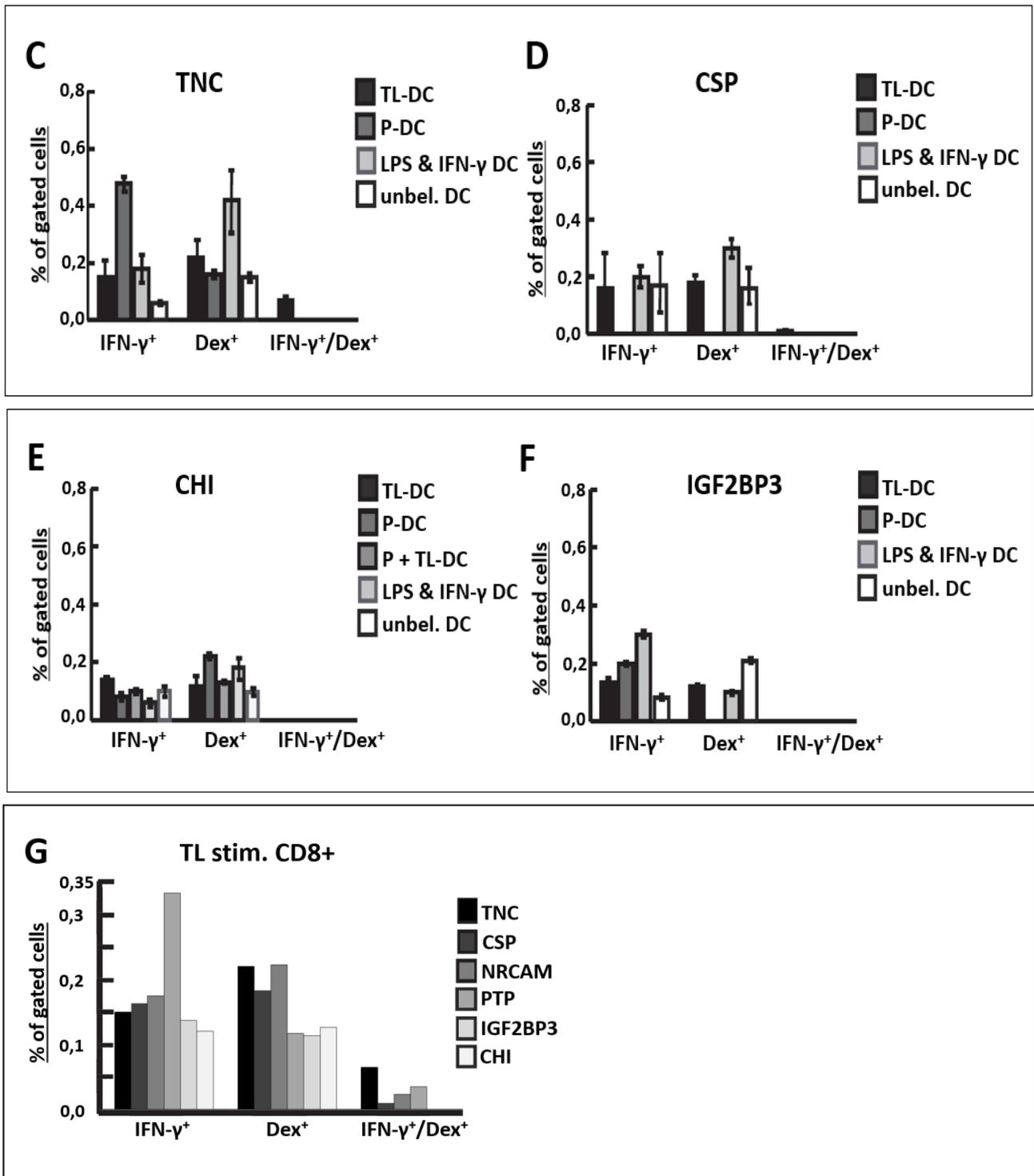


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Messung der IFN- γ - und Dextramer-Signale stimulierter CD8⁺-T-Zellen

Untersucht wurden CD8⁺-T-Zellen, die je nach Test-Gruppe mit Tumorlysate-beladenen, Peptid-beladenen, Tumorlysate- und Peptid-beladenen, unbeladenen (Negativ-Kontrolle) oder mit LPS/IFN- γ -stimulierten (Positiv-Kontrolle) dendritischen Zellen für zwölf Tage co-kultiviert worden sind. Anschließend wurden die Zellen den Färbeprotokollen entsprechend behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. In die Grafiken flossen Daten von $n > 3$ Patienten ein (Patienten 1, 2, 4, 6 und 7).

Erläuterung der Darstellungen A bis G in *Abb. 3.10*:

Abbildung A zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid NRCAM. Dargestellt ist sowohl die IFN- γ -Expression der verschiedenen Testgruppen als auch der relative Anteil an dextramer-positiven Zellen. Dies sind Zellen, die Rezeptoren besitzen, welche das NRCAM-Peptid erkennen und daher an den Dextramer-Antikörper binden. Abb. A zeigt nun, dass im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe in der Gruppe, in der PBMCs mit Peptid-beladenen DCs co-kultiviert wurden, wesentlich mehr peptidspezifische Zellen nachweisbar sind.

Abbildung B zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid PTP. Hier konnte für die Tumorlysat-beladenen DCs gezeigt werden, dass sie eine deutliche IFN- γ -Antwort in den CD8⁺-T-Zellen erzeugen. Die Anzahl dextramer-positiver Zellen unterscheidet sich nicht im Vergleich zur Negativkontrolle. Für die Peptid-beladenen DCs konnte weder ein IFN- γ - noch ein Dextramer-Signal gemessen werden.

Abbildung C zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid TNC. Sowohl PBMCs, die mit TL-beladenen DCs stimuliert wurden, wie auch diejenigen, die mit Peptid-beladenen DCs stimuliert wurden, zeigen im Vergleich zur Negativ-Kontroll-Gruppe eine erhöhte IFN- γ -Expression. Diese fällt bei der mit TNC-Peptid beladenen Gruppe besonders hoch aus. Auch für das TNC-Peptid konnten CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden, die gleichzeitig dextramer-positiv, d. h. peptidspezifisch sind und IFN- γ exprimieren.

Abbildung D zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid CSPG4. Hier konnten zwar keine IFN- γ exprimierenden oder dextramer-positiven CD8⁺-T-Zellen für die Zellen nachgewiesen werden, die mit Peptid-beladenen DCs co-kultiviert worden sind, aber in der Gruppe mit Tumorlysat-beladenen DCs wurde beides gezeigt. Darüber hinaus waren auch hier im Vergleich zur Negativkontrollgruppe, wo dies nicht nachgewiesen werden konnte, einige Zellen sowohl dextramer- als auch IFN- γ -positiv.

Abbildung E zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid CHI. Hier konnten CD8⁺-T-Zellen, die dextramer-positiv sind, sowohl in der mit Tumorlysat-beladenen DCs als auch in der mit Peptid-beladenen DCs co-kultivierten Gruppe nachgewiesen werden. Ebenso verhielt es sich in der Gruppe, die sowohl mit Tumorlysat als auch mit Peptiden stimuliert wurde. Besonders ausgeprägt war das Dextramer-Signal jedoch vor allem bei den mit CHI-Peptid beladenen DCs stimulierten Zellen.

Auch ein IFN- γ -Signal konnte in allen Gruppen nachgewiesen werden, signifikant stärker als in der Negativkontrolle jedoch nur bei der Gruppe CD8-positiver T-Zellen, die mit Tumorlysat-beladenen DCs co-kultiviert worden waren.

Abbildung F zeigt die Untersuchungsergebnisse für das Peptid IGF2BP3. Hier konnten dextramer-positive CD8⁺-T-Zellen in der Gruppe, die mit Tumorlysat-beladenen DCs co-kultiviert wurde, nachgewiesen werden, wohingegen dies in der Peptid-beladenen DC-Gruppe nicht möglich war. Allerdings wurde für beide Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutlich gesteigerte IFN- γ -Expression gezeigt.

Abbildung G fasst zusammen, dass die Co-Kultivierung von PBMCs mit dendritischen Zellen, die mit Tumorlysat beladen sind, CD8⁺-T-Zellen erzeugt, die nicht nur IFN- γ exprimieren, sondern auch dextramer-positiv sind und damit tumorspezifische Peptide erkennen.

3.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen der CD8⁺-T-Zellen von GBM-Patienten nach DC-Vakzinierung

Ebenso wie die Zellen von GBM-Patienten unter Standard-Therapie wurden auch CD8⁺-T-Zellen eines DC-vakzinierten Patienten untersucht.

Die Ergebnisse von „Patient 0238“ sind hierbei exemplarisch in *Abb. 3.11* zusammengefasst. Es konnte im Vergleich zu GBM-Patienten unter Standard-Therapie ein mehr als 10-facher Anstieg des Dextramer-Signals von ca. 0,4%, siehe *Abb. 3.10 G*, auf ca. 4%, siehe *Abb. 3.11*, verzeichnet werden, was eine hohe Anzahl peptidspezifischer T-Zellen bedeutet.

Es konnte ferner ein starker Anstieg des IFN- γ Signals gezeigt werden, was auch in der Real-Time-PCR bestätigt wurde, *siehe Abb. 3.9*. Es wurden CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen, die sowohl IFN- γ - als auch dextramer-positiv waren.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse deutlich die Immunogenität der untersuchten GBM-Peptide. Des Weiteren lässt sich schlussfolgern, dass GBM-Patienten unter Standard-Therapie keine spontane immunologische Reaktion zeigen, während eine DC-Vakzinierung eine spezifische zelluläre Tumorreaktivität induzieren kann.

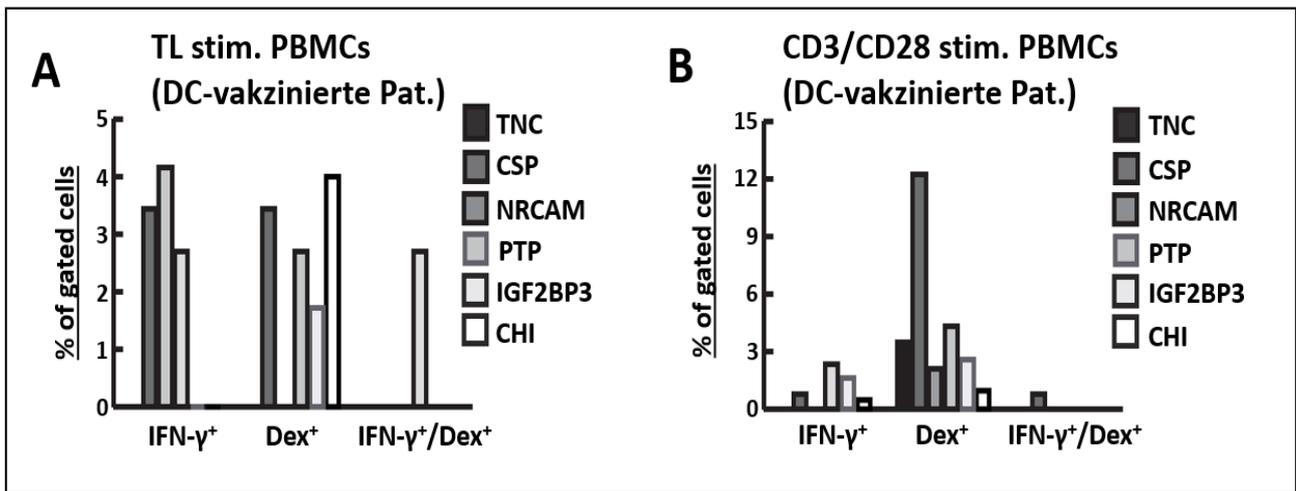


Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Messung der IFN- γ - und Dextramer-Signale von stimulierten PBMCs eines DC-vakzierten GBM-Patienten

Die PBMCs des DC-vakzierten „GBM-Patienten 0238“ wurden nach dreimaliger DC-Vakziniierung des Patienten und mehrfacher Tumor-Lysat-Booster-Impfung mehr als 12 Monate nach DC-Impfung ex-vivo entweder mit bestrahlten DCs (30 Gy), siehe Abb. A, oder mit CD3/CD28-Beads, siehe Abb. B, für 12 Tage stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre IFN- γ -Expression und Peptidspezifität (Dextramer-Signal) untersucht. Es zeigte sich ein mehr als 10-facher Anstieg des Dextramer-Signals (CSPG4 in Abb.B:) sowie ein mehr als 4-facher Anstieg des IFN- γ -Signals.

4. Diskussion

4.1 GBM-Tumorpeptide

Obwohl bei der dendritischen Zellvakzinierung die Frage nach immunogenen Antigenen mit der steigenden Anzahl an Studien und in Behandlung befindlichen Patienten an Wichtigkeit weiter zunimmt, konnte die optimale Zusammensetzung einer DC-Immuntherapie bisher noch nicht abschließend geklärt werden (Choi et al. 2009, Sampson et al. 2010 und Sensi et al. 2006). Die Spannbreite ist dabei weit und reicht von der Verabreichung des gesamten Tumorlysates (Yu et al. 2004) über einzelne Peptide (Linda et al. 2005, Heimberger et al. 2002 und Yu et al. 2001) bis hin zur Tumor-RNA (Caruso et al. 2004), wobei jeder dieser Ansätze in der frühen Phase klinischer Studien für die Patienten einen Vorteil erbracht hat. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, einen Monitoring-Test zu etablieren, um diese Vielfältigkeit hinsichtlich der Immunantwort messen zu können und gleichzeitig neue Erkenntnisse über die Schlüssel-Peptide einer Immunantwort gegen GBM-Tumore zu gewinnen.

Dafür wurden Peptide eingesetzt, die mit GBM-Tumoren assoziiert sind und deren immunogene Bedeutung als Antigene nach Präsentation durch dendritische Zellen beurteilt. Die Auswahl der Peptide beruhte auf den Daten von Dutoit et al. 2012, der wichtigsten Publikation, auf denen die vorliegende Arbeit aufbaut. Die darin beschriebene hohe Immunogenität und die wichtige Rolle der Peptide während der Tumor-Entstehung (NLGN4X, NRCAM, PTP), der Tumor-Motilität (FABP7), der Zell-Proliferation (TNC), der Tumor-Invasion (NLGN4X, NRCAM) oder Angiogenese (CSPG4, TNC) und nicht zuletzt ihrer Assoziation mit einer reduzierten Lebenserwartung des Patienten im Falle der Expression in den Tumorzellen (FABP7, IGF2BP3, NRCAM) begründete die Entscheidung, diese Peptide näher zu analysieren.

4.1.1 Expressions-Muster der GBM-Tumorpeptide

Obwohl inzwischen eine Vielzahl an Anti-Tumor-Medikamenten verfügbar ist, bleibt es bisher doch eine schwierige Entscheidung, welches davon bei einem spezifischen Patienten zur Anwendung kommen soll. Denn ein Problem der zielgerichteten Therapie stellt die sehr stark ausgeprägte Heterogenität der Peptidexpression in GBM-Tumoren dar (Wu et al. 2014). Die Tumorzellen sind neben anderen Evasionsmechanismen dazu in der Lage, schnell zu mutieren und ihre Gen-Expressionsmuster zu ändern. Diese Veränderungen der Proteinbildung können bedeutsame

Auswirkungen auf Diagnose, Prognose und therapeutischen Verlauf der Erkrankung nehmen, insbesondere, wenn sie damit Antigen-Strukturen einer zu spezifischen Therapie maskieren oder ganz verlieren (Razavi et al 2016).

Die Heterogenität der Peptidexpression in GBM-Tumoren bestätigte sich auch in den Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Doch obwohl patienten-individuell sehr unterschiedliche Expressionsmuster vorlagen, konnten sieben der neun Peptide in Form ihrer mRNA in über 80 Prozent der Tumoren mittels PCR nachgewiesen werden. Dies entspricht zwar nicht einem direkten Nachweis, doch mit der Bildung der mRNA und folglich der entsprechenden Proteine konnte die Voraussetzung gezeigt werden, dass entsprechende Peptide prozessiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden können.

Eine Einschränkung des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Assays liegt darin, dass lediglich Antigene, die bereits als solche identifiziert wurden, untersucht werden können, da die PCR-Untersuchung die Kenntnis bzw. die Herstellung spezifischer Primer verlangt. Die Voraussetzung dafür, neue Peptide, die als Antigene in Frage kommen, zu identifizieren, wäre die Anwendung eines anderen Verfahrens wie beispielsweise der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, wie sie Dutoit et al. 2012 in seiner Arbeit verwendet hat. Für einen Assay, der auch in der klinischen Routine Anwendung finden soll, ist es jedoch praktikabler, Patienten auf bereits bekannte Antigene zu untersuchen, deren Bedeutung im Zusammenhang mit der dendritischen Zellvakzinierung soweit bekannt sind, dass nach der Analyse direkt die patienten-individuelle Immunreaktion beurteilt werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen solchen in der Routine anwendbaren Monitoring-Assay zu etablieren, so dass vor allem hierauf Wert gelegt wurde. In diesem Zusammenhang ist eine der wichtigsten Leistungen des Assays zu sehen, ausführliche Informationen über die Immunogenität der einzelnen Peptide zu liefern, indem der in-vitro-Effekt der DC-Stimulation von PBMCs bzw. CD8-positiver T-Zellen untersucht wird.

Zur Verbesserung der DC-Vakzinierungsstrategie ist es von großem Interesse, die Immunantwort eines GBM-Patienten bei simultaner Durchführung von DC-Vakzinierung und des in-vitro-Monitorings mehrerer Tumorantigene zu evaluieren.

Letztendlich könnte dies dazu führen, die zunächst als Nachteil erscheinende Heterogenität der GBM-Tumoren in einen Vorteil für eine personalisiertere Behandlungsplanung und -durchführung umzukehren.

4.1.2 Semi-quantitativer Vergleich der GBM-Peptid-Expression

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, konnten überexprimierte Peptide für einzelne Tumorproben bzw. für einzelne Patienten auf mRNA-Level eindeutig nachgewiesen werden. Dies ist von besonderem Interesse, da in krankem Gewebe überexprimierte Peptide, die in gesundem Gewebe nicht oder nur kaum vorkommen, eine ideale Antigenstruktur für T-Zellen darstellen. Die einzige kritisch zu sehende Einschränkung für einen routinemäßigen Einsatz zum Monitoring in Therapie befindlicher Patienten stellt dabei der hohe Bedarf an mRNA und damit der Ausgangsmenge an Tumorlysat dar, um die entsprechenden Untersuchungen durchführen zu können. Die ist bedingt durch das geringe Volumen an cDNA, das bei der RNA-Isolation gewonnen wird, und dem nötigen Vorschritt bei dem die Bandenstärken im Agarosegel mittels Verdünnungsreihe aneinander angeglichen werden.

Wählt man jedoch die erfolgversprechendsten GBM-Tumorpeptide zum Monitoring aus, also diejenigen, die möglichst häufig im Tumorgewebe exprimiert und auch überexprimiert werden (BCA, CHI, FABP7, IGF2BP3, NRCAM und PTP), sollte es möglich sein, für jeden Patienten alle relevanten Daten zu erfassen.

4.1.3 Mögliche Optimierungen der PCR-Analyse der Tumorgewebeproben

- Photometrische Messung des RNA-Gehalts:

Nach der Isolation von RNA aus Tumorgewebeproben wurde mittels dreifacher photometrischer Messung die RNA-Konzentration bestimmt. Da sich im Laufe der Arbeiten mit dem Assay herausgestellt hat, dass auch sehr geringe Mengen an RNA für die folgende cDNA-Synthese ausreichen, kann statt der dreifachen auch eine einfache Messung durchgeführt werden. So betrug die geringste verwendete Menge 0,5 µg statt der im Protokoll angegebenen 2 µg. Auf diese Weise kann der korrekte Ablauf der RNA-Isolation noch sicher dokumentiert werden, und gleichzeitig wird Probenmaterial für spätere Analysezwecke eingespart.

- Alternative Verwendung der Real-Time-PCR bei der GBM-Peptid-Analyse:

Eine weitere Möglichkeit, das begrenzte Tumorprobenmaterial auf die Expression einer größeren Anzahl von GBM-Proteinen zu untersuchen, stellt die Real-Time-PCR dar. Diese könnte im Assay die reguläre PCR-Reaktion mit anschließender Gel-Elektrophorese ersetzen. Da die zu

untersuchende cDNA bei der Analyse mittels Real-Time-PCR im Verhältnis 1:5 verdünnt wird, könnten somit fünfmal so viele Untersuchungsdurchläufe durchgeführt werden. Der nötige zeitliche Aufwand der regulären PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese entspricht in etwa jenem der Real-Time-PCR. Auch der Vergleich der GBM-Protein-Expression der untersuchten Tumorgewebe mit gesundem Gewebe wäre mittels Real-Time-PCR möglich. Hierzu würden an die Stelle von gelelektrophoretisch gewonnen Bildern quantifizierbare CT-Werte treten. Größter Nachteil stellen jedoch die höheren Kosten der RT-PCR im Vergleich zur Standard-PCR dar, so dass man abwägen muss, welches Verfahren bei welcher Indikation zum Einsatz kommen soll.

4.2 Zellreifung und Kultivierung

In der vorliegenden Arbeit sollten Schlüssel-Peptide der Glioblastom-Tumoren nicht nur identifiziert, sondern auch deren Immunogenität beurteilt werden. Die Grundlage hierzu stellten die über insgesamt 21 Tage andauernden Prozesse der Zellreifung und Kultivierung, d. h. DC-Generierung aus Monozyten und anschließende Co-Kultivierung mit PBMCs bzw. CD8⁺-T-Zellen, dar. Während dieser Zeit wurden nicht nur Proben der Zellen entnommen und mittels Durchflusszytometrie bzw. Real-Time-PCR untersucht, um Basiswerte festzulegen, mit denen später die Zellen nach der Stimulation verglichen werden konnten, sondern auch der Zellreifungsprozess an sich genau beurteilt. Dies ist von Bedeutung, da nur reife dendritische Zellen zytotoxische T-Zellen effektiv aktivieren (Reis 2004). Durch das Monitoring der Reifung der dendritischen Zellen kann bei der abschließenden Analyse der T-Zellen eine differenzierte Aussage über die Fähigkeit der getesteten Antigene, eine Immunreaktion auszulösen, gemacht werden. Bei einer nicht erfolgten Stimulation bzw. Aktivierung der T-Zellen wäre ohne vorherige Untersuchung der DCs nicht klar, ob das verwendete Antigen keine oder nur eine sehr geringe Immunogenität besitzt, oder ob möglicherweise die dendritischen Zellen wegen mangelnder Reifung oder Aktivierung nicht dazu in der Lage gewesen sind, die T-Zellen unabhängig vom genutzten Antigen adäquat zu aktivieren. Daher ist die Kontrolle der Zellreifung ein entscheidender Zwischenschritt für die Gesamtanalyse der Immunantwort im Rahmen der DC-Vakzinierung. Wie auch die abschließende durchflusszytometrische Untersuchung an Tag 21 erlauben diese Kontrolluntersuchungen eine hohe Variabilität, indem man leicht weitere Oberflächenmarker zusätzlich untersuchen kann.

Gemeinsam mit den regelmäßigen lichtmikroskopischen Kontrollen, ob sich beispielsweise Sphären

stimulierter T-Zellen gebildet haben, hat sich diese Methodik als äußerst praktikabel erwiesen, um den Verlauf der in-vitro-Immunantwort nachzuvollziehen. Unter anderem deshalb, weil nur kleine Volumina notwendig sind, um diese Kontrolluntersuchungen durchzuführen, und somit nur wenig Probenmaterial für die abschließende Untersuchung am Ende der Co-Kultivierung der DCs und PBMCs verloren geht. Ferner ist es nützlich, jederzeit andere oder zusätzliche Reifungsmarker untersuchen zu können, beispielsweise wenn die Untersuchung weiterer T-Zell-Subpopulationen von Interesse wäre, da diese einen Einfluss auf das immunologische Geschehen nehmen können (Fecci et al. 2006). Und nicht zuletzt ist die Methodik bereits für die abschließende Co-Kultivierung etabliert und wird somit regelmäßig genutzt.

Des Weiteren wurde auch die Zellzahl, der in Kultur befindlichen Zellen regelmäßig kontrolliert und besonders nach wichtigen Schritten im Protokoll überprüft bzw. die optimale Zellzahl pro ml Medium für die weitere Kultivierung eingestellt. Durch diese Möglichkeit der raschen Kontrolle lassen sich die Kultivierungsprotokolle einfach den jeweiligen Bedürfnissen anpassen. So wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit beispielsweise bei der Isolation von Monozyten aus GBM-Patienten-Blut die Erfahrung gemacht, dass bei der Verwendung von EDTA-Blutröhrchen eine wesentlich größere Zellausbeute verzeichnet werden konnte als bei der Nutzung von Citrat-Blutröhrchen. Folglich wurden EDTA-Blutröhrchen eingesetzt.

4.3 Immunmonitoring mittels Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR diente als wichtiger Bestandteil des im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten Assays zum Immun-Monitoring dazu, die IFN- γ -Expression auf mRNA-Level zu beurteilen und letztendlich auch die so gewonnenen Ergebnisse auf Übereinstimmung mit der Durchflusszytometrie zu überprüfen. Sie ist hierzu ein verlässliches und auch in anderen Publikationen zu findendes bewährtes Verfahren (Wheeler et al. 2008, Kammula et al. 1999 und Kammula et al. 2000).

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass mit Tumorlysat beladene dendritische Zellen dazu in der Lage sind, eine IFN- γ -Expression in CD8-positiven T-Zellen zu induzieren. Hier wurde eine mehr als 4,4-fache Steigerung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle verzeichnet.

Eine solche Steigerung konnte jedoch nicht nur für die Tumorlysat-beladenen DCs nachgewiesen werden, sondern auch für mit einzelnen GBM-Peptiden beladene dendritische Zellen. Insgesamt sprechen die Daten klar dafür, dass sowohl mit Tumorlysat als auch mit Peptid beladene DCs die

IFN- γ -Expression in CD8⁺-T-Zellen steigern. Sie belegen somit auch das immunogene Potenzial einzelner Peptide. Nichtsdestotrotz bleibt die Steigerung der IFN- γ -Expression hinter derjenigen von DC-vakzinierten Patienten zurück. Dies wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass in GBM-Patienten unter Standardtherapie keine klinisch relevante Immunreaktion gegen den Tumor stattfindet bzw. ausgelöst wird.

4.3.1 Bedeutung der Real-Time-PCR innerhalb des vorgestellten Assays

Obwohl auch die Durchflusszytometrie dazu in der Lage ist, die IFN- γ -Expression und deren Steigerung in CD8-positiven T-Zellen durch beladene DCs zu messen, und dies auch fester Bestandteil des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Assays ist, bietet die Nutzung der Real-Time-PCR den enormen Vorteil einer wesentlich größeren Sensitivität.

Die durchflusszytometrisch gemessenen Signale für IFN- γ waren oft sehr gering, so dass die Bestätigung der IFN- γ -Messung mittels einer weiteren Methode sich als durchaus sinnvoll erwiesen hat. Beide Methoden ergänzen sich und machen insgesamt die mit dem Assay gewonnen Daten zuverlässiger.

4.4 Immunmonitoring mittels Durchflusszytometrie

4.4.1 Immunogenität der GBM-Tumorpeptide

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es mit dem verwendeten Monitoring-Assay möglich ist, die Aktivierung CD8-positiver T-Zellen über ihre IFN- γ -Expression bzw. deren Steigerung und über ihre Peptidspezifität bzw. die Steigerung des Dextramer-Signals durch dendritische Zellen nachzuweisen. Dies war sowohl bei DCs, die mit dem kompletten Tumorlysate, als auch bei denjenigen, die mit einzelnen GBM-Tumorpeptiden beladen worden waren, der Fall. Mittels Durchflusszytometrie ist es darüber hinaus gelungen, die Immunantwort der CD8⁺-T-Zellen genauer auf unterschiedliche Stimuli zu analysieren und somit eine Grundlage zu schaffen, um die Immunogenität der untersuchten Peptide zu beurteilen.

Fasst man die Erkenntnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zusammen, so lässt sich

feststellen, dass antigen-stimulierte CD8⁺-T-Zellen, sei es durch Tumorlysate-beladene oder Peptid-beladene DCs, für jedes der untersuchten sechs Peptide einen Anstieg an funktionalen peptidspezifischen T-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe (Stimulation der T-Zellen mittels unbeladenen DCs) aufweisen. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der IFN- γ -Expression und/oder der Stärke des Dextramersignals (Peptidspezifität) festgestellt werden, wenn man die T-Zellen mit den untersuchten sechs Peptiden oder Tumorlysate stimuliert hat.

Die Beobachtungen, welche an Zellen von GBM-Patienten unter Standardtherapie gemacht wurden, decken sich mit den Untersuchungen von Zellen gesunder Spender.

Sowohl NRCAM, das in 94 Prozent der untersuchten Tumorproben vorkam, als auch PTP, das im Vergleich zu gesundem Gewebe in 100 Prozent der darauf untersuchten Tumorproben überexprimiert war, weisen in der durchflusszytometrischen Untersuchung in der Gruppe PBMCs, die mit TL-beladenen DCs stimuliert wurde, eine Hochregulation der peptidspezifischen, d. h. dextramer-positiven, oder IFN- γ -exprimierenden Zellen auf.

Außerdem wurden für beide Peptide Zellen nachgewiesen, die sowohl dextramer-positiv als auch IFN- γ -positiv waren.

Des Weiteren kann man zusammenfassend zu den Abb. 3.10 A-G sagen, dass GBM-Patienten, in deren Tumoren die untersuchten Peptide nachgewiesen werden konnten, auch eine durch diese Peptide induzierte T-Zell-Aktivierung gezeigt haben, und zwar entweder durch eine verstärkte IFN- γ -Expression, durch ein verstärktes Dextramer-Signal oder durch beides.

Besonders Abb. 3.10 G zeigt übersichtlich, dass TL-beladene DCs nach Co-Kultivierung mit PBMCs CD8⁺-T-Zellen erzeugen, die in der Durchflusszytometrie entweder IFN- γ -positiv als Zeichen ihrer Aktivierung und/oder dextramer-positiv als Ausdruck ihrer Peptidspezifität sind. Dies betont das immunogene Potenzial der Peptide und verdeutlicht ihre Bedeutung als Antigene bei der DC-Vakzinierung, um eine gezieltere Stimulation des Immunsystems von GBM-Patienten zu erreichen.

Auch in der Durchflusszytometrie zeigte sich die schon bei der Real-Time-PCR-Untersuchung aufgefallene Tatsache, dass sowohl in den CD8-positiven Zellen gesunder Blutspender als auch in den Zellen, die von GBM-Tumorpatienten stammten, eine Immunreaktion ausgelöst werden konnte. Diese war jedoch in den Proben bereits DC-vakzinierter Patienten mit einer im Vergleich zu Patienten unter Standardtherapie bis zu 10-fachen Steigerung des Dextramer-Signals wesentlich ausgeprägter. Dies führte somit – analog zur Real-Time-PCR – auch in der Durchflusszytometrie zu

dem Schluss, dass in unter Standardtherapie befindlichen GBM-Patienten keine klinisch relevante Immunantwort gegen den Tumor abläuft.

4.4.2 Optimierung der Durchflusszytometrie

Ein Problem, das auch bereits aus anderen Publikationen bekannt ist und sich daher auch während den Arbeiten mit diesem Assay gezeigt hatte, war das in der Durchflusszytometrie gemessene oft sehr gering ausgeprägte Signal für IFN- γ - und dextramer-positive (= peptidspezifische) Zellen. Dies ist ein generelles Problem der Dextramer-Färbung, bei deren Anwendung in der Literatur regelmäßig sehr kleine Messwerte auftauchen (Dolton et al. 2015). Daher wurden im Laufe der Arbeiten mit dem Assay kleinere Korrekturen am Kultivierungs- und Färbe-Protokoll der Zellen vorgenommen, um die Signalstärke zu optimieren. So wurde beispielsweise die Zugabe des Proteinkinase-Inhibitors Dasatinib zwei Stunden vor der durchflusszytometrischen Messung eingeführt, um die Internalisierung von T-Zellrezeptoren zu minimieren und somit die Rezeptorzahl an der Zelloberfläche während der Messung zu erhöhen (Lissina et al. 2009). Dies führt im Rahmen der Dextramer-Färbung, wo spezifische T-Zell-Rezeptoren fluoreszenzmarkiert werden, zu einer Steigerung des messbaren Signals.

In Zusammenhang damit steht auch die begrenzte Anzahl an Zellen, die untersucht werden konnten. Diese ist limitiert durch die Menge des Ausgangsmaterials, das man durch die Blutentnahme bei GBM-Patienten zur Monozyten-Isolation und PBMC-Gewinnung gewinnt. Den Patienten wurden hierzu 160-200 ml Blut entnommen. Dabei musste stets der Allgemeinzustand des Patienten und die Belastung für den schon von der Tumorerkrankung und der Vortherapie beanspruchten Organismus berücksichtigt werden. Die Entnahme eines größeren Blutvolumens schien in diesem Zusammenhang als nicht angebracht.

4.4.3 Ergebnisse DC-vakzinierter GBM-Patienten

Wie schon mit Hilfe der Real-Time-PCR im Rahmen des Assays festgestellt wurde, ist der Anstieg der IFN- γ -Expression und der Anzahl an peptidspezifischen Zellen in DC-vakzinieren GBM-Patienten deutlich stärker ausgeprägt als bei Patienten unter Standardtherapie oder bei gesunden Blutspendern. Dies führt zu der Annahme, dass erst durch die DC-Vakzinierung eine relevante

Immunantwort gegen den Tumor stattfindet.

Für zukünftige Projekte wäre es jedoch wünschenswert, eine noch größere Zahl an untersuchten Proben einfließen zu lassen. Allerdings ist dies immer in Relation dazu zu setzen, dass Zellproben, die für Analysezwecke verwendet werden, gleichzeitig bei der therapeutischen Anwendung am Patienten fehlen. Dies ist besonders deswegen von Bedeutung, da in den verwendeten Impfschemata der DC-Vakzinierung die Patienten üblicherweise Booster-Impfungen in regelmäßigen Abständen erhalten, und zwar so lange, wie das initial bei Therapiestart gewonnene Material an DCs und Tumorgewebe noch in ausreichender Menge zur Verfügung steht (Van Gool 2015).

Dennoch konnte nach der Etablierung des Monitoring-Assays an gesunden Blutspendern und an mit Standard-Therapie behandelten GBM-Patienten durch die exemplarische Untersuchung der Zellen eines GBM-Patienten gezeigt werden, dass der Assay auch für das Immunmonitoring von DC-vakzinieren GBM-Patienten geeignet ist. Zusammen mit der durchgeführten Bewertung der ausgewählten GBM-Proteine in ihrer Bedeutung als Antigene im Rahmen der DC-Therapie konnten somit die beiden Hauptziele der vorliegenden Arbeit erreicht werden.

4.4.4 Bedeutung der kombinierten Multimer- und IFN- γ -Färbung im vorgestellten Assay und deren Erweiterbarkeit

Auch wenn sowohl die Dextramer-Färbung als auch das ELISPOT-Verfahren routinemäßig zur Messung der Immunantwort peptidspezifischer T-Zellen genutzt werden, kombiniert keines der beiden Einzelverfahren die Peptidspezifität mit der Zytotoxizität bzw. der Aktivierung von T-Zellen. Studien zum T-Zelltransfer belegen jedoch die entscheidende Bedeutung von IFN- γ im Zusammenhang mit der Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen (Blankenstein 2005). Darum wurde auch in dem genutzten Assay die IFN- γ -Expression als Marker für die Zytotoxizität CD8-positiver T-Zellen verwendet und mit der Dextramer-Färbung kombiniert, um peptidspezifische und gleichzeitig funktionale T-Zellen nachweisen zu können.

Auch wenn die Real-Time-PCR eine wesentlich größere Sensitivität liefert, ist es mit dieser Methode nicht möglich, doppelt-positive Zellen nachzuweisen. Ein Vorteil liegt aber in ihrer großen Flexibilität und Erweiterbarkeit der Bestimmung von Oberflächen- sowie auch intrazellulären Molekülen, indem weitere Antikörper im Rahmen des Färbe-Protokolls zum Einsatz kommen. So ist es beispielsweise jederzeit möglich, auch andere Peptide als mögliche Antigen-Ziele für eine T-Zell-Immunantwort gegen Tumore zu untersuchen, indem andere Dextramer-Moleküle verwendet

werden. Zudem können im Verlauf einer Zellkultivierung andere Reifungsmarker der Zellen analysiert werden.

Trotz der vielen beschriebenen Vorteile wäre auch die Verwendung von alternativer Methoden wie dem IFN- γ -Elispot oder dem IFN- γ -ELISA möglich. Diese weisen jedoch eine geringere Spezifität auf. Darüber hinaus konnte in Arbeiten von Okada et al. 2011 eine Abweichung der Untersuchungsergebnisse zwischen Tetramer-Färbung und ELISPOT festgestellt werden. Diese Unstimmigkeit kann jedoch durch die kombinierte und gleichzeitige Messung IFN- γ -positiver und dextramer-positiver T-Zellen umgangen werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Durchflusszytometrie durch die Kombination von Dextramer- und intrazellulärer IFN- γ -Färbung eine praktikable, funktionierende und hoch flexible Möglichkeit darstellt, um aktivierte peptidspezifische T-Zellen zu identifizieren und somit auch die Immunogenität einzelner GBM-Tumor-Peptide nachweisen zu können. Basierend auf dem sich aktuell ständig erweiternden Wissen über Molekularmechanismen, die für die Anti-Tumor-Immunantwort relevant sind, ist daher abzusehen, dass Multi-Parameter-Assays – wie der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte – zukünftig eine immer wichtigere Rolle im Monitoring von Tumor-Patienten spielen werden.

4.4.5 Weitere Anwendungsmöglichkeiten des Assays

Die kombinierte Anwendung der Multimer- und Zytokin-Färbung stellt nicht nur für das Immunmonitoring im Rahmen der DC-Vaktinierung eine neue Methode dar, sondern eignet sich auch für andere Anwendungsbereiche, in denen komplexe immunologische Abläufe bewertet und die Bedeutung einzelner T-Zell-Subpopulationen beurteilt werden sollen. Besonders auch im Hinblick auf neue Entwicklungen im Bereich der Tumorthherapie wie dem Einsatz von Antikörpern (Chinot et al. 2014, Gilbert et al. 2014 und Chang et al. 2016), Small-Molecules (Fujikawa et al. 2016) oder Zytokinen (Jahani-Asl et al. 2016) und deren Kombination mit DC-Vakzinen ist eine multifaktorielle Messung von Funktions- und phänotypischen Parametern auf dem Einzel-Zell-Level von T-Zellen, wie es mit dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Monitoring-Assay möglich ist, eine wichtige Voraussetzung, um immunologische Abläufe bei den Patienten messen und bewerten zu können.

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Assay bietet sich auch beispielsweise als Monitoring-Möglichkeit im Rahmen der Medikamenten-Entwicklung, dem Überwachen des Verlaufs infektiöser Erkrankungen, der Transplantationsmedizin, bei anderen Tumorerkrankungen,

Impfstoffen, Autoimmun-Erkrankungen und immunmodulierenden Therapien an. Immer unter der Voraussetzung, dass die durchflusszytometrische Methode jederzeit um andere Dextramer-, Zytokin und Oberflächenmolekül-Marker erweitert werden könnte.

So könnte beispielsweise die Rolle des Tumor-Antigens PD-L1 (= Programmed Death Ligand-1) und der Einfluss regulatorischer CD4⁺-T-Zellen untersucht werden. Beide sind im Zusammenhang mit einer Immunsuppression und somit einer nur eingeschränkten Anti-Tumor-Immunantwort zu sehen (Jacobs et al. 2009). Auch die Immunabläufe im Rahmen der HIV-Erkrankung könnten auf zellulärem Level untersucht werden, da sowohl Zellzahl, die Breite der Immunantwort (= Antigen-spezifität) wie auch deren Qualität, beispielsweise IFN- γ als Marker der Ausprägung der T-Zellaktivierung, beurteilt werden können. So können sowohl naive als auch Effektor-Zellen untersucht werden.

Für andere Tumorerkrankungen sowie für die Evaluierung medikamentöser Therapien bietet sich ein vergleichbarer Ansatz an, z. B. bei der Bewertung der neoadjuvanten Therapie mit Ipilimumab bei Melanom-Patienten (Tarhini et al. 2014).

Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Transplantationsmedizin dar, wo es von entscheidender Bedeutung ist, die immunologischen Abläufe bezüglich des Cytomegalie-Virus zu verfolgen. CMV-(Re-)Infektionen stellen in diesem Setting ein lebensbedrohliches Risiko dar. Zielgerichtetes Monitoring CMV-spezifischer T-Zellen mittels Multimer- und Zytokin-Färbung bietet hier eine Möglichkeit, die Posttransplantations-Immunantwort zu verfolgen (Fernández-Ruiz et al. 2014).

Ebenso bietet sich der Assay zur Beurteilung der Multifunktionalität künstlich erstellter T-Zellen, die zur T-Zell-Therapie bei Tumor-Erkrankungen genutzt werden können, an (Leisegang et al. 2015&2016).

Bei der Vielzahl von Anpassungsmöglichkeiten des Assays (unterschiedliches Laborequipment, Reagenzien, Färbeprotokolle, etc.) muss dabei natürlich immer darauf geachtet werden, vergleichbare Standards einzuhalten oder zu schaffen (Janetzki et al. 2009).

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nutzung des patienten-eigenen Immunsystems in der Tumorthherapie hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das Ziel, eine Anti-Tumorantwort auszulösen, die möglichst ausschließlich krankes Gewebe angreift, gesundes Gewebe dabei jedoch nicht schädigt, ist besonders für Patienten mit malignen Hirntumoren wie beispielsweise GBM-Patienten von enormer Wichtigkeit.

Umso bemerkenswerter erscheint die Tatsache, dass bisher aufgrund fehlender Surrogat-Marker die genauen immunologischen Abläufe im Rahmen der dendritischen Zellvakzinierung nur unzureichend geklärt sind (Liau et al. 2005 und Yu et al. 2004). Klinische Studien belegen in diesem Zusammenhang, dass zwar viele DC-vakzinierte Patienten eine Tumor-spezifische T-Zell-Antwort zeigen, nur ein Teil davon jedoch eine Tumor-Regression ausbildet (Choi et al. 2009, Sampson et al. 2010 und Sensi et al. 2006). Es ist also ein vornehmliches Ziel, effektive Tumor-Antigene zu identifizieren und deren Bedeutung in Bezug auf das Auslösen einer Anti-Tumor-Reaktion zu beurteilen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die peptidspezifische T-Zell-Antwort für ausgewählte GBM-Tumorpeptide analysiert und ein Assay etabliert, mit dem es möglich ist, die Immunogenität von Peptiden zu untersuchen. Hier konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die untersuchten Peptide jeweils eine patienten-individuelle Immunantwort auslösen, wobei gleichzeitig auf mRNA-Level differenzierte Aussagen darüber gemacht werden konnten, wie häufig diese Peptide im Tumor-Gewebe von Patienten vorkommen und wie stark sie exprimiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit Hilfe des beschriebenen Assays möglich ist, die therapeutische Bedeutung einzelner Antigene abzuschätzen.

4.5.1 Ausblick

Eine der deutlichsten Stärken der multifaktoriellen Durchflusszytometrie als Analysemethode liegt in deren Flexibilität und einfachen Erweiterbarkeit. So ist es zum Beispiel der Fall, dass während der Interaktion zwischen CD8-positiven T-Zellen und einer Ziel-Zelle Vesikel der T-Zelle mit der Zellmembran der Ziel-Zelle verschmelzen und dabei zytotoxische Mediatoren wie z. B. Perforin oder Granzyme freisetzen. Diese Abläufe der Immunantwort könnten beispielsweise in Kombination mit der Dextramer-Färbung exakt verfolgt und untersucht werden.

Des Weiteren erlaubt der vorgestellte Assay auch die Untersuchung von T-Zell-Subpopulationen. Dies ist vor allem deshalb wichtig, da regulatorische T-Zellen in vivo mittels einer Immunsuppression einen therapielimitierenden Effekt ausüben können (Fecci et al. 2006). Durch eine Änderung der Färbeprotokolle bzw. durch Nutzung anderer fluoreszenzmarkierter Antikörper, die gegen andere Zellmoleküle gerichtet sind, ist es ein Leichtes, mit dem vorgestellten Assay auch solche möglichen Einflussfaktoren der DC-Vakzinierung näher zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit weiterführender Untersuchungen stellen „Killing Assays“ dar, mit deren

Hilfe die Lyse antigen-tragender Zellen verfolgt werden kann. Damit besteht eine weitere Möglichkeit des Monitorings der Immunabläufe innerhalb der GBM-Patienten und eine zusätzliche Möglichkeit zur Quantifizierung der Immunogenität von GBM-Peptiden.

Zurzeit werden neue DC-Vakzinierungs-Strategien untersucht, die sich auf die Bedeutung viraler Infektionen in Zusammenhang mit der Wirkung der DC-Vakzinierung konzentrieren (Sultan et al. 2016 und Garcia-Bates et al. 2016).

Auch im Zusammenhang mit der kombinierten Verwendung anderer immunmodulierender Medikamente wie beispielsweise der Gabe von Cyclophosphamide zur Reduzierung der regulatorischen T-Zellen und der DC-Vakzinierung besteht noch ein erheblicher Untersuchungsbedarf (Walter et al. 2012).

In beiden Fällen könnte die Analyse spezifischer T-Zellen und das Monitoring der Anti-Tumor-Antwort entscheidende Erkenntnisse hinsichtlich der Optimierung der Vakzine liefern.

Die Umsetzung des beschriebenen Assays zur Analyse zytotoxischer T-Zellen in der klinischen Routine würde die Möglichkeit bieten, die Immunogenität spezifischer Antigene und/oder die Kombination mehrerer Antigene, beispielsweise Gesamt-Tumorlysat oder Einzelpeptide, zu beurteilen und eine Korrelation zwischen effektiver Immunantwort und Patienten-Outcome herzustellen. Der Vergleich spezifischer T-Zellen vor und nach der DC-Vakzinierung könnte hierbei als prognostischer Marker dienen, um den Erfolg einer Behandlung zu bewerten. Peptide, die als Antigene fungieren, sowie Multimer-Moleküle, die zur entsprechenden T-Zell-Untersuchung nötig sind, können prinzipiell patienten-individuell erstellt werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, vergleichbare Standards einzuhalten, die es erlauben, Schlüsse für Therapie und Prognose zu ziehen (Janetzki et al. 2009).

Zusammengefasst bietet der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Monitoring Ansatz durch die Kombination von Real-Time-PCR und Durchflusszytometrie eine durchführbare und zugängliche Methode, um tumorspezifische bzw. peptidspezifische T-Zellen in Blutproben von GBM-Patienten nachzuweisen und damit *in vitro* die Immunabläufe im Rahmen einer DC-Vakzinierung nachzuvollziehen. Die Möglichkeit der Kombination der Peptidspezifität mit der Aktivierung der T-Zellen fügt den derzeit vorhandenen Immun-Monitoring-Ansätzen eine wertvolle Komponente hinzu. Mit seiner Hilfe wird es möglicherweise durchführbar, den Erfolg einer DC-Vakzinierung vorauszusagen und die immunologische Potenz einzelner Antigene innerhalb eines Impfstoffes bereits im Vorfeld einer Verabreichung zu beurteilen.

5. Anhang

5.1 Bisherige DC-Vakzinierungsstudien

Tabelle 5.1: Studienübersicht zur DC-Vakzinierung bei Glioblastom-Patienten

Nr. im Literatur-vz.	Patientenzahl	Antigen-Stimulation	Patienten-Outcome	Immun-Monitoring Methode	Gemessene Immunantwort
57	1	Allogene Tumorpeptide	Kein Überlebensvorteil	[3H]-Thymidine incorporation T cell proliferation assay	Tumor infiltrierende T-Zellen
101	9	Autologe Tumorpeptide	Mittleres Überleben: 455d gegen Kontroll-Gruppe mit 257d	[3H]-Thymidine incorporation T cell proliferation assay	Lytisch aktive PBMCs und Tumor infiltrierende CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und CD45RO ⁺ Zellen
47	8	Fusion von DCs mit Tumorzellen für 48h	Stabile Erkrankung, Überlebenszeit nicht angegeben	IFN- γ ELISA	IFN- γ PBMC
96	10	Autologes Tumorlysat	Stabile Erkrankung >50mo	IFN- γ ELISpot	Steigerung von NK-Zellen in PBMCs, IFN- γ PBMCs, Tumor infiltrierende T-Zellen
92	34	Nicht angegeben	Nicht angegeben	Tetramer-Färbung, IFN- γ PCR, ELISpot, ELISA	Nicht angegeben
94	25	Autologes Tumorlysat oder eluierte Peptide	2 Jahres-Überleben: 42%	Cytotoxischer T-Zell-Lyse Assay, IFN- γ PCR	IFN- γ PBMCs
100	14	Autologes Tumorlysat	Mittleres Überleben: 133we	Tetramer-Färbung, IFN- γ PCR, ELISpot, ELISA, [3H]-Thymidine in-	Gesteigerte IFN- γ RNA in PBMCs; HER-2, gp100 und MAGE-1 Tetramer positive T-Zellen; CD8 ⁺ und CD45RO ⁺ infiltrierende

				corporation T cell proliferation assay	Zellen
19	1	Autologes Tumorlysat für 24h	Nach >35we noch am Leben	Nicht angegeben	DTH
74	12	Autologes Tumorlysat für 24h	Mittleres Überleben: 10,6 mo; 2 Langzeit- Überlebende (>35mo)	Nicht angegeben	DTH
46	15	Fusion von DCs mit Tumorzellen für 24h	Überlebenszeit: 9,8mo	Cr Release assay, IFN- γ Färbung	DTH, IFN- γ produzierende und lytisch active CD8 ⁺ T-Zellen
97	24	Autologes Tumorlysat	Überlebenszeit: 16mo; 3 Patienten >800d	IFN- γ ELISpot	IFN- γ PBMCs, DTH
58	12	Tumorpeptide für 1h	2 Überlebende, mittlere Überlebenszeit: 23,mo; Patienten mit stabiler Erkrankung oder ohne Residual- Tumor: 35,8mo Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrolle mit 18,3mo	Alamar Blue cytotoxic assay	Tumor infiltrierende CD8 ⁺ CD45Ro ⁺ Zellen, lytisch aktive T-Zellen
64	12	Autologes Tumorlysat für 16h	Zeit bis zur Progression: 6mo	ELISpot	EphA2 PBMC
18	56	Autologes Tumorlysat für 24h	Mittleres Überleben: 9,6mo	Nicht angegeben	DTH
93	34	Autologes Tumorlysat für 18h	Mittleres Überleben: 642d bei Respondern im Vergleich zu 430d bei Non- Respondern	IFN- γ PCR	IFN- γ PBMCs

90	13	Tumorlysat für 3d	Überleben: 11,6mo	Nicht angegeben	Tumor infiltrierende CD8 ⁺ CD45Ro ⁺ Zellen
2	8	Autologes Tumorlysat	Mittleres Überleben: 24mo	IFN- γ ELISpot	IFN- γ PBMCs
3	45	Autologes Tumorlysat für 24h	GBM Überlebenszeit: 12,2mo	Nicht angegeben	Nicht angegeben
67	23	Autologes Tumorlysat	Überlebenszeit: 31,4mo	Cytometric bead assay	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ Tumor infiltrierende Lymphozyten
63	22	Synthetische Peptide (48h)	4 Patienten mit GBM-Rezidiv sind Progressionsfrei für >12mo	IFN- γ ELISpot, Tetramer-Färbung	PBMCs spezifisch für Gliom assoziierte Antigene bei 58% der Patienten
24	10	Autologes Tumorlysat für 48h	Überlebenszeit: 28mo	IFN- γ ELISpot	IFN- γ CD4 ⁺ Zellen
9	17	Autologes Tumorlysat für 24h	Überlebenszeit: 520d im Vergleich zur Kontrollgruppe: 380d ; 5-Jahres Überleben bei 18,8% gegen Kontrollgruppe mit 0%	Nicht angegeben	Tumorinfiltrierende CD8 ⁺ Lymphozyten
42	13	Heat-shocked Tumorlysat	2-Jahres Überleben: 7,7% gegen Kontrollgruppe mit 0%	IFN- γ ELISA	IFN- γ Serum
66	16	Peptide: MAGE1, AIM-2, gp100, Her2, IL13Ra2 (ICT-107)	Überlebenszeit: 27,2mo	Intrazelluläre IFN- γ -Färbung	IFN- γ PBMC
1	9	5 Peptide	1 Patient mit stabiler Erkrankung (>2Jahre)	Intrazelluläre IFN- γ -Färbung, ELISpot	IFN- γ PBMC
14	18	Bestrahlte (100 Gy) autologe kultivierte Tumorzellen	Überlebenszeit: 32mo	Nicht angegeben	Nicht angegeben

34	9	Autologes Tumorlysat	Überlebenszeit: 23mo	IFN- γ ELISA	IFN- γ PBMC
----	---	----------------------	----------------------	---------------------	--------------------

Verwendete Abkürzungen: h = Stunden, d = Tage, we = Wochen, mo = Monate, DTH = Delayed Type Hypersensitivity (= Typ IV Hypersensibilität)

5.2 Tumorprotein-Expression

Tabelle 5.2: GBM-Tumorprotein-mRNA-Expression in den untersuchten Gewebeproben

TL	BCA	CHI	CSPG4	FABP7	IGF2BP3	NLGN4X	NRCAM	PTP	TNC
Gesundes Gewebe	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TL 6891	1	1	0	1	1	1	1	1	1
TL 7080	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TL 7015	1	1	0	1	1	1	1	1	0
TL 7030	1	1	0	1	1	1	1	1	0
TL 7035	1	1	0	1	1	1	1	1	0
TL 6933	1	1	0	1	1	1	1	1	0
TL 6902	1	1	0	1	1	1	1	1	1
TL 7323	n.t.	1	0	n.t.	n.t.	n.t.	1	1	0
TL 7431	n.t.	1	0	n.t.	n.t.	n.t.	1	1	1
TL 7219	0	0	0	1	0	n.t.	1	1	n.t.
TL 7441	1	0	0	1	1	n.t.	1	1	0
TL 116110	1	1	0	1	1	n.t.	1	1	0
TL 7505	n.t.	1	n.t.	n.t.	1	n.t.	1	1	n.t.

TL 7520	n.t.	1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1	1	n.t.
TL 7133	n.t.	1	0	n.t.	n.t.	n.t.	1	1	n.t.
TZL 7317	1	1	0	1	1	1	1	0	0
TZL U87	n.t.	1	1	n.t.	1	n.t.	1	n.t.	n.t.
Pankreas -Gewebe	0	0	0	n.t.	0	n.t.	0	0	n.t.

Legende: 1 = wird exprimiert; 0 = wird nicht exprimiert;

n.t. = not tested (wurde nicht untersucht, da zu wenig cDNA vorhanden war)

5.3 Aktuelle CTL-Monitoring-Verfahren

Tabelle 5.3: Aktuelle CTL-Monitoring-Verfahren (nach Egli et al. 2012 und Fernández-Ruiz et al. 2014)

	Zytokin- Profiling (Bead-basierte Technologie)	Real-Time- PCR	ELISPOT- Assay	Intrazelluläre Zytokin- Färbung (Durchfluss- zytometrie)	Multimer- Färbung (Durchfluss- zytometrie)
Material	Vollblut/PBMCs	PBMCs	PBMCs	Vollblut/PBMCs	PBMCs
Menge	1x10 ⁶ Zellen	1x10 ⁶ Zellen	0,25x10 ⁶ Zellen	0,25-1x10 ⁶ Zellen	0,25-1x10 ⁶ Zellen
Zeitauf- wand	48-72h	10h	48h	10h	2h
Antigen	Peptide, Lysat, Mitogen	Peptide, Lysat, Mitogen	Peptide, Lysat, Mitogen	Peptide, Lysat, Mitogen	Peptide, Lysat, Mitogen
Funktio-nale Analyse	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein

Phänotypische Charakterisierung	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
Funktion	Zytokin-Release-Panels für eine Vielzahl an Zytokinen	Vielzahl an Zytokinen (bspw. IFN- γ)	Vielzahl an Zytokinen (bspw. IFN- γ)	Vielzahl an Zytokinen (bspw. IFN- γ)	Häufigkeit von T-Zell Phänotypen
Vorteile	Hohe Sensitivität, auch bei geringen Probemengen mehrere Zytokine analysierbar	Hohe Sensitivität, wegen Amplifikation sehr kleine Probenmengen ausreichend	Hohe Sensitivität	Große Spannbreite an Zell-Phänotypen (Effektor, Regulatorische, ...) bestimmbar & Co-Rezeptoren sowie Zytokin-Expression messbar	Möglichkeit Antigen-spezifische Zellen zu erkennen, hohe Spezifität
Nachteile	Große Datenmenge, die spezieller Analyse bedarf	Arbeitsintensiv	Aufgereinigte PBMCs notwendig, geringe technische Standardisierung	Arbeitsintensiv, geringe technische Standardisierung	Arbeitsintensiv, geringe techn. Standardisierung, aufgereinigte PBMCs notwendig, HLA-Typisierung notwendig

6. Literaturverzeichnis

<u>Nummer</u>	<u>Quelle</u>
1	Akiyama Y, Kume A, Oshita C, et al. (2012) α -type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial. <i>BMC Cancer</i> 12:623
2	Ardon H, De Vleeschouwer S, Van Calenbergh F, et al. (2010) Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours. <i>Pediatr Blood Cancer</i> 54:519–25
3	Ardon H, Gool S, Lopes IS, et al. (2010) Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study. <i>J Neurooncol</i> 99:261–72
4	Banchereau J, Steinman RM. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. <i>Nature</i> 392:245-52
5	Blankenstein T. (2005) The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. <i>Curr Opin Immunol</i> 17:180-6
6	Brossart P, Stuhler G, Wirth S, et al. (2000) Induction of cytotoxic T-Lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. <i>Blood</i> 96:3102-3108
7	Caruso A, Corulli M, Licenziati S, et al. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. <i>Cytometry</i> 27:71-6
8	Caruso DA, Neale AM, Orme LM, et al. (2004) Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. <i>Neuro-oncol</i> 6:236-46
9	Chang CN, Huang YC, Yang DM, et al. (2011) A phase I/II clinical trial investigating the adverse and therapeutic effects of a postoperative autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with malignant glioma. <i>J Clin Neurosci</i> 18:1048–54
10	Chang K, Guo X, Zhang B, et al. (2016) Multimodal imaging patterns predict survival in recurrent glioblastoma patients treated with bevacizumab. <i>Neuro Oncol</i> 18:417-25
11	Chekenya M, Davies D, Rooprai HK, et al. (1999) The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. <i>Int J Dev Neurosci</i> 17:421–35
12	Chekenya M, Enger PO, Hjelstuen M, et al. (2002) NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. <i>FASEB J</i> 16:586–8
13	Chinot O, Mason W, Wick W, et al. (2014) Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. <i>N Engl J Med</i> 370:709–722
14	Cho DY, Lee HC, Yang WK, et al. (2012) Adjuvant Immunotherapy with Whole-Cell Lysate Dendritic Cells Vaccine for Glioblastoma Multiforme: A Phase II Clinical Trial. <i>World Neurosurg</i> 77:736–44
15	Choi BD, Archer GE, Mitchell DA, et al. (2009) EGFRvIII-Targeted Vaccination Therapy of Malignant Glioma. <i>Brain Pathol</i> 19:713–23
16	Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, et al. (2001) Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. <i>Clin Cancer Res</i> 7:1127–35
17	Cyster JG. (1999) Chemokines and the Homing of Dendritic Cells to the T Cell Areas of Lymphoid Organs. <i>J Exp Med</i> 189:447–450
18	Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. <i>Acta Neuropathol</i> 114:97–109

19	De Vleeschouwer S, Demaerel P, Van Calenbergh F, et al. (2004) Transient local response and persistent tumor control in a child with recurrent malignant glioma: treatment with combination therapy including dendritic cell therapy. <i>J Neurosurg Pediatr</i> 100:492–7
20	De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, et al. (2008) Postoperative Adjuvant Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Patients with relapsed Glioblastoma multiforme. <i>Clin Cancer Res</i> 14:3098-3104
21	Dolton G, Lloyd A, Tungatt K, et al. (2015) More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide–MHC multimers. <i>Immunology</i> 146:11–22
22	Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N, et al. (2012) Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. <i>Brain</i> 135:1042–54
23	Dutton RW, Bradley LM, Swain SL (1998) T cell memory. <i>Rev. Immunol</i> 16:201–223
24	Egli A, Humar A, Kumar D. (2012) State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. <i>Clin Infect Dis</i> 55:1678–1689
25	Fadul CE, Fisher JL, Hampton TH, et al. (2011) Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. <i>J Immunoth</i> 34:382–9
26	Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, et al. (2006) Increased Regulatory T-Cell Fraction Amidst a Diminished CD4 Compartment Explains Cellular Immune Defects in Patients with Malignant Glioma. <i>Cancer Res</i> 66:3294–302
27	Fernández-Ruiz M, Humar A, Kumar D (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. <i>Clin Transl Immunol</i> 3:12
28	Fujikawa A, Nagahira A, Sugawara H, et al. (2016) Small-molecule inhibition of PTPRZ reduces tumor growth in a rat model of glioblastoma. <i>Sci Rep</i> 6:20473
29	Garcia-Bates TM, Concha-Benavente F, Kim E, et al. (2016) Enhanced Cytotoxic CD8 T Cell Priming Using Dendritic Cell-Expressing Human Papillomavirus-16 E6/E7-p16INK4 Fusion Protein with Sequenced Anti-Programmed Death-1. <i>J Immunology</i> 196:2870-8
30	Gilbert MR, Dignam JJ, Won M, et al. (2014) A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. <i>N Engl J Med</i> 370:699–708
31	Dittami GM, Rabbitt RD, Sethi M, et al. (2012) Determination of Mammalian Cell Counts, Cell Size and Cell Health Using the Moxi Z Mini Automated Cell Counter. <i>J Vis Exp</i> 64:3842
32	Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. <i>Nature Reviews Immunology</i> 14:571–578
33	Heimberger AB, Archer GE, Crotty LE, et al. (2002) Dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide induce long-lasting immunity and are effective against murine intracerebral melanoma. <i>Neurosurgery</i> 50:158-64
34	Herold-Mende C, Bonsanto MM, Mueller MM, et al. (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. <i>Int J Cancer</i> 98:362–9
35	Hunn MK, Bauer E, Wood CE, et al. (2014) Dendritic cell vaccination combined with temozolomide retreatment: results of a phase I trial in patients with recurrent glioblastoma multiforme. <i>J Neurooncol</i> 121:319–29
36	Ohgaki H, Kleihues P. (2005) Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. <i>Journal of Neuropathology & Experimental Neurology</i> 64:479-489

37	Hong JJ, Dudley ME, Rosenberg SA, et al. (2010) Successful Treatment of Melanoma Brain Metastases with Adoptive Cell Therapy. <i>Clin Cancer Res</i> 16:4892–8
38	Hu B, Kong LL, Matthews RT, et al. (2008) The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. <i>J Biol Chem</i> 283:24848–59
39	Ike SO, Nubila T, Ukaejiofo EO, et al. (2010) Comparison of haematological parameters determined by the Sysmex KX - 2IN automated haematology analyzer and the manual counts. <i>BMC Clin Pathol</i> 10:3
40	Jacobs JFM, Bol KF, Idema AJ, et al. (2009) Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. <i>Neuro Oncol</i> 11:394-402
41	Jahani-Asl A, Soleimani VD, Yin H, et al. (2016) Control of glioblastoma tumorigenesis by feed-forward cytokine signaling. <i>Nat Neurosci</i> 19:798-806
42	Janetzki S, Britten CM, Kalos M, et al. (2009) “MIATA”—Minimal Information about T Cell Assays. <i>Immunity</i> 31:527–8
43	Jie X, Hua L, Jiang W, et al. (2011) Clinical Application of a Dendritic Cell Vaccine Raised Against Heat-Shocked Glioblastoma. <i>Cell Biochem Biophys</i> 62:91–9
44	Kammula US, Lee KH, Riker AI, et al. (1999) Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens. <i>J Immunol</i> 163:6867–75
45	Kammula US, Marincola FM, Rosenberg SA. (2000) Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assessment of Immune Reactivity in Melanoma Patients After Tumor Peptide Vaccination. <i>Journal of National Cancer Institute</i> 92:1336-1344
46	Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. (2010) Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. <i>N Engl J Med</i> 363:411–22
47	Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, et al. (2001) Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. <i>Cancer Immunol Immunother</i> 50:337–44
48	Kikuchi T, Abe T, Akasaki Y, et al. (2004) Vaccination of Glioma Patients with Fusions of Dendritic and Glioma Cells and Recombinant Human Interleukin 12. <i>J Immunoth</i> 27:452-9
49	Kim CH, Bak KH, Kim YS, et al. (2000) Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. <i>Surg Neurol</i> 54:235–40
50	Kreth FW, Simon M, Thon N, et al. (2013) Gross total but not incomplete resection of GBM prolongs survival in the era of radiochemotherapy. <i>Ann Oncol</i> 24:3117–3123
51	Kugler A, Stuhler G, Walden P, et al. (2000) Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. <i>Nat Med</i> 6:332-336
52	Laperriere N, Cairncross G, Zuraw L, et al. (2002) Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. <i>Radiother Oncol</i> 64:259–273
53	Leisegang M, Engels B, Schreiber K, et al. (2016) Eradication of large solid tumors by gene therapy with a T cell receptor targeting a single cancer-specific point mutation. <i>Clin Cancer Res</i> 22:2734-43
54	Leisegang M, Kammertoens T, Uckert W, et al. (2016) Targeting human melanoma neoantigens by T cell receptor gene therapy. <i>J Clin Invest</i> 126:854–8
55	Lerner C, Ketter R, Linsler S, et al. (2014) Establishment of a molecular cytogenetic analysis for native tumor tissue of meningiomas-suitable for clinical application. <i>Mol Cytogenet</i> 7:12
56	Liang Y, Diehn M, Watson N, et al. (2005) Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 102:5814–9

57	Liau LM, Black KL, Martin NA, et al. (2000) Treatment of a patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides. Case Report. Neurosurg Focus 9:e8
58	Liau LM, Kiertscher SM, Prins RM, et al. (2005) Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. Clin Cancer Res 11:5515-25
59	Lissina A, Ladell K, Skowera A, et al. (2009) Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. J Immunol Methods 340:11–24
60	Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, et al. (2007) B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? Neoplasia 9:734–44
61	Mocellin S, Bronte V, Mandruzzato S, et al. (2004) Part I: Vaccines for solid tumours. Lancet Oncol 5:681–9
62	Mocellin S, Mandruzzato S, Semenzato G, et al. (2004) Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. Lancet Oncol 5:727–37
63	Okada H, Lieberman FS, Walter KA, et al. (2007) Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. J Transl Med 5:67–67
64	Okada H, Kalinski P, Ueda R, et al. (2011) Induction of CD8 T-Cell Responses Against Novel Glioma-Associated Antigen Peptides and Clinical Activity by Vaccinations With - Type 1 Polarized Dendritic Cells and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Stabilized by Lysine and Carboxymethylcellulose in Patients With Recurrent Malignant Glioma. J Clin Oncol 29:330-336
65	Peters JH, Gieseler R, Thiele B, et al. (1996) Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. Immunol Today 17:273-8
66	Phuphanich S, Rudnick JD, Wheeler CJ, et al. (2013) Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. Cancer Immunol Immunother 62:125–135
67	Prins RM, Konkankit V, Soto H, et al. (2011) Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. Clin Cancer Res 17:1603–15
68	Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ (2002) Interferon-gamma-dependent phagocytic cells are a critical component of innate immunity against metastatic mammary carcinoma. Cancer Res 62:4406–12
69	Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. Nature Reviews Immunology 5:617-628
70	Razavi SM, Jin BE, Lee KE, et al. (2016) Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. Frontiers in Surgery 3:11
71	Reddy M, Davis C, Eirikis E, et al. (2004) Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. J Immunol Methods 293:127-42
72	Reis e Sousa C (2004) Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. Curr Opin Immunol 16:21-5
73	Rosenberg SA, Sherry RM, Yang JC, et al. (2011) Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. Clin Cancer Res 17:4550–7
74	Rutkowski S, De Vleeschouwer S, Kaempgen E, et al. (2004) Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. Br J Cancer 91:1656–62

75	Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, et al. (2006) Vaccination of melanoma Patients using dendritic cells loaded with allogenic tumor cell lysate. <i>Cancer Immunol Immunother</i> 55:819-829
76	Sampson JH, Archer GE, Heimberger AB, et al. (2010) Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. <i>J Clin Oncol</i> 28:4722–9
77	Sehgal A, Boynton AL, Young RF, et al. (1998) Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. <i>Int J Cancer</i> 76:451–8
78	Sensi M (2006) Unique Tumor Antigens: Evidence for Immune Control of Genome Integrity and Immunogenic Targets for T Cell-Mediated Patient-Specific Immunotherapy. <i>Clin Cancer Res</i> 12:5023–32
79	Soh BS, Song CM, Vallier L, et al. (2007) Pleiotrophin enhances clonal growth and long-term expansion of human embryonic stem cells. <i>Stem Cells</i> 25:3029–37
80	Steinman RM. (1991) The Dendritic Cell System and Its Role In Immunogenity. <i>Annu.Rev. Immunol</i> 9:271-96
81	Stummer W, Meinel T, Pichlmeier U, et al. (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. <i>Lancet Oncol</i> 7:392–401
82	Stummer W, Meinel T, Reulen HJ, et al. (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforma: identification of and adjustment for bias. <i>Neurosurgery</i> 62:564–576
83	Stummer W, Ewelt C, Meinel T, et al. (2012) Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery. <i>J Neurooncol</i> 108:89–97
84	Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma. <i>N Engl J Med</i> 352:987–996
85	Sultan H, Addis D, Fesenkova VI, et al. (2016) Designing therapeutic cancer vaccines by mimicking viral infections. <i>Cancer Immunology, Immunotherapy</i> Apr 6/16 Epub
86	Tarhini AA, Butterfield LH, Edington H, et al. (2014) Immune Monitoring of the Circulation and the Tumor Microenvironment in Patients with Regionally Advanced Melanoma Receiving Neoadjuvant Ipilimumab. <i>PLoS One</i> 9:e87705
87	Ulbricht U, Aigner A, Brockmann MA, et al. (2003) Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> 62:1265–75
88	Van Gool SW. (2015) Brain tumor immunotherapy: what have we learned so far? <i>Front. Oncol</i> 5:98
89	Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, et al. (2003) Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people – a randomized study. <i>Acta Neurochir</i> 145:5–10
90	Walker DG, Laherty R, Tomlinson FH, et al. (2008) Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy. <i>J Clin Neurosci</i> 15:114–21
91	Walter S, Stenzl A, Weinschenk T, et al. (2012) Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. <i>Nat Med</i> 18:1254-61
92	Weiss M., Ahrend H., Grossebrummel H., et al. (2016) Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells. <i>Urologia Internationalis</i> 97:112-7
93	Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. (2003) Thymic CD8+ T Cell Production Strongly

	Influences Tumor Antigen Recognition and Age-Dependent Glioma Mortality. J Immunol 171:4927–33
94	Wheeler CJ, Das A, Liu G, et al. (2004) Clinical Responsiveness of Glioblastoma Multiforme to Chemotherapy after Vaccination. Clin Cancer Res 10:5316–26
95	Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. (2008) Vaccination Elicits Correlated Immune and Clinical Responses in Glioblastoma Multiforme Patients. Cancer Res 68:5955–64
96	Wu ZB, Qiu C, Zhang AL, et al. (2014) Glioma-Associated Antigen HEATR1 Induces Functional Cytotoxic T Lymphocytes in Patients with Glioma. J Immunol Res 2014: 131494
97	Yamanaka R, Abe T, Yajima N, et al. (2003) Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. Br J Cancer 89:1172–9
98	Yamanaka R, Homma J, Yajima N, et al. (2005) Clinical Evaluation of Dendritic Cell Vaccination for Patients with Recurrent Glioma: Results of a Clinical Phase I/II Trial. Clin Cancer Res 11:4160–7
99	Yang J, Neudauer CL, Price MA, et al. (2004) Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. J Cell Biol 165:881–91
100	Young JL, Gaston JS, Ramage JM, et al. (1997) In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. Eur J Immunol 27:2383–2390
101	Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, et al. (2001) Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. Cancer Res 61:842-7
102	Yu JS, Liu G, Ying H, et al. (2004) Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. Cancer Res 64:4973-9
103	Zhou LJ, Tedder TF (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:2588-92
	<u>Lehrbücher</u>
104	Horn Florian (2009) Biochemie des Menschen, Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
105	Karl F. Masuhr, Florian Masuhr, Marianne Neumann (2013) Neurologie – Duale Reihe. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
106	Klinke Rainer, Pape Hans Christian, Kurtz Armin, Silbernagl Stefan (2010) Physiologie. 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
	<u>Leitlinien</u>
107	Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Leitlinie für Diagnostik und Therapie – Gliome (2014 überarbeitete Version)
	<u>Bildquellen</u>
I	Website: https://www.j-immunother.com/english/immuno-Cell/img/kind_img04.png (Stand: 21.06.2016)
II	Website: http://www.clker.com/cliparts/g/n/L/j/C/c/cd8-t-cell-md.png (Stand: 21.06.2016)
III	Website: http://www.nature.com/nprot/journal/v9/n7/images/nprot.2014.104-F5.jpg (Stand: 21.06.2016)
IV	Proimmune, Pro5 MHC Pentamer Handbook, S.3

7. Abkürzungen und Glossar

Tabelle 7.1: Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien (= Advanced Therapy Medicinal Products)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for Primer	Forward Primer
FSC	Vorwärts-Streulicht (=Forward Scatter)
g	Erdbeschleunigung (gravity)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor

Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IL	Interleukin
INF	Interferon
Karnofsky-Index	Der Karnofsky-Index (= Karnofsky performance status scale) ist eine Bewertungsskala, die in einem Spektrum von 0-100% die Selbstständigkeit in der Versorgung eines Patienten beschreibt.
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (= Mean Fluorescent Intensity)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (= major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (=Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (= phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin
PHA	Phytohämagglutinin
PRP	„Mustererkennungsrezeptor“

	(= Pattern Recognition Receptors)
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rev Primer	Reverse Primer
RNAse	Ribonuklease
sek	Sekunde
SSC	Seitwärts-Streulicht (= Side Scatter)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TL	Tumorlysat
TNF	Tumornekrosefaktor
Toll-Like Rezeptoren	Toll-Like Rezeptoren erkennen unterschiedlichste (funktionale) Bestandteile von Bakterien, Viren und Pilzen und lösen bei Erkennen solcher Antigene eine Signaltransduktionskette aus, die der Bekämpfung dieser Erreger dient.
U	Unit (Einheit)
VEGF	Wachstumsfaktor der Vaskulogenese (vascular endothelial growth factor)

8. Publikation und Danksagung

8.1 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden international publiziert:

Müller Isabelle, Altherr Dominik, Eyrich Matthias, Flesch Brigitte, Friedman Kim S, Ketter Ralf, Oertel Joachim, Schwarz Eva C, Technau Antje, Urbschat Steffi, Eichler Hermann (2016).

Tumor antigen-specific T cells for immune monitoring of DC treated GBM patients. *Cyotherapy* 18:1146-1161

8.2 Kongressbeitrag

Müller Isabelle. Immunomonitoring of DC treated GBM patients by quantification of tumour antigen specific T cells (Poster). 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 2015

8.2 Danksagung

Die Entstehung der vorliegenden Arbeit habe ich vielen Menschen zu verdanken.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Eichler, der mir die Möglichkeit gab, ein spannendes wissenschaftliches Thema zu bearbeiten. Er war bei Fragen und Anliegen immer schnell und unkompliziert zu erreichen und gab wertvolle Anregungen zu meiner Arbeit.

Dann gilt mein Dank selbstverständlich Fr. Dr. Müller, die meine Doktorarbeit als Betreuerin begleitet, mich in das Thema eingeführt und mir das Arbeiten im Labor nähergebracht hat. Dabei hat nicht nur ihre fachliche Kompetenz, sondern auch die immer sehr angenehme Zusammenarbeit entscheidend zu der Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Viel gelernt habe ich auch von Fr. Cora Ecker. Neben dem Umgang mit dem Durchflusszytometer konnte ich mir durch das immer sehr angenehme gemeinsame Arbeiten viele „handwerkliche“ Dinge aneignen. Und „den Rest“ durfte ich dann durch die tolle Zusammenarbeit mit Franziska Markwart lernen. Ohne sie wären die langen Abende vor dem Durchflusszytometer sicher um einiges langweiliger gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich auch beim gesamten Labor-Team sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin bedanken. Es herrschte immer und überall eine angenehme und freundliche Atmosphäre.

Auch den anderen Arbeitsgruppen, die zur Entstehung der Arbeit beigetragen haben, möchte ich danken. Sowohl den Mitarbeitern der Neurochirurgie und auch der AG Hoth und Frau Dr. Eva Schwarz sowie universitäts-übergreifend Prof. Dr. Eyrich und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Würzburg.

Zu guter Letzt, aber dafür in besonderem Maße danke ich meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung wäre weder die vorliegende Arbeit noch mein Studium überhaupt möglich gewesen.