

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Härtel

**Auswirkung verschiedener Ausreifungscocktails auf die
Kreuzpräsentationsfähigkeit dendritischer Zellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Veronika Lex
aus Burghausen

Würzburg, März 2021

Referent:

Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Dekan:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

04.10.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Glioblastom und seine Therapie	1
1.2	Dendritische Zellen	2
1.3	Antigenpräsentation dendritischer Zellen	4
1.4	PGE ₂	5
1.5	Zielsetzung der Arbeit	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Liste der verwendeten Materialien.....	8
2.2	Methoden	10
2.2.1	Allgemeines	10
2.2.2	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)	10
2.2.3	CMV und HLA-Typisierung der Spenderzellen	11
2.2.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen	12
2.2.5	Generierung eines HLA-A2 ⁺ CD8 ⁺ CMV ⁺ T-Zellklons.....	12
2.2.6	Generierung einer CD8 ⁺ CMV ⁺ -T-Zelllinie über CD137-Selektion.....	14
2.2.7	Herstellung und Ausreifung dendritischer Zellen	15
2.2.8	Isolierung von CD8 ⁺ Zellen über Magnetsäule	16
2.2.9	Isolierung von CD141 (BDCA-3) DCs über Magnetsäule.....	17
2.2.10	Kreuzpräsentationsversuch.....	18
2.2.10.1	Kokultur	19
2.2.10.2	Intrazelluläre Färbung	19
2.2.11	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse	21
3.1	DC Ausreifung.....	21
3.2	Generierung eines T-Zellklones.....	21
3.3	Generierung einer T-Zelllinie	23
3.4	Kreuzpräsentationsversuche	25
4	Diskussion	32
4.1	Herkunft der dendritischen Zellen	32
4.2	Der Einfluss von PGE ₂	33
4.3	Unterschiedliche T-Zellpopulationen als Readout im IFN γ -Assay	35
4.4	Tumormikroumgebung	37

4.5	Limitationen.....	37
5	Zusammenfassung	39
6	Literaturverzeichnis.....	41
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis.....	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom und seine Therapie

Das Glioblastom (Glioblastoma Multiforme - GBM) gehört zu den hochmalignen, diffus infiltrierenden Gliomen. Es ist der häufigste primär maligne Hirntumor des Erwachsenen, mit einer Inzidenz von 3-4 pro 100.000 Erwachsenen pro Jahr, betrifft jedoch auch Kinder mit 2 pro 100.000 Kindern pro Jahr.[1, 2] Als neuroepithelialer Tumor, von Astrozyten ausgehend, gehört das Glioblastom zu den hirneigenen Tumoren. Noch immer sind die Therapiemöglichkeiten und -aussichten eines Glioblastoms (WHO Grad IV) erschreckend gering. Selbst eine radikale Operation des Tumors, gefolgt von Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomide nach dem STUPP-Schema, führt lediglich zu einer geringen Überlebenszeitverlängerung. War die Überlebenszeit in den USA vor der Einführung der Chemotherapie mit Temozolomide nur bei 9,7 Monaten, ist sie nach der Einführung zumindest auf 14,2 Monate angestiegen, und somit einer alleinigen Bestrahlung überlegen.[3, 4] Doch selbst diese Errungenschaft führt aktuell noch immer nicht zu einem zufriedenstellenden Therapieergebnis. Um die operativen Ergebnisse zu verbessern, wird während der Operation 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zu Hilfe genommen, um maligne entartete Zellen besser von gesundem Hirnparenchym abgrenzen zu können.[5] Neben den unzureichenden Langzeiterfolgen der 3 Säulen der Standardtherapie kommen die oft sowohl lokalen, meist durch die Operation und Strahlentherapie bedingten, wie auch systemischen Nebenwirkungen hinzu.[6] Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Chemotherapie zählen Leuko- und Thrombozytopenien sowie gastroenterologische Beschwerden wie starke Übelkeit und Erbrechen. Auch Haarausfall und anhaltende Müdigkeit kommen häufig hinzu. Die AkdÄ (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft) stellte außerdem auch Alveolitiden bzw. Pneumonitiden in Zusammenhang mit der Einnahme von Temozolomid fest.[7]

Um die Überlebenszeit und Lebensqualität zu verbessern, werden derzeit verschiedene neue Therapieansätze erforscht und erprobt. Ein vielversprechender Therapieansatz ist hierbei die spezifische Immuntherapie (Checkpoint-Blockaden, adaptiver Zelltransfer, Tumorstoffe). Über die letzten Jahrzehnte hat sich die Immuntherapie bereits als wichtiger Teil der Therapie beispielsweise von metastasierten Melanomen oder Prostatakarzinomen etablieren können. Auch wenn noch nicht alle Hintergründe genau

erarbeitet sind, zeigt sie sich bei einem Teil dieser Patienten als lebenszeitverlängernd.[8, 9]

Patienten mit Glioblastom haben aus den zuletzt neuesten Errungenschaften in der Forschung im Bereich der Checkpointinhibitoren bisher nicht ausreichend profitieren können.[10] Eine sich ebenfalls immer weiter entwickelnde vielversprechende Möglichkeit der aktiven, spezifischen Immuntherapie ist die Gabe von autologen dendritischen Zellen, die beispielsweise mit autologem Tumorzelllysate beladen worden sind. Diese sogenannten Tumorzellen induzieren eine T-Zellantwort bzw. T-Zellaktivierung, sodass das körpereigene Immunsystem sich gegen die im Körper verbliebenen Tumorzellen richtet. Neben der Möglichkeit der Verwendung von Tumorzelllysate, Proteinen, DNA/RNA oder langen Peptiden als Antigenquelle, gibt es auch die Verwendung von kurzen Peptiden. Die erstgenannten Varianten benötigen eine intrazelluläre Prozessierung, haben jedoch den Vorteil, dass sie sowohl über HLA Klasse I als auch Klasse II Moleküle präsentiert werden und somit simultane CD4⁺ und CD8⁺-T-Zell-Antworten hervorrufen.[11] Kurze Peptide hingegen induzieren nur eine Antwort über CD8⁺-T-Zellen.

Neu ist die Verwendung von sogenannten Neoantigenen, welche z.B. in ersten Studien im Rahmen der Melanomtherapie bereits Anwendung finden.[12] Bei Ott et al. konnte sowohl eine Induktion von polyfunktionellen CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen gezeigt werden.

Als etablierteste Variante der Tumorzellen ist wohl die Verwendung von Tumorzelllysate als Antigenquelle anzusehen, welche bereits zahlreich in GMP-Protokollen verwendet wird.[13, 14] Zudem besteht hier der Vorteil das volle Repertoire der Neoantigene aus somatischen Mutationen zu erhalten, ohne die aufwendige Identifizierung dieser.[11]

1.2 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen (DCs) sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Körpers und spielen dadurch eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der T-Zellen und der resultierenden Immunantwort.[15-17] Sie stellen das Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort dar. Eine weitere wichtige Rolle spielen

sie in der Antitumorimmunantwort, indem sie neben B- und T-Zellen, als Teil des adaptiven Immunsystems, auch weitere Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren, wie beispielsweise natürliche Killerzellen (NKs). Als unreife dendritische Zellen, sogenannte immature DCs (iDC), erkennen sie körperfremde Pathogene und nehmen diese aktiv durch Phagozytose bzw. rezeptorvermittelte Endozytose, oder passiv durch Makropinozytose im peripheren Gewebe auf. Sie fungieren hier als Wächter, als Teil des angeborenen Immunsystems.[16] Die rezeptorvermittelte Aufnahme erfolgt beispielsweise über sogenannte Pattern recognition receptors (PRRs) wie C-Typ-Lektin-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren (TLRs).

Neben der Antigenerkennung und -aufnahme selbst, führen zahlreiche weitere Faktoren und Mechanismen wie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, bakterielle DNA, oder Lipopolysaccharide (LPS) zur Aktivierung und zum Beginn der Ausreifung der DCs in vivo.[18, 19] Im Laufe der Reifung erfahren sie verschiedene Veränderungen. So verlieren sie unter anderem die Rezeptoren für Endo- bzw. Phagozytose, es kommt zur Veränderung der Zellmorphologie, der Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren, sowie zur Vermehrung von kostimulatorischen Rezeptoren wie CD80 und CD86, welche wichtig für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen sind.[20] MHC (major histocompatibility) Komplexe werden hochreguliert.[21] In vivo hängt das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung vor allem von der Migrationsfähigkeit der DCs in die T-Zell-Regionen der Lymphknoten ab. Die Migration wird eingeleitet durch Hochregulation von Chemokin-Rezeptoren nach Antigenaufnahme, insbesondere des Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7). Der zugehörige Ligand 6CKine wird in den Lymphbahnen exprimiert, und führt folglich zu einer Migration der DCs in die Lymphbahnen, durch welche der Transport in die T-Zell-Regionen der sekundären Lymphorgane erfolgt.[22, 23]

Ein weiterer wichtiger Faktor für die T-Zell-Aktivierung ist der Reifungsgrad der DCs.[17] So besitzen nur reife Dendritische Zellen die Fähigkeit durch Antigenpräsentation T-Zellen zu aktivieren. Für den Zeitpunkt der Antigenaufnahme und Prozessierung sollten sie jedoch in einem unreifen Zustand vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass nur DCs mit einer nachweisbaren IL-12-Produktion Typ1-T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen aktivieren können, was in einer antigenspezifischen Interferon- γ -Ausschüttung resultiert.[24]

1.3 Antigenpräsentation dendritischer Zellen

Die von den dendritischen Zellen aufgenommenen Pathogene werden intrazellulär in Peptide zerlegt und über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Neben exogenen Antigenen können auch endogene Proteine präsentiert werden. Dies geschieht ständig und auf fast jeder Körperzelle. So ist auf der Zelloberfläche ein Spiegelbild der Zelle zu sehen. Die an die MHC-Moleküle gebundenen Antigene werden von T-Zellen erkannt. Endogene Antigene werden über MHC-I-Moleküle an $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert. Die $CD4^+$ -T-Zellen interagieren mit MHC-II-Molekülen: durch die Erkennung exogener Antigene in MHC-II-Molekülen wird die $CD4^+$ Aktivierung bzw. Proliferation angestoßen.[25] Neben diesem konventionellen Weg der Antigenpräsentation exogener Antigene über MHC II an $CD4^+$ -T-Zellen, besitzen DCs auch die Fähigkeit exogene Antigene über MHC I zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen zu präsentieren. Kommt es zu Veränderungen durch eine Entzündung oder Entartung, können spezifische zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen (CTL) ggf. diese alterierten Proteinmuster erkennen und die Apoptose einleiten. Auch bei Viruserkrankungen oder der Immunantwort gegen Tumoren kommt es zur Präsentation über MHC-I-Moleküle. Diese Aufnahme exogener Antigene in die dendritische Zelle und die Präsentation der exogenen Antigene über die MHC-I-Moleküle, anstatt MHC-II-Moleküle, an CTL wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Dies kann nur von DCs effektiv vollzogen werden. Die sogenannte Kreuzpräsentation, also Aktivierung von CTL durch exogene Antigene konnte schon 1976 von Bevan und seinen Mitarbeitern beschrieben werden.[26]

Die Kreuzpräsentation ist bedeutend für die exogene Antigenpräsentation von Proteinen und sogenannter long peptides an $CD8^+$ -T-Zellen.[27] Sie spielt jedoch nicht nur eine wichtige Rolle in der spezifischen Immunabwehr, sondern auch als Teil in der Entwicklung der Selbsttoleranz, dem Erkennen körpereigener Proteine. Die Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen auf MHC I kann also auch in einer $CD8^+$ -T-Zell-Toleranz resultieren. Dies geschieht in der Thymusdrüse, in der Thymozyten als Progenitoren der T-Zellen durch Kreuzpräsentation im Rahmen der negativen Selektion inaktiviert werden können bzw. deren Apoptose eingeleitet wird. Hiervon betroffen sind diejenigen Thymozyten welche eine hohe Affinität zu Peptiden aus körpereigenen Proteinen zeigen. [28] Dieser Vorgang dient dem Körper als Schutz, um starke Autoimmunreaktionen gegen den eigenen Körper zu verhindern.[29]

Die zentrale Rolle der DCs im Immunsystem machten sie schon früh zu einem interessanten Ansatzpunkt für Immuntherapien. Besonders die ersten Ideen zu Tumorstoffen wurden rasch weiterentwickelt und finden bereits Anwendung in klinischen Studien. Neben der *in vitro* Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation, spielen die Migrationsfähigkeit sowie die Fähigkeit zur T-Zellaktivierung eine entscheidende Rolle. In klinischen Studien werden die ersten Reifungsschritte der Monozyten in dendritische Zellen oft *in vitro* induziert, da der Reifungsprozess im Labor gut kontrolliert werden kann. Die weiteren Reifungsschritte können dann auch *in vivo*, d.h. im Körper des Patienten stattfinden. Vom Injektionsort müssen die DCs bis in die Lymphknoten migrieren, um mit den T-Zellen interagieren zu können. Um eine möglichst effektive Antitumorantwort hervorzurufen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Ausreifungscocktails erprobt, die zum Ziel hatten, ihnen möglichst viele der genannten Eigenschaften zu verleihen.[30] Bewährt hat sich die Isolation von Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen und deren Differenzierung zu unreifen DCs durch den Zusatz der Zytokine IL-4 und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Lange wurde, wie von Jonuleit und Kollegen vorgeschlagen, zur Ausreifung ein zytokinbasierter Cocktail, bestehend aus Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-1 β , IL-6 sowie Prostaglandin E₂ (PGE₂), verwendet.[30] In unserem eigenen, klinischen Vakzinierungsprogramm bei Hirntumoren haben wir bisher als Standard eine Kombination aus TNF α und IL-1 β verwendet, um GMP-konform DCs zu generieren.[13] Auch die Verwendung von Interferon γ (IFN γ) und Toll-like-Rezeptor (TLR)-Agonisten wie Poly I:C, R848 und LPS, welche zu DCs mit einer vermehrten Zytokinsekretion und Aktivierungsfähigkeit von cytotoxischen T-Zellen führt, wurden in verschiedenen Studien erprobt. Ebenso wie deren Kombination mit PGE₂, um eine erhöhte Migrationsfähigkeit zu erreichen.[17, 31]

1.4 PGE₂

PGE₂ (Prostaglandin E₂) gehört zur Gruppe der Prostaglandine, einer Untergruppe der Eicosanoide, welches in unserem Körper viele Vorgänge beeinflusst, vor allem bezogen auf Vorgänge im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen. Im Rahmen von

Tumorvakzinen wird PGE₂ bereits seit langem als Zusatz der Ausreifungscocktails erforscht. PGE₂ erhöht die Migrationsfähigkeit von DCs. Dies geschieht durch die Herabregulation der Podosomen der DCs welche für Adhäsionsfähigkeiten notwendig sind.[15] Eine gute Migrationsfähigkeit der DCs ist wichtig für den Transport in die sekundären Lymphorgane, und somit ein entscheidender Punkt für die optimale Funktion von DCs als Tumorvakzine. Jedoch zeigte sich auch, dass der Zusatz von PGE₂ zu einer erniedrigten Produktion von IL-12p70 führt, einem wichtigen Zytokin für die optimale Aktivierung von CD8⁺-T- sowie NK-Zellen.[17]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war es, verschiedene Ausreifungscocktails für dendritische Zellen, welche als Tumorvakzine verwendet werden sollen, zu untersuchen und zu modifizieren, um optimale DCs zu generieren. Diese sollten neben einer optimalen Migrationsfähigkeit, Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, sowie einer hohen Zytokinausschüttung (IL-12p), auch die Fähigkeit zur effektiven Kreuzpräsentation haben, um auch exogene Proteine besonders gut präsentieren zu können.

Für die Durchführung unserer Experimente wurden ein geeignetes Antigen sowie eine stabile T-Zell Population benötigt.

Als Modellsystem für unsere Experimente wurde ein bekanntermaßen stark immunogenes CMV-Epitop (pp65) verwendet. CMV-Antigene sind u.a. auch deshalb interessant, da vorangegangene Studien gezeigt haben, dass in 90 % der Glioblastome bei Erwachsenen CMV-Antigene nachweisbar sind.[32] Außerdem konnte in Experimenten nachgewiesen werden, dass HCMV (human cytomegalovirus infection) pp65-spezifische T-Zellen sich gegen Glioblastomzellen richten können. Dies und die Tatsache, dass 50-90 % unserer Bevölkerung CMV durchgemacht hat und damit über spezifische T-Zellen gegen CMV-Epitope verfügt, macht CMV zu einem für die Immuntherapie, vor allem bei Glioblastomen, interessanten Versuchsmodell. Durch die hohe Verbreitung innerhalb unserer Bevölkerung ist es leicht, CMV-spezifische Zellen zu isolieren und zu expandieren. Infizierte Personen weisen häufig hohe Frequenzen von CMV⁺ Effektor-

sowie auch Gedächtnis-T-Zellpopulationen mit i.d.R. stabilen Immunantworten nach T-Zell-Restimulation und T-Zell-Priming auf.[33]

Um dieses CMV-Modell für weiterführende Experimente nutzen zu können, wurden verschiedene Arten von CMVpp65 spezifischen T-Zellen erprobt: mehrere CMV⁺CD8⁺ T-Zelllinien sowie ein spezifischer T-Zellklon.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Ausreifungscocktails bzgl. der Generierung von DCs als Tumorstoffe zu validieren. Hierfür wurde der bereits in unserer Klinik verwendete Ausreifungscocktail, bestehend aus IL-1 β und TNF α , mit einem neuen Cocktail bestehend aus dem Toll-like-Rezeptor (TLR) 3 Liganden Poly I:C, dem TLR 7/8 Liganden R848 und Prostaglandin E2 (PGE₂) verglichen. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf den Einfluss von PGE₂ auf die Interaktionsfähigkeit der DCs mit T-Zellen gelegt werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde zwar oftmals die Auswirkung von PGE₂ auf den Phänotyp und die Zytokinproduktion der DCs untersucht, jedoch wurden die Auswirkungen von PGE₂ auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit bisher nicht berücksichtigt.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

Antikörper und Stimulantien:

- Anti-human HLA-A2-FITC (clone: BB7.2) Biolegend, 343304
- CD141 (BDC-A3) antibodies, human Miltenyi Biotech, 130-090-513
(clone: AD5-14H12)
- CD28 antibodies, human (clone:15E8) Miltenyi Biotech
- Alle weiteren FACS-Antikörper Beckton Dickinson
- Brefeldin A Sigma-Aldrich
- Ionomycin Sigma-Aldrich
- OKT3 Janssen-Cilag
- PMA (Phorbol-12-Myristal-13-Acetat) Sigma-Aldrich

Zytokine und Gewebshormone

- Prostaglandin E2 Sigma-Aldrich, P0409-1MG
- Poly I:C InvivoGen
- R848 (Resiquimod) InvivoGen, tlr1-r848-5
- rh GM-CSF CellGro/CellGenix 1412-050
- rh TNF α CellGro/CellGenix, 1406-050
- rh IL-1 β CellGro/CellGenix, 1411-050
- rh IL-2 CellGro/CellGenix, 1420-050
- rh IL-4 CellGro/CellGenix, 1403-050
- rh IL-7 CellGro/CellGenix, 1410-050
- rh IL-15 CellGro/CellGenix, 1413-050
- rh IL-21 BioLegend, 571204

Peptide, Proteine und Dextramere

- CMVpp65-Recombinant-Protein Miltenyi, 130-091-823
- PepTivator CMVpp65, human Miltenyi, 130-093-438
- MHC Dextramer A*0201/ NLVPMVATV/
APC, WB2132u

Medien/ Puffer und deren Zusätze

- Albumin (human) 5 % Solution
 - Bicol Separating Solution
 - Brefeldin A
 - CliniMACS PBS/EDTA Buffer
 - CryoStor CS5
 - Dextran 40 10 %, mit 0,9 % NaCl
 - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) without Ca⁺⁺/Mg⁺⁺
 - hitzeinaktiviertes FBS und 10 % DMSO
 - FACS Lysing Solution
 - Fix & Perm Buffer (PBS mit 1 % fetalem Kälberserum, 0,09 % NaN₃)
 - Fix & Perm Fixation Medium (Medium A)
 - Fix & Perm Permeabilization Medium (Medium B)
 - GMP Serum-free Dedritic Cell Medium (DC)
 - Humanserum „off the clot“ Typ AB
 - Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml
 - Pulmozyme (Dornase alfa) 2500 E./2,5ml
- Grifols
Biochrom GmbH
Sigma-Aldrich
Miltenyi Biotech, 700-25
Biolife Solutions, 205102
AlleMan Pharma
Sigma Aldrich D8537
- PAA Laboratories
BD Biosciences, 349202
Invitrogen/ ThermoFisher, GAS001S100
Invitrogen/ ThermoFisher, GAS001S100
Invitrogen
- Cellgro/ CellGenix
Biochrom, S01049.2-O,5
ThermoFisher Scientific, 15140-122
Roche

Geräte

- Biosafe Lagerbehälter
 - Countess cellcounting chamberslides
 - CO₂-Inkubator Heracell 150
 - Nalgene Mr. Frosty
 - Sicherheitswerkbank Herasafe
 - Zentrifuge Rotixa 50 RS
- Cryotherm
Thermo Fisher Scientific™, C10228
Thermo Scientific™
Sigma-Aldrich
Thermo Scientific™
Hettich

Hardware

- Cell cultur plates 12 wells Greiner CELLSTAR
 - Cell cultur plates 48 wells Greiner CELLSTAR
 - Cell cultur plates 96 wells round bottom
 - Countess Cell Countin Chamber Slides
 - MACS Säulen MS/LS/LD
 - Zellkultur- Multischalen 6 wells Nuns
 - Zellsieb Falcon 70 µm
- Sigma-Aldrich, M8687
Sigma-Aldrich, M8937
Sigma-Aldrich, CLS3799-50EA
Invitrogen, C10283
Miltenyi Biotech, 130-042-201/-401/-901
Thermo Scientific, 140675
Corning, 352350

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

Alle Waschschriffe wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Zentrifuge (Rotixa 50 RS, Hettich) bei 400 g für 10 Minuten mit Bremse durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen mit Verwendung von sterilem Einwegmaterial und unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Eine Ausnahme stellten die Färbeschritte vor den FACS-Messungen dar, da die verwendeten Zellen danach verworfen wurden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und bei 37 °C.

2.2.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)

Die PBMCs wurden aus anonymisierten Restzellen gesunder Spender gewonnen, die als nicht verwendetes Nebenprodukt bei Thrombozytenspenden mit einem leukozytenreduzierenden System (LRS-Kammern) anfallen und sich als etablierte Quelle für menschliche Lymphozyten eignen.[34] Zur Verfügung gestellt wurden die LRS-Kammern vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg. Ihre Benutzung zu Forschungszwecken benötigt kein Ethik-Votum.

Die Auftrennung des Blutes in seine verschiedenen Fraktionen wurde mittels Ficoll-Dichtegradienten durchgeführt. Zunächst wurden die Proben aus den Blutzapfen entnommen und im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Zuvor vorgelegte Bicoll-Lösung wurde mit der Blutsuspension vorsichtig überschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 400 g ohne Bremse, unter Raumtemperatur, wurde die lymphomonozytäre Interphase entnommen. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen in Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels einem ADVIA 120 Hämatologie System bestimmt.[35]

2.2.3 CMV und HLA-Typisierung der Spenderzellen

Für die Durchführung der Experimente war es wichtig zu wissen, ob die Spenderzellen HLA-A2 und CMV positiv sind, da das zur Stimulierung der T-Zellen verwendete CMVpp65-Peptid HLA-A2-restringiert ist.

Für die HLA-Typisierung wurden hierzu entweder 50 µl Blut direkt aus den LRS-Kammern entnommen und mit 50 µl PBS verdünnt oder 100 µl nach der Leukozytenisolierung aus den resuspendierten PBMCs entnommen. Je 2 µl HLA-A2-FITC, CD8 und CD56 Antikörper wurden hinzugefügt und der Ansatz für 15 Minuten im Dunkeln bei 4-8 °C inkubiert. Bei Messung direkt aus dem Blut wurden 2 ml FACS-Lyse-Puffer hinzu pipettiert und die Probe nochmals für 10 Minuten dunkel gestellt. Nach der Inkubation wurden dem Ansatz 2 ml PBS hinzugefügt und mit 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde nochmal wiederholt, danach das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert und die FACS-Analyse durchgeführt.

Zur Testung des CMV-Status wurden ebenfalls 100 µl der der frisch isolierten PBMCs in ein FACS-Röhrchen überführt. Allerdings wurde die Probe vor der Färbung einmalig gewaschen und in 100 µl PBS mit 5 % Humanserum resuspendiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Es wurden je 2,5 µl CMV-Dextramer-APC hinzugefügt, gevortext und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Weitere Antikörper wie CD8-FITC und CD56-PE konnten nun entsprechend den Vorgängen der HLA-A2 Färbung hinzugefügt werden. Ebenfalls wurde eine Vitalitätsprüfung mit 20 µl 7AAD-PerCP durchgeführt.

Nur Spender die sowohl eine sichtbare CMV-Dextramer⁺-Zellpopulation als auch mehr als 0,2 % Dextramer⁺CD8⁺ Zellen aufwiesen, wurden als CMV-positiv eingeordnet.

Tabelle 1: Färbeschema HLA-A2 und CMV-Färbung im FACS

	APC	FITC	PE	PERCP
HLA-BESTIMMUNG	CD8-APC	HLA-A2-FITC	CD56-PE	7AAD
CMV-BESTIMMUNG	CMV-APC	CD8-FITC	CD56-PE	7AAD

2.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um bei der zeitlichen Einteilung der Experimente unabhängig vom Spendezeitpunkt zu sein, wurden einzelne Proben eingefroren bzw. kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut.

Das wegen seiner guten Auswirkung auf Vitalität und Funktionalität der T-Zellen verwendete Einfriermedium enthielt 10 % DMSO und 90 % hitzeinaktiviertes FBS, und wurde nach Protokoll bereits im Voraus hergestellt.[36] Nicht zeitnah nach Ficollisierung verwendete mononukleäre Zellen wurden gewaschen und zum Einfrieren in Aliquots à 1×10^8 Zellen in je 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese wurden für 48 Stunden bis zum Erreichen von $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene/Invitrogen) in einem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Kühlschrank eingefroren, der die Proben mit $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Stunde herunterkühlt, und anschließend zur Lagerung bei $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen einzelner Proben wurde ein Auftauprotokoll, angelehnt an die von Rubinstein veröffentlichte Anleitung, verwendet. Die Kryoproben wurden während der tropfenweisen Zugabe von mindestens demselben Volumen kalten Auftaumediums, bestehend aus PBS mit 5 % humanem Serumalbumin, 5 % Dextran 40 und 10 U/ml DNase vorsichtig erwärmt. Sobald die Proben vollständig verflüssigt waren konnten auch mehrere Proben desselben Spenders gepoolt werden, gefolgt von einem Waschschrift von 10 Minuten bei 1330 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge, um das DMSO haltige Einfriermedium zu entfernen. Das Pellet wurde vorsichtig nochmals in Auftaumedium resuspendiert und die Zellsuspension für 15 Minuten auf Eis gestellt.

Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen nach Protokoll weiterverarbeitet werden.

2.2.5 Generierung eines HLA-A2⁺CD8⁺ CMV⁺ T-Zellklons

Als Ausgangszellen dienten je ein Vial einer eingefrorenen Probe eines HLA-A2⁺ Spenders mit 1×10^8 PBMCs. Nach dem Auftauen wurde die Zellzahl erneut bestimmt. Die Zellen wurden einem weiteren Waschschrift mit 5-minütiger Zentrifugation bei 400 g unterzogen. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in

CellGrow-Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 5 % Humanserum (=T-Zellmedium), entsprechend der zuvor bestimmten Zellzahl resuspendiert, so dass die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml vorlagen. Nach einer zweistündigen Ruhephase im Brutschrank wurde die Höhe der CD8⁺CMV⁺ Ausgangspopulation mit einer FACS-Messung bestimmt. Zur besseren Beurteilung der Zellen wurde außerdem CD56 mitgefärbt sowie 7AAD zur Prüfung der Vitalität beigefügt.

War die CD8⁺CMV⁺ Zellpopulation nach 7 Tagen in Kultur in T-Zell-Medium sowie IL-2 (1 µg/ml) und IL-7 (10 ng/ml), unter Restimulation mit hCMV-A pp65 Peptid auf circa 10 % angestiegen, wurden die Zellen weiterverwendet. Sie wurden einem Einzelzellsort auf CD8 und CMV doppelt positive T-Zellen, mit einem FACS ARIA III, unterzogen. Zuvor mussten die Zellen mit Antikörpern sowie dem CMV-Dextramer angefärbt werden. Hierfür wurden alle Zellen abgeerntet und in ein 50 ml Falcon gegeben, welcher auf 50 ml mit PBS aufgefüllt wurde, um die Zellen zu waschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS mit 5 % Humanserum resuspendiert und zunächst 7,5 µl des CMV Dextramers hinzugegeben. Die weitere Färbung erfolgte gemäß der Vorgehensweise und der Art der Antikörper der erstmaligen Färbung zu Beginn. Nach der Inkubation aller Antikörper wurde die Zellsuspension zweimalig gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet in T-Zellmedium resuspendiert, sodass die Zellsuspension eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml hatte. Kurz vor dem Zellsort wurden die Zellen über ein Zellsieb mit 70 µm Porendurchmesser gegeben, um etwaige Zellklumpen während des Zellsorts zu vermeiden, und für den Transport auf Eis gestellt. Je eine Zelle wurde in ein Well einer 96 Wellplatte gesortet. In allen Wells dieser Platte befanden sich zuvor bereits je 10.000 mit 30 Gy bestrahlte PBMCs als Feederzellen.

Im weiteren Verlauf wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt. Es handelte sich um CellGrow-Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin, 5 % Humanserum, 100 U IL-2/ml sowie 1 µl/ml OKT3 (muriner monoklonaler Antikörper gegen CD3). Alle 2-3 Wochen kamen beim Mediumwechsel erneut mit CMV beladene und mit 30 Gy bestrahlte allogene Feederzellen (PBMCs) hinzu. Die Feederzellen waren zuvor von 4 verschiedenen Spendern gepoolt und bis zur Verwendung kryokonserviert worden.

Bei sichtbarer Vergrößerung der Zellpellets am Boden der einzelnen Wells wurden die Zellen geteilt. Nach 4 Wochen wurde eine Kontrollmessung der CD8⁺/CMV⁺ T-Zell Population durchgeführt, wobei aufgrund der noch bestehenden Überzahl der unspezifischen Feederzellen noch keine sichtbare Population zu erwarten war. Nach weiteren 4 Wochen erfolgte eine weitere Kontrollmessung. Proliferierende Klone wurden auf Platten mit größeren Wells transferiert.

2.2.6 Generierung einer CD8⁺CMV⁺-T-Zelllinie über CD137-Selektion

Über eine CD137-Selektion wurden aktivierte T-Zellen isoliert, in diesem Fall handelte es sich um mit CMV-Peptid restimulierte T-Memory-Zellen.

Als Ausgangsmaterial dienten wiederum frisch aufgetaute PBMCs eines HLA-A2⁺ Spenders. Direkt nach dem Auftauen wurde eine FACS-Messung durchgeführt, um die Ausgangsgröße der CD8⁺/CMV⁺ Population sowie die CD137-Aktivität zu bestimmen. War eine CMV-Dextramer⁺ Population klar zu erkennen, wurde mit den gesamten Zellen ein Ficoll zum Entfernen etwaiger toter Zellen durchgeführt, anschließend die Zellzahl bestimmt und die Zellen in frischem Cellgrow-Medium mit 1 µg/ml CMV-Peptid, für eine 24stündige Stimulation, resuspendiert. Außerdem wurde 1 µl/ml CD28-Antikörper hinzugegeben, um anstelle von DCs über den CD80- und CD86-Rezeptor die T-Zellaktivierung zu unterstützen.[37] Führte die Stimulation zum Anstieg der CD137⁺ Zellen, wurden Antigen reaktive T-Zellen mit Hilfe eines CD137 MicroBead Kits von Miltenyi Biotec isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Zellen der CD137⁺ Fraktion wurden in Cellgrow Medium mit 5 % Humanserum, 1 % Penicillin-Streptomycin; 5 ng/ml rIL-7, 5 ng/ml rIL-15 und 10 ng/ml rIL-21 aufgenommen. Außerdem wurde die Selektion noch durch eine FACS-Kontrolle bestätigt. Um die Reinheit der CD137 Population zu erhöhen, erfolgte in manchen Fällen eine weitere Aufreinigung über eine zweite Säule. Um die Zellen weiter proliferieren zu lassen wurden sie in Kultur genommen. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Mengen der Zytokine durchgeführt. Nach 6 Tagen wurden die Zellen gewaschen, die Zellzahl bestimmt, wieder ausplattiert und für weitere 3 Tage kultiviert. Nach 9 Tagen wurden die Zellen mit zwei Tagen zuvor aufgetauten, bestrahlt und mit

CMV-Peptid beladenen PBMCs als Feeder in Kokultur gebracht. Zur Unterstützung der Restimulation wurde wiederum CD28-Antikörper hinzugefügt. Bei guter Proliferation wurden die Zellen nach einer weiteren Woche in Kultur für die Kreuzpräsentationsexperimente entweder gleich verwendet oder portionsweise eingefroren.

Tabelle 2: Färbeschema für FACS-Messung zur Kontrolle der Aktivierung der T-Zellen

	APC	FITC	PE	PERCP
1	CD3	CD45RO	CD137	CD8
2	CMV	CD45RO	CD137	CD8
3	CD62L	CD45RO	CD137	CD8

2.2.7 Herstellung und Ausreifung dendritischer Zellen

Die Isolierung der Monozyten als dendritische Vorläuferzellen erfolgte über Plattenadhärenz. Hierfür wurden 5×10^7 PBMCs in 8 ml DC-Medium resuspendiert und je zur Hälfte in eine kleine Kulturflasche gefüllt. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen entfernt, und die Flasche nochmal zur Erhöhung der Reinheit der adhärenen Zellen vorsichtig mit PBS gespült. Die adhärenen Zellen wurden anschließend wieder mit je 4 ml DC-Medium überschichtet, und wieder im Brutschrank inkubiert. Das Medium enthielt außerdem je 1000 U/ml IL-4 und GM-CSF, welche die Differenzierung von Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs) fördern.[38, 39] An Tag 2 und 4 (der Tag der Ausplattierung wird als Tag 0 gerechnet) wurden je 2 ml des Mediums gegen frisches DC-Medium mit der für das gesamte Volumen ausreichenden Menge IL-4 und GM-CSF ausgetauscht. An Tag 6 wurden die unausgereiften DCs geerntet. Zunächst wurde der Überstand gesammelt, die Flaschen nochmals mit PBS gefüllt und für 20 Minuten auf Eis gestellt, um die noch adhärenen Zellen besser lösen zu können. Die abgelösten Zellen wurden zu den Zellen aus dem Überstand hinzugegeben, gewaschen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen in verschiedene Platten mit entsprechender Zellzahl wieder ausgesät. Anschließend wurden die noch unreifen DCs nach Protokoll mit verschiedenen Ausreifungscocktails je

16 Stunden stimuliert. Unstimulierte Kontrollen bekamen keine weiteren Zusätze außer weiterhin IL-4 und GM-CSF (Abbildung 1).

Solche aus Monozyten gewonnenen DCs werden in der englischen Literatur als sogenannte „Monocyte derived dendritic cells“ (MoDCs) bezeichnet.

Tabelle 3: Zusammensetzung Ausreifungscocktails für DCs

	Zytokine	Konzentration
Cocktail 1	IL-1 β	2000 U/ml
	TNF α	1000 U/ml
Cocktail 2	R848	3 μ g/ml
	Poly-I:C	20 μ g/ml
	PGE ₂	10 μ g/ml
Ausreifung CD141 DCs	Poly-I:C	20 μ g/ml

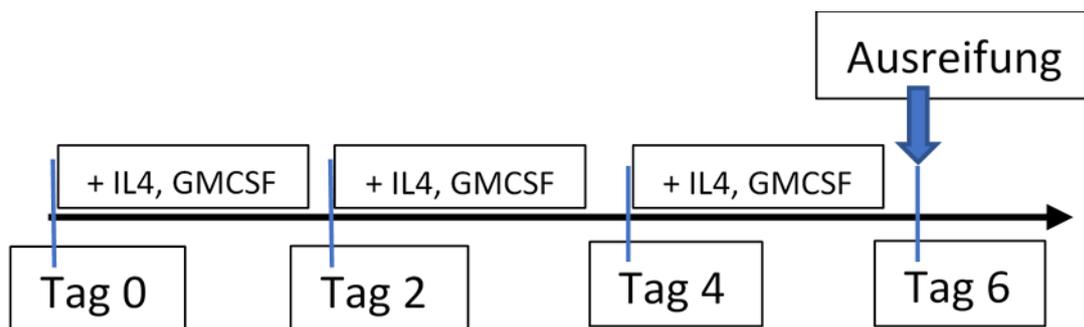


Abbildung 1: Kultur und Ausreifung der MoDC im zeitlichen Ablauf

Der Tag 0 entspricht dem Tag Isolierung der Monozyten aus den PBMCs, nach Plattenadherenz, und anschließender in Kulturnahme. An Tag 2 und 4 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel mit erneuter Hinzugabe von IL-4 und GM-CSF. An Tag 6 erfolgte das Lösen der MoDCs und die anschließende Ausreifung mit verschiedenen Ausreifungscocktails über 16 Stunden.

2.2.8 Isolierung von CD8⁺ Zellen über Magnetsäule

Frische oder nach Protokoll aufgetaute PBMCs wurden für 2 Stunden in frischem Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % Humanserum bei 37 °C inkubiert. Die nicht adhärenente Fraktion wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und über Nacht

in Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 5 % Humanserum (ab jetzt als T-Zellmedium bezeichnet) kultiviert. Außerdem wurden 50 U/ml IL-2 hinzugegeben.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels magnetischer Separation aufgereinigt. Hierzu wurde ein CD8⁺ Isolations Kit von Miltenyi verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Wahlweise erfolgte die Separation auch direkt aus frisch gewonnenen PBMCs.

2.2.9 Isolierung von CD141 (BDCA-3) DCs über Magnetsäule

Ausgangsmaterial waren kryokonservierte PBMCs. Direkt nach dem Auftauen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, um tote Zellen abzutrennen. Die restlichen Zellen wurden über ein 70 µm Sieb laufengelassen, um mögliche, beim Auftauen entstandene Zellklumpen, zu entfernen, welche die Magnetsäule verstopfen könnten. Nach der darauffolgenden Zellzahlbestimmung mittels ADVIA wurden 1×10^9 Zellen für die Aufreinigung entnommen, gewaschen und in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Für die magnetische Separation wurde das CD141 (BDCA-3) MicroBead Kit, human von Miltenyi benützt. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die hohe Ausgangszellzahl ist notwendig, da nur eine kleine Subpopulation der dendritischen Zellen des menschlichen Blutes CD141 (BDCA-3) exprimiert (circa 0,04 % aller PBMCs). In einer Vormessung wurde deshalb vor der Isolierung eine FACS-Kontrolle durchgeführt (Abbildung 2), um sicherzustellen, dass eine ausreichende Population vorhanden ist. Für die Zellzahlmessungen nach der Isolierung wurden Neubauer Zählkammern verwendet.

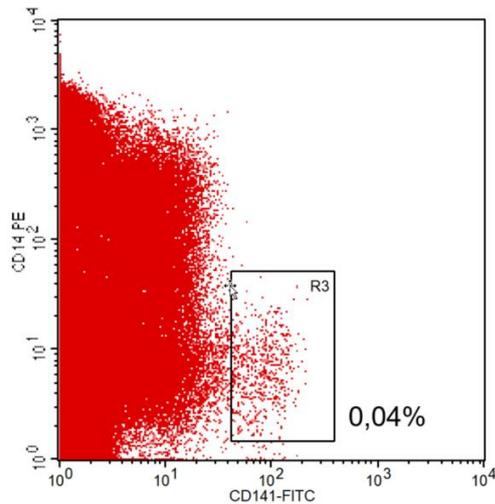


Abbildung 2: CD141 (BDCA-3) Population

FACS-Kontrollmessung vor CD141 Isolierung über Magnetsäule. R3 zeigt die CD141/CD14 doppelpositiven Zellen.

2.2.10 Kreuzpräsentationsversuch

Ein kompletter Durchlauf eines Kreuzpräsentationsversuchs dauerte 7 Tage.

Begonnen wurde an Tag 0 mit dem Auftauen der PBMCs zur Herstellung der DCs wie oben beschrieben. Zur Ausreifung wurden ebenfalls wieder der Cocktail 1 (IL-1 β , TNF α) sowie der Cocktail 2 (R848, Poly I:C, PGE₂) verwendet. In einigen bestimmten Experimenten wurde PGE₂ aus Cocktail 2 entfernt, dies ist in den jeweiligen Versuchen erwähnt. Die zuvor frisch aufgereinigten CD141 positiven DCs wurden mit Poly I:C ausgereift, im Verlauf als Cocktail 3 bezeichnet.

Als Positivkontrolle wurden mit Protein beladene CD141 DC verwendet. Zur Kontrolle der Produktionsfähigkeit von IFN γ und TNF α dienten außerdem eine Bedingung ohne CMV-Stimulation mit PMA/Ionomycin. Für die Negativkontrollen wurden CD8⁺-T-Zellen verwendet, welche jedoch nicht CMV spezifisch waren und somit größtenteils bei einmaliger CMV Stimulation in der Kokultur mit einer zu vernachlässigender IFN γ - bzw. TNF α -Produktion reagieren. Je Ausreifungscocktail 1 und 2 der DCs wurde jeweils eine Bedingung mit CMV-Peptid-beladenen DCs, sowie eine mit CMV-Protein beladenen DCs durchgeführt.

2.2.10.1 Kokultur

Die Kokultur von DCs und T-Zellen wurde 7 Stunden vor der intrazellulären Färbung des Versuchsansatzes begonnen. Bereits 24 Stunden vor Beginn wurden für einzelne Bedingungen die DCs mit 10 µl/ml mit CMV-Protein beladen, um den DCs genügend Zeit zu geben, das Protein zu prozessieren und auf der Zelloberfläche über MHC I präsentieren zu können. Die Kokultur fand im Verhältnis 1:4 statt, wobei 50.000 DCs auf 200.000 CD8⁺-T-Zellen kamen.

Hierfür wurden die sich noch in Kulturflaschen befindlichen DCs abgeerntet und deren genaue Zellzahl bestimmt. Je 50.000 DCs gelöst in 100 µl T-Zellmedium ohne Zytokine wurden in je eine Vertiefung einer 96-Well Platte vorgelegt. Auch die am selben Tag frisch aufgereinigten CD141 (BDCA-3) DCs wurden à 50.000 Zellen in 2 Wells für die Positivkontrollen verteilt. Je nach Bedingung wurden die DCs mit dem entsprechenden Cocktail ausgereift. 8 Stunden später wurden auch die CMV⁺CD8⁺-T-Zellen sowie die für CMV unspezifischen CD8⁺-T-Zellen für die Negativkontrollen geerntet. Die Zellzahl wurde bestimmt und die T-Zellen in entsprechender Menge T-Zell-Medium resuspendiert, sodass je Bedingung 100 µl T-Zellen zu den DCs in Kokultur gegeben werden konnten. Zusätzlich enthielt das Medium Brefeldin A für die intrazelluläre Färbung. Zu einigen Bedingungen, die zuvor noch kein Protein bekommen hatten, wurde noch 1h vor Beginn der Kokultur 1 µl/ml CMV-Peptid hinzupipettiert. Die sich in Kokultur befindlichen Zellen wurden über Nacht (7 h) im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

2.2.10.2 Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre Färbung wurde 7 Stunden nach Beginn der Kokultur begonnen. Die Zugabe von 1 µl/ml Brefeldin A bereits zu Beginn der Kokultur führt zur Beeinträchtigung des vesikulären Transportes und somit zur Anreicherung der induzierten Enzyme und der Blockade der Zytokinsekretion.[40] Nach der Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgeerntet und je Bedingung des Experiments in ein FACS-Röhrchen überführt, gewaschen und in je in 200 µl PBS mit 5 % Humanserum resuspendiert. Zu allen Röhrchen, bis auf die mitlaufende ungefärbte Leerprobe, sowie der Positivkontrolle mit Ionomycin und PMA, wurden je 2,5 µl CMV-Dextramer-APC hinzu pipettiert. Nach darauffolgender 15-minütiger Inkubation wurden je 2,5 µl CD8

PerCP hinzugefügt und wiederum für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml PBS-Fix & Perm wurden die Proben gevortext und abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet je in 100 µl Fix & Perm Medium A resuspendiert und für weitere 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der vorherige Waschschrift mit 2 ml PBS-Fix & Perm wiederholt und das Pellet in je 100 µl Fix & Perm Medium B resuspendiert. Zusätzlich wurden je 2 µl anti-TNF α -FITC und anti-IFN γ -PE Antikörper hinzupipettiert, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach letztmaligem Hinzugeben von 2 ml PBS-Fix & Perm, sowie Vortexen, Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet je FACS-Röhrchen in 500 µl PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse auf Eis bereitgestellt.

Tabelle 4: Färbeschema für die FACS-Messungen im Rahmen der Kreuzpräsentationsversuche

	APC	FITC	PE	PERCP	ZUSÄTZE
KONTROLLE CMV-POPULATION UNGEFÄRBT	CMV	CD8	CD56	7AAD	---
PMA/IO- KONTROLLE	CMV	TNF α	IFN γ	CD8	Brefeldin A Brefeldin A PMA Ionomycin
INTRAZELLULÄR- FÄRBUNG	CMV	TNF α	IFN γ	CD8	Brefeldin A je nach Bedingung CMV-Peptid/Protein/---

2.2.11 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Versuche erfolgt über die Berechnung des arithmetischen Mittels sowie dem SEM (Standard Error of the Mean). Die graphische Darstellung und rechnerische Auswertung erfolgte über Microsoft Excel sowie Prism GraphPad. Die Auswertung der FACS Daten wurde mit Hilfe des Programmes CellQuestPro durchgeführt. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test verwendet für die Unterschiede innerhalb einer Gruppe. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 DC Ausreifung

Bei beiden Ausreifungscocktails 1 und 2 konnte auf den reifen DCs im Vergleich zu den iDCs eine Heraufregulation von Reifemarkern festgestellt werden. In der Auswertung der FACS-Messung ergab sich ein klarer Anstieg der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), welche für die T-Zell-Aktivierung nötig sind, sowie der Verlust von CD14.

Der Anteil der CD86/CD80 doppelt positiven Zellen (gated auf 7AAD⁻/CD14⁻ vitale DCs) lag 16 Stunden nach Ausreifung mit Cocktail 1 bei $82,9 \pm 11,1$ % und mit Cocktail 2 bei $88,0 \pm 14,3$ % (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

3.2 Generierung eines T-Zellklones

Initial wurden n= 4 Spender gescreent, ein Spender wurde bereits vor dem Zellsort auf CD8/CMV-Dextramer doppelte positive T-Zellen aufgrund zu geringer Zellzahlen ausgeschlossen. Die komplette Kulturzeit wurde also mit n= 3 Spendern durchgeführt. Bei 2 von 3 Spendern ergaben sich nach dem Zellsort je eine 96-Well Platte mit je einer CD8⁺CMV⁺Zelle pro Well sowie auf einer weiteren Platte je nach Zellzahl einige Wells mit 10 bzw. 100 Zellen als Proliferationskontrolle. Bei einem der drei Spender konnten aufgrund der geringen Zellzahl nur wenige Wells weiter kultiviert werden.

Nach 7 Wochen (nach 3 Restimulationen) zeigten sich erstmals in der mikroskopischen Kontrolle sichtbare Vergrößerungen einzelner Zellpellets am Boden der 96-Well Platten bei 2 von 3 Spendern. Das verstärkte den schon in den Wochen vorher im Mikroskop, durch sichtbare einzelne Proliferationscluster, gewonnenen Eindruck der Proliferation. Nach Messung der Zellzahl aus je drei verschiedenen Wells ergab sich im Mittel eine Zellzahl von 4.000 Zellen pro Ausgangswell. Trotz der Vermutung, dass zu diesem Zeitpunkt (zwei Wochen nach der letzten Hinzugabe von Feeder Zellen) auch diese noch in der Zellzahl enthalten sind, wurde entschieden eine FACS-Messung durchzuführen. Außerdem wurden die zellichten Wells geteilt. Es wurde je eines der beiden nach Teilung entstandenen Wells gefärbt und gemessen.

Bei einer der Platten der drei Spender wurden 5 Wells identifiziert, die eine klare CMV-Dextramer spezifische CD8⁺-T-Zellpopulation aufwiesen. Da durch den

vorangegangenen Einzelzellsort nur von je einer CD8⁺CMV⁺ Progenitorzelle auszugehen ist, und alle Feederzellen durch eine 30 Gy Bestrahlung teilungsunfähig waren, gingen wir davon aus, dass es sich bei den Populationen um echte CMV-spezifische CD8⁺-T-Zellklone handelt.

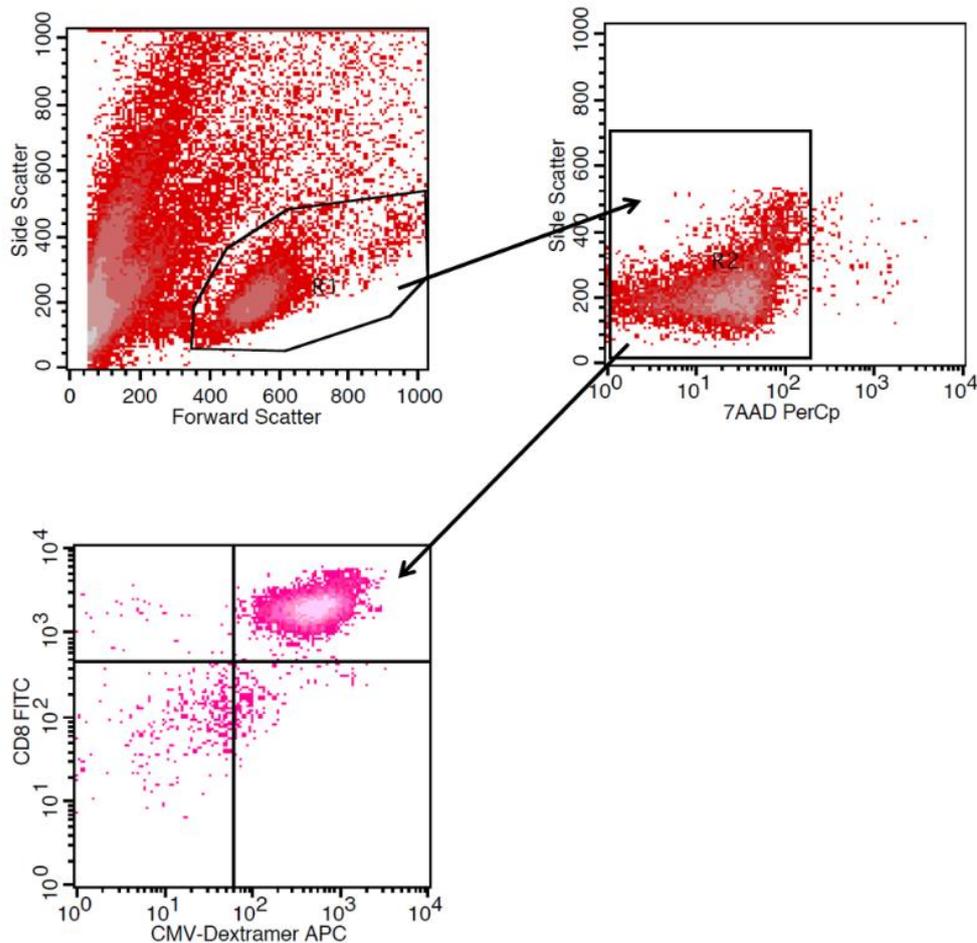


Abbildung 3: CD8⁺/CMV⁺ T-Zellklon in FACS-Messung

Zunächst wurden die Zellen nach Granularität und Größe im SSC und FSC beurteilt und eine lymphozytäre Zellpopulation identifiziert. Diese wurde als R1 definiert und im zweiten Schritt durch Ausschluss der toten Zellen mit 7AAD die vitalen Zellen als R2 definiert. R2 wurde zuletzt auf CD8⁺ Zellen sowie CMV-Dextramer⁺ Zellen untersucht. Die Population des T-Zellklons ist im oberen rechten Quadranten des letzten Dotplots dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei 2 von 3 Spendern nach dem Einzelzellsort eine Zellproliferation beobachtet werden konnte. Bei einem dieser beiden Spender konnten stabile Klone im FACS gemessen werden.

Leider konnten die gewonnenen Klone nicht für die weiterführenden Kreuzpräsentationsexperimente genutzt werden, da es im Laufe der Zellkultur zu einer bakteriellen Kontamination kam.

Dankenswerterweise konnte uns die AG Falkenberg (Leiden, NL) einen T-Zellklon ersatzweise für die weiterführenden Experimente zur Verfügung stellen.

3.3 Generierung einer T-Zelllinie

Nach der bakteriellen Kontamination unseres T-Zellklons entschieden wir uns, für die Kreuzpräsentationsexperimente eine weitere T-Zelllinie zu generieren. Hierfür benutzten wir wiederum PBMCs eines HLA-A2⁺ Spenders, der gleichzeitig auch CMV⁺ T-Zellen aufwies.

Zeigte sich nach der Aufreinigung der PBMCs noch eine eher schwache Population an CD137 positiven Zellen, auch mit einer Reinheit von nur ca. 40 %, so stellte sich nach 9 Tagen Kultur eine herausragende Vermehrung der antigenspezifischen Zellen dar.

Bei der FACS-Analyse direkt nach der Aufreinigung zeigte sich nicht nur eine Expression von CD137 sondern auch von CD45RO, was dafür spricht, dass die isolierten T-Zellen durch die vorherige Restimulation mit CMV-Peptid aktiviert worden sind und es sich um Gedächtnis-T-Zellen handelt und nicht um naive T-Zellen.[41]

Im Verlauf zeigte sich bei der Kontrolle im Mikroskop eine stetig wachsende Zellpopulation. Da die als Feeder hinzugegebenen PBMCs mit 30 Gy bestrahlt wurden, und somit teilungsunfähig waren, war davon auszugehen, dass es sich bei den sich vermehrenden Zellen um aktivierte T-Zellen handelt. Bei einem am 9. Tag durchgeführten FACS bestätigte sich eine deutlich abzugrenzende CD8/CMV-Dextramer doppelt positive Population. Zeitgleich kam es zu einem Verlust der CD62L-Expression (Abbildung 4). Außerdem waren die T-Zellen zum großen Teil CD45RA negativ. Es handelte sich zu diesem Zeitpunkt also um CD45RA⁻, CD62L⁻, CD45RO⁺ Zellen, welche nicht mehr als sogenannte central memory Tcells (T_{CM}) sondern als effector memory T-cells (T_{EM}) bezeichnet werden können (Abbildung 3).

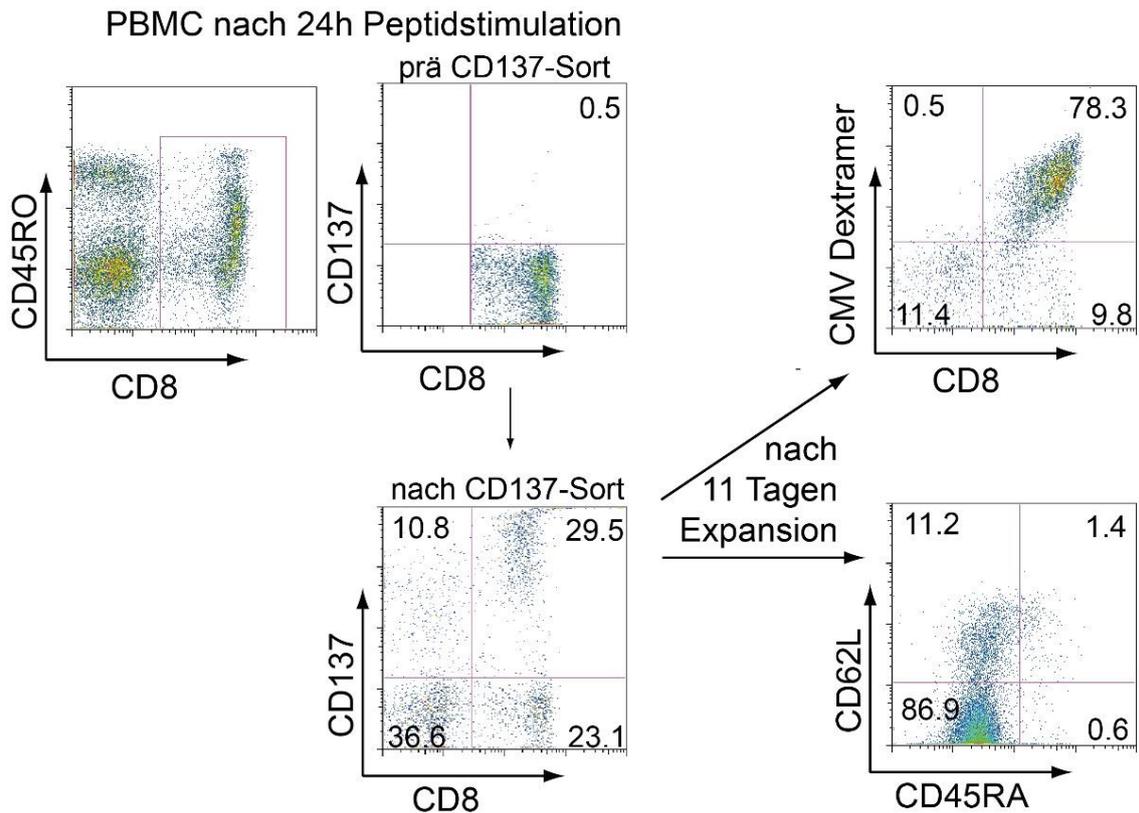


Abbildung 4: CD137⁺ T-Zelllinie

Für die CD8⁺CMVpp65-spezifische Responder-T-Zelllinien wurden von gesunden CMV-seropositiven Spendern nach 24h Peptidstimulation, CD137-MACS-Sortierung, Restimulation und Expansion generiert. Repräsentative FACS-Plots veranschaulichen die wichtigsten Schritte bei der Generierung der Zelllinien. Für die FACS-Auswertungen wurden die Zellen je zunächst nach Granularität und Größe gegatet. Die als Lymphozyten identifizierte Population als R1 bezeichnet und nach CD3⁺ sowie CD8⁺ Zellen beurteilt. Die doppelt positiven wurden als R2 gewählt und schließlich auf das Vorhandensein von CD62L, sowie CD45RA untersucht.

Außerdem zeigte sich der Effekt, dass die Fluoreszenzintensität der CD8-Expression auf CMV-Dextramer⁺ Zellen im Lauf der Kultur abnahm. Zeitweise erschien die CD8⁺ Population zweigeteilt wie in Abbildung 5 in R2 dargestellt. Die Zellen waren jedoch durch die Verwendung einer CD8 ungefärbten Probe weiterhin eindeutig als CD8 positiv zu werten (also eine hoch und eine niedrig positive Population). Außerdem waren alle CMV-positiven Zellen in dieser Population zu finden (hier nicht dargestellt).

Die so hergestellte T-Zelllinie zeigte sich auch nach Einfrieren und Wiederauftauen funktional. Der Anteil der im FACS 7AAD^{neg} vitalen Zellen nach Ficoll lag bei über 90 %. Nach Restimulation mit CMV-Peptid und Feeder-Zellen lag die Reinheit der CMV⁺ Zellen, gegatet auf die lebenden CD8⁺ T-Zellen, bei 94 %.

Parallel zu unserer eigenen T-Zelllinie wurde uns außerdem von der Arbeitsgemeinschaft Grigoleit eine weitere CMV⁺ T-Zelllinie zur Verfügung gestellt.

3.4 Kreuzpräsentationsversuche

In unseren abschließenden Experimenten zur Beantwortung der primären Arbeitshypothese wollten wir herausfinden, ob die verschiedenen Ausreifungscocktails die Kreuzpräsentationsfähigkeit der dendritischen Zellen beeinflussen. Hierfür wurden unreife DCs, welche sich in ihrem phagozytischen Stadium befinden, mit einem CMVpp65-Protein inkubiert und anschließend mit den verschiedenen Cocktails ausgereift. Zusätzlich wurden parallel je, mit denselben Cocktails ausgereifte DCs mit einem CMV-Peptid beladen (in diesen Kontrollwells ist die intrazelluläre Prozessierung irrelevant). Anschließend wurden die DCs in Kokultur mit den T-Zellen gebracht. Bei den T-Zellen handelte es sich je nach Durchlauf um entweder eine von den zwei CMVpp65 spezifischen T-Zelllinien oder um den T-Zellklon.

Als Readout für die Kreuzpräsentation der dendritischen Zellen wurde die Frequenz der IFN γ /TNF α produzierenden CD8⁺-T-Zellen (multifunktionelle T-Zellen) gemessen. Dafür erfolgte nach 7 Stunden Kokultur von DCs und CMVpp65 spezifischen T-Zellen, und extrazellulärer Färbung mit CD8-Antikörper und CMV-Dextramer sowie intrazellulärer Färbung mit IFN γ und TNF α eine FACS-Messung. Die Zellen wurden nach dem in Abbildung 5 abgebildeten Schema gegatet.

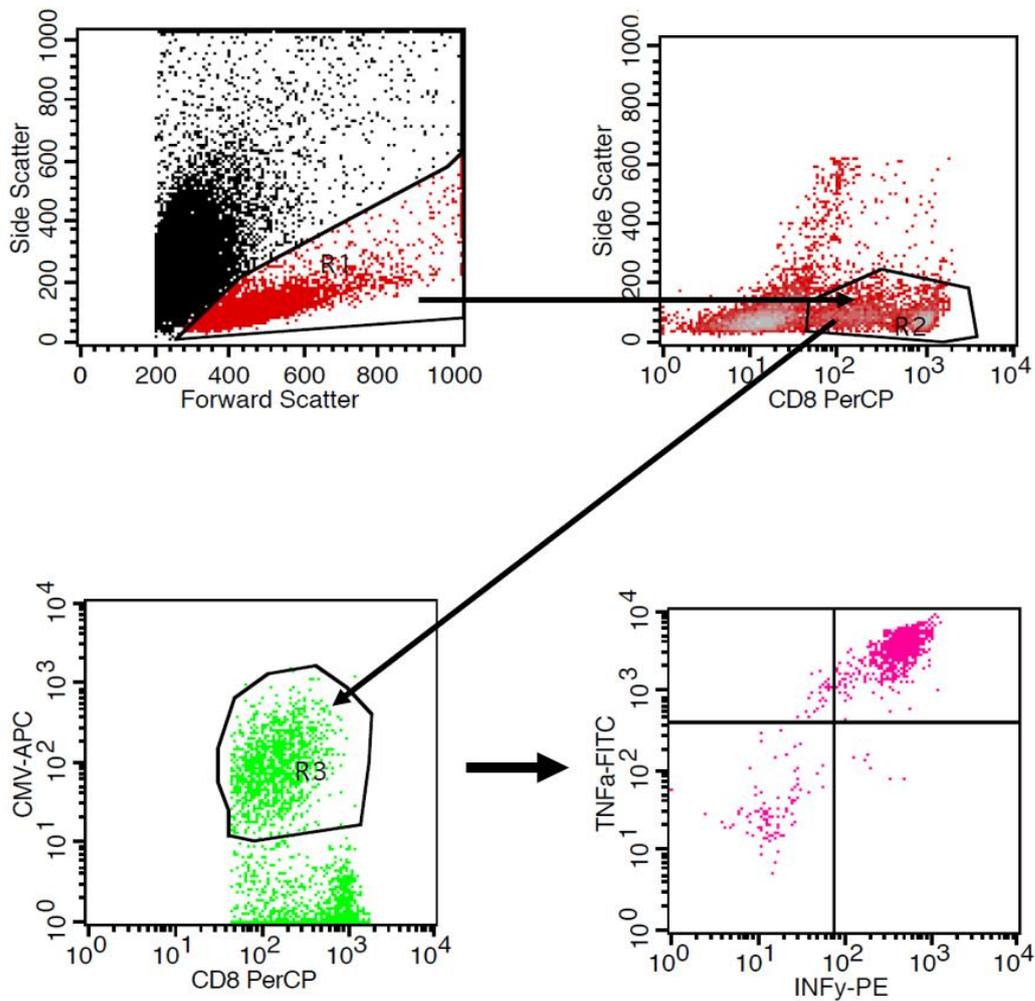


Abbildung 5: Gating-Schema zur Bestimmung der TNF α und IFN γ doppelpositiven Zellen

Die Zellen wurden nach Granularität und Größe im FSC und SSC beurteilt. Die als Lymphozyten identifizierten Zellen als R1 definiert. Die hiervon CD8⁺ sowie CMV⁺ Zellen wurden als R2 definiert und auf ihre IFN γ und TNF α Positivität untersucht.

Zunächst wurden die Zellen nach ihrer Granularität und Größe im FSC und SSC bewertet. Von den als Lymphozyten identifizierten Zellen wurden die CD8⁺ und CMV-Dextramer⁺ Zellen auf ihre IFN γ und TNF α Positivität hin analysiert.

Verglichen wurden der Prozentsatz der IFN γ /TNF α doppel positiven, multifunktionalen CD8⁺-T-Zellen nach DC-Stimulation, bezogen auf die Positivkontrolle (= 100 %). Als positive Referenz dienten die CD141⁺, mit CMV-Peptid beladenen DCs, welche auch in der Literatur als besonders effektive kreuzpräsentierende sowie T-Zell stimulierende

humane DC-Population angesehen werden.[42] Die Positivkontrolle mit CD141⁺ DCs erwies sich in der Tat (bis auf eine Ausnahme) immer als diejenige mit der höchsten Anzahl an IFN γ /TNF α doppelpositiven Events und wurde daher in der Folge als Referenz (100 %) definiert. Diese Normalisierung wurde durchgeführt, um die zum Teil großen interexperimentellen Varianzen auszugleichen und eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente zu gewährleisten.

Die CD8⁺CMV-Dextramer⁺ T-Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen waren aus unterschiedlichen Quellen (zwei T-Zelllinien bzw. ein T-Zellklon) und es sollte ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche Grundaktivität der T-Zellen das Ergebnis beeinflusst. So zeigte sich, dass bei Verwendung der T-Zellen aus der CD137 selektierten T-Zelllinie 58,2 % der CD8⁺CMV⁺ T-Zellen IFN γ /TNF α doppelpositiv waren. Bei dem Versuch mit dem T-Zellklon hingegen, waren nach Auftauen und Reexpansion jedoch nur 27,1 % doppelpositive Zellen messbar. Aufgrund der unterschiedlichen Menge der je Versuchsdurchlauf zur Verfügung stehenden T-Zellen, wurden nicht bei allen Durchläufen alle Versuchsbedingungen durchgeführt. Wie häufig eine Bedingung gemessen wurde, zeigt sich in Abbildung 6A mit n= x. Als weitere Positivkontrollen dienten zudem mit CMVpp65-Peptid beladene DCs und PMA/Ionomycin stimulierte T-Zellen (alle positiv, nicht dargestellt). Als Negativkontrolle fungierten nichtbeladene DCs sowie panCD8⁺-T-Zellen von CMV seronegativen Spendern (alle negativ, nicht dargestellt).

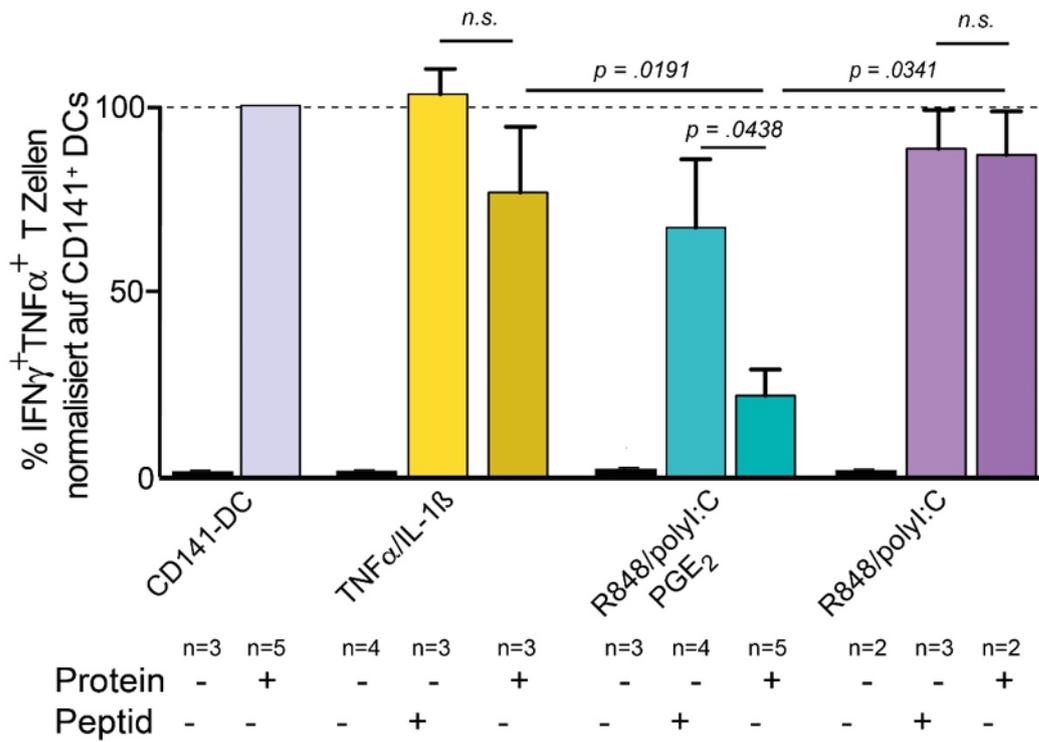
Insgesamt waren die Bedingungen, bei denen die DCs mit CMV-Peptid beladen waren, stärker in ihrer IFN γ - bzw. TNF α -Produktion als die der Bedingungen mit CMV-Protein. Hier musste das CMV-Protein erst durch die DCs prozessiert werden, um die Peptidfragmente auf der Zelloberfläche präsentieren zu können. Bei der Versuchsbedingung mit Poly I:C, R848 und PGE₂ ausgereiften DCs (Cocktail 2) zeigte sich der Unterschied zwischen Protein und Peptid stärker als bei Cocktail 1 (IL-1 β und TNF α). Bei Cocktail 2 zeigte sich zwischen Peptid- und Proteinbeladung im Mittel eine Differenz von 42 % +/- 18,4 SEM (p= 0,0438), bei Cocktail 1 im Mittel eine Differenz von 11,3 % +/- 1,6 SEM (p= n.s.).

Im Gesamtvergleich der mit Cocktail 1 (IL-1 β , TNF α) zu denen mit Cocktail 2 (Poly I:C, R848, PGE₂) ausgereiften DCs, zeigten sich die Cocktail 1 DCs als besser

kreuzpräsentierend, gemessen an den IFN γ /TNF α doppelpositiven Zellen (Abbildung 6). Dieser Effekt war mit allen drei T-Zellpopulationen reproduzierbar.

Um den Einfluss von PGE₂ auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit der DCs im Cocktail 2 genau zu bestimmen, wurde bei den letzten zwei Durchläufen der Versuchsreihe der Cocktail 2 in einer zusätzlichen Versuchsbedingung modifiziert. PGE₂ wurde weglassen und die Ausreifung nur mit R848 und Poly I:C durchgeführt (Cocktail 3). Durch die Elimination von PGE₂, erhöhte sich in beiden Durchläufen der Anteil an IFN γ /TNF α doppelpositiven Zellen signifikant auf das Niveau von Cocktail 1, was darauf hindeutet, dass die Inhibition der Kreuzpräsentation tatsächlich auf die Anwesenheit von PGE₂ zurückzuführen ist und nicht auf Poly I:C oder R848.

A



B

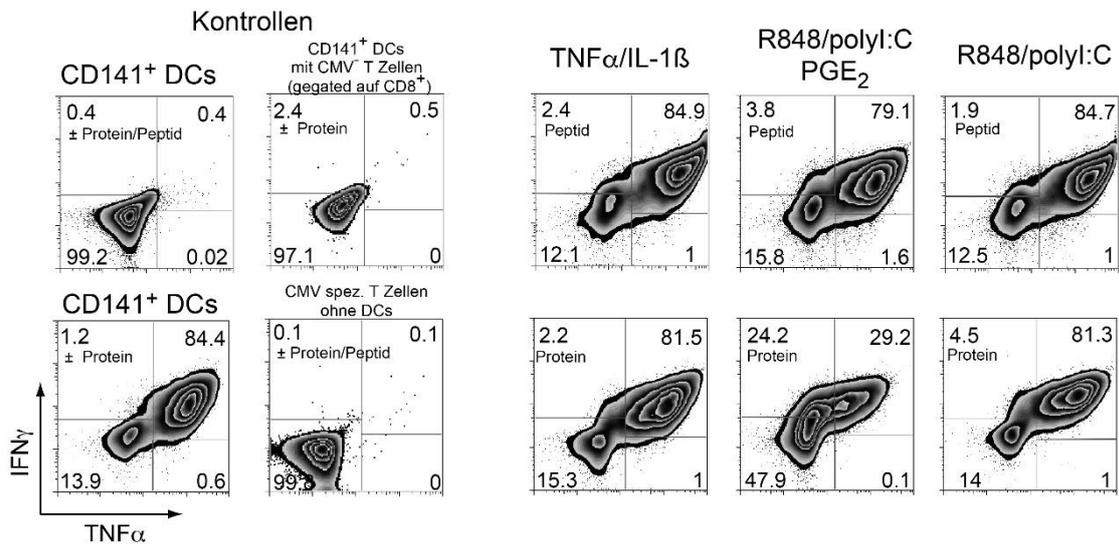


Abbildung 6: Vergleich der Kreuzpräsentationsfähigkeit verschieden ausgereifter DCs anhand ihrer TNF α /IFN γ -Produktion

A: In allen Versuchsdurchläufen wurde die Versuchsbedingung mit CD141 DCs als Positivkontrolle gewertet (=100 %) und alle Ergebnisse immer in Prozent auf diese bezogen. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte dar mit graphischer Angabe des SEM. Die jeweilige Anzahl der Werte bzw. Versuchsdurchläufe ist als n= x angegeben. Die Höhe der TNF α ⁺/IFN γ ⁺ Zellen wurde nach dem Gatingschema aus Abbildung 5 bestimmt. Verglichen werden die Ausreifungscocktails 1-3 (s. Tabelle 3). Der Ausreifungscocktail III entspricht dem von II jedoch ohne PGE₂.

B: Darstellung der FACS-Auswertung beispielhaft an einem Durchlauf. Die x-Achse gibt die Intensität der TNF α , die y-Achse die der IFN γ -Expression an. Die Kontrollen zeigen je einmal CD141DCs mit Protein/Peptid beladen ohne T-Zellen, CD141 DCs + CMV⁻ T-Zellen mit Protein beladen, CD141DC's + CMV⁺ T-Zellen sowie CMV⁺ T-Zellen ohne DCs. Auf der rechten Seite der Graphik sind CMV⁺ T-Zellen mit DCs ausgereift mit je einem der drei verschiedenen Cocktails, in der oberen Zeile beladen mit Peptid, in der unteren Zeile mit Protein

In den beiden Versuchsdurchläufen mit Cocktail 3, welcher kein PGE₂ enthält, wurde die Differenz zwischen mit Peptid und Protein stimulierten T-Zellen wesentlich geringer als bei dem ursprünglichen Cocktail 2 mit PGE₂ (Abbildung 7A und 7B). Bei dem ersten Durchlauf (Abbildung 7A) sank die Differenz zwischen der Variante mit Peptid und der mit Protein von 11,5 % auf 1,9 % durch das Weglassen von PGE₂. Bei dem zweiten Durchlauf (Abbildung 7B) zeigte sich diese Tendenz noch deutlicher (von 75,1 % auf 3,1 %).

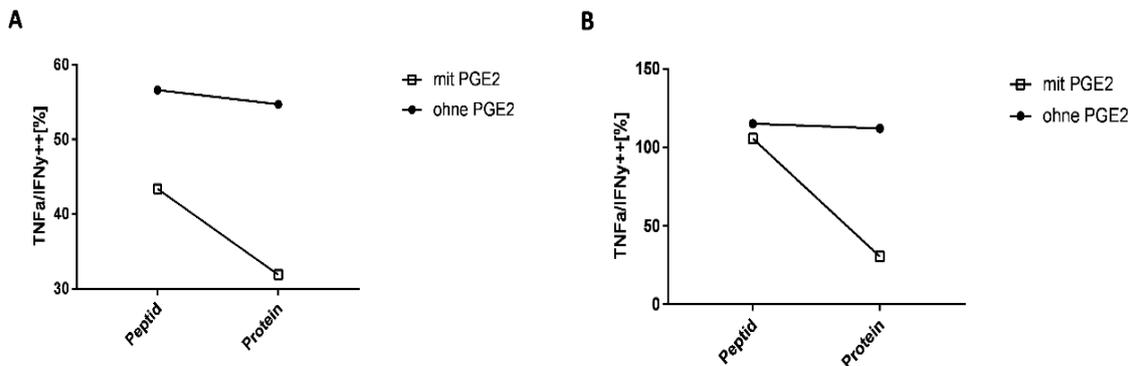


Abbildung 7: Vergleich Ausreifungscocktail 1 und 3 (=Cocktail 1 ohne PGE₂)

Es werden jeweils in Prozent die TNF α /IFN γ doppelpositiven Events bezogen auf die Positivkontrolle gezeigt. Dargestellt sind die letzten zwei Versuchsdurchläufe, bei denen neben Cocktail 1 auch Cocktail 3 verwendet wurde. Der Cocktail 3 entspricht dem 2 jedoch ohne PGE₂. In beiden Durchläufen A und B zeigt sich, dass sich durch das Weglassen von PGE₂ die TNF α /IFN γ Ausschüttung erhöht hat. Ebenso ist die Differenz zwischen der Variante mit und ohne Protein geringer.

Insgesamt lässt sich also zeigen, dass durch eine Ausreifung der DCs allein mit R848 und Poly I:C, ohne PGE₂, die Peptidstimulationsfähigkeit beinahe unverändert bleibt, wohingegen die Proteinprozessierung und/oder -präsentation sich verbessert.

Die Erhöhung der TNF α und IFN γ Ausschüttung durch das Weglassen von PGE₂, führte dazu, dass der Mittelwert der Ergebnisse bei Verwendung von Cocktail 3 bei der Versuchsbedingung mit Protein (83,35 %) höher war als bei dem in unserer Klinik verwendeten Cocktail 1 (79,79 %).

4 Diskussion

Obwohl dendritische Zellen seit vielen Jahren in therapeutischen Vakzinen eingesetzt werden, gibt es nach wie vor keinen Goldstandard für die Ausreifung dieser Zellen, um eine bestmögliche Effizienz der Vakzine zu gewährleisten.

In unseren Experimenten konnten wir erfolgreich zeigen, dass mit verschiedenen Cocktails ausgereifte DCs in der Lage sind Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Bei allen von uns untersuchten Ausreifungscocktails konnten wir eine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle messen. Außerdem konnten wir durch eine hohe Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ der T-Zellen eine gute Kreuzpräsentationsfähigkeit der DCs nachweisen. Die mit dem Zytokin basierten Cocktail 1 ausgereiften DCs zeigten sich im Vergleich stärker, jedoch ließ sich diese Fähigkeit bei den TLR-DCs deutlich durch das Weglassen von PGE_2 steigern.

4.1 Herkunft der dendritischen Zellen

In unseren Versuchen wurden MoDCs verwendet, das heißt aus Monozyten gewonnene DCs welche über Plattenadhärenz und anschließender 7-tägiger Kultur mit IL-4 und GM-CSF gewonnen wurden. Diese Methode hat sich bewährt und wurde schon 1994 etabliert.[39] Hierbei wurde jedoch keine Rücksicht auf die verschiedenen Untergruppen genommen. Die Heterogenität der Monozyten zeigt sich durch ihre Plastizität und vielfältigen phänotypischen und funktionellen Merkmale, beeinflusst durch kleinste Veränderungen ihrer lokalen Umgebung.[43] Nicht alle Untergruppen können zu funktionsfähigen unreifen DCs werden. Es wurden bisher drei Untergruppen nachgewiesen, welche in Bezug auf das Vorhandensein von CD14 sowie CD16 auf der Zelloberfläche zu unterscheiden sind.[44, 45] Nur die als klassische Gruppe bezeichnete Fraktion (CD14^{++} , CD16^-) besitzt ein hohes Potential sich zu MoDCs zu differenzieren.[45] Um eine möglichst hohe Ausbeute an antigenpräsentierenden sowie T-Zell-stimulierenden DCs zu erhalten, wäre zu erwägen die Ausgangszellen vor der Plattenadhärenz einer Positiv-Selektion auf CD14 zu unterziehen und so die Reinheit an funktionsfähigen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) noch zu erhöhen.

4.2 Der Einfluss von PGE₂

In unseren Experimenten zeigte sich, dass sich durch das Weglassen von PGE₂ im Ausreifungscocktail 2 eine erhöhte Ausschüttung von Interferon γ sowie TNF α durch die T-Zellen nachweisen ließ. Der Einfluss von PGE₂ auf die Ausreifung und Funktionsfähigkeit der DCs wurde schon vielfach diskutiert. So zeigte sich, dass PGE₂ einen positiven Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der DCs hat, jedoch die IL-12 Ausschüttung stark reduziert.[17]

Bezogen auf die Funktionalität gibt es zwei Arten von MoDCs. Zum einen proinflammatorische, welche bedingt durch hohe Zytokinsekretion (z.B. IL-12-70, IL-6, IL-10) wichtig für die Zytotoxizität der T-Zellen sind, und die IFN γ -Produktion induzieren. Zum anderen sind davon die migratorischen MoDCs zu unterscheiden, welche eine erhöhte T-Zell-Proliferation induzieren und nur eine geringe IL-12 Sekretion aufweisen. Jedoch haben sie eine deutlich erhöhte Migrationsfähigkeit im Vergleich zum proinflammatorischen Typ.

Luft et al. fanden heraus, dass PGE₂ die Polarisierung zum migratorischen Typ begünstigt. Sie zeigten, dass die Effekte von PGE₂ durch einen Anstieg der intrazellulären cAMP vermittelt werden. Die Mobilisation von cAMP konnte auch synthetisch durch die Hinzugabe eines Adenylat Cyklase Aktivators wie Forskulin erreicht werden. Luft et al. demonstrierten 2002, dass Forskulin sowohl als Zusatz zu TNF α und IFN α , als auch zu CD40L oder intakten E.coli, für die Induktion der MoDC-Migration genauso gut geeignet ist wie PGE₂. Auch cAMP-Analoga konnten die Wirkung von PGE₂ auf die Migrationsfähigkeit der DCs ersetzen, was nahelegt, dass der Einfluss von PGE₂ auf die Migrationsfähigkeit durch cAMP vermittelt wird. Es zeigte sich, dass von den vier separaten Rezeptoren, über die PGE₂ wirkt, sowohl der EP2 als auch der EP4 Rezeptor Signale für die cAMP-Mobilisation weitergibt. Außerdem beobachteten Luft et al., dass PGE₂ die Freisetzung von Zytokinen, vor allem von IL-12, inhibiert. Über den Mechanismus der IL-12-Sekretion spielen diese DCs eine zentrale Rolle in der Ausbildung von IFN γ -sekretierenden T-Zell-Effektoren. Auch dieser inhibierende Effekt von PGE₂ konnte durch Forskulin und cAMP-Analoga reproduziert werden.[46]

Die von proinflammatorischen MoDCs sezernierten Zytokine sind wichtig für die IFN γ -Produktion der spezifisch stimulierten T-Zellen. Der von Luft et al. beschriebene

inhibitorische Effekt auf die Zytokinsekretion und deren Folgen zeigte sich auch bei unseren Experimenten. Zwar wurde nicht die IL-12-Produktion gemessen, jedoch über intrazelluläre Färbung die Reaktivität der T-Zellen. Die Höhe bezogen auf die doppelpositiven CD8⁺ Zellen (TNF α und IFN γ) stieg im ersten Durchlauf durch das Weglassen von PGE₂ von 31,9 % auf 54,7 %, im zweiten Durchlauf sogar von 29,6 % auf 112 % an. Um den Zusammenhang zwischen erniedrigter IL-12 Ausschüttung und der abgesunkenen IFN γ -Produktion, wie von Luft et al. beschrieben zu testen, sollte bei Folgeexperimenten IL-12 mitbestimmt werden. Ebenso wäre es sinnvoll unseren PGE₂ enthaltenden Cocktail im Vergleich mit dem gleichen Cocktail jedoch mit beispielsweise eines cAMP-Analogons zu testen.

Auch van Helden et al. beschrieben 2006 die erhöhte Migrationsfähigkeit durch die Verwendung von PGE₂. Die Fähigkeit von PGE₂ die Podosomen der dendritischen Zellen schnell und effektiv zu vermindern, beruht laut van Helden et al. auf Veränderungen im Aktinskelett der Zellen, was folglich zu verminderter Adhäsion und erhöhter Migrationsgeschwindigkeit führt. Sie zeigten jedoch auch, dass TNF α in einem Teil der DCs, bezogen auf den Rückgang der Podosomen und der daraus resultierenden erhöhten Migrationsfähigkeit, eine ähnliche Wirkung hat.[15] So scheint TNF α auch einen durchaus positiven Effekt auf die Migrationsfähigkeit zu haben, jedoch keinen negativen auf die IFN γ Produktion wie PGE₂.

In weiteren Experimenten sollten die positiven und negativen Eigenschaften von PGE₂ auf die dendritischen Zellen aber auch auf die T-Zellen genauer untersucht werden. So wurde, neben den Auswirkungen auf die DCs und deren Kreuzpräsentation, von He et al. die Inhibition der Funktion und Proliferation von CD4⁺-T-Zellen beschrieben.[47] Für eine optimale Antitumorantwort sollten effektive Tumorstoffe sowohl eine gute CD4- sowie CD8-T-Zellreaktion fördern. Anhaltende CD8⁺-T-Zellantworten erfordern die Hilfe von CD4⁺Zellen.[11, 48] Ebenso sollte möglichen Alternativen für PGE₂ nachgegangen werden, um herauszufinden ob es die Möglichkeit gibt die durch PGE₂ beeinflusste gute Migrationsfähigkeit beizubehalten, gleichzeitig jedoch keine Reduktion der Kreuzpräsentationsfähigkeit in Kauf nehmen zu müssen.

Zusammenfassend sprechen unsere Experimente dafür, dass im Rahmen der Verwendung von DCs als Tumorstoffe mit Antigenen welche über Kreuzpräsentation eine

T-Zell-Antwort auslösen (Proteine, Tumorlysat, long-peptides) auf die Zugabe von PGE₂ im Ausreifungscocktail verzichtet werden sollte. Der inhibitorische Effekt auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit, wie in unseren Experimenten gezeigt, und somit verminderte Aktivierung der CTL bringt eine Wirkreduktion der DC-Vakzine mit sich.

Unsere Experimente wurden jedoch nur mit einem löslichen Protein durchgeführt. Um sicherzustellen, dass sich der inhibierende Effekt auf andere Antigene, welche ebenfalls eine Prozessierung benötigen, wie Tumorlysat oder long-peptides, übertragen lässt, sollten hierzu noch weitere Durchläufe erfolgen. Insbesondere da unterschiedliche intrazelluläre Vorgänge zur Antigenaufnahme und Prozessierung bei unterschiedlicher Größe beschrieben wurden.[49, 50]

Für die Verwendung von sogenannten short-peptides wie in unserem Falle das verwendete CMV-Peptid ist der Ausreifungs-Cocktail 2 mit PGE₂ optimal, da er zu voll funktionsfähigen ausgereiften DCs mit guter Migrationsfähigkeit führt, wie unter anderem bereits von Boullard et al. nahegelegt.[17] Zudem zeigt sich auch eine gute Kreuzpräsentationsfähigkeit, messbar anhand der IFN γ - sowie TNF α -Ausschüttung und somit Aktivierung der CTL.

Bei den in der Klinik später verwendeten Ausreifungscocktails muss abgewogen werden, welche Fähigkeiten die DCs nicht nur in vitro, sondern auch in vivo mit sich bringen müssen. Eine Möglichkeit dies weiter zu untersuchen und den realen Bedingungen der Verwendung am Menschen näher zu kommen, wäre die Testung der Nettofunktion in Tierexperimenten. Hierdurch wäre die Beobachtung in vivo möglich. Eine etablierte Variante wäre die Testung an murinen Modellen oder sogenannten humanized mouse models.[51]

4.3 Unterschiedliche T-Zellpopulationen als Readout im IFN γ -Assay

Die unterschiedliche Herkunft der T-Zellen in unseren Experimenten führte eventuell auch zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der T-Zellpopulation. So sind innerhalb der Gedächtniszellen Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen, engl. central memory T-cells (T_{CM}) von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, englisch effector memory T-cells (T_{EM})

zu unterscheiden.[52] So weisen die T_{EM} eine meist eine höhere Zytotoxizität mit schneller Sekretion von $IFN\gamma$, IL-4, IL-5, Perforin und Granzyme B auf.[53]

Wir arbeiteten zum einem mit einem T-Zellklon, also einer homogenen T-Zellpopulation, zum anderen mit T-Zelllinien.

Die T-Zelllinien sind zwar spezifisch für unser untersuchtes CMVpp65 Antigen, jedoch wussten wir lediglich in unserer eigenen T-Zellreihe, welche wir über CD137-Selektion gewonnen haben, über das Verhältnis von T_{CM} und T_{EM} Bescheid, da dies während der Gewinnung anhand von CD62L und 45RA im FACS untersucht wurde.

In unseren Experimenten wurde die genaue Unterscheidung der T-Zell-Untergruppen außer Acht gelassen, weil das Hauptaugenmerk unserer Untersuchung grundsätzlich auf den Eigenschaften und Fähigkeiten, besonders der Kreuzpräsentationsfähigkeit, der DCs lag. Bei unterschiedlicher Herkunft und Kulturzeit, ist auch, wenn davon auszugehen ist, dass T-Zelllinien und -klone größten Teils T_{EM} sind, womöglich eine unterschiedliche Zusammensetzung der T-Zell-Untergruppen durchaus denkbar. Sodass es bei ähnlich guter Kreuzpräsentationsfähigkeit der DCs zu einer unterschiedlich hohen $IFN\gamma$ - sowie $TNF\alpha$ -Ausschüttung kommt. In unserer Auswertung wurde die Varianz zwischen den Experimenten nivelliert, indem die $TNF\alpha$ - sowie $IFN\gamma$ -Ausschüttung auf den Prozentsatz der Positivkontrolle bezogen wurde. Einzeln betrachtet ist jedoch zu erkennen, dass unsere eigene T-Zelllinie mit einem hohen T_{EM} -Anteil von 90,97 % die höchste Anzahl an $TNF\alpha$ sowie $IFN\gamma$ doppelpositiven Zellen hatte. Es ist auch der einzige Versuch, bei dem unsere getesteten Ausreifungscocktails besser waren, im Sinne einer höheren Anzahl an doppel positivem $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ T-Zellen als unsere Positivkontrolle. Um die Heterogenität der Herkunft der T-Zellen auszuschließen ist in Betracht zu ziehen bei weiteren Versuchsreihen auf eine konstante Herkunft der T-Zellen, bzw. der Aufteilung der T-Zell-Gruppen zu achten, auch wenn die Zusammensetzung sicherlich auch in vivo variiert.

Die Herstellung eines eigenen T-Zellklones erwies sich als sehr zeitaufwendig. Zudem war für uns nicht auszuschließen, dass sich Zelleigenschaften durch die lange Kulturzeit verändern würden. Es zeigten sich gute Ergebnisse nach einigen Wochen, mit einer klar abgrenzbaren Population wie in Abbildung 2 ersichtlich. Jedoch bis zum Erreichen einer

großen Zellzahl für mehrere Versuche würden noch weitere Wochen in Kultur hinzukommen.

4.4 Tumormikroumgebung

Eine möglichst effektive Immunantwort, im Fall unserer Arbeit im Sinne der T-Zell-Aktivierung und konsekutiver Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, ist auch deshalb besonders wichtig, da in vivo der Tumor selbst inhibierend auf das Immunsystem wirkt. Diese Mechanismen werden als Tumor-Escape-Mechanismen bezeichnet.

Laut Grauer et al. werden beispielsweise verschiedene immunsupprimierende Faktoren vom Tumor selbst sezerniert. Außerdem besteht in Tumor nahem Gewebe ein Mangel an immunstimulierenden Faktoren wie IL-12, IL-18 sowie $\text{IFN}\gamma$. Da eine vollständige Tumorsektion oftmals nicht möglich ist, ist davon auszugehen, dass auch nach erfolgter Standard-Therapie ggf. noch eine tumorbedingte Immunsuppression vorhanden ist, welche immuntherapeutische Ansätze behindern kann.[6] Z.B. beschreiben Ahn et al., dass die tumorspezifische Expression von Checkpoint-Inhibitoren, welche sonst unter physiologischen Bedingungen unseren Körper schützen und Autoimmunreaktionen unterdrücken, im Tumor selbst eine adäquate Immunantwort verhindert bzw. erschwert.[54] Ein weiterer beschriebener Faktor wäre zum Beispiel das immunsuppressive Zytokin $\text{TGF-}\beta$ (Transforming Growthfactor β), welches sich sowohl auf die Ausreifung sowie auf die Präsentationsfähigkeit von APZs und die Aktivierung von T-Zellen negativ auswirkt.[55, 56] Ebenso wie die Expression von PD-L1 (Programmed Death Ligand 1), einem starken Inhibitor der CD4^+ sowie CD8^+ T-Zell-Aktivierung.[57, 58] Dem entgegenwirken und somit die Wirkung von aktiven Immuntherapien wie Tumorstoffen verbessern könnten sogenannte Checkpoint-Blockaden. Eine Kombination von Tumorstoffen mit Methoden, die den Tumor-Escape-Mechanismen des GBM entgegen wirken sind ein sicherlich interessantes Feld der weiteren Forschung.[54, 59]

4.5 Limitationen

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen eindeutige Tendenzen, jedoch sollten diese Experimente nun mit einer größeren Anzahl an Durchläufen wiederholt werden, um eine

qualitativ möglichst hohe Signifikanz zu erreichen. Dies war auf Grund des vorgesehenen Zeitfensters im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Des Weiteren handelt es sich bei den von uns durchgeführten Experimenten um in vitro Experimente. Es ist nicht sicherzustellen ob unsere Ergebnisse direkt auf in vivo Bedingungen übertragbar sind. Deswegen sind präklinische in vivo Modelle, wie zum Beispiel murine, dringend notwendig, um die genauen Auswirkungen und Effekte von PGE₂ auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit von DC basierten Tumorstoffen zu untersuchen.

Bei den Ergebnissen unserer Experimente handelt es sich um rein deskriptive Beobachtung. Die Vorgänge auf molekularer Ebene werden hierbei außer Acht gelassen. Interessant wäre, inwiefern PGE₂ die intrazellulären Vorgänge bei der Aufnahme in die Zelle und die anschließende Prozessierung via MHC I vermittelter Präsentation beeinflusst. Der bekanntere der beiden möglichen Zellvorgänge, der sogenannte zytosolische Weg (cytosolic pathway) lässt sich durch Proteasom-Inhibitoren beeinflussen.[60] Es wurde bisher noch nicht beschrieben, ob PGE₂ auch hierauf einen Einfluss hat.

In unseren Experimenten verwendeten wir als Dosierung für PGE₂ 10 µg/ml. Nicht auszuschließen ist hierbei eine Dosisabhängigkeit des von uns dargestellten negativen Einflusses von PGE₂ auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit.

Diesbezüglich erfolgten bereits nach Abschluss dieser Arbeit weitere Experimente mit unterschiedlichen Dosierungen von PGE₂ (10 ng/ml - 10 µg/ml) in unserer Arbeitsgruppe. In den hierzu bisher durchgeführten Experimenten scheint sich ein Dosisfenster von 10-100 ng/ml als optimale Dosierung darzustellen für eine ausreichende Migrationsfähigkeit bei möglichst niedrigem negativen Effekt auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit.[61]

5 Zusammenfassung

Die spezifische Immuntherapie ist ein vielversprechender neuer Weg, um die konventionellen Therapiemöglichkeiten von Krankheiten mit infausten Prognosen wie dem Glioblastom zu ergänzen oder zu ersetzen. Ziel unserer Arbeit war die Entwicklung optimaler DCs für die Generierung von therapeutischen Tumorstoffen. Hierfür ist eine optimale Vorbereitung der DCs *in vitro* notwendig. Neben den essenziellen Eigenschaften wie der Migrationsfähigkeit, der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle sowie der Zytokinausschüttung, ist auch die optimale Aufnahme von den Tumor-spezifischen Antigenen und deren Präsentation besonders wichtig, um eine effiziente Immunantwort zu ermöglichen. Das wichtigste Ziel in unserer Arbeit war es über einen optimalen Ausreifungscocktail der DCs eine effektive Antwort der zytotoxischen CD8⁺-Zellen zu erzielen. Dies geschieht im Rahmen der Präsentation von z.B. exogenen Antigenen wie in unserem Falle eines CMV-Proteins über den Weg der sogenannten Kreuzpräsentation.

Im Rahmen dieser Arbeit verglichen wir den in unserer Klinik etablierten zytokinbasierten Ausreifungscocktail bestehend aus IL-1 β und TNF α und dem von Boullard et al. vorgeschlagenen Ausreifungscocktail welcher Toll-like-Rezeptor-Agonisten mit PGE₂ kombiniert.[17] Beide Varianten führten in unseren Vorexperimenten zur Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), welche wichtig für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen sind. Alle DCs waren imstande Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und den T-Zellen zu präsentieren, gemessen an der intrazellulären TNF α /IL-1 β Ausschüttung.

Wir konnten erstmals zeigen, dass das PGE₂ nicht nur einen Einfluss auf die Ausreifung, Zytokinproduktion und somit Migrationsfähigkeit der DCs hat wie von Boullard et al. beschrieben, sondern auch auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit exogener Antigene. Das Weglassen des von PGE₂ im Cocktail 2 führte zu einer signifikant besseren Kreuzpräsentationsfähigkeit. Somit hat PGE₂ sowohl eine fördernde Wirkung, über die Erhöhung der Migrationsfähigkeit wie in der Literatur vielfach beschrieben, sowie eine hemmende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung über die Kreuzpräsentation.

Als mögliche Schlussfolgerung unserer Experimente sollte bei der Arbeit mit Antigenen, welche über Kreuzpräsentation eine T-Zell-Antwort auslösen (Proteine, Tumorlysat, long-peptides) auf die Zugabe von PGE₂ im Ausreifungscocktail verzichtet werden. Der inhibitorische Effekt auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit und somit verminderte Aktivierung der CTL bringt eine Wirkreduktion der DC-Vakzine mit sich. Für die Verwendung von DCs welche exogen mit sogenannten short peptides beladen wurden, wie in unserem Fall das verwendete CMV-Peptid, ist der Ausreifungs-Cocktail 2 mit PGE₂ optimal, da er zu voll funktionsfähigen ausgereiften DCs mit guter Migrationsfähigkeit führt.

Da es sich bei unseren Experimenten um in vitro Experimente handelt, sollten jedoch weitere Folgeexperimente im Rahmen von in vivo Modellen und mit Betrachtung der intrazellulären Vorgänge erfolgen. Außerdem sollte die Dosisabhängigkeit des beobachteten Effekts weiter mitberücksichtigt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Fleury, A., et al., *Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France*. *Cancer*, 1997. **79**(6): p. 1195-202.
2. Mandeep S. Tamber and James T. Rutka, *Pediatric supratentorial high-grade gliomas*. *Neurosurgical Focus*, 2003. **14**(2): p. 1-8.
3. Johnson, D.R. and B.P. O'Neill, *Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era*. *J Neurooncol*, 2012. **107**(2): p. 359-64.
4. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-96.
5. Zhao, S., et al., *Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63682.
6. Grauer, O.M., P. Wesseling, and G.J. Adema, *Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(4): p. 674-93.
7. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, *Temozolomid-induzierte Alveolitis*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2010. **12**.
8. Van Gool, S.W., *Brain Tumor Immunotherapy: What have We Learned so Far?* *Frontiers in Oncology*, 2015. **5**: p. 98.
9. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
10. Hilf, N., et al., *Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma*. *Nature*, 2019. **565**(7738): p. 240-245.
11. Melief, C.J., et al., *Therapeutic cancer vaccines*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(9): p. 3401-12.
12. Ott, P.A., et al., *An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma*. *Nature*, 2017. **547**(7662): p. 217-221.
13. Eyrich, M., et al., *Development and validation of a fully GMP-compliant production process of autologous, tumor-lysate-pulsed dendritic cells*. *Cytotherapy*, 2014. **16**(7): p. 946-64.
14. Boudousquié, C., et al., *Development and Optimization of a GMP-Compliant Manufacturing Process for a Personalized Tumor Lysate Dendritic Cell Vaccine*. *Vaccines*, 2020. **8**(1): p. 25.
15. van Helden, S.F., et al., *A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation*. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 1567-74.
16. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
17. Boullart, A.C., et al., *Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(11): p. 1589-97.
18. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. *Nature*, 2007. **449**: p. 419.
19. Hsieh, S.-M., et al., *Kinetics of Antigen-Induced Phenotypic and Functional Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells*. *The Journal of Immunology*, 2001. **167**(11): p. 6286.

20. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
21. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
22. Chan, V.W., et al., *Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3610-6.
23. Saeki, H., et al., *Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2472-5.
24. Kim, C.H., et al., *Enhancement of anti-tumor immunity specific to murine glioma by vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells engineered to produce interleukin-12*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(11): p. 1309-19.
25. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
26. Bevan, M.J., *Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming*. J Immunol, 1976. **117**(6): p. 2233-8.
27. Rosalia, R.A., et al., *Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation*. European journal of immunology, 2013. **43**(10): p. 2554-2565.
28. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.
29. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance*. Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(2): p. 126-134.
30. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
31. Lovgren, T., et al., *Enhanced stimulation of human tumor-specific T cells by dendritic cells matured in the presence of interferon-gamma and multiple toll-like receptor agonists*. Cancer Immunol Immunother, 2017. **66**(10): p. 1333-1344.
32. Cobbs, C.S., *Cytomegalovirus and brain tumor: epidemiology, biology and therapeutic aspects*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(6): p. 682-8.
33. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 673-85.
34. Pfeiffer, I.A., et al., *Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes*. Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1392-401.
35. Santone, M., et al., *A new TLR2 agonist promotes cross-presentation by mouse and human antigen presenting cells*. Hum Vaccin Immunother, 2015. **11**(8): p. 2038-50.
36. Disis, M.L., et al., *Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation*. Journal of Immunological Methods, 2006. **308**(1): p. 13-18.
37. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(2): p. 116-126.

38. Peters, J.H., et al., *Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro*. *Adv Exp Med Biol*, 1993. **329**: p. 275-80.
39. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
40. Schmidt, T. and M. Sester, *Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1064**: p. 267-74.
41. Maecker, H.T., J.P. McCoy, and R. Nussenblatt, *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*. *Nature Reviews Immunology*, 2012. **12**(3): p. 191-200.
42. Jongbloed, S.L., et al., *Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
43. Mitchell, A.J., B. Roediger, and W. Weninger, *Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes*. *Cellular Immunology*, 2014. **291**(1): p. 22-31.
44. Ziegler-Heitbrock, L., *Monocyte subsets in man and other species*. *Cellular Immunology*, 2014. **289**(1): p. 135-139.
45. Boyette, L.B., et al., *Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets*. *PLoS ONE*, 2017. **12**(4): p. e0176460.
46. Luft, T., et al., *Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets*. *Blood*, 2002. **100**(4): p. 1362-1372.
47. He, X. and J.M. Stuart, *Prostaglandin E₂ Selectively Inhibits Human CD4⁺ T Cells Secreting Low Amounts of Both IL-2 and IL-4*. *The Journal of Immunology*, 1999. **163**(11): p. 6173-6179.
48. Hoyer, S., et al., *Concurrent interaction of DCs with CD4+ and CD8+ T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango*. *European Journal of Immunology*, 2014. **44**(12): p. 3543-3559.
49. Roche, P.A. and K. Furuta, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. *Nature reviews. Immunology*, 2015. **15**(4): p. 203-216.
50. Cruz, F.M., et al., *The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules*. *Annual review of immunology*, 2017. **35**: p. 149-176.
51. Spranger, S., B. Frankenberger, and D.J. Schendel, *NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 30.
52. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
53. Arens, R. and S.P. Schoenberger, *Plasticity in programming of effector and memory CD8(+) T-cell formation*. *Immunol Rev*, 2010. **235**(1): p. 190-205.
54. Ahn, B.J., I.F. Pollack, and H. Okada, *Immune-Checkpoint Blockade and Active Immunotherapy for Glioma*. *Cancers*, 2013. **5**(4): p. 1379-1412.

55. Gomez, G.G. and C.A. Kruse, *Cellular and functional characterization of immunoresistant human glioma cell clones selected with alloreactive cytotoxic T lymphocytes reveals their up-regulated synthesis of biologically active TGF-beta*. J Immunother, 2007. **30**(3): p. 261-73.
56. Ueda, R., et al., *Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6551-9.
57. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
58. Wintterle, S., et al., *Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7462-7.
59. Reardon, D.A. and D.A. Mitchell, *The development of dendritic cell vaccine-based immunotherapies for glioblastoma*. Seminars in Immunopathology, 2017. **39**(2): p. 225-239.
60. Kovacovics-Bankowski, M. and K. Rock, *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules*. Science, 1995. **267**(5195): p. 243-246.
61. Gierlich, P., et al., *Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8+ T cells*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2020.

I Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BDCA-3	Blood-derived dendritic cell antigen 3
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CCR7	C-C chemokine receptor 7
CD	Differenzierungscluster
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Cytotoxic T cell
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EP	Prostaglandin-E ₂ -Rezeptor
FACS	Flourescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Flourescein
FCS	Forward scatter
GBM	Glioblastoma multiforme
GMP	Good Manufacturing Practice
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HCMV	Human cytalomegalovirus
HLA	Human Leucocyte Antigen
iDC	Unreife dendritische Zelle
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
MoDC	Monozyten abgeleitete dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Leukozyten-reduzierendes System
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phospat buffered saline
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol-myristat-Azetat
Poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
R848	Resiquimod
SEM	Standard Error of the Mean
SSC	Side scatter
T _{CM}	Zentrale-Gedächtnis-T-Zelle
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle

TGF- β	Transforming Growthfactor β
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kultur und Ausreifung der MoDC im zeitlichen Ablauf	16
Abbildung 2: CD141 (BDCA-3) Population	18
Abbildung 3: CD8 ⁺ /CMV ⁺ T-Zellklon in FACS-Messung	22
Abbildung 4: CD137 ⁺ T-Zelllinie.....	24
Abbildung 5: Gating-Schema zur Bestimmung der TNF α und IFN γ doppelpositiven Zellen	26
Abbildung 6: Vergleich der Kreuzpräsentationsfähigkeit verschieden ausgereifter DCs anhand ihrer TNF α /IFN γ -Produktion	29
Abbildung 7: Vergleich Ausreifungscocktail 1 und 3 (=Cocktail 1 ohne PGE ₂).....	30

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Färbeschema HLA-A2 und CMV-Färbung im FACS	11
Tabelle 2: Färbeschema für FACS-Messung zur Kontrolle der Aktivierung der T-Zellen	15
Tabelle 3: Zusammensetzung Ausreifungscocktails für DCs.....	16
Tabelle 4: Färbeschema für die FACS-Messungen im Rahmen der Kreuzpräsentationsversuche	20

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Matthias Eyrich, der mir diese Promotion unter seiner Leitung ermöglicht hat, für die unermüdliche Unterstützung sowohl bei der Themenfindung sowie der Betreuung während meiner Experimente und des Verfassens meiner Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Stammzelllabores, das mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Herrn Silvan Rücker danken der mich durch seinen unermüdlichen Zuspruch immer wieder motivierte und unterstützte.