

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer

**Ausreifung humaner dendritischer Zellen durch die TLR-Agonisten Poly(I:C)
und R848 mit PGE₂. Auswirkungen auf Phänotyp, Zytokinproduktion, Mi-
gration und das antigenspezifische Priming von naiven CD8^{pos} T-Zellen.**

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

vorgelegt von

Philipp Gierlich

aus Lichtenfels

Würzburg, März 2019



Referent: Prof. Dr. Matthias Eyrich

Koreferent: Prof. Dr. Guido Stoll

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2019

Der Promovend ist Arzt.

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zell-Rezeptor
BFA	Brefeldin-A
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Differenzierungs-Cluster
cDC	TNF α /IL-1 β -gereifte dendritische Zelle
CMV	Cytomegalievirus
CpG-DNA	Cytosin-Guanin-Dinukleotid-reiche DNA
CTL	Zytotoxische CD8 ^{pos} T-Zelle
CTLA-4	Zytotoxische-T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle(n)
DC-SIGN	DC-spezifisches ICAM-3-greifendes Nonintegrin
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EGFRvIII	Epidermaler Wachstumsfaktor Variante-III
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EP(2/4)	Prostaglandin-E ₂ -Rezeptor-(2/4)
ERK	Extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase
FACS	Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht
Gal	Galactose
GBM	Glioblastoma multiforme

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Gute Herstellungspraxis
GOX	Galactoseoxidase
GOX-DC	TNF α /IL-1 β -gereifte dendritische Zelle mit GOX-Behandlung
HGG	Hochgradiges Gliom
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HS	Humanserum
ICAM	Interzelluläres Adhensionsmolekül
iDC	Unreife dendritische Zelle
IDH^{R132H}	Isocitratdehydrogenase-Mutation R132H
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma-induziertes Protein-10
IRF	Interferon-regulierender Faktor
LCA	Gemeinsames Leukozyten-Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
lpsDC	LPS/IFN γ -gereifte dendritische Zelle
LRS	Leukozyten-reduzierendes System
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktions-Protein-1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIG	Gamma-Interferon-induziertes Monokin
MIP-1	Makrophagen-Inflamations-Protein-1
mRNA	Messenger-RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure (=Sialinsäure)

NK(-Zellen)	Natürliche Killer-Zellen
NLGN4X	X-gekoppeltes Neuroligin-4
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	Programmierter-Zelltod-Protein-1
PD-L1	Programmierter-Zelltod-Ligand-1
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PGE₂	Prostaglandin-E ₂
Poly(I:C)	Polyinosin:Polycytidinsäure
PRR	Pattern-Erkennungs-Rezeptor
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Rekursive Partitionierungsanalyse
RPE	R-Phycoerythrin
sIL-2R	Löslicher IL-2-Rezeptor
siRNA	Small-interfering-RNA
Smad2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT	Signalwandler und Transkriptionsaktivator
TIMP1	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinases 1
TC	Zytotoxische-T-Zelle
Tcf/Lef	Transkriptionsfaktor/Lymphoider Enhancer-bindender Faktor
T_{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor

T_E	Effektor-T-Zelle
T_{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-β
TH	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-ähnlicher-Rezeptor
tlrDC	Poly(I:C)/R848/PGE ₂ -gereifte dendritische Zellen
tlrDC/IFNγ	Poly(I:C)/R848/IFNγ-gereifte dendritische Zellen
T_N	Naive T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF3	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 3
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
T_{SCM}	Stammzell-Gedächtnis-T-Zelle
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsprotein-1
VEGF	Vaskulär-endothelialer-Wachstumsfaktor
VLA-4	Very-late-Antigen-4
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einführung	1
1.1. Grundlagen.....	1
1.1.1. <i>Gliederung des Immunsystems</i>	1
1.1.2. <i>Die adaptive Immunreaktion</i>	2
1.2. Die Tumorstoffe	11
1.2.1. <i>Prinzip, Anfänge, Entwicklungen</i>	11
1.2.2. <i>Klinische Anwendung: Immuntherapie maligner Gliome</i>	13
1.3. Die Ausreifung dendritischer Zellen auf dem Prüfstand	17
1.4. Glykane der Zelloberfläche: Galactoseoxidase-Reaktion.....	20
1.5. Formulierung der Fragestellung.....	22
2. Materialien und Methoden	24
2.1. Materialliste.....	24
2.2. Vorbemerkungen	27
2.3. Zellgewinnung und -aufbereitung	27
2.3.1. <i>Leukozyten aus LRS-Kammern</i>	27
2.3.2. <i>Leukozyten aus Apherese</i>	28
2.3.3. <i>Dendritische Zellen</i>	29
2.4. Phänotypfärbung	30
2.5. Überleben	31
2.6. Migration.....	32
2.7. T-Zell-Priming	32
2.7.1. <i>Vorbemerkungen</i>	32
2.7.2. <i>Galactoseoxidase</i>	33
2.7.3. <i>T-Zell-Gewinnung</i>	34
2.7.4. <i>DC-Kokultur</i>	34
2.7.5. <i>Zellzahlbestimmung und Dextramer-Färbung</i>	36
2.7.6. <i>Restimulation und intrazelluläre Zytokin-färbung</i>	36
2.7.7. <i>T-Zell-Phänotypbestimmung</i>	37
2.8. Zytokinmessung aus Überständen	38

2.9. Methodik der Datenauswertung	40
3. Ergebnisse	42
3.1. Phänotyp	42
3.2. Überleben	43
3.3. Zytokinsekretion	49
3.4. Migration.....	49
3.5. T-Zell-Priming	54
3.5.1. Vorversuche.....	54
3.5.2. T-Zellexpansion	55
3.5.3. Antigen-spezifische T-Zellen.....	56
3.5.4. Restimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung.....	57
3.5.5. T-Zell-Phänotyp.....	57
3.5.6. Zytokinsekretion der unstimulierten T-Zellen.....	58
3.6. Galactoseoxidase	64
4. Diskussion	66
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturverzeichnis	91
7. Abbildungsverzeichnis	106
8. Tabellenverzeichnis.....	107
8. Danksagung	108
9. Anhang	109

1. Einführung

1.1. Grundlagen

1.1.1. Gliederung des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen wird für gewöhnlich in zwei jeweils dichotome Kategorien eingeteilt. So wird einerseits unterschieden zwischen der direkt durch Abwehrzellen vermittelten *zellulären* und der *humoralen* Immunität, die über in der Interzellularflüssigkeit gelöste Substanzen wirkt. Andererseits hat man die entwicklungsgeschichtlich ältere *angeborene* von der nur in Vertebraten vorkommenden *adaptiven* Immunität getrennt. Während erstere unmittelbare aber limitierte Abwehrmechanismen gegen häufige Erreger beinhaltet, wirkt letztere durch eine initial verzögerte, dafür hochspezifische Abwehrreaktion mit Bildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Didaktisch ist diese Aufteilung durchaus sinnvoll, durch neuere Erkenntnisse werden die Grenzen der Systeme jedoch aufgeweicht. So kennt man heute Zellen, die typische Merkmale beider Seiten aufweisen, wie etwa Innate-Lymphoid-Cells, Natural-Killer-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen [1]. Darüber hinaus wird ein gewisses Maß an Spezifität mittlerweile auch dem angeborenen Teil des Immunsystems zugesprochen, da es durch Vernetzung der angestoßenen Signalwege in der Lage ist, eine dem individuellen Pathogen angepasste Abwehrreaktion zu initiieren [2, 3].

Insgesamt sprechen die vielen Verschränkungen gegen einen strengen Dualismus und für eine funktionelle Einheit der Immunität. Als Paradebeispiel dafür gelten *dendritische Zellen* (DCs), die eine Brücke zwischen der angeborenen Erkennung schädlicher Organismen und der Auslösung einer erworbenen Immunantwort schlagen [4]. Die dabei stattfindenden Vorgänge sollen auf den folgenden Seiten kurz dargelegt werden.

Tabelle 1. Klassische Gliederung des Immunsystems. Dendritischen Zellen wird eine Vermittler- und Steuerrolle zugeschrieben.

	Angeboren	Adaptiv
Zellulär	Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen	T- und B-Lymphozyten
Humoral	Komplementsystem, Zytokine	Antikörper

Dendritische Zellen

1.1.2. Die adaptive Immunreaktion

Die Erkennung von Pathogenen durch die angeborene Immunität wird zunächst anhand ihrer molekularen Strukturen, sogenannter *Pathogen-Associated-Molecular-Patterns* (PAMPs) ermöglicht, die von *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRRs), wie den *Toll-Like-Rezeptoren* (TLRs) erkannt werden. Für das in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckte Protein *Toll* fand sich ein Homolog im Menschen, das demzufolge als *Toll-like* bezeichnet wurde [5, 6]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteinklasse die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch Immunzellen steigert und immunstimulierende Oberflächenproteine auf DCs induziert [6, 7].

Heute sind viele intra- und extrazelluläre TLR-Varianten auf humanen Abwehrzellen bekannt, die meisten auf DCs [8, 9]. PAMPs von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, die für ihre Organismen meist unveränderliche und überlebenswichtige Funktionseinheiten abbilden, stimulieren dabei jeweils eine charakteristische Kombination von TLRs (*Tab. 2*) [10].

Tabelle 2. Toll-Like-Rezeptoren 1 bis 9 des Menschen (nach [11]). * = intrazellulär

	Ligand (mikrobieller Bestandteil)	Spezies
TLR1	Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Zellwandlipide, Hämagglutinin	Bakterien, Pilze, Parasiten, Viren

	Ligand (mikrobieller Bestandteil)	Spezies
TLR3*	Doppelstrang-RNA	Viren
TLR4	LPS, Lipoglykane, Envelope-Proteine, Heat-Shock-Proteine, u. A.	Bakterien, Pilze, Parasiten, Viren
TLR5	Flagellin	flagellierte Bakterien
TLR6	Zellwandlipide	Bakterien, Pilze
TLR7*	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR8*	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR9*	CpG-DNA, Hemozoin	Bakterien, Parasiten, Viren

Das erste wegweisende Signal der adaptiven Immunreaktion bildet die Definition des molekularen Ziels durch Antigenpräsentation. Als Antigene fungieren vor allem Peptide aber auch Lipide und Kohlenhydrate der Erreger. Sie werden von *antigenpräsentierenden Zellen* (APZs) aufgenommen und anderen Zellen des Immunsystems dargeboten. Die Trägermoleküle für Peptidantigene teilen sich in die Klassen MHC-I (HLA-A/-B/-C) und MHC-II (HLA-DM/-DO/-DP/-DQ/-DR) auf, während Lipide über Proteine der CD1-Familie präsentiert werden [4]. MHC-I-Moleküle sind ubiquitär auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden und tragen Bestandteile der von diesen eigens synthetisierten Proteine. Während einer Virusinfektion erscheinen demzufolge auch Viruspeptide auf den befallenen Zellen, wodurch diese vom Immunsystem identifiziert werden können. MHC-II-Moleküle hingegen kommen nur auf APZs und in hoher Dichte vor allem auf DCs vor. Sie dienen in erster Linie der Präsentation von Fremdantigenen, die zuvor endozytiert wurden. DCs sind darüber hinaus in der Lage, auch fremde Antigene über das MHC-I-System zu präsentieren, um sie für CD8^{pos} T-Zellen verfügbar zu machen (*s. u.*). Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und ist Voraussetzung für das sogenannte Kreuzpriming [12].

Als Priming wird die proteinspezifische Aktivierung eines antigenunerfahrenen Lymphozyten bezeichnet. Weist eine solche *naive T-Zelle* (T_N) einen zum präsentierten Antigen passenden *T-Zell-Rezeptor* (TCR) auf, den sie während ihrer Entstehung im Knochenmark durch genetische Rekombination erhalten hat, wird ihre klonale Expansion stimuliert. Wenngleich grundsätzlich verschiedene Zelltypen zur Antigenpräsentation fähig sind, beruht das Priming naiver T-Zellen wesentlich auf der Interaktion mit DCs [13].

Im Anschluss daran werden Differenzierungsprozesse in Gang gesetzt, aus denen definierte Subpopulationen von Effektor-Zellen und Memory-Zellen hervorgehen. CD62L (L-Selectin) auf T-Zellen wird für ihren Eintritt in die Lymphknoten benötigt und ist deshalb vor allem auf naiven T-Zellen zu finden [14]. CD62L^{pos} *zentrale Memoryzellen* (T_{CM}) sind für verzögerte Immunantworten verantwortlich, weisen eine lange Lebensdauer auf und erfüllen ihre Aufgabe dann, wenn das Antigen am Ort der Entzündung nicht mehr präsent ist. Sie verweilen in den Lymphknoten, den Sammelstellen der Antigene, wo sie auf ihre Reaktivierung durch erneuten Antigenkontakt warten. Die aus T_{CM} hervorgehenden CD62L^{neg} *Effektor-Memoryzellen* (T_{EM}) wirken dagegen als schnell verfügbare Abwehrzellen in peripheren Geweben [15, 16].

Diese Tochterzellen durchlaufen dabei den Prozess der *funktionellen Aviditätsreifung*, bei der die Schwelle zur späteren Reaktivierung gesenkt und die hervorgerufene Immunreaktion verstärkt wird [17, 18].

Die Aktivierung naiver T-Zellen wird entscheidend durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DCs beeinflusst. Nur bei deren paralleler Bindung an CD28 auf T-Zellen wird die Antigenpräsentation mit einer Aktivierung der Zelle verknüpft (*Tab. 4*) [19]. T-Zellen übernehmen vielfältige Aufgaben in der Infektabwehr und können in zwei Hauptgruppen unterschieden werden. *Zytotoxische T-Zellen* (CTLs) tragen das Protein CD8 auf ihrer Oberfläche und binden darüber an MHC-I Moleküle von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. Sie produzieren daraufhin Zytokine wie $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ und können die befallenen

Zellen mit zytotoxischen Substanzen direkt zerstören [20]. *T-Helfer-Zellen* (TH) hingegen sind durch das Protein CD4 charakterisiert, durch das sie an MHC-II-Moleküle binden. Sie produzieren in erster Linie Zytokine, die die Funktionen anderer Immunzellen beeinflussen und eine Immunreaktion aufrecht erhalten. Sie führen außerdem über die Bindung an CD40 auf DCs zu deren Stimulation und senken damit die Schwelle zur Aktivierung von CTLs [21]. CTLs können jedoch prinzipiell auch ohne Hilfe von TH-Zellen von DCs stimuliert, zur Proliferation angeregt und geprimt werden [22].

Zusätzlich zu der Bindung eines Antigen-MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor und der Aktivierung mittels Kostimulation erhalten T-Zellen ein drittes wichtiges Signal [23]. Es wird durch die heterogene Gruppe der Zytokine repräsentiert und besteht aus Interleukinen, Interferonen, Chemokinen und weiteren löslichen Stoffen, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert werden (*Tab. 3*). Zytokine können allgemein sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte bewirken, leiten Entzündungszellen zum Ort der Infektion und bestimmen die Art der Immunantwort.

Dies geschieht mitunter durch die Differenzierung von T-Helfer-Zellen in deren wichtigste Subgruppen TH₁-, TH₂- und TH₁₇-Zellen. TH₁-Zellen lösen über die Ausschüttung von IFN γ eine CTL-vermittelte Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger aus. Das für die TH₁-Differenzierung benötigte IL-12 wird dabei von DCs sezerniert. In der Abwesenheit von IL-12 gebildete TH₂-Zellen rufen mittels IL-4, IL-5 und IL-13 B-Zell-Antworten hervor, die in der Produktion von spezifischen Antikörpern zur Abwehr insbesondere von Helminthen und Bakterien resultieren. IL-23 schließlich bewirkt eine Differenzierung zu TH₁₇-Zellen, die wiederum neutrophile Granulozyten und Phagozyten durch IL-17 stimulieren und eine Rolle in der Reaktion gegen extrazelluläre Bakterien spielen [24-26].

Analog zur Subdifferenzierung der TH-Zellen existieren auch unterschiedliche Phänotypen zytotoxischer T-Zellen, die TC₁-, TC₂- und TC₁₇-Zellen genannt wer-

den. Sie zeichnen sich jeweils durch die Produktion von TNF α /IFN γ , IL-4/-5/-10 bzw. IL-17 aus [27, 28].

Das vierte von DCs übermittelte Signal stellt das *Homing-Imprinting* dar [29-31]. Der Begriff bezeichnet die Beeinflussung des Migrationsverhaltens von Leukozyten in Bezug auf bestimmte Gewebe, das sogenannte Homing: Reife, aktivierte T-Zellen verlassen den Blutstrom gezielt dort, woher das von ihnen erkannte Antigen und die präsentierende Zelle stammen. So wird eine Rekrutierung passender T-Zellklone an den Ort des Pathogeneintritts ermöglicht.

Ein gut belegtes Beispiel für ein solches Imprintingsignal ist Retinsäure, der aktive Metabolit des Vitamins A. Sie wird von DCs der intestinalen Schleimhaut endogen synthetisiert und induziert die Transkription des Integrins $\alpha 4\beta 7$ und des Chemokinrezeptors CCR9 in T-Zellen. Beide Moleküle führen zusammen zu Zellwandadhäsion und Diapedese speziell in Gefäßen der intestinalen Mukosa [29, 32, 33]. Es konnte gezeigt werden, dass dabei durch epigenetische Modulation ein stabiles Migrationsverhalten programmiert wird [34].

Das Integrin *VLA-4* ($\alpha 4\beta 1$) auf in TH₁-Milieus aktivierten CTLs spielt hingegen eine entscheidende Rolle bei der Migration in Gewebe des zentralen Nervensystems [35, 36]. Ein monoklonaler Antikörper gegen $\alpha 4\beta 1$, *Natalizumab*, wird in der Therapie der multiplen Sklerose eingesetzt und beweist durch seine hohe Wirksamkeit die Bedeutung dieses Integrins für adaptive Immunreaktionen des ZNS [37, 38]. Weiterhin bewirkt eine durch *VLA-4* vermittelte Bindung der T-Zellen an DCs eine zusätzliche Kostimulation während der Antigenpräsentation [39]. Ein der Retinsäure vergleichbares Signal für die Expression von $\alpha 4\beta 1$ konnte bisher nicht identifiziert werden. Ein Indiz für dessen Existenz liefert jedoch die Tatsache, dass auch die *VLA4*-Expression vom Ort der initialen Antigenaufnahme determiniert wird. DCs tragen diese Ortsinformation dann weiter und übermitteln sie in den Lymphknoten an T-Zellen [40].

Tabelle 3. Eine Auswahl von für die vorliegende Arbeit relevanten Zytokinen mit dazugehörigen Rezeptoren und Funktionen bzw. Zielzellen (nach [41, 42]).

		Rezeptor	Funktion/Zielzelle
Interleukine	IL-1β	IL-1R	Aktivierung von TH-Zellen, Pyrogen, Entzündungsreaktion
	IL-1Ra	IL-1R1	Negativregulation des IL-1-Signals
	IL-2	IL-2R	T-Zellproliferation
	IL-2R	\emptyset	löslicher IL-2-Rezeptor, Bindung von IL-2, Funktion unklar
	IL-4	IL-4R	B-Zellaktivierung, IgE, TH ₂ -Differenzierung
	IL-5	IL-5R	Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen
	IL-6	IL-6R	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Fieber, Akute-Phase-Reaktion
	IL-7	IL7-R	Wachstum von Pre-B und Pre-T-Zellen
	IL-10	IL-10R	Immunsuppression, Stimulation regulatorischer T-Zellen
	IL-12	IL-12R	Aktivierung von NK-Zellen, TH ₁ -Differenzierung
	IL-13	IL-13R	B-Zellwachstum, IgE, TH ₁ -Inhibition
	IL-15	IL-15R, IL-2R β	Wachstum von NK- und T-Zellen, Überleben von Memory-CD8 ^{pos} -Zellen
IL-17	IL-17R	Rekrutierung von Neutrophilen, Induktion von TH ₂ -Zytokinen und Eosinophilen	
Chemokine	IL-8 (CXCL8)	CXCR1, CXCR2	Neutrophile, Basophile, T-Zellen
	MIG (CXCL9)	CXCR3	Aktivierte T(H ₁)-Zellen
	IP-10 (CXCL10)	CXCR3	Aktivierte T(H ₁)-Zellen
	MCP-1 (CCL2)	CCR2	T-Zellen, Monozyten, Basophile
	MIP-1α (CCL3)	CCR1, CCR5	Monozyten, T-Zellen (TH ₁ >TH ₂), NK Zellen, Basophile, DCs
	MIP-1β (CCL4)	CCR5	Monozyten, T-Zellen (TH ₁ >TH ₂), NK Zellen, Basophile, DCs

		Rezeptor	Funktion/Zielzelle
	RANTES (CCL5)	CCR1, CCR3, CCR5	Monozyten, T-Zellen (TH ₁ >TH ₂), NK Zellen, Basophile, DCs, Eosinophile
	Eotaxin (CCL11)	CCR3	Eosinophile
	CCL19	CCR7	Naive T-Zellen, B-Zellen, DCs
	CCL21	CCR7	Naive T-Zellen, B-Zellen, DCs
Interferone	IFNα	IFNAR	antiviral, Induktion von MHC-I
	IFNγ	IFNGR	aktiviert Makrophagen, Induktion von MHC-I, TH ₂ -Suppression
Andere	GM-CSF	GM-CSFR	Differenzierung von myelomonocytären Zellen und DCs
	TGF-β	TGF- β R	Antiproliferativ, antiinflammatorisch
	TNFα	TNFR	Entzündung, Endothelaktivierung

Table 4. Einige humane CD-Moleküle, deren Liganden und Funktionen (nach [42, 43]).

Leuko=Leukozyten, Lympho=Lymphozyten, Mono=Monozyten, Thrombo=Thrombozyten, T=T-Zellen, B=B-Zellen, NK=NK-Zellen. Die CD-Nomenklatur wurde 1982 in Paris von der HLDA-Konferenz eingeführt und seither regelmäßig aktualisiert [44].

	Vorkommen auf	Liganden (u.a.)	Funktion
CD3	T	TCR-Komplex	TCR-Signaltransduktion
CD4	T, Mono	MHC-II	Korezeptor für MHC-II
CD8	T, NK	MHC-I	Korezeptor für MHC-I
CD11c	myeloische Zellen	ICAM-1, Fibrinogen	Adhäsion, Kostimulation
CD14	Mono	LPS	LPS-Bindung an TLR4
CD19	B, DC	BCR-Komplex	B-Korezeptor
CD27	Lympho, NK	CD70	B- und T-Kostimulation
CD28	B, T	CD80, CD86	Kostimulation
CD29 (β_1-Integrin)	Leuko, Thrombo	VCAM	bildet mit CD49d VLA-4, Adhäsion, Blutgerinnung
CD40	APZ, NK, Endothel	CD154 (CD40L)	B-Stimulation, DC-Aktivierung (v.a. Zytokinproduktion)

	Vorkommen auf	Liganden (u.a.)	Funktion
CD45 (LCA) Unterformen: CD45RO CD45RA	alle hämato- poetischen Zellen Memory-T naive T		Tyrosinphosphatase, Signalverstärkung des TCR
CD49d (α_4-Integrin)	T, B, NK, DC, Mono, Endothel	VCAM	bildet mit CD29 VLA-4, Zelladhäsion
CD56	NK	CD56	Adhäsion
CD57	NK, T		Seneszenzmarker für T, Zell-Zell-Adhäsion
CD62L (L-Selectin)	Leuko	CD34	Rollen der Leukozyten am Endothel, Homing in Lymphknoten
CD69	aktivierte T, B, NK		früher Aktivierungsmarker
CD80 (B7.1)	APZ	CD28, CTLA-4	Kostimulation, -inhibition
CD83	DC, B		Reifungsmarker für DC, T- und B-Entwicklung
CD86 (B7.2)	APZ	CD28, CTLA-4	Kostimulation, -inhibition
CD95 (FAS)	Lympho, Mono, Leuko	FAS-L	Apoptoseinduktion
CD152 (CTLA-4)	aktivierte T und B	CD80, CD86	T-Inhibition
CD154 (CD40L)	aktivierte TH	CD40	Proliferation, B-Aktivierung
CD209 (DC-SIGN)	DC	ICAM-3	T-Proliferation
CD274 (PD-L1)	DC, aktivierte T und B, Mono	PD-1	T-Inhibition
CD279 (PD-1)	aktivierte T und B	PD-L1	T-Inhibition

1.1.3. Spezielle Aspekte dendritischer Zellen

Dendritische Zellen wurden von STEINMAN in den 1970er Jahren erstmals als eigenständige Zellen des Immunsystems beschrieben und mit dem heute gängigen Terminus belegt [45]. In der Epidermis hat LANGERHANS diese Zellen bereits 1868 identifiziert, jedoch keine Aussage zu ihrer Funktion treffen können [46]. Die

später nach ihm benannten Langerhans-Zellen sind Vertreter unreifer DCs, die eine Art Wächterfunktion ausüben. Sie sind in der Regel sesshaft und zunächst auf die Aufnahme von Interzellulärmaterial spezialisiert, das neben Zelldetritus auch Pathogene und deren Proteine enthält. Diese werden im Zytoplasma zu kurzkettigen Peptiden prozessiert und über das MHC-System präsentiert. Bei gleichzeitiger Stimulation durch Gefahrensignale in Form von Zytokinen oder PAMPs, wird eine spezifische Reifung der DCs in Gang gesetzt [19].

Neben einer verbesserten Antigenpräsentation, Kostimulation und Zytokinproduktion erhalten DCs dadurch auch die Fähigkeit zur raschen gerichteten Migration. Sie beginnen zunächst damit, Zell-Zell-Kontakte und Podosomen aufzulösen, die sie am Ort der Antigenaufnahme fixieren [47]. Anschließend findet eine Bewegung in Richtung der Chemokine CCL19 und CCL21 statt, die vom Endothel der Lymphgefäße und in T-Zell-Regionen der Lymphknoten sezerniert werden (Tab. 3) [48]. Dafür ist die Expression des Lymphknoten-Homingrezeptors CCR7 auf der DC-Oberfläche und eine Aktivierung der angeschlossenen Signalwege nötig. Für eine effiziente Migration ist das Gewebshormon *Prostaglandin E₂* (PGE₂) von besonderer Bedeutung. Bleibt dessen Bindung an EP2- und EP4-Rezeptoren der DCs aus, ist die Fähigkeit zur Migration dieser Zellen deutlich eingeschränkt [49, 50].

Reife und potenziell immunogene DCs wandern also aus dem infizierten Gewebe aktiv in Lymph- und Blutgefäße ein und gelangen binnen weniger Stunden in die parakortikalen Regionen der drainierenden Lymphknoten [51]. Dort initiieren sie durch das Priming naiver T-Zellen eine De-novo-Immunantwort. Bereits ausdifferenzierte T_{CM} werden an selber Stelle im Fall einer Reinfektion zur erneuten klonalen Expansion stimuliert [15].

Darüber hinaus sind DCs auch für die Steuerung der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen essentiell. Fehlen proinflammatorische oder überwiegen antiinflammatorische Signale, wird keine Abwehrreaktion ausgelöst. Stattdessen stimulieren die dann entstehenden tolerogenen DCs die T-Zell-Ober-

flächenmoleküle CTLA-4 (Bindung an CD80) und PD1 (Bindung an PD-L1). Sie hemmen damit die Funktion aktivierter Lymphozyten und bewirken die Proliferation *regulatorischer T-Zellen* (T_{reg}). Letztere inhibieren ihrerseits auf mehreren Wegen die rekrutierten Effektor-Zellen.

Indem die Balance aus pro- und antiinflammatorischen Faktoren der jeweiligen Situation angepasst reguliert wird, verhindert ein Organismus die eigene Zerstörung im Rahmen von Infektionsgeschehen und autoimmunologischen Prozessen [52, 53].

1.2. Die Tumorstoffe

1.2.1. Prinzip, Anfänge, Entwicklungen

Immunzellen sind grundsätzlich befähigt, auch transformierte körpereigene Zellen, wie sie etwa in Tumoren vorkommen, zu erkennen und geeignete Abwehrreaktionen gegen sie zu initiieren. Besonders eindrückliche Beispiele für klinische Manifestationen solcher Antitumorantworten bieten paraneoplastische neurologische Syndrome, die meist durch kreuzreaktive onkoneuronale Antikörper vermittelt werden [4]. OPPENHEIM beschrieb bereits im Jahr 1888 den Fall einer Patientin mit Magenkarzinom, die unter rasch progredienten neuropsychologischen Defiziten litt, obwohl ihr Hirngewebe weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Pathologien aufwies [54].

Vielen Malignomen gelingt es, der immunologischen Kontrolle zu entgehen, was mitunter durch die Stimulation von tolerogenen DCs und regulatorischen T-Zellen geschieht [53, 55]. Deshalb zielen verschiedene heute verfügbare Behandlungsansätze darauf ab, die Antitumorimmunität der Patienten gezielt zu fördern. Dazu zählen neben der zunehmend eingesetzten sogenannten *Checkpoint-Blockade* (z. B. CTLA-4-Inhibitor *Ipilimumab*, PD-1-Inhibitor *Nivolumab*) auch neuere Verfahren wie die DC-basierte Immuntherapie, die auch als *Tumorstoffe* bezeichnet wird. Bei dieser Behandlungsmethode werden patienteneigene DCs mit Tumorpeptiden koinkubiert. Diese werden zumeist aus einem Lysat des rese-

zierten Tumorgewebes gewonnen, das zerkleinert, bestrahlt und mehrfachen Einfrierzyklen ausgesetzt wird [56]. Im Vergleich zu Radio- und Chemotherapie, die unspezifische und auf die Dauer der Anwendung beschränkte Effekte ausüben, sollen immunologische Verfahren langanhaltende Tumorfreiheit über die Entwicklung eines Immungedächtnisses gewähren [53].

Eine der ersten und zugleich bekanntesten klinischen Studien auf diesem Gebiet wurde 1891 von COLEY am New York Hospital durchgeführt. Er hatte den Fall einer Patientin mit einem mehrfach rezidierten Sarkom des Halses verfolgt, die eine postoperative Wundinfektion in Form eines Erysipels entwickelte. In dessen Folge kam es überraschenderweise zur vollständigen und dauerhaften Rückbildung des Tumors [57]. Daraufhin führte der Mediziner mehrere erfolgreiche Interventionsstudien an vergleichbaren Patienten durch, die schließlich zur Entwicklung der ersten Tumorstoffimpfung der Geschichte führten. Die als *Coleys Toxin* bezeichnete Aufbereitung verschiedener Bakterienspezies führte nach peritumorale Injektion bei etwa einem Zehntel der Patienten zur vollständigen Remission der Erkrankung.

Die dabei beobachteten Effekte sind aus heutiger Sicht neben einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems in erster Linie auf tumorinfiltrierende Leukozyten zurückzuführen. Darunter befinden sich auch DCs, die Peptide des Tumors als Antigene präsentieren und eine spezifische Immunantwort einleiten [53]. Solche Tumorantigene entstammen zumeist keinen strukturell veränderten Proteinen, sondern werden von Tumoren verstärkt präsentiert und weisen eine besonders hohe Affinität zu bestimmten T-Zell-Rezeptoren auf [58, 59].

Die der Tumorstoffimpfung zugrundeliegenden Mechanismen wurden in den 1990er Jahren in zahlreichen Studien untersucht, wodurch man zu wichtigen Erkenntnissen gelangte: Für eine effektive Immunantwort ist ein immunogener Träger der antigenen Information nötig, der diese den Effektoren des Immunsystems über das MHC-System präsentiert und zugleich die Ausbildung von Toleranz verhindert [60]. Im murinen Modell wurden hierzu verschiedene Ansätze verfolgt, wie retroviral veränderte, bestrahlte Tumorzellen oder rekombinante

Listerienstämme, die allesamt wegen potentieller Risiken weit von einer Zulassung als Therapieform beim Menschen entfernt blieben [61, 62]. Diese Studien lehrten aber, dass im Tumorkontext insbesondere eine TH₁-vermittelte Expansion spezifischer CTLs gefordert ist. Als vielversprechend erwies sich daher die Verwendung autologer dendritischer Zellen, die eben jene Zellen mittels Kreuzpriming direkt aktivieren können. In Analogie zu den Adjuvantien, die herkömmlichen Impfstoffen beigefügt sind, bezeichnete Ralph Steinman DCs in diesem Kontext treffend als *nature's adjuvant* [63].

Den Grundstein für die DC-Vakzine legten INABA ET AL. im Jahr 1990, indem sie zeigten, dass mit Proteinen beladene DCs T-Zellen *in vivo* primen und eine spezifische Immunantwort auslösen können [64]. Entsprechende klinisch orientierte Versuche mit murinen Tumormodellen wurden zunächst mit aus Knochenmark gewonnenen DCs durchgeführt [65].

Den Weg zu Patientenstudien ebneten schließlich SALLUSTO ET AL. mit einer Methode, humane DCs aus Monozyten des peripheren Blutes zu gewinnen, ohne dazu wie bisher auf die aufwendige Aufarbeitung von Knochenmark oder Nabelschnurblut angewiesen zu sein [66]. Größere klinische Studien zur Vakzine mit Monozyten-DCs folgten für das maligne Melanom, da für diese Tumorart anfangs die meisten spezifischen Antigene bekannt waren [58, 67]. Mit *Sipuleucel-T* erhielt schließlich im Jahr 2006 die erste Tumorstoffvakzine eine offizielle Zulassung als Behandlungsoption des Prostatakarzinoms [68].

1.2.2. *Klinische Anwendung: Immuntherapie maligner Gliome*

Als klinischer Hintergrund für die vorliegende Arbeit soll jedoch die DC-basierte Tumorstoffvakzine bei malignen Gliomen (*High grade glioma, HGG*) dienen. Die wichtigste Entität aus dieser Gruppe stellt das *Glioblastoma multiforme (GBM)* dar, die mit 16 % aller primären Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) häufigste maligne Raumforderung dieser Lokalisation [69]. Die Erkrankung zeichnet sich durch weit ins umliegende Gewebe auslaufende Tumorzellstraßen aus, die meist nur eine unvollständige chirurgische Resektion erlauben. Zudem

erschwert die Blut-Hirn-Schranke, eine durch Tight-Junctions der Endothelzellen gebildete Barriere zwischen Blut und Hirngewebe, das suffiziente Anreichern von Chemotherapeutika im ZNS [70]. Entsprechend ist die Prognose meist infaust: Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach Operation und kombinierter Radiochemotherapie mit *Temozolomid* aktuell unter 10 %, im Mittel überleben die Patienten nur 15 Monate [71]. Aufgrund dieser unbefriedigenden Zahlen wird die Suche nach alternativen Behandlungsformen mit großer Vehemenz betrieben. Verschiedene Merkmale des Tumors lassen die Immuntherapie dabei besonders erfolgversprechend erscheinen.

Lange Zeit galt das ZNS als ein immunologisch privilegierter Ort, insbesondere, da das gesunde Hirngewebe nahezu keine Leukozyten und kein Lymphgefäßsystem aufweist. Die Blut-Hirn-Schranke stellt auch für Immunzellen ein effektives Hindernis dar: residente ZNS-DCs finden sich im Normalzustand nur an Stellen, wo diese nicht vollständig ausgebildet ist, etwa in den zirkumventrikulären Organen. Bei Infektionen, Traumata, Ischämien und Tumoren ändert sich dieses Bild jedoch rasch: aktivierte T-Zellen und periphere dendritische Zellen migrieren binnen weniger Stunden an den Ort der Schädigung und bewirken eine lokale Immunreaktion [72].

Maligne Gliome verfügen allerdings über zahlreiche Mechanismen der Immunevasion, indem sie ihre molekulare Mikroumgebung beeinflussen. Sie schütten eine Vielzahl immunsuppressiver Substanzen aus, darunter TGF- β , das zur Aktivierung von T_{reg} führt und wachstumsfördernde Effekte auf den Tumor und die ihn versorgenden Gefäße ausübt [70, 73]. Durch die Bildung von VEGF wird die Neoangiogenese und damit die Blutversorgung des Tumors weiter begünstigt [74]. Das den Tumorzellen entstammende Enzym Indolamindioxygenase (IDO) konvertiert Tryptophan in Kynurenin, welches Effektorzellen inhibiert und sowohl Stimulation als auch Chemotaxis für T_{reg} bewirkt [75, 76]. Ähnliche Effekte besitzen auch *myeloide Suppressorzellen*, die von dem lokalen inflammatorischen Milieu, reich an IL-1 β , IL-6 und TNF α , rekrutiert werden [70, 75]. Sezerniertes PGE₂ induziert darüber hinaus die IDO auch in infiltrierenden DCs, die dadurch

einen tolerogenen Phänotyp annehmen. Die dementsprechend hohe Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 inhibiert Signalwege proinflammatorischer Zytokine, an deren Stelle immunsuppressive Vertreter wie IL-10 gebildet und ein TH₂-dominiertes Umfeld geschaffen werden [70]. Auch die Proteinausstattung der Tumorzelloberfläche wird verändert: eine hohe Dichte von PD-L1 inaktiviert DCs und infiltrierende T-Zellen, die Expression von MHC-I-Molekülen nimmt ab [70, 75]. Der nun folgenden Elimination durch Natural-Killer-Zellen wird mittels Expression von HLA-E und -G und durch die Ausschüttung von TGF- β entgangen [70]. Weiterhin besitzen HGGs eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Evolution ihres Peptidoms unter dem Selektionsdruck des Immunsystems. Dadurch proliferieren eben jene Zellklone, die keine immunogenen Peptide aufweisen. Dieser als *Immunoediting* bezeichnete Vorgang liefert einen weiteren Teil der Erklärung, weshalb trotz des Nachweises zahlreicher tumorassoziierter Antigene eine spezifische Immunantwort nur bei einem kleinen Teil der Patienten nachweisbar ist [59, 75].

Mit der therapeutischen Tumorstudie wird nun versucht, durch Auslagerung der DC-Aktivierung in die Zellkulturschale die beschriebenen Mechanismen der Immunevasion zu umgehen, die tumorinfiltrierende DCs *in vivo* in einen funktionslosen Zustand treiben. BENENCIA schreibt hierzu [74]: „*This heterogeneity [of DCs] is subjacent to a characteristic that seems to be a hallmark of these cells: their plasticity. It has been shown that these cells can modify their phenotype in response to microenvironmental factors. This characteristic seems to be exploited by tumors that [...] repress the maturation of these cells, thus abrogating specific antitumor immune responses [...].*“

Erste Studien an Mäusen und Ratten sowie später an Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien bewiesen, dass die Anwendung der DC-Immuntherapie bei Patienten mit Gliomen sicher und verträglich ist. Insbesondere zeigte sich bei Verwendung von Tumorlysat als Antigenquelle kein gehäuftes Auftreten von autoimmunen Enzephalitiden, obwohl es neben Tumorzellen beinahe immer auch intaktes Hirngewebe enthält [77-79]. Die Schlüssigkeit der Methode konnte

durch den Nachweis von expandierenden tumorspezifischen T-Zellen im Blut der Patienten bestätigt werden. Häufig korrelierten diese labormedizinischen Parameter jedoch nicht ausreichend mit den klinischen Resultaten [80].

WHEELER ET AL. leiteten 2008 eine Phase-II-Studie mit 34 Glioblastompatienten in verschiedenen Tumorstadien und verwendeten autologe, Tumorlysat-beladene, unstimulierte DCs (iDCs). Ihnen gelang dabei der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen >1,5-fach gesteigerter postvakzinaler antigenspezifischer IFN γ -Produktion nach Stimulation von PBMC mit den peptidbeladenen DCs und einem längeren Überleben. Auf diese Weise definierte *Responder* lebten im Mittel 7 Monate länger als *Nonresponder*. Bei Patienten, die bereits vor Impfung eine spezifische IFN γ -Produktion zeigten, konnte diese durch die Impfung jedoch nicht weiter gesteigert werden. Dies weist darauf hin, dass die verwendete Vakzine zwar T-Zellen primen konnte, jedoch keine ausreichende immunstimulierende Wirkung besaß [78].

Eine Integration der Tumorstudie in das Standardtherapieschema des GBMs führten Ardon et al. 2010 ein. Die Pilotstudie mit 8 de-novo-GBM-Patienten, die Injektionen von autologen, Lysat-beladenen und mit TNF α , IL-1 β und PGE $_2$ ausgereiften DCs erhielten, bestätigte die Sicherheit und Durchführbarkeit des Verfahrens [80].

Eine entsprechende Phase I/II-Studie folgte 2012 und schloss bereits 77 Patienten ein. Die kombinierte Radiochemoimmuntherapie erbrachte ein medianes Gesamtüberleben von 18,3 Monaten in der Intention-To-Treat-Analyse. Hierbei zeigte sich jedoch eine starke Abhängigkeit von den prognostischen Gruppen, wie sie in der RPA-Klassifikation der *EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)* definiert wurden. Jüngere Patienten in gutem Allgemeinzustand in RPA-Klasse 3 profitierten am deutlichsten von der Immuntherapie, ihr Gesamtüberleben konnte gegenüber entsprechenden Vergleichsdaten annähernd verdoppelt werden (39,7 vs. 21,4 Monate) [71, 81].

Eine ähnlich konzipierte, jedoch randomisierte Interventionsstudie mit ausgewähltem Patientenkollektiv (34 Patienten, Karnofsky-Index >70) und Ganz-

zelllysat-gepulsten iDCs ergab ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von 32 Monaten gegenüber 15 Monaten in der Kontrollgruppe [82].

Denselben Ansatz der DC-Herstellung (Ganzzelltumorlysate, iDCs) verfolgt aktuell die erste in Phase III der Therapiezulassung befindliche DC-Vakzine für das Glioblastom, *DCVax[®]-L*. Die randomisierte, doppelt verblindete und placebokontrollierte, multizentrische Studie wird von *Northwest Biotherapeutics* betrieben und untersucht die Wirksamkeit der Behandlung an über 300 Patienten [83].

Bei allen genannten Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine Prognoseverbesserung durch die Tumorimpfung, die offenbar besonders aus der Kombination der Behandlungsmethoden erwächst [84]. So wird mittels Temozolomid-bedingter Inhibition der CCL2-Produktion die Rekrutierung von T_{reg} gehemmt und der immuntherapeutische Effekt damit unterstützt [78, 80, 81]. Ebenso zeigen Immun- und Radiotherapie synergistische Wirkungen, welche auf eine strahlenvermittelte erhöhte MHC-Expression der Tumorzellen und wiederum peritumorale T_{reg} -Depletion zurückzuführen sind [80]. Ein greifbares Beispiel für diese Immunaktivierung liefert der abscopale Effekt, der eine Tumormassenreduktion nach Bestrahlung entfernt gelegener Tumoranteile beschreibt [75]. Darüber hinaus erfasst die Immuntherapie nicht resektable mikroskopische Tumoranteile sowie strahlenresistente Gliomstammzellen und schließt damit Lücken, die die konventionellen Therapieformen naturgemäß aufweisen [31, 80]. Die kombinierte Radiochemoimmuntherapie bietet somit nach aktuellem Kenntnisstand die größte Chance auf eine günstige Beeinflussung von Krankheitsprogression und Überleben.

1.3. Die Ausreifung dendritischer Zellen auf dem Prüfstand

Um robuste klinische Effekte durch Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen zu gewährleisten, werden DCs mit starker Fähigkeit zu Kostimulation, Migration, Priming und Zytokinsekretion gefordert. Ein großer Nachteil vieler Studienpro-

tokolle ist das Fehlen eines suffizienten Reifungssignals während der Herstellung der DCs, die deshalb funktionell eingeschränkt sind [85]. Vor dem Hintergrund der Resistenzmechanismen von malignen Gliomen hat sich die Verwendung ausgereifter DCs aber als wichtigste Gegenmaßnahme erwiesen: Dabei konkurrieren die durch Reifungssignale phosphorylierte *p38-MAPK* und die durch TGF- β aktivierte *ERK* um Stimulation und Suppression der dendritischen Zelle [73, 86]. Durch Unterdrückung des Signaltransduktionsmoleküls *Smad2* und Bildung von IL-12 kann der inhibitorische Effekt von TGF- β durch reife DCs überschrieben werden [73].

Im klinischen Kontext verwendete man für die Ausreifung von DCs zunächst *Monozyten-konditioniertes Medium*, das von interindividuell schwankender Qualität und dessen genaue Zusammensetzung letztlich undefiniert war [87]. Daraus abgeleitet stellten JONULEIT ET AL. 1997 den ersten standardisierten Reifungscocktail bestehend aus TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ vor, der in der Lage war, vollständige phänotypische Reife zu erzeugen [88]. Er diente daher lange als Goldstandard der DC-Ausreifung, offenbarte letztlich aber eine entscheidende funktionelle Schwäche: durch den Einfluss von PGE₂ wird die Produktion von biologisch aktivem IL-12 inhibiert und überwiegend IL-23 gebildet [89-91]. Als Folge wird anstelle der gewünschten TH₁-Antwort die Expansion von TH₂ und TH₁₇-Zellen gefördert [70, 72, 89]. Weiterhin bewirkt PGE₂ wie bereits erwähnt eine Induktion der tolerogenen IDO in DCs [70]. Gleichzeitig wird die Wirkung von PGE₂ auf deren Migrationsfähigkeit aber dringend benötigt [49, 50]. Dieses Dilemma prägt bis heute den Diskurs um den optimalen Reifungscocktail für DCs.

Im europäischen Raum hat sich seither eine Variante des Jonuleit-Cocktails etabliert, die auf PGE₂ und IL-6 verzichtet, welches ebenfalls TH₁₇-Antworten triggern kann [56, 70]. Die mit der Kombination aus TNF α und IL-1 β ausgereiften „konventionellen“ DCs werden im Folgenden als cDCs bezeichnet. Wegen ihrer geringen IL-12-Sekretion und insuffizienten Migration wurden in den letzten

Jahren zahlreiche alternative Substanzen und deren Kombinationen zur DC-Ausreifung vorgeschlagen.

Neuere Ansätze beruhen zumeist auf der Verwendung von Toll-Like-Rezeptor-Agonisten, deren Nutzung wegen ihrer Rolle bei der Initiation einer Immunantwort vielversprechend erscheint. Im Gegensatz zu anderen PRRs wie *Nod-Like*-, *C-Typ-Lectin*- oder *RIG-Like-Rezeptoren* kommen TLRs nur auf Immunzellen vor und ihre Aktivierung reicht alleine bereits für eine vollständige Immunstimulation aus [3]. Der klinische Einsatz wird jedoch häufig durch ihre Gewinnung aus pathogenen Organismen erschwert, deren Zubereitungen folglich Kontaminationen z. B. bakterieller Endotoxine aufweisen können [10]. Für die Zulassung eines geprüften Arzneimittels in Deutschland müssen die Standards des *Paul-Ehrlich-Instituts* mit der Forderung nach *Guter Herstellungspraxis* (GMP) jedoch zwingend eingehalten werden [56]. Viele der in den letzten Jahren vorgeschlagenen TLR-Agonisten haben daher wenig Chancen, den Weg in die Anwendung am Patienten zu finden. Dies gilt beispielsweise für die von verschiedenen Gruppen vorgeschlagenen Aufbereitungen von Mycobakterien, Klebsiellen, Streptokokken oder Salmonellen [92-96]. Die Reifungserfolge dieser Substanzen erwiesen sich zudem als inkomplett, sodass jeweils entweder die Migration, Zytokinsekretion oder bestimmte phänotypische Merkmale der gewonnenen DCs Nachteile gegenüber dem klassischen Jonuleit-Cocktail besaßen. Nichtsdestotrotz sind einige TLR-Agonisten auch synthetisch herstellbar und aktuell oder in naher Zukunft flächendeckend in GMP-Qualität zu beziehen. Dazu zählen unter anderem der TLR3-Agonist Poly(I:C) und der TLR8-Agonist R848, die virale RNA imitieren [97-99].

SPISEK ET AL. wiesen 2001 eine dem Jonuleit-Cocktail überlegene IL-12-Produktion von DCs nach, die mit Poly(I:C) und TNF α behandelt wurden [100].

MAILLARD ET AL. schlugen sogenannte *α -Typ-1-DCs* vor. Diese mit Poly(I:C), IFN α , IFN γ , TNF α und IL-1 β stimulierten Zellen zeigten eine gute IL-12-Produk-

tion und CTL-Stimulation, aber beeinträchtigte Migration sowie wenig überzeugende Resultate in einer klinischen Studie bei HGG-Patienten [101-103].

Auch Poly(I:C) in Kombination mit löslichem CD40-Ligand erwies sich wegen suboptimaler Migration und niedrigerer Expression von CD83 und HLA-DR als unterlegen [104].

BOULLART und Kollegen gelang es schließlich 2008, durch Ausreifung mit Poly(I:C) und R848 in Kombination mit PGE₂ DCs zu generieren, die sowohl eine vergleichbare spontane und chemotaktische Migration wie der Jonuleit-Cocktail aufwiesen und gleichzeitig zur Sekretion großer Mengen IL-12 befähigt waren. PGE₂ beeinflusste daneben auch die Expression der phänotypischen Reifungsmarker wie CD83 positiv. Die Stimulation der IFN γ -Produktion von Lymphozyten sowie die IL-12-Produktion nach CD40-Ligation waren bei diesen DCs höher als unter Verwendung des Jonuleit-Cocktails. Für die antigenspezifische Aktivierung von CD4^{POS}-T-Zellen zeigten sich hingegen keine Unterschiede [105]. Damit lieferte diese Publikation erstmals eine Methode der DC-Ausreifung, die alle für die Tumorstimulierung geforderten Kernfähigkeiten hervorrufen konnte.

SPRANGER ET AL. verwendeten eine ähnliche Kombination, fügten jedoch noch TNF α , IL1 β und IFN γ hinzu und untersuchten die Eigenschaften der so gewonnenen DCs in einem verkürzten, 3-tägigen Herstellungsverfahren. Sie konnten die Ergebnisse BOULLARTS bestätigen. In Kokulturen mit NK-Zellen oder T-Zellen zeigten die TLR-gereiften DCs jeweils eine stärkere Stimulation als Zytokin-gereifte DCs [106].

1.4. Glykane der Zelloberfläche: Galactoseoxidasereaktion

Eine weitere, bisher unerwähnte Ebene der DC-Funktion stellt die makromolekulare Beschaffenheit ihrer Zelloberfläche dar. Die meisten Proteine der Zellmembran liegen als Glykoproteine vor, sind also kovalent an langkettige Polysaccharide gebunden, die eine Schicht um die Leukozyten bilden, welche als Glykokalix bezeichnet wird. Ihre Funktion besteht in der durch negative Ladungen vermit-

telten gegenseitigen Abstoßung der Leukozyten, was eine unspezifische Aggregation verhindert. Zudem bilden sie ein System der Informationsübertragung. Mittels spezifischer Bindung verschiedener Lectine an die Glykane können andere Zellen und Pathogene Informationen über deren Träger erhalten [107].

Der molekulare Aufbau dieser Polysaccharide ist bemerkenswert: Am terminalen Ende befindet sich stets N-Acetylneuraminsäure, die den Abbau der Glykoproteine durch Proteasen verhindert, gefolgt von Galactose oder N-Acetylgalactosamin [107, 108]. Diese beiden Zuckerreste bilden während der antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung Schiff'sche Basen mit Aminen auf der gegenüberliegenden Zelloberfläche aus. Die Interaktion der Zellen wird somit durch Verringerung der Distanz der komplementären Membranproteine erleichtert [109].

NOVOGRODSKY und KATCHALSKI zeigten bereits 1973, dass die enzymatische Behandlung von murinen Milzzellen mit Neuraminidase und *Galactoseoxidase* (GOX) zu starker Proliferation führte, was später als *mitogen treatment* Eingang in die Literatur fand [108, 110]. Die Neuraminidase vermittelt dabei die Abspaltung der N-Acetylneuraminsäure, während so freigelegte Galactose- und N-Acetylgalactosaminreste durch die Galactoseoxidase oxidiert werden. Hierbei entstehen aus Hydroxylresten am Kohlenstoffatom C6 Aldehyde, die dann für die Bildung der Schiff'schen Basen zur Verfügung stehen (*Abb. 1*).

BINIAMINOV ET AL. untersuchten dies in An- und Abwesenheit der adhärenen Leukozytenfraktion, bestehend aus Monozyten und Makrophagen. Bei deren Depletion war der stimulatorische Effekt deutlich herabgesetzt, was APZs als Schlüsselemente für die Vermittlung der GOX-Wirkung identifizierte. Bei Verwendung humaner Zellen erwies sich die reine Behandlung mit GOX ebenfalls als wirksam [111].

Im Jahr 1980 publizierten KLINKERT ET AL. ihre Untersuchungen zur Inkubation aufgereinigter DCs mit Neuraminidase und GOX. Sie konnten erstmals die hohe Fähigkeit der so behandelten DCs zur Stimulation autologer T-Zellen zeigen [110].

Jüngst wurde von HEUER, LUTZ und BEILHACK die GOX-Behandlung humaner DCs zur Immuntherapie erfolgreich patentiert. Die Autoren konnten in Übereinstimmung mit den genannten Studien eine erheblich gesteigerte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung so modifizierter DCs zeigen. In Kokulturen bildeten sich dabei rasch zahlreiche Zellcluster aus und die T-Zellzahl stieg drastisch an. Zudem ergaben sich keine Hinweise auf negative Auswirkungen der Behandlung in Bezug auf Phänotyp und Zytokinproduktion der DCs. Auch die dreidimensionale Struktur der Glykokalix wurde offenbar nicht verändert, was eine unbeeinträchtigte Bindung mehrerer getesteter Lectine nahelegte [112]. Damit stellte die Arbeitsgruppe eine potente Methode zur DC-Optimierung auch im Rahmen klinischer Studien vor. Weil die GOX-Anwendung als Adjuvans eine Ebene beeinflusst, die voraussichtlich nicht mit anderen Stimulatoren wie TLR-Agonisten oder Zytokinen interferiert, erscheint eine Kombination mit den bekannten Ansätzen vielversprechend [113].

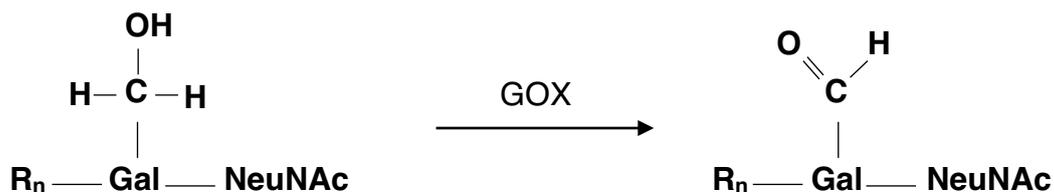


Abb. 1

Schematische Darstellung der Galactoseoxidasereaktion. Die an der Außenseite der Zellmembran gebundenen Polysaccharidreste werden an vorletzter Position, hier Galactose, oxidiert, dabei entsteht eine freie Aldehydgruppe.

1.5. Formulierung der Fragestellung

Vor dem skizzierten Hintergrund adressiert die vorliegende Arbeit nun folgende Fragen: Sind die Effekte des von BOULLART vorgeschlagenen Cocktails aus Poly(I:C), R848 und PGE₂ auf DCs (im folgenden *tlrDCs*) unter den gegebenen Bedingungen und im Vergleich mit dem konventionellen Cocktail aus TNFα und

IL-1 β reproduzierbar? Welche spezifischen Effekte sind dabei auf den Einfluss von PGE₂ zurückzuführen? Sind die phänotypischen Reifungsmerkmale dieser DCs auch in längerer Kultur stabil und besitzen sie eine ausreichende Lebensdauer? Findet eine gerichtete, chemotaktische Migration der DCs statt? Wie ist das Zytokinsekretionsprofil der Zellen beschaffen und gibt es diesbezüglich eine zeitliche Modulation? Sind tlrDCs zum Priming naiver CD8^{pos} T-Zellen befähigt, insbesondere auch bei Verwendung von Glioblastompeptiden mit geringer Vorläuferfrequenz im naiven T-Zellpool? Sind die aktivierten CTLs anschließend in der Lage, nach antigenspezifischer Restimulation inflammatorische Zytokine zu produzieren und hat der verwendete DC-Reifungscocktail Einfluss auf ihre funktionelle Avidität? Welchen Phänotyp besitzen die T-Zellen im Hinblick auf Differenzierungs-, Aktivitäts- und Homingmerkmale? Zuletzt: Kann die Inkubation von DCs mit GOX vor Beginn der Primingphase die Expansion antigenspezifischer T-Zellen fördern und nimmt dies Einfluss auf deren phänotypische und funktionelle Eigenschaften?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialliste

Antikörper

- Anti-human HLA-A2-FITC, BioLegend, 343304
- Anti-IFN γ -PE, Affymetrix/eBioscience, 12-7319-42
- alle weiteren FACS-Antikörper von Beckton Dickinson

Zytokine/Gewebshormone

- Prostaglandin E2, Sigma-Aldrich, P0409-1MG
- rhCCL19 (MIP3 β)
 - Peprotech, 300-29B
 - eBioScience, 14-8997
- rhCCL21 (Exodus-2), Peprotech, 300-35
- rhGM-CSF, CellGro/CellGenix, 1412-050
- rhIFN- γ
 - ThermoFisher, PHC4031
 - Invivogen, rhifn-g
- rhTNF- α , CellGro/CellGenix, 1406-050
- rhIL-1 β , CellGro/CellGenix, 1411-050
- rhIL-4, CellGro/CellGenix, 1403-050
- rhIL-7, CellGro/CellGenix, 1410-050
- rhIL-15, CellGro/CellGenix, 1413-050
- rhIL-21, CellGro/CellGenix, 1419-050

Medien/Puffer und Bestandteile

- Albumin (Human) 5 % Solution, Grifols
- Brefeldin A, Sigma-Aldrich, B7651-5MG
- CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Miltenyi Biotech, 700-25

- CryoStor CS5, Biolife Solutions, 205102
- Dendritic Cell Medium Serum-free GMP, CellGro/CellGenix, 20801-0500
- Dextran 40 10 % mit 0,9 % NaCl, AlleMan Pharma
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, D8537
- FACS Lysing Solution, BD Biosciences, 349202
- Fix & Perm Buffer (PBS mit 1 % Fetalem Kälberserum, 0,09 % NaN₃)
- Fix & Perm Fixation Medium (Medium A), Invitrogen/ThermoFisher, GAS001S100
- Fix & Perm Permeabilization Medium (Medium B), Invitrogen/ThermoFisher, GAS002S100
- Humanserum "off the clot" Typ AB, Biochrom, S01049.2-0,5
 - LOT: 0260A
 - LOT: 0672B (für Priming-Experimente)
- Penicillin-Streptomycin
 - ThermoFisher, 10.000 U/ml, 15140-122
 - Merck Millipore, 10.000 µg/ml, A2213
- Pulmozyme (Dornase alfa), Roche

Peptide und Dextramere

- MART-1 (Melan-A) Peptid ELAGIGILTV, JPT Peptide Tech., JE.# 21080_1, Batch# 100513G2-47
- MART-1 (Melan-A) HLA-A*0201 ELAGIGILTV MHC-Dextramer, Immudex, WB2162-APC
- NLGN4X (131-139) Peptid NLDTLMTYV, JPT Peptide Tech., JE.# 20931_3, Batch# 170413M2-45
- NLGN4X HLA-A*0201 NLDTLMTYV MHC-Dextramer, Immudex, WB3871-APC
- PTP (1347-1355) Peptid KVFAGIPTV, JPT Peptide Tech., JE.# 20931_4, Batch# 170413M2-46
- PTP HLA-A*0201 KVFAGIPTV MHC-Dextramer, Immudex, WB3873-APC

Sonstige Reagenzien

- Biocoll Trennlösung, Merck Millipore, L6615
- CD14 MicroBeads human, MACS/Miltenyi Biotech, 130-050-201
- Dasatinib, Selleckchem, S1021
- Galactoseoxidase
 - CellSystems, LS004524
 - Sigma-Aldrich, G-7907-150UN
- Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel, Invitrogen/ThermoFisher, LHC0009M, LOT: 1540716
- IL-12 p70 Human Uncoated ELISA Kit with Plates, ThermoFisher, 88-7126-22
- Lipopolysaccharide (LPS) von E. coli 0111:B4, Sigma-Aldrich, L4391-1MG
- Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotech, 130-093-244
- Polyinosinmonophosphat:Polycytidinmonophosphat (Poly(I:C))
 - Sigma-Aldrich, P1530-25MG
 - Invivogen, tlrl-pic
- R848 (Resiquimod), Invivogen, tlrl-r848-5
- Trypanblau Stain (0.4%), Invitrogen/ThermoFisher, T10282

Hardware

- Cell culture plates 12 wells Greiner CELLSTAR, Sigma-Aldrich, M8687
- Cell culture plates 48 wells Greiner CELLSTAR, Sigma-Aldrich, M8937
- Cell culture plates 96 well round bottom, Sigma-Aldrich, CLS3799-50EA
- Countess Cell Counting Chamber Slides, Invitrogen, C10283, LOT: 2C08741A
- MACS Säulen MS/LS/LD, Miltenyi Biotech, 130-042-201/-401/-901
- Transwell 5.0 µm Pore Insert Steril, Corning, 3421
- Zellkultur-Multischalen 6 wells Nunc, Thermo Scientific, 140675
- Zellsieb Falcon 40 µm, Corning, 352340
- Zellsieb Falcon 70 µm, Corning, 352350

2.2. Vorbemerkungen

Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank vorgenommen, ausgenommen einige Färbungen am jeweiligen Messtag. Alle Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, mit 400 g, für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Erhebung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit einem *FACSCalibur* und *CellQuest Pro 4.0.2 für Macintosh* (beide *BD Biosciences, Singapur*). Für jeden Zelltyp wurde eine Gerätekalibrierung mittels Kanalkompensation anhand von CD45 vorgenommen. Das durchwegs verwendete *CellGro GMP-DC-Medium* wird im folgenden vereinfacht als Zellkulturmedium bezeichnet.

2.3. Zellgewinnung und -aufbereitung

2.3.1. Leukozyten aus LRS-Kammern

Als Ausgangsmaterial dienten Leukozytenproben aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg. Diese fallen bei Thrombozytenspenden mit leukozytenreduzierendem System (LRS-Kammer) an und stellen eine gute Quelle für anonyme Blutproben gesunder Spender dar [114].

Zunächst wurden 15 ml Biocoll-Trennlösung in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die Leukozytenproben im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Nach langsamer Überschichtung der Trennlösung mit der Zellsuspension wurden die Röhrchen mit 400 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert (*Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen, D*). Die entstandene Leukozytenschicht wurde anschließend gesammelt. Nach einem Waschschrift und Resuspendieren in PBS konnte eine Zellzahlbestimmung vorgenommen werden. Diese wurde entweder an einem ADVIA-120-Hämatologie-System (*Siemens Healthcare, Erlangen, D*) oder einem Countess-Zellzähler (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) durchgeführt. Die mittlere Anzahl aus einer einzelnen LRS-Kammer gewonnener PBMC lag bei $4,6 \times 10^8$ Zellen.

2.3.2. Leukozyten aus Apherese

Für die Experimente zum T-Zell-Priming wurde wegen der benötigten großen Anzahl homologer Leukozyten auf Leukapheresen zurückgegriffen. Die Zellseparationen wurden in der klinischen Aphereseeinheit der Universitäts-Kinderklinik an vier gesunden, HLA-A02-positiven, freiwilligen Spendern durchgeführt, die zuvor ihre informierte Zustimmung erteilten.

Nach erfolgreicher Sammlung wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und eine Probe für die Zellzahlbestimmung (ADVIA) entnommen. Es konnten im Mittel $1,2 \times 10^{10}$ ($\pm 1 \times 10^9$) PBMC gewonnen werden. Das Apheresat zeigte bereits einen hohen Anteil an Lymphozyten (63 % \pm 8 %) und Monozyten (21 % \pm 4 %). Es waren durchschnittlich noch 1×10^9 ($\pm 7 \times 10^8$) Erythrozyten pro Milliliter enthalten, der mittlere Hämoglobingehalt lag bei $2,4 \pm 2$ g/dl.

Die Zellen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert. Dazu wurde die Suspension gewaschen, durch Resuspendieren in *CryoStor*-Medium auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt und nach Aufteilen auf Kryogefäße in ein Einfriergerät (*control rate freezer, Kryosafe Integra/Delta T, Cryotherm, Kirchen, D*) gegeben. Nach Abkühlen auf -100 °C wurden die Proben in einem Stickstofftank (*Biosafe, Cryotherm, Kirchen, D*) bei -160 °C weitergelagert und bei Bedarf portionsweise aufgetaut. Als Vorlage für das Auftauprotokoll diente die von RUBINSTEIN 1995 publizierte Methode [115]. Die Kryogefäße wurden zunächst auf Eis inkubiert und in der Zwischenzeit kaltes Auftaumedium (PBS mit 5 % Dextran 40, 2,5 % w/vol Humanalbumin, 100 U/ml Pulmozyme) mindestens entsprechend dem Gesamtvolumen der aufzutauenden Proben hergestellt. Diese wurden in der Hand erwärmt und tropfenweise zu dem restlichen vorbereiteten Medium gegeben, sobald sich die Suspension verflüssigt hatte. Die Zellen wurden gepoolt, gewaschen, in 10 ml frischem Auftaumedium sehr vorsichtig resuspendiert und vor der weiteren Verwendung zunächst 15 min auf Eis inkubiert.

2.3.3. Dendritische Zellen

Die Herstellung dendritischer Zellen erfolgte aus Monozyten wie an anderer Stelle beschrieben [66]. Diese wurden mittels Trennsäulen entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Antikörperbeschichtete magnetisierbare Mikropartikel, sogenannte Beads, binden in diesem Verfahren an CD14^{pos} Monozyten und immobilisieren diese in einem über der Trennsäule angelegten Magnetfeld, während sie andere Zellen frei passieren. Durch Spülen der Säule, anschließendes Entfernen aus dem Magnetfeld und erneutes Spülen werden die gewünschten Zellen aufgereinigt. Als Puffer- und Spüllösung wurde hierbei *CliniMACS*-Puffer oder PBS mit 1 % HS verwendet. Der Selektionserfolg wurde am FACS nach folgendem Schema kontrolliert:

Tabelle 5. Färbungsschema nach CD14-MACS. Bei den Versuchen zum T-Zell-Priming wurde CD56 statt CD3 angefärbt, um eine für diese Versuche relevante Kontamination mit NK-Zellen zu registrieren.

FITC	PE	PerCP	APC
CD19	CD3 / CD56	7AAD	CD14

Der Anteil CD14^{pos}/7AAD^{neg} Monozyten lag dabei im Mittel bei 94 ± 6 % mit je ≤ 1 % verbleibenden T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen. Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Monozyten gezählt, gewaschen und in Zellkulturmedium (1 % PenStrep, 10 % HS, 1.000 IU/ml IL-4 & GM-CSF) auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Je 2 ml (3×10^6 Zellen) wurden in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Wärmeschrank inkubiert (*HeraCell 150, Heraeus, Hanau, D*). Auf diese Weise wurde eine Differenzierung der Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs) bewirkt [66, 116].

Nach 48-72 h (=Tag 2/3) erfolgte ein partieller Mediumwechsel mit Zytokinzugabe. Pro Well wurden hierfür 1 ml gesammelt, gepoolt, zentrifugiert und mit frischem Zellkulturmedium sowie Zytokinen berechnet auf das ausgetauschte

Volumen in die Wells zurück gegeben. An Tag 5 wurde ein zweiter Mediumwechsel durchgeführt und den Kulturen einer der folgenden Reifungscocktails zugegeben.

Table 6. Die fünf verwendeten DC-Konditionen wurden durch die Zugabe der unterschiedlichen Reifungscocktails definiert. Neben den TLR-Agonisten PolyI:C (TLR3), R848 (TLR8) und LPS (TLR4) wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF α und IFN γ sowie PGE $_2$ verwendet.

iDC	ohne weitere Substanzzugabe
cDC	IL-1 β (2000 U/ml) + TNF α (1000 U/ml)
tlrDC	PolyI:C (20 μ g/ml) + R848 (3 μ g/ml) + PGE $_2$ (10 μ g/ml)
tlrDC/IFNγ	PolyI:C (20 μ g/ml) + R848 (3 μ g/ml) + IFN γ (1000 U/ml)
lpsDC	LPS (10 ng/ml) + IFN γ (100 U/ml)

Nach 48 h dauernder Ausreifungsphase wurden die Zellen abgelöst und die Messungen durchgeführt (=Tag 7). Um die plastikadhärenten DCs von den Böden der Platten abzulösen, wurde der gesamte Überstand zunächst in separate Zentrifugenröhrchen überführt. Die geleerten Wells wurden mit 3 ml kaltem PBS befüllt und die Zellkulturplatten für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Well-Böden kräftig gespült. Sobald sich unter mikroskopischer Kontrolle (*DM IRB Lichtmikroskop, Leica, Wetzlar, D*) keine Adhärenz mehr zeigte, wurden die Zellen gesammelt und eine Zellzahlbestimmung vorgenommen.

2.4. Phänotypfärbung

Es wurden zunächst etwa 1×10^5 Zellen für ein FACS-Röhrchen entnommen, gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 7. Standardschema der DC-Phänotyp-Kontrolle. Jedes Röhrchen enthält 7AAD zum Ausschluss avitaler Zellen. #1 enthält Informationen über die Kostimulation, #2 über Antigenpräsentation und phänotypische Reife, #3 dient der Bestimmung von Kontamination anderer Zelltypen, #4 gibt Aufschluss über die Integrinexpression.

	FITC	PE	PerCP	APC
#1	CD86	CD80	7AAD	CD14
#2	HLA-DR	CD83	7AAD	CD14
#3	CD19	CD56	7AAD	CD3
#4	CD14	CD11c	7AAD	CD209

Im Anschluss an die Zugabe der Antikörper wurden die Proben für 20 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und 20 µl 7AAD hinzugefügt. Nach 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen bis zu ihrer Messung auf Eis gelagert.

2.5. Überleben

Zur Dokumentation des Überlebensverhaltens der unterschiedlich ausgereiften DCs wurde bei drei Versuchsläufen die Dauer der Kultur über Tag 7 hinaus verlängert. Um dabei die Ausreifungsdauer auf unverändert 48 h zu begrenzen, wurde das komplette Zellkulturmedium aller Wells nach Ablauf der Zeit ausgetauscht, wobei nun GM-CSF sowie IL-4 in erniedrigter Dosis von 250 U/ml zugegeben wurden. An den Tagen 8, 9, 11 und 13 wurden aus separaten Wells Messungen der Zellzahl und FACS-Färbungen nach oben beschriebenem Schema durchgeführt. Alle 48 h (Tage 9 und 11) wurde das Medium wie gewohnt zur Hälfte getauscht und mit neuen Zytokinen (250 U/ml) versehen (*Abb. 2A*).

2.6. Migration

Um die Fähigkeit zur Migration der DCs zu überprüfen, erfolgte am Tag der Phänotypfärbung ein Chemotaxisversuch (*Abb. 2B*). Die DCs wurden dazu in Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Davon wurden je 100 μ l ($=1 \times 10^5$ DCs) in die Siebeinsätze einer Transwell-Platte gegeben, nachdem zuvor in den unteren Schalen je 600 μ l Medium mit 25 ng/ml CCL19 und CCL21 vorgelegt wurden. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden die Einsätze entfernt und die migrierten Zellen durch Spülen der Wellböden abgelöst. Die Evaluation erfolgte am FACS für eine definierte Zeit von 300 s bei mittlerer Geschwindigkeit. Mittels SSC/FSC-Gating wurde eine DC-Region festgelegt und die darin enthaltenen Events gezählt.

Bei drei Experimenten wurde zudem eine Phänotypbestimmung der migrierten Zellen vorgenommen. Dazu wurden die nach der Migrationsmessung im FACS-Röhrchen verbliebenen Zellen nach folgendem Schema gefärbt:

Tabelle 8. Färbung der migrierten DCs. Wegen Mangel an Anti-HLA-DR-APC-Antikörpern wurden nur die FITC- und PE-Kanäle verwendet, was eine leicht veränderte MFI im Vergleich zur Standardfärbung zufolge hatte.

FITC	PE	PerCP
CD86	CD83	7AAD

2.7. T-Zell-Priming

2.7.1. Vorbemerkungen

Zur Bestimmung ihrer Priming-Fähigkeiten wurden die unterschiedlich ausgereiften DCs mit autologen, naiven CD8^{pos} T-Zellen koinkubiert und nach 10 Tagen deren Proliferation, Peptidspezifität, Zytokinproduktion und Phänotyp bestimmt (*Abb. 2C*). Als Vorlage diente das von WÖLFL und GREENBERG publizierte

Protokoll, welches in einzelnen Punkten leicht angepasst wurde [117]. Die gesamte DC-Kulturdauer bis Beginn der Kokultur betrug wie zuvor 7 Tage. Außerdem wurde die Selektion naiver T-Zellen nicht in sogenannter *Untouched-Technik* durchgeführt.

Als Antigene wurden die Glioblastompeptide NLGN4X₁₃₁₋₁₃₉ und PTP₁₃₄₇₋₁₃₅₅ ausgewählt, welche in dieser Form nur auf Tumorzellen, nicht jedoch im normalen ZNS-Gewebe exprimiert werden und für die die Möglichkeit peptidspezifischer T-Zell-Antworten nachgewiesen wurde [59]. Die Peptide wurden separat zusammen mit den Reifungscocktails in einer Konzentration von 1 µg/ml der DC-Kultur zugegeben. Mit Melan-A (MART-1) beladene IpsDCs dienten wie in der Originalpublikation stets als Positivkontrolle. Dieses Protein mit unbekannter Funktion, das von Melanozyten und malignen Melanomen exprimiert wird, eignet sich hierfür in besonderer Weise. Während die Frequenz epitopspezifischer, naiver CD8^{pos} T-Zellen im peripheren Blut allgemein ungefähr 1-5/10⁵ beträgt, liegt diese für Melan-A bei etwa 1/10³ und somit bis zu 100-fach höher [118]. cDCs ohne Peptidzugabe dienten als Negativkontrolle. Alle Zellzahlbestimmungen dieser Versuchsreihe wurden mit dem *Countess*-Zellzähler durchgeführt.

Da die verwendeten Peptide eine Restriktion für HLA-A*02:01 aufweisen, wurde bei unklarem Status eine HLA-Typisierung der Spender mittels FACS vorgenommen. 100 µl Vollblut aus venöser Blutentnahme wurden dazu mit 1 ml Lysopuffer versetzt und nach 10-minütiger Inkubation gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und 5 µl Anti-HLA-A2-FITC zugegeben. Eine ungefärbte Probe diente als Kontrolle.

2.7.2. Galactoseoxidase

Die Wirkung von Galactoseoxidase als potentiell Adjuvans wurde in einigen Primingversuchen getestet. Es wurde 90 min vor Ende der Ausreifungsperiode in einer Konzentration von 2 U/ml zu der betreffenden Kultur gegeben und nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS ausgewaschen.

2.7.3. T-Zell-Gewinnung

Autologe, naive CD8^{pos} T-Lymphozyten wurden mittels Trennsäulen (*Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit human, Miltenyi*) nach Anleitung des Herstellers aus aufgetautem Apheresat gewonnen. Dabei wurden in einem ersten Schritt biotinylierte Antikörper gegen CD45RO, CD56, CD57 und CD244 zu den Zellen gegeben und nach erfolgter Inkubation Anti-Biotin-Beads zur Suspension hinzugefügt. Nach Auftrennung des Zellgemisches konnten die in der Durchflussfraktion verbleibenden unmarkierten naiven T- und B-Zellen aufgefangen und daraus im Anschluss mit Anti-CD8-Beads die gewünschte Zellart aufgereinigt werden. Das Ergebnis wurde am FACS nach folgendem Schema kontrolliert.

Tabelle 9. FACS-Kontrollschema der naiven CD8^{pos}-Aufreinigung. #1 und #2 dienten der Einordnung in T-Zell-Subtypen, während #3 Kontaminationen anderer Zelltypen zeigen sollte.

	FITC	PE	PerCP	APC
#1	CD8	CD62L	7AAD	CD45RA
#2	CD8	CD27	7AAD	CD28
#3	CD8	CD3	7AAD	CD56

Bezogen auf lebende Lymphozyten waren dabei etwa 97 ± 2 % CD8^{pos}, davon wiederum 93 ± 5 % CD45RA^{pos}/CD62L^{pos} sowie 94 ± 4 % CD27^{pos}/CD28^{pos}.

Im Anschluss wurden die Zellen gezählt, gewaschen und in Zellkulturmedium (1 % PenStrep, 5 % HS, 5 ng/ml IL-7) auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. In einer 6-Well Platte (2 ml pro Well) wurden diese über Nacht inkubiert.

2.7.4. DC-Kokultur

Nach der Übernachtslagerung der T-Zellen wurden diese wieder gepoolt, eine erneute Zellzahlbestimmung vorgenommen und die Konzentration in Zellkulturmedium (1 % PenStrep, 5 % HS) auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach gewohnter Ablösung der DCs (Eisinkubation, Spülen mit PBS) wurden diese in 10 ml PBS in separate Zentrifugenröhrchen aufgenommen und mit 30 Gy bestrahlt, um

eine Proliferationsblockade für eventuell kontaminierende NK-Zellen zu bewirken. Die bestrahlten DCs wurden gewaschen und in Zellkulturmedium (1 % Pen-Strep, 5 % HS, 60 ng/ml IL-21) mit 5×10^5 Zellen/ml aufgenommen. Die Suspensionen beider Zelltypen wurden sodann 1:1 vermischt und die Vertiefungen einer 48-Well-Platte mit jeweils 500 μ l des Zellmixes befüllt, sodass initial pro Well $1,25 \times 10^5$ DCs und 5×10^5 T-Zellen entsprechend einem Verhältnis von 1:4 vorliegen [117]. Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Kombinationen von DC-Ausreifung und Peptid sowie die Anzahl der jeweils eingesetzten Replikate pro Versuch.

Tabelle 10. Wells der Primingversuche. cDCs ohne Peptid dienen als Negativkontrolle, lpsDCs mit Melan-A als Positivkontrolle. Üblicherweise wurden 3 separate Wells pro Kombination aus DC-Kondition und Peptid angelegt. In einem der Versuche wurden für die Glioblastompeptide 5 Wells verwendet. GOX-DCs wurden nur mit Melan-A-Peptid getestet.

	ohne	Melan-A	NLGN4X	PTP
cDC	3 (Negativkontrolle)	3	3-5	3-5
lpsDC	∅	3 (Positivkontrolle)	3-5	3-5
tlrDC	∅	3	3-5	3-5
cDC/GOX	3	3	∅	∅

Nach 72 h (=Tag 3) erfolgte eine Medium- und Zytokinzugabe, indem die Gesamtvolumina der Wells verdoppelt und dabei eine finale Konzentration von je 5 ng/ml IL-7 & IL-15 zugegeben wurden. Dieser Vorgang wurde nach 48 h (=Tag 5) wiederholt, wobei die nun in 2 ml Medium vorliegenden Zellen in 12-Well-Platten umgesiedelt wurden. Nach weiteren 48 h (=Tag 7) wurde eine finale Konzentration von 10 ng/ml IL-7 & IL-15 zugegeben und die Zellen in 6-Wells überführt.

2.7.5. Zellzahlbestimmung und Dextramer-Färbung

Nach wiederum 72 h (=Tag 10) wurden die T-Zellen gezählt und für eine FACS-Messung vorbereitet, um die Frequenz peptidspezifischer T-Zellen zu bestimmen. Dafür wurden etwa 2×10^5 Zellen für jedes FACS-Röhrchen entnommen und in eine 96-Well-Platte gegeben, worin die Zellen gewaschen und in 50 μ l PBS mit 1 μ l Dextramer-APC und 0,1 mmol/ml Dasatinib resuspendiert wurden. Nach 30 min dunkler Lagerung bei Raumtemperatur wurden 50 μ l PBS und 2 μ l Anti-CD8-FITC hinzugefügt und die Platte 15 min bei 4 °C weiterinkubiert. Einer Zugabe von 100 μ l PBS folgte ein Waschschrift (1700 rpm, 5 min, 4 °C), das Aufnehmen in 120 μ l PBS mit 10 μ l 7AAD sowie das Überführen in FACS-Röhrchen. Nach 5 min Inkubation wurden alle Proben bis zur Messung auf Eis gelagert. Für die Dextramer-Färbung nicht benötigte Zellen wurden in ihren Wells belassen, 1:1 mit frischem Zellkulturmedium (5 % HS, 1 % PenStrep, 5 ng/ml IL-7 & IL-15) aufgefüllt und im Wärmeschrank inkubiert.

2.7.6. Restimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung

Um die Zytokinproduktion der für Melan-A geprimten T-Zellen nach Peptid-Restimulation zu überprüfen, wurden diese mit autologen, Melan-A-beladenen, CD14-selektierten PBMCs koinkubiert. Durch Anlegen einer Peptid-Verdünnungsreihe wurde außerdem die T-Zell-Rezeptoravidität bestimmt [119]. Dazu wurde an Tag 11 eine Portion Apheresat aufgetaut und daraus Monozyten isoliert. Von diesen wurden je 5×10^4 in 100 μ l Zellkulturmedium (1 % HS, 1 % PenStrep, 1000 U/ml IL-4 & GM-CSF) in die Vertiefungen einer 96-Well Platte gegeben und Melan-A in den Konzentrationen 1 μ g/ml, 10^{-2} μ g/ml, 10^{-4} μ g/ml und 10^{-6} μ g/ml beigefügt. Über Nacht wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag (=Tag 12) wurden die T-Zellen innerhalb der Gruppen gepoolt und nach Bestimmung der Zellzahl in Zellkulturmedium (5 % HS, 1 % PenStrep, 1 μ g/ml Brefeldin A) auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Monozyten wurden in ihrer Platte durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand dekantiert. Pro Well wurden dann 200 μ l T-Zell-Suspension hin-

zugegeben und mit den darin befindlichen Monozyten vermischt (Monozyten/T-Zell-Verhältnis 1:4). Es folgte eine Inkubation für 5 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde die gesamte Platte gewaschen und dekantiert. Die in den Wells verbleibenden Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert, 5 µl Anti-CD8-FITC zugegeben, die Platte 15 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen und in je 100 µl *Fix & Perm Medium A* resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurde der letzte Waschschrift wiederholt und nach Dekantieren des Überstands 100 µl *Fix & Perm Medium B* sowie je 5 µl Anti-IFN γ -PE und Anti-TNF α -APC zugegeben. Nach 20 min Lagerung bei 4 °C und erneutem Waschen wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und gemessen.

2.7.7. T-Zell-Phänotypbestimmung

An Tag 12 der Kokultur wurde außerdem eine Bestimmung des T-Zell-Phänotyps vorgenommen. Die Zellen wurden nach der Zählung zu 1×10^5 bis 1×10^6 in FACS-Röhrchen portioniert, gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert, je 5 µl Antikörper zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und nach Zugabe von 20 µl 7AAD und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln die Proben auf Eis gelagert und gemessen. Für intrazelluläre Analyte wurden die Zellen im Anschluss noch wie beschrieben fixiert und permeabilisiert. Entsprechend wurde für die Dextramer-Färbung wie beschrieben vorgegangen. Es wurden folgende Färbeschemata angewendet:

Tabelle 11. Kontrolle des CD8^{pos}-Phänotyps am Ende der Kokultur. #1 gibt Aufschluss über die Proliferationsaktivität, #2 und #3 erlauben eine Zuordnung zu den T-Zell-Subtypen, während #4 den VLA-4-Status definiert.

	FITC	PE	PerCp	APC
#1	–	Ki-67	CD8	CD3
#2	CD69	CD27	CD8	CD45RA
#3	CD57	CD62L	CD8	CD45RA
#4	CD29	CD49d	CD8	Melan-A-Dextramer

2.8. Zytokinmessung aus Überständen

Den DC-Kulturen wurden 8 h (n=7), 16 h (n=3) und 48 h (n=10) nach Beginn der Ausreifung, den Priming-Wells (n=2) am Tag 10 der Kokultur je 200 µl Mediumüberstand entnommen und diese nach Zentrifugation (*Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, D*) in sterilen Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C zwischengelagert (*Froster, Kirsch, Offenburg, D*).

Für die Messung der Zytokinproduktion wurde zunächst das *Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel (Life Technologies)* nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dieses Prinzip beruht auf magnetischen Beads, die für jedes Analyt eine spezifische Autofluoreszenz aufweisen. Die Beads wurden in einer Mikrotiterplatte mit Proben von jeweils 50 µl Mediumüberstand inkubiert und im nächsten Schritt ein biotinylierter Detektorantikörper hinzugefügt, der proteinspezifisch an die immobilisierten Zytokine bindet. Eine fluoreszierende Verbindung aus Streptavidin und R-Phycoerythrin (RPE) wurde beigefügt, die ihrerseits hochaffin an das Biotin bindet. Der so gebildete Komplex aus Zytokin, Bead, Detektorantikörper und Streptavidin-RPE ermöglicht die simultane Bestimmung aller Substanzen, indem das Bead-Signal eine Zuordnung zum Analyt und die Streptavidin-RPE-Intensität die Quantifizierung erlaubt.

Um die gemessene Fluoreszenz (MFI-Wert) in eine Stoffkonzentration (pg/ml) umrechnen zu können, wurde eine chargenspezifische, interpolierbare Standardkurve verwendet. Folgende 25 Analyte wurden auf diese Weise bestimmt: Eotaxin, GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α . TNF α , IL-1 β , IL-4 und GM-CSF wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen, da sie als Mediumzusätze Verwendung fanden und daher keine validen Werte gewährleisten konnten. Ebenso wurde auf die Darstellung von Eotaxin verzichtet, das in keiner Überstandsprobe nachgewiesen werden konnte.

Die Messung erfolgte an einem *MAGPIX-System (Luminex Corporation, Texas)*. Alle Proben wurden als technische Duplikate gemessen und deren Mittel als Er-

gebnis gewertet. Mithilfe der Systemsoftware erfolgte die Anpassung der Standardkurven und die Projektion der Messwerte. Für die Erstellung der in *Abb. 8* gezeigten Heatmaps wurden die jeweiligen Werte der Zytokine \log_2 -transferiert und auf dieser Basis eine Farbskala erstellt. Eine normalisierte Variante wurde erzeugt, indem iDC als spenderspezifischer Nullwert diente und die Werte von cDC und tlrDC als dessen Vielfaches ausgedrückt wurden. Diese Darstellung erleichterte einen Vergleich der Modulation der Zytokine untereinander, indem die Unterschiede zwischen den Absolutwerten relativiert wurden. Zudem verminderte diese Methode die Effekte spenderabhängiger Zellzahldifferenzen.

Für das aus den Untereinheiten p35 und p40 bestehende IL-12 ergab sich diesbezüglich eine besondere Situation. Durch den Multiplexassay wurde nicht ausschließlich das biologisch aktive Heterodimer IL-12p70, sondern auch die p40-Einheit gemessen. Somit erlaubte die bestimmte Konzentration keinen funktionellen Rückschluss, da das antagonistisch wirkende IL-12p40-Homodimer und sogar IL-23 in den gemessenen Summenwert eingingen. Ergänzend wurde daher noch ein IL-12p70-spezifischer ELISA (*Thermo Fisher, Waltham, MA*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dem Kit gelieferte 96-well-Platten wurden dabei zunächst über Nacht mit dem spezifischen Antikörper beschichtet. Anschließend wurden Standards in absteigender Verdünnung und die Proben jeweils in Duplikaten hinzugegeben. Einer Reihe von Waschschritten folgte die Zugabe des Detektorantikörpers und nachfolgend der Substrate für die enzymatische Reaktion. Deren Farbumschlag wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem *TECAN GENios (Tecan GmbH, Crailsheim, D)* ausgelesen. Die ermittelten Werte konnten dann mit der Standardkurve und der dazugehörigen *Magellan*-Software in eine Stoffkonzentration umgerechnet werden.

2.9. Methodik der Datenauswertung

Für die Verwaltung der Daten wurde *Microsoft Excel für Mac 2011 (Microsoft Corporation)* verwendet und zur Berechnung von statistischer Signifikanz der zweiseitige, gepaarte Student'sche t-Test herangezogen. Angaben zur Streuung der Werte beziehen sich auf die Standardabweichung σ der betreffenden Stichprobe. Grafiken wurden vornehmlich mit *Prism 7.0 für Mac OS X (GraphPad Software, Inc.)* erstellt und Kurven programmintern auf Signifikanz untersucht. Für Dotplots und Histogramme wurde *FlowJo 10 für Macintosh (FlowJo, LLC, Oregon)* verwendet.

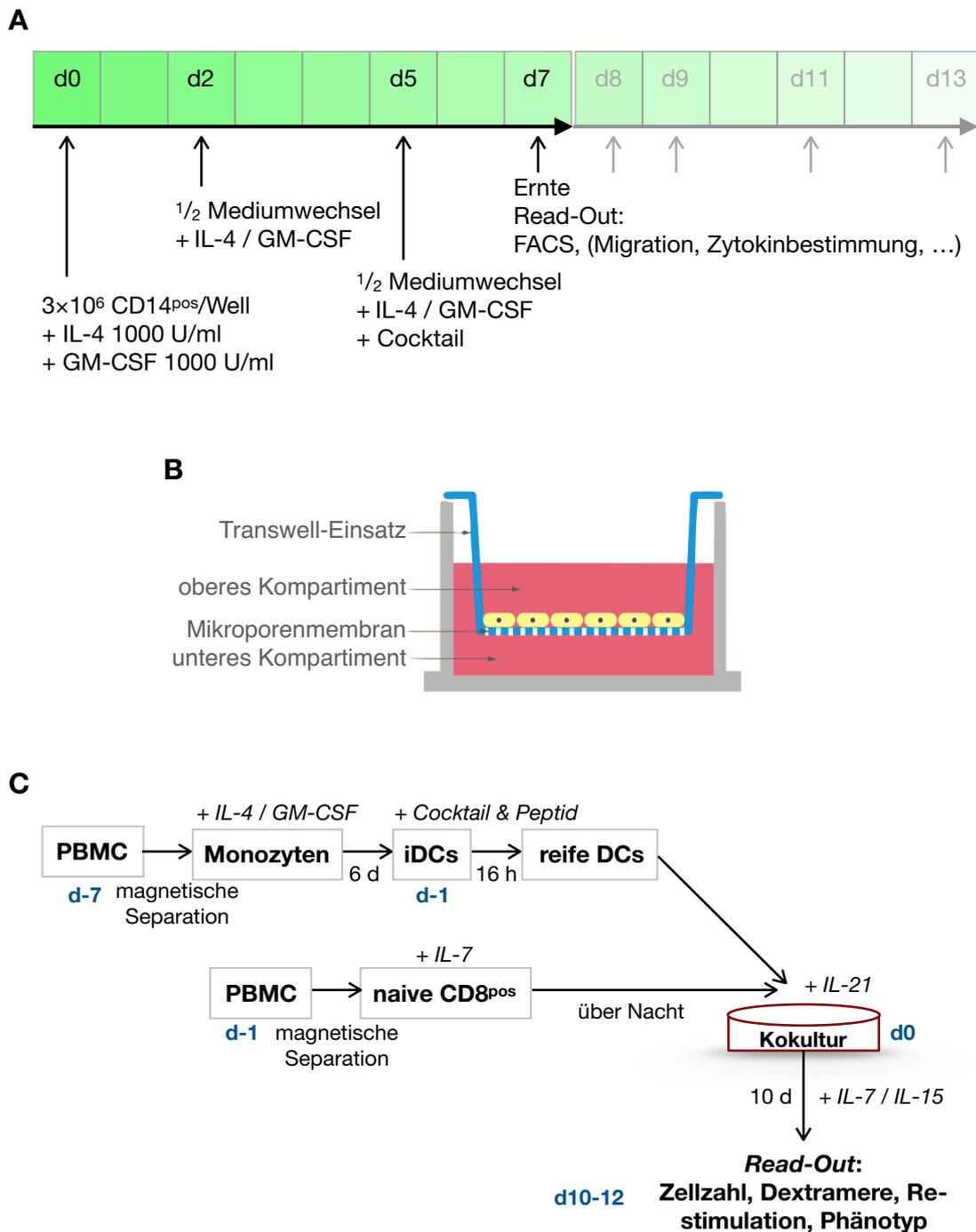


Abb. 2

A. DC-Herstellung: Die Monozyten wurden über 5 Tage mit IL-4 und GM-CSF kultiviert, bevor die Zugabe der Reifungscocktails erfolgte. Nach 48 h wurden die reifen DCs geerntet und entsprechende Messungen durchgeführt. Für Untersuchungen zur Lebensdauer wurde bei einigen Versuchsläufen die Kultur auf 13 Tage verlängert. **B.** Aufbau des Chemotaxisversuchs. Bildmaterial des Herstellers (https://beta-static.fishersci.com/images/euimages/10005331_GRP_E~wl.jpg). **C.** CD8^{pos} T-Zell-Priming: Die Herstellung der DCs erfolgte mit verkürzter Ausreifungsdauer von 16 h. Nach 10 Tagen Koinkubation mit naiven T-Zellen wurden letztere gezählt und Dextramer- sowie Phänotypfärbungen durchgeführt. Eine peptidspezifische Restimulation mit Messung der Zytokinsekretion folgte an Tag 12.

3. Ergebnisse

3.1. Phänotyp

Aus den 3×10^6 initial im Well befindlichen Monozyten konnten nach 7 Tagen Kultur durchschnittlich $1,4 \times 10^6 \pm (5 \times 10^5)$ DCs gewonnen werden. Die Ausbeute der tlrDCs war dabei am höchsten ($53 \pm 11 \%$), gefolgt von iDCs ($46 \pm 13 \%$) und cDCs ($40 \pm 21 \%$). Bezüglich der Vitalität der Zellen waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen, diese lag gemäß FACS bei durchschnittlich $89 \pm 7 \%$ (Abb. 3, 4C).

Alle ausgereiften DCs zeigten eine im Vergleich zur iDC-Gruppe erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, des MHC-II-Rezeptorproteins HLA-DR sowie des DC-Reifungsmarkers CD83. Bei tlrDCs war im Vergleich mit cDCs ein hochsignifikant größerer Anteil positiv für CD80 (87% vs. 43% , $p=0,003$) und CD83 (75% vs. 23% , $p=0,0002$). CD86 und HLA-DR dagegen offenbarten keinen relevanten Unterschied, alle Gruppen exprimierten diese in hohem Maße. Ein bei tlrDCs signifikant erhöhter MFI-Wert für CD86 (277 vs. 207 , $p=0,01$) deutete jedoch dessen stärkere Expression bei annähernd gleicher prozentualer Ausprägung an. Dies konnte im Gegensatz dazu für HLA-DR nicht gezeigt werden. Das Integrin CD11c war auf allen Gruppen in ähnlichem Maße vorhanden, wohingegen das DC-spezifische CD209 (DC-SIGN) bei tlrDCs hochsignifikant niedriger exprimiert war (55% vs. 92% bei cDCs, $p=0,00003$) (Abb. 4A/B).

Wurde PGE_2 durch $IFN\gamma$ ersetzt ($n=3$), kam es zu spezifischen Änderungen im Expressionsprofil der Zellen. Während CD80 und HLA-DR eine annähernd unveränderte Ausprägung zeigten, wurden CD83 und CD86 geringer exprimiert. Der CD209-Effekt blieb vollständig aus ($p=0,006$). Zudem wiesen diese Zellen eine starke residuale Expression des monozytären Markers CD14 auf. Obwohl diese alle Gruppen in gewissem Maß zeigten, war sie hier mit durchschnittlich

41 % am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich dazu präsentierten sich nur 17 % der tlrDCs mit PGE₂ positiv für CD14 ($p=0,03$). Die Werte für iDCs und cDCs lagen mit 14 % und 10 % noch etwas niedriger. Insgesamt war dieser Effekt extrem spenderabhängig, sodass die Werte beispielsweise in der tlrDC-Gruppe interexperimentell zwischen 3 % und 46 % rangierten (*Abb. 4D*).

Bei einem Spender wurde die CD14^{pos} Subpopulation separat analysiert und stellte sich dabei in allen Ausreifungsbedingungen als CD11c^{pos}/CD209^{pos}/HLA-DR^{pos} dar. Für CD80, CD83 und CD86 zeigte sich hingegen eine zweigipfelige Expression, wobei besonders der Anteil der CD83^{pos} im Vergleich zur Gesamtpopulation deutlich kleiner ausfiel (*Abb. 5*).

3.2. Überleben

Hinsichtlich der Lebensdauer und der zeitabhängigen Dynamik der phänotypischen Merkmale waren Unterschiede zwischen cDCs und tlrDCs zu erkennen. In allen Kulturen zeigte sich erwartungsgemäß eine Abnahme der Zellzahl, die rapideste jedoch bei tlrDCs ($p=0,0018$). Paradoxerweise war deren Zunahme an 7AAD^{pos} Zellen jedoch geringer ausgeprägt ($p=0,0013$) (*Abb. 6A/B*). Ein Unterschied bestand zudem in der Dynamik der CD14-Expression. Diese blieb in der tlrDC-Gruppe bei Werten um 10 % konstant, im Gegensatz dazu zeigten die beiden anderen Gruppen eine Tendenz zur Hochregulation (*Abb. 6C*). Die Expression von CD80 und CD86 war im zeitlichen Verlauf über alle Konditionen hinweg weitgehend stabil. Dagegen zeigte sich für die CD83-Expression eine Herabregulation auf 65 % des Ausgangswerts bei tlrDCs bzw. 61 % bei cDCs. HLA-DR wurde bei letzteren konsekutiv schwächer exprimiert, wohingegen tlrDCs sogar eine weitere Zunahme der MFI verzeichneten (45 % vs. 135 % des Ausgangswerts an Tag 13; $p<0,0001$) (*Abb. 7*).

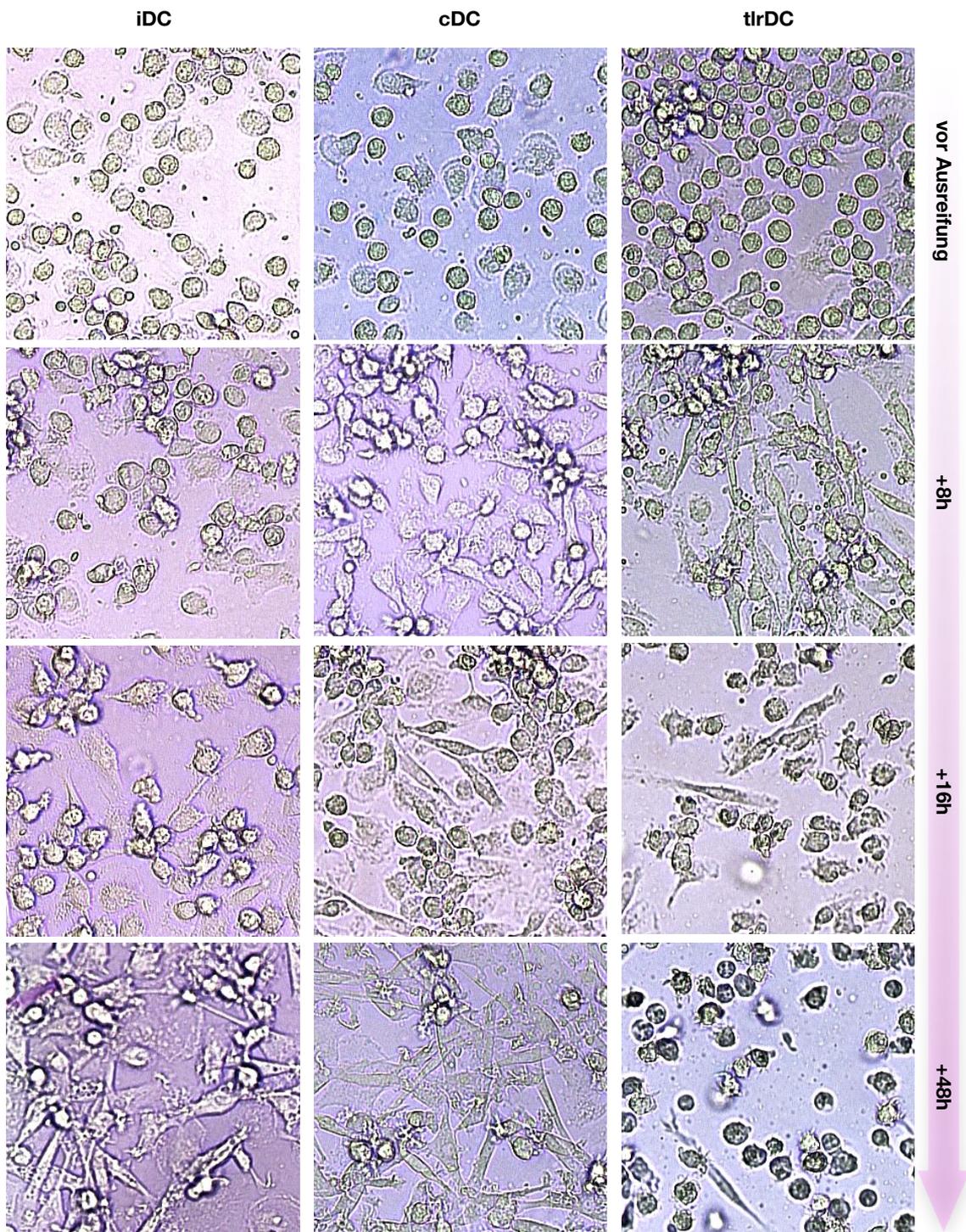


Abb. 3
 Bildausschnitte der mikroskopischen Aufnahmen mit Vergrößerungsfaktor 400 (*Digital Camera KY-F75U, JVC, Yokohama, Japan*) von Wells eines repräsentativen Spenders jeweils vor Beginn der Ausreifung sowie 8, 16 und 48 Stunden später. tlrDCs zeigten zum Ende der Kulturphase wieder abgerundete Zellen mit geringer Adhärenz. Im Gegensatz dazu blieben cDCs (im Verlauf auch iDCs) deutlich flacher ausgestreckt und haften fest am Well-Boden.

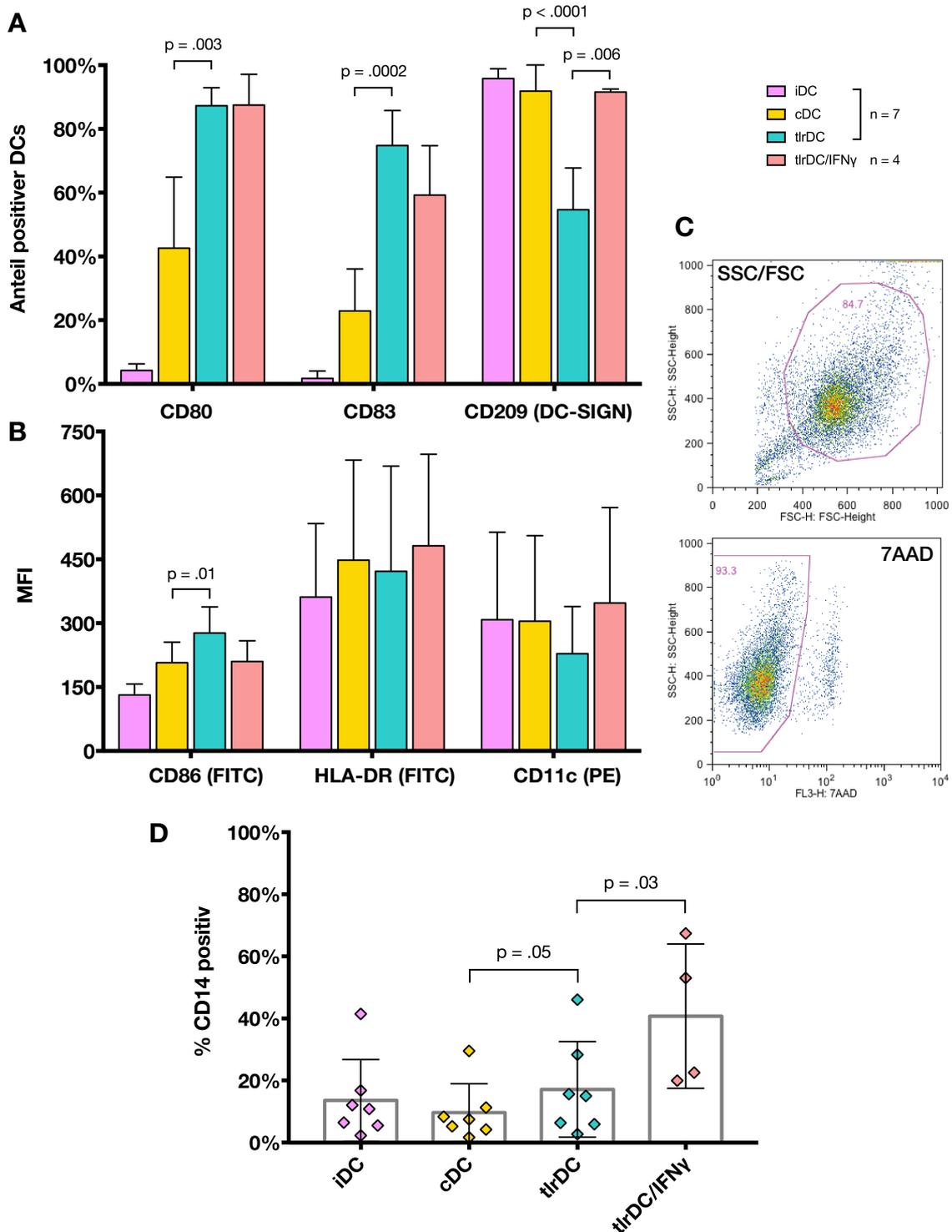


Abb. 4

A. Prozentuale Expression der DC-Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD209 (DC-SIGN) im Vergleich. Für diese Analyse konnte eine signifikant höhere Expression der tlrDCs gegenüber cDCs nachgewiesen werden. **B.** MFI-Werte von CD86, HLA-DR und CD11c. Diese Merkmale wurden von den DCs aller Konditionen prozentual ähnlich hoch exprimiert, sodass hier ein Vergleich der Expressionsstärke herangezogen wurde. **C.** Gating-Strategie der DCs. Anhand des SSC/FSC-Signals wurde eine DC-Region festgelegt, 7AAD^{pos} Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **D.** CD14-Expression der DCs an Tag 7 im Vergleich. Besonders bei Verwendung der TLR-Agonisten mit IFN γ zeigte sich eine starke residuale Expression.

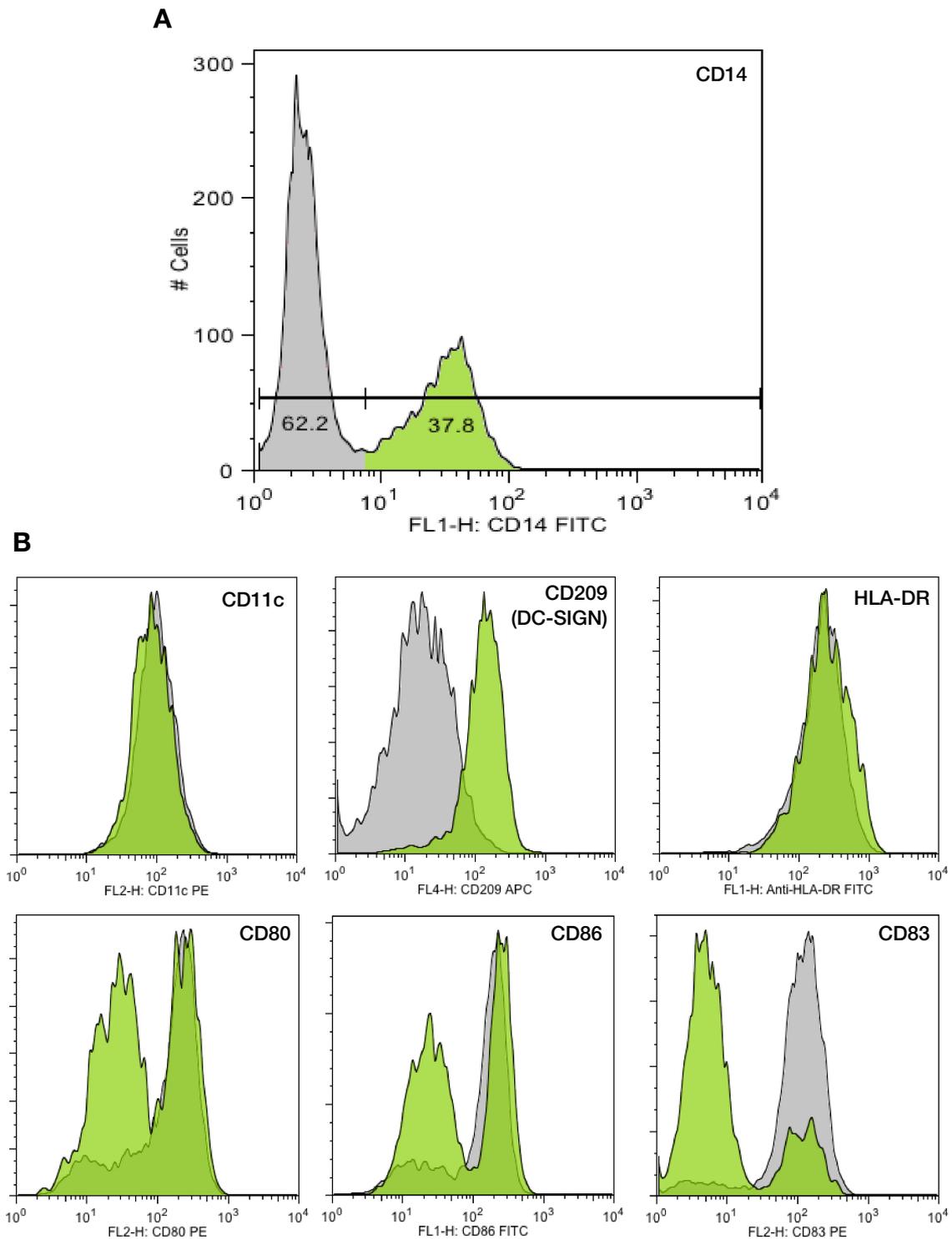


Abb. 5

A. DCs eines Spenders mit hohem Anteil CD14^{pos} Zellen an Tag 7 der Kultur. CD14-Expression in der tlrDC-Gruppe in einer Histogrammdarstellung. Gating wie bei *Abb. 4C*. y-Achse: Zellzahl; x-Achse: MFI. **B.** Zellen des Spenders aus (A): Normalisierte Overlays von CD14^{pos} (grün) und CD14^{neg} Populationen (grau) zum Vergleich der Expressionsstärke der Oberflächenmarker. Auffallend ist die hohe Positivität für CD209, sowie die zweigipfelige Expression von CD80, CD86 und CD83.

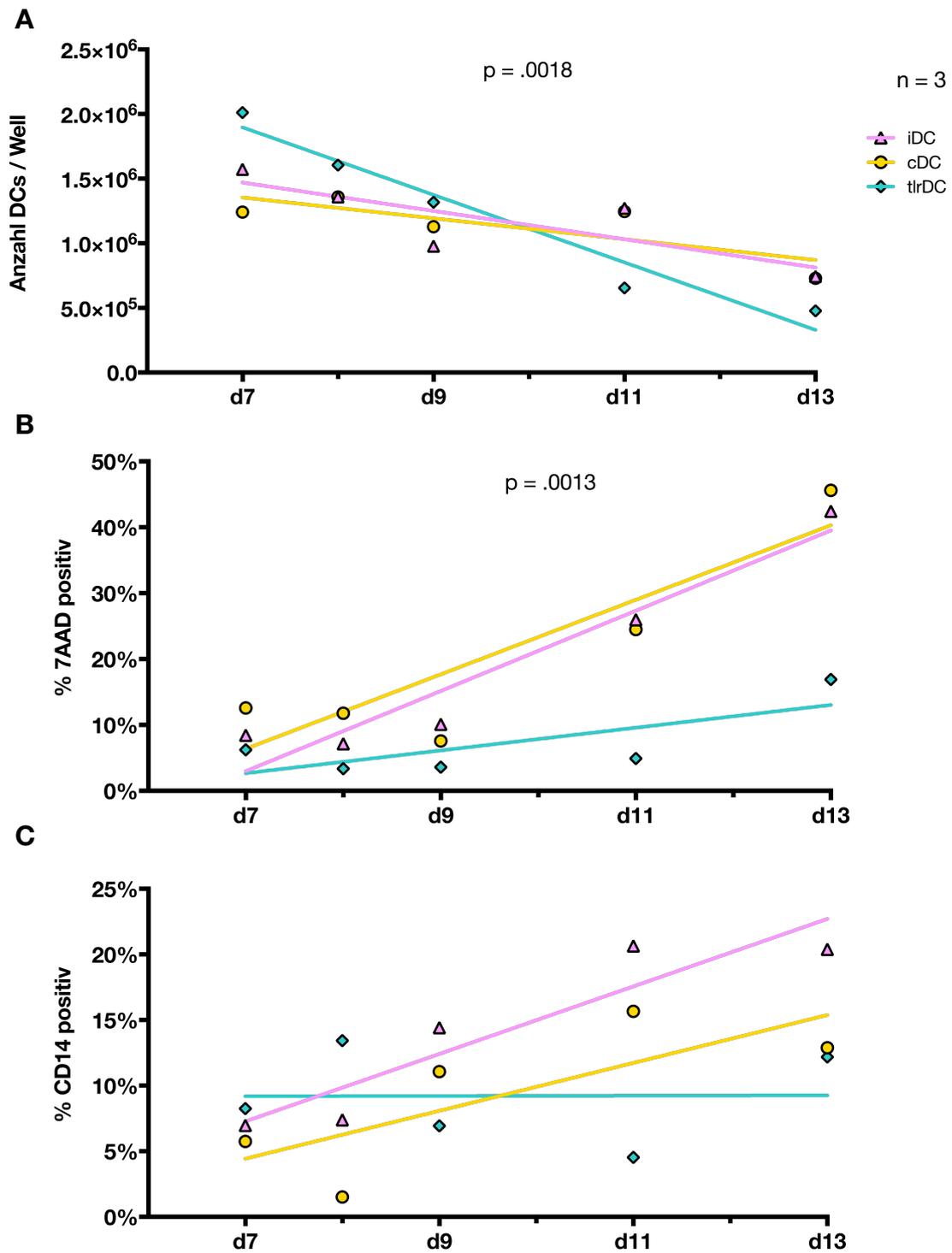


Abb. 6

A. Lebensdauer der DCs im Vergleich: Mittelwerte von 3 Spendern mit interpolierter linearer Regressionslinie. y-Achse: absolute Zellzahlen der einzelnen Wells; x-Achse: Tage seit Start der Kulturen. tlrDCs dezimierten sich signifikant schneller als iDCs und cDCs. **B.** 7AAD-Positivität der DCs. tlrDCs zeigten paradoxerweise zugleich den jeweils geringsten Anteil apoptotischer Zellen. **C.** Dynamik der CD14-Expression. Diese war bei tlrDCs über die Zeit konstant, während cDCs und iDCs eine Hochregulation zeigten.

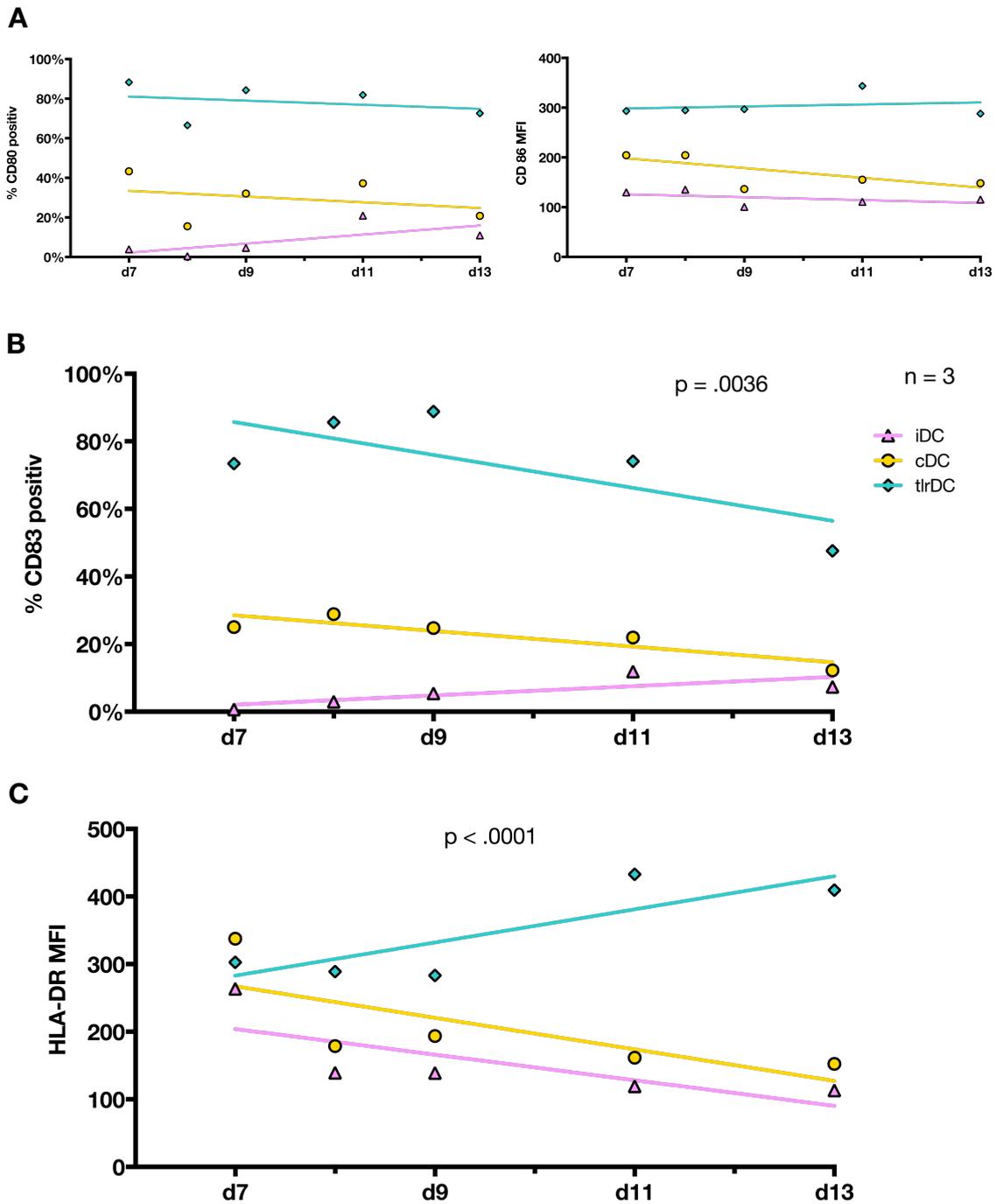


Abb. 7

A. Für die Kostimulatoren CD80 und CD86 zeigte sich keine relevante Dynamik während der verlängerten Kultur. **B.** Prozentuale Expression des Reifungsmarkers CD83 mit leichter Regression bei tlrDCs und cDCs. **C.** Hochsignifikante Unterschiede zeigten sich für HLA-DR, welches auf iDCs und cDCs im Verlauf schwächer exprimiert, von tlrDCs dagegen noch weiter hochreguliert wurde.

3.3. Zytokinsekretion

Für die Zytokinproduktion der DCs zeigte sich eine deutliche zeitabhängige Modulation. Während 8 h nach Zugabe der Reifungscocktails noch weitgehend keine über die unstimulierte Kontrolle hinausgehende Sekretion zu messen war, kam es nach 16 h bei einigen Analyten zu einem signifikanten Anstieg, der sich besonders stark bei tlrDCs zeigte (*Abb. 8*). Die zugehörigen Werte lagen dann weitgehend höher als bei cDCs, insbesondere für IL-6 (84.855 vs. 1.179 pg/ml, $p=0,0001$), IL-8 (447.386 vs. 18.436 pg/ml, $p=0,0008$), IL-10 (2.054 vs. 69 pg/ml, $p=0,053$), IL-12 (10.453 vs. 470 pg/ml, $p=0,004$), MIP-1 α (29.882 vs. 9.089 pg/ml, $p=0,27$) und MIP-1 β (32.153 vs. 14.376 pg/ml, $p=0,29$). 48 h nach Ausreifungsbeginn hatte die Sekretion der meisten Zytokine bereits wieder deutlich abgenommen, was sich in erniedrigten Spiegeln im Überstand zeigte. Lediglich IL-12 fiel durch eine anhaltend hohe Konzentration auf, die nach 48 h für tlrDCs noch bei 86 %, für cDCs bei 95 % des 16 h-Werts lag.

Das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Sowohl cDCs (Ratio 381,5) als auch tlrDCs (Ratio 322,1) produzierten nach 48 h deutlich mehr IL-12 als IL-10 und wiesen somit ein prinzipiell immunogenes Sekretionsprofil auf (*Abb. 8A*).

Für IL-12p70 konnte hingegen weder bei iDC noch cDC eine messbare Produktion festgestellt werden. tlrDCs sezernierten nach 8 h im Mittel 9,8 pg/ml, nach 16 h 50,1 pg/ml und nach 48 h 34,1 pg/ml (*Abb. 9B*). Das Maximum der Produktion lag folglich auch hier bei 16 h.

3.4. Migration

Bezüglich der Migrationsfunktion waren tlrDCs den cDCs erwartungsgemäß überlegen. So wurden bei letzteren nach 5 min FACS-Messung im Mittel 718 ± 714 Events gezählt, bei tlrDCs lag der Wert mit 7.880 ± 5.692 Events etwa eine Zehnerpotenz höher (*Abb. 10A/B*). Trotz der großen interindividuellen

Schwankungen ist der Unterschied der Mittelwerte als signifikant zu werten ($p=0,012$). Der Austausch von PGE_2 durch $IFN\gamma$ reduzierte den mittleren Messwert unter den betreffenden Proben ($n=4$) von 10.039 Events bei tlrDCs auf 1.310 Events bei tlrDC/ $IFN\gamma$ ($p= 0,083$).

Migrierte tlrDCs zeigten eine im Vergleich zur Gesamtpopulation deutlich erhöhte Expression beinahe aller Reifungsmarker. Im Mittel waren 97 % der migrierten Zellen hoch positiv für CD86 und 99 % für CD83, während zuvor nur 84 % bzw. 67 % den entsprechenden Populationen zuzuordnen waren (*Abb. 10C*). Für cDCs und iDCs war dieser Effekt nicht vergleichend darstellbar, weil durch die niedrige Migrationsfrequenz zu wenig Zellen für eine Auswertung zur Verfügung standen.

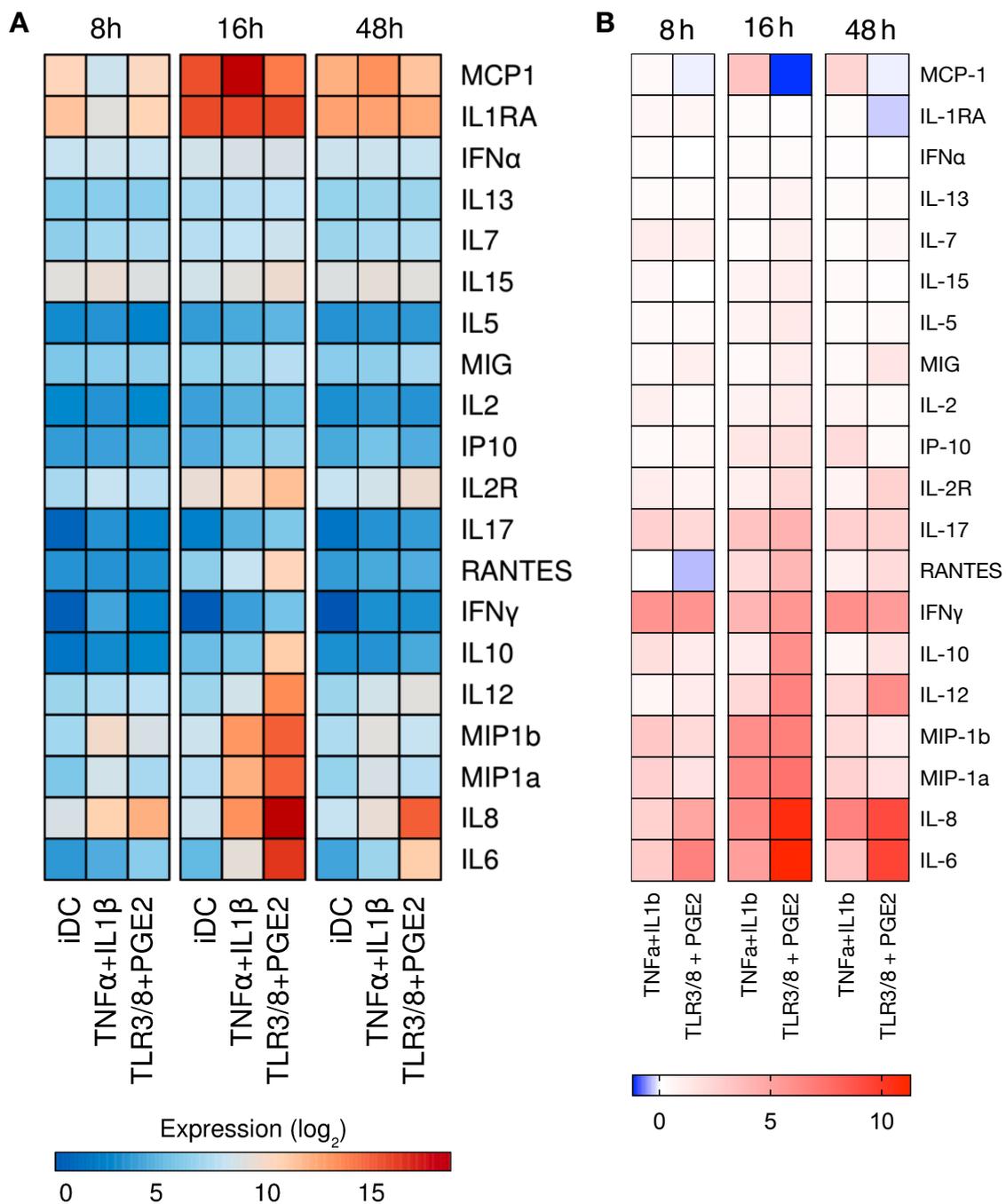


Abb. 8

A. \log_2 -transferierte Zytokinsekretionswerte in pg/[ml Mediumüberstand]. Blöcke definieren die Zeit der Entnahme der Proben nach Start der Ausreifung, Spalten die verwendeten Ausreifungscocktails, Zeilen die einzelnen Zytokine. Die Farbcodierung wurde automatisch generiert. Für viele Zytokine zeigte sich ein Maximum nach 16 h, unter diesen fiel v.a. IL-12 durch anhaltend hohe Spiegel auch nach 48 h auf. **B.** Alternative Darstellung desselben Datenmaterials, um die Modulation der Zytokinsekretion durch Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle (iDC) besser sichtbar zu machen. Die Rohdaten wurden als Vielfache der jeweiligen iDC Werte ausgedrückt und logarithmiert.

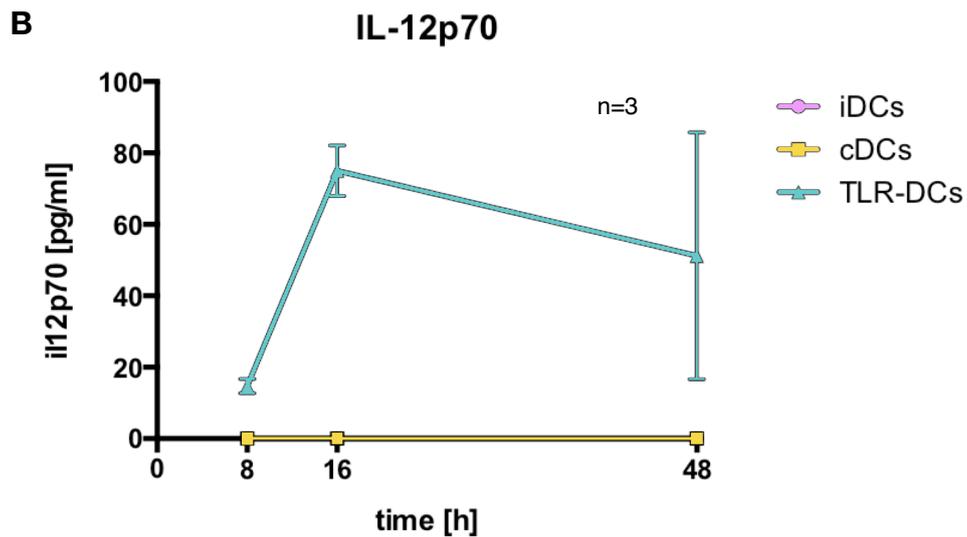
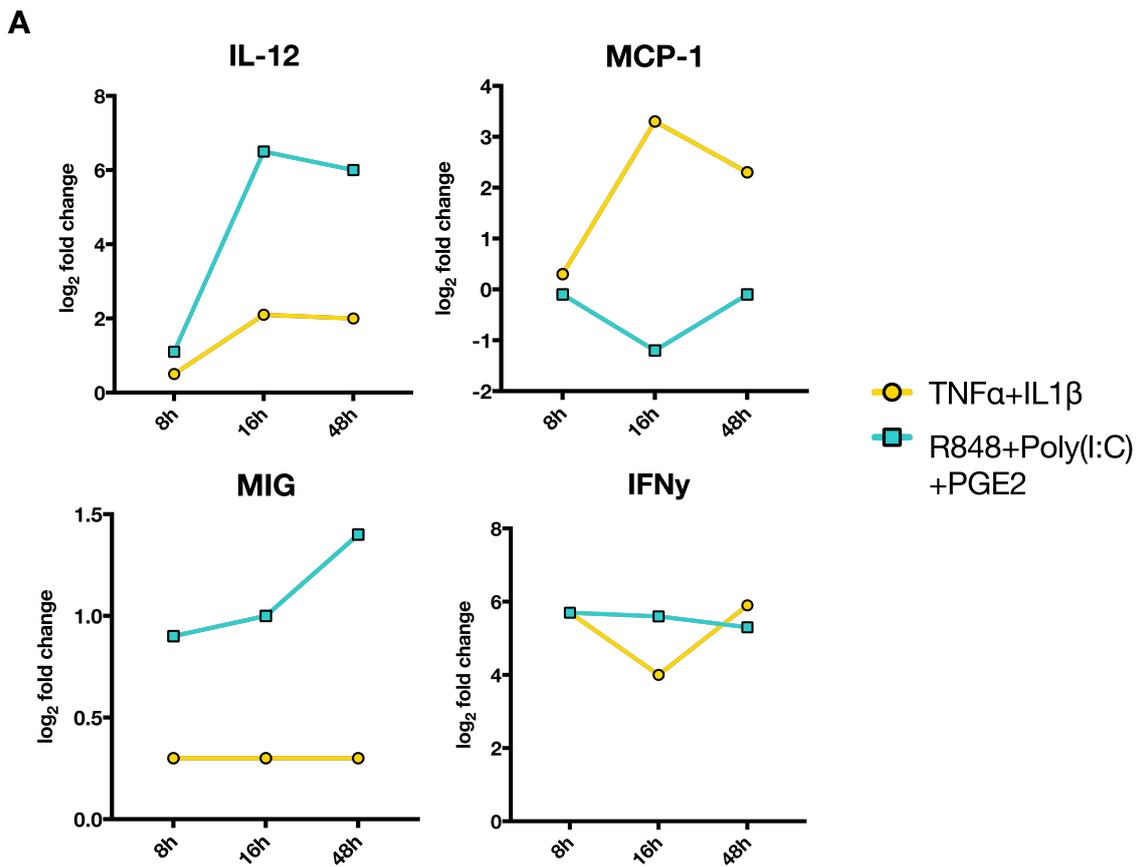


Abb. 9

A. Werte aus *Abb. 8B* für ausgewählte Analyte zur Demonstration der verschiedenen beobachteten Modulationsvarianten. Neben der am häufigsten vorkommenden Variante eines Maximums nach 16 h (wie bei IL-12) waren vereinzelt auch gänzlich andere Verläufe zu sehen. **B.** IL-12p70-Sekretion in den DC-Kulturüberständen zu den Zeitpunkten 8, 16 und 48 h. Die Werte für die biologisch aktive Form lagen deutlich niedriger als die p40/70-Gesamtkonzentration. Das Sekretionsmaximum war auch hier nach 16 h zu finden. Nur tlrDCs wiesen eine messbare Produktion auf – im Gegensatz zu cDC und iDC, deren Werte unter der Detektionsschwelle lagen.

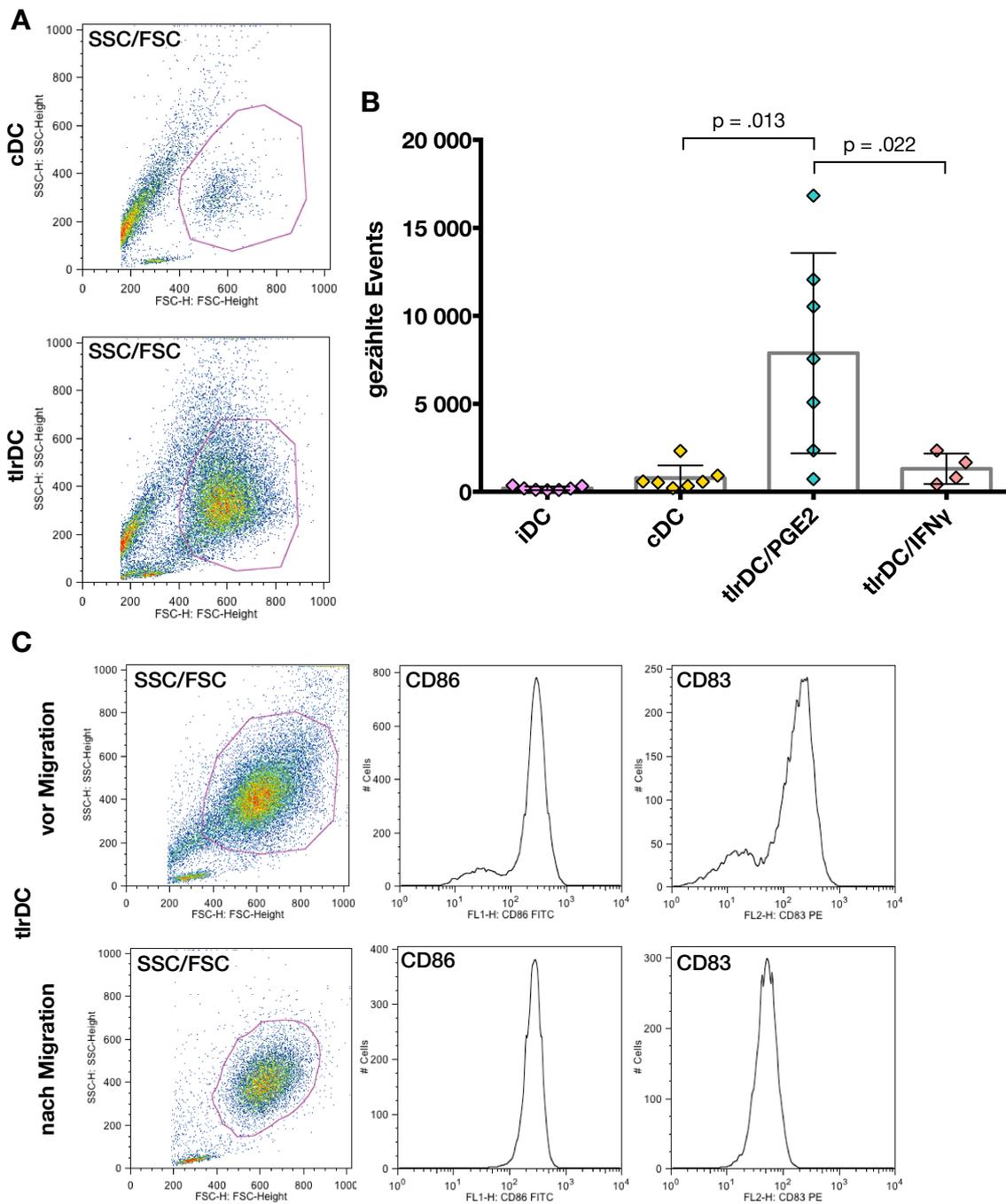


Abb. 10

A. Beispiel-FACS-Plots eines repräsentativen Migrationsversuchs. Die DC-Region wurde durch SSC/FSC-Gating festgelegt und deren Events gezählt. **B.** Migrations-Fähigkeit der DCs nach Ausreifung mit den verschiedenen Cocktails. 3 h nach Beschicken der Transwells wurden die entlang des Chemokingradienten migrierten Zellen aus den Kulturschalen gesammelt und ungefärbt am FACS aufgenommen. **C.** Migrierte tlrDC-Population im Vergleich zur Gesamtpopulation vor Migration. Der SSC/FSC-Plot zeigte eine enger abgrenzbare DC-Region. Für CD86 und CD83 wiesen migrierte tlrDCs eine reine, einheitlich hohe Expression auf, vor Migration waren eine Negativ- und Positivpopulation deutlich voneinander abgrenzbar.

3.5. T-Zell-Priming

3.5.1. Vorversuche

Die Priming-Fähigkeiten der verschiedenen ausgereiften DC-Gruppen in der Kokultur mit naiven CD8^{pos} T-Zellen wurde zunächst hinsichtlich der Proliferation und der Spezifität zum jeweiligen Antigen ausgewertet. Die Kombination beider Messgrößen ergibt die absolute Zellzahl antigenspezifischer T-Zellen und dient somit als gutes Maß für die Effektivität des Primings [117]. Die Messungen der intrazellulären Zytokinkonzentrationen nach Restimulation mit dem betreffenden Antigen gaben weiter Aufschluss über funktionelle Aspekte, während phänotypische Färbungen eine Zuordnung zu den CD8^{pos} T-Zell-Subtypen erlaubten.

Den Experimenten war eine Testperiode vorgeschaltet, wofür zunächst auf lpsDC verzichtet und dafür neben tlrDC auch die Alternative tlrDC/IFN γ verwendet wurde. Die DC-Ausreifungsdauer betrug dabei wie zuvor 48 h. tlrDCs erschienen den übrigen Gruppen vor allem hinsichtlich der Proliferation überlegen, die absolute Zellzahl Melan-A-spezifischer Zellen war im Vergleich mit tlrDC/IFN γ etwa 3-fach und im Vergleich mit cDC 6-fach größer. Auch war die Zytokinproduktion der T-Zellen nach Restimulation bei tlrDC am höchsten.

Tabelle 12. Erster Versuchslauf. Oben Angabe der Anzahl peptidspezifischer Zellen pro Well, unten Anteil IFN γ /TNF α doppelt positiver Zellen.

<i>Dextramer-positive</i>	Melan-A (n=3)	NLGN4X (n=2)	PTP (n=2)
cDC	13.112±6.297	175±175	58±58
tlrDC	82.150±14.059	2.135±1.775	2.520±2.520
tlrDC/IFNγ	27.011±7.757	0±0	632±447
<i>IFNγ/TNFα-positive</i>			
cDC	0,01±0,00 %	0,00±0,00 %	0,00±0,00 %
tlrDC	0,82±0,20 %	0,46±0,07 %	0,27±0,20 %
tlrDC/IFNγ	0,15±0,06 %	0,01±0,00 %	0,00±0,00 %

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein zweiter Vorversuch gestartet, bei dem nun lpsDC statt tlrDC/IFN γ eingesetzt und bei der DC-Ausreifungsdauer die Zeitpunkte 48 h und 16 h gegenübergestellt wurden. Dabei wurden wegen zu geringer Ausbeute bei der Aufreinigung der naiven T-Zellen statt 5×10^5 nur $1,8 \times 10^5$ Zellen in Kultur gegeben. Dennoch konnte ein klarer Trend zu höheren Anteilen und Absolutzahlen spezifischer T-Zellen in den 16 h-Gruppen erkannt werden, wobei lpsDC die höchsten Werte lieferte.

Tabelle 13. Zweiter Versuchslauf: Anzahl Melan-A-spezifischer T-Zellen pro Well.

	16h	48h
cDC	∅	9.257
tlrDC	17.636	9.896
lpsDC	41.303	6.344

Die Vorversuche führten letztlich zur Festlegung der Ausreifungsdauer auf 16 h sowie der Beibehaltung von lpsDC als Positivkontrollgruppe für alle weiteren Versuchsläufe, deren Resultate im folgenden dargelegt werden.

3.5.2. T-Zellexpansion

Nach 10 Tagen Kokultur lag die mittlere Gesamtzellzahl bei cDC ohne Peptidzugabe bei $1,3 \times 10^6$. Die Verwendung von Melan-A-beladenen DCs verdoppelte diesen Wert bei cDC ($2,6 \times 10^6$), während bei lpsDC ($4,2 \times 10^6$) und tlrDC ($5,6 \times 10^6$) eine stärkere Proliferation gemessen werden konnte.

Für die verwendeten GBM-Peptide lagen die Zahlen insgesamt niedriger, wobei tlrDC wiederum die stärkste Proliferation zeigte ($1,8 \times 10^6$ für NLGN4X und $2,7 \times 10^6$ für PTP). Die Vitalität der T-Zellen lag über alle Konditionen hinweg bei durchschnittlich 99%.

Einen Eindruck der Proliferationsaktivität und Zellclusterbildung in den Kulturen an Tag 3 liefert *Abb. 11*.

3.5.3. Antigen-spezifische T-Zellen

Sämtliche Reifungscocktails waren in der Lage, eine T-Zell-Differenzierung mit Expansion der peptidspezifischen Population bei allen verwendeten Tumorpeptiden zu bewirken (Abb. 13A).

Bei Verwendung von Melan-A, das in allen Wells zu starker Proliferation führte, war dieser Anteil mit $35 \pm 25\%$ bei cDC, $42 \pm 29\%$ bei lpsDC und $42 \pm 25\%$ bei tlrDC am größten. Die absoluten Zellzahlen antigen-spezifischer Zellen lagen bei tlrDC demnach am größten ($2,94 \times 10^6$), gefolgt von lpsDC ($2,5 \times 10^6$) und cDC ($1,37 \times 10^6$). Hierbei wurde bei erheblicher Varianz der Experimente keine Signifikanz erzielt (Abb. 12A/B).

Noch größere, auch intraexperimentelle Schwankungen waren für die GBM-Peptide zu beobachten. Hier wies jeweils nur ein Teil der Wells eine messbare Population peptidspezifischer Zellen auf, die zwischen 0,0% und 6,2% variierte. Dies entspricht insofern der Erwartung, als der Primingerfolg von der initialen Anzahl der Vorläuferzellen mit passendem T-Zell-Rezeptor in den einzelnen Wells abhängt. Deren Frequenz wird für die verwendeten Glioblastompeptide als sehr niedrig eingeschätzt [59]. Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten errechnet sich diese für NLGN4X auf $1/1.2 \times 10^6$ und auf $1/2.04 \times 10^6$ für PTP.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist es daher sinnvoll, neben einer Mittelwertbildung (Abb. 12C/D) die Datenpunkte einzeln darzustellen. Folgende Tabelle fasst die Anzahl der Wells mit mehr als 0,1% Dextramer-positiven Zellen aus allen Experimenten zusammen. Bei diesem Cut-off war stets eine optisch gut abgrenzbare spezifische Population im FACS-Plot zu beobachten.

Tabelle. 14. Versuchsübergreifender Anteil der Wells mit erfolgreichem Priming und damit relevanter Population peptidspezifischer Zellen von >0,1%.

	NLGN4X	PTP	Melan-A
lpsDC	5/11	4/11	9/9
cDC	4/10	1/10	9/9
tlrDC	4/10	3/11	9/9

Die Absolutzahlen GBM-spezifischer Zellen sind zudem in *Abb. 12E* als Heatmap vergleichend dargestellt. In der Zusammenschau zeigte sich eine Tendenz zu mehr spezifischen Zellen in der lpsDC-Gruppe, gefolgt von tlrDC und zuletzt cDC.

3.5.4. Restimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Zytokinproduktion nach Restimulation mit Melan-A zeigte im Allgemeinen einen höheren Anteil TNF α ^{pos} als IFN γ ^{pos} Zellen. Dies war vor allem bei cDC deutlich (7,9 % vs. 0,3 %, Ratio 26,3), jedoch auch bei tlrDC (11,9 % vs. 5,1 %, Ratio 2,3) und lpsDC (22,5 % vs. 6,9 %, Ratio 3,3) zu beobachten. tlrDC-geprimte T-Zellen unterschieden sich von cDC-geprimten folglich vor allem durch ihre höhere IFN γ -Produktion (*Abb. 13B*). lpsDC lieferte vor tlrDC und cDC für beide Zytokine die höchsten Werte, entsprechend zeigten sich davon in genannter Reihenfolge 6,6 %, 4,9 % und 0,2 % doppelt positiv. Hinsichtlich der T-Zell-Rezeptoravidität ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (*Abb. 13C/D*).

3.5.5. T-Zell-Phänotyp

10 Tage nach Start der Kokultur waren in den Wells nur noch T-Zellen und keine DCs mehr vorhanden, sodass die CD3^{pos}-Rate in allen Gruppen über 99,9 % lag. Deren Proliferationsaktivität war zu diesem Zeitpunkt weitgehend gestoppt, was die Expression von Ki-67 in zumeist weniger als 1 % der Zellen zeigte. Der frühe Aktivierungsmarker CD69 war in der Melan-A-Gruppe bei lpsDC noch am stärksten ausgeprägt (8,1 %), schwächer bei tlrDC (3,5 %) und kaum bei cDC (0,8 %). Dieselbe Tendenz zeigte sich für den Seneszenzmarker CD57 (6,7 %; 2,6 %; 1,3 %). Umgekehrt proportional dazu verhielten sich CD27 (78,5 %; 85,4 %; 97,0 %) und CD62L (86,2 %; 90,0 %; 96,8 %).

Eine Charakterisierung der T-Zell-Subgruppen wurde anhand der Expression von CD62L und CD45RA vorgenommen [15, 16]. In allen drei Konditionen überwogen anteilig noch naive T-Zellen (T_N) mit dem Phänotyp CD62L^{pos}/

CD45RA^{pos}. Die zweitgrößte Subpopulation wurde durch die Central-Memory-T-Zellen gebildet (T_{CM} , CD62L^{pos}/CD45RA^{neg}), deren Frequenz bei lpsDC und tlrDC höher war als bei cDC. Neben wenigen Effektor-T-Zellen (T_E , CD62L^{neg}/CD45RA^{pos}) waren auch Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM} , CD62L^{neg}/CD45RA^{neg}) vorhanden, die vor allem bei lpsDC eine stabile Population bildeten (Abb. 14).

Das aus den Untereinheiten CD29 und CD49d zusammengesetzte Integrin VLA-4 war auf den Zellen aller Gruppen in gewissem Maße vorhanden. Dessen Expression war in einem Versuchslauf bei tlrDC insgesamt deutlich höher als bei cDC (27,1 % vs. 3,4 %). Wurden dabei in der tlrDC-Gruppe nur die Melan-A-spezifischen Zellen betrachtet, so konnte im Vergleich zur Restpopulation eine Anreicherung der VLA-4-Expression von 17,7 % auf 45,5 % gezeigt werden. Dagegen fand bei cDC eine deutlich schwächere Hochregulation von 5,0 % auf 8,3 % statt (Abb. 15).

3.5.6. Zytokinsekretion der unstimulierten T-Zellen

Die Überstände vom 10. Tag der T-Zellkulturen offenbarten zumeist ähnliche Zytokinwerte für alle Konditionen. In der Negativkontrollgruppe (cDC ohne Peptid) wurde tendenziell mehr IL-7, MCP-1 und MIP-1 α/β gemessen, während in den Gruppen, die mit Melan-A beladen wurden, lpsDC für MIG, RANTES, GM-CSF sowie IFN γ , cDC für IL-1RA, IL-5, IL-7 sowie IL-13 und tlrDC für IL-6, IL-8 sowie IL-12 die höchsten Werte lieferten (siehe Anhang, Abb. X-XIV).

In keiner der Gruppen wurde eine messbare Menge an IL-17 gefunden, selbiges gilt für IL-10. Die mittlere IFN γ /IL-4-Ratio lag in den Melan-A-Gruppen bei lpsDC mit 14,8 am höchsten, gefolgt von tlrDC mit 2,3 und cDC mit 0,2.

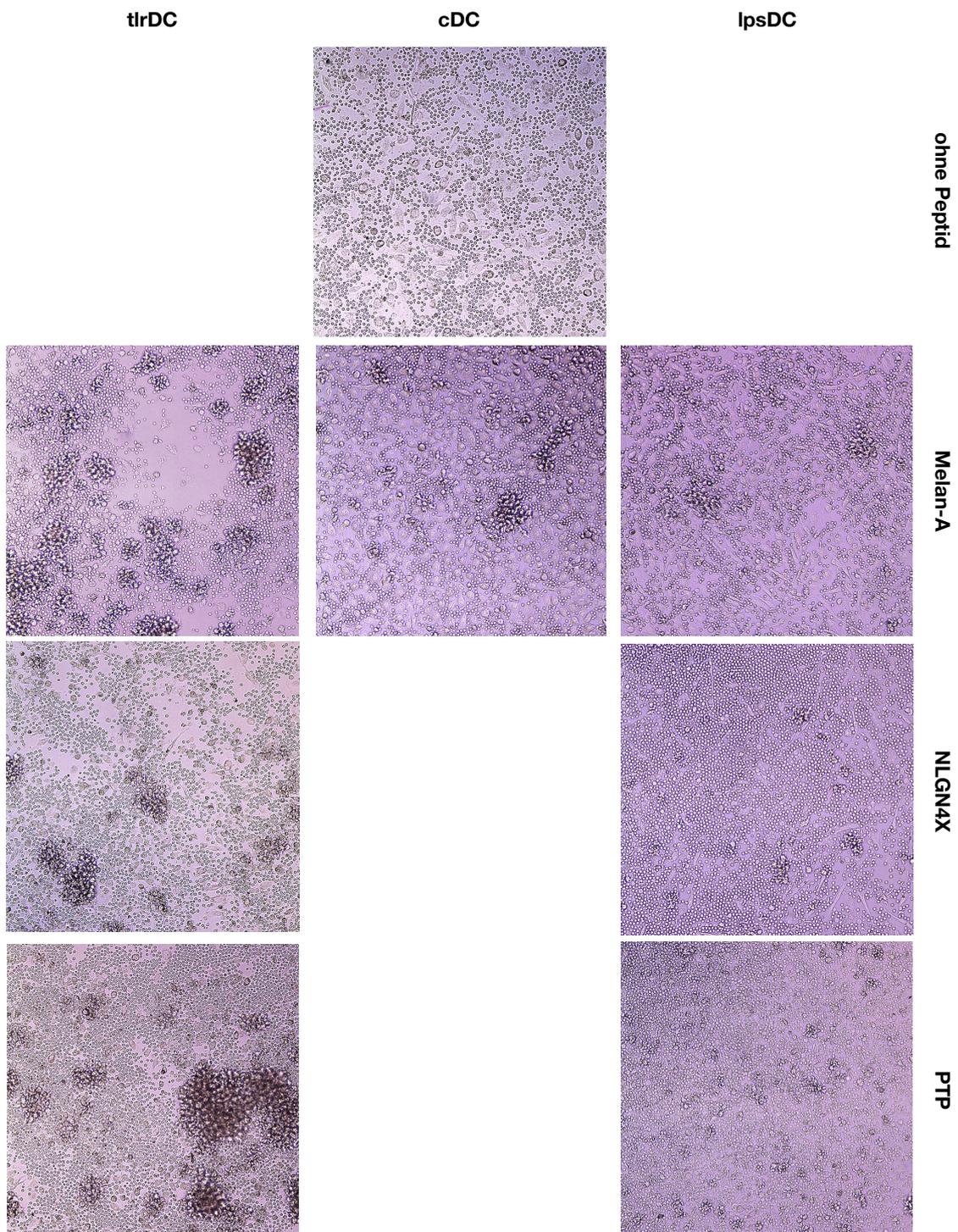


Abb. 11

Ausschnitte der lichtmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerungsfaktor 100) der Priming- Wells an Tag 3, vor der ersten Medium-/Zytokinzugabe. Clusterbildungen zeigen eine hohe Dichte proliferierender T-Zellen. DCs (flache, langgezogene und große, runde Zellen) sind zu diesem Zeitpunkt noch sichtbar, gehen im Laufe der Kultur jedoch zugrunde.

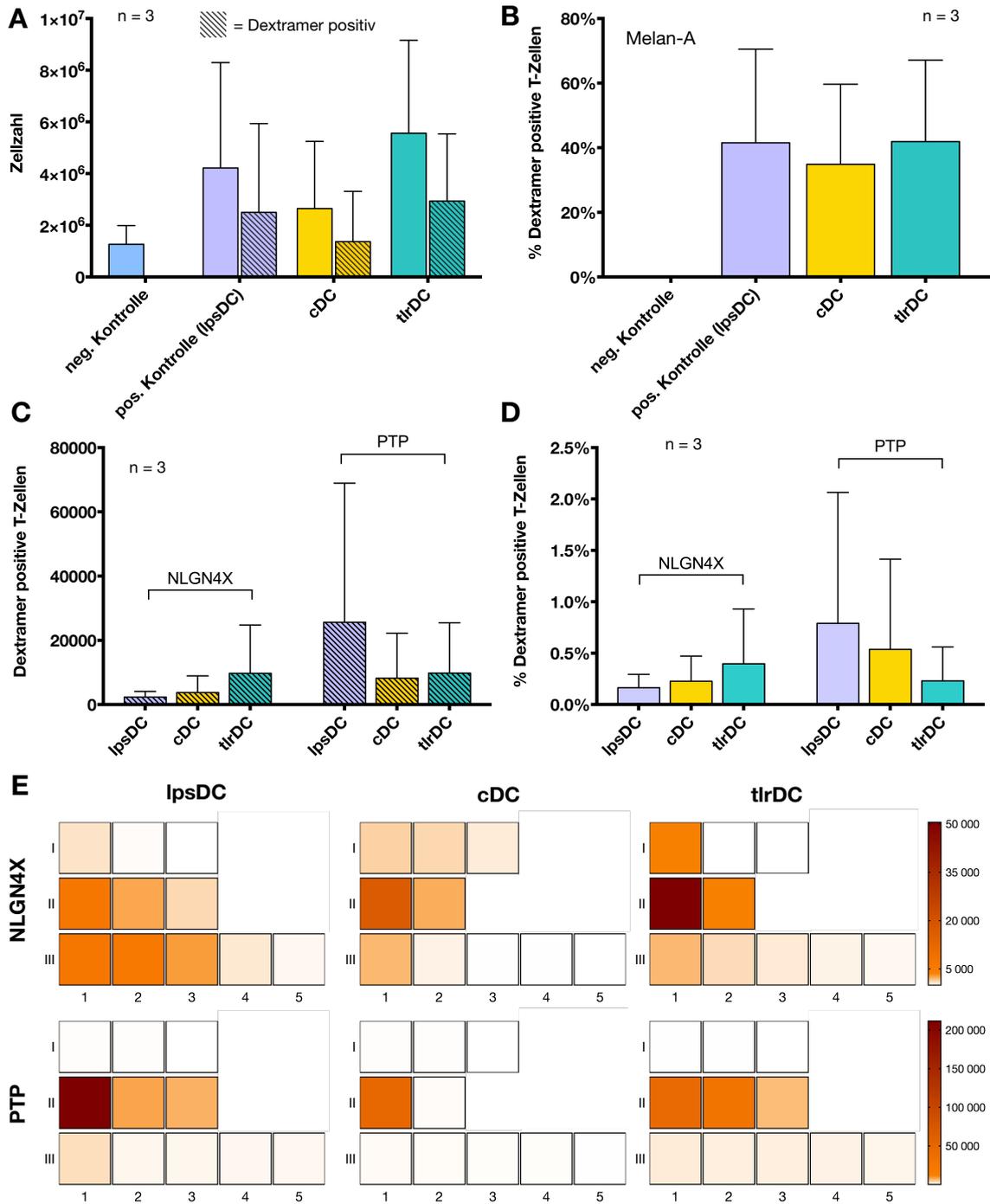


Abb. 12

A. T-Zellzahlen am Tag 10 der Priming-Versuche (Zellen/Well): Mittelwerte von drei Spendern. Schraffierte Säulen repräsentieren Melan-A-positive Zellen. Es ließ sich in allen Konditionen Proliferation nachweisen, die stärkste in der tlrDC-Gruppe. **B.** Anteil der Melan-A-Dextramer-positiven T-Zellen an der Gesamtzellzahl. Hierbei war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied auszumachen. **C/D.** Anzahl GBM-Peptid-spezifischer Zellen/Well und relative Anteile analog zu (A/B). Aufgrund der großen intraexperimentellen Varianz bei kleiner Stichprobengröße zeigt die Mittelwertbildung hier nur eine Tendenz auf, ohne dass statistische Signifikanz erreicht wurde. **E.** Heatmap-Darstellung der absoluten Zahlen spezifischer Zellen in den GBM-Gruppen. Blöcke sind durch die Konditionen definiert, während die einzelnen Wells (1-5) dreier Spender (I-III) jeweils hintereinander in absteigender Sortierung abgebildet sind.

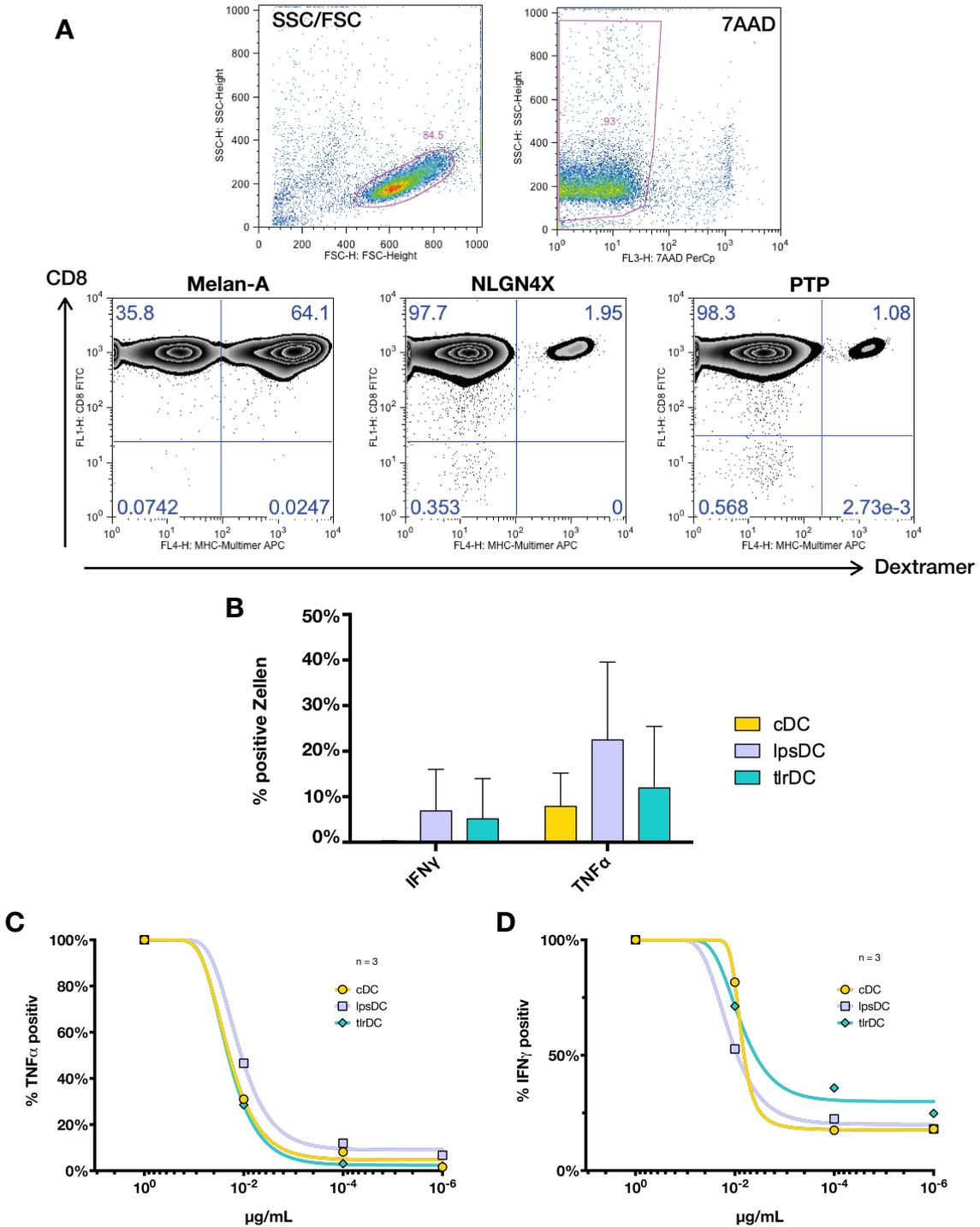


Abb. 13

A. Gating-Strategie und Beispielplots der Dextramer-Färbungen eines Spenders (tlrDC-Gruppen). **B.** Intrazelluläre Zytokinfärbung an Tag 12. Anteil TNF α - bzw. IFN γ -positiver T-Zellen nach Restimulation mit autologen Monozyten, die mit 1 μ g Melan-A beladen waren. Für TNF α wurde bei allen Konditionen eine stabile Sekretion gemessen, für IFN γ nur bei tlrDC und lpsDC. **C/D.** Restimulation mit Melan-A-Peptid in absteigender Konzentration (x-Achse). Normalisierte Darstellung der Verdünnungskurve, durch die eine vergleichende Beurteilung der T-Zell-Aviditäten möglich wird. Für diese war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

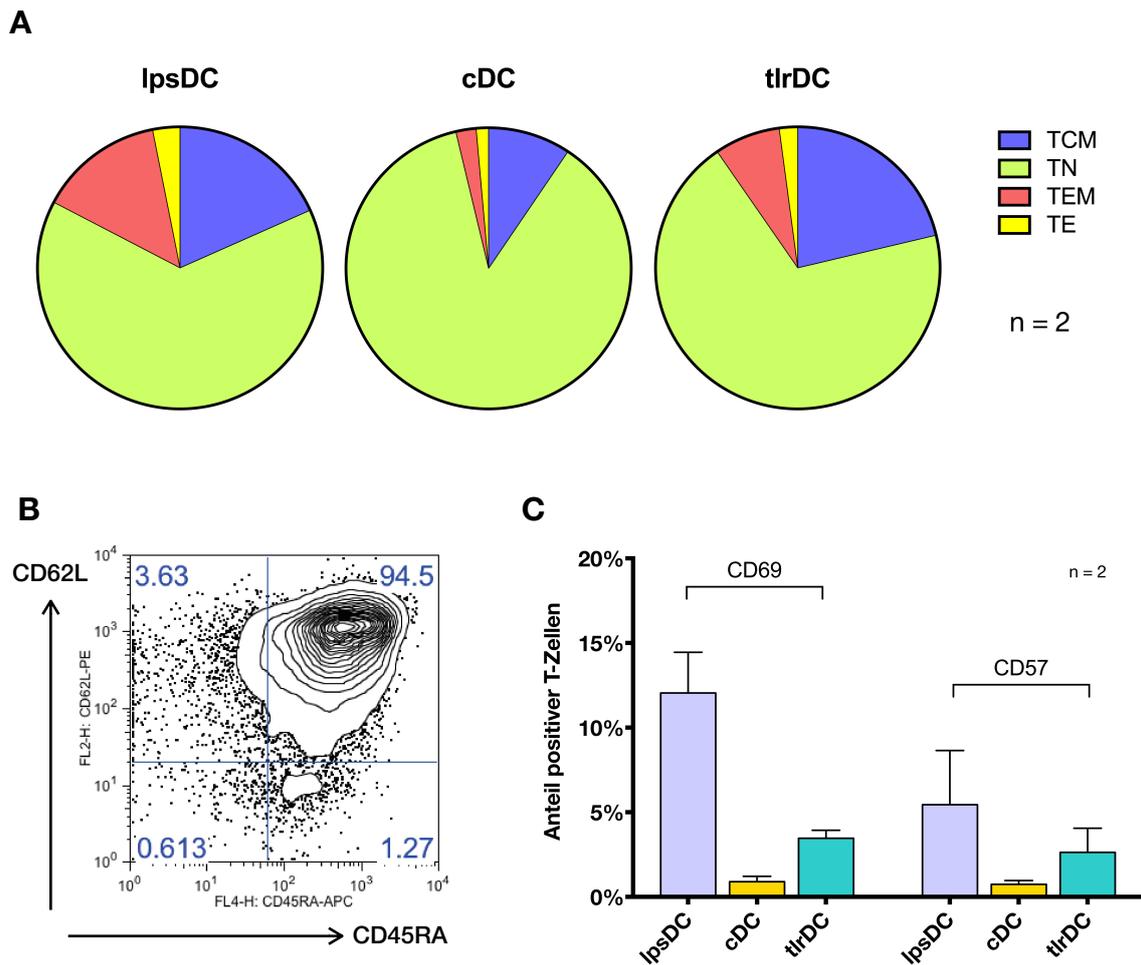


Abb. 14

A. CD8^{pos} Subpopulationen nach erfolgtem Priming mit Melan-A beladenen DCs der unterschiedlichen Ausreifungsgruppen. tlrDCs führten zu anteilig mehr Central-Memory, Effektor-Memory und Effektor-T-Zellen als cDCs. In allen Konditionen stellten jedoch naive T-Zellen die vorherrschende Population dar. **B.** FACS-Darstellung der T-Zell-Subpopulationen aus (A) anhand des CD45RA/CD62L-Status. Beispiel aus der tlrDC-Gruppe. **C.** Für den frühen Aktivitätsmarker CD69 und den Seneszenzmarker CD57 gleichermaßen zeigten tlrDCs eine höhere Expression als cDCs.

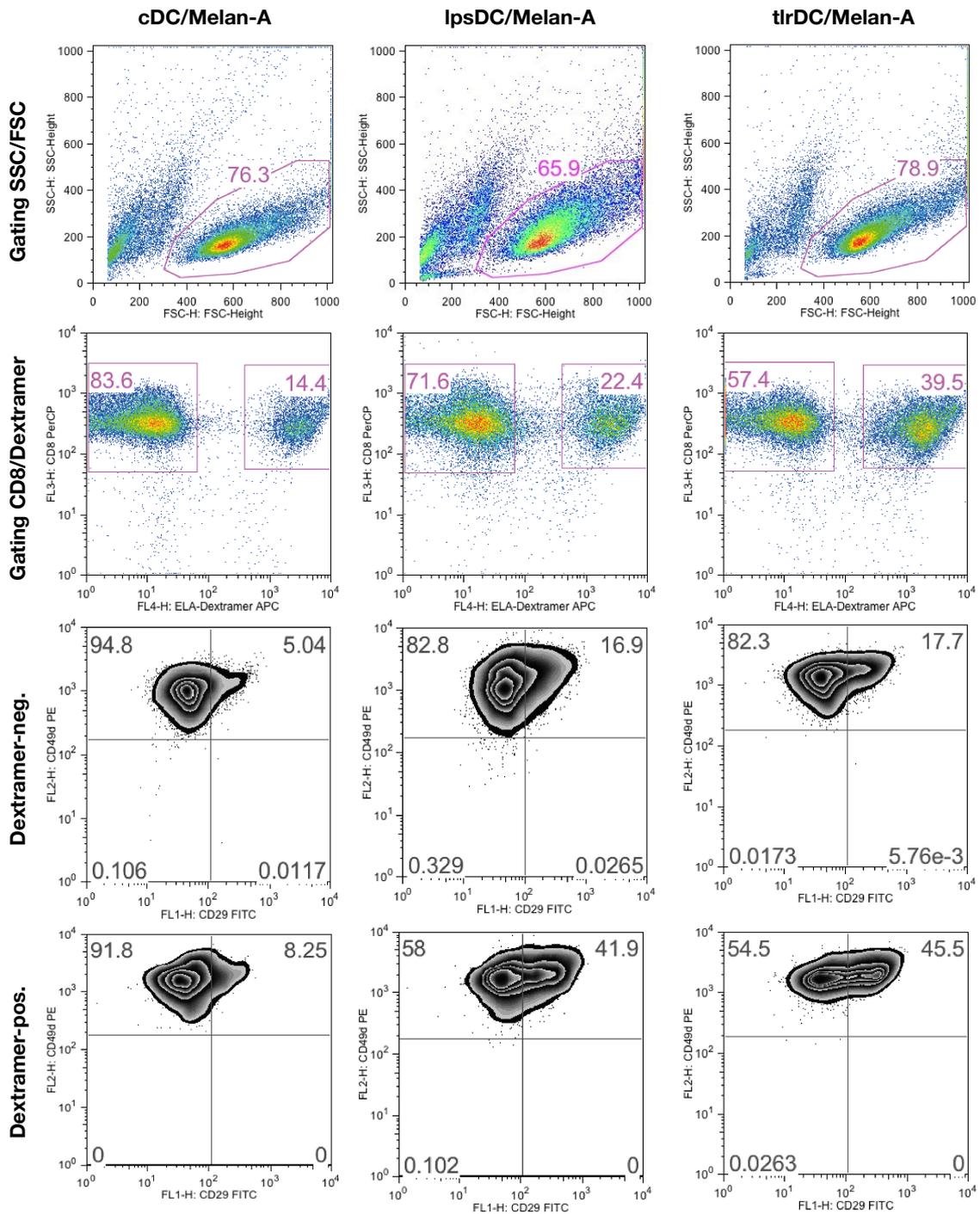


Abb. 15

VLA-4-Expression der T-Zellen eines repräsentativen Spenders. Gating auf jeweils Melan-A-Dextramer positive bzw. negative CD8^{pos} Lymphozyten. Bei den Melan-A geprimten Zellen konnte im Vergleich zur Dextramer-negativen Population eine Hochregulation der CD29/CD49d-doppelt positiven Zellen beobachtet werden, die unter tlrDCs am stärksten ausfiel. Insbesondere im Vergleich mit cDCs war hier ein deutlicher Unterschied erkennbar.

3.6. Galactoseoxidase

Mit GOX behandelte cDCs bewirkten eine starke Proliferation der T-Zellen. Wurden diese ohne Peptidzugabe im Verhältnis 1:4 zu den T-Zellen verwendet, führte die Kokultur zu einer Zellvermehrung um den Faktor 35,5 (2,5 ohne GOX), mit Melan-A um den Faktor 37,2 (5,3 ohne GOX).

Es wurden dabei einige Variationen des DC/T-Zell-Verhältnisses getestet, wobei sich der unveränderte Wert von 1:4 jedoch als am geeignetsten herausstellte, sofern mit einer insgesamt reduzierten Anzahl von 1×10^5 T-Zellen und $2,5 \times 10^4$ DCs gestartet wurde. Bei Verwendung der üblichen Mengen genügte der reguläre Rhythmus der Mediumwechsel nicht, um dessen Gelbfärbung zu verhindern. Diese dient als Indikator für einen erniedrigten pH-Wert und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten (*Abb. 16A*).

GOX-DCs waren befähigt, T-Zellen für Melan-A zu primen, jedoch machten die antigenspezifischen Zellen hier meist weniger als 1 % aus. Deren absolute Anzahl war stets geringer als in Gruppen ohne GOX. Dextramer-Färbungen 72 h und 120 h nach Start der Kokultur zeigten ebenfalls keine höheren Anteile auf, was einen zunächst vermuteten Verdrängungseffekt widerlegte. Auch eine geringere Dosis des Enzyms bei Behandlung der DCs (0,2 U/ml und 0,02 U/ml) hatte diesbezüglich keinen positiven Effekt.

Die mit GOX-DCs geprimten T-Zellen waren nach 10 Tagen phänotypisch überwiegend naiv. Die Verteilung auf die T-Zell-Subpopulationen zeigte sich insgesamt vergleichbar mit jener der Gruppen ohne GOX. Die hohe Proliferationsaktivität konnte durch einen Anteil von 77 % Ki-67^{pos} T-Zellen bei der Messung nach 120 h nachgewiesen werden (*Abb. 16E/F/G*).

Im Vergleich mit cDCs ohne GOX sezernierten die koinkubierten T-Zellen weniger IL-1RA, IL-5, IL-13 und GM-CSF, jedoch mehr IL-2R, IL-6, IL-8 und MIG (siehe Anhang, *Abb. V*).

Nach der Restimulation mit Melan-A-beladenen Monozyten fand keine detektierte Produktion von TNF α oder IFN γ statt.

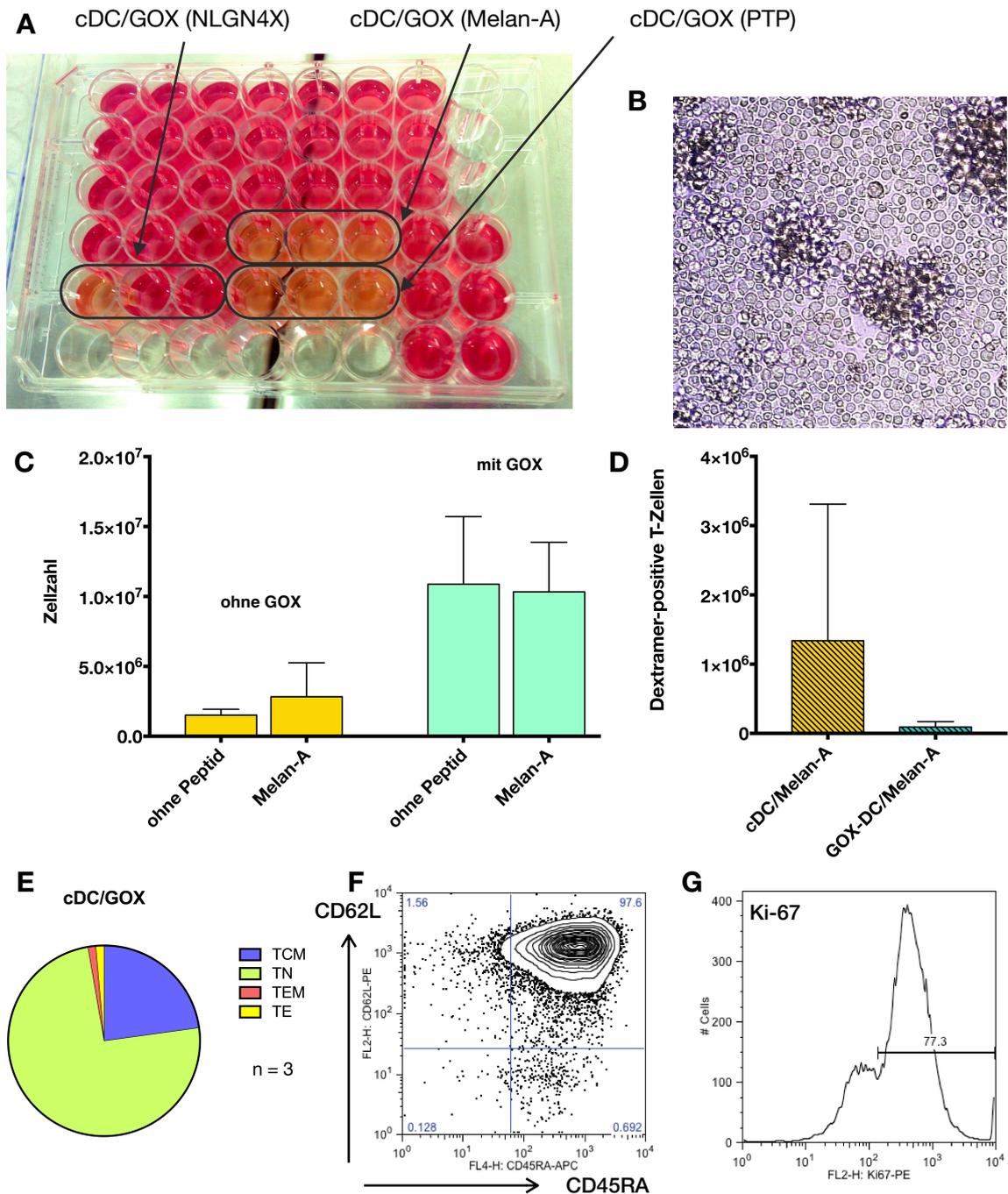


Abb. 16

A. Exemplarisches Beispiel einer Zellkulturplatte mit deutlich sichtbarer Gelbfärbung der GOX-Kulturen im Sinne einer stark gesteigerten Stoffwechselaktivität. **B.** Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerungsfaktor 100) eines GOX-Priming-Wells. Die T-Zellen weisen deutlich größere Zelleiber auf als jene in Kulturen ohne GOX (vgl. Abb. 11). **C.** Zellzahlen an Tag 10 der Priming-Kulturen aus insgesamt 3 Experimenten mit Zellen von 2 Spendern. cDC mit und ohne GOX im Vergleich. Dabei zeigt sich der starke, jedoch unspezifische Proliferationsstimulus unter Verwendung von GOX. **D.** Melan-A-Spezifität der Zellen. Trotz der insgesamt höheren Zellzahlen war der Anteil peptidspezifischer Zellen bei cDC/GOX niedriger. **E / F.** Subpopulationen der mit cDC/GOX geprimten T-Zellen analog zu Abb. 14A/B. **G.** Ki-67 Expression der GOX-geprimten T-Zellen 120 h nach Kokulturbeginn. Die hohe Frequenz des Markers zeigt die auch anhand der Mediumverfärbung und Zellzahl beobachtete starke Proliferationsstendenz dieser Gruppe.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Effekte von Poly(I:C), R848 und PGE₂ auf die Ausreifung humaner tlrDCs im Hinblick auf phänotypische und funktionelle Aspekte. Als Referenz dienten mit TNF α und IL-1 β behandelte cDCs, die aktuell den Goldstandard vieler europäischer Immuntherapiezentren darstellen [56, 81].

Vor diesem Hintergrund erfolgte die Auswahl der im tlrDC-Cocktail enthaltenen Substanzen keineswegs zufällig, sondern beruhte auf einer in der Literatur gut belegten Rationale. Zunächst führt eine DC-Aktivierung ohne Stimulation von PRRs zu einer insuffizienten Reifung der Zellen. Die intrinsische Funktion der Pathogen-Rezeptoren ist die Bahnung der durch sie ausgelösten Immunantwort, was unter anderem mittels Differenzierung von TH-Zellen erreicht wird. Diese kann folglich nur unvollständig ausgebildet werden, wenn Entzündungsmediatoren wie TNF α und IL-1 β alleine verwendet werden, deren Funktion eher in einer Verstärkung der hervorgerufenen Reaktionen besteht [120].

Wie anfangs dargelegt stehen für die Ausreifung von DCs prinzipiell verschiedene TLRs und mindestens ebensoviele komplementäre Agonisten zur Auswahl. Die Voraussetzung einer GMP-konformen Herstellungsmethode ist jedoch nur einer von zahlreichen Beweggründen für eine kombinierte Anwendung von TLR3- und TLR8-Agonisten. Als Rezeptor für dsRNA ist TLR3 zunächst an der Erkennung von Virusinfektionen beteiligt. dsRNA entsteht als Nebenprodukt bei der viralen Replikation im Intrazellulärraum infizierter Zellen. Sie gelangt mittels Endozytose apoptotischer, infizierter Zellen in das Zytosol von DCs und wird dort von TLR3 auf Endosomenmembranen gebunden [11, 121]. Durch dessen angeschlossene Signalwege und das Adaptermolekül TRIF induziert es die Expression von Typ-I-Interferonen wie IFN α /- β [11]. Die TLR3-Stimulation führt dabei auch ganz speziell zu einer Steigerung der Fähigkeit zum Kreuzpriming der DCs, während andere TLRs, u. a. R848, diesen Effekt nicht vermitteln oder

sich sogar negativ auswirken können [11, 121, 122]. Poly(I:C) hat sich zudem als günstig erwiesen, einer nachlassenden Zytokinproduktion der DCs nach Restimulation entgegen zu wirken [123]. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht spezifisch untersucht. Der ssRNA-Rezeptor TLR8 hingegen regt nach Stimulation über eine Aktivierung des MyD88-Adapterproteins in besonderer Weise die IL-12p70-Produktion von DCs an. IL-12 wiederum bewirkt eine starke TH₁-Stimulation für CD4^{pos} sowie eine funktionelle Aviditätsreifung in CD8^{pos} T-Zellen. Über die ebenso TLR8-vermittelte Förderung der IFN γ -Produktion in DCs entsteht ein autokriner Verstärkermechanismus, der ihre IL-12-Produktion weiter steigert [124].

Aus folgenden zellphysiologischen Überlegungen ist es zur DC-Ausreifung generell von Vorteil, eine Kombination von TLR-Agonisten einer einzelnen Substanz vorzuziehen. Für eine korrekt angepasste Aktivierung ist *in vivo* eine sequentielle Bindung von PAMPs verantwortlich. So wurde für bestimmte Herpes-simplex-Viren gezeigt, dass nur eine Stimulation von TLR2 gefolgt von TLR9 eine wirksame Immunantwort erzeugt [3]. Einzelne Erreger besitzen oft mehrere PAMPs, die zumeist in einer bestimmten Abfolge freigesetzt werden. ssRNA-Viren zum Beispiel setzen erst den TLR8-Agonisten ssRNA bei ihrer Aufnahme in Endosomen frei, während die während ihrer Replikation entstehende dsRNA später von TLR3 erkannt wird. Solche Kombinationen von TLR-Liganden führen nicht einfach zu einer Addition der jeweiligen Effekte. Die differenzierte Nettoantwort entsteht vielmehr erst durch die auf charakteristische Weise kommunizierenden Signalwege. Ein starker Synergieeffekt wird dabei insbesondere durch die simultane Stimulation der von den Adaptermolekülen MyD88 und TRIF abhängigen Signalwege erzeugt. Die Kombination von Agonisten nur einer der beiden Signalwegvarianten führt dagegen nicht zu einer Verstärkung der ausgelösten Immunantwort [3, 125].

MAKELA ET AL. führten DNA-Bindungsassays bei aus Monozyten differenzierten DCs durch und zeigten, dass durch TLR3- und TLR8-Stimulation jeweils ver-

schiedene IRF- und STAT-Transkriptionsfaktoren induziert werden. Diese bewirken zusammen eine synergistische Steigerung der Produktion von u. a. IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF α . Andere TLR-Kombinationen erzeugten diesen Effekt nicht. Die Anpassung der Immunantwort beruht dementsprechend vor allem auf einer kooperativen Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Signalwegen [125]. Denselben Effekt einer kombinierten TLR3- und TLR8-Stimulation auf die IL-12-Produktion konnten auch NAPOLITANI ET AL. zeigen. Die unterschiedliche Kinetik der angestoßenen Signalwege führte in deren Studie zu einer länger anhaltenden Sekretion von Zytokinen wie IL-12 und IL-23 [126].

Auch im Kontext der Immunevasion von malignen Gliomen erscheint eine kombinierte TLR-Aktivierung von DCs förderlich: GRAUER und Kollegen untersuchten die Einflüsse einer TGF- β -Einwirkung während der DC-Ausreifungsphase. Bei Verwendung des Jonuleit-Cocktails entstanden so zwar phänotypisch reife, jedoch funktionell stark kompromittierte DCs. Wenn wie in der vorliegenden Arbeit nur TNF α und IL-1 β zur Ausreifung benutzt wurden, waren die gewonnenen DCs darüber hinaus auch phänotypisch unreif und führten nicht zu einer T-Zell-Proliferation in der Gemischten-Lymphozyten-Reaktion. Bei Zugabe von Poly(I:C), R848, IFN γ , TNF α und IL-1 β konnte hingegen eine hohe MHC-Expression und IL-12-Sekretion der DCs trotz TGF- β nachgewiesen werden [73].

An dieser Stelle sei auch eine Bemerkung zu dem in vielen Protokollen enthaltenen IFN γ angefügt. Zwar ist dessen stimulierende Wirkung auf die Produktion von IL-12p70 in DCs in der Literatur gut belegt. Dennoch besitzt es auch ungünstige Effekte sowohl auf den Phänotyp als auch die Migrationsfunktion der Zellen. Während einerseits die CD83- und CCR7-Expression bei Verwendung von IFN γ reduziert wird, findet auch eine Hemmung der gerichteten Migration statt. Hierfür ist die Wirkung als PGE₂-Antagonist durch eine Inhibition der cAMP-Bildung und der angeschlossenen Signalwege ursächlich [127].

Auch die Verwendung von PGE₂ ist als ambivalent zu betrachten. Zwar besitzt es stimulierende Effekte auf iDCs in peripheren Geweben, andererseits supprimierende Eigenschaften auf reife DCs in den Lymphknoten und auf die Produktion bestimmter Zytokine. Es vermittelt seine Wirkung autokrin und parakrin über die G-Protein-gekoppelten EP2- und EP4-Rezeptoren auf DCs, die letztlich zur Stimulation der Transkriptionsfaktorfamilie Tcf/Lef führen. Generell werden dadurch die Expression von CCR7 gesteigert, die Auflösung von Podosomen erleichtert, IL-10 hochreguliert und IL-12 supprimiert. Jedoch sind die Effekte stark abhängig vom Zelltyp und der Stoffkonzentration: Während es supprimierend auf Monozyten in mikromolaren Konzentrationen wirkt, werden iDCs in nanomolaren Konzentrationen stimuliert. In besonders niedrigen Konzentrationen von 1-10 nM überwiegt die Stimulation von EP4, was zur Förderung der IL-23-Sekretion und damit von TH₁₇-Antworten führt. Bei über 50 nM findet dagegen vorwiegend eine Bindung an EP2 und eine darauffolgende Inhibition von IL-23 statt [91, 128]. Mit noch weiter steigender Konzentration werden IL-12, TNF α und MCP-1 und schließlich auch die IL-23-Produktion supprimiert [91]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Stoffkonzentration von 3.000 nM verwendet, die damit deutlich über den in o. g. Studie untersuchten Bereichen liegt. Eine Dosistitration mit Evaluation der Effekte auf Migration und Zytokinsekretion erscheint daher notwendig, um eine optimale Balance der funktionellen Auswirkungen zu erzielen.

Für die Gewinnung unreifer DCs wurden zunächst mittels magnetischer Separation Monozyten aufgereinigt. Dieses Verfahren ist gegenüber einer Selektion durch Plattenadhärenz leichter zu standardisieren und lieferte im vorliegenden Fall eine reproduzierbar hohe Reinheit der gewonnenen Zellen, wodurch die unspezifische Einflussnahme kontaminierender Zelltypen minimiert wurde.

Zum Ende der Ausreifungsphase erfolgte die Ablösung der DCs. Hier zeigte sich die Wirkung von PGE₂ auf deren Motilität bereits mikroskopisch: tlrDCs florierten schon vor dem Spülen mit kaltem PBS überwiegend frei im Medium,

während DCs der übrigen Konditionen noch fest am Boden hafteten [47]. Im klinischen Kontext und im Vergleich mit cDCs erscheinen die daher höhere Ausbeute und der geringere mechanische Stress während der Ablöseprozedur von tlrDCs vorteilhaft. Dies ermöglicht die Applikation von funktionell unbeeinträchtigten Zellaufbereitungen in größerer Menge und in höherer Frequenz als bisher.

Die Untersuchung des DC-Phänotyps erfolgte in Hinblick auf Antigenpräsentation, Kostimulation, Reifungsmarker und Integrine der DC-Linie. tlrDCs waren cDCs aus phänotypischer Sicht deutlich überlegen. Dies drückte sich in einer besseren Antigenpräsentation durch stärker exprimiertes HLA-DR, höherer kostimulatorischer Fähigkeit über CD80 und CD86 sowie insbesondere auch einer stärkeren CD83-Expression aus [19]. Membrangebundenes CD83 besitzt immunstimulatorische Funktionen und gilt zugleich als etabliertester Marker für DCs, die zur Stimulation naiver T-Zellen befähigt sind. Die experimentelle Inhibition der CD83-Expression mittels siRNA führt dementsprechend zu einem DC-Phänotyp mit kompromittierter Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation. CD83 unterstützt zudem scheinbar spezifisch das Priming naiver CD8^{pos} T-Zellen [129].

Die deutlich höhere CD80-Expression von tlrDCs kann als Hinweis auf eine stärkere Fähigkeit zum TH₁-Priming im Vergleich mit cDCs interpretiert werden. CD86 gilt hingegen zwar eher als Stimulus einer TH₂-Polarisierung, besitzt dafür aber eine niedrigere Affinität zum inhibitorischen CTLA-4 als CD80 [4, 130].

Für CD209 und ebenso für CD11c, das in besonderer Weise mit TH₁-Antworten verknüpft ist, zeigten sich zumeist homogen positive Populationen [4]. Auf tlrDCs waren beide, insbesondere CD209, schwächer exprimiert. Die Herabregulation der Integrine schien dabei von PGE₂ abhängig zu sein, da der Austausch durch IFN γ den Effekt komplett aufhob. Dies könnte als Ausdruck einer PGE₂-getriggerten Steigerung der Motilität und verminderten Endozytoseaktivität reifer tlrDCs interpretiert werden. Einen solchen Effekt auf CD209 zeigten auch BUSCHOW ET AL. in einer Transkriptionsanalyse von mit dem Jonuleit-Cocktail ausgereiften DCs [131].

Die Verwendung von IFN γ begünstigte hingegen bei einigen Spendern eine Rückdifferenzierung der Zellen in Richtung Monozyten oder Makrophagen, was durch deren hohe CD14-Expression auffiel. Dennoch waren diese Zellen anhand ihrer CD209- und CD11c-Expression phänotypisch eindeutig DCs zuzuordnen. Auch exprimierten sie, wenngleich in geringerem Ausmaß, weiterhin alle wichtigen DC-Reifungsmarker.

Weil diese Beobachtung geringer ausgeprägt auch in allen anderen Konditionen gemacht werden konnte, schien hier vielmehr ein durch IFN γ verstärkter unspezifischer Effekt verantwortlich zu sein. So könnte sich beispielsweise die abfallende IL-4-Konzentration in den DC-Medien während der Ausreifungsphase dergestalt ausgewirkt haben [116]. PGE₂ besitzt schließlich Effekte auf differenzierende Monozyten, die ihre Entwicklung zu DCs inhibieren [88, 89, 128]. Die PGE₂-Zugabe zum tlrDC-Cocktail erfolgte zwar erst 5 Tage nach Beginn der Differenzierung zu DCs. Noch nicht ausreichend differenzierte Monozyten könnten dadurch aber in ihrer weiteren Entwicklung gehemmt worden sein.

In vivo spielt die Entwicklung von DCs aus Monozyten vor allem im inflammatorischen Milieu eine Rolle [25]. In solche Umgebungen wird eine Vielzahl an Monozyten rekrutiert, die dann weiter zu Makrophagen oder DCs differenzieren. Diese sogenannten *inflammatorischen DCs* finden sich etwa bei Psoriasis vulgaris oder atopischer Dermatitis in den betroffenen Hautarealen. Daneben existiert jedoch auch ein Differenzierungsweg von Monozyten zu CD14^{pos} DCs, die sich dann sowohl in peripheren Geweben als auch in Lymphknoten nachweisen lassen und CD11c exprimieren [132]. Die Funktionen dieser Zellen sind jedoch nicht ausreichend geklärt, sodass die Interpretation für die vorliegende Arbeit letztlich nicht abschließend möglich ist. Weitere Untersuchungen hierzu könnten die Auswirkungen von IL-4 und GM-CSF während der Reifungsperiode oder die Effekte unterschiedlicher Humanseren und Kulturmedien in den Blick nehmen.

Interessanterweise blieb die CD14-Expression auf tlrDCs auch während der verlängerten Kultur nach Ausreifung stabil, während sie in den anderen Konditio-

nen eher weiter zunahm, obwohl IL-4 und GM-CSF in geringerer Dosis weiter substituiert wurden.

Die Zelldichte der tlrDCs sank dabei rapider als bei iDC und cDC beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit der in der Literatur vorherrschenden Meinung überein, dass eine negative Korrelation zwischen phänotypischer Reife von DCs und deren Lebensdauer besteht [100]. Bei cDCs wird diesem Effekt durch den Zusatz von TNF α entgegengewirkt, das positive Auswirkungen auf das Überleben von DCs ausübt, während für iDCs ohnehin eine lange Lebensspanne von etwa drei Monaten beschrieben wurde [66, 133].

Die Expression von CD83 nahm im Verlauf bei allen ausgereiften DCs etwas ab, lag bei tlrDC aber mit 48 % dennoch auch an Tag 13 doppelt so hoch wie bei cDC unmittelbar nach Ausreifung. Eine gänzlich andere Kinetik zeigte sich für HLA-DR, dessen Expression bei tlrDC über die gesamte Dauer der Kultur weiter anstieg, während sie bei cDC konsekutiv abnahm. Somit scheinen tlrDCs wünschenswerte Charakteristika für eine effiziente Antigenpräsentation und T-Zellstimulation auch noch Tage bis Wochen nach Verabreichung der DC-Vakzine zu besitzen.

In den Überständen der DC-Kulturen wurden 8 h, 16 h und 48 h nach Beginn der Ausreifung die Konzentrationen von mehr als 20 Zytokinen gemessen und so deren Sekretionskinetik bestimmt. Das Medium wurde zu den gewählten Zeitpunkten nicht ausgetauscht, sodass die erhaltenen Werte als kumulativ zu interpretieren sind. Die jeweiligen Halbwertszeiten und ein Verbrauch der Zytokine sind dabei als Einflussvariablen grundsätzlich zu berücksichtigen, im vorliegenden Fall jedoch nicht untersucht worden.

Ein Konzentrationsmaximum nach 16 h konnte für die Mehrzahl der Analyte dargestellt werden, was zeigt, dass generell im Verlauf der DC-Reifung bestimmte funktionelle Stadien durchlaufen werden. Während zu Beginn die Produktion von Zytokinen im Vordergrund steht, wird erst im weiteren Verlauf die Migrati-

onsfähigkeit voll ausgebildet sowie die phänotypische Reife und T-Zellstimulation entwickelt [130].

Nach 8 h wurden sowohl von cDCs als auch tlrDCs zunächst allgemein immunstimulierende und chemotaktische Substanzen, z. B. IL-6, IL-8, IFN γ und MIP-1 α/β gebildet. cDCs produzierten zudem auch MCP-1, tlrDCs hingegen nicht, was auf eine Suppression durch PGE $_2$ zurückgeführt werden kann [91]. Die Funktion von MCP-1 besteht unter anderem in der Chemotaxis für TH $_2$ -Zellen über Bindung an CCR4. Nach 16 h war dafür RANTES insbesondere bei tlrDCs nachweisbar. Die genannten Stoffe erreichten zu diesem Zeitpunkt zumeist auch ihr Konzentrationsmaximum. Über eben jene Zytokine rekrutieren reife DCs durch Stimulation von CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 Monozyten und iDCs an den Ort eines Pathogeneintritts, die wiederum nachfolgende Generationen reifer DCs hervorbringen [4]. RANTES scheint darüber hinaus einen günstigen Einfluss auf die mesenchymale Migration von iDCs zu haben. Hierunter versteht man die Wanderung durch dichte, feinporige Gewebestrukturen, die die Ausbildung von Podosomen und die proteolytische Auflösung umliegender Bindegewebe beinhaltet [134]. Indem reife DCs selbst die oben genannten Rezeptoren herabregulieren, wird ihre folgende Migration aus dem entzündeten Gewebe in die Lymphgefäße ermöglicht [135]. Spezifische chemotaktische Signale an TH $_1$ - und T $_{EM}$ -Zellen werden von tlrDCs durch die Produktion von MIP-1 α/β , RANTES, MIG und IP-10 über Bindung von CCR5 und CXCR3 vermittelt [16, 136].

Für eine Gruppe bestimmter Zytokine konnte ein deutliches Sekretionsmaximum nach 16 h nachgewiesen werden. Dazu gehörten insbesondere IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12, die zudem alle von cDCs in wesentlich geringerem Ausmaß als von tlrDCs produziert wurden. Von DCs gebildetes IL-6 besitzt eine antisuppressive Wirkung, indem es T $_{reg}$ -Zellen inhibiert und die Empfindlichkeit aktivierter T-Zellen für deren Einflüsse senkt [121, 137, 138]. tlrDCs sind damit besser als cDCs gegen eine Immunevasion maligner Tumoren mittels T $_{reg}$ -Induktion gewappnet. Gleichzeitig spielt IL-6 jedoch auch bei der Rekrutierung von myelo-

iden Suppressorzellen und der TH₁₇-Induktion eine Rolle, sodass dessen Nettoeffekte im Rahmen der Tumorstimulanz nicht eindeutig vorherzusehen sind [70].

In den Überständen beider ausgereifter DC-Gruppen, nicht aber bei iDC, fand sich eine geringe Menge IL-17, das üblicherweise von TH₁₇-Zellen produziert wird. Mögliche Effekte von durch DCs gebildetes IL-23 oder IL-6 auf kontaminierende CD4^{pos} T-Zellen sind hierbei nicht auszuschließen.

Gerade für IL-12 fiel bei tlrDC eine anhaltend hohe Produktion bis 48 h nach Ausreifung auf, wohingegen die IL-10-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt bereits wieder deutlich abgefallen waren. Ein Maß für die Immunogenität dendritischer Zellen, die sich im Zytokinsekretionsprofil ausdrückt, ist das Verhältnis von IL-12 zu IL-10. Während IL-12 als wichtigstes Signal zur Einleitung einer TH₁-Antwort mit darauffolgender IFN γ -Sekretion dient, wirkt IL-10 diesem entgegen und fördert damit TH₂-Antworten. Zugleich wird die Sekretion von IL-12 auf Transkriptionsebene direkt durch IL-10 inhibiert [139]. Für cDC und tlrDC zeigte sich in dieser Arbeit nach 48 h eine deutliche Mehrproduktion von IL-12 mit einer IL-12/IL-10-Ratio von >300. Im tlrDC-Cocktail enthaltenes PGE₂ induziert das antagonistisch wirkende IL-12p40-Monomer und inhibiert kompetitiv die Synthese von IL12p70, weshalb sein Einsatz als nicht unproblematisch gilt [140]. Da die Fähigkeit zur IL-12-Produktion klinisch so entscheidend ist, wurde noch ein spezifischer IL-12p70-ELISA durchgeführt. Für tlrDCs konnte hierbei eine relevante Produktion gezeigt werden, deren Kinetik erneut einem Maximum nach 16 h entsprach. Dahingegen fand sich in den Überständen weder von iDCs noch von cDCs eine messbare Menge. In der Zusammenschau könnte die mangelnde IL-12-Produktion der cDC-Gruppe für eine ausreichende TH₁-Stimulation hinderlich sein, sodass tlrDCs hier ein deutlich vorteilhafteres Profil aufweisen.

Es sei an dieser Stelle jedoch bemerkt, dass für IL-10 durchaus auch günstige Effekte auf CTL-Antworten beschrieben wurden. NIZZOLI ET AL. fanden Hinweise auf eine selektive Rolle von IL-10 bei der Auswahl hochaffiner TCR-Klone während des Kreuzprimings. Desweiteren förderte IL-10 in dieser Studie die Prolife-

ration von Memory-T-Zellen durch Verstärkung des DC-abhängigen Effekts von IL-15. Die IL-10-Produktion wurde dabei interessanterweise durch R848 stimuliert [141]. In der klinischen Anwendung könnte sogar erst durch diese Mechanismen eine anhaltende protektive Wirkung besonders von Tumorlysat-basierten Vakzinen gewährleistet werden.

Die IL-12-Produktion von DCs hat sich nichtsdestotrotz vor allem im Kontext der Tumorstimmung als verlässlichster Parameter für klinischen Benefit herausgestellt. CARRENO ET AL. publizierten dazu eine Studie mit CD40L/IFN γ -gereiften, antigenbeladenen DCs zur Immuntherapie von Melanomen. Die antigenspezifischen Zellen im Blut der Patienten nahmen nach Verabreichung der Vakzine zwar regelmäßig zu. Doch nur für Patienten mit hoher IL-12 Produktion der DCs konnte ein signifikanter, lebensverlängernder Effekt gezeigt werden. Die antigenspezifische IFN γ -Produktion der von IL-12 stimulierten CTLs korrelierte ebenfalls mit einer längeren Zeitspanne bis zum Fortschreiten der Erkrankung. Interessanterweise konnte die Hinzunahme von Poly(I:C) und R848 zum Reifungscocktail die IL-12-Produktion bei Therapieversagern wiederherstellen [142]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Verwendung von tlrDCs ein weiteres Mal günstig, um bei möglichst vielen Patienten eine hohe Produktion von IL-12 und somit eine Verbesserung der Prognose bewirken zu können.

DCs in untergehenden Tumoren produzieren große Mengen CXCL9 (MIG), wodurch sie CXCR3^{pos} aktivierte TH₁-Zellen rekrutieren. MIG fungiert zudem als Antagonist von CCR3 auf TH₂-Zellen und begünstigt dadurch die Ausbildung einer TH₁-dominierten Immunreaktion [48]. Daneben fungiert auch CXCL10 (IP-10) als CXCR3-Ligand [31]. Es wird in früheren Stadien der Immunantwort gebildet und gilt im Tumorkontext als wichtiges chemotaktisches Signal für die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen ins ZNS. Darüber hinaus stimuliert es T-Zellen zur IFN γ -Produktion und fördert die Generierung tumorspezifischer T-Zellen [143]. Beide Chemokine induzieren durch Hochregulation von VLA-4 das Anhaf-

ten von TH₁-Zellen am zerebralen Gefäßendothel [144]. In der vorliegenden Arbeit wurde IP-10 von tlrDCs literaturkonform v. a. in der frühen Phase der Ausreifung produziert, während die Konzentration von MIG auch nach 48 h weiter anstieg. Somit könnte durch tlrDCs eine konstante Chemotaxis für aktivierte TH₁-Zellen ausgeübt und deren Homing ins ZNS begünstigt werden [48].

Die Produktion der Typ-I-Interferone IFN α und IFN β hängt generell stark von einer vorherigen Stimulation bestimmter TLR-Agonisten, darunter Poly(I:C) und R848, ab, die TRAF3 und in der Folge den Transkriptionsfaktor IRF7 aktivieren [2, 11]. Typ-I-Interferone tragen wiederum selbst durch autokrine und parakrine Effekte zur Ausreifung der DCs bei [121, 145]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten DC-Überstände enthielten allesamt nur eine niedrige Menge IFN α . Als Erklärungsansatz für die fehlende Produktion durch tlrDCs könnte ein starker Verbrauch dieser Interferone während der Reifung herangezogen werden.

LANGENKAMP ET AL. zeigten, dass die IL-12p70-Produktion von DCs nach TLR-Stimulation während der frühen Aktivierungsphase erfolgt. Sie konnten einen Beginn der Sekretion nach 10 h mit Erreichen eines Plateaus um 18 h belegen. Entsprechend wies die mRNA der p40- und p35-Untereinheiten ein Konzentrationsmaximum nach 8 h auf und war bereits nach 18 h nicht mehr nachweisbar. Die Zugabe von IFN γ veränderte diese Kinetik nicht. Auch bei allen weiteren untersuchten Zytokinen fiel die Produktion nach 24 h drastisch ab. Frühe aktivierte DCs stimulierten in den Experimenten vornehmlich TH₁-Zellen. „Erschöpfte“, zu späteren Zeitpunkten verwendete DCs hingegen übten positiven Einfluss auf TH₂-Zellen oder unpolarisierte T_{CM}-Zellen aus [130]. MAKELA ET AL. bestätigten diese Beobachtungen bei DCs, die mit einer Kombination von Poly(I:C) und R848 ausgereift wurden [125]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen daher zusammen mit der in der Literatur beschriebenen Kinetik für eine Verkürzung der üblicherweise verwendeten Ausreifungsdauer von 48 h, wenn DCs zum Zeitpunkt ihres Sekretionsoptimums appliziert werden sollen. Man kann jedoch ein-

wenden, dass vermutlich erst mit zunehmender Reifungsdauer eine Resistenz der DCs gegenüber den suppressiven Effekten von IL-10 auftritt [85].

TAWAB und Kollegen untersuchten auch die Effekte einer verkürzten Differenzierungsphase von DCs, die sie *fastDCs* nannten. Sie fanden eine ähnlich hohe, aber homogenere Expression der Reifungsmarker. Daneben zeigte sich die IL-12/IL-10-Ratio gegenüber konventionellen DCs vorteilhafter. Als Ausreifungscocktail wurde hier LPS/IFN γ verwendet [146]. Ist also die Verkürzung der Differenzierungsphase zusammen mit der Ausreifungsdauer tatsächlich vielversprechend? Hier sollte ein vorsichtiges, durch weitere Studien mit unterschiedlichen Cocktails unterstütztes Vorgehen mit dem kritischen Endpunkt der klinischen Wirksamkeit verfolgt werden. Neben den genannten Aspekten sind noch viele andere Parameter der Gewinnung und Herstellung von DCs diesbezüglich nicht ausreichend evaluiert.

Eine weitere funktionelle Untersuchung stellte die Quantifizierung der Migrationsfähigkeit mittels Chemotaxisversuch dar. Der Versuchsaufbau simulierte den aktiven Eintritt in afferente Lymphgefäße, was eine direkte Voraussetzung für späteres T-Zell-Priming in Lymphknoten darstellt. tlrDCs migrierten in etwa zehnmal höherer Frequenz als tlrDCs/IFN γ oder cDCs, welche selbst nur eine geringe Steigerung der Migration im Vergleich mit iDCs aufwiesen. Die in der Literatur beschriebene Wirkung von PGE₂ auf die migratorische Funktion von DCs konnte somit auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden [47, 147].

PGE₂ in Reifungscocktails besitzt zwar einen positiven Einfluss auf die gerichtete Migration von DCs, jedoch wirkt es durch Verstärkung der TIMP1-Produktion auch einschränkend auf die Migration in einer Extrazellulärmatrix [147]. Die Bewegung von Zellen durch dreidimensionale Gewebestrukturen beruht auf dem bereits genannten mesenchymalen Migrationsmodus, der von der Funktion der Podosomen abhängig ist. Deren PGE₂-vermittelte Auflösung könnte sich daher in gewisser Hinsicht auch als kontraproduktiv erweisen [134].

MORSE ET AL. zeigten, dass nur ein Bruchteil der bei einer Tumorstoffvakzine subkutan applizierten DCs tatsächlich aus der Injektionsstelle in Richtung Lymphknoten migrieren [148]. Da reife DCs kein CD62L exprimieren und folglich aus dem Blutstrom nicht in Lymphknoten eintreten, können sie nicht intravenös adressiert werden. Sinnvolle Applikationswege existieren daher nur über periphere Gewebe via Lymphgefäße [149]. Zwar wird versucht, das zugrundeliegende Problem durch direktes Targeting der Tumorantigene an DCs, etwa über CD205 zu umgehen. Hiermit werden jedoch in erster Linie Steady-state-DCs adressiert, die dann bei ausbleibendem Reifungssignal auch tolerogene Effekte vermitteln könnten. Die gleichzeitige Aktivierung der DCs durch geeignete Stimulation in ausreichendem Maß zu vermitteln, stellt dabei die größte Herausforderung dar [147]. Insofern muss die Optimierung der Migrationsbereitschaft klinisch eingesetzter DC-Aufbereitungen aktuell als eine der wichtigsten Stell-schrauben zur Verbesserung ihrer Wirksamkeit gelten [25].

Die vorliegende Arbeit untersuchte auch speziell die migrierte Zellfraktion hinsichtlich ihres Oberflächenphänotyps. Dabei präsentierten sich die gewanderten tlrDCs als homogene Population mit starker Expression von CD83 und CD86, was eine Korrelation zwischen Migration und phänotypischer Reife nahelegt. Keine Aussage konnte jedoch über den Zusammenhang von Migration und funktioneller Reife im Hinblick auf Zytokinproduktion und Priming getroffen werden.

Die Fähigkeit zum CTL-Priming der verschiedenen DC-Konditionen wurde in einer Kokultur mit naiven CD8^{pos} T-Zellen getestet und durch Zellzahlbestimmung und Färbung mit Peptid-MHC-Dextrameren quantifiziert. Dazu wurden die verwendeten DCs für nur 16 h ausgereift, da sich eine verkürzte Reifungsdauer im Kontext des T-Zell-Primings als vorteilhaft erwies [117, 130]. Während einige Studien den Effekt unterschiedlicher Reifungscocktails auf allogene und autologe panT-Zell-Stimulation vergleichen, wird in der vorliegenden Arbeit das Priming autologer, naiver zytotoxischer T-Zellen durch tlrDCs spezifisch untersucht [103,

106]. Durch die Anwendung dieser Methode wird verhindert, dass sich bereits aktivierte Klone unter den verwendeten T-Zellen befinden und durch ihre Expansion den Primingerfolg imitieren. Insbesondere bei Verwendung von Melan-A sind nämlich auch im Blut gesunder Probanden zahlreiche aktivierte T-Zellklone mit passendem TCR vorhanden [118]. Umgekehrt ist die Detektion von Antworten seltenerer TCR-Klone innerhalb der gesamten CD8^{pos} Population äußerst unwahrscheinlich. Nur durch die Aufreinigung naiver Zellen können beide Problematiken umgangen werden. Desweiteren fand im verwendeten Protokoll keine Beeinflussung durch CD4^{pos} TH-Zellen statt, stattdessen wurde spezifisch die DC-CD8^{pos}-Interaktion evaluiert und der daraus hervorgehende Phänotyp und die Zytokinproduktion der CTLs untersucht. Erstmals wurden auch die GBM-Peptide NLGN4X₁₃₁₋₁₃₉ und PTP₁₃₄₇₋₁₃₅₅ mit diesem Protokoll verwendet und spezifische T-Zell-Antworten gegen sie nachgewiesen.

Eine Abweichung von dem von WÖFL ET AL. publizierten Protokoll stellte die Aufreinigungsmethode dar, da die naiven T-Zellen nicht in *Untouched-Technik* gewonnen wurden. Da die DCs aber erst 7 Tage nach CD14-Selektion zur Kokultur gegeben wurden, zu diesem Zeitpunkt von einer Herabregulation von CD14 auszugehen ist und die T-Zellen erst nach Übernachtslagerung verwendet wurden, ist eine Beeinflussung durch verbleibende zelladhärente Beads unwahrscheinlich.

Die Evaluation der Ergebnisse erfolgte zunächst hinsichtlich der T-Zellzahl und Antigenpezifität. Da nur IL-7 und IL-15 zur Kultur zugegeben wurden, war der Proliferationsschub der T-Zellen in der Tat DC-abhängig, eine unspezifische Zellteilung fand somit nicht statt. Die Gesamtzellzahlen lagen bei Melan-A-beladenen tlrDCs mehr als doppelt so hoch wie bei cDCs, was auf eine stärkere mitogene Wirkung schließen lässt. Der Anteil Melan-A-spezifischer Zellen lag bei tlrDCs dagegen nur unsignifikant höher. Insgesamt produzierten diese also mehr als zweimal so viele peptidspezifische T-Zellen wie cDCs. Die GBM-Peptide riefen erwartungsgemäß deutlich schwächere Antworten hervor und wiesen eine große Spendervariabilität auf, sodass Zellzahlen und Antigenpezifität niedriger lagen.

Eine Tendenz zu mehr positiven Wells mit klar abgrenzbarer antigenspezifischer Population konnte in der tlrDC-Gruppe beobachtet werden.

Nach Beendigung der Kokultur wurden die T-Zellen auf ihren Phänotyp überprüft und dabei auf Aktivierungs-, Proliferations- und Seneszenzmarker, Homingmerkmale sowie die Differenzierung in Subtypen geachtet. Ki-67 und CD69 waren in allen Konditionen erwartungsgemäß nur noch schwach vorhanden, da diese Marker während der aktiven Zellteilung und frühen Aktivierung exprimiert werden. Für CD69 wurde gezeigt, dass bereits nach 6 Zellteilungen wieder eine Herabregulation stattfindet [150]. Stärkere Zellteilung ging mit schnellerer Seneszenz einher, sodass CD57 bei tlrDC höher lag als bei cDC. Dieser Marker dient als Anzeiger für die Teilungsinaktivität der T-Zellen, unabhängig von ihrem CD28-/CD62L-Status [151]. Der Lymphknoten-Homingrezeptor CD62L wird bei der Subdifferenzierung von T-Zellen herabreguliert [14]. Seine Expression war entsprechend bei tlrDC niedriger als bei cDC und deutete zusammen mit CD27 eine fortgeschrittenere Aktivierung der T-Zellen an. Dennoch überwogen in allen Konditionen noch naive T-Zellen, die CD62L und CD45RA exprimierten. tlrDCs förderten jedoch die Differenzierung zu zentralen Memoryzellen mehr als cDCs. An dieser Stelle wären weitere Versuche beispielsweise mit verlängerter Kulturdauer nötig, um die zeitliche Dimension des Phänotypshifts besser beschreiben zu können. Zudem wäre für eine vollständige Charakterisierung der Zellen ein erweitertes Panel, das neben CD45RO auch die zu den verwendeten Peptiden korrespondierenden Dextramere enthält, hilfreich.

Eine alternative Erklärung für die Beobachtungen könnte die Entstehung von sogenannten Stammzell-Memory-T-Zellen (T_{SCM}) liefern. Diese phänotypisch naiven Zellen sind im Differenzierungsprozess zwischen T_N und T_{CM} zu verorten, besitzen das größte Proliferationspotenzial aller T-Zell-Subgruppen und zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD95 aus. Sie weisen überlegene Antitumoreffekte auf, können im Organismus dank ihrer stammzellartigen Charakteristik persistieren und weiter differenzieren. Ihre Entwicklung aus T_N wird sogar

durch die vorherige Stimulation mit IL-7 und IL-15 gefördert. T_{SCM} könnten also durchaus einen Teil der als phänotypisch naiv klassifizierten T-Zell-Population darstellen [16].

Durch ihre fast zehnfach stärkere VLA-4-Expression war das ZNS-Homing von tlrDC-geprägten CTLs im Vergleich zur cDC-Gruppe deutlich vorteilhafter zu bewerten. Auch die Verdopplung der VLA-4^{pos} T-Zellen in der peptidspezifischen Population ist erwähnenswert und unterstützt die These eines spezifischen Imprintingsignals während des Primings. Somit wird durch tlrDCs die Migration aktivierter T-Zellen in die Region intrazerebraler Tumoren voraussichtlich besser gewährleistet als bei der Verwendung von cDCs.

In den Überständen der T-Zell-Kulturen von Tag 10 wurden die sezernierten Zytokine und Chemokine bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden. Dies erscheint insofern plausibel, als es sich um unstimulierte Zellen handelte, deren letzter Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle bereits mehrere Tage zurücklag.

Die Positivkontrollgruppe mit lpsDCs wies die höchste IFN γ -Produktion auf, was auf eine starke TC₁-Reaktion schließen lässt. Der Quotient aus IFN γ und IL-4 war jedoch auch in der Gruppe der Melan-A-präsentierenden DCs bei tlrDC deutlich positiv und lag dabei ungefähr eine Zehnerpotenz höher als bei cDC. cDC-geprägte T-Zellen produzierten zudem auch die größte Menge der TH₂-stimulierenden Zytokine IL-5 und IL-13.

Desweiteren waren in den Überständen weder IL-17 noch IL-10 nachweisbar, was gegen eine Induktion von Subtypen wie TC₁₇, TC₂ oder CD8^{pos} Suppressorzellen sprach [28].

Da zum Zeitpunkt der Ausreifung kein Auswaschen des IL-4-haltigen DC-Mediums erfolgte, konnte aus den DC-Überständen keine Aussage über die Höhe des produzierten IL-4 und eine damit einhergehende mögliche TC₂-Induktion getroffen werden. Die T-Zell-Überstände hingegen waren in dieser Hinsicht durchaus verwertbar. Zudem lieferte die Menge des enthaltenen IL-12 eine Aus-

sage über die Sekretion der DCs nach Kontakt mit T-Zellen. Sowohl tlrDCs als auch cDCs wiesen hier einen positiven Quotienten auf, was gegen eine in der Literatur beschriebene Erschöpfung der DCs sprach [130]. Die IL-12-Konzentrationen in der tlrDC-Gruppe lagen sogar etwas höher als bei lpsDCs, obwohl deren Reifungscocktail das IL-12-stimulierende IFN γ enthielt. Dass auch cDCs hier ein TC₁-gewichtetes Sekretionsprofil aufwiesen, lässt möglicherweise auf eine sekundäre Förderung ihrer IL-12-Produktion nach T-Zell-Kontakt schließen. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für einen eindeutig TC₁-polarisierenden Effekt der tlrDCs auf naive CD8^{pos} T-Zellen.

Um die funktionellen Aspekte der T-Zell-Antworten genauer abzubilden, wurden die geprimten T-Zellen antigenspezifisch restimuliert. Die selektive Verwendung von Melan-A-beladenen Monozyten, die nach Übernachtlagerung in IL-4- und GM-CSF-haltigem Medium höchstwahrscheinlich bereits teilweise einen iDC-Phänotyp angenommen hatten, garantierte eine ausschließlich MHC-vermittelte Restimulation. Dadurch wurde die Interaktion zwischen CTLs und APZs direkt nachgebildet, ohne durch CD4^{pos} Helferzellen einen weiteren Einflussfaktor auf die TC-Polarisierung einzuführen. Die Reaktion der T-Zellen wurde anhand ihrer IFN γ - und TNF α -Produktion nach Restimulation mit unterschiedlichen Peptiddosen bemessen. Während alle DC-Konditionen eine Bildung von TNF α hervorriefen, bewirkten nur lpsDCs und tlrDCs auch eine relevante IFN γ -Produktion der T-Zellen, die jedoch stets niedriger als die von TNF α lag.

Zwei mögliche Erklärungen für das Sekretionsverhalten der T-Zellen liefert ihr Phänotyp. Für die überwiegend enthaltenen T_N und T_{CM} als Vertreter undifferenzierter CTLs im Hinblick auf eine TC₁/TC₂-Polarisierung ist eine niedrigere IFN γ -Produktion beschrieben als für Effektorzellen [130]. TNF α und IL-2 werden zudem in früheren Stadien von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet als IFN γ , für dessen Bildung mehrere Proliferationsrunden notwendig sind [16].

Daneben wäre besonders in der cDC-Gruppe auch ein Überwiegen von TC₂-Zellen denkbar, die TC₁-Zellen bezüglich einer IFN γ -Antwort deutlich unterlegen

sind und stattdessen regulierende Effekte auf die beteiligten APZs über die Ausschüttung von IL-10 ausüben. Während zwar sowohl TH₁- als auch TH₂-Zellen formal zur Abwehr von Tumoren beitragen, sind TC₂- im Gegensatz zu TC₁-Zellen für Antitumoreffekte offensichtlich unbedeutend [27].

Interessanterweise konnte die in der Literatur beschriebene Aviditätsreifung der T-Zellen nach Kontakt mit TLR-gereiften DCs durch die hier angewendete Methode nicht bestätigt werden [124, 152]. Nach Normalisierung der Peptidverdünnungskurven ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wenngleich cDC-geprimte CTLs bei gleicher Peptiddosis absolut betrachtet deutlich weniger antitumorale Zytokine produzierten als tlrDC-geprimte CTLs. Um feinere Unterschiede festzustellen, wären Untersuchungen mit höherer Probenanzahl und kleineren Abstufungen der Peptiddosis sowie eine zu beiden Seiten erweiterte Skala notwendig. Alternativ könnten die selektierten Monozyten statt über Nacht auch protokollgemäß über 5 Tage zu iDCs differenziert und ausgereift werden, um eine effektivere Antigenpräsentation zu gewährleisten.

Es ist für die Interpretation der Ergebnisse aller in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Primingversuche durchaus relevant, dass mit der gewählten Methode zwar eine differenzierte Sicht auf die DC-CD8^{pos}-Interaktion ermöglicht wird, die Situation im lebenden Organismus dadurch aber nur unzureichend abgebildet wird. Es gibt Hinweise, dass im Kontext der nicht-inflammatorischen Präsentation von zellassozierten Antigenen die Unterstützung durch CD4^{pos} Zellen (z. B. mittels CD40-Ligation) besonders gefordert ist. Dies kann gerade in frühen Stadien des Glioblastoms große Relevanz besitzen, wenn nämlich noch keine umgebende Inflammationsreaktion etabliert ist [61, 62, 153].

Ein Novum in dieser Arbeit stellte die Verwendung von GOX im Primingmodell mit naiven CTLs dar. Der starke proliferative Effekt, der hier gezeigt werden konnte, basierte jedoch vermutlich auf einer unspezifischen Aktivierung der inkubierten T-Zellen, sodass am Ende der Kulturperiode kaum antigenspezifische

Zellen vorhanden waren. Welche Implikationen diese Ergebnisse für die Verwendung von GOX-DCs im klinischen Kontext besitzen, kann hieraus allerdings nicht abgeleitet werden. Ob durch die Modifikation der Glykoproteine der DC-Oberfläche auch unerwünschte Wirkungen, etwa auf die Homingfunktion, vermittelt werden, wurde zudem in dieser Arbeit nicht untersucht [112].

Neben der beabsichtigten Wirkung auf TH₁-Zellen könnte auch eine Aktivierung von TH₁₇-Zellen für die Antitumoreffekte von DC-Vakzinen verantwortlich sein. Diese durch IL-23 stimulierten Zellen zeichnen sich durch Charakteristika aus, die besondere Vorteile im Tumorkontext bedeuten könnten. Durch ihre fehlende Expression von PD-1 und FOXP3 gilt es als unwahrscheinlich, dass durch sie immunsuppressive Effekte vermittelt werden. Durch Sekretion von IL-17 bewirken sie gemeinsam mit IFN γ eine Induktion von MIG und IP-10. Daneben produzieren sie interessanterweise kein IL-10, dafür aber z. B. GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-2 und IL-8. Tumorassoziierte TH₁₇-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR6. Ihr Nachweis korreliert mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von TH₁-Zellen, CTLs und NK-Zellen in Tumoren, wohingegen dann signifikant weniger regulatorische T-Zellen gefunden werden. In klinischen Studien ergaben sich teils widersprüchliche Ergebnisse. Während einige Arbeitsgruppen tumorinduzierende Effekte fanden, zeigten andere einen deutlichen Überlebensvorteil von Patienten mit IL-17-vermittelten Immunantworten [154].

Weiterhin existieren Hinweise, dass TH₁₇-Zellen nicht in Seneszenz eintreten wie andere TH-Subgruppen, was auf eine gewisse Ähnlichkeit zu Stammzellen schließen lässt. Sie können darüber hinaus Tumorzellen direkt lysieren und CD8-Antworten verstärken [155]. Ihre Stimulation durch DC-Vakzinen sollte vermutlich nicht als unerwünschter Nebeneffekt, sondern vielmehr als hilfreiche Unterstützung von TH₁-dominierten Antitumorantworten gelten. Insofern könnten auch die genannten Effekte von PGE₂ auf die T-Zell-Differenzierung durch DCs damit in einem anderen Licht erscheinen.

Ein in dieser Arbeit bisher vernachlässigter, für die Tumorabwehr aber möglicherweise entscheidender Zelltyp wird durch die zum angeborenen Immunsystem zählenden NK-Zellen repräsentiert. Diese werden auf verschiedenen Wegen durch DCs ohne vorheriges Priming stimuliert und besitzen schlagkräftige Mechanismen gegen virusinfizierte und veränderte körpereigene Zellen. Durch sie werden Zellklone mit herabreguliertem MHC-I angreifbar, wie sie in Tumoren vorkommen [70, 156]. Die NK-Aktivierung geschieht über eine Reihe verschiedener Rezeptoren sowie über direkten DC-Kontakt. Durch IL-12, IL-15 und IFN α/β wird ihre IFN γ -Produktion, Proliferation und Zytotoxizität gesteigert. Der dafür notwendige Zell-Zell-Kontakt findet ebenso in den parakortikalen Regionen der Lymphknoten statt, wohin sie wie iDCs aus dem Blutstrom durch Chemotaxis über CXCR3- und CCR5-Liganden migrieren [1, 4, 157, 158]. Dort angekommen verstärken sie außerdem TH₁-Antworten durch Bildung von IFN γ und fördern damit das Priming von CTLs [158, 159].

Eine enge Verbindung der NK-Zellen zur DC-Funktion während der Initiation einer adaptiven Immunantwort, besonders im Rahmen von Tumoren, stellt deren lineares Bild ausgehend von DCs teilweise infrage [156]. So können NK-Zellen in nicht-mikrobiellen Szenarios wiederum DCs direkt aktivieren. Sie führen dabei zur Ausreifung von iDCs und regulieren deren Expression von CD80, CD86, CD83, HLA-DR und CCR7 hoch. In frühen Stadien der Entzündungsreaktion stellen NK-Zellen durch die Lyse der befallenen Zellen überhaupt erst Antigene für APZs zur Verfügung. Gereifte DCs stimulieren dann ihrerseits ruhende NK-Zellen und aktivieren diese [160].

Wie bereits beschrieben existieren mehrere Mechanismen, mit denen maligne Gliome einer gegen sie gerichteten Immunantwort entgehen können. Dazu gehört auch eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in tumorinfiltrierenden DCs, die daraufhin vermehrt IL-2 bilden, wodurch T_{reg}-Zellen stimuliert und NK-Zellen inhibiert werden. Niedrigere STAT3-Level führen hingegen zu mehr IL-12, weniger TGF- β und einer verbesserten Funktion von NK-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass auch NK-Zellen durch DC-Vakzinen stimuliert wer-

den und ihre Aktivität dabei sogar mit der Prognose der Patienten korreliert. Bei Verwendung von R848 und Poly(I:C) im DC-Reifungscocktail ließ sich in einer Arbeit von SARHAN ET AL. weniger STAT3 nachweisen als bei LPS-gereiften DCs [159]. Man könnte in Bezug auf die vorliegende Arbeit annehmen, dass durch den von tlrDCs sezernierten sIL-2R im Tumorkontext eine Inhibition der IL-2-vermittelten NK-Zell-Suppression vermittelt werde. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass tlrDCs durch ihr Chemokin- und Zytokinsekretionsprofil auch alle nötigen Voraussetzungen besitzen, starke NK-Zell-Antworten zur Tumorabwehr hervorzurufen.

Wendet man sich der klinischen Anwendung der DC-Vakzine zu, so werden neben der Frage nach der optimalen Ausreifungsmethode der DCs auch weitere Faktoren diskutiert, die erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit der Behandlung haben.

Heute sind zum Beispiel zahlreiche unterschiedliche Arten der Auswahl und Aufbereitung von Tumorantigenen in Verwendung, die von einzelnen mutierten Proteinen (IDHR^{R132H}, EGFRvIII) über entweder vordefinierte oder individualisierte Panels tumorassoziiertes Antigene bis zum klassischen Tumorlysat reichen. Tumorlysat gilt dabei als weniger spezifisch und anfälliger für unerwünschte Toleranzeffekte und Autoimmunität. Moderne Methoden der Massenspektroskopie und des DNA-Sequenzierens bieten zudem vielversprechende Möglichkeiten, um individualisierte Antigene mittels Vergleich von Patienten- und Tumorpeptidom zu identifizieren. Selbst die Verwendung CMV-spezifischer DCs ist in bestimmten Fällen möglich, da CMV-Antigene überzufällig häufig in Glioblastomen gefunden werden, während sie im umliegenden Gewebe nicht exprimiert werden [84].

Grundsätzlich besitzen Tumorpeptide schwierig vorherzusehende MHC-Bindungseigenschaften, was eine vorherige Analyse des Peptidoms notwendig macht, um unspezifische und eventuell nebenwirkungsbehaftete Effekte zu minimieren [58, 59]. Zudem wird das Immunoediting von Gliomen bei Verwendung von einzelnen Peptiden im Vergleich zu LySAT wesentlich erleichtert. Dies

liegt an der Tatsache, dass Tumorlysat eine größere Heterogenität der enthaltenen Peptide aufweist und damit die tatsächlichen Verhältnisse innerhalb des Tumors besser widerspiegelt. Somit evoziert es vermutlich eine breitere und gegenüber tolerogenen Effekten widerstandsfähigere Immunantwort als einzelne Peptide.

Dafür ist zur Prozessierung von Tumorlysat die Endozytose der darin enthaltenen länger-kettigen Peptide und folglich die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation der verwendeten DCs von Nöten, was eine zusätzliche Anforderung an deren funktionelle Beschaffenheit stellt [25, 70]. Die Antigenaufnahme der DCs wird mit ihrer Ausreifung zunächst herauf- und im Verlauf drastisch herabgesetzt. Daher sollte die zeitliche Sequenz der einzelnen Herstellungsschritte abgestimmt werden und die Zugabe von unprozessierten Antigenen idealerweise zeitgleich mit dem Reifungsstimulus erfolgen [161].

Einen weiteren Ansatz, additive Effekte im Rahmen der zellulären Immuntherapie auszuüben, stellt die Modifikation von suppressiven Zellen der Tumormikroumgebung dar. Durch eine Inhibition des Zelloberflächenproteins Galectin-1 gelingt die Unterdrückung von myeloiden Suppressorzellen und der Tumorneoangiogenese. Mit metronomisch verabreichtem, niedrigdosiertem Cyclophosphamid oder dem Anti-CD25-Antikörper *Daclizumab* wird eine T_{reg}-Depletion im umgebenden Hirnparenchym versucht, da gezeigt werden konnte, dass eine positive Korrelation zwischen deren Frequenz und dem WHO-Grad des Tumors besteht [70]. Auch der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren als zusätzliche Adjuvantien erscheint angesichts der hohen PD-1/PD-L1-Aktivität von Glioblastomen vielversprechend, ihr Einfluss muss jedoch im Kontext der Tumorstoffe erst dezidiert untersucht werden. Daneben werden auch andere Strategien wie etwa der Einsatz von STAT-3- oder IDO-Inhibitoren verfolgt [84].

Mit der DC-basierten Immuntherapie steht der modernen Medizin ein äußerst vielversprechendes Verfahren der Tumorbekämpfung zur Verfügung. Aufgrund seiner

dargelegten Eigenschaften und Wirkmechanismen stellt es eine geradezu ideale Ergänzung zu etablierten Behandlungsmethoden wie etwa Radio- und Chemotherapie dar. Die in den letzten Jahren von den Pionieren der Tumorstoffwechsel durchgeführten Studien zeigten bereits die großen gegebenen Möglichkeiten auf, während die beobachteten klinischen Effekte jeweils nur bei einem Teil der Patienten zufriedenstellten. Die Verbesserung der Effektivität muss also als oberste Prämisse in der Weiterentwicklung dieses Ansatzes gelten. Die vorliegende Arbeit stellt eine aussichtsreiche Methode zur Optimierung des Ausreifungserfolgs dendritischer Zellen vor, der anhand von morphologischen, phänotypischen und funktionellen Charakteristika bemessen wurde. Die unter Laborbedingungen gezeigten Ergebnisse dieser und vergleichbarer Arbeiten müssen sich jedoch letztlich in der Anwendung am lebenden Menschen beweisen, bevor sie Eingang in die klinische Routine finden können, sodass weiterhin gilt: *in vivo veritas* [147].

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Dendritische Zellen (DCs) stellen als Vertreter antigenpräsentierender Zellen ein vielversprechendes Werkzeug im Rahmen der Immuntherapie von Tumoren, darunter dem *Glioblastom* (GBM) dar. Ihre Nutzung in der Tumorzellvaccine soll in robusten und langanhaltenden tumoriziden Effekten resultieren. Aktuelle Herstellungsprotokolle von DCs beruhen auf der Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine, zumeist TNF α und IL-1 β (cDCs), wodurch aber nur insuffiziente Reifungssignale vermittelt werden. Die vorliegende Arbeit untersucht einen alternativen Ausreifungscocktail bestehend aus den *Toll-like-Rezeptor-Agonisten* R848 und Poly(I:C) in Kombination mit PGE₂ (tlrDCs) hinsichtlich seiner phänotypischen und funktionellen Effekte.

Methoden: Hierzu wurden Monozyten von PBMCs magnetisch separiert und zu DCs differenziert, die anschließend mit Reifungscocktails inkubiert wurden. Mittels Durchflusszytometrie wurde der resultierende Phänotyp zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert. Ein Transwell-Versuch quantifizierte die Fähigkeit zur chemotaktischen Migration. Die Zellkulturüberstände gaben Aufschluss über die Zytokinsekretion, die mit einem Multiplex-Assay simultan für 25 Analyte und drei Zeitpunkte bemessen wurde. In Kokultur mit naiven CD8^{pos} T-Zellen wurde das Priming spezifisch u. a. für die GBM-Peptide *NLGN4X* und *PTP* durch Dextramerfärbung überprüft. Dabei wurde neben dem T-Zell-Phänotyp die basale Zytokinsekretion in Überständen und zudem nach Peptid-Restimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert. Weiterhin wurden die Auswirkungen einer Modifikation der DC-Glykokalix mittels Galactoseoxidase (GOX) im Kontext des T-Zell-Primings untersucht.

Ergebnisse: Im Vergleich mit cDCs konnte für tlrDCs eine deutlich vorteilhaftere Reifung in Bezug auf phänotypische Merkmale (HLA-DR, CD83, Kostimulation) gezeigt werden, die zudem auch über die Zeit stabiler exprimiert wurden. Bezüglich der Zytokinsekretion konnte für die meisten Analyte ein Maximum 16 h nach Beginn der Ausreifung nachgewiesen werden. tlrDCs zeigten dabei

eine überlegene Sekretion insbesondere von IL-6, -8, -10 und -12 sowie von TH₁-Chemokinen. tlrDCs bewiesen eine etwa zehnfach höhere Migrationsfrequenz als cDCs, zudem konnte eine hohe phänotypische Reife der migrierten Zellen gezeigt werden. Im Priming-Assay führte die Koinkubation mit tlrDCs zu größerer Proliferation als bei cDCs bei etwa gleich hoher Spezifität der T-Zellen. Auch für die verwendeten GBM-Peptide wurde erfolgreiches Priming in allen Konditionen beobachtet. Die geprimten T-Zellen befanden sich meist in Transition von naivem zu einem Gedächtnisphänotyp, deren Anteil bei tlrDCs tendenziell größer war. Die VLA-4-Expression lag zudem in dieser Kondition etwa zehnfach höher. Die Untersuchung der Zytokine im Überstand nach Ende der Expansionsphase war nicht wegweisend, wohingegen nach Peptid-Restimulation nur bei tlrDC eine relevante Menge IFN γ gebildet wurde. Die funktionelle T-Zellrezeptoravidität wurde durch den Cocktail nicht messbar beeinflusst. Die GOX-Anwendung bewirkte einen starken, unspezifischen Proliferationsschub, was jedoch mit deutlich niedrigerer Spezifität der T-Zellen einherging.

Schlussfolgerung: Grundsätzlich existieren zahlreiche zellphysiologische Gründe für den Einsatz einer doppelten TLR-Stimulation zur DC-Ausreifung, wobei PGE₂ als Motilitätsförderer eingesetzt werden kann. Es besitzt zwar teils negative Auswirkungen insbesondere auf die Zytokinsekretion, die Verbesserung der Migration stellt aber die vielversprechendste Stellgröße zur Optimierung der Tumorstimmulation dar. Insgesamt wurde für tlrDCs eine überlegene Immunstimulation für naive CTLs und TH₁/TC₁-Antworten nachgewiesen. Eine Verkürzung der Ausreifungsdauer auf 16 h erscheint für eine optimale Zytokinsekretion günstig. Aus dem Primingmodell lässt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit für die T_{CM}-Generierung und die Migration von spezifischen T-Zellen ins ZNS durch tlrDCs ableiten. Der Einsatz von GOX-DCs in Tumorstimmulanten besitzt aktuell schwer vorherzusehende Effekte, sodass weitere Untersuchungen zur T-Zell-Interaktion notwendig erscheinen. Bei der Interpretation klinisch beobachteter Effekte sind die Rollen von TH₁₇- und NK-Zellen unterrepräsentiert, wobei auch diese mit DCs interagieren und eigenständige Antitumorantworten ausbilden.

6. Literaturverzeichnis

1. Sun, J.C., S. Ugolini, and E. Vivier, Immunological memory within the innate immune system. *EMBO J*, 2014. **33**(12): p. 1295-303.
2. Brown, J., et al., TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*, 2011. **90**(4): p. 417-27.
3. Tan, R.S., et al., TLR cross-talk confers specificity to innate immunity. *Int Rev Immunol*, 2014. **33**(6): p. 443-53.
4. Banchereau, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
5. Gay, N.J. and E.J. Keith, *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
6. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
7. Wasserman, S.A., A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(8): p. 767-71.
8. Muzio, M., et al., Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
9. Kawai, T. and S. Akira, SnapShot: Pattern-recognition receptors. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 1024.
10. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-8.
11. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
12. Bevan, M.J., Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, 1976. **143**(5): p. 1283-8.

13. Inaba, K. and R.M. Steinman, Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science*, 1985. **229**(4712): p. 475-9.
14. Gallatin, W.M., I.L. Weissman, and E.C. Butcher, A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 1983. **304**(5921): p. 30-4.
15. Sallusto, F., et al., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
16. Mahnke, Y.D., et al., The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
17. Robinson, A.T., N. Miller, and D.R. Alexander, CD3 antigen-mediated calcium signals and protein kinase C activation are higher in CD45RO+ than in CD45RA+ human T lymphocyte subsets. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(1): p. 61-8.
18. von Essen, M.R., M. Kongsbak, and C. Geisler, Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 1-8.
19. Banchereau, J. and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
20. Kaech, S.M. and R. Ahmed, Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol*, 2001. **2**(5): p. 415-22.
21. Lanzavecchia, A., Immunology. Licence to kill. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 413-4.
22. Young, J.W. and R.M. Steinman, Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med*, 1990. **171**(4): p. 1315-32.
23. Curtsinger, J.M., et al., Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
24. Mosmann, T.R., et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.

25. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
26. Schmitt, N. and H. Ueno, Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol*, 2015. **34**: p. 130-6.
27. Kemp, R.A. and F. Ronchese, Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6497-502.
28. Hamada, H., et al., Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*, 2009. **182**(6): p. 3469-81.
29. Mora, J.R., et al., Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 2003. **424**(6944): p. 88-93.
30. Villablanca, E.J., V. Russo, and J.R. Mora, Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(7): p. 897-910.
31. Kalinski, P, Dendritic cells in immunotherapy of established cancer: Roles of signals 1, 2, 3 and 4. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009. **10**(6): p. 526-35.
32. Iwata, M., et al., Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 527-38.
33. Guo, Y., et al., Leukocyte homing, fate, and function are controlled by retinoic acid. *Physiol Rev*, 2015. **95**(1): p. 125-48.
34. Szilagy, B.A., et al., Gut memories do not fade: epigenetic regulation of lasting gut homing receptor expression in CD4(+) memory T cells. *Mucosal Immunol*, 2017. **10**(6): p. 1443-1454.
35. Baron, J.L., et al., Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med*, 1993. **177**(1): p. 57-68.
36. Sasaki, K., et al., Preferential expression of very late antigen-4 on type 1 CTL cells plays a critical role in trafficking into central nervous system tumors. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6451-8.
37. Yednock, T.A., et al., Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 63-6.

38. Steinman, L., Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(6): p. 510-8.
39. Mittelbrunn, M., et al., VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(30): p. 11058-63.
40. Calzascia, T., et al., Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity*, 2005. **22**(2): p. 175-84.
41. Caruso, C., et al., Biological significance of soluble IL-2 receptor. *Mediators Inflamm*, 1993. **2**(1): p. 3-21.
42. Luttmann, W., *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarbeitete und korrigierte Auflage ed. Der Experimentator. 2014, Berlin [u.a.]: Springer Spektrum. XVIII, 299 S.
43. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2., neu bearb. und aktualisierte Aufl. ed. 2015, Berlin [u.a.]: Springer Spektrum. XIII, 271 S. 150 Abb., 130 Abb. in Farbe.
44. Bernard, A. and L. Boumsell, The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol*, 1984. **11**(1): p. 1-10.
45. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
46. Langerhans, P., *Über die Nerven der menschlichen Haut*. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 1868. **44**(2): p. 325-337.
47. 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.
48. Sallusto, F. and C.R. Mackay, Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(6): p. 724-31.

49. Scandella, E., et al., CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1595-601.
50. Legler, D.F., et al., Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 966-73.
51. Austyn, J.M. and C.P. Larsen, Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation*, 1990. **49**(1): p. 1-7.
52. Lewis, K.L. and B. Reizis, Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(8): p. 1-14.
53. D'Errico, G., H.L. Machado, and B. Sainz, Jr., A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med*, 2017. **6**(1): p. 3.
54. Schulz, P and H. Pruss, "Hirnsymptome bei Carcinomatose" - Hermann Oppenheim and an Early Description of a Paraneoplastic Neurological Syndrome. *J Hist Neurosci*, 2015. **24**(4): p. 371-7.
55. Dong, H., et al., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 793-800.
56. 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.
57. Coley, W.B., The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res*, 1893(262): p. 3-11.
58. Pardoll, D.M., Tumour antigens. A new look for the 1990s. *Nature*, 1994. **369**(6479): p. 357.
59. Dutoit, V., et al., Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain*, 2012. **135**(Pt 4): p. 1042-54.

60. Aichele, P., et al., T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 261-6.
61. Dranoff, G., et al., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(8): p. 3539-43.
62. Pan, Z.K., et al., A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nat Med*, 1995. **1**(5): p. 471-7.
63. Steinman, R.M., The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 271-96.
64. Inaba, K., et al., Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med*, 1990. **172**(2): p. 631-40.
65. Mayordomo, J.I., et al., Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*, 1995. **1**(12): p. 1297-302.
66. 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.
67. Nestle, F.O., et al., Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 328-32.
68. So-Rosillo, R. and E.J. Small, Sipuleucel-T (APC8015) for prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006. **6**(9): p. 1163-7.
69. Dolecek, T.A., et al., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*, 2012. **14 Suppl 5**: p. v1-49.
70. Van Gool, S.W., Brain Tumor Immunotherapy: What have We Learned so Far? *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 98.

71. Stupp, R., et al., Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-66.
72. Ganea, D., et al., Modulation of dendritic cell function by PGE2 and DHA: a framework for understanding the role of dendritic cells in neuroinflammation. *Clin Lipidol*, 2011. **6**: p. 277-291.
73. Grauer, O., et al., Toll-like receptor triggered dendritic cell maturation and IL-12 secretion are necessary to overcome T-cell inhibition by glioma-associated TGF-beta2. *J Neurooncol*, 2007. **82**(2): p. 151-61.
74. Benencia, F., et al., Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 1-15.
75. van den Boorn, J.G. and G. Hartmann, Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 27-37.
76. Binder, D.C., A.A. Davis, and D.A. Wainwright, Immunotherapy for cancer in the central nervous system: Current and future directions. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(2): p. 1-15.
77. Liao, L.M., et al., Treatment of intracranial gliomas with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor antigens. *J Neurosurg*, 1999. **90**(6): p. 1115-24.
78. Wheeler, C.J., et al., Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5955-64.
79. Eyrich, M., et al., Dendritic cell vaccination in pediatric gliomas: lessons learnt and future perspectives. *Front Pediatr*, 2013. **1**: p. 12.
80. Ardon, H., et al., Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study. *J Neurooncol*, 2010. **99**(2): p. 261-72.

81. Ardon, H., et al., Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(11): p. 2033-44.
82. Cho, D.Y., et al., Adjuvant immunotherapy with whole-cell lysate dendritic cells vaccine for glioblastoma multiforme: a phase II clinical trial. *World Neurosurg*, 2012. **77**(5-6): p. 736-44.
83. Polyzoidis, S. and K. Ashkan, DCVax(R)-L--developed by Northwest Biotherapeutics. *Hum Vaccin Immunother*, 2014. **10**(11): p. 3139-45.
84. Weller, M., et al., Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat Rev Neurol*, 2017. **13**(6): p. 363-374.
85. Steinman, R.M. and M. Dhodapkar, Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer*, 2001. **94**(4): p. 459-73.
86. Xiao, Y.Q., et al., Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 14884-93.
87. Thurner, B., et al., Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*, 1999. **190**(11): p. 1669-78.
88. 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.
89. Kalinski, P., et al., IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol*, 1997. **159**(1): p. 28-35.
90. Curti, A., et al., Generation of dendritic cells from positively selected CD14+ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(7): p. 1419-28.

91. Poloso, N.J., et al., PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4). *Mol Immunol*, 2013. **54**(3-4): p. 284-95.
92. Tsuji, S., et al., Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6883-90.
93. Jongmans, W., et al., Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J Immunother*, 2005. **28**(5): p. 480-7.
94. Sakakibara, M., et al., Quick generation of fully mature dendritic cells from monocytes with OK432, low-dose prostanoid, and interferon-alpha as potent immune enhancers. *J Immunother*, 2006. **29**(1): p. 67-77.
95. Ten Brinke, A., et al., The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFNgamma generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization. *Vaccine*, 2007. **25**(41): p. 7145-52.
96. Vanderlocht, J., et al., Increased tumor-specific CD8+ T cell induction by dendritic cells matured with a clinical grade TLR-agonist in combination with IFN-gamma. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010. **23**(1): p. 35-50.
97. Verdijk, R.M., et al., Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 57-61.
98. Jurk, M., et al., Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, 2002. **3**(6): p. 499.
99. 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.

100. Spisek, R., et al., Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother*, 2001. **50**(8): p. 417-27.
101. Mailliard, R.B., et al., alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 5934-7.
102. Akiyama, Y., et al., alpha-type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 623.
103. Hansen, M., et al., Comparison of clinical grade type 1 polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine*, 2013. **31**(4): p. 639-46.
104. Kim, S., et al., Generation of functionally mature dendritic cells from elutriated monocytes using polyinosinic : polycytidylic acid and soluble CD40 ligand for clinical application. *Clin Exp Immunol*, 2008. **154**(3): p. 365-74.
105. 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.
106. Spranger, S., et al., Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 738-47.
107. Maverakis, E., et al., Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun*, 2015. **57**: p. 1-13.
108. Novogrodsky, A. and E. Katchalski, Induction of lymphocyte transformation by sequential treatment with neuraminidase and galactose oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(6): p. 1824-7.
109. Rhodes, J., Evidence for an intercellular covalent reaction essential in antigen-specific T cell activation. *J Immunol*, 1989. **143**(5): p. 1482-9.

110. Klinkert, W.E., et al., Rat dendritic cells function as accessory cells and control the production of a soluble factor required for mitogenic responses of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(9): p. 5414-8.
111. Biniaminov, M., et al., Galactose oxidase-induced blastogenesis of human lymphocytes and the effect of macrophages on the reaction. *Clin Exp Immunol*, 1975. **19**(1): p. 93-8.
112. HEUER, M., M. Lutz, and A. BEILHACK, Galactose oxidase treatment of dendritic cells to improve their immunogenicity. 2015, Google Patents.
113. Zheng, B., et al., Galactose oxidation in the design of immunogenic vaccines. *Science*, 1992. **256**(5063): p. 1560-3.
114. 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.
115. Rubinstein, P., et al., Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(22): p. 10119-22.
116. Kiertscher, S.M. and M.D. Roth, Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(2): p. 208-18.
117. Wolfl, M. and P.D. Greenberg, Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells. *Nat Protoc*, 2014. **9**(4): p. 950-66.
118. Zippelius, A., et al., Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J Exp Med*, 2002. **195**(4): p. 485-94.
119. Buggert, M., et al., Functional avidity and IL-2/perforin production is linked to the emergence of mutations within HLA-B*5701-restricted epitopes and HIV-1 disease progression. *J Immunol*, 2014. **192**(10): p. 4685-96.
120. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*, 2005. **6**(2): p. 163-70.

121. Reis e Sousa, C., Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 27-34.
122. Schulz, O., et al., Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, 2005. **433**(7028): p. 887-92.
123. Rouas, R., et al., Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *Int Immunol*, 2004. **16**(5): p. 767-73.
124. Xu, S., et al., High-avidity antitumor T-cell generation by toll receptor 8-primed, myeloid-derived dendritic cells is mediated by IL-12 production. *Surgery*, 2006. **140**(2): p. 170-8.
125. Makela, S.M., et al., Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(4): p. 664-72.
126. Napolitani, G., et al., Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*, 2005. **6**(8): p. 769-76.
127. Alder, J., et al., Interferon-gamma dose-dependently inhibits prostaglandin E2-mediated dendritic-cell-migration towards secondary lymphoid organ chemokines. *Vaccine*, 2006. **24**(49-50): p. 7087-94.
128. De Keijzer, S., et al., The multiple faces of prostaglandin E2 G-protein coupled receptor signaling during the dendritic cell life cycle. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(4): p. 6542-55.
129. Prechtel, A.T. and A. Steinkasserer, CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, 2007. **299**(2): p. 59-69.
130. Langenkamp, A., et al., Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 2000. **1**(4): p. 311-6.

131. Buschow, S.I., et al., Dominant processes during human dendritic cell maturation revealed by integration of proteome and transcriptome at the pathway level. *J Proteome Res*, 2010. **9**(4): p. 1727-37.
132. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. *Immunology*, 2013. **140**(1): p. 22-30.
133. Um, H.D., et al., TNF-alpha suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal. *Exp Dermatol*, 2004. **13**(5): p. 282-8.
134. Cougoule, C., et al., Podosomes, But Not the Maturation Status, Determine the Protease-Dependent 3D Migration in Human Dendritic Cells. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 846.
135. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*, 1999. **189**(4): p. 611-4.
136. Syrbe, U., J. Siveke, and A. Hamann, Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol*, 1999. **21**(3): p. 263-85.
137. Pasare, C. and R. Medzhitov, Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.
138. Lee, H.K. and A. Iwasaki, Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin Immunol*, 2007. **19**(1): p. 48-55.
139. Aste-Amezaga, M., et al., Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol*, 1998. **160**(12): p. 5936-44.
140. Kalinski, P., et al., Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3466-9.
141. Nizzoli, G., et al., IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8(+) memory T cells and, when produced by CD1c(+) DCs, shapes naive CD8(+) T-cell priming. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(7): p. 1622-32.

142. Carreno, B.M., et al., IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3383-94.
143. Dufour, J.H., et al., IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*, 2002. **168**(7): p. 3195-204.
144. D'Ambrosio, D., et al., Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion. *J Immunol*, 2002. **169**(5): p. 2303-12.
145. Hoshino, K., et al., Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *International Immunology*, 2002. **14**(10): p. 1225-31.
146. Tawab, A., et al., Effect of ex vivo culture duration on phenotype and cytokine production by mature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Transfusion*, 2009. **49**(3): p. 536-47.
147. Adema, G.J., et al., Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(2): p. 170-4.
148. Morse, M.A., et al., Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res*, 1999. **59**(1): p. 56-8.
149. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
150. Oehen, S. and K. Brduscha-Riem, Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol*, 1998. **161**(10): p. 5338-46.
151. Brenchley, J.M., et al., Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
152. von Essen, M.R., M. Kongsbak, and C. Geisler, Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 163453.
153. Livingstone, A.M., et al., Unravelling the mechanisms of help for CD8+ T cell responses. *Immunol Res*, 2009. **45**(2-3): p. 209-17.

154. Wilke, C.M., et al., Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*, 2011. **32**(5): p. 643-9.
155. Bowers, J.S., et al., Th17 cells are refractory to senescence and retain robust antitumor activity after long-term ex vivo expansion. *JCI Insight*, 2017. **2**(5): p. e90772.
156. Kalinski, P., et al., Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. **5**(10): p. 1303-15.
157. Walzer, T., et al., Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
158. Gustafsson, K., et al., Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5965-71.
159. Sarhan, D., et al., Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotoxin-alpha, IL-12, and TGF-beta. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(6): p. 1783-93.
160. Zitvogel, L., Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. F9-14.
161. Reis e Sousa, C., Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(6): p. 476-83.

7. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i>	Galactoseoxidasereaktion.	Seite 22
<i>Abb. 2:</i>	DC-Herstellung, Chemotaxisversuch, Priming.	Seite 41
<i>Abb. 3:</i>	DC-Mikroskopie.	Seite 44
<i>Abb. 4:</i>	DC-Phänotyp.	Seite 45
<i>Abb. 5:</i>	CD14 ^{pos} -DC-Subpopulation.	Seite 46
<i>Abb. 6:</i>	DC-Überleben 1.	Seite 47
<i>Abb. 7:</i>	DC-Überleben 2.	Seite 48
<i>Abb. 8:</i>	Heatmaps der DC-Zytokinsekretion.	Seite 51
<i>Abb. 9:</i>	Ausgewählte DC-Zytokine.	Seite 52
<i>Abb. 10:</i>	DC-Migration.	Seite 53
<i>Abb. 11:</i>	Mikroskopie der Priming-Wells.	Seite 59
<i>Abb. 12:</i>	T-Zell-Priming: Zellzahlen.	Seite 60
<i>Abb. 13:</i>	T-Zell-Priming: Dextramere und Zytokine.	Seite 61
<i>Abb. 14:</i>	T-Zell-Priming: CD8 ^{pos} -Subpopulationen.	Seite 62
<i>Abb. 15:</i>	T-Zell-Priming: VLA-4.	Seite 63
<i>Abb. 16:</i>	T-Zell-Priming: GOX.	Seite 65

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1:</i>	Gliederung des Immunsystems.	Seite 2
<i>Tab. 2:</i>	Toll-like-Rezeptoren.	Seite 2
<i>Tab. 3:</i>	Zytokine und Chemokine.	Seite 7
<i>Tab. 4:</i>	Humane CD-Moleküle.	Seite 8
<i>Tab. 5:</i>	Färbung nach CD14-Aufreinigung.	Seite 29
<i>Tab. 6:</i>	DC-Konditionen.	Seite 30
<i>Tab. 7:</i>	Färbung des DC-Phänotyps.	Seite 31
<i>Tab. 8:</i>	Färbung der migrierten DCs.	Seite 32
<i>Tab. 9:</i>	Färbung der naiven CD8 ^{pos} -T-Zellen.	Seite 34
<i>Tab. 10:</i>	Wells der Primingversuche.	Seite 35
<i>Tab. 11:</i>	Färbung des CD8 ^{pos} -Phänotyps.	Seite 38

8. Danksagung

Ich danke A. F., S. H. und M. R. herzlich für ihre freundschaftliche Bereitschaft zur Leukapherese.

9. Anhang

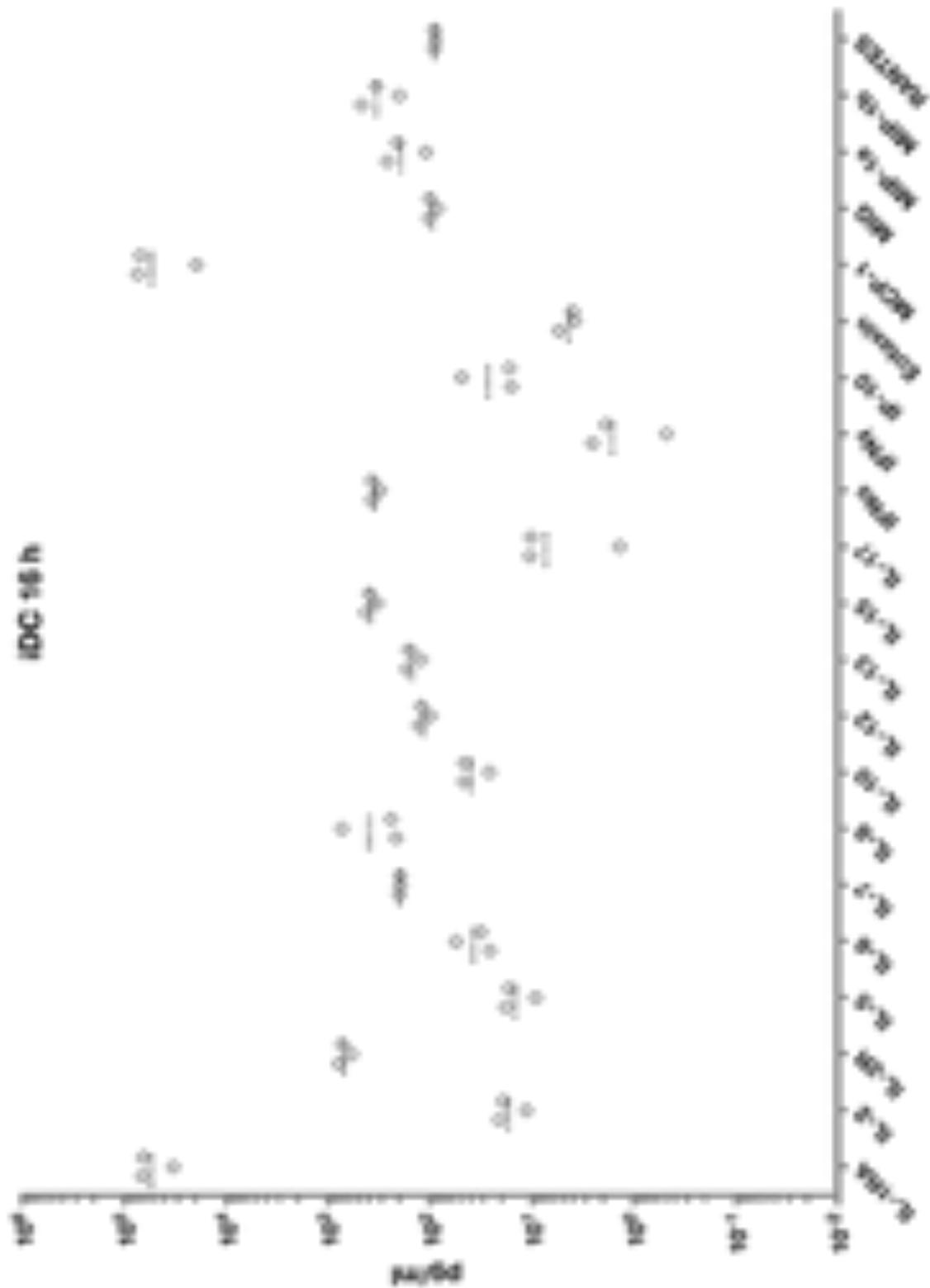


Abb. II
 Zytokinsekretion der iDCs. Messung im Zellkulturüberstand 16 h nach Beginn der Ausreifungsperiode (in dieser Gruppe ist keine Substanzzugabe erfolgt). Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

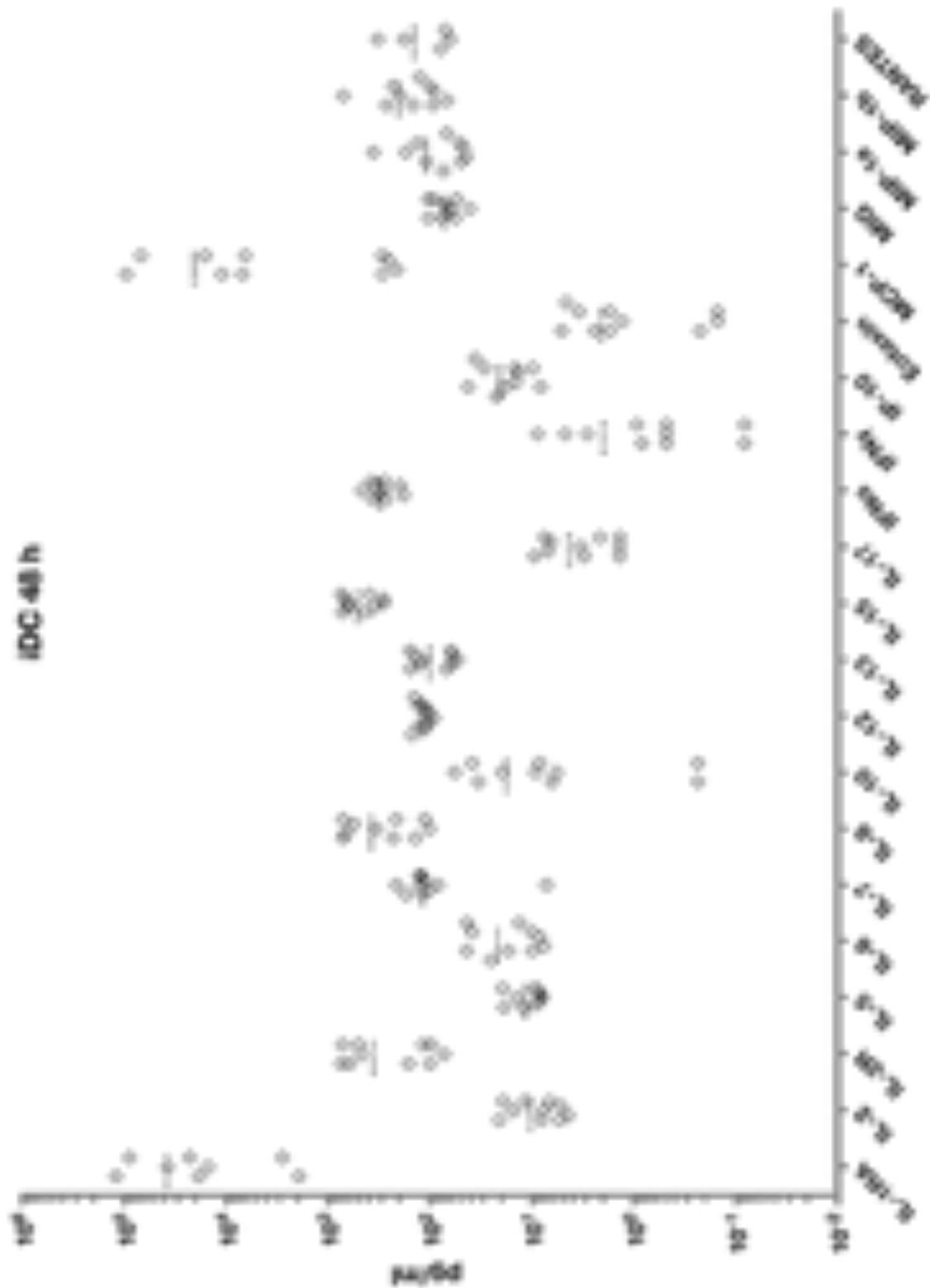


Abb. III
 Zytokinsekretion der iDCs. Messung im Zellkulturüberstand 48 h nach Beginn der Ausreifungsperiode (in dieser Gruppe ist keine Substanzzugabe erfolgt). Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

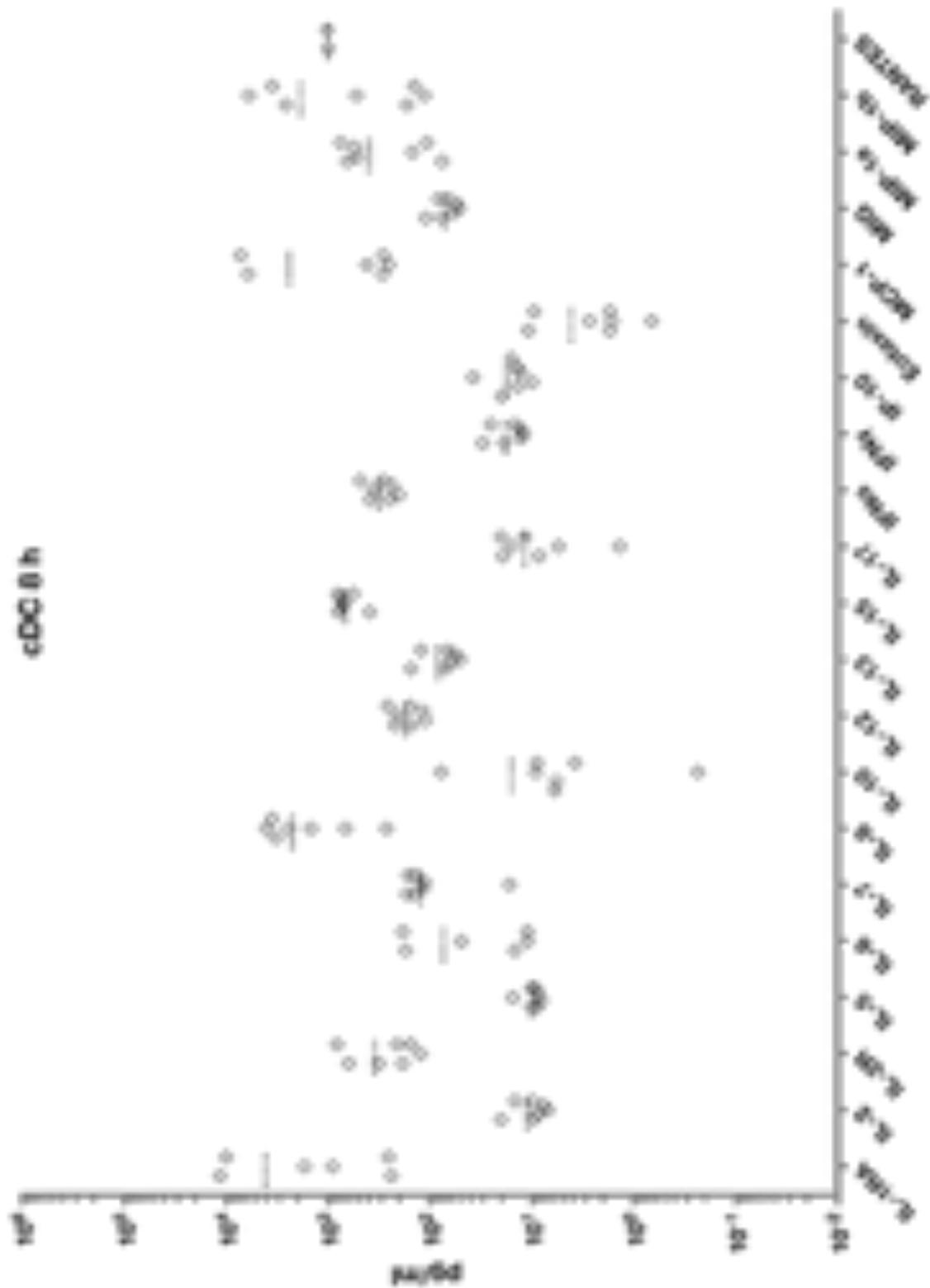


Abb. IV
 Zytokinsekretion der cDCs. Messung im Zellkulturüberstand 8 h nach Beginn der Ausreifungsperiode. Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

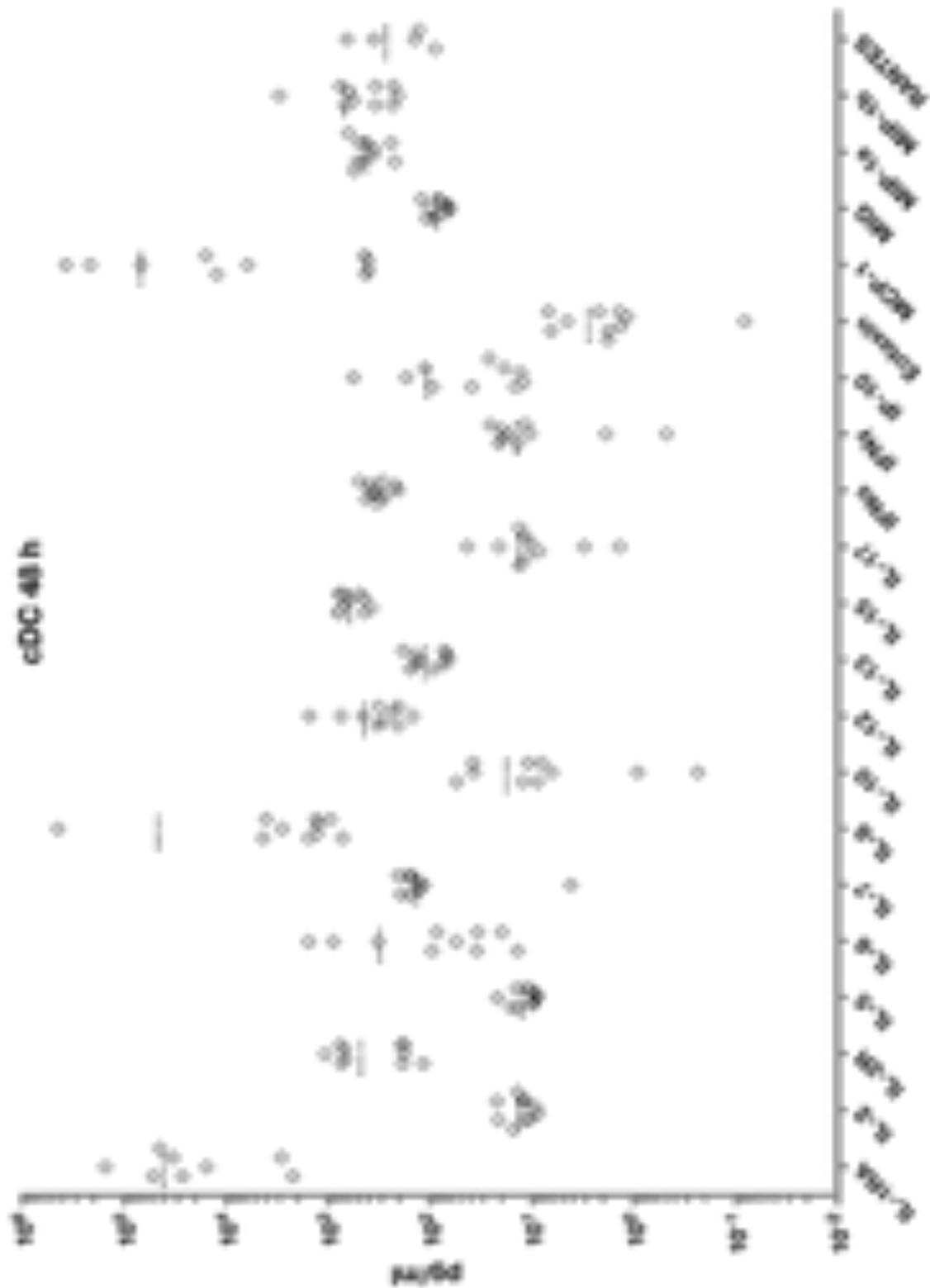


Abb. VI
 Zytokinsekretion der cDCs. Messung im Zellkulturüberstand 48 h nach Beginn der Ausreifungsperiode. Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

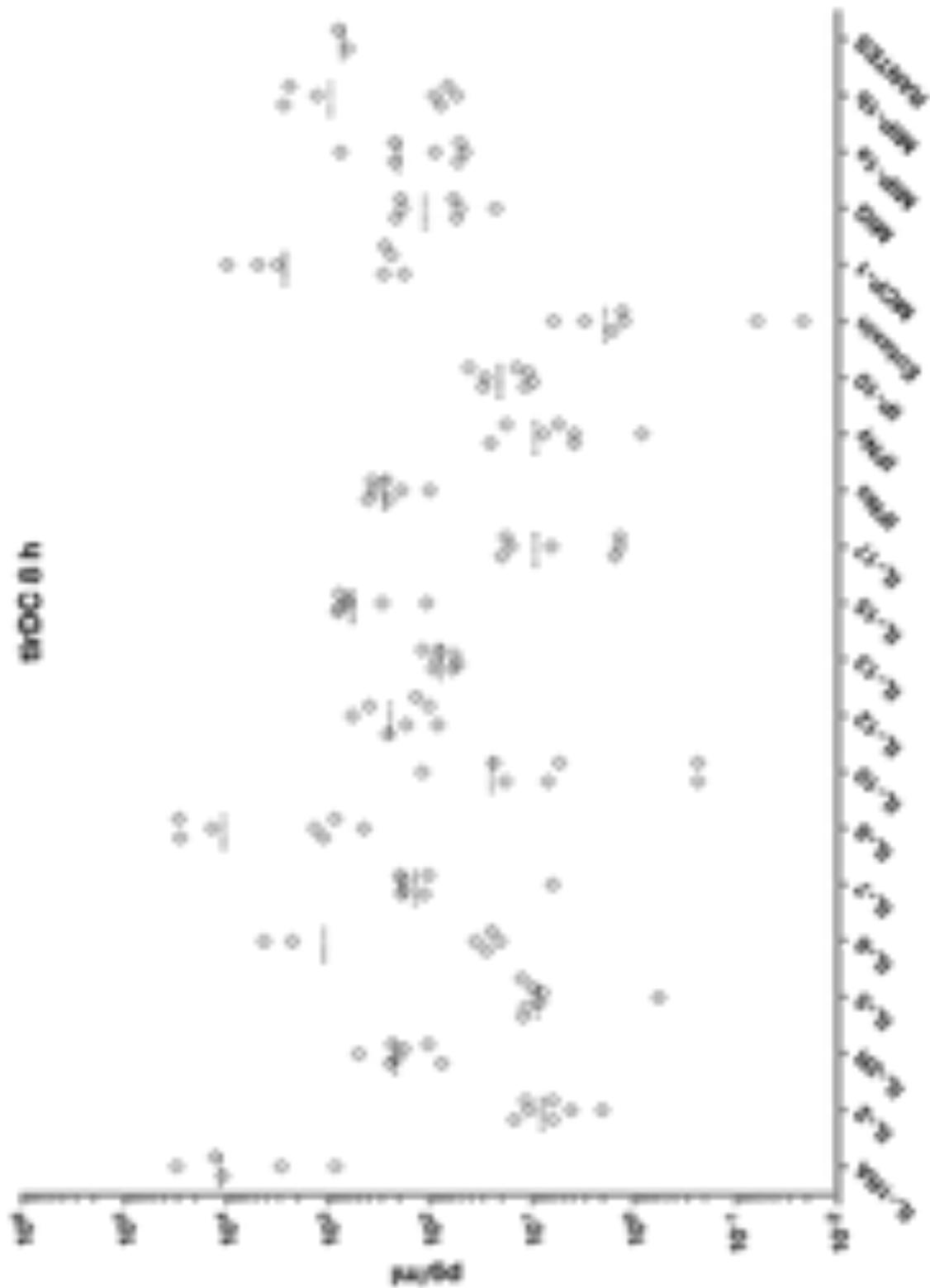


Abb. VII
 Zytokinsekretion der tlrDCs. Messung im Zellkulturüberstand 8 h nach Beginn der Ausreifungsperiode. Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

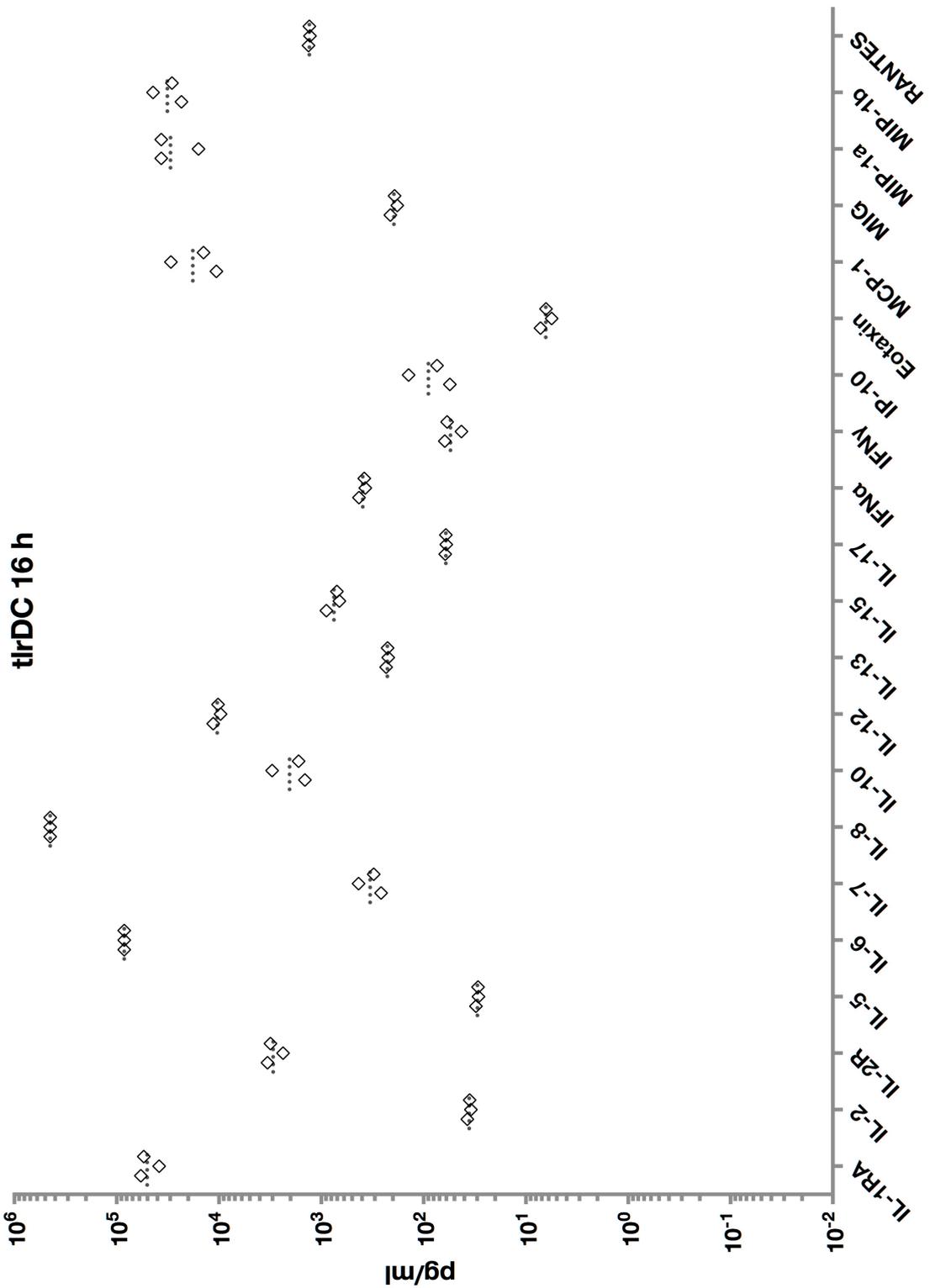


Abb. VIII

Zytokinsekretion der tlrDCs. Messung im Zellkulturüberstand 16 h nach Beginn der Ausreifungsperiode. Gezeigt sind alle biologischen Replikate.

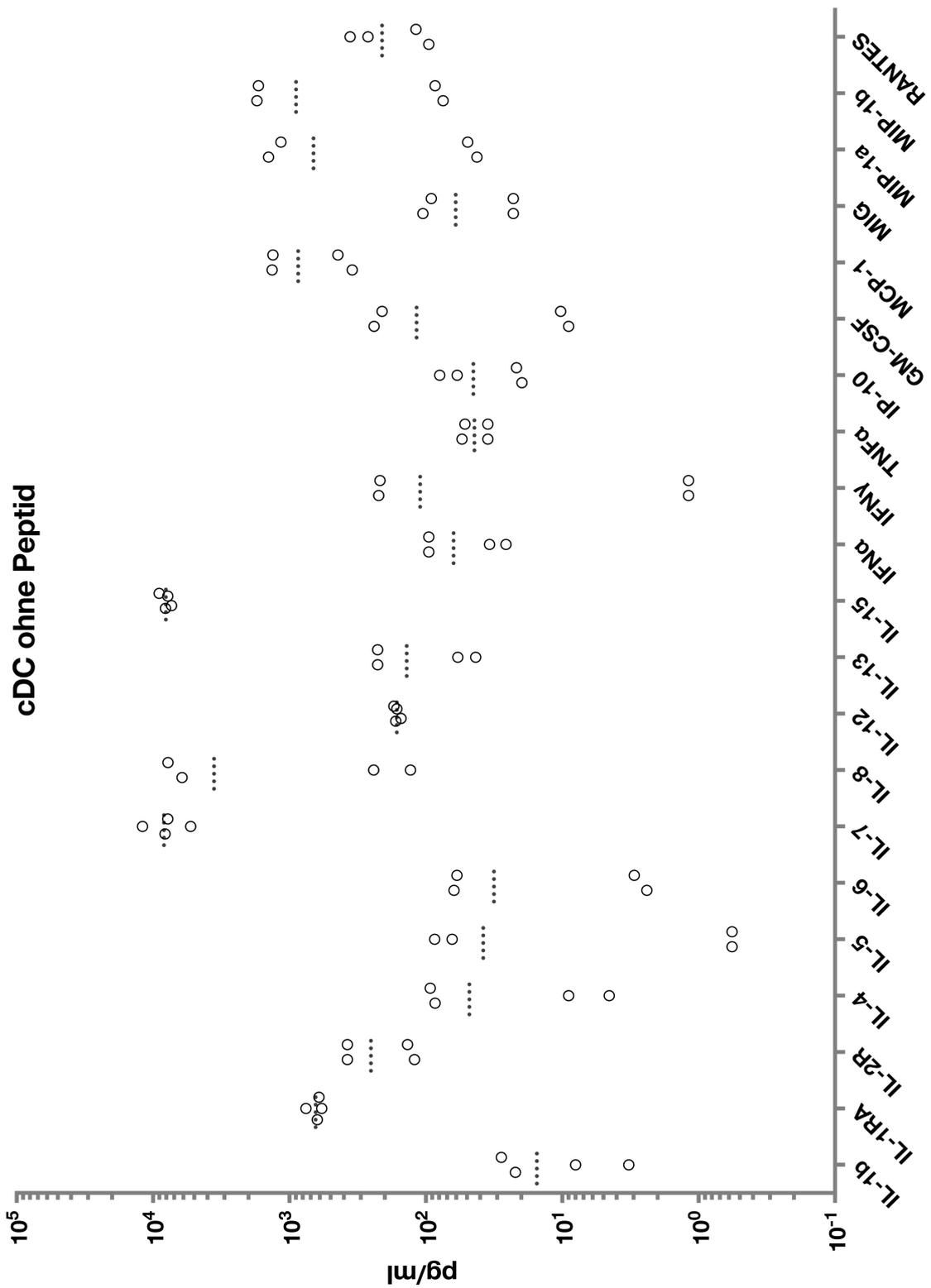


Abb. X

Basale Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand der T-Zellen. Verwendung von cDCs ohne Peptid (Negativkontrolle). Gezeigt sind alle technischen Replikate. In dieser Gruppe wurden für IL-7, MCP-1 und MIP-1α/β im Vergleich die höchsten Werte gemessen.

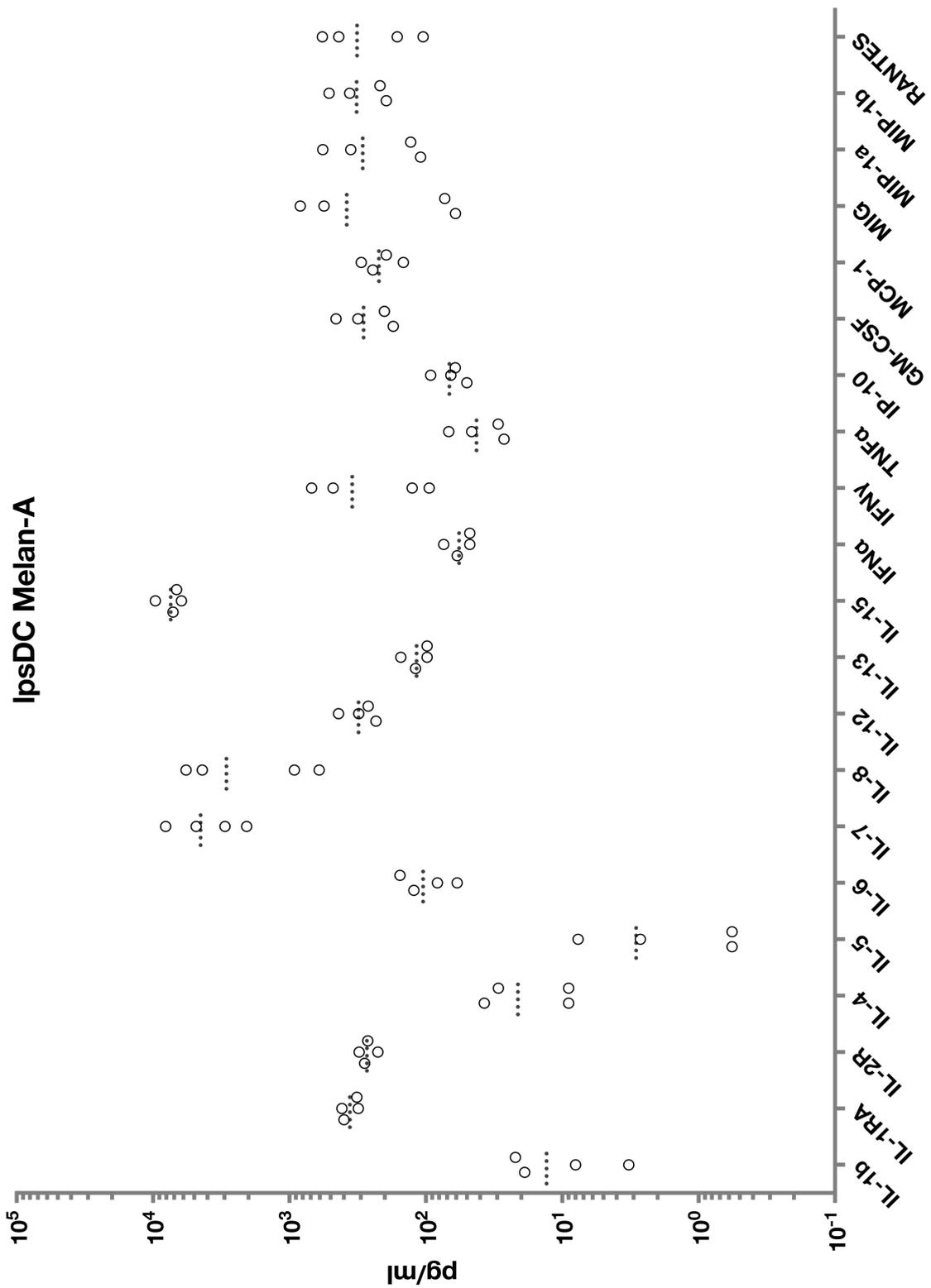


Abb. XI

Basale Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand der T-Zellen. Verwendung von IpsDCs mit Melan-A. Gezeigt sind alle technischen Replikate. In dieser Gruppe wurden für MIG, RANTES, GM-CSF und IFN γ im Vergleich die höchsten Werte gemessen.

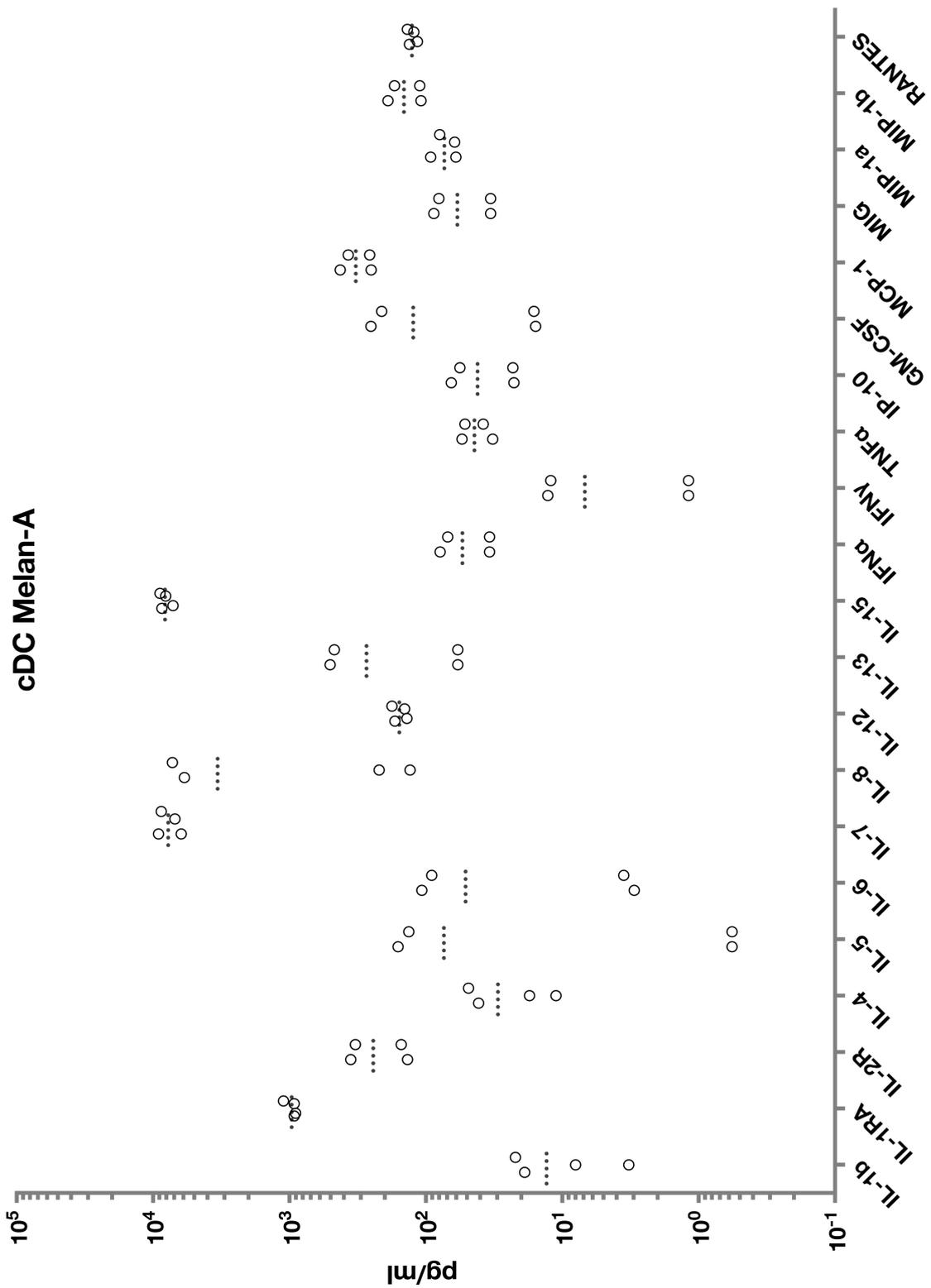


Abb. XII

Basale Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand der T-Zellen. Verwendung von cDCs mit Melan-A. Gezeigt sind alle technischen Replikate. In dieser Gruppe wurden für IL-1RA, IL-5, IL-7 und IL-13 im Vergleich die höchsten Werte gemessen.

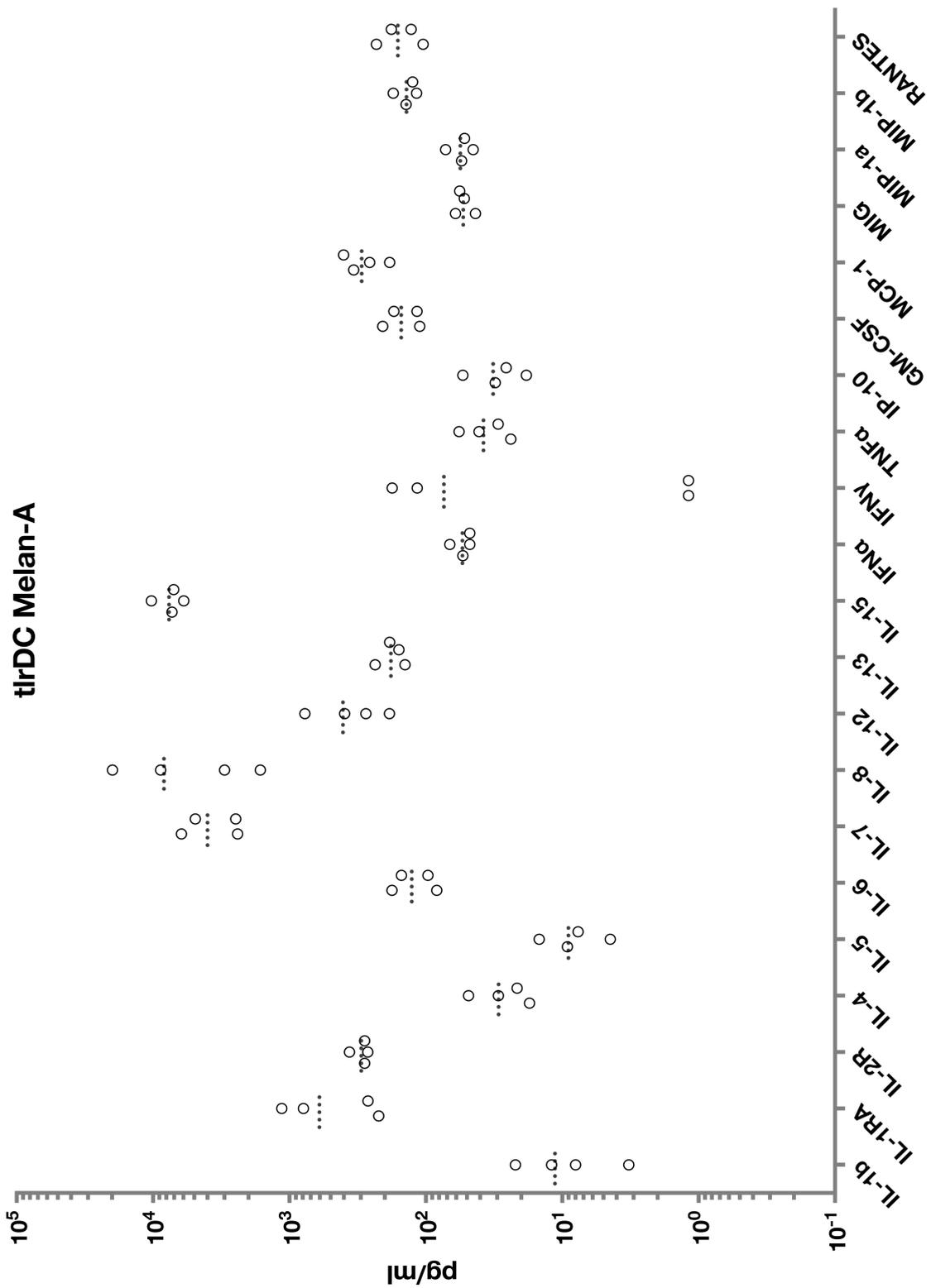


Abb. XIII

Basale Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand der T-Zellen. Verwendung von tlrDCs mit Melan-A. Gezeigt sind alle technischen Replikate. In dieser Gruppe wurden für IL-6, IL-8 und IL-12 im Vergleich die höchsten Werte gemessen.

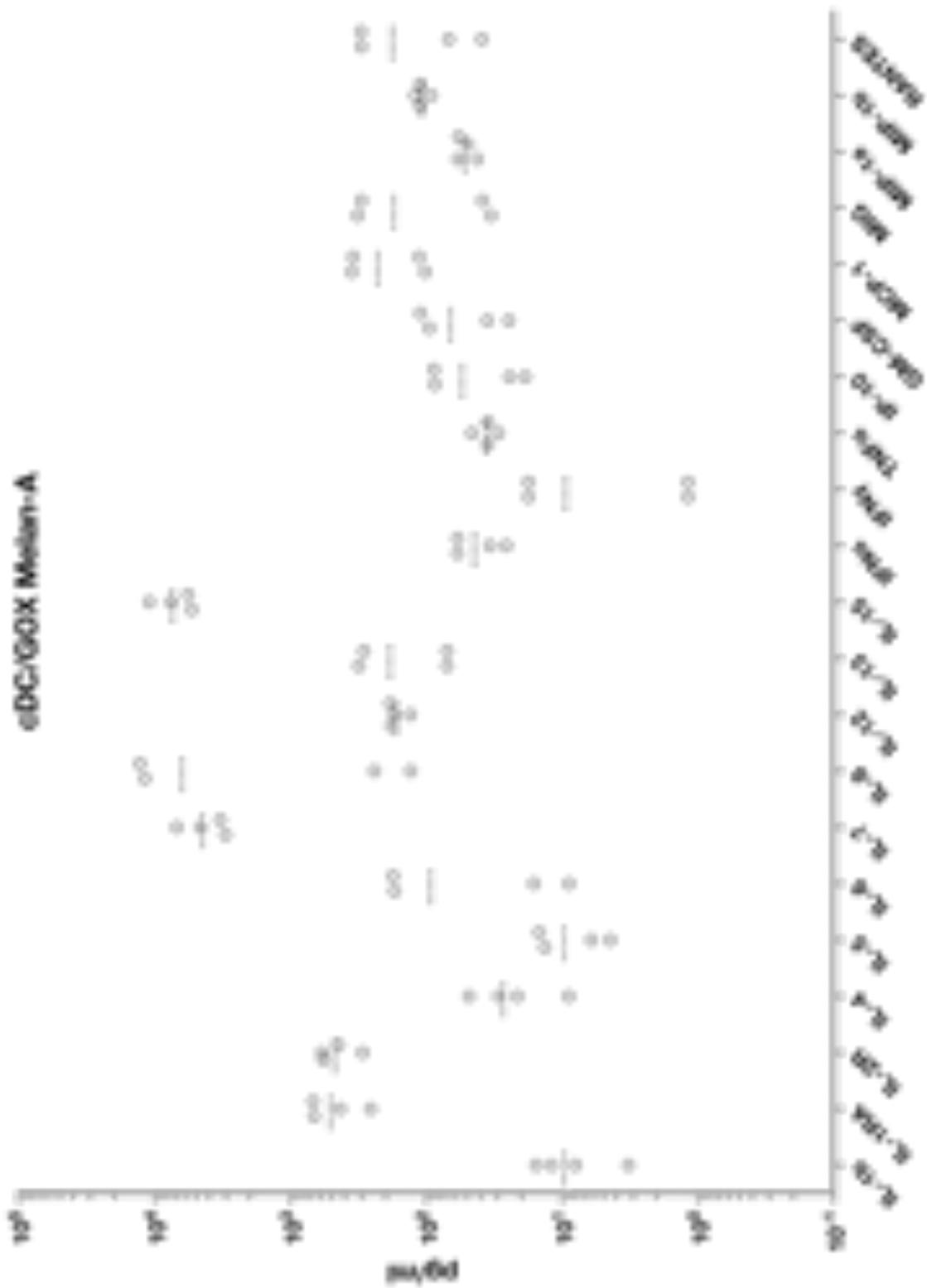


Abb. XIV

Basale Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand der T-Zellen. Verwendung von cDCs/GOX mit Melan-A. Gezeigt sind alle technischen Replikate. In dieser Gruppe wurden für IL-2R, IL-6, IL-8 sowie MIG im Vergleich mit cDCs ohne GOX höhere Werte gemessen.