



**Phänotypische Wirkung von PGE2 auf die TLR-vermittelte Ausreifung
in-vitro-generierter monozytenderivierter dendritischer Zellen**

**Phenotypical effects of PGE2 on the TLR-mediated maturation of
in-vitro-generated monocyte-derived dendritic cells**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Lorenz Morper

aus

Dachau

Würzburg 2023

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. med. Martina Prelog

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Götz Ulrich Grigoleit

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) spielen eine Schlüsselrolle im Immunsystem. Sie dienen als professionelle antigenpräsentierende Zellen und können eine antigenspezifische Immunantwort initiieren, indem sie naive T-Zellen primen.

DC können auch verwendet werden, um T-Zellen im Kontext der onkologischen Immuntherapie zu stimulieren. In vitro können sie leicht aus Monozyten differenziert werden. Die daraus resultierenden unreifen DC können bereits Antigene phagozytieren und präsentieren, sie aktivieren jedoch noch keine Immunantwort solange keines der aufgenommenen Antigene als pathogen erkannt wird. Die Ausreifung einer unreifen, tolerogenen DC zu einer immunogenen reifen DC kann, neben anderen Methoden, durch einen Cocktail aus TLR-Liganden oder Zytokinen erreicht werden. Die Auswahl der Substanzen in diesem Cocktail bestimmt den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften der resultierenden reifen DC. Einige der benötigten Fähigkeiten der DC in der Tumorummuntherapie, wo sie aus Patientenmonozyten generiert, mit Tumorantigen beladen und dem Patienten wieder zugeführt werden sollen, umfassen die Migration zu den T-Zell-Zonen der Lymphknoten, Antigenpräsentation auf sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Molekülen, Zytokinproduktion für die Direktion der T-Zell-Antwort wie IL-12p70, und die Expression von Oberflächenmarkern wie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass durch Zugabe von Prostaglandin E2 (PGE2) zu einem Cocktail mit dem synthetischen TLR3-Liganden poly-I:C und dem TLR7/8-Liganden R848 (Resiquimod) sowohl eine gute migratorische Fähigkeit als auch eine erhöhte IL-12p70-Produktion erreicht werden kann, während etwa die Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation reduziert erschien. Anhand von Monozyten anonymer gesunder Spender beleuchtet diese Arbeit daher den Effekt von PGE2 auf monozytenderivierte DC näher, indem seine konzentrationsabhängige Wirkung auf deren Phänotyp untersucht wird. In den durchgeführten Versuchen wurde dabei die Expressionsdichte der Oberflächenmarker CD83, CD80 und CD86, HLA-DR und CCR7 sowie der monozytäre Marker CD14 durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigen bei Exposition mit PGE2 dosisabhängig eine Heraufregulation von CD80, CD83, CD86 und CCR7 in der Population reifer DC, deren Maximum in unteren mikromolaren Konzentrationen erreicht wird. Gleichzeitig induzierte PGE2 dosisabhängig auch die Entstehung einer zweiten Zellpopulation mit anderen Eigenschaften, die stattdessen den monozytären Marker CD14 re-exprimierte. Dies ist für künftige Studien eine interessante Beobachtung, da sie eine differenzierte Betrachtung beider resultierender Subpopulationen anregt.

Abstract

Dendritic cells (DC) play a key role in the immune system. They serve as professional antigen presenting cells and can initiate an antigen-specific immune response by priming naive T cells.

DC can also be used to stimulate T cells in the context of tumor immunotherapy. In vitro, they can easily be differentiated from monocytes. The resulting immature DC are capable of antigen phagocytosis and presentation, but do not yet activate an immune response as long as none of the uptaken antigens is recognized as pathogenic. The process of converting an immature, tolerogenic DC to an immunogenic mature DC can, among other methods, be achieved by using a cocktail of toll-like receptor (TLR) ligands and cytokines. The choice of the substances included into this cocktail later determines the phenotype and capabilities of the resulting mature dendritic cells. Some of the required DCs' capabilities in the field of cancer immunotherapy, where they are to be generated from patient monocytes, loaded with tumor antigen and re-transferred into the patient, include migration to the T cell areas of lymph nodes, antigen presentation on both MHC-I and MHC-II molecules, cytokine production for shaping the T cell response such as IL-12p70, and the expression of surface markers such as the costimulatory molecules CD80 and CD86.

Adding Prostaglandin E2 (PGE2) to a cocktail of the TLR3 ligand poly(I:C) and the TLR7/8 ligand R848 (Resiquimod) has been shown to result in a good migratory capacity as well as an elevated IL-12p70 production. In earlier research, the capability of antigen cross-presentation however appeared to be reduced when PGE2 was added. Hence, using anonymous healthy donor monocytes, this work was designed to further investigate the effects of PGE2 on DC dose-dependently by studying their phenotype. Particularly, the density of the cell surface markers CD83, CD80 and CD86, HLA-DR and CCR7 as well as the monocyte marker CD14 have been studied in flow cytometry. The results suggest a dose-dependent up-regulation by PGE2 of CD80, CD83, CD86 and CCR7 in the population of mature DC reaching its maximum at low μM concentrations. Simultaneously, PGE2 also dose-dependently induced the generation of a second cell population, which instead re-expressed the monocyte marker CD14. This is an interesting finding as well as it encourages a differential look at both resulting subpopulations in future analyses.

Inhalt

A • Einführung

A.1 • Das menschliche Immunsystem	1
A.1.1 • Angeborene und adaptive Immunität.....	1
A.1.2 • Dendritische Zellen.....	4
A.1.3 • Priming naiver T-Lymphozyten.....	6
A.2 • Tumorimmunologie	9
A.2.1 • Die physiologische Tumorimmunität.....	9
A.2.2 • Immun-Evasion von Tumorzellen.....	11
A.2.3 • Immuntherapie.....	12
A.3 • Therapeutische Tumorstoffe mit dendritischen Zellen	15
A.3.1 • Dendritische Zellen als Basis für Tumorstoffe.....	15
A.3.2 • Ausreifung monozytenderivierter dendritischer Zellen.....	16
A.3.3 • Formulierung der Fragestellung.....	18

B • Material und Methoden

B.1 • Materialien	20
B.2 • Zellkultur	22
B.2.1 • Isolation von Monozyten.....	22
B.2.2 • Differenzierung und Ausreifung dendritischer Zellen.....	23
B.3 • Durchflusszytometrie	25
B.3.1 • Färbung.....	25
B.3.2 • Datenauswertung.....	28

C • Ergebnisse

C.1 • Lichtmikroskopische Morphologie	31
C.2 • Phänotypische Analyse mittels FACS	33
C.2.1 • Beschreibung zweier Subpopulationen.....	33
C.2.2 • Reifungsmarker-Analyse in den Hauptversuchsbedingungen.....	35
C.2.3 • Zusätzliche Kontrollbedingungen.....	40

D • Diskussion

D.1 • Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse	43
D.2 • Die Rolle der CD14+ Subpopulation	44
D.3 • Fazit	50

E • Anhang

E.1 • Absolute Messwerte	52
E.2 • Literaturverzeichnis	55
E.3 • Curriculum Vitae	60
E.4 • Eidesstattliche Erklärung / Affidavit	61

Abkürzungen

APC	professionelle Antigen-präsentierende Zelle - <i>antigen presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Differenzierungsmarker - <i>cluster of differentiation</i>
CTL	CD8+ Zytotoxischer Lymphozyt - <i>cytotoxic lymphocyte</i>
DAMP	Stress-assoziierte Molekülstruktur - <i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle(n) - <i>dendritic cell(s)</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie - <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSc	<i>Forward Scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practise</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
iDC	unreife, noch nicht aktivierte dendritische Zelle(n) - <i>immature dendritic cell(s)</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Leukozytenreduktionssystem
MDSC	myeloide Suppressorzelle - <i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
moDC	monozytenderivierte dendritische Zelle - <i>monocyte-derived dendritic cell</i>
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
nm	Nanometer
nM, µM	molare Konzentration (nmol/L, µmol/L)
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülstruktur - <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre periphere Blutzellen - <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD	<i>Programmed Death</i>

PGE2	Prostaglandin E2
PRR	Erkennungsrezeptor typischer Pathogene - <i>pattern recognition receptor</i>
SD	Standardabweichung - <i>standard deviation</i>
SMAC	"Immunologische Synapse" - <i>supramolecular activation cluster</i>
SSc	<i>Side Scatter</i>
TAM	Tumor-assoziiierter Makrophage
TCR	T-Zell-Rezeptor - <i>T cell receptor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	CD4+ T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor
Treg	CD4+ regulatorische T-Zelle

A • Einführung

Krebserkrankungen stellen weltweit eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität des Menschen dar. Zu Beginn des Jahrzehnts kam es allein 2020 weltweit bei einer geschätzten Jahresinzidenz von ca. 19,3 Millionen Neuerkrankungen zu knapp 10 Millionen krebsbedingten Todesfällen. Für die kommenden Jahrzehnte wird global mit weiter deutlich steigenden Zahlen gerechnet.⁽¹⁾ In der EU ist die Mortalität insgesamt zwar seit Langem rückläufig, dennoch werden allein hier im Jahr 2023 noch immer ca. 1,3 Mio. krebsbedingte Todesfälle erwartet⁽²⁾.

Um erfolgreich die Tumorüberlebensrate zu steigern, sind neben der chirurgischen Tumorresektion auch weitere konventionelle Therapieverfahren wie Radio- und Chemotherapie etabliert. Als Kehrseite wird bei diesen Behandlungsformen durch unspezifische Wirkung auch in erheblichem Maße gesundes Gewebe geschädigt, das nicht an der Tumorerkrankung beteiligt ist. Verbleiben nach Abschluss der Behandlung einzelne vitale Tumorzellen im Patienten, können diese trotz vorangegangener Therapie zum Rezidiv und neuen Metastasen führen.

Das Konzept der Immuntherapie hat es sich deshalb zur Aufgabe gemacht, durch Nutzung des Immunsystems eine möglichst spezifische, systemische und nachhaltige antitumorale Abwehr zu generieren⁽³⁾. Die Verfahren der Immuncheckpoint-Blockade oder der Einsatz anderer monoklonaler Antikörper sind hierfür bekannte erfolgreiche Beispiele aus der klinischen Praxis. Auch therapeutische Tumorstoffe sind ein zentraler Baustein auf dem Feld der onkologischen Immuntherapie, zu dem seit Jahrzehnten geforscht wird und der auch anlassgebend für diese Arbeit ist.

Eine der zentralen Herausforderungen stellt die Überwindung der mannigfaltigen Immunresistenzmechanismen dar, die Tumoren entwickeln können. Diese führen nicht nur zum primären Versagen der natürlichen Immunreaktion, sondern können auch die Wirksamkeit immuntherapeutischer Maßnahmen kompromittieren.^(3; 4)

Für deren Anwendung und Weiterentwicklung ist daher zunächst ein grundlegendes Verständnis der Tumorimmunologie unabdingbar.

A.1 • Das menschliche Immunsystem

A.1.1 • Angeborene und adaptive Immunität

Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem erkennt Pathogene anhand molekularer Strukturen (*Antigene*). Hierunter fallen neben exogenen Mikroben auch geschädigte körpereigene Gewebe, wie virusinfizierte oder entartete Zellen. Traditionell wird dabei in Faktoren der angeborenen (innaten) und der hochspezifischen, adaptiven Immunität untergliedert, die auf vielfältige Weise miteinander interagieren.

Zellen des Immunsystems werden je nach gemeinsamer Progenitorzelle den myeloiden oder aber den lymphoiden Zellen zugeordnet. Sie unterscheiden sich nicht nur in Effektorfunktion und sezernierten *Zytokinen*, sondern können auch anhand ihrer Oberflächenmoleküle als Differenzierungsmarker voneinander abgegrenzt werden. Häufig sind diese als "*CD*" (*cluster of differentiation*) in der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert.⁽³⁾

Die adaptive Immunität

Über die Mechanismen der adaptiven Immunität können bestimmte Teilstrukturen von Antigenen, sog. *Epitope*, hochspezifisch erkannt werden. Bei Erstkontakt mit einem jeweiligen pathogenen Antigen steht diese Kompetenz des Immunsystems jedoch noch nicht sofort zur Verfügung, sondern muss zunächst epitopspezifisch entwickelt werden.

Lymphozyten sind Vermittler der adaptiven Immunität. Sie sind die einzige Art menschlicher Körperzellen, die klonal spezifische Antigenrezeptoren mit einer einzelnen Spezifität je Klon exprimiert. Die genetische Kodierung dieser Rezeptoren entsteht durch somatische DNA-Rekombination während des Prozesses der Lymphozytenausreifung.

B-Lymphozyten produzieren nach ihrer Ausreifung und Aktivierung in Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen antigenspezifische Antikörper, die gegen Epitope sowohl zellgebundener als auch löslicher Substanzen gerichtet sein können und die nach Antigenbindung von anderen Zelltypen erkannt werden.

T-Lymphozyten hingegen sind die Mediatoren der zellulären adaptiven Immunität. Sie verfügen über klonal antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptors, TCR*), mit denen Antigene auf körpereigenen Zellen erkannt werden können, die diese ihnen aktiv auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Nach ihrer Reifung in Knochenmark und Thymus zirkulieren sie funktionell inaktiv als *naive* T-Lymphozyten, bis sie durch spezifischen Antigen-Erstkontakt und gleichzeitige aktive Aktivierung, das sog. *Priming*, proliferieren und ihre jeweiligen Effektorfunktionen aufnehmen.

Zusätzlich zum TCR tragen T-Lymphozyten die Korezeptoren *CD4* oder *CD8*, mit denen sie unterschiedliche Wege der Antigenpräsentation erkennen. CD8-tragende (CD8+) T-Lymphozyten haben als *cytotoxische T-Lymphozyten (CTL)* die Aufgabe, körpereigene Zellen zu eliminieren, auf denen sie pathologische Antigenstrukturen erkennen. CD4+ T-Lymphozyten erfüllen andere Aufgaben, wie etwa die antigenvermittelte Stimulation anderer Immunzellen als sog. *T-Helferzellen (T_h)* oder aber die Dämpfung überschießender Immunreaktionen und den Erhalt der Selbsttoleranz als *regulatorische T-Zellen (T_{reg})*.

Nach ihrer Aktivierung von naiven in funktionell aktive Effektorzellen bleiben sowohl von B- als auch von T-Lymphozytenklonen langlebige Gedächtniszellen (*Memoryzellen*) erhalten, die bei erneutem Antigenkontakt schnell wieder proliferieren und sich ohne erneutes Priming in Effektorzellen differenzieren können. Auf diese Weise steht bei wiederholtem Antigenkontakt eine zuvor einmal aktivierte antigenspezifische adaptive Immunreaktion umgehend wieder zur Verfügung.⁽³⁾

Die angeborene Immunität und ihre Rezeptoren

Im Gegensatz zur adaptiven Immunität zeichnen sich die Mechanismen der angeborenen (innaten) Abwehr durch eine schnelle und frühe Verfügbarkeit bereits bei erstmaliger Antigenexposition aus. Neben löslichen Faktoren, wie dem C-reaktiven Protein und Faktoren des Komplementsystems, existieren auf verschiedenen Zellarten auch zelluläre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Anders als bei der adaptiven Antigenerkennung durch Lymphozyten sind diese unveränderlich im Erbgut codiert und zeichnen sich durch eine jeweils sehr breite Antigenspezifität aus. Als Erkennungsrezeptoren typischer pathogener Antigene (*Pattern recognition receptors, PRR*) können sie insgesamt etwa 10^4 verschiedene Antigene erkennen. Diese finden sich entweder typischerweise auf Krankheitserregern (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) oder gehen von geschädigten körpereigenen Zellen aus (*damage-associated⁽³⁾ bzw. danger-associated⁽⁴⁾ molecular patterns, DAMPs*).⁽³⁾

Ein wichtiges Beispiel für PRR sind die *Toll-Like-Rezeptoren (TLR)*. TLR sind, ebenso wie der angeschlossene Signalweg, bereits bei evolutiv sehr frühen Lebensformen nachweisbar⁽³⁾. Sie sind integrale membranständige Glykoproteine und können von PAMPs oder auch synthetisch hergestellten Liganden aktiviert werden^(3; 5). TLR-1, -2, -4, -5, -6 und -10 finden sich auf der Zelloberfläche und überwachen das extrazelluläre Milieu. TLR-3, -7, -8 und -9 erkennen in Endosomen, Lysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum pathogene Nukleinsäurestrukturen, wie doppelsträngige RNA (TLR3) oder einzelsträngige RNA (TLR 7 und 8), welche zwar nicht spezifisch für Pathogene ist, jedoch üblicherweise bei Vorkommen in Endosomen pathogenen Ursprungs sind.^(3; 5)

Eine Ligandenbindung an innate Immunrezeptoren hat die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden zur Folge, um eine Reaktion des Immunsystems auf das erkannte Pathogen herbeizuführen.⁽³⁾

Zellen des angeborenen Immunsystems

Hierfür steht eine Vielzahl an Mechanismen und Zelltypen bereit, deren wichtigste Vertreter für diese Arbeit im Folgenden kurz beleuchtet werden.

Phagozyten beispielsweise nehmen mittels Phagozytose Pathogene auf, wie etwa Mikroben, nekrotische und apoptotische Zellreste oder antikörperbeladene (*opsonierte*) Zellen und Strukturen, und zerstören diese in Lysosomen. Hierunter zeichnen sich *neutrophile Granulozyten* ferner durch Granula aus, die Substanzen enthalten, die im Rahmen einer Inflammation extrazelluläre Pathogene ebenso wie gesundes Gewebe zerstören können.⁽³⁾ Zellen des *mononukleären Phagozytensystems (MPS)* hingegen umfassen *Monozyten* und *Makrophagen*. Anders als bei neutrophilen Granulozyten ist neben der Phagozytose eine ihrer Hauptaufgaben die Interaktion mit anderen Immunzellen durch ausgeprägte Zytokinsekretion und Zell-Zell-Interaktionen.⁽³⁾

Monozyten werden anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD14 und CD16 klassifiziert: Die klassischen Monozyten als erste Gruppe tragen den Rezeptor *CD14^(3; 6)*, der als PRR

insbesondere für die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide (*LPS*), sowie als Korezeptor für mehrere TLR fungiert⁽⁷⁾. Sie migrieren in periphere Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren können. Neben ihrer phagozytotischen Aktivität können sie Mediatoren ausschütten, die proinflammatorisch, antimikrobiell und tumorizid wirken. Außerdem existieren weitere, nonklassische Monozyten, die anstelle von CD14 den Rezeptor CD16 tragen^(6; 8). Als Rezeptor für den invariablen Fc-Teil von IgG-Antikörpern dient dieser der Erkennung opsonierter Pathogene, gegen die bereits eine adaptive Immunreaktion in Form von Antikörpern ausgebildet wurde⁽³⁾. Diese Monozyten patrouillieren entlang von Gefäßendothelien und extravasieren tendenziell nur bei inflammatorischen Zuständen im Gewebe. Ferner beschriebene intermediäre Monozyten tragen beide Marker.⁽⁸⁾

Makrophagen sind Phagozyten, die weit verstreut in peripheren Geweben residieren und entweder als organspezifische, ortsständige Makrophagen während der Embryogenese oder aber aus eingewanderten Monozyten entstanden sind. Auch Makrophagen können unterschiedliche Aktivierungsreize erfahren und verschiedene funktionelle Phänotypen einnehmen. Im onkologischen Setting werden sie tendenziell dem tumorhemmenden *M1*-Phänotyp oder dem eher tumorfördernden *M2*-Phänotyp zugeordnet⁽⁴⁾. M1-Makrophagen sind effiziente Bekämpfer von Pathogenen nicht nur durch Phagozytose und Eliminierung durch lysosomale Enzyme, sondern auch durch Sezernierung toxischer Substanzen wie reaktiver Sauerstoffspezies und Stickstoffoxid (NO). M2-Makrophagen nehmen dagegen wichtige Aufgaben in der Remodellierung und Reparatur geschädigter Gewebe wahr. Sie können zum Beispiel durch Metalloproteinasen die Extrazellulärmatrix verändern und durch das Zytokin VEGF das Einwachsen neuer Blutgefäße (*Neoangiogenese*) fördern.⁽³⁾

Natürliche Killerzellen (NK) gehören nicht zu den Phagozyten und ähneln in Morphologie und Funktion den zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie erkennen geschädigte körpereigene Zellen, ohne dabei klonal antigenspezifisch zu agieren, etwa bei gestörter Präsentation von Autoantigenen auf deren Zelloberfläche oder CD16-vermittelt bei Opsonierung durch Antikörper. Auf diese Weise spielen auch sie in der antitumoralen Immunität eine bedeutende Rolle.⁽³⁾

A.1.2 • Dendritische Zellen

Dendritische Zellen – eine Brücke zwischen nativer und adaptiver Immunität

Eine wichtige Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität stellen dendritische Zellen (*dendritic cells, DC*) dar⁽⁹⁾. Sie nehmen eine Wächterfunktion wahr, indem sie wie kein anderer Zelltyp Antigene aufnehmen, verarbeiten und transportieren, um anschließend mit anderen Immunzellen wie insbesondere den T-Lymphozyten zu interagieren. Auf diese Weise sind sie in der Lage, sowohl die schnelle angeborene Immunreaktion als auch die spezifische adaptive Reaktion nicht nur zu initiieren, sondern auch ihre Art zu dirigieren.

Ähnlich wie Makrophagen gehen sie entweder als organspezifische, ortsständige DC aus der Embryogenese hervor, wie etwa die Langerhans-Zellen der Haut, oder sind auf

hämatopoietischem Weg im Knochenmark entstanden, eingewandert und haben sich erst vor Ort in DC differenziert⁽³⁾. Sie gehen dabei aus der gleichen gemeinsamen myeloiden Progenitorzelle hervor wie Monozyten.^(3; 9) Diese als "klassisch" oder "konventionell" bezeichneten DC finden sich vor allem in Epithelien und lymphoiden Organen⁽⁹⁾. Auch CD14+ Monozyten selbst können sich unter dem Einfluss der Zytokine GM-CSF und IL-4 in inflammatorischen Situationen zu DC, den sog. monozytenderivierten dendritischen Zellen (*monocyte-derived DC, moDC*) differenzieren^(5; 6; 8; 9).

Daneben existiert ferner die nach ihrer Morphologie benannte Gruppe der plasmazytoiden DC, die hauptsächlich im Blut vertreten sind, dort Antigene aufnehmen und sich besonders durch eine zytokinvermittelte, antivirale Wirkung auszeichnen, indem sie auf virale RNA und DNA reagieren⁽⁹⁾.

Antigenprozessierung und Aktivierung der DC

Ortsständige klassische DC adhären an ihrer Umgebung mit speziellen Adhäsionsstrukturen, genannt *Podosomen*⁽¹⁰⁾. Mittels rezeptorvermittelter Endo- und Phagozytose sowie unspezifischer Pinozytose nehmen sie konstant Antigene aus ihrer Umgebung auf. Durch Expression einer Vielzahl von innatem PRR wie den TLR werden die aufgenommenen Antigene konstant auf das Vorkommen pathogener Strukturen überwacht.⁽³⁾

Sollte eine solche erkannt werden, durchlaufen DC einen komplexen Ausreifungsprozess, der ihre weitere Funktion programmiert. Entscheidend hierfür ist die Beschaffenheit der Stimuli, die die DC währenddessen erfährt: Nicht nur die Art des erkannten Antigens, sondern auch die Zusammensetzung des vorherrschenden Zytokinmilieus prägt ihren weiteren Werdegang.⁽¹¹⁾ Einige DC können nach ihrer Ausreifung an Ort und Stelle verbleiben, ihr Profil sezernierter Zytokine verändern und inflammatorische Stimuli vermitteln, die weitere Immunzellen an den Ort der Antigenerkennung rekrutieren.⁽¹²⁾ Andere DC verlieren, insbesondere unter dem Einfluss von Gewebsmediatoren wie *Prostaglandin E2 (PGE2)*⁽¹⁰⁻¹²⁾, ihre Adhärenz und migrieren über die Lymphgefäße in die parafollikulären Zonen der Lymphknoten, wo sie auf naive T-Zellen treffen um diese antigenselektiv zu aktivieren.

Dieser Migrationsprozess findet mithilfe der chemotaktischen Zytokine (*Chemokine*) CCL19 und CCL21 statt, die konstitutiv in Lymphgefäßen und T-Zell-Zonen der Lymphknoten sezerniert werden. Entlang ihres Konzentrationsgradienten und mittels des Chemokinrezeptors *CCR7* migrieren sowohl aktivierte DC als auch naive T-Zellen an ihr gemeinsames Ziel. Auf diese Weise werden im Lymphknoten beide Zelltypen konzentriert, sodass die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens einer aktivierten, antigenbeladenen DC mit einer passenden antigenspezifischen naiven T-Zelle maximiert wird.⁽³⁾

Antigenpräsentation

Im Lymphknoten angekommen, besteht deshalb die nächste wichtige Aufgabe der dendritischen Zelle in der Antigenpräsentation an die naiven T-Zellen.

Jede kernhaltige Körperzelle präsentiert Peptidfragmente aus ihrem Proteom auf ihrer Oberfläche an T-Zellen. Dem adaptiven Immunsystem präsentiert sich auf diese Weise eine Stichprobe aller physiologischer, wie auch ggfs. pathologischer Proteinfragmente, die in der jeweiligen Zelle synthetisiert wurden.

Als Träger der Peptide dienen dabei Moleküle des *Major Histocompatibility Complex (MHC)*, heterodimere Moleküle mit einer genetisch interindividuell hochvariablen Peptidbindungsstelle, codiert auf den polymorphen *HLA*-Genloki (*Human Leukocyte antigen*). Die T-Zell-Rezeptoren eines Individuums, die die präsentierten Antigene erkennen, reagieren dabei nicht nur spezifisch auf das Antigen, sondern auch auf die eigenen MHC-Moleküle (*MHC-Restriktion*).

Zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen kommen zum Einsatz. Auf MHC-Klasse I findet die Antigenpräsentation aus zelleigenen Proteinen statt. Darüber hinaus ist eine bestimmte Gruppe von Immunzellen ebenfalls in der Lage, auf MHC-Molekülen der Klasse II auch Peptidfragmente von Proteinen zu präsentieren, die aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und nicht in der Zelle selbst synthetisiert wurden. Diese Zellen werden als professionelle antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems (*antigen-presenting cells, APC*) bezeichnet und umfassen neben DC auch Makrophagen und B-Lymphozyten.

Die Corezeptoren der T-Zellen dienen der Erkennung der jeweiligen MHC-Rezeptoren: CD4 bindet an MHC-II-Moleküle, sodass beispielsweise T-Helferzellen nur auf Antigene reagieren, die von APC präsentiert werden. CD8 hingegen bindet an MHC-I-Moleküle, sodass CTL mit allen kernhaltigen Zellen interagieren und auf deren selbst synthetisierte Antigene reagieren.

Die Erkennung von MHC-I-Molekülen auf der Zellmembran ist gleichzeitig ein inhibitorisches Signal an NK-Zellen. Sollte die Autoantigenpräsentation an CD8+ CTL gestört sein, was etwa in Fällen maligner Entartung beobachtet werden kann, kann die Zelle auf diese Weise stattdessen von NK-Zellen erkannt und eliminiert werden.⁽³⁾

Kreuzpräsentation

Damit das Priming naiver CD8+ T-Lymphozyten erfolgreich stattfinden kann, muss eine DC auch in der Lage sein, pathogene Antigene aus fremden Zellen an diese zu präsentieren.

Eine häufige Unterart klassischer dendritischer Zellen, identifizierbar durch den Marker CD141 (BDCA-3), ist deshalb in der Lage zur sogenannten *Kreuzpräsentation*, bei der Antigenstrukturen trotz Aufnahme aus dem Extrazellulärraum auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden.⁽³⁾

A.1.3 • Priming naiver T-Lymphozyten

Erstes Signal: Antigenerkennung

Trifft nun ein naiver T-Lymphozyt im Lymphknoten auf eine dendritische Zelle mit dem passenden Antigen auf einem passenden MHC-Molekül, so bildet sie mit dieser zunächst eine adhärente Verbindung aus, die sogenannte immunologische Synapse, oder

supramolecular activation cluster, SMAC. Auf diese Weise entsteht eine mechanisch stabile Verbindung, in der weitere Signale zwischen DC und T-Zelle ausgetauscht werden können.⁽³⁾

Zweites Signal: Kostimulation und Koinhibition

Für eine erfolgreiche Aktivierung naiver T-Zellen durch DC ist neben der Antigenerkennung als erstem Signal außerdem die Erkennung sogenannter Kostimulatoren als zweites Signal wichtig. Sie bestimmen das weitere funktionelle Schicksal des T-Lymphozyten.

Hierbei handelt es sich um Membranproteine, die in niedriger Intensität konstitutiv auf APC wie insbesondere den DC exprimiert werden und deren Dichte sich dort durch Aktivierung der jeweiligen Zelle, etwa PRR-, Zytokin- oder T_h-zellvermittelt, nochmals deutlich erhöht.

Die wichtigsten Vertreter der Kostimulatoren umfassen die B7-Familie mit den homologen membranständigen Glykoproteinen CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die vom Rezeptor CD28 auf T-Zellen erkannt werden. Erhält ein naiver T-Lymphozyt nach Antigenerkennung kein zusätzliches Signal durch die erhöhte Expression von Kostimulatoren, wie dies etwa bei Kontakt mit nicht-aktivierten DC vorkommen kann, die nur harmlose Autoantigene präsentieren⁽³⁾ - oder etwa auch durch ein bestimmtes Milieu im Umfeld eines malignen Tumors von einer Aktivierung abgehalten wurden⁽⁴⁾ - so findet im Dienste der Selbsttoleranz auch keine Aktivierung des spezifischen T-Lymphozyten statt; vielmehr kann dieser dauerhaft in einen autotoleranten Zustand versetzt werden.

Neben B7 und CD28 gibt es weitere Rezeptor-Ligandenpaare, die auf T-Zellen ebenfalls eine stimulierende oder aber eine inhibierende Wirkung haben und deshalb als Koinhibitoren bezeichnet werden. Zu Letzteren gehören die Rezeptoren CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) und PD-1 (programmed death 1), die auch als Immun-Checkpoints bezeichnet werden. CTLA-4 fungiert als kompetitiver Antagonist zu CD28, der mit erheblich höherer Affinität an B7-Moleküle bindet und damit erst bei Vorhandensein einer hohen B7-Dichte die Stimulation über CD28 zulässt. PD-1 bindet an die entsprechenden PD-Liganden auf beispielsweise APC, Endothel-, aber auch Tumorzellen, und inhibiert die Signalwege von CD28 und dem TCR. Nach zuvor erfolgtem Priming kann PD-1 auf diese Weise sogar die Aktivität von Effektorzellen erschöpfen. Durch die Balance kostimulierender und koinhibierender Signale wird eine überschießende Immunreaktion gebremst und eine Selbsttoleranz sichergestellt.⁽³⁾

Drittes Signal: Zytokine beim T-Zell-Priming

Ist auch die Hürde der Kostimulation überwunden, proliferiert der T-Lymphozyt (klonale Expansion) und es erfolgt die Differenzierung in funktionell aktive Effektorzellen und langlebige Memoryzellen. Bei diesen Prozessen spielen nun Zytokine eine wegweisende Rolle, die sich in der immunologischen Synapse anreichern.

Nach initialer Aktivierung sezerniert der T-Lymphozyt autokrin Zytokine wie Interleukin 2 (*IL-2*). Dieses induziert Überleben, Proliferation und Differenzierung.⁽³⁾

Aber auch die DC liefert Zytokinsignale wie das Interleukin 12 (*IL-12*)⁽¹¹⁾, ein Zytokin aus der gleichnamigen Familie mit pleiotropen Wirkungen auf innate und adaptive Funktionen des Immunsystems. Seine wirksame Form, IL-12-p70, ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten p35 und p40, die kovalent verbunden sind. Tritt anstelle von IL-12-p70 dagegen nur die Untereinheit IL-12-p40 alleine auf, so wirkt diese wiederum kompetitiv antagonistisch zum Zytokin in seiner aktiven Form.⁽¹³⁾ IL-12p70 wirkt determinierend auf die späteren Effektorfunktionen der T-Lymphozyten, wie in Kürze erläutert wird.

Effektorfunktionen der CD8+ CTL

Trifft nach dem Priming ein CD8+ CTL erneut auf sein spezifisches Antigen, das von einer beliebigen kernhaltigen Zelle auf MHC-I präsentiert wird, kommt es mit dieser erneut zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, in die sich die Granula des CTL per Exozytose entleeren. Sie enthalten Granzyme als Wirkstoffe, Serinproteasen, die unter anderem via Proteolyse die Kaskade der Caspasen in der Zielzelle aktivieren und diese somit in die Apoptose treiben. Das ebenfalls in den Granula enthaltene Perforin, ein membrandurchdringendes Molekül homolog zum C9-Komplementfaktor, ermöglicht den Granzymen den Eintritt in die Zielzelle. Außerdem bindet der CTL über den FasL an den Fas-Todesrezeptor auf der Zielzelle, dessen Aktivierung ebenfalls zur Apoptose führt. Innerhalb weniger Stunden kommt es zum Zelltod der Zielzelle, bei dem auch ihr Genom abgebaut wird.⁽³⁾

Parakrin sezernieren CTL dabei das Zytokin Interferon Gamma (*IFN γ*), welches seinerseits eine aktivierende Wirkung auf Effektorzellen des Immunsystems besitzt. Es bewirkt unter anderem die verstärkte Antigenpräsentation und kann APC zur verstärkten Expression von Kostimulatoren aktivieren. Makrophagen werden zum klassischen M1-Phänotyp aktiviert, sodass es zu einer vermehrten Phagozytose, Pathogeneliminierung und Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren kommt. APC werden ferner zur Sezernierung von IL-12p70 angeregt, welches seinerseits als positiver Rückkopplungsmechanismus die Sekretion von IFN γ in CTL begünstigt.⁽³⁾ Im onkologischen Kontext führt IFN γ auch zur Hemmung des Tumorzellwachstums⁽⁴⁾.

Effektorfunktionen von CD4+ T-Helferzellen

CD4+ T-Lymphozyten differenzieren neben regulatorischen T-Zellen insbesondere zu T-Helferzellen aus. Diese wiederum können bestimmte funktionelle Phänotypen annehmen.

Th1-Helferzellen wirken analog zum M1-Phänotyp von Makrophagen proinflammatorisch. Sie sezernieren neben anderen proinflammatorischen Zytokinen ebenfalls IFN γ , sowie IL-2, das zur Rekrutierung und Stimulation weiterer T-Lymphozyten führt. Sie exprimieren außerdem den zellulären Liganden CD40L, der an den Rezeptor CD40 auf APC bindet. Durch diese Zell-Zell-Interaktion kommt es ähnlich wie durch IFN γ zur Aktivierung (*Licensing*) der jeweiligen APC: Makrophagen werden verstärkt zum M1-

Phänotyp aktiviert, DC werden zur Migration, Kostimulation und Produktion von IL-12p70 angeregt,⁽³⁾ was wiederum insbesondere dann von essentieller Bedeutung ist, wenn wenig innate Aktivatoren wie TLR-Liganden zur Aktivierung der DC vorliegen⁽⁴⁾. Im onkologischen Kontext ist dieser T-Helfer-Subtyp daher prognosebegünstigend.^(3; 11)

Th2-Helferzellen hingegen produzieren primär die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Dieser Reaktionstyp ist insbesondere in antihelminthischen Immunreaktionen und Allergien vertreten. Makrophagen werden zum alternativen M2-Phänotyp aktiviert⁽³⁾, der die Geweberemodellierung und ein Tumorwachstum begünstigt^(3; 4).

Ein weiterer Subtyp, *Th17*, sezerniert insbesondere IL-17 und IL-22, wirkt aktivierend auf neutrophile Granulozyten und entfaltet seine Rolle in der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze.⁽³⁾

Polarisation von Immunreaktionen

Analog wird die effektorzellvermittelte Immunität in drei generelle Typen kategorisiert: Typ 1 ist unter anderem durch IFN γ -produzierende CTL und Th1-Helferzellen vermittelt, die ihrerseits Zellen des MPS aktivieren. Typ 2 wird unter anderem von Th2-Zellen und ihren Zytokinen, Typ 3 von Th17-Zellen und ihren Zytokinen getragen.⁽¹⁴⁾

Bereits beim T-Zell-Priming wirken die genannten Einflüsse auf die Differenzierung der T-Lymphozyten und determinieren ihren künftigen adaptiven Reaktionstyp auf das erkannte Antigen. Es kommt zur *Polarisation* der Immunreaktion auf einen der Reaktionstypen: Zytokine des jeweils einen Typs wirken dabei nicht nur fördernd auf seine eigene weitere Ausbildung, sondern hemmen zusätzlich die jeweils Anderen.⁽³⁾

Für die Ausbildung einer protektiven antitumoralen Antwort muss die antigenpräsentierende dendritische Zelle daher in der Lage sein, IL-12p70 zu produzieren⁽¹¹⁾, um eine Typ-1-Reaktion gegen das Tumorantigen in die Wege zu leiten.

A.2 • Tumorimmunologie

A.2.1 • Die physiologische Tumorimmunität

Überblick über wichtige antitumorale Wirkmechanismen

Auch Tumoren können wie eindringende Pathogene innate und adaptive Immunantworten hervorrufen, die sich aus einem komplexen Zusammenwirken verschiedener Arten von Immunzellen und Zellen der Tumorumgebung speisen. Beteiligt sind beispielsweise tumorspezifische CTL und T-Helferzellen, insbesondere vom Th1-Typ.

APC in der Tumorumgebung werden durch DAMPs, Zytokine wie IFN γ aus T-Zellen oder direkten CD40L-CD40-Interaktionen aktiviert. M1-Makrophagen üben ihre phagozytotische Tätigkeit aus, greifen Tumorzellen mit reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies direkt an, und sezernieren Zytokine wie IL-12p70⁽³⁾, das neben den bereits beschriebenen Effekten in der Tumorumgebung außerdem zur Sekretion anti-angiogenetischer Zytokine führt und

das dämpfend auf Suppressorzellen wirkt, die sich in der Tumorumgebung gebildet haben⁽¹³⁾.

Außer durch CTL kommt es auch Komplement- oder antikörperabhängig zur zellvermittelten Zytotoxizität, etwa durch Fc-Rezeptor-tragende Makrophagen und NK-Zellen, die zudem bei Vorliegen verschiedener aktivierender Liganden auf Tumorzellen, IL-2 aus Th1-Helferzellen und Herabregulation der Antigenpräsentation über MHC-I durch den Tumor aktiviert werden.

Viele Tumoren werden von mononukleären Zellen infiltriert. Die Beschaffenheit dieses Infiltrates lässt prognostische Rückschlüsse zu, etwa auf die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung.⁽³⁾

Tumorantigene

Verschiedene Strukturen des Tumors werden vom Immunsystem als pathologische Antigene erkannt.

Die wichtigste Rolle spielen *Neoantigene*, die von veränderten Genen produziert werden, etwa durch somatische Mutationen, Frameshifts oder posttranslationale Veränderungen⁽⁴⁾. Auch mutierte Onkogene oder Tumorsuppressorgene fallen unter diese Kategorie. Da sie sonst nicht in vivo präsent sind, besteht ihnen gegenüber keine physiologische Toleranz. Zumeist handelt es sich um cytosolische Proteine, die über das Proteasom auf MHC-I-Rezeptoren der Tumorzellen präsentiert werden. Werden sie von DC aufgenommen, werden sie auf MHC-II und via Kreuzpräsentation auf MHC-I präsentiert. Ihre interindividuelle Immunogenität ist dabei nicht nur davon abhängig, wie viele genetische Veränderungen vorliegen, sondern auch wie affin die jeweils entstehenden Peptide zu den polymorphen MHC- und T-Tell-Rezeptoren eines Individuums sind.^(3; 4)

Ebenfalls erkannt werden können Antigene, die im physiologischen Kontext normalerweise nicht zu erwarten sind. Hierzu zählen zum Beispiel onkofetale Proteine, die nur während der Embryonalentwicklung und in Tumoren vorkommen und für die keine Langzeittoleranz besteht. Cancer-Testis-Antigene werden von Gameten und Trophoblasten der Plazenta, nicht aber in normalen somatischen Geweben gebildet, und finden sich beispielsweise in malignen Melanomen.

Eine weitere Gruppe von Antigenen spielt zwar für die physiologische Immunität eine untergeordnete Rolle, ist jedoch ein guter Angriffspunkt für spezifische immuntherapeutische Verfahren: Diese Antigene sind zwar physiologisch vorhanden, finden sich aber in deutlicher Überexpression auf Tumorzellen. Hierzu zählen etwa Her2/Neu in manchen Mammakarzinomen, oder Differenzierungsantigene der Ursprungsgewebe wie MART-1 (Melan-A) in malignen Melanomen oder CD20 in manchen Lymphomen.⁽³⁾

Immunologische Begünstigung von Tumorentstehung

Während das Immunsystem manifeste Tumoren bekämpft, führen andere Immunreaktionen primär erst zur Tumorentstehung. Eine chronische Inflammation wie bei

Virushepatitiden oder Helicobacter-Befall kann beispielsweise durch die anhaltende Exposition mit freien Radikalen, die von innate Immunzellen ausgeschüttet werden, langfristig zur DNA-Schädigung führen.

Andere Immunreaktionen begünstigen das Wachstum und die Metastasierung von malignen Tumoren. M2-Makrophagen können das Extrazellulärgewebe tumorbegünstigend remodellieren und mittels des Wachstumsfaktors *VEGF* zum Einwachsen neuer Blutgefäße ins Tumorumfeld führen, die neben einer verbesserten Perfusion außerdem einen möglichen Metastasierungsweg darstellen.⁽³⁾ VEGF inhibiert außerdem die Aktivierung dendritischer Zellen und erschwert damit eine antitumorale Immunantwort⁽⁹⁾.

Derartige Mechanismen können Tumoren gezielt ausschöpfen, um ihr Wachstum zu begünstigen und auch um eine antitumorale Immunität auszuschalten.⁽³⁾

A.2.2 • Immun-Evasion von Tumorzellen

Fehlschlagen der antitumoralen Immunantwort

So vielfältig die antitumoralen Wirkmechanismen des Immunsystems sind, so unterschiedlich kann ihr Fehlschlagen begründet sein. Viele der tumoralen Mechanismen, das Immunsystem zu umgehen, entwickeln sich nicht zuletzt durch konstanten Selektionsdruck durch das Immunsystem.⁽³⁾

Grob unterteilen lassen sich diese Mechanismen zum einen in tumor-intrinsische Mechanismen, bei denen sich die Tumorzelle selbst verändert, sowie in tumor-extrinsische Mechanismen, bei denen der Tumor auf seine Mikroumgebung und deren Zellen, oder sogar systemisch einwirkt.⁽⁴⁾

Verlust der Immunogenität

Mit der Zeit, nicht zuletzt durch Selektionsdruck, werden Tumoren immer weniger immunogen. Beispielsweise kann die Expression der als pathogen erkannten Antigene verloren gehen, oder deren Präsentation auf MHC-I-Molekülen gestört sein, etwa durch eine Störung ihrer intrazellulären Prozessierung nach proteasomalem Abbau.

Auch können Resistenzen bei Signalwegen auftreten, die für die Immunerkennung wichtig sind, wie die Reaktion auf die Zytokine IFN γ oder TNF.^(3; 4)

Aktive Inhibierung der Immunantwort

Tumoren können außerdem eine breite Palette an regulatorischen Mechanismen ausschöpfen, um zytotoxische Reaktionen zu unterdrücken.

Eine Möglichkeit ist die Überführung reaktiver T-Lymphozyten in einen dysfunktionalen erschöpften Phänotyp, der durch eingeschränkte Effektorfunktionen und erhöhte Expression inhibitorischer Rezeptoren wie den Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 gekennzeichnet ist. Da Tumorantigene oft keine starke innate Reaktion an PRR auslösen, werden APC mitunter nicht stark zur Kostimulation über B7-Moleküle angeregt. Die konstitutiv exprimierten Kostimulatoren reichen jedoch für eine Bindung an den stärker

affinen CTLA-4-Rezeptor aus, was zur T-Zell-Inhibierung führt. Exprimiert der Tumor den Liganden für PD-1, kann eine Immunreaktion weiter zurückgefahren werden.

Auch lösliche Faktoren und Zytokine wie beispielsweise *TGF-β* können vom Tumor oder Zellen in seiner Mikroumgebung produziert werden, um Proliferation und Effektorfunktionen von Lymphozyten und Makrophagen zu dämpfen.⁽³⁾

In der Tumorumgebung können darüber hinaus zelluläre Regulatoren induziert werden, die T-Zell-Antworten unterdrücken. Neben regulatorischen T-Zellen zählen dazu insbesondere die myeloid-derivierten Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells, MDSC*), eine heterogene Gruppe verschiedener Zelltypen. Sie wirken immunmodulierend und akkumulieren an Orten chronischer Inflammation. Dabei verfügen sie über verschiedene Mechanismen, wie IL-10, TGF-β, Prostaglandine, inhibitorische Rezeptorliganden und Andere, um innate und adaptive Immunantworten zu supprimieren. Sie fördern ihrerseits die Differenzierung regulatorischer T-Zellen.⁽³⁾ Tumorassoziierte Makrophagen (*TAM*) als einer ihrer Vertreter können wie eingangs erwähnt durch Immunmodulierung, Typ-2-Polarisation, Remodellierung der Extrazellulärmatrix und Förderung einer Neoangiogenese Wachstum und Metastasierung eines Tumors fördern.⁽⁸⁾

Auch DC können dazu konditioniert werden, die Typ-2-Polarisierung antitumoraler Zellen auszulösen. Durch die Wirkung inhibitorischer Zytokine wie IL-6 und IL-10 können sie etwa daran gehindert werden, T-Zellen zu primen oder deren Typ-1-Polarisation zu induzieren. Andere Faktoren, zu denen beispielsweise Prostaglandin E2 (PGE2) zählt, sowie tumorderivierte regulatorische T-Zellen hemmen die Ausschüttung von IL-12p70 durch dendritische Zellen⁽³⁾.

Andere Zellen in der Tumorumgebung sind Krebs-assoziierte Fibroblasten (*CAF*). Durch Verdichtung der Extrazellulärmatrix und Regulation von Zytokin- und Chemokingradienten hindern sie tumorspezifische T-Zellen, myeloide Effektorzellen und dendritische Zellen daran, den Tumor zu infiltrieren.⁽⁴⁾

A.2.3 • Immuntherapie

Ebenso vielfältig wie die Mechanismen, mit denen Tumoren einer Eradikation durch das Immunsystem entgehen, sind wiederum auch mögliche Angriffspunkte für immuntherapeutische Verfahren, um eine Tumormunität zu induzieren bzw. wiederherzustellen, und dabei neben der vollständigen und systemischen immunologisch vermittelten Tumoreradikation ein bleibendes immunologisches Gedächtnis zu etablieren. Gesunde Gewebe sollen dabei möglichst intakt bleiben.^(3; 4)

Verfahren auf dem Gebiet der Immuntherapie sind Gegenstand großflächiger aktueller Forschung und werden kontinuierlich weiterentwickelt.

Immuneckpoint-Blockade

Ein klinisch erfolgreicher Ansatz besteht in der Immuneckpoint-Inhibition (*ICI*). Durch Inhibierung der Inhibitoren CTLA-4 oder PD-1, oder dessen Liganden PD-1L mittels monoklonaler Antikörper ist es möglich, den dysfunktionalen erschöpften Phänotyp von T-

Zellen im Tumorinfiltrat zu reversieren und ihre Effektivität gegen den Tumor wiederherzustellen.

Die endgültige Lösung aller Probleme ist die ICI jedoch nicht: Durch den damit induzierten Wegfall eines wichtigen Mechanismus der Selbsttoleranz können als Nebenwirkung der Checkpointinhibitoren autoimmune und entzündliche Reaktionen in verschiedenen Organen auftreten. Eine Mehrheit der mit allein dieser Methode behandelten Tumoren in Patienten entwickelt im Behandlungsverlauf Resistenzen oder spricht bereits initial nicht auf die Therapie an, da die Tumoren andere Mechanismen ausschöpfen, um sich vor der zytotoxischen Zerstörung durch das Immunsystem zu schützen.⁽³⁾

CAR-T-Zellen

Immunzellen, die in vitro kultiviert und modifiziert worden sind, können nach Verabreichung in vivo eine antitumorale Immunreaktion bewirken. Ein erfolgreiches Beispiel aus der klinischen Anwendung sind T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor (*CAR*), der genetisch verändert wurde und als Antigenbindungsstelle ein tumorantigen-spezifisches Immunglobulin ähnlich eines Antikörpers enthält. Dadurch wird die MHC-Restriktion aufgehoben, sodass sich der Rezeptor patientenunabhängig verwenden lässt.

Obwohl bei Antigenbindung an diesen artifiziellen Rezeptor die Signalkaskaden des TCR und des Rezeptors CD28 für Kostimulatoren gleichermaßen ausgelöst werden, kann es auch bei CAR-T-Zellen zum Auftreten des dysfunktionalen, erschöpften Zustandes kommen. Außerdem kann auch hier der Tumor durch Ausschöpfung anderer Immunresistenzmechanismen zum Therapieversagen führen.⁽³⁾

Antikörpertherapie

Die Gabe monoklonaler Antikörper kann zu schnellen und spezifischen antitumoralen Effekten führen. Antitumorale Antikörper können direkt auf Oberflächenmolekülen von Tumorzellen binden und zu deren Zerstörung mittels Komplement, NK-Zellen oder phagozytierenden Makrophagen führen. Andere Antikörper richten sich gegen Moleküle, die beispielsweise durch Signalkaskaden oder auf andere Weise für das Tumorstadium vonnöten sind.

Ein Nachteil der Antikörpertherapie ist jedoch, dass sie kein immunologisches Langzeitgedächtnis hinterlässt.⁽³⁾

Unspezifische Immunstimulation im Umfeld des Tumors

Da häufig die Mikroumgebung des Tumors eine entscheidende Rolle dabei spielt, Immunreaktionen zu unterdrücken, besteht ein weiteres Konzept darin, unspezifische immunologische Stimuli im Tumorumfeld zu setzen, um die vorhandenen inhibitorischen Signale zu überwiegen, die Tumorsuppression zu reversieren und neue Immunreaktionen gegen den Tumor zu induzieren. Hierfür eignen sich beispielsweise synthetische TLR-Agonisten, die dendritische Zellen im Tumorumfeld entgegen

inhibitorischer Signale aktivieren. Als Zielrezeptoren in konventionellen Gewebs-DC sind insbesondere TLR3 und TLR7 verbreitet, die sich mit topischen Aktivatoren wie etwa Imiquimod in vivo stimulieren lassen.⁽⁹⁾ Aufgrund der immunogenen Wirkung werden diese Therapieansätze auch als antigenfreie "In-situ-Vakzine" bezeichnet⁽⁴⁾, im Gegensatz zur Immunisierung durch zugeführtes Antigen.

Vakzinierung mit Tumorantigenen

Der Einsatz von antigenbasierten Vakzinen im onkologischen Kontext umfasst nicht nur die präventive Vakzinierung gegen Produkte bestimmter onkogener Viren wie des HPV-Virus⁽¹⁵⁾, sondern auch die Verwendung therapeutischer Vakzine, die bei bereits manifester Krebserkrankung zur Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen den bestehenden Tumor dienen.⁽⁴⁾

Viele Tumorkranke besitzen auf tumorassoziierte Antigene zunächst keine vorbestehende suffiziente T-Zell-Reaktivität⁽¹⁶⁾. Die Vakzinierung mit Tumorantigenen hat zum Zweck, Tumormunität aufzubauen unter Umgehung des, oft immunoprotektiven, Tumormikroumfeldes.⁽⁹⁾ Auf diese Weise soll eine starke und anhaltende Reaktion durch T-Zellen hervorgerufen werden, welche die Tumorumgebung infiltrieren und dort ihre Effektorfunktionen ausüben.

Dabei ist nicht nur die Generierung tumorspezifischer CTL wichtig, sondern auch antigenspezifische Th1-Helferzellen sind unabdingbar. Auch sie üben fundamentale antitumorale Aufgaben aus, insbesondere in Situationen, in denen wenig andere Signale wie DAMPs vorhanden sind. Dazu gehören beispielsweise die Typ-1-Polarisierung und Tumormultiproliferationshemmung durch IFN γ , die antigenabhängige Aktivierung von DC und M1-Makrophagen durch CD40L und die Stimulation und Rekrutierung spezifischer CTL mittels IL-2.⁽⁴⁾

Derzeit erlebt das Konzept der therapeutischen Tumorkvakzine eine Renaissance, nachdem sich zunächst keine zufriedenstellende klinische Wirksamkeit gezeigt hatte. So hat sich herausgestellt, dass die alleinige Generierung tumorspezifischer T-Zellen zumeist nicht für einen therapeutischen Erfolg ausreicht, sondern man mannigfaltige individuelle Faktoren von Umwelt, Patient und Tumor ebenfalls berücksichtigen muss⁽⁴⁾. Gegenstand zahlreicher Studien ist es beispielsweise, erfolgreich generierte tumorspezifische T-Zellen durch eine Kombinationstherapie mit ICI im funktionell aktiven Zustand zu erhalten und damit einen wichtigen Resistenzmechanismus auszuschalten.⁽¹⁷⁾ Auf der anderen Seite wäre dieser Ansatz wiederum ineffektiv in anderen Fällen, in denen der Tumor gar nicht erst von spezifischen T-Zellen infiltriert werden kann⁽¹⁸⁾. Auch die Kombination mit anderen Therapieverfahren, wie der etablierten Radio- und Chemotherapie, kann die Wirksamkeit der Vakzine verbessern⁽¹⁹⁾.

Therapeutische Vakzine stellen daher wie andere immuntherapeutische Verfahren auch keine eigenständige Universallösung dar, wecken jedoch in den richtigen Konstellationen ein zunehmendes therapeutisches Interesse⁽⁴⁾.

Bei der Wahl der Antigene für ein therapeutisches Tumorstoffimpfung spielen gemeinsame Tumorstoff-assoziierte Antigene, wie auch patientenspezifische Neoantigene eine Rolle^(4; 16). Moderne Algorithmen haben die Möglichkeiten revolutioniert, Peptide zu identifizieren, die gut von MHC-Molekülen und TCR gebunden werden und somit als geeignete Kandidaten für die Stoffimpfung in Frage kommen.⁽³⁾

Diese Antigene können zum Einen direkt in vivo über verschiedene Darreichungsformen, etwa peptid- oder nukleinsäurebasiert⁽¹⁹⁾, in Kombination mit Adjuvantien erfolgen, um dendritische Zellen zu aktivieren. Ebenso kann das Stoffimpfung jedoch auch aus bereits in vitro präparierten DC bestehen.⁽⁴⁾

A.3 • Therapeutische Tumorstoffimpfungen mit dendritischen Zellen

A.3.1 • Dendritische Zellen als Basis für Tumorstoffimpfungen

Das Konzept DC-basierter Stoffimpfungen

Für diesen Ansatz müssen Zellen jedem zu behandelnden Patienten individuell entnommen und in Zellkultur expandiert werden. Die so gewonnenen DC werden ex vivo mit Tumorstoffantigen inkubiert und anschließend wieder dem Patienten verabreicht.⁽³⁾

Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die geringe Toxizität und gute Verträglichkeit⁽⁹⁾. Nebenwirkungen umfassen typischerweise unspezifische Reaktionen wie Fieber, Müdigkeit, Lymphadenopathie und Reaktionen an der Applikationsstelle⁽¹⁷⁾. In der Vergangenheit konnte eindrücklich gezeigt werden, dass durch diese Art der Stoffimpfung erfolgreich neoantigen-spezifische T-Zell-Immunität generiert werden kann⁽²⁰⁾. Heute laufen zahlreiche klinische Studien mit DC-basierten Tumorstoffimpfungen^(9; 21).

Ebenfalls Gegenstand der Forschung ist bis heute die Standardisierung einer optimalen Methode für das ressourcenintensive Verfahren, patienteneigene DC in vitro zu generieren und für die Stoffimpfung zu präparieren^(3; 17).

Wahl geeigneter DC

Nach ihrer Verabreichung müssen die DC eine Reihe von Aufgaben wahrnehmen, um erfolgreich eine antitumorale T-Zell-Antwort induzieren zu können. Hierzu gehört einerseits die phänotypische Reife nach Aktivierung, sichtbar etwa an Kostimulatoren auf der Zelloberfläche⁽¹⁷⁾. Ferner müssen sie in der Lage sein, zum Lymphknoten zu migrieren und dort antigenspezifische T-Zellen zu stimulieren. Dabei müssen sowohl die Immunreaktion in Richtung einer Th1-Reaktion polarisiert, als auch durch Kreuzpräsentation antigenspezifische CTL aktiviert werden. Die DC muss hierfür ausreichende Mengen IL-12p70 sezernieren können⁽¹¹⁾.

Da sich gewebständige klassische DC, die sich hierfür am Besten eignen, nur in sehr geringer Dichte finden und daher nicht mit verhältnismäßigem Aufwand gewinnen lassen, hat sich als praktikablere Lösung etabliert, mit anderen Arten von DC zu arbeiten,

insbesondere monozytenderivierten DC^(4; 9; 17). Klassische CD14+ Monozyten lassen sich mit einfachen Methoden in großer Menge aus peripherem Blut gewinnen und selektieren, etwa durch ihre Eigenschaft zur Plastikadhärenz in Zellkultur oder positiver Selektion durch immunomagnetische Partikel⁽¹⁷⁾. Hierfür müssen jedoch einige Nachteile in Kauf genommen werden: In-vitro generierte moDC haben tendenziell eine schlechtere Migrationsfähigkeit als klassische DC und kreuzpräsentieren Antigene weniger gut als die CD141(BDCA3)+ cDC^(16; 17).

Antigenbeladung

Um nach ihrer Differenzierung aus Monozyten die unreifen, noch nicht aktivierten phagozytierenden DC mit Tumorantigen zu beladen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Möglichkeiten bestehen etwa in direktem Beladen mit geeigneten HLA-affinen Peptiden, die nicht zuvor prozessiert werden müssen, oder nukleinsäurebasierter Antigenkodierung⁽⁴⁾. Sogar die Fusion von DC mit Tumorzellen ist eine beschriebene Methode⁽⁹⁾. Ein großer Vorteil der in-vitro-Generierung von DC ist jedoch auch die Möglichkeit, diese direkt mit Tumorlysate zu inkubieren. Durch Phagozytose werden Tumorantigene von der DC aufgenommen und verarbeitet, ohne patientenspezifische Neoantigene zuvor manuell exakt bestimmen und synthetisch für das Vakzin aufbereiten zu müssen^(4; 16; 21).

A.3.2 • Ausreifung monozytenderivierter dendritischer Zellen

Zytokinbasierte DC-Ausreifung

Monozyten differenzieren sich unter GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC, die die Expression von CD14 verlieren⁽¹⁷⁾. Um in vivo eine effektive Immunantwort zu generieren, müssen sie an richtiger Stelle und zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Stimuli erhalten, damit sie adäquat aktiviert und ausgereift werden, um alle ihre benötigten, o.g. Fähigkeiten auszubilden.⁽¹¹⁾ Welche Substanzen sich in welcher Konzentration hierfür am Besten eignen, ist weiterhin Gegenstand der Forschung^(9; 17).

Als Goldstandard war hierfür über längere Zeit ein Cocktail aus den Zytokinen TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE2 etabliert⁽²²⁾. Dieser führte zuverlässig zu einer Hochregulation der Reifungsmarker MHC-I und -II, CD40, den Kostimulatoren CD80 und CD86, und dem für die Migration zum Lymphknoten essentiellen Chemokinrezeptor CCR7. In anderen Aspekten zeigte sich jedoch eine Limitierung dieses Zytokincocktails: Die DC waren nicht in der Lage, größere Mengen IL-12p70 zu produzieren. Hierfür wird der Mediator PGE2 verantwortlich gemacht.⁽¹⁷⁾

Prostaglandin E2 in der DC-Ausreifung

Prostaglandin E2 (*PGE2*) ist ein lipider Mediator, der durch die Enzyme Cyclooxygenase und nachgeschaltete Prostaglandin-Synthasen aus Arachidonsäure gebildet wird. Er spielt vor allem als parakrin sezernierter Gewebsbotenstoff eine Rolle, da er im Gewebe schnell

in einen inaktiven Metaboliten umgewandelt wird und somit keinen weiten Diffusionsradius hat.⁽²³⁾ Die immunologischen Wirkungen sind dichotomer, teils gegensätzlicher Natur und können kontext- und konzentrationsabhängig sowohl stimulierende, als auch hemmende Wirkungen auf die gleichen Mechanismen haben.^(23; 24) In der Mikroumgebung von Tumoren beispielsweise entfaltet es vielseitige immunsupprimierende Wirkungen und kann daher zu einem Fortschreiten der Krankheit beitragen⁽²⁵⁾. Aber auch physiologisch kommt es an mannigfaltigen Orten und Situationen vor, beispielsweise im Rahmen akuter Inflammationen, wo es Vasodilatation und mastzellvermittelte Gefäßhyperpermeabilität für die Leukozytenrekrutierung bewirkt⁽²⁶⁾.

An Zielzellen wirkt PGE2 über vier E-Typ-Prostanoidrezeptoren (EP1-EP4), die jeweils G-Protein-gekoppelte membranständige Rezeptoren⁽²⁶⁾ mit unterschiedlichen Isoformen⁽²³⁾ sind, welche jeweils unterschiedliche Signalkaskaden bewirken⁽²⁴⁾.

Auf dendritischen Zellen sind ausschließlich die Rezeptoren EP2 und EP4 funktionell aktiv^(11; 23; 24). Diese haben unterschiedliche Affinitäten zu PGE2, sodass sie in physiologischen Konzentrationen, die bis 100nM reichen, konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Wirkungen führen. EP2, der vor allem bei höheren Konzentrationen aktiviert wird, führt zu einer Inhibierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-12.⁽²⁴⁾ EP4 hingegen wirkt bereits bei niedrigen PGE2-Konzentrationen, wird bei Ligandenbindung jedoch rasch internalisiert, was bei höheren oder längerfristig aktiven PGE2-Konzentrationen ebenfalls die Wirkung von EP2 dominieren lässt^(23; 24).

Die Wirkung im Zusammenhang mit DC unterscheidet sich jedoch nicht nur konzentrations- sondern auch kontextabhängig: Vermittelt durch EP1 und EP3 führt PGE2 zunächst bei der gemeinsamen hämatopoietischen Stammzelle zu einer bevorzugten Differenzierung in DC anstatt zu Monozyten. Die Weiterdifferenzierung von Monozyten zu DC wird gleichzeitig jedoch gehemmt. Während der Ausreifung unreifer, phagozytierender DC (*iDC*) wirkt PGE2 hingegen wiederum stimulierend, während es anschließend eine inhibierende Wirkung auf reife DC im Lymphknoten ausübt.⁽²³⁾

Bei der Herstellung DC-basierter Tumorstoffe kann deshalb PGE2 im Cocktail der Substanzen zur Ausreifung von iDC Verwendung finden. Hier führt es EP4-vermittelt⁽²⁷⁾ zu einer raschen Podosomenauflösung innerhalb von Minuten und fördert die Migration der DC zum Lymphknoten, indem es unter anderem die verstärkte Expression und Aktivierung des CCR7,⁽¹¹⁾ sowie Matrix-Metalloproteinase 9 bewirkt. Dies funktioniert jedoch nur bei Zugabe in frühen Stadien der Ausreifung; sind DC einmal aktiviert worden, kann PGE2 diese Effekte nicht mehr bewirken.⁽²³⁾ Neben der verbesserten Migration führt PGE2 zu einer verstärkten Expression wichtiger Moleküle für die Antigenpräsentation wie CD40, CD86 und MHC-II⁽²⁴⁾, bewirkt jedoch insbesondere in höheren Konzentrationen⁽²⁴⁾ gleichzeitig auch die Inhibierung von Zytokinen wie dem essentiellen IL-12p70⁽⁹⁾. In der Literatur ist sogar das Phänomen beschrieben, dass moDC sich bei Aktivierung PGE2-vermittelt entweder zu einem migratorischen Phänotyp oder einem ortsständigen, zytokinproduzierenden Phänotyp entwickeln und die jeweils andere Aufgabe nicht ausführen können^(12; 16).

TLR-vermittelte Ausreifung von DC

Um die aktivierten DC mit optimalen funktionellen Eigenschaften auszustatten, wurden nach dem zytokinbasierten Ausreifungsprotokoll deshalb auch alternative Ansätze entwickelt. Neben der Möglichkeit, DC durch Licensing via CD40L-CD40-Interaktionen zu aktivieren, ist dabei insbesondere die Möglichkeit in den Fokus getreten, TLR-Rezeptoren in den DC durch synthetische Liganden zu aktivieren⁽¹⁷⁾. Nach ähnlichem Prinzip wie bei den "In-situ-Vakzinen" besprochenen Verfahren ist es ein gängiger Ansatz, die in DC exprimierten TLR3 sowie TLR7 zu stimulieren. Neben dem genannten Imiquimod stehen jeweils eine Palette weiterer Agonisten zur Verfügung. Dazu gehören poly-I:C bzw. dessen Analogon poly-ICLC als virales dsRNA-Mimetikum für TLR3, bzw. Resiquimod (R848) für TLR 7 und 8⁽⁹⁾. Die Aktivierung dieser TLR wirkt jeweils synergistisch auf die IL-12p70-Produktion bei T-Zell-Kontakt.⁽²⁸⁾ In vorangegangenen Versuchen, bei denen auf diese Weise stimulierte moDC mit peripheren Blutleukozyten inkubiert wurden, zeigte sich anschließend konsekutiv eine ausgeprägte IFN γ -Produktion als Reaktion⁽¹¹⁾.

Die TLR-vermittelte Aktivierung der moDC hemmt jedoch gleichzeitig deren Chemotaxis und Migration, weshalb in der Vergangenheit von *Boullart et al.* auch die Zugabe von PGE2 zu den TLR-Agonisten bei der DC-Ausreifung untersucht wurde. In diesen Versuchen konnte durch die PGE2-Zugabe eine gute Migrationsfähigkeit hergestellt werden, während die TLR-vermittelte IL12p70-Produktion nicht wesentlich beeinträchtigt wurde.⁽¹¹⁾

A.3.3 • Formulierung der Fragestellung

Wegweisende Protokolle arbeiten häufig mit sehr hohen Konzentrationen PGE2^(11; 16; 22) um 10 μ g/ml, d.h. etwa 28 μ M bei einer molaren Masse von 352g/mol⁽²⁹⁾. Diese liegen deutlich über physiologisch vorkommenden Konzentrationen von bis zu 100nM⁽²⁴⁾. Wie gezeigt kann PGE2 jedoch konzentrationsabhängig die Dichotomie seiner Effekte in niedrigen Konzentrationsbereichen ausprägen⁽²⁴⁾.

Aus zurückliegenden Versuchen von *Gierlich et al.* ist bekannt, dass sich eine gute Migrationsfähigkeit unter PGE2 bereits im Dosisbereich von 10ng/ml ausbildet. Eine weitere Konzentrationserhöhung führte dagegen kaum noch zu einer weiteren Steigerung.⁽¹⁶⁾ Der hemmende Effekt auf die Sezernierung von IL-12p70 tritt hingegen EP2-vermittelt erst bei höheren Konzentrationen von PGE2 auf⁽²⁴⁾. Auch Versuche zur Kreuzpräsentation der moDC von prozessierten Proteinantigenen an CD8+ T-Lymphozyten zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung bei zunehmender Dosis PGE2⁽¹⁶⁾.

Diese Versuchsergebnisse legen nahe, eine neue Frage in den Raum zu werfen: Sollte die Überlegung, ob PGE2 per se bei der Etablierung zukünftiger Protokolle zur Ausreifung von moDC eine Rolle spielen sollte oder nicht, differenzierter betrachtet werden und dieses insbesondere in erheblich niedrigeren, physiologischen Konzentrationen untersucht werden?^(16; 24)

Für ein erfolgreiches Priming naiver T-Lymphozyten ist neben Migration, Kreuzpräsentation und Zytokinsezernierung der moDC ihr reifer Phänotyp eine

unverzichtbare Eigenschaft, messbar unter anderem an der Ausprägung der Kostimulatoren CD80 und CD86⁽¹⁷⁾. Bisher wurde beschrieben, dass der Ausreifungscocktail mit den Substanzen poly-I:C, R848 und PGE2 in supraphysiologischer, mikromolarer Konzentration zu einer Erhöhung der Reifungsmarker CD80 und CD86, CCR7, dem für vollständig ausgereifte DC charakteristischen⁽³⁰⁾ membranständigen Marker CD83, sowie dem MHC-II-Molekül⁽³⁾ HLA-DR führt^(11; 16).

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, wie sich der Phänotyp der reifen moDC diesbezüglich verhält, wenn im Kontext des o.g. Ausreifungscocktails aus TLR-Liganden eine Exposition mit verschiedenen Konzentrationen PGE2 stattfindet. Dabei soll insbesondere die Frage beleuchtet werden, ob konzentrationsabhängig auch unerwünschte Wirkungen von PGE2 auf die Ausreifung der iDC zu beobachten sind.

B • Material und Methoden

B.1 • Materialien

Medien, Puffer und ihre Bestandteile

Basismedium	Dendritic Cell Medium Serum-free GMP, CellGro/CellGenix, 20801-0500
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, D8537
Biocoll-Trennlösung	Biocoll Trennlösung, Merck Millipore, L6615
MACS-Puffer	CliniMACS PBS/EDTA Buffer (700-25), Miltenyi Biotech, 200-070-025
CryoStor	CryoStor CS5, Biolife Solutions, 205102
Dextran 40	Dextran 40 10 % mit 0,9 % NaCl, AlleMan Pharma
Humanalbumin	Albumin (Human) 5 % Solution, Grifols
Humanserum	Humanserum "off the clot" AB, Biochrom, S01049.2-0,5
Penicillin-Streptomycin	Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), ThermoFisher Scientific, 15140122
Pulmozyme	Pulmozyme (Dornase alfa) (1000U/ml), Roche

Sonstige Reagenzien

CD14 Microbeads	CD14 MicroBeads human, MACS/Miltenyi Biotech, 130-050-201
GM-CSF	rhGM-CSF, CellGro/CellGenix, 1412-050
IL-4	rhIL-4, CellGro/CellGenix, 1403-050
R848	R848 (Resiquimod), Invivogen, tlr-r848-5
poly(I:C)	Poly(I:C) HMW, Invivogen, tlr-pic
PGE₂	Prostaglandin E2, Sigma-Aldrich, P0409-1MG
AH6809	AH 6809, Cayman Chemical, 14050
GW 627368X	GW 627368X, Cayman Chemical, 10009162
Trucount™ Tubes	Trucount™ Absolute Counting Tubes, BD Biosciences, 340334

FACS-Reagenzien

Live/Dead-Färbungen	BD Via-Probe™ [7AAD], BD, 555815 LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, ThermoFisher Scientific, L34957
----------------------------	--

CompBeads	Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences, 552843
FACS-Antikörper	Murine Antikörper (IgG2b) gegen humane Zellmarker: Anti-CD83 PE-Cy™7, BD, 561132 Anti-CD86 V450, BD, 560359 Anti-HLA-DR FITC, BD, 347400 Anti-CD80 APC-H7, BD, 561134 Anti-CCR7 PE, BD, 560765 Anti-CCR7 FITC, BD, 561271 Anti-CD14 APC, BD, 345787 Anti-HLA-DR PerCP, BD, 347402 Isotypkontrolle PE-Cy™7, BD, 560542 Isotypkontrolle V450, BD, 560374 Isotypkontrolle FITC, BD, 556655 Isotypkontrolle PE, BD, 556656 Isotypkontrolle PerCP, BD, 558304 Isotypkontrolle APC, BD, 555745 Isotypkontrolle APC-H7, BD, 555745
Hardware	
Zentrifuge	Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator	HeraCell 150, Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturwerkbank	Kendro HERAsafe KS 18
Mikroskop	DM IRB Lichtmikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop-Kamera	Digital Camera KY-F75U, JVC, Yokohama, Japan
MACS® MultiStand	MACS MultiStand, Miltenyi Biotech, 130-042-303
QuadroMACS™-Magnet	QuadroMACS™ Starting Kit, Miltenyi Biotech, 130-091-051
MACS® LS Säule	LS columns, Miltenyi Biotech, 130-042-401
Zellkulturflasche	CELLSTAR® cell culture flasks, greiner bio-one, 658-175
Multiwell-Plate	CELLSTAR® Cell Culture Multiwell Plates, greiner bio-one, 662 160 (24 Wells), 677 180 (48 Wells)
Kryokonserviergefäß	Cryogenic Vial 2mL, Corning Inc, 430488
Zentrifugiergefäße	CELLSTAR® Tubes, greiner bio-one, 227261 (50mL), 188271 (15mL)
Pipette, elektronisch	accu-jet® pro, BRAND, 26300
Dispenser	Dispensette® III 1-10mL, BRAND, 4700140
Laborkühlschrank	Super-V 520, Kirsch, Deutschland, 41 34 02521

Mr. Frosty™ - Gefrierbehälter	Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, 5100-0001
Flüssigstickstofftank	Biosafe Chronos 120, Cryotherm, Kirchen, Deutschland
ADVIA-System	ADVIA-120-Hämatologie-System, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland

Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturwerkbank durchgeführt, mit Ausnahme der durchflusszytometrischen Färbungen und Messungen.

B.2 • Zellkultur

B.2.1 • Isolation von Monozyten

Gewinnung des Ausgangsmaterials

Bei Thrombozytophereseverfahren im Rahmen von Thrombozytenspenden wird routinemäßig ein leukozytendepletierendes Verfahren angewandt, bei dem vitale Spenderleukozyten in hoher Zahl in einem sterilen Auffangbehälter (*LRS-Kammer*) separiert werden. Diese sind typischerweise ein Abfallprodukt des Spendeverfahrens, sind jedoch auch als gutes Ausgangsmaterial für die Herstellung monozytenderivierter dendritischer Zellen anerkannt⁽³¹⁾. Am Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg fallen regelhaft LRS-Kammern gesunder Donatoren an. Diese werden, nach Aufklärung und Einwilligung der Spender, gemäß Richtlinie der Ethikkommission bei der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg anonymisiert ohne spezifische Einzelvoten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt⁽¹⁶⁾ und dienen für die beschriebenen Versuche als Ausgangsmaterial.

Isolierung der PBMC

Im ersten Schritt wurden die mononukleären Blutzellen aus den LRS-Kammern (*peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) mittels Dichtezentrifugation in *Biocoll-Trennlösung* bei 400g für 20 Minuten, ohne Bremse beim Auslauf zentrifugiert, um eine möglichst präzise Auftrennung zu erreichen.

Die Leukozyten, die sich nach der Zentrifugation als dünne, weißlich-trübe Schicht darstellen, wurden vorsichtig durch manuelle Pipettierung getrennt, in PBS gewaschen und gezählt. Zellzählungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an das hämatologische Labor und das Stammzelllabor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg delegiert, denen hierfür automatisierte Messsysteme (*ADVIA-System, Trucount™-Tubes, s.o.*) zur Verfügung standen.

Selektion von Monozyten

Die Selektion der vitalen Monozyten erfolgte während der Zellkultur mittels Plastikadhärenz an Zellkulturflaschen^(17; 32). Für eine noch größere Reinheit wurde als weiteres gängiges Verfahren⁽¹⁷⁾ teils zusätzlich eine immunomagnetische positive Selektion der Monozyten anhand CD14 vorgenommen^(16; 17). Das Vorgehen erfolgte hierbei mit dem MACS®-System von *Miltenyi Biotech* gemäß Herstelleranweisung. In diesem Fall kam dafür ein magnetisch konjugierter muriner anti-human CD14 IgG2a - Antikörper zum Einsatz, dessen Bindung nicht zu einer Signaltransduktion führt⁽³³⁾. In einem Magnetfeld können anschließend die markierten von den restlichen Zellen getrennt werden.

Kryokonservierung

Sofern die gewonnenen PBMC bzw. magnetisch selektierten CD14+ Monozyten nicht sofort in Zellkultur gegeben wurden, wurden sie zunächst kryokonserviert. Hierzu wurden sie nach erneuter Zentrifugation in *CryoStor*-Medium resuspendiert, in *Kryokonserviergefäße* gegeben und in einer *Mr. Frosty™*-Tiefkühlbox über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Lagerung in der Gasphase eines *Flüssigstickstofftanks* bei -160°C bis zur weiteren Verwendung.

Vor Beginn der Zellkultur wurden die Konserven wieder aufgetaut. Hierfür wurde ein Auftaumedium⁽³⁴⁾ hergestellt, das bei 4°C vorgehalten wurde, aus *PBS* mit 2,5% *Humanalbumin*, 5% *Dextran-40-Lösung*, sowie 10U/ml *Pulmozyme*. Die aufzutauenden Kryokonserviergefäße wurden zunächst auf Eis bei ca. 0°C erwärmt, anschließend bei Handwärme langsam aufgetaut und allmählich bei Verflüssigung vorsichtig zunächst im Verhältnis 1:1, anschließend im Verhältnis 1:2, im vorbereiteten Auftaumedium resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation mit anschließender Erneuerung des Mediums, um das *CryoStor*-Medium vorsichtig auszuwaschen. Einer in einigen Fällen beobachteten Verklumpung der Zellen wurde durch weitere schrittweise Zugabe von *Pulmozyme* begegnet.

B.2.2 • Differenzierung und Ausreifung dendritischer Zellen

Tag 0: Ansatz der Zellkultur

Die Differenzierung der Monozyten zu moDC erfolgte nach gängigem Verfahren^(3; 9; 16; 35) in Zellkultur mittels GM-CSF und IL-4. Als Kulturmedium diente hierfür eine Suspension bestehend aus *CellGro-DC-Medium*, 1% *Humanserum*, 1% *Penicillin-Streptomycin* sowie 800IU/ml *GM-CSF* und 10ng/ml *IL-4*⁽³²⁾. Anhand der durch Zellzählung ermittelten Werte erfolgte die Resuspendierung zu $1-1,5 \times 10^6$ Monozyten / ml. Die anschließende Inkubation erfolgte für 5-6 Tage bei 37°C und einem Luft-CO₂-Gehalt von 5%.

Bereits nach wenigen Stunden zeigte sich eine feste Adhärenz der Monozyten am Boden der Zellkulturflaschen, sodass nicht-adhärenzte sonstige PBMC im Überstand durch Austausch des Kulturmediums entfernt werden konnten. Eine weitere Erneuerung des Mediums fand nach 2-3 Tagen statt.

Tag 5-6: Gewinnung der unreifen DC aus der Zellkultur

Nach erfolgter Differenzierung der Monozyten zu iDC wurde eine Mikroskopkontrolle durchgeführt, bevor die iDC aus den Kulturflaschen gewonnen und gepoolt wurden, um sie anschließend auf die Versuchsreihen zur Ausreifung zu verteilen.

Nicht-adhärentes Material, wie avitale Zellen oder verbliebene nicht-monozytäre PBMC, wurde zunächst durch Bewegung und Dekantierung des Mediums entfernt. Nach etabliertem Verfahren⁽³²⁾ erfolgte anschließend die Ablösung der plastikadhärenten iDC von den Zellkulturflaschen mittels kaltem Medium. Hierfür erfolgte die Zugabe von auf 4°C gekühlter PBS, Inkubation auf 0°C Eis für 20 Minuten und Auswaschung mit weiterer gekühlter PBS. Eine Probe der gewonnenen iDC wurde durchflusszytometrisch analysiert, wie ab der nächsten Seite beschrieben.

Ausreifung der dendritischen Zellen

Nach Pooling der iDC erfolgte im Anschluss ihre Ausreifung, d.h. Aktivierung, für weitere 48 Stunden, bei identischen Zellkulturbedingungen unter Beifügung des jeweiligen Ausreifungscocktails (**Tabelle 2**).

Betrachtet wurden in Anwesenheit der TLR-Agonisten poly-I:C (20µg/ml) und R848 (3µg/ml)⁽¹⁶⁾ unterschiedliche Konzentrationen von PGE2 im physiologischen Bereich bis 100nM, sowie dreier supraphysiologischer Abstufungen der bisweilen oft untersuchten Konzentration von 10µg/ml (28,4µM). Um Hinweise auf rezeptorabhängige Effekte untersuchen zu können, wurden einzelne zusätzliche Kontrollbedingungen mit Rezeptorenblockern angesetzt: *GW627368X* (10µM) gegen EP4, und *AH6809* (10µM) gegen sowohl EP2 als auch EP1 und EP3. Diese Rezeptorantagonisten wurden in gleicher Konzentration für einige Minuten mit den DC vorinkubiert, bevor diese in Kontakt mit dem gesamten Ausreifungscocktail versetzt wurden.

	TLR-Agonisten	PGE2	Anti-EP1/EP2/EP3	Anti-EP4
1. (iDC)	-	-	-	-
2.	poly-I:C, R848	-	-	-
3.	poly-I:C, R848	1nM	-	-
4.	poly-I:C, R848	10nM	-	-
4a.	poly-I:C, R848	10nM	AH6809	-
4b.	poly-I:C, R848	10nM	-	GW627368X
5.	poly-I:C, R848	100nM	-	-
5a.	poly-I:C, R848	100nM	AH6809	-
5b.	poly-I:C, R848	100nM	-	GW627368X
6.	poly-I:C, R848	0,5µg/mL (1,42µM)	-	-
7.	poly-I:C, R848	1µg/mL (2,84µM)	-	-
8.	poly-I:C, R848	10µg/mL (28,4µM)	-	-

Tabelle 2: Untersuchte Ausreifungscocktails. Sonstige Konzentrationen: poly-I:C je 20µg/ml; R848 je 3µg/ml; AH6809 je 10µM; GW627368X je 10µM

Nach erfolgter Ausreifung und erneuter Mikroskopkontrolle wurden die DC der jeweiligen Versuchsbedingungen erneut nach etabliertem Protokoll⁽³²⁾ mittels kaltem Medium vom Zellkulturgefäß gelöst und für die durchflusszytometrische Analyse ihres Phänotyps vorbereitet.

B.3 • Durchflusszytometrie

B.3.1 • Färbung

Vorgehen zur FACS-Färbung

Vor und nach Ausreifung wurden die DC durchflusszytometrisch mittels fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen die jeweils zu untersuchenden Oberflächenmarker analysiert (*FACS*). Diese Methode erlaubt eine quantitative Bestimmung derer Expressionsdichte.

Nach Zentrifugation wurden die DC in 200µl PBS resuspendiert und lichtgeschützt bei 4°C für 20 Minuten mit den korrespondierenden FACS-Antikörpern für die Phänotypbestimmung inkubiert.

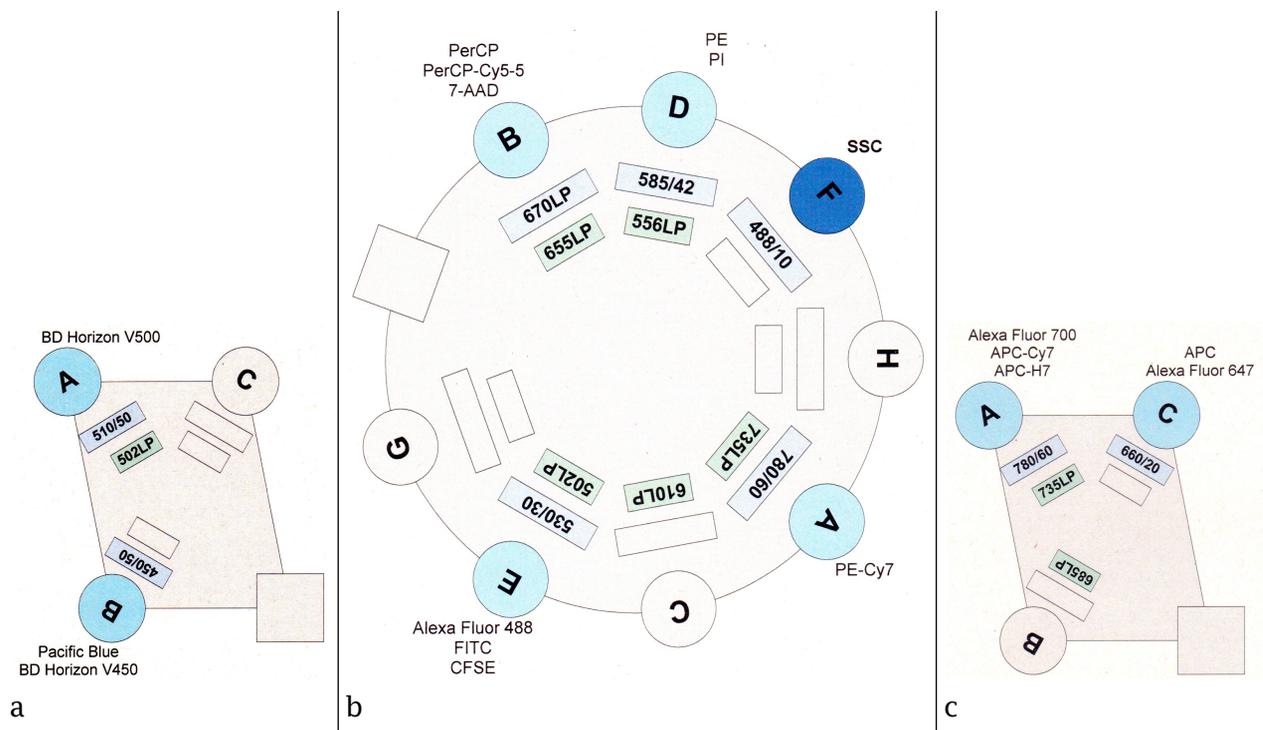
Daraufhin erfolgte die Entfernung der verbliebenen, nicht bindenden FACS-Antikörper durch Waschung mit je 1ml PBS, Zentrifugation und erneuter Resuspendierung der gefärbten DC in 200µl PBS. Anschließend wurden diese bis unmittelbar vor Durchführung der jeweiligen FACS-Messung in eine lichtundurchlässige Transportbox mit Eisenlage

gegeben. Etwa eine Minute vor Beginn der jeweiligen Messung wurden je 5µl der jeweiligen Live/Dead-Färbung zur Markierung avitaler Zellen zugegeben und die DC erneut mittels Vortex resuspendiert.

Konfiguration des Zytometers

Die Messungen zur Phänotypbestimmung erfolgten am Durchflusszytometer *FACS Canto™ II* von *Beckton Dickinson (BD Biosciences)*. Dieses bietet die Möglichkeit, bis zu acht verschiedene Fluorochrome zugleich zu messen.⁽³⁶⁾ Die Kompensation der Spektralüberlappungen und Datenanalyse erfolgten jeweils mit der zugehörigen Software *FACSDiva*.

Das verwendete *FACS Canto™ II* verfügte über drei Exzitationslaser mit den Wellenlängen 405nm (violett), 488nm (blau) und 633nm (rot) und war unter anderem für die parallele Verwendung der Fluorochrome *BD Horizon™ V450*, *BD Horizon™ V500*, *FITC*, *PE*, *PerCP/7AAD*, *PE-Cy™7*, *APC* und *APC-H7* konfiguriert (siehe **Grafik 1**).



Grafik 1: Konfiguration des Zytometers. A-H: Sensoren, benannt in der Reihenfolge des Auftreffens des Lichtstrahles. Blaue Kästen (außen): Vorgeschaltete Lichtfilter, grüne Kästen (innen): Vorgeschaltete Reflektoren⁽³⁶⁾.

a) Das Messmodul für den violetten Laser verfügte über zwei Lichtsensoren, die durch die Verwendung der Farbfilter 780/60 und 660/20 (Angaben in nm) für die Messung der Fluorochrome *BD Horizon™ V450* und *BD Horizon™ V500* optimiert waren.

b) Der blaue Laser war in ein Messmodul mit fünf aktiven Lichtsensoren integriert, deren Optimierung durch die Farbfilter 780/60nm, 670LP, 585/42, 530/30 und 488/10 für die Messung der Farben *FITC*, *PE*, *PerCP/7AAD* und *PE-Cy™7* sowie den *SSc* etabliert war.

c) Der rote Laser wiederum verfügte über ein Modul mit zwei Sensoren mit den Filtern 780/60 und 660/20, um die Farben *APC* und *APC-H7* zu messen.

Färbestrategie

Um den Phänotyp der DC zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzintensität der Marker CD14, CD80, CD83, CD86, CCR7 und HLA-DR gemessen. **Tabelle 3** zeigt die Färbestrategie für die untersuchten Oberflächenproteine.

Spender	CD14	CD80	CD83	CD86	CCR7	HLA-DR	Live/Dead
1	APC	APC-H7	PE-Cy7	V450	FITC	PerCP	-
2	APC	APC-H7	PE-Cy7	V450	PE	PerCP	V500
3	APC	APC-H7	PE-Cy7	V450	PE	FITC	7AAD

Tabelle 3: Färbung der DC zur Bestimmung ihres Phänotyps. Modifikationen zwischen Spendern ergaben sich bedingt durch lokale Verfügbarkeit oder Eigenschaften der verwendeten Antikörper. So ersetzte etwa der PE-konjugierte Antikörper für den gering exprimierten Rezeptor CCR7 in späteren Versuchen den FITC-Konjugierten, da er sich in der Praxis aufgrund der helleren Lichtemission als wesentlich sensitiver erwies. Bei der Datenauswertung erfolgte eine Normierung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (Kapitel B.3.2).

Ermittlung der Kompensationsmatrix

Überlappungen der Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome wurden mathematisch kompensiert. Das Vorgehen hierfür erfolgte gemäß Herstellervorschrift⁽³⁷⁾ mit *BD CompBeads*. Hierbei handelt es sich um Polystyren-Mikropartikel, konjugiert mit einem passenden Antikörper um die zur Färbung eingesetzten, hier murinen, Immunglobuline auf deren Oberfläche zu adsorbieren⁽³⁸⁾. In je einer separaten Messung wurden sie mit jedem der verwendeten Antikörper einzeln gefärbt. Zusammen mit je einer ungefärbten *CompBeads*-Fraktion als Negativkontrolle wurden sie anschließend mit den gleichen Zytometereinstellungen gemessen, die auch für die Messungen der DC angewandt wurden.

Aus den so ermittelten Überstrahlungswerten der Fluorochrome in die verschiedenen Farbkanäle wurde durch die Software *FACSDiva* anschließend die Kompensationsmatrix ermittelt.

Durch manuelle Analyse der Überstrahlungswerte jedes der einzelnen Farbkanäle ineinander wurde die Korrektheit der Kompensation überprüft und ggfs. wo noch Ungenauigkeiten erkennbar waren, manuelle Feinabstimmungen vorgenommen. Durch eine Expertin des Herstellers *BD Biosciences* wurde bei einem frühen Versuch die auf diese Weise ermittelte Kompensationsmatrix bestätigt⁽³⁹⁾, bevor diese zum Schluss anhand gefärbter Zellen jeweils durch Vergleich mit Einzel- und FMO-Messungen verifiziert wurde.

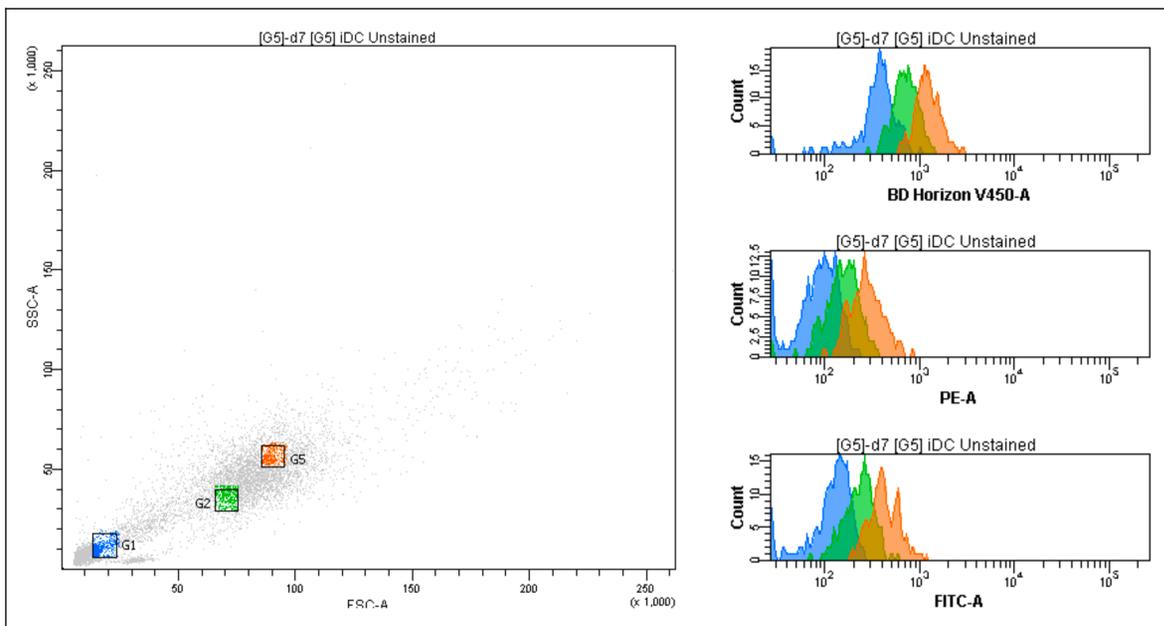
Das Kompensationsschema wurde bei Aufnahme neuer Fluorochrom-Antikörper in die Färbeschemata in gleicher Weise ergänzt. Die Überstrahlungswerte der Live/Dead-Färbungen wurden bestimmt, indem entweder ein Antikörper der gleichen Farbe auf den *CompBeads* eingesetzt wurde (V500) oder aber anhand gefärbter und ungefärbter Zellen (7-AAD) eine manuelle Kompensation vorgenommen wurde.

B.3.2 • Datenauswertung

Selektion der DC für die Analyse

Die DC präsentierten sich im FACS als große Zellen, die in den Kanälen für FSc und SSc hohe Werte im Vergleich zu Monozyten präsentieren. Auf diese Weise ist bereits durch Gating im Fsc/SSc eine Abgrenzung zu sonstigen und avitalen Zellen möglich (**Grafik 3**).

Bei der Bestimmung der Gatinggrenzen fiel auf, dass bereits ungefärbte DC zu ausgeprägten Autofluoreszenzphänomenen tendieren. Die gemessene Farbintensität auf den Fluorochromkanälen zeigte eine deutliche Korrelation mit den Signalintensitäten in FSc und SSc, wie **Grafik 2** beispielhaft demonstriert.

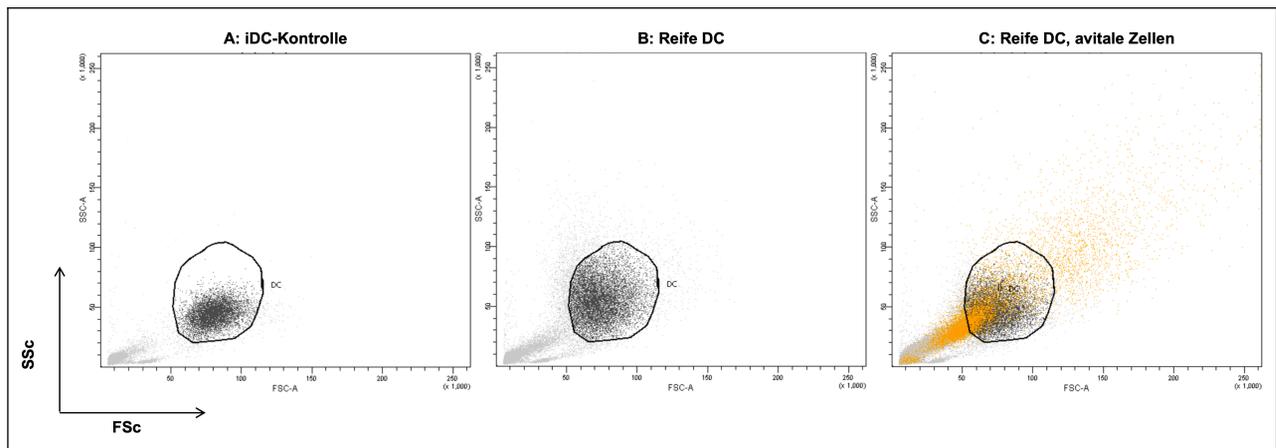


Grafik 2: Darstellung der Autofluoreszenz ungefärbter Zellen.

Links: FSc (x-Achse) und SSc (y-Achse) mit drei Stichproben unterschiedlicher Zellen (Blau: Avitale Zellen, grün und orange: Zellen im DC-Gate).

Rechts: Gemessene Intensität derselben ungefärbten Stichproben auf verschiedenen Farbkanälen (oben: BD Horizon V450, mittig: PE, unten: FITC). Es zeigt sich eine Zunahme der Autofluoreszenz in Korrelation mit FSc/SSc.

Das Einschlussgate für DC wurde deshalb möglichst restriktiv auf den Kern der in diesen Dimensionen sichtbaren DC-Population gehalten. Von Spender zu Spender zeigte sich eine gewisse interindividuelle Variabilität der Verteilung in FSc und SSc, sodass das Einschlussgate individuell für jede LRS-Kammer festgelegt, und über alle Versuchsbedingungen beibehalten wurde.



Grafik 3: Wahl des Einschluss-Gates für dendritische Zellen (A-C: gleicher Spender). A: Negativkontrolle (iDC) nach 48h Ausreifung. B: beispielhaft Reife DC unter TLR-Agonisten und 10 μ g/ml PGE2. Der Veränderung der Signale in FSc und SSc wurde bei der Definition des spenderspezifischen DC-Gates Rechnung getragen, indem es so weitläufig gewählt wurde, dass es die DC-Population in allen Bedingungen umfasste, jedoch nicht über diese hinaus reichte um Autofluoreszenzartefakten vorzubeugen. C: Dieselbe Ausreifungsbedingung. Gelb: Gefärbte avitale Zellen, die zusätzlich ausgeschlossen wurden. Schwarz: Berücksichtigte DC. Hellgrau: Sonstige

Die Definition eines weitläufigen, permissiven DC-Gates, mit dem möglichst viele Zellen (bzw. *Events* in der Messung) für alle Spender zugleich erfasst werden sollen, erschien hingegen nicht zielführend. Artefakte durch Autofluoreszenzphänomene, Dubletten, ggfs. avitale Zellen u.Ä. wären eine zu erwartende Folge gewesen. Wo zutreffend, wurden stark auf dem jeweiligen Farbkanal der Live/Dead-Färbung fluoreszierende Events durch entsprechendes Gating zusätzlich ausgeschlossen.

Normierung der Messwerte

Zur Gegenüberstellung der Messwerte wird für eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Spender untereinander eine leerwertbereinigte Normierung vorgenommen. Hierfür werden nicht die absoluten Messwerte direkt miteinander verglichen, sondern in Relation zum jeweiligen spenderspezifischen Leerwert (ungefärbte DC vor Beginn der Ausreifung, definiert als unterer Referenzwert 0) gesetzt, sowie der jeweils in den Hauptversuchsbedingungen maximalen beobachteten Markerausprägung (definiert als oberer Referenzwert 1).

Diese Gegenüberstellung erlaubt einen quantitativen Vergleich der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten (*MFI*) aller Spender, insbesondere in Bezug auf die Fragestellung einer Konzentrationsabhängigkeit eines jeweils beobachteten Effektes von PGE2. Gleichzeitig finden durch diese Normierung unterschiedliche Autofluoreszenzen, die wie gezeigt interindividuell in Korrelation mit FSc und SSc variieren, und teilweise unterschiedliche Färbungen der Marker CCR7 und HLA-DR, Berücksichtigung.

Die absoluten Messwerte sowie die zugrunde liegenden Leer- und Maximalwerte sind im Anhang in Kapitel E.1, Seite 52ff. abgedruckt. Die Ermittlung der relativen Messwerte erfolgte gemäß der nachstehenden Formel:

$$\text{Rel. Messwert} = \frac{\text{Abs. Messwert} - \text{Leerwert}}{\text{Maximum} - \text{Leerwert}}$$

Auf diese Weise nehmen alle im Folgenden dargestellten Messwerte einen Platz zwischen 0 (entspr. dem Leerwert, also der MFI der ungefärbten Zellen) und 1 (entspr. der maximal beobachteten MFI) ein.

Statistik

Die Normierung, mathematische Analyse und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels gängiger Tabellenkalkulationssoftware, Microsoft Excel®. Signifikanzprüfungen der Ergebnisse werden, solange von einer Nicht-Normalverteilung der normierten Messwerte ausgegangen wird, wesentlich durch die vorliegende Stichprobengröße bestimmt (siehe Seite 50).

C • Ergebnisse

C.1 • Lichtmikroskopische Morphologie

Während ihrer Differenzierung und Ausreifung wurde die Morphologie der DC lichtmikroskopisch dokumentiert (*Grafik 4*).

Beginn der Zellkultur

Die Kamera fokussiert auf den Boden der Zellkulturflasche, wo sich bereits wenige Stunden nach Aussaat eine Schicht adhätierender Monozyten mit kleinen Ausläufern zeigt. Die nicht-adhätierenden PBMC wurden ausgewaschen.

Differenzierung zu iDC

Nach Mediumwechsel am 3. Tag zeigen sich weniger Zellen im Bildausschnitt. Die Zellen entwickeln zunehmend sichtbare Ausläufer. Am Ende ihrer Differenzierung zeigen die adhätierenden iDC langgestreckte Zellkörper mit Dendriten.

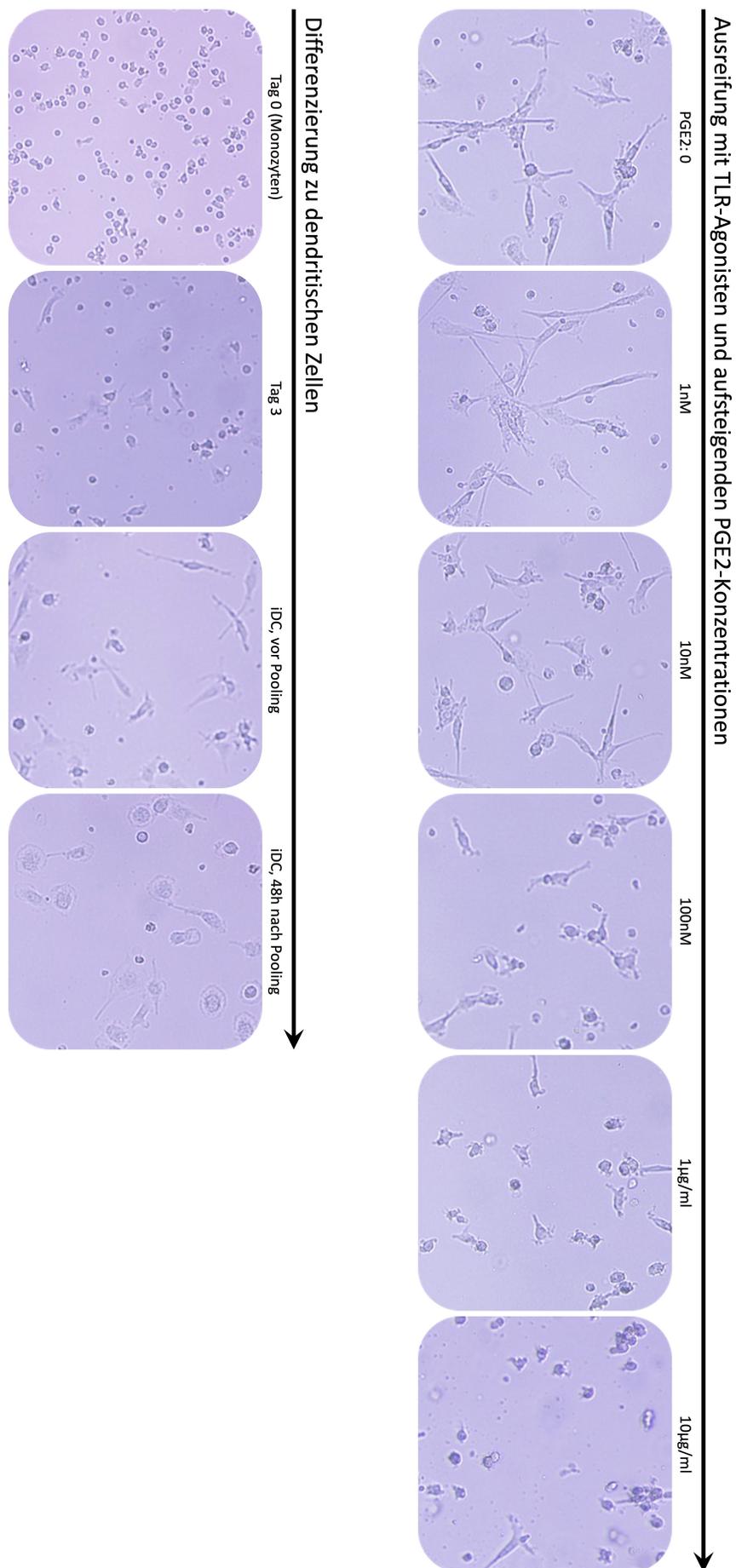
iDC als Negativkontrolle

48h nach Ablösen, Pooling und Wiederaussaat in Zellkultur sind die iDC wieder fest adhätent. Das Zytoplasma ist dabei in gleichmäßigem Abstand um den Zellkern verteilt, neue Dendriten haben sich kaum noch ausgebildet. Viele iDC präsentieren deshalb eine rundliche, spiegeleiförmige Morphologie.

TLR-Aktivierte DC mit Zusatz von PGE2

Bei alleinigem Einsatz der TLR-Liganden zeigt sich eine sehr feste Adhärenz der DC. Bis hin zu niedrigen PGE2-Konzentrationen haben sich sogar neue Dendriten als Zeichen der Zelladhärenz ausgebildet.

Bei höheren Konzentrationen PGE2 zeigen sich die DC jedoch zunehmend rundlicher mit konzentrierterem Zytoplasma als Zeichen einer verminderten Adhärenz. Bei sanften Bewegungen des Zellkulturgefäßes während der Mikroskopie bewegten diese sich zunehmend frei im Kulturmedium.



Grafik 4: Lichtmikroskopische Morphologie der DC auf dem Weg ihrer Differenzierung und Ausreifung

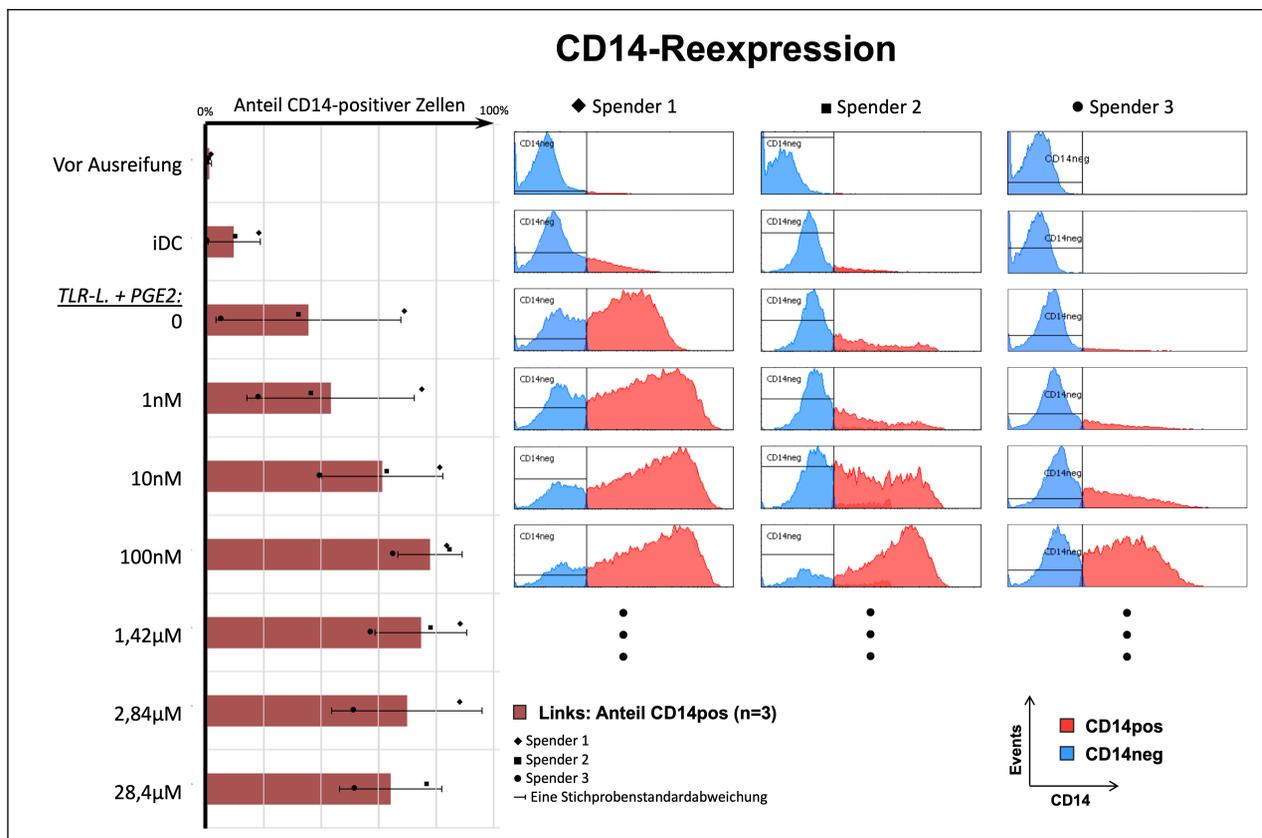
C.2 • Phänotypische Analyse mittels FACS

C.2.1 • Beschreibung zweier Subpopulationen

Zu Beginn der Ausreifungsphase zeigten die unreifen DC einen einheitlichen Phänotyp. CD14 war bei allen Spendern nicht mehr exprimiert. Die iDC zeigten kaum Positivität für CD80 und CD83, während CD86 und HLA-DR konstitutiv exprimiert wurden (**Grafiken 5 sowie 7 bis 10**).

Dieses Bild zeigte sich auch nach 48h bei den iDC, die als Negativkontrolle keine Stimulationscocktails erhalten hatten.

Bei Ausreifung mit TLR-Liganden und PGE2 zeigte sich wie bereits zuvor beobachtet^(16; 40) eine teilweise Positivität für CD14. Dabei zeigte sich eine zweigipflige Kurve: Während ein Teil der Zellen stets fortwährend einen Gipfel im CD14-negativen Bereich bildete, zeigte ein weiterer Teil eine CD14-Reexpression, die teils schon bei Zugabe der TLR-Agonisten einsetzte und bei PGE2-Zugabe konzentrationsabhängig bereits im nanomolaren Bereich weiter zunahm (**Grafik 5**).



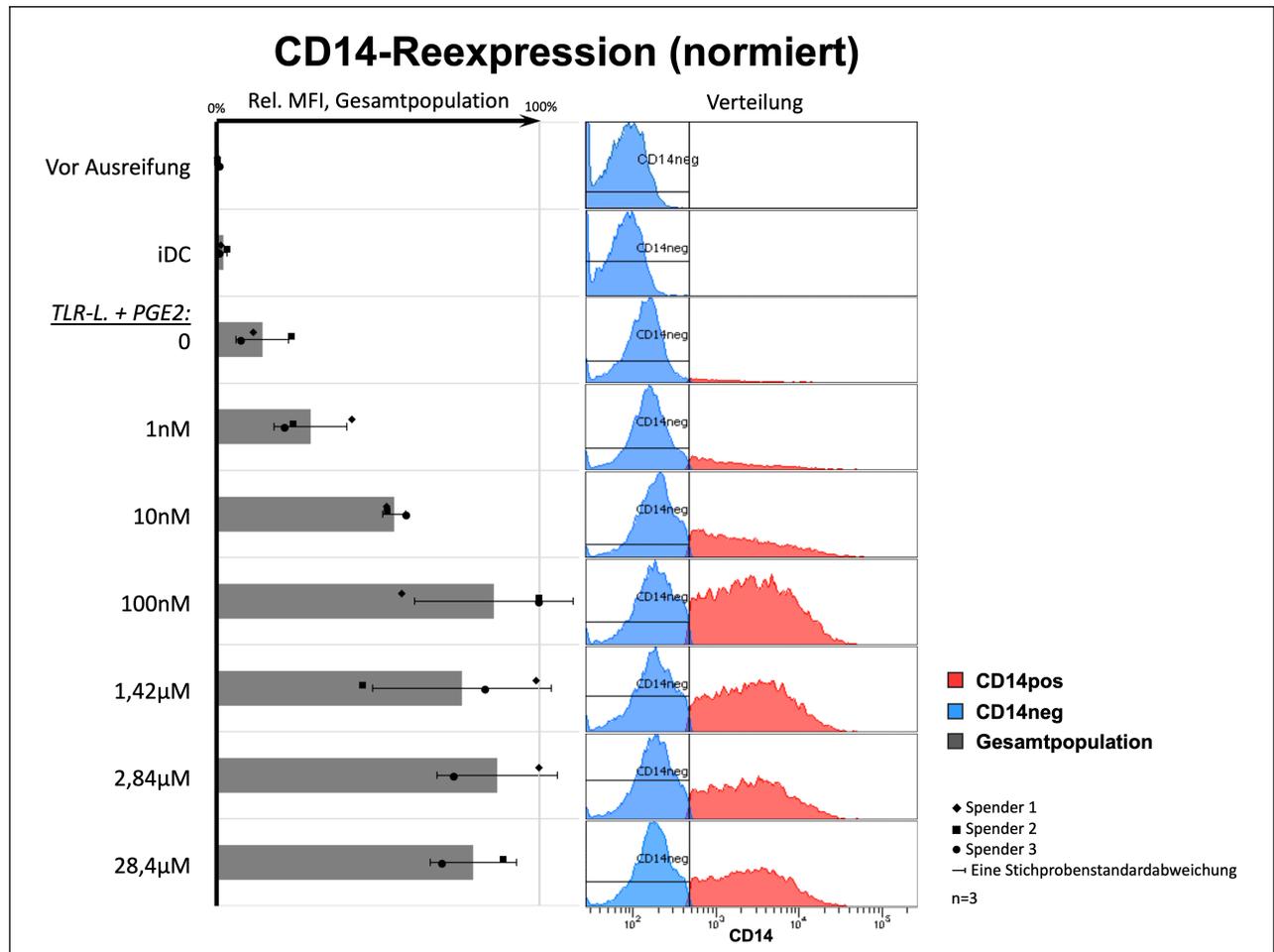
Grafik 5: CD14-Reexpression.

Links: Anteil CD14-positiver Zellen an der Gesamtpopulation (Messpunkte: Spender 1-3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung.)

Rechts: Verteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten für CD14 der einzelnen Spender. PGE2 führt zusammen mit einem TLR-Stimulus bis etwa 100nM konzentrationsabhängig zu einer CD14-Reexpression. Spenderabhängig präsentiert sich eine hohe interindividuelle Variabilität in der Tendenz, CD14 bereits durch alleinigen TLR-Stimulus zu re-exprimieren.

Die zuvor beobachtete^(16; 40) hohe interindividuelle Variabilität zwischen den Spendern zeigte sich auch hier: Die Spender zeigten jeweils eine individuelle, aber über die Versuchsbedingungen hinweg konstante Tendenz zu einer insgesamt unterschiedlich starken Verschiebung in Richtung der CD14-negativen oder der CD14-positiven Subpopulation (**Grafik 5, ebd.**)

Bei Betrachtung der normierten relativen MFI der Gesamtpopulation zeigte sich eine kongruente Tendenz aller Spender zur PGE2-konzentrationsabhängigen Heraufregulation von CD14 (**Grafik 6**).



Grafik 6: Re-Expression von CD14, konzentrationsabhängig induziert durch PGE2.

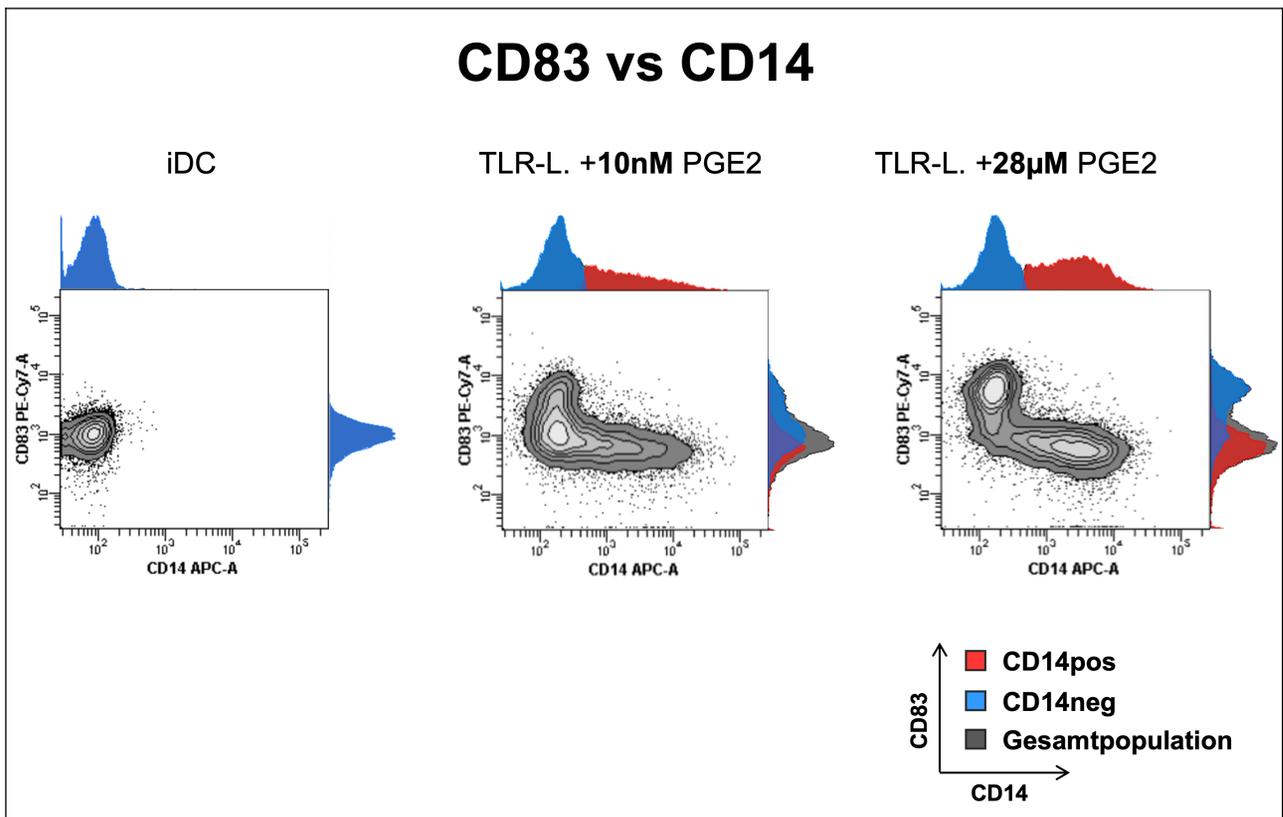
Links: Relative MFI-Werte der Gesamtpopulation für CD14 (Messpunkte: Spender 1-3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung.). Normiert auf jeweils den spenderspezifischen Maximalwert zeigt sich eine kongruente MFI-Zunahme bis etwa 100nM PGE2-Konzentration.

Rechts: Beispielhafte Verteilung der CD14-Fluoreszenz anhand eines Spenders (hier Spender 3), wie bereits in Grafik 5 abgebildet.

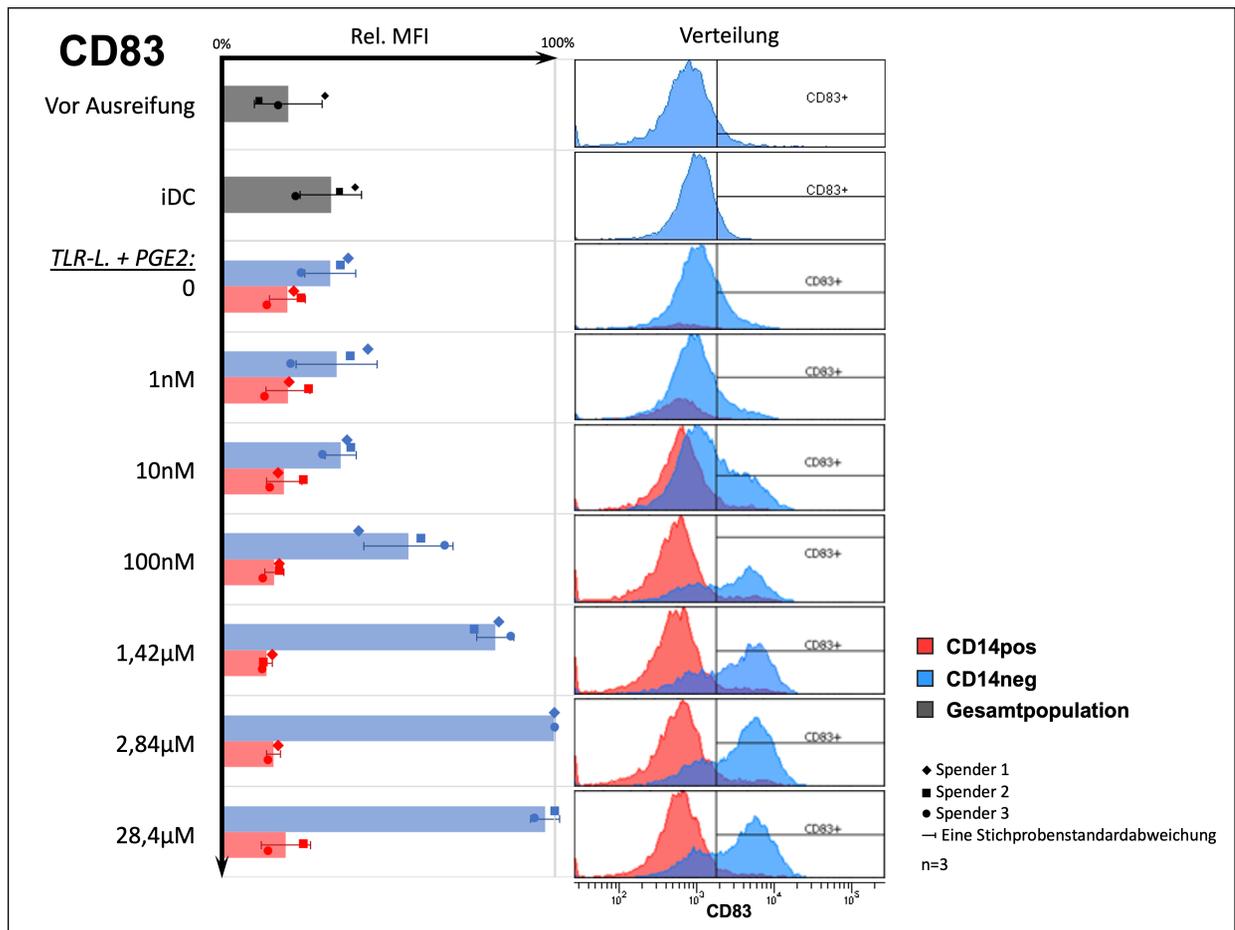
C.2.2 • Reifungsmarker-Analyse in den Hauptversuchsbedingungen

CD83

Die beiden anhand CD14 definierten Subpopulationen, CD14neg und CD14pos, zeigten ein grundlegend gegensätzliches Verhalten bezüglich der weiteren Markerexpression. In der CD14- Subpopulation zeigte sich etwa bei Betrachtung des Markers CD83 eine konzentrationsabhängige Zunahme bei PGE2-Zugabe (**Grafik 7**) - ein Phänomen, das spenderunabhängig bei PGE2-Konzentrationen oberhalb 10nM auftrat und ein Maximum erst im mikromolaren Bereich entfaltete (**Grafik 8**). Die CD14+ Subpopulation hingegen zeigte in keiner Bedingung erhöhte Werte für CD83, auch nicht nach Exposition mit PGE2.



Grafik 7: Gegenüberstellung von CD83 und CD14. Es kristallisieren sich zwei verschiedene Subpopulationen heraus, die sich bei zunehmenden PGE2-Konzentrationen zunehmend deutlich voneinander abgrenzen: Eine Population zeigt sich negativ für CD14 (blau) mit zunehmender Positivität für CD83, die andere verhält sich genau umgekehrt (rot). An den Rändern der Populationsdiagramme ist die jeweilige Verteilung der Subpopulationen dargestellt (Event-Counts je Fluoreszenzintensität).



Grafik 8: Expression des Reifungsmarkers CD83.

Links: Normierte MFI-Werte der beiden Subpopulationen (Messpunkte: Spender 1-3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung; blau: CD14-, rot: CD14+). Da bei den iDC noch keine CD14-Reexpression auftrat, hier Betrachtung der homogenen Gesamtpopulation für einen bestmöglichen Vergleich (grau).

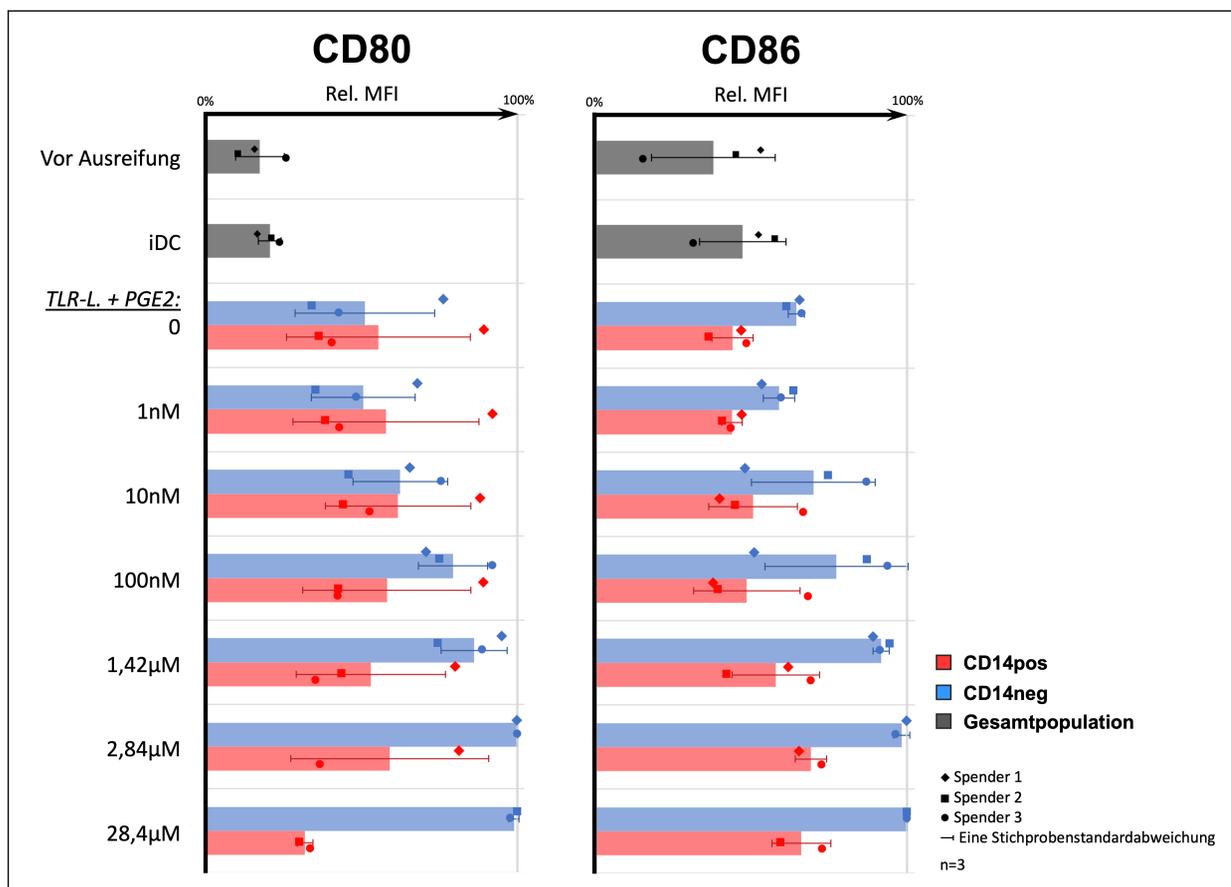
Rechts: Verteilung der CD83-Fluoreszenz, bezogen auf die beiden Subpopulationen, hier anhand Spender 3.

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Intensität für CD83 oberhalb von 10nM PGE2 auf CD14-negativen Zellen, während dieses auf CD14-reexprimierenden Zellen nicht induziert werden konnte.

Kostimulatoren CD80 und CD86

Ein gleiches Bild zeigte sich auch bei den für das T-Zell-Priming essentiellen Kostimulatoren (**Grafik 9**). Wie auch bei CD83 zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle beim konstitutiv exprimierten B7-Molekül CD86 eine PGE2-dosisabhängige Erhöhung der Intensität auf den CD14⁻ Zellen, während die Anderen die konstitutive Expression auch dieses Markers kaum verstärkten.

CD80, das konstitutiv kaum exprimiert wurde, wurde auf beiden Populationen bereits durch die TLR-Agonisten induziert. Eine Zugabe von PGE2 erhöhte auch hier weiterhin die Intensität des Markers in der CD14⁻ Subpopulation. Bei einem Spender zeigte sich auch eine Positivität in der CD14⁺ Subpopulation.



Grafik 9: Expression der Kostimulatoren, CD80 (links) und CD86 (rechts).

Normierte MFI-Werte der beiden Subpopulationen (Messpunkte: Spender 1-3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung; blau: CD14⁻, rot: CD14⁺). Da bei den iDC noch keine CD14-Reexpression auftrat, hier Betrachtung der homogenen Gesamtpopulation für einen bestmöglichen Vergleich (grau). Auf iDC findet sich eine konstitutive Expression von CD86. Bei TLR-Stimulus wurde auch CD80 verstärkt exprimiert. Für beide Kostimulatoren zeigt sich auf der CD14⁻negativen Subpopulation eine weitere dosisabhängige Expressionszunahme infolge einer PGE2-Exposition.

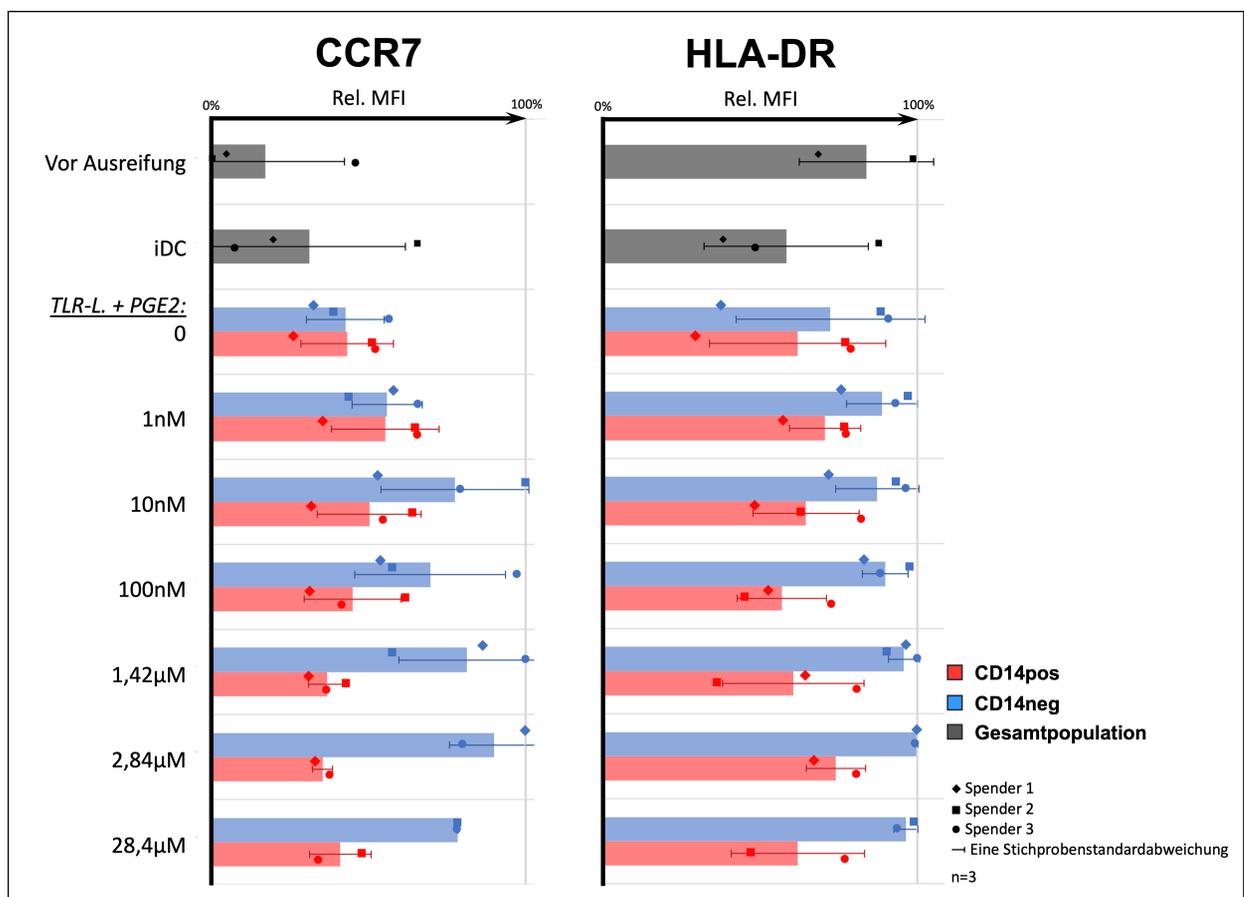
Chemokinrezeptor CCR7

Auch eine höhere Anfärbbarkeit des CCR7 zeigte sich bei Exposition mit zunehmenden Konzentrationen PGE2 auf der CD14- Subpopulation, während die CD14+ Subpopulation keine stärkere Expression zeigte (**Grafik 10**).

Durch seine geringe Expressionsdichte und der damit einhergehenden schwächeren Sensitivität der Durchflusszytometrie für den Marker CCR7 zeigte sich bei den relativen Intensitäten eine größere Schwankungsbreite als für andere Oberflächenmarker.

HLA-DR

Beim Marker HLA-DR zeigten die mit TLR-Agonisten ausgereiften CD14- Zellen ebenfalls eine höhere Intensität als die CD14+ Subpopulation, neben einer bereits bei iDC vorhandenen konstitutiven Expression. Eine Korrelation der Markerintensität mit der zugesetzten PGE2-Konzentration ließ sich bei HLA-DR nicht beobachten (**Grafik 10**).



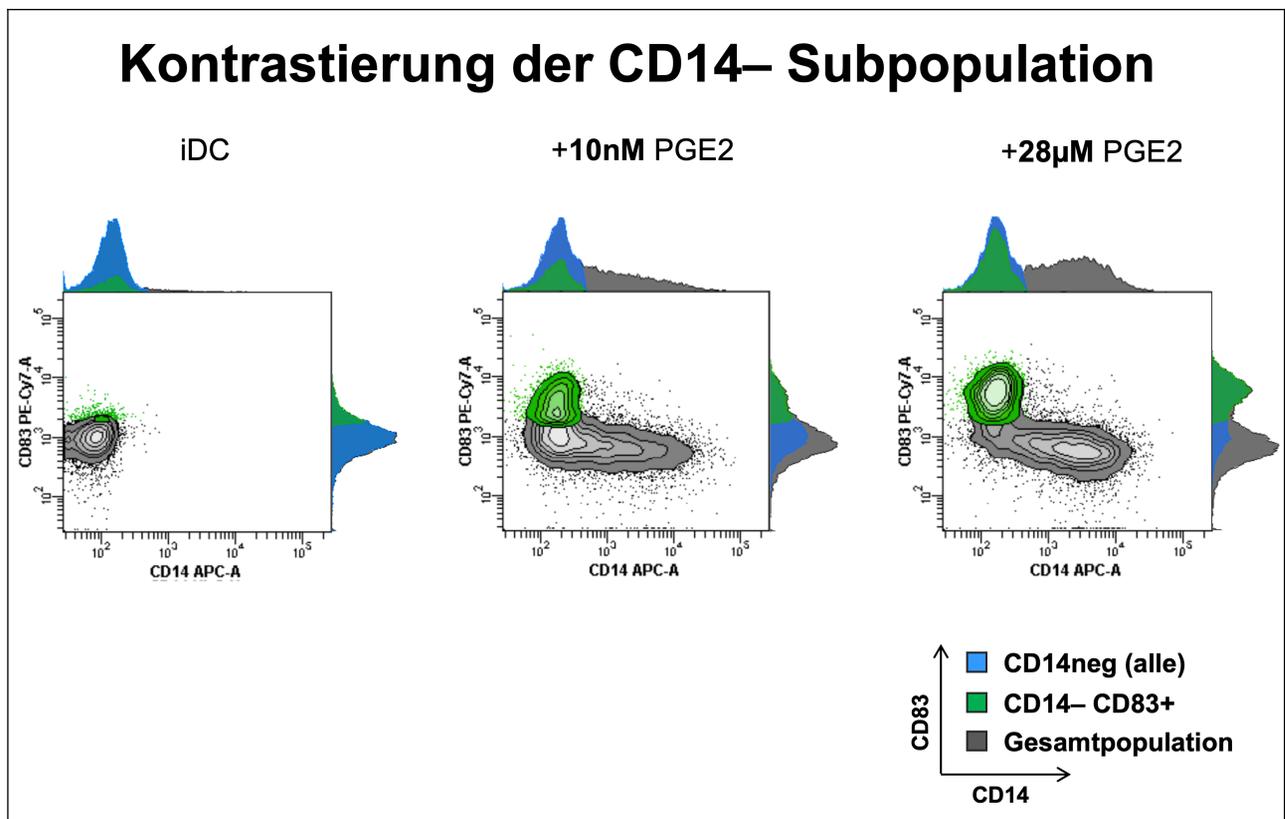
Grafik 10: Expression des CCR7 (links) und HLA-DR (rechts).

Normierte MFI-Werte der beiden Subpopulationen (Messpunkte: Spender 1-3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung; blau: CD14-, rot: CD14+). Da bei den iDC noch keine CD14-Reexpression auftrat, hier Betrachtung der homogenen Gesamtpopulation für einen bestmöglichen Vergleich (grau). Bei Exposition mit PGE2 zeigt sich dosisabhängig für den Reifungsmarker CCR7 eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf der CD14-negativen Subpopulation. Auch HLA-DR weist auf diesen Zellen die höhere Expressionsdichte auf, jedoch ohne deutliche Korrelation mit der PGE2-Exposition.

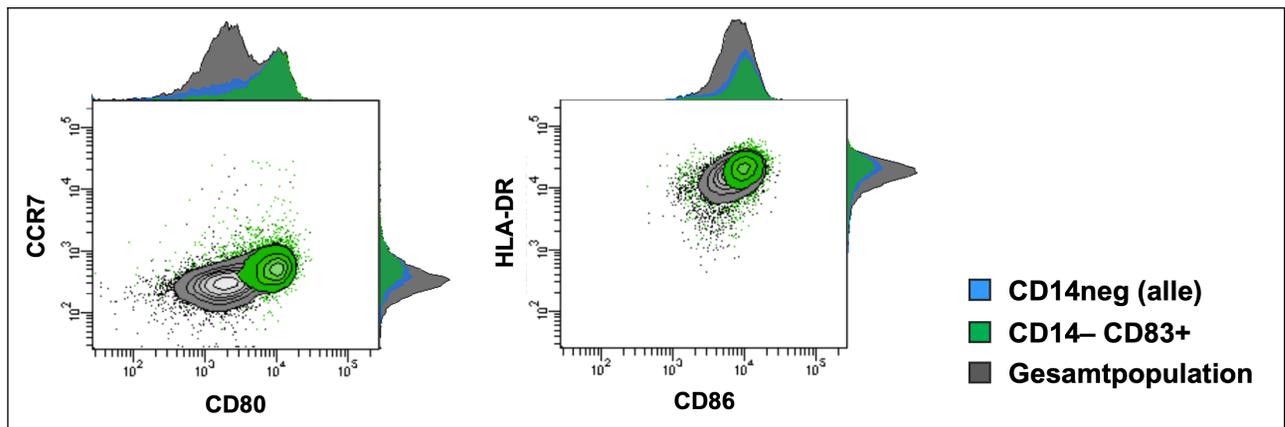
Kontrastierung der CD14- Subpopulation

Das hier ersichtliche Bild zeigt eine CD14- Subpopulation, die verstärkt Reifungsmarker exprimiert, und eine CD14+ Subpopulation, die diese nicht heraufreguliert. Noch deutlicher ersichtlich wird dieser Effekt, wenn einem Anteil indifferenter Zellen Rechnung getragen wird, die weder den einen noch den anderen Weg eindeutig einschlagen und Reifungsmarker wie CD83, oder aber CD14, nur so schwach ausprägen, dass sie sich keiner der beiden Subpopulationen eindeutig zuordnen lassen (**Grafik 7**). In den bisherigen Grafiken waren diese stets den CD14- Zellen (blau dargestellt) zugeordnet.

Weiter schärfen ließe sich diese Kontrastierung, indem CD83+CD14- Zellen abgegrenzt werden (**Grafik 11**). Diese weisen für alle untersuchten Reifungsmarker außer CD14 die höchsten Intensitäten auf und grenzen sich somit nochmals schärfer von den CD14+ Zellen ab (**Grafik 12**). Möglich ist diese Unterscheidung allerdings nur bei einer vorhandenen CD83-Expression, welche erst bei höheren PGE2-Konzentrationen zu beobachten ist (**Grafik 8**).



Grafik 11: Abgrenzung einer CD14-negativen Population mit Positivität für CD83 (grün), um diese von indifferenten Zellen abzugrenzen, welche keinen der Marker tragen. Blau: Alle CD14-negativen Events



Grafik 12: Die abgegrenzten CD14- CD83+ Zellen zeigen auch für die weiteren untersuchten Reifungsmarker die höchsten Intensitäten (Versuchsbedingung mit TLR-Agonisten und 28µM PGE2).

C.2.3 • Zusätzliche Kontrollbedingungen

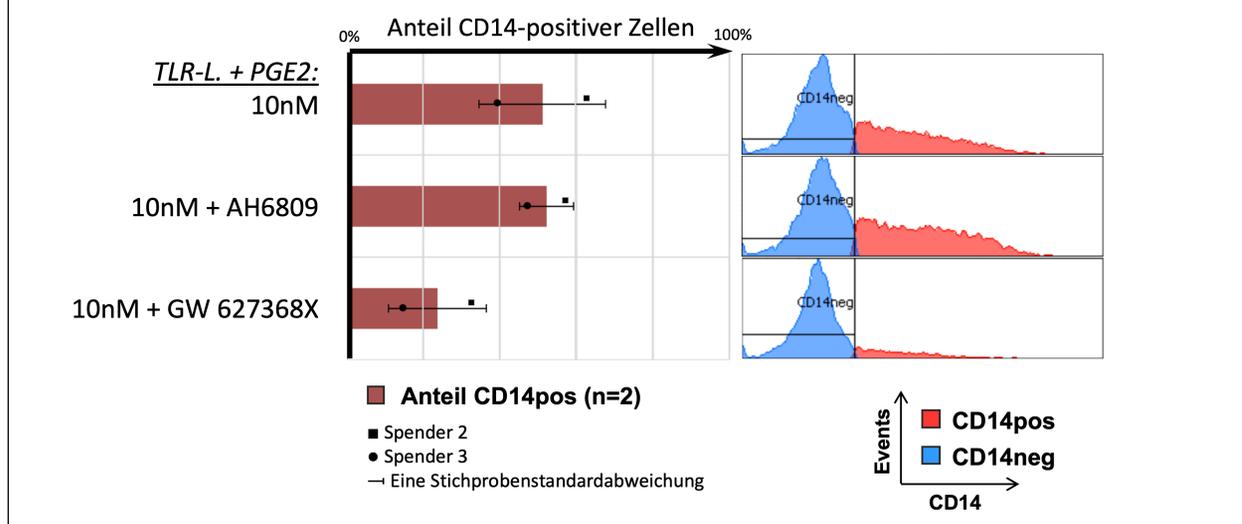
Neben diesen Beobachtungen aus den Hauptversuchen wurden einige zusätzliche Einzelversuche durchgeführt, um weitere Details von Interesse näher zu beleuchten. Obwohl sie nicht in direktem Zusammenhang mit der Frage nach konzentrationsabhängigen Effekten von PGE2 stehen, bieten sie einige Impulse von Interesse für die Interpretation der o.g. Ergebnisse. Auf eine naturgemäß reduzierte Aussagekraft von Einzelmessungen sei dabei stets verwiesen.

Blockade von PGE2-Rezeptoren

Zunächst interessierte als zusätzliche Kontrollbedingung, welchen Effekt eine Blockade der Rezeptoren EP2 und EP4 auf die CD14-Reexpression haben würde. Hierfür wurde bei zwei der Spender eine zusätzliche Kontrolle untersucht, bei der eine selektive Rezeptorenblockade von EP2 und EP4 bei 10nM PGE2 und TLR-Stimulus vorgenommen wurde.

Eine Zugabe des Rezeptorenblockers GW 627368X gegen EP4 führte bei beiden Spendern zu einer Reversierung der CD14-Reexpression. Die Antagonisierung von EP2 sowie von EP1 und EP3 durch AH6809 konnte dagegen hierauf keinen relevanten Effekt zeigen (**Grafik 13**). Eine Untersuchung von CD83 war hier obsolet, da dieser Marker noch nicht bei 10nM PGE2 induziert wurde.

CD14-Reexpression unter Rezeptorenblockade (10nM PGE2)



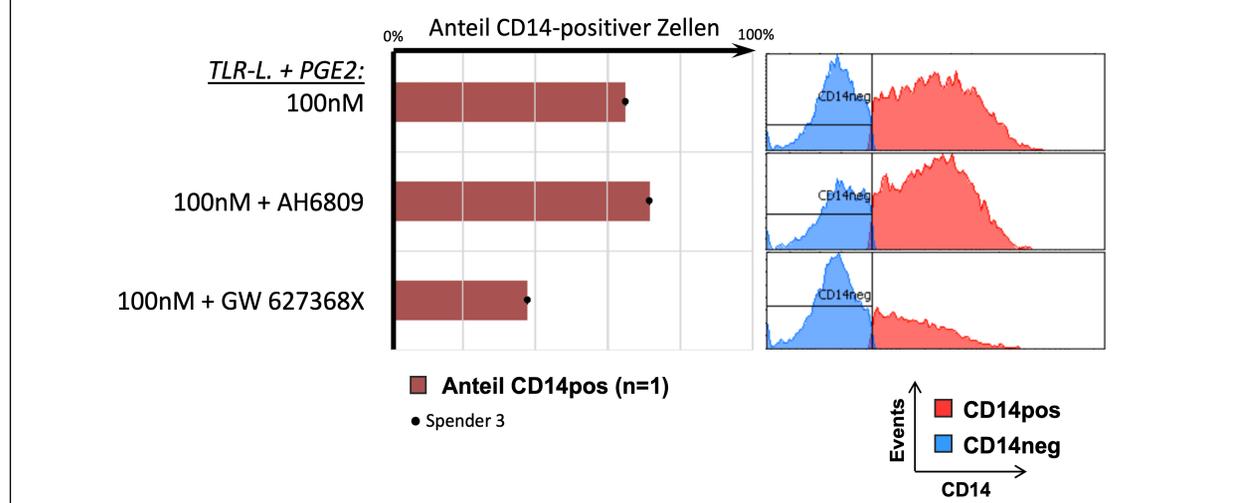
Grafik 13: Reversierung der CD14-Reexpression durch EP4-Blocker GW 627368X. In diesem Einzelversuch zeigt er im Gegensatz zum Antagonisten der Rezeptoren EP-1,2 und -3, AH6809, je zu 10 μ M zugegeben, einen deutlichen Rückgang CD14-reexprimierender Zellen unter 10nM PGE2-Exposition mit den TLR-Agonisten.

Links: Prozentualer Anteil CD14-reexprimierender Zellen (Messpunkte: Spender 2 und 3, siehe Legende; Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Je Richtung eine Stichprobenstandardabweichung).

Rechts: Verteilung der CD14-Intensität, hier anhand Spender 3.

Da der weniger affine Rezeptor EP2 möglicherweise erst bei höheren PGE2-Konzentrationen einen sichtbaren Effekt bewirkt, wurde bei einem Spender diese Kontrollbedingung zusätzlich auch für 100nM PGE2 angesetzt. Es zeigte sich auch hier nur bei Blockade von EP4 eine Antagonisierung der CD14-Reexpression (**Grafik 14**).

CD14-Reexpression unter Rezeptorenblockade (100nM PGE2)



Grafik 14: Blockade von EP4 wirkt auch bei 100nM inhibierend auf die CD14-Reexpression, nicht jedoch Blockade von EP2.

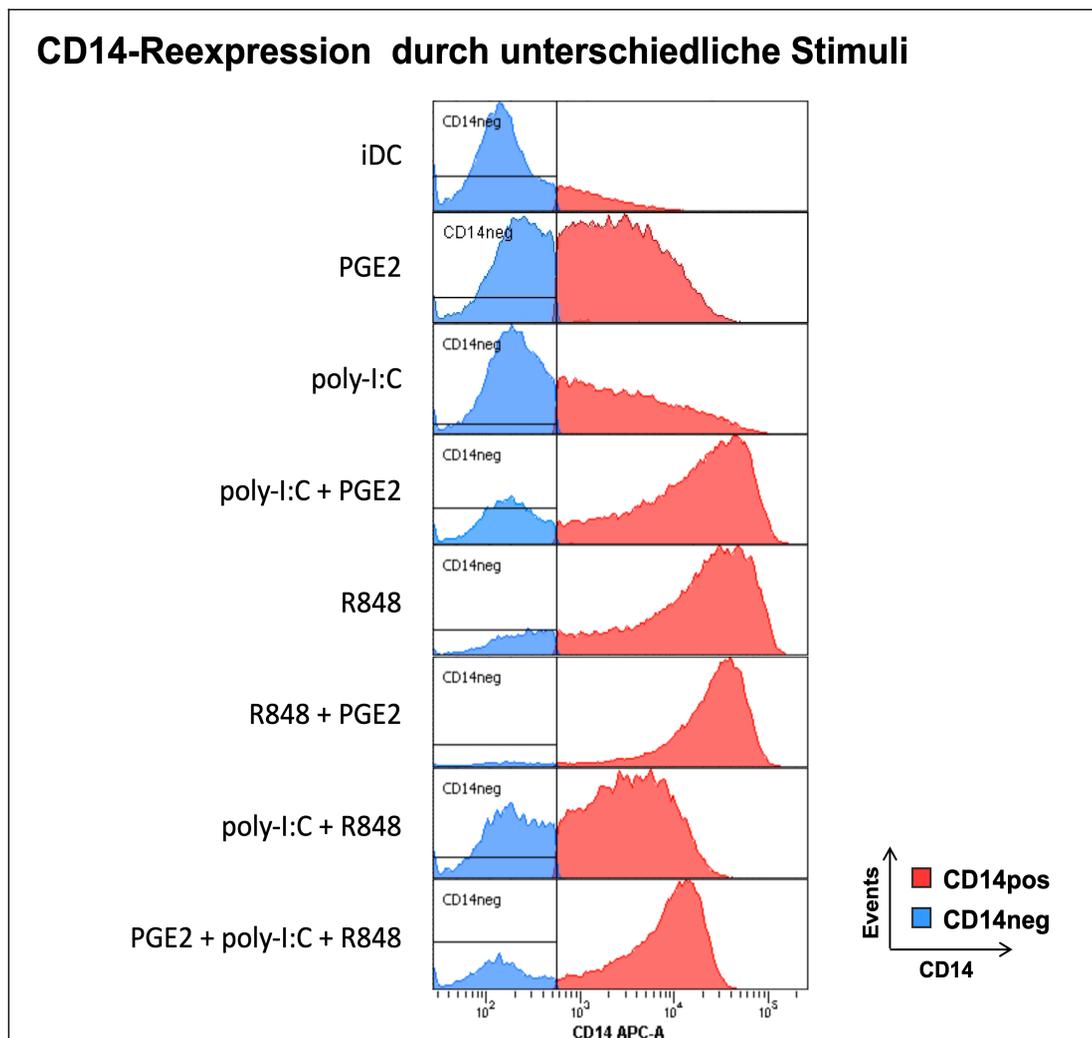
Zur Aussagekraft dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dieser Messung um einen einzelnen Zusatzversuch handelt (n=1, Spender 3).

Links: Prozentualer Anteil CD14-reexprimierender Zellen.

Rechts: Verteilung der CD14-Intensität.

Untersuchung einzelner Bestandteile des Ausreifungscocktails

Da ferner die intrinsischen Effekte der einzelnen Bestandteile des Ausreifungscocktails, poly-I:C, R848, und PGE2 in der höchsten Konzentration (10µg/ml) auf die CD14-Reexpression interessierten, wurde ein Einzelversuch unternommen, bei dem die iDC jeweils mit keinem, einem, zwei oder allen drei der Bestandteile inkubiert wurden. Bei dieser Messung führten alle drei Bestandteile synergistisch zur CD14-Reexpression, wobei neben PGE2 insbesondere auch R848 eine starke Rolle spielte. Für die Relevanz dieser Beobachtung sei auf Kapitel D.2 in der Diskussion verwiesen.



Grafik 15: CD14-Reexpression durch die unterschiedlichen Bestandteile des Ausreifungscocktails. Einzelversuch (n=1).

D • Diskussion

D.1 • Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich zwei wichtige Schlüsse über dichotome Effekte von PGE2 im TLR-basierten Cocktail auf die Ausreifung von Monozyten zu aktivierten dendritischen Zellen ziehen, die für die Herstellung moDC-basierter Tumorstoffe von Bedeutung sind.

Effekte von PGE2 auf den Phänotyp reifer CD14- moDC

Zum Einen zeigte sich bei allen Spendern auf reifen CD14-negativen dendritischen Zellen wie erwartet bei Zugabe von PGE2 zu den TLR-Agonisten eine Zunahme der Reifungsmarker CD83, CD80 und CD86, sowie CCR7. Bei HLA-DR zeigte sich eine konstitutive Expression bereits auf iDC mit Erhöhung durch einen TLR-Stimulus, die sich jedoch durch PGE2 nicht mehr in erheblichem Maß steigern ließ.

Die Zunahme der Kostimulatoren CD80 und CD86 setzte bei PGE2-Konzentrationen oberhalb von 10nM ein und erreichte ihr Maximum jeweils erst im unteren µM-Bereich. CD80 zeigte zunächst eine Negativität auf iDC, während CD86 ebenfalls bereits auf iDC konstitutiv exprimiert wurde. Neben einer leichten Zunahme beider Marker durch ein TLR-Signal induzierte erst die Exposition mit PGE2 eine deutliche Erhöhung der Expressionsdichte. Nur bei einem Spender genügte für CD80, nicht jedoch CD86, auch bereits ein TLR-Stimulus zur Ausprägung einer deutlichen Markerzunahme.

CD83, das sich auf iDC und auch nach TLR-Aktivierung negativ zeigte, erreichte bei allen Spendern erst durch Zugabe von PGE2 eine Positivität. Dieser Effekt setzte erst oberhalb von 10nM ein und erreichte sein Maximum dabei ebenfalls im niedrigen µM-Bereich.

Diese Beobachtungen stimmen mit bisherigen Erkenntnissen überein⁽¹⁶⁾ und zeigen nun auch die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von PGE2. Bei den für die Herstellung DC-basierter Vakzine eingangs diskutierten niedrigeren, hochphysiologischen Alternativdosierungen um 100nM^(16; 24) PGE2 zeigte sich bereits ein sichtbarer Effekt auf alle untersuchten Reifungsmarker, der jedoch bei noch höheren Konzentrationen zu einer weiteren Steigerung derer Intensitäten führte. Würde PGE2 daher für die In-vitro-Maturierung von DC in niedrigeren Konzentrationen bis 100nM eingesetzt, ließe sich damit hinsichtlich eines reifen Phänotyps zwar bereits ein positiver Effekt erreichen, der jedoch noch unterhalb seiner maximal erreichbaren Ausprägung läge.

Induktion einer weiteren, CD14+ Population

Zum Anderen zeigen die vorliegenden Ergebnisse jedoch auch einen gleichzeitigen, unerwünschten Effekt von PGE2: Die konzentrationsabhängige Induktion einer zweiten, CD14+ CD83- Population.

Während bereits die TLR-Stimulation zur Ausprägung dieses Effektes führte, konnte PGE2 den prozentualen Anteil CD14-reexprimierender Zellen weiter konzentrationsabhängig steigern. Schon bei niedrigen Konzentrationen ließ sich dies beobachten, und ein Maximum wurde bereits bei 100nM PGE2 gemessen. In zusätzlichen Messungen konnte dieser Effekt durch Blockade des hochaffinen EP4-Rezeptors, nicht jedoch des EP2-Rezeptors, aufgehoben werden.

Die CD14+ Subpopulation zeigte nach TLR-Aktivierung in etwa eine gleiche Intensität für die Marker CCR7, CD80 und HLA-DR wie die reifen CD14- DC, während CD86 nicht über das Niveau der konstitutiven Expression hinaus und CD83 sogar in geringerer Intensität als auf iDC exprimiert wurde. Bei keinem der Marker außer CD14 bewirkte die Zugabe von PGE2 auf dieser Subpopulation eine darüber hinausgehende Veränderung.

Interesse weckt nun insbesondere die Bedeutung dieser zweiten Subpopulation für die Herstellung DC-basierter Vakzine.

D.2 • Die Rolle der CD14+ Subpopulation

Bisherige Beobachtung im untersuchten Ausreifungscocktail

Bei vorangegangenen Untersuchungen zum verwendeten Ausreifungscocktail wurde ebenfalls eine Proportion CD14+ Zellen nach Ausreifung festgestellt^(16; 40), die eine schlechtere Markerausprägung zeigte und einen nicht unerheblichen Anteil von bis zu 46% der Gesamtzellen ausmachte, welcher auch hier von Spender zu Spender stark variierte⁽⁴⁰⁾. In den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit variierte dieser Anteil nach Inkubation mit TLR-Liganden und verschiedenen Konzentrationen PGE2 sogar zwischen 4,9% bis hin zu 88,3%.

In den genannten Quellen wurde die CD14-Positivität als residuelle Expression gedeutet. Die vorliegenden Ergebnisse mit Pooling und Messung vor der Ausreifung konnten nun zeigen, dass im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zu Beginn der Ausreifung CD14 auf der Gesamtpopulation homogen herabreguliert war, dann jedoch während der Inkubation mit den Ausreifungscocktails wieder auf einem Teil der Zellen re-exprimiert wurde.

Ein wesentliches Charaktermerkmal der beiden entstehenden Subpopulationen ist die spenderabhängige Variabilität ihrer prozentualen Verteilung. Bisher wurde üblicherweise die Gesamtpopulation aller Zellen untersucht^(4; 9; 11; 16; 22). Die vorliegenden Ergebnisse legen jedoch nahe, dass aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens beide entstehenden Subpopulationen, sowie auch ihre prozentuale Verteilung, stets wie hier geschehen getrennt voneinander beleuchtet werden sollten, um eine aussagekräftige Beschreibung des jeweiligen Verhaltens der verschiedenen Zellen liefern zu können. Auf diese Weise entsteht ein differenziertes Ergebnis, das nicht durch einen unerwartet hohen Anteil der CD14+ Subpopulation verfälscht wird. Ein möglichst niedriger Anteil CD14+ Zellen im Endprodukt könnte dabei möglicherweise, so legen es die untersuchten Reifungsmarker nahe, für eine höhere Qualität des Produktes als DC-Vakzine sprechen.

CD14 auf dendritischen Zellen

Nach Ausreifung klassischer Monozyten mit GM-CSF und IL-4 werden CD14-negative dendritische Zellen erwartet⁽⁶⁾, welche zu Beginn der Ausreifung im Rahmen dieser Arbeit bei allen Spendern vorlagen. In der Literatur sind zwar durchaus auch reife funktionskompetente CD14+ DC beschrieben, die beispielsweise im Rahmen von rheumatoider oder psoriatischer Arthritis auftreten⁽⁴¹⁾.

Anstatt reifer monozytenderivierter dendritischer Zellen ist jedoch trotz Inkubation mit GM-CSF und IL-4 auch noch die Entwicklung hin zu anderen Zelltypen möglich, die CD14 re-exprimieren und um die es sich in den vorliegenden Ergebnissen handeln könnte.

Tatsächlich wurde das hier beschriebene Phänomen mit Re-Expression von CD14 auf einem Teil, sowie CD83 auf dem anderen Teil der Zellen, auch in einer Studie von *Krakov et al.* beobachtet und die CD14+ Subpopulation dabei näher beleuchtet⁽⁴²⁾. Dort führte nach der Differenzierungsphase mit GM-CSF und IL-4 ebenfalls ein TLR-Stimulus zur Ausbildung der beiden Subpopulationen, insbesondere wenn die Zellen kurz zuvor mit IL-10 vorinkubiert wurden. Ein TLR-Stimulus alleine führte zwar auch dort bereits zu einer geringen CD14-Reexpression, doch erst IL-10 konnte diesen Effekt in eine starke Ausprägung potenzieren. Wie sich auch im Rahmen einer Einzelmessung in dieser Arbeit bestätigte (Seite 42), zeigte R848 dabei eine größere Wirkung auf die CD14-Reexpression als poly-I:C.

Während die CD14- CD83+ Subpopulation dort als aktivierte DC identifiziert wurde, präsentierte sich die CD14+ CD83- Subpopulation als makrophagenähnliche Zellen mit immunomodulatorischem Phänotyp, ähnlich tolerogener DC oder CD14+ *MDSC* (myeloid-derivierter Suppressorzellen, siehe Seite 11 f.). CD14 wurde auch in den dortigen Beobachtungen de novo re-exprimiert, nachdem der Marker zuvor komplett im FACS erloschen war. Auch *Krakov et al.* empfahlen aufgrund ihrer Ergebnisse, anstelle der Gesamtpopulation bei der Analyse monozytenderivierter Zellen die einzelnen entstehenden Subpopulationen anhand der Marker CD14 und CD83 zu distinguieren und getrennt voneinander zu analysieren.⁽⁴²⁾

Entstehung und Funktion von MDSC

MDSC, die eingangs bereits im Rahmen der Tumor-Immunresistenzmechanismen beleuchtet worden sind, sind eine sehr heterogene Gruppe von unreifen Zellen mit potenter immunsupprimierender Wirkung. Sie lassen sich hauptsächlich in die Gruppe der monozytären (*M-MDSC*) und granulozytären bzw. polymorphonukleären (*PMN-MDSC*) MDSC unterteilen. Im Gegensatz zu ihrer Funktion weisen sie phänotypisch nur sehr geringe Unterschiede zu funktionell kompetenten Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten auf. M-MDSC charakterisieren sich im Wesentlichen durch eine geringere Expression von HLA-DR als Monozyten, während für PMN-MDSC als Unterscheidungsmarker der Rezeptor LOX-1 diskutiert wird^(43; 44).

Funktionell wirken MDSC insbesondere auf T-Zellen inhibierend. Zu ihren Wirkmechanismen zählen dazu neben Zytokinen und Rezeptorliganden auch Enzyme, sowie reaktive Stick- und Sauerstoffspezies, mit denen etwa TCR und T-Zell-Chemokine unbrauchbar gemacht werden.⁽⁴³⁾ Eines der Zytokine, das von MDSC freigesetzt wird, ist IL-10⁽⁴⁵⁾, welches wie geschildert seinerseits die Ausbildung von MDSC bewirken kann⁽⁴²⁾.

In vivo entstehen MDSC bei chronischen Inflammationsgeschehen, um einer überschießenden Immunreaktion vorzubeugen und die Selbsttoleranz aufrecht zu erhalten. Dafür sind zwei Signale⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ erforderlich: Zuerst wird nach der Expansion unreifer Zellen⁽⁴⁴⁾ deren terminale Differenzierung in funktionell kompetente myeloide Immunzellen inhibiert^(43; 45), anschließend führt ein proinflammatorischer Reiz zur Stimulation der Zellen, die sie vom unreifen Zustand vollends in MDSC konvertiert.⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ Dies bedeutet wiederum keine eigenständige Ausdifferenzierung, vielmehr wird die heterogene Gruppe der MDSC als unreife Zellen in pathologischem Aktivierungszustand angesehen^(44; 46). Eine weitere Ausdifferenzierung hin zum Phänotyp von etwa Makrophagen oder DC ist möglich, die dann jedoch weiterhin tolerogen wirken^(46; 47). Ein wichtiges Beispiel sind im onkologischen Kontext die eingangs beleuchteten Tumor-assoziierten Makrophagen (*TAM*, Seite 11 f.).

MDSC in den monozytären Ausgangszellen

Hinsichtlich der Generierung von therapeutischen moDC-basierten Vakzinen im tatsächlichen klinischen Einsatz bei Tumorpatienten wurde auch das Phänomen beobachtet, dass unabhängig von der DC-Generierung bereits zu Beginn der Zellkultur eine Proportion dysfunktionaler monozytärer Zellen im Sinne von M-MDSC vorliegen kann, charakterisiert als CD14+ Zellen mit niedriger oder keiner HLA-DR-Expression und immunsupprimierendem Phänotyp^(47; 48). In einer Studie von *Poschke et al.* konnten zwar auch diese mit GM-CSF und IL-4 den Marker HLA-DR wieder heraufregulieren und ließen sich vor Beginn der DC-Ausreifung nicht mehr sicher von funktionalen iDC unterscheiden. Im fertigen Produkt mit reifen DC jedoch hatten sie nicht nur selbst eine schlechtere Funktion und Phänotyp, sondern wirkten auch inhibitorisch auf die Funktion der reifen DC und kompromittierten dadurch die Wirksamkeit des Vakzins. Während diese Studie bei Tumorpatienten durchgeführt wurde, die zu Beginn der Ausreifung unterschiedliche Proportionen der MDSC aufwiesen,⁽⁴⁷⁾ sind diese andererseits bei gesunden Donatoren nicht zu erwarten⁽⁴³⁾. Als wahrscheinlichere Erklärung für das starke, spendervariable Vorkommen der CD14+ Subpopulation in dieser und auch erwähnter vorheriger^(16; 40) Arbeit kommen daher andere Ursachen als ein bereits initiales Vorliegen von MDSC infrage.

PGE2 und MDSC

In den hier durchgeführten Versuchen fand, anders als bei *Krakov et al.*, keine Vorinkubation mit IL-10 als ein mögliches erstes Signal zur MDSC-Entstehung statt. Dennoch führte auch hier ein TLR-Stimulus zur phänotypischen Ausbildung der dort

beschriebenen Subpopulationen. Anstelle einer IL-10-Exposition zeigte sich durch Zugabe von PGE2 konzentrationsabhängig eine noch weitere Zunahme der CD14+ Population.

Prostaglandin E2 ist nicht nur einer der Wirkmediatoren, die von MDSC ausgeschüttet werden können⁽⁴⁶⁾. Ähnlich wie IL-10 spielt es auch eine entscheidende Rolle bei ihrer Entstehung. Insbesondere wurde von *Obermajer et al.*⁽⁴⁵⁾ ein positiver Feedbackmechanismus zwischen PGE2 und der Umwandlung funktioneller Monozyten in einen MDSC-Phänotyp beschrieben.

Viele der hieran beteiligten Faktoren, wie PGE2 selbst, induzieren in den Präkursoren der MDSC die Cyclooxygenase COX2, das Schlüsselenzym der Biosynthese von PGE2. Dies führt zu autokriner PGE2-Sekretion und einem positiven Feedbackmechanismus, der die Differenzierung zu MDSC weiter vorantreibt und auch einen einmal etablierten funktionellen MDSC-Phänotyp aufrechterhält.⁽⁴⁵⁾

Vermittelt durch diesen Mechanismus konnte gezeigt werden, dass PGE2 für die Induktion von MDSC aus unreifen oder sich differenzierenden dendritischen Zellen nicht nur erforderlich ist, sondern bereits alleine ausreicht.⁽⁴⁹⁾

Soweit es sich, vorbehaltlich einer hierzu durchzuführenden funktionellen Analyse, bei der beobachteten CD14+ Subpopulation auch im Rahmen dieser Arbeit funktionell um MDSC handelt, kann dieser Mechanismus ihre starke Zunahme bei PGE2-Exposition erklären.

Pooling von DC vor der Ausreifung

Noch immer verbleibt die Frage, ob es bei den Versuchen noch ein weiteres, erstes Signal außer PGE2 zur Induktion etwaiger MDSC gegeben haben könnte, anstelle etwa einer Vorinkubation mit IL-10 wie bei *Krakov et al.*⁽⁴²⁾ Zu diskutieren ist in dieser Hinsicht insbesondere die Frage, warum der prozentuale Anteil der CD14+ Subpopulation in den Versuchen dieser Arbeit mit bis zu 88,3% nochmals erheblich höher lag als in vorangegangenen Versuchen, bei denen ihr Anteil 46% nicht überstiegen hatte⁽⁴⁰⁾.

Ein besonderes Augenmerk darf darauf gelegt werden, dass in dieser Arbeit vor Beginn der Ausreifung der iDC nach etabliertem Protokoll⁽³²⁾ ein Pooling der Zellen stattfand. Die adhärennten Zellen wurden hierfür nach dort beschriebener Methodik unter Kühlung von den Zellkulturgefäßen abgelöst und gezählt, bevor sie in jeweils gleicher Zelldichte mit den Ausreifungsmedien der jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert wurden.

Ein wesentlicher Vorteil des angewandten Pooling bestand darin, dass alle Versuchsbedingungen mit derselben homogenen Ausgangs-iDC-Population in identisch eingestellter Zelldichte durchgeführt wurden, deren Phänotyp vor Ausreifung bestimmt werden und anschließend mit den ausgereiften Zellen verglichen werden konnte. Auf diese Weise konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das Auftreten von CD14 bei den Versuchen dieser Arbeit in allen Fällen auf eine Re-Expression zurückzuführen war und es sich dabei nicht um eine residuelle Expression, etwa durch ausbleibende Differenzierung, handelte.

Trotz der etablierten Vorgehensweise⁽³²⁾ gilt es zu diskutieren ob durch das Pooling möglicherweise Veränderungen an den Zellen ausgelöst werden könnten, die deren späteres Verhalten beeinflusst.

Die Adhärenz an die umgebende Matrix beeinflusst Signalkaskaden innerhalb der Zellen⁽⁴⁵⁾. Adhäsionsrezeptoren sind dabei typischerweise in integrin-assoziierten Adhäsionskomplexen zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix organisiert, die sich durch eine große Vielfalt auszeichnen und auf unterschiedliche Signalwege wirken können^(50; 51). Durch mechanische Stimulation können Zellen wiederum außerdem zur Freisetzung von *ATP* angeregt werden, das an purinerge Rezeptoren binden und darüber unterschiedliche Wirkungen u.a. auf Differenzierungswege und sonstiges Verhalten der Zellen ausprägen kann⁽⁵²⁾. Studien an Mäusen haben insbesondere eine stimulierende Wirkung von extrazellulärem ATP auf monozytäre MDSC gezeigt, vermittelt durch deren membranständigen P2X7-Rezeptor^(53; 54).

Auch Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum (*ER*) verfügen über Stressrezeptoren, die etwa bei dessen Membranschädigung aktiviert werden.⁽⁵⁵⁾ In murinen Krebsmodellen konnte gezeigt werden, dass auch die Erzeugung von ER-Stress zu einer Expansion von MDSC führt⁽⁵⁶⁾.

Das angewandte Protokoll enthält somit durchaus einen Schritt, bei dem die iDC an einem vulnerablen Zeitpunkt mechanischem Stress ausgesetzt wurden. Da dieses Verfahren schwer zu standardisieren ist, könnten die Zellen der verschiedenen Spender jeweils ungleichen mechanischen Wirkungen exponiert gewesen sein. Korrelierend dazu zeigte sich auch hinsichtlich des Gesamtbestrebens, CD14 zu re-exprimieren, nach 48h Ausreifung eine spenderbezogene Variabilität.

Das Pooling sollte insofern als ein möglicher Störfaktor diskutiert werden. Inwieweit der hierfür applizierte mechanische Stress tatsächliche Einflüsse auf den Phänotyp der späteren Zellen hat, könnte beispielsweise in zukünftigen Versuchen durch einen direkten Vergleich ermittelt werden zwischen gepoolten DC und DC, die von Anfang an im endgültigen Kulturgefäß ohne zwischenzeitliche Ablösung kultiviert wurden. Dabei sollte beachtet werden, dass bereits während der Differenzierungsphase stets durch Zelluntergang eine spendervariable Reduktion der Zellzahl zu erwarten ist⁽⁴⁷⁾, und für eine bestmögliche Vergleichbarkeit eine Einstellung der gepoolten Zellen auf dieselbe Dichte wie die der Ungepoolten wichtig ist. Sollten sich weiterhin erhebliche Unterschiede zeigen, wäre das durchgeführte Pooling retrospektiv ein Nachteil dieser Arbeit, und es sollte künftig auf alternative Protokolle zur DC-Generierung zurückgegriffen werden die ohne Pooling arbeiten.

Als eine mögliche Alternative zu Zellkulturgefäßen aus Hartplastik, die eine starke Zelladhärenz begünstigen, können für die DC-Ausdifferenzierung auch andere Produkte verwendet werden. Dazu zählen spezielle Zellkulturbeutel etwa aus der *VueLife*[®]-Reihe⁽⁴⁷⁾. Diese kommen insbesondere für die Herstellung von DC-Vakzinen nach GMP-Standards zum Einsatz, würden jedoch für Experimente in vitro einen nicht unerheblichen zusätzlichen Kostenfaktor bedeuten.

Zell-Zell-Interaktionen

Zellen können in vivo wie auch in Kultur auf vielfältige Weise miteinander interagieren. Ein Beispiel ist der o.g. positive Feedbackmechanismus zwischen auto- bzw. parakrin sezerniertem PGE2 und COX2 in MDSC⁽⁴⁵⁾. Doch nicht nur MDSC oder sonstige funktionell unerwünschte Populationen in DC-Vakzinen, sondern selbst reife aktivierte und funktionskompetente CD83+ dendritische Zellen interagieren untereinander und können sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen.

Eine interessante Rolle wird dabei dem Reifungsmarker CD83 selbst zuteil. Dieser ist nicht nur seit Langem als charakteristischer Marker für vollständig ausgereifte DC bekannt⁽³⁰⁾, sondern kann in seiner Funktion auch Immunantworten modulieren und Toleranz induzieren. Dies dient physiologisch der Dämpfung überschießender Immunreaktionen und dem Erhalt der Homöostase, kann jedoch auch bereits die für eine Immunreaktion benötigte DC-Aktivierung hemmen⁽⁵⁷⁾. Dies kann nicht nur eine Reduktion der Wirksamkeit in vitro generierter DC-Vakzine bedeuten, sondern eine CD83-Expression kann auch von verschiedenen malignen Tumoren selbst als möglicher Immunresistenzmechanismus ausgenutzt werden.⁽⁵⁸⁾

CD83 ist ein Protein mit struktureller Ähnlichkeit zu den B7-Molekülen (Seite 7 ff.), das Homodimere formt und in einer transmembranären zellgebundenen, sowie auch einer löslichen Form als Splicing-Variante gebildet wird. Der membranständige Rezeptor kommt auf verschiedenen aktivierten Immunzellen vor, insbesondere DC. Die homotypische Aktivierung des Rezeptors durch ein lösliches oder aber membrangebundenes CD83-Molekül auf anderen Zellen inhibiert ihre weitere Reifung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine⁽⁵⁸⁾ wie etwa IL-12p70 bzw. dessen Untereinheit IL-12p40. Die Expression von Reifungsmarkern wird gehemmt⁽⁵⁷⁾. Außerdem wird die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung gebremst und stattdessen regulatorische T-Zellen (*T_{reg}*, Seite 2 f.) induziert. Durch CD83-Interaktionen kann auch bereits die Differenzierung von Monozyten zu DC gehemmt werden,⁽⁵⁸⁾ wo lösliches CD83 auch durch anderweitige Rezeptorenbindung stattdessen zu einer endogenen COX2-vermittelten Produktion von PGE2 und auch IL-10 führt⁽⁵⁹⁾, was wiederum zum Kreis des positiven PGE2-COX2-Feedbackmechanismus in der Entstehung von MDSC aus Monozyten zurückführt.

Derartige Zell-Zell-Interaktionen können also einen weiteren potentiellen Störfaktor in der DC-Generierung in vitro darstellen. Die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens steigt mit der Dichte, in der die Zellen pro Volumen Medium sowie auch pro Grundfläche des verwendeten Zellkulturgefäßes inkubiert sind, weshalb eine konstante Zelldichte von wichtiger Bedeutung ist.

Um diesbezügliche Fluktuationen in dieser Arbeit zu vermeiden, wurden die Zellen nach erfolgtem Pooling erneut gezählt und auf eine identische Zelldichte für alle Versuchsbedingungen eingestellt. Nach o.g. Protokoll⁽³²⁾ ist neben einer empfohlenen Mindestzellzahl eine optimale Dichte von 1×10^6 iDC pro ml vorgesehen. Andere Protokolle mit GMP-Standard arbeiten dagegen auch mit Konzentrationen von 2×10^6

iDC/ml⁽⁴⁷⁾. Für diese Arbeit wurde eine Dichte von $1 - 1,5 \times 10^6$ iDC/ml gewählt. Als evtl. zu diskutierender Störfaktor kommen jedoch potentiell die angewandten Messverfahren zur Zellzählung (Seite 22) hinsichtlich ihrer Präzision für dendritische Zellen in Betracht.

Insgesamt könnte sich zur Vermeidung von Zell-Zell-Interaktionen während der DC-Ausreifung eine eher geringe Zelldichte im genannten Bereich möglicherweise vorteilhaft auf die Ausprägung des erwünschten, CD14-CD83+ Phänotyps auswirken, da wie beschrieben beide entstehenden Subpopulationen mit der DC-Aktivierung interferieren können.

Stichprobengröße und Signifikanzen

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit stets unter Berücksichtigung der Stichprobengröße zu betrachten sind. Untersucht man beispielsweise die Fragestellung, ob die MFI für einen untersuchten Marker auf der CD14- Subpopulation

- größer ist als auf der CD14+ Subpopulation;
- bei zugesetztem PGE2 größer ist als bei alleinigem TLR-Stimulus;
- oder in einer Ausreifungsbedingung größer ist als auf der homogenen iDC-Population;

ergibt sich bedingt durch die Stichprobengröße von $n=3$ stets eine Aussagekraft nach dem qualitativen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für nicht-normalverteilte Werte von $p=0,25$, wenn diese Fragen bei allen drei Spendern mit Ja zu beantworten sind. Um die Beobachtungen weiter zu reproduzieren und Schlussfolgerungen auf einem höheren Signifikanzniveau zu treffen, könnte eine Erhöhung der Stichprobengröße im Rahmen künftiger Forschung stattfinden, in deren Rahmen auch die oben diskutierten Einflussvariablen wie Pooling und Zell-Zell-Interaktionen auf die Ergebnisse näher untersucht werden könnten.

D.3 • Fazit

Die durchgeführten Versuche zeigen einerseits die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von PGE2, zu einer verstärkten Expression der Reifungsmarker CD83, CCR7, sowie CD80 und CD86 auf CD14- reifen dendritischen Zellen zu führen: Ein Maximum wird erst bei hohen PGE2-Konzentrationen im unteren μM -Bereich erreicht.

Gleichzeitig zeigen sie jedoch auch einen weiteren, gegensätzlichen Effekt von PGE2 in der DC-Ausreifung, der in jedem Fall eine wichtige Rolle in der Herstellung von DC-Vakzinen spielt: Die Begünstigung einer zweiten, CD14+CD83- Subpopulation, bei der es sich um monozytäre MDSC mit immunsupprimierender Wirkung handeln könnte. Ein Maximum wurde in den durchgeführten Versuchen bereits bei niedrigen PGE2-Spiegeln von 100nM erreicht. Diese zweite Subpopulation zeigte phänotypisch keine gewünschten Effekte für den Einsatz in DC-basierten Tumorstoffen und könnte deren Wirksamkeit unter Umständen sogar kompromittieren. Mögliche begünstigende Faktoren für ihre verstärkte Ausbildung, zu denen für eine sichere Aussage jedoch weitere Versuche in

zukünftiger Forschung erforderlich sind, könnten etwa mechanische Reize vor der Ausreifung und eine hohe Zelldichte in der Kultur umfassen.

Wie bisherige Forschungsergebnisse zeigen, tritt diese unerwünschte CD14+ Subpopulation nicht in jedem Fall bei DC-Ausreifung mit TLR-Liganden und PGE2 auf^(11; 16). Somit konnte nun jedoch ein durchaus mögliches Phänomen demonstriert werden, das im Falle seines unentdeckten Auftretens zu widersprüchlichen Forschungsergebnissen und unwirksamen DC-Vakzinen führen könnte.

Aus dieser Arbeit ergeben sich damit zwei wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Erforschung und Anwendung moDC-basierter Produkte: Erstens erscheint es sinnvoll, sowohl im klinischen als auch im experimentellen Kontext zur Qualitätskontrolle den Anteil CD14+CD83- Zellen nach DC-Ausreifung zu bestimmen und ggfs. Produkte mit einem hohen Anteil zu separieren. Zweitens sollte für eine präzise Beschreibung des Verhaltens in vitro generierter moDC-Populationen nicht per se die Gesamtpopulation, sondern wo zutreffend die beiden entstehenden Subpopulationen (CD14+CD83-, und CD14-CD83+) getrennt voneinander betrachtet, bzw. für die Gesamtbeurteilung in Korrelation zu ihrer anteiligen Verteilung untereinander gesetzt werden.

Die Zukunft DC-basierter Vakzine könnte indes auf einer völlig anderen Basis als monozytenderivierten DC beruhen: Neuere Verfahren erleichtern die Gewinnung von DC über CD34+ hämatopoietische Stammzellen aus Nabelschnur- oder adultem peripherem Blut, die moDC in ihren benötigten funktionellen Eigenschaften erheblich übertreffen könnten^(4; 60).

E • Anhang

E.1 • Absolute Messwerte

Spender 1 (Markierung ♦ in allen Diagrammen)

Spender 1 ♦	ungefärbt vor Ausreifung	iDC vor Ausreifung	TLR-Ag. iDC Ohne PGE2	+ PGE2: 1nM	+ PGE2: 10nM	+ PGE2: 100nM	+ PGE2: 0,5µg/ ml	+ PGE2: 1µg/ ml	+ PGE2: 10µg/ ml
CD14									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	48	127	461	3546	12990	16320	17772	30676	30935
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	30935								
Minimum	48								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	1,6	18,3	69,1	75,1	81,4	83,8	88,5	88,3
CD83									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	39	561	711	452	434	354	358	322	353
CD14neg	39	561	722	677	776	671	727	1432	1711
CD14pos	781	559	669	402	381	324	331	295	323
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	1711								
Minimum	39								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	15,2	31,7	17,2	21,2	17,9	18,6	16,0	16,5
CD14neg		15,1	32,8	30,4	36,9	34,9	37,0	60,0	66,7
CD14pos		18,8	26,8	11,3	16,0	14,0	15,0	10,3	9,9
CD86									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	181	5779	5714	5740	5316	4551	4401	7060	7516
CD14neg	181	5833	6288	7107	5825	5249	5558	9604	10751
CD14pos	1042	2427	3145	5129	5147	4391	4177	6731	7088
CD14- CD83+	0	5340	5701	7456	7942	7547	8045	11571	12493
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	7516								
Minimum	181								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	41,0	39,9	40,8	34,6	27,6	26,0	51,0	54,0
CD14neg		41,6	45,9	55,3	39,0	36,6	38,9	67,0	76,1
CD14pos		6,3	13,1	34,3	33,0	25,7	23,6	49,0	51,2
CD80									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	32	1160	1225	6202	6260	6099	6268	5948	6075
CD14neg	32	1160	1226	5552	4953	4778	5155	6905	7265
CD14pos	800	1161	1221	6493	6694	6401	6483	5824	5918
CD14- CD83+	0	2150	2649	6695	6709	7072	7373	8908	8941
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	7265								
Minimum	32								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	2,7	6,0	75,2	72,2	70,3	71,5	66,7	69,1
CD14neg		2,7	6,7	65,7	52,6	51,1	54,3	66,1	71,8
CD14pos		0,0	2,7	79,5	78,7	74,7	74,8	66,8	68,7
HLA-DR									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	74	1131	662	564	1029	886	962	1124	1170
CD14neg	74	1136	715	651	1243	1183	1358	1564	1618
CD14pos	1757	837	427	525	958	818	886	1067	1111
CD14- CD83+	0	1328	927	790	1678	1682	1991	1840	1870
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	1618								
Minimum	74								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	81,2	59,4	49,5	66,2	59,8	61,0	71,4	75,4
CD14neg		81,4	65,6	57,6	78,3	75,8	76,5	87,0	88,0
CD14pos		75,0	31,7	45,9	62,2	56,1	58,0	69,4	73,7
CCR7									
<u>Absolute MFI-Werte</u>									
Gesamtpopulation	92	112	178	214	272	249	245	255	271
CD14neg	92	112	179	234	346	324	328	471	531
CD14pos	583	115	175	206	247	231	229	227	236
CD14- CD83+	0	135	242	282	460	442	454	581	635
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>									
Maximum	531								
Minimum	92								
<u>% Zellen im Positivgate</u>									
Gesamtpopulation	0,0	0,0	0,2	0,9	4,8	3,7	3,7	4,8	5,8
CD14neg		0,0	0,1	1,6	10,0	8,6	9,9	23,5	29,9
CD14pos		0,0	0,5	0,7	3,1	2,5	2,5	2,4	2,6

Spender 2 (Markierung ■ in allen Diagrammen)

Spender 2 ■	ungefärbt vor Ausreifung	iDC vor Ausreifung	TLR-Ag. iDC Ohne PGE2	+ PGE2: 1nM	+ PGE2: 10nM	+ PGE2: 100nM	+ PGE2: 0,5µg/ ml	+ PGE2: 1µg/ ml	+ PGE2: 10µg/ ml	+ 10nM PGE2 + Anti-EP-1,2,3	+10nM PGE2 + Anti-EP-4
CD14											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	51	65	372	2402	2466	5436	10241	4650	9109	4437	2584
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	10241										
Minimum	51										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	0,0	0,8	9,9	32,0	36,3	62,7	84,7	78,1	76,6	57,2	32,6
CD83											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	42	437	1281	1135	1200	1029	696	550	1050	1287	1437
CD14neg	42	434	1315	1287	1387	1396	2124	2687	3528	1624	1573
CD14pos	0	867	1030	874	952	900	641	482	896	1120	1162
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	3528										
Minimum	42										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	0,0	2,5	19,8	20,1	22,0	16,7	11,3	14,7	22,9	25,3	27,7
CD14neg		2,5	20,8	24,6	28,7	30,8	52,9	59,8	76,9	39,3	32,5
CD14pos		0,0	11,1	10,6	9,9	8,5	3,8	2,0	6,4	14,9	17,8
CD86											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	386	8516	10785	10010	10342	10486	8792	10042	12811	11090	10263
CD14neg	386	8576	11690	11455	11846	13859	16116	17450	18464	14155	11851
CD14pos	0	1064	2549	6936	7706	8477	7467	7968	11089	8794	6975
CD14- CD83+	0	5901	14909	15035	15152	16836	18616	19035	18980	17001	14951
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	12811										
Minimum	386										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	0,0	59,6	65,9	60,3	62,0	61,6	49,0	55,9	73,1	64,8	61,6
CD14neg		60,1	72,7	70,3	72,4	81,8	91,5	93,6	97,0	83,6	73,4
CD14pos		0,0	4,0	39,1	43,8	49,8	41,4	45,3	65,8	50,7	37,1
CD80											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	21	670	1353	2216	2314	2845	3027	3198	2951	2898	2365
CD14neg	21	664	1232	2169	2242	2912	4764	4732	6353	3033	2330
CD14pos	0	1503	2455	2316	2439	2805	2713	2769	1915	2796	2437
CD14- CD83+	0	1529	2140	2775	2960	4648	7030	6288	7321	4355	2827
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	6353										
Minimum	21										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	0,0	0,2	2,7	6,6	7,6	13,4	14,8	16,1	18,0	14,2	8,2
CD14neg		0,2	2,4	6,8	7,5	16,1	42,5	44,7	60,7	17,1	9,1
CD14pos		0,0	5,1	5,9	7,7	11,8	9,8	8,1	4,8	12,1	6,7
HLA-DR											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	104	4248	3789	3658	3863	3216	2327	2114	2577	2973	3576
CD14neg	104	4230	3635	3808	4172	4016	4196	3892	4257	3576	3856
CD14pos	0	6487	5188	3338	3321	2739	1989	1616	2065	2521	2998
CD14- CD83+	0	4425	4003	3665	4350	4336	4642	4366	4516	3618	3865
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	4300										
Minimum	104										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	0,0	40,2	27,6	28,7	29,7	21,4	13,0	9,8	12,9	16,5	26,4
CD14neg		39,9	24,4	30,7	33,4	31,9	37,3	32,9	35,5	24,8	30,6
CD14pos		87,5	57,6	24,4	23,1	15,2	8,6	3,3	6,1	10,3	17,8
CCR7											
<u>Absolute MFI-Werte</u>											
Gesamtpopulation	166	119	389	310	340	429	373	322	352	410	359
CD14neg	166	118	350	297	314	506	361	361	432	337	325
CD14pos	0	240	739	339	386	383	375	311	328	465	429
CD14- CD83+	0	142	449	350	381	990	417	409	463	388	380
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>											
Maximum	506										
Minimum	166										
<u>% Zellen im Positivgate</u>											
Gesamtpopulation	4,1	0,1	23,6	8,7	11,6	18,5	21,3	12,7	14,6	19,2	16,7
CD14neg		0,1	18,6	6,3	9,1	12,9	20,9	19,6	31,2	12,6	11,1
CD14pos		0,0	68,7	14,1	16,0	21,9	21,4	10,8	9,5	24,1	28,2

Spender 3 (Markierung • in allen Diagrammen)

Spender 3 •	ungefärbt vor Ausreifung	IDC vor Ausreifung	TLR-Ag. IDC	Ohne PGE2	+ PGE2: 1nM	+ PGE2: 10nM	+ PGE2: 100nM	+ PGE2: 0,5µg/ ml	+ PGE2: 1µg/ ml	+ PGE2: 10µg/ ml	+ 10nM PGE2 + Anti-EP-1,2,3	+ 10nM PGE2 + Anti-EP-4	+ 100nM PGE2 + Anti-EP-1,2,3	+ 100nM PGE2 + Anti-EP-4
CD14														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	52	79	80	279	694	1847	3102	2592	2295	2184	2690	545	2919	1110
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	3102													
Minimum	52													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0	0	0,1	4,9	18	39,3	64,8	57,1	51,2	51,5	47,1	14,6	71,5	37,7
CD83														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	17	751	974	1010	837	939	720	837	1114	1042	1022	1309	614	916
CD14neg	17	751	973	1039	906	1313	2883	3727	4295	4031	1724	1457	1562	1462
CD14pos	5	1702	1295	601	571	636	546	541	617	614	659	715	518	573
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	4295													
Minimum	17													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0,0	8,7	8,8	18,6	13,3	24,9	26,0	33,6	40,9	37,7	30,4	35,1	17,4	28,7
CD14neg	0,0	8,7	8,8	19,3	15,7	37,2	61,9	69,5	75,0	71,8	48,8	39,9	46,0	43,5
CD14pos			0,0	6,1	2,8	5,9	6,5	6,7	8,4	5,6	9,8	6,8	6,0	4,2
CD86														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	494	1863	3315	6359	5574	7588	7434	7553	8058	8219	7135	7211	5618	6748
CD14neg	494	1862	3315	6437	5835	8303	8917	8692	9153	9484	8441	7551	6936	7582
CD14pos	1031	5737	2805	4834	4391	6482	6627	6698	7012	7026	5669	5226	5094	5368
CD14- CD83+	0	2951	3448	9244	9159	10549	9618	9336	9823	10375	10411	10301	7983	9440
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	8219													
Minimum	494													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0,0	4,3	6,9	30,3	22,5	41,2	40,2	42,8	47,6	48,9	36,8	37,2	20,7	33,8
CD14neg	0,0	4,2	6,9	31,0	24,5	49,1	59,4	58,3	62,9	65,6	50,3	40,3	36,1	43,0
CD14pos			0,0	16,3	13,3	29,0	29,8	31,2	33,0	33,2	21,7	19,9	14,5	18,6
CD80														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	41	1838	1697	3014	3336	4684	4213	4099	4757	4555	5426	4913	3158	4124
CD14neg	41	1837	1696	3022	3402	5312	6460	6235	7028	6861	6500	5267	4386	5065
CD14pos	240	2550	2897	2857	3033	3714	2990	2494	2589	2380	4221	2847	2670	2565
CD14- CD83+	0	2824	2447	4649	6272	8909	8687	7898	8568	8718	9474	8825	6759	8240
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	7028													
Minimum	41													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0,0	2,6	0,5	14,5	17,8	31,2	27,0	28,4	34,6	31,6	38,4	30,6	16,5	25,7
CD14neg	0,0	2,6	0,5	14,7	18,3	36,2	52,8	54,8	60,5	57,7	46,7	33,7	33,0	35,6
CD14pos			0,0	12,2	15,6	23,7	13,0	8,4	10,0	7,0	29,1	12,3	9,9	9,3
HLA-DR														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	169	10123	18772	18754	18861	16240	18515	18662	17681	16927	20587	14939	17767	
CD14neg	169	10125	18892	19339	20021	18330	20786	20640	19459	18762	20971	16480	18512	
CD14pos	387	7598	16414	16094	17068	15102	16811	16774	16005	14866	18350	14325	16533	
CD14- CD83+	0	10415	18751	19343	20710	19373	21783	21650	20822	20132	21948	17767	19156	
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	20786													
Minimum	169													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0,0	0,8	39,0	37,5	40,1	25,7	36,7	38,3	33,1	33,9	50,0	19,7	35,6	
CD14neg	0,0	0,8	39,5	40,6	47,4	38,1	49,4	50,4	43,9	43,5	52,1	31,6	41,1	
CD14pos		0,0	26,5	23,3	28,8	19,1	27,1	26,8	22,9	23,1	37,7	15,1	26,5	
CCR7														
<u>Absolute MFI-Werte</u>														
Gesamtpopulation	104	414	153	483	548	574	517	535	497	478	588	674	471	562
CD14neg	104	414	153	485	548	640	762	781	644	632	703	721	628	659
CD14pos	193	181	176	456	547	473	383	350	357	333	459	398	408	403
CD14- CD83+	0	1436	187	926	1326	1070	972	941	713	731	1020	1213	891	1028
<u>Relative MFI-Werte normiert auf</u>														
Maximum	781													
Minimum	104													
<u>% Zellen im Positivgate</u>														
Gesamtpopulation	0,0	4,2	0,1	12,2	13,5	20,9	20,7	22,6	25,3	22,5	24,0	25,4	16,5	20,8
CD14neg	0,0	4,2	0,1	12,5	14,0	27,3	38,6	40,8	41,6	39,2	33,6	28,0	31,2	28,1
CD14pos			0,0	6,1	11,1	10,9	11,0	8,8	9,6	7,0	13,4	10,3	10,6	8,8

E.2 • Literaturverzeichnis

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., u. a.: "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 71(3):209–49 (2021); doi:10.3322/caac.21660
2. Malvezzi M., Santucci C., Boffetta P., Collatuzzo G., Levi F., La Vecchia C., u. a.: "EUROPEAN CANCER MORTALITY PREDICTIONS FOR THE YEAR 2023 WITH FOCUS ON LUNG CANCER". *Ann Oncol.* :S0923-7534(23)00048-0 (2023); doi:10.1016/j.annonc.2023.01.010
3. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S.: "Cellular and molecular immunology". Ninth edition. Philadelphia, PA, Elsevier (2018); ISBN 978-0-323-52323-3
4. Saxena M., van der Burg S.H., Melief C.J.M., Bhardwaj N.: "Therapeutic cancer vaccines". *Nat Rev Cancer*. 21(6):360–78 (2021); doi:10.1038/s41568-021-00346-0
5. Chiang C.L.-L., Kandalafi L.E.: "In vivo cancer vaccination: Which dendritic cells to target and how?". *Cancer Treat Rev*. 71:88–101 (2018); doi:10.1016/j.ctrv.2018.10.012
6. Boyette L.B., Macedo C., Hadi K., Elinoff B.D., Walters J.T., Ramaswami B., u. a.: "Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets". *PLoS One*. 12(4):e0176460 (2017); doi:10.1371/journal.pone.0176460
7. Zanoni I., Granucci F.: "Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation". *Front Cell Infect Microbiol*. 3:32 (2013); doi:10.3389/fcimb.2013.00032
8. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C.: "Monocyte heterogeneity and functions in cancer". *J Leukoc Biol*. 106(2):309–22 (2019); doi:10.1002/JLB.4RI0818-311R
9. Gardner A., de Mingo Pulido Á., Ruffell B.: "Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy". *Front Immunol*. 11:924 (2020); doi:10.3389/fimmu.2020.00924
10. van Helden S.F.G., Krooshoop D.J.E.B., Broers K.C.M., Raymakers R.A.P., Figdor C.G., van Leeuwen F.N.: "A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation". *J Immunol*. 177(3):1567–74 (2006); doi:10.4049/jimmunol.177.3.1567
11. Boullart A.C.I., Aarntzen E.H.J.G., Verdijk P., Jacobs J.F.M., Schuurhuis D.H., Benitez-Ribas D., u. a.: "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*. 57(11):1589–97 (2008); doi:10.1007/s00262-008-0489-2
12. Luft T., Jefford M., Luetjens P., Toy T., Hochrein H., Masterman K.-A., u. a.: "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: Prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets". *Blood*. 100:1362–72 (2002); doi:10.1182/blood-2001-12-0360
13. Lasek W., Zagożdżon R., Jakobisiak M.: "Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?". *Cancer Immunol Immunother*. 63(5):419–35 (2014); doi:10.1007/s00262-014-1523-1

14. Annunziato F., Romagnani C., Romagnani S.: "The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity". *J Allergy Clin Immunol.* 135(3):626–35 (2015); doi:10.1016/j.jaci.2014.11.001
15. Arbyn M., Xu L., Simoens C., Martin Hirsch P.P.: "Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors". *Cochrane Database of Systematic Reviews.* (5) (2018); doi:10.1002/14651858.CD009069.pub3
16. Gierlich P., Lex V., Technau A., Keupp A., Morper L., Glunz A., u. a.: "Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8+ T cells". *Cancer Immunol Immunother.* 69(6):1029–42 (2020); doi:10.1007/s00262-019-02470-1
17. Sabado R.L., Balan S., Bhardwaj N.: "Dendritic cell-based immunotherapy". *Cell Res.* 27(1):74–95 (2017); doi:10.1038/cr.2016.157
18. Luke J.J., Bao R., Sweis R.F., Spranger S., Gajewski T.F.: "WNT/ β -catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers". *Clin Cancer Res.* 25(10):3074–83 (2019); doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1942
19. Peng M., Mo Y., Wang Y., Wu P., Zhang Y., Xiong F., u. a.: "Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy". *Mol Cancer.* 18(1):128 (2019); doi:10.1186/s12943-019-1055-6
20. Carreno B.M., Magrini V., Becker-Hapak M., Kaabinejadian S., Hundal J., Petti A.A., u. a.: "Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells". *Science.* 348(6236):803–8 (2015); doi:10.1126/science.aaa3828
21. Löhr M., Freitag B., Technau A., Krauss J., Monoranu C.-M., Rachor J., u. a.: "High-grade glioma associated immunosuppression does not prevent immune responses induced by therapeutic vaccines in combination with Treg depletion". *Cancer Immunol Immunother.* 67(10):1545–58 (2018); doi:10.1007/s00262-018-2214-0
22. Lee A.W., Truong T., Bickham K., Fonteneau J.-F., Larsson M., Da Silva I., u. a.: "A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy". *Vaccine.* 20 Suppl 4:A8–22 (2002); doi:10.1016/s0264-410x(02)00382-1
23. De Keijzer S., Meddens M., Torensma R., Cambi A.: "The Multiple Faces of Prostaglandin E2 G-Protein Coupled Receptor Signaling during the Dendritic Cell Life Cycle". *IJMS.* 14(4):6542–55 (2013); doi:10.3390/ijms14046542
24. Poloso N.J., Urquhart P., Nicolaou A., Wang J., Woodward D.F.: "PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4)". *Molecular Immunology.* 54(3–4):284–95 (2013); doi:10.1016/j.molimm.2012.12.010
25. Take Y., Koizumi S., Nagahisa A.: "Prostaglandin E Receptor 4 Antagonist in Cancer Immunotherapy: Mechanisms of Action". *Front Immunol.* 11:324 (2020); doi:10.3389/fimmu.2020.00324
26. Tsuge K., Inazumi T., Shimamoto A., Sugimoto Y.: "Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases". *Int Immunol.* 31(9):597–606 (2019); doi:10.1093/intimm/dxz021
27. Vleeshouwers W., van den Dries K., de Keijzer S., Joosten B., Lidke D.S., Cambi A.: "Characterization of the Signaling Modalities of Prostaglandin E2 Receptors EP2 and EP4 Reveals Crosstalk and a Role for Microtubules". *Front Immunol.* 11:613286 (2020); doi:10.3389/fimmu.2020.613286

28. Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A.: "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells". *Nat Immunol.* 6(8):769–76 (2005); doi:10.1038/ni1223
29. National Center for Biotechnology Information: "PubChem Compound Summary for CID 5280360, Dinoprostone". (2022) [zitiert 21. September 2022] Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280360>
30. Prectel A.T., Steinkasserer A.: "CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells". *Arch Dermatol Res.* 299(2):59–69 (2007); doi:10.1007/s00403-007-0743-z
31. Pfeiffer I.A., Zinser E., Strasser E., Stein M.F., Dörrie J., Schaft N., u. a.: "Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes". *Immunobiology.* 218(11):1392–401 (2013); doi:10.1016/j.imbio.2013.07.005
32. Wölfl M., Greenberg P.D.: "Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells". *Nat Protoc.* 9(4):950–66 (2014); doi:10.1038/nprot.2014.064
33. Miltenyi Biotec: "Datenblatt CD14 MicroBeads, 130-050-201". [zitiert 30. Oktober 2020] Verfügbar unter: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/cd14-microbeads-human.html#130-050-201>
34. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Migliaccio G., Migliaccio A.R., u. a.: "Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(22):10119–22 (1995); doi:10.1073/pnas.92.22.10119
35. Sallusto F., Lanzavecchia A.: "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.* 179(4):1109–18 (1994); doi:10.1084/jem.179.4.1109
36. BD Biosciences: "BD FACSCanto™ II Flow Cytometer - Research Brochure". [zitiert 2. November 2020] Verfügbar unter: https://static.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_brochure_research.pdf
37. BD Biosciences: "Grundkurs BD FACSDiva™". In: 3. Aufl. (2015)
38. BD Biosciences: "Datenblatt BD(TM) CompBead and BD(TM) CompBead Plus Compensation Particles". [zitiert 17. November 2020] Verfügbar unter: <https://www.bdbiosciences.com/eu/applications/clinical/blood-cell-disorders/other-reagents/set-up-reagents/anti-mouse-ig-negative-control-compensation-particles-set/p/552843>
39. BD Kundendienst: Telefonat mit BD-Expertin T. Schenkel nach elektronischer Übermittlung gemessener Kompensationswerte. (19. Mai 2017)
40. Gierlich P.: "Ausreifung humaner dendritischer Zellen durch die TLR-Agonisten Poly(I:C) und R848 mit PGE2. Auswirkungen auf Phänotyp, Zytokinproduktion, Migration und das antigenspezifische Priming von naiven CD8pos T-Zellen". Würzburg, Julius-Maximilians-Universität (2019); urn:nbn:de:bvb:20-opus-188756
41. Marzaioli V., Canavan M., Floudas A., Flynn K., Mullan R., Veale D.J., u. a.: "CD209/CD14+ Dendritic Cells Characterization in Rheumatoid and Psoriatic Arthritis Patients: Activation, Synovial Infiltration, and Therapeutic Targeting". *Front Immunol.* 12:722349 (2021); doi:10.3389/fimmu.2021.722349

42. Krakow S., Crescimone M.L., Bartels C., Wiegering V., Eyrich M., Schlegel P.G., u. a.: "Re-expression of CD14 in Response to a Combined IL-10/TLR Stimulus Defines Monocyte-Derived Cells With an Immunoregulatory Phenotype". *Front Immunol.* 10:1484 (2019); doi:10.3389/fimmu.2019.01484
43. Gabrilovich D.I.: "Myeloid-Derived Suppressor Cells". *Cancer Immunol Res.* 5(1):3–8 (2017); doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
44. Tcyganov E., Mastio J., Chen E., Gabrilovich D.I.: "Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer". *Curr Opin Immunol.* 51:76–82 (2018); doi:10.1016/j.coi.2018.03.009
45. Obermajer N., Muthuswamy R., Lesnock J., Edwards R.P., Kalinski P.: "Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells". *Blood.* 118(20):5498–505 (2011); doi:10.1182/blood-2011-07-365825
46. Grover A., Sanseviero E., Timosenko E., Gabrilovich D.I.: "Myeloid-Derived Suppressor Cells: A Propitious Road to Clinic". *Cancer Discov.* 11(11):2693–706 (2021); doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0764
47. Poschke I., Mao Y., Adamson L., Salazar-Onfray F., Masucci G., Kiessling R.: "Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines". *Cancer Immunol Immunother.* 61(6):827–38 (2012); doi:10.1007/s00262-011-1143-y
48. Mengos A.E., Gastineau D.A., Gustafson M.P.: "The CD14+HLA-DRlo/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy". *Front Immunol.* 10:1147 (2019); doi:10.3389/fimmu.2019.01147
49. Obermajer N., Kalinski P.: "Key role of the positive feedback between PGE2 and COX2 in the biology of myeloid-derived suppressor cells". *Oncoimmunology.* 1(5):762–4 (2012); doi:10.4161/onci.19681
50. Chastney M.R., Conway J.R.W., Ivaska J.: "Integrin adhesion complexes". *Curr Biol.* 31(10):R536–42 (2021); doi:10.1016/j.cub.2021.01.038
51. Jones M.C., Zha J., Humphries M.J.: "Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 374(1779):20180227 (2019); doi:10.1098/rstb.2018.0227
52. Burnstock G., Knight G.E.: "Cell culture: complications due to mechanical release of ATP and activation of purinoceptors". *Cell Tissue Res.* 370(1):1–11 (2017); doi:10.1007/s00441-017-2618-8
53. Bianchi G., Vuerich M., Pellegatti P., Marimpietri D., Emionite L., Marigo I., u. a.: "ATP/P2X7 axis modulates myeloid-derived suppressor cell functions in neuroblastoma microenvironment". *Cell Death Dis.* 5:e1135 (2014); doi:10.1038/cddis.2014.109
54. Principi E., Raffaghello L.: "The role of the P2X7 receptor in myeloid-derived suppressor cells and immunosuppression". *Curr Opin Pharmacol.* 47:82–9 (2019); doi:10.1016/j.coph.2019.02.010
55. Di Conza G., Ho P.-C.: "ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity". *Cells.* 9(3):E695 (2020); doi:10.3390/cells9030695
56. Lee B.-R., Chang S.-Y., Hong E.-H., Kwon B.-E., Kim H.M., Kim Y.-J., u. a.: "Elevated endoplasmic reticulum stress reinforced immunosuppression in the tumor microenvironment via myeloid-derived suppressor cells". *Oncotarget.* 5(23):12331–45 (2014); doi:10.18632/oncotarget.2589

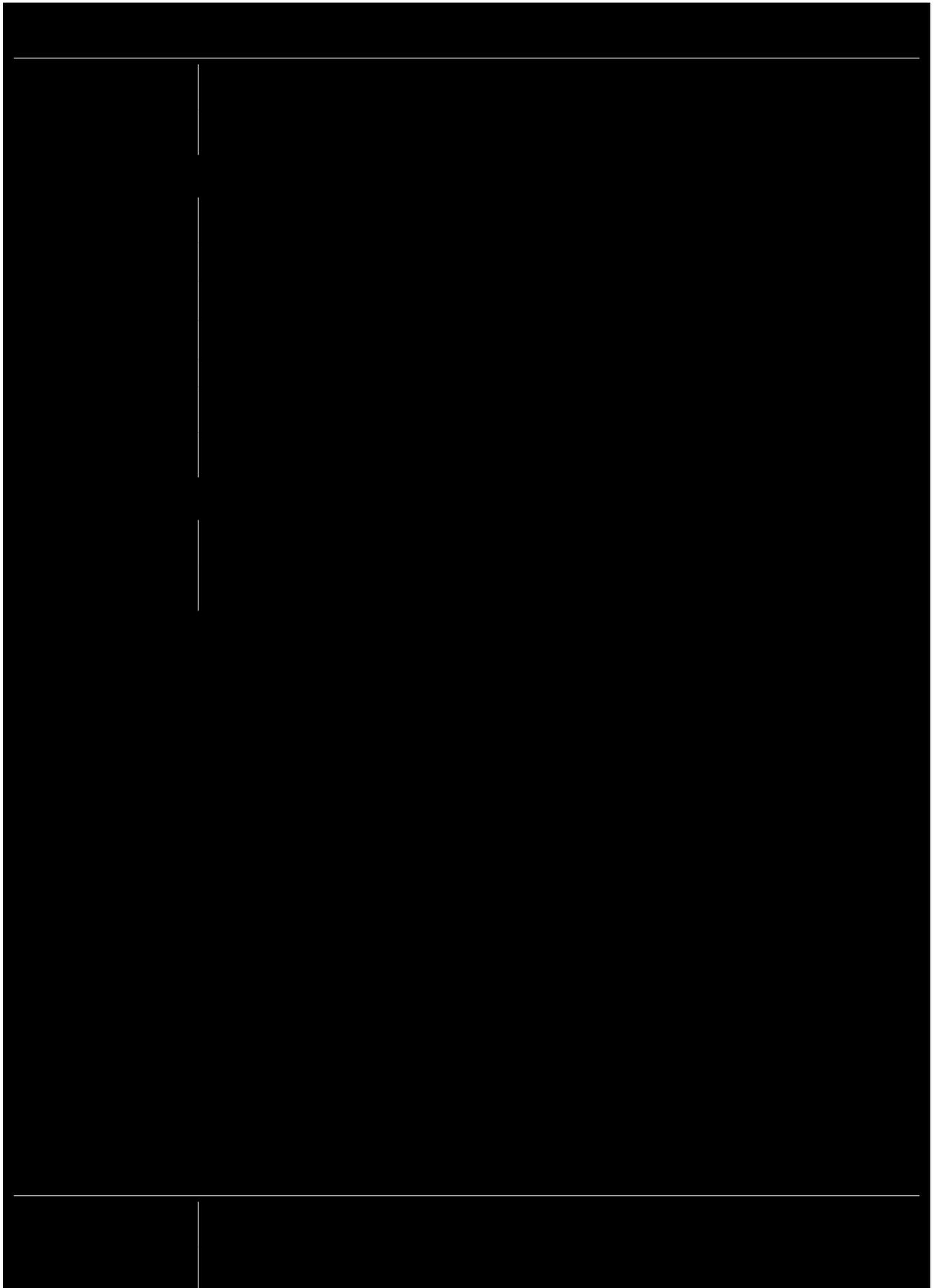
57. Bates J.M., Flanagan K., Mo L., Ota N., Ding J., Ho S., u. a.: "Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis". *Mucosal Immunology*. 8(2):414-28 (2015); doi:10.1038/mi.2014.79
58. Li Z., Ju X., Silveira P.A., Abadir E., Hsu W.-H., Hart D.N.J., u. a.: "CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential". *Front Immunol*. 10:1312 (2019); doi:10.3389/fimmu.2019.01312
59. Horvatinovich J.M., Grogan E.W., Norris M., Steinkasserer A., Lemos H., Mellor A.L., u. a.: "Soluble CD83 Inhibits T Cell Activation by Binding to the TLR4/MD-2 Complex on CD14+ Monocytes". *The Journal of Immunology*. 198(6):2286-301 (2017); doi:10.4049/jimmunol.1600802
60. Balan S., Arnold-Schrauf C., Abbas A., Couespel N., Savoret J., Imperatore F., u. a.: "Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity". *Cell Rep*. 24(7):1902-1915.e6 (2018); doi:10.1016/j.celrep.2018.07.033

Publikation dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in⁽¹⁶⁾:

*Gierlich P., Lex V., Technau A., Keupp A., Morper L., u.a.: "Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8+ T cells". *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69(6):1029-1042 (2020); doi:10.1007/s00262-019-02470-1*

E.3 • Curriculum Vitae



E.4 • Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Phänotypische Wirkung von PGE2 auf die TLR-vermittelte Ausreifung in-vitro-generierter monozytenderivierter dendritischer Zellen* eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

I hereby confirm that my thesis entitled *Phenotypical effects of PGE2 on the TLR-mediated maturation of in-vitro-generated monocyte-derived dendritic cells* is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

