



Aus der Neurochirurgischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Steiger

Immuntherapie des Glioblastoma multiforme mit dendritischen Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Beez

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: apl. Prof. Dr. med. Michael Sabel
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Immuntherapie des Glioblastoma multiforme mit dendritischen Zellen

1. Einleitung

1.1	Neuropathologie des Glioblastoma multiforme (GBM)	5
1.2	Neuroonkologie des GBM	9
1.3	Grundlagen des humanen Immunsystems	12
1.4	Antigen-Präsentation und der Major Histocompatibility Complex (MHC)	15
1.5	T-Zellen	16
1.6	Dendritische Zellen	19
1.7	Neuroimmunologie	21
1.8	Tumorimmunologie des GBM	23
1.9	Immuntherapie des GBM	25
1.10	Ziele dieser Dissertation	31

2. Materialien und Methoden

2.1	Charakterisierung der Patienten	32
2.2	Venöses Blut von Vakzinierungspatienten, nicht-vakzinierten GBM-Patienten sowie von gesunden Probanden	33
2.3	Isolierung von mononukleären Zellen aus venösem Blut	33
2.4	Bestimmung von Zellzahlen	34
2.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
2.6	Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen	35
2.7	Induktion und Nachweis proliferativer Antworten mittels BrdU-ELISA	36
2.8	Induktion und Nachweis der Zytokinexpression durch T-Zellen mittels IFN γ -ELISPOT	37
2.9	Erfassung von klinischen Verlaufsparemtern der Vakzinierungspatienten	38
2.10	Statistik	39

3.	Ergebnisse	
3.1	Immunstatus von GBM-Patienten	40
3.2	Immunstatus von Vakzinierungspatienten im Verlauf der Vakzinierung	44
3.3	Regulatorische T-Zellen bei Vakzinierungspatienten	46
3.4	Zytotoxische Effektorzellen bei Vakzinierungspatienten	49
3.5	Klinische Verlaufsparemeter bei Vakzinierungspatienten	50
3.6	Proliferationsantwort von Effektorzellen nach Stimulation mit unbeladenen versus tumorantigenbeladenen autologen DC	57
3.7	Zytokinantwort durch Effektorzellen nach Stimulation mit unbeladenen versus tumorantigenbeladenen autologen DC	59
4.	Diskussion	
4.1	Immunologische Charakterisierung von GBM-Patienten	65
4.2	Immunstatus von Vakzinierungspatienten und Nebenwirkungen der Immuntherapie	69
4.3	Verhalten von Tregs während der Immuntherapie	70
4.4	Verhalten von zytotoxischen Effektorzellen während der Immuntherapie	73
4.5	Induktion tumorspezifischer Immunantworten durch die Immuntherapie	74
5.	Abkürzungsverzeichnis	81
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Danksagung	100
8.	Lebenslauf	101

1. Einleitung

"Glioblastoma multiforme – the terminator" – so lautet der Titel eines im Jahr 2000 veröffentlichten Kommentars zu experimentellen Therapiekonzepten für das Glioblastoma multiforme (GBM) (Holland, 2000). Tatsächlich ist die Prognose dieses primären Hirntumors nach wie vor schlecht, da trotz moderner Medizin die mittlere Überlebenszeit von 6 Monaten in den 1960er und 70er Jahren nur auf 12 Monate im Jahr 2000 gesteigert werden konnte (Jelsma und Bucy, 1967; Oertel et al., 2005; Holland, 2000). Auch mit der aktuellen Standardtherapie beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten nur 14,6 Monate (Stupp et al., 2005). Hierdurch wird die intensive Forschungsaktivität verständlich, welche zu einem besseren Verständnis der Biologie dieses Tumors führen soll und letztendlich darauf zielt, durch Translation dieser Erkenntnisse in therapeutische Konzepte eine Verbesserung des Überlebens zu erreichen. Zu diesen Konzepten zählen operative, pharmakologische, radiotherapeutische und immuntherapeutische Ansätze. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Immuntherapie mit dendritischen Zellen (DC) und hat zum Ziel, die am Universitätsklinikum Düsseldorf mit diesem Verfahren behandelten Patienten zu untersuchen sowie die allgemeinen immunologischen Voraussetzungen für eine solche Therapie bei Gliompatienten nachzuweisen, um Erkenntnisse für die Fortführung dieser experimentellen Therapie zu gewinnen.

1.1 Neuropathologie des GBM

Das GBM zählt zu den Gliomen, welche die häufigsten primären Tumoren des Gehirns sind. Innerhalb dieser Gruppe stellt das GBM die bösartigste Entität dar und wird entsprechend der WHO-Gradierung der Tumoren des zentralen Nervensystems als ein hochmaligner Tumor des WHO-Grades IV eingestuft (Louis et al., 2007).

GBM entstehen typischerweise in den Großhirnhemisphären von Patienten zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. In Deutschland werden pro Jahr ca. 2000-3000 neue Fälle diagnostiziert; damit ist das GBM das häufigste Gliom mit einem Anteil von ca. 70% aller Gliome (Weller et al., 2009; Wen und Kesari, 2008).

Ausgehend von Astrozyten beziehungsweise neuroepithelialen Vorläuferzellen führt die Akkumulation genetischer Veränderungen entweder zum primären, das heißt de novo entstandenen GBM oder zu einem niedriggradigen Gliom, welches in der Folge

in ein höhergradiges Gliom bis hin zum sekundären GBM übergehen kann. In der Mehrheit der Fälle handelt es sich allerdings um primäre GBM, während bei nur 5% der GBM-Patienten ein vorhergehender Tumor des WHO-Grades II oder III nachgewiesen und damit ein sekundäres GBM diagnostiziert werden kann. Sekundäre GBM betreffen eher jüngere Patienten in der 4. Lebensdekade, wohingegen das primäre GBM wie oben beschrieben am häufigsten ab der 6. Lebensdekade auftritt (Wen und Kesari, 2008).

Beim GBM handelt es sich in mehrfacher Hinsicht um einen multiformen Tumor. Bereits makroskopisch erscheint die Schnittfläche des GBM vielgestaltig mit soliden Tumorarealen, Nekrosen und Einblutungen. Histologisch zeigt sich ebenfalls das unruhige Bild eines zellreichen, diffus infiltrierenden astrozytären Tumorgewebes aus pleomorphen Tumorzellen mit zahlreichen atypischen Mitosen, Nekrosen mit Pseudopallisadenformationen, pathologischen Gefäßproliferationen und Einblutungen (Tolnay, 2002). Neben diesen soliden Tumoranteilen wird insbesondere in stereotaktischen Serienbiopsien deutlich, dass maligne Gliome eine Infiltrationszone aufweisen, in der isolierte Tumorzellverbände oder Einzelzellen das umgebende funktionelle Hirngewebe infiltrieren. Zudem erfolgt eine Migration von Tumorzellen entlang der zerebralen Faserbahnen und Gefäße, welche sich klinisch durch multifokale Rezidivtumoren oder Ausbreitung des Tumors auf die andere Hemisphäre im Sinne eines Schmetterlingsglioms manifestieren kann (Abbildung 1).

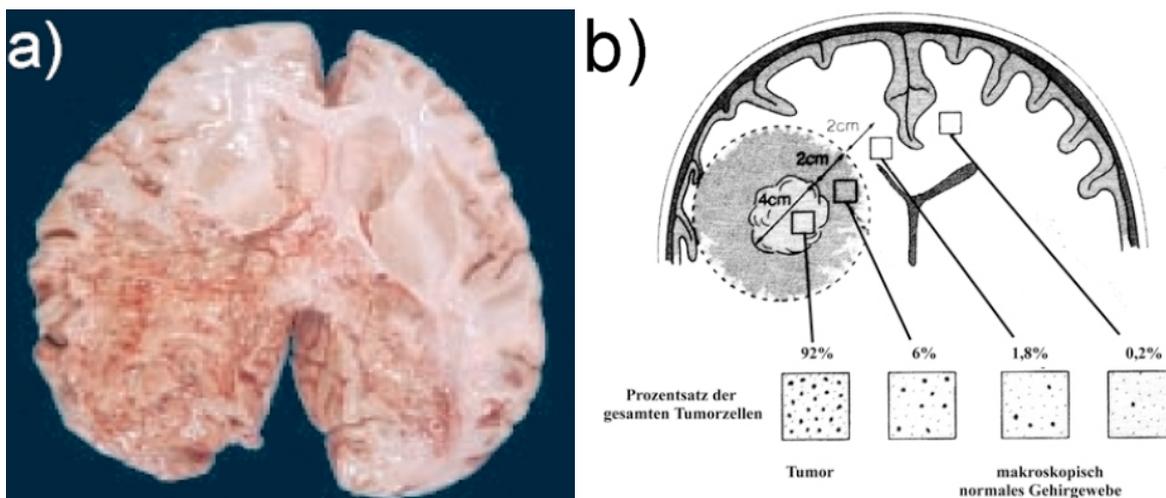


Abb. 1: a) Makroskopisches Bild eines Schmetterlings-GBM mit Ausbreitung über das Corpus callosum und typischer inhomogener Schnittfläche (Tolnay, 2002) sowie b) Schemazeichnung des Ausmaßes der Infiltration des Hirngewebes durch Tumorzellen maligner Gliome (modifiziert nach Enam et al., 1998).

Die Tumorzellmigration entlang der zerebralen Faserbahnen und Mikrogefäße wird durch vielfältige Mechanismen vermittelt, die eine Interaktion der Tumorzellen mit der Umgebung ermöglichen. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die Cysteinprotease Cathepsin-B und andere Enzyme gestatten die Invasion von Gliomzellen in das umgebende Hirnparenchym, während die Expression von Integrinen die Migration entlang von extrazellulären Matrixkomponenten vermittelt. Diese Proliferations- und Migrationsprozesse werden durch Mediatoren und ihre entsprechenden Rezeptoren reguliert, zu denen zum Beispiel EGF (epidermal growth factor) und EGFR (EGF - Rezeptor) gehören. Der in 40% der GBM überexprimierte EGFR sowie eine konstitutiv aktivierte Variante (EGFRvIII) induzieren unter Anderem die Hochregulation der Expression von Matrix-Metalloproteinasen. Interessanterweise finden sich Tumorzellen mit EGFR-Überexpression vermehrt in der peripheren Infiltrationszone des GBM (Okada et al., 2003). Das Zusammenwirken der genannten Faktoren führt zu dem in Abbildung 2 dargestellten Ausbreitungsmuster der Gliomzellen im Gehirn, denn in den perivaskulären und subpialen Regionen des Gehirns findet sich eine besonders gut differenzierte Basallamina sowie extrazelluläre Matrix.

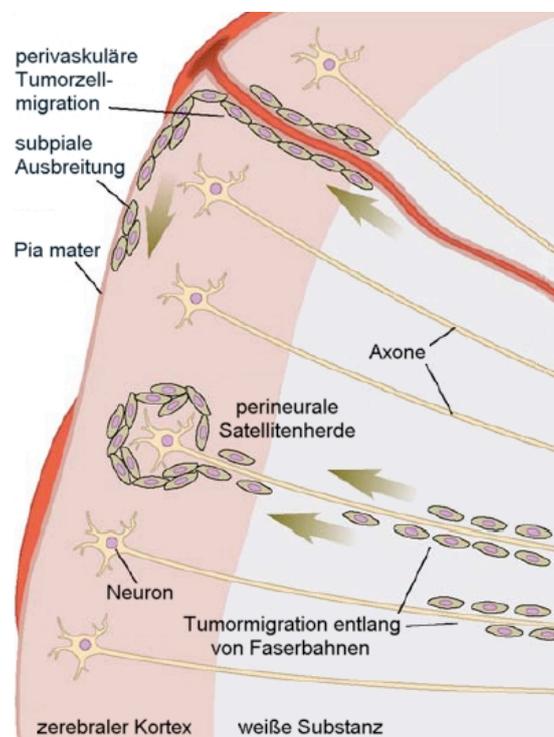


Abb. 2: Ausbreitungswege von Gliomzellen im Gehirn. (modifiziert nach Louis, 2006).

Letztendlich spiegelt sich das multiforme Bild des GBM auch in der Tumorgenetik wieder, da zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen in den Tumorzellen identifiziert werden konnten (Levin, 2002; Louis, 2006; Ohgaki und Kleihues, 2007). Der Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) mit Deletionen auf dem langen Arm des Chromosoms 10 ist die häufigste genetische Veränderung und ist sowohl in primären als auch sekundären GBM nachweisbar. Weiterhin sind wichtige zelluläre Signaltransduktionswege von Aberrationen betroffen, die allerdings in primären und sekundären GBM mit unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbar sind (Tabelle 1). Störungen des EGFR/PTEN-Signaltransduktionsweges werden insbesondere bei primären GBM gefunden, während Gliome der WHO-Grade II und III sowie sekundäre GBM häufiger Störungen des TP53-Signaltransduktionsweges aufweisen.

Tab. 1: Häufige genetische Veränderungen maligner Gliome.
(Ohgaki und Kleihues, 2007).

Gen/Chromosom	Art der Veränderung	Häufigkeit bei malignen Gliomen
EGFR	Amplifikation, Überexpression, Mutation (EGFRvIII)	30-40% (besonders primäre GBM)
PTEN	Mutation	15-40% (besonders primäre GBM)
TP53	Mutation	30-65% (bes. Gliome WHO-Grad II + III sowie sekundäre GBM)
p16 ^{INK4a}	Deletion	20-30% (besonders primäre GBM)
10q	LOH	60-80% (sowohl primäre als auch sekundäre GBM)

Aufgrund der in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbaren genetischen Aberrationen können zwei Wege der Progression zum primären beziehungsweise sekundären GBM formuliert werden, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

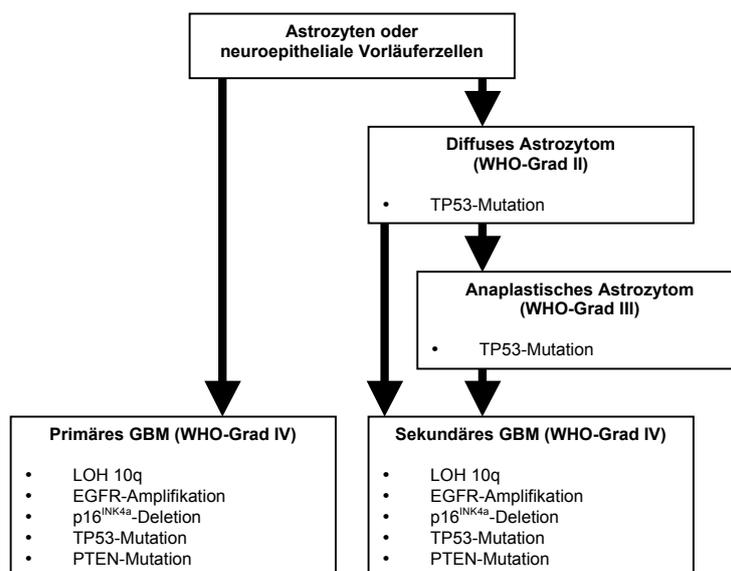


Abb. 3: Wege der Progression zum primären bzw. sekundären GBM. (modifiziert nach Ohgaki und Kleihues, 2007).

Neben der großen Anzahl genetischer Veränderungen, welche Proteine in der Zellzykluskontrolle oder in Signalwegen und damit in erster Linie die Tumorgenese betreffen, finden sich beim GBM einige weitere veränderte Proteine, die eher eine Rolle für die Immunogenität des Tumors spielen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um tumor-assoziierte Antigene (TAA), die außer von Gliomen auch von vielen anderen Tumoren exprimiert werden können und erstmals beim Melanom nachgewiesen worden sind (Zhang et al., 2007). Allgemein handelt es sich um durch Mutationen veränderte oder aberrant modifizierte Proteine, virale Proteine, überexprimierte Proteine oder Proteine, deren Expression zeitlich oder örtlich verändert ist. Das Vorhandensein solcher TAA impliziert eine potentielle Immunogenität der Tumorzellen, worauf in Abschnitt 1.8 genauer eingegangen wird. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bisher in GBM-Präparaten und GBM-Zelllinien identifizierten TAA.

Tab. 2: TAA des GBM. (Zhang et al., 2007).	
TAA	Häufigkeit in GBM-Präparaten (Nachweis durch qPCR, n = 11)
B-Cyclin	100%
EphA2	91%
Her2/neu	100%
IL-13R α 2	91%
GnT-V	100%
GP100	82%
Mage-1	100%
Mart-1	36%
Survivin	91%
hTert	100%
Trp-1	91%
Trp-2	82%
Tyrosinase	91%
Aim-2	91%
Sart-1	91%

1.2 Neuroonkologie des GBM

Klinisch werden Patienten mit GBM in erster Linie durch progrediente fokale neurologische Ausfälle, neuropsychologische Veränderungen, Krampfanfälle oder Zeichen des erhöhten intrakraniellen Druckes symptomatisch. Die klinische Manifestationsphase bis zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt bei 70% der Patienten mit primärem GBM weniger als 3 Monate. Die Manifestation eines sekundären GBM

erfolgt meist mehrere Jahre nach Erstdiagnose eines Glioms des WHO-Grades II (mittlere Progressionszeit 5,3 Jahre) oder III (mittlere Progressionszeit 1,4 Jahre) (Ohgaki und Kleihues, 2007).

In der Bildgebung zeigt sich das GBM in der Computertomographie (CT) als eine meist in den Großhirnhemisphären lokalisierte, inhomogene Raumforderung mit ringförmiger Kontrastmittelaufnahme, zentralen hypodensen Nekrosen und deutlichem perifokalem Ödem. In der Magnetresonanztomographie (MRT), dem Goldstandard in der Hirntumor bildgebung, stellt sich das GBM ebenfalls mit oft ringförmiger Kontrastmittelaufnahme dar, wobei aber insbesondere in T2- und FLAIR-Sequenzen (fluid attenuated inversion recovery) die Ausbreitung des perifokalen Ödems und damit in ungefähre r Nähe r die Infiltration der Tumorzellen in das umgehende funktionelle Hirngewebe deutlich wird (Abbildung 4).

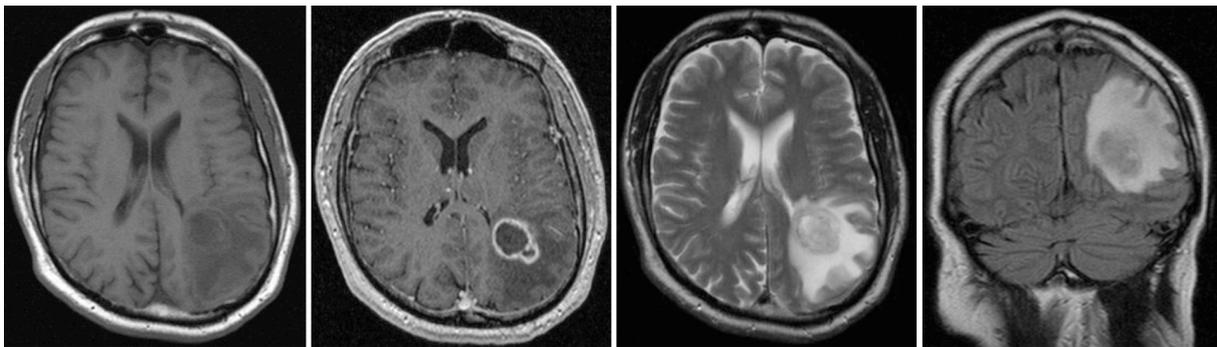


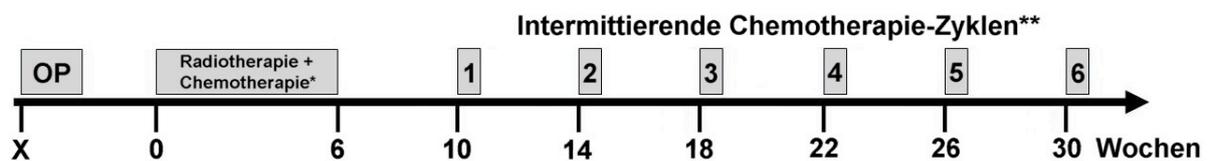
Abb. 4: MRT-Morphologie des GBM in den Sequenzen T1, T1+KM, T2 und FLAIR (von links)

Diese Infiltration stellt das zentrale Problem in der Behandlung der malignen Gliome dar, denn bislang konnte kein Konzept zur effektiven, dauerhaften Eradikation der das peritumorale Hirngewebe infiltrierenden Tumorzellen gefunden werden, so dass, mit Ausnahme weniger Einzelfallberichte, jeder Patient letztendlich einen Rezidivtumor entwickelt. Die Rate so genannter Langzeitüberleber, definiert als Patienten mit Überlebenszeiten von mehr als drei Jahren ab Diagnosestellung, wird mit weniger als fünf Prozent angegeben (Krex et al., 2007).

Der aktuelle Goldstandard in der Therapie eines erstdiagnostizierten GBM besteht aus einer möglichst makroskopisch kompletten neurochirurgischen Entfernung der Tumormasse und einer adjuvanten Strahlen- und Chemotherapie (Stupp und Roila, 2008). Durch moderne neurochirurgische Operationsverfahren, insbesondere durch die fluoreszenzgestützte Resektion mit Hilfe von 5-Aminolävulinsäure (ALA), gelingt in vielen Fällen eine makroskopisch und radiologisch komplette Resektion des

Tumors, welche nach neueren Erkenntnissen per se einen Überlebensvorteil darstellt (Stummer et al., 2006; Stummer et al., 2008).

Das Wissen über die auch nach makroskopisch kompletter Operation verbliebenen infiltrierenden Tumorzellen macht eine adjuvante Therapie obligat. Eine große Studie aus dem Jahr 2005 konnte ein bis dahin unerreichtes medianes Überleben von 14,6 Monaten und eine 2-Jahres-Überlebensrate von 26,5% zeigen, so dass sich dieses adjuvante Therapieregime aus 42 Tagen Strahlentherapie und konkomittierender oraler Chemotherapie mit dem alkylierenden Pharmakon Temozolomid sowie anschließender intermittierender Chemotherapie mit Temozolomid über 6 Zyklen nach dem in Abbildung 5 gezeigten Schema als Standardbehandlung nach der Resektion etabliert hat (Stupp et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Chemotherapie bei Patienten, deren GBM eine Methylierung der Promotorregion des Gens für das DNA-Reparaturenzym MGMT (O^6 -Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase) und damit eine herabgesetzte Expression des Enzyms aufweisen, ein signifikant längeres medianes Überleben von 21,7 Monaten ermöglicht (Hegi et al., 2005).



* Konkomittierende Temozolomid-Gabe: 75mg/m² p.o. täglich an 7 Tagen pro Woche während der gesamten Radiotherapie.

** Intermittierende Temozolomid-Gabe: 150-200mg/m² p.o. täglich an 5 Tagen in 28-Tage-Zyklen

Abb. 5: Nachbehandlungsschema für GBM-Patienten (Stupp et al., 2005).

Für die Therapie eines Rezidivtumors gibt es derzeit keine eindeutigen Daten, so dass nach aktueller Leitlinie die individuelle Entscheidung zur erneuten Operation, erneuten Chemotherapie oder Einschleusung in eine Therapiestudie erfolgen sollte (Stupp und Roila, 2008). Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, und Irinotecan, ein DNA-Topoisomerase-I-Hemmer, zeigen als Kombinationstherapie für das rezidierte GBM vielversprechende Ergebnisse mit einer Reduktion der Tumorgröße um $\geq 30\%$ des Ausgangswertes (partial response) bei fast 60% der behandelten Studienpatienten (Vredenburgh et al., 2007).

Die dennoch insgesamt schlechte Prognose von Patienten mit GBM erklärt, warum ein sehr breites Spektrum an experimentellen Therapiekonzepten Gegenstand der

aktuellen neuroonkologischen Forschung ist. Eines dieser Konzepte ist die Immuntherapie mit dendritischen Zellen, mit welcher sich diese Arbeit beschäftigt.

1.3 Grundlagen des humanen Immunsystems

Die physiologische Aufgabe des Immunsystems ist die Erkennung und Abwehr von auf den Körper einwirkenden Pathogenen. Das klassische Konzept des Immunsystems beruht auf der Einteilung in angeborene und erworbene/adaptive Immunität. Zu beiden Formen der Immunität gehören zelluläre und humorale Komponenten, die in der folgenden Übersicht dargestellt werden (Parslow et al., 2001; Murphy et al., 2008).

Kennzeichen der angeborenen Immunität sind eine allgemeinspezifische Reaktivität gegen ein breites Spektrum von sogenannten konservierten Pathogenstrukturen, eine weitgehend fehlende intrinsische Modifizierbarkeit ihrer von der Evolution geformten Funktionen sowie die volle Reaktivität bereits beim Erstkontakt mit einem Antigen ohne vorhergehende Sensibilisierung. Der zelluläre Arm der angeborenen Immunität besteht aus den Granulozyten sowie dem Monozyten-Makrophagen-System, während der humorale Arm aus einer Vielzahl von Proteinen besteht, welche im Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorhanden sind und auch ohne zelluläre Unterstützung eine Abwehr von Pathogenen ermöglichen. Zu diesen Proteinen zählen unter Anderem Lysozym, Defensin, Mannan-bindendes Lektin, C-reaktives Protein, LPS-bindendes Protein sowie die Gruppe der Komplement-Proteine. Das Grundprinzip der Funktion der angeborenen Immunität ist die Erkennung von bestimmten Mustern, welche vielen Pathogenen gemeinsam sind, bei menschlichen Zellen aber nicht auftreten. Ein Beispiel hierfür ist das Lipopolysaccharid, welches in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommt.

Granulozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, zirkulieren in großer Zahl in der Blutbahn und migrieren, geleitet von aktivierten Endothelien und chemotaktischen Mediatoren, innerhalb weniger Stunden an den Ort einer Gewebeschädigung. Granulozyten sind zur allgemeinspezifischen Erkennung antigener Muster sowie zur Phagozytose und anschließenden, sehr potenten Lyse von zellulärem Debris und Erregern fähig, wofür sie mit einem in ihren Granula gespeicherten Repertoire an lytischen Enzymen ausgestattet sind. Diese schnell eintretende erste Immunreaktion führt oft stereotypisch zur klassischen klinisch

beobachteten Entzündung mit Rubor, Calor, Dolor, Eiterbildung durch zerfallende Granulozyten sowie Blutneutrophilie mit reaktiver Linksverschiebung. Die granulozytäre Entzündung kann über eine Steigerung der Phagozytose durch Opsonisierung, das heißt Markierung der Pathogene, sowohl vom humoralen Arm der angeborenen Immunität (Opsonisierung durch Komplement-Proteine und Erkennung durch granulozytäre Komplement-Rezeptoren) als auch vom humoralen Arm der erworbenen Immunität (Opsonisierung durch spezifische Immunglobuline und Erkennung durch granulozytäre Fc-Rezeptoren) beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu den in massiver Zahl im Blut zirkulierenden, kurzlebigen Granulozyten, handelt es sich bei den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems um in geringer Zahl im Blut zirkulierende oder gewebeständige und langlebigere Zellen, welche mit ähnlichen Fähigkeiten ausgestattet sind, sich aber dennoch in einigen wichtigen Aspekten von den Granulozyten unterscheiden. Analog zu den Granulozyten können Makrophagen mittels verschiedener Oberflächenrezeptoren (unter anderem Komplement-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren, membranständige CD14-Moleküle, Scavenger-Rezeptoren und Toll-Like-Rezeptoren) Antigen-Muster erkennen und entsprechend identifizierte Strukturen phagozytieren und lysieren, wenn auch weniger fulminant als bei Granulozyten. Eine wichtige Facette dieser Art der Entzündung ist die Fähigkeit der aktivierten Makrophagen, nach ihrer Aktivierung über zwei Hauptwege die adaptive Immunität, also das Lymphozyten-System, zu beeinflussen. Zum einen erfolgt über Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) und Interleukin (IL) -8 eine Modulation des Durchmessers und der Permeabilität lokaler Gefäße, wodurch mehr Plasmaproteine zum Entzündungsort gelangen sowie Leukozyten abgebremst werden (rolling) und das Endothel durchdringen (Extravasation), wodurch Effektorzellen am Infektionsort akkumulieren. Zum Anderen synthetisieren Makrophagen IL-1 und IL-6, welche in der Leber die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (u.a. C-reaktives Protein) induzieren und als endogene Pyrogene eine Temperaturerhöhung im Sinne von Fieber bewirken. Insgesamt entsteht ein proinflammatorisches Mikromillieu, das einen Teil des sogenannten Danger-Signals darstellt und damit zur Aktivierung von DC beiträgt, worauf unter 1.6 detailliert eingegangen wird.

Kennzeichen der erworbenen oder adaptiven Immunität ist die Fähigkeit, nach Erstkontakt mit einem Pathogen ein immunologisches Gedächtnis zu generieren und bei folgenden Kontakten eine spezifische Immunreaktion gegen das Pathogen

schneller und effektiver zu erzeugen. Die erworbene Immunität ist daher ein System, welches durch natürliche Erstkontakte oder iatrogene Beeinflussung, zum Beispiel durch Impfungen, gegenüber bestimmten Antigenen sensibilisiert werden kann. Der zelluläre Arm der erworbenen Immunität besteht aus den Lymphozyten, zu denen T-Zellen und B-Zellen gehören. Immunglobuline, welche durch B-Zellen bzw. aus diesen entstehenden Plasmazellen gebildet werden, stellen den humoralen Effektormechanismus der erworbenen Immunität dar.

T- und B-Zellen bilden einen Pool aus ruhenden Zellen, welche sich durch die präformierte Antigen-Spezifität ihrer Oberflächenrezeptoren unterscheiden. Als grundlegendes Funktionsprinzip gilt, dass in der sogenannten Initiationsphase ruhende T-Zellen (T-Helfer-Zellen oder zytotoxische T-Zellen) durch DC bzw. ruhende B-Zellen durch T-Helfer-Effektorzellen (T-Zell-Subtypen siehe unten) entsprechend ihrer Antigen-Spezifität nach Kontakt des Körpers mit dem spezifischen Antigen aktiviert werden. Die klonale Expansion dieser aktivierten Zellen und deren Differenzierung zu Effektorzellen führen in der sogenannten Effektorphase zu einer spezifischen Immunreaktion gegen das betreffende Antigen. Im Falle der T-Zellen ist dies insbesondere eine Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen (CTL), im Falle der B-Zellen die Umwandlung zu Plasmazellen und Synthese von spezifischen Immunglobulinen, welche als humoraler Arm der erworbenen Immunität unter anderem durch die oben genannte Opsonisierung von Pathogenen protektiv wirken. Während der Erstkontakt mit einem Antigen aufgrund des skizzierten „langen“ Signalweges erst relativ spät zur Antwort der erworbenen Immunität führt, kann im Falle eines Zweitkontaktes diese Antwort wesentlich schneller erfolgen. Der Grund hierfür ist die Generierung von Gedächtnis-T- bzw. -B-Zellen, die als immunologisches Gedächtnis auch nach Abklingen der Gewebeschädigung oder Infektion bestehen bleiben. Hierdurch ergibt sich eine höhere Frequenz an Zellen, welche einen für ein bestimmtes Antigen spezifischen Oberflächenrezeptor tragen. Außerdem ist die Aktivierung einer Gedächtniszelle einfacher und effektiver, da zum Beispiel naive T-Zellen nur durch DC, Gedächtnis-T-Zellen hingegen durch jede APC aktiviert werden können.

1.4 Antigen-Präsentation und der Major Histocompatibility Complex (MHC)

Die Funktion der erworbenen Immunität beruht auf der Spaltung von endogenen und exogenen, das heißt aufgenommenen, Proteinen zu Peptiden (Antigen-Prozessierung) und der anschließenden Präsentation dieser Peptide auf der Zelloberfläche (Antigen-Präsentation). Diese Prozesse finden in fast allen Körperzellen statt, wobei zwischen der Präsentation auf kernhaltigen Körperzellen und APC unterschieden werden muss.

In allen kernhaltigen Körperzellen werden im Rahmen des zytosolischen Weges der Antigen-Prozessierung sowohl endogene Proteine, darunter ggf. auch Proteine von intrazellulären Erregern (z.B. Viren, Chlamydien, Toxoplasma), im Proteasom zu Peptiden abgebaut. Diese Peptide gelangen aus dem Zytoplasma mittels spezialisierter ATP-abhängiger Transporter in das endoplasmatische Retikulum, wo sie mit Major Histocompatibility Class 1-Proteinen (MHC1-Proteinen) assoziieren und schließlich zur Zellmembran gelangen, wo sie von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können.

In spezialisierten APC, also unter anderem auch in dendritischen Zellen (DC), werden durch Phagozytose, Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommene Proteine im Rahmen des endozytotischen Weges der Antigen-Prozessierung verarbeitet. Nach Aufspaltung der Proteine im Lysosom erfolgt die Assoziation der entstandenen Peptide mit Major Histocompatibility Class 2-Proteinen (MHC2-Proteinen) und anschließend die Präsentation auf der Zellmembran, wo sie von T-Helfer-Zellen erkannt werden können.

Die Trennung dieser beiden Mechanismen wird in DC durch die sogenannte Kreuzpräsentation (cross presentation) durchbrochen. Diese ermöglicht den DC die Präsentation von endozytotisch aufgenommenen Proteinen im Kontext von MHC1-Proteinen, wodurch eine zytotoxische Immunantwort hervorgerufen werden kann, und gerade nicht die im endozytotischen Weg übliche T-Helfer-Antwort erzeugt wird. Die Kreuzpräsentation hat für die Immuntherapie des GBM mit DC eine besondere Bedeutung, da nur durch die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort ein Anti-Tumor-Effekt im Gehirn erreicht werden kann (Calzascia et al., 2003).

Zentrale Bedeutung in diesen Wegen haben die humanen MHC1- und -2-Proteine. Die für diese Proteine codierenden Gene befinden sich im Human Leukocyte Antigen-Komplex (HLA) auf Chromosom 6p. Man unterscheidet die klassischen MHC1-Gene HLA-A, -B und -C sowie die MHC2-Gene HLA-DP, -DQ und -DR, für die jeweils zahlreiche Polymorphismen bekannt sind. Ihren Namen haben die MHC-Proteine aufgrund der Beobachtung, dass sie das größte Hindernis der Histokompatibilität, also der freien allogenen Übertragung von Geweben, sind. Aufgrund des hochgradigen Polymorphismus und der hohen Immunogenität dieser Proteine (Kreuzreaktivität) kommt es in den meisten Fällen bei Ko-Kultur allogener Immunzellen zu einer starken T-Zell-Reaktivität gegen die jeweils fremden MHC-Proteine, was sich in vivo als Abstoßungsreaktion manifestiert. Diese Bedeutung für die Histokompatibilität ist allerdings nur ein sekundärer Effekt, denn die Funktion der MHC-Proteine liegt in der immunologischen Erkennung der mit ihnen assoziierten Peptide durch T-Zellen (MHC-Restriktion der T-Zell-Antwort).

Komplexe aus MHC1-Proteinen und Peptiden auf der Zellmembran kernhaltiger Körperzellen werden durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erkannt, was zur Zerstörung der z.B. virusinfizierten Körperzelle führt.

Komplexe aus MHC2-Proteinen und Peptiden auf der Zellmembran von APC werden durch CD4⁺ Helfer-T-Zellen erkannt. Die Erkennung eines Fremdproteins führt hier zu Initiierung einer antigen-spezifischen B-Zell-Aktivierung, wodurch es zu einer Immunglobulin-Bildung gegen das identifizierte extrazelluläre Antigen kommt.

1.5 T-Zellen

Die im Rahmen der T-Lymphopoese aus den lymphatischen multipotenten Stammzellen des Knochenmarks hervorgehenden T-Lymphozyten durchlaufen eine wichtige Phase ihrer Entwicklung im Thymus. Dort werden durch positive Selektion diejenigen T-Zellen selektiert, welche die eigenen MHC-Proteine erkennen. Im nächsten Schritt werden T-Zellen identifiziert, die eine Autoreaktivität gegen Komplexe aus MHC-Proteinen und körpereigenen Peptiden aufweisen. Diese Zellen werden im Sinne einer negativen Selektion durch Apoptose eliminiert. Durch diese Mechanismen entsteht ein T-Zell-Kompartiment, welches körperfremde Peptide identifizieren kann, die in Assoziation mit MHC-Proteinen präsentiert werden,

während im physiologischen Zustand Autoantigene als körpereigen erkannt und von der Immunreaktion ausgespart bleiben.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich T-Zellen allgemein als CD3⁺ Zellen innerhalb der CD45⁺ Leukozyten-Population identifizieren. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der T-Zellen ist die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR), welcher in Analogie zu den Immunglobulinen eine variable antigenspezifische Region aufweist. Eine weitere Unterscheidung der CD45⁺ CD3⁺ T-Zellen gelingt durch die Oberflächen-Marker CD4, CD8 und CD25, so dass sich im humanen Blut folgenden Subpopulationen finden lassen:

- CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺: Hierbei handelt es sich um T-Helfer-Zellen (TH-Zellen), welche als naive T-Helfer-Zellen (TH0) auf MHC2-Proteinen präsentierte Peptide erkennen und nach Aktivierung durch APC verschiedene Differenzierungswege nehmen können:
 - TH1-Zellen: Sie erkennen als Effektorzellen ihr Peptid auf DC und bilden IL-2 sowie Interferon γ und leiten eine zelluläre Immunantwort mit Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen sowie Synthese opsonisierender Immunglobuline (besonders IgG und IgM) ein.
 - TH2-Zellen: Sie erkennen als Effektorzellen ihr Peptid auf B-Zellen, bilden IL-4 und leiten über B-Zell-Aktivierung und Plasmazell-Differenzierung eine humorale Immunantwort mit Synthese aller Immunglobulin-Klassen sowie Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen ein.
 - TH3-Zellen: Sie bilden IL-10 und transforming growth factor β (TGF β) und haben eine negative regulatorische Funktion.
- CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺: Hierbei handelt es sich um zytotoxische T-Zellen (CTL), welche auf MHC1-Proteinen präsentierte Peptide erkennen und nach Aktivierung als Effektorzellen die Apoptose der Zielzellen durch Perforin, Granzyme und FasL induzieren können.
- Naive CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen: Hierbei handelt es sich um T-Helfer-Zellen (TH0) beziehungsweise CTL, die noch keinen Aktivierungszyklus durchlaufen haben. TH0-Zellen werden als Zellen mit dem Expressionsprofil CD4⁺ CD27⁺ CD28⁺ CCR7⁺ CD45RA⁺ CD11a low beschrieben. CD27 und CD28 sind

kostimulatorische Moleküle, CCR7 ist ein Chemokin-Rezeptor, CD45RA ist eine Isoform des Panleukozytenantigens (leukocyte common antigen) und CD11a ist ein Adhäsionsmolekül. Naive CTL weisen den Phänotyp CD8⁺ CD27⁺ CD28⁺ CCR7⁺ CD45RA⁺ bei nur geringer Expression von Perforin, Granzyme B und IFN γ auf. Sowohl TH0 als auch naive CTL können nach Aktivierung in Effektorzellen bzw. in memory T-Zellen übergehen.

- antigen experienced und memory CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen: Nach Aktivierung naiver T-Zellen zeigen sich bei CD4⁺ und CD8⁺ Subtypen Veränderungen des Expressionsmusters; im Wesentlichen kommt es zum Verlust von CD27, CD28, CCR7 und CD45RA sowie bei CTL zu einer Zunahme der Expression von Perforin, Granzyme B und IFN γ . Nach neueren Erkenntnissen ist die klassische phänotypische Unterscheidung in Effektorzellen und memory T-Zellen nicht ohne Weiteres zutreffend, so dass Appay et al. 2002 für aktivierte CTL eine Klassifikation anhand charakteristischer Phänotypen, welche durch die Expression von CD27 und CD28 determiniert werden, vorschlugen. Die Autoren unterscheiden die Differenzierungsstadien early (CD27⁺ CD28⁺), intermediate (CD27⁺ CD28⁻) und late (CD27⁻ CD28⁻) vorschlugen. Aus allen diesen Differenzierungsstadien können demnach auch memory CTL als Träger des immunologischen Gedächtnisses hervorgehen. Eine ähnliche Einteilung wurde auch für CD4⁺ T-Zellen vorgeschlagen (Appay et al., 2008).
- CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺: Hierbei handelt es sich um regulatorische T-Zellen (Treg), welche nach TCR-abhängiger Aktivierung sowohl die Zytokin- als auch die Proliferationsantwort und zytotoxische Antwort der übrigen T-Zell-Subtypen supprimieren können. Bei der Untersuchung dieser Subpopulation muss beachtet werden, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen ebenfalls CD25 exprimieren. Ähnliches gilt für den Marker CTLA-4/CD152, welcher sowohl konstitutiv auf Treg, aber auch auf anderen T-Zellen exprimiert wird. Eine bessere Identifikation der Treg gelingt mit Hilfe der durchflusszytometrischen Erfassung des Transkriptionsfaktors FoxP3, der als spezifischster Marker für Treg gilt (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). Ein Fehlen des Markers CD127 auf CD4⁺ CD25⁺ Zellen erlaubt ebenfalls die Erfassung der Treg, wobei circa 80% der FoxP3⁺ Treg diesen Phänotyp aufweisen (Liu et al., 2006).

1.6 Dendritische Zellen (DC)

Die morphologische Erstbeschreibung von DC in Form der epidermalen Langerhans-Zellen erfolgte 1868 durch Langerhans, doch erst 1973 gelang Steinman und Cohn die funktionelle Charakterisierung von DC. In der Folge wurde die zentrale Rolle dieser hochpotenten APC in der Einleitung einer T-Zell-Antwort deutlich. Morphologisch stellen sich reife DC, wie in Abbildung 6 erkennbar, als Zellen mit typischen, unregelmäßigen Zytoplasmaausläufern (Dendriten) dar.

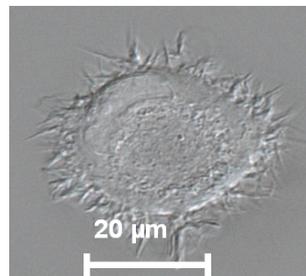


Abb. 6: Charakteristische Morphologie einer reifen DC.

Die DC stammen von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen ab und erreichen ihre unterschiedliche Differenzierung entweder über myeloide oder lymphoide Vorstufen unter dem Einfluss verschiedener Zytokin-Bedingungen. Die Klassifikation der DC ist größtenteils Ergebnis von in vitro-Untersuchungen und unterscheidet folgende Subtypen (Rossi und Young, 2005; Jacobs et al., 2008):

- konventionelle DC (cDC):
 - CD14+ blood monocyte derived DC (moDC)
 - dermale DC, interstitielle DC (DDC-IDC)
 - Langerhans-Zellen (LC)
- plasmazytoide DC (pDC)

Funktionell können DC im Körper in zwei Zuständen vorliegen: Man unterscheidet unreife und reife DC. Unreife DC sind gewebständig und nehmen kontinuierlich mit hoher Effektivität Antigene auf, welche sie sowohl im Kontext von MHC2-Proteinen als auch, durch Kreuzpräsentation, im Kontext von MHC1-Proteinen T-Zellen präsentieren. Unreife DC sind unter Anderem durch die Expression zahlreicher Chemokin-Rezeptoren (CCR1, CCR2, CCR5, CCR 6) gekennzeichnet, was eine

effektive Chemotaxis zum Ort einer Gewebeschädigung bzw. Entzündung ermöglicht. Des Weiteren exprimieren sie Rezeptoren zur Erkennung von pathogen-assoziierten Mustern sowie von Anzeichen einer Gewebeschädigung. Hierzu zählen in erster Linie die Toll-Like-Rezeptoren, welche zum Beispiel Lipopolysaccharid und virale bzw. bakterielle Strukturen sowie Nukleinsäuren erkennen können, aber auch Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-1, IL-6 und TNF α . Alle diese Reize können ein sogenanntes Danger-Signal darstellen, welches letztendlich determiniert, ob eine Ausreifung der DC erfolgt.

Die Ausreifung ist gekennzeichnet durch den Verlust der Infektionsort-typischen Chemokin-Rezeptoren und Hochregulation des Chemokin-Rezeptors CCR7, welcher die Migration aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten bewirkt. Weiterhin geht die Ausreifung mit der Einstellung der Antigen-Aufnahme einher, wohingegen die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation und damit zur Aktivierung von T-Zellen um ein Vielfaches gesteigert wird. Hierzu werden Adhäsionsmoleküle (CD54/ICAM-1, CD50/ICAM-3), kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86), akzessorische Moleküle (CD40, CD58) sowie Zytokine (IFN α durch pDC; IL-6, IL-10, IL-12 und TNF α durch cDC) vermehrt gebildet. Diese Veränderungen führen letztendlich zur reifen DC, welche sehr effektiv sowohl CD4-Zellen als auch CD8-Zellen stimulieren kann. Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die Vorgänge bei der Ausreifung von DC sowie über die Rolle von DC bei der Einleitung einer Immunreaktion.

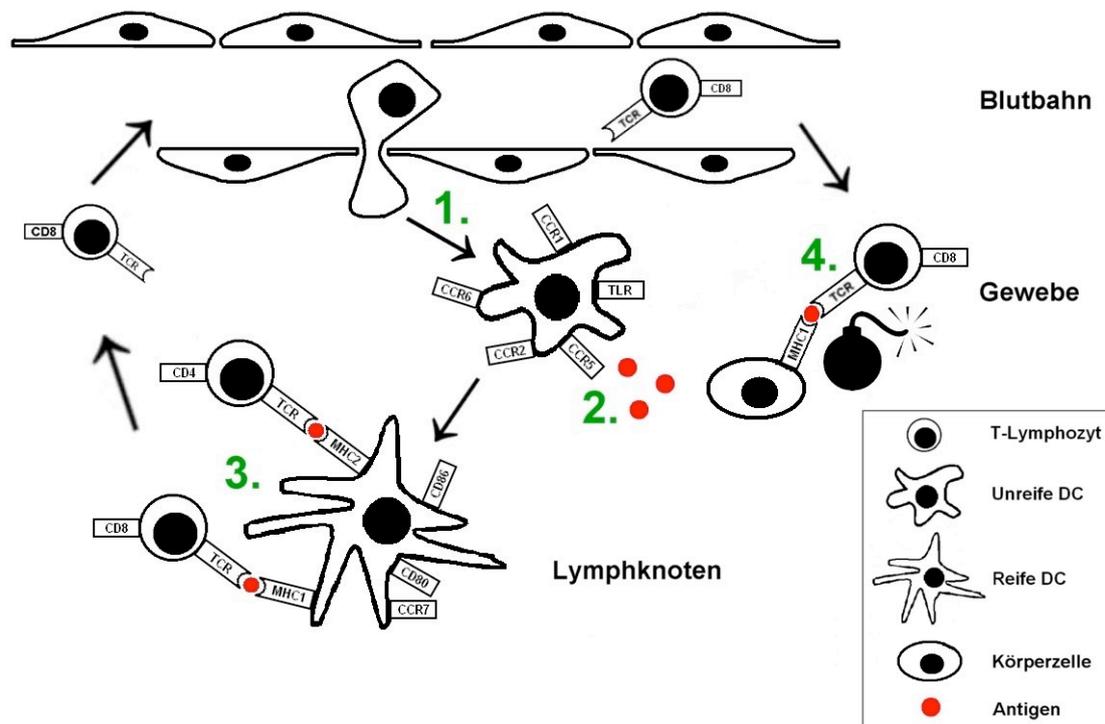


Abb. 7: Funktion der DC bei der Einleitung einer Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen. Die Phasen der durch DC eingeleiteten Immunantwort lassen sich einteilen in:

1. Unreife DC patrouillieren in Blut und Gewebe
2. Unreife DC treffen auf Antigene, welche nach Aufnahme im Kontext eines Danger-Signals zur Ausreifung der DC führen.
3. Nach Migration in die lokalen Lymphknoten kann die reife DC über den MHC2-Weg CD4+ T-Zellen und über den MHC1-Weg im Sinne der Kreuzpräsentation auch direkt zytotoxische CD8+ T-Zellen aktivieren.
4. Die aktivierten und expandierten antigenspezifischen CD8+ T-Zellen lysieren Körperzellen, welche das antigene Peptid auf MHC1-Molekülen präsentieren.

(TCR = T-Zell-Rezeptor, TLR = toll like-Rezeptor, CCR = Chemokin-Rezeptor, MHC = major histocompatibility complex)

1.7 Neuroimmunologie

Traditionell wurde das zentrale Nervensystem (ZNS) als ein Ort mit „immune privilege“ beschrieben; das heißt als ein Ort, an dem Immunreaktionen gegen Antigene weniger effektiv ablaufen als in anderen Geweben des Körpers (Head und Griffin, 1985; Walker et al., 2002; Prins und Liau, 2003; Friese et al., 2004). Die Hauptgründe für diese Beobachtung waren beziehungsweise sind:

- Die intakte Blut-Hirn-Schranke verhindert größtenteils den Übertritt unter anderem von Komplement-Proteinen, Immunglobulinen und zirkulierenden, nicht-aktivierten Immunzellen in das Gehirn.

- Das weitgehende Fehlen eines klassischen lymphatischen Systems im Gehirn verhindert die oben beschriebene Aktivität von APC und Effektorzellen.
- Im Gehirn finden sich keine gewebeständigen APC.
- Neurone und Gliazellen weisen unter physiologischen Bedingungen eine extrem niedrige MHC-Expression auf, so dass sie nicht vom T-Zell-System erkannt werden können.

Die strikte Beschreibung des Gehirns als ein immunologisch annähernd inertes Kompartiment wurde durch den Nachweis geringer Zahlen von T-Zellen im gesunden Gehirn (Hickey et al., 1991), eines Lymphabflusses des zentralen Nervensystems (ZNS) in die zervikalen Lymphknoten (Cserr et al., 1992) und einer intrathekalen Antikörpersynthese bei intakter Blut-Hirn-Schranke (Cserr et al., 1992) in Frage gestellt. Während eine immunprivilegierte Stellung auf das gesunde Gehirn zutreffen mag, lassen sich bei zahlreichen Erkrankungen, wie zum Beispiel zerebralen Infektionen, experimenteller Autoimmun-Enzephalitis (EAE) und humanen Autoimmunerkrankungen, sowohl humorale als auch zelluläre Elemente des Immunsystem, insbesondere DC und aktivierte CTL, im ZNS und Liquor nachweisen (Bradl und Hohlfeld, 2003).

Warum primäre Hirntumore im ZNS existieren können, während ihre sehr seltenen Metastasen außerhalb des Gehirns vom Immunsystem weitgehend kontrolliert werden können, bleibt unklar. Man muss vermuten, dass hier eine Potenzierung der Effekte sowohl durch die immunologischen Bedingungen im ZNS als auch durch die Immune Escape-Mechanismen der Tumorzellen vorliegt.

Sowohl bei vorher unbehandelten Patienten als auch bei Patienten mit Zustand nach Immuntherapie konnten in Gliom-Präparaten tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) nachgewiesen werden, wobei eine TH2-Antwort offenbar dominiert (El Andaloussi und Lesniak, 2006; El Andaloussi und Lesniak, 2007; Walker et al., 2008). Auch eine Signalveränderung in PET und MRT nach Immuntherapie als radiologisches Korrelat einer lokalen Blut-Hirn-Schranken-Störung wurde berichtet (De Vleeschouwer et al., 2004). Somit sind zumindest morphologisch zwei der wesentlichen klassischen immunprivilegierenden Mechanismen am tumortragenden Gehirn aufgehoben. Außerdem kann man bei adjuvanter Durchführung der Immuntherapie von einer ohnehin durch die neurochirurgische Operation gestörten Blut-Hirn-Schranke ausgehen, welche eine Einwanderung von Effektorzellen der erworbenen Immunität

in das Gehirn erlauben sollte. Ohnehin ist anzunehmen, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke im Bereich von pathologischen Tumor-Gefäßproliferationen gestört ist. In Hinblick auf eine Immuntherapie des GBM mit DC ist weiterhin zu beachten, dass die Induktion der Immunreaktion nach Applikation der Vakzine in peripheren Geweben, insbesondere den zervikalen Lymphknoten, erfolgt, wo alle Bedingungen für die Aktivierung von spezifischen Anti-Tumor-Effektorzellen gegeben sein sollten, da eine klinisch relevante GBM-assoziierte Störung der peripheren zellulären Immunität nicht nachgewiesen werden konnte (Rapp et al., 2006).

1.8 Tumorimmunologie des GBM

Als wichtige immunologische Voraussetzung einer Immuntherapie mit DC konnte gezeigt werden, dass GBM analog zu vielen anderen Tumoren, zahlreiche tumor-assoziierte Antigene (TAA) exprimieren, welche potentielle Ziele für eine Immuntherapie sein könnten und auf die prinzipielle Immunogenität des Tumors hindeuten (Tabelle 2). Tang et al. konnten 2006 erstmals bei Patienten mit GBM eine spezifische Reaktivität von CD8⁺ T-Zellen gegen autologe Tumorzellen nachweisen. Diese Reaktivität bestand auch gegen Zellen einer GBM-Zelllinie, nicht jedoch gegen Zellen von niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen, so dass von einer spezifischen Immunantwort gegen TAA des GBM auszugehen ist. Warum sich diese zytotoxische Immunantwort dennoch in vivo nicht in Form einer erfolgreichen Tumorkontrolle durch den Körper manifestiert, soll im Folgenden erörtert werden.

Tumorzellen nutzen eine Reihe von Mechanismen, welche ihre Immunogenität mindern, die Anti-Tumor-Aktivität des Immunsystems untergraben und das unkontrollierte Wachstum einer Neoplasie erlauben. Die Summe dieser Mechanismen wird als immune escape bezeichnet und beruht auf dem Zusammenspiel zahlreicher Interaktionen mit fast allen Schritten der Immunantwort (Gomez und Kruse, 2006; Gilboa, 1999):

- Fehlende Antigenpräsentation: Sowohl aberrante MHC1-Expression als auch Störungen der für die Präsentation von Peptiden in Assoziation mit MHC1 verantwortlichen zellulären Proteine können zur Beeinträchtigung der MHC-gebundenen T-Zell-Immunität gegen Tumore führen (Mehling et al., 2007).
- Apoptoseresistenz: Das Fas/FasL-System vermittelt die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen. FasL-exprimierende Immunzellen können hierbei Apoptose von Fas-

exprimierenden Zielzellen auslösen. Eine Störung dieses Signalweges, zum Beispiel durch verminderte Fas-Expression auf Tumorzellen, führt daher zu Apoptoseresistenz von Tumorzellen (Walker et al., 1997).

- **Aktive Immunsuppression:** Gliomzellen können Immunantworten aktiv durch sezernierte sowie membranständige Moleküle beeinflussen. Prostaglandin E2 (PGE2), transforming growth factor beta 2 (TGFβ2) und Interleukin 10 (IL-10) sind wichtige bisher bekannte Immunmodulatoren, die von malignen Gliomen sezerniert werden und vielfältige Effekte haben (Wang und Dubois, 2006; Bodmer et al., 1989; Hishii et al., 1995). Des Weiteren sind in Form von Tenascin-C und Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure) Modifikationen der extrazellulären Matrix bekannt, die Immunzellen inhibieren (Herold-Mende et al., 2002; Parekh et al., 2005). Zu den Veränderungen von membranständigen Molekülen zählen die Expression von FasL und HLA-G auf Tumorzellen. FasL-Expression auf Tumorzellen kann im Sinne einer Umkehr der physiologischen Fas/FasL-Funktion eine Apoptose von Fas-exprimierenden T-Zellen herbeiführen. Die ektopische Expression von fetalem HLA-G auf Gliomzellen, welches physiologischerweise eine Rolle bei der feto-maternalen Immuntoleranz spielt, inhibiert die T-Zell-Funktion (Wiendl et al., 2002).
- **Toleranzinduktion:** Die zentrale Toleranz wird, wie unter 1.6 beschrieben, durch Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus gesichert, so dass auf Tumorzellen exprimierte körpereigene Proteine ebenfalls nicht als körperfremd erkannt werden. Ob nun auf verschiedene Art „veränderte“ Proteine, also TAA, tatsächlich in vollem Umfang als immunologisch körperfremd erkannt werden können oder der zentralen Toleranz unterliegen ist unklar. Gegen einige TAA konnten aber spezifische CD8-Zellen beim Menschen nachgewiesen werden (Ramirez-Montagut et al., 2000; Romero et al., 2002). Eine andere Form der Toleranz ist die periphere Toleranz, bei der eine Anergie der T-Zellen durch fehlende Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen induziert wird (Wintterle et al., 2003). Ein weiterer, für die Immuntherapie besonders wichtiger, Mechanismus der peripheren Toleranz ist das Treg-System. Diese Zellen vermitteln eine kontaktabhängige Suppression zytotoxischer T-Zellen und mindern damit die Aktivität genau jener Zellpopulation, die bei der Immuntherapie mit DC die Effektorfunktion übernehmen soll.

1.9 Immuntherapie mit DC

DC sind viel versprechende Kandidaten für die Immuntherapie von Tumoren, weil sie eine zentrale Rolle in der Einleitung einer T-Zell-Immunantwort einnehmen (Steinman et al., 2001; Schuler et al., 2003). So können tumorantigenbeladene reife DC genutzt werden, um in vitro tumorspezifische T-Zellen zu expandieren, welche nach adoptivem Transfer im Patienten als zytotoxische Effektorzellen eine Lyse der Tumorzellen induzieren können (Kurokawa et al., 2001). Ein alternatives Konzept beruht auf der Vakzinierung des Patienten mit DC, welche in vitro ausgereift und mit autologem Tumorlysate beladen wurden. Man überträgt somit aktivierte APC, welche in vivo eine tumorspezifische T-Zell-Antwort erzeugen können, so dass sowohl die Initiations- und als auch die Effektorphase der Immunreaktion im Körper des Patienten ablaufen (Hsu et al., 1996).

Voraussetzung für beide Ansätze ist die Gewinnung einer ausreichenden Zellzahl an DC. Dies ist angesichts der sehr geringen DC-Frequenz von 0,1% der Leukozyten im peripheren Blut ein sehr aufwendiges Unterfangen (Fearnley et al., 1999). Als effektivere Alternativen bieten sich daher die in vitro Differenzierung von DC aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen (Santiago-Schwarz et al., 1992) oder aus CD14+ Monozyten (Romani et al., 1996) an. In Zellkulturverfahren können CD34+ hämatopoetische Stammzellen in Gegenwart von GM-CSF und TNF α zu DC ausgereift werden. Die Ausbeute bei diesem Verfahren kann durch eine Vorkulturphase unter Zugabe von Zytokinen noch deutlich erhöht werden. Nachteile sind allerdings die geringe Homogenität der gewonnenen Zellpopulation im Vergleich zu CD14+ Monozyten als Ausgangszellen sowie die Notwendigkeit einer Mobilisierung der CD34+ hämatopoetischen Stammzellen im Patienten vor Apherese durch G-CSF-Gabe (Siena et al., 1995). Das Problem beim Einsatz von G-CSF ist, dass eine Polarisierung des Immunsystems in Richtung einer TH2-Antwort erfolgt, welche für eine Immuntherapie von Tumoren nicht wünschenswert ist (Sloand et al., 2000; Nishimura et al., 1999).

Die Frequenz von CD14+ Monozyten im Blut beträgt 2,5-10% und steigt in Leukapheresepreparaten auf 25% an, so dass im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen sogar ohne Mobilisierung ausreichende Zellzahlen erreicht werden können (Sorg et al., 2001). Nach weiterer Anreicherung mittels positiver immunmagnetischer Selektion (Sorg et al., 2003) können CD14+ Monozyten in

Gegenwart von GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert werden (Romani et al., 1994). Im nächsten Schritt kann dann durch Zugabe von TNF α , IL-1, IL-6 und PGE2 die Ausreifung zu reifen DC induziert werden (Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994; Zhou et al., 1996; Jonuleit et al., 1997). Der große Vorteil dieses Verfahrens im Hinblick auf die Immuntherapie von Tumoren ist die Möglichkeit, sowohl unreife als auch reife DC sukzessiv gewinnen zu können. Unreife DC weisen eine hohe Antigenaufnahmeaktivität auf und können somit sehr effizient mit Antigenen beladen werden. Reife DC sind wiederum spezialisiert auf die Migration zu lokalen Lymphknoten und die potente Stimulation von T-Zellen, so dass sie nahezu ideale Kandidaten für die Vakzinierung des Patienten sind. Charakteristische Eigenschaften von in vitro aus CD14⁺ Monozyten erzeugten unreifen DC sind die fehlende Expression von CD14 und CD83 bei gleichzeitiger Expression von CD11c und effizienter Antigenaufnahmeaktivität. Reife DC sind ebenfalls durch fehlende CD14-Expression gekennzeichnet, weisen aber eine Expression von CD83 und eine starke T-Zell-stimulatorische Aktivität auf. In beiden Reifungsstadien ist eine Expression von CD40, CD50, CD54, CD58, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-ABC nachweisbar, die bei reifen DC aber deutlich stärker ausgeprägt ist. Reife DC sollten zusätzlich IL-12 und CCR7 exprimieren, die typische in Abbildung 6 gezeigte Morphologie besitzen und HLA-DR-Moleküle aus dem lysosomalen Kompartiment an die Zelloberfläche transloziert haben, was auf eine Antigenpräsentation über den MHC2-Weg als typisches Merkmal von APC hinweist.

Unter Nutzung der beschriebenen Methoden ist es möglich, unter good manufacturing practice (GMP)-Bedingungen ausgehend von CD14⁺ Monozyten eine Vakzine aus reifen, mit autologem Tumorslysat beladenen DC in ausreichender Menge herzustellen, um eine Immuntherapie von Tumorpatienten durchzuführen (Sorg et al., 2003).

In einer Reihe von in vitro-Untersuchungen sowie tierexperimentellen Studien konnte die prinzipielle Anwendbarkeit des Konzeptes der Immuntherapie mit DC für die Therapie von glialen Hirntumoren nachgewiesen werden (Ashley et al., 1997; De Vleeschouwer et al., 2005; Zhu et al., 2005). Nach diesen positiven präklinischen Ergebnissen wurden mehrere Fallbeschreibungen sowie klinische Studien der Phasen I und II publiziert, welche erste Ergebnisse zur klinischen Anwendung lieferten. Die meisten Studien wurden an kleinen, inhomogenen Patientenserien durchgeführt, in denen die Immuntherapie mit DC als adjuvantes Konzept nach

Operation des Primärtumors oder eines Rezidivtumors eingesetzt wurde. Oft sind die Patienten daher mit Chemo- oder Strahlentherapie vorbehandelt bzw. erhalten im Rahmen des Studienprotokolls neben der Immuntherapie eine solche konventionelle Therapie. Dennoch wird aus den in Tabelle 3 zusammengefassten Untersuchungen zur Immuntherapie mit DC bei Patienten mit malignen Gliomen deutlich, dass die Therapie bei diesem Kollektiv mehrheitlich ohne schwere Nebenwirkungen anwendbar ist sowie immunologische Surrogatmarker und klinische Beobachtungen eine Wirksamkeit nahe legen.

Tabelle 3: Übersicht über die bisher publizierten klinischen Studien und Fallberichte zur Immuntherapie von malignen Gliomen mit DC.				
Autor und Jahr der Publikation	Patientenzahl	Angaben über unerwünschte Nebenwirkungen	Immunologische Antwort und sonstiges Monitoring	Klinische Antwort bzw. relevante klinische Daten
Liau et al. 2000	1	- keine	- T-Zell-Proliferations-Assay: zelluläre Immunantwort (n = 1)	- keine
Yu et al. 2001	9	- Übelkeit, Fieber und Erbrechen (n=1) - generalisierte Lymphadenopathie (n = 1)	- JAM-Assay: zelluläre Immunantwort (n = 4)	- keine
Kikuchi et al. 2001	8	- Erythem an der Injektionsstelle (n = 1)	- FACS: Zunahme der NK-Zellen im Blut (n = 4) - ELISA: erhöhte IFN γ -Konzentration im Überstand (n = 6)	- mixed response (n = 1)
Yamanaka et al. 2003	10	- Kopfschmerzen (n = 1)	- FACS: Zunahme der NK-Zellen im Blut (n = 5) - DTH: positiv gegen Tumorlysat (n = 3) - ELISPOT: vermehrte T-Zell-Antwort gegen Tumorantigene (n = 2)	- minor response (n = 2)
Wheeler et al. 2003	1717	- keine Angaben	- qPCR-Assay: Zunahme der IFN γ -Bildung (n = 6)	- keine Angaben
Yu et al. 2004	14	- Kopfschmerzen (n = 3) - Fatigue (n = 2) - Erythem an der Injektionsstelle (n = 1) - Krampfanfall (n = 2)	- qPCR-Assay: Zunahme der IFN γ -Bildung (n = 6) - Tetramer-Färbung: Expansion eines tumorspezifischen CD8-Klons (n = 4) - JAM-Assay: zelluläre Immunantwort (n = 1)	- medianes Überleben signifikant erhöht
De Vleeschouwer et al. 2004	1	- transiente Morgensteifigkeit (n = 1)	- DTH: positiv gegen Tumorlysat - transiente Veränderungen von Kontrastmittelaufnahme bzw. Metabolismus in MRT und PET	- tumorfreie Überlebenszeit 60 Monate nach Immuntherapie zum Zeitpunkt der Publikation (n = 1)
Rutkowski et al. 2004	12	- reversible Grad IV Neurotoxizität (n = 1) - transiente Grad II Hämatotoxizität (n = 2) - Meningismus (n = 1) - Nachtschweiß (n = 1)	- DTH: positiv gegen Tumorlysat (n = 6)	- partial response (n = 4) - tumorfreie Überlebenszeit 5 Jahre nach Immuntherapie zum Zeitpunkt der Publikation (n = 2)
Kikuchi et al. 2004	15	- Fieber (n = 4) - Krampfanfall (n = 1) - reversible Leberfunktionsstörung (n = 6) - transiente Grad II Hämatotoxizität (n = 7)	- DTH: positiv gegen Tumorlysat (n = 15) - ELISA: IFN γ -Bildung durch CD8-Zellen (n = 1) - Chrom-Release-Assay: vermehrte zytotoxische Reaktion (n = 2)	- partial response (n = 4) - mixed response (n = 1)

Yamanaka et al. 2005	24	<ul style="list-style-type: none"> - Erythem an der Injektionsstelle (n = 7) - Kopfschmerzen (n = 1) 	<ul style="list-style-type: none"> - DTH: positiv gegen Tumorslysate (n = 8) - ELISPOT: positiv (n = 7) 	<ul style="list-style-type: none"> - partial response (n = 1) - minor response (n = 3) - medianes Überleben signifikant erhöht
Liau et al. 2005	12	<ul style="list-style-type: none"> - Übelkeit (n = 3) - Kopfschmerzen (n = 2) - Krampfanfall (n = 1) - Erythem (n = 3) - Fatigue (n = 5) - Fieber (n = 2) 	<ul style="list-style-type: none"> - Alamar-blue-CTL-Assay: zelluläre Immunantwort (n = 6) 	<ul style="list-style-type: none"> - partial response (n = 1) - medianes Überleben signifikant erhöht
Okada et al. 2007	5	<ul style="list-style-type: none"> - Kopfschmerzen (n = 1) 	<ul style="list-style-type: none"> - keine 	<ul style="list-style-type: none"> - keine
Walker et al. 2008	13	<ul style="list-style-type: none"> - keine Angaben 	<ul style="list-style-type: none"> - Immunhistochemie: erhöhte Anzahl tumorinfiltrierender T-Zellen (CD8+) und memory T-Zellen (CD45+) in post-Immuntherapie- vs. prä-Immuntherapie-OP-Präparaten (n = 3) 	<ul style="list-style-type: none"> - Überlebenszeiten bei 9 Patienten mit vollständig durchgeführtem adjuvanten Immuntherapie-Protokoll: 8 Patienten überlebten für 9 Monate nach OP, 5 für 12 Monate und 2 für mehr als 18 Monate - Überlebenszeiten aller 13 Patienten: 9 Patienten überlebten für 9 Monate nach OP, 6 für 12 Monate und 3 für >18 Monate
De Vleeschouwer et al. 2008	56	<ul style="list-style-type: none"> - Erythem an der Injektionsstelle (n = 56) - reversible Grad IV Neurotoxizität (n = 1) - transiente Grad II Hämatotoxizität (n = 2) - reversible fokale neurolog. Defizite (n = 6) - Kopfschmerzen (n = 9) - Erbrechen (n = 2) - Fatigue (n = 7) - grippale Symptome (n = 3) - Krampfanfall (n = 4) - Myalgien und Arthralgien (n = 3) - subdurale Hygrome (n = 2) - Tumorblutung (n = 2) 	<ul style="list-style-type: none"> - DTH: positiv gegen Tumorslysate (n = 9) 	<ul style="list-style-type: none"> - verlängertes progressionsfreies Intervall bei jungen Patienten - erhöhte Zahl von Patienten mit Überlebenszeiten von 2 bzw. 3 Jahren nach Immuntherapie - besseres Outcome durch schnelles Immuntherapie-Protokoll
Wheeler et al. 2008	32	<ul style="list-style-type: none"> - kutanes Gliomwachstum am Ort der DTH-Testung 	<ul style="list-style-type: none"> - qPCR-Assay: IFNγ-Bildung durch PBMC nach Immuntherapie erhöht im Vergleich zum Wert vor Immuntherapie (n = 17) 	<ul style="list-style-type: none"> - signifikant längere Überlebenszeit bei Patienten mit Nachweis einer erhöhten IFNγ-Bildung nach Immuntherapie (definiert als responder; 642 +/- 61d) versus Patienten ohne erhöhte IFNγ-Bildung (definiert als non-responder; 430 +/- 50d) - 2-Jahres-Überlebensrate bei respondern betrug 41%, bei non-respondern 7%

Wenn auch in vielen Aspekten der technischen Durchführung und des Therapiemonitorings Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeiten bestehen, so kommt die Mehrheit der Autoren zu dem Schluss, dass die Immuntherapie mit DC nach einer makroskopisch kompletten neurochirurgischen Tumorresektion, das heißt ohne radiologisch nachweisbaren Resttumor, eingesetzt werden sollte. Die klassischen onkologischen Kriterien, zum Beispiel die RECIST-Kriterien, lassen sich aus diesem Grund für die Bewertung der Immuntherapie nicht ohne Schwierigkeiten

heranziehen, da eine radiologisch beurteilbare Ausgangsläsion nicht mehr vorliegt. Die Evaluation einer Immuntherapie sollte sich daher idealerweise einerseits auf immunologische Surrogatmarker stützen und andererseits den tatsächlichen klinischen Effekt als overall survival angeben. Diese und weitere für die Bewertung und Planung einer Studie zur Immuntherapie des GBM relevante Aspekte wurden von De Vleeschouwer et al. 2006 ausführlich zusammengefasst.

Am Universitätsklinikum Düsseldorf wird bei Gliompatienten die Immuntherapie mit DC als adjuvantes Konzept möglichst nach ALA-gestützter, makroskopisch kompletter neurochirurgischer Resektion des Tumors durchgeführt. Das zur Beladung der DC benötigte autologe Tumormaterial wird im Rahmen dieser Operation asserviert. Nach Leukapherese zwischen Operation und Beginn der Strahlen-Chemotherapie können die DC wie zuvor beschrieben unter GMP-Bedingungen aus CD14+ Monozyten generiert, mit Tumormaterial beladen, ausgereift und bis zur Anwendung der fertigen Vakzine kryokonserviert werden (Abbildung 8). Die eigentliche Vakzinierung des Patienten erfolgt nach Abschluss der Strahlen-Chemotherapie und vor Beginn der intermittierenden Chemotherapie-Zyklen des Therapieschemas nach Stupp et al, 2005. Pro Patient werden durchschnittlich 5 subkutane Vakzinierungen im Bereich der Oberarme oder zervikal vorgenommen. Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die zeitliche Abfolge des gesamten multimodalen Therapiekonzeptes bei Behandlung eines erstdiagnostizierten GBM. Im Falle der Immuntherapie eines Rezidiv-GBM oder bei patientenbezogenen Besonderheiten können individuelle Abweichungen vorkommen.

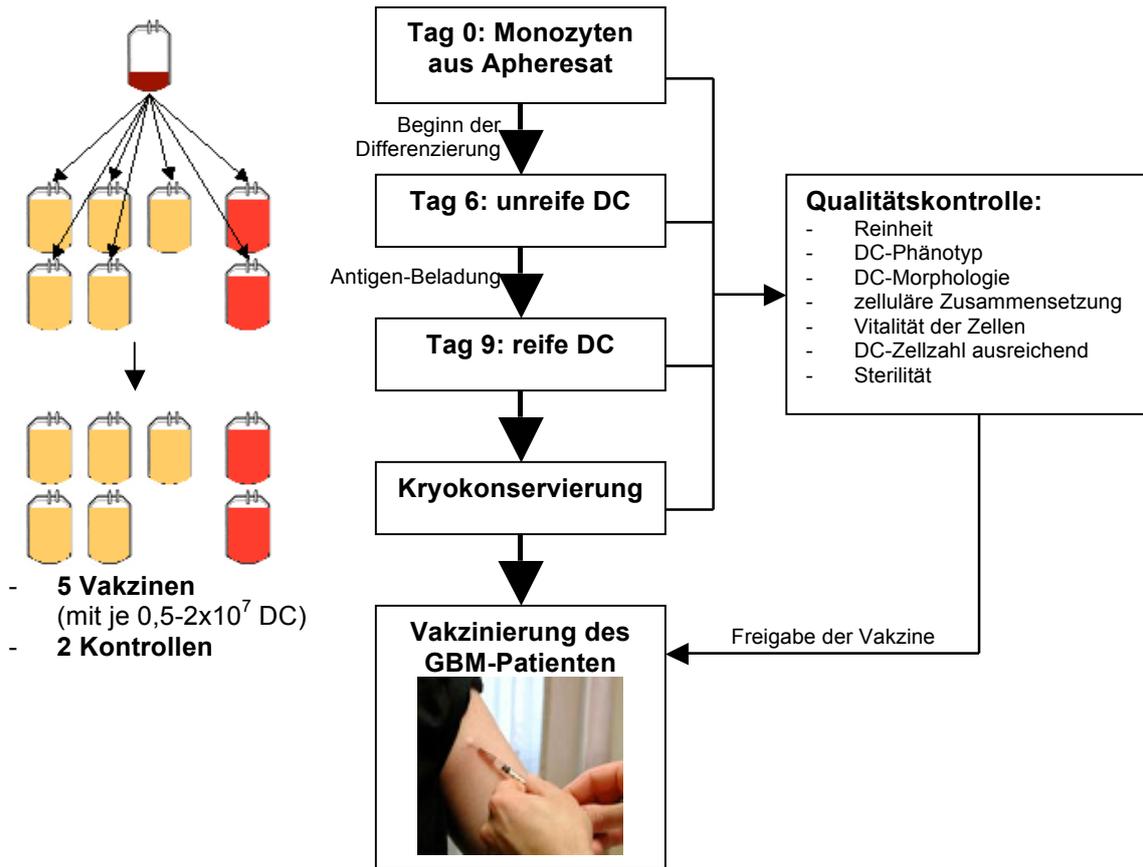


Abb. 8: Herstellungsprozess der Vakzine für die Immuntherapie mit DC. Ausgehend von CD14+ Monozyten erfolgt die Ausreifung, Tumorantigen-Beladung und Kryokonservierung der DC-Vakzine. Alle Schritte erfolgen unter GMP-Bedingungen und unterliegen Qualitätskontrollen.

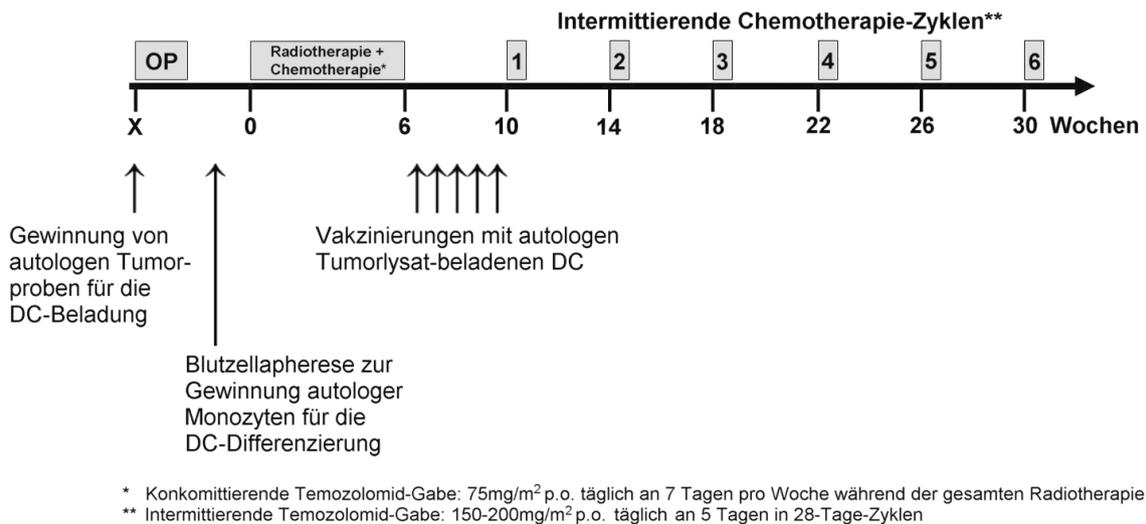


Abb. 9: Übersicht über das gesamte Therapiekonzept für GBM-Patienten, die eine Immuntherapie mit DC erhalten. Die Asservierung autologen Tumormaterials zur späteren DC-Beladung, die Apherese zur Isolierung von Monozyten für die DC-Differenzierung und die Applikation der Vakzine wird entsprechend der Grafik in das an der Neurochirurgischen Klinik als Standardkonzept betrachtete Therapieschema (Stupp et al., 2005) integriert.

1.10 Ziele dieser Dissertation

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung des allgemeinen Immunstatus von Patienten mit GBM in der perioperativen Phase. Dabei sollte untersucht werden:

- ob relevante immunologische Beeinträchtigungen dieses potentiell für eine Immuntherapie in Frage kommenden Patientenkollektivs vorliegen.
- ob eine Veränderung des Immunstatus nach operativer Reduktion der Tumormasse erfolgt.

Der Hauptaspekt dieser Arbeit war die umfassende Analyse der vier bisher am Universitätsklinikum Düsseldorf mit einer adjuvanten Immuntherapie mit DC behandelten GBM-Patienten. Im Einzelnen sollte untersucht werden:

- ob unter der Immuntherapie Nebenwirkungen auftreten, insbesondere Hämatoxizität.
- ob die Immuntherapie eine Expansion von zytotoxischen T-Zellen induziert.
- ob die Immuntherapie eine Expansion von regulatorischen T-Zellen induziert.
- ob mit der Immuntherapie im Patienten eine tumorspezifische Immunantwort erzeugt werden kann.

2. Materialien und Methoden

2.1 Charakterisierung der Patienten

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Patienten mit malignen Gliomen wurden in der Neurochirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstdiagnostiziert, operiert und nachbehandelt. In Anbetracht der beiden Schwerpunkte in der Zielsetzung dieser Arbeit wird im Folgenden zwischen Vakzinierungspatienten und GBM-Patienten unterschieden.

Bei den Vakzinierungspatienten (Tabelle 4) handelte es um zwei Patienten, bei denen die Immuntherapie nach der Erstoperation analog zu dem in Abbildung 9 gezeigten Schema erfolgte, sowie um zwei Patienten, die nach der Operation eines Rezidiv-GBM immuntherapiert wurden. Die histologische Diagnose und der Status der MGMT-Promotormethylierung wurden jeweils durch das Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gesichert. Die für diese Dissertation zu wissenschaftlichen Zwecken von Vakzinierungspatienten untersuchten Proben umfassten PBMC aus venösem Blut und asservierte Aliquots der DC-Vakzine.

Tab. 4: Zusammenfassung wichtiger Daten der Vakzinierungspatienten (n = 4).							
Pat.	Geschlecht u. Alter bei Diagnose	Histologie	MGMT-Promotormethylierung	Therapie vor Immuntherapie	Immuntherapie	Therapie unter/nach Immuntherapie	Verlauf
A	männlich 43 Jahre	GBM	nicht methyliert	- OP 10/2003 - Radiatio 11-12/2003 - OP 11/2004 - OP 12/2004	- 12/2004 - 12/2004 - 02/2005 - 03/2005 - 02/2005	- Radiatio 01/2005 - Temozolomid 04-06/2005	- Tod 08/2005 - Überleben ab Diagnose: 668 Tage
B	männlich 52 Jahre	GBM	methyliert	- OP 06/2005 - Radiatio + Temozolomid 06-08/2005	- 08/2005 - 09/2005 - 09/2005 - 09/2005		- Tod 03/2007 - Überleben ab Diagnose: 663 Tage
C	männlich 57 Jahre	GBM	methyliert	- OP 01/2007 - Radiatio + Temozolomid 02-03/2007	- 03/2007 - 04/2007 - 04/2007 - 04/2007 - 05/2007	- Temozolomid 05-08/2007 - Temozolomid 09-11/2007	- lebt
D	männlich 13 Jahre	GBM, AA WHO-Grad III im Rezidivpräparat	nicht methyliert	- OP 10/1999 - Radiatio + Chemotherapie 10/1999-10/2000 - OP 06/2006 - Radiatio + Temozolomid 06-07/2006 - OP 05/2007 - Temozolomid 05-07/2007 - OP 08/2007 - OP 11/2007	- 11/2007 - 11/2007 - 11/2007 - 12/2007 - 12/2007	- Irinotecan + Bevacizumab 01-04/2008	- Tod 05/2008 - Überleben ab Diagnose: 3109 Tage

Bei den GBM-Patienten handelt es sich um sechs Patienten mit GBM, bei denen im perioperativen Zeitraum venöse Blutentnahmen zur Erfassung des Immunstatus durchgeführt wurden. Die Therapie erfolgte durch Operation mit konventioneller Nachbehandlung; eine Immuntherapie wurde nicht durchgeführt. Die Daten dieser Patienten können Tabelle 5 entnommen werden.

Patient	Geschlecht	Primärtumor	Erstoperation
1	weiblich	primäres GBM	06/2005
2	männlich	primäres GBM	04/2005
3	männlich	sekundäres GBM	06/2005
4	männlich	primäres GBM	05/2005
5	männlich	primäres GBM	06/2005
6	männlich	primäres GBM	04/2005

Als Referenzgruppe zur Auswertung des Immunstatus wurden 13 gesunde Probanden untersucht.

Alle Patienten wurden ausführlich über die geplanten wissenschaftlichen Untersuchungen und die damit verbundenen Blutproben-Entnahmen informiert und erteilten nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis, welches jederzeit widerrufen werden konnte.

2.2 Venöses Blut von Vakzinierungspatienten, nicht-vakzinieren GBM-Patienten und gesunden Probanden

Die Abnahme des Blutes wurde peripher venös mit Hilfe des Vacutainer-Systems durchgeführt. Als Antikoagulanzen diente EDTA (Ethylen-Diethyl-Tetraacetat).

2.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus venösem Blut

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde das venöse Vollblut vorsichtig unter Vermeidung einer Durchmischung über 15 ml Ficoll-Lösung ($1,077\text{g/cm}^3$; Biochrom; Berlin, Deutschland) geschichtet, welche in einem 50 ml Röhrchen (Falcon/BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) vorgelegt wurden. Nach Zentrifugation mit 850g ohne Bremse für 20 min bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ befanden sich die mononukleären Zellen in

einer sichtbaren Schicht zwischen der Ficoll-Lösung und dem Überstand aus Plasma und konnten manuell mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Dieses wurde im anschließenden Waschschrift mit PBS (phosphate buffered saline, Serag-Wiessner, Neila, Deutschland) aufgefüllt und erneut mit 550g für 7 min bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Zellsediment wurde in 25 ml Ammoniumchlorid-Lösung (8,3g/l NH₄Cl, 1g/l KHCO₃, 0,0375g/l EDTA) resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Im Anschluß an diese Inkubation erfolgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS, bevor die Zellen entweder zur weiteren baldigen Verwendung in 0,5% HSA/PBS (humanes Serumalbumin in PBS, Octapharma, Langenfeld oder Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) bei 4 °C gelagert wurden oder zur längeren Aufbewahrung eingefroren wurden.

2.4 Bestimmung von Zellzahlen

Zur automatischen Bestimmung von Zellzahlen und Differentialblutbildern diente ein Blutzellanalysator (CellDyn 3500, Abbott, Wiesbaden, Deutschland).

Für isolierte bzw. aufgetaute Zellen zur Verwendung im Rahmen von Zellkulturen wurden Zellzahl und Vitalität manuell durch Zugabe von 10 µl Trypan-Blau-Lösung zu 10 µl der Zellsuspension und anschließende Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Hierzu wurden die Zellen im ersten Schritt bei 550g für 7 min bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Zellsediment wurde in 0,5 ml einer 8% HSA/RPMI-1640-Lösung aufgenommen und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Nun erfolgte nach Zugabe von 0,5 ml einer 22% DMSO/RPMI-1640-Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) das umgehende Einfrieren der Proben bei -80 °C. Für eine längere Aufbewahrung über mehr als 6 Monate wurden die Proben in Flüssigstickstoff bei -196 °C eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut und dann, nach Zugabe von 1 ml einer 8% HSA/RPMI-1640-Lösung, vollständig aufgetaut. Anschließend erfolgte die Überführung der Probe in 2 ml einer 8% HSA/RPMI-1640-

Lösung, welche in einem 15 ml Röhrchen (Falcon/BD Biosciences) vorgelegt wurden. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min wurden die Zellen zweimal mit 0,5% HSA/PBS gewaschen und schließlich zur weiteren Verarbeitung resuspendiert.

2.6 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen

Für eine direkte durchflusszytometrische Analyse aus Vollblut erfolgte zunächst eine Lyse der Erythrozyten durch Ammoniumchlorid-Lösung wie zuvor beschrieben. Nach Abschluss der Lyse wurden die Zellen gewaschen und dann, genauso wie zuvor gereinigte Zellproben, in 100 µl einer 0,5% HSA/PBS-Lösung pro anzusetzender Färbung resuspendiert. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspension wurden in die entsprechende Anzahl von FACS-Röhrchen überführt.

Für Färbungen von membranständigen Antigenen wurden je 5 µl der jeweiligen Antikörper zugegeben. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C erfolgte ein Waschschrift und danach entweder die direkte Messung oder eine Fixierung mit 0,5% Formaldehyd/PBS-Lösung.

Für Färbungen einer Kombination aus membranständigen und intrazellulären Antigenen wurden zuerst die Membranfärbungen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Durchführung der intrazellulären Färbungen benutzten wir den Cytotfix/Cytoperm-Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland); entsprechend erfolgte die Vorbereitung der benötigten Reagenzien nach Angaben des Herstellers. Die membrangefärbten Zellen wurden gewaschen, dann in 250 µl Fix/Perm-Lösung resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit Perm/Wash-Puffer wurden die Zellen in 100 µl Perm/Wash-Puffer resuspendiert und 5 µl des Antikörpers gegen das intrazelluläre Antigen bzw. der entsprechenden Isotyp-Kontrolle hinzugegeben. Nun wurden die Proben für 30 min bei 4 °C in der Dunkelheit inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen und schließlich entweder direkt gemessen oder fixiert.

Alle Messungen erfolgten an einem FACS-Canto-Zytometer mit Diva-Software (BD Biosciences) unter Verwendung entsprechender Isotypkontrollen.

Verwendet wurden FITC-konjugierte Antikörper gegen CD3 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), CD4 (Beckman Coulter), CD8 (Beckman Coulter), CD14 (Beckman Coulter), CD25 (Beckman Coulter), CD45 (BD Biosciences) und FoxP3 (eBioscience, San Diego, USA). Verwendet wurden PE-konjugierte Antikörper gegen

CD3 (Beckman Coulter), CD14 (Beckman Coulter), CD19 (Beckman Coulter), CD56 (Beckman Coulter), CD127 (BD Biosciences) und CD107a (BD Biosciences). Außerdem wurden APC-konjugierte Antikörper gegen CD8 (BD Biosciences), PE-Cy5-konjugierte Antikörper gegen CD25 (BD Biosciences) sowie PE-Cy7-konjugierte Antikörper gegen CD4 (BD Biosciences) genutzt.

2.7 Induktion und Nachweis proliferativer Antworten mittels BrdU-ELISA

Pro Patient wurden auf je einer Hälfte zweier 96-Well-Rundbodenplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pro Well 2000 antigen-beladene bzw. nicht-antigen-beladene DC mit 1×10^5 autologen mononukleären Zellen in 200 μ l X-Vivo 15-Medium (Lanza, Verviers, Belgien) bei 37 °C und 5% CO₂ kokultiviert. Die Bestückung beider Platten war identisch und kann der Abbildung 10 entnommen werden, welche den kompletten Platten-Satz dieses Versuches zeigt.

		Patient A				Patient B							
		Beladene DC		Unbeladene DC		Beladene DC		Unbeladene DC					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zeitpunkt 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 7	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 8	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

		Patient A				Patient B							
		Beladene DC		Unbeladene DC		Beladene DC		Unbeladene DC					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zeitpunkt 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 7	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 8	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

		Patient C				Patient D							
		Beladene DC		Unbeladene DC		Beladene DC		Unbeladene DC					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zeitpunkt 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 7	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 8	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

		Patient C				Patient D							
		Beladene DC		Unbeladene DC		Beladene DC		Unbeladene DC					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zeitpunkt 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 7	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zeitpunkt 8	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 10: Bestückung der 96-Well-Rundbodenplatten für den BrdU-ELISA- und den IFN γ -ELISPOT-Test. Für beide Tests wurden entsprechend der Grafik jeweils zwei 96-Well-Rundbodenplatten mit PBMC und unbeladenen bzw. tumorbeladenen DC der Patienten A und B sowie C und D bestückt. Die PBMC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach der Immuntherapie entnommen; pro Vakzinierungspatient wurden mindestens fünf Zeitpunkte untersucht.

Nach 5 Tagen wurden zu den Kulturen zweier 96-Well-Rundbodenplatten (bestückt mit Zellen der Patienten A/B und C/D) 20 μ l pro Well einer 1:100 verdünnten BrdU-Lösung (5'-Brom-2'-Deoxy-Uridin, ELISA-Kit, Roche Diagnostics, Mannheim,

Deutschland) hinzugegeben. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wurden die Zellen resuspendiert, in eine 96-Well-Flachbodenplatte (Greiner) überführt und mit 200 µl für 10 min bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platte bei 60 °C für 1 Stunde getrocknet. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Fixans-Lösung pro Well (ELISA-Kit, Roche Diagnostics) und eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur. Die Fixans-Lösung wurde abgegossen, 100 µl pro Well einer Anti-BrdU-POD-Lösung (Peroxidase-konjugierte anti-BrdU-Antikörper) in 1:100-Verdünnung hinzugegeben und erneut für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschrritten erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat-Lösung (ELISA-Kit, Roche Diagnostics) pro Well sowie eine Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur. Die photometrische Messung wurde bei OD_{660nm} vs. 490nm an einem Biomek1000-Photometer (Beckman Coulter) durchgeführt. Alle Messungen waren Dreifachansätze und werden als Mittelwerte angegeben. Hintergrundwerte wurden aus Wells ermittelt, die nur Medium enthielten.

Bei den Zellen auf den übrigen 96-Well-Rundbodenplatten wurden erstmals am 7. Tag der Zellkultur und in der Folge an jedem 3. Tag 100 µl des Mediums vorsichtig entfernt und durch 100 µl frischen Mediums mit Zugabe von 1000 U/ml Interleukin 2 (IL-2, Chiron-Behring, Marburg, Deutschland) ersetzt. Diese Expansionsphase dauerte 18 Tage, bis schließlich eine Restimulation mit autologen DC und anschließende Durchführung des BrdU-ELISA-Assays in oben beschriebener Weise erfolgte.

2.8 Induktion und Nachweis der Zytokinexpression durch T-Zellen mittels IFN γ -ELISPOT

Pro Patient wurden auf jeweils der Hälfte einer 96-Well-ELISPOT-Platte (BD ELISPOT-Kit, BD Biosciences) und einer 96-Well-Rundbodenplatte pro Well 2000 antigen-beladene beziehungsweise nicht-antigen-beladene DC mit 1×10^5 autologen mononukleären Zellen in 200 µl X-Vivo 15-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ kokultiviert. Die Bestückung beider Platten war identisch und kann der Abbildung 10 entnommen werden.

Die meisten der in diesem Versuch verwendeten Reagenzien entstammen dem BD ELISPOT-Kit (BD Biosciences) und wurden entsprechend der Anweisungen des Herstellers vorbereitet.

Die Zellsuspension der 96-Well-ELISPOT-Platten wurde nach Inkubation über Nacht am folgenden Tag abgegossen und die Platten zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Drei weitere Waschschriffe wurden mit 200 µl Waschpuffer pro Well durchgeführt. Anschließend wurden pro Well 100 µl der detection antibody-Lösung hinzugegeben und die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abgießen und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden pro Well 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung zugefügt und die Platte erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abgießen wurden die Wells viermal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS-Lösung gewaschen, bevor zu jedem Well 100 µl der AEC-Substrat-Lösung (BD ELISPOT-Kit, BD Biosciences) zugegeben wurden. Die Entwicklung der Spots wurde kontinuierlich beobachtet und bei deutlichen erkennbaren Spots nach durchschnittlich 30 min Inkubation durch Zugabe von Aqua dest. abgestoppt. Nach Waschen mit Aqua dest. wurde die Platte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur Auszählung in einer verschlossenen Plastiktüte in der Dunkelheit aufbewahrt. Die Auszählung der Spots erfolgte manuell unter einem Auflicht-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Alle Messungen waren Dreifachansätze und werden als Mittelwerte angegeben. Hintergrundwerte wurden aus Wells ermittelt, die nur Medium enthielten.

Bei den Zellen auf den konventionellen 96-Well-Rundbodenplatten wurden erstmals am 7. Tag der Zellkultur und in der Folge an jedem 3. Tag 100 µl des Mediums vorsichtig entfernt und durch 100 µl frischen Mediums mit 1000 U/ml Interleukin 2 (IL-2, Chiron-Behring) ersetzt. Diese Expansionsphase dauerte 18 Tage, bis schließlich die Zellen auf ELISPOT-Platten umgesetzt wurden, mit autologen DC restimuliert wurden und der ELISPOT-Assays in oben beschriebener Weise durchgeführt wurde.

2.9 Erfassung von klinischen Verlaufsparemtern der Vakzinierungs-patienten

Die Erfassung des klinischen Verlaufs beruht primär auf der aktiven Datensammlung während der Betreuung der Patienten und wird durch die retrospektive Auswertung der Patientenakten aus der Neurochirurgischen Klinik ergänzt. Die registrierten klinischen Parameter lassen sich in folgende Kategorien einteilen:

- Symptomatik des Patienten
- operative Therapiemaßnahmen

- strahlen- und chemotherapeutische Therapiemaßnahmen
- immuntherapeutische Therapiemaßnahmen
- Tumormasse (berechnet anhand von MRT-Sequenzen nach der üblichen radiologischen Methodik) sowie Besonderheiten in der MRT- und PET-Bildgebung
- Begleitmedikation, insbesondere Glukokortikosteroid-Gaben
- Besonderheiten und Komplikationen im Erkrankungsverlauf
- Gesamtüberlebenszeit

2.10 Statistik

Alle Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test beziehungsweise mit dem Student's t-Test bestimmt und wird als p-Wert angegeben, wobei ein $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wird. Für die statistischen Berechnungen und die graphische Darstellung der Daten wurde die Software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Immunstatus von GBM-Patienten

Zur Erfassung des allgemeinen Immunstatus von Patienten mit GBM wurden Analysen von relevanten Immunzellen im venösen Blut durchgeführt. Insgesamt wurden 12 Blutproben von 6 Patienten untersucht, wobei die Blutentnahmen am Tag vor der OP sowie 6±1 Tage nach Operation entnommen wurden. Als Referenzgruppe dienten 13 gesunde Probanden. Neben der Gesamt-Leukozytenzahl wurden die Frequenzen beziehungsweise Zellzahlen der in Tabelle 6 aufgelisteten Leukozyten-Subpopulationen ermittelt.

Tab. 6: Im Rahmen der Erhebung des Immunstatus untersuchte Zellpopulationen.			
Leukozyten-Population		Subpopulation	
Bestimmung mit automatischem Blutzellanalysator (Differentialblutbild):			
Neutrophile Granulozyten			
Lymphozyten			
Monozyten			
Durchflusszytometrische Bestimmung:			
T-Zellen (CD45+/CD3+)	Helfer T-Zellen (CD3+/CD4+)		
	zytotoxische T-Zellen (CD3+/CD8+)		
B-Zellen (CD45+/CD19+)			
Monozyten (CD45+/CD14+)			
NK-/NKT-Zellen (CD45+/CD56+)			

Bei den Messungen mit dem automatischen Blutzellanalysator waren hinsichtlich der Gesamtzellzahl der Leukozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen GBM-Patienten und der Kontrollgruppe nachweisbar.

Bei den GBM-Patienten zeigte sich jedoch eine in Relation zur Kontrolle erhöhte Zellzahl der neutrophilen Granulozyten, die postoperativ statistische Signifikanz erreichte ($7,2 \pm 1,3 \times 10^6$ Zellen/ml vs. $4,3 \pm 0,5 \times 10^6$ Zellen/ml, $p < 0,05$). Die Frequenz der neutrophilen Granulozyten war sowohl prä- als auch postoperativ erhöht ($73,1 \pm 3,9\%$ bzw. $76,7 \pm 2,6\%$ vs. $60,7 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$).

Die Zellzahl der Lymphozyten war präoperativ erniedrigt ($1,0 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml vs. $2,0 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml, $p < 0,05$) und wies postoperativ eine leichte Steigerung auf. Die Frequenz der Lymphozyten war bei GBM-Patienten stets erniedrigt ($15,2 \pm 2,2\%$ bzw. $15,9 \pm 2,6\%$ vs. $28,6 \pm 1,6\%$, $p < 0,05$).

Die Monozytenzellzahlen und –frequenzen wiesen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Veränderungen auf; tendenziell bestanden aber präoperativ erhöhte Werte.

Die differenziertere durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen ergab sowohl in prä- als auch postoperativen Proben der GBM-Patienten eine deutliche Verminderung von Zellzahl ($0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml bzw. $0,8 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen/ml vs. $2,0 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml, $p < 0,05$) und Frequenz ($11,0 \pm 3,5\%$ bzw. $9,0 \pm 2,1\%$ vs. $28,9 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$) der CD3+ T-Lymphozyten. Die weitere Differenzierung der CD3+ T-Lymphozyten in CD4+ Zellen und CD8+ Zellen ließ eine präoperativ erniedrigte CD4+ Frequenz ($50,3 \pm 4,2\%$ vs. $63,3 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$) und eine sowohl prä- als auch postoperativ erhöhte CD8+ Frequenz ($40,6 \pm 5,5\%$ bzw. $40,1 \pm 5,9\%$ vs. $27,8 \pm 2\%$, $p < 0,05$) erkennen. Die postoperative Analyse der CD4+ Frequenz ergab eine tendenzielle Normalisierung mit Annäherung an den Wert der gesunden Probanden.

Die Frequenz der CD19+ B-Lymphozyten war präoperativ erniedrigt ($2,2 \pm 0,7\%$ vs. $4,6 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$) und zeigte postoperativ einen Anstieg auf annähernd normales Niveau ohne signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Dieser Verlauf ließ sich auch in der Zellzahl nachvollziehen.

Die Frequenz der CD14+ Monozyten war prä- und postoperativ bei GBM-Patienten signifikant erhöht ($11 \pm 3,6\%$ bzw. $7,6 \pm 0,7\%$ vs. $5,4 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$). Im Vergleich zwischen prä- und postoperativen Werten zeigt sich ein postoperativer Rückgang der Frequenz.

Die Frequenz der CD56+ NK- und NKT-Zellen wies bei den GBM-Patienten vor der Operation keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, fiel aber postoperativ auf erniedrigte Werte ab ($3,2 \pm 0,3\%$ vs. $5,9 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$). Die Zellzahl war postoperativ ebenfalls verringert.

Zellzahlen und Frequenzen der einzelnen Zellpopulationen sind in den Abbildungen 11 und 12 wiedergegeben.

Abb. 11: Zellzahlen und Frequenzen der Leukozyten-Populationen von GBM-Patienten prä- und postoperativ. Aus der Gesamtleukozytenzahl (WBC [$\times 10^6/\text{ml}$]) und den Frequenzen der Populationen wurden deren Zellzahlen [$\times 10^6/\text{ml}$] berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet.

Legende:

-  GBM-Patienten prä OP
-  GBM-Patienten post OP
-  Kontrollen

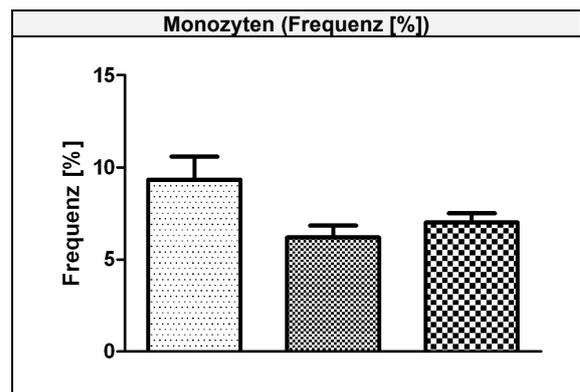
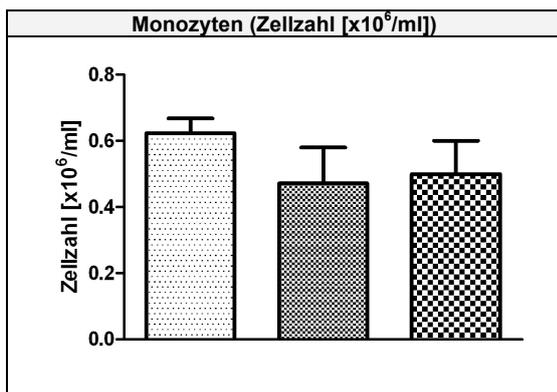
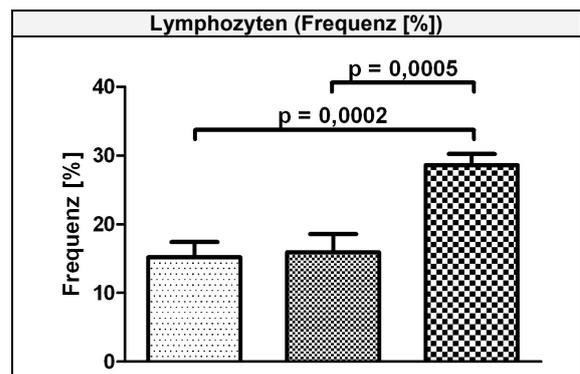
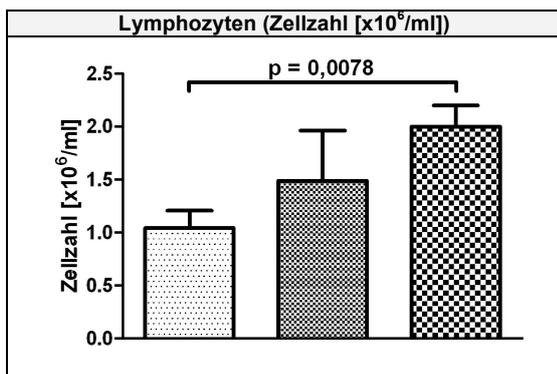
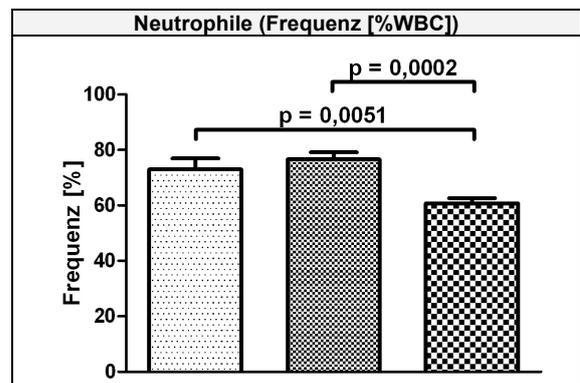
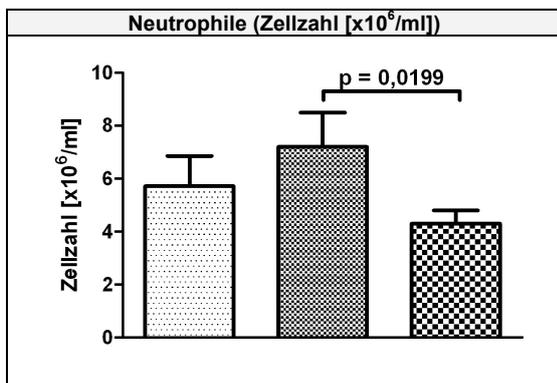
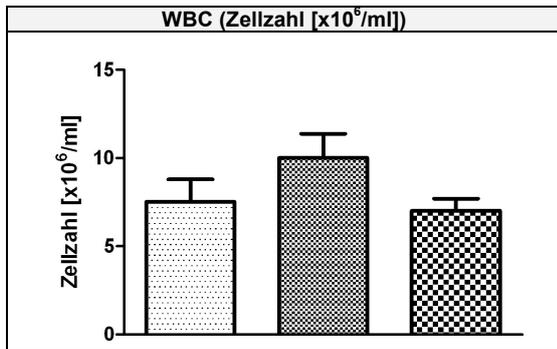
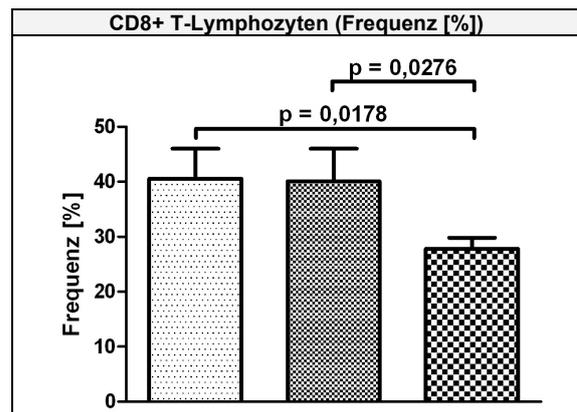
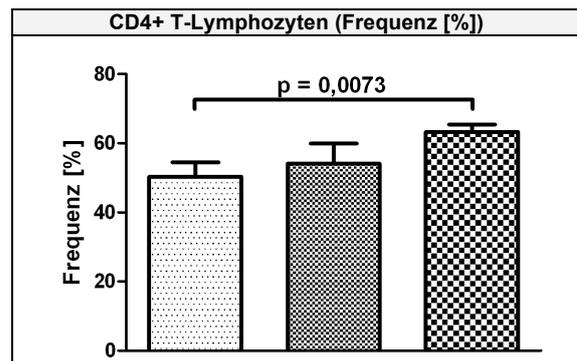
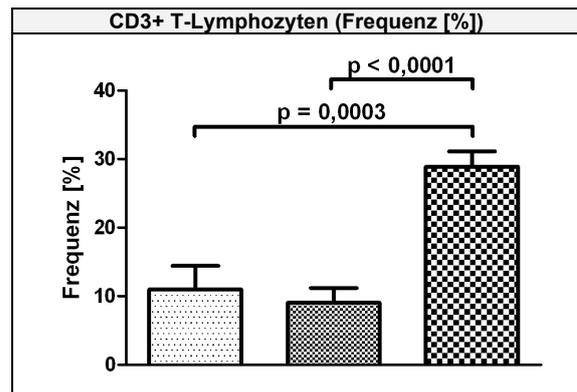
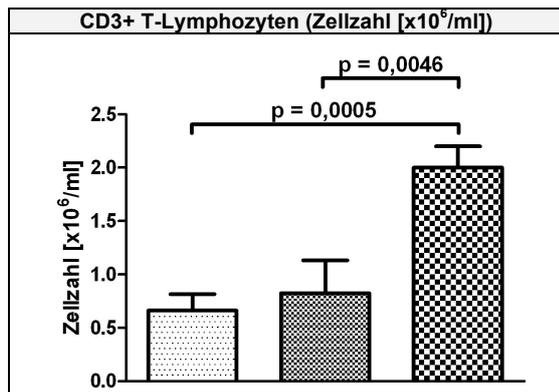


Abb. 12: Zellzahlen und Frequenzen der durchflusszytometrisch bestimmten Leukozyten-Subpopulationen von GBM-Patienten prä- und postoperativ. Aus der Gesamtleukozytenzahl (WBC [$\times 10^6/\text{ml}$]) und den Frequenzen der Subpopulationen wurden deren Zellzahlen [$\times 10^6/\text{ml}$] berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet.

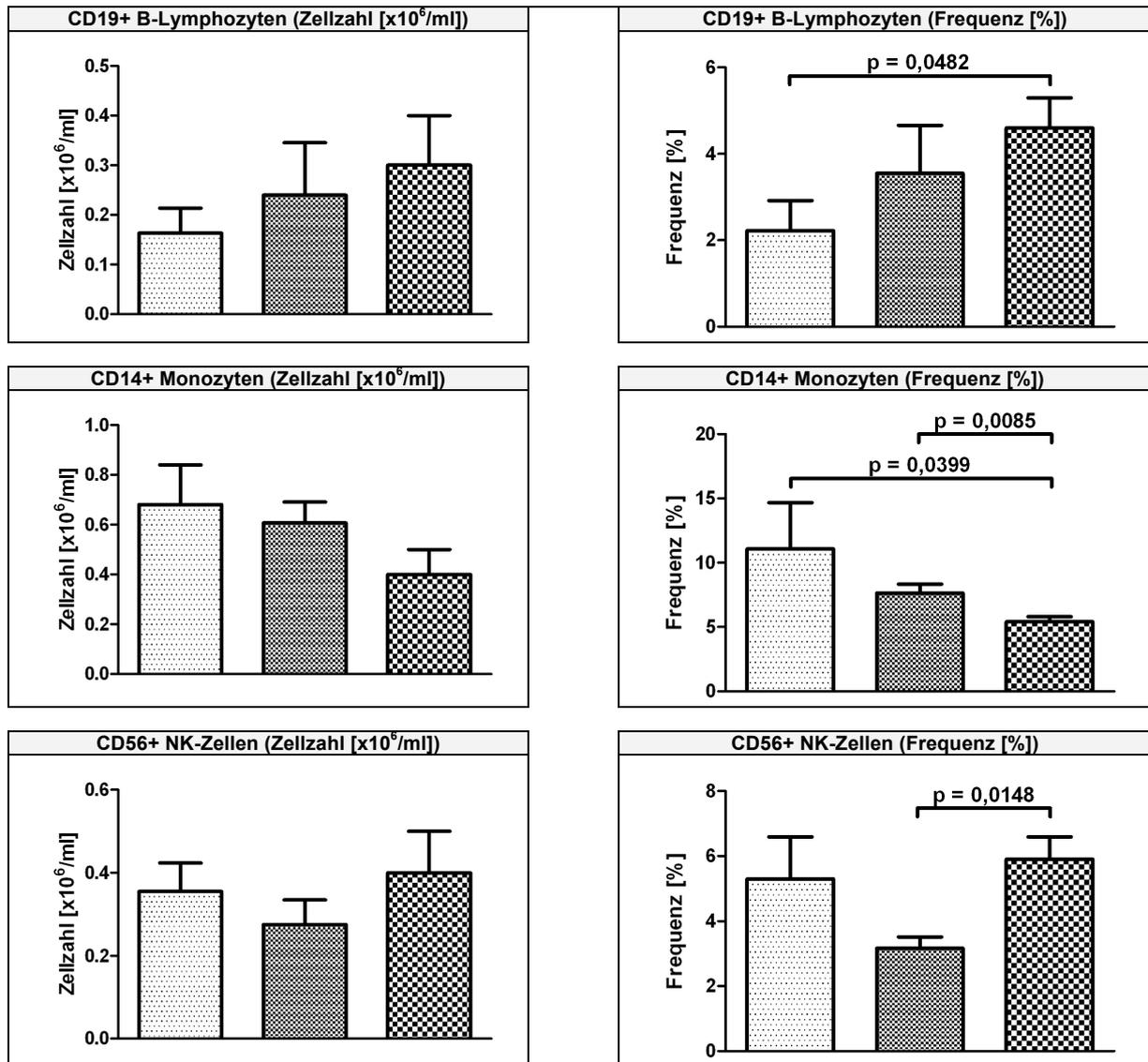
Legende:

-  GBM-Patienten prä OP
-  GBM-Patienten post OP
-  Kontrollen



Fortsetzung auf der nächsten Seite.

Abb. 12: Fortsetzung.



3.2 Immunstatus von Vakzinierungspatienten im Verlauf der Vakzinierung

Als Teil des Immunmonitorings während der Vakzinierungstherapie führten wir zur Erfassung der wichtigsten Immunzellen analog zur Erhebung des Immunstatus bei GBM-Patienten (siehe 3.1) Messungen mit dem automatischen Blutzellanalysator und der Durchflusszytometrie durch. Diese Untersuchungen wurden an jedem Vakzinierungszeitpunkt ausgeführt und hatten zum Ziel, quantitative Veränderungen der untersuchten Zellen besonders im Sinne von Hämatotoxizität in Anlehnung an die CTCAE-Kriterien (common terminology criteria for adverse events) zu erkennen. Bei keinem der vier Vakzinierungspatienten zeigten sich Veränderungen in diesen

Messungen, die im Zusammenhang mit der Immuntherapie die Kriterien einer hämatotoxischen Nebenwirkung erfüllen. Ein repräsentativer Verlauf ist anhand der Messwerte von Patient C in Abbildung 13 dargestellt.

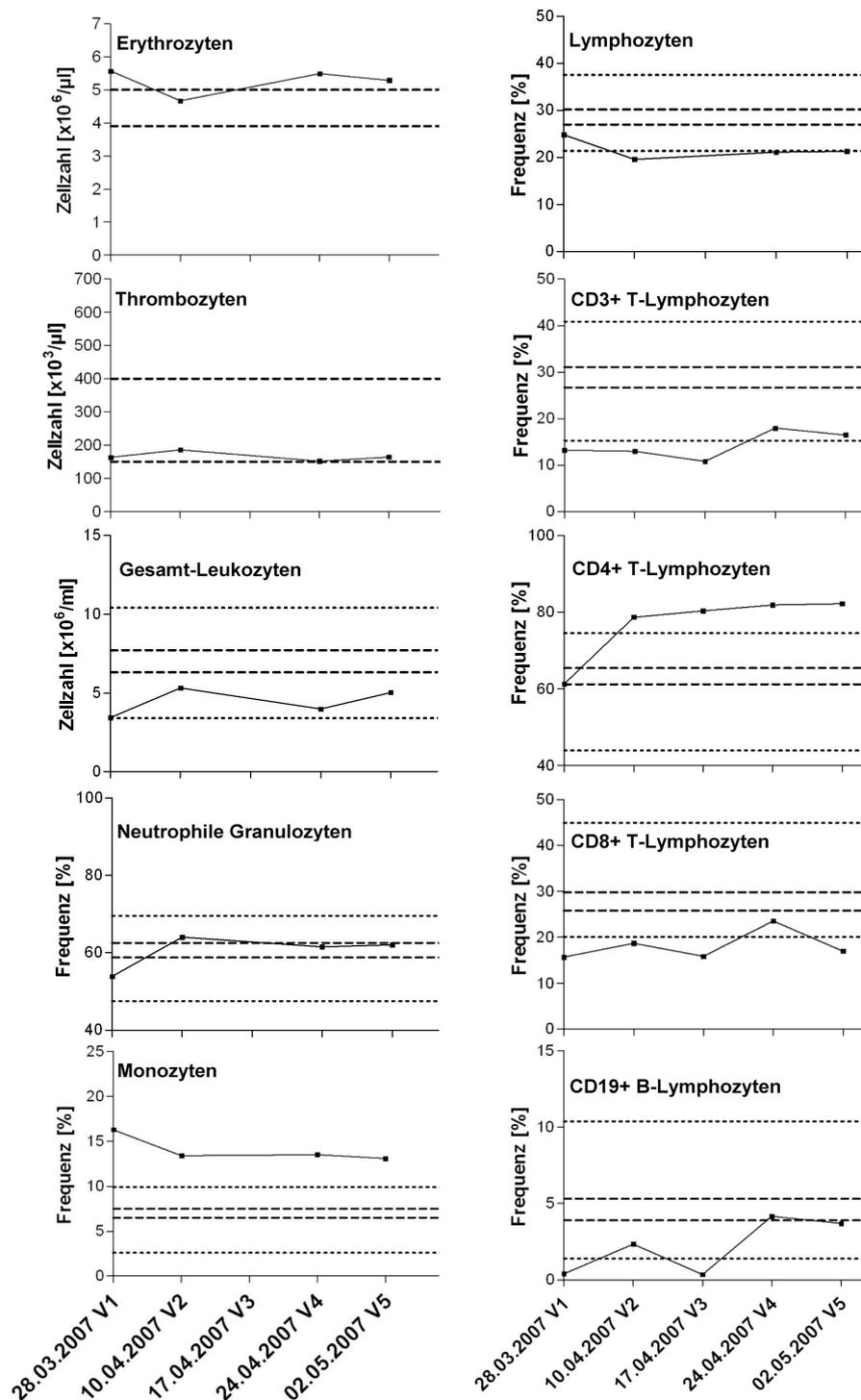


Abb. 13: Repräsentatives Beispiel des Immunmonitorings (Daten von Patient C). Der Immunstatus wurde methodisch analog zu den Untersuchungen bei GBM-Patienten bestimmt. Proben wurden an den Vakzinierungszeitpunkten (V1 bis V5) gewonnen. Als Normbereiche sind Mittelwerte \pm SEM der Kontrollgruppe als grob unterbrochene Linien und der Streubereich der Kontrollgruppe als fein unterbrochene Linien dargestellt.

3.3 Regulatorische T-Zellen bei Vakzinierungspatienten

Zur Erfassung einer Expansion von Tregs unter der Immuntherapie führten wir durchflusszytometrische Messungen mit der für diese Subpopulation der CD4+ CD25+ T-Zellen spezifischen Markerkonstellation CD4+ CD25+ FoxP3+ durch. Zur weiteren Bestätigung des Treg-Phänotyps wurde zudem die fehlende Expression von CD127 auf diesen Zellen als typisches Merkmal von FoxP3+ Tregs nachgewiesen. Abbildung 13 zeigt beispielhaft die durchflusszytometrische Charakterisierung eines Patienten. Hierbei zeigten sich bei allen vier Vakzinierungspatienten Anstiege der Frequenzen der CD4+ CD25+ T-Lymphozyten im Verlauf der Immuntherapie. Die Frequenz dieser Zellen war im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erhöht ($1,05 \pm 0,39\%$ vs. $3,08 \pm 0,45\%$, $p < 0,05$) (Abbildung 14a). Innerhalb der CD4+ CD25+ Population blieb bei allen Patienten die Frequenz der CD4+ CD25+ FoxP3+ Tregs weitgehend konstant ($83,55 \pm 1,45\%$); es trat während der Immuntherapie keine Veränderung gegenüber der Ausgangsfrequenz auf (Abbildung 14b). Zusammenfassend beobachteten wir während der Immuntherapie eine Zunahme der CD4+ CD25+ T-Zellen, wobei der Anteil der ihrer FoxP3+ Subpopulation konstant blieb. Die Verläufe dieser Zellen bei den Vakzinierungspatienten sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt. Die zusätzliche Validierung des Treg-Phänotyps durch Nachweis der fehlenden CD127-Expression ergab identische Verläufe, wobei die gemessenen Frequenzen wie in der der Literatur angegeben mit dieser Methode um circa 10% geringer waren (repräsentatives Beispiel in Abbildung 17).

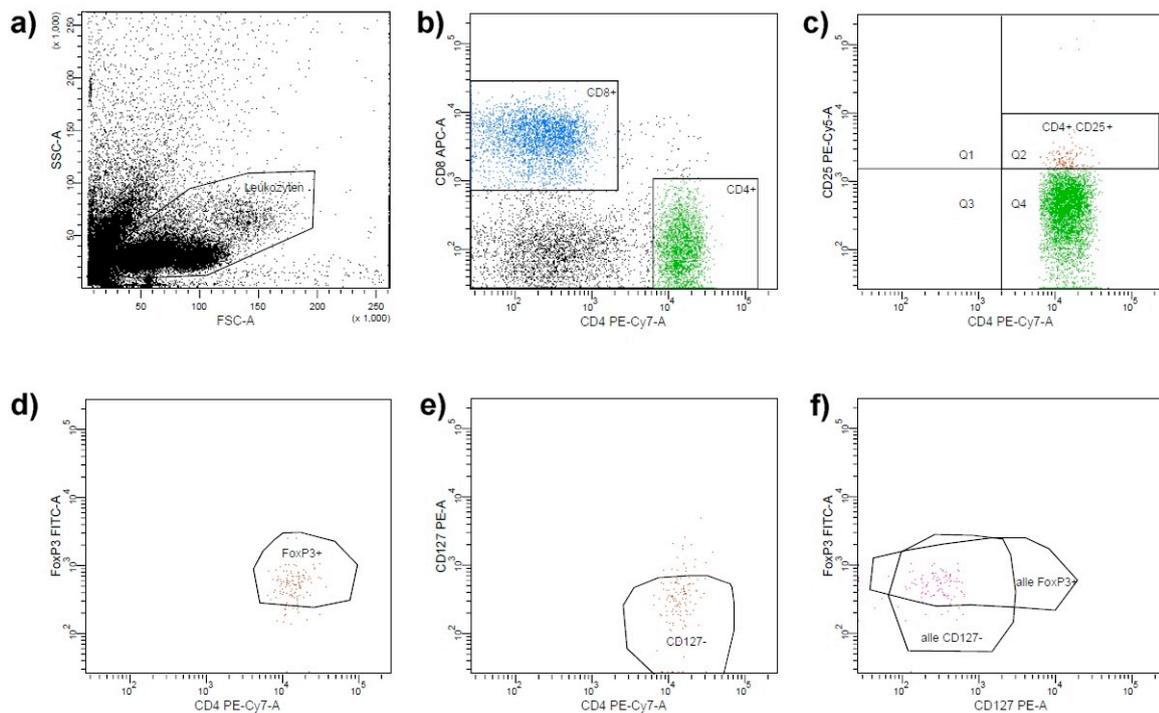


Abb. 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung der CD4+ CD25+ T-Zellen und Tregs. Die Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern der jeweils angegebenen Spezifität gefärbt. Die Frequenz positiver Zellen wurde elektronisch auf CD4+ (b) und dann auf CD4+ CD25+ (c) eingeschränkt. Danach wurden FoxP3+ (d) bzw. CD127- (e) Zellen identifiziert und schließlich durch überlappende Regionen die Frequenz der Tregs mit dem Phänotyp CD4+ CD25+ FoxP3+ CD127- gemessen (f).

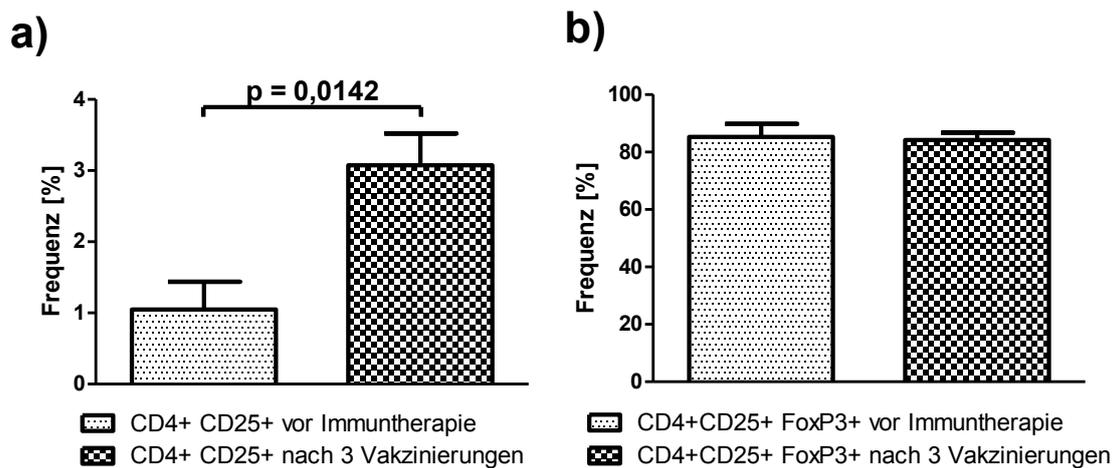


Abb. 14: Frequenz der CD4+ CD25+ T-Zellen (a) sowie Frequenz der CD4+ CD25+ FoxP3+ T-Zellen (b) jeweils vor Immuntherapie und nach drei verabreichten Vakzinierungen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-test bestimmt.

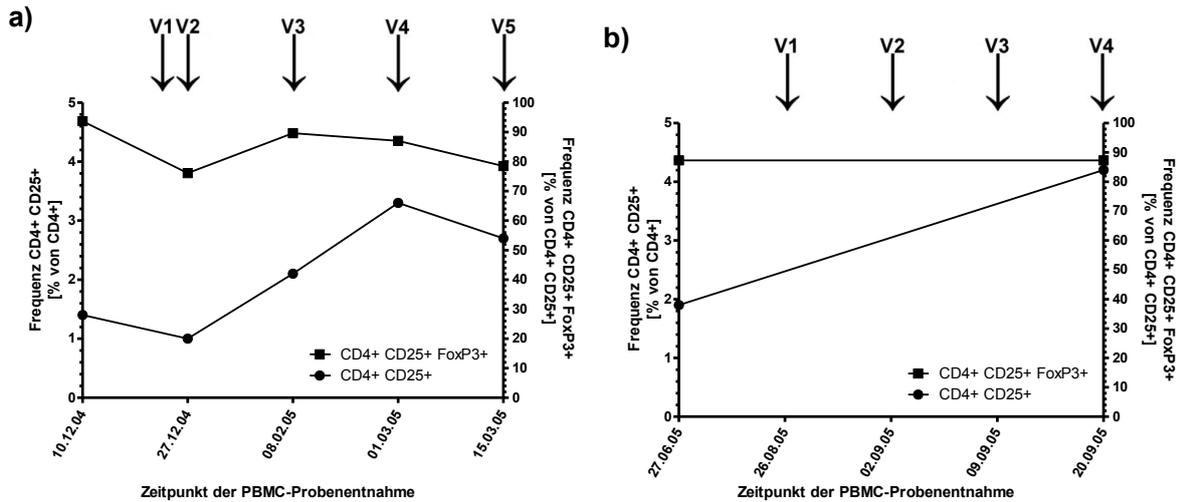


Abb. 15: Frequenzen von CD4+ T-Zellen, CD4+ CD25+ T-Zellen und CD4+ CD25+ FoxP3+ T-Zellen (= T_{reg}) von Patient A (a) und B (b). Die CD4+ CD25+ T-Zellen stellen eine Subpopulation der CD4+ T-Zellen dar, welche die FoxP3+ T_{reg} enthält. Die Vakzinierungen sind als Pfeile (V1 bis V4 bzw. V5) angegeben.

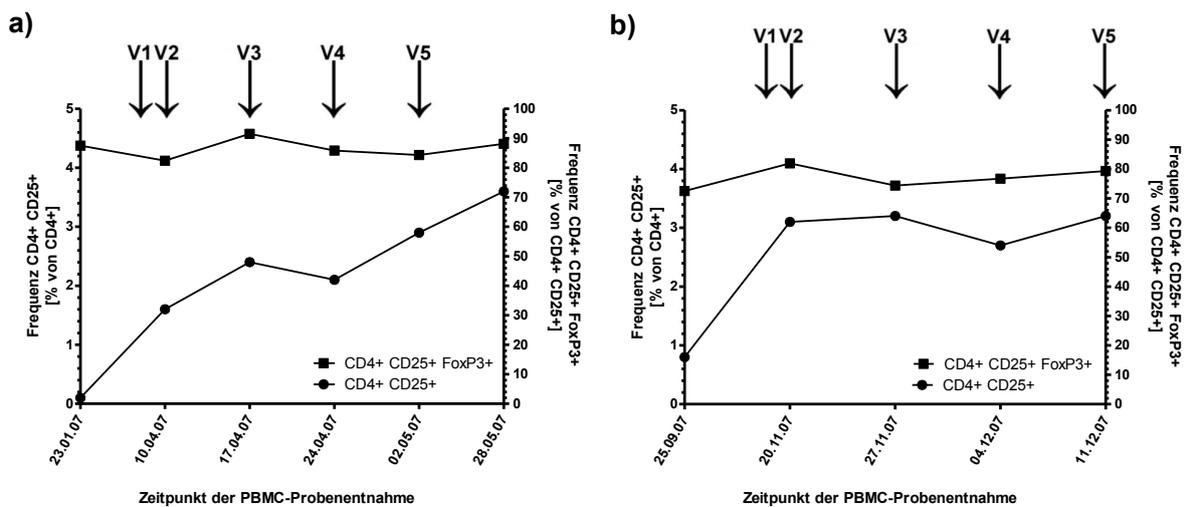


Abb. 16: Frequenzen von CD4+ T-Zellen, CD4+ CD25+ T-Zellen und CD4+ CD25+ FoxP3+ T-Zellen (= T_{reg}) von Patient C (a) und B (b). Die CD4+ CD25+ T-Zellen stellen eine Subpopulation der CD4+ T-Zellen dar, welche die FoxP3+ T_{reg} enthält. Die Vakzinierungen sind als Pfeile (V1 bis V4 bzw. V5) angegeben.

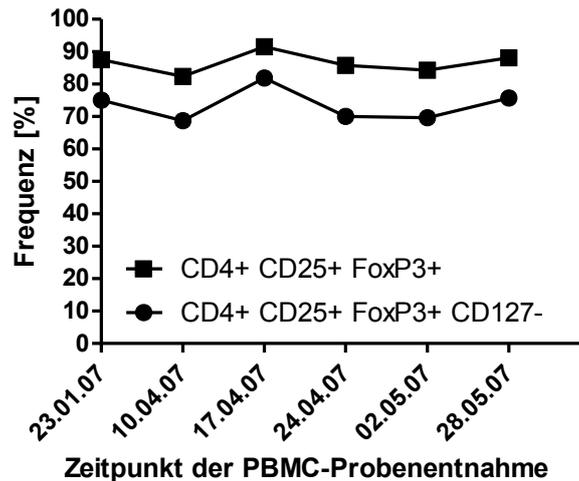


Abb. 17: Vergleich der Verläufe von Tregs bei Bestimmung von CD4+ CD25+ FoxP3+ sowie bei zusätzlichem Nachweis der fehlenden CD127-Expression.

3.4 Zytotoxische Effektorzellen bei Vakzinierungspatienten

Als Parameter für eine durch die Immuntherapie induzierte zytotoxische Reaktion von Effektorzellen haben wir die Expression des Zytotoxizitätsmarkers CD107a durchflusszytometrisch bestimmt. Dieser Marker gehört zur Gruppe der LAMP (lysosomal associated membrane glycoproteins) und gelangt bei Degranulation von zytotoxischen Zellen, insbesondere CD8+ T-Lymphozyten, an die Zelloberfläche und kann damit als Marker der aktiven Zytotoxizität dienen (Betts et al., 2003). Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse der CD107a-Expression. Bei den Patienten C und D kam es, wie in Abbildung 19 erkennbar, nach drei beziehungsweise zwei applizierten Vakzinierungen zu einem deutlichen Anstieg der CD107a-Expression mit transient mehr als verdoppelter Ausgangsfrequenz. Beim Vergleich beider Verläufe ist zu beachten, dass bei Patient C der letzte Messzeitpunkt 26 Tage nach Gabe der letzten Vakzine erfolgte und damit weniger dem Immuntherapiemonitoring als vielmehr einer Nachuntersuchung entspricht. Bei den Patienten A und B konnte eine vergleichbar deutliche Hochregulation von CD107a nicht beobachtet werden.

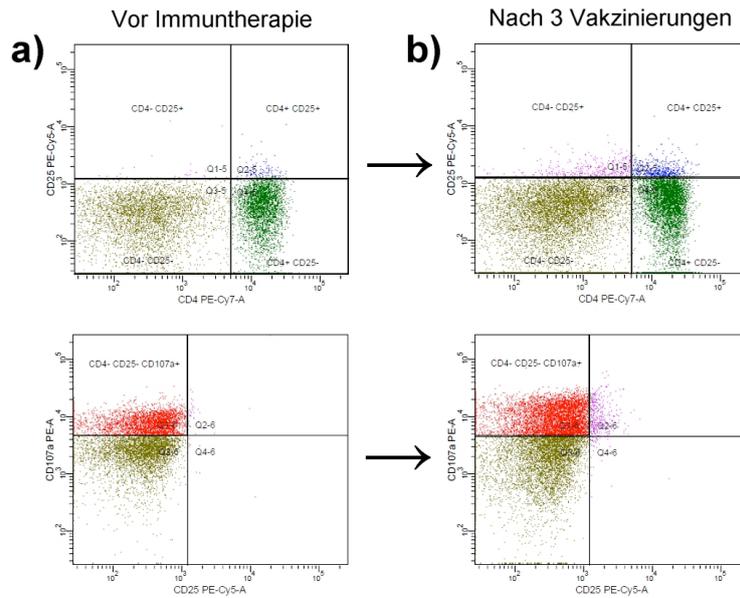


Abb. 18 a und b: Durchflusszytometrische Charakterisierung der CD107a-Expression. Die Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern der jeweils angegebenen Spezifität gefärbt. Die Frequenz positiver Zellen wurde elektronisch auf CD4⁺CD25⁻ Zellen eingeschränkt (obere Dotplot-Reihe) und die Expression von CD107a in dieser Population gemessen. Nach 3 Vakzinierungen (b) zeigt sich bei diesem Patienten eine Frequenzzunahme der CD4⁺CD25⁻ Zellen und ihrer CD107a⁺-Subpopulation im Vergleich zum Ausgangszustand vor Immuntherapie (a).

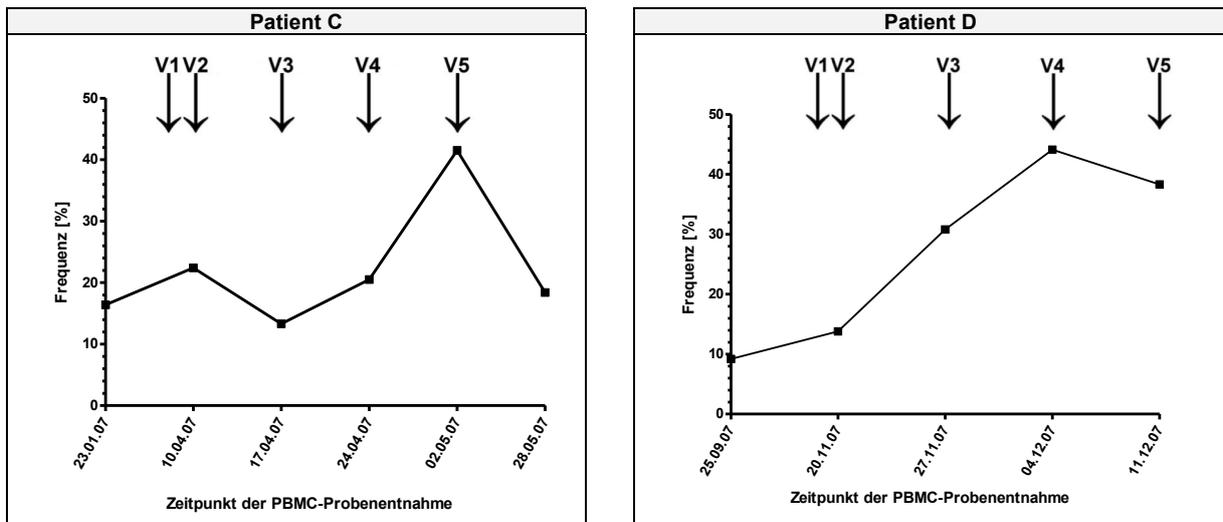


Abb. 19: Frequenzen der CD107a-exprimierenden aktivierten zytotoxischen Effektorzellen. Die Zeitpunkte der Vakzinierungen sind als Pfeile (V1 bis V4 bzw. V5) angegeben.

3.5 Klinische Verlaufparameter bei Vakzinierungspatienten

Die klinische Beobachtung der Vakzinierungspatienten zielte neben dem allgemeinen Krankheitsverlauf insbesondere auf Nebenwirkungen und Komplikationen unter der Immuntherapie ab. Lokale Erytheme im Bereich der Injektionsstellen der Vakzinen

waren die häufigste beobachtete Nebenwirkung der Immuntherapie und waren stets selbstlimitierend.

Bei Patient B trat nach drei verabreichten Vakzinen am vierten Tag nach der letzten Vakzinierung eine tiefe Venenthrombose (TVT) der V. femoralis superficialis am proximalen rechten Oberschenkel auf. Trotz umgehend eingeleiteter Thrombosetherapie kam es in der Folge zu einer Ausweitung der TVT und zur klinischen Verschlechterung des Patienten mit Dyspnoe und Tachykardie. Bei positivem Nachweis einer Lungenembolie wurde eine intensivmedizinische Behandlung notwendig. Hierbei handelte es sich um die einzige schwere Komplikation, die wir bei den Vakzinierungspatienten beobachten konnten.

Aufgrund der Natur der Gliomerkrankung traten bei allen Patienten neurologische Symptome auf. Im Beobachtungszeitraum neu aufgetretene neurologische Defizite, besonders fokale neurologische Ausfälle, konnten stets nach entsprechender Bildgebung durch Tumorlokalisierung beziehungsweise Tumorprogress oder -rezidiv erklärt werden; Anhaltspunkte für entzündliche oder autoimmunologische Prozesse ergaben sich nicht.

Die Analyse der prognostischen Parameter zeigte bei Patient A eine Überlebenszeit ab Diagnose von 27 Monaten; unmittelbar nach der bei einem geschätzten Tumolvolumen von $<50\text{cm}^3$ durchgeführten Immuntherapie trat ein Tumorprogress ein, der nach 4 Monaten zum Tod führte.

Bei Patient B betrug die Überlebenszeit ab Diagnose 23 Monate. Das progressionsfreie Intervall nach der Immuntherapie, welche nach makroskopisch kompletter Resektion erfolgte, betrug 16 Monate und der Patient erhielt in diesem Zeitraum 12 Zyklen einer Chemotherapie mit Temozolomid. Der Patient verstarb 17 Monate nach Abschluss der Immuntherapie bei fulminantem Tumorprogress.

Patient C lebte zum Zeitpunkt der Zusammenstellung dieser Daten, wobei die Diagnose 19 Monate zuvor gestellt worden war. Der Patient erhielt die Immuntherapie annähernd 3 Monate nach Erstdiagnose in makroskopisch komplett reseziertem Zustand und wurde im Anschluß mit Temozolomid nach den Schemata von Stupp et al. (2005) sowie Wick et al. (2006) chemotherapiert. Die radiologischen Verlaufskontrollen zeigten eine minimale Tumormasse $<2\text{cm}^3$, so dass derzeit von einer Tumorkontrolle ausgegangen werden kann.

Patient D wurde im Alter von 13 Jahren erstmals an einem GBM operiert und blieb danach für 68 Monate progressionsfrei. Die Immuntherapie erfolgte nach zweimaliger

inkompletter Resektion eines Rezidivtumors. Unter der Immuntherapie zeigte sich erneut ein Tumorprogress, der abermals neurochirurgisch therapiert wurde. Unmittelbar vor der Vakzinierung erhielt der Patient Temozolomid. Bei weiterhin progredienter Tumorerkrankung wurde nach Abschluss der Immuntherapie eine Chemotherapie mit Irinotecan und Bevacizumab begonnen, die trotz initialer Teilremission bei letztendlich unkontrollierbarem multifokalem Tumorprogress eingestellt wurde, so dass der Patient 12 Monate nach Auftreten des ersten Rezidivs verstarb.

Angesichts der prognostischen Relevanz bei Chemotherapie mit Temozolomid wurde bei allen Vakzinierungspatienten der Status der MGMT-Promotor-Methylierung bestimmt. Die Patienten B und C wiesen eine MGMT-Promotor-Methylierung auf, während diese bei den Patienten A und D nicht nachweisbar war.

Die Tabellen 7, 8, 9 und 10 enthalten eine Übersicht über die klinischen Verläufe der vier Vakzinierungspatienten unter zeitlicher Zusammenschau von Symptomatik, Befunden der Bildgebung, operativer sowie radio- und chemotherapeutischer Behandlung, medikamentöser Begleittherapie und Immuntherapie.

Tab. 7: Klinische Verlaufsbeobachtungen des Patienten A. RF = Raumforderung, TV = Tumolvolumen.					
Zeit	Symptomatik	Bildgebung	Operation	Radiatio/Chemo/ Medikamente	Immuntherapie
Juli 03	Sturz, neuropsychologische Defizite	MRT: links temporale RF			
Oktober 03	kein fokales neurologisches Defizit nach Operation	MRT prä OP: TV = 30cm ³ (links temporal)	Resektion links temporal am 21.10.03, histologisch GBM		
November 03		MRT post OP: TV = 3cm ³ (links temporal)		Radiatio links temporal, keine Steroid-Gabe	
Dezember 03					
Februar 04		MRT: TV = 0 cm ³			
Mai 04		MRT: TV = 0 cm ³			
Juli 04		MRT: TV = 0 cm ³			
November 04	kein fokales neurologisches Defizit nach Operation	MRT prä OP: TV = 14 cm ³ (links temporal); MRT post OP: TV = 1 cm ³ (links temporal)	Resektion links temporal am 08.11.04		
Dezember 04	homonymer Gesichtsfelddefekt rechts, Krampfanfall am 21.12.04	MRT prä OP: TV = 14 cm ³ (links okzipital); 1. MRT post OP: TV = 1 cm ³ (links okzipital); 2. MRT post OP: TV = 48 cm ³ (links okzipital)	Resektion links okzipital am 14.12.04	Orfiril 300mg 3x täglich ab dem 21.12.04	1. Vakzinierung am 20.12.04; 2. Vakzinierung am 27.12.04
Januar 05		FET-/FDG-PET: Tumorrezidiv links okzipital		Radiatio links okzipital, temporäre Steroid-Gabe	
Februar 05		FET-/FDG-PET am 02.02.05: Verdacht auf Tumorrezidiv links temporal, unklare Signalveränderungen links okzipital			3. Vakzinierung am 08.02.05
März 05	progrediente Hemiparese	MRT: TV = 78 cm ³ (links temporal)		Steroid-Gabe nach Abschluss der Vakzinierung	4. Vakzinierung am 01.03.05; 5. Vakzinierung am 15.03.05
April 05		FET-/FDG-PET: Verdacht auf Rezidiv links temporal, unklare Signalveränderungen links okzipital		Temozolomid-Gabe (intermittierendes Schema)	
Mai 05		MRT:TV = 100 cm ³ (links okzipital)			
Juni 05		MRT: TV = 93 cm ³ (links okzipital)			
Juli 05					
August 05	Tod des Patienten, Gesamtüberlebenszeit 668 Tage ab Diagnosestellung				

Tab. 8: Klinische Verlaufsbeobachtungen des Patienten B. RF = Raumforderung, TV = Tumolvolumen.					
Zeit	Symptomatik	Bildgebung	Operation	Radiatio/Chemo/ Medikamente	Immuntherapie
Mai 05	Hemiparese rechts, Aphasie	MRT prä OP: TV = 20 cm ³ (links temporal)		Zyprexa 5mg 1x täglich, Jodid 125 1x täglich, Nexium 40 mg 1x täglich, Steroid-Gabe	
Juni 05	postoperativ: Aphasie, hirnorganisches Psychosyndrom	MRT post OP: TV = 0 cm ³	Resektion links temporal am 02.06.05, histologisch GBM		
Juli 05					
August 05		FET-/FDG-PET: unspezifische Signal- veränderungen links temporal, kein sicherer Tumornachweis		Radiatio links temporal, konko- mittierende Temozolomid- Gabe, Steroid- Gabe (jeweils bis zum 10.08.05)	1. Vakzinierung am 26.08.05
September 05	TVT mit Lungenembolie am 13.09.05			temporäre Gabe von Liquemin und Refludan, Beginn einer Dauerthera- pie mit Phenpro- counon	2. Vakzinierung am 02.09.05; 3. Vakzinierung am 09.09.05; 4. Vakzinierung am 20.09.05
Oktober 05		MRT: TV = 0 cm ³			
November 05					
Dezember 05					
Januar 06					
Februar 06					
März 06		MRT: TV = 0 cm ³			
April 06		MRT: TV = 0 cm ³			
Mai 06					
Juni 06					
Juli 06		MRT: TV = 0 cm ³			
August 06		MRT: TV = 0 cm ³			
September 06					
Oktober 06					
November 06		MRT: TV = 0 cm ³			
Februar 07		MRT: Tumorrezidiv links temporal			
März 07	Tod des Patienten, Gesamtüberlebens- zeit 663 Tage ab Diagnosestellung				

Tab. 9: Klinische Verlaufsbeobachtungen des Patienten C. RF = Raumforderung, TV = Tumolvolumen.						
Zeit	Symptomatik	Bildgebung	Operation	Radiatio/Chemo/ Medikamente	Immuntherapie	
Januar 07	sensorische Aphasie, kein fokales neurologisches Defizit	MRT prä OP: TV = 13 cm ³ ; MRT post OP: TV = 0 cm ³	Resektion am 02.01.07, histologisch GBM	Steroid-Gabe		
Februar 07					Radiatio, konko- mittierende Temozolomid- Gabe, Umstellung der Steroide auf H15 vor Beginn der Vakzinierung)	1. Vakzinierung am 28.03.07 (nach Abschluss der Radiatio)
März 07						2. Vakzinierung am 10.04.07; 3. Vakzinierung am 17.04.07; 4. Vakzinierung am 24.04.07
April 07					5. Vakzinierung am 02.05.07	
Mai 07			MRT: TV = 2 cm ³		Temozolomid (intermittierendes Schema, nach Abschluss der Vakzinierung)	
Juni 07						
Juli 07						
August 07			MRT prä OP: Rezidiv; MRT post OP: kein sicherer Tumornach- weis, unspezifische Veränderungen bei Zustand nach PDT	Resektion und PDT am 27.08.07		
September 07			MRT: kein sicherer Tumornachweis		Temozolomid (1 Woche on/1 Woche off- Schema nach Wick et al., 2006)	
Oktober 07						
November 07			MRT: kein sicherer Tumornachweis			
Dezember 07						
Januar 08			MRT: kein sicherer Tumornachweis			
März 08		MRT: kein sicherer Tumornachweis				
Juni 08		MRT: kein sicherer Tumornachweis				
September 08		MRT: kein sicherer Tumornachweis				

Tab. 10: Klinische Verlaufsbeobachtungen des Patienten D. RF = Raumforderung, TV = Tumorzvolumen.					
Zeit	Symptomatik	Bildgebung	Operation	Radiatio/Chemo/ Medikamente	Immuntherapie
Oktober 99		RF rechts parietal	Resektion 10/99, histologisch GBM	Therapie gemäß HIT-GBM-C-Protokoll (adjuvante Radiatio und simultane Chemotherapie mit Etoposid, Cisplatin und Vincristin, danach Chemotherapie mit Etoposid, Cisplatin und Ifosfamid)	
November 99					
Dezember 99					
Januar 00					
Februar 00					
März 00					
April 00					
Mai 00					
Juni 00					
Juli 00					
August 00					
September 00					
Oktober 00		Remission			
Juni 06		MRT: Tumorrezidiv rechts okzipital	Resektion am 30.06.06, histologisch AA	Radiatio, simultan Chemotherapie mit Temozolomid und Valproat	
Juli 06					
Mai 07		MRT prä OP: multifokales Tumorrezidiv rechts frontal, temporal und parietal; MRT post OP: Resttumor	inkomplette Resektion am 23.05.07, Einlage von Gliadel-Wafern	Temozolomid	
Juni 07					
Juli 07					
August 07		MRT prä OP: Tumorprogress rechts frontal; MRT post OP: Resttumor	inkomplette Resektion am 22.08.07		
September 07					
Oktober 07		MRT: Tumorprogress			
November 07		MRT post OP: Resttumor	inkomplette Resektion am 02.11.07		1. Vakzinierung am 10.11.07; 2. Vakzinierung am 20.11.07; 3. Vakzinierung am 27.11.07
Dezember 07					4. Vakzinierung am 04.12.07; 5. Vakzinierung am 11.12.07
Januar 08	progrediente Ver-gesslichkeit, Ataxie, Kopfschmerzen, zunehmende Vigilanz-störung	MRT: Tumorprogress		Chemotherapie mit Irinotecan und Bevacizumab	
Februar 08		MRT: Teilremission			
März 08					
April 08		MRT: massiver Tumor-progress			
Mai 08	Tod des Patienten, Gesamtüberlebenszeit XX Tage ab Diagnosestellung				

3.6 Proliferationsantwort von Effektorzellen nach Stimulation mit unbeladenen versus tumorantigenbeladenen autologen DC

Um das Proliferationspotential von Effektorzellen der Vakzinierungspatienten in Abhängigkeit von der Anzahl der verabreichten Vakzinierungen zu untersuchen, wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu verschiedenen Zeitpunkten während der Vakzinierungsphase isoliert und mit unbeladenen sowie tumorantigenbeladenen autologen DC stimuliert sowie restimuliert. Die Quantifizierung der proliferativen Antwort erfolgte mit Hilfe eines BrdU-ELISA.

Auf diese Weise wurden von den Patienten A, B und D jeweils fünf und von Patient C sechs PBMC-Proben untersucht, wobei jeweils eine Probe vor Beginn der Vakzinierungsphase und die übrigen Proben während beziehungsweise nach dieser Phase entnommen wurden. Die unbeladenen sowie tumorantigenbeladenen DC wurden aus Rückstellproben der Vakzinen entnommen.

Die Ergebnisse der durchgeführten BrdU-ELISA nach Vorstimulation zeigten bei den Patienten C und D eine mit steigender Zahl der Vakzinierungen zunehmende Proliferationskapazität der PBMC mit vermehrtem BrdU-Einbau. Bei den Patienten A und B ließ sich keine signifikante Änderung des BrdU-Einbaus erkennen. Ohne Vorstimulation waren in keinem signifikante Veränderungen detektierbar.

Bei Patient D fand sich bei PBMC, die nach zwei applizierten Vakzinierungen entnommen worden waren, ein signifikanter Anstieg des BrdU-Einbaus bei Stimulation mit tumorantigenbeladenen DC im Vergleich zum Ausgangswert vor Immuntherapie (Abbildung 21). Am letzten Messpunkt nach vier erfolgten Vakzinierungen kam es aber zur Angleichung des BrdU-Einbaus in beiden Ansätzen. Nach vier durchgeführten Vakzinierungen ließ sich der im Vergleich zur Messung vor der Immuntherapie signifikant erhöhte BrdU-Einbau in den Effektorzellen weiterhin nachweisen ($0,043 \pm 0,00$ vs. $0,331 \pm 0,05$, $p < 0,05$) (Abbildung 22). Mit unbeladenen DC war diese Steigerung des BrdU-Einbaus zunächst nicht auslösbar.

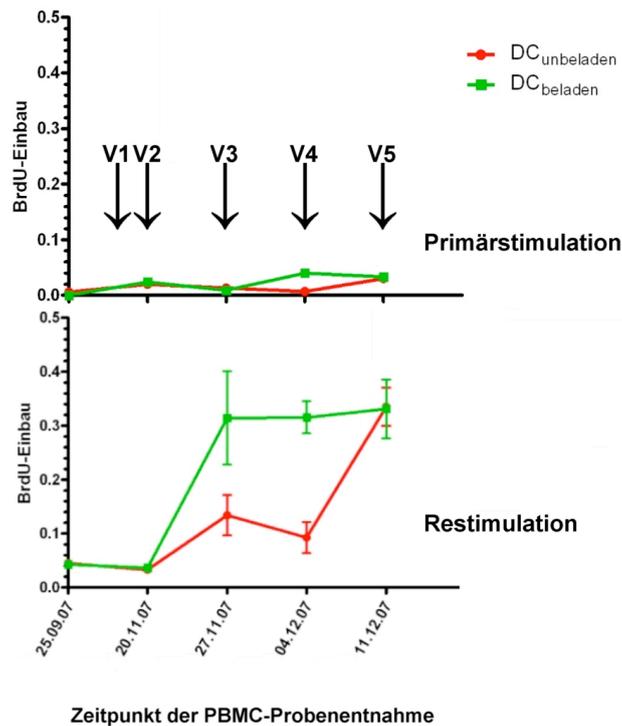


Abb. 21: Proliferative Antwort von PBMC vor, während und nach Immuntherapie auf Stimulation mit autologen unbeladenen und tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten D wurden an den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC stimuliert bzw. restimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten angegeben.

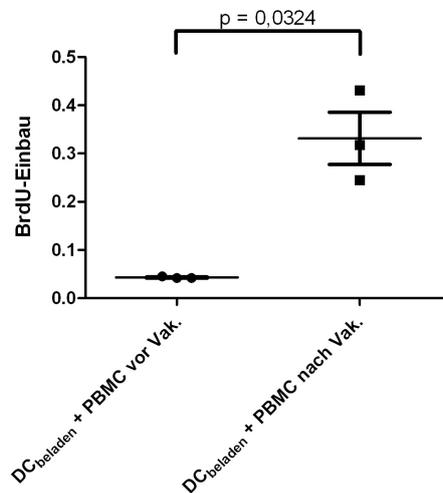


Abb. 22: Proliferative Antwort von PBMC vor und nach Immuntherapie bei Restimulation mit autologen tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten D wurden vor und nach der Immuntherapie gewonnen und jeweils mit autologen tumorantigenbeladenen DC restimuliert. Die Ergebnisse sind als Triplikate angegeben; Mittelwerte \pm SEM sind als horizontale Linien dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test bestimmt.

Bei Patient C war ein signifikanter Unterschied zwischen Stimulation mit unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC nicht nachweisbar; in beiden Ansätzen war mit zunehmender Zahl der verabreichten Vakzinierungen eine

tendenzielle Steigerung der allerdings nur sehr schwach messbaren Proliferationskapazität der PBMC erkennbar (Abbildung 23).

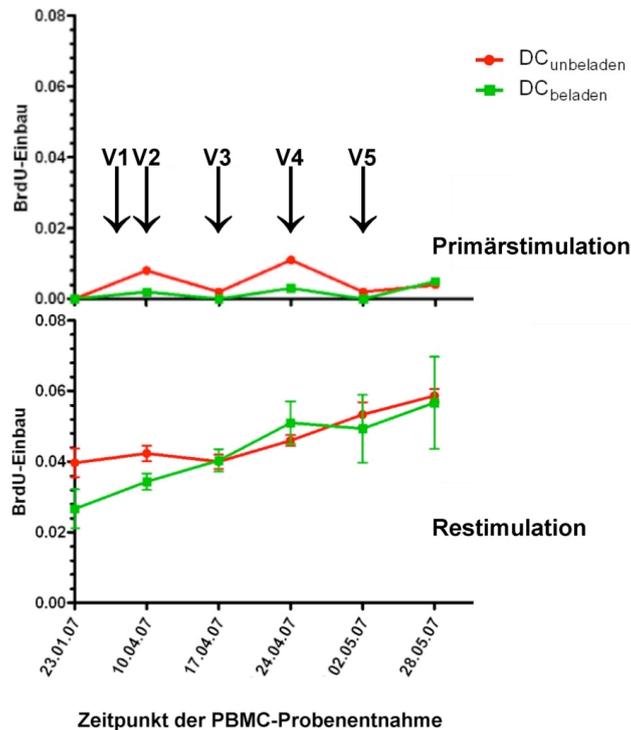


Abb. 23: Proliferative Antwort von PBMC vor, während und nach Immuntherapie auf Stimulation mit autologen unbeladenen und tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten C wurden an den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC stimuliert und restimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten angegeben.

3.7 Zytokinantwort von Effektorzellen nach Stimulation mit unbeladenen versus tumorantigenbeladenen autologen DC

Um die tumorspezifische Stimulierbarkeit des T-Zell-Systems der Vakzinierungspatienten in Abhängigkeit von der Anzahl der verabreichten Vakzinierungen zu untersuchen, wurden PBMC zu verschiedenen Zeitpunkten während der Vakzinierungsphase isoliert und mit unbeladenen sowie tumorantigenbeladenen autologen DC stimuliert sowie restimuliert. Als Maß für die Stimulierbarkeit des T-Zell-Systems diente die Quantifizierung der Synthese des insbesondere von zytotoxischen T-Zellen sowie TH1-Effektorzellen gebildeten Zytokins Interferon γ (IFN γ) mit Hilfe eines IFN γ -ELISPOT-Assays.

Auch für diese Untersuchung wurden von den Patienten A, B und D jeweils fünf und von Patient C sechs PBMC-Proben untersucht, wobei jeweils eine Probe vor Beginn der Vakzinierungsphase und die übrigen Proben während beziehungsweise nach

dieser Phase entnommen wurden. Die unbeladenen sowie tumorantigenbeladenen DC wurden aus Rückstellproben der Vakzinen entnommen.

Die Messung der Synthese des Zytokins IFN γ ergab bei zwei Patienten einen signifikanten Anstieg der IFN γ -Spots mit steigender Zahl der Vakzinierungen. Bei Patient C betraf dieser Anstieg nur die mit tumorantigenbeladenen DC stimulierten PBMC, während die mit unbeladenen DC stimulierten Zellen keine relevante Erhöhung der IFN γ -Synthese aufwiesen (Abbildung 24). Am ersten Messzeitpunkt, das heißt ca. drei Monate vor Beginn der Immuntherapie, bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der IFN γ -Spots zwischen beiden Ansätzen. Am letzten erfassten Messzeitpunkt, das heißt nach Verabreichung von fünf Vakzinen und 26 Tage nach Gabe der letzten Vakzine, bestand eine signifikant erhöhte Anzahl an IFN γ -Spots bei mit tumorantigenbeladenen DC stimulierten PBMC im Vergleich zum Ausgangswert dieses Ansatzes ($0,03 \pm 0,03$ vs. $10 \pm 1,73$, $p < 0,05$) sowie im Vergleich zum letzten Messzeitpunkt des anderen Ansatzes ($2,33 \pm 1,2$ vs. $10 \pm 1,73$, $p < 0,05$). Diese in der Endphase der Immuntherapie deutlich zunehmende Differenz zwischen der IFN γ -Antwort von PBMC bei Stimulation mit tumorantigenbeladenen versus unbeladenen DC ist in Abbildung 28a dargestellt.

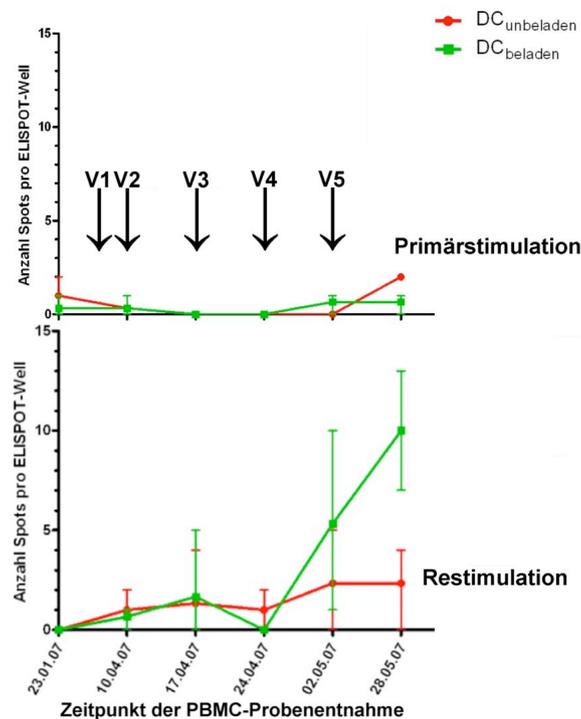


Abb. 24: IFN γ -Antwort von PBMC vor, während und nach Immuntherapie auf Stimulation mit autologen unbeladenen und tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten C wurden an den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC stimuliert und restimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten angegeben.

Bei Patient D zeigten sich sowohl in der Primär- als auch in der Restimulationsantwort Anstiege der IFN γ -Spots im Laufe der Immuntherapie, die bei Stimulation mit unbeladenen DC geringer ausfiel als bei Stimulation mit tumorantigenbeladenen DC. In der Restimulationsuntersuchung lag an den Messzeitpunkten vor Beginn der Immuntherapie sowie nach der ersten verabreichten Vakzine nur eine minimale IFN γ -Synthese der stimulierten PBMC vor, wohingegen an allen Messzeitpunkten nach Gabe der zweiten Vakzine eine massive Zunahme der IFN γ -Spots deutlich wurde (Abbildung 25). Es bestand nach drei applizierten Vakzinen eine signifikant erhöhte Anzahl an IFN γ -Spots bei mit tumorantigenbeladenen DC stimulierten PBMC im Vergleich zum Ausgangswert dieses Ansatzes ($0,67 \pm 0,67$ vs. $522,30 \pm 150,80$, $p < 0,05$). Im Vergleich zum anderen Ansatz zeigte sich besonders in der Endphase der Immuntherapie eine steile Zunahme der Differenz in den IFN γ -Antworten von mit unbeladenen versus tumorantigenbeladenen DC stimulierten PBMC, wie aus Abbildung 28b hervorgeht. Typische, mit den durchgeführten IFN γ -ELISPOT-Untersuchungen erhaltene ELISPOT-Wells sind anhand eines Ansatzes des Patienten D in Abbildung 26 gezeigt.

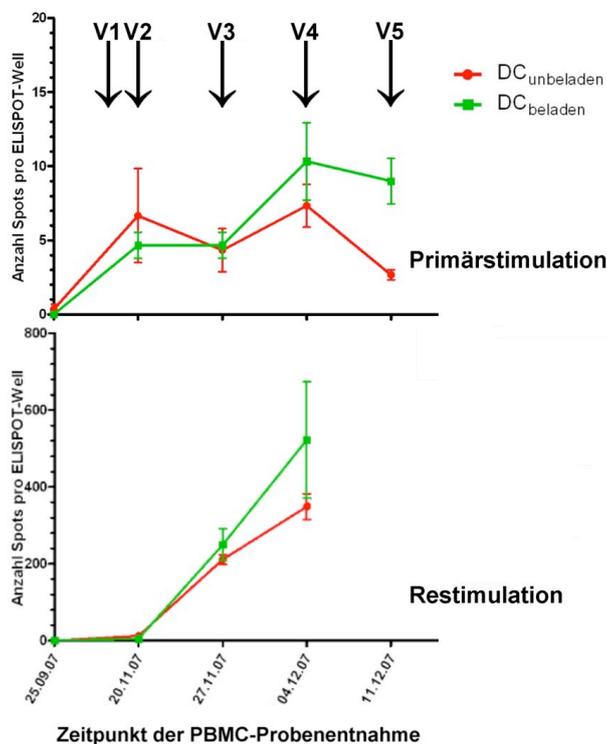


Abb. 25: IFN γ -Antwort von PBMC vor, während und nach Immuntherapie auf Stimulation mit autologen unbeladenen und tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten D wurden an den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC stimuliert und restimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten angegeben.

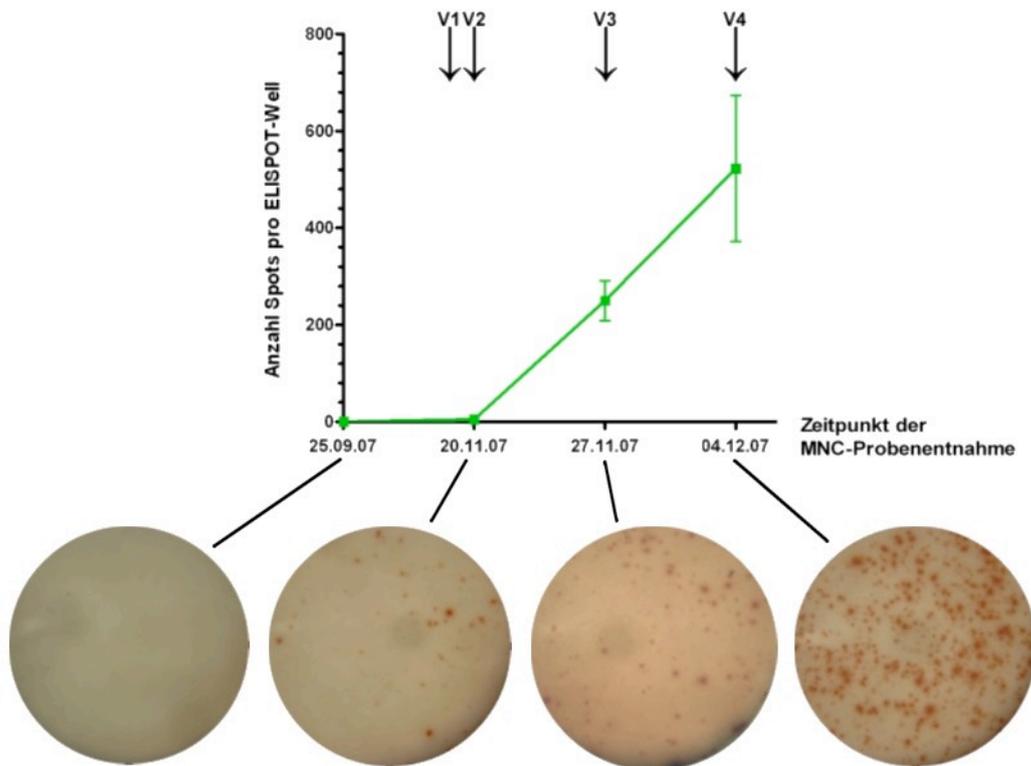


Abb. 26: Typische ELISPOT-Wellen des IFN γ -ELISPOT von Patient D.

Bei Patient A war im Restimulationsversuch die IFN γ -Antwort bei Stimulation mit tumorantigenbeladenen DC zu allen Zeitpunkten, inklusive dem Zeitpunkt vor Beginn der Immuntherapie, tendenziell stärker als bei Stimulation mit unbeladenen DC. Statistisch signifikante Differenzen waren nicht nachweisbar.

Bei Patient B ließen sich keine Veränderungen der Anzahl an IFN γ -Spots in dieser Untersuchung nachweisen.

Zusammenfassend ergaben die IFN γ -ELISPOT-Untersuchungen signifikante Anstiege der IFN γ -Synthese in Korrelation mit zunehmender Anzahl der applizierten Vakzinierungen. Bei zwei Patienten waren nach Verabreichung von zwei beziehungsweise vier Vakzinen signifikant vermehrte IFN γ -Spots bei restimulierten PBMC im Vergleich zum Ausgangswert vor der Immuntherapie nachweisbar. Außerdem zeigte sich bei diesen Patienten eine deutliche Zunahme der Differenz in der IFN γ -Synthese zwischen Stimulation mit unbeladenen versus tumorbeladenen DC (Abbildung 28) in der Endphase der Immuntherapie. Die IFN γ -Spot-Anzahlen für PBMC vor und nach Immuntherapie mit Restimulation durch unbeladene sowie tumorbeladenen DC sind in Abbildung 29 für alle Patienten in der Übersicht dargestellt.

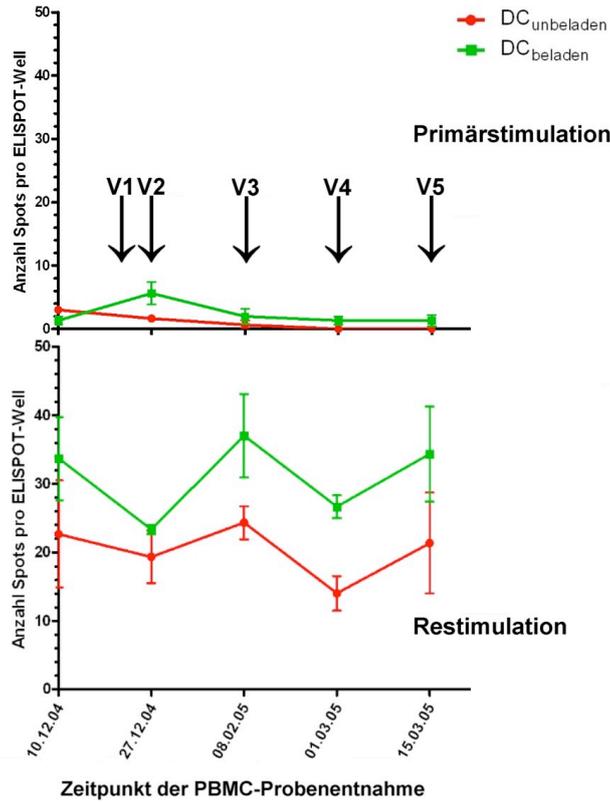


Abb. 27: IFN γ -Antwort von PBMC vor, während und nach Immuntherapie auf Stimulation mit autologen unbeladenen und tumorantigenbeladenen DC. PBMC des Patienten A wurden an den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen oder tumorantigenbeladenen DC stimuliert und restimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten angegeben.

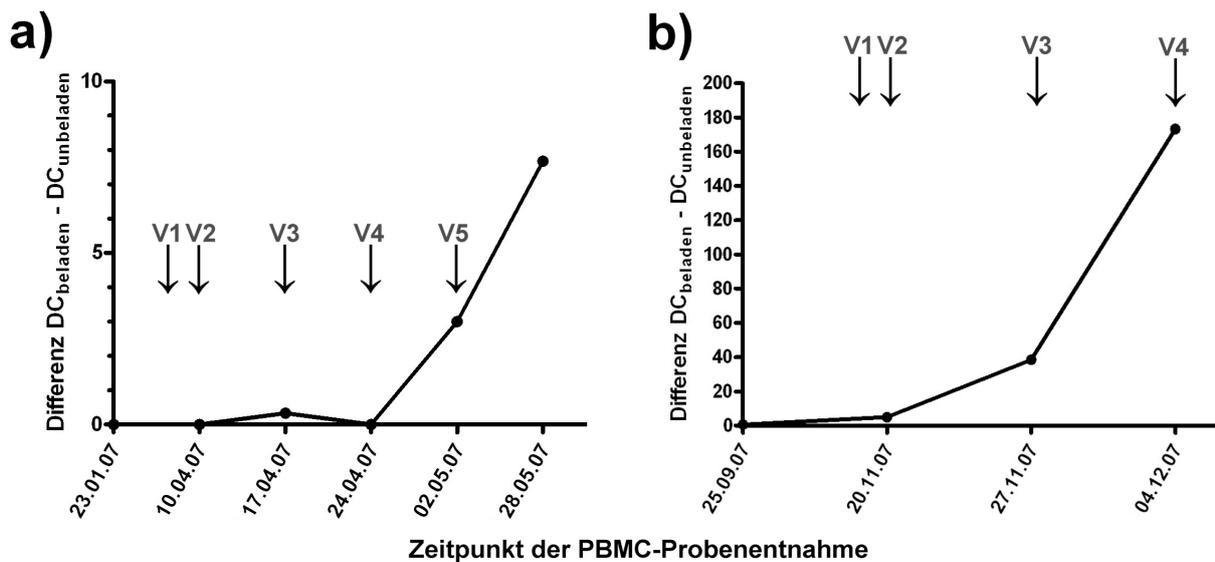


Abb. 28: Differenz der IFN γ -ELISPOT-Ergebnisse zwischen mit tumorantigenbeladenen und mit unbeladenen DC stimulierten T-Zellen im Therapieverlauf, berechnet für Patient C (a) und D (b).

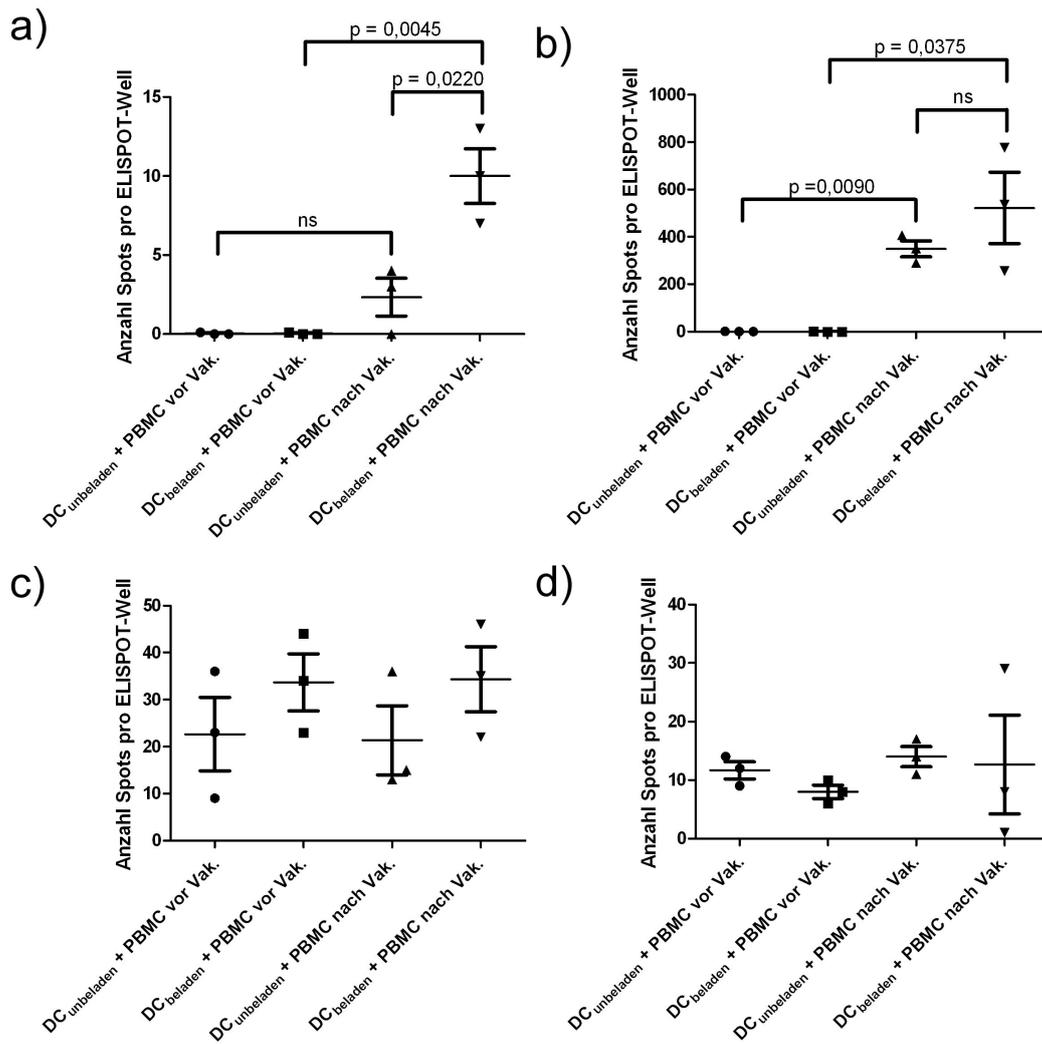


Abb. 29: IFN γ -Antwort von PBMC vor und nach Immuntherapie auf Restimulation mit autologen tumorantigenbeladenen DC. PBMC der Patienten C (a), D (b), A (c) und B (d) wurden vor und nach der Immuntherapie gewonnen und jeweils mit autologen unbeladenen bzw. tumorantigenbeladenen DC restimuliert. Die Ergebnisse sind als Triplikate angegeben; Mittelwerte \pm SEM sind als horizontale Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test bestimmt.

4. Diskussion

4.1 Immunologische Charakterisierung von GBM-Patienten

Um eine mögliche Kompromittierung des Immunsystems durch das GBM sowie den Einfluss der Operation zu erfassen, wurde der Immunstatus von GBM-Patienten im Verlauf einer perioperativen Beobachtungsphase erhoben. Frühere Untersuchungen konnten verschiedene quantitative und qualitative Anomalien im Immunstatus von bereits operierten GBM-Patienten nachweisen. Ob allerdings die Operation eine Veränderung des Immunstatus bewirkt und somit eventuell direkten Einfluss auf die Immuntherapie haben könnte, blieb unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher sowohl präoperativ als auch postoperativ Proben entnommen, um den unmittelbaren immunologischen Effekt der Zytoreduktion zu untersuchen. Konkret wurden sechs GBM-Patienten am Zeitpunkt 1 ± 1 Tage vor Operation sowie am Zeitpunkt 6 ± 1 Tage nach Operation untersucht, wobei einige Auffälligkeiten des Immunstatus im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt wurden.

Bei Analyse der Patientenproben mit dem automatischen Blutzellanalysator fielen eine signifikante Neutrophilie und Lymphopenie bei normaler Gesamtleukozytenzahl auf. Diese Befunde zeigten sich sowohl prä- als auch postoperativ und betrafen die Frequenz wie auch die Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten. Bei der detaillierteren Analyse der Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Lymphopenie in erster Linie das T-Zell-Kompartiment, aber in geringerem Maße auch das B-Zell-Kompartiment betraf. Zellzahl und Frequenz der CD3⁺ T-Lymphozyten waren sowohl prä- als auch postoperativ signifikant erniedrigt. Die weitere Unterscheidung in CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ T-Lymphozyten machte eine reduzierte Frequenz der CD4⁺ Zellen und eine erhöhte Frequenz der CD8⁺ Zellen deutlich. Während die Veränderung der CD8⁺ T-Lymphozyten durch die Operation im Beobachtungszeitraum nicht beeinflusst wurde, kam es bei den CD4⁺ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten zu einem Anstieg der Frequenzen nach der Operation; die präoperativ nachweisbare Frequenzverminderung dieser Zellen war postoperativ nur tendenziell nachvollziehbar, ohne dass noch statistische Signifikanz erreicht wurde. Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD14⁺ Monozyten ergab eine Monozytose mit erhöhten Frequenzen sowohl vor als auch nach

Operation, allerdings zeichnete sich auch hier eine postoperative Tendenz zur Normalisierung ab.

Zuvor wurden bereits in vielen Studien sowohl in vivo als auch in vitro immunologische Veränderungen bei Patienten mit malignen Gliomen nachgewiesen, die als Folge der unter Abschnitt 1.9 beschriebenen immune escape-Mechanismen des Tumors interpretiert werden und somit eine effektive Immunantwort gegen die Tumorzellen hemmen können. Bereits in frühen Arbeiten wurden in Form von reduzierter Reaktivität gegen bakterielle Recall-Antigene im DTH-Hauttest, Nachweis einer Lymphopenie und Nachweis einer verminderten Stimulierbarkeit von Effektorzellen deutliche Hinweise auf eine Beeinträchtigung der systemischen Immunität bei Patienten mit malignen Gliomen publiziert (Brooks et al., 1977; Mahaley et al., 1977; Roszman et al., 1980). In der Folge konnten die zugrunde liegenden Mechanismen genauer beschrieben werden. So werden zum Beispiel für die Lymphopenie bei Gliompatienten (Dix et al., 1999) sowohl eine vermehrte Apoptose von T-Zellen (Morford et al., 1999) als auch eine verminderte Produktion im Thymus (Prins et al., 2003) und für die Neutrophilie das von Gliomzellen produzierte G-CSF (Hintzen et al., 2000) verantwortlich gemacht; beide Befunde wurden auch im Rahmen dieser Dissertation beobachtet. Während die B-Lymphozyten und Monozyten sowie die Frequenz der CD4⁺ T-Lymphozyten in der von uns untersuchten ersten postoperativen Woche bereits eine Normalisierungstendenz aufwiesen, bestanden die Neutrophilie und die absolute T-Lymphopenie unverändert fort. Auch bei sporadisch entnommenen Blutproben von einigen GBM-Patienten mehrere Wochen nach Operation war eine Normalisierung insbesondere der T-Lymphopenie nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt), so dass von einem direkten Einfluss der Reduktion der Tumormasse auf dieses Zellkompartiment nicht ausgegangen werden kann. Möglicherweise kommt es mit längerer Latenz nach Zytoreduktion zu einer Erholung der reduzierten T-Lymphozyten-Population. Allerdings erhalten die meisten Patienten mit GBM entsprechend dem in Abbildung 9 wiedergegebenen Therapieschema mit durchschnittlich vierwöchigem Abstand zur Operation eine Strahlentherapie in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid und im Anschluß, nach erneuter vierwöchiger Pausierung, intermittierende Chemotherapiezyklen mit Temozolomid. Sowohl die Bestrahlung als auch die Chemotherapie verursachen bei vielen Patienten eine Leukopenie beziehungsweise Lymphopenie (Su et al., 2004; Stupp et al., 2005; Brandes et al.,

2006; Wick et al., 2007; Pouratian et al., 2007), so dass eine genaue ätiologische Zuordnung von immunologischen Messungen in diesem Zeitraum nicht mehr möglich ist und damit Einflüsse der Operation nicht mehr nachvollzogen werden können. Patienten mit GBM müssen daher in Zusammenschau unserer Ergebnisse und der publizierten Daten als ein Kollektiv mit multifaktorieller T-Lymphopenie betrachtet werden.

Neben diesen quantitativen Veränderungen der Immunzellen wurden verschiedene intrinsische Defekte der Funktion von T-Zellen und Monozyten beschrieben, die durch von den Gliomzellen sezernierte Mediatoren induziert werden (Dix et al., 1999; Zhou et al. 1999). Diese funktionellen Defekte scheinen jedoch durch Resektion der Tumormasse reversibel zu sein, denn Rapp et al. konnten 2006 zwar ebenfalls quantitative Veränderungen des Immunstatus bei postoperativen Gliompatienten mit einem mittleren Resttumorvolumen von 1,9 ml nachweisen, die Reaktivität der Effektorzellen bei in vitro Analyse im Phytohämagglutinin-Stimulationstest war aber nicht eingeschränkt im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Untersuchung des Immunstatus von GBM-Patienten in der perioperativen Phase als Hauptbefunde eine signifikante T-Lymphopenie und Neutrophilie ergab, die auch nach neurochirurgischer Tumorresektion fortbestanden. Die Veränderungen von CD4+ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und CD14+ Monozyten ließen bereits in der ersten Woche nach Zytoreduktion eine Tendenz zur Normalisierung erkennen. Die Frage nach der klinischen Relevanz der festgestellten T-Lymphopenie für eine Immuntherapie mit DC ist schwierig zu beantworten. Eine Option zur näherungsweise Einschätzung der Immunkompetenz von GBM-Patienten beziehungsweise leuko-/lymphopenen Patienten im Allgemeinen ist die Betrachtung von charakteristischen Infektionen in solchen Kollektiven. Su et al. definierten 2004 in einer Therapiestudie des malignen Melanoms mit Temozolomid eine Lymphopenie als eine Gesamtlymphozytenzahl <800 Zellen/ μ l und beobachteten bei 53 lymphopenen Patienten zwei Fälle von *Pneumocystis carinii* (PCP)-Pneumonie, also per definitionem einer opportunistischen Infektion, sowie bei 21 Patienten Infektionen, die auf eine lymphozytäre Dysfunktion hindeuten, wie zum Beispiel Infektionen mit Herpesviren. Diese Beobachtungen legen eine eingeschränkte Funktion des Immunsystems bei Lymphopenien <800 Zellen/ μ l nahe, denn bei gesunden Probanden sind insbesondere PCP-Infektionen extrem selten. Des Weiteren gilt bei Patienten mit

HIV-Infektion (human immunodeficiency virus) eine CD4+ Zellzahl $<200/\mu\text{l}$ als „Gefahrenbereich“, in dem mit einer schweren Immunsuppression und daher mit vermehrten Infektionen gerechnet werden muss (Khonkarlya et al., 2004). Interessanterweise gehören mit dem Kaposi-Sarkom, einigen Lymphom-Entitäten und dem invasiven Zervixkarzinom auch Neoplasien zu den so genannten AIDS-definierenden Erkrankungen (acquired immunodeficiency syndrome), da ihre Inzidenz bei schwerer anhaltender Lymphopenie stark ansteigt. Überträgt man die beiden genannten Grenzwerte aus anderen Bereichen der Medizin auf unsere Befunde bei GBM-Patienten, so wird deutlich, dass die Regionen einer schweren klinisch relevanten Immunsuppression bei der von uns bestimmten mittleren Gesamtlymphozytenzahl von $1040/\mu\text{l}$ und mittleren CD4+-Zellzahl von $350/\mu\text{l}$ nicht erreicht werden. Eine Beeinträchtigung des Immunsystems, insbesondere der Lymphozyten, ist demnach bei den untersuchten GBM-Patienten nicht anzunehmen, wenn man zum Einen die funktionellen Untersuchungen von Rapp et al. und zum Anderen die anhand von opportunistischen Infektionen und Tumoren validierten quantitativen Grenzen als Marker einer Immunkompetenz heranzieht. Im Umkehrschluss lassen die Ergebnisse von Su et al. aber befürchten, dass nach Therapie mit Temozolomid bei einigen Patienten eine schwere Immunsuppression auftreten kann, die dann sehr wohl die Erfolgsaussichten einer Immuntherapie minimieren könnte.

Die diskutierte Literatur und die erhobenen Messbefunde sprechen zwar insgesamt nicht gegen die Immunkompetenz der untersuchten GBM-Patienten und stellen damit keine Hindernisse für eine Immuntherapie dar, unterstreichen aber die Bedeutung der individuellen Erhebung des Immunstatus an mehreren Zeitpunkten bei potentiellen Kandidaten für eine Immuntherapie. Dies gestattet die individuelle Einschätzung der Immunkompetenz, denn die immunologischen Veränderungen können in einzelnen Fällen sehr variable Verläufe nehmen. Zudem handelt es sich um ein Patientengut, welches in kurzer Zeit sowohl den Einflüssen operativer, chemotherapeutischer als auch strahlentherapeutischer Therapiemaßnahmen ausgesetzt ist und aufgrund der Hirntumorerkrankung bereits per se immunologische Störungen aufweisen kann. Da aber ein funktionierendes Immunsystem unabdingbare Voraussetzung einer aktiven Immuntherapie mit DC ist, sollte eine individuelle Betrachtung der Immunkompetenz des Patienten durch quantitative und qualitative immunologische Untersuchungen erfolgen.

4.2 Immunstatus von Vakzinierungspatienten und Nebenwirkungen der Immuntherapie

Die Erhebung des Immunstatus bei Vakzinierungspatienten als Teil des Immunmonitorings zielte auf den labordiagnostischen Ausschluss von immuntherapieassoziierten Nebenwirkungen im Sinne von Hämatotoxizität oder schweren inflammatorischen Zuständen ab. Die Auswertung des allgemeinen Immunstatus aller vier vakzinierten Patienten zeigte zwar teilweise die unter 4.1 beschriebenen „gliomtypischen“ Veränderungen, ergab aber darüber hinaus keine signifikanten Veränderungen unter der Immuntherapie. Insbesondere ließen sich keine hämatotoxischen Nebenwirkungen erkennen, über die bei immuntherapierten Gliompatienten 2004 von Rutkowski et al. und Kikuchi et al. sowie 2008 von De Vleeschouwer et al. meist im Sinne von Grad II Hämatotoxizität nach CTCAE-Klassifikation berichtet worden war. Insbesondere wurden von uns keine schweren akuten Zytopenien oder Hinweise auf progrediente inflammatorische Aktivität, wie z.B. eine massive Neutrophilie oder Lymphozytose, registriert. Auch eine Manifestation von Autoimmunphänomenen trat im Beobachtungszeitraum nicht auf.

Bei der klinischen Verlaufsbeobachtung der vier Vakzinierungspatienten bestätigte sich die in zahlreichen Untersuchungen erwiesene Sicherheit der Immuntherapie mit DC. Die häufigste von uns beobachtete Nebenwirkung der Immuntherapie war das selbstlimitierende, lokale Erythem an der Injektionsstelle der Vakzine, das bereits zuvor in einigen Arbeiten als harmlose Erscheinung erwähnt worden ist (Tabelle 3). Eine lokale oder generalisierte Lymphadenopathie sowie virusgrippeähnliche Krankheitsbilder konnten wir hingegen nicht feststellen.

Die einzige im Beobachtungszeitraum registrierte schwere Komplikation war eine nach drei verabreichten Vakzinen am vierten Tag nach der letzten Vakzinierung aufgetretene tiefe Venenthrombose (TVT) mit konsekutiver Lungenembolie. Thromboembolische Komplikationen treten bei Patienten mit Malignomen mit erhöhter Inzidenz auf, da bei diesen ein prothrombotischer Zustand des Gerinnungssystems mit vermutlich multifaktorieller Genese vorliegt (De Cicco, 2004). In einer prospektiven Studie ergab sich für Patienten mit malignen Gliomen, die eine Nachbehandlung mit Strahlen- und Chemotherapie erhielten, ein Risiko von 20,8% für eine TVT nach 12 Monaten. 20 Patienten entwickelten eine TVT, mit der höchsten Inzidenz in den ersten 7 Monaten nach der Operation. In 4 Fällen trat eine

Lungenembolie auf. Unser Patient gehört demnach aufgrund seiner Grunderkrankung einer Hochrisikogruppe an und die beobachtete TVT mit Lungenembolie trat im Zeitraum der größten Gefährdung für derartige Komplikationen auf. Die Komplikation sollte daher, wie auch die beobachteten neurologischen Symptome, am ehesten der Grunderkrankung zugeschrieben und nicht als Nebenwirkung der Immuntherapie interpretiert werden.

Die Daten aus der Erhebung des Immunstatus und der klinischen Beobachtung der Vakzinierungspatienten belegen, dass die Immuntherapie ohne schwere Nebenwirkungen bei Patienten mit GBM durchgeführt werden kann.

4.3 Verhalten von Tregs während der Immuntherapie

In der durchflusszytometrischen Analyse der CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten sowie der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs zeigten sich bei allen vier Vakzinierungspatienten Anstiege der Frequenzen der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen im Verlauf der Immuntherapie. Die Frequenz der Subpopulation der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs wies keine Veränderungen auf, die Absolutzahl der FoxP3⁺ Tregs stieg aber aufgrund der Zunahme der CD4⁺ CD25⁺ Gesamtpopulation entsprechend an. Beim Menschen exprimieren laut Clarke et al. (2006) >95% der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen den Transkriptionsfaktor FoxP3; in unseren Untersuchungen lag diese Frequenz bei >80%. Aufgrund des sehr hohen Anteils von FoxP3⁺ Tregs werden von vielen Autoren die CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen den Tregs gleichgesetzt (Wada et al., 2008). Die von uns erhobenen Ergebnisse müssen daher als durch die Immuntherapie induzierter Anstieg der Tregs interpretiert werden; unabhängig davon, ob Tregs allgemein als CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen oder speziell als FoxP3⁺ Subpopulation definiert werden.

Die zunehmende Bedeutung der Tregs in der Tumorimmunologie und Immuntherapie von Tumoren beruht auf der Erkenntnis, dass sie neben ihrer wichtigen Rolle bei der Verhinderung von Autoreaktivität (Sakaguchi et al., 1995) auch einen potenten Einfluss auf physiologische Anti-Tumor-Immunreaktivität sowie iatrogen erzeugte Immunreaktionen ausüben. In Bezug auf Hirntumore konnte im Tiermodell beobachtet werden, dass im Rahmen der Tumorprogression eine Akkumulation von Tregs im Tumorgewebe erfolgt, deren suppressiver Phänotyp nach Isolation nachgewiesen werden konnte (Grauer et al., 2007). Aufbauend auf diesen Befunden

wurde die funktionelle Bedeutung der tumorassoziierten Tregs untersucht, wobei sich zeigte, dass die natürliche Immunität und auch der Effekt einer Immuntherapie gegen Tumore, die in Anwesenheit der Tregs einer Kontrolle durch das Immunsystem entgehen konnten, durch Depletion von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen verstärkt werden können. In experimentellen Studien gelang diese Depletion unter anderem durch monoklonale anti-CD25-Antikörper (El Andaloussi et al., 2006) oder durch spezifische Immuntherapie gegen das intrazelluläre „Autoantigen“ FoxP3 mittels FoxP3 mRNA transfektierter DC (Nair et al., 2007), wodurch bei den Versuchstieren eine Regression des Tumors erreicht werden konnte. In einer klinischen Studie konnten bei Patienten mit metastasierten malignen Melanomen nach transients CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Depletion in der Phase der Immunrestitution spezifische zytotoxische T-Zellen gegen TAA nachgewiesen und eine Regression der Metastasen beobachtet werden (Rasku et al., 2008). Die Depletion erfolgte hier mit einem rekombinanten Interleukin 2/Diphtherie-Toxin-Konjugat.

Zahlreiche Untersuchungen demonstrierten die Amplifikation von Tregs bei Patienten mit Ösophagus-, Magen-, Kolon- und Ovarialkarzinomen sowie anderen epithelialen Tumorentitäten sowohl im peripheren Blut als auch innerhalb der TIL sowie die Fähigkeit dieser Zellen, eine Immunantwort gegen TAA zu hemmen (Wolf et al., 2003; Ichihara et al., 2003; Curiel et al., 2004; Kono et al., 2005; Clarke et al., 2006). Die Spezifität von Tregs für TAA konnte beim malignen Melanom für das cancer-testis-Antigen LAGE1 (Wang et al., 2004) und beim Kolonkarzinom für den EGF-Rezeptor Her2/Neu (Clarke et al., 2006) sowie für das onko-fetale Antigen 5T4 (Clarke et al., 2006) nachgewiesen werden. Für Ösophagus- und Magenkarzinome wurde ein positiver Zusammenhang zwischen Stadium der Tumorerkrankung und Frequenz der Tregs festgestellt (Kono et al., 2005). Bei diesen Tumoren, wie auch beim Ovarialkarzinom, korreliert eine Zunahme der Treg-Population mit einer schlechteren Prognose (Curiel et al., 2004). Auch beim GBM gelang der Nachweis einer Amplifikation von Tregs in TIL (tumor infiltrating leukocytes) und Blut, wobei sich letztere als im Vergleich zu gesunden Probanden dreifach erhöhter Anteil der Tregs an einer insgesamt lymphopenen CD4⁺ Population darstellte (El Andaloussi und Lesniak, 2006; Grauer et al., 2007; Fecci et al., 2006). Die Zusammenschau der beschriebenen Daten ergibt somit einen quantitativen Zusammenhang zwischen Tregs und bestimmten Tumorerkrankungen sowie einen qualitativen Nachweis des hemmenden Einflusses dieser Zellen auf die spontane und immuntherapeutisch

induzierte Anti-Tumor-Immunität. Auf Basis dieser grundlegenden Erkenntnisse wird die Wertigkeit von lymphoablativer Chemotherapie und weiterer, weniger radikaler Ansätze einer Treg-Depletion beim Menschen zur Konditionierung vor einer Immuntherapie untersucht (Lizee et al., 2006). Das beim GBM indizierte Chemotherapeutikum Temozolomid bewirkt in der Mehrzahl der Therapiestudien bei einem Teil der Patienten eine zumeist transiente Lymphopenie als hämatotoxische Nebenwirkung (Stupp et al., 2005; Brandes et al., 2006; Wick et al., 2007; Pouratian et al., 2007). In einer Arbeit wird bei mehr als der Hälfte der behandelten Patienten über eine Lymphopenie berichtet, die insbesondere das CD4⁺ Kompartiment betrifft, zu dem auch die Tregs zählen (Su et al., 2004). Durch ihren Einfluss auf das T-Zell-System könnte eine vorhergehende Chemotherapie somit synergistisch mit einer Immuntherapie wirken (DeVleeschouwer et al., 2006).

Letztendlich ist jedoch auch zu beachten, dass Zhou et al. 2006 darauf hin wiesen, dass im Tiermodell eine Amplifikation von Tregs als kontraproduktive Folge einer Immuntherapie möglich ist. Nach Hämagglutinin (HA)-spezifischer Vakzinierung konnte in Mäusen, welche ein HA-exprimierendes B-Zell-Lymphom trugen, eine Amplifikation von HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, welche suppressorische Aktivität und einen FoxP3⁺ Treg-Phänotyp aufwiesen. Berntsen et al. publizierten 2008 Ergebnisse einer Studie zur DC-Vakzinierung in Kombination mit low dose IL-2-Gabe bei Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen. Bei den behandelten Patienten kam es nach Verabreichung der vierten Vakzinierung zu einem mehr als siebenfachen Anstieg der Frequenz von FoxP3⁺ Tregs im Vergleich zum Ausgangswert. In einer anderen Arbeit berichten Wada et al. 2008 von 22 Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen, die eine Immuntherapie mit DC erhielten. Patienten mit niedriger CD4⁺ CD25⁺ Frequenz vor Beginn der Immuntherapie wiesen eine längere Überlebenszeit auf als Patienten mit hohen Frequenzen. Die Immuntherapie bewirkte einen hier leichten Abfall der CD4⁺ CD25⁺ Frequenz, der allerdings nicht statistisch signifikant war. Beide Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Tregs gerade bei der Immuntherapie von Tumorpatienten bedeutsam sind. Berntsen et al. interpretieren ihre Daten als Argument für die mögliche Kombination der Immuntherapie mit einer Depletion von regulatorischen T-Zellen, die eine Expansion dieser Zellen verhindern könnte. Wada et al. sehen die Tregs insbesondere als Parameter für das zu erwartende Ansprechen von Immuntherapie sowie für das Gesamtüberleben des Patienten.

Unsere Ergebnisse zeigen, ähnlich wie die Arbeit von Berntsen et al., dass unter der Immuntherapie mit DC eine Zunahme der Frequenz von Tregs auftrat. Allerdings entsprach der von uns registrierte Anstieg nur einer ungefähren Verdreifachung des Ausgangswertes und war daher geringer ausgeprägt als bei Berntsen et al. Die CD4+ CD25+ Frequenz bei unseren Patienten betrug vor Immuntherapie $1,05 \pm 0,39\%$ und nach vier Vakzinierungen $3,08 \pm 0,45$. In der neueren Literatur wird die von uns praktizierte phänotypische Bestimmung der Tregs als CD4+ CD25hi FoxP3+ bevorzugt; Clarke et al. (2006) ermittelten auf diesem Weg bei gesunden Probanden eine Frequenz von 0,46% und bei Kolonkarzinom-Patienten eine Frequenz von 1,13%, Wada et al. (2008) definierten $>4,99\%$ als eine hohe, mit schlechterer Prognose korrelierende Treg-Zahl bei Karzinom-Patienten. Die Einordnung unserer Ergebnisse in die publizierten Daten ergibt somit keine per se erhöhte Treg-Frequenz bei GBM-Patienten, zeigt aber einen deutlichen Anstieg der Tregs unter der Immuntherapie, wobei der prognostisch ungünstige Bereich nicht erreicht zu werden scheint. Letztendlich vermittelt diese Einordnung aber nur eine ungefähre Einschätzung der Verhältnisse, so dass die Notwendigkeit größerer Studien zur Untersuchung der Tregs im Kontext einer Immuntherapie bei GBM-Patienten unterstrichen wird. Insbesondere die klinische Bedeutung einer Expansion von Tregs unter Immuntherapie kann derzeit noch nicht sicher beurteilt werden, unsere Ergebnisse sollten aber Anlass sein, die Erfassung der Tregs in das Therapiemonitoring zukünftiger Studien bei Vakzinierungspatienten zu integrieren.

4.4 Verhalten von zytotoxischen Effektorzellen während der Immuntherapie

Während die Tregs im Kontext einer Immuntherapie als kontraproduktiver Parameter gelten, dient die durchflusszytometrische Erfassung des Zytotoxizitätsmarkers CD107a auf Effektorzellen einer Quantifizierung der gewünschten zytotoxischen Therapieantwort. Dieser Marker gehört zur Gruppe der LAMP (lysosomal associated membrane glycoproteins) und gelangt bei Degranulation von zytotoxischen Zellen, insbesondere CD8+ T-Lymphozyten, an die Zelloberfläche und kann damit als Marker der aktiven Zytotoxizität dienen (Betts et al., 2003). Unsere Daten belegen bei zwei Vakzinierungspatienten einen deutlichen Anstieg der CD107a-Expression nach zwei bzw. drei verabreichten Vakzinen mit mehr als verdoppelter Ausgangsfrequenz. Während diese signifikante Steigerung der Degranulation zytotoxischer

Effektorzellen im gesamten Zeitraum der Immuntherapie erhalten blieb, konnte bei Patient C in einer 26 Tage nach Gabe der letzten Vakzine entnommenen PBMC-Probe ein Abfall der CD107a+ Frequenz auf den Ausgangswert detektiert werden. Diese Dynamik der CD107a-Expression zeigte sich auch in einer 2007 publizierten Studie von Anderson et al., in der im Mausmodell ein adoptiver Transfer Prostatakarzinom-TAA-spezifischer CD8+ T-Zellen mit einer nachfolgenden DC-Vakzinierung kombiniert wurde. Adoptiver Transfer ohne DC-Gabe führte zum Nachweis einer Toleranzinduktion gegenüber TAA, während bei Kombination mit DC-Gabe für einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen der Nachweis einer gesteigerten CD107a-Expression gelang. Dieser Parameter einer aktiven zytotoxischen Reaktion korreliert mit einer Regression des Tumors. Nach Absinken der CD107a-Expression kam es interessanterweise zu einer erneuten Zunahme des Tumorumfanges. Untersuchungen bei Tumorpatienten belegen ebenfalls die Eignung der durchflusszytometrischen Erfassung von CD107a als Parameter einer zytotoxischen Antwort auf eine Immuntherapie (Rubio et al., 2003).

Die im Rahmen dieser Dissertation bei zwei mit tumorantigenbeladenen DC vakzinieren GBM-Patienten gezeigte transiente Steigerung der Degranulation weist auf die Fähigkeit der Immuntherapie hin, zytotoxische Effektorzellen effizient zu aktivieren. Die Rückkehr der CD107a-Expression zum Ausgangsniveau innerhalb von 26 Tagen nach Vakzinierung könnte auf eine therapieinduzierte Abnahme der residuellen Tumorantigenmasse oder aber auf eine Toleranzinduktion in den aktivierten Effektorzellen hindeuten. Insbesondere die klinische Relevanz von CD107a als Surrogatmarker für die Effektivität einer Immuntherapie sollte zukünftig Gegenstand größerer Studien sein.

4.5 Induktion tumorspezifischer Immunantworten durch die Immuntherapie

Um immunologische, in vivo erzeugte Effekte einer Immuntherapie des GBM nachzuweisen, wurden umfangreiche Untersuchungen an vier Vakzinierungspatienten durchgeführt. Zum Nachweis einer tumorspezifischen Immunantwort wurden PBMC aus venösen Blutproben, welche vor, während und nach der Immuntherapie entnommen wurden, gewonnen und mit autologen DC stimuliert. Um die Tumorspezifität der Immunantwort darzustellen, wurden sowohl unbeladene DC als auch tumorantigenbeladene DC eingesetzt. Als Parameter der Immunantwort

wurden die Proliferationskapazität der stimulierten PBMC, gemessen im BrdU-ELISA-Test, und die Synthese des TH1-Zytokins IFN γ , gemessen im IFN γ -ELISPOT-Test, herangezogen.

Der BrdU-ELISA-Test zeigte bei zwei Patienten, dass in der Endphase der Immuntherapie entnommene PBMC eine erhöhte Proliferationskapazität im Vergleich zum Ausgangswert aufweisen. Bei Patient D ließ sich nach zwei Vakzinierungen ein signifikanter Anstieg der Proliferationsantwort bei Stimulation mit tumorantigenbeladenen DC im Vergleich zum Ausgangswert vor Immuntherapie erfassen, der durch unbeladene DC nicht auslösbar war und somit als tumorspezifische Antwort betrachtet werden kann. Die erhöhte Proliferationsaktivität blieb an allen folgenden Messzeitpunkten im Sinne eines Plateaus konstant und wurde durch die beiden weiteren von unseren Monitoring erfassten Vakzinierungen nicht mehr beeinflusst. Bei Patient C beobachteten wir einen kontinuierlichen Anstieg der Proliferationsantwort im BrdU-ELISA-Test mit zunehmender Zahl der applizierten Vakzinierungen. Hier betraf die Steigerung der proliferativen Kapazität sowohl die mit unbeladenen als auch die mit tumorantigenbeladenen DC stimulierten Effektorzellen, so dass die Ergebnisse als Hinweis auf eine durch die Immuntherapie global erhöhte Proliferationskapazität der PBMC des Patienten interpretiert werden können. Das Monitoring mittels des BrdU-ELISA-Tests erlaubte also den Nachweis einer immunologischen Auswirkung der Immuntherapie im Sinne einer Steigerung der Proliferationskapazität von PBMC bei zwei Patienten. Methodisch ist anzumerken, dass sich bei allen vier mit dem BrdU-ELISA-Test untersuchten Vakzinierungspatienten ein verwertbares Niveau des photometrisch gemessenen BrdU-Einbaus in die proliferierenden Zellen erst beim Restimulationsversuch, das heißt nach einer Expansionsphase mit Interleukin 2 und erneuter Stimulation mit autologen DC, zeigte. Bei drei Patienten blieb das Niveau der Messwerte dennoch relativ gering. Unter den kolorimetrischen Tests zur Messung der Zellproliferation wird dem BrdU-ELISA-Test die größte Sensitivität bei der Erfassung insbesondere sehr geringer Unterschiede in der Proliferation von T-Zellen zugeschrieben (Maghni et al., 1999). Bei Untersuchungen von antigenspezifischen Immunantworten im Rahmen von Immuntherapie-Studien wird jedoch zunehmend die ELISPOT-Methode bevorzugt, da sie eine Einzelzellanalyse ermöglicht und eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist, die die Erfassung einer Zytokinsynthese durch 1 unter 100.000 bis 300.000 Zellen erlaubt. Schultes und Whiteside berichteten 2003, dass

im Rahmen einer Immuntherapiestudie mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein Ovarialkarzinom-TAA der Nachweis antigenspezifischer Effektorzellen mittels IFN γ -ELISPOT gelang, während ein konventioneller kolorimetrischer Proliferationsnachweis keine Ergebnisse lieferte. Zahlreiche Autoren etablierten bisher IFN γ -ELISPOT-Tests für das immunologische Monitoring bei Immuntherapiestudien (Tabelle 3).

Wir haben daher neben dem BrdU-ELISA-Test auch die Zytokin-Synthese von T-Zellen nach Stimulation mit unbeladenen sowie tumorantigenbeladenen DC durch einen IFN γ -ELISPOT-Test erfasst. Hierbei gelang der Nachweis einer tumorspezifischen, das heißt nur durch tumorantigenbeladene DC induzierbaren, Reaktivität der PBMC in der Endphase der Immuntherapie bei zwei Patienten. Bei Patient C war nach vier verabreichten Vakzinen ein steiler Anstieg der durch tumorspezifische Stimulation ausgelösten IFN γ -Antwort detektierbar, der sich auch im Anschluss an die abgeschlossene Immuntherapie noch nachvollziehen ließ. Die unspezifische Stimulation mit unbeladenen DC erbrachte hingegen stets konstante Messwerte. Diese Befunde können als anhaltende, durch die Immuntherapie mit DC in vivo induzierte, tumorspezifische Immunreaktivität interpretiert werden. Ebenso ergab sich bei Patient D in den IFN γ -ELISPOT-Analysen bei tumorspezifischer Stimulation der PBMC eine Zunahme der IFN γ -Synthese ab Gabe der zweiten Vakzine. Diese gesteigerte IFN γ -Antwort mit zunehmender Anzahl der applizierten Vakzinierungen war zu frühen Zeitpunkten tendenziell auch durch unbeladene DC induzierbar, die Kurven trennten sich aber nach der dritten Vakzinierung zu Gunsten der tumorspezifischen Stimulation, so dass man auch bei diesem Patienten von in vivo induzierter, tumorspezifischer Immunreaktivität ausgehen kann.

Während die ELISPOT-Analysen bei Patient B keine Veränderungen der Reaktivität zeigten, fiel bei den PBMC von Patient A ein zu allen Zeitpunkten, inklusive der Probe vor Beginn der Immuntherapie, eine erhöhte IFN γ -Synthese bei tumorspezifischer Stimulation auf. Interessanterweise war auch die IFN γ -Antwort bei unspezifischer Stimulation auf relativ hohem Niveau messbar, jedoch um etwa ein Drittel geringer als bei Anwesenheit von tumorantigenbeladenen DC. Als Erklärung für die erste Beobachtung lässt sich eine endogene tumorspezifische Immunreaktivität heranziehen, die naturgemäß bereits vor Immuntherapie bestand. Warum allerdings auch unbeladene DC eine IFN γ -Antwort auf erhöhtem Niveau induzieren, mag weniger klar erscheinen. Über eine solche unspezifische

Effektorzellaktivierung durch unbeladene, reife DC wurde 2002 bereits von Bachleitner-Hofmann et al. berichtet. Bei einer in vitro-Studie zur Herstellung von Tumorlysat-beladenen DC für die potentielle Immuntherapie von medullären Schilddrüsenkarzinomen wurde beobachtet, dass neben tumorbeladenen DC auch unbeladene, reife DC eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen autologe Tumorzellen induzieren konnten. Die Autoren erklärten dies mit dem potenten stimulatorischen Einfluss reifer, wenn auch unbeladener, DC auf T-Zellen im Sinne einer unspezifischen Aktivierung und vermuteten bei ihrem Patienten einen bereits spontan erhöhten Aktivierungsgrad der Effektorzellen.

Endogene Immunreaktivität gegen Gliomantigene bei nicht-immuntherapierten Patienten, wie im Falle unseres Patienten A, konnte bereits zuvor 2005 von Tang et al. und 2007 von Ueda et al. 2007 durch IFN γ -ELISPOT-Analysen, Durchflusszytometrie und Stimulation mit DC nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde wurden auch bei Patienten mit malignen Melanomen (Yamshchikov et al., 2001) erhoben. Allerdings ist die tatsächliche klinische Relevanz dieser endogenen Immunantworten gegen Tumorantigene unklar. Bei der von Ueda et al. untersuchten Patientin wurde die Erstdiagnose eines anaplastischen Astrozytoms vor mehr als 12 Jahren durch Biopsie gestellt und nach Radiotherapie und Kombinationschemotherapie bis zum Zeitpunkt der Publikation kein Rezidivtumor beobachtet. Es handelt sich somit um eine Patientin mit außergewöhnlich langer Überlebenszeit, weshalb Ueda et al. vermuteten, dass die Überlebenszeit der meisten Gliompatienten zu kurz für die Entstehung einer spontanen Immunantwort sein könnte. Diese These wurde durch die Ergebnisse von Tang et al. und Wheeler et al. zumindest in Frage gestellt. Beide konnten bei GBM-Patienten, die überwiegend erstdiagnostiziert worden waren beziehungsweise kurze Krankheitsverläufe aufwiesen, endogene tumorspezifische Immunreaktivität mittels IFN γ -ELISPOT zeigen, wie es uns bei Patient A ebenfalls gelungen ist. Während die klinische Bedeutung dieser Befunde nach wie vor unklar bleibt, konnten Wheeler et al. hingegen eine Konsequenz für die Immuntherapie herausstellen. In dieser Studie war bei sieben Patienten bereits vor Durchführung der Immuntherapie eine signifikant erhöhte IFN γ -Antwort bei tumorspezifischer Stimulation nachweisbar. Bei diesen Patienten fand sich eine negative Korrelation zwischen endogener Immunantwort und Effekt der Vakzinierung, das heißt sie wiesen eine proportional

geringere Zunahme der IFN γ -Antwort unter Immuntherapie auf im Vergleich zu Patienten ohne endogene Reaktivität.

Der Hauptbefund unserer IFN γ -ELISPOT- und BrdU-Analysen ist aber der Nachweis einer durch die Immuntherapie mit DC in vivo induzierten, tumorspezifischen Immunreaktivität bei den Patienten C und D. Der Grund für die Relevanz dieser Ergebnisse ist eine 2008 von Wheeler et al. publizierte Phase II-Studie, in welcher 32 GBM-Patienten eine Immuntherapie mit Tumorlysat-beladenen DC erhielten. Das Immunmonitoring wurde mit DTH-Hauttestungen (delayed type hypersensitivity) und einem Stimulationstest realisiert, bei dem PBMC vor und nach Vakzinierung gewonnen und mit autologen tumorantigenbeladenen DC restimuliert wurden. Die Zytokinantwort der Effektorzellen wurde anhand einer qPCR für IFN γ -Transkripte quantifiziert. 17 von 34 Studienpatienten wiesen nach drei verabreichten Vakzinierungen eine signifikante IFN γ -Antwort auf, die vor der Immuntherapie nicht nachweisbar war. Die als Immuntherapie-Responder definierten Patienten wiesen ein Gesamtüberleben von 642 ± 61 Tagen auf, welches signifikant länger war als das der Non-Responder (430 ± 50 Tage). Auch das progressionsfreie Überleben war bei den Immuntherapie-Respondern mit 308 ± 55 Tagen signifikant länger als bei Non-Respondern (167 ± 22 Tage). Eine tumorspezifische, durch die Vakzinierung induzierte Immunreaktivität war demnach mit einem Zugewinn von 7 beziehungsweise 4,5 Monaten assoziiert. Weiterhin ließ sich aus der Phase II-Studie ableiten, dass Immuntherapie-Responder (besonders solche mit sehr hoher IFN γ -Antwort nach Vakzinierung) ein verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei Kombination der Immuntherapie mit einer nachfolgenden Chemotherapie aufwiesen. Über diese Chemosensibilisierung von malignen Gliomen nach einer Immuntherapie wurde bereits zuvor berichtet (Wheeler et al., 2004); in dem von uns bevorzugten Therapiekonzept wurde die Immuntherapie daher zeitlich vor der intermittierenden Chemotherapie mit Temozolomid eingeordnet (Abbildung 9).

Die von uns untersuchten Vakzinierungspatienten B und C wiesen in Anbetracht der schlechten Prognose des GBM erfreuliche Verläufe auf. Patient B erlebte nach Immuntherapie ein progressionsfreies Intervall von 16 Monaten und bei Patient C bestand bis zum Zeitpunkt dieser Datenerfassung eine Überlebenszeit von 19 Monaten bei stabiler, minimaler, residualer Tumormasse. Jedoch ist zu beachten, dass beide Patienten im Anschluß an die Immuntherapie eine Chemotherapie mit

Temozolomid erhielten und bei beiden Patienten eine MGMT-Promotor-Methylierung nachweisbar war. Die für diese Subgruppe der Patienten nach derzeitiger Studienlage zu erwartende mediane Überlebenszeit beträgt 21,7 Monate (Hegi et al., 2005) und ist somit deutlich länger als die für die Gesamtgruppe der GBM-Patienten dokumentierte mediane Überlebenszeit von 14,6 Monaten (Stupp et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit kann aufgrund der sehr geringen Patientenzahl zwar keine valide Aussage zur klinischen Bedeutung der Immuntherapie machen, jedoch ist der Nachweis eines immunologischen Effektes von großer Bedeutung. Die von zahlreichen Autoren mit verschiedenen Methoden gezeigte Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort durch Immuntherapie mit DC bei Patienten mit malignen Gliomen (Tabelle 3) konnte auch bei unseren Patienten C und D dargestellt werden.

Das von uns verwendete Immunmonitoring basierte auf regelmäßigen PBMC-Probenentnahmen während der Immuntherapie, welche mit Durchflusszytometrie sowie in vitro-Stimulationsversuchen analysiert wurden. Aus den gewonnenen Daten konnte in Zusammenschau mit den klinischen Beobachtungen zusammenfassend abgeleitet werden:

- Die Immuntherapie mit DC konnte bei Patienten mit GBM ohne schwere therapieassoziierte Nebenwirkungen durchgeführt werden.
- Die Immuntherapie führte zur Expansion von Tregs, wobei die klinische Relevanz dieses Befundes noch zu klären bleibt.
- Die Immuntherapie konnte in vivo zytotoxische Effektorzellen induzieren.
- Die Immuntherapie konnte in vivo eine tumorspezifische Immunantwort gegen das GBM erzeugen.

Im Kontext der neuen Daten von Wheeler et al. (2008) kommt dem Nachweis einer Anti-Tumor-Immunantwort bei Studien zur Immuntherapie mit DC eine besondere Bedeutung zu, da erstmals eine Korrelation von immunologischen Surrogatparametern mit einem signifikant verbesserten Outcome der Immuntherapie-Responder in einer Phase III-Studie gelungen ist.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gewonnenen Erkenntnisse können demnach als „proof of principle“ für das von uns durchgeführte Immuntherapie-Konzept interpretiert werden und sprechen trotz der geringen Zahl der untersuchten Patienten für das Potential der Immuntherapie mit DC, die schlechte Prognose des Glioblastoma multiforme als Teil eines multimodalen Therapieregimes zu verbessern.

5. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (Erworbenes Immundefizienz-Syndrom)
ALA	5-Aminolävulinsäure
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
BrdU	Bromdesoxyuridin
CCR	CC chemokine receptor oder Beta chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
CT	Computertomografie
CTL	Cytotoxic T cell (Zytotoxische T-Zelle)
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	Delayed-type hypersensitivity (Zelluläre Immunreaktion vom verzögerten Typ)
EDTA	Ethylen-Diethyl-Tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme linked immuno spot technique
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie
FET-PET	Fluorethyltyrosin-Positronen-Emissions-Tomografie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GBM	Glioblastoma multiforme
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Good manufacturing practice
HIV	Human immunodeficiency virus (Humanes Immundefizienz-Virus)
HLA	Human leukocyte antigen (Humanes Leukozytenantigen)
HSA	Humanes Serum-Albumin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase

MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MRT	Magnetresonanztomografie
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
RF	Raumforderung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard error of the mean
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TV	Tumorzellen
TVT	Tiefe Venenthrombose
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

6. Literaturverzeichnis

- Anderson MJ, Shafer-Weaver K, Greenberg NM, Hurwitz AA (2007). Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *The Journal of Immunology*, 178, 1268-1276.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL (2002). Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*, 8(4), 379-385.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry*, 73(11), 975-983.
- Bachleitner-Hofmann T, Stift A, Friedl J, Pfragner R, Radelbauer K, Dubsky P, Schüller G, Benkö T, Niederle B, Brostjan C, Jakesz R, Gnant M (2002). Stimulation of autologous antitumor T-cell responses against medullary thyroid carcinoma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3), 1098-1104.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods*, 281, 65-78.
- Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A (1989). Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. *The Journal of Immunology*, 143(10), 3222-3229.
- Bradl M, Hohlfeld R (2003). Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74, 1364-1370.

- Brandes AA, Scelzi E, Salmistraro G, Ermani M, Carollo C, Berti F, Zampieri P, Baiocchi C, Fiorentino MV (1997). Incidence of risk of thromboembolism during treatment high-grade gliomas: a prospective study. *European Journal of Cancer*, 33(10), 1592-1596.
- Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Bertorelle R, Gioia V, Franceschi E, Biscuola M, Blatt V, Crinò L, Ermani M & GICNO (2006). Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO). *British Journal of Cancer*, 95(9), 1155-1160.
- Brooks WH, Roszman TL, Mahaley MS, Woosley RE (1977). Immunobiology of primary intracranial tumours. II. Analysis of lymphocyte subpopulations in patients with primary brain tumours. *Clinical and Experimental Immunology*, 29(1), 61-66.
- Calzascia T, di Bernardino-Besson W, Wilmotte R, Masson F, de Tribolet N, Dietrich PY, Walker PR (2003). Cutting edge: Cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain. *The Journal of Immunology*, 171, 2187-2191.
- Calzascia T, Masson F, di Bernardino-Besson W, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Rüegg C, Dietrich PY, Walker PR (2005). Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity*, 22, 175-184.
- Clarke SL, Betts GJ, Plant A, Wright KL, El-Shanawany T, Harrop R, Torkington J, Rees BI, Williams GT, Gallimore AM, Godkin AJ (2006). CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE*, 1(1), e129
- Cserr HF, DePasquale M, Harling-Berg CJ, Park JT, Knopf PM (1992). Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF-administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *Journal of Neuroimmunology*, 41(2), 195-202.

- Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathology*, 2(4), 269-276.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942-949.
- De Cicco M (2004). The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50(3), 187-196.
- De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, van Calenbergh F, van Loon J, Goffin J, Wilms G, Demaerel P, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Wolff JEA, Wagner S, Kaempgen E, van Gool S (2008). Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*, 14(10), 3098-3104.
- De Vleeschouwer S, Rapp M, Sorg RV, Steiger HJ, Stummer W, van Gool S, Sabel M (2006). Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery*, 59(5), 988-1000.
- De Vleeschouwer S, van Calenbergh F, Demaerel P, Flamen P, Rutkowski S, Kaempgen E, Wolff JE, Plets C, Sciote R, van Gool S (2004). Transient local response and persistent tumor control in a child with recurrent malignant glioma: treatment with a combination therapy including dendritic cell therapy. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 100(5), 492-497.
- Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *Journal of Neuroimmunology*, 100, 216-232.

- Dranoff G (2005). The therapeutic implications of intratumoral regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*, 11(23), 8226-8229.
- El Andaloussi A, Han Y, Lesniak MS (2006). Prolongation of survival following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in mice with experimental brain tumors. *Journal of Neurosurgery*, 105, 430-437.
- El Andaloussi A, Lesniak MS (2006). An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 8(3), 234-243.
- El Andaloussi A, Lesniak MS (2007). CD4+CD25+FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *Journal of Neurooncology*, 83(2), 145-152.
- Enam SA, Rosenblum ML, Edvardsen K (1998). Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell processes. *Neurosurgery*, 42(3), 599-607.
- Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN (1999). Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood*, 93, 728-736.
- Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, Herndon II JE, Bigner DD, Dranoff G, Sampson JH (2006). Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Research*, 66(6), 3294-3302.
- Friese MA, Steinle A, Weller M (2004). The innate immune response in the central nervous system and its role in glioma immune surveillance. *Onkologie*, 27, 487-491.

- Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu JX, Wang FS (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*, 132(7), 2328-2339.
- Gilboa E (1999). How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 48, 382-385.
- Gomez GG, Kruse CA (2006). Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol*, 10, 133-146.
- Grauer OM, Nierkens S, Bennink E, Toonen LWJ, Boon L, Wesseling P, Suttmuller RPM, Adema GJ (2007). CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *International Journal of Cancer*, 121, 95-105.
- Head JR, Griffin WS (1985). Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: evidence for immunological privilege. *Proceedings of the Royal Society of London*, 224(1236), 375-387.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005). MGMT gene silencing and benefit from Temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003.
- Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *International Journal of Cancer*, 98(3), 362-369.
- Hickey WF (1991). Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathology*, 1(2), 97-105.

- Hintzen RQ, Voormolen J, Sonneveld P, van Duinen SG (2000). Glioblastoma causing granulocytosis by secretion of granulocyte-colony-stimulating factor. *Neurology*, 54, 259-261.
- Hishii M, Nitta T, Ishida H, Ebato M, Kurosu A, Yagita H, Sato K, Okumura K (1995). Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro. *Neurosurgery*, 37(6), 1160-1166.
- Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL (2000). Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Research*, 60, 3542-3549.
- Holland EC (2000). Glioblastoma multiforme: the terminator. *PNAS*, 97(12), 6242-6244.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-1061.
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*, 2, 52-58.
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clinical Cancer Research*, 9, 4404-4408.
- Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, Seissler J, Schott M (2008). Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. *Horm Metab Res*, 40, 99-107.
- Jelsma R, Bucy PC (1967). The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *Journal of Neurosurgery*, 27(5), 388-400.

- Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, van der Burg SH, Fleuren GJ (2008). Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: Which variable determines survival of cervical cancer patients?. *Clinical Cancer Research*, 14(7), 2028-2035.
- Khatti R, Yasayko SA, Ramsdell F (2003). An essential role for Scurfin in CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 337-342.
- Khonkarlya MB, Merlania GM, Halfona P, Bellinia C, Peleta A, Kazadia K, Cavassinia ML, Tarra PE (2004). HIV-Infektion: praktisches Update für Hausärzte in 10 Punkten. *Schweizer Medizin Forum*, 4, 1058-1067.
- Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, Homma S, Abe T, Ohno T (2001). Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 50, 337-344.
- Kondo T, Cortese I, Markovic-Plese S, Wandinger KP, Carter C, Brown M, Leitman S, Martin R (2001). Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nature Immunology* 2, 932 - 938 (2001) *Nature Immunology*, 2, 932-938.
- Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H (2005). CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, ,
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G, for the German Glioma Network (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, 2596-2606.
- Kurokawa, T, Oelke M, Mackensen A (2001). Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *International Journal of Cancer*, 91, 749-756.

- Lampson LA (2003). Brain tumor immunotherapy: an immunologist's perspective. *Journal of Neuro-Oncology*, 64, 3-11.
- Levin VA (Ed.) (2002). *Cancer in the nervous system*, second edition. New York: Oxford University Press.
- Liau LM, Black KL, Martin NA, Sykes SN, Bronstein JM, Jouben-Steele L, Mischel PS, Beldegrun A, Cloughesy TF (2000). Treatment of a glioblastoma patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides. *Neurosurgical Focus*, 9(6),
- Liu W, Putman AL, Xu-you Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St. Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1701-1711.
- Lizee G, Radvanyi LG, Overwijk WW, Hwu P (2006). Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. *Clinical Cancer Research*, 12(16), 4794-4803.
- Louis DN (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1, 97-117.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Eds.) (2007). *WHO classification of tumours of the central nervous system*, fourth edition. Lyon: World Health Organization/IARC.
- Maghni K, Nicolescu OM, Martin JG (1999). Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 223(2), 185-194.

- Mahaley MS Jr, Brooks WH, Roszman TL, Bigner DD, Dudka L, Richardson S (1977). Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 1: studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. *Journal of Neurosurgery*, 46(4), 467-476.
- Medewar P (1948). Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *British Journal of Experimental Pathology*, 29, 58-69.
- Mehling M, Simon P, Mittelbronn M, Meyermann R, Ferrone S, Weller M, Wiendl H (2007). WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism?. *Acta Neuropathologica*, 114, 111-119.
- Morford LA, Dix AR, Brooks WH, Roszman TL (1999). Apoptotic elimination of peripheral T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. *Journal of Neurosurgery*, 91, 935-946.
- Murphy KM, Travers P, Walport M (Eds.) (2008). *Janeway's immunobiology*, seventh edition. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.
- Nair S, Boczkowski D, Fassnacht M, Pisetsky D, Gilboa E (2007). Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer Research*, 67(1), 371-380.
- Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M, Ohta A (1999). Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 190, 617-627.
- Oertel J, von Buttlar E, Schroeder HWS, Gaab MR (2005). Prognosis of gliomas in the 1970s and today. *Neurosurgical Focus*, 18(4),

- Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN (2003). Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Research*, 63, 413-416.
- Parekh K, Ramachandran S, Cooper J, Bigner D, Patterson A, Mohanakumar T (2005). Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. *Lung Cancer*, 47(1), 17-29.
- Parney IF, Hao C, Petruk K (2000). Glioma immunology and immunotherapy. *Neurosurgery*, 46(4), 778-792.
- Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB (Eds.) (2001). *Medical immunology*, tenth edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Pouratian N, Gasco J, Sherman JH, Shaffrey ME, Schiff D (2007). Toxicity and efficacy of protracted low dose temozolomide for the treatment of low grade gliomas. *Journal of Neurooncology*, 82(3), 281-288.
- Prins RM, Graf MR, Merchant RE, Black KL, Wheeler CJ (2003). Thymic function and output of recent thymic emigrant T cells during intracranial glioma progression. *Journal of Neurooncology*, 64, 45-54.
- Prins RM, Liao LM (2003). Immunology and immunotherapy in neurosurgical disease. *Neurosurgery*, 53(1), 144-153.
- Ramirez-Montagut T, Andrews DM, Ihara A, Pervaiz S, Pandolfi F, Van Den Elsen PJ, Waitkus R, Boyle LA, Hishii M, Kurnick JT (2000). Melanoma antigen recognition by tumour-infiltrating T lymphocytes (TIL): effect of differential expression of melan-A/MART-1. *Clinical and Experimental Immunology*, 119(1), 11-18.

- Rapp M, Özcan Z, Steiger HJ, Wernet P, Sabel MC, Sorg RV (2006). Cellular immunity of patients with malignant glioma: prerequisites for dendritic cell vaccination immunotherapy. *Journal of Neurosurgery*, 105(1), 41-50.
- Rasku MA, Clem AL, Telang S, Taft B, Gettings K, Gragg H, Cramer D, Lear SC, McMasters KM, Miller DM, Chesney J (2008). Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *Journal of Translational Medicine* 2008, 6:12, 6(12),
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 83-93.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods*, 196, 137-151.
- Romero P, Valmori D, Pittet MJ, Zippelius A, Rimoldi D, Lévy F, Dutoit V, Ayyoub M, Rubio-Godoy V, Michielin O, Guillaume P, Batard P, Luescher IF, Lejeune F, Liénard D, Rufer N, Dietrich PY, Speiser DE, Cerottini JC (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunological Reviews*, 188, 81-96.
- Rossi M, Young JD (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 175, 1373-1381.
- Roszman TL, Brooks WH (1980). Immunobiology of primary intracranial tumours. III. Demonstration of a qualitative lymphocyte abnormality in patients with primary brain tumours. *Clinical and Experimental Immunology*, 39(2), 395-402.

- Rubio V, Stuge TB, Singh N, Betts MR, Weber JS, Roederer M, Lee PP (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nature Medicine*, 9(11), 1377-1382.
- Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE (1992). TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 274-281.
- Schuler, G, Schuler-Thurner B, Steinman RM (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinions in Immunology*, 15, 138-147.
- Schultes BC, Whiteside TL (2003). Monitoring of immune responses to CA125 with an IFN-gamma ELISPOT assay. *Journal of Immunological Methods*, 279, 1-15.
- Shevach EM (2004). Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nature Medicine*, 10(9), 900-901.
- Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM (1995). Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Experimental Hematology*, 23, 1463-1471.
- Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP, Van Rhee F, Chaudhuri A, Barrett J, Young NS (2000). Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood*, 95, 2269-2274.
- Sorg RV, Andres S, Kögler G, Fischer J, Wernet P (2001). Phenotypic and functional comparison of monocytes from cord blood and granulocyte colony stimulating factor-mobilized apheresis products. *Experimental Hematology*, 29, 1289-1294.
- Sorg RV, Özcan Z, Brefort T, Fischer J, Ackermann J, Müller M, Wernet P (2003). Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *Journal of Immunotherapy*, 26(4), 374-383.

- Steinman RM, Cohn ZA (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 139(2), 380-397.
- Steinman, RM (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Reviews in Immunology*, 9, 271-296.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Reulen HJ, ALA-Glioma Study Group (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncology*, 7(5), 392-401.
- Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T, ALA-Glioma Study Group (2008). Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 62(3), 564-576.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996.
- Stupp R, Roila F (2008). Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 19, 83-85.
- Su YB, Sohn S, Krown SE, Livingston PO, Wolchok JD, Quinn C, Williams L, Foster T, Sepkowitz KA, Chapman PB (2004). Selective CD4+ lymphopenia in melanoma patients treated with Temozolomide: a toxicity with therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*, 22(4), 610-616.
- Tang J, Flomenberg P, Harshyne L, Kenyon L, Andrews DW (2005). Glioblastoma patients exhibit circulating tumor-specific CD8+ T cells. *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5292-5299.

- Therasse P, Arbuck AG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(3), 205-216.
- Tolnay M (2002). Neuropathologie glialer Hirntumoren. *Schweiz Med Forum*, 29/30, 698-703.
- Ueda R, Low, KL, Zhu X, Fujita M, Sasaki K, Whiteside TL, Butterfield LH, Okada H (2007). Spontaneous immune responses against glioma-associated antigens in a long term survivor with malignant glioma. *Journal of Translational Medicine*, 5(68),
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcelllo J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology*, 25(30), 4722-4729.
- Walker DG, Laherty R, Tomlinson FH, Chuah T, Schmidt C (2008). Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15, 114-121.
- Walker PR, Calzascia T, de Tribolet N, Dietrich PY (2003). T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Research Reviews*, 42(2), 97-122.
- Walker PR, Calzascia T, Dietrich PY (2002). All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology*, 107, 28-38.
- Wang D, Dubois RN (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55(1), 115-122.

- Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, Shevach EM, Wang RF (2004). Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*, 20, 107-118.
- Weller M, Tonn J, Ernemann U, Wiestler O, Bamberg M (2009). Glioblastome – Aktuelle Standards bei Diagnostik und Therapie. *Best Practice Onkologie*, 4(2), 4-11.
- Wen PY, Kesari S (2008). Malignant gliomas in adults. *NEJM*, 359(5), 492-507.
- Wheeler CJ, Black KL, Liu G, Mazer M, Zhang XX, Pepkowitz S, Goldfinger D, Ng H, Irvin D, Yu JS (2008). Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Research*, 68(14), 5955-5964.
- Wheeler CJ, Black KL, Liu G, Ying H, Yu JS, Zhang W, Lee PK (2003). Thymic CD8⁺ T cell production strongly influences tumor antigen recognition and age-dependent glioma mortality. *Journal of Immunology*, 171(9), 4927-4933.
- Wheeler CJ, Das A, Liu G, Yu JS, Black KL (2004). Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clinical Cancer Research*, 10, 5316-5326.
- Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, Herrlinger U, Platten M, Blaschke B, Meyermann R, Reifenberger G, Weller M, Wick W (2007). Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(22), 3357-3361.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss EH, Melms A, Weller M (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *Journal of Immunology*, 168(9), 4772-4780.

- Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H (2003). Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Research*, 63(21), 7462-7467.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 9, 606-612.
- Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH (2002). Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 168(4272), 4276
- Yamanaka R, Abe T, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Kobayashi T, Narita M, Takahashi M, Tanaka R (2003). Vaccination of recurrent glioma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. *British Journal of Cancer*, 89, 1172-1179.
- Yamanaka R, Homma J, Yajima N, Tsuchiya N, Sano M, Kobayashi T, Yoshida S, Abe T, Narita M, Takahashi M, Tanaka R (2005). Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clinical Cancer Research*, 11(11), 4160-4167.
- Yamshchikov G, Thompson L, Ross WG, Galavotti H, Aquila W, Deacon D, Caldwell J, Patterson JW, Hunt DF, Slingluff CL Jr (2001). Analysis of a natural immune response against tumor antigens in a melanoma survivor: lessons applicable to clinical trial evaluations. *Clinical Cancer Research*, 7(3), 909-916.
- Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN, Lee PK, Yong WH, Incardona F, Thompson RC, Riedinger MS, Zhang W, Prins RM, Black KL (2001). Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Research*, 61, 842-847.

Zhang JG, Eguchi J, Kruse CA, Gomez GG, Fakhrai H, Schroter S, Ma W, Hoa N, Minev B, Delgado C, Wepsic HT, Okada H, Jadus MR (2007). Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell based therapeutics. *Clinical Cancer Research*, 13(2), 566-575.

Zhou G, Drake CG, Levitsky HI (2006). Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood*, 107(2), 628-636.

7. Danksagung

An erster Stelle danke ich unseren Patienten und deren Angehörigen, da sie trotz der schwerwiegenden Diagnose unsere Forschung unterstützt und damit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Steiger danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt den beiden Betreuern meiner Promotionsarbeit. Herr PD Dr. Rüdiger Sorg hat mich stets mit größtem Engagement, außergewöhnlicher Kompetenz und mit Begeisterung bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen sowie bei der Durchführung der Experimente unterstützt. Herr Prof. Dr. Michael Sabel stand mir insbesondere bei den klinischen Aspekten dieser Arbeit mit größtem Eifer und mit Freundschaftlichkeit zur Seite. Dank ihm entschied ich mich für die Neurochirurgie, da er mich bereits während des Studiums stets in die Klinik integriert hat.

Nathalie Walter und Verena Börger haben mir beigebracht, im Labor experimentell zu arbeiten und haben mir bei allen Versuchen tatkräftig geholfen. Ihre Mitarbeit ist von unschätzbarem Wert gewesen.

Meinen Eltern danke ich für die grenzenlose Unterstützung, die ich immer und in jeder Hinsicht von ihnen erfahren habe. Vielen herzlichen Dank!

Mit Wiebke Dohrn habe ich alle guten und weniger guten Facetten des Medizinstudiums sowie des ärztlichen Berufseinstiegs erlebt, gemeistert und gefeiert. Dafür bin ich für immer dankbar...

8. Lebenslauf

Lebenslauf von **Thomas Beez**

Geburtsdatum/-ort 9. April 1982 in Duisburg

Eltern Brigitte Beez, geb. Mucha
Rainer Beez

Familienstand ledig

Schullaufbahn

1988 bis 2001 Grundschule und Gymnasium in Duisburg, Abiturnote 1,5

Studium und ärztliche Laufbahn

2002 bis 2008 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

01.09.2004 Ärztliche Vorprüfung mit der Note „gut“

18.12.2008 Ärztliche Prüfung mit der Note „sehr gut“

09.01.2009 Approbation als Arzt

seit 16.02.2009 Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Klinik des
Universitätsklinikums Düsseldorf bei Prof. Dr. Steiger

Praktisches Jahr

Neurochirurgie	Universitätsklinikum Düsseldorf (Prof. Dr. Steiger)
Innere Medizin	Western General Hospital, Edinburgh, Schottland (Prof. Dr. Satsangi)
Chirurgie	Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Prof. Dr. Kübler) sowie Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie (Prof. Dr. Knoefel)

Dissertation

2005 - 2009	Experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. Sabel und PD Dr. Sorg über das Thema "Immuntherapie des Glioblastoma multiforme mit dendritischen Zellen"
-------------	---

Stipendium & Fortbildung

07-08/2007	Short-Term-Training-Grant des Neuro-Netzwerkes NRW für einen Auslandsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. De Vleeschouwer an der Katholieke Universiteit Leuven, Belgien
------------	---

Nebentätigkeiten

- 2001 bis 2002 Zivildienst im chirurgischen Pflegedienst des Malteser Krankenhauses St. Anna in Duisburg
- 2003 bis 2006 Studentische Hilfskraft im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. Dr. Reifenberger)
- 2006 bis 2008 Studentische Hilfskraft in der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. Dr. Windolf)
- 2007 bis 2008 Unterricht in Anatomie und Medizin an der Krankenpflegeschule der Diakonie Kaiserswerth und der Rettungsdienstschule der Feuerwehr Düsseldorf

Veröffentlichungen, Poster und Vorträge

- Beez T, Rapp M, Özcan Z, De Vleeschouwer S, Steiger HJ, Wernet P, Sorg RV (2006). Sabel M, Serum-free generation of dendritic cells for clinical application in malignant glioma patients. DGNC-Jahrestagung, Essen, Poster P05.71.
- Rapp M, Beez T, Özcan Z, De Vleeschouwer S, Steiger HJ, Wernet P, Sorg RV, Sabel M (2006). Immune escape of malignant glioma: Interference with dendritic cell mediated immunity. DGNC-Jahrestagung, Essen, Poster P05.64.
- Rapp M, Beez T, Özcan Z, De Vleeschouwer S, Steiger HJ, Wernet P, Sorg RV, Sabel M (2007). Vaccination of glioma patients. DGNC-Jahrestagung, Leipzig, Poster P077.

Beez T, Börger V, Rapp M, Sorg R, Sabel M (2009). Anti-glioma immune response induced by immunotherapy with dendritic cells. DGNC-Jahrestagung, Münster, Vortrag MI.09-03.

Ardon H, Maes W, Beez T, Van Gool S, De Vleeschouwer S (2009). Recent findings in immune monitoring for HGG patients treated with autologous DC vaccination: CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of CD4+ Treg cells. DGNC-Jahrestagung, Münster, Poster P06-06.

Beez T, Börger V, Rapp M, Sorg R, Sabel M (2009). Immunological markers of anti-glioma immune response generated in vivo by dendritic cell immunotherapy. *Acta Neuropathologica*, 118(3), 433-467.

Beez T, Börger V, Rapp M, Sorg R, Sabel M (2009). Immunomonitoring of vaccination therapy with dendritic cells indicates anti-glioma activity induced in patients. Jahrestagung der Sektion Neuroonkologie der DGNC, Bonn, Poster.

Lees CW, Critchley J, Chee N, Beez T, Gailer RE, Williams AR, Shand AG, Arnott ID, Satsangi J (2009). Lack of association between cervical dysplasia and IBD: a large case-control study. *Inflamm Bowel Disease*, 15(11), 1621-1629.

Ardon H, Verbinnen B, Maes W, Beez T, Van Gool S, De Vleeschouwer S (2010). Technical advancement in regulatory T cell isolation and characterization using CD127 expression in patients with malignant glioma treated with autologous dendritic cell vaccination. *J Immunol Methods*, 352(1-2), 169-173.

Düsseldorf, den 25.10.2010

Thomas Beez