

Induktion einer Immunantwort und Mechanismen der Toleranz beim malignen Gliom

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Zakir Özcan

aus Yazikisla

Düsseldorf 2006

Aus dem
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Gesine Kögler
Koreferent: PD Dr. Rüdiger V. Sorg
Koreferent: Prof. Dr. William Martin

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Peter Wernet danken, dass ich diese interessante Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen konnte.

Prof. Dr. William Martin und Prof Dr. Gesine Kögler danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt PD. Dr. Rüdiger Sorg, der mich während dieser Zeit betreut, ständig unterstützt, zu neuen Ideen sowie Ansätzen angeregt hat und vor allem meine Arbeit unermüdlich korrigierte.

PD Dr. Michael Sabel und Marion Rapp bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe in allen Fragen, die das maligne Gliom betrafen.

Weiterhin danke ich PD Dr. Markus Uhrberg, Dr. Britta Eisermann, Sandra Weinhold und Julia Christ für die Einführung in die Biologie der NK-Zellen und die Zurverfügungstellung von NK-Zellen.

Ich danke allen meinen Kollegen im Institut für das angenehme und freundliche Arbeitsklima und für die große Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an Meike Winter, Natalie Walter, Teja Radke und Sandra Sensken dafür, dass sie meine „perfekte“ Grammatik korrigiert haben.

Weiterhin danke ich Mahtab Maleki und Aurelie Lefort, dass sie einfach da waren, wenn Hilfe erforderlich war und ständig gute Laune im Labor verbreitet haben.

Für die seelische Unterstützung danke ich meinen Eltern und Geschwistern, speziell meinem Bruder Ahmet Özcan, der mir das Studium in Deutschland ermöglicht hat.

Vor allem aber danke ich meiner Frau Bediriye und meinen Töchtern Meryem und Sümeyye für das Verständnis und die Geduld, die sie mir während meiner Arbeit entgegengebracht haben.

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 10 |
| 1.1 Das Immunsystem | 10 |
| 1.2 Natürliche Killerzellen..... | 11 |
| 1.3 T-Zellen..... | 12 |
| 1.4 Dendritische Zellen | 14 |
| 1.4.1 Antigen-Prozessierung und -Präsentation..... | 15 |
| 1.4.2 Interaktion der T-Zellen durch Dendritische Zellen | 17 |
| 1.4.3 Ex vivo Generierung Dendritischer Zellen..... | 19 |
| 1.5 Tumor und Immunsystem | 21 |
| 1.6 Vakzinierung mit Dendritischen Zellen gegen Gliome..... | 24 |
| 1.7 Zielsetzung der Arbeit | 25 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 2.1 Venöses Blut von Gliompatienten und gesunden Probanden | 26 |
| 2.2 Gewinnung von Nabelschnurblut | 26 |
| 2.3 Präparation von nekrotischem Tumorgewebe..... | 26 |
| 2.4 Monoklonale Antikörper | 27 |
| 2.5 Medien und Cytokine | 27 |
| 2.6 Zellpräparationen | 27 |
| 2.6.1 Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) aus Blut | 27 |
| 2.6.2 Anreicherung von CD14+ Monozyten | 27 |
| 2.6.3 Anreicherung von T-Zellen aus Nabelschnurblut | 28 |
| 2.6.4 Gewinnung von NK-Zellen aus Nabelschnurblut..... | 28 |
| 2.7 Gewinnung von Plasma | 29 |
| 2.8 Tumorzelllinien und Generierung konditionierter Medien | 29 |
| 2.9 Bestimmung von Zellzahlen | 31 |
| 2.10 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 31 |
| 2.11 Immunmarkierung und Durchflusszytometrie..... | 32 |
| 2.12 Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten..... | 32 |
| 2.13 Pinozytose- und Phagozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen | 33 |
| 2.14 Beladung unreifer Dendritischer Zellen mit autologem Tumormaterial | 34 |
| 2.15 Anreicherung von Clustern aus Dendritischen Zellen und T-Zellen | 34 |
| 2.16 Induktion und Nachweis proliferativer T-Zell-Antworten | 34 |
| 2.16.1 Allostimulatorische Aktivität reifer Dendritischer Zellen..... | 34 |
| 2.16.2 PHA-Antwort mononukleärer Zellen..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 2.16.3 Mitogene Aktivität gliomzellkonditionierter Medien..... | 35 |
| 2.16.4 Tumormaterial-spezifische T-Zell-Antwort..... | 35 |
| 2.17 Induktion und Nachweis der Cytokinexpression durch T-Zellen..... | 36 |
| 2.17.1 Allostimulatorische Aktivität reifer Dendritischer Zellen..... | 36 |
| 2.17.2 Cytokine-induzierende Aktivität gliomzellkonditionierter Medien..... | 36 |
| 2.17.3 Tumormaterial-spezifische T-Zell-Cytokin-Antwort | 37 |
| 2.17.4 ELISPOT-Assay | 37 |
| 2.18 NK-Zell-Lyse Dendritischer Zellen | 37 |
| 2.19 Nachweis von löslichem CD83..... | 38 |
| 2.20 Nachweis von Cytokinen in konditionierten Medien | 38 |
| 2.20.1 Cytokin-Array | 38 |
| 2.20.2 Luminex-Analyse | 39 |
| 2.21 Statistik | 40 |
| 3. ERGEBNISSE | 41 |
| 3.1 Immunstatus von Gliompatienten..... | 41 |
| 3.1.1 Zusammensetzung der Leukozyten des Blutes | 41 |
| 3.1.2 Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin | 46 |
| 3.1.3 Ex-vivo Generierung von Dendritischen Zellen (DC) | 46 |
| 3.2 Optimierte Generierung Dendritischer Zellen von Gliompatienten unter serumfreien Kulturbedingungen | 50 |
| 3.2.1 Vergleichende Phänotypanalyse der in X-Vivo 15 oder CellGroDC Medium generierten Dendritischen Zellen von Gliompatienten | 50 |
| 3.2.2 Vergleichende Analyse der T-Zell-stimulatorischen Aktivität von in X-Vivo 15 bzw. CellGroDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten..... | 54 |
| 3.2.3 Vergleichende immunphänotypische Analyse in serumfreiem CellGroDC Medium generierter Dendritischer Zellen von Gliompatienten und gesunden Probanden | 57 |
| 3.2.4 Antigenaufnahme-Aktivität der unter serumfreien Bedingungen generierten unreifen Dendritischen Zellen | 59 |
| 3.2.5 Morphologische Charakterisierung der DC in CellGroDC Medium | 61 |
| 3.2.6 Interaktion der in serumfreiem CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten mit naiven T-Zellen | 63 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2.7 | In vitro Induktion einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort mit TH1-Polarisierung | 64 |
| 3.3 | Mechanismen der Interferenz von Gliomzellen mit der durch Dendritische Zellen vermittelten Immunität | 67 |
| 3.3.1 | Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen | 68 |
| 3.3.2 | Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Expression immunrelevanter Moleküle durch reife Dendritische Zellen..... | 72 |
| 3.3.3 | Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Antigenaufnahme-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen | 76 |
| 3.3.4 | Einfluss der Gliomzelllinie U373 auf die T-Zell-stimulatorische Aktivität von reifen Dendritischen Zellen | 77 |
| 3.3.6 | Cytokin- und Chemokinexpression der Gliomzelllinien U373 und A172 | 81 |
| 3.3.7 | Beteiligung von IL-6, TGF- β und VEGF an der Inhibition der Differenzierung/Ausreifung Dendritischer Zellen durch Gliomzellen | 84 |
| 3.3.8 | Konsequenz der durch Gliomzellen induzierten reduzierten Expression von HLA-Klasse I Molekülen auf Dendritischen Zellen für deren Sensitivität gegenüber der Lyse durch NK-Zellen | 86 |
| 4. | DISKUSSION..... | 88 |
| 4.1 | Immunstatus von Gliompatienten..... | 88 |
| 4.2 | Ex vivo Generierung und Charakterisierung Dendritischer Zellen..... | 90 |
| 4.3 | Mechanismen zur immunologischen Toleranz von Gliomzellen..... | 95 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 102 |
| 6. | ANHANG | 105 |
| 7. | REFERENZEN..... | 125 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ADCC | Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity |
| APC | Antigen-Presenting Cell(s) |
| BCIP/NBT | Bromo-Chloro-Indoryl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium |
| BrdU | 5'-Brom-2'-Deoxyuridin |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CB | Cord Blood |
| CD | Cluster Designation |
| CFDA,SE | Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester |
| CPD | Citrat-Phosphate-Dextrose |
| DC | Dendritic Cell(s) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | Forward Scatter |
| GM-CSF | Granulocyte-Makrophage-Colony Stimulating Factor |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HLA | Humane Leukocyte Antigene |
| HSA | Humanserumalbumin |
| ICAM | Intracellular Adhesion Molecule |
| IL | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| IP-10 | IFN - Inducible Protein 10 |
| KIR | Killercell Immunoglobulin-Like Receptors |
| LFA | Leukocyte Function-Associated Antigen |
| LIF | Leukemia Inhibitory Factor |
| Lin | Lineage Marker |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mAb | Monoclonal Antibody |
| MACS | Magnet Activated Cell Sorter |

| | |
|--------------|---|
| MCP | Monocyten Chemoattractant Protein |
| MDC | Macrophage-Derived Chemokine |
| M-CSF | Macrophage-Colony Stimulating Factor |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MIP | Macrophage Inflammatory Protein |
| MLC | Mixed Leukocyte Culture |
| MNC | Mononuclear Cells |
| NK-Zelle | Natürliche Killer-Zelle |
| Osm | Oncostatin M |
| PB | Peripheral Blood |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pDC | Plasmacytoid Dendritic Cell(s) |
| PE | Phycoerythrin |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PI | Propidiumjodid |
| preDC | Precursor Dendritic Cell(s) |
| RANTES | Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed, And Presumably Secreted, Chemokin |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standard Deviation |
| SEM | Standard Error Of The Mean |
| SSC | Side Scatter |
| TAP | Transporter Associated With Antigen Processing |
| TCR | T-Cell Receptor |
| TGF β | Transforming Growth Factor beta |
| TLR | Toll-Like Rezeptor |
| TNF α | Tumor Necrosis Factor α |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl miteinander interagierender Zellen. Seine zentrale Funktion besteht darin, körpereigene von pathogenen, körperfremden oder malignen Zellen bzw. Strukturen zu unterscheiden, was durch spezifische Rezeptoren auf den Immunzellen gewährleistet wird.

Das Immunsystem lässt sich in angeborene und erworbene (adaptive) Immunität unterteilen. Die Effektorzellen der angeborenen Immunität - Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen - bilden die erste Abwehr. Sie erkennen generelle, auf vielen Pathogenen konservierte Strukturen wie bspw. Lipopolysaccharide (LPS), und beseitigen die Pathogene durch Phagozytose und Abbau in den Phagolysosomen [1]. Die dabei aktivierten Makrophagen sezernieren Cytokine wie IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ und Chemokine wie IL-8, die weitere Immunzellen zum Infektionsherd locken. Darüber hinaus entsteht durch diese proinflammatorischen Signale am Infektionsort ein immunstimulatorisches Milieu, das ein Teil des Danger-Signals ist, welches die adaptive Immunantwort einleitet [2, 3].

Die sich anschließende adaptive Immunantwort beruht auf hochspezifischen humoralen und zellulären Mechanismen, die gezielt von antigenpräsentierenden Zellen (APC), insbesondere von Dendritischen Zellen (DC), initiiert werden [1]. Effektorzellen der adaptiven Immunität sind Plasmazellen, die große Mengen an Antikörpern sezernieren, sowie T-Zellen, die als zytotoxische T-Zellen (CTL) ihre Targetzellen lysieren oder als T_{Helfer} -Zellen (T_{H}) die zelluläre und humorale Immunität regulieren. Diese Effektorzellen entstehen in der Initiationsphase der adaptiven Immunantwort, in der ruhende T-Zellen mit DC bzw. ruhende B-Zellen mit T_{H} -Effektorzellen interagieren. Hierbei werden aus dem Pool der T- bzw. B-Lymphozyten mit klonal exprimierten Antigenrezeptor-Spezifitäten, die Klone aktiviert und proliferieren und differenzieren zu Effektorzellen, welche über einen T- bzw. B-Zell-Antigenrezeptor verfügen, dessen Antigen in einem immunstimulatorischen Kontext im Organismus vorhanden ist.

Ein Charakteristikum der adaptiven Immunität ist das immunologische Gedächtnis [4, 5]. Nach einer Infektion bleiben sogenannte Memory T- bzw. B-Zellen im Körper erhalten. Bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger ist dann die Frequenz der für diesen Erreger spezifischen T- bzw. B-Zellen höher. Des Weiteren sind die

Aktivierungsvoraussetzungen solcher Memory-Zellen im Vergleich zur Primärantwort naiver B- und T-Zellen vermindert. Die Memory-Antwort läuft deshalb schneller und effektiver ab.

1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind zytotoxische Lymphozyten, welche von zytotoxischen T-Zellen durch das Fehlen des T-Zell-Rezeptors unterschieden werden können. Durchflusszytometrisch sind NK-Zellen durch den Phänotyp CD3-, CD16+, CD56+ charakterisiert [6]. Sie machen circa 10-15% der Lymphozyten des Blutes aus [7].

Die Aufgabe von NK-Zellen besteht vor allem in der Beseitigung virusinfizierter und entarteter Körperzellen. Sie sind darauf spezialisiert, Zellen zu erkennen, welche eine reduzierte oder gänzlich fehlende Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (MHC-I - Major Histocompatibility Complex Class I; human: HLA-Klasse I – Human Leukocyte Antigen Class I) aufweisen, was bei vielen Tumorzellen und virusinfizierten Zellen zu beobachten ist, und es diesen gestattet, einer Immunantwort HLA-Klasse I-restringierter, zytotoxischer T-Zellen zu entgehen [8, 9]. NK-Zellen können solche Unterschiede in der Expression von MHC-I wahrnehmen und die entsprechenden Zellen lysieren.

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche inhibitorische und stimulatorische Rezeptoren. Die inhibitorischen Rezeptoren binden MHC-I. Beim Menschen werden HLA-Klasse I Moleküle entweder durch Rezeptoren der KIR-Familie (Killer Immunoglobulin-Like Rezeptor) oder durch das heterodimere C-Typ Lektin NKG2a/CD94 erkannt [10]. Bei Abwesenheit bzw. reduzierter Expression von HLA-Klasse I bleibt das durch die KIR-Rezeptoren oder NKG2A/CD94 vermittelte inhibitorische Signal aus und die Targetzelle wird abgetötet. Das Abtöten der Targetzelle durch eine NK-Zelle erfolgt durch Induktion von Apoptose, entweder über den Perforin/Granzym B Mechanismus oder über die Fas/FasL Interaktion [11].

NK-Zellen enthalten lytische Granula mit Proteinen wie Perforin und Granzym B. Nach dem Kontakt zwischen NK-Zelle und Targetzelle und dem Ausbleiben des inhibitorischen Signals werden beide Proteine durch Exozytose ausgeschleust. Perforin wird Ca^{2+} -abhängig an die Lipidmembran der Targetzelle gebunden und als Monomer in die Membran inseriert. Es folgt eine schrittweise Polymerisierung, wodurch in der Membran der Zielzelle Poren gebildet werden [12, 13]. Dies kann

entweder direkt zur Lyse führen oder die Serinprotease Granzym B gelangt über diese Poren in die Targetzelle und spaltet dort und dadurch aktiviert das ubiquitäre CPP-32, eine Caspase, die wiederum die Caspase-aktivierbare DNase (CAD) aktivieren kann. CAD dringt, nachdem eine inhibitorische Untereinheit (I-CAD) abgespalten wurde, in den Zellkern ein und führt zum Abbau der DNA .

Alternativ zum Perforin/Granzym B Mechanismus bindet FasL auf NK-Zellen an das ubiquitär exprimierte Fas (CD95/APO-1) auf der Targetzelle [14, 15]. Fas Proteine weisen eine Todesdomäne ("Death Domain", DD) im zytoplasmatischen Teil auf, welche das apoptotische Signal mit Hilfe eines Adapterproteins (FADD "Fas-Associated Death Domain" Protein) in das Zellinnere überträgt. FADD interagiert mit Procaspase-8. Aggregierte Procaspase-8-Moleküle spalten sich gegenseitig, wodurch eine aktive Caspasedomäne entsteht. Diese spaltet und dadurch aktiviert ihrerseits wiederum weitere Procaspasen. Diese Caspase-Kaskade endet bei der Caspase-aktivierbaren DNase (CAD), die den Abbau der DNA der Targetzelle bewirkt.

Neben diesen Aktivitäten im Rahmen der angeborenen Immunität haben NK-Zellen auch eine Funktion bei der adaptiven Immunität. Über ihre Fc γ III-Rezeptoren (CD16) binden sie antikörperopsonisierte Targetzellen und töten diese in einem als Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) bezeichneten Prozess ab [16].

1.3 T-Zellen

Im Knochenmark aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen gebildete lymphatische Vorläuferzellen wandern über die Blutbahn in den Thymus ein, wo sie ausreifen. Während ihrer Reifung durchlaufen die Thymozyten eine positive Selektion, wobei nur die eigene MHC-Moleküle erkennenden Zellen überleben. Die darauf folgende negative Selektion filtert potentiell autoreaktive Zellen heraus [17]. Unterschiedlichste gewebespezifische Antigene werden von Thymusepithelzellen exprimiert und abgeleitete Peptide von thymusständigen lymphoiden DC über MHC-Moleküle präsentiert. Haben Thymozyten einen TCR, der einen entsprechenden MHC/Peptid-Komplex erkennt, werden sie durch Apoptose eliminiert.

Durchflusszytometrisch sind T-Zellen durch den Phänotyp CD3⁺ innerhalb der CD45⁺ Leukozyten charakterisiert. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TCR), der von kovalent verknüpften $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Dimeren gebildet

wird, welche mit dem für die Signaltransduktion zuständigen CD3-Komplex (CD3 $\epsilon_2\gamma\delta\zeta_2$) assoziiert sind [18]. Der TCR-Komplex beinhaltet ferner den CD4 oder CD8 Corezeptor, welche die T_H und CTL Subpopulationen der T-Zellen unterscheiden.

Die CD3+ T-Zellen im peripheren Blut können anhand weiterer Oberflächenmoleküle in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden:

1. CD4+ T_H-Zellen: erkennen auf MHC-Klasse II Molekülen präsentierte Peptide. Ruhende, naive T_H-Zellen (T_{H0}) differenzieren erst nach Aktivierung und Instruierung durch DC zu T_{H1}- oder T_{H2}-Effektorzellen, welche sich in ihrer Cytokinexpression unterscheiden. T_{H1}-Zellen produzieren IL-2 und IFN γ und leiten die zellvermittelte Immunantwort ein. T_{H2}-Zellen produzieren dagegen u.a. IL-4 und steuern die humorale Immunantwort. Auch regulatorische T-Zellen (T_{H3}, T_{R1}), die durch die Expression von TGF β und IL-10 gekennzeichnet sind und eine negative regulatorische Funktion im Rahmen der Kontrolle der Immunantwort ausüben, können aus einem solchen Aktivierungszyklus hervorgehen.
2. CD8+ CTL: erkennen auf MHC-Klasse I Molekülen präsentierte Peptide. Nach Aktivierung der naiven CD8+ CTL differenzieren sie zu zytotoxischen Effektorzellen, welche über Perforin/Granzym B oder Fas-FasL-abhängige Mechanismen Apoptose der Targetzellen induzieren können.
3. CD45RA+ naive T-Zellen: haben noch keinen Aktivierungszyklus durchlaufen.
4. CD45RO+ Memory-T-Zellen: aus einem Aktivierungszyklus hervorgegangene Zellen, die das immunologische, zelluläre Gedächtnis vermitteln und auf eine weitere Infektion durch den gleichen Erreger effizienter reagieren können.
5. CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (T_{reg}): entstehen im Thymus, haben immunsuppressive Aktivität und sind an der Aufrechterhaltung von Toleranz beteiligt. Die CD4+CD25+ Zellen beinhalten aber auch gerade frisch aktivierte T_H-Zellen.
6. CD3+CD56+ natürliche Killer-T-Zellen (NKT): erkennen über CD1-Moleküle präsentierte Glykolipide.

Weitere relevante T-Zell-Antigene, deren Expression Aussagen über Aktivierungszustand und Funktionalität gestatten sind: CD28, CD152, CD154 und HLA-DR.

1.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen als hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) spielen eine zentrale Rolle in der Initiationsphase von T-Zell-Antworten und damit auch für die meisten Aspekte adaptiver Immunität [19, 20].

Morphologisch sind reife DC als unregelmäßig geformte Zellen mit langen Cytoplasmafortsätzen (Dendriten) charakterisiert, welchen sie auch ihren Namen verdanken. Sie können sowohl aus der lymphoiden als auch aus der myeloischen Entwicklungsreihe entstehen [21-23]. Der lymphoide DC-Subtyp, die sogenannten plasmacytoiden Dendritischen Zellen (pDC), ist im Thymus, im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen zu finden. Im Thymus spielen sie eine zentrale Rolle bei der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen. In sekundären lymphatischen Organen können sie aber auch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktivieren, wobei eine präferenzielle Induktion von T_H2-Antworten beschrieben wurde [24].

Langerhans Zellen der Haut, interstitielle Zellen in nicht-lymphatischen Geweben, die sogenannten 'veiled cells' in den afferenten Lymphbahnen sowie die interdigitierenden Zellen der Lymphknoten repräsentieren myeloische DC [21-23]. Sie sind eng mit Monozyten verwandt. Tatsächlich können Monozyten auch als proDC fungieren und in einem als reverse Transmigration bezeichneten Prozess zu reifen DC differenzieren und ausreifen [25]. In Zellkultursystemen wurde Ähnliches bereits 1994 beobachtet [26, 27]. Wurden Monozyten in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert, differenzierten sie zu unreifen DC, die durch weitere Stimuli wie bspw. TNF α ausreifen und dann durch die Expression von CD83 gekennzeichnet sind [28].

Dendritische Zellen existieren im Organismus in zwei unterschiedlichen funktionellen Zuständen: als unreife und reife Dendritische Zellen [20, 29]. Unreife DC patrouillieren in den peripheren Geweben und nehmen dort kontinuierlich Antigene auf [30]. Sie exprimieren Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6, welche sie zu Infektionsorten bzw. Entzündungsherden locken [31, 32].

Die Antigenaufnahme erfolgt in Form von Rezeptor-vermittelter Endozytose (u.a. Mannose-Rezeptor, DEC205), Pinozytose sowie Phagozytose. Die Effizienz dieser Mechanismen gestattet es, dass Antigene, die im Pikomolarbereich vorliegen, aufgenommen und über MHC-Moleküle präsentiert werden können [33]. Die Antigenaufnahme durch DC führt jedoch nur dann zur Induktion einer Immunantwort, wenn die DC ein sogenanntes Danger-Signal wahrnehmen, wie es z.B. Pathogene,

Signale von Toll-like Rezeptoren (TLR), bestimmte Gewebeschädigungen oder Anzeichen einer Entzündung wie die Gegenwart proinflammatorischer Cytokine (u.a. IL-1, IL-6, TNF α) darstellen [2, 3]. Die Danger-Signale induzieren die Ausreifung der DC [34, 35], was mit einer Veränderung des Chemokinrezeptorprofils einhergeht. Die Rezeptoren für an Infektionsorten gebildete Chemokine werden herunterreguliert und CCR7, welcher sie zu den Lymphknoten leitet, wo die entsprechenden Liganden, CCL19 und CCL21, gebildet werden, wird hochreguliert [31, 32].

Die DC migrieren zu den lokalen Lymphknoten und reifen aus. Die Antigenaufnahme wird eingestellt [36] und die Expression von Adhäsions- (CD54 - ICAM-1, CD50 - ICAM-3), costimulatorischen (CD80 - B7.1, CD86 - B7.2) und weiteren akzessorischen Molekülen (CD40, CD58 - LFA-3) sowie von Cytokinen (z.B. IL-12), welche für die T-Zell-Aktivierung essentiell sind, wird hochreguliert [20, 29, 37].

Die durch Danger-Signale induzierte Ausreifung der DC ist ein kritischer Schritt. Er entscheidet letztendlich darüber, ob eine Immunantwort gegen eines der aufgenommenen Antigene ausgelöst wird oder nicht. In der Abwesenheit von reifen Dendritischen Zellen können naive T-Zellen ihre Peptide nur auf 'normalen' Körperzellen oder auf unreifen DC erkennen. Auch andere antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und B-Zellen können reife DC nicht ersetzen. Die Konsequenz hiervon ist die Eliminierung der erkennenden T-Zellen bzw. ihre Entwicklung zu immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen, Vorgänge die zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz beitragen [38-40]. Darüber hinaus entscheiden die Signale am Antigenaufnahmeort, die zur Aktivierung und Ausreifung der DC beitragen, auch darüber, welches polarisierende Signal (z.B. IL-12 für T_H1, OX40L für T_H2 oder IL-10 für T_R1) in den DC induziert wird, also über die qualitative Ausprägung der Immunantwort.

1.4.1 Antigen-Prozessierung und -Präsentation

Peptidantigene werden entweder über MHC-Klasse I oder Klasse II Moleküle präsentiert. MHC-Klasse I Moleküle bestehen aus einer α -Kette und β 2-Mikroglobulin. Sie werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Bei den präsentierten Peptiden handelt es sich in der Regel um Produkte endogener, d.h. in der Zelle selbst synthetisierter Proteine. Sie repräsentieren ein Abbild der Proteinsynthese in jeder Körperzelle [41]. Ein Teil der Peptide stammt dabei von falsch synthetisierten oder gefalteten Proteinen, sogenannten DRiPs (defective

ribosomal products) [42], die nach der Synthese mit Ubiquitin markiert [43] und im Proteasom, einem multikatalytischen Proteinkomplex, zu Peptiden degradiert werden. Tatsächlich scheinen ein relativ großer Anteil neu synthetisierter Proteine (ca. 30%) unmittelbar nach der Synthese wieder abgebaut zu werden [44]. Die degradierten Proteine werden dann als Peptide durch spezielle ATP-abhängige Transporter, die sogenannten transporters associated with antigen processing (TAP), vom Zytosol ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) geschleust, wo sie mit MHC-Klasse I assoziieren. MHC-Klasse I Moleküle werden während ihrer Synthese im ER durch eine Reihe von Chaperonen wie Calnexin, ERp57, Calretikulin und Tapasin festgehalten, bis ein Peptid gebunden wurde. Erst nach der Assoziation eines Peptides mit MHC-Klasse I fallen die Chaperone ab und der MHC-Klasse I/Peptid-Komplex kann über den Golgi-Komplex an die Zelloberfläche transportiert werden.

Da nur DC naive CD8+ CTL zu aktivieren vermögen, verfügen sie über einen speziellen Mechanismus, um Proteinantigene aufzunehmen, sie aber dennoch über MHC-Klasse I Moleküle präsentieren zu können, die sogenannte Kreuzpräsentation [45, 46]. Proteinantigene werden durch Endozytose in Phagosomen aufgenommen. Diese fusionieren mit dem ER. Dann werden die Antigene ins Zytosol exportiert, im Proteasom degradiert und nach dem Rücktransport erfolgt die Beladung der MHC-Klasse I Moleküle [47].

MHC-Klasse II Moleküle werden auf antigenpräsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen) exprimiert. Die Expressionsdichte auf reifen DC ist 10-100-Mal höher als auf anderen APC [48]. Über MHC-Klasse II Moleküle werden Peptide exogenen Ursprungs präsentiert.

MHC-Klasse II Moleküle bestehen aus einer α -Kette und einer β -Kette. Während ihrer Bildung im ER wird die Peptidbindungsstelle von MHC-Klasse II Molekülen durch die Klasse II-assoziierte invariante Kette blockiert. Durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommene Antigene gelangen in Endosomen. Durch Azidifizierung werden Proteasen (u.a. Cathepsin S and L) aktiviert, welche die Proteinantigene zu Peptiden abbauen. Verschmelzen diese peptidhaltenden Vesikel mit den Vesikeln, welche die neusynthetisierten MHC-Klasse II Moleküle enthalten (sogenannte MIIC - MHC-class II compartment), wird im sauren Milieu die invariante Kette gespalten, so dass nun unter Beteiligung von HLA-DM, ein MHC-Klasse II ähnliches Dimer, Peptide von den MHC-Klasse II Molekülen gebunden werden

können [30, 49]. Anschließend werden die MHC-Klasse II/Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche transportiert und können nun von CD4+ T-Zellen erkannt werden.

1.4.2 Interaktion der T-Zellen durch Dendritische Zellen

Von unreifen DC aufgenommene und prozessierte Antigene werden von reifen DC im Lymphknoten über MHC-Klasse I und II Moleküle im Kontext von Adhäsions-, costimulatorischen und akzessorischen Molekülen präsentiert und können so von naiven T-Zellen erkannt werden. Die Wechselwirkung zwischen DC und T-Zellen erfolgt in der immunologischen Synapse (Abb. 1.1).

Initial binden T-Zellen MHC-unabhängig über Adhäsionsmoleküle an Dendritische Zellen: ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102) auf DC binden an LFA-1 (CD11a/CD18) auf T-Zellen, LFA-3 (CD58) und DC-SIGN (CD209) an CD2 und ICAM-3 (CD50). Diese Interaktionen gestatten es dem TCR die MHC-Moleküle 'abzusuchen'. Wird ein Peptid erkannt (=Signal 1 der T-Zell-Aktivierung), kommt es zu einer Konformationsänderung von LFA-1, die den Zell-Zell-Komplex stabilisiert. Erhält die T-Zelle nun zusätzlich costimulatorische und weitere akzessorische Signale, beginnt die klonale Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen [50, 51].

Von zentraler Bedeutung ist die Interaktion zwischen CD28 auf der T-Zelle und CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) auf der DC. Diese Interaktion generiert das essentielle costimulatorische Signal 2. Fehlt dieses Signal 2 bei vorliegendem Signal 1 (z.B. wenn T-Zellen ihr Peptid auf normalen Körperzellen oder unreifen DC erkennen, welche kein CD80 oder CD86 exprimieren), führt dies zu Anergie oder Apoptose der erkennenden T-Zelle oder zur Ausbildung von regulatorischen T-Zellen, in Abhängigkeit von anderen akzessorischen Wechselwirkungen [40, 50, 52-54].

Eine weitere wichtige Interaktion ist die zwischen CD40 auf DC und CD154 auf der T-Zelle [55]. Sie führt zu einer verstärkten Expression von CD80 und CD86 auf DC und zur Induktion der Synthese von IL-12. Das CD40 Signal spielt somit auch eine Rolle für die T_H1/T_H2 -Polarisierung der T-Zell-Antwort. Deren Entwicklung wird dann aber auch durch die von den Effektor- T_H -Zellen selbst gebildeten T_H1 - oder T_H2 -Cytokine stabilisiert. Das T_H1 -Cytokin $IFN\gamma$ fördert die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines T_H1 -Phänotyps und inhibiert gleichzeitig eine T_H2 -Antwort, wogegen die T_H2 -Cytokine IL-4 und IL-10 die IL-12 Produktion durch DC und somit die Ausbildung einer T_H1 -Antwort hemmen [56]. Das polarisierende Signal der DC,

welches durch die Integration der Signale am Antigenaufnahmeort definiert wird, bestimmt jedoch initial, ob eine CD4⁺ T_H0-Zelle sich zu einer T_H1- oder T_H2-Zelle entwickelt [57, 58]. Neben IL-12 führen auch IFN α und IFN δ zu einer T_H1-Antwort, wogegen OX40L oder Jagged eine T_H2-Antwort fördern.

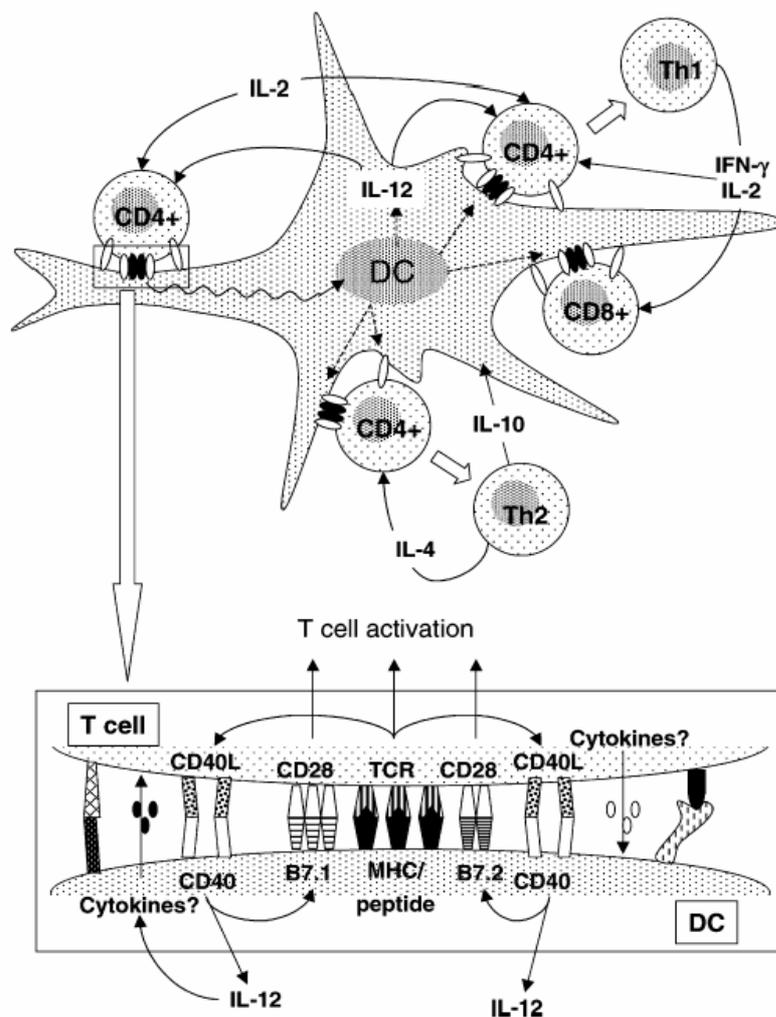


Abb. 1.1: Interaktion zwischen reifer Dendritischer Zelle und T-Zelle. Dendritische Zellen präsentieren die aufgenommenen und prozessierten Peptide auf MHC-Klasse I/II Molekülen den T-Zellen. Weitere adhäsive, costimulatorische und akzessorische Wechselwirkungen stabilisieren die immunologische Synapse und ermöglichen die T-Zell-Aktivierung. Modifiziert nach [59].

Ruhende T-Zellen exprimieren nur einen niedrigaffinen IL-2-Rezeptor (IL-2R), der aus einer β - und einer γ -Kette besteht. Nach Erkennung eines MHC/Peptid-Komplexes durch den TCR führt die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 zur Expression der α -Untereinheit (CD25) des IL-2R, wodurch ein hochaffiner $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptor entsteht. Das gleichzeitig von den aktivierten T-Zellen produzierte IL-2 führt dann zur klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Zellen [18].

CD80 und CD86 auf DC können auch mit CD152 (CTLA-4) auf den T-Zellen interagieren, das im Gegensatz zu CD28 aber erst nach Aktivierung der T-Zellen exprimiert wird. Diese Interaktion ist Teil eines negativen Regulationskreislaufes, der nach erfolgter Aktivierung, Differenzierung und Expansion ein Überschießen der T-Zell-Antwort unterbindet [52].

1.4.3 Ex vivo Generierung Dendritischer Zellen

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Initiationsphase der T-Zell-Antwort, sind DC interessante Kandidaten für die Immuntherapie [60, 61]. So können sie eingesetzt werden, um in vitro Tumorantigen-spezifische T-Zellen zu generieren und expandieren, die nach adoptivem Transfer in Patienten in der Effektorphase der T-Zell-Antwort die Tumorzellen abtöten [62, 63]. Alternativ können Patienten mit Tumorantigenen-beladenen DC vakziniert werden mit dem Konzept, dass sowohl Initiationsphase als auch Effektorphase der T-Zell-Antwort im Patienten ablaufen [64]. Beide Ansätze setzen jedoch voraus, dass ausreichende Zellzahlen an DC für die Therapie zur Verfügung stehen.

DC machen nur ca. 0,1% der Leukozyten des Blutes aus [65]. Entsprechend ist es sehr mühsam und aufwändig, die erforderlichen Zellzahlen für die Therapie zu gewinnen [64]. Eine Alternative bieten Zellkulturverfahren, die von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen [66, 67] oder CD14+ Monozyten [26, 27] ausgehend Dendritische Zellen in vitro generieren.

In der Gegenwart von GM-CSF und $\text{TNF}\alpha$ differenzieren hämatopoetische Stammzellen zu Dendritischen Zellen aus [66, 67]. Durch Vorkultur in der Gegenwart von Cytokinen wie Flt3L oder SCF kann dabei die Ausbeute noch deutlich erhöht werden [68]. Nachteile dieses Verfahrens sind die geringere Homogenität der erhaltenen Zellpopulation im Vergleich zur Verwendung von Monozyten als Ausgangspopulation und insbesondere die Erfordernis einer Mobilisierung der CD34+ Zellen aus dem Knochenmark der Patienten ins Blut durch G-CSF Gabe, um

ausreichende CD34+ Zellzahlen aus dem Blut gewinnen zu können [68]. G-CSF Mobilisierung geht mit einer systemischen Polarisierung des Immunsystems hin zu T_H2-Antworten einher, d.h. mit einem Typ Antwort, der für die Immuntherapie von Tumoren nicht wünschenswert ist [69, 70].

Monozyten können in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert werden [26, 27], welche durch zusätzliche Stimuli wie TNF α , IL-1, IL-6 und PGE2 [26, 27, 71, 72] oder anderen Stimuli [73, 74] zu reifen DC ausreifen. Dieses 2-Schritt-Verfahren gestattet die sequentielle Generierung unreifer und reifer Dendritischer Zellen, ein Vorteil, da unreife DC aufgrund ihrer gut entwickelten Antigenaufnahmeaktivität effizient mit Tumorantigenen beladen werden können und reife DC aufgrund ihrer potenten T-Zell-stimulatorischen Aktivität und ihres Migrationsverhaltens die besseren Kandidaten für die Vakzinierung selbst oder die in vitro Generierung von Effektorzellen sind. Die Frequenz von Monozyten im peripheren Blut liegt bei 2,5-10%, in Leukapheresepräparaten bei ca. 25% [75], so dass ausreichende Zellzahlen effizient durch Adhärenz [73, 76], Elutriation [77], positive CD14+ [78, 79] oder negative immunmagnetische Selektion [80] gewonnen werden können. Eigenschaften solcher in vitro differenzierter unreifer und reifer Dendritischer Zellen sind entsprechend:

- fehlende Expression von CD14 und CD83 bei gleichzeitiger Expression von CD11c und effizienter Antigenaufnahmeaktivität für unreife DC
- fehlende Expression von CD14 bei gleichzeitiger Expression von CD83 und potenter T-Zell-stimulatorischer Aktivität für reife DC

Beide Reifungsstadien sollten eine Expression von CD40, CD50, CD54, CD58, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-ABC zeigen, die auf reifen DC stärker ausgeprägt sein sollte. Reife DC sollten darüber hinaus IL-12 und CCR7 exprimieren, eine typische Morphologie besitzen und HLA-DR Moleküle aus dem lysosomalen Kompartiment an die Zelloberfläche transloziert haben, um von authentischen DC ausgehen zu können.

1.5 Tumor und Immunsystem

Durch die genetische Instabilität von Tumorzellen entstehen kontinuierlich Veränderungen [81, 82], die zur Überexpression, ektopischen Expression, Reexpression oder zur Expression strukturell veränderter Proteine führen, sogenannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA), die es dem Immunsystem gestatten, die Tumorzellen selektiv zu erkennen und so entartete von normalen Körperzellen zu unterscheiden. Mit MAGE-1 in Melanomzellen wurde 1991 das erste solche TAA molekularbiologisch identifiziert und nachgewiesen, dass Peptide dieses Proteins von CTL erkannt und die entsprechenden Targetzellen lysiert werden können [83]. Inzwischen wurden zahlreiche solcher TAA für die unterschiedlichsten Tumorentitäten beschrieben [84]. Es handelt sich generell um (1) durch Mutationen veränderte Proteine, (2) virale Proteine, (3) überexprimierte Proteine und (4) aberrant modifizierte Proteine (z.B. veränderte Glykosylierung) sowie um Proteine, die eine (5) zeitlich (z.B. Reaktivierung im Adulten von normalerweise nicht exprimierten Entwicklungsgenen) oder (6) örtlich veränderte Expression (z.B. Proteine, die normalerweise nur in immunprivilegierten Geweben exprimiert werden wie die sogenannten Cancer-Testis-Antigene) aufweisen.

Wahrscheinlich exprimiert jede Tumorzelle solche TAA und ist somit zumindest potentiell immunogen. Da das progressive Tumorwachstum und die damit verbundene Invasion benachbarter Gewebe auch zu Veränderungen wie lokalem Zelltod und im Cytokinmilieu führen, liegen vermutlich auch Danger-Signale vor, die zur Aktivierung Dendritischer Zellen und Induktion einer gegen die TAA-gerichteten Immunantwort führen. Tatsächlich scheint es auch eine Immunüberwachung von Tumoren zu geben, denn Rekombinase-defiziente Mäuse [85], d.h. Mäuse ohne funktionelle B- und T-Zellen, zeigen eine signifikant erhöhte Inzidenz spontaner wie auch chemisch induzierter Tumoren. Darüber hinaus wurde in analogen Untersuchungen an TCR-defizienten Mäusen eine Beteiligung von T-Zellen als Effektorzellen nachgewiesen [86] und als weitere beteiligte Zellpopulation wurden NK-Zellen identifiziert [87].

Die gleichen Mechanismen, die für die Immunogenität von Tumorzellen durch die Generierung von Neoantigenen verantwortlich sind, sind vermutlich aber auch an einem als Immuneditierung bezeichneten Phänomen beteiligt [88-90]: während der Tumorprogression unterliegen Tumorzellen kontinuierlich einer Überwachung durch das Immunsystem, die zur Beseitigung neoplastischer Zellen führt. Im Tumor treten

jedoch spontan Varianten auf, die sich dieser Überwachung zu entziehen vermögen. Dem Immunsystem kann es nun immer wieder gelingen, sich zu adaptieren und auch die Varianten zu beseitigen. Für diesen Fall entwickelt sich ein Gleichgewicht zwischen Tumorprogression und immunologisch induzierter Tumorregression. Der Tumor wird dabei fortschreitend immer besser an das Immunsystem angepasst, ein Vorgang, den man auch als Immuneditierung der Tumorzellen bezeichnet. Irgendwann wird dieses Gleichgewicht jedoch kippen und entweder werden alle Tumorzellen beseitigt, d.h. der Tumor kann sich dem Immunsystem nicht mehr entziehen, oder dem Immunsystem gelingt es nicht mehr, sich auf eine Variante einzustellen, was zum Auswachsen des Tumors führt (Abb. 1.2).

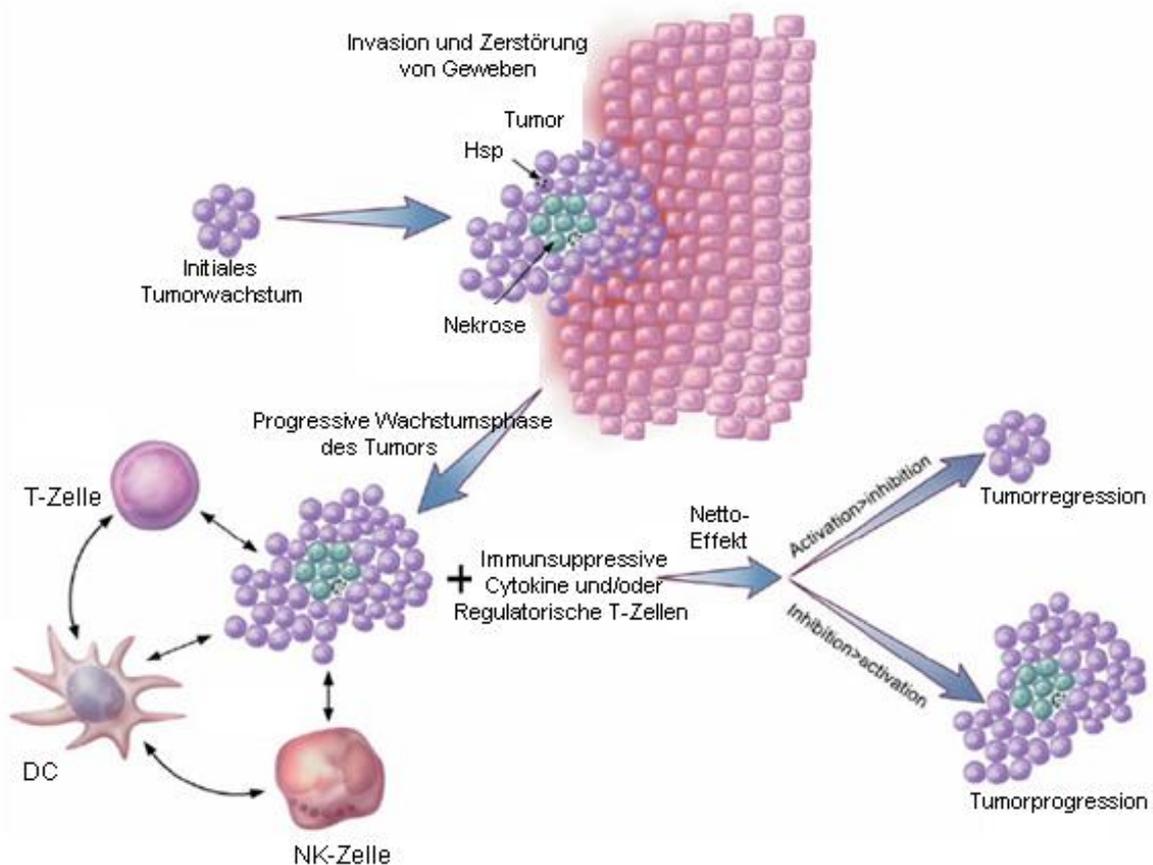


Abb. 1.2: Immunüberwachung von Tumoren. Tumorzellen exprimieren Neoantigene (TAA), die vom Immunsystem erkannt werden können. Während des progressiven Wachstums der Tumorzellen treten massive Veränderungen auf (Apoptose, Nekrose, Freisetzung von Stressproteinen (Hitzeschockproteine - Hsp), intermediäre Sauerstoffradikale (ROS), die von DC als Danger-Signale interpretiert werden und ihre Ausreifung induzieren. Die DC wandern zu den Lymphknoten, wo sie als reife Zellen die TAA den T-Zellen präsentieren und TAA-Peptid-spezifische T-Zellen aktivieren, welche die Tumorzellen zu beseitigen vermögen. Die Tumorzellen andererseits verfügen über Immune Escape Strategien wie die Expression immunsuppressiver Cytokine (z.B. VEGF, TGF β und IL-10), die sowohl die T-Zellen als auch die DC beeinträchtigen. (modifiziert nach [91, 92]).

Die Mechanismen, die Tumorzellen nutzen, um sich einer Immunantwort zu entziehen, werden als Immune Escape Mechanismen bezeichnet. Hierzu zählt der Verlust der MHC-Klasse I Expression, was verhindert, dass die Tumorzellen durch CTL erkannt und lysiert werden können [93]. Da solche MHC-Klasse I negativen Tumorzellen jedoch zu einem Target von NK-Zellen würden, die auf die Detektion und Eliminierung von MHC-Klasse I negativen Zellen spezialisiert sind, zeigt, dass die Tumorzellen noch über weitere Strategien verfügen müssen, um sich auch der NK-Antwort zu entziehen. Tatsächlich können Tumorzellen nahezu jeden Schritt einer Immunantwort beeinflussen [94, 95]:

- Toleranz/Ignoranz: Tumorzellen können während der frühen Wachstumsphase als ‚normales‘ Gewebe erscheinen, so dass TAA-erkennende T-Zellen im Rahmen der Aufrechterhaltung von Toleranz eliminiert werden bzw. es zu einer Ausbildung TAA-spezifischer regulatorischer T-Zellen kommt [91, 96] und der Tumor immunologisch ignoriert wird.
- Fehlende Antigenpräsentation: Sowohl die MHC-Gene selbst als auch Komponenten der Prozessierungs- und Beladungsmaschinerie (Proteasom, TAP) können in Tumorzellen verändert sein, so dass die MHC-Präsentation von Peptiden unterbleibt [97, 98]. Eine Herunterregulation oder Veränderung des TAA (Antigenverlustvarianten), führt ebenfalls zu keiner produktiven Antigenpräsentation [99]
- Resistenz gegenüber Effektormechanismen (Apoptoseresistenz) durch reduzierte oder fehlende Expression von Fas [100, 101], verstärkte Expression des FADD/FLICE-Inhibitors FLIP und damit Inhibition der Signalkaskade, welche zur Apoptose führt [102, 103], Bildung von löslichem Fas [104] und Expression von Fas-Decoy-Rezeptoren (DecR3), welche an FasL binden, aber kein Apoptosesignal vermitteln [105].
- Abtöten von T-Effektorzellen NK-Zellen durch FasL [106, 107].
- Expression von immunsupprimierenden und immunmodulierenden Cytokinen und Faktoren. Für maligne Gliome wurde die Expression von PGE₂ [108, 109], IL-6 [110], IL-10 [111, 112], VEGF [113, 114], und TGFβ [115] sowie von Hyaluronan [116] nachgewiesen, d.h. von Cytokinen und Faktoren, welche mit der Aktivierung und Funktion Dendritischer Zellen interferieren [117], die T-Zell-Aktivierung und Expansion blockieren [118] oder die Effektorantwort umleiten [109] und vermutlich

zu der beim Glioblastom beschriebenen lokalen und systemischen Immunsuppression beitragen [119, 120].

1.6 Vakzinierung mit Dendritischen Zellen gegen Gliome

Gehirn und Rückenmark enthalten neben den eigentlichen Nervenzellen verschiedene Formen von Stützzellen (Gliazellen): die Astrozyten, die Oligodendrozyten und die Ependymzellen [121]. Gehirntumoren gehen am häufigsten von Gliazellen aus. Je nach zellulärem Ursprung werden die Gliome als Astrozytome, Oligodendrogliome, Mischgliome (aus Astrozyten und Oligodendrozyten) und Ependymome bezeichnet. Je nach Malignität werden Grad I-IV Tumoren unterschieden. Interessanterweise entstehen die wenigsten Gehirntumoren aus den Nervenzellen (Neuronen) selbst, was vermutlich daher kommt, dass sie sich als terminal differenzierte Zellen nicht mehr teilen.

Die meisten Gehirntumoren haben eine astrozytäre Komponente. Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste und bösartigste astrozytäre Tumor. Glioblastome machen mehr als die Hälfte aller Gliome aus und treten bevorzugt im Großhirn bei Erwachsenen auf. Unbehandelt führt ein Glioblastom innerhalb weniger Wochen zum Tode. In der Regel wird der Primärtumor zunächst unvollständig operativ entfernt. Da die Tumorzellen in normales, funktionsfähiges Gehirngewebe infiltrieren, ist eine komplette Entfernung und damit eine rein operative Behandlung der Patienten nicht möglich. Daher werden die Patienten im Anschluss durch lokale Strahlentherapie und Chemotherapie behandelt. Mit dem derzeit eingesetzten Protokoll, der Kombination von Strahlentherapie und Temozolomid-Chemotherapie wird jedoch nur ein medianes Überleben von 14,6 Monaten bei einem medianen progressionsfreien Überleben von 6,9 Monaten und einer 2-Jahresüberlebensrate von 26,5% erreicht [122]. Deshalb sind neue Therapien beim Glioblastom dringend erforderlich.

Die Vakzinierungstherapie mit Dendritischen Zellen (s.1.4.3) könnte eine solche Therapie darstellen. Mit EGFRvIII [123], gp240 [124], Tenascin [125], Survivin [126], SART1 [127], IL-13R α 2 [128], TRP1 und 2, gp100 sowie MAGE-1 und MAGE-3 [129] wurden bereits Kandidaten-TAA identifiziert. Die ersten Ergebnisse von klinischen Studien bei denen jedoch nicht definierte einzelne Peptide von TAA zum Einsatz kamen, sondern Tumorzelllysate [130-134], Peptideluat [135, 136] oder Fusionsprodukte [137, 138] aus DC und Tumorzellen, sind vielversprechend. Sie zeigten nicht nur die Sicherheit dieses Ansatzes – es wurden keine

schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet - sondern konnten auch ein immunologisches und in einigen Patienten sogar ein klinisches Ansprechen und ein verlängertes Überleben beobachten, wenn auch natürlich die Wirksamkeit der Vakzinierung nicht abschließend geklärt werden konnte.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Dissertation sollte untersucht werden:

- (1) ob die Tumorerkrankung oder die Vortherapie von Gliompatienten systemische Auswirkungen auf das Immunsystem haben, welche die Differenzierung, Ausreifung und Funktion Dendritischer Zellen bzw. die Wirksamkeit einer Vakzinierungstherapie beeinflussen könnten.
- (2) ob Gliomzellen Faktoren produzieren, welche mit der Differenzierung, Ausreifung und Funktion Dendritischer Zellen sowie der Induktion einer T-Zell-Antwort interferieren.

2. Material und Methoden

2.1 Venöses Blut von Gliompatienten und gesunden Probanden

Die Abnahme von venösem Blut erfolgte in Kooperation mit der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) mit dem Einverständnis der Spender. ACD (Acidum Citricum/Dextrose) diente als Antikoagulanzen. Die Charakterisierung der Gliompatienten ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

2.2 Gewinnung von Nabelschnurblut

Die Gewinnung von Nabelschnurblut erfolgte wie beschrieben [139, 140] mit dem Einverständnis der Mutter in einem der am Düsseldorfer Programm zur unverwandten Nabelschnurblutspende und -kryokonservierung beteiligten Abnahmezentren durch speziell geschulte Hebammen. Nach der Geburt, mit der Plazenta noch in utero, wurde die Nabelschnur abgeklemmt, desinfiziert, die Vene punktiert und das Nabelschnurblut (CB) in Entnahmebeutel (MacoPharma; Tourcoing, Frankreich) mit CPD (Citrat/Phosphat/Dextrose) als Antikoagulanzen abgenommen. Nabelschnurblutpräparate wurden innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt aufgearbeitet und bis dahin bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Alle für die Untersuchungen eingesetzten Nabelschnurblutpräparate genügten den Einschlusskriterien des Düsseldorfer Nabelschnurblutprogramms nicht. Die hämatologischen Parameter der verwendeten Nabelschnurblutpräparate sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

2.3 Präparation von nekrotischem Tumorgewebe

Tumormaterial von Gliompatienten wurde während der Tumorresektion durch die Neurochirurgische Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf gewonnen und innerhalb einer Stunde nach Entnahme aufgearbeitet. Das Gewebe wurde hierzu mechanisch mit einem Skalpell (Feather/pfm; Köln) zerkleinert und in 0,9% NaCl-Lösung (BBraun; Melsungen) aufgenommen. Anschließend wurden die Tumorzellen 30min bei 56°C im Wasserbad inkubiert und durch drei Einfrier- (flüssiger Stickstoff) und Auftau-Zyklen (56°C) abgetötet. Um sicherzustellen, dass alle Zellen tot waren, wurde die Vitalität durch Trypanblau-Färbung ermittelt. Hierzu wurde ein 10µl-Aliquot der Tumorgewebesuspension abgenommen, mit 10µl Trypanblau-Lösung (0,4%; Sigma-Aldrich; Seelze) versetzt und mikroskopisch ausgewertet.

2.4 Monoklonale Antikörper

Die für die Untersuchungen eingesetzten Antikörper und die jeweilige Bezugsquelle sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

2.5 Medien und Cytokine

Alle verwendeten Cytokine, Zellkulturmedien und Supplemente mit Bezugsquellen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

2.6 Zellpräparationen

2.6.1 Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) aus Blut

Zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion aus dem venösen Blut von Patienten und gesunden Probanden sowie aus Nabelschnurblut wurden 15ml Ficoll (1,077g/cm³; Biochrom; Berlin) in 50ml Röhrchen (Falcon/BD Biosciences; Heidelberg) vorsichtig mit Blut überschichtet und zentrifugiert (850g, 20min, 20°C, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation konnten die mononukleären Zellen aus der intermediären Schicht zwischen Plasma und Ficoll abgenommen werden. Die MNC wurden anschließend in Phosphat-gepufferter Saline (PBS - Phosphate Buffered Saline; Serag-Wiessner; Neila) gewaschen (550g, 10min, 4°C). Das Zellsediment wurde in 25ml Ammoniumchlorid-Lösung (8,3g/l NH₄Cl, 1g/l KHCO₃, 0,0375g/l EDTA) aufgenommen und für 5-10min bei 4°C inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde das Zellsediment bis zur weiteren Verwendung in 0,5% HSA/PBS (humanes Serumalbumin; Octapharma; Langenfeld oder Sanofi-Aventis; Frankfurt) aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt oder eingefroren.

2.6.2 Anreicherung von CD14+ Monozyten

Monozyten wurden aus der mononukleären Zellfraktion immunmagnetisch als CD14+ Zellen gewonnen [75]. Hierzu wurden die MNC mit 0,5% HSA/PBS auf 1x10⁸Zellen/ml eingestellt und mit einem anti-CD14 mAb markiert (1µl/10⁶ Zellen; 15min, 4°C). Nach einem Waschschriff mit 0,5% HSA/PBS (550g, 7min, 4°C) wurden die Zellen mit einem mit magnetischen Mikropartikeln gekoppelten Ziege-anti-Maus-Immunglobulin mAb (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach) markiert (2µl/10⁶ Zellen; 15min, 4°C) und anschließend direkt über eine LS-Säule an einem VarioMACS (Miltenyi Biotec) separiert. Nach dem Auftragen der markierten MNC auf die Säule

wurde durch dreimaliges Spülen mit 3ml 0,5% HSA/PBS die CD14- Fraktion entfernt. Abschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld des VarioMACS genommen, die CD14+ Zellen mit 5ml 0,5% HSA/PBS eluiert und vor ihrer weiteren Verwendung mit 0,5% HSA/PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C).

2.6.3 Anreicherung von T-Zellen aus Nabelschnurblut

T-Zellen wurden aus den mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes durch negative immunmagnetische Selektion (untouched) gewonnen [75]. Hierzu wurden die MNC mit 0,5% HSA/PBS auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt und mit mAb spezifisch für die CD11b, CD14, CD16, CD19, CD34, CD56, CD66b, CD235a und HLA-DR Antigene markiert (jeweils $1 \mu\text{l}/10^6$ Zellen; 15min, 4°C). Nach einem Waschschrift mit 0,5% HSA/PBS (550g, 7min, 4°C) wurden die Zellen mit einem mit magnetischen Mikropartikeln gekoppelten Ziege-anti-Maus-Immunglobulin mAb markiert ($2 \mu\text{l}/10^6$ Zellen; 15min, 4°C) und anschließend direkt über eine CS-Säule an einem VarioMACS separiert. Nach dem Auftragen der markierten MNC auf die Säule wurde die negative Fraktion (=angereicherte T-Zellen) durch dreimaliges Spülen mit 3ml 0,5% HSA/PBS eluiert und vor ihrer weiteren Verwendung mit 0,5% HSA/PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C). In der T-Zell-angereicherten Zellfraktion lag der Anteil an CD3+ T-Zellen bei $95.0 \pm 1,1\%$ (n=14).

2.6.4 Gewinnung von NK-Zellen aus Nabelschnurblut

NK-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Markus Uhrberg (ITZ) zur Verfügung gestellt. Die NK-Zellen wurden mit dem NK-Zell Isolierungskit II (untouched; Miltenyi Biotec) als CD3-, CD4-, CD14-, CD15-, CD19-, CD36-, CD123- und CD235a- Zellen aus mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes oder venösen Blutes angereichert. Anschließend wurden die Zellen durch Kultur in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 5% humanem Serum, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100µg/ml Streptomycin, 100U/ml Penicillin und 1000U/ml IL-2 in der Gegenwart bestrahlter (50Gy), autologer MNC sowie 721.221 Zellen als Feeder bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre stimuliert. Nach 2 Wochen wurden die NK-Zellen im gleichen Medium jedoch in der Abwesenheit von Feederzellen weiter kultiviert und innerhalb der nächsten 2 Monate als Responder-Zellen verwendet.

2.7 Gewinnung von Plasma

Nach der Ficoll-Gradienten-Zentrifugation (s. 2.6.1) wurde das Plasma in 50ml Röhrrchen abgenommen und zelluläre und feste Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert (1880g, 15min. 20°C, ohne Bremse). Im Anschluss wurde das Plasma für 30min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und erneut die festen Bestandteile sedimentiert. Abschließend wurde das Plasma sterilfiltriert (0,2µm-Filter; Sartorius; Göttingen) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in 2ml Kryoröhrrchen (Greiner; Nürtingen) gelagert.

2.8 Tumorzelllinien und Generierung konditionierter Medien

Die für die Untersuchungen verwendeten Gliomzelllinien U373 (ATCC HTB-17) und A172 (ATCC CRL-1620) wurden freundlicherweise von PD Dr. Michael Sabel (Neurochirurgische Klinik des UKD) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in T75 oder T225 Zellkulturflaschen (Costar/Corning; Wiesbaden) kultiviert. Bei ca. 80-90% Konfluenz wurden die adhären wachsenden Kulturen passagiert (1:2-3 Aufteilung). Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen, die Flaschen einmal mit PBS gespült und dann mit 0,25% Trypsin/PBS (Cambrex, Verviers, Belgien) versetzt. Nach 5-10minütiger Inkubation (mikroskopische Kontrolle) bei 37°C wurden die sich ablösenden Zellen abgeschlagen und in ein 50ml Röhrrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit PBS gespült und HSA (Endkonzentration 2%) zu den abgelösten Zellen zugegeben. Nach einem Waschschrift (550g, 7 min, 4°C) wurde das Zellsediment in Kulturmedium aufgenommen, auf Zellkulturflaschen verteilt und weiter kultiviert oder die Zellen wurden eingefroren.

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurde dieses von 80-90% konfluenten Kulturen abgenommen, sterilfiltriert (0,2µm Filter) und bis zur Verwendung bei -30°C gelagert.

Um eine mögliche Kontamination der Zellen mit Mycoplasmen auszuschließen, wurden beide Linien mit dem Mycoplasma VenorGeM PCR-Kit (Minerva Biolabs; Berlin) untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit PBS auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 5min bei 99°C inkubiert. Nicht-lösliche Bestandteile wurden sedimentiert

(14000rpm, 1min, RT) und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf; Hamburg) überführt.

Folgender PCR-Master-Mix wurde pro Ansatz vorbereitet:

| | |
|------------------------|--------|
| Bidestilliertes Wasser | 30,8µl |
| 10x Puffer | 5µl |
| Primer/Nukleotid-Mix | 10µl |
| Interne Kontrolle | 2µl |
| Taq-Polymerase | 0,2µl |

Nach guter Durchmischung wurden 48µl PCR-Master-Mix pro PCR-Reaktionsgefäß (Costar/Corning) vorgelegt und mit jeweils 2µl Probe, Positivkontrolle (Kit) oder bidestilliertem Wasser (Negativkontrolle) versetzt. Die Amplifikationsbedingungen in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems; Darmstadt) waren wie folgt:

| | |
|-----------|-----------|
| 1 Zyklus | 2min 94°C |
| 35 Zyklen | 30s 94°C |
| | 30s 55°C |
| | 30s 72°C |
| 1 Zyklus | 5min 72°C |

Danach wurde auf 4°C abgekühlt und die Temperatur bis zur Entnahme der Probenröhrchen gehalten. 15µl jedes PCR-Ansatzes wurden mit 1,5µl Gelladepuffer (Invitrogen; Karlsruhe) gemischt, auf ein 1,5% Agarosegel (peqLab; Erlangen) mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid (Roth; Karlsruhe) aufgetragen und mit 1x TBE als Laufpuffer (Roth) bei 100V separiert. Als Größenmarker wurde 1µg der 100-Basenpaar-Leiter (Invitrogen) verwendet. Die interne Kontrolle resultiert in einer Bande von 191 Basenpaaren, Mycoplasmen-spezifische Banden variieren zwischen 265 und 278 Basenpaaren. Beide Zelllinien waren negativ für Mycoplasmen (Fig. 2.1).

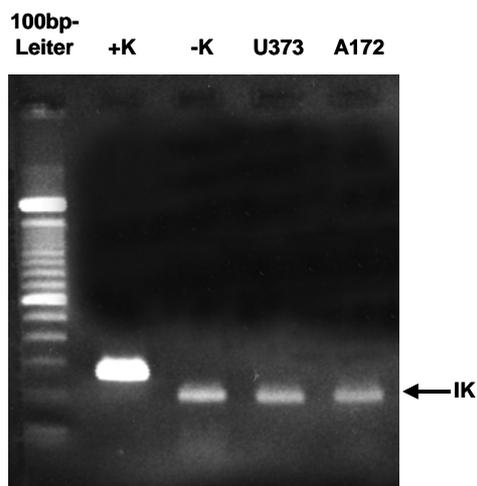


Abb. 2.1: Mycoplasmen-PCR Analyse der Zelllinien U373 und A172. +K: Positivkontrolle, -K: Negativkontrolle, IK: Interne Kontrolle.

2.9 Bestimmung von Zellzahlen

Zellzahlen und Differenzialblutbilder wurden mit einem Cell-Dyn 3500 Blutzellanalysator (Abbott; Wiesbaden) erhoben, wobei die ‚Extended Red Blood Cell Lysis‘ Einstellung benutzt wurde. Für angereicherte Zellpopulationen und Zellen nach *in vitro* Kultur wurde die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Hierzu wurden 10µl einer Zellsuspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert, 10µl Trypanblau-Lösung zugegeben und die Anzahl lebender (ungefärbt) und toter (blaugefärbt) Zellen in einer Neubauerzählkammer mikroskopisch ermittelt.

2.10 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden sedimentiert (550g, 7min, 4°C). Das Zellsediment wurde in 0,5ml eiskaltem 8% HSA/RPMI-1640 je einzufrierender Ampulle aufgenommen und auf 2ml Kryoröhrchen verteilt. Nach Zugabe von 0,5ml/Ampulle 22% DMSO/RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) wurden die Kryoröhrchen direkt bei -80°C eingefroren. Für eine längere Aufbewahrung (>6 Monate) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C Wasserbad angetaut, 1:2 mit 8% HSA/RPMI-1640 verdünnt und in 15ml Röhrchen (Greiner) mit 2ml 8% HSA/RPMI-1640 je Ampulle überführt. Nach kurzer Inkubation bei RT wurde mit 0,5% HSA/PBS aufgefüllt und die Zellen sedimentiert (550g, 7min, RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen für die jeweiligen Untersuchungen verwendet.

2.11 Immunmarkierung und Durchflusszytometrie

Für die direkte durchflusszytometrische Analyse von Zellen in venösem Blut wurde zunächst eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Für jede anzusetzende Färbung wurden 150µl Blut in ein 15ml Röhrchen pipettiert, mit Ammoniumchlorid-Lösung aufgefüllt, 10min bei 4°C inkubiert und die Zellen sedimentiert (550g, 7min, 4°C). Das Zellsediment wurde in 100µl 0,5% HSA/PBS je anzusetzender Färbung resuspendiert.

Für die Immunmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten (FITC – Fluoresceinisothiocyanat oder PE – Phycoerythrin) mAb wurden 100µl Zellsuspension in 5ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen (BD Biosciences) überführt und mit den Antikörperkonjugaten versetzt. Nach 15min bei 4°C wurde mit PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C) und die Zellen an einem EPICS-XL-MCL (Beckman-Coulter, Krefeld) oder FACS-Calibur (BD Biosciences) Durchflusszytometer analysiert. Bei der Verwendung unkonjugierter mAb wurde zunächst eine Einzelfärbung mit dem unkonjugierten mAb wie oben beschrieben durchgeführt. Nach dem Waschschrift mit PBS wurde der gebundene Antikörper dann durch Anfärbung mit einem Zweitantikörper (FITC- oder PE-konjugierter Ziege-anti-Maus-Ig Antikörper) detektiert. Sollte diese indirekte Färbung mit einem weiteren direkt konjugierten mAb kombiniert werden, wurden nach einem Waschschrift mit PBS 25µl 10% Mausserum (Sigma-Aldrich) zugegeben und 5min bei RT inkubiert, um die Bindungsstellen des Zweitantikörpers abzusättigen und dann mit einem entsprechend konjugierten mAb angefärbt. Für alle Färbungen dienten entsprechend konjugierte bzw. unkonjugierte Isotypkontrollen als Kontrollen.

2.12 Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten

Die Differenzierung von CD14+ Monozyten zu Dendritischen Zellen wurde modifiziert nach einem Protokoll von Zhou & Tedder [71] durchgeführt. Monozyten (1×10^6 Zellen/ml) wurden entweder unter serumfreien Bedingungen (CellGroDC-Medium) oder in mit 1,5% autologem Plasma supplementiertem X-Vivo 15 Medium in der Gegenwart von 1000U/ml GM-CSF und 1000U/ml (10ng/ml) IL-4 in 24-Well-Platten (2ml/Well; Greiner) innerhalb von 6 Tagen zu unreifen Dendritischen Zellen differenziert. Nach 3 Tagen Kultur wurde 1ml vorsichtig abgenommen und durch frisches Medium mit Cytokinen ersetzt. Nach 6 Tagen Kultur folgte die Ausreifungsphase. Abermals wurde 1ml Kulturmedium abgenommen und durch 1ml

frisches Medium ersetzt, das nun neben GM-CSF und IL-4 auch $\text{TNF}\alpha$ (Endkonzentration 10ng/ml) enthielt. Unreife Dendritische Zellen wurden nach 6 Tagen, reife Dendritische Zellen nach 9 Tagen geerntet und analysiert. Für manche Experimente wurde zusätzlich bereits nach 3 Tagen eine Probe genommen.

Um Effekte der konditionierten Medien auf die Differenzierung und Ausreifung der Dendritischen Zellen zu untersuchen, wurde den Kulturen von Beginn an sowie an den Tagen 3 und 6 (Mediumwechsel) unterschiedliche Mengen an konditioniertem Medium (10, 20 und 40%) der Gliomzelllinien A172 und U373 bzw. die entsprechende Menge an RPMI-1640 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (Kulturmedium der Linien - Negativkontrolle) zugegeben.

In Neutralisierungsstudien wurden den Kulturen von Beginn an sowie an den Tagen 3 und 6 (Mediumwechsel) neutralisierende Antikörper spezifisch für $\text{TGF}\beta$, VEGF und IL-6 (Endkonzentration jeweils 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben.

2.13 Pinozytose- und Phagozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen

Für den Nachweis der aktiven Pinozytose wurden unreife Dendritische Zellen für 15min bei 4°C (Negativkontrolle) oder 37°C in 0,5% HSA/PBS in 5ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen in einem Volumen von 100 μl äquilibriert. Dann wurde FITC-konjugiertes BSA (Bovine Serum Albumin; Molecular Probes/Invitrogen) zugegeben (Endkonzentrationen 0,01-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nach 60min Inkubation bei 4°C bzw. 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C), mit 0,5% Formaldehyd/PBS (Merck; Darmstadt) fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Maß für die Pinozytose-Aktivität wurde die mittlere Fluoreszenzintensität für die unterschiedlichen Konzentrationen an BSA-FITC bestimmt [75].

Für den Nachweis der phagozytotischen Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen wurden U373 Zellen zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE (Molecular Probes/Invitrogen) markiert. Hierzu wurden die Zellen sedimentiert, das Zellsediment in 0,5 μM CFDA-SE/PBS aufgenommen (10⁶ Zellen/ml) und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (550g, 7min, 4°C) wurden die Zellen für 30min bei 37°C in CGDC-Medium inkubiert, damit ungebundenes CFDA-SE wieder aus der Zelle diffundieren kann. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Markierte U373 Zellen wurden dann in 5ml CGDC-Medium mit unreifen Dendritischen Zellen in einem

Verhältnis von 1:3 (DC:U373) in einem 50ml Röhrchen kokultiviert und nach 2h mikroskopisch ausgewertet.

2.14 Beladung unreifer Dendritischer Zellen mit autologem Tumormaterial

Zur Beladung von unreifen Dendritischen Zellen mit autologem, nekrotischem Tumormaterial wurde das Tumorgewebe wie in 2.3 beschrieben aufgearbeitet. Unreife Dendritische Zellen von Patienten wurden dann für 2h mit dem autologen, nekrotischen Tumormaterial inkubiert, bevor die die Reifung induzierenden Cytokine und frisches Medium zugegeben wurden.

2.15 Anreicherung von Clustern aus Dendritischen Zellen und T-Zellen

Reife Dendritische Zellen wurden im Verhältnis 1:5 mit naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Gln, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin in einem 50ml Röhrchen gemischt und 3h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde 4°C kaltes 50% FCS/RPMI-1640 (1ml) vorsichtig mit der Zellsuspension in einem 2ml Kryoröhrchen 1:1 überschichtet und für 30min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden Einzelzellen und Zelltrümmer in der oberen Phase abgenommen und die DC-T-Zell-Cluster, welche sich in der unteren Phase anreichern, geerntet. Durch Cytospinzentrifugation (5min, 100rpm) wurden die Zellen auf den Objektträger aufgebracht. Nach May-Grünwald-Färbung (Sigma-Aldrich) wurde die Clusterbildung mikroskopisch ausgewertet.

2.16 Induktion und Nachweis proliferativer T-Zell-Antworten

2.16.1 Allostimulatorische Aktivität reifer Dendritischer Zellen

Unterschiedliche Zellzahlen reifer Dendritischer Zellen wurden mit 1×10^5 angereicherten, allogenen, naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut in X-Vivo 15 Medium (200µl/Well) in 96-Well-Rundbodenplatten (Greiner) bei 37°C und 5% CO₂ kokultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Kulturen mit 5'-Brom-2'-Deoxy-Uridin (BrdU; ELISA-Kit; Roche Diagnostics; Mannheim) versetzt (20µl/Well einer 1:100 Verdünnung) und für weiter 16h inkubiert. Dann wurden die Zellen gut resuspendiert, in eine 96-Well-Flachbodenplatte (Greiner) überführt und sedimentiert (200g, 10min, RT). Nach der vorsichtigen Abnahme des Überstandes wurden die Platten für 1h bei 60°C getrocknet, mit 200µl/Well Fix/Denat (Kit) versetzt und 30min bei RT inkubiert. Das Fix/Denat wurde abgegossen, 100µl/Well Peroxidase-konjugierter anti-BrdU

Antikörper (1:100 Verdünnung in Verdünnungspuffer, Kit) zugegeben und 90min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten (Zugabe/Abgießen) mit jeweils 200µl/Well 1x Waschpuffer (Kit) wurden 100µl/Well TMB-Substrat (Kit) zugegeben, 20min bei RT inkubiert, am Rundschtüttler vorsichtig gemischt und die OD660 vs. 490nm an einem Biomek1000 (Beckman-Coulter) gemessen. Alle Tests wurden als Dreifachansätze durchgeführt. Hintergrundwerte wurden von Wells, welche nur Medium enthielten, erhalten.

2.16.2 PHA-Antwort mononukleärer Zellen

Um die Lektinantwort mononukleärer Zellen zu analysieren, wurden 1×10^5 Zellen/Well in einem Volumen von 200µl in 96-Well-Rundbodenplatten in der Gegenwart von 0,5µg/ml Phytohämagglutinin (PHA; Sigma-Aldrich) in X-Vivo 15 Medium für drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und anschließend der BrdU-Einbau (s. 2.15.1) gemessen. Alle Tests wurden als Dreifachansätze durchgeführt.

2.16.3 Mitogene Aktivität gliomzellkonditionierter Medien

Um die mitogene Aktivität von U373- oder A172-konditioniertem Medium zu bestimmen, wurden 1×10^5 naive T-Zellen aus Nabelschnurblut pro Well in einem Volumen von 200µl in 96-Well-Rundbodenplatten in der Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der konditionierten Medien in X-Vivo 15 Medium kultiviert und nach 3 Tagen der BrdU-Einbau (s. 2.16.1) bestimmt. Das nicht-konditionierte Kulturmedium der Gliomzelllinien diente als Kontrolle. Alle Tests wurden als Dreifachansätze durchgeführt.

2.16.4 Tumormaterial-spezifische T-Zell-Antwort

Unreife Dendritische Zellen wurden wie unter 2.14 beschrieben mit autologem Tumormaterial beladen und ausgereift. Die beladenen reifen DC (3×10^5) wurden dann mit 1×10^6 autologen T-Zellen in 24-Well-Platten in X-Vivo 15 Medium für 12 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kokultiviert. Erst am dritten Tag des Kulturverlaufs wurde IL-2 (50ng/ml) zugegeben. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium mit IL-2 ersetzt. Nach 12 Tagen wurden die Zellen geerntet und einmal mit 0,5% HSA/PBS gewaschen. 1×10^5 dieser Zellen wurden mit 5×10^3 Tumormaterial-beladenen oder unbeladenen (Kontrolle) reifen Dendritischen Zellen in 96-Well-Rundbodenplatten in X-Vivo 15 Medium kokultiviert und nach 5 Tagen

wurde der BrdU-Einbau bestimmt (s. 2.16.1). Alle Tests wurden als Dreifachansätze durchgeführt.

2.17 Induktion und Nachweis der Cytokinexpression durch T-Zellen

2.17.1 Allostimulatorische Aktivität reifer Dendritischer Zellen

Das Vorgehen zum Nachweis einer durch reife Dendritische Zellen induzierten Cytokinexpression in allogenen, naiven T-Zellen orientierte sich an der Arbeit von Rissoan et al. [24]. Reife Dendritische Zellen (5×10^4) und 1×10^5 T-Zellen wurden in einer 96-Well-Rundbodenplatte in einem Volumen von 200 μ l für 5 Tage in X-Vivo 15 Medium bei 37°C und 5% CO₂ kokultiviert. Die Restimulation der so allogenen vorstimulierten T-Zellen erfolgte in einer 24-Well-Flachbodenplatte mit unbehandelter Oberfläche (Falcon/BD Biosciences), die über Nacht bei 4°C mit anti-CD3 (5 μ g/ml in PBS) und anti-CD28 (5 μ g/ml in PBS) mAb (400 μ l/Well) beschichtet worden war. Nach der Beschichtung wurden die Wells zweimal mit 2ml 0,5% HSA/PBS und einmal mit 2ml X-Vivo 15 Medium gespült. Die Zellen wurden aus der 96-Well-Rundbodenplatte geerntet, mit 0,5% HSA/PBS gewaschen (550g, 7min, RT), in 2ml/Well X-Vivo 15 Medium aufgenommen und in die beschichtete 24-Well-Platte gegeben. Nach 2h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde den Kulturen GolgiStop (BD Biosciences) zugegeben, um die Sekretion von Cytokinen zu unterbinden, und für weitere 2h inkubiert. Dann wurden die Zellen aus den Wells geerntet, einmal mit 0,5% HSA/PBS gewaschen, in 0,1ml/Färbung 0,5% HSA/PBS aufgenommen und auf 5ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen verteilt. Je Röhrchen wurden 500 μ l Fixans (Fix/Perm-Kit, BD Biosciences) zugegeben und 20min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer (Kit) wurde das Zellsediment in 100 μ l Waschpuffer aufgenommen, die jeweiligen mAb zugegeben und 20min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.17.2 Cytokine-induzierende Aktivität gliomzellkonditionierter Medien

Naive T-Zellen aus Nabelschnurblut (1×10^5 /Well; 200 μ l/Well) wurden in der Gegenwart oder Abwesenheit von U373- oder A172-konditioniertem Medium in X-Vivo 15 Medium für drei Tage in 96-Well-Rundbodenplatten bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Daran anschließend wurde die Cytokinexpression nach anti-CD3/anti-CD28

Restimulation durch intrazytoplasmatische Färbung und Durchflusszytometrie wie in 2.17.1 beschrieben bestimmt.

2.17.3 Tumormaterial-spezifische T-Zell-Cytokin-Antwort

Unreife Dendritische Zellen wurden wie unter 2.14 beschrieben mit autologem Tumormaterial beladen, ausgereift und wie unter 2.16.4 beschrieben benutzt, um autologe T-Zellen zu stimulieren. Nach Expansion in der Gegenwart von 50ng/ml IL-2 in X-Vivo 15 Medium und spezifischer Restimulation mit autologen, Tumormaterial-beladenen Dendritischen Zellen (2.16.4) wurde die Cytokinexpression nach anti-CD3/anti-CD28 Restimulation durch intrazytoplasmatische Färbung und Durchflusszytometrie (s. 2.17.1) bestimmt.

2.17.4 ELISPOT-Assay

Für den Nachweis der $IFN\gamma$ -Produktion mittels ELISPOT wurden T-Zellen mit Tumorantigen-beladenen (s. 2.14), autologen Dendritischen Zellen stimuliert (s. 2.16.4), in der Gegenwart von IL-2 expandiert (s. 2.16.4) und nach anti-CD3/anti-CD28 Restimulation (2.17.3) analysiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,5% HSA/PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C), in frischem X-Vivo 15 Medium (100 μ l/Well) mit variierenden Zelltitern (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 2×10^5 und 4×10^5 pro 100 μ l) aufgenommen, verteilt und in einer 96-Well-ELISPOT-Platte ($IFN\gamma$ -ELISPOT-Kit; R&D Systems; Wiesbaden) für 20 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zellen und Medium wurden abgenommen und die Platte einmal mit 200 μ l Waschpuffer (Kit) gewaschen. Danach wurden 100 μ l/Well biotinylierte Detektionsantikörper (Kit) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin (100 μ l/Well) zugegeben und für 2h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Detektion durch Zugabe von BCIP/NBT (Kit) und Inkubation für 1h bei RT. Danach wurde die Substratlösung abgenommen, einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Platte bei RT getrocknet. Abschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung.

2.18 NK-Zell-Lyse Dendritischer Zellen

Target-Zellen für die NK-Zell-Lyse (Dendritische Zellen, K562 Leukämiezelllinie – freundlicherweise von PD Dr. M. Uhrberg zur Verfügung gestellt) wurden wie unter 2.13 beschrieben mit CFDA-SE markiert und bei unterschiedlichen Effektor:Target Verhältnissen mit aktivierten, kurzzeitkultivierten NK-Zellen (2.6.4) für 4h bei 37°C

und 5% CO₂ in 5ml Rundbodenröhrchen kokultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,5% HSA/PBS gewaschen (550g, 7min, 4°C) und in jeweils 100µl 0,5% HSA/PBS aufgenommen. Um die toten Zellen anzufärben, wurden die Proben mit Propidiumjodid (Endkonzentration: 10ng/ml; Molecular Probes/Invitrogen) versetzt und für 10min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 0,5% HSA/PBS wurde die Frequenz toter Target-Zellen (CFDA-SE+/PI+) innerhalb der Target-Zell-Population (CFDA-SE+) durchflusszytometrisch ermittelt.

2.19 Nachweis von löslichem CD83

Der Nachweis von löslichem CD83 im konditionierten Medium Dendritischer Zellen durch einen ELISA wurde freundlicherweise wie beschrieben [141] von Dr. B. Hock und Dr. J. McKenzie (Haematology/Immunology Research Group, Christchurch School of Medicine, Christchurch, Neuseeland) durchgeführt.

2.20 Nachweis von Cytokinen in konditionierten Medien

Um verschiedene Cytokine im konditionierten Medium der Gliomzelllinie U373 oder von Dendritischen Zellen nachzuweisen, wurden Cytokin-Arrays (Ray Biotech/Hölzel Diagnostika; Köln) und Luminex-Analysen (BioRad; München und BioSource; Solingen) durchgeführt.

2.20.1 Cytokin-Array

Cytokine im konditionierten Medium der Gliomzelllinie U373 und von reifen Dendritischen Zellen wurden mit einem Human Cytokine Antibody-Array Kit (RayBiotech/Hölzel Diagnostika) nachgewiesen.

Die mit 79 verschiedenen Cytokin-Antikörpern und Kontrollen beschichtete Membran (Kit) wurde für 30min bei RT mit Blockierungspuffer (Kit) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Dann wurde 1ml konditioniertes Medium auf die Membran gegeben und unter leichtem Schütteln für 2h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer-I (Kit) und zweimal mit Waschpuffer-II (Kit) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit Biotin-konjugierten Cytokin-Antikörpern (Kit) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer-I und -II wurde die Membran für 60min mit HRP-konjugiertem Streptavidin (Kit) und nach einem weiteren Waschschrift mit Waschpuffer-I und -II für 5min mit Chemolumineszenz-Detektionpuffer (Kit) bei RT inkubiert. Zur Detektion wurde für 1-

20min auf Röntgenfilme (Kodak; Stuttgart) exponiert und diese in einem Kodakentwickler automatisch entwickelt.

2.20.2 Luminex-Analyse

Die Luminex-Analyse basiert auf einem Festphasen-Sandwich-Immunoassay in Verbindung mit einem Luminex LabScan 100 Analyzer (OneLambda; Canoga Park, USA), der die spektralen Eigenschaften von bis zu 100 verschiedenen Partikeln (\varnothing 5,6 μ m) zu unterscheiden vermag. Sie gestattet die gleichzeitige, quantitative Detektion von bis zu 100 verschiedenen Molekülen. An jeden Partikeltyp ist ein Capture-Antikörper gebunden, der für das jeweils nachzuweisende Molekül spezifisch ist. Die Detektion erfolgt mit einem zweiten spezifischen Set an biotinylierten Antikörpern in Kombination mit PE-konjugiertem Streptavidin.

Konditioniertes Medium der Gliomzelllinien A172 und U373 wurde mit dem Bioplex 8-Plex-Kit (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ , TNF α ; BioRad) und einem 15-Multiplex-Kit (EGF, FGF, GM-CSF, HGF, IFN γ , IL-10, IL-15, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF α , VEGF ; BioSource) untersucht. Alle Angaben beziehen sich auf den Kit von BioRad, Angaben in Klammern auf den Kit von BioSource.

Die 96-Well-Filterplatten wurden mit 100 μ l/Well (200 μ l/Well) Puffer (Kit) beschickt und dieser bei einem Vakuum von 1-2" Hg abgesaugt. Nach dieser Anfeuchtung der Filter wurden 50 μ l/Well (25 μ l/Well) der Partikelsuspension (in Puffer rekonstituiert) zugegeben, die Flüssigkeit abgesaugt und zweimal mit 100 μ l/Well (200 μ l/Well) Puffer gespült. Nun wurden die Cytokinstandards (in Zellkulturmedium rekonstituiert, serielle Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium) und die Proben aufgetragen. Nach 30min (2h) Inkubation bei RT auf einem Rundschtüttler wurde dreimal (zweimal) mit 100 μ l/Well (200 μ l/Well) Puffer gewaschen. Danach wurden 25 μ l/Well (100 μ l/Well) biotinylierte Detektionsantikörper (in Puffer rekonstituiert) zugegeben und 30min (1h) bei RT auf einem Rundschtüttler inkubiert. Nach drei (zwei) Waschschritten mit 100 μ l/Well (200 μ l/Well) Puffer wurden 50 μ l/Well (100 μ l/Well) PE-konjugiertes Streptavidin zugegeben und 30min bei RT auf einem Rundschtüttler inkubiert. Nach zwei (drei) abschließenden Waschschritten wurden die Partikel in 125 μ l/Well (100 μ l/Well) Puffer resuspendiert und mit Hilfe der Bioplex Manager Software an einem LabScan 100 ausgewertet. Mittels der Verdünnungsreihen der Cytokinstandards wurden Eichkurven erstellt und für die um die Mediumwerte

(Negativkontrolle) korrigierten Messwerte der Proben die Cytokinkonzentrationen ermittelt.

2.21 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean) aufgeführt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 3.0 (GraphPad; SanDiego, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Test bzw. dem Student's paired ratio t-Test ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunstatus von Gliompatienten

3.1.1 Zusammensetzung der Leukozyten des Blutes

Um mögliche durch die Tumorerkrankung oder Therapie bedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Leukozyten des Blutes bei Gliompatienten aufzudecken, wurden von 21 Patienten die Frequenzen und Zellzahlen folgender Leukozyten-Subpopulationen bestimmt und mit denen einer Gruppe von 13 gesunden Probanden verglichen: neutrophile Granulozyten, Lymphozyten (weiter unterteilt in CD3+ T-Lymphozyten, CD19+ B-Lymphozyten und CD56+ NK- und NKT-Zellen) sowie Monozyten (CD14+). Außerdem wurden für T-Lymphozyten (CD4, CD8, CD25, CD28, CD45RA, CD45R0, CD56 und HLA-DR) und Monozyten (CD40, CD80, CD86 und HLA-DR) weitere Subpopulationen quantifiziert und die Expression verschiedener immunrelevanter Moleküle verglichen. In den Tabellen 3.1.1-3 sind die Ergebnisse zusammengefasst und in den Abbildungen 3.1.1 bis 3.1.5 grafisch dargestellt.

Der Anteil an neutrophilen Granulozyten war bei Gliompatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($70,7 \pm 2,3\%$ vs. $60,7 \pm 1,9\%$; $p=0,005$), während der Anteil an Lymphozyten bei den Patienten signifikant niedriger war ($19,0 \pm 1,7\%$ vs. $28,6 \pm 1,6\%$; $p<0,001$). Keine signifikanten Unterschiede konnten dagegen in der Frequenz der Monozyten und in der Gesamtleukozytenzahl (WBC – white blood cells) sowie in der Anzahl an neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.1.1A und B).

Eine differenziertere Analyse von Leukozyten-Subpopulationen erfolgte durchflusszytometrisch. Abbildung 3.1.2 zeigt eine repräsentative Dotplot-Analyse der Leukozyten (Abb. 3.1.2A), der T-Lymphozyten (Abb. 3.1.2B) und Monozyten (Abb. 3.1.2C) eines Gliompatienten.

Die Frequenz (Abb. 3.1.3A) und Absolutzellzahl (Abb. 3.1.3B) der CD3+ T-Lymphozyten ($28,9 \pm 2,2\%$ vs. $17,3 \pm 2,6\%$; $p=0,003$ bzw. $2,0 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml vs. $1,3 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml; $p=0,039$) sowie die Frequenz der CD19+ B-Lymphozyten ($4,6 \pm 0,7\%$ vs. $2,4 \pm 0,5\%$; $p=0,011$) waren bei Patienten signifikant niedriger, während die Verteilung der CD56+ NK- und NKT-Zellen und die Absolutzellzahl CD19+ B-Lymphozyten statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und

Kontrollpersonen aufwiesen. Die Frequenz nicht jedoch die Absolutzellzahl der CD14+ Monozyten war dagegen in den Patienten signifikant erhöht ($6,9\pm 0,5\%$ vs. $5,4\pm 0,4\%$; $p=0,028$).

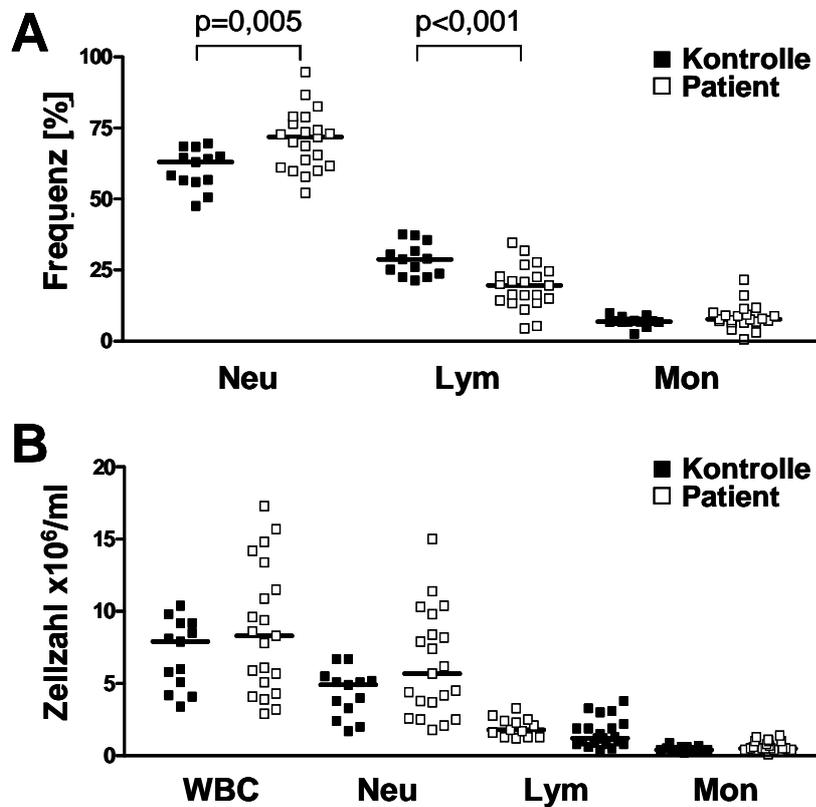


Abb. 3.1.1: Frequenzen (A) und Zellzahl/ml (B) der Leukozyten von Gliompatienten und Kontrollen. Frequenzen und Zellzahlen wurden mittels eines Cell-Dyn 3500 Blutzellanalytators erhoben. Aus der Gesamtleukozytenzahl/ml und der Frequenz wurde die Anzahl/ml der jeweiligen Zellen berechnet. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test geprüft. Medianwerte sind durch eine horizontale Linie angezeigt. WBC – white blood cells (Gesamtleukozyten), Neu – neutrophile Granulozyten, Lym – Lymphozyten, Mon – Monozyten.

Die mittlere Tumorlast der Patienten lag bei $1,9\text{cm}^3$. Wenn der Immunstatus der Patienten mit niedrigerer Tumorlast ($\leq 1,9\text{cm}^3$) mit dem der Patienten mit größerer Tumorlast ($>1,9\text{cm}^3$) verglichen wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der CD3+ T-Lymphozyten, der CD19+ B-Lymphozyten, der CD56+ NK/NKT-Zellen, der CD14+ Monozyten sowie der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Gesamtleukozyten zwischen den beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme der Gesamtleukozytenzahl ($10,5\pm 1,2\times 10^6$ Zellen/ml ($n=11$) vs. $6,7\pm 1,3\times 10^6$ Zellen/ml ($n=10$); $p=0,038$) und der Frequenz CD19+ B-Lymphozyten ($3,5\pm 0,8\%$ ($n=10$) vs. $1,2\pm 0,3\%$ ($n=9$); $p=0,032$) konnten ebenfalls keine signifikanten

Unterschiede zwischen Patienten ohne oder nach Chemotherapie mit Temodal festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

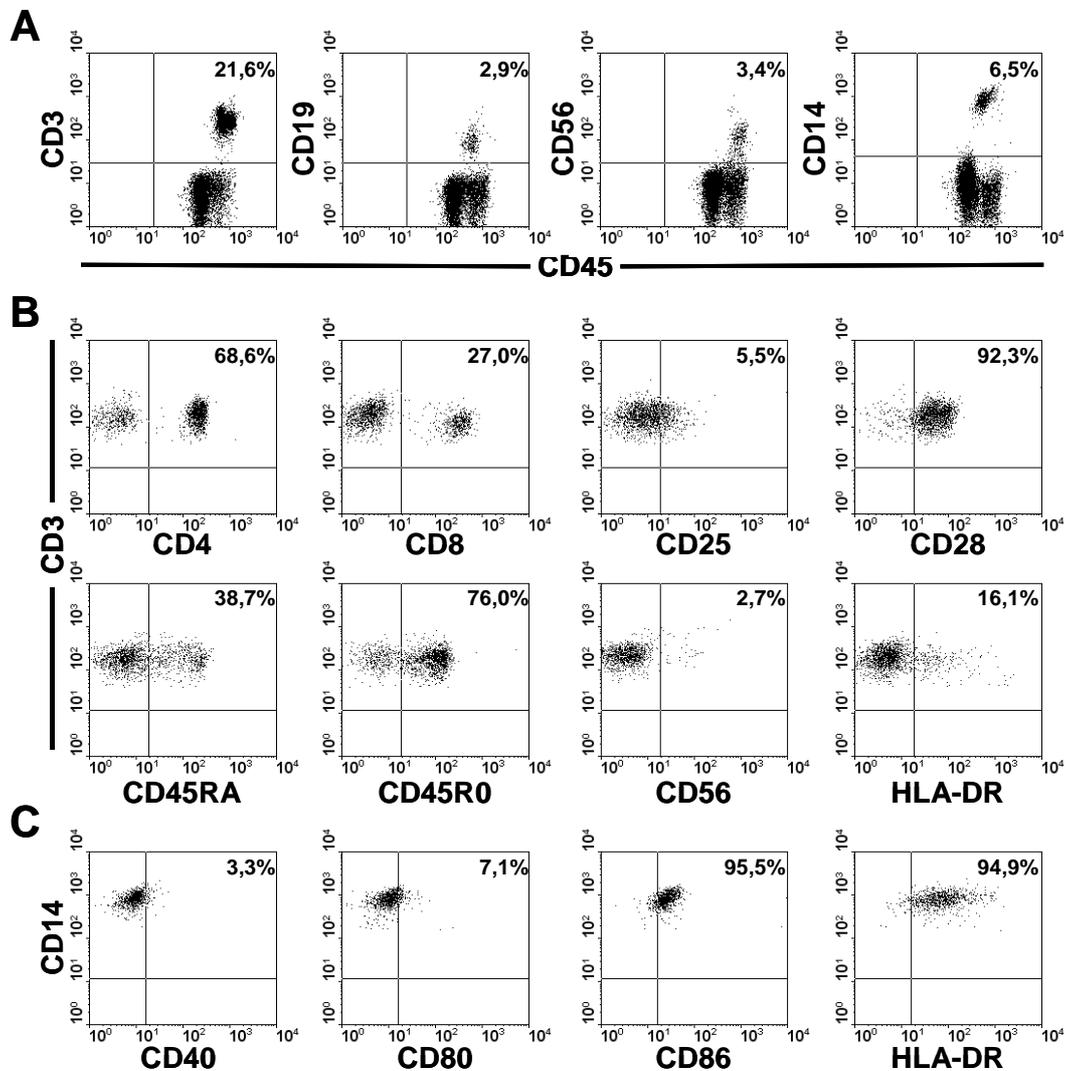


Abb. 3.1.2: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung von Leukozyten- (A), T-Lymphozyten (B) und Monozyten-Subpopulationen (C) eines Gliompatienten. Leukozyten wurden mit anti-CD45 (A), anti-CD3 (B) bzw. anti-CD14 mAb (C) und mAb der jeweils angegebenen Spezifität gefärbt und die Frequenz positiver Zellen der elektronisch auf CD45+ (A), CD3+ (B) bzw. CD14+ (C) eingeschränkten Populationen durchflusszytometrisch gemessen. Die Quadranten wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt; die Frequenz positiver Zellen ist angezeigt.

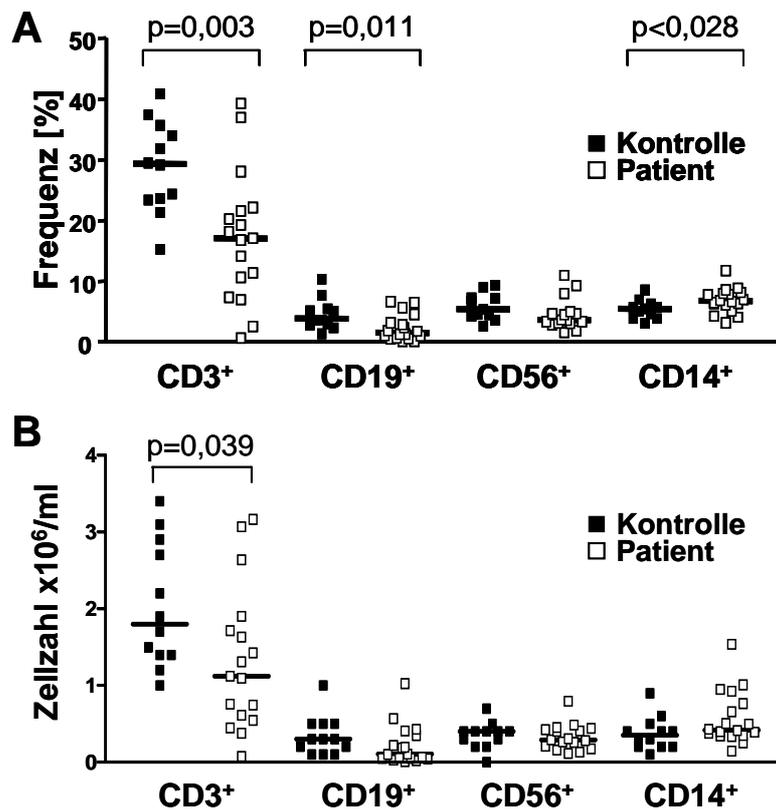


Abb.3.1.3: Frequenzen (A) und Zellzahl/ml (B) der Leukozyten-Subpopulationen von Gliompatienten und Kontrollen. Die Frequenzen (A) wurden wie in Abb. 3.1.2A dargestellt bestimmt. Aus der Gesamtleukozytenzahl $\times 10^6/\text{ml}$ und der Frequenz der CD3⁺ T-Lymphozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten, CD56⁺ NK/NKT-Zellen und CD14⁺ Monozyten wurde die Anzahl dieser Zellen $\times 10^6/\text{ml}$ berechnet (B). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test ermittelt. Medianwerte sind durch horizontale Linien angezeigt.

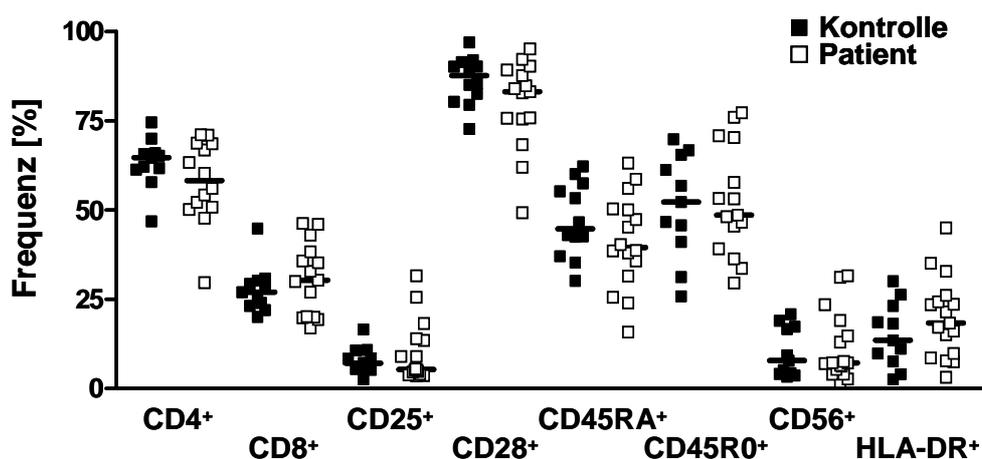


Abb.3.1.4: Immunphänotyp der T-Zell-Subpopulationen von Gliompatienten und Kontrollen. Die Frequenzen wurden wie in Abb. 3.1.2B dargestellt bestimmt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test ermittelt. Medianwerte sind durch horizontale Linien angezeigt.

Die immunphänotypische Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen (Abb. 3.1.4) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CD4+, CD8+, CD25+, CD28+, CD45RA+, CD45RO+, CD56+ und HLA-DR+ T-Lymphozyten zwischen Gliompatienten und Kontrollpersonen.

Die immunphänotypische Charakterisierung der Monozyten (Abb. 3.1.5) zeigte eine signifikante Reduktion der CD80 ($39,8 \pm 9,7\%$ vs. $72,3 \pm 5,5\%$; $p=0,015$) sowie der CD86 Expression ($94,8 \pm 2,3\%$ vs. $85,7 \pm 4,7\%$; $p=0,029$) bei den Patienten, wogegen keine Unterschiede in der Expression von CD40 und HLA-DR sowie in der Expressionsdichte aller untersuchten Moleküle beobachtet wurden.

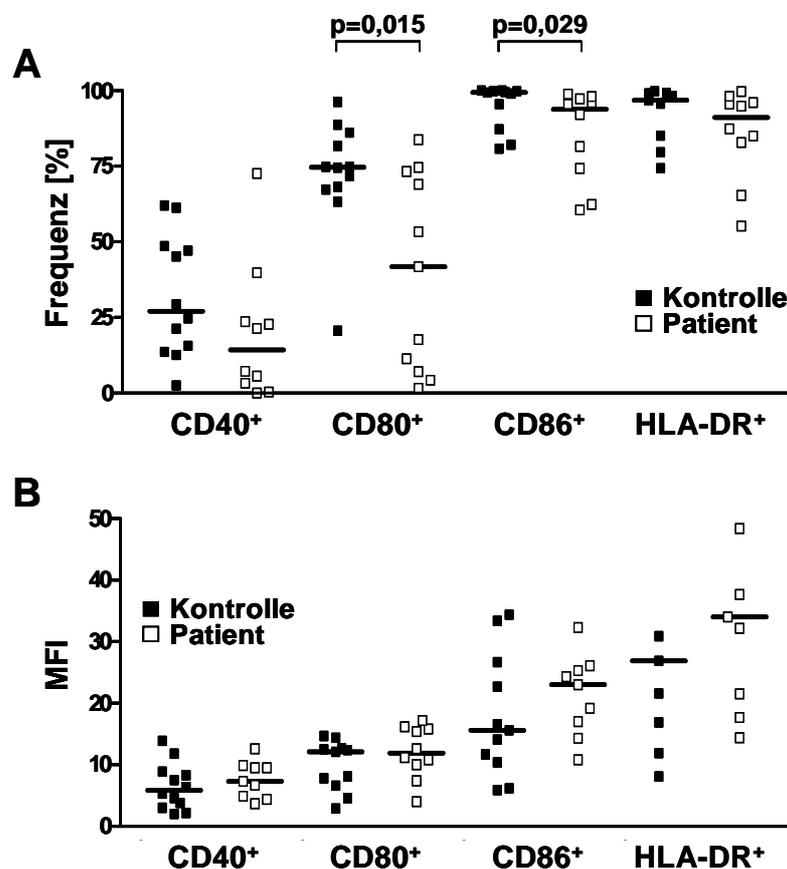


Abb.3.1.5: Expression von costimulatorischen und HLA-Klasse II Molekülen auf Monozyten von Gliompatienten und Kontrollen. Die Frequenzen (A) wurden wie in Abb. 3.1.2C dargestellt bestimmt. Als Maß für die Expressionsdichte (B) wurde durchflusszytometrisch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test ermittelt. Medianwerte sind durch horizontale Linien angezeigt.

3.1.2 Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin

Um das Proliferationspotential von T-Lymphozyten in Patienten und ihre Stimulierbarkeit mit Lektinen zu analysieren, wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) als Maß für die DNA-Synthese und damit Proliferation der T-Lymphozyten für drei Gliompatienten und zwei Kontrollpersonen photometrisch bestimmt. Diese Untersuchungen zeigten eine vergleichbare PHA-Antwort für Patienten und Kontrollen (Abb.3.1.6).

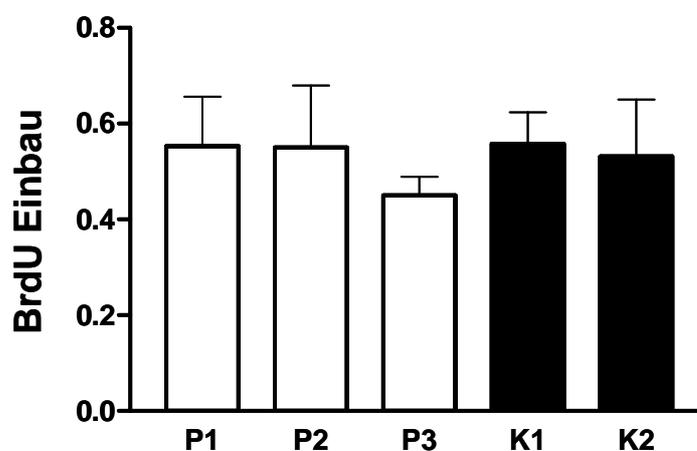


Abb.3.1.6: Proliferative Antwort auf Phytohämagglutinin-Stimulation von mononukleären Zellen von Gliompatienten und Kontrollen. PBMC von Patienten (P1-P3) und von Kontrollpersonen (K1, K2) wurden für drei Tage mit 5µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und dann der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einbau bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwerte (\pm SD) von Quadriplikaten nach Hintergrundkorrektur (nicht-stimulierte PBMC) dargestellt.

3.1.3 Ex-vivo Generierung von Dendritischen Zellen (DC)

Um zu überprüfen, ob von Gliompatienten reife Dendritische Zellen gewonnen werden können, wurde ein zweistufiges Zellkulturverfahren eingesetzt: Monozyten von Gliompatienten (n=15) oder gesunden Probanden (n=10) wurden zunächst in mit autologem Plasma supplementiertem X-Vivo 15 Medium in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 innerhalb von sechs Tagen zu unreifen DC differenziert. Daran schloss sich eine dreitägige Reifungsphase in der Gegenwart von GM-CSF, IL-4 und TNF α an. Differenzierung und Ausreifung wurden über die Expression von CD14 und CD83 verfolgt (Monozyten: CD14+ CD83; reife Dendritische Zellen: CD14- CD83+).

Neben diesen Molekülen wurde auch die Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie die Expression von CD1a und HLA-DR untersucht und die Vitalität und Ausbeute ermittelt. Repräsentative durchflusszytometrische Analysen sind in Abb. 3.1.7A und C dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.4 zusammengefasst.

Nach immunmagnetischer Anreicherung betrug die CD14⁺ Reinheit der für die Differenzierung eingesetzten Monozyten $98,0 \pm 0,5\%$ (n=15) für Patientenzellen bzw. $98,2 \pm 0,2\%$ (n=10) für die Zellen der gesunden Probanden (Abb. 3.1.7A, B).

Nach neuntägiger Differenzierung und Ausreifung konnte eine deutliche Reduktion des Anteils an CD14⁺ Monozyten und eine Zunahme des Anteils an CD83⁺ reifen DC sowohl für die Kontrollen als auch für die Patientenzellen beobachtet werden (Abb. 3.1.7B).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Anteil an reifen CD83⁺ DC ($34,1 \pm 7,3\%$ vs. $24,3 \pm 6,7\%$), residuellen CD14⁺ Monozyten ($14,1 \pm 4,2\%$ vs. $20,8 \pm 4,6\%$) und CD1a⁺ DC ($5,5 \pm 1,2\%$ vs. $5,1 \pm 1,7\%$) wie auch in den entsprechenden Absolutzellzahlen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 3.1.8A, B). Während die Expression von CD80 auf reifen DC in der Patientengruppe signifikant höher war als in der Kontrollgruppe ($59,8 \pm 6,5\%$ vs. $40,7 \pm 5,8\%$; $p=0,044$), ergab die Messung der Oberflächenexpression von CD40, CD86 und HLA-DR keine Unterschiede (Abb. 3.1.8C). Vitalität ($96,1 \pm 0,6\%$ vs. $95,6 \pm 0,9\%$) und Ausbeute ($38,4 \pm 2,6\%$ vs. $47,0 \pm 3,3\%$) waren für Patienten und Kontrollen ebenfalls vergleichbar (Abb. 3.1.8B).

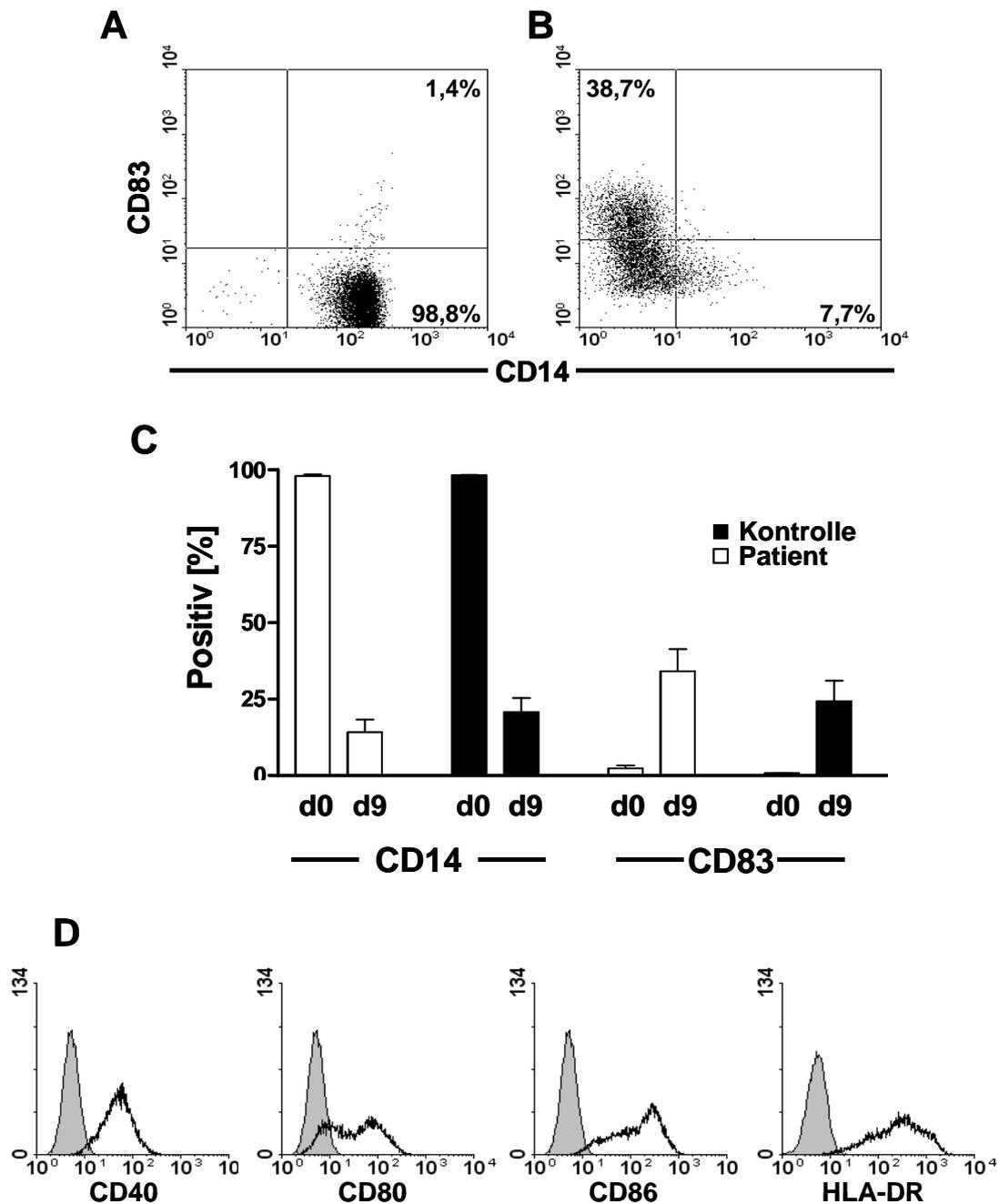


Abb. 3.1.7: Immunphänotyp der Monozyten und reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten und Kontrollen. Monozyten eines Gliompatienten am Tag 0 (A) und Zellen nach neuntägiger Kultur (B, D) in plasmasupplementiertem X-Vivo 15 Medium wurden mit CD14 und CD83 spezifischen mAb (A, B) bzw. CD40, CD80, CD86 und HLA-DR spezifischen mAb (D) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Quadranten in Dotplot-Analysen wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt; die Frequenzen CD14 und CD83 positiver Zellen sind angezeigt und in (C) als Mittelwert \pm SEM für $n \geq 6$ dargestellt.

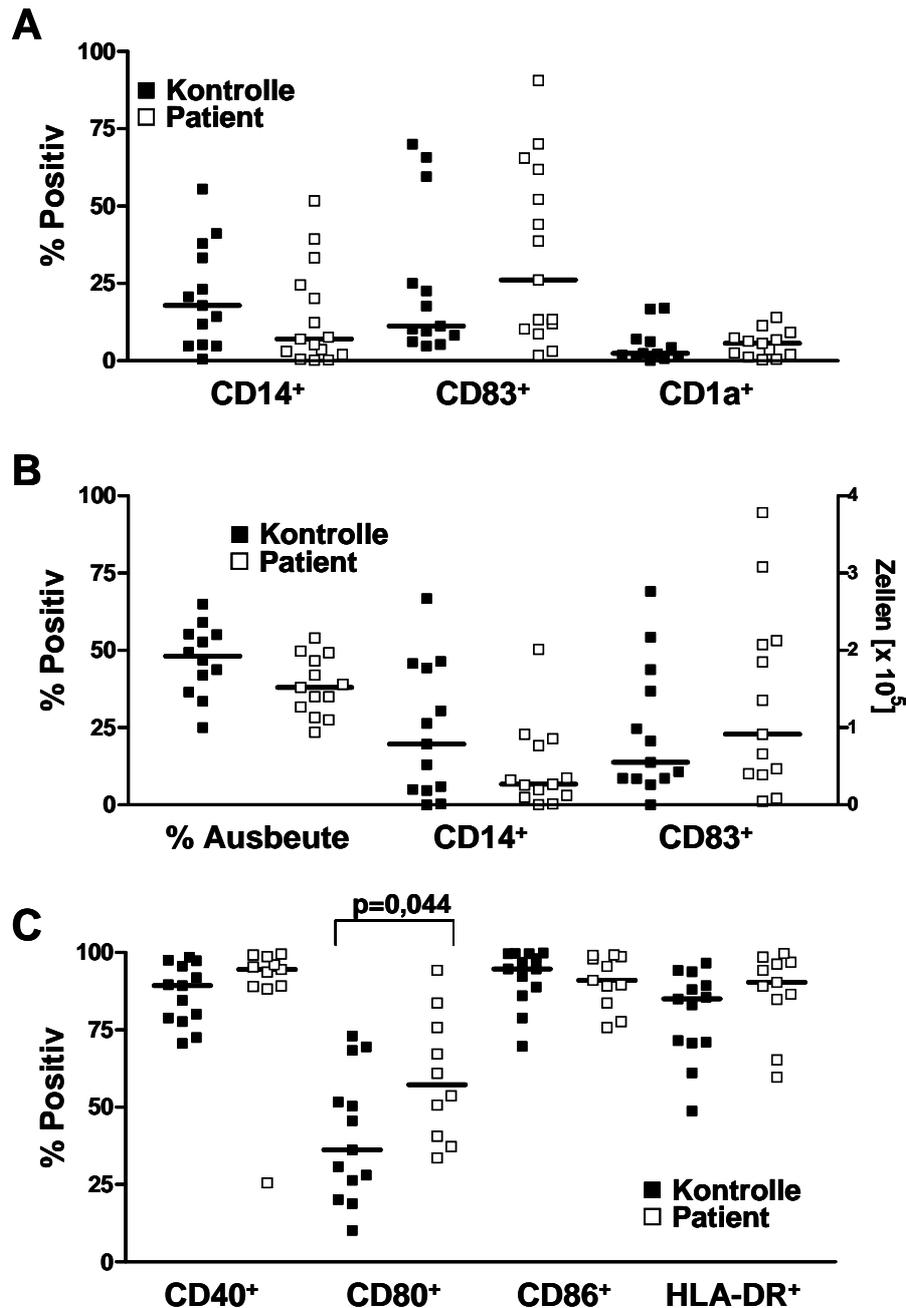


Abb. 3.1.8: Vergleich der Generierung reifer Dendritischer Zellen aus Monozyten von Gliompatienten und Kontrollen. Die Differenzierung und Ausreifung immunmagnetisch CD14⁺ angereicherter Monozyten zu reifen Dendritischen Zellen wurde in plasmasupplementiertem Medium in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 (Tage 0-6) bzw. GM-CSF, IL-4 und TNF α (Tage 6-9) durchgeführt. Am Tag 9 wurden die Frequenzen der (A) CD14⁺, CD83⁺ und CD1a⁺ sowie der (C) CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺ und HLA-DR⁺ Zellen bestimmt. (B) Ausgehend vom Input an Monozyten wurde die prozentuale zelluläre Ausbeute berechnet, aus erhaltener Zellzahl nach Differenzierung/Ausreifung und den Frequenzen die Absolutzellzahl der entsprechenden Populationen. Medianwerte sind als horizontale Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U Test geprüft.

3.2 Optimierte Generierung Dendritischer Zellen von Gliompatienten unter serumfreien Kulturbedingungen

Für zahlreiche Patienten und Kontrollpersonen war es mit dem Standardprotokoll, in dem autologes Plasma ein notwendiger Bestandteil des Kulturmediums (X-Vivo 15 Medium supplementiert mit 1,5% autologem Plasma – XV15) ist, nicht möglich, aus Monozyten eine Population mit einem hohen Anteil an reifen CD83+ Dendritischen Zellen zu gewinnen ($34,1 \pm 7,3\%$ bzw. $24,3 \pm 6,7\%$, Abb. 3.1.7, 3.1.8 und Tab. 3.1.4). Deshalb wurde geprüft, ob sowohl unreife als auch reife Dendritische Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen gewonnen werden können. Dazu wurde die Differenzierung und Ausreifung der Dendritischen Zellen von Gliompatienten in plasmasupplementiertem XV15 oder serumfreiem CellGroDC (CGDC) Medium durchgeführt und unter folgenden Gesichtspunkten verglichen:

- Prozentualer Anteil an reifen CD83+ Dendritischen Zellen
- Expression costimulatorischer Moleküle (CD40, CD80 und CD86)
- Expression von HLA-Klasse I und II Molekülen
- T-Zell-stimulatorische Aktivität reifer Dendritischer Zellen

3.2.1 Vergleichende Phänotypanalyse der in X-Vivo 15 oder CellGroDC Medium generierten Dendritischen Zellen von Gliompatienten

Um die Differenzierung von Monozyten (CD14+ Reinheit: $98,1 \pm 0,4\%$; n=16) von Gliompatienten zu Dendritischen Zellen zu verfolgen, wurden die Zellen im Verlauf der Differenzierungs-/Reifungskulturen (Tag 0-6: GM-CSF/IL-4; Tag 6-9: GM-CSF/IL-4/TNF α) in XV15 bzw. CGDC Medium an den Tagen 3, 6 und 9 durchflusszytometrisch phänotypisiert und verglichen. Die Differenzierung/Ausreifung wurde über die Expression von CD14 und CD83 beurteilt:

Monozyten: CD14+/CD83-

unreife Dendritische Zellen: CD14-/CD83-

reife Dendritische Zellen: CD14-/CD83+

Unter beiden Kulturbedingungen kam es im Kulturverlauf zu einer Abnahme der Frequenz CD14+ Monozyten (Abb. 3.2.1). Diese Abnahme war jedoch in der Gegenwart von plasmasupplementiertem XV15 Medium signifikant verzögert und reduziert. Nach drei und sechs Tagen Kultur zeigten noch $74,8 \pm 6,4\%$ und $42,0 \pm 9,1\%$

der Zellen den Monozytenmarker CD14 gegenüber einer Frequenz von $47,2 \pm 13,8\%$ und $23,1 \pm 14,8\%$ in CGDC Kulturen ($p=0,041$; $n=5$ und $p=ns$; $n=4$). Weder in XV15 noch in CGDC Kulturen konnte dagegen ohne vorangegangenen Reifungsstimulus eine Expression von CD83 nachgewiesen werden.

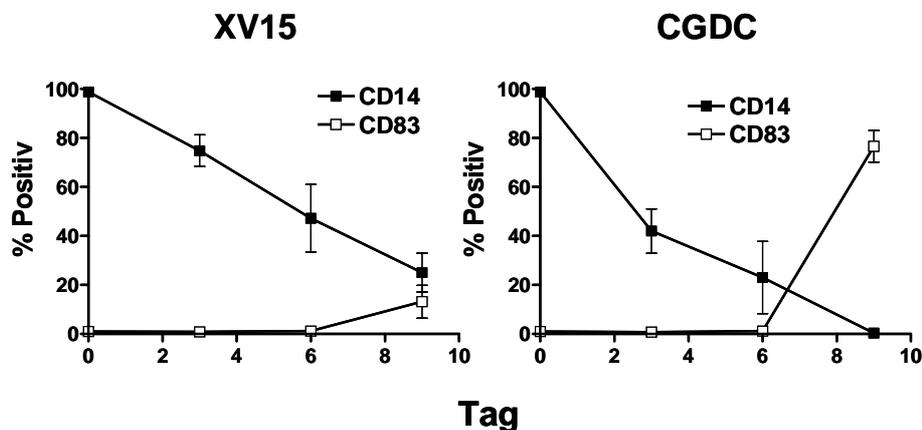


Abb. 3.2.1: Vergleich der CD14 und CD83 Expression im Verlauf der DC Differenzierung in CGDC und in mit autologem Plasma supplementiertem XV15 Medium. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Erst nach Induktion mit $TNF\alpha$ am Tag 6 erfolgte eine Hochregulation von CD83, begleitet von einer weiteren Reduktion der CD14 Expression (Abb. 3.2.1). Abb. 3.2.2 zeigt eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse am Tag 9, Abb. 3.2.3 fasst die Ergebnisse nach 9-tägiger Zellkultur zusammen.

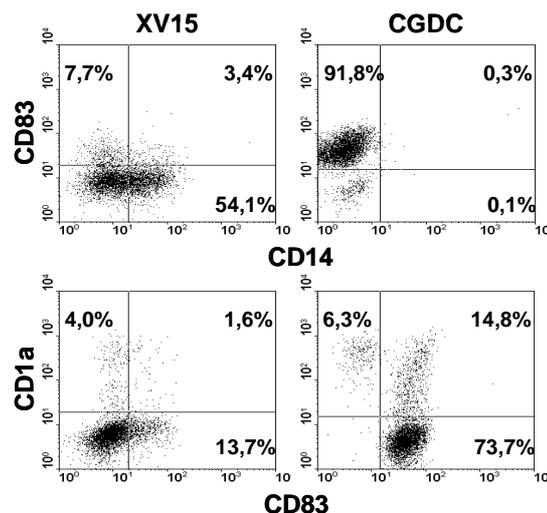


Abb. 3.2.2: Durchflusszytometrischer Nachweis der Generierung reifer Dendritischer Zellen in XV15 oder CGDC Medium. Nach Differenzierung und Ausreifung (Tag 9) wurde die Expression von CD14, CD83 und CD1a durchflusszytometrisch analysiert. Quadranten wurden entsprechend den Isotypkontrollen gesetzt. Die jeweilige Frequenz positiver Zellen ist angezeigt.

Obwohl es in beiden Medien zu einer weiteren Reduktion der CD14 Expression kam, war diese am Ende der 9-tägigen Kultur in XV15 Medium signifikant höher als in der Gegenwart von CGDC Medium ($15,1\pm 4,4\%$ vs. $1,4\pm 0,6\%$; $p=0,013$; $n=14$; Abb. 3.2.3A). Umgekehrt aber in Übereinstimmung mit einer besseren Differenzierung und Ausreifung war die Expression des Markers für reife Dendritische Zellen, CD83, in CGDC Kulturen signifikant höher ($64,3\pm 5,5\%$ vs. $32,9\pm 7,8\%$; $p=0,001$; $n=14$; Abb. 3.2.3A). Eine Expression eines weiteren Markers für Dendritische Zellen, CD1a, konnte ausschließlich in CGDC Kulturen beobachtet werden ($36,9\pm 7,6\%$ vs. $5,0\pm 1,2\%$; $p=0,002$; $n=12$; Abb. 3.2.2 und 3.2.3A).

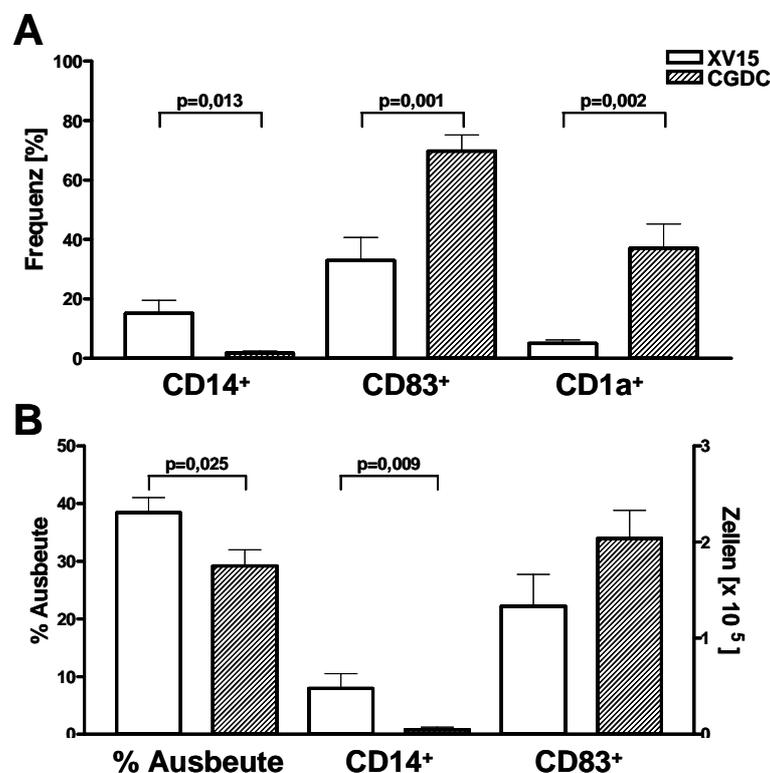


Abb. 3.2.3: Vergleich der DC-Differenzierung aus Monozyten von Gliompatienten in XV15 und CGDC Medium. Die Frequenzen an CD14+, CD83+ und CD1a+ Zellen nach 9-tägiger Kultur wurden durchflusszytometrisch bestimmt (A). Prozentuale Ausbeute und Anzahl an erhaltenen CD14+ und CD83+ Zellen (berechnet für 1×10^6 eingesetzte Zellen) wurden aus den jeweiligen Gesamtzellzahlen berechnet (B). Statistische Signifikanz ist angezeigt und wurde mit dem paired t-Test ermittelt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM für $n \geq 11$.

Wurde die zelluläre Ausbeute in beiden Medien verglichen, so war diese in XV15 Medium signifikant höher als in CGDC Medium ($38,4\pm 2,6\%$ vs. $27,7\pm 2,3\%$; $p=0,025$; $n=13$; Abb. 3.2.3B), was auf eine höhere Anzahl an residuellen Monozyten

zurückzuführen war ($0,48 \pm 0,15 \times 10^5 / 10^6$ vs. $0,04 \pm 0,02 \times 10^5 / 10^6$; $p=0,017$; $n=13$; Abb.3.2.3B). Im Gegensatz hierzu war die Anzahl an je 1×10^6 eingesetzten Monozyten erhaltenen CD83+ Zellen für CGDC Medium tendenziell zwar höher, aber nicht signifikant von der für XV15 Medium verschieden ($1,83 \pm 0,26 \times 10^5 / 10^6$ vs. $1,33 \pm 0,33 \times 10^5 / 10^6$; $n=13$; Abb. 3.2.3B). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.2.1 zusammengefasst.

Neben der Expression der für Monozyten bzw. Dendritische Zellen spezifischen Marker CD14, CD83 und CD1a wurde desweiteren die Expression der funktionell relevanten costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie von HLA-Klasse I (HLA-ABC) und II Molekülen (HLA-DR) nach 9-tägiger Kultur verglichen. Abb. 3.2.4 zeigt eine repräsentative Analyse. In Abb. 3.2.5 und Tabelle 3.2.2 sind die Ergebnisse von jeweils mindestens 6 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

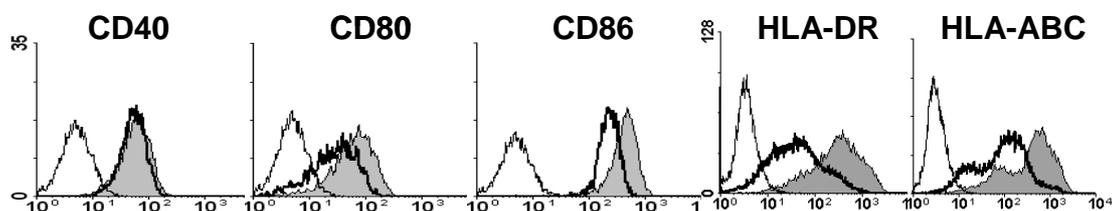


Abb. 3.2.4: Nachweis der Expression costimulatorischer und von HLA Molekülen von in XV15 bzw. CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten. Offene Histogramme repräsentieren Isotypkontrollen (dünne Linien) oder Ergebnisse für XV15 Kulturen (fettgedruckte Linien), grau hinterlegte Histogramme repräsentieren die Ergebnisse für CGDC Kulturen.

Obwohl alle diese Moleküle auf Zellen aus beiden Kultursystemen nachgewiesen werden konnten, war die Expressionsdichte von CD40 (MFI von $10,5 \pm 2,2$ vs. $8,7 \pm 1,8$; $n=7$) und CD80 (MFI von $10,1 \pm 1,5$ vs. $7,2 \pm 1,4$; $n=6$) für Zellen aus CGDC Kulturen tendenziell, die von CD86 (MFI von $35,9 \pm 4,0$ vs. $28,9 \pm 3,5$; $p=0,018$; $n=7$), HLA-ABC (MFI von $1004,9 \pm 99,8$ vs. $666,9 \pm 127,8$; $p=0,020$; $n=6$) und HLA-DR ($311,4 \pm 93,9$ vs. $126,8 \pm 42,9$; $p=0,003$; $n=12$) signifikant höher als für Zellen aus XV15 Kulturen (Abb. 3.2.5). Somit bestätigt die Analyse der Expression costimulatorischer und von HLA-Molekülen eine verbesserte Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen in Gegenwart von serumfreiem CGDC Medium.

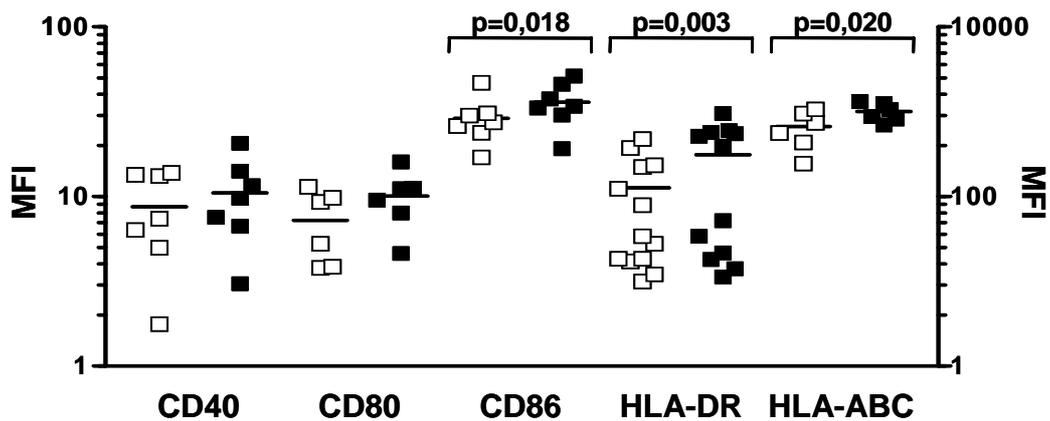


Abb. 3.2.5: Vergleich der Expressionsdichte von costimulatorischen und HLA-Molekülen auf in XV15 bzw. CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen. Die Expressionsdichte von CD40, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-ABC wurde durchflusszytometrisch für die elektronisch auf CD83+ eingeschränkte Population reifer Dendritischer Zellen bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 6 unabhängigen Experimenten. Mittelwerte sind durch eine horizontale Linie angezeigt. Statistische Signifikanz ist angegeben und wurde mit dem paired t-Test ermittelt.

3.2.2 Vergleichende Analyse der T-Zell-stimulatorischen Aktivität von in X-Vivo 15 bzw. CellGroDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten

Für die funktionelle Charakterisierung der Dendritischen Zellen, welche entweder in plasmasupplementiertem XV15 Medium oder in serumfreiem CGDC Medium generiert worden waren, wurde ihre typische potente allostimulatorische Aktivität herangezogen. Hierzu wurden die DC von Gliompatienten mit allogenen, naiven T-Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert worden waren, kokultiviert. Nach 6 Tagen wurde die durch die DC induzierte Proliferation der T-Zellen durch den Nachweis des BrdU-Einbaus gemessen.

Abb. 3.2.6 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer solchen T-Zell-Stimulation. Es zeigte sich eine vergleichbare maximale Allostimulation durch die in XV15 oder CGDC generierten DC bei $1\text{-}5 \times 10^4$ Stimulatorzellen/ 10^5 T-Zellen. War jedoch die Anzahl der Stimulatorzellen limitierend (500 Dendritische Zellen/ 10^5 T-Zellen), offenbarte sich die höhere allostimulatorische Aktivität der in CGDC Medium generierten Dendritischen Zellen. Diese Differenz war allerdings nur für Zellkulturen nachweisbar, welche eine niedrigere Frequenz an CD83+ Zellen nach XV15 Kultur im Vergleich zur entsprechenden CGDC Kultur aufwiesen.

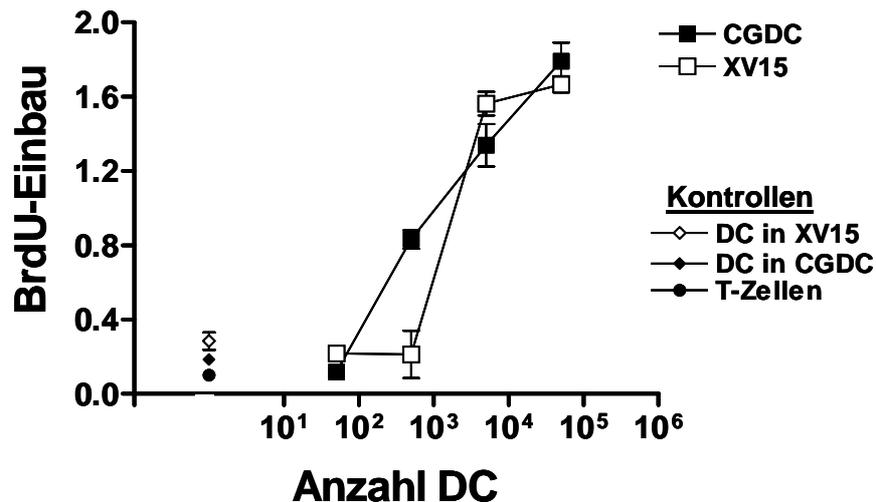


Abb.3.2.6: Allostimulatorische Aktivität von in XV15 oder CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden mit naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert und nach 6 Tagen der BrdU-Einbau gemessen. Als Kontrollen dienten nicht-stimulierte T-Zellen sowie Dendritische Zellen ohne T-Zellen. Ergebnisse sind als Mittelwert±SD von Dreifachansätzen dargestellt.

Neben der Proliferation der T-Zellen sind Dendritische Zellen zudem entscheidend für die Polarisierung der T-Zell-Antwort, d.h. dafür, zu welchem Effektorotyp sich die stimulierten T-Zellen entwickeln. So können durch den Nachweis von IL-2, IFN γ und IL-4 TH1 (IL-2, IFN γ) und TH2 (IL-4) Effektorotypen unterschieden werden. Um mögliche Unterschiede in ihrer die T-Zell-Antwort polarisierenden Aktivität nachzuweisen, wurden DC von Gliompatienten, die in XV15 oder CGDC Medium generiert worden waren, mit allogenen T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert. Nach Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28 wurde dann der Anteil an IL-2, IL-4 und IFN γ produzierenden CD3⁺ T-Zellen durch intrazytoplasmatische Färbung und durchflusszytometrische Messung bestimmt.

In Abb. 3.2.7 ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse von restimulierten T-Zellen dargestellt. In Abb. 3.2.8 sind die Ergebnisse von mindestens 5 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.3 zusammengefasst.

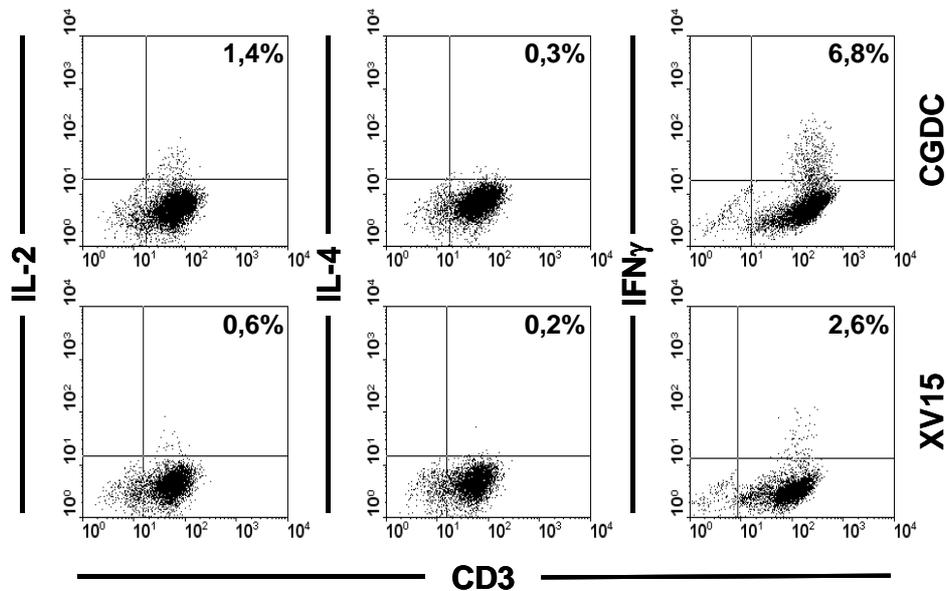


Abb. 3.2.7: Nachweis IL-2, IL-4 und IFN γ produzierender T-Zellen nach Stimulation mit in XV15 oder CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen. Allogene, naive T-Zellen aus Nabelschnurblut wurden mit Dendritischen Zellen stimuliert und nach Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28 wurde die Frequenz IL-2, IL-4 oder IFN γ exprimierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Quadranten wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt; Frequenzen die Cytokine exprimierender CD3⁺ T-Zellen sind angezeigt.

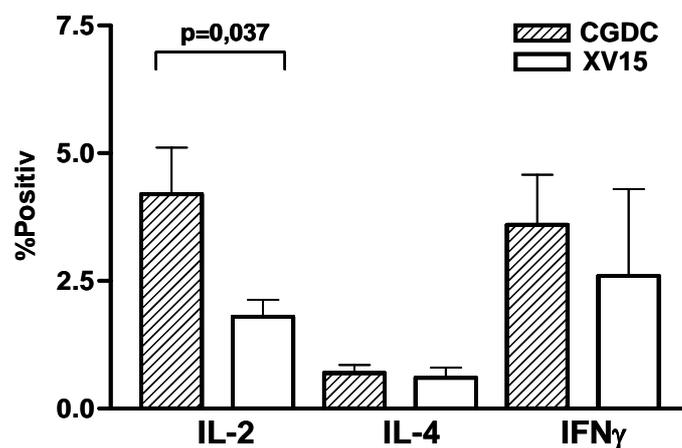


Abb. 3.2.8: Vergleich der Frequenzen IL-2, IL-4 und IFN γ produzierender T-Zellen nach Stimulation mit in XV15 oder CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen. Allogene, naive T-Zellen aus Nabelschnurblut wurden mit Dendritischen Zellen stimuliert. Nach Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28 wurde die Frequenz IL-2, IL-4 oder IFN γ exprimierender T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n \geq 5.

Die Analyse der Cytokinproduktion der T-Zellen zeigte für beide Medien eine präferenzielle TH1 Polarisierung, gekennzeichnet durch die Produktion von IL-2 und IFN γ . Eine substanzielle Bildung des TH2 Cytokins IL-4 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.2.8). Dabei war die Frequenz der IL-2 produzierenden T-Zellen nach Stimulation mit DC, welche in CGDC Medium generiert worden waren, signifikant höher als für XV15 generierte DC ($4,2\pm 0,9\%$ vs. $1,8\pm 0,3\%$; $p=0,037$; $n=6$). Die Frequenz IFN γ produzierender Zellen war ebenfalls erhöht, aber nicht signifikant verschieden ($3,6\pm 1,0\%$ vs. $2,6\pm 1,7\%$).

3.2.3 Vergleichende immunphänotypische Analyse in serumfreiem CellGroDC Medium generierter Dendritischer Zellen von Gliompatienten und gesunden Probanden

Die bisherigen Analysen zeigten eine verbesserte Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen von Gliompatienten unter serumfreien Bedingungen im Vergleich zum Standard plasmasupplementiertes XV15 Medium. Wurde die Generierung Dendritischer Zellen unter diesen optimierten Kulturbedingungen zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden verglichen, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz (Abb. 3.2.9A) und zellulären Ausbeute (Abb. 3.2.9B) CD14, CD83 und CD1a exprimierender Zellen sowie in der Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Abb. 3.2.9C) nachgewiesen werden. Nur in der Expression von HLA-DR wurde eine signifikante Erhöhung für die Dendritischen Zellen der Gliompatienten beobachtet ($85,2\pm 3,3\%$ vs. $95,0\pm 1,9\%$; $p=0,025$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.4 zusammengefasst.

Wurde die Differenzierung und Ausreifung für Gliompatienten und gesunde Probanden zusammen zwischen serumfreiem CellGroDC Medium und plasmasupplementiertem X-Vivo 15 Medium verglichen (Abb. 3.2.10), so war die Frequenz der den Marker für reife Dendritische Zellen, CD83, exprimierenden Zellen nach 9 Tagen für die CGDC Kulturen signifikant höher ($68,4\pm 4,2\%$ vs. $29,6\pm 5,0\%$; $p<0,001$; $n=28$).

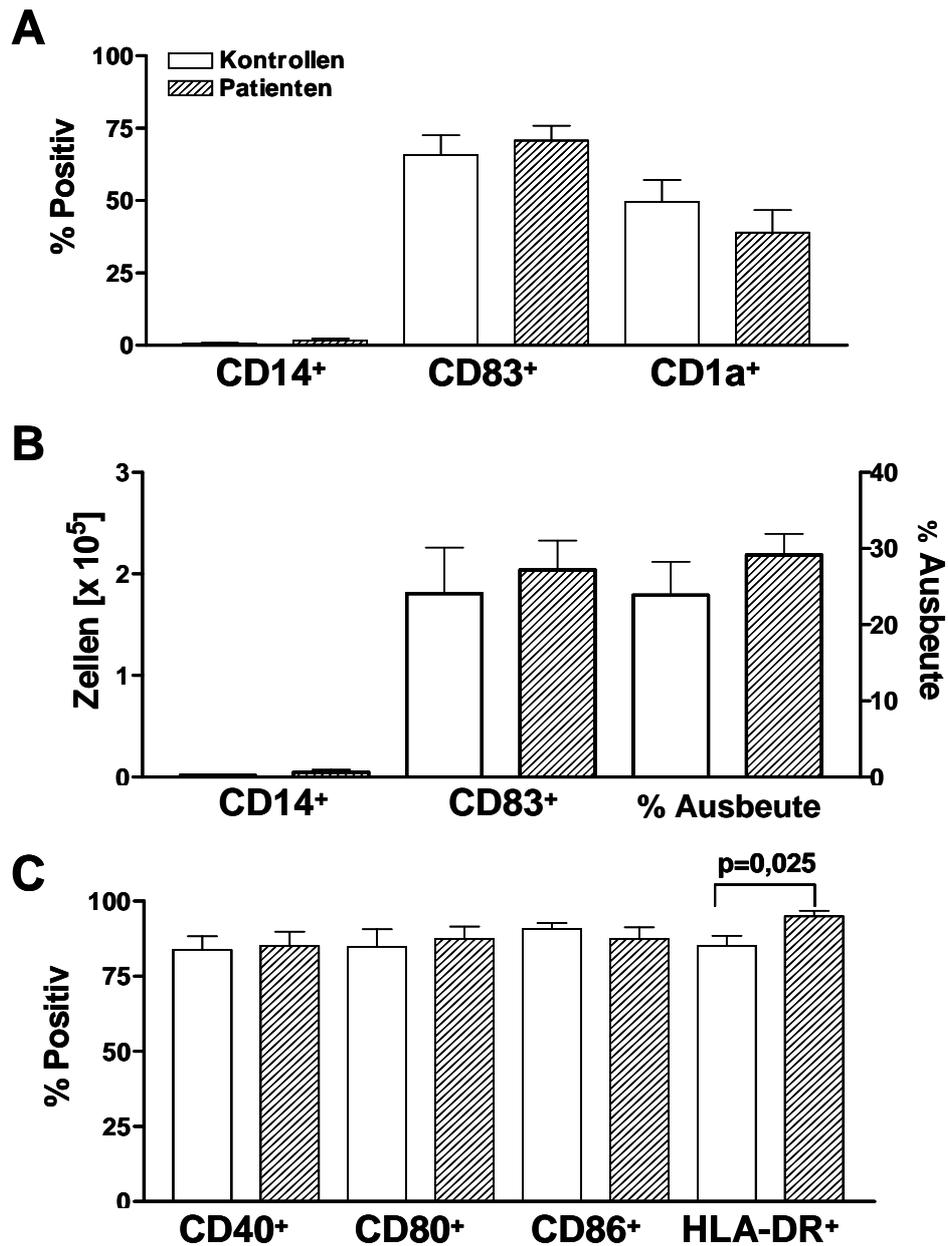


Abb. 3.2.9: Vergleich der DC-Differenzierung aus Monozyten in serumfreiem CGDC Medium zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden. Nach 9 Tagen Differenzierungs-/Ausreifungskultur wurden die Frequenzen CD14, CD83 und CD1a exprimierender Zellen (A) sowie der CD40+, CD80+, CD86+ und HLA-DR+ Zellen (C) durchflusszytometrisch bestimmt. Prozentuale Ausbeute und Anzahl an erhaltenen CD14+ und CD83+ Zellen (berechnet für 1×10^6 eingesetzte Monozyten) wurden aus den jeweiligen Gesamtzellzahlen berechnet (B). Statistische Signifikanz ist angezeigt und wurde mit dem Mann-Whitney-U Test ermittelt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM für $n \geq 10$.

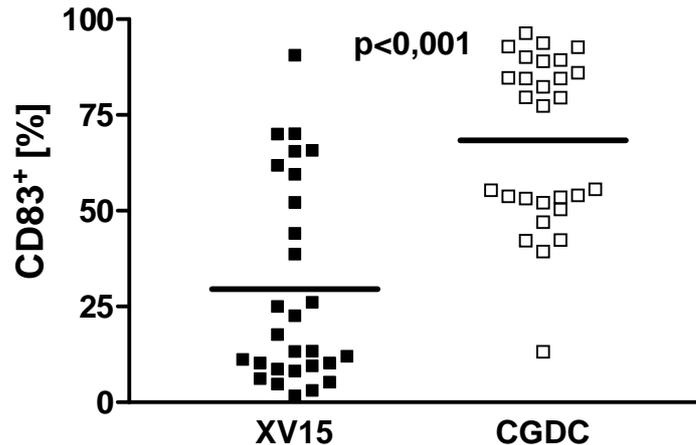


Abb. 3.2.10: Vergleich der Frequenz CD83+ Zellen nach Generierung Dendritischer Zellen aus Monozyten in XV15 oder CGDC Medium. Dendritische Zellen wurden aus Monozyten von gesunden Probanden oder Gliompatienten entweder in XV15 oder CGDC Medium generiert. Nach 9 Tagen wurde der Anteil an CD83+ reifen Dendritischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (n=28). Statistische Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney U Test ermittelt und ist angegeben. Horizontale Linien kennzeichnen die Mittelwerte.

3.2.4 Antigenaufnahme-Aktivität der unter serumfreien Bedingungen generierten unreifen Dendritischen Zellen

Ein funktionelles Merkmal unreifer Dendritischer Zellen ist ihre gut entwickelte Antigenaufnahmeaktivität. Zur weiteren Charakterisierung der von Gliompatienten unter serumfreien Kulturbedingungen in CGDC Medium generierten DC wurde die Pinozytose- und Phagozytose-Aktivität der unreifen Zellen nach 6 Tagen Kultur bestimmt.

3.2.4.1 Pinozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen

Zum Nachweis der Pinozytose-Aktivität wurden unreife Dendritische Zellen mit FITC-BSA bei 37°C oder 4°C (Negativkontrolle für den aktiven Prozess) inkubiert und die Aufnahme nach einer Stunde durchflusszytometrisch gemessen. Wie in Abb. 3.2.11 dokumentiert, zeigten die Zellen eine effiziente Aufnahme des fluoreszenzmarkierten BSA.

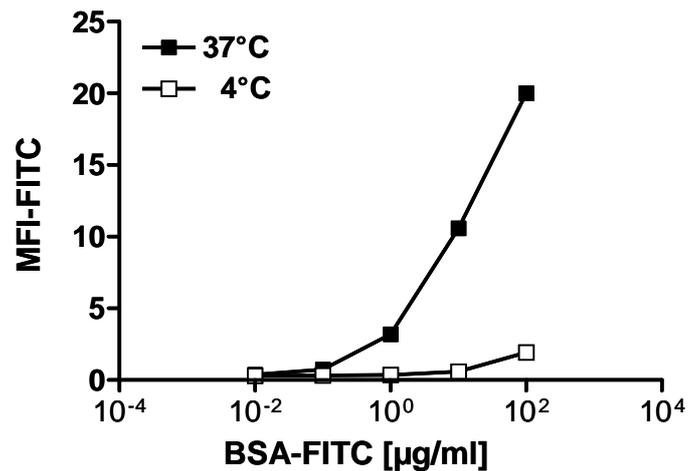


Abb. 3.2.11: Pinozytose-Aktivität in CGDC Medium generierter unreifer Dendritischer Zellen von Gliompatienten. Unreife Dendritische Zellen wurden aus Monozyten durch 6-tägige Kultur in GM-CSF/IL-4 supplementiertem CGDC Medium differenziert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA-FITC für eine Stunde bei 4°C (Kontrolle) oder 37°C inkubiert. Dann erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis der Aufnahme des FITC-BSA über die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

3.2.4.2 Phagozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen

Für den Nachweis der Phagozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen wurde die Aufnahme abgetöteter, nekrotischer Gliomzellen herangezogen, ein Verfahren, das auch für die Beladung Dendritischer Zellen mit Tumorantigenen im Rahmen der Herstellung von Vakzinen für die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort zum Einsatz kommt.

Zunächst wurden die Gliomzellen einer Hitzebehandlung (30min 56°C) und drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen. Durch dieses Verfahren war es möglich, die Zellen abzutöten. Die Avitalität wurde durch Trypanblau-Färbung dokumentiert (Abb. 3.2.12A), die Induktion von Nekrose durch Anfärbung mit einem Annexin V-spezifischen mAb und Propidiumjodid, bei der sich nekrotische Zellen durchflusszytometrisch als Annexin V-/Propidiumjodid+ darstellen (Abb. 3.2.12B).

Für den Nachweis der Aufnahme der Tumorzellen wurden diese vor der Abtötung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (CFDA-SE) markiert, mit den unreifen Dendritischen Zellen kokultiviert und dann die Aufnahme von Tumormaterial durch die Dendritischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In Abb. 3.2.12C ist der Kontakt zwischen Tumorzellen und Dendritischen Zellen sowie die Aufnahme von Tumormaterial dokumentiert.

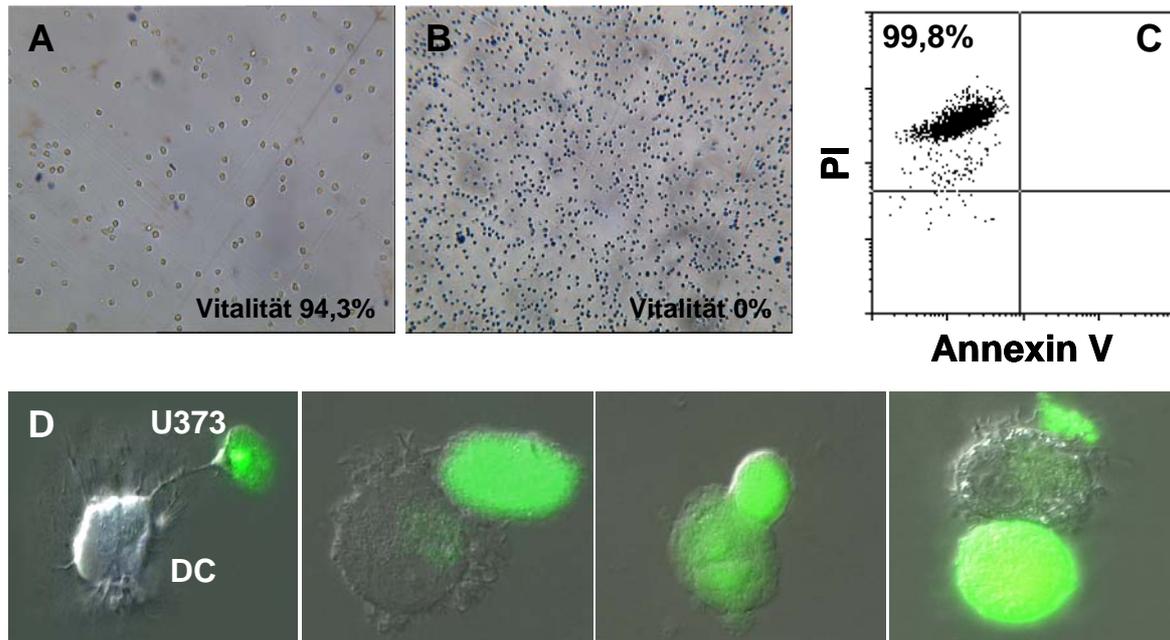


Abb. 3.2.12: Induktion von Nekrose (A-C) und Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen (D). Tumorzellen (A172) wurden durch Hitzebehandlung und drei Einfrier-/Auftauzyklen abgetötet. Vitalität vor (A) und nach Abtötung (B) wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Frequenz vitaler Zellen ist angegeben. Der Nachweis der Induktion von Nekrose erfolgte durchflusszytometrisch durch die Bestätigung des Annexin V-/Propidiumjodid(PI)+ Phänotyps der abgetöteten Zellen (C). Quadranten wurden entsprechend einer IgG1/IgG1 Isotypkontrollfärbung gesetzt. Die Frequenz Annexin V-/PI+ Zellen ist angezeigt. Für den Nachweis der Aufnahme von Tumormaterial durch unreife Dendritische Zellen wurden Gliomzellen (U373) fluoreszenzmarkiert, abgetötet, mit Dendritischen Zellen kokultiviert und die Ansätze am konfokalen Mikroskop ausgewertet (D).

3.2.5 Morphologische Charakterisierung der DC in CellGroDC Medium

Typischerweise sind reife Dendritische Zellen größer und granulärer als Monozyten und zeichnen sich durch eine charakteristische, namensgebende Morphologie mit einem bohnenförmigen Kern und zahlreichen, verschieden geformten Zytoplasmafortsätzen aus. Um zu prüfen, ob unter serumfreien Bedingungen generierte reife Dendritische Zellen von Gliompatienten diese Merkmale aufweisen, wurden zum Einen die reifen DC durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Größe (Forward Scatter) und Granularität (Side Scatter) mit Monozyten verglichen. Zum Anderen wurde die Morphologie reifer DC mikroskopisch erfasst. In Abb. 3.2.13A ist repräsentativ die Zunahme der Größe und Granularität bei der Differenzierung und Ausreifung von Monozyten zu Dendritischen Zellen dargestellt. Abb. 3.2.13B zeigt eine Auswahl an mikroskopischen Aufnahmen, welche die typische DC-Morphologie der Zellen dokumentieren.

Ein weiteres Merkmal reifer DC ist die bei der Ausreifung stattfindende Translokation von HLA-Klasse II Molekülen aus den lysosomalen Kompartimenten an die Zelloberfläche. Um diese Translokation nachzuweisen, wurden die Zellen mit mAb gegen ein lysosomales Protein (DC-LAMP; PE) und HLA-DR (FITC) angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Wie in Abb. 3.2.13C zu erkennen ist, sind HLA-DR-Moleküle (grün) hauptsächlich auf der Zelloberfläche und nur in geringem Maße in den lysosomalen Kompartimenten (rot; eine Colokalisation mit DC-LAMP würde durch die Überlagerung von rot und grün zu einer Orangefärbung führen) lokalisiert.

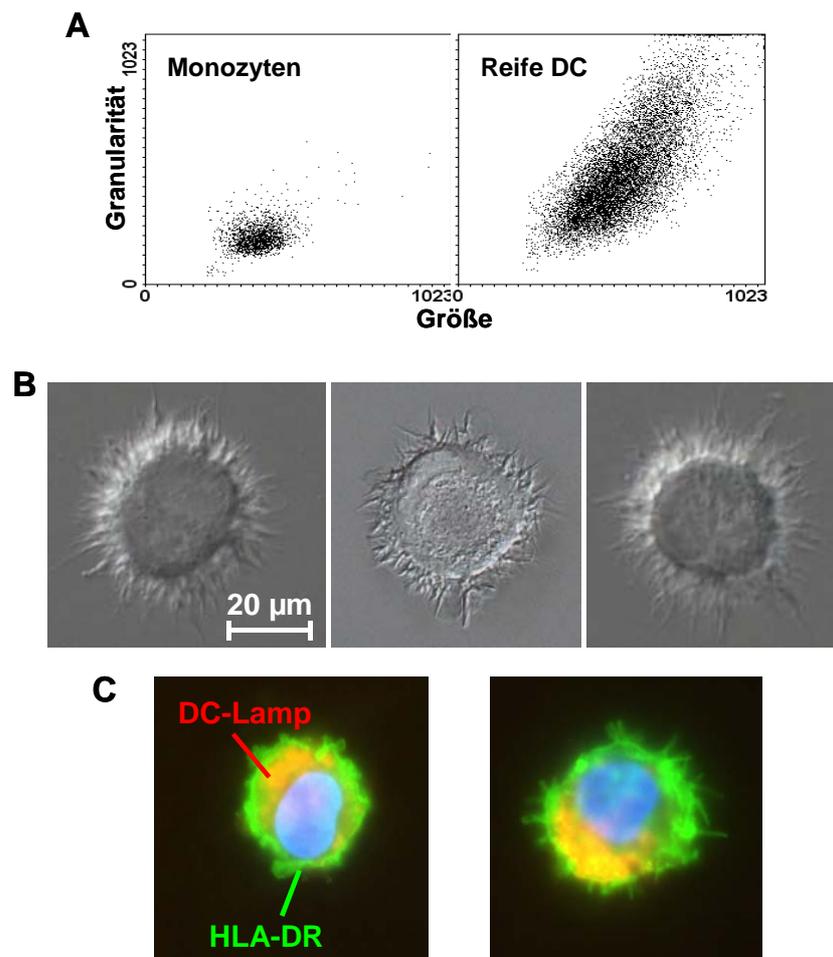


Abb. 3.2.13: Morphologie unter serumfreien Bedingungen generierter Dendritischer Zellen und Lokalisation von HLA-DR. Größe und Granularität von Monozyten und aus diesen generierten reifen DC wurden durchflusszytometrisch mittels Forward und Side Scatter verglichen (A). Die morphologische Beurteilung der reifen DC erfolgte durch differentielle Interferenz-Kontrastmikroskopie (B). Der Maßstab ist angezeigt. Die Lokalisation von HLA-DR Molekülen wurde durch Anfärbung mit anti-HLA-DR (FITC) und einem mAb spezifisch für den lysosomalen Marker DC-LAMP (PE, CD208) gefolgt von fluoreszenzmikroskopischer Auswertung bestimmt (C). Nuclei sind durch DAPI-Färbung blau dargestellt.

3.2.6 Interaktion der in serumfreiem CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten mit naiven T-Zellen

Zur Beurteilung der Interaktion der in CGDC Medium generierten reifen DC mit naiven T-Zellen wurde das Migrationsverhalten bei Cokultur der Dendritischen Zellen mit naiven T-Zellen mikroskopisch beobachtet. In Abb. 3.2.14 ist eine typische Zeitrafferaufnahme dargestellt. Sie dokumentiert, dass DC und T-Zellen aktiv zueinander migrieren und einen Komplex ausbilden. Von der Annäherung der Zellen, über die Ausbildung des Komplexes bis zum wieder Trennen der Zellen vergeht ca. eine Stunde.

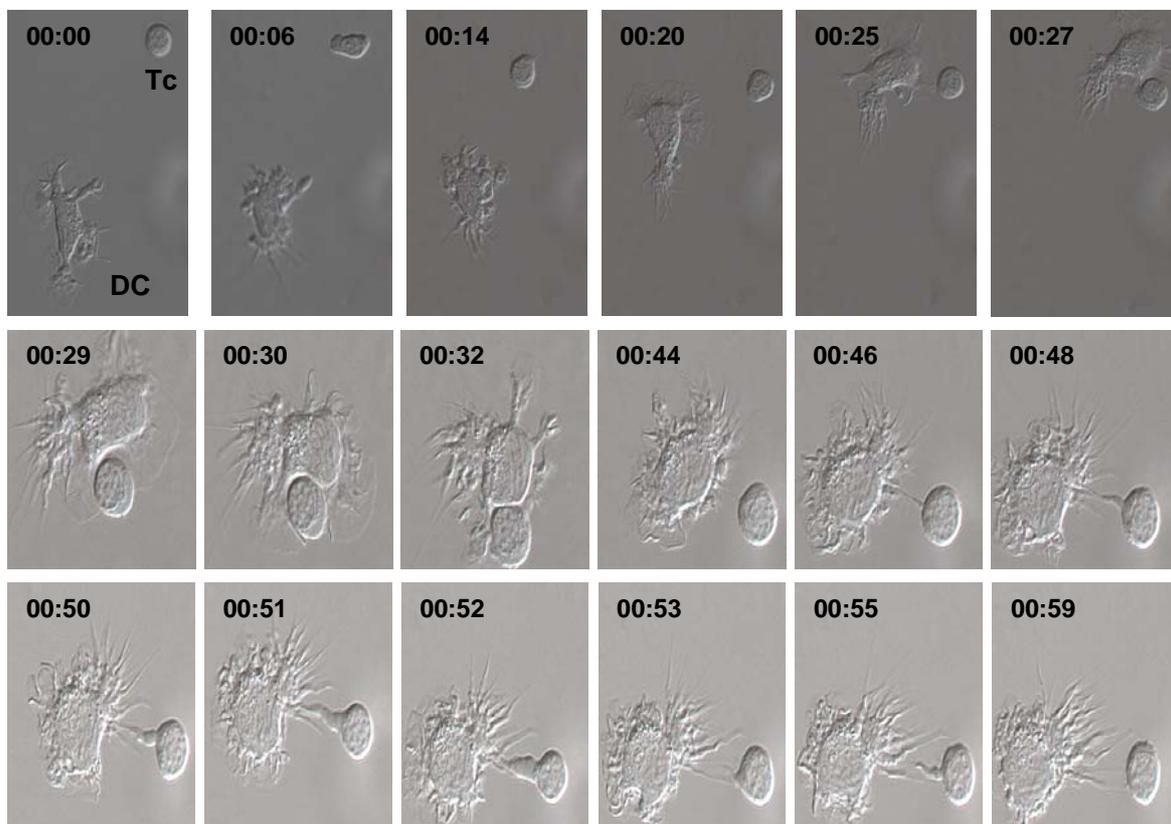


Abb. 3.2.14: Migration und Interaktion reifer Dendritischer Zellen mit naiven T-Zellen. Reife DC wurden mit allogenen naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert und die Migration und Interaktion der Zellen durch mikroskopische Zeitrafferaufnahmen verfolgt. DC, T-Zellen (Tc) sowie der jeweilige Zeitpunkt der Aufnahme sind angezeigt.

Eine detailliertere Darstellung der sich bei der Interaktion ausbildenden Cluster aus DC und einer oder mehreren T-Zellen ist in Abb. 3.2.15 nach Anreicherung der Cluster durch Sedimentation in 50% FCS anhand mehrerer Beispiele gezeigt.

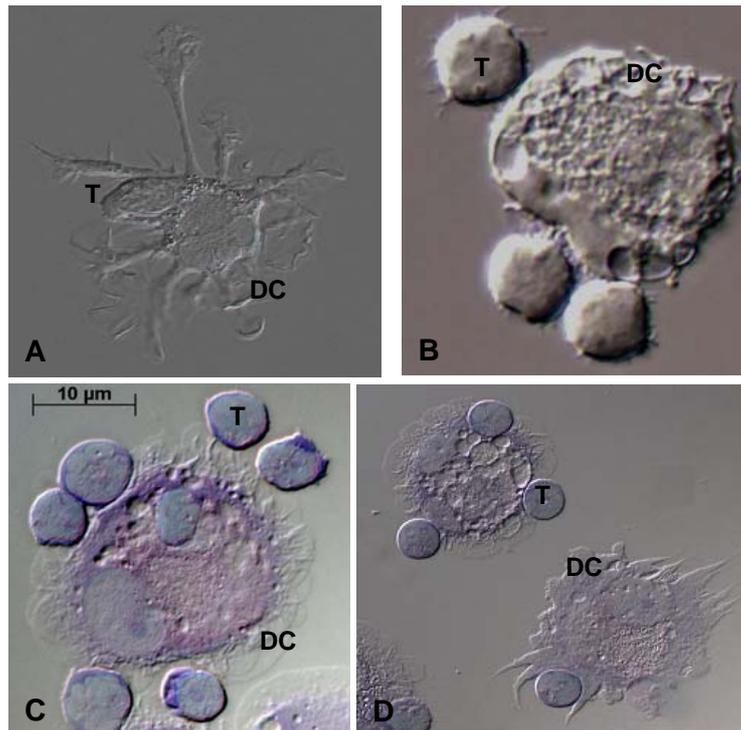


Abb. 3.2.15: Clusterbildung der in CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zelle eines Gliompatienten mit allogene naiven T-Zellen. Reife DC (DC) und naive T-Zellen (T) aus Nabelschnurblut wurden kokultiviert und direkt (A) oder nach Anreicherung der Cluster durch einen FCS-Gradienten (B-D) nativ (A, B) oder nach May-Grünwald-Färbung (C, D) mikroskopisch dargestellt.

3.2.7 In vitro Induktion einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort mit TH1-Polarisierung

Da das serumfreie Verfahren es gestattet, effizient sequentiell unreife und reife funktionelle Dendritische Zellen von Gliompatienten zu generieren, wurde als nächstes geprüft, ob mit Tumormaterial (abgetötete, nekrotische Tumorzellen, s. 3.2.4.2) in vitro eine gegen Tumorantigene gerichtete T-Zell-Antwort induziert werden kann. Hierzu wurden zunächst unreife DC eines Patienten generiert, diese mit nekrotischen Zellen seines Tumors beladen und dann ausgereift. Mit den reifen, beladenen DC wurden autologe T-Zellen (CD3+ Reinheit 96,6%) für 6 Tage stimuliert. Nach einer Vermehrungsphase der stimulierten T-Zellen mit IL-2 und IL-7 für zwei Wochen erfolgte dann eine Restimulation mit Tumormaterial-beladenen oder nicht-beladenen DC (Kontrolle) und die Analyse der proliferativen Antwort. Wie in Abb. 3.2.16 gezeigt, konnte eine eindeutige Tumorantigen-spezifische Antwort

nachgewiesen werden. So lag der BrdU-Einbau nach Restimulation mit Tumormaterial-beladenen DC signifikant über dem nach Restimulation mit unbeladenen DC ($p=0,002$), der sich auf dem selben Niveau bewegte wie die Kontrollen aus nicht-stimulierten T-Zellen und DC ohne die Zugabe von T-Zellen, d.h. zum Einen konnte eine Tumorantigen-spezifische Antwort induziert werden, zum Anderen traten dabei keine Autoreaktionen gegen Antigene der zur Induktion der Antwort eingesetzten autologen Dendritischen Zellen auf.

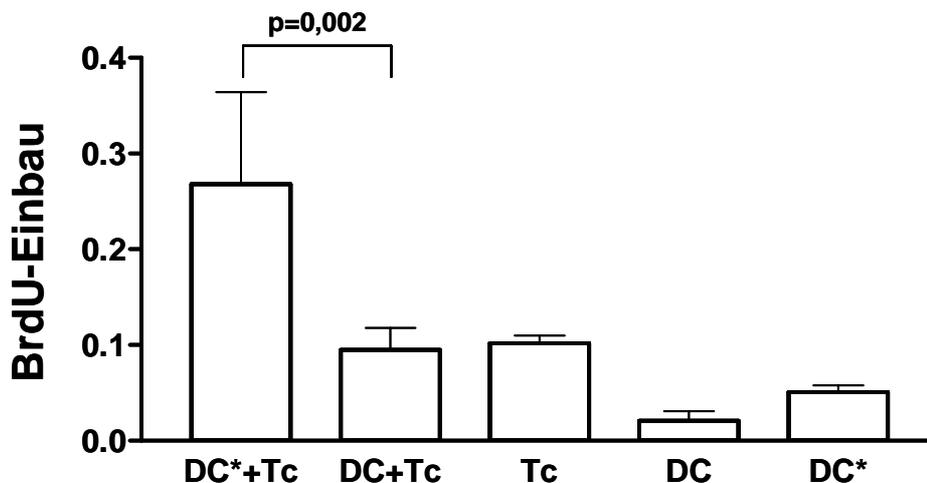


Abb. 3.2.16: Induktion einer Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antwort durch reife, Tumormaterial-beladene Dendritische Zellen. Unreife Dendritische Zellen eines Gliompatienten wurden mit seinen abgetöteten, nekrotischen Tumorzellen beladen, ausgereift und dann eingesetzt, um T-Zellen des Patienten zu stimulieren. Nach einer zusätzlichen Vermehrungsphase mit IL-2 und IL-7 erfolgte dann der Nachweis der proliferativen Antwort auf Restimulation mit beladenen (DC*+Tc) oder unbeladenen (DC+Tc) Dendritischen Zellen. T-Zellen (Tc) und DC alleine (DC, DC*) dienen als weitere Kontrollen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SD von Triplikaten. Statistische Signifikanz (t-Test) ist angezeigt.

Um zu bestimmen, welcher Effektor Typ einer T-Zell-Antwort (TH1/TH2) nach spezifischer Restimulation induziert wurde, wurde durch intrazytoplasmatische Färbung und durchflusszytometrische Analyse die Expression der Cytokine IL-2, IL-4 und IFN γ gemessen. Diese Analyse belegte die Induktion einer TH1 Antwort (Abb. 3.2.17A): 11,4% der Zellen exprimierten IL-2 und 11,6% IFN γ bei praktisch abwesender Expression von IL-4 (1,8%).

Auch der IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.2.17B, C) bestätigte die Produktion von IFN γ und belegte darüber hinaus die Spezifität der Antwort: bei 10^5 und 2×10^5 eingesetzten T-Zellen wurden nach spezifischer Restimulation $67,2 \pm 10,3$ und $141,3 \pm 7,4$ IFN γ -Spots

ausgezählt. Nach Restimulation mit unbeladenen DC lagen die entsprechenden Werte signifikant niedriger: $6,3 \pm 0,8$ ($p < 0,001$) und $14,3 \pm 1,7$ ($p < 0,001$) IFN γ -Spots.

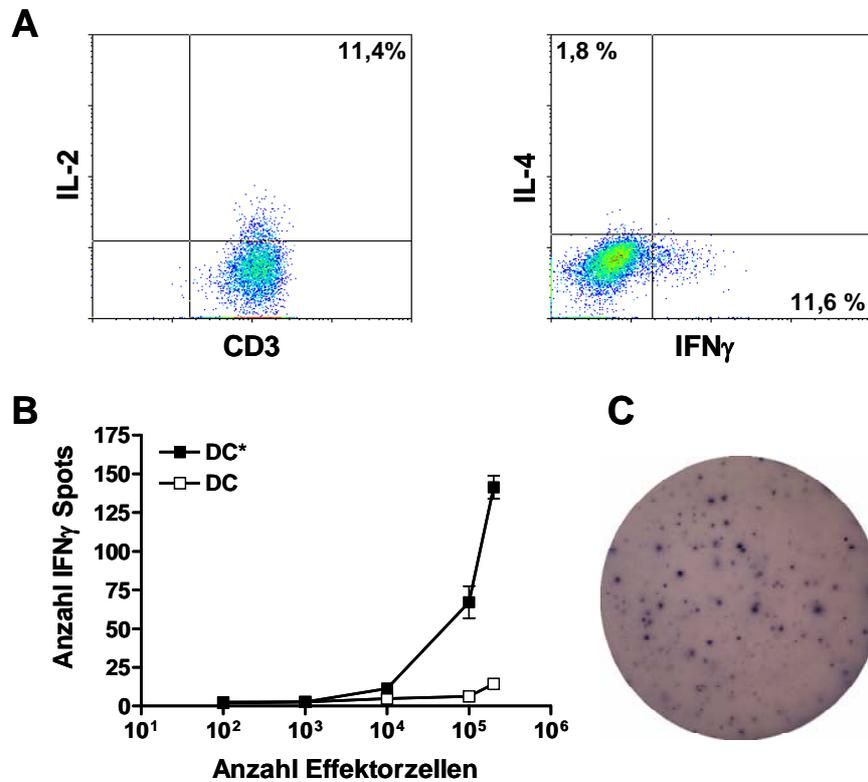


Abb. 3.2.17: Cytokinexpression nach Induktion einer Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Nach Restimulation (wie in Abb. 3.2.16 beschrieben) wurden die Frequenzen IL-2, IL-4 und IFN γ produzierender T-Zellen durch intrazytoplasmatische Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt (A). Quadranten wurden entsprechend von Isotypkontrollen gesetzt, die Frequenzen positiver Zellen sind angezeigt. Für ELISPOT-Assays wurden unterschiedliche Anzahlen an T-Zellen mit beladenen (DC*) oder unbeladenen DC in ELISPOT 96-Well Platten 20h stimuliert, die Färbungen entwickelt und die Anzahl an Spots ausgezählt (B). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=6. Ein typisches ELISPOT-Well ist in (C) dargestellt.

3.3 Mechanismen der Interferenz von Gliomzellen mit der durch Dendritische Zellen vermittelten Immunität

Tumorzellen verfügen häufig über Strategien, die es ihnen gestatten, einer gegen sie gerichteten Immunantwort zu entgehen, sogenannte *Immune Escape Mechanismen*. Um zu prüfen, ob von Gliomzellen Faktoren sezerniert werden, die einen Einfluss auf die durch Dendritische Zellen induzierte, von T-Zellen vermittelte adaptive Immunität haben, wurde der Effekt von durch die Gliomzelllinien U373 und A172 konditionierten Medien (CM) auf Dendritische Zellen und T-Zellen hinsichtlich folgender Parameter untersucht:

- Einfluss auf Dendritische Zellen:
 - Differenzierung/Ausreifung
 - Expression immunrelevanter Membranproteine reifer DC
 - Cytokinproduktion reifer DC
 - Antigenaufnahmeaktivität unreifer DC
 - T-Zell-stimulatorische Aktivität reifer DC

- Einfluss auf T-Zellen:
 - Proliferation und Polarisierung

Experimentelles System

Nach der immunmagnetischen Anreicherung von CD14+ Monozyten (CD14+ Reinheit: $98,2 \pm 0,2\%$; $n=44$) wurden diese in CellGroDC Medium in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 innerhalb von sechs Tagen zu unreifen DC differenziert und durch Zugabe von zusätzlich $\text{TNF}\alpha$ für weitere drei Tage zu reifen DC ausgereift. Um den Einfluss von A172- oder U373-konditioniertem Medium zu untersuchen, wurde dieses den Differenzierungs-/Ausreifungskulturen in verschiedenen Konzentrationen von Beginn an zugegeben und mit jedem Mediumwechsel ergänzt. Unreife und reife DC, welche in der Anwesenheit oder Abwesenheit von konditioniertem Medium generiert worden waren, wurden dann phänotypisch und funktionell verglichen. Dieses experimentelle Vorgehen ist in Abb. 3.3.1 schematisch dargestellt.

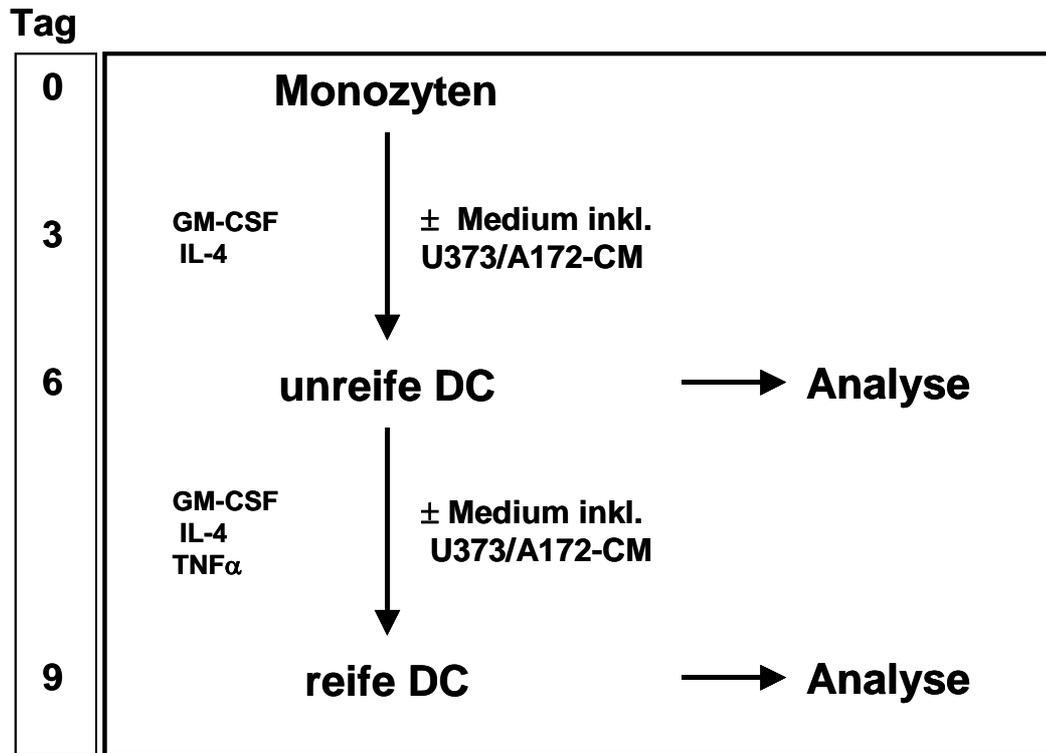


Abb. 3.3.1: Experimentelles System. Differenzierung und Ausreifung von Dendritischen Zellen aus Monozyten in der Gegenwart oder Abwesenheit konditionierten Mediums der Gliomzelllinien U373 und A172.

3.3.1 Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen

Um den Einfluss der gliomzellkonditionierten Medien auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen zu untersuchen, wurde die Expression des Monozytenmarkers CD14 und des Markers für reife DC, CD83, im 9-tägigen Kulturverlauf in der Gegenwart oder Abwesenheit der konditionierten Medien durchflusszytometrisch untersucht. In Abb. 3.3.2A ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse dargestellt, in Abb. 3.3.2B die graphische Auswertung des Verlaufs der Expression in der Abwesenheit oder in der Gegenwart von 40% U373-konditioniertem Medium ($n \geq 5$). Bereits nach drei Tagen war eine Reduktion der Herunterregulation von CD14 in der Gegenwart von 40% U373-CM zu beobachten ($76,3 \pm 2,6\%$ vs. $41,9 \pm 15,9\%$; ns), die sich über die Zeitpunkte Tag 6 ($47,6 \pm 4,2\%$ vs. $5,5 \pm 1,6\%$; $p < 0,001$) und Tag 9 ($31,3 \pm 7,6\%$ vs. $1,3 \pm 0,6\%$; $p < 0,001$) fortsetzte. Gleichermäßen war die Induktion von CD83 in der Gegenwart von 40% U373-CM signifikant reduziert ($10,1 \pm 3,2\%$ vs. $68,7 \pm 5,7\%$; $p < 0,001$).

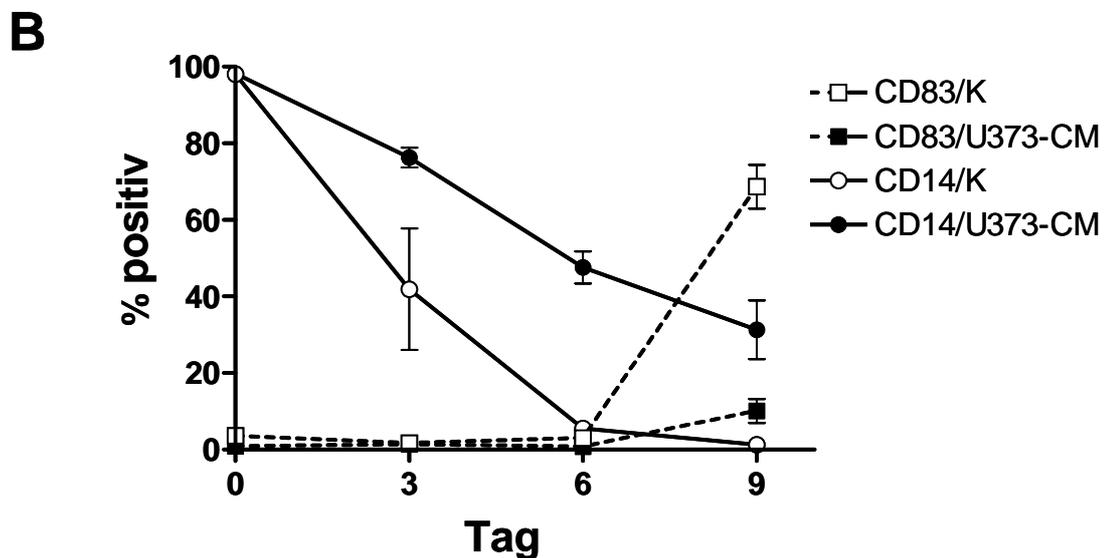
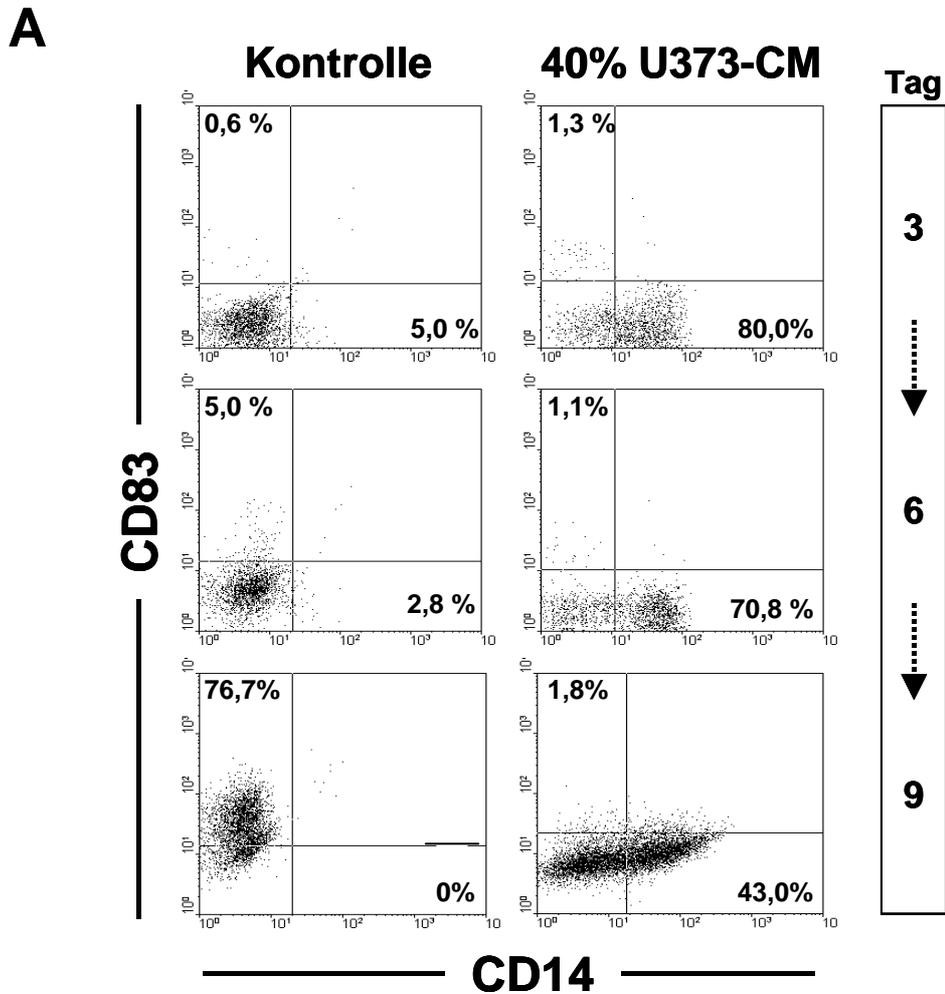


Abb. 3.3.2: Vergleich des Verlaufs der Differenzierung Dendritischer Zellen in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 40% U373 konditioniertem Medium. Dendritische Zellen wurden aus Monozyten differenziert und ausgereift. Nach 3, 6 und 9 Tagen Kultur wurde die Expression von CD14 und CD83 durchflusszytometrisch bestimmt (A). Quadranten wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt. Frequenzen CD14+ und CD83+ Zellen sind angegeben. Von mindestens 5 unabhängigen Experimenten wurden Mittelwert \pm SEM des Anteils an CD14+ und CD83+ Zellen bestimmt (B). K: Kontrolle, U373-CM: 40% U373 konditioniertes Medium.

Wurde die Konzentration des U373-CM während der Differenzierung/Ausreifung variiert (10, 20 und 40%), so konnte eine dosisabhängige Inhibition der Herunterregulierung der Expression von CD14 wie auch der Induktion von CD83 nach 9 Tagen Kultur beobachtet werden (Abb. 3.3.3). Bei einer Konzentration von 40% lag die normalisierte relative Expression von CD14 (bezogen auf Kontrolle=1) bei $42,7 \pm 4,9$ ($p < 0,001$; $n=8$), die von CD83 bei $0,19 \pm 0,04$ ($p < 0,001$; $n=8$).

Für A172-CM wurden ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen beobachtet (Abb. 3.3.3). Nach 9 Tagen lag bei einer Konzentration des A172-CM von 40% die relative Expression von CD14 bei $41,9 \pm 12,3$ ($p < 0,001$; $n=7$), die von CD83 bei $0,10 \pm 0,01$ ($p < 0,001$; $n=7$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst.

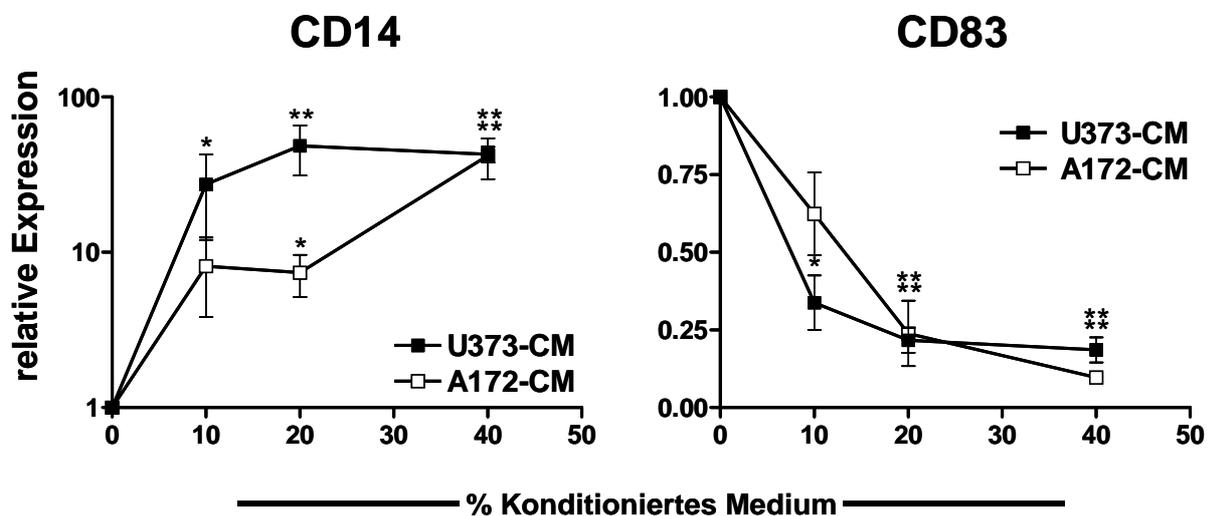


Abb. 3.3.3: Dosisabhängigkeit des Einflusses konditionierter Medien der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Expression von CD14 und CD83 nach Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit oder in der Gegenwart von 10, 20 oder 40% U373-CM oder A172-CM generiert und nach 9 Tagen die Frequenz an CD14+ und CD83+ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Werte wurden normiert (Kontrolle=1) und die relative Expression in der Gegenwart der konditionierten Medien berechnet. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n \geq 4$. Statistische Signifikanz (CM vs. Kontrolle) wurde mit dem paired t-Test für die nicht-normalisierten Werte ermittelt und ist angezeigt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Um zu prüfen, ob die reduzierte Expression von CD83 in der Gegenwart von gliomzellkonditioniertem Medium auf eine verstärkte Bildung der löslichen Form zurückzuführen ist, wurde parallel zur durchflusszytometrischen Oberflächenanalyse ein ELISA für die lösliche Form mit dem Medium, in dem die DC generiert worden waren, durchgeführt. Wie in Abb. 3.3.4 dargestellt, gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression und der Bildung der löslichen Form, d.h. bei höherer Oberflächenexpression wird auch mehr lösliches CD83

gebildet. Die Menge an löslichem CD83 ist, analog zur Oberflächenexpression, in der Gegenwart von gliomzellkonditioniertem Medium ebenfalls reduziert, weshalb eine Verschiebung von einer Oberflächenexpression hin zur Bildung der löslichen Form nicht für die Reduktion der CD83 Expression durch U373- und A172-CM (Daten nicht gezeigt) verantwortlich ist.

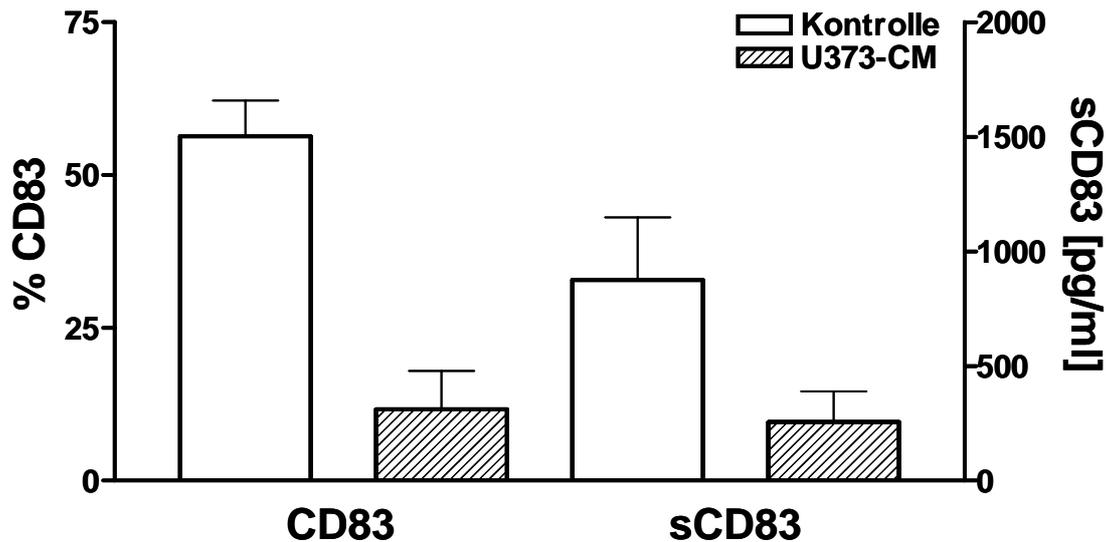


Abb. 3.3.4 Oberflächenexpression und Bildung von löslichem CD83 nach Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Dendritische Zellen wurden in der Gegenwart oder Abwesenheit von 20% U373-CM generiert. Nach 9 Tagen wurde die Oberflächenexpression von CD83 durchflusszytometrisch, die Bildung von löslichem CD83 (sCD83) durch ELISA (DC-konditioniertes Medium) bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=5.

Ein Einfluss der konditionierten Medien auf die Vitalität der Zellen (Abb. 3.3.5) konnte nicht festgestellt werden. Die normalisierte relative Vitalität nach 9 Tagen (Kontrollkulturen: $88,2\pm 1,8\%$; n=39) betrug $0,79\pm 0,08$ (n=10) für 40% U373-CM bzw. $0,87\pm 0,07$ (n=8) für 40% A172-CM. Im Gegensatz hierzu führten die konditionierten Medien jedoch zu einer leichten Erhöhung der zellulären Ausbeute. Die mittlere zelluläre Ausbeute der Kontrollkulturen lag bei $21,9\pm 1,3\%$ der eingesetzten Monozyten, die normalisierte relative Ausbeute für U373-CM bei $1,64\pm 0,22$ (n=9) und für A172-CM bei $1,58\pm 0,33$ (n=8). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst.

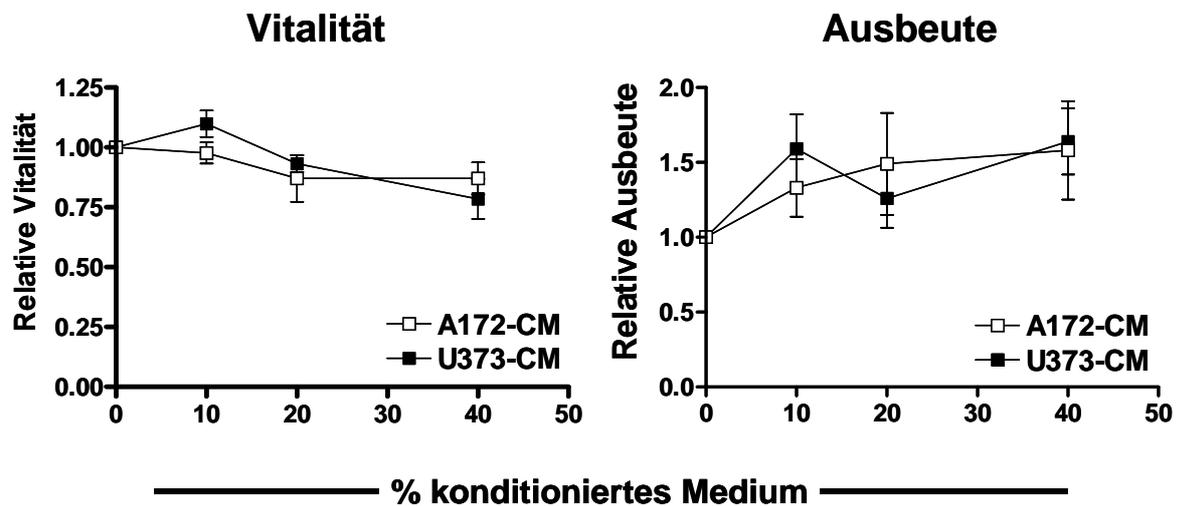


Abb. 3.3.5: Einfluss konditionierter Medien der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Vitalität und Ausbeute nach Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit oder in der Gegenwart von 10, 20 oder 40% U373-CM oder A172-CM generiert. Nach 9 Tagen wurde die Vitalität und zelluläre Ausbeute bestimmt. Werte wurden normiert (Kontrolle=1) und die relative Vitalität bzw. Ausbeute in der Gegenwart der konditionierten Medien berechnet. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n \geq 8$.

3.3.2 Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Expression immunrelevanter Moleküle durch reife Dendritische Zellen

Um den Einfluss der gliomzellkonditionierten Medien auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Expression immunrelevanter costimulatorischer Moleküle (CD40, CD80 und CD86), HLA-Moleküle (HLA-ABC, HLA-DR) und Adhäsionsmoleküle (CD50, CD54, CD58) auf reifen DC analysiert. Abbildung 3.3.6 zeigt eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse, Abb. 3.3.7 fasst die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten für U373-CM und A172-CM zusammen.

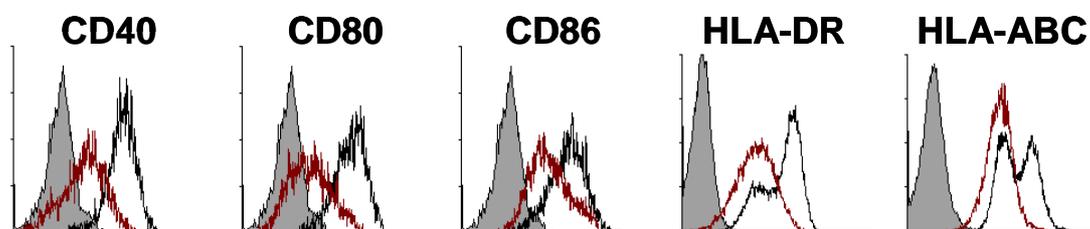


Abb. 3.3.6: Einfluss von U373-CM auf die Expression immunrelevanter Moleküle auf reifen Dendritischen Zellen. Reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit (---) oder Gegenwart (---) von 20% U373-CM generiert und die Expression von CD40, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-ABC durchflusszytometrisch bestimmt. Grau hinterlegte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrolle

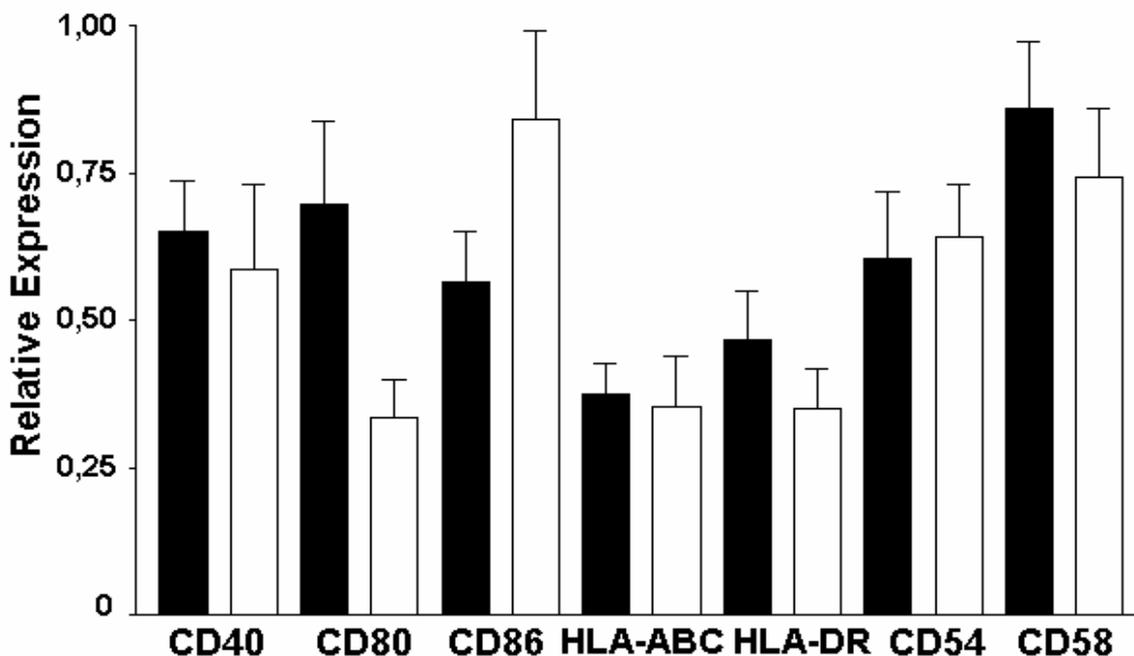


Abb. 3.3.7: Einfluss von gliomzellkonditionierten Medien auf die Expression von immunrelevanten Molekülen auf reifen Dendritischen Zellen. Reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit oder in der Gegenwart von 40% U373-CM (■) oder 40% A172-CM (□) generiert und die Expression von CD40, CD80, CD86, HLA-ABC, HLA-DR, CD54 und CD58 durchflusszytometrisch bestimmt. Mittlere Fluoreszenzintensitäten wurden normalisiert (Kontrolle=1). Werte repräsentieren Mittelwert±SEM der normalisierten relativen Expression für $n \geq 3$.

Diese Analysen zeigten, dass 40% U373-CM eine signifikante Reduktion der Expression von CD40 ($0,65 \pm 0,09$; $p=0,009$; $n=6$), CD86 ($0,56 \pm 0,08$; $p=0,013$; $n=6$), HLA-ABC ($0,38 \pm 0,05$; $p < 0,001$; $n=8$) und HLA-DR ($0,47 \pm 0,08$; $p=0,019$; $n=8$) verursacht. Auch die Expression von CD80 ($0,70 \pm 0,14$; ns; $n=4$) und CD54 ($0,60 \pm 0,11$; ns; $n=4$) waren tendenziell reduziert.

A172-CM (40%) hemmte ebenfalls die Expression von HLA-ABC ($0,35 \pm 0,09$; $p=0,019$; $n=4$) und HLA-DR ($0,35 \pm 0,07$; $p=0,012$; $n=4$) sowie die von CD80 ($0,33 \pm 0,07$) signifikant und induzierte eine tendenzielle Reduktion von CD40 ($0,65 \pm 0,14$; ns; $n=3$) und CD54 ($0,64 \pm 0,09$; ns; $n=3$). Im Gegensatz zu U373-CM konnte für A172-CM ($0,84 \pm 0,15$; ns; $n=4$) jedoch keine Reduktion der CD86 Expression ($n=4$) beobachtet werden.

Beide gliomzellkonditionierten Medien hatten keinen Effekt auf die CD58 Expression ($n \geq 3$) und entgegen der zuvor beschriebenen inhibitorischen Effekte, führten U373-CM ($4,3 \pm 1,6$; $p=0,036$; $n=4$) und A172-CM ($3,6 \pm 1,0$; $p=0,015$; $n=4$) zu einer

verstärkten Expression von CD50 (Abb. 3.3.8). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.3.2 zusammengefasst.

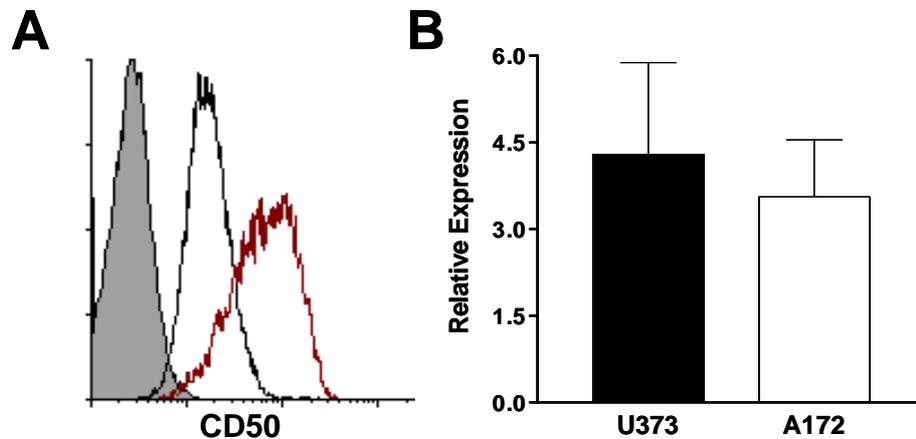


Abb. 3.3.8: Einfluss gliomzellkonditionierter Medien auf die CD50 Expression reifer Dendritischer Zellen. Reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit (---) oder in der Gegenwart von 20% U373-CM (A, ---), 40% U373-CM (B, ■) oder 40% A172-CM (B, □) generiert und die Expression von CD50 durchflusszytometrisch bestimmt. Grau hinterlegte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrolle (A). Mittlere Fluoreszenzintensitäten (B) wurden normalisiert (Kontrolle=1). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM der normalisierten relativen Expression für n=4.

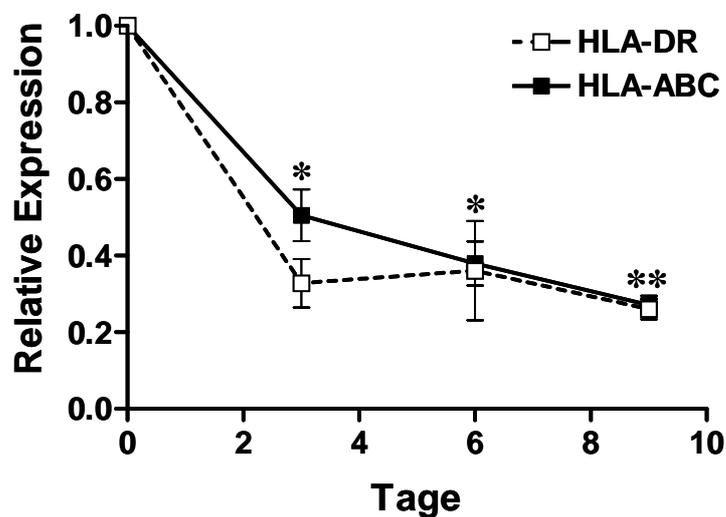


Abb. 3.3.9: HLA-Expression im Verlauf der Differenzierung Dendritischer Zellen in der Gegenwart von U373-CM. Monozyten (Tag 0) wurden über unreife DC (Tag 6) zu reifen DC (Tag 9) in der Abwesenheit oder Gegenwart von 40% U373-CM differenziert und die Expression von HLA-ABC und HLA-DR durchflusszytometrisch verfolgt. Mittlere Fluoreszenzintensitäten wurden für jeden Tag normalisiert (Kontrolle=1). Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n=3. Statistische Signifikanz wurde für die nicht-normalisierten Werte mit dem paired t-Test ermittelt und ist angezeigt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

HLA-Moleküle werden bereits von Monozyten exprimiert, ihre Expression nimmt jedoch mit der Differenzierung und Ausreifung der Monozyten zu Dendritischen Zellen zu. Wenn die HLA-Klasse I und II Expression im Verlauf der Differenzierung/Ausreifung in der Gegenwart von U373-CM analysiert wurde (Abb. 3.3.9), zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrollkultur bereits nach 3 Tagen eine signifikante Reduktion der Stärke der HLA-Expression, die sich über die Tage 6 und 9 fortsetzte, d.h. die gliomzellkonditionierten Medien entfalten ihren Effekt bereits früh in der Differenzierung/Ausreifung von Monozyten zu Dendritischen Zellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.3 zusammengefasst.

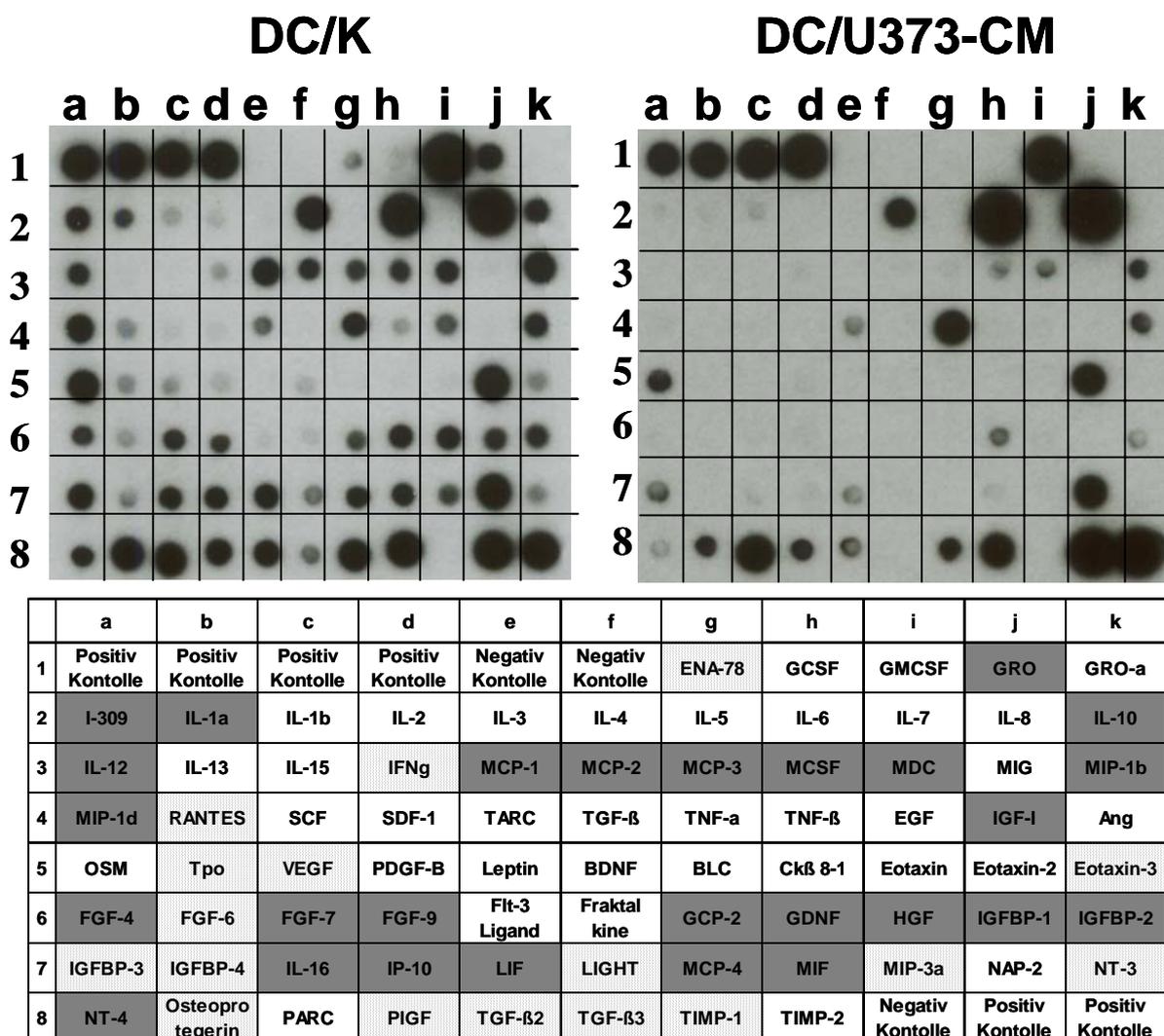


Abb. 3.3.10: Cytokin- und Chemokinexpressionsprofil reifer Dendritischer Zellen. Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit (DC/K) oder in der Gegenwart von 20% U373-CM (DC/U373-CM) generiert. Nach 9 Tagen wurde das durch die reifen DC konditionierte Medium durch einen Protein-Array analysiert (n=2). Die der jeweiligen Position entsprechenden Cytokine/Chemokine sind angegeben. Kein Unterschied zwischen DC/K und DC/U373-CM ist durch weiß hinterlegte Felder gekennzeichnet, eine schwache Reduktion durch gepunktete Felder und eine starke Reduktion durch U373-CM durch grau hinterlegte Felder.

Neben Oberflächenmolekülen spielen auch sezernierte Faktoren eine wichtige Rolle für die funktionelle Aktivität reifer Dendritischer Zellen. Insbesondere die Expression von für T-Zellen chemoattraktiven Chemokinen und von polarisierenden Cytokinen sind dabei von zentraler Bedeutung. Deshalb wurde der Einfluss der gliomzellkonditionierten Medien auf die Produktion solcher Faktoren durch reife DC durch eine Protein-Array Analyse bestimmt.

Wie in Abb. 3.3.10 dargestellt führt die Gegenwart von 20% U373-CM zu einem deutlichen Unterschied im Profil der durch den Protein-Array nachweisbaren Faktoren. So zeigten DC, die in Gegenwart des konditionierten Mediums generiert worden waren im Vergleich zur Kontrollkultur keine Expression mehr der für die Anlockung, Stimulation und Polarisierung von T-Zellen wichtigen Chemokine MCP-1,-2,-3, IL-16, MIP-1 δ , MIP-1 β , IP-10 und RANTES sowie I-309, MIP-3 α und MDC und der Cytokine IL-12, IL-1 α , IL-10 und M-CSF. Die Liganden, ihre Rezeptoren und ihre vollständige Namen sind in Tabelle 3.3.4 zusammengefasst.

3.3.3 Einfluss der Gliomzelllinien U373 und A172 auf die Antigenaufnahme-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen

Unreife Dendritische Zellen sind durch eine gut entwickelte Antigenaufnahme-Aktivität charakterisiert. Um zu prüfen, ob unreife DC, die in der Gegenwart der gliomzellkonditionierten Medien generiert worden waren, auch funktionell beeinträchtigt sind, wurde ihre Pinozytose-Aktivität verglichen. Hierzu wurden die unreifen DC in An- bzw. Abwesenheit von 40% A172-CM bzw. U373-CM generiert, die Kulturen am Tag 6 geerntet und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von FITC-konjugiertem BSA inkubiert. Die Aufnahme von FITC-BSA wurde dann durchflusszytometrisch über die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.3.11 dargestellt.

Die in Gegenwart von 40% U373-CM differenzierten Zellen zeigten eine signifikante Reduktion der Pinozytose-Aktivität (MFI100 μ g/ml: 66,0 \pm 3,1 vs. 34,9 \pm 4,4; p=0,031; n=3). Trotz vergleichbarem Phänotyp der in U373-CM und A172-CM generierten Zellen (50,6 \pm 5,7% CD14+ vs. 46,9 \pm 12,4% CD14+; keine Expression von CD83) wurde dagegen keine Inhibition der Pinozytose-Aktivität durch A172-CM induziert (Abb. 3.3.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.5 zusammengefasst.

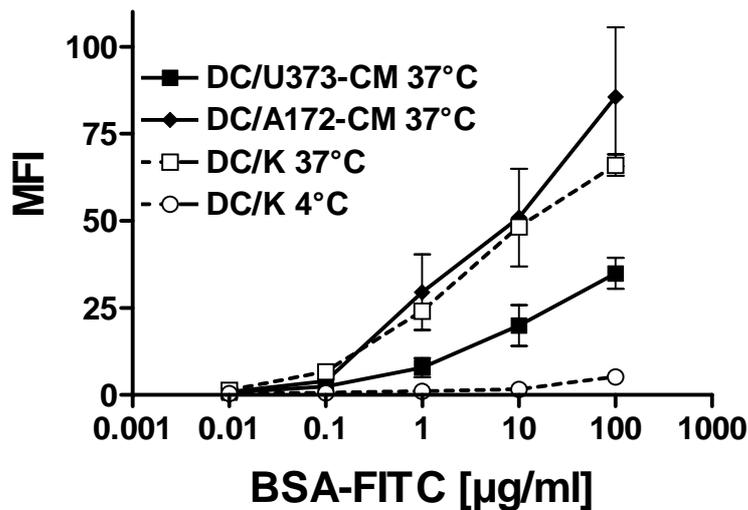


Abb. 3.3.11: Pinozytose-Aktivität unreifer Dendritischer Zellen. Unreife Dendritische Zellen wurde durch 6-tägige Kultur in der Abwesenheit oder Gegenwart von 40% U373-CM oder A172-CM generiert. Die Aufnahme von BSA-FITC wurde für verschiedene Konzentrationen durchflusszytometrisch nach einstündiger Inkubation bei 37°C bestimmt. Negativkontrollen für den aktiven Aufnahmeprozess wurden bei 4°C anstelle von 37°C inkubiert. Werte repräsentieren Mittelwert±SEM für n≥2.

3.3.4 Einfluss der Gliomzelllinie U373 auf die T-Zell-stimulatorische Aktivität von reifen Dendritischen Zellen

Um die Funktionalität der in der Gegenwart von gliomzellkonditioniertem Medium generierten reifen DC zu untersuchen, wurde zum Einen ihr Vermögen als potente Stimulatoren für eine Alloantwort naiver T-Zellen zu fungieren, zum Anderen ihre Fähigkeit, eine polarisierte Cytokin-Antwort allogener, naiver T-Zellen zu induzieren bestimmt.

3.3.4.1 Proliferative Alloantwort

Zum Nachweis der allostimulatorischen Aktivität reifer Dendritischer Zellen wurden diese mit allogenen, naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert und als Maß für die proliferative Antwort der T-Zellen nach 6 Tagen der BrdU-Einbau gemessen. Wie in Abb. 3.3.12 dargestellt, inhibierte die Gegenwart von U373-CM während der Differenzierung/Ausreifung der Dendritischen Zellen dosisabhängig die Fähigkeit der Dendritischen Zellen eine proliferative Alloantwort von T-Zellen zu induzieren. Bei einer Konzentration von 40% betrug die Inhibition $88,7 \pm 4,2\%$ (n=9).

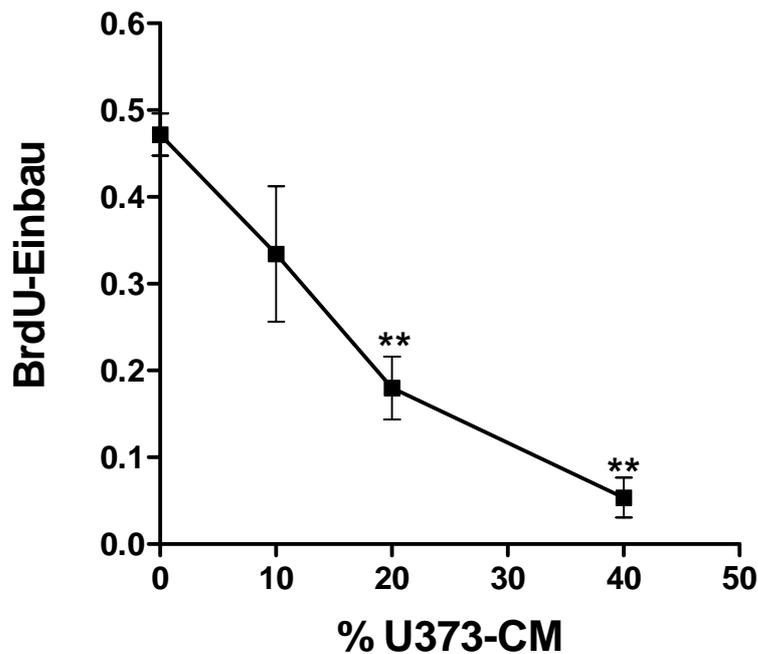


Abb. 3.3.12: Dosisabhängige Inhibition der allostimulatorischen Aktivität reifer Dendritischer Zellen durch U373-CM. Reife Dendritische Zellen, die in der Abwesenheit oder Gegenwart von 10, 20 oder 40% U373-CM generiert worden waren, wurden mit allogenen, naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert. Nach 6 Tagen wurde der BrdU-Einbau gemessen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n \geq 6$. Statistische Signifikanz wurde durch den paired t-Test ermittelt und ist angezeigt (** $p \leq 0,01$).

3.3.4.2 Polarisierung der Cytokin-Antwort auf Allostimulation

Um zu prüfen, ob U373-CM die DC-induzierte T-Zell-Polarisierung (TH1/TH2) beeinflusst, wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20% U373-CM generierte reife DC mit allogenen, naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut für 6 Tage kokultiviert. Nach Restimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 wurde die Expression von IL-2, IL-4 und IFN γ durch intrazytoplasmatisch Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Abbildung 3.3.13 zeigt eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse, Abb. 3.3.14 fasst die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten zusammen.

Die Dendritischen Zellen führten zu einer TH1-Polarisierung der T-Zell-Antwort (Expression von IL-2 und IFN γ bei gleichzeitiger Abwesenheit von IL-4), wobei die Fähigkeit die Expression von IL-2 ($16,5 \pm 3,8\%$ vs. $6,4 \pm 1,4\%$; $p=0,008$) und IFN γ ($12,2 \pm 2,4\%$ vs. $4,2 \pm 0,9\%$; $p=0,001$) zu induzieren bei DC, die in U373-CM generiert worden waren, deutlich reduziert war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3.6 zusammengefasst.

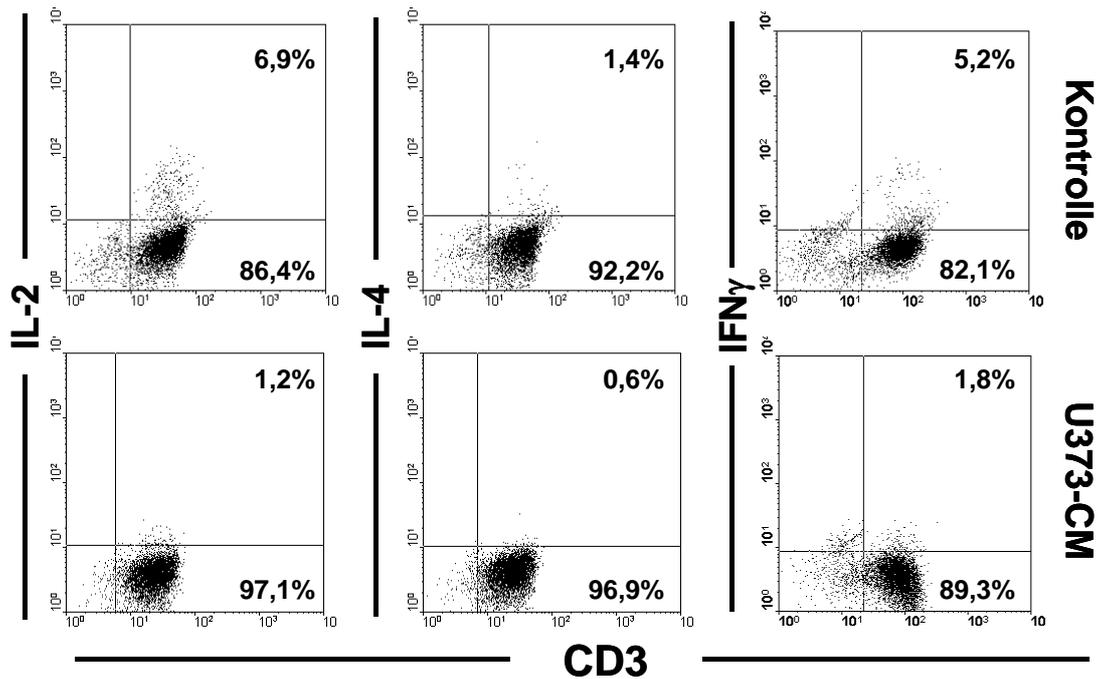


Abb. 3.3.13: Cytokinproduktion allogener, naiver T-Zellen nach Stimulation mit reifen Dendritischen Zellen. DC wurden in der Abwesenheit oder in der Gegenwart von 20% U373-CM generiert und mit allogenen T-Zellen aus Nabelschnurblut kokultiviert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 restimuliert. Nach intrazytoplasmatischer Färbung wurde die Bildung von IL-2, IL-4 und IFN γ durchflusszytometrisch bestimmt. Quadranten wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt. Der Anteil die Cytokine produzierender T-Zellen ist angezeigt.

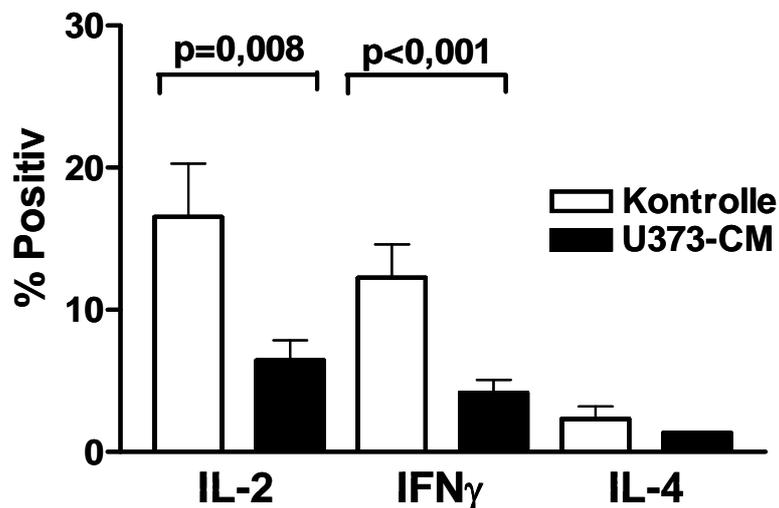


Abb. 3.3.14: Beeinflussung der durch Dendritische Zellen induzierten T_H-Polarisierung durch die Gliomzelllinie U373. Die Cytokinproduktion allogener T-Zellen nach Stimulation mit reifen Dendritischen Zellen, welche in der Abwesenheit oder Gegenwart von 20% U373-CM generiert worden waren, wurde durch intrazytoplasmatische Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für n \geq 3. Statistische Signifikanz wurde mit dem paired t-Test ermittelt und ist angezeigt.

3.3.5 Direkte T-Zell-stimulatorische Aktivität gliomzellkonditionierter Medien

Zum Nachweis direkter Effekte der von Gliomzellen gebildeten Faktoren auf T-Zellen wurde zum Einen die mitogene Aktivität, zum Anderen die Fähigkeit, eine Cytokin-Antwort zu induzieren und polarisieren für gliomzellkonditionierte Medien untersucht.

3.3.5.1 Direkte T-Zell-mitogene Aktivität gliomzellkonditionierter Medien

Um festzustellen, ob U373-CM bzw. A172-CM einen direkten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation haben, wurden naive T-Zellen aus Nabelschnurblut in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an U373-CM oder A172-CM kultiviert und nach drei Tagen die T-Zell-Proliferation bestimmt. Diese Analysen zeigten, dass U373-CM, nicht jedoch A172-CM, eine dosisabhängige T-Zell-Proliferation induziert (Abb. 3.3.15).

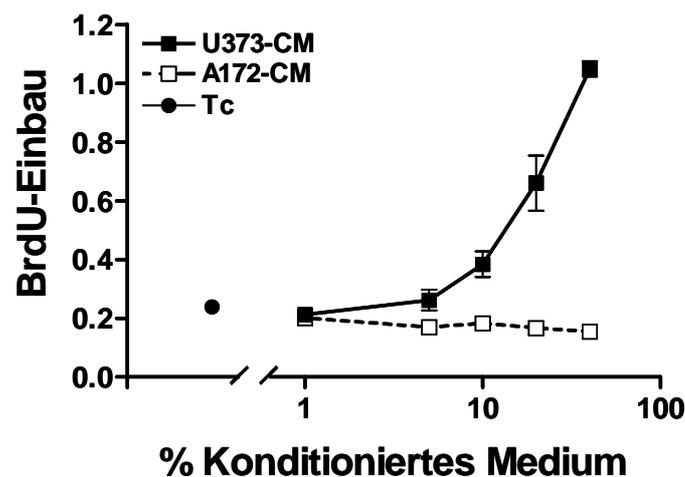


Abb. 3.3.15: T-Zell-mitogene Aktivität gliomzellkonditionierter Medien. Naive T-Zellen aus Nabelschnurblut wurden drei Tage in der An- oder Abwesenheit von U373-CM oder A172-CM kultiviert und der BrdU-Einbau gemessen. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM für $n \geq 12$.

3.3.5.2 Direkte T-Zell-Cytokin-Antwort stimulierende Aktivität gliomzellkonditionierter Medien

Gleichzeitig mit der Induktion der Proliferation (3.3.5.1) wurde die Cytokinexpression der T-Zellen untersucht. Hier führte die Gegenwart von 20% U373-CM zur verstärkten Produktion von IL-4 und IL-10 bei gleichzeitiger Reduktion der IL-2-Expression (Abb. 3.3.16). Eine Bildung von IFN γ konnte dagegen in beiden Kulturansätzen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

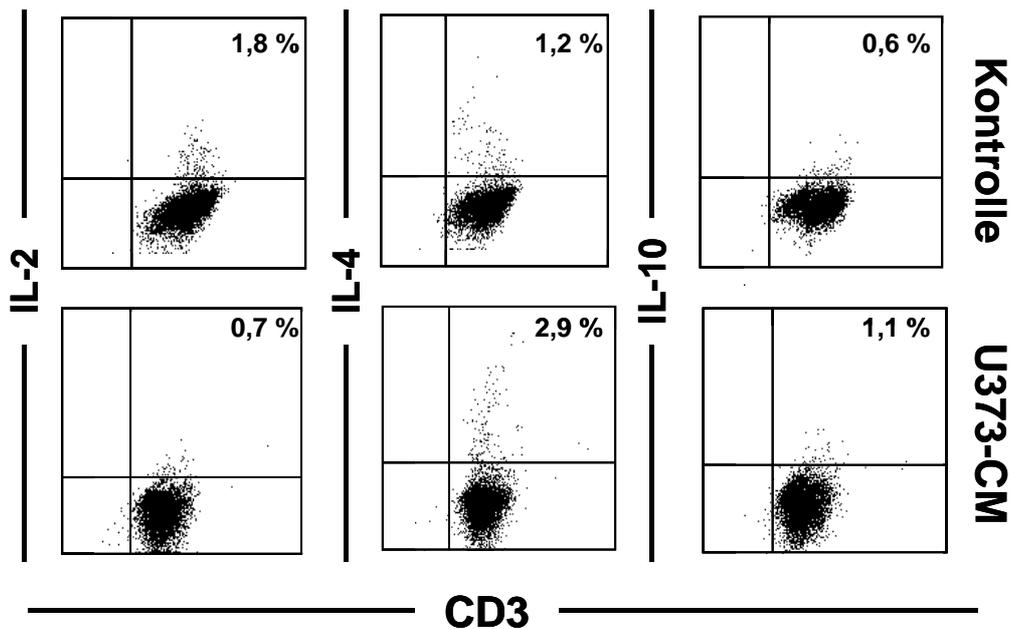


Abb. 3.3.16: Direkter Einfluss von U373-CM auf die Cytokinproduktion naiver T-Zellen. Naive T-Zellen aus Nabelschnurblut wurden drei Tage in der Ab- oder Anwesenheit von 20% U373-CM kultiviert. Nach Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28 wurde die Expression von IL-2, IL-4 und IL-10 durch intrazytoplasmatische Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Quadranten wurden entsprechend der Isotypkontrollen gesetzt. Die Frequenz positiver Zellen ist angezeigt.

3.3.6 Cytokin- und Chemokinexpression der Gliomzelllinien U373 und A172

Um mögliche Faktor-Kandidaten zu identifizieren, welche zu den oben beschriebenen Effekten auf Dendritische Zellen und T-Zellen beitragen, wurde konditioniertes Medium der Gliomzelllinien U373 und A172 durch Multiplex-Analysen und Protein-Arrays untersucht. In Abb. 3.3.17 sind die Ergebnisse der Multiplex-Analysen, in Abb. 3.3.18 der Protein-Arrays dargestellt.

Die Multiplex-Analyse ergab eine substantielle Produktion von VEGF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 für U373, wogegen EGF, FGF, GM-CSF, HGF, IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-15 nicht oder nur in Spuren nachgewiesen werden konnten. A172 zeigte ein ähnliches Profil und unterschied sich von U373 nur durch eine fehlende Expression von IL-1 β und IL-8. Des Weiteren war die Expressionsstärke von VEGF und IL-6 niedriger als bei U373.

Die Protein-Array Analyse von U373 bestätigte die Expression von IL-6 und IL-8 und identifizierte als weitere Kandidaten Oncostatin M (OSM), Leukemia-Inhibitory Factor (LIF) und TGF β 2. Die Expression von VEGF konnte dagegen nicht detektiert werden.

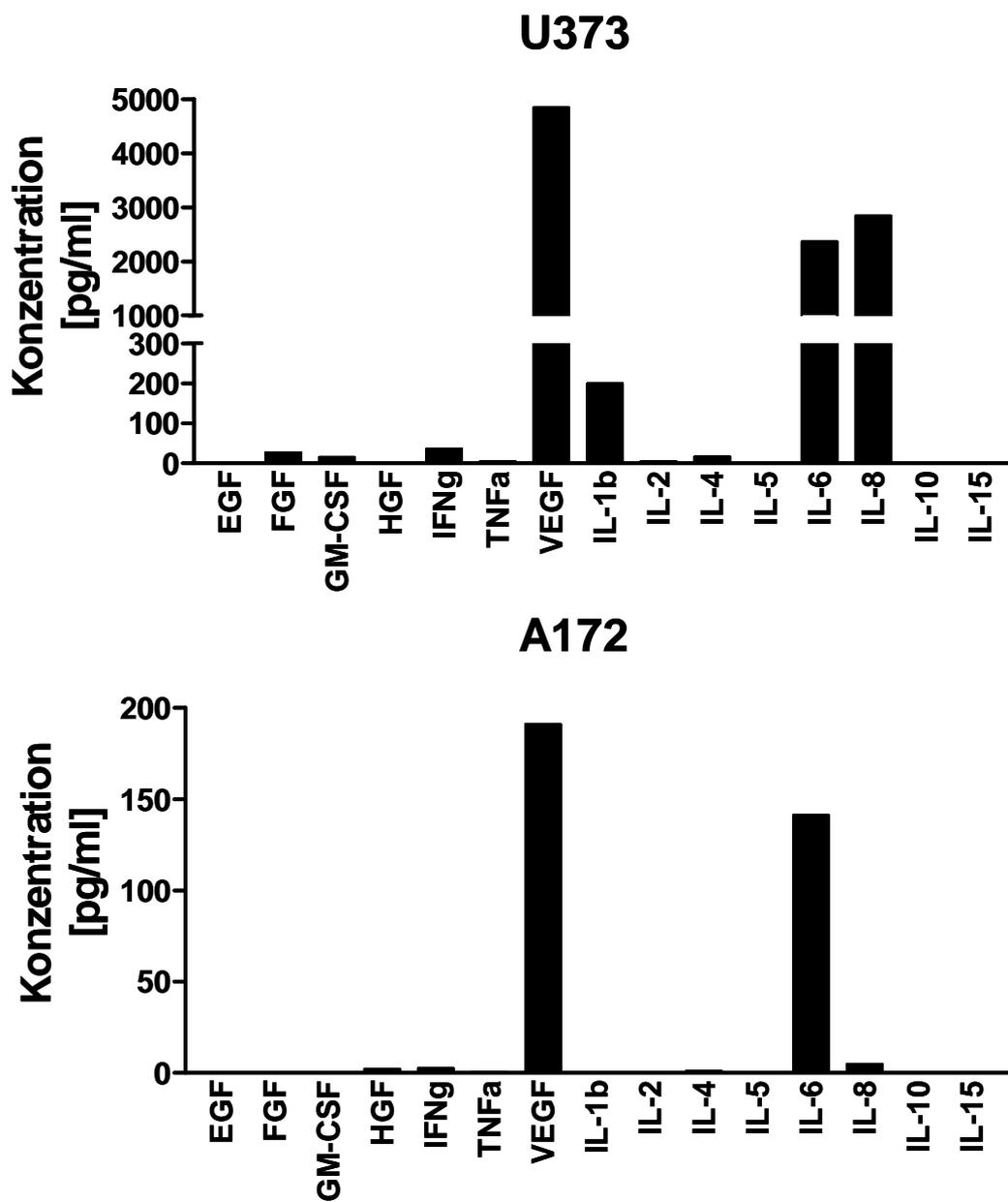
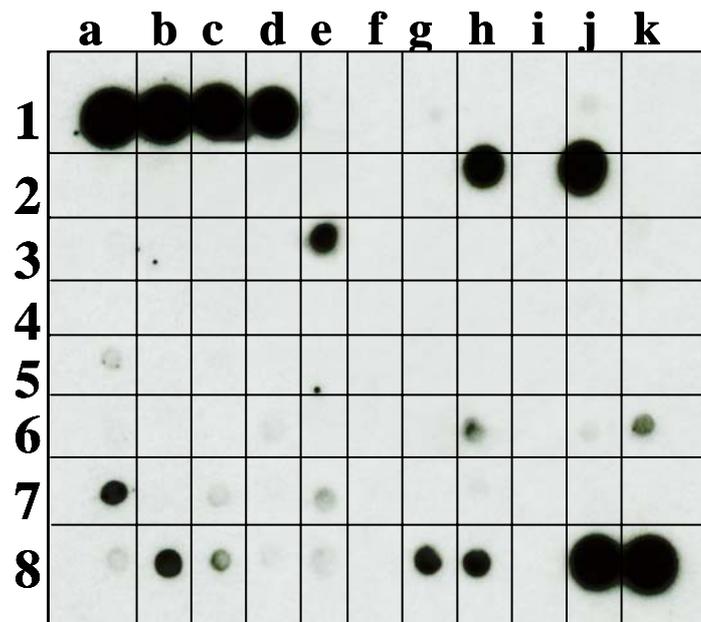


Abb. 3.3.16: Multiplex-Cytokinexpressionsprofil der Gliomzelllinien U373 und A172. Die Expression der angeführten Cytokine wurde durch quantitative Multiplex-Analyse des konditionierten Mediums von U373 und A172 ermittelt.



| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | k |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Positiv Kontrolle | Positiv Kontrolle | Positiv Kontrolle | Positiv Kontrolle | Negativ Kontrolle | Negativ Kontrolle | ENA-78 | GCSF | GMCSF | GRO | GRO-a |
| 2 | I-309 | IL-1a | IL-1b | IL-2 | IL-3 | IL-4 | IL-5 | IL-6 | IL-7 | IL-8 | IL-10 |
| 3 | IL-12 | IL-13 | IL-15 | IFNg | MCP-1 | MCP-2 | MCP-3 | MCSF | MDC | MIG | MIP-1b |
| 4 | MIP-1d | RANTES | SCF | SDF-1 | TARC | TGF- β | TNF-a | TNF- β | EGF | IGF-I | Ang |
| 5 | OSM | Tpo | VEGF | PDGF-B | Leptin | BDNF | BLC | Ck β 8-1 | Eotaxin | Eotaxin-2 | Eotaxin-3 |
| 6 | FGF-4 | FGF-6 | FGF-7 | FGF-9 | Flt-3 Ligand | Fraktal kine | GCP-2 | GDNF | HGF | IGFBP-1 | IGFBP-2 |
| 7 | IGFBP-3 | IGFBP-4 | IL-16 | IP-10 | LIF | LIGHT | MCP-4 | MIF | MIP-3a | NAP-2 | NT-3 |
| 8 | NT-4 | Osteoprotegerin | PARC | PIGF | TGF- β 2 | TGF- β 3 | TIMP-1 | TIMP-2 | Negativ Kontrolle | Positiv Kontrolle | Positiv Kontrolle |

Abb. 3.3.17: Protein-Array Cytokinexpressionsprofil der Gliomzelllinie U373. Die Expression der angeführten Cytokine wurde durch eine Protein-Array-Analyse des U373-konditionierten Mediums ermittelt. Die der jeweiligen Position entsprechenden Cytokine/Chemokine sind angegeben. Keine Expression ist durch weiß hinterlegte Felder gekennzeichnet, eine schwache Expression durch gepunktete Felder und eine starke Expression durch grau hinterlegte Felder.

3.3.7 Beteiligung von IL-6, TGF- β und VEGF an der Inhibition der Differenzierung/Ausreifung Dendritischer Zellen durch Gliomzellen

Mit IL-6, TGF- β 2 und VEGF wurden mögliche Kandidaten, welche die Inhibition der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen vermitteln könnten, im gliomzellkonditionierten Medium nachgewiesen. Um ihre Rolle zu untersuchen, wurde ihre Aktivität durch neutralisierende Antikörper blockiert. Hierzu wurde U373-CM (20%) vor der Zugabe zu den Differenzierungskulturen am Tag 0 mit den Antikörpern versetzt und für 1h vorinkubiert. Der Einfluss auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen wurde dann über den Vergleich der Expression von CD14 und CD83 (Abb. 3.3.18) sowie von costimulatorischen und HLA-Molekülen (Abb. 3.3.19) mit Kontrollkulturen ermittelt.

In vier unabhängigen Experimenten zeigten diese Untersuchungen, dass durch die Neutralisierung von IL-6, VEGF und TGF β die durch U373-CM verursachte Inhibition der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen teilweise aufgehoben werden kann. So war in Gegenwart der neutralisierenden Antikörper (Abb. 3.3.18) die residuelle Expression von CD14 signifikant reduziert (normalisierte relative Expression $19,5 \pm 6,9$ vs. $51,7 \pm 35,2$; $p=0,044$; $n=4$), die von CD83 tendenziell erhöht (normalisierte relative Expression $0,4 \pm 0,1$ vs. $0,1 \pm 0,04$; $p < 0,001$; $n=4$). Auch die Inhibition der Expression von CD40, CD80 und CD86, welche durch 20% U373-CM induziert wurde, konnte durch die Zugabe der neutralisierenden Antikörper teilweise aufgehoben werden, wogegen die Inhibition der Expression von HLA-Klasse I und II Molekülen nicht oder nur gering beeinflusst wurde (repräsentatives Experiment von 4; Abb. 3.3.19). Trotz dieser partiellen Restaurierung der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen, konnte durch die Zugabe der neutralisierenden Antikörper jedoch nie das Expressionsniveau der Kontrollkulturen erreicht werden.

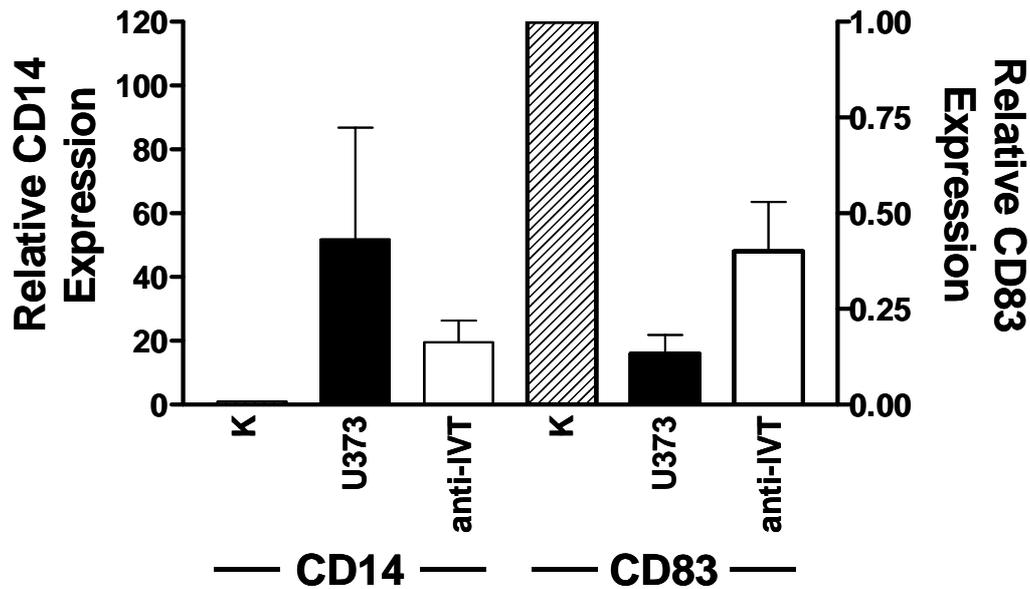


Abb. 3.3.18: Einfluss der Neutralisierung von IL-6, TGF β und VEGF im gliomzellkonditionierten Medium auf die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Reife DC wurden in der Ab- (K) oder Anwesenheit von 20% U373-CM, ohne (U373) oder nach vorheriger Neutralisierung der Aktivität von IL-6, TGF β und VEGF durch Präinkubation mit 10 μ g/ml neutralisierenden Antikörpern (anti-IVT) generiert und die Expression von CD14 (links) und CD83 (rechts) durchflusszytometrisch bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwert \pm SEM der normalisierten relativen Expression (Kontrolle=1) für ≥ 4 .

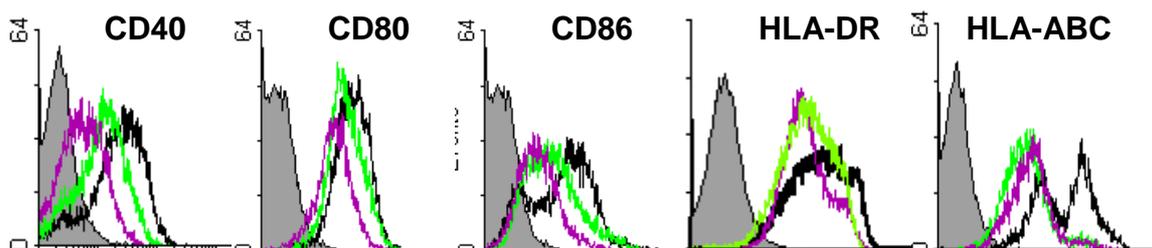


Abb. 3.3.19: Einfluss der Neutralisierung von IL-6, TGF β und VEGF im gliomzellkonditionierten Medium auf die Expression costimulatorischer und von HLA-Molekülen auf reifen Dendritischen Zellen. Reife DC wurden in der Abwesenheit (----) oder in der Gegenwart von 20% U373-CM, ohne (----) oder nach vorheriger Neutralisierung der Aktivität von IL-6, TGF β und VEGF durch Präinkubation mit 10 μ g/ml neutralisierenden Antikörpern (---) generiert und die Expression von CD40, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-ABC durchflusszytometrisch bestimmt. Entsprechende Isotypkontrollen sind durch grau unterlegte Histogramme dargestellt.

3.3.8 Konsequenz der durch Gliomzellen induzierten reduzierten Expression von HLA-Klasse I Molekülen auf Dendritischen Zellen für deren Sensitivität gegenüber der Lyse durch NK-Zellen

Unreife und reife Dendritische Zellen, die in der Gegenwart von konditioniertem Medium der Gliomzelllinien U373 oder A172 generiert wurden, zeigten eine deutlich reduzierte HLA-Klasse I Expression. Deshalb wurde geprüft, ob sie hierdurch für eine NK-Zell-Lyse sensibler sind. DC wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und mit kurzzeitkultivierten NK-Zellen kokultiviert. Nach 4 Stunden wurden tote Zellen mit Propidiumjodid angefärbt und der Anteil toter, CFSE-positiver DC durchflusszytometrisch bestimmt. Parallel mit DC wurden die Untersuchungen mit der NK-Zell-Target Linie K562 als Kontrolle für die lytische Aktivität der NK-Zellen durchgeführt (Abb. 3.3.20, repräsentatives Experiment von 3).

Die Lyse von K562-Zellen war effektor dosisabhängig. Die maximale Lyse bei einem Effektor:Target-Verhältnis von 5:1 lag bei $61,0 \pm 7,9\%$ ($n=3$). Wenn die Sensitivität der DC für eine NK-Zell-Lyse untersucht wurde, so konnte weder für unreife DC noch für reife DC eine erhöhte Sensitivität nach Generierung in der Gegenwart von U373-CM nachgewiesen werden (Abb. 3.3.21).

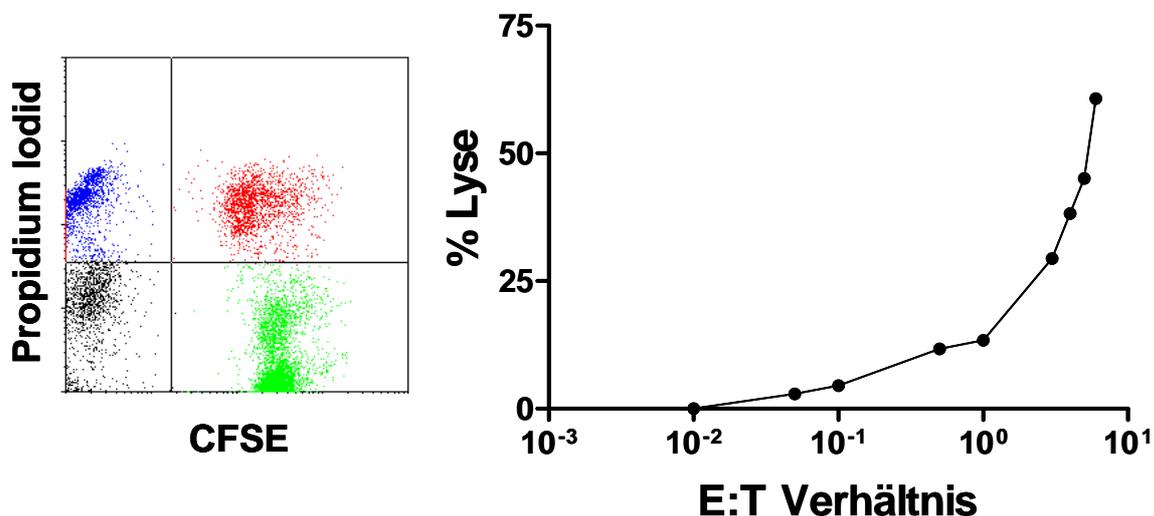


Abb. 3.3.20: Lytische Aktivität kurzzeitkultivierter NK-Zellen. K562-Zellen wurden mit CFSE markiert und 4h mit NK-Zellen bei unterschiedlichen Effektor-Target-Verhältnissen kokultiviert. Dann wurden tote Zellen mit Propidiumjodid angefärbt und durchflusszytometrisch der Anteil an toten (Propidiumjodid+) K562-Zellen (CFSE+) bestimmt.

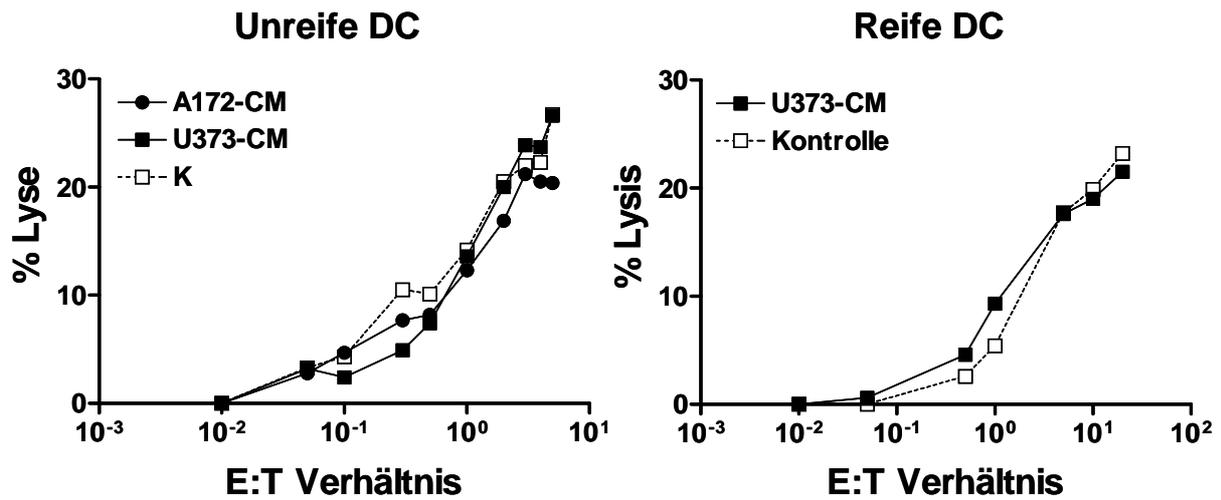


Abb. 3.3.21 NK-Zell-Sensitivität unreifer und reifer Dendritischer Zellen. Unreife und reife Dendritische Zellen wurden in der Abwesenheit (Kontrolle) oder Gegenwart von 20% gliomzellkonditioniertem Medium generiert und dann durchflusszytometrisch (CFSE+/Propidiumjodid+) auf ihre Sensitivität gegenüber einer Lyse durch kurzzeitkultivierte NK-Zellen analysiert.

4. Diskussion

4.1 Immunstatus von Gliompatienten

Um mögliche systemische Effekte der Tumorerkrankung oder der Vortherapien der Gliompatienten auf das Immunsystem zu erfassen und damit zu prüfen, ob Gliompatienten noch über ein intaktes Immunsystem verfügen – eine Grundvoraussetzung für eine Vakzinierungstherapie - wurde ein Immunstatus der Patienten erhoben und mit dem gesunder Probanden verglichen.

Im Immunstatus der Gliompatienten zeigten sich im Vergleich zu Kontrollpersonen einige Auffälligkeiten. Die Patienten waren aufgrund einer signifikanten Reduktion des Anteils an T-Zellen lymphopenisch, wobei die relativen Anteile der CD4+ T_H- und CD8+ CTL Subpopulationen unverändert waren, was auf eine generelle und nicht Subtyp-spezifische Reduktion der T-Zellen hinweist. Dies wird auch die vergleichbare Expression von CD25, CD28, CD45RA, CD45R0, CD56 und HLA-DR auf T-Zellen von Patienten und gesunden Probanden unterstützt. Unterschiede in der Expression von CD4 und CD25, wie sie von anderen Autoren beschrieben wurde [119, 142], konnten nicht bestätigt werden.

Eine T-Lymphopenie in Gliompatienten wurde bereits beschrieben [119], und sowohl Apoptose von T-Zellen [143] als auch eine verminderte Produktion im Thymus [144] dafür verantwortlich gemacht, wogegen für die hier und von Hintzen et al. beobachtete leichte Neutrophilie, das von Gliomzellen produzierte G-CSF verantwortlich gemacht wurde [145].

Im Gegensatz zur Reduktion der T-Zellen, war der Anteil an NK-Zellen in Patienten unverändert. Dies wird auch durch die Ergebnisse von Bhondley et al. und von Ausiello et al. bestätigt [142, 146], und kürzlich veröffentlichte Untersuchungen konnten ergänzen, dass auch der Anteil an NKT-Zellen in Gliompatienten unverändert ist [147]. Die Gesamtleukozytenzahl wie auch die Absolutzellzahlen für Monozyten und B-Zellen waren in Gliompatienten ebenfalls unverändert, sodass die mit Gliomen assoziierten Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung des Blutes hauptsächlich das T-Zell-Kompartiment betreffen.

Die Unterschiede scheinen jedoch nur quantitativer Natur zu sein, denn die T-Zellen der hier untersuchten Patienten waren funktionell kompetent und zeigten eine normale Stimulierbarkeit mit dem Lektin PHA. Eine Induktion von Apoptose oder verminderte Antwort der T-Zellen von Patienten auf Stimulation mit Mitogenen oder

anti-CD3 [118, 148-151] wurde nicht beobachtet. Die Gründe hierfür sind unklar. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Gliom-assoziierte Immunsuppression mit der Größe des Tumors korreliert und durch chirurgisches Entfernen des Tumors, die T-Zell-Antwort zumindest teilweise wiederhergestellt werden kann [152-154]. Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Analysen war die Cytoreduktion bereits erfolgt und die untersuchten Patienten waren nur noch mit einem niedrigen Tumorstadium belastet. Das mediane Tumorstadium aller Patienten vor der Cytoreduktion betrug $42,9\text{cm}^3$, nach der Cytoreduktion nur $3,8\text{cm}^3$. Aufgrund dieses relativ geringen Restvolumens konnten vermutlich auch keine Unterschiede zwischen Patienten mit einem Tumorstadium von mindestens $3,8\text{cm}^3$ oder einem kleineren Tumorstadium festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise scheinen die Immundefekte in Gliompatienten nicht ausschließlich T-Zell-intrinsisch zu sein. So wurde eine zumindest partielle Restauration der T-Zell-Antwort nach Depletion von Suppressor- oder akzessorischen Zellen beschrieben [155, 156], und in die gleiche Richtung weisend, konnten Morford et al. zeigen [143], dass mit Gliomzell-konditioniertem Medium vorbehandelte Monozyten Apoptose von T-Zellen induzieren. D.h. auch das monozytäre Kompartiment scheint eine Rolle zu spielen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von CD80 und CD86 auf Monozyten, d.h. von zwei Molekülen, welche essentiell für die T-Zell-Aktivierung sind (Signal 2) und deren Fehlen zur Induktion von T-Zell-Anergie und Apoptose führen kann [50], was auf eine systemische Präsenz immunsuppressiver Faktoren hinweisen könnte. Konsistent mit dieser Beobachtung, wurde von Zou et al. berichtet, dass die Behandlung von Monozyten mit Gliomzell-konditioniertem Medium in vitro zu einer reduzierten Expression von CD80, CD86, HLA-DR und IL-12 sowie einer verstärkten Expression von IL-10 führt [157]. Eine reduzierte Expression von HLA-DR oder CD40 für Monozyten aus dem Blut von Patienten konnte hier in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [158] nicht nachgewiesen werden, aber auch für das monozytäre Kompartiment scheint die Cytoreduktion eine Normalisierung zu bedingen [158].

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Veränderungen im Immunstatus von Gliompatienten eher quantitativer Natur sind, da keine Beeinträchtigung der Funktion von T-Zellen und Monozyten nachgewiesen werden konnte. Sie machen weiter deutlich, dass die Cytoreduktion vor der Immuntherapie erfolgen sollte, was

auch deshalb sinnvoll ist, da die Vakzinierungstherapie besser dafür geeignet zu sein scheint, die sogenannte ‚minimal residual disease‘ zu beseitigen, nicht aber das Gran Tumor [159]. Da der Verlauf der Erholung nach Cytotherapie bisher noch nicht ausreichend untersucht ist, aber vermutlich von Patient zu Patient variieren wird, wird es außerdem wichtig sein, in Voruntersuchungen für jeden Patienten den besten Zeitpunkt für die Vakzinegewinnung und für die Vakzinierung zu ermitteln. Es wird des Weiteren auch abzuklären sein, ob Steroide oder eine Kombinationstherapie aus Strahlentherapie und Temozolomid-Chemotherapie mit einer Immuntherapie kombiniert werden kann. Obwohl die Fallzahlen noch klein sind und keine endgültige Bewertung gestatten, konnten bisher noch keine Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des Blutes zwischen Patienten mit und ohne Temozolomid oder Steroid-Therapie nachgewiesen werden.

4.2 Ex vivo Generierung und Charakterisierung Dendritischer Zellen

Neben einer ausreichenden Funktion der zellulären Mechanismen des Immunsystems in Patienten, ist die Generierung funktionell kompetenter Dendritischer Zellen in geeigneter Qualität und Quantität eine weitere Voraussetzung für die Vakzinierungstherapie. Es ist inzwischen etabliert, dass für die Vakzinierung reife DC eingesetzt werden sollten, da sie nicht wie unreife DC mit der Induktion von Toleranz assoziiert sind [38, 39, 160].

Für klinische Studien werden bevorzugt aus Monozyten differenzierte Dendritische Zellen verwendet. Monozyten können einfach durch Adhärenz [73, 76], Elutriation [77], positive CD14⁺ Selektion [78, 79] oder negative Selektion [80] gewonnen werden, wobei selbst im Großmaßstab, d.h. wenn Leukozyten im Bereich von $1-2 \times 10^{10}$ Zellen separiert werden müssen, CD14⁺ Reinheiten zwischen 60 und 98% erreicht werden, wobei die höchsten Reinheiten durch positive immunmagnetische Separation erzielt wurden [78, 79]. Eine hohe Reinheit des Ausgangsmaterials ist nicht nur eine Voraussetzung für eine hohe Reinheit des Endproduktes (reife Dendritische Zellen), sondern sie ist auch entscheidend dafür, dass die Dendritischen Zellen unter gleichbleibenden Bedingungen generiert werden können, d.h. in der Abwesenheit von kontaminierenden Zellen, welche Cytokine produzieren, die die Dendritischen Zellen funktionell verändern.

Wir haben deshalb ein Protokoll entwickelt, das es gestattet, Monozyten aus Leukapherese-Präparaten mit dem CliniMACS als CD14⁺ Zellen zu gewinnen und in

einem 2-Schritt-Verfahren in der Gegenwart von autologem Plasma der Patienten durch Kultur in Teflon-Beuteln über unreife DC zu reifen DC zu differenzieren und auszureifen [79]. Die so gewonnenen Zellen zeigen die typischen Merkmale und Funktionen unreifer bzw. reifer DC. Ob eine vergleichbare Generierung Dendritischer Zellen auch für Gliompatienten möglich ist, wurde hier untersucht, insbesondere, da das monozytäre Kompartiment von den systemischen Veränderungen bei Gliompatienten betroffen ist (s.o. und [157, 158]) und für Gliomzellen gezeigt wurde, dass sie eine Herunterregulation von CD54, CD80 und CD86 sowie von HLA-Klasse I und II bei Dendritischen Zellen induzieren [117]. Des Weiteren könnte die systemische Immunsuppression der Patienten damit einhergehen, dass das Plasma supprimierende Faktoren enthält, die mit der ex vivo Generierung Dendritischer Zellen interferieren. Gleiches gilt auch für Glucokorticoide, die zur Verhinderung der Ödembildung verabreicht werden, und für welche schon nachgewiesen werden konnte, dass sie die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen inhibieren [161, 162] bzw. zur Entwicklung IL-10 produzierender DC mit verringerter Expression von CD40, CD80, CD86, CD1a und HLA-DR führen können [163]. Beides stellt in Frage, ob autologes Plasma von Gliompatienten als Bestandteil des Zellkulturmediums verwendet werden kann.

Für die Untersuchungen wurde ein experimentelles (nicht klinisches) Anreicherungs- und Kulturverfahren im Labormaßstab verwendet: Monozyten wurden in Gewebekulturplatten in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 (1. Kulturphase) bzw. GM-CSF, IL-4 und TNF α (2. Kulturphase) kultiviert. Als Kulturmedium diente mit autologem Plasma supplementiertes X-Vivo 15 Medium, wie es bei vielen Protokollen zum Einsatz kommt [130, 135, 137]. In der Abwesenheit von Plasma nimmt die Vitalität der differenzierenden Dendritischen Zellen rasch ab, wobei das Plasma möglicherweise u.a. Katalase und Glutathione liefert, welche intermediäre Sauerstoffradikale abfangen [164].

Hinsichtlich der Reinheit der von gesunden Probanden oder Gliompatienten gewonnenen Monozyten traten keine Unterschiede auf. Für beide konnte eine mittlere CD14+ Reinheit von ca. 98% erreicht werden. Wenn die Monozyten in Plasma-supplementiertem Medium zu Dendritischen Zellen differenziert und ausgereift wurden, konnten mit Ausnahme einer leichten Erhöhung der CD80 Expression ebenfalls keine Unterschiede zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden festgestellt werden. Sowohl der Anteil residueller CD14+ Monozyten als

auch der Anteil CD83+ reifer Dendritischer Zellen und deren Expression von costimulatorischen (CD40, CD80) und HLA-Klasse II Molekülen waren vergleichbar. Die Expression eines weiteren Markers für DC, CD1a, war in beiden Gruppen schwach ausgeprägt (ca. 5%), wie es bereits zuvor von Loudovaris et al. für X-Vivo 15 Medium beschrieben wurde [165]. Eine Gliom-assoziierte inhibitorische Aktivität für das Plasma der Patienten wie sie bspw. für das Myelodysplastische Syndrom beobachtet wurde [166], konnte nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt lag der Anteil an reifen CD83+ Dendritischen Zellen bei diesen Kulturen sowohl für Patienten ($34,1 \pm 7,3\%$) als auch für gesunde Probanden ($24,3 \pm 6,7\%$) niedriger als dies zuvor für Teflonbeutelkulturen im gleichen Medium beschrieben worden war [79]. Da das Reifungsstadium der DC entscheidend für ihre immunstimulatorische Aktivität ist, zu der auch CD83 selbst beiträgt [167], welches nur von einem kleinen Anteil der Zellen exprimiert wurde, wurde versucht, das Protokoll zu verbessern. Da Blutplasma bis zu 10000 Proteine enthält, welche während der Nekrose, Apoptose oder Hämolyse ins Plasma gelangen [168], da das Plasmaprotein Apolipoprotein A-1 in Monozyten die Expression von IL-10 und PGE₂ induziert, welche die Differenzierung und Funktion Dendritischer Zellen (Endozytose, T-Zell-Stimulation) beeinträchtigen [169] und Plasma weitere nicht vorhersehbare Komponenten wie Cytokine und Hormone enthalten kann, wurde ein serumfreies Kultursystem (CellGroDC Medium) als Alternative zum Plasma-supplementierten Medium gewählt und die Generierung Dendritischer Zellen zwischen beiden Medien und zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden verglichen.

Unter serumfreien Kulturbedingungen war eine deutlich verbesserte Differenzierung und Ausreifung der Dendritischen Zellen zu beobachten. So lag der Anteil an CD83+ reifen DC für beide Gruppen zusammen bei 68,4% gegenüber 29,6% in Plasma-supplementiertem Medium. Wurden die Kulturen von Gliompatienten und gesunden Probanden verglichen, so konnten auch unter serumfreien Kulturbedingungen mit der Ausnahme einer erhöhten Expression von HLA-DR auf Patientenzellen, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Expression von CD14, CD83, CD1a, HLA-Klasse I, CD40, CD80 und CD86 war vergleichbar.

Im Gegensatz hierzu waren die Unterschiede zwischen Plasma-supplementierten und serumfreien Kulturbedingungen deutlich ausgeprägt. Wenn die DC-

Differenzierung von Gliompatienten in CGDC und in XV15 Medium verglichen wurde, zeigten XV15 Kulturen im Vergleich zu CGDC Kulturen einen 9-fach höheren Anteil an residuellen CD14⁺ Zellen, wogegen der Anteil an reifen CD83⁺ nur halb so groß, der Anteil an CD1a⁺ DC nur 1/7 so hoch war. Auch die Expressionsdichte von CD40, CD80, CD86, HLA-Klasse I und HLA-Klasse II war in XV15 Kulturen deutlich niedriger als in CGDC Kulturen, was die verbesserte Differenzierung und Ausreifung unter serumfreien Kulturbedingungen weiter bestätigt.

Diese phänotypischen Unterschiede hatten auch biologische Konsequenzen. Wurde die allostimulatorische Aktivität von DC aus CGDC und XV15 Kulturen verglichen, so war bei limitierender Stimulatorzellzahl die potentere allostimulatorische Aktivität der Zellen aus CGDC Kulturen deutlich ausgeprägt. Diese Potenz der Zellen konnte sowohl für die Induktion einer proliferativen als auch einer T_H1-Cytokin-Antwort (Produktion von IFN γ und IL-2, nicht aber von IL-4) dokumentiert werden. Die in CGDC generierten DC stimulieren also den Typ von T-Zell-Antwort, der für die Induktion einer CTL-Antwort zur Beseitigung von Tumorzellen erforderlich ist [70]. Die Unterschied zwischen CGDC und XV15 Kulturen hinsichtlich des T-Zell-stimulatorischen Potentials waren jedoch nur dann nachweisbar, wenn der Anteil an reifen DC in den XV15 Kulturen niedrig war.

Neben der T-Zell-stimulatorischen Aktivität der reifen DC, war auch die Antigenaufnahmeaktivität der unreifen DC aus CGDC Kulturen durch Pinozytose wie auch durch Phagozytose gut entwickelt, ein typisches Merkmal für funktionell kompetente unreife Dendritische Zellen [36]. Darüber hinaus konnte für die reifen DC aus CGDC Kulturen die charakteristische Morphologie der Zellen mit langen zytoplasmatischen Ausläufern, die Translokation von HLA-Klasse II Molekülen aus dem lysosomalen Kompartiment zur Zelloberfläche, ihre Motilität und die Ausbildung von DC/T-Zell-Clustern nachgewiesen werden, weitere typische Merkmale reifer Dendritischer Zellen [73, 76, 170, 171]. Die aus CGDC Kulturen erhaltenen unreifen und reifen DC zeigen also eine Reihe phänotypischer und funktioneller Eigenschaften durch welche typische unreife und reife DC charakterisiert sind [73, 76, 79, 170-174].

Die Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort setzt voraus, dass Dendritische Zellen effizient mit Tumormaterial, welches ein TAA enthält, beladen werden, sie dieses Material prozessieren und in Form von Peptiden über HLA-Klasse

I und II Moleküle präsentieren, welche dann von spezifischen T_H-Zellen und CTL erkannt werden, was zu deren Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen führt.

Das TAA und die Antigenbeladung unreifer DC sind also essentiell für die Induktion einer Gliomzell-spezifischen T-Zell-Antwort. Obwohl für Gliome zahlreiche TAA beschrieben wurden (EGFRvIII [123, 175], gp240 [124], AIM-2 [176], GLEA2 [177], Tenascin [125], Survivin [126, 178], SART1 [127], IL-13R α 2 [128], TRP1 und 2, gp100 sowie MAGE-1 und MAGE-3 [129, 179]), wurden in den bisherigen klinischen Studien nicht definierte, einzelne oder mehrere Peptide von solchen TAA eingesetzt, sondern Tumorzelllysate [130-134], Peptideluate von Tumorzellen [135, 136] oder Fusionsprodukte aus DC und Tumorzellen [137, 138]. In präklinischen Untersuchungen konnten außerdem Tumor-mRNA [180] und apoptotische Tumorzellen [181] als mögliche Antigenquelle identifiziert werden. Die Verwendung solcher ‚breiter‘, unspezifischer Antigenquellen bietet gegenüber einer reinen Peptidvakzinierung den Vorteil, dass Peptide für die HLA-Klasse I und II-Präsentation für zahlreiche HLA-Typen von den DC prozessiert werden können. Des Weiteren sinkt durch die Verwendung multipler Targets die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Antigenverlustvarianten der Tumorzellen [91, 182, 183]. Eine Induktion von Autoimmunität - eine mögliche Nebenwirkung durch die Präsenz von normalen Selbstproteinen in der Antigenquelle - wurde bisher trotz der Verwendung unspezifischer Antigenquellen weder in klinischen Studien noch Tiermodellen beobachtet [184, 185]. Die manifestierte Toleranz gegenüber normalen Selbstproteinen scheint eine solche Autoimmunität zu verhindern. Tatsächlich konnten Kobayashi et al. zeigen, dass mit Gliomzell mRNA beladene DC eine CTL-Antwort gegen autologe Tumorzellen induzieren, nicht jedoch gegen EBV-transformierte B-Zellen der Patienten. Umgekehrt führte eine Beladung mit mRNA aus gesundem Gehirngewebe der Patienten nicht zur Induktion einer gegen die autologen Tumorzellen gerichteten Antwort [180]. Solange die verwendete Antigenquelle nicht mit der Funktion der DC interferiert, wie es bspw. für das TAA MUC1 gezeigt wurde [186, 187] oder für apoptotische Zellen, die eher zu Toleranz als Immunität zu führen scheinen [188], bieten die ‚breiten‘, unspezifischen Antigenquellen also eher Vorteile.

Um zu prüfen, ob auch mit nekrotischem Tumormaterial beladene Dendritische Zellen von Gliompatienten eine für TAA spezifische Antwort autologer T-Zellen

induzieren, wurden unreife Dendritische Zellen mit durch mehrere Hitze/Auftau-Zyklen nekrotisiertem Tumormaterial beladen. An Gliomzelllinien konnte gezeigt werden, dass dieser Modus des Abtötens Nekrose induziert und die nekrotisierten Zellen von unreifen DC aufgenommen werden, ohne dass deren anschließende Ausreifung dadurch beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt). Neben ihrer Funktion als Antigenquelle bieten nekrotische Zellen den Vorteil, dass Stressproteine wie gp96 und hsp70 hochreguliert werden, welche einen positiven Einfluss auf die Ausreifung von DC besitzen [189, 190].

Wurden diese mit nekrotischem Tumormaterial beladenen DC benutzt, um autologe T-Zellen eines Patienten zu stimulieren, führte dies zur Induktion einer TAA-spezifischen T-Zell-Antwort: Die mit nekrotischem Tumormaterial stimulierten T-Zellen reagierten nur gegen Tumorantigen-beladene, nicht aber gegen unbeladene DC des Patienten. Ob die so induzierten T-Zellen auch in Lage sind Tumorzellen abzutöten und wie spezifisch diese Antwort für den Tumor des Patienten ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Dennoch zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass es möglich ist von Gliompatienten funktionell kompetente Dendritische Zellen zu gewinnen und durch die gewählte Vorgehensweise, zumindest in vitro, bei Gliompatienten eine T-Zell-Antwort gegen autologes Tumormaterial zu induzieren.

4.3 Mechanismen zur immunologischen Toleranz von Gliomzellen

Tumoren müssen sich ständig der Überwachung durch das Immunsystem entziehen, da durch die genetische Instabilität und die die Malignität verursachenden genetischen Veränderungen Tumor-assoziierte Antigene vorliegen [81, 82, 84], welche vom Immunsystem erkannt und zu einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führen können [85-87]. Da der Tumor im fortgeschrittenen Stadium darüber hinaus auch Danger-Signale generiert, können diese TAA in einem immunogenen Kontext von reifen Dendritischen Zellen präsentiert werden. Im Verlauf der Tumorprogression kommt es deshalb zu einem als Immuneditioning bezeichneten Prozess: durch immunologische Selektion von Tumorzellvarianten passt sich der Tumor kontinuierlich besser an das Immunsystem an [88-90]. Die Mechanismen die dabei den Tumorzellen gestatten, sich der Immunantwort zu entziehen, werden als Immune Escape Mechanismen bezeichnet [95, 191].

Da Dendritische Zellen eine zentrale Rolle in der Initiationsphase der T-Zell-Antwort und damit auch für die meisten Aspekte adaptiver zellulärer und humoraler Immunität

spielen und zwischen Immunität und Toleranz entscheiden, stellen sie ein attraktives Target für solche Immune Escape Mechanismen von Tumoren dar [19, 20].

DC können in Tumoren nachgewiesen werden [192], wobei es sich zumeist um unreife DC handelt [193]. Troy et al. zeigten jedoch, dass die Frequenz von DC im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe reduziert ist [194, 195] und Zou et al. konnten eine Induktion von IL-10 in T-Zellen und damit verbundene schlechte T-Zell-Aktivierung durch DC aus Tumoren nachweisen [196]. DC scheinen also tatsächlich ein Target von Immune Escape Strategien von Tumoren zu sein.

Hier wurde am Beispiel zweier Gliomzelllinien, A172 und U373, untersucht, ob diese mit einer durch DC induzierten Immunantwort in vitro interferieren. DC wurden unter serumfreien Kulturbedingungen aus Monozyten differenziert und ausgereift und der Einfluss von Gliomzell-konditioniertem Medium, d.h. von sezernierten Faktoren, auf Phänotyp und Funktion der DC bestimmt.

Da von Chen et al. gezeigt worden war, dass Mycoplasmen phänotypische und funktionelle Eigenschaften von DC modulieren [197], wurde zuerst eine Mycoplasmeninfektion der verwendeten Zelllinien ausgeschlossen, sodass die im Weiteren beschriebenen Effekte der Gliomzelllinien auf DC und nicht auf Mycoplasmen zurückzuführen sind.

U373-CM und A172-CM hemmten dosisabhängig die Differenzierung von Monozyten zu unreifen DC. Nach 6 Tagen Kultur war der Anteil residueller CD14⁺ Zellen in A172-CM und U373-CM Kulturen signifikant erhöht. Für U373-CM, nicht jedoch für A172-CM, konnte auch eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellen nachgewiesen werden: ihre Antigenaufnahmeaktivität war signifikant supprimiert. Die beiden Zelllinien scheinen unterschiedliche Faktoren zu sezernieren, die die Inhibition der Differenzierung (A172 und U373) bzw. der Antigenaufnahme (U373) vermitteln. Interessanterweise konnten Kikuchi et al. keine Inhibition der Antigenaufnahme durch die Gliomzelllinie U373 nachweisen [117]. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie zunächst unreife DC generierten und erst diese dem Einfluss der Gliomzelllinie aussetzten. Für die Inhibition der Antigenaufnahmeaktivität scheint es also wichtig zu sein, dass der inhibitorische Faktor bereits von Beginn der Differenzierung präsent ist. Hat die Zelle das Stadium einer unreifen DC erreicht, ist sie gegenüber der inhibitorischen Aktivität nicht mehr sensitiv.

Auch die Ausreifung der Dendritischen Zellen wurde durch A172-CM und U373-CM dosisabhängig inhibiert. Die Expression des Markers für reife Dendritische Zellen, CD83, war auf Zellen, welche in der Gegenwart der konditionierten Medien generiert worden waren, signifikant reduziert. Da CD83 auch in löslicher Form exprimiert werden kann [141] und bei einigen Tumorpatienten die Konzentration von sCD83 im Plasma erhöht ist [198], wurde geprüft, ob die fehlende Oberflächenexpression von CD83 möglicherweise auf eine vermehrte Bildung der löslichen Form durch proteolytische Spaltung zurückzuführen ist und die Menge an sCD83 im konditionierten Medium der Dendritischen Zellen bestimmt. Es konnte jedoch keine erhöhte Konzentration im konditionierten Medium der DC festgestellt werden, welche in der Gegenwart von U373-CM generiert worden waren. Vielmehr korrelierte die Menge an sCD83 im konditionierten Medium mit der Oberflächenexpression, sodass von einer Blockade der Ausreifung der DC und nicht von einer veränderten Expressionsform von CD83 ausgegangen werden kann.

Auch die Reduktion der Expression der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, des Adhäsionsmoleküls CD54 sowie von HLA-Klasse I und II durch U373-CM (typische Oberflächenmoleküle, die während der Ausreifung der DC induziert werden [55, 79, 199, 200]) belegt, dass durch U373-CM die Ausreifung von DC supprimiert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für A172-CM erhalten, das im Gegensatz zu U373-CM jedoch zu keiner verringerten Expression von CD86 führte, ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Faktoren in den konditionierten Medien der beiden Zelllinien. Die Bedeutung einer differentiellen Regulation von CD86, das wie CD80 an CD28 oder CD152 (CTLA-4) auf T-Zellen bindet [52], ist unklar. Eine Reduktion der Expression von CD80, CD86, HLA-Klasse I und II auf DC unter dem Einfluss von Gliomzelllinien wurde auch von Kikuchi et al. beschrieben [117].

Im Gegensatz zu den zuvor aufgeführten Molekülen war die Expression des Adhäsionsmoleküls CD50 erhöht. CD50 ist vermutlich am initialen Kontakt zwischen T-Zellen und DC beteiligt [199], sodass ein Szenario vorstellbar wäre, in dem TAA-spezifische T-Zellen aufgrund der erhöhten Expression von CD50 besser an DC binden, ihr Peptid erkennen, aufgrund der fehlenden Expression von CD80 und CD86 nun aber nicht aktiviert, sondern apoptotisch oder anergisch werden bzw. zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, die TAA-spezifische Antworten supprimieren. Andererseits führt die reduzierte Expression von HLA-Klasse I und II möglicherweise

zu einer insuffizienten Peptid-Präsentation und damit verminderten Wahrscheinlichkeit für TAA-spezifische T-Zellen, ihr Peptid zu erkennen. Die Abklärung dieser Zusammenhänge steht noch aus.

Die reduzierte HLA-Klasse I Expression auf DC, welche in konditioniertem Medium generiert worden waren, warf die Frage auf, ob DC hierdurch zu einem Target von NK-Zellen werden und der Tumor so erreicht, dass DC selektiv lysiert werden, was die Initiation einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort unterbinden würde. Wie zuvor beschrieben [201], konnten sowohl unreife als auch reife DC von allogenen NK-Zellen lysiert werden, wobei reife DC weniger sensitiv für die NK-Zell-Lyse waren. Die Untersuchung der Sensitivität gegenüber einer NK-Zell-Lyse der DC erbrachte jedoch keine Unterschiede zwischen Kontroll-DC und DC, die in der Gegenwart von U373-CM generiert worden waren.

Dass die Inhibition der Ausreifung der Dendritischen Zellen durch Gliomzell-konditioniertes Medium nicht nur die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen betrifft, sondern tatsächlich funktionelle Konsequenzen hat, wurde durch die Untersuchung der allostimulatorischen Aktivität der DC nachgewiesen. Die Gegenwart von U373-CM während der DC-Differenzierung/Ausreifung hemmte dosisabhängig das allostimulatorische Potential der DC, was in einer verminderten proliferativen Antwort der T-Zellen zum Ausdruck kam. Des Weiteren war auch die Induktion der T_H1 -Cytokine IL-2 und $IFN\gamma$ supprimiert. Die Gliomzellen scheinen also nicht nur generell die Induktion einer Immunantwort zu inhibieren, sondern scheinbar auch ihre Polarisierung beeinflussen zu können, eine wichtige Beobachtung, da T_H1 -Antworten essentiell für die Entwicklung einer CTL-vermittelten anti-Tumor Immunität sind [70], und für Nierenzellkarzinome gezeigt werden konnte, dass die Tumorprogression mit einer Polarisierung des Immunsystems hin zu T_H2 -Antworten einhergeht [202], ein Phänomen das auch als Immune Deviation bezeichnet wird [203].

Eine mögliche Ursache für die Modifikation der polarisierenden Aktivität der DC wurde mit dem Verlust der Expression von IL-12 durch DC, welche in der Gegenwart von U373-CM generiert worden waren identifiziert. IL-12 ist ein kritisches polarisierendes Signal für die Produktion von $IFN\gamma$ durch T-Zellen [204].

Gleichermaßen war die Produktion von IL-1 α supprimiert, einem wichtigen Cofaktor für die IL-12 vermittelte Induktion von IFN γ [205] und die Aktivierung von CD8+ CTL [206].

Neben diesen unmittelbaren Effekten auf die T-Zell-Aktivierung scheinen die von Gliomzellen produzierten immunsuppressiven Faktoren noch früher zu greifen. Normalerweise sezernieren DC Chemokine, welche T-Zellen anlocken - ein früherer Schritt in der Regulationskaskade der T-Zell-Antwort [207-209]. Je nach Chemokin werden dabei unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen angelockt: MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8) und MCP-3 (CCL7) fungieren als Lockstoffe für CD4+ und CD8+ T-Zellen [210], IL-16 für CD4+-T-Zellen [211], MIP-1 δ (CCL15), MIP-1 β (CCL4), IP-10 (CXCL10) und RANTES (CCL5) für T_H1-Zellen [212-217], I-309 (CCL1) und MIP-3 α (CCL20) für T_{reg}-Zellen und Memory T-Zellen [212, 213, 218, 219] und MDC (CCL22) für T_H2-Zellen [214, 217, 220, 221].

Die Chemokin/Cytokin-Protein-Array Analysen ergaben, dass jedes dieser Chemokine, im Vergleich zu Kontroll-DC, in DC, welche in der Gegenwart von U373-CM generiert worden waren, inhibiert ist. Die Breite des Spektrums an Chemokinen, die in Kontroll-DC exprimiert werden, ist dabei möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das Medium für die Analysen nach 9 Tagen gewonnen wurde, d.h. verschiedene Stadien der DC zur Konditionierung beigetragen haben. Um die Beeinflussung der Chemokinexpression der einzelnen DC-Stadien durch Gliomzellen aufzuklären und abzuklären, inwieweit die Expressionsveränderungen auch funktionelle Auswirkungen haben, sind zusätzliche, detailliertere Analysen erforderlich. Dennoch erlauben die bisher zur Verfügung stehenden Daten die Vermutung, dass durch die Beeinflussung der Chemokinexpression von DC, Gliomzellen massiv das Entstehen einer Immunantwort beeinträchtigen können, insbesondere in vivo, wo sich DC und TAA-spezifische T-Zelle im Lymphknoten finden müssen, damit es zur T-Zell-Antwort kommt.

In einem ersten Versuch, Kandidaten für die von U373 Gliomzellen sezernierten, immunsuppressiven Faktoren zu identifizieren, wurde eine Expressionsanalyse für verschiedene Cytokine durchgeführt. Diese Untersuchungen bestätigten für U373 Zellen die aus der Literatur für Gliome bekannte Expression von VEGF [114], IL-6 [110] und TGF- β [115], d.h. von Faktoren, für die in verschiedenen Studien bereits

gezeigt werden konnte, dass sie mit der Differenzierung, Ausreifung und Funktion Dendritischer Zellen interferieren. VEGF hemmt die Differenzierung und Ausreifung von DC in vitro und in vivo und ist an der Suppression der IL-12, CD80 und CD86 Expression durch DC beteiligt [222-224]. Ähnliche Effekte wurden auch für IL-6 berichtet, dessen Anwesenheit in der frühen Phase der DC Differenzierung zu einer Inhibition führt [225, 226], wogegen es bei unreifen DC an der Induktion der Ausreifung beteiligt ist [72]. TGF- β letztendlich hat breite immunsuppressive Aktivitäten [227], u.a. hemmt es die Aktivierung und Ausreifung Dendritischer Zellen [228].

Die Neutralisierung von VEGF, IL-6 und TGF- β im U373-CM mit monoklonalen Antikörpern führte jedoch nur zu einer partiellen Wiederherstellung der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Des Weiteren hatte die Neutralisierung keinen Effekt auf die Inhibition der Expression von HLA-Klasse I und II Molekülen. Sie war trotz Neutralisierung der VEGF, IL-6 und TGF- β Aktivität signifikant niedriger als in Kontroll-DC. Zou et al. berichteten von einer Modifikation der Cytokinexpression von Monozyten durch Gliomzellen [157]. Auch hier war der Effekt trotz Präsenz von TGF- β und IL-6 nicht auf diese beiden Faktoren zurückzuführen, sondern es konnte ein pH-resistenter, temperatursensitiver Faktor von 40kDa dafür verantwortlich gemacht werden. Obwohl VEGF, IL-6 und TGF- β an der immunsuppressiven Wirkung von U373 Gliomzellen auf Dendritische Zellen beteiligt sind, scheinen also noch weiter, bisher unbekannte Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen.

Gliomzellen supprimieren die T-Zell-Antwort nicht nur indirekt über die Beeinflussung Dendritischer Zellen, sondern besitzen auch direkte T-Zell-modulierende Aktivität. Wurden aufgereinigte, naive T-Zellen aus Nabelschnurblut in U373 konditioniertem Medium kultiviert, so war eine dosisabhängige Proliferation und die Induktion von IL-4 und IL-10, d.h. von T_H2-Cytokinen, unabhängig von einer Antigenstimulation zu beobachten, d.h. abermals bewirkten die Gliomzellen eine Veränderung der Polarisation der T_H-Zell-Effektorantwort, wobei unklar bleibt, welcher Faktor für die antigenunabhängige Proliferation der naiven T-Zellen verantwortlich ist.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Gliomzellen auf mannigfaltige Weise mit der durch Dendritische Zellen induzierten T-Zell-Immunität interferieren

und dass für eine erfolgreiche Immuntherapie die Immune Escape Mechanismen der Tumoren berücksichtigt werden müssen.

5. Zusammenfassung

Mit einem medianen Überleben von 14,6 Monaten und einer Zweijahresüberlebensrate von 26,5% ist die Prognose für das maligne Gliom noch immer schlecht und neue Therapieverfahren werden dringend benötigt. Die Vakzinierung mit Dendritischen Zellen stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Dendritische Zellen sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen, die eine zentrale Rolle in der Initiationsphase der Immunantwort spielen. Über MHC-Klasse I und II Moleküle präsentieren sie in einem immunogenen Kontext antigene Peptide, die von peptidspezifischen T-Zellen erkannt werden können, was zu deren Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen führt. Für die Vakzinierungstherapie werden Dendritische Zellen *in vitro* generiert, mit Tumorantigenen beladen und den Patienten verabreicht, mit der Vorstellung, dass sie im Patienten zur Entwicklung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führen.

Voraussetzungen für die Vakzinierungstherapie ist eine ausreichende, nicht vom Tumor oder der Vortherapie eingeschränkte Funktionalität des Immunsystems der Patienten und die *in vitro* Generierung funktionell kompetenter Dendritischer Zellen. Deshalb wurde im ersten Teil der Arbeit ein Immunstatus der Patienten erhoben. Da sich dabei zeigte, dass ein Standardprotokoll für die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen unter Verwendung von autologem, Plasma-supplementiertem Medium nur unbefriedigende Ergebnisse lieferte, wurde ein serumfreies Kulturprotokoll entwickelt und die damit generierten Dendritischen Zellen umfassend charakterisiert. Da Tumoren während ihrer Entwicklung kontinuierlich immunologisch selektioniert werden, wurde abschließend untersucht, ob Gliomzellen mit der durch Dendritische Zellen induzierten Immunität interferieren.

Gliompatienten wiesen einige Auffälligkeiten in der zellulären Zusammensetzung des Blutes auf. Insbesondere ausgeprägt war eine T-Lymphopenie, wobei T-Zell-Subpopulationen gleichermaßen betroffen waren. Die Unterschiede scheinen jedoch hauptsächlich quantitativer Natur zu sein, da die T-Zellen eine normale Antwort auf Lektinstimulation zeigten. Auch das Monozytenkompartiment war betroffen und eine reduzierte Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wurde festgestellt. Dennoch konnten die Monozyten zu Dendritischen Zellen differenziert und ausgereift werden und hinsichtlich der Expression von costimulatorischen und

HLA-Molekülen wurden keine Unterschiede zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden nachgewiesen.

Mit einem Standardprotokoll zur *in vitro* Generierung Dendritischer Zellen lag der Anteil an CD83+, reifen Zellen nur bei 34,1%. Deshalb wurde ein serumfreies Zellkulturprotokoll etabliert. Auch unter serumfreien Kulturbedingungen traten keine Unterschiede in der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen zwischen Gliompatienten und gesunden Probanden auf. Das serumfreie Kulturprotokoll war jedoch dem Plasma-supplementierten Medium überlegen. So waren unter serumfreien Bedingungen die Anteile an reifen, CD83⁺ Dendritischen Zellen (64,3%) sowie deren Expression costimulatorischer und HLA-Moleküle signifikant erhöht, was sich funktionell in einem höheren allostimulatorischen Potential und einer effektiveren Induktion einer T_H1-Cytokin-Antwort äußerte. Des Weiteren zeigten die unter serumfreien Kulturbedingungen generierten Dendritischen Zellen im unreifen Stadium eine typische potente Antigenaufnahmeaktivität und als reife Zellen, die charakteristische Morphologie, Motilität, Clusterbildung mit T-Zellen und Translokation von HLA-Klasse II Molekülen von den lysosomalen Kompartimenten zur Zelloberfläche. Wurden Dendritische Zellen von Patienten mit Tumorantigen beladen, so induzierten sie eine Tumorantigen-spezifische autologe T-Zell-Antwort.

Das serumfreie Zellkulturprotokoll wurde dann eingesetzt, um den Einfluss von Gliomzellen auf Dendritischer Zellen am Beispiel von zwei Zelllinien zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die Gliomzellen Faktoren sezernieren, welche die Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen hemmen. So war die Expression der immunrelevanten Oberflächenmoleküle CD40, CD54, CD80, CD86, HLA-Klasse I und HLA-Klasse II sowie von sezernierten Cytokinen wie IL-12 und von zahlreichen Chemokinen supprimiert, was sich funktionell in einer reduzierten T-Zell-stimulatorischen Aktivität der Dendritischen Zellen und einer verminderten Produktion des T_H1-Cytokins IFN γ durch die stimulierten T-Zellen äußerte. Mit VEGF, IL-6 und TGF- β wurde die Expression von Kandidaten für diese immunsuppressive Aktivität der Gliomzellen nachgewiesen, doch ihre Neutralisierung konnte die Differenzierung und Ausreifung der Dendritischen Zellen nur partiell wiederherstellen.

Zusammengefasst zeigte der Immunstatus von Gliompatienten hauptsächlich quantitative Veränderungen, wovon weder die Stimulierbarkeit der T-Zellen noch die Differenzierung und Ausreifung von Dendritischen Zellen betroffen waren. Insbesondere mit dem neu etablierten, serumfreien Zellkulturverfahren war es

möglich, von Gliompatienten effizient funktionell kompetente Dendritische Zellen zu generieren, die nach Antigenbeladung eine tumorantigenspezifische Antwort von autologen T-Zellen der Patienten stimulierten. Im Patienten könnten diese Vorgänge gestört sein, da Gliomzellen Faktoren sezernieren, welche mit der Differenzierung, Ausreifung und Funktion Dendritischer Zellen interferieren und so eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort supprimieren können.

6. Anhang

Tabelle 2.1
Diagnose, Therapie und Medikation der Gliompatienten

| Patient | Diagnose | Therapie | Medik. |
|----------------|-----------------|---------------------------------------|---------------|
| 1* | GBM | / | b, c, d |
| 2* | GBM | / | A |
| 3*+ | GBM | Radiotherapie | a, d |
| 4*+ | GBM | Radiotherapie, IL-4 Therapie | A |
| 5*+ | GBM | / | A |
| 6* | GBM | Radiotherapie, PCV | a, c |
| 7*+ | AAIII | Radiotherapie, PCV, Temodal | A |
| 8* | GBM | / | Ns |
| 9+ | AAIII | Radiotherapie | A |
| 10+ | GBM | Radiotherapie, Temodal | / |
| 11+# | GBM | Radiotherapie, Temodal | a, c, d |
| 12+ | AAIII | / | a, c |
| 13+# | GBM | / | A |
| 14+ | GBM | Radiotherapie, Temodal | B |
| 15+ | GBM | / | B |
| 16+# | AAIII | Radiotherapie, Temodal | A |
| 17+ | GBM | / | A |
| 18+ | GBM | / | A |
| 19+ | GBM | Radiotherapie | A |
| 20*+ | GBM | Radiotherapie, Temodal | B |
| 21*+ | GBM | Radiotherapie | B |
| 22* | GBM | Radiotherapie | a, c |
| 23*+ | GBM | Radiotherapie, Temodal, IL-4 Therapie | A |
| 24*+ | GBM | Radiotherapie, Temodal | E |
| 25*+ | GBM | Radiotherapie, Temodal | Ns |
| 26* | GBM | / | b, c |

Die Blutproben der Patienten (GBM – Glioblastom; AAIII – anaplastisches Astrozytom Grad III) wurden für die Immuncharakterisierung (+), DC Generierung (*) und PHA-Stimulation (#) verwendet. Zuvor waren die Patienten mit Dexamethason, Omeprazol und antiepileptischen Medikamenten (a), Dexamethason und Omeprazol (b), Beta-Blockern (c), Hypothyreotischen Medikamenten (d) oder antiepileptischen Medikamenten (e) behandelt worden oder die medikamentöse Behandlung ist nicht bekannt (ns). Medik – Medikation.

Tabelle 2.2
Hämatologische Parameter der untersuchten
Nabelschnurblut-Präparate

| | Mittelwert ± SD | Bereich | n |
|--------------------------------|------------------------|----------------|----------|
| Volumen [ml] | 80,6 ± 24,1 | 50,0 – 192,0 | 62 |
| Leukozyten/ml x10 ⁶ | 9,9 ± 3,3 | 4,87 – 23,3 | 62 |
| % Neutrophile | 51,2 ± 7,4 | 32,3 – 70,8 | 62 |
| % Lymphozyten | 34,6 ± 7,1 | 18,0 – 52,9 | 62 |
| % Monozyten | 9,6 ± 2,6 | 3,5 – 15,2 | 62 |

Tabelle 2.3A
Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper
- Durchflusszytometrie -

| Spezifität | Fluorochrom | Klon | Isotyp | Bezugsquelle |
|--------------|-------------|----------|--------|-----------------|
| CD1a | FITC | HI149 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD1a | PE | BL6 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD3 | FITC/PE | UCHT1 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD3 | PE-Cy5 | S4.1 | IgG2a | Immunotools |
| CD4 | FITC/PE | 13B8.2 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD8 | FITC | B9.11 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD14 | FITC/PE | RMO52 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD16 | FITC/PE | 3G8 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD19 | PE | J4.119 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD25 | FITC/PE | B1.49.9 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD28 | PE | CD28.2 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD28 | PE | L293 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD40 | FITC | 5C3 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD45 | FITC | 2D1 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD45RA | FITC | ALB11 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD45R0 | FITC | UCHL1 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD50 | PE | HP2/19 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD54 | PE | 84H10 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD56 | PE | NKH-1 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD56 | PE | B159 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD58 | FITC | AICD58 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD80 | FITC | MAB104 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD83 | FITC/PE | HB15a | IgG2b | Beckman/Coulter |
| CD86 | FITC | FUN-1 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD152 | PE | BNI3 | IgG2a | BD Biosciences |
| CD154 | PE | TRAP1 | IgG1 | BD Biosciences |
| CD208 | PE | 104.G4 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| HLA-ABC | FITC | B9.12.1 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| HLA-DR | FITC | Immu-357 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| HLA-DR | PE | G46-6 | IgG2a | BD Biosciences |
| IFN γ | FITC | 45.15 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| IL-2 | PE | N7.48A | IgG1 | Beckman/Coulter |
| IL-4 | PE | 4D9 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| IL-10 | PE | IC2171P | IgG2b | R&D Systems |
| IL-12 | FITC | C11.5 | IgG1 | BD Biosciences |
| IgG1 | FITC/PE | 679.1Mc7 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| IgG2a | PE | U7.27 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| IgG2b | PE | 27-35 | IgG2b | BD Biosciences |

FITC – Fluoreszeinisothiocyanat, PE – Phycoerythrin, Immunotools; Friesoythe, Beckman/Coulter; Krefeld, BD Biosciences; Heidelberg, Serotec; Düsseldorf.

Tabelle 2.3B

**Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper
-Zellseparation, T-Zell-Stimulation und Neutralisierung-**

| Spezifität | Klon | Isotyp | Bezugsquelle |
|-------------------------|-------------|---------------|---------------------|
| CD11b | BEAR 1 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD14 | RMO52 | IgG2a | Beckman/Coulter |
| CD16 | 3G8 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD19 | J4.119 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD28 | CD28.2 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD34 | QBEND10 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD56 | C218 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD66b | 80H3 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| CD235a | 11E4B7.6 | IgG1 | Beckman/Coulter |
| HLA-DR | B8.12.2 | IgG2b | Beckman/Coulter |
| Anti-IL-6 | 6708 | IgG1 | R&D Systems |
| Anti-TGF β -1,2,3 | 1D11 | IgG1 | R&D Systems |
| Anti-VEGF | 26503 | IgG2b | R&D Systems |

Alle Antikörper waren azidfrei.

Tabelle 2.4
Medien, Cytokine, Supplemente

| Reagenz | Bezugsquelle |
|-------------------------|------------------------------|
| RPMI-1640 | Life Technologies; Karlsruhe |
| DMEM | Cambrex; Verviers, Belgien |
| CellGroDC | Cellgenix; Freiburg |
| X-Vivo15 | Cambrex; Verviers, Belgien |
| Fötales Kälberserum | Cambrex; Verviers, Belgien |
| Penicillin/Streptomycin | Cambrex; Verviers, Belgien |
| L-Glutamin Cambrex | Cambrex; Verviers, Belgien |
| PHA-M | Sigma-Aldrich; Seelze |
| IL-2 (Proleukin) | Chiron/Behring; Marburg |
| IL-4 | Cellgenix; Freiburg |
| IL-4 | Strathmann; Hannover |
| IL-4 | R&D Systems; Wiesbaden |
| GM-CSF (Leukomax) | Essex-Pharma; München |
| GM-CSF (Leukine) | Berlex; Richmond, USA |
| TNF α | Cellgenix, Freiburg |
| TNF α | R&D Systems; Wiesbaden |

Tabelle 3.1.1

Vergleich der Frequenzen der Leukozyten-Subpopulationen und der Expression verschiedener immunrelevanter Moleküle auf T-Lymphozyten und Monozyten von Gliompatienten und gesunden Probanden

| | Patienten MW ± SEM Bereich (n) | Kontrolle MW ± SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz |
|-------------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| % neutrophile Granulozyten | 70,7 ± 2,3 52,2 - 94,7 (21) | 60,7 ± 1,9 47,6 - 69,6 (13) | p=0,005 |
| % Lymphozyten | 19,0 ± 1,7 4,5 - 34,7 (21) | 28,6 ± 1,6 21,4 - 37,5 (13) | p<0,001 |
| % Monozyten | 8,6 ± 1,0 0,6 - 21,6 (21) | 7,0 ± 0,5 2,6 - 9,9 (13) | ns |
| % CD3 ⁺ | 17,3 ± 2,6 0,7 - 39,3 (17) | 28,9 ± 2,2 15,3 - 40,9 (12) | p=0,003 |
| % CD14 ⁺ | 6,9 ± 0,5 3,2 - 11,8 (18) | 5,4 ± 0,4 3,1 - 8,6 (12) | p=0,028 |
| % CD19 ⁺ | 2,4 ± 0,5 0,2 - 6,7 (18) | 4,6 ± 0,7 1,4 - 10,4 (12) | p=0,011 |
| % CD56 ⁺ | 4,6 ± 0,6 1,6 - 11,0 (17) | 5,9 ± 0,7 2,7 - 9,4 (11) | ns |
| % CD4 ⁺ T-Lymphozyten | 58,0 ± 3,1 29,7 - 71,1 (14) | 63,3 ± 2,1 46,9 - 74,6 (11) | ns |
| % CD8 ⁺ T-Lymphozyten | 30,8 ± 2,6 17,0 - 46,3 (15) | 27,8 ± 2,0 20,1 - 44,9 (11) | ns |
| % CD25 ⁺ T-Lymphozyten | 10,1 ± 2,1 3,5 - 31,6 (16) | 7,8 ± 1,0 2,6 - 16,6 (12) | ns |
| % CD28 ⁺ T-Lymphozyten | 79,8 ± 3,2 49,3 - 95,2 (15) | 86,4 ± 1,9 72,8 - 97,0 (12) | ns |
| % CD45RA ⁺ T-Lymphozyten | 41,2 ± 3,3 15,9 - 63,2 (16) | 47,2 ± 3,0 30,2 - 62,3 (12) | ns |
| % CD45R0 ⁺ T-Lymphozyten | 52,4 ± 4,0 29,6 - 77,3 (15) | 51,2 ± 4,4 25,9 - 69,9 (11) | ns |
| % CD56 ⁺ T-Lymphozyten | 11,3 ± 2,3 1,8 - 31,6 (17) | 10,2 ± 2,1 3,4 - 20,9 (11) | ns |
| % HLA-DR ⁺ T-Lymphozyten | 19,8 ± 2,7 3,2 - 45,0 (17) | 15,0 ± 2,7 2,6 - 30,1 (11) | ns |
| % CD40 ⁺ Monozyten | 19,7 ± 7,2 0,0 - 72,6 (10) | 32,0 ± 5,8 2,5 - 62,0 (12) | ns |
| % CD80 ⁺ Monozyten | 39,8 ± 9,7 1,6 - 83,8 (11) | 72,3 ± 5,5 20,6 - 96,3 (12) | p=0,015 |
| % CD86 ⁺ Monozyten | 85,7 ± 4,7 60,5 - 98,9 (10) | 94,8 ± 2,3 80,8 - 100,0 (11) | p=0,029 |
| % HLA-DR ⁺ Monozyten | 86,0 ± 4,7 55,2 - 99,7 (10) | 92,0 ± 3,2 74,4 - 99,8 (9) | ns |

ns – nicht signifikant

Tabelle 3.1.2

Vergleich der Zellzahlen der Leukozyten-Subpopulationen von Gliompatienten
und gesunden Probanden

| Zellzahl x10 ⁶ /ml | Patienten MW ± SEM Bereich (n) | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| WBC | 8,7 ± 1,0 2,9 - 17,3 (21) | 7,0 ± 0,7 3,4 - 10,4 (13) | ns |
| Neutrophile Granulozyten | 6,3 ± 0,8 1,8 - 15,0 (21) | 4,3 ± 0,5 1,7 - 6,7 (13) | ns |
| Lymphozyten | 1,6 ± 0,2 0,4 - 3,8 (21) | 2,0 ± 0,2 1,2 - 3,3 (13) | ns |
| Monozyten | 0,7 ± 0,1 0,1 - 1,4 (21) | 0,5 ± 0,1 0,2 - 0,9 (13) | ns |
| CD3 ⁺ | 1,3 ± 0,2 0,1 - 3,2 (17) | 2,0 ± 0,2 1,0 - 3,4 (12) | p=0,039 |
| CD14 ⁺ | 0,6 ± 0,1 0,1 - 1,5 (18) | 0,4 ± 0,1 0,1 - 0,9 (12) | ns |
| CD19 ⁺ | 0,2 ± 0,1 0,0 - 1,0 (18) | 0,3 ± 0,1 0,1 - 1,0 (12) | ns |
| CD56 ⁺ | 0,3 ± 0,0 0,1 - 0,8 (17) | 0,4 ± 0,1 0,0 - 0,7 (12) | ns |

ns – nicht signifikant

Tabelle 3.1.3

Vergleich der Expressionsdichte costimulatorischer und von HLA-Klasse II Molekülen auf Monozyten von Gliompatienten und gesunden Probanden

| MFI | Patienten MW±SEM Bereich (n) | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz |
|-------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| CD40 ⁺ Monozyten | 7,6 ± 1,0 3,7 - 12,6 (9) | 6,5 ± 1,1 2,0 - 13,9 (12) | ns |
| CD80 ⁺ Monozyten | 12,1 ± 1,3 4,0 - 17,2 (10) | 9,9 ± 1,2 2,9 - 14,7 (12) | ns |
| CD86 ⁺ Monozyten | 21,4 ± 2,2 10,8 - 32,3 (9) | 18,0 ± 3,0 5,9 - 34,4 (11) | ns |
| HLA-DR ⁺ Monozyten | 35,4 ± 5,3 14,4 - 57,2 (9) | 35,4 ± 8,7 8,1 - 78,8 (9) | ns |

ns – nicht signifikant, MFI – mittlere Fluoreszenzintensität

Tabelle 3.1.4

Vergleich der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen von Gliompatienten und gesunden Probanden in plasmasupplementiertem X-Vivo 15 Medium

| | Patienten MW±SEM Bereich (n) | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz |
|--------------------------|---|---|-------------------------------------|
| Tag 0 | | | |
| % CD14 ⁺ | 98,0 ± 0,5 94,9 – 99,9 (15) | 98,2 ± 0,2 97,0 – 99,2 (10) | ns |
| % CD83 ⁺ | 2,4 ± 0,9 0,8 – 7,8 (7) | 0,7 ± 0,1 0,1 – 1,5 (10) | ns |
| % CD1a ⁺ | 3,5 ± 1,2 0,9 – 7,0 (6) | 1,3 ± 0,2 0,3 – 2,5 (10) | ns |
| Tag 9 | | | |
| % CD14 ⁺ | 14,1 ± 4,2 0,2 – 51,7 (15) | 20,8 ± 4,6 0,5 – 55,5 (13) | ns |
| % CD83 ⁺ | 34,1 ± 7,3 1,7 - 90,6 (15) | 24,3 ± 6,7 4,8 - 70,0(13) | ns |
| % CD1a ⁺ | 5,5 ± 1,2 0,4 – 14,0 (13) | 5,1 ± 1,7 0,1 - 17,0 (13) | ns |
| % CD40 ⁺ | 88,1 ± 6,4 25,5 – 99,5 (11) | 86,5 ± 2,7 70,6 – 98,5 (13) | ns |
| % CD80 ⁺ | 59,8 ± 6,5 33,6 – 94,3 (10) | 40,7 ± 5,8 10,2 – 73,0 (13) | p=0,044 |
| % CD86 ⁺ | 90,7 ± 2,6 75,8 – 99,2 (11) | 92,2 ± 2,6 69,7 – 99,9 (13) | ns |
| % HLA-DR ⁺ | 87,4 ± 4,0 59,7 – 99,7 (11) | 79,9 ± 4,0 48,8 – 96,6 (13) | ns |
| % Vitalität | 96,1 ± 0,6 93,0 – 100,0 (13) | 95,6 ± 0,9 90,0 – 100,0 (13) | ns |
| % Ausbeute | 38,4 ± 2,6 23,5 – 54,0 (13) | 47,0 ± 3,3 25,0 - 65,0 (12) | ns |
| Anzahl CD14 [*] | 0,5 ± 0,2 0,0 – 2,0 (13) | 1,0 ± 0,2 0,0 - 2,7 (13) | ns |
| Anzahl CD83 [*] | 1,3 ± 0,3 0,0 – 3,8 (13) | 0,9 ± 0,2 0,0 – 2,8 (13) | ns |
| Anzahl CD1a [*] | 0,2 ± 0,1 0,0 – 0,7 (13) | 0,2 ± 0,1 0,0 – 0,6 (12) | ns |

ns – nicht signifikant; * - x10⁵/10⁶ Input

Tabelle 3.2.1

Vergleich der DC-Differenzierung aus Monozyten von Gliompatienten in
X-Vivo 15 und CGDC-Medium

| | CellGro MW±SEM Bereich (n) | X-Vivo 15 MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Tag 0 | | | |
| %CD14 ⁺ | 98,8± 0,5 97,3 – 99,9 (5) | 98,8± 0,5 97,3 – 99,9 (5) | ns |
| %CD83 ⁺ | 1,0 ± 0,2 0,8 – 1,4 (3) | 1,0 ± 0,2 0,8 – 1,4 (3) | ns |
| Tag 3 | | | |
| %CD14 ⁺ | 42,0 ± 9,1 16,8 – 64,7 (5) | 74,8 ± 6,4 57,3 – 91,0 (5) | p=0,041 |
| %CD83 ⁺ | 0,8 ± 0,2 0,4 – 1,7 (5) | 0,9 ± 0,3 0,2 – 1,7 (5) | ns |
| Tag 6 | | | |
| %CD14 ⁺ | 23,1 ± 14,8 0,3 – 62,4(4) | 47,2 ± 13,8 20,9 – 75,9 (4) | ns |
| %CD83 ⁺ | 1,2 ± 0,2 0,7 – 1,6 (5) | 1,2 ± 0,7 0,2 – 4,2 (5) | ns |
| Tag 9 | | | |
| %CD14 ⁺ | 1,4 ± 0,6 0,1 – 9,9 (18) | 15,1 ± 4,4 0,2 – 51,7 (14) | p=0,013 |
| %CD83 ⁺ | 64,3 ± 5,5 8,3 – 92,9(18) | 32,9 ± 7,8 1,7 – 90,6 (14) | p=0,001 |
| %CD1a ⁺ | 36,9 ± 7,6 3,3 – 95,5 (18) | 5,0 ± 1,2 0,4– 14,0 (12) | p=0,002 |
| % Ausbeute | 27,7 ± 2,3 12,5 – 42,0 (17) | 38,4 ± 2,6 23,5 – 54,0 (13) | p=0,025 |
| Anzahl CD14 ⁺ | 0,039 ± 0,019 0,001 – 0,320 (17) | 0,477 ± 0,154 0,005 – 2,016 (13) | p=0,009 |
| Anzahl CD83 ⁺ | 1,827 ± 0,255 0,140 – 3,557 (17) | 1,331 ± 0,331 0,048 – 3,839 (13) | ns |

Tabelle 3.2.2

Vergleich der Expression costimulatorischer und von HLA-Molekülen von in X-Vivo 15 oder CGDC-Medium generierten reifen Dendritischen Zellen von Gliompatienten

| MFI | X-Vivo 15 MW±SEM Bereich (n) | CellGro MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|------------|---|---|---|
| CD40 | 8,7 ± 1,8 1,8 – 13,8 (7) | 10,5 ± 2,2 3,1 – 20,6 (7) | ns |
| CD80 | 7,2 ± 1,4 3,8 – 11,4 (6) | 10,1 ± 1,5 4,6 – 16 (6) | ns |
| CD86 | 28,9 ± 3,5 17,0 – 46,9 (7) | 35,9 ± 4,0 19,2 – 98,5 (7) | p=0,018 |
| HLA-DR | 126,8 ± 42,9 10,0 – 478,8 (13) | 311,4 ± 93,9 11,3 – 954,2 (12) | p=0,003 |
| HLA-ABC | 666,9 ± 127,8 244,2 – 1066,7 (6) | 1004,9 ± 99,8 701,7 – 1322,3(6) | p=0,020 |

ns – nicht signifikant, MFI – mittlere Fluoreszenzintensität

Tabelle 3.2.3

Vergleich der Frequenzen der IL-2, IL-4 und IFN γ produzierenden T-Zellen nach Stimulation mit in X-Vivo 15 oder CGDC Medium generierten reifen Dendritischen Zellen

| | X-Vivo 15 MW\pmSEM Bereich (n) | CGDC MW\pmSEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|----------------------------|--|---|---|
| %IL-2 ⁺ | 1,8 \pm 0,3 0,7 – 3,1 (6) | 4,2 \pm 1,5 1,5 – 7,6 (7) | p=0,037 |
| %IL-4 ⁺ | 0,6 \pm 0,2 0,2 – 1,3 (6) | 0,7 \pm 0,1 0,3 – 1,3 (7) | ns |
| %IFN γ ⁺ | 2,6 \pm 1,7 0,2 – 9,1 (6) | 3,6 \pm 1,0 1,3– 7,0 (6) | ns |

ns – nicht signifikant

Tabelle 3.2.4
Vergleich der DC-Generierung von Gliompatienten und
gesunden Probanden in CGDC Medium

| | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | Patienten MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|--------------------------|---|---|---|
| %CD14 d0 | 98,2 ± 0,2 97,0 – 99,2 (10) | 98,1 ± 0,4 94,9 – 99,9 (16) | ns |
| %CD83 d0 | 0,7 ± 0,1 0,1 – 1,5 (10) | 1,9 ± 0,8 0,1 – 7,8 (9) | ns |
| %CD1a d0 | 1,3 ± 0,2 0,3 – 2,5 (10) | 2,7 ± 1,0 0,1 – 7,0 (8) | ns |
| % CD14 ⁺ | 0,7 ± 0,2 0,1 – 2,2 (13) | 1,4 ± 0,6 0,1 – 9,9 (18) | ns |
| %CD83 ⁺ | 65,8 ± 6,8 13,2 - 96,4 (13) | 64,3 ± 5,5 8,3 – 92,9 (18) | ns |
| %CD1a ⁺ | 49,6 ± 7,5 9,4 – 84,5 (13) | 36,9 ± 7,6 3,3 - 95,5 (14) | ns |
| %CD40 ⁺ | 83,8 ± 4,4 45,3 – 99,5 (13) | 86,3 ± 3,7 55,8 – 99,3 (15) | ns |
| %CD80 ⁺ | 84,7 ± 5,9 26,2 – 99,6 (13) | 84,9 ± 4,3 52,8 – 99,8 (13) | ns |
| %CD86 ⁺ | 90,8 ± 1,9 73,8 – 98,4 (13) | 84,7 ± 3,7 55,8 – 98,5 (15) | ns |
| %HLA-DR ⁺ | 85,2 ± 3,3 58,8 – 99,7 (13) | 92,5 ± 2,7 67,8 – 99,7 (14) | p=0,025 |
| % Ausbeute | 23,9 ± 4,4 6,9 – 63,0 (13) | 27,7 ± 2,3 12,5 – 42,0 (17) | ns |
| Anzahl CD14 ⁺ | 0,0 ± 0,0 0,0 – 0,1 (13) | 0,1 ± 0,02 0,0 – 0,3 (17) | ns |
| Anzahl CD83 ⁺ | 1,8 ± 0,5 0,2 – 5,6 (13) | 1,8 ± 0,3 0,1 – 3,6 (17) | ns |

ns – nicht signifikant

Tabelle 3.3.1

Dosisabhängiger Einfluss der U373 und A172 konditionierten Medien auf die Expression der CD14 und CD83 Moleküle auf reifen Dendritischen Zellen

| | 10%CM MW±SEM Bereich (n) | 20%CM MW±SEM Bereich (n) | 40%CM MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|---|---|---|---|---|
| U373 | | | | |
| %CD14 ⁺ | 27,4 ±15,3 54,8 – 96,7 (6) | 48,5 ± 17,3 38,3 – 30,9 (19) | 42,7± 4,9 26,2 – 70,7 (8) | p ¹ =0,039 p ² <0,001 p ⁴ <0,001 |
| %CD83 ⁺ | 0,338 ± 0,087 0,058 – 0,690 (6) | 0,217 ± 0,040 0,015 – 0,596 (19) | 0,186 ± 0,041 0,066 – 0,355 (8) | p ¹ =0,042 p ² <0,001 p ⁴ <0,001 |
| %Ausbeute | 1,587 ± 0,231 0,692 – 2,829 (10) | 1,261 ± 0,196 0,556 – 4,571 (20) | 1,635 ± 0,218 0,556 – 2,571 (9) | p ¹ =ns p ² =ns p ⁴ =ns |
| %Viabilität | 1,098 ± 0,055 0,873 – 1,561 (12) | 0,932 ±0,035 0,492 – 1,164 (17) | 0,786 ±0,083 0,284 – 1,034 (10) | p ¹ =ns p ² =0,038 p ⁴ =0,035 |
| A172 | | | | |
| %CD14 ⁺ | 8,1 ± 4,3 0,1 – 22,5 (5) | 7,4 ± 2,2 0,2 – 20,5 (8) | 41,9 ± 12,3 10,3 – 10,6 (7) | p ¹ =ns p ² =0,042 p ⁴ <0,001 |
| %CD83 ⁺ | 0,720 ± 0,140 0,363 – 1,102 (5) | 0,239 ± 0,105 0,031 – 0,934 (8) | 0,097 ± 0,013 0,056 – 0,141 (7) | p ¹ =ns p ² =0,001 p ⁴ <0,001 |
| %Ausbeute | 1,327 ± 0,193 0,830 – 2,570 (9) | 1,491 ± 0,342 0,547 – 3,640 (8) | 1,583 ±0,329 0,611 – 3,500 (8) | p ¹ =ns p ² =0,038 p ⁴ =ns |
| %Viabilität | 0,977 ± 0,045 0,760 – 1,190 (9) | 0,870 ± 0,098 0,407 – 1,310 (8) | 0,874 ± 0,066 0,463 – 1,130 (8) | p ¹ =ns p ² =ns p ⁴ =ns |
| ns – nicht signifikant, p ¹ =10%CM, p ² =20%CM, p ⁴ =40%CM | | | | |

Tabelle 3.3.2

Einfluss gliomzellkonditionierter Medien auf die Expression von costimulatorischen, HLA- und Adhäsionsmolekülen reifer Dendritischer Zellen

| MFI | A172 MW±SEM Bereich (n) | U373 MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|------------|--|--|---|
| CD40 | 0,587 ± 0,143 0,282 – 0,935 (4) | 0,650 ± 0,087 0,397 – 0,914 (6) | p ^a =ns p ^b =0,009 |
| CD80 | 0,334 ± 0,066 0,226 – 0,455 (3) | 0,696 ± 0,142 0,453 – 1,021 (4) | p ^a = 0,030 p ^b =ns |
| CD86 | 0,841 ± 0,149 0,574 – 1,190 (4) | 0,565 ± 0,084 0,272 – 0,824 (6) | p ^a =ns p ^b =0,013 |
| CD58 | 0,743 ± 0,118 0,439 – 0,975 (4) | 0,860 ± 0,112 0,642 – 1,014 (3) | p ^a = ns p ^b =ns |
| HLA-DR | 0,350± 0,069 0,215 – 0,513 (4) | 0,466± 0,082 0,217 – 0,920 (8) | p ^a =0,012 p ^b =0,002 |
| HLA-ABC | 0,353 ± 0,087 0,206 – 0,583 (4) | 0,376 ±0,052 0,239 – 0,652 (8) | p ^a =0,019 p ^b <0,001 |
| CD50 | 3,556 ± 0,986 2,507 – 6,512 (4) | 4,292 ± 1,592 167,7 – 8,881 (4) | p ^a =0,015 p ^b =0,036 |
| CD54 | 0,641 ± 0,090 0,463 – 0,754 (3) | 0,603 ± 0,114 0,388 – 0,776 (3) | p ^a =ns p ^b =ns |

ns – nicht signifikant, MFI – mittlere Fluoreszenzintensität
p^a=A172CM, p^b=U373CM

Tabelle 3.3.3
HLA-Expression im Verlauf der Differenzierung Dendritischer Zellen
in der Gegenwart von U373-CM

| MFI | 40% U373 CM MW\pmSEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|--------------|--|---|
| Tag 3 | | |
| HLA-ABC | 0,506 \pm 0,067 0,383 – 0,616 (3) | p= 0,037 |
| HLA-DR | 0,328 \pm 0,064 0,259 – 0,455 (3) | p= 0,024 |
| Tag 6 | | |
| HLA-ABC | 0,379 \pm 0,058 0,297 – 0,490 (3) | p= 0,021 |
| HLA-DR | 0,360 \pm 0,013 0,206 – 0,618 (3) | p= ns |
| Tag 9 | | |
| HLA-ABC | 0,271 \pm 0,025 0,239 – 0,320 (3) | p= 0,005 |
| HLA-DR | 0,261 \pm 0,027 0,217 – 0,309 (3) | p= 0,006 |

ns – nicht signifikant, MFI – mittlere Fluoreszenzintensität

Tab.3.3.4

**Cytokin- und Chemokinexpressionsprofil reifer Dendritischer Zellen, sowie
Systematische Nomenklatur für Chemokine**

(nach IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2001)*

| | Name des Liganden | Bezeichnung | SN* | Rezeptor | Chromosom | CRF | Signal-Stärke K-DC |
|----|--------------------------|---|------------|------------------|------------------|------------|---------------------------|
| 1 | I-309 | I-309 | CCL1 | CCR8 | 17q11.2 | CC | +++ |
| 2 | MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein | CCL2 | CCR2 | 17q11.2 | CC | +++ |
| 3 | MIP-1 beta | Macrophage Inflammatory Protein 1 beta | CCL4 | CCR5 | 17q12 | CC | ++++ |
| 4 | RANTES | Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted | CCL5 | CCR1, CCR3, CCR5 | 17q12 | CC | + |
| 5 | MCP-3 | Monocyte Chemoattractant Protein 3 | CCL7 | CCR1, CCR2, CCR3 | 17q11.2 | CC | +++ |
| 6 | MCP-2 | Monocyte Chemoattractant Protein 2 | CCL8 | CCR3, CCR5 | 17q11.2 | CC | +++ |
| 7 | Eotaxin | Eotaxin | CCL11 | CCR3 | 17q11.2 | CC | - |
| 8 | MCP-4 | Monocyte Chemoattractant Protein 4 | CCL13 | CCR2, CCR3 | 17q11.2 | CC | +++ |
| 9 | MIP-1 delta | Macrophage Inflammatory Protein 1 delta | CCL15 | CCR1, CCR3 | 17q12 | CC | +++ |
| 10 | TARC | Thymus and Activation-Regulated Chemokine | CCL17 | CCR4 | 16q13 | CC | ++ |
| 11 | MIP-3 alpha | Macrophage Inflammatory Protein 3 alpha | CCL20 | CCR6 | 2q36.3 | CC | ++ |
| 12 | MDC | Macrophage-derived Chemokine | CCL22 | CCR4 | 16q13 | CC | +++ |
| 13 | Ck beta 8-1 | Chemokine-beta-8-1 | CCL23 | CCR1 | 17q12 | CC | - |
| 14 | Eotaxin-2 | MPIF-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2), Chemokine-beta-6 | CCL24 | CCR3 | 7q11.23 | CC | ++++ |
| 15 | Eotaxin-3 | MIP-4-alpha (macrophage inflammatory protein-4-alpha), TSC-1 (thymic stroma chemokine-1) | CCL26 | CCR3 | 7q11.23 | CC | + |
| 16 | GRO | Growth Related Oncogene | CXCL1-3 | CXCR2 | 4q21.1 | CXC | +++ |
| 17 | GRO-alpha | Growth Related Oncogene-Alpha | CXCL1 | CXCR2>CXCR1 | 4q21.1 | CXC | - |
| 18 | ENA-78 | Epithelial neutrophil-activating protein 78, epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 | CXCL5 | CXCR2 | 4q21.1 | CXC | + |
| 19 | GCP-2 | Granulocyte Chemotactic Protein 2 | CXCL6 | CXCR1, CXCR2 | 4q21.1 | CXC | +++ |
| 20 | NAP-2 | Neutrophil Activating Peptide 2 | CXCL7 | CCR2 | 4q21.1 | CXC | ++++ |
| 21 | IL-8 | Interleukin 8 | CXCL8 | CXCR1, CXCR2 | 4q21.1 | CXC | +++++ |
| 22 | MIG | Monokine induced by gamma interferon | CXCL9 | CXCR3 | 4q21.1 | CXC | - |
| 23 | IP-10 | IFN-gamma inducible Protein 10, Immune Protein 10 | CXCL10 | CXCR3 | 4q21.1 | CXC | +++ |
| 24 | SDF-1 | Stromal cell-derived factor | CXCL12 | CXCR4, CXCR7 | 10q11.21 | CXC | +/- |
| 25 | Fractalkine | Fractalkine or FK | CX3CL1 | CX3CR1 | 16q13 | CX3C | - |
| 26 | IL-1 alpha | Interleukin 1 alpha | | | | | ++ |
| 27 | IL-1 beta | Interleukin 1 beta | | | | | + |
| 28 | IL-2 | Interleukin 2 | | | | | + |
| 29 | IL-3 | Interleukin 3 | | | | | - |
| 30 | IL-4 | Interleukin 4 | | | | | +++ |
| 31 | IL-5 | Interleukin 5 | | | | | - |
| 32 | IL-6 | Interleukin 6 | | | | | +++++ |
| 33 | IL-7 | Interleukin 7 | | | | | - |
| 34 | IL-10 | Interleukin 10 | | | | | ++ |
| 35 | IL-12 | Interleukin 12 | | | | | +++ |
| 36 | IL-13 | Interleukin 14 | | | | | - |
| 37 | IL-15 | Interleukin 15 | | | | | - |
| 38 | IL-16 | Interleukin 16 | | | | | +++ |
| 39 | IFN-gamma | Interferon gamma | | | | | + |
| 40 | ANG | Angiogenin | | | | | +++ |
| 41 | BDNF | Brain-derived neurotrophic factor | | | | | +/- |
| 42 | BLC | B-lymphocyte chemoattractant | | | | | - |
| 43 | EGF | Epidermal growth factor | | | | | ++ |
| 44 | FGF-4 | Fibroblast growth factor-4 | | | | | +++ |

| | | | | | | | | |
|----|------------------------|--|--|--|--|--|--|------|
| 45 | FGF-6 | Fibroblast growth factor-6 | | | | | | + |
| 46 | FGF-7 | Fibroblast growth factor-7 | | | | | | +++ |
| 47 | FGF-9 | Fibroblast growth factor-9 | | | | | | ++ |
| 48 | Fit-3 Ligand | fms-like tyrosine kinase-3 Ligand (also known as STK-1 Ligand) | | | | | | - |
| 49 | GCSF | Granulocyte-colony Stimulating Factor | | | | | | +/- |
| 50 | GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony stimulating factor | | | | | | ++++ |
| 51 | GDNF | Glial-derived Neurotrophic Factor | | | | | | +++ |
| 52 | HGF | Hematopoietic growth factors, hepatocyte growth factor | | | | | | +++ |
| 53 | IGF-I | Insulin-like growth factor-1 | | | | | | - |
| 54 | IGFBP-1 | Insulin-like growth factor binding proteins 1 | | | | | | +++ |
| 55 | IGFBP-2 | Insulin-like growth factor binding proteins 2 | | | | | | +++ |
| 56 | IGFBP-3 | Insulin-like growth factor binding proteins 3 | | | | | | +++ |
| 57 | IGFBP-4 | Insulin-like growth factor binding proteins 4 | | | | | | + |
| 58 | LEPTIN(OB) | LEPTIN | | | | | | - |
| 59 | LIF | Leukemia Inhibitory Factor | | | | | | +++ |
| 60 | LIGHT | LIGHT | | | | | | + |
| 61 | M-CSF | Macrophage colony stimulating factor | | | | | | +++ |
| 62 | MIF | Macrophage Migration Inhibitory Factor | | | | | | +++ |
| 63 | NT-3 | Neurotrophin-3 | | | | | | + |
| 64 | NT-4 | Neurotrophin-4 | | | | | | +++ |
| 65 | Osm | Oncostatin M | | | | | | ++++ |
| 66 | Osteoprotegerin | Osteoprotegerin | | | | | | ++++ |
| 67 | PARC | Pulmonary and Activation-Regulated Chem | | | | | | ++++ |
| 68 | PDGF-BB | Platelet-derived Growth Factor BB | | | | | | + |
| 69 | PIGF | Placenta growth Factor | | | | | | +++ |
| 70 | SCF | Stem Cell Factor | | | | | | +/- |
| 71 | TGF-beta 2 | Tumor Necrosis Factor beta2 | | | | | | +++ |
| 72 | TGF-beta 3 | Tumor Necrosis Factor beta3 | | | | | | + |
| 73 | TGF-beta | Tumor Necrosis Factor beta | | | | | | - |
| 74 | TIMP-1 | Tissue inhibitor of metalloproteinases- | | | | | | ++++ |
| 75 | TIMP-2 | Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 | | | | | | ++++ |
| 76 | TNF-alpha | Tumor necrosis factor-alpha | | | | | | +++ |
| 77 | TNF-beta | Tumor necrosis factor-beta | | | | | | + |
| 78 | TPO | Thrombopoietin | | | | | | + |
| 79 | VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor | | | | | | + |

Tabelle 3.3.5

**Einfluss gliomkonditionierter Medien auf die Pinocytose-Aktivität und den
Phänotyp unreifer Dendritischen Zellen**

| FITC-BSA Konzentration [µg/ml] | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | A172 DC MW±SEM Bereich (n) | U373 DC MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|---|---|---|---|---|
| 4°C | | | | |
| 0,01 | 0,40± 0,03 0,37 – 0,43 (2) | 0,44 ± 0,04 0,38 – 0,51 (3) | 0,38 ± 0,05 0,34 – 0,43 (2) | ns |
| 0,1 | 0,60± 0,02 0,58 – 0,62 (2) | 0,57 ± 0,05 0,48 – 0,64 (3) | 0,47 ± 0,04 0,43 – 0,51 (2) | ns |
| 1 | 1,03 ± 0,05 0,98 – 1,08 (2) | 0,96 ± 0,05 0,90 – 1,05 (3) | 0,63 ± 0,05 0,58 – 0,68 (2) | ns |
| 10 | 1,61 ± 0,25 1,16 – 2,01 (3) | 2,23± 0,18 1,96 – 2,57 (3) | 1,54 ± 0,27 1,27 – 1,80 (2) | ns |
| 100 | 5,20 ± 1,65 2,64 – 8,29 (3) | 6,34 ± 2,34 3,69 – 11,00 (3) | 4,15 ± 0,05 4,10 – 4,19 (2) | ns |
| 37°C | | | | |
| 0,01 | 1,3 ± 0,1 1,2 – 1,4 (2) | 0,9 ± 0,3 0,5 – 1,4 (3) | 0,7 ± 0,0 0,7 – 0,67 (2) | ns |
| 0,1 | 6,61 ± 0,01 6,6 – 6,6 (2) | 4,0± 1,4 1,6 – 6,5 (3) | 2,5± 0,0 2,5 – 2,5 (2) | ns |
| 1 | 24,1 ± 1,5 21,3 – 26,4 (3) | 29,5 ± 10,9 14,2 – 50,5 (3) | 7,8 ± 2,7 2,4 – 10,7 (3) | ns |
| 10 | 48,2 ± 2,1 45,1 – 52,2 (3) | 50,9 ± 14,0 24,3 – 75,2 (4) | 19,9 ± 5,9 8,6 – 28,5 (3) | ns |
| 100 | 66,0 ± 3,1 61,0 – 71,6 (3) | 85,6 ± 19,9 48,3 – 128,8 (4) | 34,9 ± 4,4 26,9 – 42,2 (3) | p ^a = ns p ^b =0,031 |
| Phänotyp unreifer DC | | | | |
| % Viabilität | 97,6 ± 1,2 95,8 – 100,0 (3) | 97,6 ± 0,7 96,0 – 99,2 (4) | 95,5 ± 1,5 92,6 – 97,0 (3) | ns |
| %CD14 ⁺ | 7,2 ± 1,1 5,1 – 8,8 (3) | 46,9 ± 12,4 23,4 – 80,2 (4) | 50,6 ± 5,7 39,6 – 58,9 (3) | p ^a =0,009 p ^b =0,002 |
| %CD83 ⁺ | 3,0 ± 1,5 1,2 – 5,9 (3) | 2,9 ± 2,2 0,2 – 9,4 (4) | 0,7 ± 0,1 0,5 – 0,9 (3) | ns |

ns – nicht signifikant, p^a= A172 CM, p^b= U373 CM

Tabelle 3.3.6

Einfluss der Dendritischer Zellen, welche in Gegenwart von 20% U373 konditionierten Medium generiert wurden, auf die T-Zellpolarisierung

| Frequenz | Kontrolle MW±SEM Bereich (n) | U373 CM MW±SEM Bereich (n) | statistische Signifikanz Ratio paired t-test |
|--|---|---|---|
| %CD3⁺ | 77,4 ± 5,7 58,8 – 96,4 (6) | 85,3 ± 4,7 70,0 – 96,4 (6) | ns |
| %IL-2⁺ | 16,5 ± 3,8 3,8 – 26,6 (6) | 6,4 ± 1,4 2,6 – 11,4 (6) | p=0,008 |
| %IL-4⁺ | 2,3 ± 0,9 1,4 – 4,1 (3) | 1,4 ± 0,04 1,3 – 1,4 (2) | ns |
| %IFNγ⁺ | 12,2 ± 2,4 3,4 – 23,7 (8) | 4,2 ± 0,9 1,1 – 8,4 (8) | p<0,001 |

ns – nicht signifikant

7. Referenzen

1. Janeway, C. A., Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216 (2002).
2. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 12: 991-1045 (1994).
3. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296: 301-305 (2002).
4. Sallusto, F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 22: 745-763 (2004).
5. McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams M. G. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol.* 23: 487-513 (2005).
6. Colucci, F., Caligiuri M. A., Di Santo J. P. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 3: 413-425 (2003).
7. Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 47: 187-376 (1989).
8. del Val, M., Hengel H., Hacker H., Hartlaub U., Ruppert T., Lucin P., Koszinowski U. H. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med.* 176: 729-738 (1992).
9. Jimenez, P., Canton J., Collado A., Cabrera T., Serrano A., Real L. M., Garcia A., Ruiz-Cabello F., Garrido F. Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer.* 83: 91-97 (1999).
10. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 23: 225-274 (2005).
11. Russell, J. H., Ley T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 20: 323-370 (2002).
12. Lord, S. J., Rajotte R. V., Korbutt G. S., Bleackley R. C. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 193: 31-38 (2003).
13. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3: 361-370 (2003).
14. Moretta, A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell.* 90: 13-18 (1997).
15. Medvedev, A. E., Johnsen A. C., Haux J., Steinkjer B., Egeberg K., Lynch D. H., Sundan A., Espevik T. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine.* 9: 394-404 (1997).
16. Young, J. D., Cohn Z. A. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv Immunol.* 41: 269-332 (1987).
17. Gallegos, A. M., Bevan M. J. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev.* 209: 290-296 (2006).
18. Janeway, C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.: *Immunobiology: The immune system in health and disease* (ed 6). London, Garland Science, 2005
19. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 9: 271-296 (1991).
20. Banchereau, J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y. J., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18: 767-811 (2000).
21. Vandenabeele, S., Wu L. Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes. *Immunol Cell Biol.* 77: 411-419 (1999).

22. Liu, Y. J., Kanzler H., Soumelis V., Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2: 585-589. (2001).
23. Shortman, K., Liu Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2: 151-161 (2002).
24. Rissoan, M. C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R., Liu Y. J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283: 1183-1186 (1999).
25. Randolph, G. J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R. M., Muller W. A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science.* 282: 480-483 (1998).
26. Romani, N., Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O., Steinman R. M., Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 180: 83-93 (1994).
27. Sallusto, F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179: 1109-1118 (1994).
28. Zhou, L. J., Tedder T. F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 154: 3821-3835 (1995).
29. Lipscomb, M. F., Masten B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82: 97-130 (2002).
30. Trombetta, E. S., Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 23: 975-1028 (2005).
31. Caux, C., Ait-Yahia S., Chemin K., de Bouteiller O., Dieu-Nosjean M. C., Homey B., Massacrier C., Vanbervliet B., Zlotnik A., Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol.* 22: 345-369 (2000).
32. Yoneyama, H., Matsuno K., Matsushimaa K. Migration of dendritic cells. *Int J Hematol.* 81: 204-207 (2005).
33. Sattaporn, S., Eremin O. Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb.* 46: 9-19 (2001).
34. Kalinski, P., Hilkens C. M., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 20: 561-567 (1999).
35. de Jong, E. C., Smits H. H., Kapsenberg M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 26: 289-307 (2005).
36. Nijman, H. W., Kleijmeer M. J., Ossevoort M. A., Oorschot V. M., Vierboom M. P., van de Keur M., Kenemans P., Kast W. M., Geuze H. J., Melief C. J. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med.* 182: 163-174 (1995).
37. Banchereau, J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245-252 (1998).
38. Dhodapkar, M. V., Steinman R. M., Krasovsky J., Munz C., Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 193: 233-238 (2001).
39. Dhodapkar, M. V., Steinman R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 100: 174-177 (2002).

40. Lutz, M. B., Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23: 445-449 (2002).
41. Cresswell, P., Ackerman A. L., Giodini A., Peaper D. R., Wearsch P. A. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev.* 207: 145-157 (2005).
42. Yewdell, J. W., Anton L. C., Bennink J. R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol.* 157: 1823-1826 (1996).
43. Bates, E. E., Ravel O., Dieu M. C., Ho S., Guret C., Bridon J. M., Ait-Yahia S., Briere F., Caux C., Banchereau J., Lebecque S. Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur J Immunol.* 27: 2471-2477 (1997).
44. Yewdell, J. W., Schubert U., Bennink J. R. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci.* 114: 845-851 (2001).
45. Heath, W. R., Carbone F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 19: 47-64 (2001).
46. Belz, G. T., Carbone F. R., Heath W. R. Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 22: 439-448 (2002).
47. Guermonprez, P., Saveanu L., Kleijmeer M., Davoust J., Van Endert P., Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 425: 397-402 (2003).
48. Inaba, K. Dendritic cells as antigen-presenting cells in vivo. *Immunol Cell Biol.* 75: 206-208 (1997).
49. Mellman, I., Steinman R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106: 255-258 (2001).
50. Guinan, E. C., Gribben J. G., Boussiotis V. A., Freeman G. J., Nadler L. M. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood.* 84: 3261-3282 (1994).
51. Carreno, B. M., Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 20: 29-53 (2002).
52. Boussiotis, V. A., Freeman G. J., Gribben J. G., Nadler L. M. The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev.* 153: 5-26 (1996).
53. Jonuleit, H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 192: 1213-1222 (2000).
54. Levings, M. K., Gregori S., Tresoldi E., Cazzaniga S., Bonini C., Roncarolo M. G. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood.* 105: 1162-1169 (2005).
55. McLellan, A. D., Sorg R. V., Williams L. A., Hart D. N. J. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol.* 26: 1204-1210 (1996).
56. O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8: 275-283 (1998).
57. Szabo, S. J., Sullivan B. M., Peng S. L., Glimcher L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 21: 713-758 (2003).

58. Mowen, K. A., Glimcher L. H. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev.* 202: 203-222 (2004).
59. Creusot, R. J., Mitchison N. A., Terazzini N. M. The immunological synapse. *Mol Immunol.* 38: 997-1002 (2002).
60. Steinman, R. M., Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer.* 94: 459-473 (2001).
61. Schuler, G., Schuler-Thurner B., Steinman R. M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 15: 138-147 (2003).
62. Mutis, T., Verdijk R., Schrama E., Esendam B., Brand A., Goulmy E. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood.* 93: 2336-2341 (1999).
63. Kurokawa, T., Oelke M., Mackensen A. 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. *Int J Cancer.* 91: 749-756 (2001).
64. Hsu, F. J., Benike C., Fagnoni F., Liles T. M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E. G., Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 2: 52-58 (1996).
65. Fearnley, D. B., Whyte L. F., Carnoutsos S. A., Cook A. H., Hart D. N. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood.* 93: 728-736 (1999).
66. Santiago-Schwarz, F., Belilos E., Diamond B., Carsons S. E. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol.* 52: 274-281 (1992).
67. Caux, C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D., Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 360: 258-261 (1992).
68. Siena, S., Di Nicola M., Bregni M., Mortarini R., Anichini A., Lombardi L., Ravagnani F., Parmiani G., Gianni A. M. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol.* 23: 1463-1471 (1995).
69. Sloand, E. M., Kim S., Maciejewski J. P., Van Rhee F., Chaudhuri A., Barrett J., Young N. S. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood.* 95: 2269-2274 (2000).
70. Nishimura, T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., Sato T., Habu S., Tashiro H., Sato M., Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med.* 190: 617-627 (1999).
71. Zhou, L. J., Tedder T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 2588-2592 (1996).
72. Jonuleit, H., Kuhn U., Muller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A. H. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 27: 3135-3142 (1997).
73. Bender, A., Sapp M., Schuler G., Steinman R. M., Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods.* 196: 121-135 (1996).

74. Mailliard, R. B., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilkens C. M., Kapsenberg M. L., Kirkwood J. M., Storkus W. J., Kalinski P. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 64: 5934-5937 (2004).
75. Sorg, R. V., Andres S., Kögler G., Fischer J., Wernet P. Phenotypic and functional comparison of monocytes from cord blood and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis products. *Exp Hematol.* 29: 1289-1294 (2001).
76. Thurner, B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 223: 1-15 (1999).
77. Bernard, J., Ittelet D., Christoph A., Potron G., Adjizian J. C., Kochman S., Lopez M. Adherent-free generation of functional dendritic cells from purified blood monocytes in view of potential clinical use. *Hematol Cell Ther.* 40: 17-26 (1998).
78. Padley, D. J., Dietz A. B., Gastineau D. A., Vuk-Pavlovic S. Mature myeloid dendritic cells for clinical use prepared from CD14+ cells isolated by immunomagnetic adsorption. *J Hematother Stem Cell Res.* 10: 427-429 (2001).
79. Sorg, R. V., Özcan Z., Brefort T., Fischer J., Ackermann R., Müller M., Wernet P. Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunotherapy.* 26: 374-383 (2003).
80. Suen, Y., Lee S. M., Aono F., Hou S., Loudovaris M., Ofstein G., Bender J. G. Comparison of monocyte enrichment by immuno-magnetic depletion or adherence for the clinical-scale generation of DC. *Cytotherapy.* 3: 365-375 (2001).
81. Stoler, D. L., Chen N., Basik M., Kahlenberg M. S., Rodriguez-Bigas M. A., Petrelli N. J., Anderson G. R. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 15121-15126 (1999).
82. Fabarius, A., Hehlmann R., Duesberg P. H. Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet.* 143: 59-72 (2003).
83. van der Bruggen, P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 254: 1643-1647 (1991).
84. Novellino, L., Castelli C., Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother.* 54: 187-207 (2005).
85. Shankaran, V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410: 1107-1111 (2001).
86. Girardi, M., Glusac E., Filler R. B., Roberts S. J., Propperova I., Lewis J., Tigelaar R. E., Hayday A. C. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med.* 198: 747-755 (2003).

87. Smyth, M. J., Crowe N. Y., Godfrey D. I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 13: 459-463 (2001).
88. Dunn, G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., Schreiber R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 3: 991-998 (2002).
89. Dunn, G. P., Old L. J., Schreiber R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22: 329-360 (2004).
90. Dunn, G. P., Old L. J., Schreiber R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21: 137-148 (2004).
91. Khong, H. T., Restifo N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 3: 999-1005 (2002).
92. Penna, G., Giarratana N., Amuchastegui S., Mariani R., Daniel K. C., Adorini L. Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microbes Infect.* 7: 1033-1039 (2005).
93. Natali, P. G., Nicotra M. R., Bigotti A., Ventura I., Marcenaro L., Giacomini P., Russo C. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 6719-6723 (1989).
94. Igney, F. H., Krammer P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2: 277-288 (2002).
95. Pawelec, G. Tumour escape from the immune response. *Cancer Immunol Immunother.* 53: 843 (2004).
96. Fuchs, E. J., Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol.* 8: 271-280 (1996).
97. Seliger, B., Maeurer M. J., Ferrone S. TAP off--tumors on. *Immunol Today.* 18: 292-299 (1997).
98. Johnsen, A. K., Templeton D. J., Sy M., Harding C. V. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol.* 163: 4224-4231 (1999).
99. Nagase, F., Rahman S. M., Yokochi T., Kawashima K., Isobe K., Yoshida T., Nagura E., Nakashima I. Dynamics of generation of antigen loss variants from L1210 murine leukemia clones detected by a tumor-specific T-cell clone. *Cancer Res.* 47: 6494-6499 (1987).
100. Landowski, T. H., Qu N., Buyuksal I., Painter J. S., Dalton W. S. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood.* 90: 4266-4270 (1997).
101. Shin, M. S., Park W. S., Kim S. Y., Kim H. S., Kang S. J., Song K. Y., Park J. Y., Dong S. M., Pi J. H., Oh R. R., Lee J. Y., Yoo N. J., Lee S. H. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol.* 154: 1785-1791 (1999).
102. Irmeler, M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J. L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L. E., Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 388: 190-195 (1997).
103. Medema, J. P., de Jong J., van Hall T., Melief C. J., Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med.* 190: 1033-1038 (1999).
104. Nagao, M., Nakajima Y., Hisanaga M., Kayagaki N., Kanehiro H., Aomatsu Y., Ko S., Yagita H., Yamada T., Okumura K., Nakano H. The alteration of Fas

- receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo? *Hepatology*. 30: 413-421 (1999).
105. Pitti, R. M., Marsters S. A., Lawrence D. A., Roy M., Kischkel F. C., Dowd P., Huang A., Donahue C. J., Sherwood S. W., Baldwin D. T., Godowski P. J., Wood W. I., Gurney A. L., Hillan K. J., Cohen R. L., Goddard A. D., Botstein D., Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 396: 699-703 (1998).
 106. Hahne, M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L. E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 274: 1363-1366 (1996).
 107. Bennett, M. W., O'Connell J., O'Sullivan G. C., Brady C., Roche D., Collins J. K., Shanahan F. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol*. 160: 5669-5675 (1998).
 108. Sawamura, Y., Diserens A. C., de Tribolet N. In vitro prostaglandin E2 production by glioblastoma cells and its effect on interleukin-2 activation of oncolytic lymphocytes. *J Neurooncol*. 9: 125-130 (1990).
 109. Akasaki, Y., Liu G., Chung N. H., Ehtesham M., Black K. L., Yu J. S. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol*. 173: 4352-4359 (2004).
 110. Van Meir, E., Sawamura Y., Diserens A. C., Hamou M. F., de Tribolet N. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 50: 6683-6688 (1990).
 111. Nitta, T., Hishii M., Sato K., Okumura K. Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme. *Brain Res*. 649: 122-128 (1994).
 112. Huettner, C., Czub S., Kerkau S., Roggendorf W., Tonn J. C. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res*. 17: 3217-3224 (1997).
 113. Salmaggi, A., Eoli M., Frigerio S., Silvani A., Gelati M., Corsini E., Broggi G., Boiardi A. Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 62: 297-303 (2003).
 114. Huang, H., Held-Feindt J., Buhl R., Mehdorn H. M., Mentlein R. Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors. *Neurol Res*. 27: 371-377 (2005).
 115. de Martin, R., Haendler B., Hofer-Warbinek R., Gaugitsch H., Wrann M., Schlusener H., Seifert J. M., Bodmer S., Fontana A., Hofer E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *Embo J*. 6: 3673-3677 (1987).
 116. Yang, T., Witham T. F., Villa L., Erff M., Attanucci J., Watkins S., Kondziolka D., Okada H., Pollack I. F., Chambers W. H. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. *Cancer Res*. 62: 2583-2591 (2002).
 117. Kikuchi, T., Abe T., Ohno T. Effects of glioma cells on maturation of dendritic cells. *J Neurooncol*. 58: 125-130 (2002).
 118. Ashkenazi, E., Deutsch M., Tirosh R., Weinreb A., Tsukerman A., Brodie C. A selective impairment of the IL-2 system in lymphocytes of patients with

- glioblastomas: increased level of soluble IL-2R and reduced protein tyrosine phosphorylation. *Neuroimmunomodulation*. 4: 49-56 (1997).
119. Dix, A. R., Brooks W. H., Roszman T. L., Morford L. A. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol*. 100: 216-232 (1999).
 120. Parney, I. F., Hao C., Petruk K. C. Glioma immunology and immunotherapy. *Neurosurgery*. 46: 778-791; discussion 791-772 (2000).
 121. Jessen, K. R. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 1861-1867 (2004).
 122. Stupp, R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 352: 987-996 (2005).
 123. McLendon, R. E., Wikstrand C. J., Matthews M. R., Al-Baradei R., Bigner S. H., Bigner D. D. Glioma-associated antigen expression in oligodendroglial neoplasms. Tenascin and epidermal growth factor receptor. *J Histochem Cytochem*. 48: 1103-1110 (2000).
 124. Kurpad, S. N., Zhao X. G., Wikstrand C. J., Batra S. K., McLendon R. E., Bigner D. D. Tumor antigens in astrocytic gliomas. *Glia*. 15: 244-256 (1995).
 125. Ventimiglia, J. B., Wikstrand C. J., Ostrowski L. E., Bourdon M. A., Lightner V. A., Bigner D. D. Tenascin expression in human glioma cell lines and normal tissues. *J Neuroimmunol*. 36: 41-55 (1992).
 126. Yamada, Y., Kuroiwa T., Nakagawa T., Kajimoto Y., Dohi T., Azuma H., Tsuji M., Kami K., Miyatake S. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg*. 99: 738-745 (2003).
 127. Imaizumi, T., Kuramoto T., Matsunaga K., Shichijo S., Yutani S., Shigemori M., Oizumi K., Itoh K. Expression of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. *Int J Cancer*. 83: 760-764 (1999).
 128. Okano, F., Storkus W. J., Chambers W. H., Pollack I. F., Okada H. Identification of a novel HLA-A*0201-restricted, cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor alpha2 chain. *Clin Cancer Res*. 8: 2851-2855 (2002).
 129. Chi, D. D., Merchant R. E., Rand R., Conrad A. J., Garrison D., Turner R., Morton D. L., Hoon D. S. Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol*. 150: 2143-2152 (1997).
 130. Yamanaka, R., Abe T., Yajima N., Tsuchiya N., Homma J., Kobayashi T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. *Br J Cancer*. 89: 1172-1179 (2003).
 131. Yu, J. S., Liu G., Ying H., Yong W. H., Black K. L., Wheeler C. J. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res*. 64: 4973-4979 (2004).
 132. Rutkowski, S., De Vleeschouwer S., Kaempgen E., Wolff J. E., Kuhl J., Demaerel P., Warmuth-Metz M., Flamen P., Van Calenbergh F., Plets C., Sorensen N., Opitz A., Van Gool S. W. Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *Br J Cancer*. 91: 1656-1662 (2004).
 133. De Vleeschouwer, S., Van Calenbergh F., Demaerel P., Flamen P., Rutkowski S., Kaempgen E., Wolff J. E., Plets C., Sciote R., Van Gool S. W. Transient local response and persistent tumor control in a child with recurrent malignant

- glioma: treatment with combination therapy including dendritic cell therapy. Case report. *J Neurosurg.* 100: 492-497 (2004).
134. Yamanaka, R., Homma J., Yajima N., Tsuchiya N., Sano M., Kobayashi T., Yoshida S., Abe T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin Cancer Res.* 11: 4160-4167 (2005).
 135. Yu, J. S., Wheeler C. J., Zeltzer P. M., Ying H., Finger D. N., Lee P. K., Yong W. H., Incardona F., Thompson R. C., Riedinger M. S., Zhang W., Prins R. M., Black K. L. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res.* 61: 842-847 (2001).
 136. Liao, L. M., Prins R. M., Kiertscher S. M., Odesa S. K., Kremen T. J., Giovannone A. J., Lin J. W., Chute D. J., Mischel P. S., Cloughesy T. F., Roth M. D. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 11: 5515-5525 (2005).
 137. Kikuchi, T., Akasaki Y., Irie M., Homma S., Abe T., Ohno T. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 50: 337-344 (2001).
 138. Kikuchi, T., Akasaki Y., Abe T., Fukuda T., Saotome H., Ryan J. L., Kufe D. W., Ohno T. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother.* 27: 452-459 (2004).
 139. Kögler, G., Callejas J., Hakenberg P., Enczmann J., Adams O., Däubener W., Krempe C., Göbel U., Somville T., Wernet P. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J Hematother.* 5: 105-116 (1996).
 140. Kögler, G., Callejas J., Sorg R. V., Fischer J., Migliaccio A. R., Wernet P. The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the ex-vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant.* 21: 233-241 (1998).
 141. Hock, B. D., Kato M., McKenzie J. L., Hart D. N. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol.* 13: 959-967 (2001).
 142. Bhondeley, M. K., Mehra R. D., Mehra N. K., Mohapatra A. K., Tandon P. N., Roy S., Bijlani V. Imbalances in T cell subpopulations in human gliomas. *J Neurosurg.* 68: 589-593 (1988).
 143. Morford, L. A., Dix A. R., Brooks W. H., Roszman T. L. Apoptotic elimination of peripheral T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. *J Neurosurg.* 91: 935-946 (1999).
 144. Prins, R. M., Graf M. R., Merchant R. E., Black K. L., Wheeler C. J. Thymic function and output of recent thymic emigrant T cells during intracranial glioma progression. *J Neurooncol.* 64: 45-54 (2003).
 145. Hintzen, R. Q., Voormolen J., Sonneveld P., van Duinen S. G. Glioblastoma causing granulocytosis by secretion of granulocyte-colony-stimulating factor. *Neurology.* 54: 259-261 (2000).
 146. Ausiello, C., Maleci A., Spagnoli G. C., Antonelli G., Cassone A. Cell-mediated cytotoxicity in glioma-bearing patients: differential responses of peripheral blood mononuclear cells to stimulation with interleukin-2 and microbial antigen. *J Neurooncol.* 6: 329-338 (1988).

147. Dhodapkar, K. M., Cirignano B., Chamian F., Zagzag D., Miller D. C., Finlay J. L., Steinman R. M. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. *Int J Cancer*. 109: 893-899 (2004).
148. Elliott, L. H., Brooks W. H., Roszman T. L. Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol*. 132: 1208-1215 (1984).
149. Blom, U., Blomgren H., Ullen H., Collins P., Von Holst H. Mitogen stimulation of blood lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. Correlation to histological tumor type. *Anticancer Res*. 5: 343-348 (1985).
150. Elliott, L., Brooks W., Roszman T. Role of interleukin-2 (IL-2) and IL-2 receptor expression in the proliferative defect observed in mitogen-stimulated lymphocytes from patients with gliomas. *J Natl Cancer Inst*. 78: 919-922 (1987).
151. Elliott, L. H., Brooks W. H., Roszman T. L. Inability of mitogen-activated lymphocytes obtained from patients with malignant primary intracranial tumors to express high affinity interleukin 2 receptors. *J Clin Invest*. 86: 80-86 (1990).
152. Brooks, W. H., Latta R. B., Mahaley M. S., Roszman T. L., Dudka L., Skaggs C. Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 5: Correlation of a lymphocyte index and clinical status. *J Neurosurg*. 54: 331-337 (1981).
153. Braun, D. P., Penn R. D., Flannery A. M., Harris J. E. Immunoregulatory cell function in peripheral blood leukocytes of patients with intracranial gliomas. *Neurosurgery*. 10: 203-209 (1982).
154. Morford, L. A., Elliott L. H., Carlson S. L., Brooks W. H., Roszman T. L. T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol*. 159: 4415-4425 (1997).
155. Wood, G. W., Morantz R. A. Depressed T lymphocyte function in brain tumor patients: monocytes as suppressor cells. *J Neurooncol*. 1: 87-94 (1983).
156. McVicar, D. W., Davis D. F., Merchant R. E. In vitro analysis of the proliferative potential of T cells from patients with brain tumor: glioma-associated immunosuppression unrelated to intrinsic cellular defect. *J Neurosurg*. 76: 251-260 (1992).
157. Zou, J. P., Morford L. A., Chougnet C., Dix A. R., Brooks A. G., Torres N., Shuman J. D., Coligan J. E., Brooks W. H., Roszman T. L., Shearer G. M. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J Immunol*. 162: 4882-4892 (1999).
158. Woiciechowsky, C., Asadullah K., Nestler D., Schoning B., Glockner F., Docke W. D., Volk H. D. Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation. *J Neuroimmunol*. 84: 164-171 (1998).
159. Casati, A., Zimmermann V. S., Benigni F., Bertilaccio M. T., Bellone M., Mondino A. The immunogenicity of dendritic cell-based vaccines is not hampered by doxorubicin and melphalan administration. *J Immunol*. 174: 3317-3325 (2005).
160. McIlroy, D., Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother*. 52: 583-591 (2003).
161. Matasic, R., Dietz A. B., Vuk-Pavlovic S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol*. 66: 909-914 (1999).

162. Piemonti, L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B. E., Socci C., Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol.* 162: 6473-6481 (1999).
163. Xia, C. Q., Peng R., Beato F., Clare-Salzler M. J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol.* 62: 45-54 (2005).
164. Um, H. D., Cho Y. H., Kim do K., Shin J. R., Lee Y. J., Choi K. S., Kang J. M., Lee M. G. TNF-alpha suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal. *Exp Dermatol.* 13: 282-288 (2004).
165. Loudovaris, M., Hansen M., Suen Y., Lee S. M., Casing P., Bender J. G. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 10: 569-578 (2001).
166. Kufner, S., Zitzelsberger H., Kroell T., Pelka-Fleischer R., Salem A., de Valle F., Schmid C., Schweiger C., Kolb H. J., Schmetzer H. M. Leukaemia-derived dendritic cells can be generated from blood or bone marrow cells from patients with myelodysplasia: a methodological approach under serum-free culture conditions. *Scand J Immunol.* 62: 75-85 (2005).
167. Scholler, N., Hayden-Ledbetter M., Dahlin A., Hellstrom I., Hellstrom K. E., Ledbetter J. A. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol.* 168: 2599-2602 (2002).
168. Adkins, J. N., Varnum S. M., Auberry K. J., Moore R. J., Angell N. H., Smith R. D., Springer D. L., Pounds J. G. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 1: 947-955 (2002).
169. Kim, K. D., Lim H. Y., Lee H. G., Yoon D. Y., Choe Y. K., Choi I., Paik S. G., Kim Y. S., Yang Y., Lim J. S. Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 1126-1136 (2005).
170. Romani, N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kampgen E., Eibl B., Niederwieser D., Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 196: 137-151 (1996).
171. de Saint-Vis, B., Vincent J., Vandenabeele S., Vanbervliet B., Pin J. J., Ait-Yahia S., Patel S., Mattei M. G., Banchereau J., Zurawski S., Davoust J., Caux C., Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 9: 325-336 (1998).
172. Pickl, W. F., Majdic O., Kohl P., Stockl J., Riedl E., Scheinecker C., Bello-Fernandez C., Knapp W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 157: 3850-3859 (1996).
173. Tuytaerts, S., Noppe S. M., Corthals J., Breckpot K., Heirman C., De Greef C., Van Riet I., Thielemans K. Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories. *J Immunol Methods.* 264: 135-151 (2002).
174. Berger, T., Feuerstein B., Strasser E., Hirsch U., Schreiner D., Schuler G., Schuler-Thurner B. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods.* 268: 131 (2002).
175. Wu, A. H., Xiao J., Anker L., Hall W. A., Gregerson D. S., Cavenee W. K., Chen W., Low W. C. Identification of EGFRvIII-derived CTL Epitopes

- Restricted by HLA A0201 for Dendritic Cell Based Immunotherapy of Gliomas. *J Neurooncol.* (2005).
176. Liu, G., Yu J. S., Zeng G., Yin D., Xie D., Black K. L., Ying H. AIM-2: a novel tumor antigen is expressed and presented by human glioma cells. *J Immunother.* 27: 220-226 (2004).
 177. Fischer, U., Struss A. K., Hemmer D., Pallasch C. P., Steudel W. I., Meese E. Glioma-expressed antigen 2 (GLEA2): a novel protein that can elicit immune responses in glioblastoma patients and some controls. *Clin Exp Immunol.* 126: 206-213 (2001).
 178. Katoh, M., Wilmotte R., Belkouch M. C., de Tribolet N., Pizzolato G., Dietrich P. Y. Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy. *J Neurooncol.* 64: 71-76 (2003).
 179. Liu, G., Khong H. T., Wheeler C. J., Yu J. S., Black K. L., Ying H. Molecular and functional analysis of tyrosinase-related protein (TRP)-2 as a cytotoxic T lymphocyte target in patients with malignant glioma. *J Immunother.* 26: 301-312 (2003).
 180. Kobayashi, T., Yamanaka R., Homma J., Tsuchiya N., Yajima N., Yoshida S., Tanaka R. Tumor mRNA-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8(+) cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother.* 52: 632-637 (2003).
 181. Zhu, X., Lu C., Xiao B., Qiao J., Sun Y. An experimental study of dendritic cells-mediated immunotherapy against intracranial gliomas in rats. *J Neurooncol.* 74: 9-17 (2005).
 182. Gilboa, E., Nair S. K., Lyerly H. K. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 46: 82-87 (1998).
 183. Riker, A., Cormier J., Panelli M., Kammula U., Wang E., Abati A., Fetsch P., Lee K. H., Steinberg S., Rosenberg S., Marincola F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery.* 126: 112-120 (1999).
 184. Yamanaka, R., Yajima N., Abe T., Tsuchiya N., Homma J., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Dendritic cell-based glioma immunotherapy (review). *Int J Oncol.* 23: 5-15 (2003).
 185. De Vleeschouwer, S., Van Gool S. W., Van Calenbergh F. Immunotherapy for malignant gliomas: emphasis on strategies of active specific immunotherapy using autologous dendritic cells. *Childs Nerv Syst.* 21: 7-18 (2005).
 186. Hiltbold, E. M., Vlad A. M., Ciborowski P., Watkins S. C., Finn O. J. The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells. *J Immunol.* 165: 3730-3741 (2000).
 187. Monti, P., Leone B. E., Zerbi A., Balzano G., Cainarca S., Sordi V., Pontillo M., Mercurio A., Di Carlo V., Allavena P., Piemonti L. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol.* 172: 7341-7349 (2004).
 188. Sauter, B., Albert M. L., Francisco L., Larsson M., Somersan S., Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 191: 423-434 (2000).
 189. Basu, S., Binder R. J., Suto R., Anderson K. M., Srivastava P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 12: 1539-1546 (2000).

190. Kuppner, M. C., Gastpar R., Gelwer S., Nossner E., Ochmann O., Scharner A., Issels R. D. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol.* 31: 1602-1609 (2001).
191. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 5: 263-274 (2005).
192. Lespagnard, L., Gancberg D., Rouas G., Leclercq G., de Saint-Aubain Somerhausen N., Di Leo A., Piccart M., Verhest A., Larsimont D. Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int J Cancer.* 84: 309-314 (1999).
193. Bell, D., Chomarar P., Broyles D., Netto G., Harb G. M., Lebecque S., Valladeau J., Davoust J., Palucka K. A., Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med.* 190: 1417-1426 (1999).
194. Troy, A., Davidson P., Atkinson C., Hart D. Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol.* 160: 214-219 (1998).
195. Troy, A. J., Summers K. L., Davidson P. J., Atkinson C. H., Hart D. N. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 4: 585-593 (1998).
196. Zou, W., Machelon V., Coulomb-L'Hermin A., Borvak J., Nome F., Isaeva T., Wei S., Krzysiek R., Durand-Gasselien I., Gordon A., Pustilnik T., Curiel D. T., Galanaud P., Capron F., Emilie D., Curiel T. J. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med.* 7: 1339-1346 (2001).
197. Chen, X., Chang L. J. Mycoplasma-mediated alterations of in vitro generation and functions of human dendritic cells. *J Biomed Sci.* 12: 31-46 (2005).
198. Hock, B. D., Haring L. F., Steinkasserer A., Taylor K. G., Patton W. N., McKenzie J. L. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res.* 28: 237-241 (2004).
199. Starling, G. C., McLellan A. D., Egner W., Sorg R. V., Fawcett J., Simmons D. L., Hart D. N. Intercellular adhesion molecule-3 is the predominant co-stimulatory ligand for leukocyte function antigen-1 on human blood dendritic cells. *Eur J Immunol.* 25: 2528-2532 (1995).
200. McLellan, A. D., Starling G. C., Williams L. A., Hock B. D., Hart D. N. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol.* 25: 2064-2068 (1995).
201. Ferlazzo, G., Tsang M. L., Moretta L., Melioli G., Steinman R. M., Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 195: 343-351 (2002).
202. Ghosh, P., Komschlies K. L., Cippitelli M., Longo D. L., Subleski J., Ye J., Sica A., Young H. A., Wiltrout R. H., Ochoa A. C. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 87: 1478-1483 (1995).
203. Rocken, M., Shevach E. M. Immune deviation--the third dimension of nondeletional T cell tolerance. *Immunol Rev.* 149: 175-194 (1996).

204. Watford, W. T., Moriguchi M., Morinobu A., O'Shea J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 361-368 (2003).
205. Shibuya, K., Robinson D., Zonin F., Hartley S. B., Macatonia S. E., Somoza C., Hunter C. A., Murphy K. M., O'Garra A. IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J Immunol.* 160: 1708-1716 (1998).
206. Hope, J. C., Sopp P., Collins R. A., Howard C. J. Differences in the induction of CD8+ T cell responses by subpopulations of dendritic cells from afferent lymph are related to IL-1 alpha secretion. *J Leukoc Biol.* 69: 271-279 (2001).
207. Sallusto, F., Mackay C. R., Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol.* 18: 593-620 (2000).
208. Rossi, D., Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 18: 217-242 (2000).
209. Rot, A., von Andrian U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 22: 891-928 (2004).
210. Loetscher, P., Seitz M., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Faseb J.* 8: 1055-1060 (1994).
211. Reich, K., Hugo S., Middel P., Blaschke V., Heine A., Neumann C. The maturation-dependent production of interleukin-16 is impaired in monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients but is restored by inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Exp Dermatol.* 13: 740-747 (2004).
212. Sebastiani, S., Albanesi C., Nasorri F., Girolomoni G., Cavani A. Nickel-specific CD4(+) and CD8(+) T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 118: 1052-1058 (2002).
213. Sebastiani, S., Albanesi C., De P. O., Puddu P., Cavani A., Girolomoni G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 293: 552-559 (2002).
214. Hammad, H., Smits H. H., Ratajczak C., Nithiananthan A., Wierenga E. A., Stewart G. A., Jacquet A., Tonnel A. B., Pestel J. Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. *Eur Cytokine Netw.* 14: 219-228 (2003).
215. Huang, H., Xiang J. Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer.* 109: 817-825 (2004).
216. Maurer, M., von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1882-1886 (2004).
217. Lebre, M. C., Burwell T., Vieira P. L., Lora J., Coyle A. J., Kapsenberg M. L., Clausen B. E., De Jong E. C. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol.* 83: 525-535 (2005).
218. Iellem, A., Mariani M., Lang R., Recalde H., Panina-Bordignon P., Sinigaglia F., D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific

- expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 194: 847-853 (2001).
219. Matsui, T., Akahoshi T., Namai R., Hashimoto A., Kurihara Y., Rana M., Nishimura A., Endo H., Kitasato H., Kawai S., Takagishi K., Kondo H. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 125: 155-161 (2001).
 220. Chantry, D., Romagnani P., Raport C. J., Wood C. L., Epp A., Romagnani S., Gray P. W. Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood.* 94: 1890-1898 (1999).
 221. Penna, G., Vulcano M., Roncari A., Facchetti F., Sozzani S., Adorini L. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 169: 6673-6676 (2002).
 222. Gabrilovich, D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 2: 1096-1103 (1996).
 223. Gabrilovich, D., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S., Carbone D. P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 92: 4150-4166 (1998).
 224. Takahashi, A., Kono K., Ichihara F., Sugai H., Fujii H., Matsumoto Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother.* 53: 543-550 (2004).
 225. Menetrier-Caux, C., Montmain G., Dieu M. C., Bain C., Favrot M. C., Caux C., Blay J. Y. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 92: 4778-4791 (1998).
 226. Chomarat, P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 1: 510-514 (2000).
 227. Li, M. O., Wan Y. Y., Sanjabi S., Robertson A. K., Flavell R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24: 99-146 (2006).
 228. Strobl, H., Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1: 1283-1290 (1999).

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 31.05.2006

(Zakir Özcan)