

Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock
Direktorin (k): Prof. Dr. med. M. Wigger
Bereich Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Leiter: PD Dr. med. Carl Friedrich Classen

Einfluss von Temozolomid *in vitro* auf Ausreifung und
Funktion dendritischer Zellen zur Vakzinetherapie des
Glioblastoma multiforme

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Pichorner, Anne, geboren Enders, am 20.09.1986 in Berlin
Rostock, 2013
Dekan: Prof. Dr. med. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger
Gutachter/in: 1. PD Dr. med. Carl Friedrich Classen
2. Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
3. Prof. Dr. med. Christian Junghanß

Datum der Einreichung: 12.02.2013

Datum der Verteidigung: 10.12.2013

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIC	5-Amino-imidazol-4-carboxamid
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
BC	B-Lymphozyten (<i>B Cells</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Karzinom
CCR	CC Chemokinrezeptor
CD	Differenzierungsmarker der Zelloberfläche (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cm ²	Quadratzenimeter
COX	Cyclooxygenase
d	Tag
DC	dendritische Zellen (<i>Dendritic Cells</i>)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrine</i>
ddH ₂ O	Aqua bidestillata (<i>Double Distilled Water</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot Assay	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)

Abkürzungsverzeichnis

FKS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>Forward Light Scatter</i>)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GBM	Glioblastoma multiforme
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
Gy	Gray
h	Stunde (<i>Hour</i>)
HIT	Hirntumor
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Isocove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IU	internationale Einheiten (<i>International Units</i>)
kb	Kilo-Basenpaare
M	molar
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>Magnetic Cell Separation</i>)
MAGE	Melanom-assoziiertes Antigen (<i>Melanoma-associated Antigene</i>)
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex <i>(Major Histocompatibility Complex)</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
n	Anzahl
neg.	negativ
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer

Abkürzungsverzeichnis

OS	Gesamtüberleben (<i>Overall Survival</i>)
PAMP	Pathogen assoziierte molokulare Muster (<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PFS	progressionsfreies Überleben (<i>Progression Free Survival</i>)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
rh	rekombinant human
PI	Propidiumiodid
pos.	positive
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>Sideward Scatter</i>)
σ	Standardfehler
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TC	T-Lymphozyten (<i>T Cells</i>)
tgl.	täglich
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like Receptor</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Lymphozyten
TuLy	Tumorlysat
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Verlauf	2
1.1.2.1 Einflussfaktoren auf den klinischen Verlauf	2
1.1.3 Therapie	3
1.1.3.1 Temozolomid	3
1.1.3.2 Kombinierte Radiochemotherapie des Glioblastoms mit TMZ	4
1.1.3.3 Einflussfaktoren auf TMZ-Therapie	6
1.1.3.4 Weitere Therapieansätze	8
1.2 Grundlagen der angeborenen und erworbenen Immunität.....	9
1.2.1 Das angeborene Immunsystem.....	9
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	9
1.2.3 Dendritische Zellen.....	10
1.2.3.1 Reifung von dendritischen Zellen	12
1.2.3.2 Induktion einer Immunantwort durch dendritische Zellen	14
1.2.4 Immune-Escape von Tumoren	16
1.2.5 Das ZNS – für das Immunsystem ein besonderer Ort.....	17
1.3 Dendritische Zellen in der Immuntherapie des Glioblastoma multiforme	19
1.3.1 Prinzipien der Immuntherapie maligner Erkrankungen	19
1.3.2 <i>In-vitro</i> Generierung dendritischer Zellen	20
1.3.3 DC-Vakzine an Tiermodellen.....	21
1.3.4 Ergebnisse klinischer Studien	22
1.3.4.1 Monitoring	25
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Laborgeräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	28
2.1.4 Medien und Puffer	29
2.1.4.1 Allgemeine Medien und Puffer	29

2.1.4.2	ELISA Puffer	29
2.1.5	Herkunft der Blutprodukte.....	29
2.1.6	Antikörper	30
2.1.7	Zytokine	30
2.1.8	Zelllinien	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.1.1	Zellkultur allgemein.....	31
2.2.1.2	Passagieren adhärenter Zellen	31
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
2.2.1.4	Aufreinigung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	32
2.2.1.5	Generierung dendritischer Zellen	33
2.2.1.6	Behandlung der Zellen mit Temozolomid	34
2.2.2	Durchflusszytometrische Analyse.....	34
2.2.2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	34
2.2.2.2	Durchflusszytometrische Analysen mit direkt markiertem Antikörper.....	36
2.2.2.3	Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie	37
2.2.3	Vitalitätsbestimmung dendritischer Zellen	38
2.2.4	Mikroskopische Analyse	40
2.2.4.1	Beschichtung von Deckgläschen.....	40
2.2.4.2	May-Grünwald-Giemsa-Färbung	40
2.2.4.3	Mikroskopieren	41
2.2.5	Mykoplasmen-PCR.....	41
2.2.6	Herstellung von Tumorzelllysate	42
2.2.7	Proteinquantifizierung	42
2.2.8	Magnetische Zellsortierung	43
2.2.9	Gemischte Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten	44
2.2.10	MTT-Assay	45
2.2.11	Interferon- γ -ELISA.....	45
2.2.12	Statistik	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Monozytenreinheit nach Adhärenz	49
3.2	Wirkung von TMZ auf dendritische Zellen – Durchflusszytometrische Analysen von CD83 und CD86.....	50
3.2.1	Gruppe 1: TMZ d 0	50

3.2.2	Gruppe 2: TMZ d +6	53
3.2.3	Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6.....	53
3.3	Wirkung von TMZ auf T- und B-Lymphozyten – Durchflusszytometrische Analysen von CD3 und CD19.....	55
3.3.1	Gruppe 1: TMZ d 0	55
3.3.2	Gruppe 2: TMZ d +6	56
3.3.3	Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6.....	57
3.4	Vitalitätsbestimmung	59
3.4.1	Gruppe 1: TMZ d 0	59
3.4.2	Gruppe 2: TMZ d +6	60
3.4.3	Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6.....	61
3.5	Fotografische Darstellung dendritischer Zellen nach TMZ-Behandlung.....	63
3.5.1	Fotografien von Zellen in Kultur.....	63
3.5.2	Fotografien von gefärbten Zellen.....	63
3.6	Mykoplasmen-PCR.....	65
3.7	MTT-Assay nach gemischter Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten	66
3.8	Proteinquantifizierung mit Erstellung einer Eichgeraden	67
3.9	Interferon- γ -ELISA.....	67
4	Diskussion	69
4.1	Bedeutung der dendritischen Zellvakzine beim Glioblastoma multiforme	69
4.2	Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	70
4.3	Einfluss von TMZ auf einzelne Zellpopulationen	71
4.3.1	Quantifizierung von Zellen mittels Latexkugeln	72
4.3.2	Einfluss von TMZ auf dendritische Zellen.....	72
4.3.2.1	Mögliche Vorteile einer niedrigdosierten Chemotherapie.....	74
4.3.3	Einfluss von TMZ auf T- und B-Lymphozyten	75
4.4	Einfluss von TMZ auf die Zellvitalität	77
4.4.1	Vitalitätsmessung mittels Calcein	77
4.4.2	PI-Färbung.....	78
4.5	Mikroskopische Analysen	79
4.6	Funktionalität behandelter DC	79
4.7	Die Kombination einer DC-Vakzinetherapie mit der Standardtherapie gegen das Glioblastoma multiforme ist sinnvoll	82
4.8	Herausforderungen einer DC-Vakzine	83

4.8.1	Antigenaufarbeitung	85
4.9	Ausblick auf zukünftige Entwicklungen.....	86
5	Zusammenfassung	89
6	Abbildungsverzeichnis	90
7	Tabellenverzeichnis	92
8	Literaturverzeichnis.....	93
	Curriculum Vitae	127
	Wissenschaftliche Tätigkeit	129
	Selbstständigkeitserklärung	130
	Danksagung	131
	Anhang	132

1 EINLEITUNG

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Primäre ZNS-Tumoren werden nach den Guidelines der World Health Organization (WHO) klassifiziert (siehe Anhang Nr. 1). Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV (GBM) ist einer der aggressivsten malignen Tumoren und der häufigste primäre Tumor des ZNS¹. Die weltweite Inzidenz beträgt 3-4 pro 100.000 Erwachsene und 2 pro 1 Million Kinder pro Jahr; in industrialisierten Ländern ist sie mit 4-5 pro 100.000 Erwachsene etwas höher^{2,3,4}. Männer sind mit einem Anteil von 57-59% häufiger betroffen als Frauen^{5,6}.

Zwei Drittel aller GBM sind primäre Tumoren und ein Drittel entwickelt sich sekundär auf Basis eines niedriggradigen Glioms wie des Astrozytoms Grad II^{1,7}.

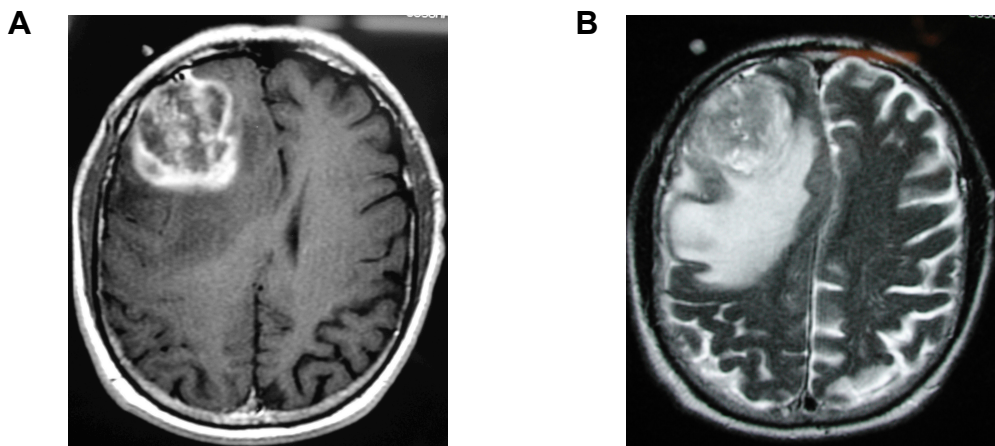


Abb. 1.1: MRT-Darstellung eines malignen Hirntumors. A: Das T1-gewichtete axiale MRT-Bild mit Gadolinium zeigt einen Kontrastmittel-aufnehmenden Tumor im rechten Frontallappen. **B:** Das T2-gewichtete Bild zeigt dieselbe Läsion mit deutlichem Ödem und Mittellinienverlagerung. Die radiologischen Befunde sind vereinbar mit der Diagnose eines hochgradig malignen Tumors wie dem Glioblastoma multiforme⁸.

Die meisten Glioblastome treten sporadisch auf. Eine Ausnahme davon stellen sie im Rahmen erblicher Tumorsyndrome, z.B. des Turcot-Syndroms⁹ oder des Li-Fraumeni-Syndroms, dar¹⁰.

Heutzutage ist bekannt, dass Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familien wie der EGF-Rezeptor¹¹, der VEGF-Rezeptor¹², der PDGF-Rezeptor¹³ und ihre Mutationen bei der Entstehung des GBM involviert sind^{14,15}.

In diversen Studien wurde zudem die Assoziation von sozioökonomischen, Umwelt- und Arbeitsplatzfaktoren¹⁶, der Lebensweise³, Rauchen¹⁷, Ernährung^{18,19}, dem immunologischen Status^{20,21}, elektromagnetischen Feldern²² und dem Gebrauch von Mobiltelefonen²³⁻²⁵ evaluiert. Bisher konnte kein einheitlicher

Zusammenhang zum Auftreten eines GBM gefunden werden. Ionisierende Strahlung scheint bei der Entstehung jedoch eine zu Rolle spielen^{26–28}.

1.1.2 Verlauf

Das mediane Gesamtüberleben (OS) von GBM-Patienten beträgt mit der aktuellen Standardtherapie (siehe unten) 12-15 Monate - das Gesamtüberleben nach 2 Jahren 27,2%^{29,30} – im Rahmen von Studien 15-18 Monate³¹. Vor der Einführung von Temozolomid lag die mediane Überlebensdauer bei 9-12 Monaten¹. Nur 2-3% der Patienten erreichen eine Langzeit-Tumorkontrolle und überleben 5 oder mehr Jahre. Damit hat das GBM eine der schlechtesten 5-Jahres-Überlebensraten unter allen Malignomentitäten^{32–35}. Bei Kindern variieren die Daten für das 5-Jahres-Gesamtüberleben zwischen 40%³⁶ und 10,3%³⁷. Ob GBM bei Kindern wirklich eine bessere Prognose hat, bleibt Bestandteil von Diskussionen^{32,36,38}.

Rezidive sind häufig und man glaubt, dass sie aufgrund der Migration von Tumorzellen in umliegende Hirnregionen entstehen^{32–34,39}. Meist kommt es zu einem Lokalrezidiv innerhalb der ersten 9 Monate nach Bestrahlung¹. Dabei wird die Mehrheit der Glioblastome im Radius von 2 cm um ihre ursprüngliche Lokalisation rezidivieren⁴⁰. Fernmetastasen außerhalb des ZNS sind mit weniger als 1% sehr selten. Bei Auftreten eines Rezidivs beträgt das progressionsfreie Überleben 2 Monate, mit Chemotherapie 7 Monate⁴¹.

1.1.2.1 Einflussfaktoren auf den klinischen Verlauf

Therapieunabhängige positive prognostische Faktoren sind neben der makroskopisch kompletten Tumorresektion^{37,42,43} junges Alter und ein guter Karnofsky Index (siehe Anhang Nr. 2) bei Diagnosestellung^{35,36,44–49}, sowie die Tumorlokalisierung in den Hemisphären³⁷.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Glioblastome viele tumorassoziierte Antigene (TAA) exprimieren. Dazu gehören das Glykoprotein 240⁵¹, Tenascin⁵², Survivin⁵³, die α -2-Kette des IL-13-Rezeptors⁵⁴, HER2, EphA2, SOX11 und Melanom-assoziierte Antigene wie gp100, Melanom-Antigen(MAGE)-1 und MAGE-3^{55–62}.

Molekulare Marker, die eine Therapieantwort und Prognose vorherzusagen helfen, sind selten, nur der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus hat bisher eine zuverlässige klinische Relevanz erlangt (siehe Kapitel 1.1.3.3)^{63–65}. Ob eine EGFR-Amplifikation oder -Überexpression wirklich mit einer schlechteren

Prognose korreliert⁶⁶⁻⁶⁹, wird kontrovers diskutiert^{32,50,70-72}. Auch die Rolle der TP53-Mutation ist nicht abschließend geklärt^{32,73-77}.

Negativ auf die Prognose wirken sich eine kurze Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs, ein hoher Anteil von CD133⁺ Gliom-Stammzellen innerhalb des Tumors sowie ein Tumor außerhalb des Frontallappens aus⁷⁸⁻⁸⁰.

1.1.3 Therapie

1.1.3.1 Temozolomid

Temozolomid (SCH52365), Handelsname z.B. Temodal, ist ein oral applizierbares Alkylanz. Es wurde ursprünglich zur Therapie von Hirnmetastasen beim malignen Melanom entwickelt⁸¹⁻⁸³ und nach weiteren Untersuchungen 1999 zur Therapie von Patienten mit einem Rezidiv oder Progredienz eines Glioblastoms oder anaplastischen Astrozytoms zugelassen⁸⁴⁻⁸⁷.

Seit der EORTC-Studie²⁹ (siehe unten) im März 2005 ist Temodal begleitend zur Radiotherapie und anschließend als adjuvante Monotherapie bei erstmalig diagnostizierten Glioblastompatienten zugelassen, auch bei Kindern ab drei Jahren. Weitere Indikationen können niedriggradige Gliome⁸⁸⁻⁹⁰ und Hirnmetastasen des Bronchial-Ca sein⁹¹⁻⁹³.

Temozolomid wird nach oraler Einnahme rasch resorbiert. Die Bioverfügbarkeit beträgt nahezu 100% und die Halbwertszeit 1,8-1,9 Stunden^{85,87,94-97}.

Das Prodrug Temozolomid hydrolysiert bei physiologischem pH ($\text{pH} \geq 7$) spontan zu 5-(3-Methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid (MTIC) mit einer HWZ von ebenfalls ca. 1,9 h⁹⁸. Dieses degradiert zu dem aktiven Methylazonium sowie zu 5-Amino-imidazol-4-carboxamid (AIC) (siehe Abb.1.2)⁹⁹⁻¹⁰³. Ersteres wirkt als basenselektives Alkylanz, indem es eine Methylgruppe auf Nukleotide der DNA überträgt⁸⁷. Durch Bildung von O⁶-Methylguanin wirkt TMZ zytotoxisch¹⁰⁴, denn es kommt zu einem Einbau von Thymidin an Stelle von Cytosin. Dies wird vom zellulären Mismatch-Repair-System erkannt, führt zu DNA-Strangbrüchen¹⁰⁵ und hat einen Arrest der Zellteilung in der radiosensitiven G2/M-Phase¹⁰⁶ mit Apoptose zur Folge^{107,108}. In präklinischen Studien konnte ferner gezeigt werden, dass TMZ bestrahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und Zelltod^{108,109} fördert, insbesondere wenn es begleitend zur Radiotherapie appliziert wird¹¹⁰.

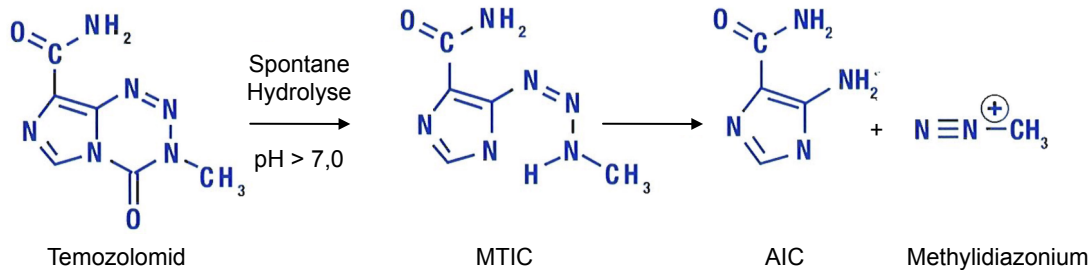


Abb. 1.2: Pharmakokinetik vom Temozolomid. Es erfolgt eine spontane Hydrolyse von TMZ zu MTIC, welches zu AIC und dem aktiven Metaboliten Methylidiazonium degradiert. Modifiziert nach¹¹¹.

Maximale Plasmakonzentrationen von TMZ betragen nach oraler Anwendung von 200 mg/m² tgl. 5,2 µg/ml-13,9 µg/ml (entspricht 26,8-71 µM)^{85,96}, nach oraler Anwendung von 150 mg/m² tgl. 5,8-7 µg/ml (entspricht 30-35 µM) und nach oraler Anwendung von 75 mg/m² tgl. 0,13-2,45 µg/ml (entspricht 0,7-12,6 µM)¹¹². Sie werden nach 0,3-2,5 Stunden erreicht^{85,94,96}. Die Hauptmenge (68%) wird in weniger als 24 Stunden nach Ende der Behandlung ausgeschieden, ohne dass eine Akkumulation nachgewiesen werden konnte^{85,96,113}.

Durch die spontane, nicht hepatische Metabolisierung, unterliegt die Bioverfügbarkeit nur geringen interindividuellen Schwankungen. Deswegen, sowie aufgrund der geringen Plasmaproteinbindung, ist die Beeinflussung durch andere Medikamente sehr unwahrscheinlich¹¹⁴. Bei älteren Patienten erwies sich Temozolomid in zahlreichen Studien als wirksam¹¹⁵⁻¹¹⁸ und eine Dosisanpassung war nicht notwendig¹¹⁹⁻¹²².

Die Toxizität von TMZ betrifft vor allem das hämatologische System. Es kann zu einer dosisabhängigen reversiblen Reduktion der Leukozyten- und Thrombozytenzahl kommen¹⁰². Zielorgane der Toxizität sind auch die Hoden, der Gastrointestinaltrakt und bei sehr hohen Dosen die Netzhaut. TMZ ist embryotoxisch, teratogen und kann genotoxische Wirkungen haben¹²³.

1.1.3.2 Kombinierte Radiochemotherapie des Glioblastoms mit TMZ

Stupp *et al.*²⁹ konnten in einer multizentrischen internationalen randomisierten Phase-III-Studie der EORTC an 573 Erwachsenen mit der Erstdiagnose Glioblastom erstmalig zeigen, dass die simultane Radiochemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von einer Erhaltungstherapie, mit einem signifikanten Überlebensvorteil und sehr geringer Toxizität einhergeht. Die Patienten erhielten entweder ausschließlich eine fokale Bestrahlung (30 Fraktionen à 2 Gy, 5 d/Woche) oder simultan 75 mg/m² TMZ über 42 Tage. Nach 4 Wochen Pause wurde mit einer Monotherapie mit 150-200 mg/m² tgl. TMZ für 5 Tage eines

28-tägigen Zyklus fortgeföhren. Bis zu 6 Zyklen waren bei entsprechender Verträglichkeit möglich.

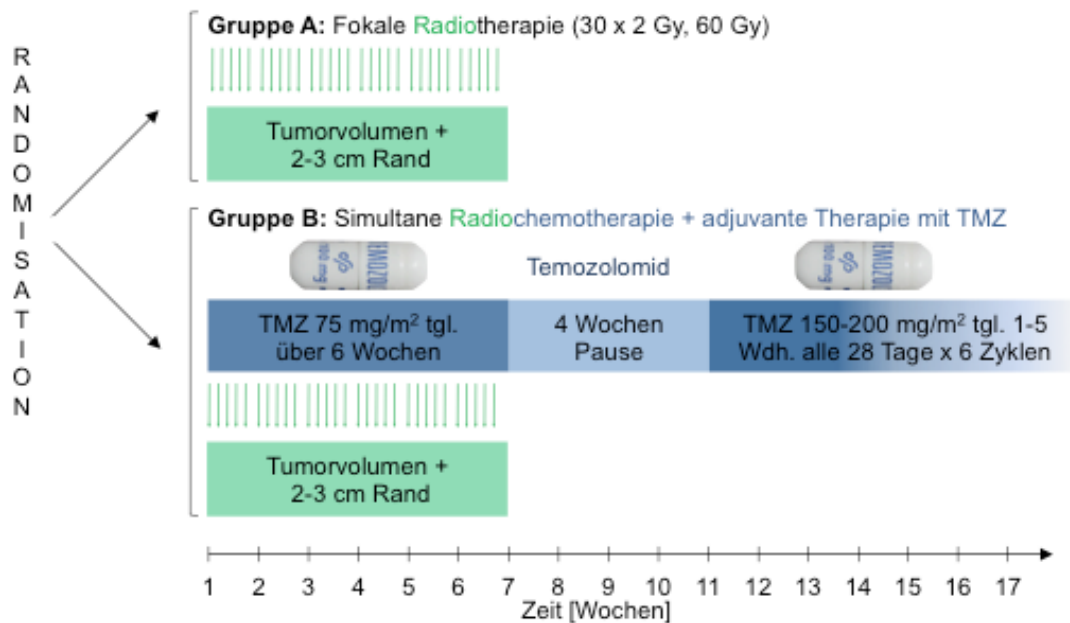


Abb. 1.3: Therapieschema der EORTC-Studie. Gruppe A: Nach Tumorresektion erfolgte ausschließlich eine fokale Radiotherapie mit einer Gesamtdosis von 60 Gy. Gruppe B: Die Patienten erhielten initial eine kombinierte RCT mit 75 mg/m² tgl. TMZ über 6 Wochen und nach einer 4-wöchigen Pause nochmals 100-200mg/m² tgl. TMZ an 5 von 28 Tagen bis zu 6 Zyklen²⁹.

Die Kombination aus Bestrahlung und TMZ verlängerte das progressionsfreie Überleben (PFS) von 5,0 auf 6,9 Monate. Die mediane Überlebenszeit in der Kombinationsgruppe erhöhte sich signifikant auf 14,6 Monate, verglichen mit 12,1 Monaten in der Gruppe mit alleiniger Radiotherapie. Die 2-Jahresüberlebensrate wurde durch Kombination mit TMZ von 10,8% auf 27,2% gesteigert. Die Lebensqualität war zwischen den Gruppen vergleichbar, bei guter Verträglichkeit des Chemotherapeutikums^{124,125}.

Fraktionierte fokale Radiotherapie (60 Gy, 30-33 Fraktionen von 1,8-2 Gy oder äquivalente Dosen) ist die Standard-Behandlung nach Resektion oder Biopsie. Eskalationsdosen von über 60 Gy konnten keinen weiteren Effekt erreichen. Bei Älteren oder Patienten mit niedrigem Karnofsky Index werden generell kürzere, hypofraktionierte Regime (z.B. 40 Gy in 15 Fraktionen) vorgeschlagen^{126,127}.

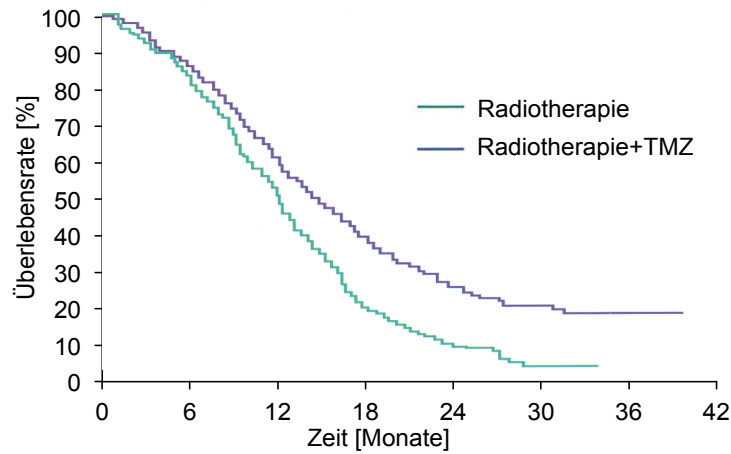


Abb. 1.4: Kaplan-Meier Überlebenskurve der EORTC-Studie²⁹.

Die Ergebnisse haben dazu geführt, dass die simultane Radiochemotherapie mit Temozolomid als neue Standardtherapie beim GBM eingeführt wurde².

2009 wurden weitere Daten der Patienten analysiert. Das PFS nach 5 Jahren betrug 4,1% in der Gruppe mit Kombinationstherapie und 1,3% in der Gruppe mit alleiniger Radiotherapie³⁰.

Es scheinen alle Untergruppen von der Kombinationstherapie zu profitieren. Prognostisch ist es von positiver Bedeutung, besonders früh im Krankheitsverlauf mit der Chemotherapie zu beginnen¹²⁸.

	Radiotherapie	TMZ + Radiotherapie
Medianes PFS (Monate)	5	6,9
1-Jahres-PFS	9,1%	26,9%
2-Jahres-PFS	1,5%	10,7%
5-Jahres-PFS	1,3%	4,1%
Medianes OS (Monate)	12,1	14,6
2-Jahresüberleben	10,8%	27,2%
5-Jahresüberleben	1,9%	9,8%

Tabelle 1.1: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben der EORTC-Studie^{29,30}.

Das „One week on/one week off-Schema“ (150 mg/m² an Tag 1-7, Wiederholung an Tag 15 des Zyklus) zeigte mit einer 48%-igem PSF nach 6 Monaten derzeit die besten Ergebnisse bei rezidivierendem oder progressivem Glioblastom. In diese Studie wurden allerdings nur 21 Patienten eingeschlossen^{129,130}.

1.1.3.3 Einflussfaktoren auf TMZ-Therapie

Die größte Bedeutung für eine Resistenz gegen Temozolomid hat neben dem DNA-Mismatch-Repair-System¹⁰⁷ und dem Nukleotidexzisionssystem¹³¹ vor allem das Enzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)¹³². Sobald sich

durch Temozolomid in der Zelle O⁶-Methylguanin gebildet hat, kann MGMT diese Alkylierung rückgängig machen, wird dabei aber irreversibel inaktiviert¹³³. Zellen mit niedrigem MGMT-Spiegel, z.B. im Gehirn¹³⁴ oder Blutstammzellen¹³⁵, sind besonders empfindlich gegenüber TMZ. Auch in Chemotherapie-sensiblen malignen Hirntumoren ist die MGMT-Konzentration niedriger als in resistenten Hirntumoren¹³⁶.

Die Expression des Enzyms wird durch Methylierung des Promotors des MGMT-Gens reguliert¹³⁷. Die Methylierung unterbindet die de novo-Synthese von MGMT. Sie ist mit einem längeren Überleben assoziiert und stärkster Prognosefaktor, wenn mit alkylierenden Substanzen behandelt wird^{32,63-65,138-141}. Bei knapp 50% der GBM-Patienten ist der Promotor in den Tumorzellen methyliert^{29,138}.

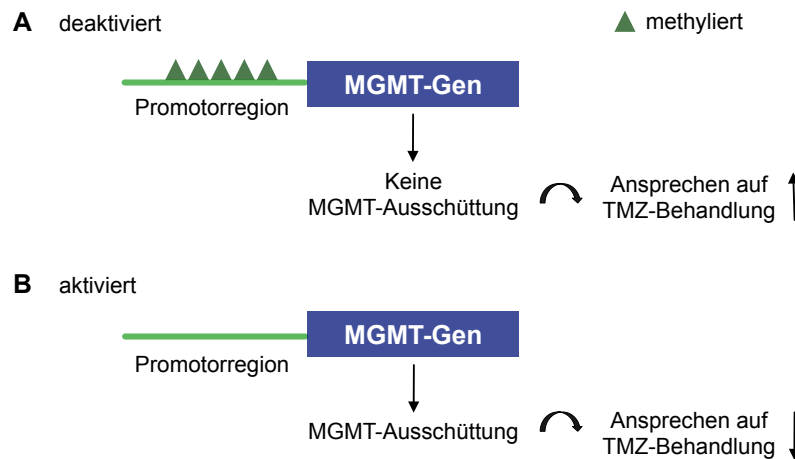


Abb. 1.5: Rolle der Methylierung des Promotors der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). **A:** Bei methyliertem MGMT-Promotor wird die Enzymsynthese herabreguliert. Als Folge kann die TMZ-Wirkung nicht rückgängig gemacht werden und Patienten sprechen besser auf die TMZ-Therapie an. **B:** Ist der MGMT-Promotor nicht methyliert, kann das Enzym synthetisiert werden und die TMZ-Wirkung aufheben. Die Patienten sprechen schlechter auf die TMZ-Therapie an. Modifiziert nach¹¹¹.

In der Untergruppe der EORTC-Studie mit methyliertem MGMT-Promotor und kombinierter Radiochemotherapie lebten nach 5 Jahren noch 13,8% der Patienten, in der Gruppe mit nicht methyliertem MGMT-Promotor nur 8,3%⁶⁵.

	Strahlentherapie (n = 100)	TMZ + Radiotherapie (n = 106)	
Methylierter MGMT-Promotor	5,9	10,3	PFS (Monate)
	15,3	23,4	OS (Monate)
	5,2%	13,8%	5-Jahresüberleben
Nicht methylierter MGMT-Promotor	4,4	5,3	PFS (Monate)
	11,8	12,6	OS (Monate)
	0%	8,3%	5-Jahresüberleben

Tabelle 1.2: Effekt der Promotormethylierung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase auf das Überleben unter Temozolomidtherapie^{30,65}.

Ein metronomisches TMZ-Regime mit kontinuierlich niedrigdosierter TMZ-Applikation ist ebenfalls eine attraktive Strategie für die Behandlung von malignen Gliomen, da es die Anzahl der zirkulierenden regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) vermindern kann^{142,143}. Es könnte daher effektiver als die konventionelle TMZ-Therapie sein¹⁴⁴.

1.1.3.4 Weitere Therapieansätze

Diverse Studien untersuchten die Kombinationswirkung von TMZ und/oder Radiotherapie zusammen mit anderen Chemotherapeutika, wie Nitrosoharnstoffen^{145–151}, Cisplatin¹⁵², Topoisomerasehemmern^{153,154}, EGF-Rezeptor-Inhibitoren¹⁵⁵ wie Erlotinib^{148,156} oder PDGF-Rezeptor-Inhibitoren wie Imatinib¹⁵⁷ und anderen Medikamenten^{158,159–162} auf das Glioblastoma multiforme. Nitrosoharnstoffe scheinen zwar eine Medikamentengruppe zu sein, die das Langzeitüberleben in Metaanalysen positiv beeinflussen^{149,163}, die anderen Kombinationen brachten aber keinen Durchbruch.

O⁶-Benzylguanin kann MGMT hemmen, da es als Analogon zu O⁶-Methylguanin irreversibel an MGMT bindet. Die Kombination mit TMZ hat in klinischen Studien erhöhte Toxizität, jedoch keinen Überlebensvorteil erbracht^{164,165}. Da Glioblastome hoch angiogene Tumoren sind, wurden diverse antiangiogenetische Medikamente, wie der VEGF-Antagonist Bevacizumab, oder mTOR-Inhibitoren, wie Temserolimus^{128,166–170} eingesetzt, jedoch ebenfalls ohne eindeutigen Erfolg. Auch an Radionukleotide oder Exotoxine gebundene Antikörper wurden entwickelt und lokal angewandt, ohne ein überlegenes Resultat zu erbringen^{171–173}.

Demgegenüber zeigen selektive Cyclooxygenase(COX)-2-Inhibitoren, unabhängig von ihrer COX-2-inhibitorischen Aktivität, antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte mit reduziertem Glioblastomwachstum *in vivo*^{174,175}. Der Intergrinrezeptorinhibitor Cilengitide zeigte bisher ebenfalls gute Ergebnisse^{176,177} und ist in Kombination mit TMZ bei neu diagnostiziertem GBM mit MGMT-Promotormethylierung eine aussichtsreiche Therapiealternative^{128,178}. Die derzeitige Standardtherapie konnte bisher im klinischen Alltag jedoch nicht übertroffen werden.

1.2 Grundlagen der angeborenen und erworbenen Immunität

Das Immunsystem des Menschen ist durch verschiedene Effektorzellen und Moleküle in der Lage, uns vor Krankheitserregern und maligne entarteten Zellen zu schützen. Zu seinen Aufgaben gehören die Erkennung von Erregern und malignen Zellen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem, die Abwehr von Infektionen mittels Komplementfaktoren, Antikörpern, Lymphozyten und anderer Immunzellen, sowie die Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion^{180a}.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Eine Vielzahl von Zelltypen und Molekülen ist in der Lage gegen Erreger vorzugehen oder entartete Zellen zu vernichten, allerdings nicht antigenspezifisch. Zu den Phagozyten des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten und Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (DC), welche den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen. Die ersten Zellen des angeborenen Immunsystems, die auf fremde Organismen innerhalb von wenigen Stunden reagieren, sind Makrophagen. Sie sind reife Monozyten, zirkulieren zunächst im Blut und wandern in Gewebe ein, wo sie sich differenzieren und durch Phagozytose Krankheitserreger abtöten können^{180a}.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) reagieren nach Aktivierung gegen intrazelluläre Infektion und mutierte Zellen wie Tumorzellen. Durch zytotoxische Granula können sie diese lysieren bzw. Apoptose auslösen und mithilfe von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- α und γ eine Immunantwort gegen den Tumor unterstützen^{180a,181}.

Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem gehören die Mastzellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen und der Abwehr von Parasiten^{180a}.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Die sich anschließende antigenspezifische Reaktion des adaptiven Immunsystems kann Infektionen effektiver abwehren, benötigt im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem aber länger, um wirkungsvoll zu sein^{180a}. Die Hauptakteure sind B- und T-Lymphozyten.

Jeder T-Lymphozyt, der die zentralen lymphatischen Organe verlässt, ist aufgrund von hoch variablen Oberflächenrezeptoren für ein Antigen spezifisch. Man

unterscheidet zwischen naiven, ungeprägten T-Lymphozyten und aktivierten Effektorzellen nach Antigenkontakt. T-Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen, an das ihr Rezeptor bindet, werden aktiviert, um zu proliferieren und sich u.a. zu CD4⁺ und CD8⁺ Effektorzellen zu differenzieren^{180a}.

B-Lymphozyten, die Vorläufer der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, können ein naives Antigen direkt über ihren B-Lymphozyten-Rezeptor erkennen¹⁸². Nach Antigenprozessierung können sie kostimulatorische Moleküle wie Peptid-MHC-II-Komplexe an ihrer Oberfläche exprimieren und dadurch naive CD4⁺ T-Lymphozyten aktivieren^{180b}.

Regulatorische T-Lymphozyten unterdrücken möglicherweise die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Effektorzellen, können die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten hemmen und kontrollieren so die Immunantwort. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sie auch die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Lymphozyten hemmen und die NK-Zell-Funktion unterdrücken^{144,183,184}. Sie sezernieren immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-10 oder sind konstitutiv aktiv¹⁸⁵.

Im Verlauf der Immunantwort entwickeln sich einige B- und T-Lymphozyten zu Gedächtniszellen und sorgen so für eine langanhaltende Immunität^{180a}.

1.2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems können Erreger nicht nur abtöten, sondern bilden als hoch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen ein entscheidendes Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Sie sind die potentesten Zellen für die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten und für die Induktion einer primären Immunantwort^{180a,186,187}.

Unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet, besitzen DC lange fingerförmige Ausläufer >10 μ M, ähnlich den Dendriten von Nervenzellen, die sich in verschiedene Richtungen des Zellkörpers bewegen können und zu ihrer Namensgebung beitragen^{182,188}.

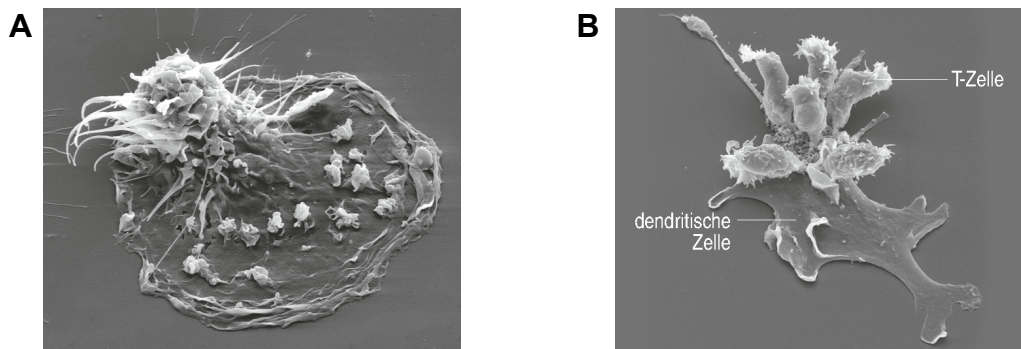


Abb. 1.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dendritischer Zellen in verschiedenen Reifestadien. A: Unreife dendritische Zellen besitzen viele lange Fortsätze (Dendriten) mit zahlreichen endozytotischen Vesikeln. **B:** Reife DC phagozytieren nicht mehr. Hier sind die typische Morphologie und Interaktion einer reifen DC dargestellt (Aufnahmen von K. Dittmar). Modifiziert nach^{180c}.

Die recht langlebigen Zellen sind unter den meisten Oberflächenepithelien, wie Haut und Tonsillen, und in den meisten soliden Organen, wie Herz, Lunge und Niere, sowie im Blut dauerhaft im unreifen Phänotyp zu finden¹⁸². DC wurden erstmals 1886 in Form einer Untergruppe, den Langerhans-Zellen der Haut, entdeckt. Ralph Steinmann erkannte in den 1970-iger Jahren ihre Bedeutung und beschrieb DC genauer¹⁸⁹.

Sie nehmen zunächst Antigene auf und prozessieren diese, präsentieren dann eine große Menge an MHC-Peptid-Komplexen an ihrer Oberfläche, regulieren kostimulatorische Moleküle hoch und migrieren anschließend in die Lymphorgane, wo sie antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren¹⁸².

Unter normalen Bedingungen tragen unreife, nicht aktivierte DC zur Immunhomöostase durch Löschung autoreaktiver T-Lymphozyten bei und induzieren eine T-Lymphozyten-Toleranz. Kommt es hier zu Störungen können Allergien die Folge sein^{144,182}.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Immunologie sind sie Ziel von Therapiekonzepten in vielen klinische Situationen, die T-Lymphozyten involvieren: Resistenz gegenüber Infektionen und Tumoren, Immundefizienz, Transplantation, Allergie, Autoimmunerkrankungen und Vakzinen¹⁸².

Im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten oder B-Lymphozyten können DC Antigenpeptide sowohl zusammen mit MHC-I- als auch mit MHC-II-Molekülen kreuzpräsentieren^{190,191}. Dadurch aktivieren sie nicht nur CD4⁺ T-Helfer-Zellen, sondern auch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten¹⁹². Man glaubt, dass beide Typen von Effektorlymphozyten notwendig sind, um eine optimale zelluläre Immunantwort hervorzurufen¹⁹³⁻¹⁹⁵.

DC sind zudem starke Aktivatoren der NK-Zellen des angeborenen Immunsystems¹⁹⁶. Dadurch können theoretisch sowohl Tumorzellen mit als auch ohne Expression von MHC-I-Molekülen getötet werden¹⁹⁷.

1.2.3.1 Reifung von dendritischen Zellen

Die Hauptfunktion unreifer DC (iDC) ist die Phagozytose von Pathogenen. In diesem Zustand sind sie nicht in der Lage, T-Lymphozyten zu stimulieren, da ihnen die Signalmoleküle wie CD40, CD54 und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 fehlen und sie durch geringe Mengen an MHC-Molekülen an der Oberfläche charakterisiert sind¹⁸². Mittels Makropinozytose können iDC nicht nur partikuläres Material phagozytieren, sondern auch große Mengen Extrazellulärflüssigkeit und deren Inhaltsstoffe aufnehmen, z.B. Virusbestandteile und Bakterien^{180a,198-202}. Sie tragen an ihrer Oberfläche Mustererkennungsrezeptoren (PRR), die allgemein vorkommende Merkmale vieler Pathogene, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), erkennen. Dabei handelt es sich um mannosereiche Oligosaccharide, Proteoglykane und Lipopolysaccharide, Bestandteil bakterieller Zellwände¹⁹⁸. Zu den PRR gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR) und der C-Typ-Lektinrezeptor DEC 205²⁰³. Nach Bindung stimulieren PRR die Phagozytose und Prozessierung von Antigenen sowie die Reifung von DC²⁰⁴⁻²⁰⁶. Die immunologischen Stimuli führen dazu, dass sich die Chemokinrezeptoren der DC deutlich verändern, antigenaufnehmende Strukturen verschwinden und stimulierende Faktoren für T-Lymphozyten zunehmen¹⁸².

Der endgültige Schritt zu reifen DC (mDC) wird auch intakte Bakterien²⁰⁷ sowie durch Zytokine wie IL-1, IL-3, GM-CSF und TNF- α gefördert. IL-10 hingegen hemmt die Reifung²⁰⁸⁻²¹⁰. TLR-Signale stimulieren während dieses Prozesses die Expression der Rezeptoren CCR6 und CCR7, wodurch eine aktive Migration der DC in die T-Lymphozyten-Areale der sekundären lymphatischen Organe stattfinden kann^{180d, 211}.

Innerhalb weniger Tage tragen DC große Mengen der kostimulierenden Transmembranglykoproteine CD80 und CD86 an ihrer Oberfläche sowie viel MHC, ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58)¹⁸². Letztere verstärken die Adhäsion und Signalgebung mit dem T-Lymphozyten-Rezeptor auf naiven T-Lymphozyten für ihre Aktivierung^{203,212}. Zudem exprimieren DC ein hohes Maß der NF- κ B-Familie

z.B. Rel A/p65²¹³, welche die Expression vieler Gene für immunmodulatorische und inflammatorische Proteine kodieren.

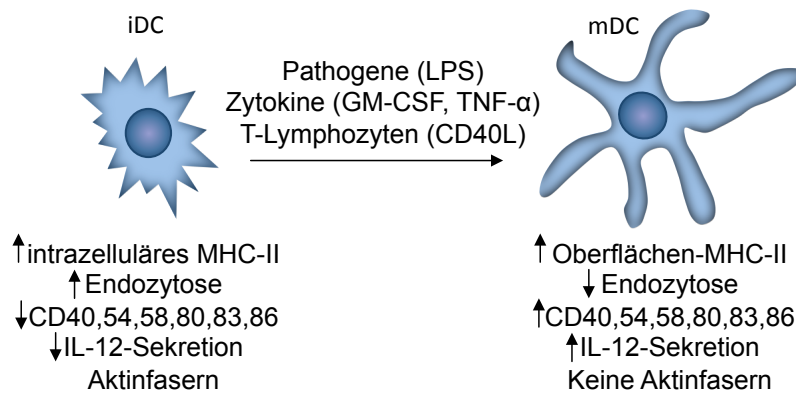


Abb. 1.7: Eigenschaften, die sich während der DC-Reifung verändern. Unreife DC können Antigene auf unterschiedliche Weise aufnehmen: Phagozytose, Macropinozytose, Pinozytose. Pathogene wie LPS, Zytokine wie GM-CSF und TNF-α oder der T-Lymphozyten-Ligand CD40L, der an CD40 auf DC bindet, führen zur Reifung von iDC zur mDC. Modifiziert nach¹⁸².

Die Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme machen die Antigenpräsentation so effizient, dass picomolare Antigenkonzentrationen ausreichen um eine suffiziente Immunantwort zu generieren¹⁹⁸.

Antigene von Infektionserregern^{199,200} oder Tumoren müssen zunächst durch DC verarbeitet werden, um präsentiert zu werden²¹⁵⁻²¹⁸. Intrazelluläre Antigene werden im Zytosol fragmentiert und regen, an MHC-I gebunden, CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten zur Proliferation an²¹⁹⁻²²². Diese können dann infizierte Zellen direkt eliminieren und Tumorzellen attackieren^{182,219,220}. Extrazelluläre Antigene, welche den endozytotischen Weg gehen, werden mittels MHC-II-Molekülen CD4⁺ T-Helfer-Zellen präsentiert¹⁸² und bleiben über Tage stabil^{223,224}. Reife DC können Antigene nicht mehr durch Phagozytose oder Makropinozytose aufnehmen. Sie exprimieren nun aber 10-100 Mal mehr MHC-I- und MHC-II-Moleküle als andere antigenpräsentierende Zellen wie B-Lymphozyten oder Monozyten^{182,214}.

Molekül	Lokalisation	Funktion
CD3	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten-Rezeptor
CD4	T-Lymphozyten	Erkennung von an MHC-I-gebundenen Antigenen durch T-Lymphozyten-Rezeptor
CD8	T-Lymphozyten	Erkennung von an MHC-I-gebundenen Antigenpeptiden durch T-Lymphozyten-Rezeptor
CD14	Monozyten, Makrophagen	LPS-Rezeptor
CD19	B-Lymphozyten	B-Lymphozyten-Rezeptor, Aktivierung von B-Lymphozyten

CD40	antigenpräsentierende Zellen	stimuliert Differenzierung von antigenpräsentierenden Zellen über CD154
CD54 (ICAM-1)	Lymphozyten, DC, Endothelzellen	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül, Migration
CD58 (LFA-3)	antigenpräsentierende Zellen	Zelladhäsionsmolekül
CD80 (B7.1)	antigenpräsentierende Zellen	Kostimulation von T-Lymphozyten
CD83	DC	DC-Marker
CD86 (B7.2)	antigenpräsentierende Zellen	Kostimulation von T-Lymphozyten
CD154 (CD40L)	antigenpräsentierende Zellen	Bindet an CD40 und löst Reifung von antigenpräsentierenden Zellen aus
CD197 (CCR7)	DC, T-Lymphozyten	Rezeptor für CCL19 und 21, Migration
CD209 (DC-SIGN)	DC, Makrophagen	PAMP-Bindung, Adhäsionsmolekül, T-Lymphozyten-Aktivierung
MHC (HLA-DR)	antigenpräsentierende Zellen	Peptidpräsentation
RANKL	T-Helfer Zellen	DC-Reifung und Überleben

Tabelle 1.3: Übersicht über ausgewählte zelluläre Moleküle, deren Lokalisation und Funktion¹⁸⁰.

1.2.3.2 Induktion einer Immunantwort durch dendritische Zellen

Die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten erfordert zusätzlich zum Erkennen des Antigens durch den T-Lymphozyten-Rezeptor die kostimulatorischen Moleküle auf dendritischen Zellen¹⁴⁴.

Naive T-Lymphozyten migrieren zunächst in die T-Lymphozyten-Zone lymphatischer Organe über Bindung des T-Lymphozyten-Integrins LFA-1 an die intrazellulären Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 der DC und des Endothels. Zudem bindet LFA-1 an ICAM-3, das von naiven T-Lymphozyten exprimiert wird, und an das Adhäsionsmolekül DC-SIGN, das in großen Mengen auf dendritischen Zellen vorkommt. Zusätzlich interagieren T-Lymphozyten über CD2 mit LFA-3 (CD58) der DC^{180d}.

T-Lymphozyten durchlaufen nun eine klonale Expansion und Differenzierung zu T-Effektorzellen. Die naiven CD4⁺ T-Lymphozyten differenzieren sich während des Voranschreitens der Infektion zu verschiedenen Gruppen von T-Effektorzellen: Th₁₇, Th₁, Th₂ oder zu CD25⁺ T_{reg} (S. 537-540)¹⁸⁰. Dabei entsteht ein Klon von T-Lymphozyten mit identischer Antigenpezifität¹⁴⁴. Zytokine bestimmen in der frühen Aktivierungsphase der CD4⁺ T-Lymphozyten zu einem großen Teil ihre weitere Differenzierung^{180e} (siehe Abb. 1.8).

Nach Zusammentreffen mit einem Antigen synthetisieren DC in der ersten Phase der Immunreaktion IL-6 und TGF- β . Naive T-Lymphozyten differenzieren sich dadurch zu Th₁₇-Zellen, vorausgesetzt IL-4, IL-12 oder IFN- γ hemmen sie dabei nicht.

Mit Voranschreiten der Immunantwort nimmt die Produktion von IL-6 und TGF- β ab^{180e}. Naive T-Lymphozyten differenzieren sich dann in Gegenwart von mDC und IL-12, Viren, Bakterien oder Protozoen in IFN- γ -produzierende Th₁-Zellen^{225–228}. IFN- γ wiederum aktiviert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und fördert, zusammen mit IL-12, die Differenzierung von T-Lymphozyten zu CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten^{180e}. Letztere können Tumorzellen und mit Viren infizierte Zellen erkennen und zerstören¹⁴⁴.

Durch IL-4 induzieren DC bei T-Lymphozyten eine Differenzierung zu Th₂-Zellen, welche IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren²²⁹. Diese Zytokine aktivieren eosinophile Granulozyten und unterstützen B-Lymphozyten bei der entsprechenden Antikörperproduktion¹⁸². DC sind auch in der Lage, über TGF- β effizient bei der Aktivierung von natürlich vorkommenden T_{reg} mitzuwirken^{230–232}.

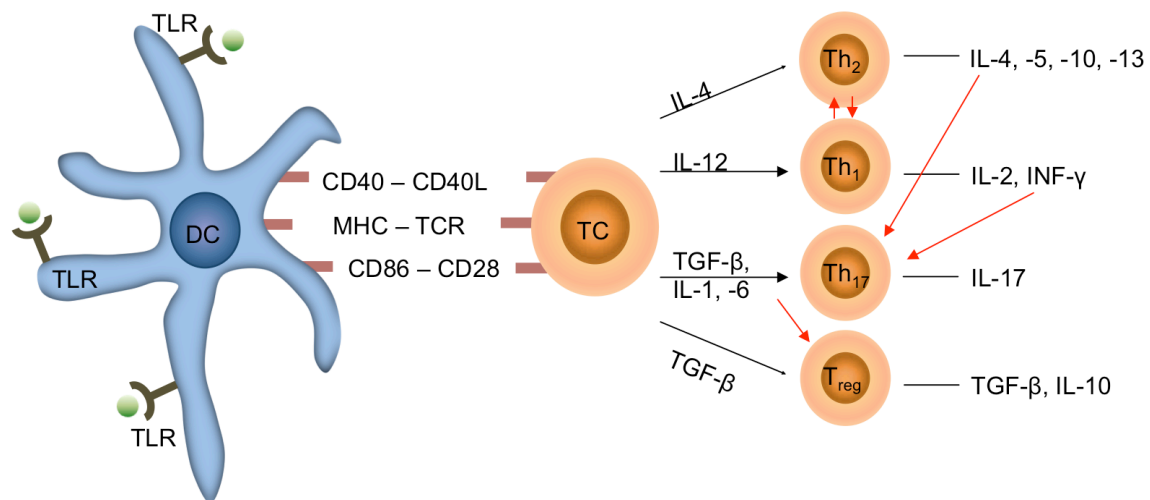


Abb. 1.8: DC-vermittelte T-Lymphozyten-Polarisierung. Nach Aktivierung von TLR durch Pathogene (hier in grün) erhöhen DC die Expression von MHC auf der Zelloberfläche, regulieren kostimulatorische Moleküle hoch und sezernieren immunmodulatorische Zytokine, welche die T-Lymphozyten-Polarisierung dirigieren. Bindung bestimmter TLR bewirkt eine unterschiedliche Zytokinproduktion. IL-4 unterstützt die Differenzierung zu Th₂-Zellen, wohingegen IL-12 die Bildung von Th₁-Zellen fördert. Th₂-Zellen selbst sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, Th₁-Zellen dagegen schütten IL-2 und IFN- γ aus. IL-4 und IL-12 verstärken die Generierung ihrer eigenen Untergruppe und hindern gleichzeitig die Entwicklung der entgegengesetzten Untergruppe. Eine Kombination von IL-1 oder IL-6 mit TGF- β trägt zur Entwicklung von Th₁₇-Zellen bei. TGF- β allein dagegen unterstützt die Generierung von regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}). Sowohl IL-4 als auch IFN- γ hemmen die Th₁₇-Entwicklung. IL-6 hemmt die Entwicklung von T_{reg}. Schwarze Pfeile stellen fördernde Aktivität dar, rote zeigen inhibitorische Aktivität. Modifiziert nach¹⁴⁴.

Die DC-Oberflächenmoleküle CD40 und der TRANCE/RANK-Rezeptor werden von CD40L bzw. RANK-Ligand auf aktivierten T-Lymphozyten und T-Gedächtniszellen gebunden. Dies führt zu einem besseren Überleben der DC^{233,234}. Durch CD40 werden CD80 und CD86 hochreguliert²⁰⁵ und die Sekretion von IL-12 gefördert^{182,225,226,235}. Über dieses Zytokin können DC auch die Antikörperproduktion und Proliferation von B-Lymphozyten direkt fördern²³⁶ sowie NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems aktivieren²²⁵⁻²²⁷.

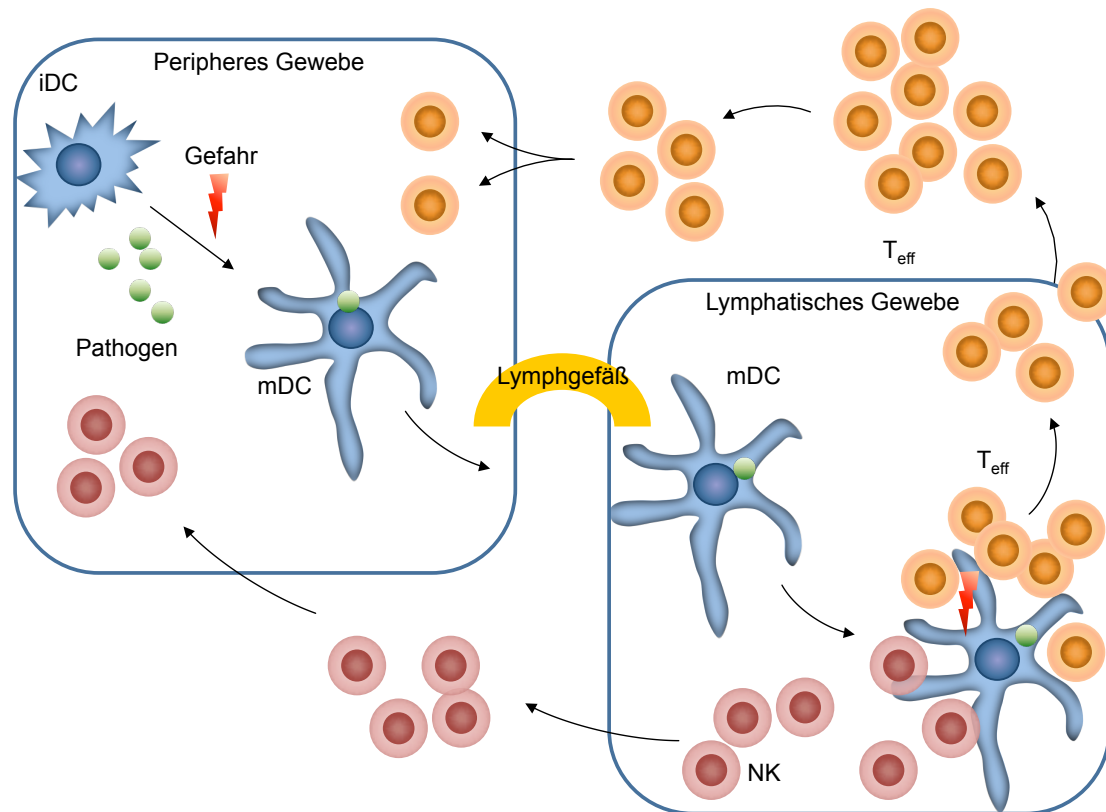


Abb. 1.9: Die zentrale Rolle von DC bei der Initiierung einer Immunantwort. DC kommen in fast allen Geweben und Organen vor, auch im Gehirn, und kontrollieren kontinuierlich die Umwelt auf Gefahren, z.B. Mikroorganismen und Gewebeschäden. Unreife DC (iDC) sind sehr effizient in der Antigenaufnahme durch Endozytose und Expression einer Reihe von Zelloberflächenrezeptoren. Durch Erkennen einer Gefahr reifen DC und wandern zu den lymphatischen Organen. Hier interagieren reife DC (mDC) mit naiven Lymphozyten, aktivieren sie und initiieren so eine Immunantwort. Nach ihrer Expansion verlassen aktivierte T-Effektorzellen (T_{eff}) und natürliche Killerzellen (NK) das lymphatische Gewebe und kehren zum Ort der Antigenablagerung zurück, um die Gefahr im Gewebe (z.B. dem Gehirn) zu eliminieren. Modifiziert nach¹⁴⁴.

1.2.4 Immune-Escape von Tumoren

Die oben beschriebenen Sachverhalte stellen dar, von welcher Bedeutung das Immunsystem bei dem Entstehungsprozess eines Tumors ist. Zusätzlich verdichten sich Beweise, dass die Aktivierung des Immunsystems bei Glioblastompatienten durch die lokale Mikroumgebung unterdrückt wird^{56,237-240}.

Maligne Gliome sind durch das Vorhandensein einer Reihe löslicher, teils immunsuppressiver Faktoren wie VEGF, IL-10 und TGF- β gekennzeichnet¹⁸².

IL-10 kann die T-Lymphozyten-Aktivierung direkt blockieren und die DC-Reifung hemmen. TGF- β unterdrückt die Reaktion inflammatorischer T-Lymphozyten und kann die Entwicklung von T_{reg} induzieren^{180f}. Zahlreiche immuninhibitorische Moleküle, z.B. Galectin-1²⁴¹, HLA-G²⁴², HLA-E²⁴³ oder PD-L1 (B7-H1)^{244,245}, kommen auf der Oberfläche von Glioblastomzellen vor. Zusätzlich werden immunsuppressive Enzyme, wie die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), COX-2, Arginase und Stickstoffmonoxidsynthase-2 (NOS-2), in Glioblastomzellen überexprimiert^{246–250}.

Immunstimulatorische Moleküle, wie IL-12, IL-18 und INF- γ , fehlen in der Umgebung von Glioblastomen. Auch ist die Menge spezifischer Antigen-MHC-Komplexe und anderer kostimulatorischer Moleküle auf Tumoren gering¹⁸².

Es konnte zudem gezeigt werden, dass T_{reg} Gliome infiltrieren^{251,252}. GBM-Patienten zeigen eine erhöhte T_{reg}-Population im peripheren Blut im Rahmen eines reduzierten T-Lymphozyten-Pools²⁵³. Die Bedeutung dessen ist noch nicht eindeutig geklärt.

1.2.5 Das ZNS – für das Immunsystem ein besonderer Ort

Hirntumoren befinden sich im ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und der Abwesenheit konventioneller Lymphgefäße sowie eines geringen T-Lymphozyten-Aufkommens in einer besonderen Position für das Immunsystem^{254,255}.

DC können in geringer Anzahl in den Meningen, im perivaskulären Raum, im Plexus choroideus und im Liquor gefunden werden, wo sie im unreifen Zustand verweilen^{256–258}. Trotz des Fehlens von Lymphgefäßen können antigenbeladene DC das ZNS über den subarachnoidalen Raum durch die Lamina cribrosa in Lymphgefäße der Nasenschleimhaut verlassen oder über Arachnoidalzotten in das venöse Blut drainiert werden^{259–261}.

Wenn massiver Gewebsschaden mit Destruktion der Bluthirnschranke und Tumorzellnekrose mit Antigenausschwemmung in die Peripherie stattfindet, werden Hirntumoren für das periphere Immunsystem erreichbar¹⁴⁴. DC treten dann sowohl im Hirnparenchym als auch im Liquor zahlreich auf^{262–264}.

Nach Antigenkontakt und klonaler Expansion kehren aktivierte antigenspezifische T-Lymphozyten aus der Peripherie ins Gehirn zurück^{265,266}. Unter Entzündungsbedingungen sind sie in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden²⁶⁷. Nach Ankunft im ZNS ist für eine optimale Stimulation der T-Lymphozyten eine antigenspezifische Reaktivierung durch perivaskuläre

antigenpräsentierende Zellen wie Mikrogliazellen notwendig²⁶⁸⁻²⁷¹. Diese können sich als Reaktion auf inflammatorische oder mikrobielle Stimuli in DC-ähnliche Zellen verwandeln²⁷²⁻²⁷⁴. Trotzdem ist das Maß an MHC-Expression und kostimulatorischen Molekülen auf Mikrogliazellen bei voller Aktivierung deutlich niedriger als auf reifen DC, und sie können weder naive T-Lymphozyten noch T-Effektorzellen aktivieren^{275,276}.

Die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und anderen Immuneffektorzellen korreliert bisher nicht unvermeidlich mit dem klinischen Ergebnis^{56,280}. Inwiefern die Infiltration von Tumoren durch Immunzellen als prognostischer Faktor für das klinische Ergebnis von GBM-Patienten gewertet werden kann, bleibt widersprüchlich^{182,277-279}.

1.3 Dendritische Zellen in der Immuntherapie des Glioblastoma multiforme

1.3.1 Prinzipien der Immuntherapie maligner Erkrankungen

Malignome werden durch das progressive Wachstum der Nachkommen einer einzigen mutierten Zelle verursacht. Zur Heilung müssen wahrscheinlich sämtliche bösartigen Zellen entfernt und zerstört werden. Aufgrund der disseminierten Verteilung der Glioblastomzellen ist das bei der hier im Vordergrund stehenden Malignomentität besonders schwierig^{43,128}. Eine Möglichkeit, das Ziel zu erreichen, ist die Induktion einer Immunantwort mittels Immuntherapie.

Man kann Immuntherapie in vier verschiedene Gruppen einteilen:

1) Passive Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern²⁸¹.

Dieser Therapieansatz wird jedoch erschwert durch die Antigenvariabilität der Tumoren sowie durch die Tatsache, dass die verwendeten Antikörper oft nicht tief genug in die Tumormasse eindringen und die Tumoren durch Ak-Bindung häufig nicht vollständig abgetötet werden können. Passive Immuntherapie wird z.B. bei Lymphomen in Form von Rituximab angewendet⁴¹⁵.

2) Passive Immunstimulation mit proinflammatorischen Molekülen²⁸²⁻²⁸⁶.

Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die lokale Administration des TLR-9-Agonisten CpG-Oligonukleotid, der im Vergleich zu anderen TLR-Agonisten beim Glioblastom eine starke Antitumor-Immunität induziert²⁸⁷. Auch die intratumorale Anwendung von GM-CSF wurde untersucht, zeigte bisher aber nur geringe Behandlungserfolge, wahrscheinlich, da die stimulierte Immunantwort zeitlich limitiert ist^{180g}.

3) Adaptive Immuntherapie durch Behandlung mit stimulierten Immunzellen²⁸⁸⁻²⁹⁰.

Im Rahmen dieser gut verträglichen Methode konnte ebenfalls nur selten eine klinische Effektivität bei lokaler Administration von lymphokinaktivierten Killerzellen^{291,292}, NK-Zellen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten und allogenen oder autologen tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten beobachtet werden^{289,293-296}.

4) Aktive spezifische Immuntherapie.

Bei diesem Ansatz werden üblicherweise *ex vivo* generierte, mit Tumorantigenen oder inaktivierten Tumorzellen beladene DC als Vakzine genutzt, um das Immunsystem zu stimulieren^{297,298,300,301}. Sie induzieren eine hoch tumorspezifische Zytotoxizität bei minimalen Nebenwirkungen²⁹⁹.

Bei Glioblastompatienten kann aktive Immuntherapie eine potente Antitumorantwort *in vivo* auslösen und so zumindest bei einer Subpopulation der Patienten ein Langzeitüberleben induzieren²⁹⁷. Chemotherapie allein verfehlt dieses Ziel häufig aufgrund der Entstehung von Resistenzen oder Toxizität.

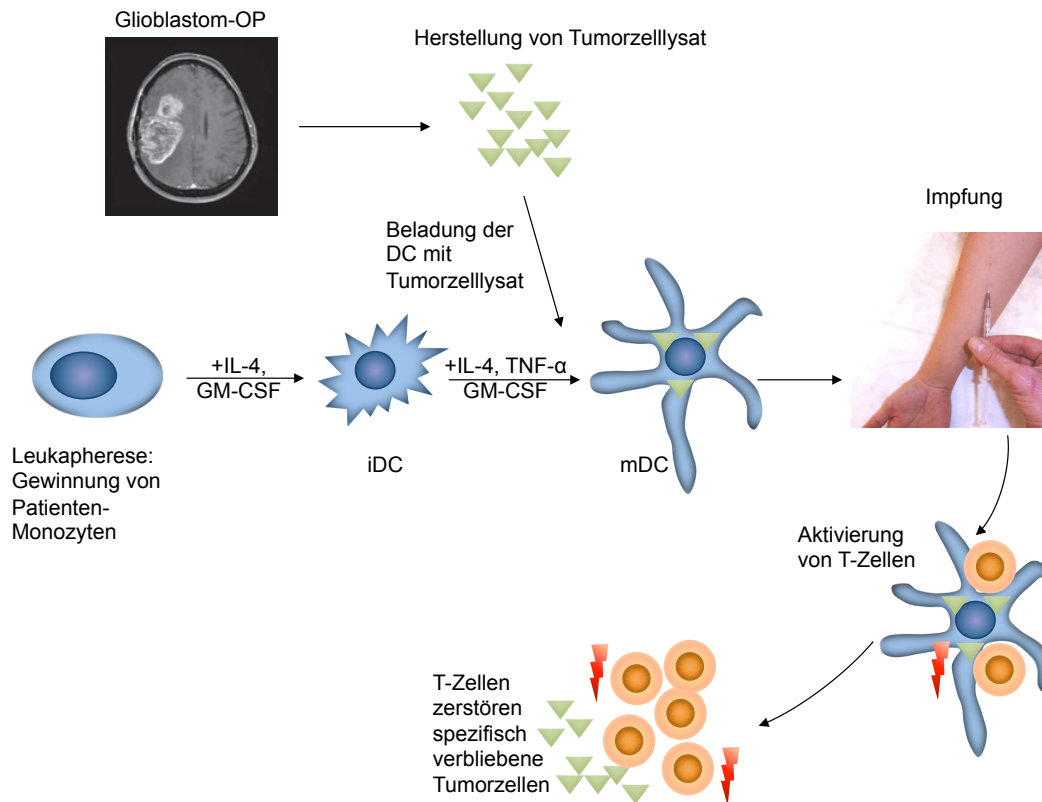


Abb. 1.10: Prinzip der aktiven Immunisierung mittels einer dendritischen Zellvaccine. Bei den betroffenen Patienten wird eine Leukapherese zur Gewinnung von Monozyten durchgeführt. Aus den gewonnenen Zellen werden *ex vivo* durch Zugabe von Zytokinen reife DC (mDC) generiert, welche mit dem eigenen Tumorzelllysate der Patienten beladen werden. Diese beladenen DC werden dem Patienten anschließend injiziert und können spezifische T-Lymphozyten aktivieren. Abbildung enthält Anteile aus²⁹⁷.

1.3.2 *In-vitro* Generierung dendritischer Zellen

CD14⁺ Monozyten aus dem peripheren Blut können unter geeigneten Bedingungen in Monozytenserum und unter Hinzugabe von GM-CSF, IL-4 und TNF- α zu DC gereift werden^{198,204,302–305} und stellen damit äußerst potente antigenpräsentierende Zellen dar^{302,303}.

DC zeigten stärkere NK- und T-Lymphozyten-Antworten und eine geringere Induktion von T_{reg}, wenn sie mit TNF- α , IL-1 β und IFN- γ gereift wurden. Die Koadministration von IL-12 zu einer DC-Vaccine verstärkte die Antitumorantwort und resultierte in einigen humanen und Tierstudien mit verlängertem Überleben^{306–308}. Bei Patienten mit großer Tumormasse wurde jedoch eine deutliche Toxizität erzeugt^{309,310}.

Eine weitere effektive Methode, die Immunogenität von DC zu verstärken, ist der Einsatz von Stoffen bei der Reifung, die DC optimal aktivieren z.B. von TLR-3-Agonisten Poly I:C (Poly-Inosin-poly-Cytosin-Säure) oder von TLR-7/8-Agonisten R 848. TLR-gereifte DC zeigen einen stabilen Phänotyp und gute IL-12 Produktion, sogar wenn sie TGF- β , Th₂-Zellen oder Bedingungen, die T_{reg} stimulieren, ausgesetzt sind^{311–314}.

Unvollständig gereifte DC spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Toleranz. Zudem konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Aktivität vonIDO (siehe Kapitel 1.2.4) in DC verstärkt und so eine Art regulatorischen DC-Subtyp induziert³¹⁵. Daher entschieden sich Van Gool *et al.*, das zuvor im Reifungscocktail genutzte PGE₂ in zukünftigen klinischen Studien durch topische Imiquimod-Applikation zu ersetzen. Imiquimod ist ein TLR-7 Agonist und induziert stark die DC-Reifung und Aktivierung³¹⁶. Auch eine RNA-Beladung ist für den klinischen Einsatz prinzipiell geeignet³⁵¹.

Inwieweit aus PBMC von GBM-Patienten unter Steroidtherapie qualitativ hochwertige DC generiert werden können, ist noch nicht geklärt^{297,322,332,345,358}.

1.3.3 DC-Vakzine an Tiermodellen

„Proof of principle“ einer DC-basierten Immuntherapie gegen Glioblastome wurde *in vitro*^{321,333} und anhand von Nagetiermodellen^{334–337} demonstriert und die Notwendigkeit der klinischen Anwendung mehrfach thematisiert^{297,338}.

Ein multimodales Therapieregime mit einer DC-basierten Vakzine in Kombination mit niedrigdosierter Chemotherapie mit TMZ führt zu einer vermehrten tumorspezifischen Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten und verbessertem Antitumoreffekt im GL261-Mausmodell sowie zur Suppression von T_{reg}. Die Kombinationstherapie aus TMZ und DC resultierte in einer Erhöhung IFN- γ sezernierender tumorspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten verglichen mit singulärer Therapie²⁹⁹. Zudem war bei Kombination die Heilungsrate höher als mit DC-Vakzine bzw. TMZ-Therapie allein³³⁹. Park *et al.* bestätigten die Ergebnisse³⁴⁰. Kjaergaard *et al.* beobachteten bei Mäusen eine komplette Rückbildung von intrakraniellen Tumoren mit Infiltration durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, wenn sie eine Vakzine nutzten, die durch Elektrofusion von DC und bestrahlten Tumorzellen entstanden war. Langzeitüberlebende Mäuse fanden sich nur in der Gruppe, die Radiotherapie zusammen mit einer DC-Vakzine erhielten³⁴¹.

Eine Strategie, die Tumor-Mikroumgebung zu beeinflussen, ist DC direkt in den Tumor zu injizieren. Intratumorale Injektion von DC, welche entweder mit INF- α DNA transfiziert wurden oder TLR-polarisiert waren, konnte bei Mäusen eine ZNS-Immunität durch Präsentation von TAA verstärken und das Homing von zytotoxischen T-Lymphozyten fördern^{311,342}. Zudem verstärkten sie die Effektivität peripherer Vakzine^{300,311,343}. Bei Mäusen konnte eine Vakzinierung mit antigenstimulierten, TLR-gereiften DC in Kombination mit peri- oder intratumoraler Injektion von TLR-Agonisten eine Immunität potenzieren³⁴⁴.

Des Weiteren ist die Rate apoptotischer Hirntumorzellen höher bei Mäusen, die mit TMZ behandelt wurden³⁴⁵. TMZ könnte also Tumorzellen verletzen, was dann dazu führt, dass Gefahrensignale, wie Harnsäure, Calreticulin, HMGB1, Alarmin und Hitzeschockproteine^{346,347,475-478} ausgeschüttet werden, welche die DC-Reifung stimulieren³⁴⁸.

Grauer *et al.* illustrierten den Einfluss von FoxP3⁺ T_{reg} und nahmen an, dass die Elimination von T_{reg} eine Voraussetzung für die erfolgreiche Eradikation von Glioblastomen ist, wenn man lysatbeladene DC nutzt^{287,349}. Dies konnten die Ergebnisse einer DC-Vakzinierung zusammen mit T_{reg}-Depletion bestätigen, da eine langfristige Immunität gegen den Tumor entstand^{287,336}.

In vitro und *in vivo* wurde gezeigt, dass DC, welche mit Tumorantigenen in Form von RNA beladen wurden, in der Lage sind, eine durch T-Lymphozyten vermittelte Immunität zu induzieren und das Überleben von am Glioblastom erkrankten Mäusen zu verlängern^{336,337,350}.

Im murinen GL261-Modell erreichten Insug *et al.* protektive Immunität gegen intrakranielles Glioblastomwachstum durch Immunisierung mit entweder lysat- oder RNA-beladenen DC³⁰⁶. Eine Verbesserung des Überlebens konnte neben IL-12³⁰⁶ auch durch eine Kombination von DC und IFN- β Gentherapie durch Saito *et al.* demonstriert werden³⁵².

1.3.4 Ergebnisse klinischer Studien

Glioblastompatienten sind aufgrund der limitierten Effektivität von Standardbehandlungen oft gewillt, experimentelle Therapieoptionen in Anspruch zu nehmen³⁵³.

Einige Vakzine-basierte klinische Studien schlossen alle Patienten mit Subtypen hochmaligner Gliome ein^{54,319,320,324,326,328,354}, wobei andere sich nur auf GBM-Patienten fokussierten^{317,318,322,323,325,355}. Manche Studien waren nur für

Rezidivpatienten gedacht^{317,326–328}, andere schlossen ausschließlich Patienten mit Erstdiagnose GBM ein³⁵⁴ oder beide wurden zusammen analysiert^{54,318–320,324,325}. Nur die europäische Arbeitsgruppe berichtete über Kinder mit einem Rezidiv^{322,323,355}. In allen klinischen Studien nutzte man DC, die aus Monozyten des peripheren Blutes gereift wurden²⁹⁷.

Aufgrund des heterogenen Studiendesigns und der verschiedenen Vakzinierungsprotokolle sind vergleichende Analysen zum klinischen Ergebnis schwierig; in den meisten Studien konnten allerdings positive Resultate beobachtet werden. Die Daten bestätigen die Sicherheit, Durchführbarkeit und mögliche vorteilhafte Effekte einer DC-Vakzinierung^{297,323,338,355}.

Ob DC am besten intradermal, intravenös oder direkt in die Lymphknoten injiziert werden sollten, ist noch nicht abschließend geklärt^{265,356}. Gewiss ist, dass nur ein geringer Anteil der intradermal injizierten DC letztendlich die Areale der T-Lymphozyten in Lymphknoten erreicht²⁹⁷.

Eine der größten klinischen Studien zur postoperativen adjuvanten Immuntherapie mit DC bei 56 Glioblastom-Rezidivpatienten wurde von der Arbeitsgruppe um Van Gool durchgeführt³²². Nach Tumorresektion und Absetzen der Steroide für eine Woche erfolgte eine Leukapherese mit mindestens drei Impfungen im Anschluss. Das mediane Gesamtüberleben betrug 9,6 Monate. Nach einem Jahr lebten noch 37,4% der Patienten, nach zwei Jahren 14,8%³²².

Die Injektion von DC, gefolgt von „Boost-Impfungen“ mit reinem Tumorlysat generierte die effektivste Antitumorwirkung mit möglichem Langzeitüberleben³²², wie bereits im Mausmodell gezeigt werden konnte³⁵⁷. Weiterführende Studien fanden mit größeren Patientenkollektiven bei primär diagnostiziertem GBM und optimiertem Vakzinierungsprotokoll statt, beispielsweise mit einem verkürzten Intervall zwischen den DC-Vakzinierungen.

Bei Rezidivpatienten konnte bei kompletter Resektion ein medianes Gesamtüberleben von 10 Monaten und ein 2-Jahres PFS von 15,3% und 2-Jahres OS von 27,8% erreicht werden. Aufgrund der positiven Resultate bei Rezidivpatienten wurde die Immuntherapie in Kombination mit Radiotherapie durch *Ardon et al.* in die First-line Therapie beim primär diagnostizierten Glioblastom integriert³⁵⁸. Während der TMZ-Erhaltungstherapie erhielten die Patienten Impfungen mit einer DC-Vakzine. Die Zellen wurden im Rahmen des Reifungsprozesses mit autologem Tumorlysat inkubiert. Die Anzahl und Eigenschaften der erhaltenen DC variierten zwischen den Patienten sehr stark.

1-12 x 10⁶ DC pro Lymphknotenregion wurden in das obere Armdrittel intradermal über 4 Wochen 1 Mal wöchentlich appliziert. Diese Impfungen waren gefolgt von "Boost-Impfungen" mit Lysat allein³⁵⁸. Das mediane OS aller Patienten betrug 24 Monate, eine deutliche Steigerung verglichen mit 14,6 Monaten bei der EORTC-Studie 2005. Das mediane PFS aller Patienten betrug 18 Monate.

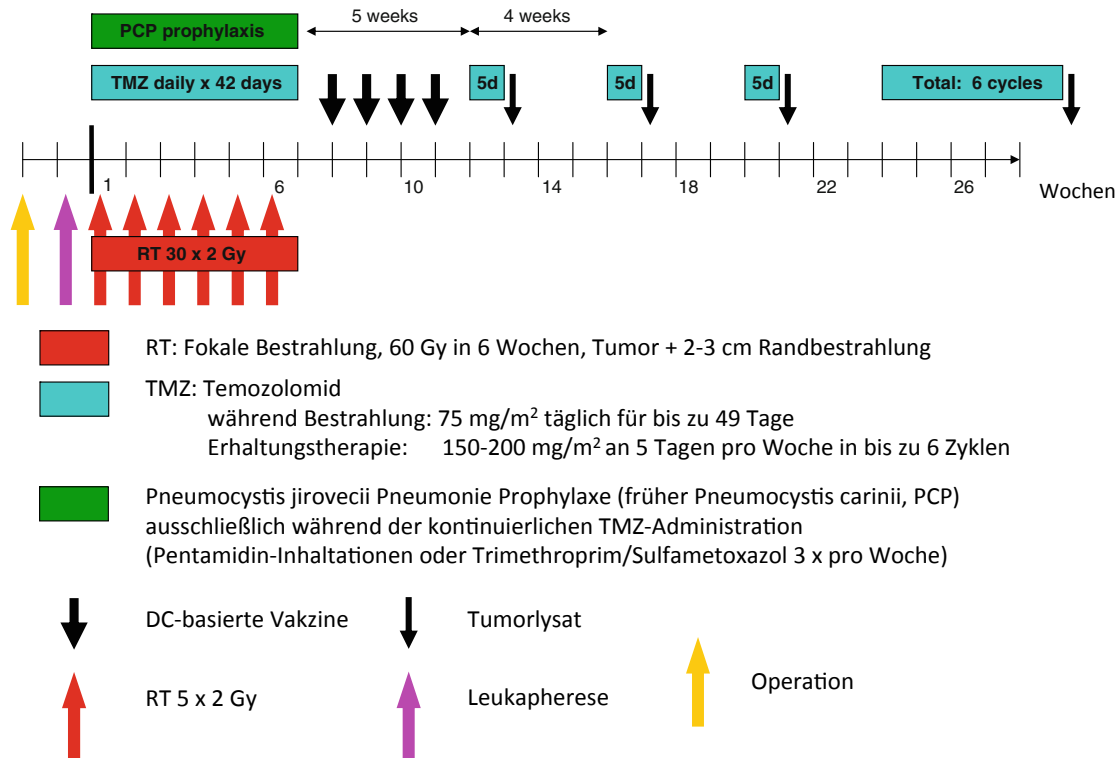


Abb. 1.11: Erste klinische Studie einer DC-Vakzine bei primär diagnostiziertem Glioblastoma multiforme. Nach Radiochemotherapie mit TMZ wurden die Patienten 1 x pro Woche insgesamt 4 Mal mit Tumorlysat beladenen DC geimpft. Während der TMZ-Erhaltungstherapie folgten weitere „Boost-Impfungen“ mit Tumorlysat allein³⁵⁸.

Die Vorbehandlung der Injektionsstelle mit proinflammatorischen Verbindungen oder TLR-Agonisten wie Imiquimod (TLR-7) konnte sowohl die Dauer der Reaktion als auch das Wandern von DC in die drainierenden Lymphknoten nach der Vakzinierung signifikant erhöhen, was zu einem vermehrten Priming von tumorspezifischen T-Lymphozyten führte³⁵⁹⁻³⁶¹ und mit einem signifikanten Überlebensvorteil assoziiert war²⁹⁷.

Die DC-Vakzinierung scheint für junge Patienten mit geringer Tumormasse, gutem Karnofsky Index (siehe Anhang Nr. 2) und niedriger TGF-β-Expression besonders vorteilhaft zu sein^{318,319,322,323,326,327,354}. Milde Nebenwirkungen wie temporäre vakzininduzierte Rötung, Kratzen und Schwellung an der Injektionsstelle waren häufig³²². Von einer durch die DC-Vakzine induzierten Autoimmunreaktion wurde bisher nicht berichtet²⁹⁷.

Bei großen Tumoren konnte eine Immuntherapie bisher, vermutlich aufgrund der vom Tumor ausgehenden immunsuppressiven Faktoren, keinen durchgreifenden Erfolg bringen^{362,363}. Da überschießende peritumorale Entzündungsreaktionen nach Vakzinierung bei großen Residualtumoren beobachtet wurden, sollte eine DC-Vakzinierung eher in Tumorstadien mit minimaler Resterkrankung Anwendung finden^{322,323,355}.

Bisher konnte kein Faktor für eine dosisabhängige Toxizität oder Wirksamkeit einer DC-basierten Vakzinierungstherapie gefunden werden³¹⁸.

Insgesamt hat eine Vakzine mit dendritischen Zellen bei Glioblastompatienten eine Ansprechrate von 11,4%, basierend auf den Macdonald-Kriterien^{297,364} (siehe Anhang Nr. 3). Von 5-10% klinischem Ansprechen auf eine DC-Vakzine wurde auch bei anderen malignen Erkrankungen, wie dem Melanom, berichtet³⁶⁵.

Insgesamt ergaben sich vor allem mit der signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens bei guter Lebensqualität zufriedenstellende Ergebnisse. Ein "Proof of Efficacy" kann jedoch nur in einer großen, gut entworfenen, idealerweise Placebo-kontrollierten, klinischen Studie erbracht werden²⁹⁷.

1.3.4.1 Monitoring

Das radiologische Follow-up wird bei Glioblastompatienten routinemäßig mit MRT durchgeführt. Eine KM-Aufnahme, einhergehend mit einem periläsionalem Ödem und Masseneffekten, wird bei einigen Patienten beschrieben. Die Unterscheidung zwischen vakzininduzierter entzündlicher Immunreaktion und frühem Tumorrezidiv bleibt anspruchsvoll, da die radiologischen Charakteristika beider Entitäten ähnlich sind²⁹⁷. Eine effektive Reaktion gegen den Tumor ist in der Regel 4 Monate nach Beginn der Vakzinierung zu beobachten³⁵⁵.

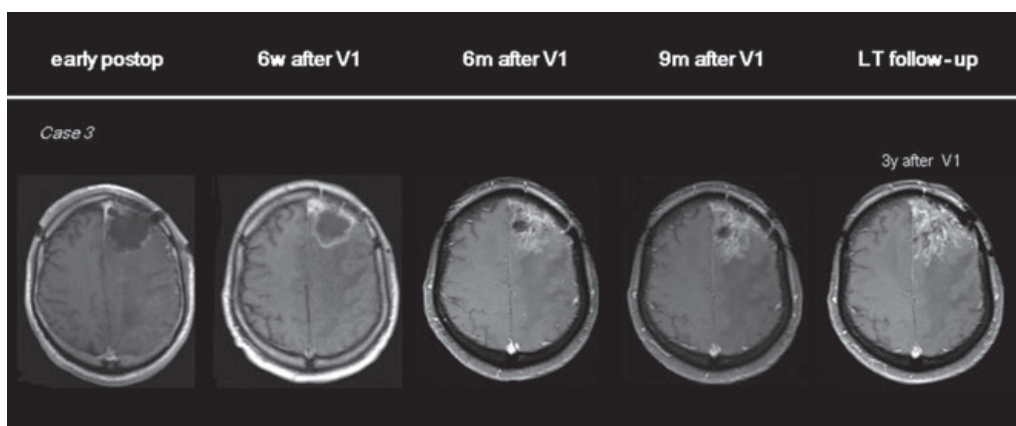


Abb. 1.12: Radiologisches Follow-up eines Patienten mit rezidiviertem Glioblastom unter Therapie mit einer DC-Vakzine. Transversale MRT-Bilder nach KM-Gabe einen Tag nach Operation (early postOP), 6 Wochen nach der ersten Vakzinierung (6w after V1), 6 und 9 Monate nach der ersten Vakzinierung (6 bzw. 9m after V1) und im Rahmen der Langzeit-Nachsorge (LT follow-up)²⁹⁷.

Da die momentane Routine-MRT nicht immer zwischen Immunreaktion und einem Tumorprogress differenzieren kann, wird derzeit an der Entwicklung fortgeschrittener MR-Techniken wie der MR-Spektroskopie^{366–368}, diffusionsgewichteter MR^{368,369}, perfusionsgewichteter MR^{368–370} sowie “Diffusion Tensor Imaging”³⁷¹ geforscht. PET-Scans mit der radioaktiv markierten Aminosäure Methionin in Kombination mit hoch auflösender MRT könnten ebenfalls vorteilhaft sein, da die Technik metabolische Daten für relevante Läsionen liefert²⁹⁷.

Für das immunologische Monitoring einer DC-Vakzinierung wurden auch DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*) Hautreaktionstests^{307,318,319,326,354}, die T-Lymphozyten-Reaktivität^{307,319} und die NK-Zell-Anreicherung im peripheren Blut^{326,328} herangezogen, ebenso wie die Messung von T-Lymphozyten-Infiltration im Tumorgewebe nach Vakzinierung^{317–320,326,354}. Eine Korrelation zwischen immunologisch messbaren Effekten und dem klinischen Ergebnis wurde in einigen Veröffentlichungen berichtet^{318,324,325}. Wheeler *et al.*³²⁴ beispielsweise, zeigten eine signifikante Assoziation zwischen dem Überleben und der Erhöhung von IFN- γ nach Vakzinierung.

Da die Summe der Effekte einer DC-Vakzinierung zweifelsfrei sehr viel komplexer ist als durch ein einzelnes Instrument erfasst werden kann, ist noch nicht ganz geklärt, welche Tests am besten mit den klinischen Resultaten korrelieren³⁵⁸.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Trotz des relativen Erfolges der EORTC-Studie und der Einführung der kombinierten Radiochemotherapie als Standardtherapie des Glioblastoma multiforme wird die Mehrheit der Patienten innerhalb von 2 Jahren nach Diagnose sterben, und neue Therapiemöglichkeiten werden dringend benötigt³⁷². Die DC-Vakzine stellt im Rahmen klinischer Studien eine attraktive Therapieoption dar.

Bisher wurde *in vitro* noch nicht eindeutig gezeigt, dass die Kombination aus der Standardtherapie mit Temozolomid in therapeutischen Dosen und einer DC-Vakzine unbedenklich ist und dass insbesondere DC auch in Gegenwart wirksamer Temozolomidkonzentrationen effektiv bleiben. Dies ist jedoch Voraussetzung für die bedenkenlose Anwendung als neue Therapiemöglichkeit.

Der Wunsch dieser Arbeit ist es daher, durch Bestätigung der Unbedenklichkeit, einen Beitrag zur zeitnahen Einführung einer dendritischen Zellvakzine für die Therapie des Glioblastoma multiforme in die klinische Routine zu leisten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Brutschränke: Thermo Scientific B 6060 CB 150	Heraeus Binder
Durchflusszytometer FACS Calibur™	BD Biosciences
Farbkamera 320R2	Leica
MACS® Multi stand	Miltenyi Biotec
MACS® quadro magnet	Miltenyi Biotec
Microplate Reader LP400	Diagnostics Pasteur
Mikroskope: Olympus CKX 41 DMI 400B für Fotografien	Olympus Leica
Multiplate Reader Infinite® 200	Tecan
Photometer SmartSpec™ 3000	Biorad
pH-Meter inoLab® 720	WTW
Sterilbänke: MSC Advantage 1,2 Safeflow 1.2	Heraeus Nunc
Thermocycler RoboCycler®96	STRATAGENE
Vortex-Genie2™	Scientific Industries
Zentrifugen: Laborfuge 400e Funktion Line Multifuge 3S-R Tischzentrifuge Centrifuge 54150	Heraeus Heraeus Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene™
Deckgläser	Menzel Gläser
Dispenser-Tips	Brand
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5 ml-2 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarsted
Filter (10 µm, steril)	Brand
Fluoresbrite® YG Mikropartikel	Polysciences
Kryoröhrchen cryo.s™	Greiner Bio-One
MACS® -Trennsäule	Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte Cellstar®	Greiner Bio-One
Neubauer Zählkammer	Marienfeld

Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen und -platten Cellstar®	Greiner Bio-One
Zellschaber Cellstar®	Greiner Bio-One

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Agarose	Biozym
BCA Protein Assay Kit	Novagen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calcein AM	Sigma-Aldrich
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotech
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
dNTPs	Promega
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA
Ethanol	Zentralapotheke Uni HRO
Ethidiumhomodimer	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum	PAA
Ficoll Lymphocyte Separation Medium	PAA
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau	Merck
IFN- γ ELISA Kit	Immunotools
L-Glutamin (200 mM)	PAA
LoadDye	Promega
May-Grünwalds Eosin-Methylenblau	Merck
MTS-Lösung	Promega
Penicillin (Stocklösung 10^5 IE/ml)	Jenapharm
PBS	PAA
PI	Sigma-Aldrich
PMS-Lösung	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma-Aldrich
Roti-Load (4x)	Roth GmbH
RPMI 1640	PAA
Streptomycin (Stocklösung 0,325 g/ml)	Fatol
TAE-Puffer	AppliChem
Taq-DNA Polymerase	Bioron
Temozolomid	Sigma-Aldrich®

TMB One Solution	Promega
Tris	Roth
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.4 Medien und Puffer

2.1.4.1 Allgemeine Medien und Puffer

Zellkulturmedien:

DMEM und IMDM: 10% FKS, 1% L-Glutamin (200 mM), 10 IE/ml Penicillin, 130 µg/ml Streptomycin

RPMI: 10% humanes AB-Serum, 2% L-Glutamin (200 mM), 10 IE/ml Penicillin, 130 µg/ml Streptomycin

Einfriermedium: RPMI 1640 mit 10% DMSO und 20% humanem AB-Serum für PBMC bzw. nur 10% DMSO in FKS für Tumorzellen

PBS (10 x): Ansatz für 1 l: 7,64 g Na₂HPO₄, 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, pH-Wert = 7,4

MACS-Puffer: PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA, pH-Wert = 7,2

2.1.4.2 ELISA Puffer

TBS-Puffer: 50 mM Tris/140 mM NaCl, ddH₂O ad 1 l, pH-Wert = 8,0

Coating-Puffer: 0,05 M Carbonat-Bicarbonat, ddH₂O ad 1 l, pH-Wert = 9,6

Wasch-Puffer 1 l: 1 x TBS + 0,05% Tween20

Block-Puffer: 100 ml 1 x TBS + 1% Bovines Serum Albumin (BSA)

Proben-Puffer: 100 ml Wasch-Puffer 1% BSA

Enzym Substrat: TMB-Solution

Stopping-Solution: 2 M H₂SO₄

2.1.5 Herkunft der Blutprodukte

Buffy Coats und humanes AB-Serum gesunder Spender wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Eine Einverständniserklärung für die wissenschaftliche Nutzung des Materials wurde vor der Blutspende von den Probanden unterzeichnet. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Rostock (Nr. 48/2007) liegt vor.

2.1.6 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
CD3	APC	MEM-241	Immunotools
CD3	FITC	UCHT-1	Immunotools
CD14	APC	MEM-15	Immunotools
CD19	FITC	LT19	Immunotools
CD83	APC	HB15	Miltenyi Biotec
CD86	PE	M95	Miltenyi Biotec
Isotypkontrolle	FITC	PPV-06	Immunotools
Isotypkontrolle	PE	PPV-06	Immunotools
Isotypkontrolle	APC	PPV-06	Immunotools

Tabelle 2.1: Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung.

Für alle Antikörper wurde der Isotyp Mouse IgG1 genutzt.

2.1.7 Zytokine

Material	Hersteller
Leukine® Sargramostim = rh GM-CSF Biologische Aktivität $5,6 \times 10^6$ IU/mg	Bayer
rh TNF- α Biologische Aktivität 1×10^7 IU/mg	Immunotools
rh IL-4 Biologische Aktivität 21×10^6 IU/mg	Immunotools

Tabelle 2.2: Zytokine für die DC-Generierung.

2.1.8 Zelllinien

Die für die Herstellung von Tumorzelllysat verwendete humane Glioblastomzelllinie U138 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen. Sie stammt von dem Glioblastom eines 47-jährigen kaukasischen Mannes. Die Verdopplungszeit der Tumorzellen beträgt ungefähr 70 h.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultur allgemein

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer keimfreien Sicherheitswerkbank mit ausschließlich sterilen Materialien vorgenommen. Für die Generierung dendritischer Zellen wurde RPMI Medium verwendet, das 10% humanes AB-Serum, 1% L-Glutamin sowie 10 IE/ml Penicillin und 130 µg/ml Streptomycin enthielt. Tumorzellen wurden in DMEM kultiviert, welches mit 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), 2% L-Glutamin, 10 IE/ml Penicillin und 130 µg/ml Streptomycin supplementiert war. Humane Lymphozyten wurden in IMDM mit den gleichen Zusätzen wie die Tumorzellen kultiviert. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Anzahl vitaler Zellen pro ml wurde mittels Trypanblaufärbung und Zählen in der Neubauerkammer bestimmt. Ein Wechsel des Tumorzellmediums wurde bei Farbumschlag des Mediums durchgeführt. Dieser kommt durch den pH-Indikator Phenolrot im DMEM zustande und erfolgt bei einer pH-Ansäuerung (z.B. von pH 7,4–rot auf pH 6,0–gelb) des Mediums durch Stoffwechselfvorgänge. Das Kulturmedium der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) und dendritischen Zellen (DC) wurde nach Protokoll (siehe Kapitel 2.2.1.5) gewechselt.

2.2.1.2 Passagieren adhärenter Zellen

Da sich Zellen bei einer zu hohen Zelldichte gegenseitig in ihrem Wachstum hemmen, müssen adhärenente Zellen, wie z.B. die verwendete Glioblastomzelllinie U138, regelmäßig verdünnt und neu ausgesät werden. Wenn mikroskopisch eine Konfluenz von 80% erreicht war, wurde daher das Medium der Zellen abgesaugt und sie wurden mit PBS gewaschen. Es wurde so viel Trypsin-EDTA (0,02% / 0,05% in PBS) hinzugegeben, bis der Boden der Kulturflasche bedeckt war. Es folgte eine Inkubation für ca. 5 min bei 37 °C, bis sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst hatten. Die Reaktion wurde mittels Zellkulturmedium gestoppt, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. 2×10^6 U138-Zellen wurden dann in eine neue 75 cm² Kulturflasche ausgesät.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Zellen einige Tage bis Wochen lagern zu können, ohne dass es zu einer dramatischen Beeinflussung ihrer Vitalität kam, wurden sie bei -80 °C eingefroren. In einem Kryoröhrchen konnten so 3×10^6 Tumorzellen bzw. 70×10^6 PBMC

aufbewahrt werden. Sie wurden in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und langsam mit Hilfe eines Cryo 1 °C Freezing Containers um 1 °C pro Stunde von 4 °C auf -80 °C gekühlt. Das verwendete Medium enthielt 10% des Gefrierschutzmittels DMSO. Diese hygroskopische Flüssigkeit bindet intrazelluläre Kristalle und verhindert die dadurch die Zerstörung der Zellen³⁷³.

Für die Reaktivierung erfolgte die Erwärmung der Zellen in einem Wasserbad, bis gerade das letzte Eis im Kryoröhrchen geschmolzen war. Die Zellen wurden dann in das entsprechende Zellkulturmedium aufgenommen und anschließend bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun abgenommen, die Zellen in frisches Medium aufgenommen und anschließend gezählt werden.

2.2.1.4 Aufreinigung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Aus dem peripheren Blut gesunder Spender wurde je ein Buffy Coat vom Institut für Transfusionsmedizin der Universität Rostock hergestellt. Der Buffy Coat wurde unter sterilen Bedingungen auf 8 Zentrifugenröhrchen (ca. 8 ml) verteilt, mit PBS auf 35 ml aufgefüllt und über 15 ml Ficoll-Paque geschichtet. PBMC wurden mit Hilfe der Ficoll-Paque Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Ficoll® ist ein synthetisches Polysaccharid mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Ein darüber geschichtetes Zellgemisch trennt sich bei Zentrifugation (hier: 15 min bei 4 °C und 1300 x g ohne Bremse) in Abhängigkeit von seiner Dichte und Größe auf. Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine größere Dichte und sedimentieren daher am Boden des Zentrifugenröhrchens, während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) in der darüber liegenden Grenzschicht befinden. Blutplasma und Thrombozyten verbleiben oberhalb des Mediums und können abgezogen werden.

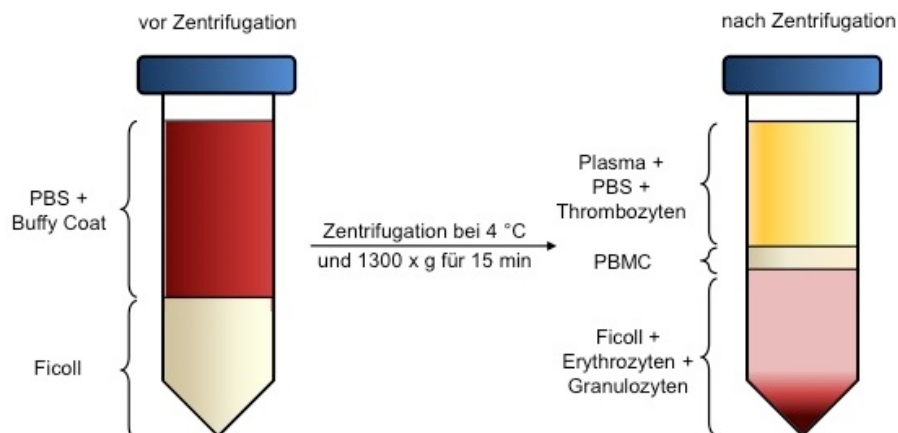


Abb. 2.1: Prinzip der Ficoll-Paque Dichtegradienten-Zentrifugation. Peripheres Blut wird über Ficoll geschichtet und zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren am Boden. PBMC lagern sich in der Interphaseschicht ab, während Plasma und Thrombozyten oberhalb der Grenzschicht verbleiben.

Die sich in der Interphase befindenden PBMC konnten großzügig mit einer Pipette abgenommen werden. Sie wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen (10 min bei 4 °C und 300 x g mit Bremse) um evtl. enthaltene Thrombozyten abzureichern. In einer 1:10-fachen Verdünnung wurde die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt und 70×10^6 unverdünnte PBMC eingefroren. Die Zellausbeute pro Spender variierte sehr stark und lag zwischen 500×10^6 und 900×10^6 Zellen.

2.2.1.5 Generierung dendritischer Zellen

Die zuvor eingefrorenen PBMC wurden in Medium aufgenommen und bei 300 x g 10 min zentrifugiert um das toxische DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frisches Medium überführt und gezählt. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde die Eigenschaft von Monozyten genutzt, sich an Plastikoberflächen anzuhafte. 10×10^6 PBMC wurden in 4 ml RPMI 1640, versehen mit 2% humanem AB-Serum, 1% L-Glutamin, je 10 IE/ml Penicillin sowie 130 µg/ml Streptomycin in eine 6-Well Platte ausgesät. Nach zwei-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die nicht-adhärenen Zellen durch vorsichtiges Schwenken abgelöst und konnten abgesaugt werden. Die verbliebenen adhärenen Zellen, welche vor allem Monozyten darstellten, wurden in 4 ml RPMI 1640 kultiviert, das mit 100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und 10% humanem AB-Serum (im Weiteren als Differenzierungscocktail bezeichnet) supplementiert war. Auf diesen Zeitpunkt wird im Folgenden als Tag 0 (d 0) Bezug genommen. Die Zell-Differenzierung wurde mittels Lichtmikroskopie beobachtet, und an Tag +6 (d +6) konnte die morphologische Veränderung der Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen gesehen werden. Um reife DC zu generieren, erfolgte ein Mediumwechsel. Das neue Medium enthielt ebenfalls 100 ng/ml rh GM-CSF und 1000 IU/ml IL-4 sowie zusätzlich 50 ng/ml TNF-α als Reifungscocktail. An Tag +8 (d +8) wurden an den reifen dendritischen Zellen die im Folgenden beschriebenen Analysen durchgeführt.

Durch ausführliche Untersuchung einer breiten Palette von Oberflächenmarkern (CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, CD205, CD209, HLA-DR, BDCA1 und BDCA4) konnte im Vorfeld in Kooperation mit der Rostocker Arbeitsgruppe Immunologie und Immuntherapie gezeigt werden, dass bei Anwendung der gewählten Zytokinkonzentrationen und Zeitabstände reife DC generiert werden können³⁷⁴⁻³⁷⁷.

2.2.1.6 Behandlung der Zellen mit Temozolomid

Lyophilisiertes Temozolomid wurde nach Herstellerangaben in DMSO in einer Stocklösung von 100 mM angesetzt und mithilfe eines Vortexers sorgfältig gemischt, bis es sich vollständig aufgelöst hatte. Je 50 µl des gelösten TMZ wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Substanz wurde in Konzentrationen von 5, 50, 100, 250 und 500 µM zu den Zellen gegeben. Die Konzentrationen wurden so gewählt, um auch Effekte ober- und unterhalb der durchschnittlichen Plasmakonzentration von 25-70 µM nach einmaliger oraler Applikation von 200 mg Temodal zeigen zu können^{111,378}. Eine unbehandelte Kontrolle wurde immer mitgeführt. Um ein Artefakt durch unspezifische Wirkung des Lösungsmittels DMSO mit steigender TMZ-Konzentration auszuschließen, wurde bei allen Ansätzen mit einer DMSO-Konzentration von 0,5% gearbeitet. Für die Behandlung der PBMC mit dem Chemotherapeutikum wurden drei Gruppen wie folgt gebildet:

Gruppe 1: TMZ-Applikation an d 0 zusammen mit dem Differenzierungscocktail

Gruppe 2: TMZ-Applikation an d +6 zusammen mit dem Reifungscocktail

Gruppe 3: TMZ-Applikation sowohl an d 0 als auch an d +6

In jeder Gruppe wurden die einzelnen Konzentrationen doppelt angelegt und nach Reifung der DC Oberflächenmarkeranalysen mittels Durchflusszytometrie sowie ein Calcein-Vitalitätsassay durchgeführt.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

2.2.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung und Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften einzelner Zellen. Diese treten dabei in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge (hier Argonlaser, $\lambda=488$ nm). Die Intensität des Streulichts, das entsteht während die Zelle durch den Laserstrahl wandert, wird durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle beeinflusst. Daher kann aus der Vorwärtsstreuung (FSC = *forward light scatter*), welche im Wesentlichen von der Querschnittsfläche der Zelle abhängig ist, die Zellgröße errechnet werden. Im rechten Winkel dazu wird die Seitwärtsstreuung (SSC = *sideward scatter*) gemessen, welche Rückschlüsse auf die intrazelluläre Granularität zulässt. Der Gebrauch von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern erlaubt es zudem, die Expression bestimmter

Moleküle auf und in der Zelle nachzuweisen. Dies ist möglich, da die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt werden und daraufhin ihr spezifisches Emissionsspektrum (Fluoreszenz) gemessen wird. Dafür regulieren Filter und Spiegel die Lichtstrahlen so, dass sie auf ein optisches Detektorsystem treffen, wo sie digital umgewandelt werden³⁷⁹.

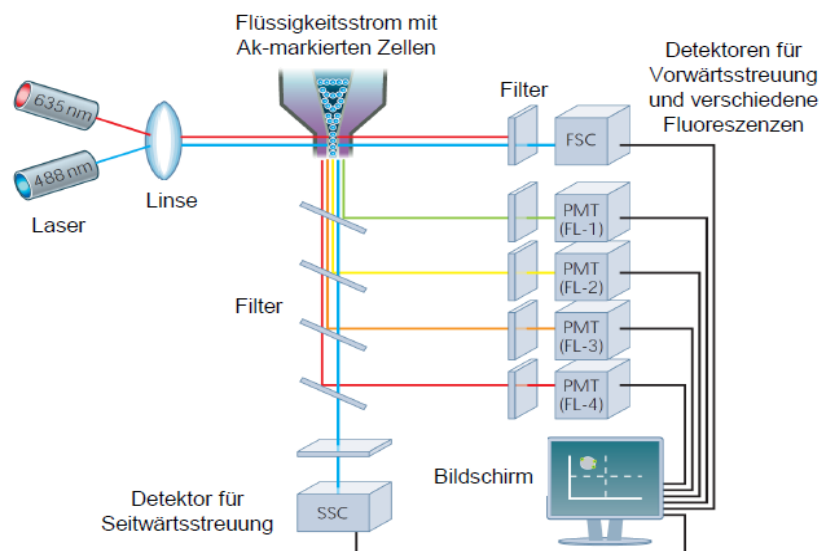


Abb. 2.2: Prinzip der Durchflusszytometrie. Zellen, die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert wurden, werden in einem linearen Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Das entstandene Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und die Lichtemission der spezifischen Antikörper, welche gegen Zellantigene gerichtet sind, können durch Detektoren registriert und an den Computer übertragen werden. Modifiziert nach³⁷⁹.

Die verwendeten Farbstoffe für Oberflächenantigene (FITC, PE, APC) ermöglichen bei einem ähnlichen Absorptionsspektrum durch unterschiedliche Emissionsspektren die gleichzeitige Messung von drei verschiedenen Fluoreszenzintensitäten. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Ak und damit zur Expressionsdichte des Oberflächenmoleküls. Zusätzlich wurden Messungen mit den Farbstoffen Calcein und PI mittels Durchflusszytomter durchgeführt³⁸⁰.

Farbstoffe	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Abkürzung
Allophycocyanin	650	661	APC
Calcein	495	515	-
Fluorescein- isothiozyanat	490	525	FITC
Phycoerythrin	490,565	578	PR
Propidiumiodid	550	650	PI

Tabelle 2.3: Farbstoffe für die durchflusszytometrischen Messungen³⁷⁹.

2.2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen mit direkt markiertem Antikörper

Zur Charakterisierung der Oberflächenmarker wurden an Tag +8 zunächst 2 ml Medium aus jedem Well entnommen. Dann konnten die reifen DC vorsichtig mithilfe eines Zellschabers und durch Schwenken vom Boden der Zellkulturplatte gelöst werden. Exakt 1 ml des Zellgemisches wurden aus jedem Well in ein FACS-Röhrchen überführt. Um keine DC in der Kulturplatte zurückzulassen, wurde mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension der Pellets erfolgte mit 1 ml PBS. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min bei 4 °C und 300 x g) und der Überstand abgezogen. Für die Antikörper-Reaktion wurden zu jedem Ansatz ad 100 µl kaltes PBS (4 °C) und 4 µl des jeweiligen direkt markierten Antikörpers gegeben und dieses Gemisch für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen Oberflächenstrukturen dendritischer Zellen verwendet, welche mit drei verschiedenen Farbstoffen markiert waren: Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycozyanid (APC). Anschließend wurden die Ansätze zwei Mal mit PBS gewaschen (10 min bei 4 °C und 300 x g). Das entstandene Zellpellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen.

Zur objektiven Quantifizierung der Zellzahlen wurden direkt vor der Messung 50 µl einer Suspension kleiner Latexkugeln (Fluoresbrite® Mikrospheres) in die FACS-Röhrchen hinzugegeben. Die 2 µm großen Fluoreszein-markierten Latexpartikel befanden sich in einer Suspension mit einer Konzentration von $5,68 \times 10^9$ pro ml Wasser. Dies ermöglichte die Quantifizierung der absoluten Anzahl dendritischer Zellen, welche zuvor mit TMZ behandelt wurden, in einem definierten Volumen. Durch Darstellung der Intensität der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung jeder einzelnen zu messenden Zelle im Standardpunktdiagramm (*Dot Plot*) wurden die Populationen ähnlicher Morphologie innerhalb des Gemisches abgebildet. Zur gezielten Analyse von fluoreszenzmarkierten Strukturen einer bestimmten Population, z.B. dendritischen Zellen, konnte die Messung auf einen definierten Bereich (*gate*) beschränkt werden. Für die Analysen wurde ein Grenzwert von 5000 zu messenden Latexkugeln festgelegt.

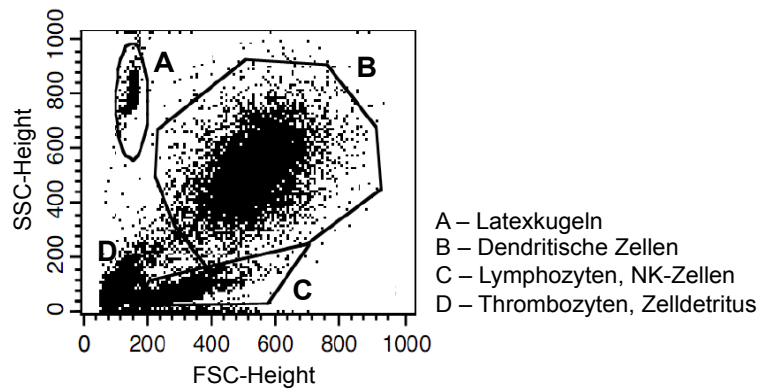
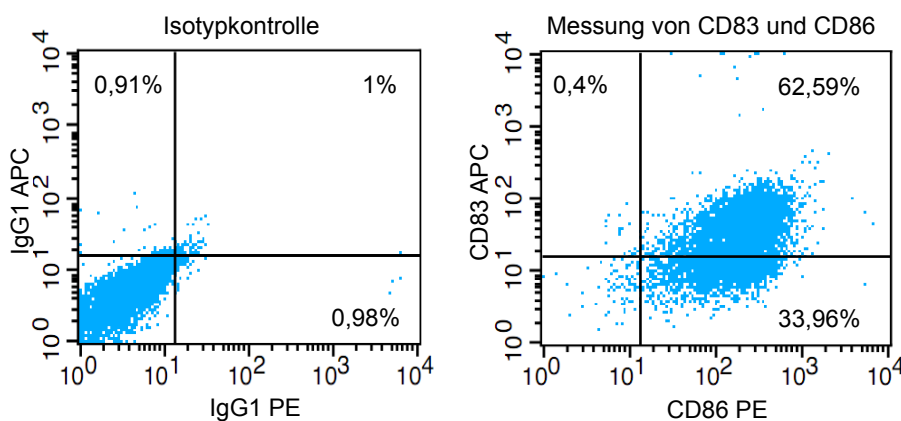


Abb. 2.3: Standardpunktdiagramm einer durchflusszytometrischen Analyse. Nach Plastikadhärenz und 8-tägiger Kultur können verschiedene Zellpopulationen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht dargestellt werden. Durch Festlegung von Gates lassen sich einzelne Fraktionen gezielt auf Ak-markierte Oberflächenantigene untersuchen. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurde eine definierte Menge kleiner Latexkugeln hinzugegeben.

2.2.2.3 Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Eine Kontrolle mit unspezifischem Antikörper des selben Isotyps ist bei jeder durchflusszytometrischen Messung mitzuführen. Der Grund dafür ist, dass es bei der Färbung mit markierten Antikörpern einerseits zu unspezifischen Bindungen, z.B. an FC-Rezeptoren oder ähnliche Epitope, kommen kann und andererseits die Zellen eine Autofluoreszenz aufweisen. Die mitgeführte Isotypkontrolle (hier IgG1) war jeweils mit dem entsprechenden Farbstoff markiert. Bei der Festlegung der Grenze, ab wann eine Ak-Bindung spezifisch war, wurde sich an der Darstellung im Dot Plot orientiert. Nach Festlegen einer Koordinatenachse sollten sich in jedem Positiv-Quadranten $\leq 1\%$ der gemessenen Kontrollzellen befinden. Der Prozentsatz der positiven Zellen dieser Isotypkontrolle wurde bei den folgenden Oberflächenmarkeranalysen von den als positiv gewerteten Zellen abgezogen.



Berechnung der CD83⁺/CD86⁺ Zellen: 33,96% - 0,98% = 32,98%
 Berechnung der CD83⁺/CD86⁻ Zellen: 0,4% - 0,91% = keine positiven Zellen
 Berechnung der CD83⁻/CD86⁺ Zellen: 62,59% - 1% = 61,59%

Abb. 2.4: Isotypkontrolle am Beispiel der Oberflächenmarker CD83 und CD86. Um unspezifische Bindungen darzustellen, wurden die Zellen mit einem Antikörper inkubiert, der die gleiche Subklasse und Farbe wie der Detektionsantikörper für die Messung besaß (links). Bei der Auswertung der Analysen der Oberflächenantigene CD83 und CD86 (rechts) musste diese unspezifische Bindung von den positiven Zellen subtrahiert werden (siehe Rechnung).

Die so erhaltenen Ergebnisse der mit TMZ behandelten Gruppen 1, 2 und 3 wurden jeweils auf die Anzahl unbehandelter dendritischer Zellen bzw. Lymphozyten als Referenzgruppe bezogen.

2.2.3 Vitalitätsbestimmung dendritischer Zellen

Zusätzlich zur Analyse von Oberflächenmolekülen wurde die Vitalität der kultivierten humanen PBMC bestimmt. Dazu wurden die Farbstoffe Calcein-AM und PI verwendet. Calcein-AM (AM = Acetoxymethylester) ist ein Farbstoff, der ungehindert in das Zytosol lebender Zellen eindringen kann. Diese können dann durch intrazelluläre Esterasen die Acetoxymethylgruppe von Calcein abspalten. Dadurch entsteht die fluoreszierende Form Calcein ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$). Calcein-AM besitzt praktisch keine Fluoreszenz, jedoch fluoreszieren die lebenden Zellen durch Abspaltung der Acetoxymethylgruppe stark grün, da Calcein intrazelluläre Calcium-Ionen komplexiert und die Zelle nicht mehr verlassen kann³⁸¹.

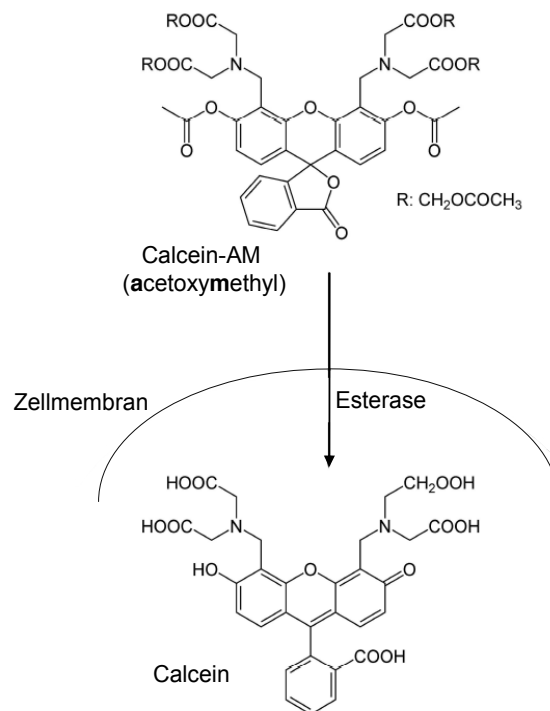


Abb. 2.5: Calcein-Färbung zur Vitalitätsbestimmung. Der nicht fluoreszierende Farbstoff Calcein-AM kann ungehindert in eine Zelle eindringen. Dort wird die Acetoxymethylgruppe durch Esterasen abgespalten und es entsteht Calcein, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann. Die Intensität des von Calcein emittierten Lichts kann im Durchflusszytometer oder mit einem Multiplatten Fluoreszenzreader gemessen werden. Modifiziert nach³⁸².

Für die Calcein-Analysen wurden die Zellkulturplatten zunächst zentrifugiert (5 min bei 300 x g) um beim nachfolgenden Abziehen von 3 ml Medium aus jedem Well möglichst wenige der behandelten DC zu entfernen. Im Anschluss wurde 1 ml PBS mit darin gelöstem Calcein (Endkonzentration 1 μ M) hinzugegeben und durch

leichtes Schwenken mit der Zellsuspension gleichmäßig vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Messung am Mikroplatten Reader Tecan Infinite® 200. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die 30 min vor Calcein-Zugabe mit 70%-igem Ethanol inkubiert und damit abgetötet wurden.

Parameter	Einstellung
Plate	Greiner 6 Flat Bottom Transparent Polysterol
Mode	Fluorescence Bottom Reading
Multiple Reads per Well (Square (filled))	3 x 3
Multiple Reads per Well (Border)	500 µm
Excitation Wavelength	485 nm
Emission Wavelength	535 nm
Excitation Bandwidth	9 nm
Emission Bandwidth	20 nm
Gain	169 Optimal
Number of Flashes	2
Integration Time	20 µs
Lag Time	10 µs

Tabelle 2.4: Parameter des Mikroplatten Reader Tecan Infinite® 200 zur Calcein-Messung.

Als Vergleichsmethode wurden die mittels Multiplatten Reader gemessenen Zellen nach vorsichtigem Ablösen mit einem Zellschaber direkt im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei erfolgte die Zugabe von 50 µl PI und 50 µl der sich in Lösung befindenden Latexkügelchen direkt vor der Messung.

PI kann im Gegensatz zu Calcein nur bei einer perforierten Zellmembran eindringen und verbleibt dort an DNA gebunden. Dies ist der Fall bei toten oder sterbenden Zellen. Durch die Kombination der beiden Methoden war eine zuverlässigere Vitalitätsbestimmung möglich.

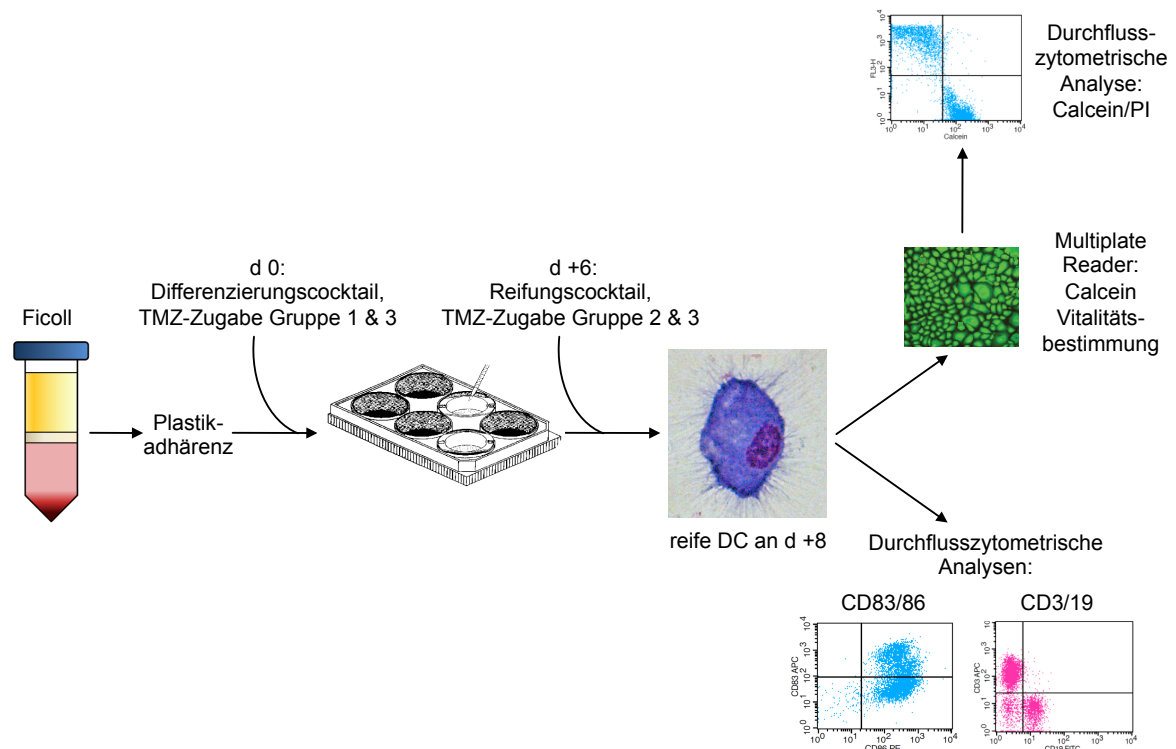


Abb. 2.6.: Ablauf von der Isolierung von PBMC bis zu den Versuchen. PBMC aus dem peripheren Blut gesunder Spender wurden mittels Ficoll isoliert (d 0). Nach einer zwei-stündigen Plastikadhärenz zur Gewinnung von Monozyten wurde ein Differenzierungscocktail mit 100 ng/ml rh GM-CSF und 1000 IU/ml IL-4 hinzugegeben. Die Gruppen 1 & 3 erhielten TMZ in den Konzentrationen 5, 50, 100, 250 und 500 μ M, bzw. die Kontrollgruppe lediglich DMSO 5%. An d +6 wurden der Reifungscocktail mit 100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und 50 ng/ml TNF- α sowie TMZ in den Gruppen 2 & 3 zugefügt. Die reifen DC konnten an d +8 gemessen werden. Durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenmoleküle CD3, 19, 83 und 86 sowie ein Calcein-Vitalitätsassay wurden durchgeführt. Die mit Calcein gefärbten Zellen wurden nach Zugabe von PI zusätzlich mittels Durchflusszytometer untersucht. Abbildung enthält Anteile aus^{383,384}.

2.2.4 Mikroskopische Analyse

2.2.4.1 Beschichtung von Deckgläschen

Sterile Deckgläschen wurden mithilfe eines Pumpzerstäubers mit Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) besprüht, bis die Oberfläche benetzt war und bei Raumtemperatur (RT) über Nacht in einer Zellschale getrocknet. Die Deckgläschen wurden am nächsten Morgen mit einer sterilen Pinzette vom Boden der Schale gelöst und in eine neue transferiert, in der sie, nach Verschluss mit Parafilm, für 2h unter UV-Licht bestrahlt wurden. Im Anschluss erfolgte die Lagerung bei 4 °C. Die Generierung der dendritischen Zellen konnte wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben, durchgeführt werden.

2.2.4.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung ist eine Kombination von Farbstoffen auf der Basis von Methyleneblau und Eosin. Die May-Grünwald-Lösung besteht aus mit Eosin angesäuertem Methyleneblau und Methanol, welches die Zellen fixiert.

Methylenblau ist eine basische Thiazinfarbe mit positiver Ladung und färbt negativ geladene Bestandteile der Zellen z.B. Säuren wie DNA, RNA und Proteine in einem Blauton. Eosin ist ein saurer anionischer Farbstoff und färbt die basischen positiv geladenen Bestandteile der Zellen wie z.B. zytoplasmatische Proteine. Dies verleiht ihnen eine rosa bis rote Farbe. Die Giemsa-Lösung enthält als wichtige Bestandteile Methylenblau, Eosin und Azur B. May-Grünwald färbt hauptsächlich die basischen Bestandteile, Giemsa hauptsächlich die sauren Bestandteile des Zytoplasmas³⁸⁵.

Für die Färbung der auf Deckgläschen generierten dendritischen Zellen wurden sie für 3 min vollständig in die May-Grünwald-Lösung eingetaucht und danach für weitere 3 min in 1:10 mit Aqua dest. verdünnte Giemsa-Lösung. Im Anschluss daran wurden sie mit PBS so lange gewaschen, bis die abtropfende Flüssigkeit klar war. Nach der Färbung wurden sie über Nacht getrocknet.

2.2.4.3 Mikroskopieren

Die dendritischen Zellen wurden nach der Färbung unter dem Lichtmikroskop DMI 400B von Leica analysiert und ein repräsentativer Ausschnitt aus dem Präparat in 63-facher Vergrößerung mit Öl fotografiert. Die Einstellungen für die Kamera erfolgten mithilfe der Software: Leica Application Version 3.6.0.

Außerdem wurden Fotos von lebenden DC in Kultur gemacht. Dafür wurden die Zellkulturplatten ohne Zusätze fotografiert.

2.2.5 Mykoplasmen-PCR

Eine Kontrolle auf Mykoplasmen in der Zellkultur der U138-Tumorzellen, welche als Tumorzelllysat zur Stimulation genutzt wurden, erfolgte in regelmäßigen Abständen. Mykoplasmen sind 0,3-0,8 µm große, obligat intrazellulär wachsende gramnegative Bakterien und in der Lage, Wachstum und Stoffwechsel ihrer Wirtszellen zu beeinflussen. Um Verunreinigungen mit diesen ubiquitär vorkommenden Keimen auszuschließen, erfolgte die Kontrolle in Form einer spezifischen PCR. Dafür wurden 10^6 U138-Zellen zentrifugiert (10 min bei 300 x g), nach Abziehen des Überstandes in 200 µl PBS aufgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Diese Zellsuspension wurde 1:100 mit PBS verdünnt. Nun wurden 2,5 µl der Verdünnung mit 22,5 µl Mastermix vermischt und die Polymerasekettenreaktion gestartet (siehe Tabelle 2.6).

Nach Abschluss der PCR wurde die Probe kurzzeitig bei 4 °C gelagert, bevor sie in einem 1%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid und TAE Laufpuffer bei

80-200 V gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die Zellen galten als frei von Mykoplasmen, wenn im Gel keine Bande von ca. 500 bp erkennbar waren.

Primer A (forward)	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
Primer B (reverse)	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

Tabelle 2.5: Primer für den Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR.

Reagenz	µl/Ansatz
PCR-Puffer (10fach)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Primer A (10 µM)	1,25 µl
Primer B (10 µM)	1,25 µl
Taq	0,13 µl
dd H ₂ O	16,2 µl

Tabelle 2.6: Standardansatz für den Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR.

Reaktion	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	40
Primeranlagerung (Annealing)	60 °C	1 min	
Strangsynthese (Extension)	72 °C	90 sec	
Abschluss der Synthese	72 °C	5 min	1

Tabelle 2.7: Standardreaktionsbedingungen für die Mykoplasmen-PCR.

Als Positivkontrolle dienten zuvor positiv getestete Zellen. Die Negativkontrolle enthielt den Mastermix und Wasser.

2.2.6 Herstellung von Tumorzelllysat

Das U138-Tumorzelllysat wurde aus konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflaschen hergestellt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden 2 ml PBS zu den Zellen gegeben, um sie mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abkratzen zu können. Nach wiederholter Spülung der Kulturflasche mit PBS folgten drei Gefrierzyklen bei -80 °C, um die Tumorzellen abzutöten und aufzuschließen. Das entstandene Lysat wurde zentrifugiert (10 min bei 300 x g), der Überstand abgezogen und durch einen sterilen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.7 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des U138-Zelllysats (siehe Kapitel 2.2.6) erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kits von Novagen, das nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion funktioniert. In alkalischer Lösung bilden sich Protein-

Cu^{2+} -Komplexe, wobei die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ reduziert werden und mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden³⁷³. Als Standard wurden Bovines Serum Albumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe von 15,62 µg/ml bis 1000 µg/ml in nicht-denaturierendem Lysepuffer sowie eine Negativkontrolle ohne BSA angesetzt. Pro Ansatz wurden 200 µl BCA-Lösung und 4 µl 4% Kupfersulfat-Lösung als BCA-Arbeitsreagenz vorbereitet. Die zu messenden Proben wurden unverdünnt, sowie 1:5 und 1:10 in Puffer verdünnt, hinzugegeben. Jeweils 25 µl, sowohl des Eichstandards als auch der Proben, wurden in Doppelansätzen in eine 96-Well Platte gegeben und mit je 200 µl des BCA-Arbeitsreagenz versetzt. Nach sorgfältigem Mischen und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption des Farbkomplexes bei 562 nm gemessen. Durch Erstellen einer Eichgeraden des BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben berechnet werden.

2.2.8 Magnetische Zellsortierung

Zur Anreicherung von CD14^+ Zellen wurde das magnetische Zelltrennsystem MACS® verwendet. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (10 min bei 300 x g) und Abziehen des Überstandes direkt mit superparamagnetischen Mikropartikeln markiert. Dafür wurden 10^7 Zellen in 80 µl MACS®-Puffer aufgenommen und 20 µl der MACS®-Suspension von CD14 magnetisch markierten Ak hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C mit MACS®-Puffer gewaschen (10 min bei 300 x g) und bis zu 10^8 Zellen erneut in 500 µl des Puffers aufgenommen. Nach Einspannen der MACS®-Trennsäule in ein Hochgradienten-Magnetfeld und einmaligem Spülen mit 500 µl Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben, welche unter anderem Stahlwolle enthielt. Alle nicht markierten Zellen passierten die Säule ungehindert. Diese Zellfraktion war CD14 depletiert und konnte im Anschluss in IMDM aufgenommen werden. Die markierten Zellen wurden zunächst in der Säule zurückgehalten. Anschließend wurde die Säule außerhalb des Magnetfeldes drei Mal mit Puffer gewaschen und die verbleibenden Zellen mithilfe eines Stempels von der Säule eluiert. Die CD14^+ Zellen wurden nach Zentrifugation (10 min bei 300 x g) und Verwerfen des Puffers in RPMI 1640 resuspendiert.

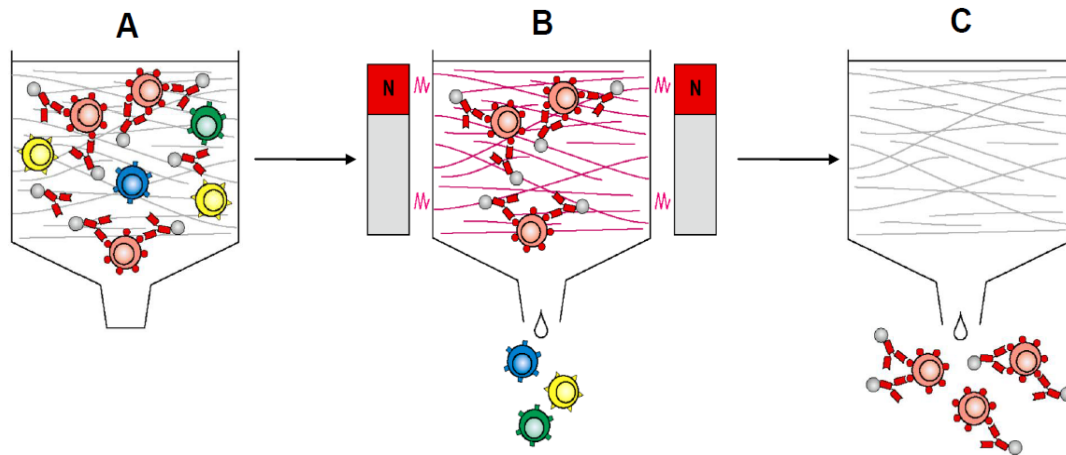


Abb. 2.7: Prinzip der magnetischen Zellsortierung. (A) Eine heterogene Lymphozytenpopulation wird zur Auftrennung mit paramagnetischen Partikeln, welche an einen CD14-Ak gebunden sind, vermischt und auf Stahlwolle in eine MACS® Säule gegeben (B) Bei Anlegen eines Magnetfeldes verbleiben die Ak-gebundenen Zellen in der Säule, während die nicht markierten Zellen ausgewaschen werden. (C) Die gebundenen Zellen werden nach Entfernen des Magnetfeldes freigesetzt. Modifiziert nach^{180h}.

2.2.9 Gemischte Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten

Um einen Einblick in die Funktionalität der mit TMZ behandelten dendritischen Zellen zu gewinnen, wurde eine gemischte Zellkultur von autologen dendritischen Zellen und Lymphozyten angelegt. Nach einer magnetischen Zellsortierung (siehe Kapitel 2.2.7) wurde die CD14⁺ Zellfraktion in RPMI 1640 aufgenommen und 5×10^4 Zellen pro Kavität in eine 96-Well Platte gegeben. Der Differenzierungscocktail (siehe Kapitel 2.2.1.5) wurde zugefügt, sodass die Zytokinkonzentration 100 ng/ml rh GM-CSF und 1000 IU/ml IL-4 entsprach. Zusätzlich wurde TMZ in den Konzentrationen 5, 50, 100, 250, 500 μM an diesem Tag (d 0) hinzugegeben. Für je einen Spender wurde jede Konzentration 3-fach angesetzt. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen, welche kein TMZ erhalten hatten sowie DC, die weder mit TMZ noch mit Tumorlysat inkubiert wurden. Die DMSO-Konzentration war bei allen Ansätzen 0,5%. Die Zellen wurden 8 Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. An Tag +6 erfolgte die Zugabe des Reifungscocktails (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4, 50 ng/ml TNF- α). Um einen Zellverlust beim Abziehen des Mediums vor dem Wechsel zu verhindern wurde die Zellkulturplatte 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Zusätzlich zu dem Reifungscocktail erfolgte die Zugabe von Tumorlysat (75 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen) der U138 Glioblastomzelllinie (siehe Kapitel 2.2.6).

Die bei der magnetischen Zellsortierung aufgefangene CD14⁻ Zellfraktion wurde in IMDM aufgenommen und 40×10^6 Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche für einen Tag kultiviert um sie ruhen zu lassen. Danach wurden sie eingefroren.

An d +8 war die zuvor CD14⁺ selektionierte Zellfraktion zu reifen DC ausdifferenziert. Daher wurden an diesem Tag 4×10^5 Zellen der CD14⁻ Zellfraktion in 100 µl MDM hinzugegeben. Aufgrund der Zellzählung mit Trypanblaufärbung konnte davon ausgegangen werden, dass von den initial ausgesäten CD14⁺ Zellen nach 8 Tagen im Mittel eine Reduktion um 20% stattfand.

Die Zellen wurden nun für drei Tage gemeinsam kultiviert. Die reifen DC sollen während dieser Zeit T-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Diese können daher als Beurteilungskriterium für die MLC genutzt werden.

2.2.10 MTT-Assay

Der MTT Proliferationstest ist ein quantitativer colorimetrischer Test, der lebende Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Das den Zellen angebotene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion zu Formazanen umgebaut. Die Farbintensität und mitochondriale Aktivität als Maß für die Vitalität sind einander direkt proportional. Andere Stoffwechselforgänge könnten beim MTT-Assay ebenfalls eine Rolle spielen^{386,387}.

Die in der 96-Well Platte befindlichen Zellen wurden zunächst zentrifugiert (10 min bei 300 x g) und 200 µl Medium für einen IFN-γ-ELISA vorsichtig abgezogen, sodass 100 µl in einem Well verblieben. Dazu wurden 20 µl einer MTT Arbeitslösung gegeben. Die Stocklösung bestand aus 500 µl PMS-Lösung, welche 1:50 in sterilem PBS gelöst war, und 10 ml MTS-Lösung. Die Zellkulturplatte wurde im Brutschrank unter den bereits erläuterten Bedingungen inkubiert und optional nach 1h, 2h, 3h und 4h bei einer Extinktion von 495 nm mit einem Referenzfilter von 620 nm im Photometer gemessen. Vor jeder Messung musste gut geschüttelt werden, um eine optimale Verteilung des Farbstoffes zu gewährleisten.

2.2.11 Interferon-γ-ELISA

Als Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird ein immunologisches Nachweisverfahren bezeichnet, welches mittels enzymatischer Farbreaktion dem Nachweis eines Antigens dient. In dieser Arbeit wurde das Zytokin IFN-γ in

Zellüberständen mit einem double-Antibody Sandwich ELISA der Firma Immunotools gemessen. Es wurden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Antigen (IFN- γ) binden.

Zunächst wurde der Beschichtungs-Ak 1:100 mit Beschichtungspuffer (Coating-Puffer) verdünnt und 100 μ l davon in jede Kavität einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte eine ein-stündige Inkubation bei RT. Während aller Inkubationsschritte waren die Lösungen in der Platte mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt. Anschließend wurden ungebundene Ak durch Abklopfen und dreimaliges Waschen mit je 200 μ l Waschpuffer je Kavität entfernt. Zur Blockierung unbesetzter Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden je 200 μ l Block-Puffer pro Well zugegeben und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Währenddessen konnten die Standardreihen und Proben vorbereitet werden.

Für die Standardreihe wurden Konzentrationen von 39 pg/ml bis 2500 pg/ml IFN- γ angesetzt. Als Leerwert diente eine Lösung von IMDM 1:3 mit Probenpuffer. Die zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls 1:3 mit Proben-Puffer verdünnt. Nach Entfernen des Block-Puffers und drei Waschschritten wurden die Proben und Standards (100 μ l/Well) im Doppelansatz aufgetragen. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut drei Mal mit 200 μ l Waschpuffer je Well gewaschen, um ungebundene Komponenten zu entfernen. Es folgte nun die Zugabe von 100 μ l der 1:400 in Proben-Puffer verdünnten biotinylierten IFN- γ Detektions-Antikörper. Die Platte wurde wieder für 1 h bei RT inkubiert und 5 Mal gewaschen. Nun wurden 100 μ l von 1:10 000 verdünnter Streptavidin-HRP (*Horseradish Peroxidase*) je Well hinzugegeben und für eine weitere halbe Stunde bei RT inkubiert. Das Streptavidin konnte während dieser Zeit an das Biotin des Detektions-Ak binden. Es folgten 5 weitere Waschschrritte und die Enzym-Substrat-Reaktion schloss sich an. Nach Zugabe von 100 μ l Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB) pro Well wurde die Reaktion bei entsprechender Farbintensität nach 0,5-5 min durch Zugabe von 100 μ l 2 M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm im ELISA-Photometer.

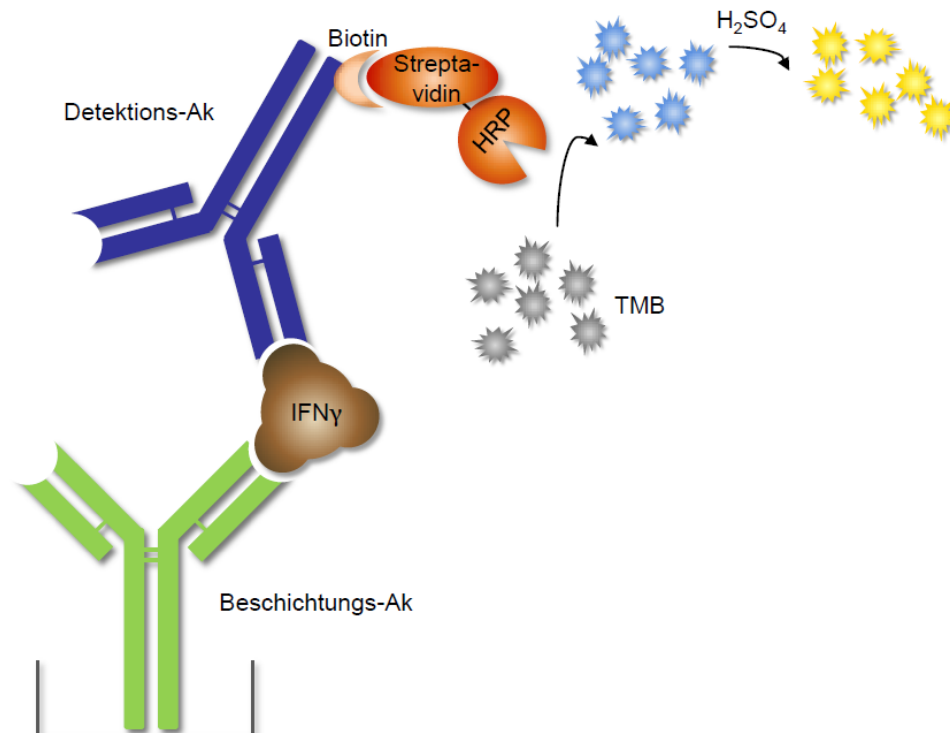


Abb. 2.8: Prinzip des double-Antibody Sandwich ELISA. Eine 96-well Mikrotiterplatte wird mit einem gegen IFN- γ gerichteten Ak beschichtet. Nach Inkubation mit dem zu untersuchenden Medium wird ein biotinylierter Detektions-Ak dazugegeben. An diesen bindet Streptavidin-HRP, welches einen Farbumschlag des hinzugefügten TMB von farblos zu blau katalysiert. Die Reaktion wird mit H $_2$ SO $_4$ gestoppt, sodass eine gelbe Flüssigkeit photometrisch gemessen wird.

2.2.12 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zuvor wurde ein Kruskal-Wallis-Test gemacht, um zu zeigen, dass die Anwendung des U-Tests möglich ist. Alle Werte mit $p \leq 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5\%$) unterscheiden sich signifikant von den unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Gruppe und sind in den Diagrammen mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Alle Werte mit $p \leq 0,01$ ($\alpha \leq 1\%$) sind mit zwei Sternchen (**) versehen. Der Standardfehler σ wird bezogen auf den Mittelwert +/- angegeben.

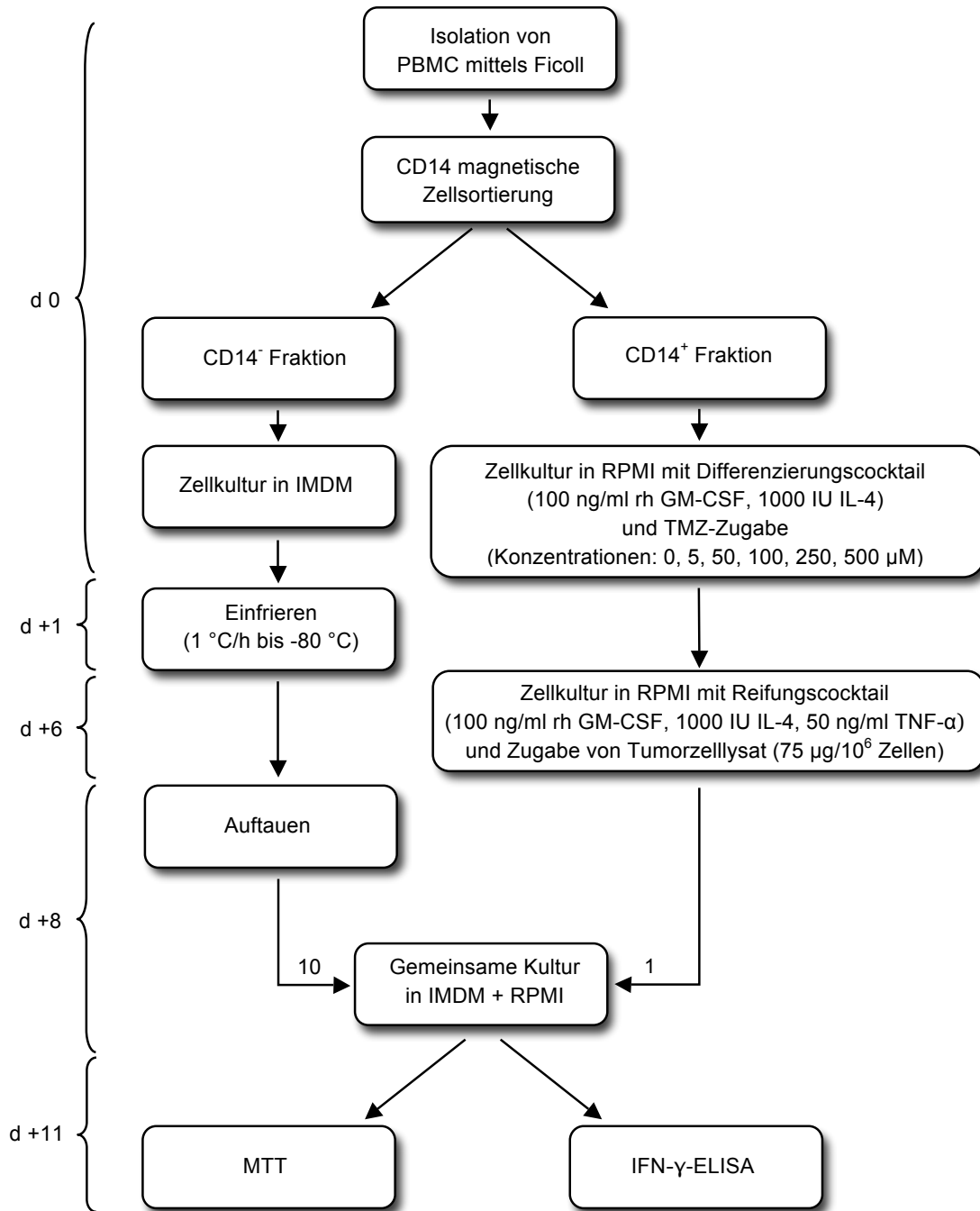


Abb. 2.9: Ablauf der Arbeitsschritte für eine gemischte Zellkultur von DC und Lymphozyten und deren Analysen. An Tag 0 wurden PBMC mittels Ficoll aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert und durch eine magnetische Zellsortierung in eine CD14⁺ und eine CD14⁻ Fraktion getrennt. Aus der CD14⁺ Fraktion wurden dendritische Zellen generiert (rechte Seite). Die CD14⁻ Fraktion wurde nach einem Tag Kultur eingefroren (linke Seite). Ab d +8 wurden beide Fraktionen in einem Verhältnis von 1:10 gemeinsam in Kultur genommen, um an d +11 funktionelle Analysen in Form von MTT-Assays und IFN-γ-ELISAs durchzuführen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Monozytenreinheit nach Adhärenz

Eine Leukozytenseparation wurde mit Buffy Coats gesunder Spender mittels Ficoll durchgeführt. Die hierbei isolierten PBMC konnten anschließend durchflusszytometrisch auf den Monozytenmarker CD14 untersucht werden. Bei den Analysen wurde sich auf eine Region (Gate) beschränkt, die anhand der Vorwärts-Seitwärts-Streuung morphologisch nur vitale Zellen (Gate A) enthielt. In dem exemplarisch dargestellten Standardpunktdiagramm (*Dot Plot*) ist zu erkennen, dass sich in der Suspension neben den verschiedenen Zellpopulationen noch viel Detritus und Thrombozyten befanden (Abb. 3.1). In dem betrachteten Gate A exprimierten 15,7% \pm 0,93% der Zellen CD14 und über die Hälfte (55,0% \pm 2,3%) CD3 (nicht dargestellt). Innerhalb des Gate A wurden mit dem Gate B die großen Zellen herausgegriffen.

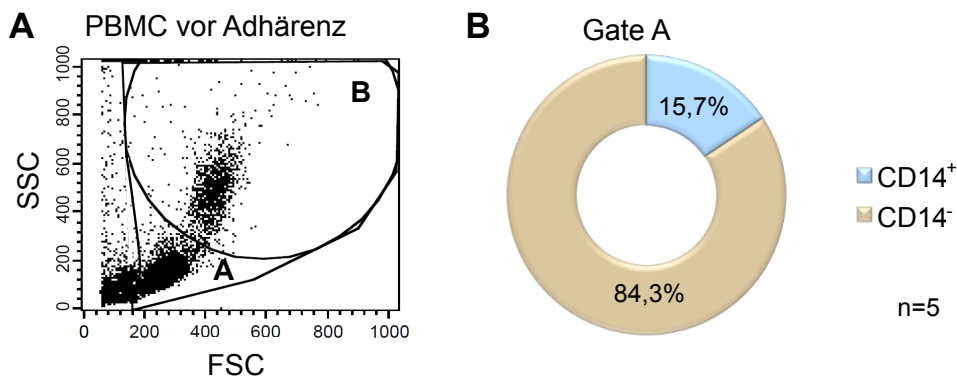


Abb. 3.1: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC vor Adhärenz. A) Exemplarisch ist ein Dot Plot der PBMC eines Spenders vor zwei-stündiger Plastikadhärenz dargestellt. Gate A wurde so gewählt, dass Zelldetritus und tote Zellen ausgeschlossen sind. Im Gate B befinden sich ihrer Größe und Granularität nach vor allem Monozyten. B) Der Anteil CD14⁺ Zellen im Gate A ist im Ringdiagramm dargestellt.

Nach einer zwei-stündigen Plastikadhärenz und vorsichtigem Abziehen der nicht-adhären Zellen, konnte der Anteil CD14⁺ Zellen im Gate A auf 55,7% \pm 1,8% erhöht und der nicht zelluläre Anteil deutlich reduziert werden (Abb. 3.2). Das Adhärenzverhalten der Zellen war je nach Spender sehr variabel. Wurde nur das Monozytengate B analysiert, so waren 94,2% \pm 0,54% der Zellen CD14⁺. Mit diesem Hintergrundwissen konnte nun die Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen begonnen werden.

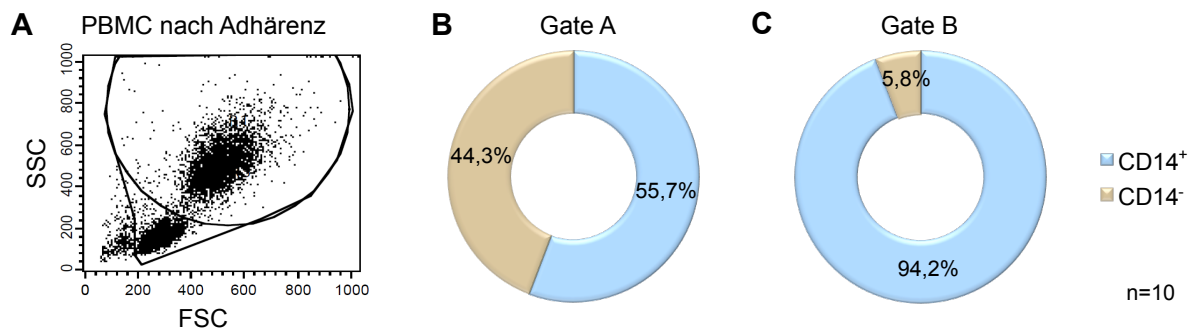


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC nach Adhärenz. A) Der Dot Plot des selben Spenders wie in Abb. 3.1 ist nach zwei-stündiger Plastikadhärenz gezeigt. B) Es wurde der Anteil CD14⁺ Zellen an allen Zellen (Gate A) berechnet. C) Der Anteil CD14⁺ Zellen innerhalb des Monozytengates (Gate B) wurde ebenfalls bestimmt.

3.2 Wirkung von TMZ auf dendritische Zellen – Durchflusszytometrische Analysen von CD83 und CD86

Die Zellen eines Buffy Coats wurden nach Isolation mittels Ficoll und zwei-stündiger Plastikadhärenz in verschiedenen Konzentrationen mit Temozolomid (0, 5, 50, 100, 250 und 500 μM) behandelt. Sie erhielten das Chemotherapeutikum entweder an d 0 (Gruppe 1), an d +6 (Gruppe 2) oder zu beiden Zeitpunkten (Gruppe 3). Eine Konzentration von 0,5% des Lösungsmittels DMSO war bei allen Ansätzen inklusive der Kontrollen gewährleistet, um toxische Effekte der Substanz auszuschließen. An d 0 wurden zusätzlich der Differenzierungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4) und an d +6 der Reifungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und 50 ng/ml TNF- α) zu den Zellen gegeben.

Um den Einfluss von Temozolomid auf reife dendritische Zellen in vitro zu ermitteln, wurde die Ausprägung der typischen dendritischen Oberflächenmarker CD83 (Aktivierungsmarker) und CD86 (kostimulatorisches Molekül) an d +8 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurde für diese Analysen eine Gate betrachtet, in das sich die Zellen aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung als dendritische Zellen oder Monozyten (DC-Gate) einordnen ließen.

3.2.1 Gruppe 1: TMZ d 0

Gruppe 1 beinhaltet Zellen, welche Temozolomid ausschließlich am Tag ihrer Aussaat (d 0) nach der Plastikadhärenz zusammen mit dem Differenzierungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4) erhielten.

Innerhalb des DC-Gates waren bei der unbehandelten Kontrolle 35-70% der Zellen sowohl für den Oberflächenmarker CD83 als auch für CD86 positiv. Die interindividuelle Varianz ist jeweils als Standardfehler dargestellt. In Abhängigkeit von der angewandten TMZ-Konzentration sank der relative Anteil von CD83⁺/86⁺ Zellen innerhalb des DC-Gates von 46% +/- 5% bei den unbehandelten Zellen auf 33% +/- 7,9% bei 500 µM TMZ. Bei 5 µM TMZ konnte ein Anstieg auf 53% +/- 6,5% aller Zellen im DC-Gate beobachtet werden.

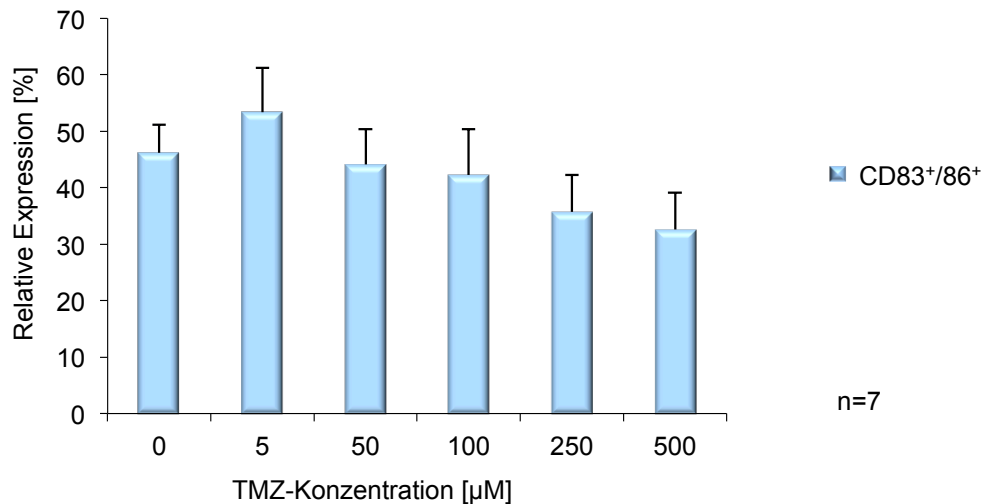


Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von CD83 und CD86 an d+8 nach TMZ-Applikation an d 0. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD83 und CD86 auf Zellen innerhalb des DC-Gates sank mit steigender TMZ-Konzentration.

Betrachtete man die Kulturplatte unter dem Lichtmikroskop, so befanden sich jedoch noch deutlich weniger Zellen in einem Well, besonders bei hohen Konzentrationen von 250 µM und 500 µM. Zur absoluten Quantifizierung wurden daher zu einem definierten Volumen der Zellsuspension kleine Latexkugeln (Beads) hinzugegeben. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse erfolgte durch Messung von 5000 dieser Kugeln.

Die Anzahl CD83⁺/86⁺ dendritischer Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe wurde gleich 1 gesetzt. Damit wurde die relative Anzahl der für diese Oberflächenmarker positiven Zellen berechnet, welche mit 5, 50, 100, 250, bzw. 500 µM TMZ behandelt wurden (Abb. 3.3). Neben den doppelt positiven Zellen war ein Teil der Population im DC-Gate ausschließlich CD86⁺. Das waren bei der unbehandelten Kontrolle 44% +/- 7%, bei 500 µM 52% +/- 5% der betrachteten Zellen. Hierbei handelt es sich um unreife DC oder Monozyten. Der Anteil CD83⁺/CD86⁻ Zellen war vernachlässigbar klein (2,36 % +/- 1,3 der Zellen). Wie im exemplarischen Dot Plot eines Spenders erkennbar ist, verringert sich bei steigender TMZ-Konzentration die Zahl der gezählten Events im DC-Gate bei

konstant gemessener Latexkugelzahl (Abb. 3.4 A). Bei der Analyse von CD83 und CD86 wird dieser Effekt noch deutlicher (Abb. 3.4 B).

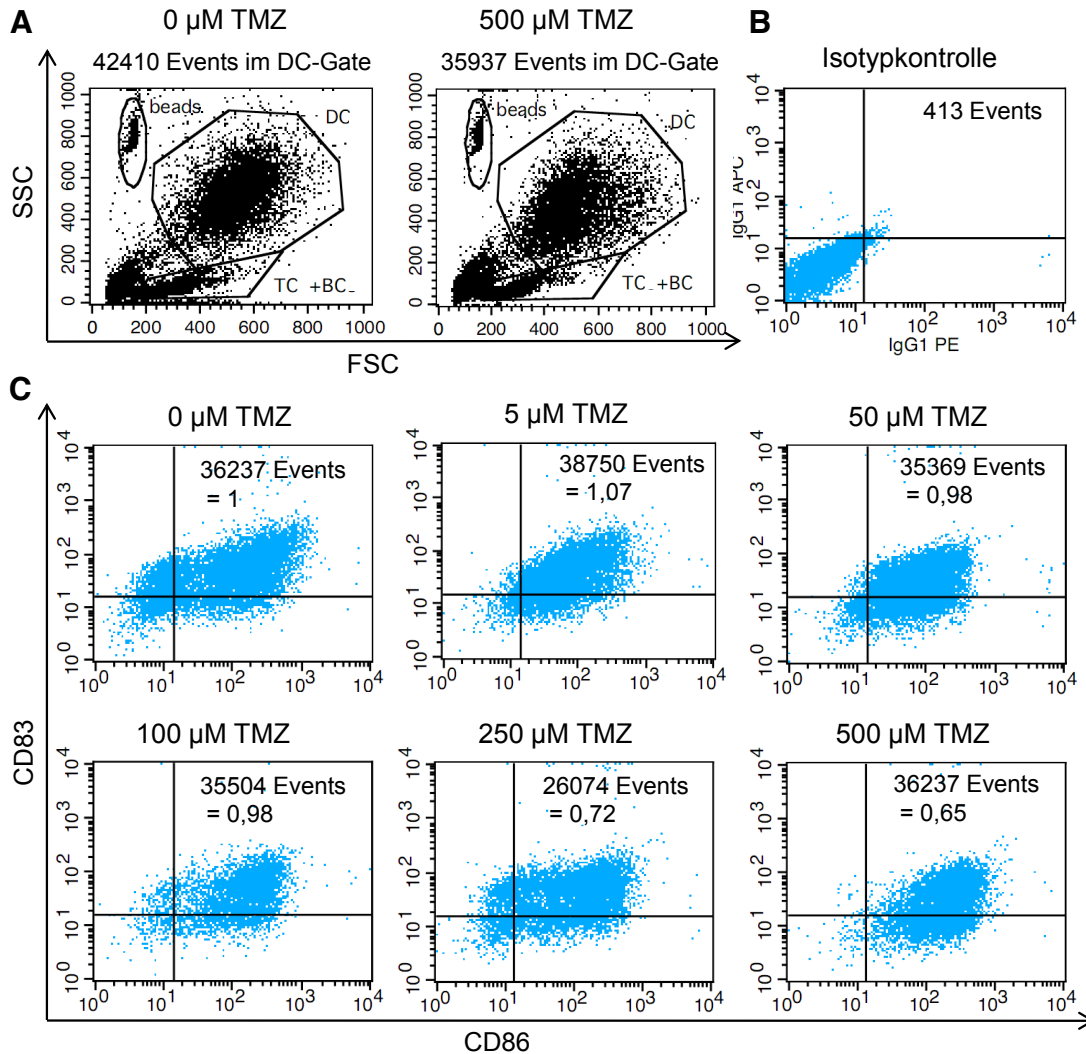


Abb. 3.4: Exemplarische durchflusszytometrische Messung von CD83 und CD86 und Quantifizierung mithilfe von Latexkugeln nach TMZ-Applikation. A) Zellen im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht mit Angabe der gezählten Events im DC-Gate bei 5000 gezählten Kugeln. B) Isotypkontrolle für diese Messung. C) Gezeigt ist die Messung der Expression von CD83 und CD86 im DC-Gate bei den entsprechenden TMZ-Konzentrationen. Die Anzahl CD83⁺/86⁺ Zellen der unbehandelten Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

Bei der zusammenfassenden Analyse der Untersuchungen von 7 Spendern lag die Zahl reifer DC bei einer Konzentration von 5 μM TMZ 1,07-fach über der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 3.5 A). Bei 50 μM war sie fast identisch mit ihr. Mit steigender TMZ-Konzentration verringerte sich die DC-Zahl kontinuierlich auf das 0,69-fache bei 100 μM und entsprach bei 500 μM im Mittel dem 0,45-fachen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$).

3.2.2 Gruppe 2: TMZ d +6

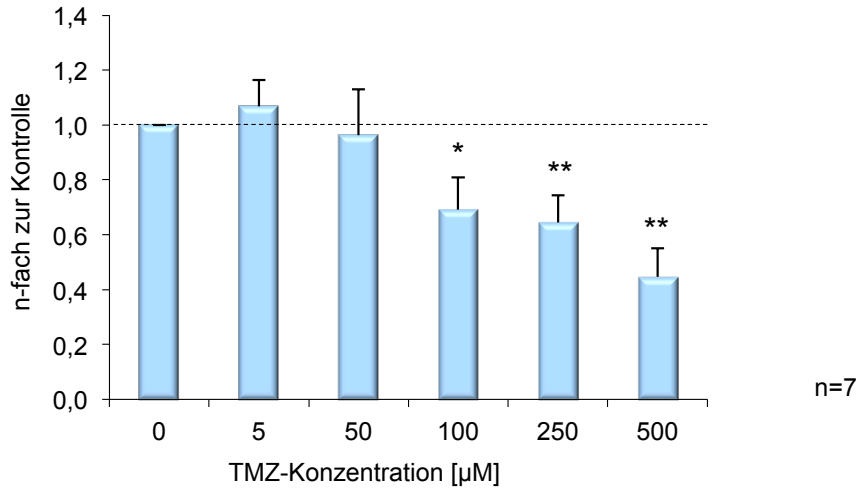
Bei der zweiten Gruppe wurden nach Plastikadhärenz aus den Monozyten über 6 Tage unreife DCs generiert, indem lediglich der Differenzierungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4) zu den Zellen gegeben wurde. An d +6 wurde zusammen mit dem Reifungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und 50 ng/ml TNF- α) Temozolomid (0-500 μ M) zugefügt. Anschließend konnte an d +8 die Expression von CD83 und CD86 mit Hilfe von Latexkugeln (Kapitel 1.2.1) untersucht werden.

Die Zugabe von TMZ zu einem späteren Zeitpunkt, an d +6, hatte hier kaum einen Einfluss auf die Zahl CD83⁺/86⁺ reifer dendritischer Zellen im Vergleich zur früheren Gabe an d 0. Bei niedrigen Konzentrationen waren sogar mehr reife DC vorhanden, als wenn gar nicht mit TMZ behandelt wurde (bei 50 μ M TMZ beispielsweise 26% mehr). Auch bei hohen Konzentrationen hielt sich die Zahl reifer DC weitestgehend auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.5 B).

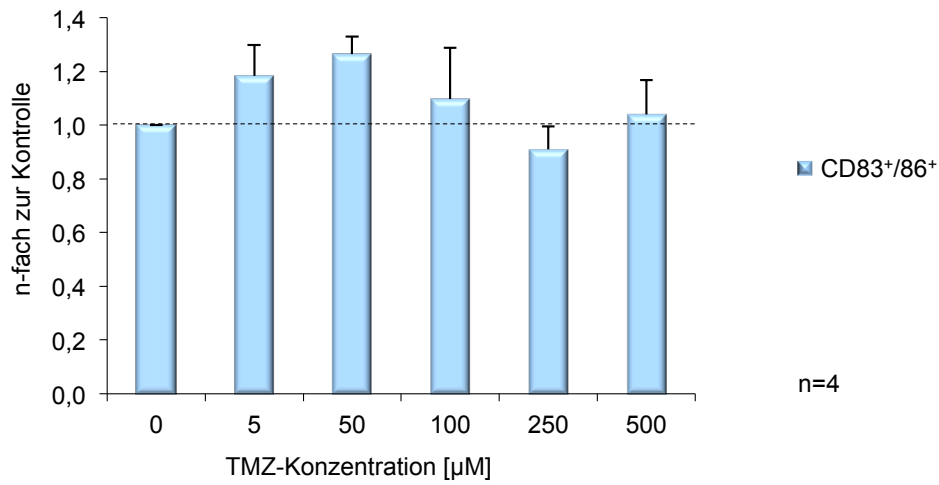
3.2.3 Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

Behandelte man die Zellen nun zwei Mal mit TMZ, zunächst zusammen mit dem Differenzierungscocktail an d 0 und ein zweites Mal zusammen mit dem Reifungscocktail an d +6, so konnte eine additive Wirkung der Substanz beobachtet werden. Bereits bei 5 μ M waren 22% ($p < 0,05$) weniger reife DC messbar als in der Kontrolle. Diese Zellzahlverringering fiel besonders bei hohen Konzentrationen auf. Bei 250 μ M hatte sich der Anteil reifer DCs auf den 0,67-fachen Vergleichswert ($p < 0,05$), bei 500 μ M auf das 0,32-fache der unbehandelten Kontrolle reduziert ($p < 0,05$) (Abb. 3.5 C).

A Gruppe 1: TMZ d 0



B Gruppe 2: TMZ d +6



C Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

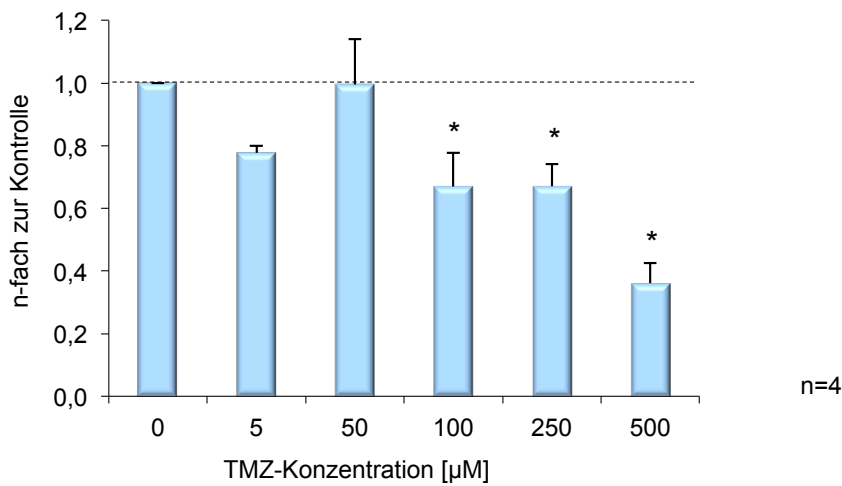


Abb. 3.5: Durchflusszytometrische Analyse von CD83 und CD86 nach TMZ-Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Messung mit Beads erfolgte an d +8 und die Zahl CD83⁺/86⁺ Zellen ist als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Angegeben ist der Mittelwert +/- Standardfehler, * p<0,05; ** p<0,01 im Mann-Whitney-Test A) Gruppe 1: TMZ (5-500 µM) wurde an d 0 zusammen mit dem Differenzierungscocktail zu den Zellen gegeben. B) Gruppe 2: TMZ-Applikation erfolgte an d +6 zusammen mit dem Reifungscocktail C) Gruppe 3: TMZ-Zugabe erfolgte sowohl an d 0 als auch an d +6.

3.3 Wirkung von TMZ auf T- und B-Lymphozyten – Durchflusszytometrische Analysen von CD3 und CD19

3.3.1 Gruppe 1: TMZ d 0

Der Einfluss von TMZ auf B- und T-Lymphozyten konnte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, da sich nach Plastikadhärenz in der Zellsuspension nicht nur monozytäre Zellen, sondern auch ein gewisser Anteil Lymphozyten befand. Für CD3⁺ T-Lymphozyten und CD19⁺ B-Lymphozyten erfolgte dies auf die gleiche Weise wie für die dendritischen Zellen unter Zugabe von Latexkugeln direkt vor der Messung. Hier wurde im Unterschied zu den DC-Analysen das Gate auf eine Population gelegt, die sich aufgrund ihrer Granularität und Größe als Lymphozyten einordnen ließ (TC+BC) (Abb. 3.6 A). Die zwei getrennten Populationen, die entweder CD3⁺ oder CD19⁺ waren, können im Dot Plot deutlich abgegrenzt werden. Exemplarisch sind für einen Spender die Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen gezeigt (Abb. 3.6 B und C)

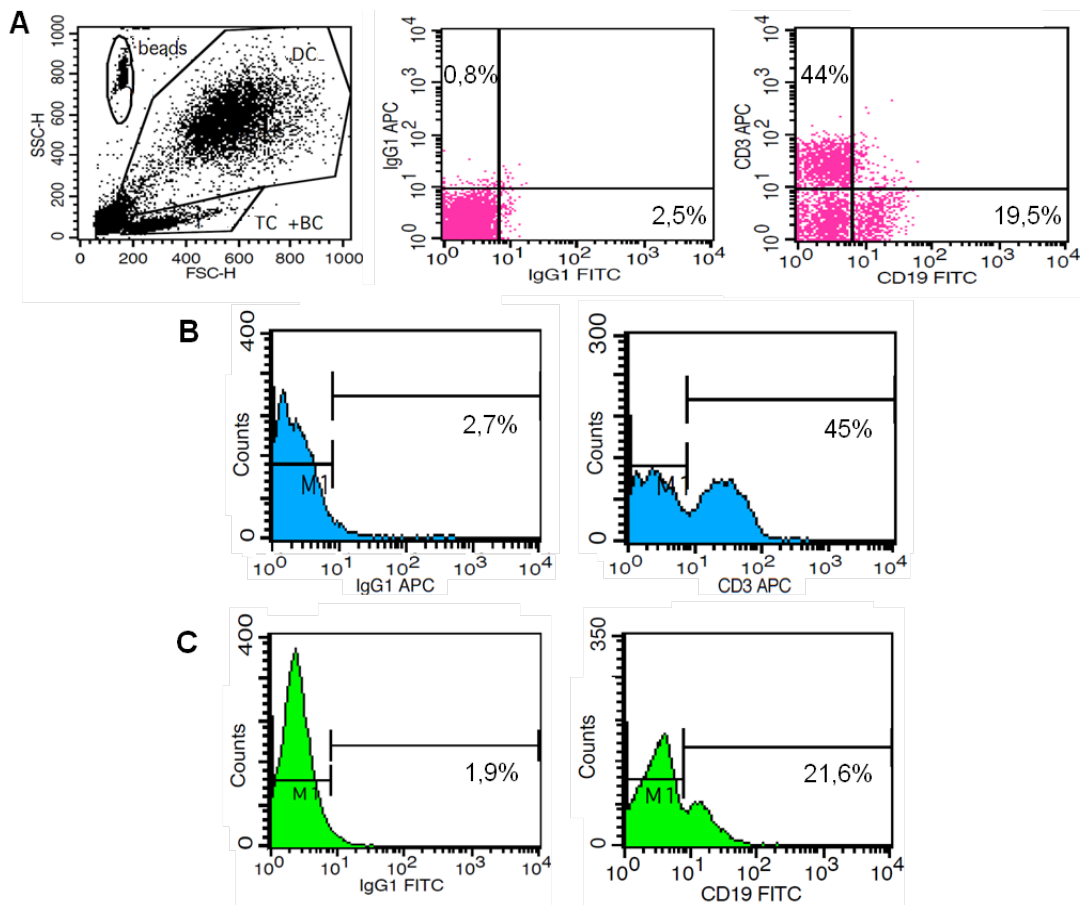


Abb. 3.6: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD3 und CD19. A) Lymphozytengate (TC+BC) und Dot Plot für untersuchte Zellen mit Latexkugeln; Negativkontrolle (links) und gefärbte Zellen (rechts) B) Histogramm der Negativkontrolle von APC (links) und CD3-Färbung (rechts) C) Histogramm der Negativkontrolle von FITC (links) und CD19-Färbung (rechts).

CD3⁺ Zellen machten insgesamt 46,9% +/- 9% der Zellpopulation im Lymphozytengate bei der unbehandelten Kontrollgruppe aus. Der Anteil der CD19⁺ Zellen betrug 19,4% +/- 8,3%. Dieses Verhältnis von B- zu T-Lymphozyten, veränderte sich kaum, unabhängig von der zugegebenen TMZ-Konzentration (Abb. 3.7).

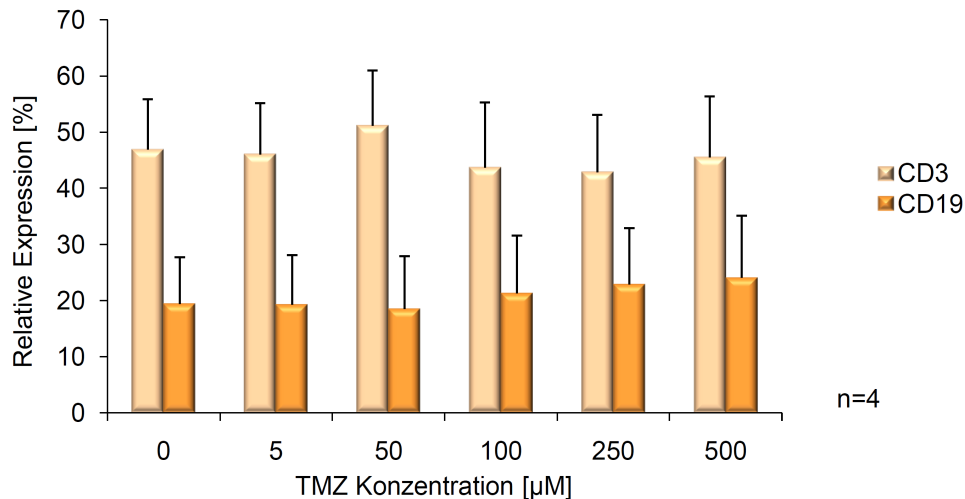


Abb. 3.7: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 und CD19 an d+8 nach TMZ-Applikation an d 0. Der Anteil von CD3 und CD19 exprimierenden Zellen innerhalb des Lymphozytengates ist dargestellt.

Bei der quantitativen Analyse der Lymphozyten von vier Spendern mittels Beads konnte gezeigt werden, dass die einmalige TMZ-Applikation an d 0 von 5 µM und 50 µM zu einer erhöhten Zahl sowohl von CD3⁺ als auch CD19⁺ Lymphozyten führte, im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 3.8 A). Ab 100 µM kam es zu einer eindeutigen Reduktion von Lymphozyten bis auf das 0,65-fache der T-Lymphozyten ($p < 0,05$) und das 0,66-fache der B-Lymphozyten. Bei 500 µM waren nur noch 24% der T-Lymphozyten ($p < 0,01$) und 29% der B-Lymphozyten ($p < 0,01$) vorhanden, bezogen auf die unbehandelten Zellen. Der Effekt, dass die Zellzahl bei niedrigen Dosen stieg und bei hohen Dosen sank, war bei CD3⁺-Zellen stärker ausgeprägt als bei CD19⁺-Zellen. Die Wirkung des Chemotherapeutikums bei einmaliger Applikation an d 0 fiel für die T- und B-Lymphozyten deutlich stärker aus als für die dendritischen Zellen (Vgl. Abb. 3.5 A).

3.3.2 Gruppe 2: TMZ d +6

Wurde TMZ ausschließlich an d +6 appliziert, war in den durchflusszytometrischen Analysen zu erkennen, dass die Zahl CD19⁺ B-Zellen bei niedrigen TMZ-Dosen von 5 µM und 50 µM 1,23-fach bzw. 1,12-fach höher war als ohne TMZ (Abb. 3.8 B). Bei höheren Konzentration von 500 µM fiel sie jedoch bis auf die

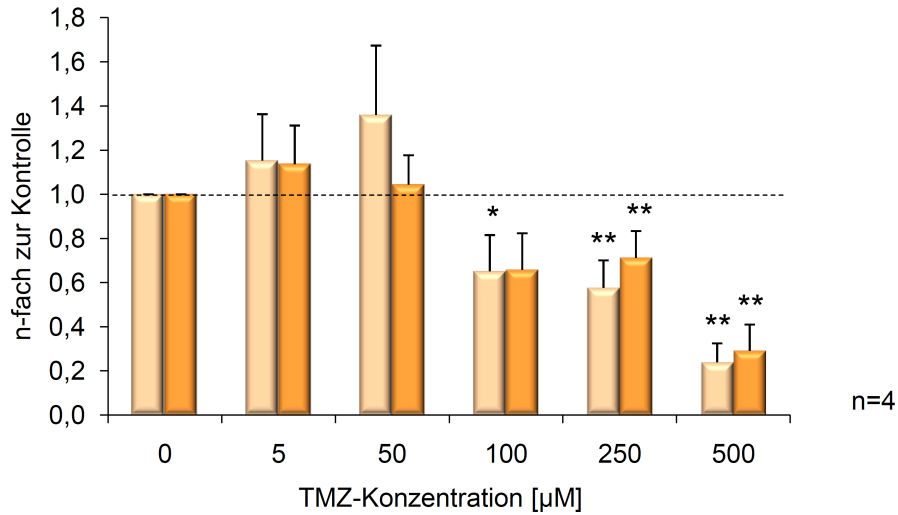
Hälfte im Vergleich zur Kontrolle ab ($p < 0,05$). Die $CD3^+$ T-Lymphozyten zeigten sich bereits bei niedrigen Dosen negativ beeinflusst, erreichten bei $500 \mu\text{M}$ allerdings noch 75% des Referenzwertes.

Die Reduktion der Zellzahl in Gruppe 2 war sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten weniger stark ausgeprägt als bei Zugabe des Chemotherapeutikums an d 0. In dieser Gruppe 2 der Lymphozyten waren der Aufwärtstrend bei niedrigen Konzentrationen und die Reduktion bei hohen Konzentrationen deutlich stärker ausgeprägt als in Gruppe 2 der dendritischen Zellen (Vgl. Abb. 3.5 B).

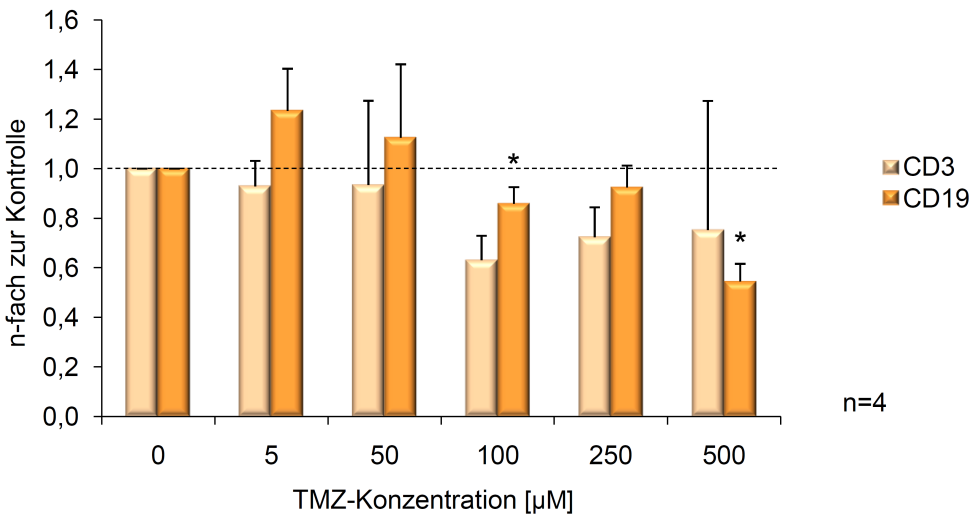
3.3.3 Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

Behandelte man die Zellen der Spender aus Gruppe 1 und 2 sowohl an d 0 als auch an d +6 mit den entsprechenden Dosen Temozolomid, konnte man einen sehr deutlichen Effekt der Substanz beobachten (Abb. 3.8 C). Ab $50 \mu\text{M}$ war eine Verringerung der T-Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle auf das 0,75-fache und bei $500 \mu\text{M}$ bis auf das 0,15-fache ($p < 0,05$) zu beobachten. Dieser Effekt trat auch bei den B-Lymphozyten auf, die bei $500 \mu\text{M}$ TMZ das 0,23-fache ($p < 0,05$) der unbehandelten Kontrolle betragen, jedoch erst bei $100 \mu\text{M}$ TMZ in ihrer Zahl reduziert wurden. Auch bei der Gruppe 3 war wie bereits in Gruppe 1 erkennbar, dass T-Lymphozyten stärker beeinträchtigt wurden als B-Lymphozyten. Für die Marker CD3 und CD19 handelte es sich hierbei um einen additiven Effekt von TMZ, wie er bereits für die dendritischen Zellen der Gruppe 3 (Vgl. Abb. 3.5 C) beschrieben wurde.

A Gruppe 1: TMZ d 0



B Gruppe 2: TMZ d +6



C Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

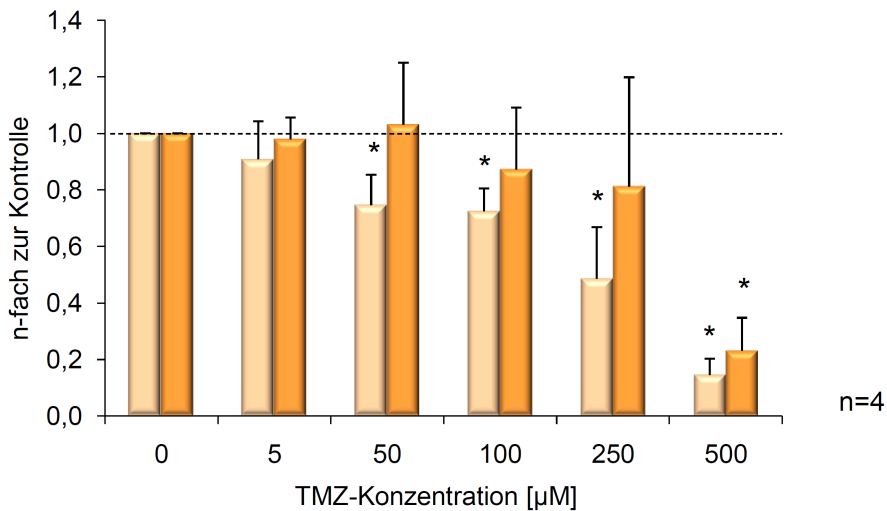


Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 und CD19 nach TMZ-Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Analyse mit Beads erfolgte an d +8 und die Zahl CD3⁺ bzw. CD19⁺ Zellen ist als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Angegeben ist der Mittelwert +/- Standardfehler, * p<0,05; ** p<0,01 im Mann-Whitney-Test A) Gruppe 1: TMZ (5-500 µM) wurde an d 0 zusammen mit dem Differenzierungscocktail zu den Zellen gegeben. B) Gruppe 2: TMZ-Applikation erfolgte an d +6 zusammen mit dem Reifungscocktail C) Gruppe 3: TMZ-Applikation fand sowohl an d 0 als auch an d +6 statt.

3.4 Vitalitätsbestimmung

Eine Aussage über die Vitalität von Zellen kann anhand ihrer Fähigkeit Calcein-AM zu verstoffwechseln, gemacht werden. Die Esterasen lebender Zellen katalysieren eine Reaktion von Calcein-AM zu dem grün fluoreszierenden Molekül Calcein, welches dann mittels Multiplate Reader oder Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Propidium-Iodid (PI) ist ein Farbstoff, der es möglich macht, ein Urteil über die Membranintegrität zu fällen. Sie ist bei toten Zellen gestört. Für die Analysen der Vitalität wurde eine Totkontrolle mitgeführt. Sie bestand aus Zellen, welche vor der Vitalitätsmessung 30 min mit 70%-igem Ethanol inkubiert wurden. PI wurde direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse hinzugefügt.

3.4.1 Gruppe 1: TMZ d 0

Die Zellen, welche Temozolomid ausschließlich an d 0 zusammen mit dem Differenzierungscocktail erhielten, wurden zunächst mit Calcein gefärbt und im Multiplate Reader analysiert (Abb. 3.10 A). Es konnte durch diese Methode gezeigt werden, dass TMZ ab einer Konzentration von 50 μM die Vitalität auf das ca. 0,9-fache der unbehandelten Kontrolle reduzierte. Einen ähnlichen Effekt auf die Vitalität hatte die Applikation von 100 μM und 250 μM TMZ. Bei 500 μM nahm der Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf 74% ab. In der Totkontrolle wurde mit dieser Methode eine Fluoreszenzintensität gemessen, die 16% der Lebendkontrolle betrug.

Nach der Messung im Multiplate Reader wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers vorsichtig vom Boden der Kulturplatte gelöst. Direkt vor der sich anschließenden durchflusszytometrischen Messung wurden PI und Latexkugeln hinzugegeben. Anhand der Totkontrolle konnten die Einstellungen für das FACS-Gerät vorgenommen werden (Abb 3.9). Bei der Kontrollgruppe und den behandelten Zellen konnte nun die Aufnahme von Calcein und PI analysiert werden. Als PI-positiv galten Zellen im linken und rechten oberen Quadranten des Dot Plot. Calcein-positiv und lebend wurden die Zellen im rechten unteren Quadranten gewertet. Die wenigen doppelt positiven Zellen wurden ebenfalls als „tot“ gezählt.

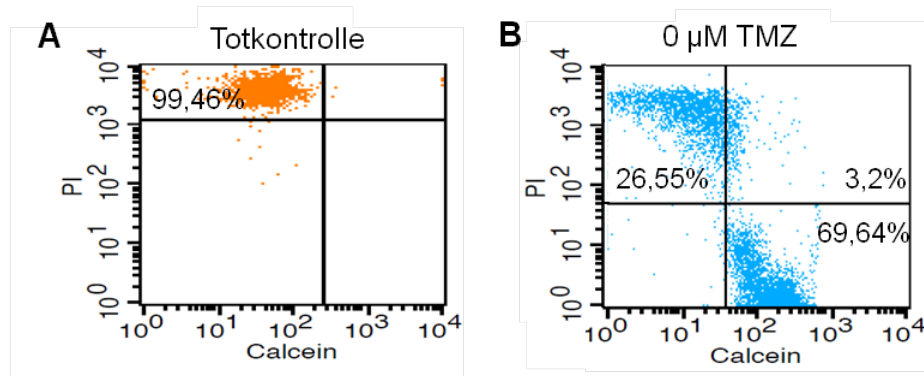


Abb. 3.9: Exemplarische durchflusszytometrische Messung von Calcein und PI. A) Dot Plot der Totkontrolle, welche 30 min vor der Färbung mit 70%-igem Ethanol versetzt wurde B) Dot Plot der Färbung der nicht mit TMZ- behandelten DC. Die Analysen erfolgten innerhalb des DC-Gates.

Für Gruppe 1 konnte durchflusszytometrisch gemessen werden, dass sich die Zahl vitaler Zellen im DC-Gate bereits bei niedrigen und mittleren TMZ-Konzentrationen verringerte. Bei 5 µM reduzierte sich die Vitalität auf 86% der unbehandelten Kontrolle. Sie entsprach bei 100 µM dem 0,81-fachen der unbehandelten Kontrolle und wurde bei der maximalen Dosis von 500 µM auf das 0,59-fache herabgesetzt ($p < 0,05$). Mit dieser Methode ließ sich im Vergleich zur Messung im Multiplate Reader eine stärkere Reduktion der Vitalität bei hohen TMZ-Dosen ermitteln (Abb. 3.10 A).

Die Zahl der PI-positiven Zellen nahm ebenfalls mit steigender Konzentration des Chemotherapeutikums bis auf das 0,68-fache bei 500 µM ab ($p < 0,05$), blieb bei den geringen und mittleren Dosen aber fast identisch mit der Kontrolle (nicht dargestellt). Die Berechnung der relativen PI-Werte im Vergleich zu den unbehandelten DC war für die Totkontrolle nicht möglich, da die Zellen durch das Ethanol zu stark degradiert waren. Dadurch korrelierte die Zahl PI-positiver Zellen nicht mit der Anzahl toter DC. Wie im Histogramm der durchflusszytometrischen Messung ersichtlich, nahmen jedoch alle Zellen in der Totkontrolle im DC-Gate PI auf und galten daher als nicht mehr vital (Abb. 3.9).

3.4.2 Gruppe 2: TMZ d +6

Die Messung der Vitalität der Zellen, welchen Temozolomid ausschließlich an d +6 zusammen mit dem Reifungscocktail appliziert wurde, erfolgte wie in den anderen Gruppen zunächst mit dem Multiplate Reader. Es fiel auf, dass die Vitalität der Zellen kaum von TMZ mit kurzer Applikationsdauer beeinträchtigt wurde. Ausschließlich bei der höchsten Konzentration wurde sie auf 95% der unbehandelten Kontrolle herabgesetzt (Abb. 3.10 B).

Auch bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung zeigte sich nur bei 500 μM TMZ eine Verringerung der Vitalität, nämlich auf das 0,85-fache des Referenzwertes.

In der PI-Messung stieg die Zahl der toten Zellen bis auf den Faktor 1,27 der unbehandelten Kontrolle bei 100 μM TMZ an. Bei 500 μM war sie wieder genauso hoch wie in der Kontrollgruppe.

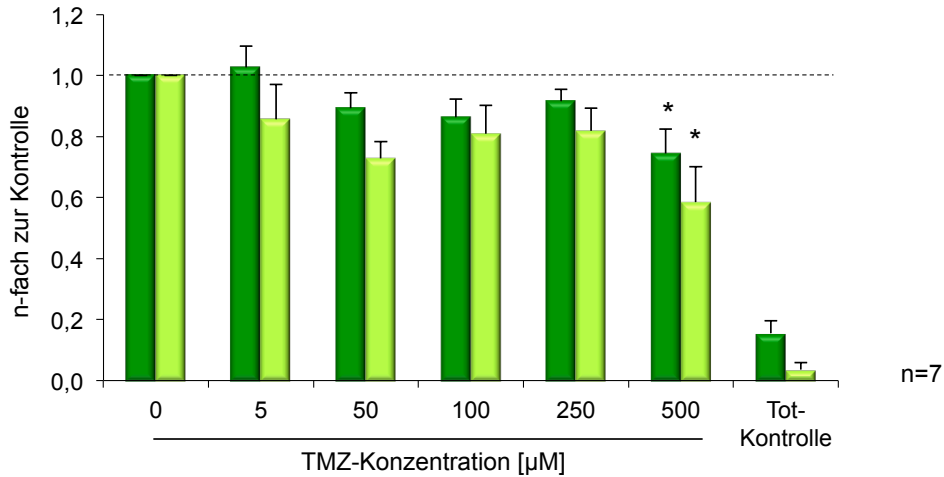
3.4.3 Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

Die Calcein Analysen der dritten Gruppe mit zweimaliger TMZ-Zugabe an d 0 und d +6 zeigten im Multiplate Reader ab 50 μM ein Herabsinken der lebenden Zellen auf 95% des Referenzwertes (Abb. 3.10 C). Die Vitalität reduzierte sich kontinuierlich auf das 0,72-fache der unbehandelten Kontrolle bei der maximalen Konzentration von 500 μM . Somit fiel die Reduktion bei dieser Methode ein wenig stärker aus, als bei einmaliger TMZ-Applikation an d 0 bei Gruppe 1 und ein additiver Substanzeffekt konnte bestätigt werden.

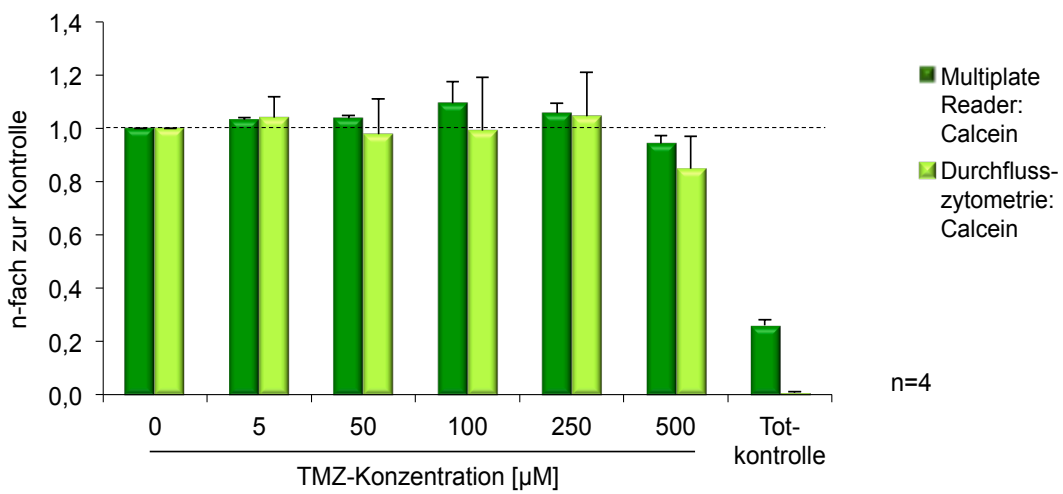
Mittels Durchflusszytometrie wurde im DC-Gate gemessen, dass die Anzahl vitaler Zellen bereits bei 5 μM auf das 0,81-fache abfällt und bei den mittleren Konzentrationen zwischen dem 0,86- und 0,93-fachen Referenzwert schwankt, um bei 500 μM auf 62% der Kontrolle abzufallen. Die Vitalität zwischen Gruppe 1 und 3 ergab hier keine wesentlichen Unterschiede.

Bei den PI-Analysen konnte bei 5 μM ein Abfall der PI-positiven Zellen auf das 0,72-fache festgestellt werden. Bei den mittleren Konzentrationen stieg die Zahl toter Zellen bis auf das 1,18-fache des Ausgangswertes bei 250 μM . Der Anteil toter Zellen reduzierte sich dann bei 500 μM wieder auf das 0,69-fache der unbehandelten Kontrolle.

A Gruppe 1: TMZ d 0



B Gruppe 2: TMZ d +6



C Gruppe 3: TMZ d 0 & d +6

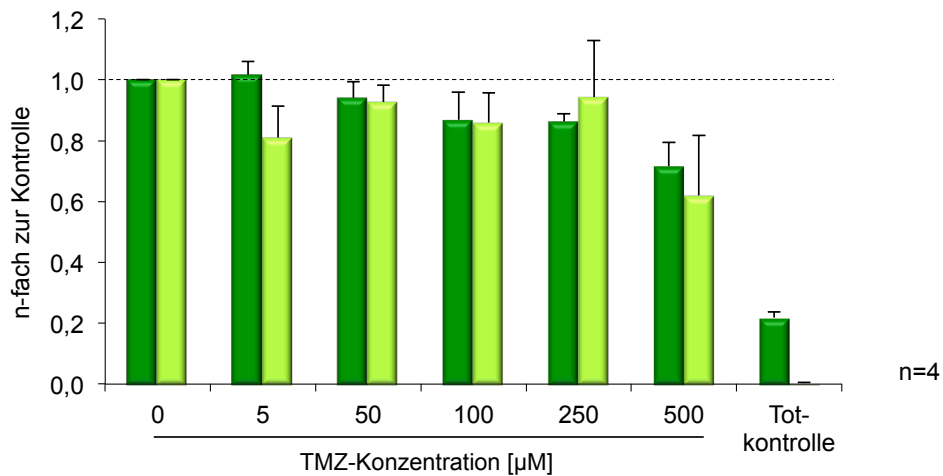


Abb. 3.10: Calcein-Färbung mittels Multiplate Reader und durchflusszytometrische Analyse mit Beads an d +8. Calcein aufnehmende, vitale Zellen sind als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Eine mit 70%-igem Ethanol behandelte Totkontrolle wurde mitgeführt. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Mann-Whitney-Test A) Gruppe 1: TMZ (5-500 µM) wurde an d 0 zu den Zellen gegeben. B) Gruppe 2: TMZ-Applikation erfolgte an d +6. C) Gruppe 3: TMZ-Applikation fand sowohl an d 0 als auch an d +6 statt.

3.5 Fotografische Darstellung dendritischer Zellen nach TMZ-Behandlung

3.5.1 Fotografien von Zellen in Kultur

Um den morphologischen Aspekt der Zellen in ihrer Gesamtheit zu dokumentieren, wurden sie an d 8 in Kulturbedingungen fotografiert. Die hier dargestellten Zellen erhielten an d 0 einmalig TMZ zusammen mit dem Differenzierungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4) und an d +6 den Reifungscocktail (100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und 50 ng/ml TNF- α). Die typische Form der dendritischen Zellen mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern ist bei der Kontrollgruppe, die kein Chemotherapeutikum erhielt, auf den Fotografien zu sehen (Abb. 3.11 A). Bei einer Konzentration von 500 μ M TMZ waren deutlich weniger Zellen am Boden der Kulturplatte zu erkennen, hingegen umso mehr Zellfragmente und kleine kugelförmige Zellen ohne Ausläufer (Abb. 3.11 B).

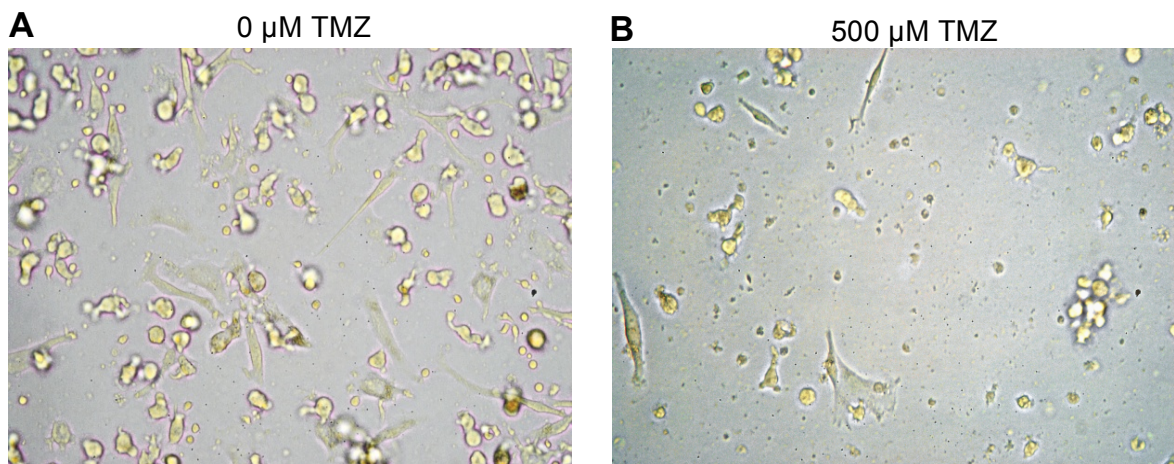


Abb. 3.11: Reife dendritische Zellen in Kulturmedium. Die Zellen erhielten nach der Plastikadhärenz an d 0 den Reifungscocktail und an d +6 wurde der Differenzierungscocktail hinzugegeben. Die Fotografie der reifen DC in Kulturmedium erfolgte am achten Tag. A) Kontrollgruppe, die kein TMZ erhielt B) Applikation von 500 μ M TMZ an d 0.

3.5.2 Fotografien von gefärbten Zellen

Eine genauere Betrachtung der Morphologie von Zellen ist möglich, wenn man eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchführt und mikroskopisch auswertet. Dafür wurden zunächst Deckgläschen auf dem Boden der Kulturplatte ausgelegt und dann eine Adhärenz durchgeführt. Anschließend erhielten die Zellen den Differenzierungs- und Reifungscocktail an d 0 und d +6, wie bei den anderen Analysen. Temozolomid wurde an d 0 zusammen mit dem Differenzierungscocktail in das Kulturmedium gegeben. Repräsentative

Ausschnitte der bewachsenen Deckgläschen wurden an d +8 fotografiert und sind in Abb. 3.12 dargestellt.

Die Zellkerne der gefärbten Zellen erscheinen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der Desoxyribonukleinsäure purpurrot. Das Zytoplasma ist bläulich dargestellt. Bei der unbehandelten Kontrolle sowie bei den Zellen, denen 5 μ M bzw. 50 μ M TMZ appliziert wurde, sieht man die typischen zytoplasmatischen Ausläufer der dendritischen Zellen. Bei den Zellen, die 500 μ M TMZ erhielten, sind weniger Ausläufer zu erkennen und viele Zellfragmente im Bild. Oft finden sich hier abgelöste Vesikel von schrumpfenden Zellen, sogenannte apoptotische Blebs, als Zeichen der Zellschädigung.

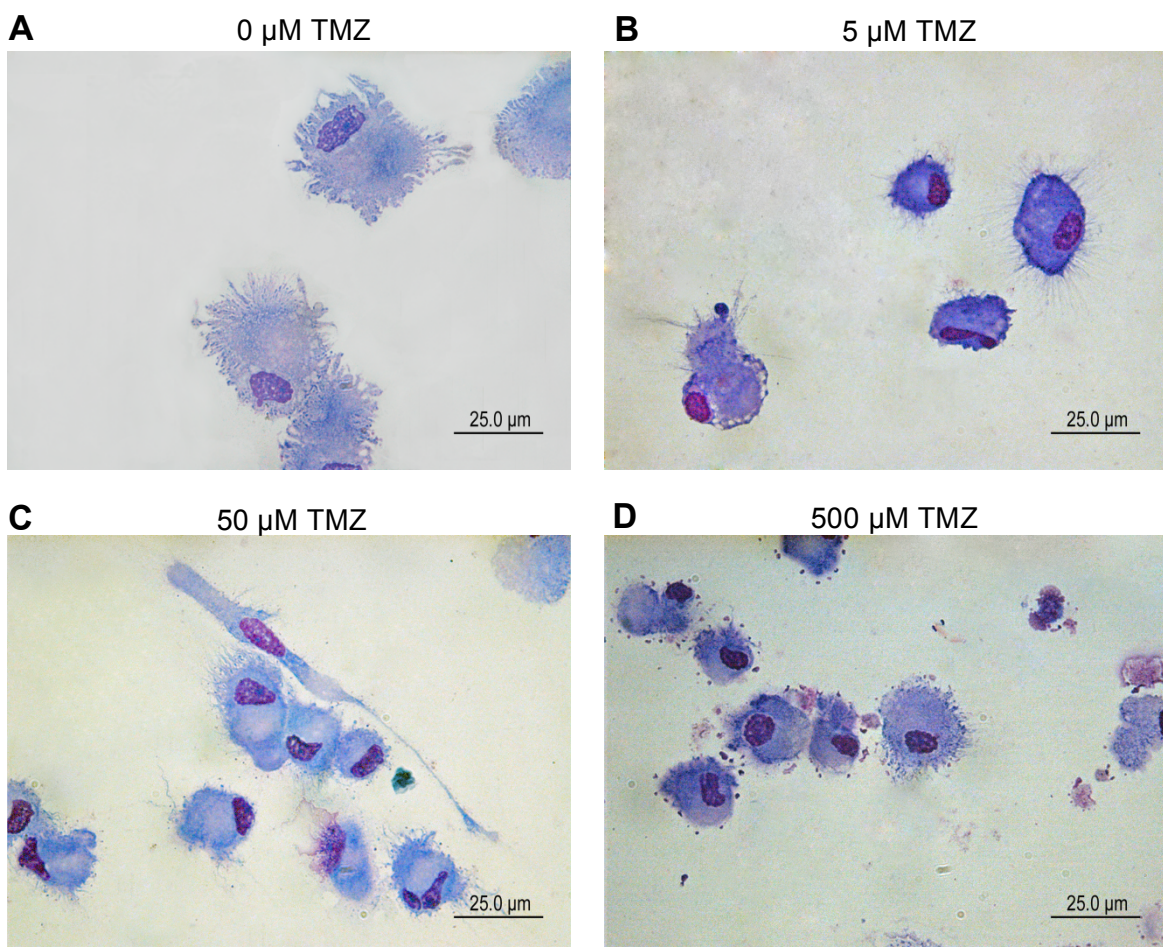


Abb. 3.12: Fotografien reifer dendritischen Zellen nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung. A) Kontrollgruppe, welche kein TMZ erhielt B) TMZ-Applikation von 5 μ M erfolgte ab d 0 C) TMZ-Applikation von 50 μ M ab d 0 D) TMZ-Applikation von 500 μ M ab d 0.

Für die Funktion der dendritischen Zellen spielt die Interaktion mit T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle. Auf einer Fotografie der Kontrollgruppe kann vermutet werden, dass zwei Zellen miteinander kommunizieren (Abb. 3.13). Eine der beiden Zellen auf dem Foto imponiert mit ihren typischen Ausläufern wie eine DC. Die

zweite Zelle könnte aufgrund ihrer Morphologie und des Färbeverhaltens am ehesten als Lymphozyt interpretiert werden.

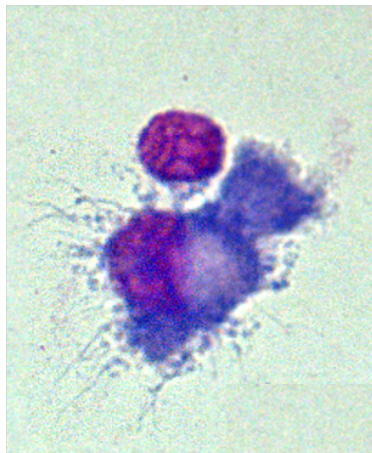


Abb. 3.13: Fotografie nach May-Grünwald-Giemsa Färbung. Neben der typischen Morphologie von dendritischen Zellen ist auf diesem Bild möglicherweise die Interaktion einer DC mit einer zweiten Zelle, wahrscheinlich einem Lymphozyten, gezeigt.

3.6 Mykoplasmen-PCR

Eine PCR zum Ausschluss einer Kontamination der U138-Zellen mit Mykoplasmen wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Die Proben wurden danach gelelektrophoretisch aufgetrennt.

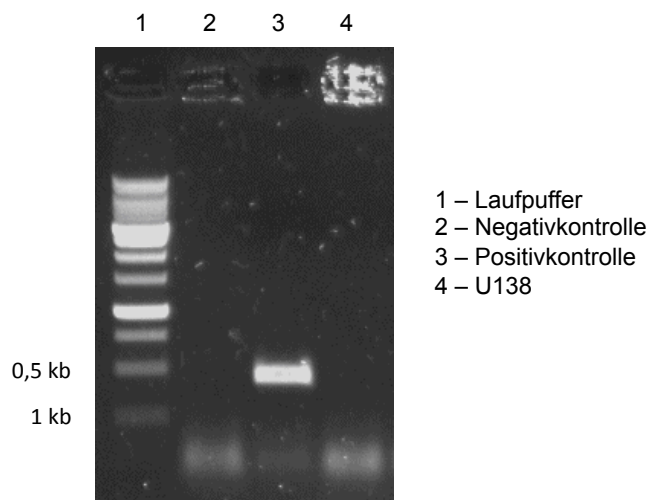


Abb. 3.14: Gelelektrophorese nach Mykoplasmen-PCR. Von links nach rechts: Laufpuffer, Negativkontrolle, Positivkontrolle bei 0,5 kb und getestete Zelllinie U138.

Als Positivkontrolle diente eine mit Mykoplasmen kontaminierte Zelllinie, als Negativkontrolle PBS. Außer bei der Positivkontrolle sind auf dem Gel für U138 keine Banden. Die Proben wurden daher als frei von Mykoplasmen bewertet. Aus der Glioblastomzelllinie wurde nach negativer Testung Lysat zur Stimulation dendritischer Zellen für die gemischte Zellkultur mit Lymphozyten hergestellt.

3.7 MTT-Assay nach gemischter Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten

PBMC wurden mit Hilfe von Ak-gebundenen magnetischen Beads isoliert und durch Zugabe des Reifungs- und Differenzierungscocktails zu der CD14⁺ Fraktion dendritische Zellen generiert. An d 0 wurde TMZ hinzugefügt (5-500 μ M), an d +6 erhielten die Zellen zusammen mit dem Differenzierungscocktail U138-Tumorzelllysate und an d +8 wurden zu den reifen DC die CD14⁻ autologen Lymphozyten mit neuem Medium zugegeben (Vgl. Abb. 2.9). Anschließend wurde eine gemischte Zellkultur mit dendritischen Zellen und Lymphozyten im Verhältnis 1:10 durchgeführt. Die Fähigkeit dendritischer Zellen, Lymphozyten zur Proliferation anzuregen, wurde mittels MTT-Assay geprüft. Es konnte durch diesen Test die Funktionalität der dendritischen Zellen analysiert werden, ohne die Lymphozyten direkt dem Chemotherapeutikum zu exponieren. Als Negativkontrolle dienten dendritische Zellen, die kein Tumorlysate erhielten.

Wie aus Abbildung 3.15 zu entnehmen ist, hatte im MTT-Assay die TMZ-Dosis, mit der die DC behandelt wurden, keinen wesentlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der autologen Lymphozyten 5 verschiedener Spender. Für die einzelnen Spender sind bei zunehmender TMZ-Konzentration nur leichte Schwankungen der Extinktion messbar.

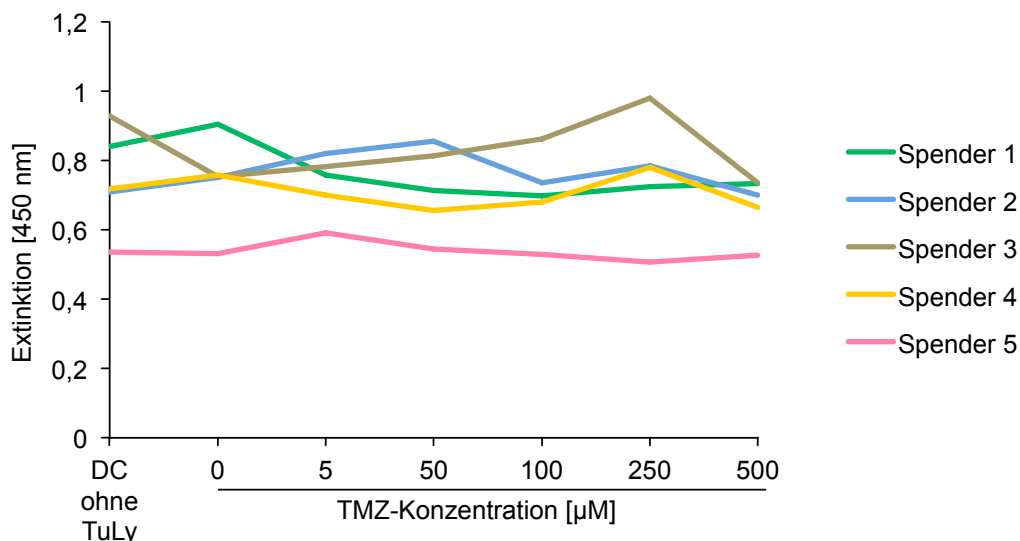


Abb. 3.15: Extinktionswerte von MTT-Assays nach gemischter Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten. PBMC wurden nach CD 14⁺ Beads Selektion an d 0 mit TMZ (5-500 μ M) behandelt. Nach Reifungs- und Differenzierungscocktail an d 0 bzw. d +6 wurden zu den reifen DC autologe CD 14⁻ Zellen im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und proliferierten für 5 Tage. Die dargestellten MTT-Assays von 5 Spendern zeigen die Beeinflussung der stimulatorischen Fähigkeit von DC auf Lymphozyten durch. Als Kontrolle dienten DC, die weder TMZ noch Tumorlysate erhalten hatten.

3.8 Proteinquantifizierung mit Erstellung einer Eichgeraden

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Tumorzelllysats sowie der Interferon- γ -Konzentration mittels ELISA nach gemischter Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten, wurden bei jeder Untersuchung Standardreihen mitgeführt, um die Konzentrationen in den Proben zu interpolieren. Exemplarisch sind eine Eichkurve für IFN- γ und die daraus ermittelte lineare Regressionsgerade dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß und die Gleichung zur Berechnung der Probenkonzentration sind der Abbildung 3.16 zu entnehmen.

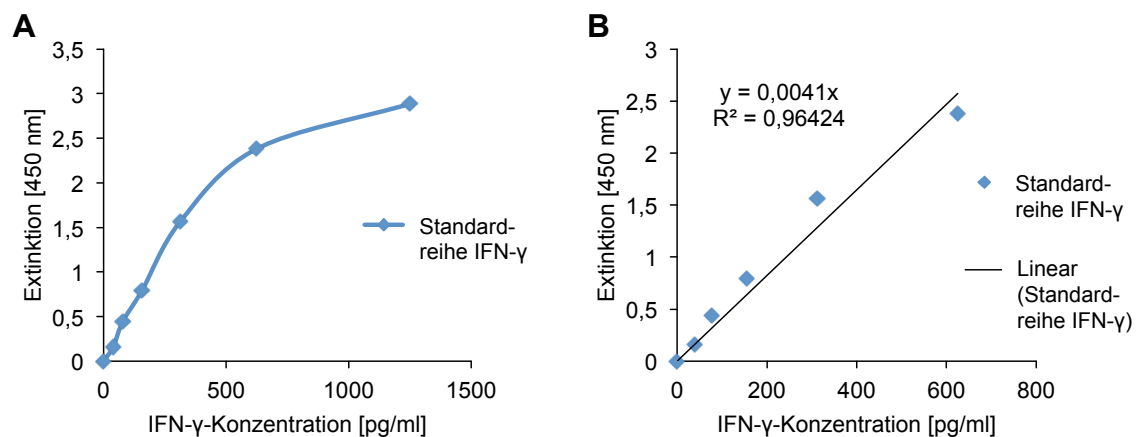


Abb. 3.16: Erstellen einer Eichgeraden A) Dargestellt ist eine exemplarische Eichkurve für den Interferon- γ -ELISA B) Aus den Werten wurde die lineare Regressionsgerade mit Bestimmtheitsmaß und Gleichung zur Berechnung der IFN- γ -Konzentration in den Proben erstellt.

3.9 Interferon- γ -ELISA

Die Überstände der Versuchsreihen, bei denen die gemischte Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten 5 verschiedener Spender erfolgte, wurden mittels ELISA auf IFN- γ untersucht. Dieses Zytokin wurde gewählt, da es ein Indikator für die Aktivierung von T-Lymphozyten ist. Bei einer Wellenlänge 450 nm wurde die Extinktion von TMB nach Reaktionsstopp mit H_2SO_4 im ELISA Reader ermittelt. Als Leerwert galt reines Medium, dessen Extinktion von den Messwerten abgezogen wurde. Für einen Überstand wurden die Messungen als Tripletten durchgeführt.

Bei dieser Untersuchung konnten deutlichere Ergebnisse erzielt werden (Abb. 3.17), die allerdings sehr spenderabhängig waren. Zwei Spender (Spender 4 und 5) zeigten bei geringen und mittleren TMZ-Dosen eine Steigerung der IFN- γ -Produktion. Bei Spender 2 war die Konzentration des Zytokins bereits bei 5 μ M im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Zwei weitere Spender (Spender 1 und 3) zeigten eine konstant niedrige IFN- γ -Produktion, unabhängig von der TMZ-

Konzentration mit der die dendritischen Zellen zuvor behandelt wurden. In der Kontrolle ohne Inkubation der DC mit Tumorlysat war die INF- γ -Konzentration niedriger.

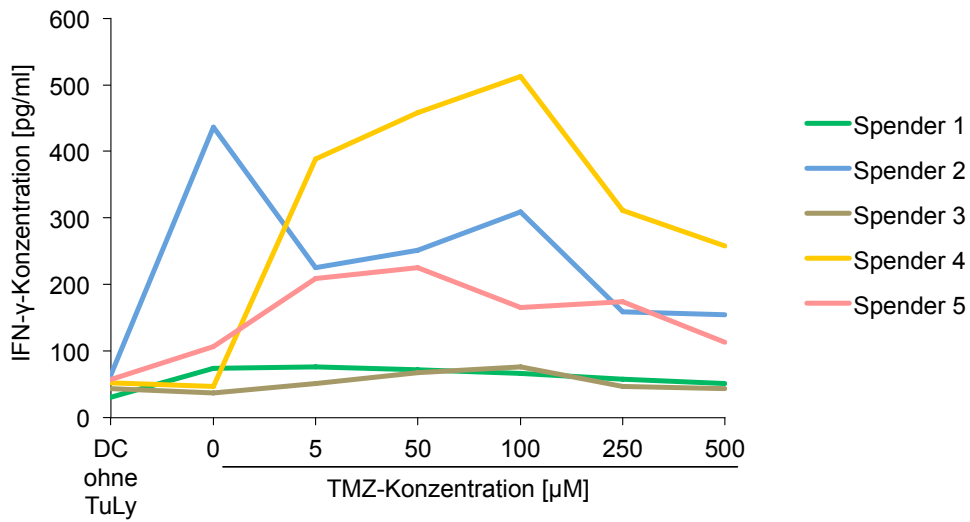


Abb. 3. 17: Interferon- γ -ELISA. Die Überstände der gemischten Zellkultur dendritischer Zellen und Lymphozyten von 5 Spendern wurden abpipettiert und mittels ELISA auf die Konzentration des Zytokins Interferon- γ untersucht.

4 DISKUSSION

4.1 Bedeutung der dendritischen Zellvakzine beim Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist einer der aggressivsten malignen Tumoren. Die aktuelle Standardtherapie besteht aus möglichst vollständiger Tumorresektion, Chemotherapie mit Temozolomid und Bestrahlung. Trotz verbesserter OP-Techniken⁴⁵ führt eine makroskopisch komplette Resektion aufgrund von disseminierten malignen Zellen äußerst selten zur Heilung.

Selbst wenn die Patienten das mediane Gesamtüberleben von 12-15 Monaten³⁰ überschreiten, kommt es bei den meisten zu einem Rezidiv, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate nur 9% beträgt². Man kann insofern wohl kaum von der Existenz einer kurativen Therapieoption sprechen, da eine dauerhafte, echte Heilung derzeit nicht möglich ist³⁰. Es besteht daher der dringende Bedarf an potentiell synergistischen Therapieansätzen. Immuntherapie ist solch ein neuer tumorspezifischer Ansatz.

Beim Glioblastoma multiforme und anderen Malignomen könnte die Vakzinierung mit dendritischen Zellen im Rahmen von klinischen Studien eine sinnvolle Ergänzung zur Standardtherapie darstellen. Erste klinische Daten bestätigen die Sicherheit und Durchführbarkeit einer DC-Vakzinierung bei Patienten mit dieser fatalen Krankheit^{297,338,388}. Trotz der Lage von Glioblastomen in der sogenannten immunprivilegierten Umgebung des ZNS wurden viel versprechende klinische Ergebnisse autologer DC-basierter Tumor-Vakzinierung nach einer entsprechenden Operation beschrieben^{308,319,323,354}. Mehrere Studien zu DC-Vakzinierungsansätzen berichten anhaltend über positive Ergebnisse und minimale Toxizität bei Glioblastompatienten, wobei 40-70% der Patienten länger als 2 Jahre überleben^{308,318,319,320,327,328,354,355,389,390}.

So konnte die Gruppe um Stefaan van Gool zeigen, dass eine autologe DC-Vakzinierung im Tiermodell und bei GBM-Patienten ein Langzeitüberleben induzieren kann^{297,322,358,391}. Zudem beschrieben Liau *et al.*³¹⁸ systemische Antworten gegen den Tumor durch T-Lymphozyten und eine erhöhte Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten. Yu *et al.*³¹⁹ beobachteten ebenfalls zytotoxische T-Lymphozyten-Antworten bei 60% der Glioblastompatienten, welche mit autologen Tumorlysaten beladenen DC vakziniert wurden³⁵⁴.

Bestrahlung und Chemotherapie können das Immunsystem und mithin auch eine Immuntherapie beeinflussen. Bei der zytostatischen Therapie von Tumoren ist die Immundefizienz, vor allem die Lymphopenie, eine ernste, gegebenenfalls therapielimitierende Nebenwirkung³⁹². Die Modulation, insbesondere der mononukleären Zellpopulation, durch Chemotherapie und Bestrahlung hat wichtige Auswirkungen auf die optimale Koadministration von Immuntherapie bei Glioblastompatienten³⁴⁵. Eine Zerstörung dieser Zellen, kann für die DC-vermittelte Tumorabwehr maßgebend sein³⁹³.

Das Konzept einer tumorspezifischen Immuntherapie zum Zeitpunkt der Immunrestitution nach Chemotherapie wurde erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen und Phase I/II klinischen Studien getestet. Es wurde zudem wiederholt berichtet, dass das Vorhandensein von Tumorantigenen während der Proliferation von T-Lymphozyten zu einer effektiven Immunität gegen den Tumor führt und eine verstärkte Antwort von T-Gedächtniszellen hervorruft³⁹⁴⁻³⁹⁷.

Die grundlegenden Arbeiten von Steinman *et al.* zu DC und ihrem klinischen Einsatz wurden 2011 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Dies unterstreicht die Relevanz und das öffentliche Interesse für eine künftige Optimierung in der Tumorthherapie in Form von immunologischen Ansätzen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss des Standard-Chemotherapeutikums in der Glioblastomtherapie, Temozolomid, *in vitro* insbesondere auf dendritische Zellen, aber auch auf T- und B-Lymphozyten, untersucht werden. Ziel war es, die positiven klinischen Ergebnisse der Kombination aus Immun- und Chemotherapie messtechnisch zu belegen, um so den Einfluss einer möglichen TMZ-induzierten Immunmodulation auf eine dendritische Zellvakzine abschätzen zu können.

4.2 Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

Die Methode für die DC-Präparation ist mittlerweile gut etabliert^{297,356}. In dieser Arbeit wurden Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender verwendet, mittels Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt und anschließend in eine 6-Well-Platte gegeben. Nicht adhärente Zellen wurden nach zwei-stündiger Inkubation entfernt. Die übrig gebliebenen adhärennten Zellen entsprachen Monozyten³⁹⁸. Diese wurden an d 0 mittels 100 ng/ml rh GM-CSF, 1000 IU/ml IL-4 und an d +6 mit den gleichen Zytokinkonzentrationen, sowie zusätzlich 50 ng/ml TNF- α , zu reifen dendritischen Zellen ausdifferenziert und mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten inkubiert.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die mit diesem Protokoll generierten dendritischen Zellen typische DC-Oberflächenmarker^{392,399} wie CD80, CD83, CD86 und MHCII exprimierten, CD14 gegenüber den Monozyten der Ausgangspopulation reduziert war und sie im FITC-Dextran-Assay phagozytotisch aktiv waren (Ergebnisse nicht dargestellt)³³².

Die meisten anderen Gruppen nutzen für die Isolation von PBMC aus dem peripheren Blut ebenfalls Dichtezentrifugation mittels Ficoll. Eine Alternative dazu stellt die Elutrierung dar, ein Vorgang ähnlich einer Leukapherese. Es handelt sich dabei um ein aufwändiges und kostspieliges Verfahren, das zur Gewinnung größerer Zellmengen in einem geschlossenen System genutzt werden kann und zur Anwendung am Patienten geeignet ist³⁵¹.

Ähnliche Protokolle zur Herstellung dendritischer Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit, wurden mehrfach in der Forschung genutzt und befinden sich teilweise bereits in klinischer Anwendung^{358,374–377,400}. Diverse Variationen wurden bereits *in vitro* und im Rahmen von Tiermodellen ausgetestet (siehe Kapitel 1.3.2).

Häufig werden DC in Kulturflaschen herangereift, aber auch mit Medium gefüllte, speziell abgeschlossene Plastikbeutel sind möglich³⁵¹. In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns aufgrund der begrenzten Zellzahl eines einzelnen Spenders, gegenüber den Variationsmöglichkeiten von TMZ-Konzentrationen und Applikationszeitpunkten, für die DC-Reifung in 6-Well-Platten. In ein Well wurden 1×10^7 PBMC gegeben, eine Adhärenz durchgeführt und die Zellen anschließend in 4 ml Medium inkubiert. Bauer *et al.*³⁹² konnten mit vergleichbarer Zellzahl und Mediummenge ($1-1,5 \times 10^7$ Zellen/3ml) ebenfalls gute Ergebnisse erzielen. Dagegen nutzten Briegert *et al.* für ihre Vitalitätsanalysen $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml³⁹³.

4.3 Einfluss von TMZ auf einzelne Zellpopulationen

Die getesteten Spenderzellen wurden anhand der TMZ-Applikationszeitpunkte in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt. In Gruppe 1 erfolgte die TMZ-Applikation ausschließlich an d 0, in Gruppe 2 ausschließlich an d +6 und in Gruppe 3 sowohl an d 0 als auch an d +6. Das Chemotherapeutikum wurde dann zu den Zellen in verschiedenen Konzentrationen (5, 50, 100, 250 und 500 μM) gegeben.

Besonders interessant waren die Konzentrationen um den therapeutischen Bereich zwischen 5 und 50 μM ^{85,96,112}.

Zunächst erfolgten durchflusszytometrische Analysen von CD83 und CD86. Es konnten hierbei keine eindeutigen Aussagen über die Änderung der relativen

Expression der genannten Oberflächenmarker nach TMZ-Applikation getroffen werden. Da jedoch lichtmikroskopisch eine veränderte Morphologie der DC sowie eine reduzierte Zellzahl sichtbar waren, bedienten wir uns einer Bead-basierten Methode um die absolute Anzahl dendritischer Zellen zu bestimmen.

4.3.1 Quantifizierung von Zellen mittels Latexkugeln

Die zelluläre Quantifizierung mithilfe von Durchflusszytometrie und Bead-basierter Methode ist sehr verbreitet und gut untersucht, da sie sehr genau und reproduzierbar ist⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Dafür wird direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse ein definiertes Volumen von Latexkugeln (= Beads) in Lösung in die zu messende Probe gegeben. Die absolute Anzahl wird durch Multiplikation der Zell : Bead Ratio mit der absoluten Anzahl von hinzugegebenen Latexkugeln berechnet⁴⁰⁴.

Die Beads sind im Durchflusszytometer einfach anhand ihrer Größe zu identifizieren. So ist die Anwendung kommerzieller Latexkugeln beispielsweise die Methode der Wahl zur Quantifizierung verschiedener Zelltypen geworden, inklusive zirkulierender CD 4⁺ T-Lymphozyten^{405,406-408}. Nicht nur im Blut^{401,409} und in Biopsien^{410,411} können Beads bei der Quantifizierung von Zellen hilfreich sein; *Saito et al.*³⁹⁹ bedienten sich beispielsweise dieser Methode, um die absolute Anzahl lebender Effektor- und Zielzellen nach einem Zytotoxizitätsassay zu messen.

Nantakomol et al. konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genauigkeit, zwischen einer flussratenbasierten Kalibrierungsmethode und der Nutzung von Zell-Beads bei der Messung im Durchflusszytometer zur Berechnung der absoluten Zahl CD4⁺ T-Lymphozyten, feststellen⁴⁰⁶.

4.3.2 Einfluss von TMZ auf dendritische Zellen

Die absoluten DC-Zahlen halfen, einen genaueren Einblick bezüglich des TMZ-Einflusses auf dendritische Zellen zu gewinnen.

In Gruppe 1 war die Zahl reifer CD83⁺/86⁺ dendritischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ab 100 µM reduziert. In Gruppe 2 hingegen zeigte sich kaum ein Einfluss auf die Zellzahl. In Gruppe 3 wiederum war ein additiver TMZ-Effekt zu beobachten. Ein wichtiges Ergebnis war, dass therapeutische Dosen Temozolomid keinen signifikant messbaren Einfluss auf die Anzahl dendritischer Zellen hatten.

Vergleicht man die kaum veränderte relative Expression der Oberflächenmarker CD83 und CD86 nach TMZ-Applikation, mit der deutlich reduzierten absoluten Zellzahl, scheint sich das Chemotherapeutikum nicht primär auf die Reifung von PBMC zu DC, sondern eher auf das Überleben der Zellen auszuwirken. Diese Vermutung konnte durch die anschließenden Vitalitätsuntersuchungen, besonders im Bereich höherer Dosen um 500 μM , bestätigt werden (siehe Kapitel 4.4).

Die abweichenden Ergebnisse zwischen Gruppe 1 und 2 waren zunächst überraschend, da die HWZ von TMZ bei physiologischem pH aufgrund von spontaner Hydrolyse nur 1,8-1,9 h beträgt^{85,96} und die Gruppen demnach dem Chemotherapeutikum eine vergleichbare Zeitdauer ausgesetzt waren. Die Tatsache, dass Bauer und Briegert *et al.* aufzeigen konnten, dass Monozyten, nicht jedoch dendritische Zellen und Makrophagen, sehr sensitiv gegenüber dem TMZ-Effekt sind, scheint eine Erklärung für dieses Phänomen zu sein^{392,393} und stimmt mit unseren Ergebnissen überein.

Im Regelfall ist O⁶-Methylguanin für die Toxizität methylierender Substanzen in proliferierenden Zellen verantwortlich⁴¹². Diese DNA-Läsion ist in dem hier verwendeten Zellsystem wahrscheinlich nicht wichtig, da die Zellen nicht proliferieren, mit Ausnahme sehr kleiner Populationen^{392,413}. Interessanterweise ist zudem die Expression der detoxifizierenden O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase in Monozyten höher als bei DC. Sie sind daher in der Lage O⁶-Methylguanin von der DNA zu entfernen⁴¹⁴. Das Basenexzisions-Reparatursystem wurde daraufhin näher untersucht und festgestellt, dass Monozyten im Gegensatz zu DC und peripheren Blutlymphozyten nicht in der Lage sind, Basenexzisions-Reparaturen durchzuführen³⁹². Monozyten fehlen die DNA-Reparaturenzyme XRCC1, Ligase III α und PARP-1, deren Expression während der Differenzierung zu dendritischen Zellen mittels GM-CSF und IL-4 gesteigert wird. Dieses Phänomen wird für den beobachteten Defekt bei Monozyten verantwortlich gemacht³⁹². Die Hypersensitivität von Monozyten bewirkt letztendlich einen Mangel an DC, was eine immense Verminderung der Immunantwort gegen den Tumor bewirken könnte⁴¹⁴. In der realen Situation am Patienten bleibt die Frage jedoch offen, inwiefern TMZ zu Alterationen im Immunsystem führt.

Vergleicht man aus PBMC generierte DC von gesunden Spendern mit denen von GBM-Patienten, so können keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR ermittelt werden³³². Jedoch konnte eine geringere Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40 bei Patienten-DC

zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im Verlauf der Behandlung gemessen werden. Eine Herabregulation von CD40 behindert die korrekte Aktivierung antigenpräsentierender Zellen³³². Dieser Mechanismus wurde bereits als Ursache von Tumor-Escape diskutiert⁴¹⁶.

Fadul *et al.* untersuchten, das periphere Blut von 25 Glioblastompatienten vor und vier Wochen nach kombinierter Radiochemotherapie und 75 mg/m² TMZ pro Tag³⁴⁵. Auch in dieser Studie war die PBMC-Zahl nicht durch die TMZ-Therapie beeinflusst worden. DC-Reifung wurde hier ebenfalls über Expressionsanalysen von Oberflächenmarkern evaluiert und eine Erhöhung von CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR sowie eine Reduktion von CD14 gemessen. Monozyten nach Standard-GBM-Therapie behielten die Fähigkeit, *ex vivo* zu dendritischen Zellen auszureifen, und könnten daher als Quelle für DC bei der Immuntherapie genutzt werden^{322,358}.

4.3.2.1 Mögliche Vorteile einer niedrigdosierten Chemotherapie

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung einer niedrigen TMZ-Dosis von 5 µM in Gruppe 1 und 2 die Tendenz zu einer vermehrten Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten DC.

Kaneno *et al.* beobachteten ebenfalls eine Stimulation der Expression von CD80 auf DC durch Vinblastin, Paclitaxel, Azacytidin, Methotrexat und Mitomycin C in geringen, nicht-zytotoxischen Dosen. Tubulotoxische Medikamente wie Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel oder Antimetaboliten wie 5-aza-2-deoxycytidin (= Decitabin) und Methotrexat bewirkten zudem eine erhöhte CD83- und CD40-Expression. Es kam in der Studie zu keiner nennenswerten Veränderung der HLA-DR- und CD86-Expression durch die getesteten Chemotherapeutika in niedriger Dosierung. Zusätzlich veränderten einige der niedrigdosierten Chemotherapeutika nicht die Vitalität humaner DC, förderten aber interessanterweise die DC-Reifung und ihr antigenpräsentierendes Potential³⁷⁸. Die Ergebnisse waren mit denen von Liu *et al.* vereinbar⁴¹⁷. Kaneno *et al.* stellten daher die These auf, dass Chemomodulation von DC durch nichtzytotoxische Dosen antineoplastischer Medikamente einen Ansatz für die Verbesserung der Funktionalität von DC darstellen könnte. Sie suggerierten sogar, dass sich dadurch die Protokolle einer *ex vivo* hergestellten DC Vakzine verbessern ließen³⁷⁸. Dies können wir für TMZ nur bedingt bestätigen, da in unseren Untersuchungen keine signifikanten Ergebnisse erbracht wurden und die

ausgeprägte Spenderheterogenität verallgemeinernde Aussagen erschwert.

Die Unterdrückung einer Immunantwort durch eine konventionelle hochdosierte Chemotherapie könnte Tumor-Escape unterstützen und so die Proliferation chemoresistenter Tumorzellen ermöglichen. Eine niedrigdosierte Therapie hingegen, würde die Entstehung einer Immunantwort gegen den Tumor unterstützen^{417,418}. Die tägliche Verabreichung niedriger Dosen erhöht zudem die Dosisintensität um den Faktor 2, ohne dabei die Toxizität zu verstärken¹¹³. Durch eine Dosisreduktion könnten folglich viele unerwünschte Nebenwirkungen von konventioneller Chemotherapie reduziert werden^{419,420}.

4.3.3 Einfluss von TMZ auf T- und B-Lymphozyten

Im Überstand der Kultur dendritischer Zellen befanden sich auch T- und B-Lymphozyten. Daher konnten sie nach TMZ-Applikation anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD3 und CD19 durchflusszytometrisch analysiert und mit Beads quantifiziert werden.

Die Reduktion der Zellzahl durch das Chemotherapeutikum war bei den Lymphozyten, insbesondere bei hohen TMZ-Konzentrationen, im Vergleich zu DC stärker ausgeprägt. In Gruppe 2 fiel, wie schon bei den dendritischen Zellen, der Effekt geringer aus als in Gruppe 1, bei welcher TMZ bereits an d 0 hinzugegeben wurde. Für die Lymphozyten konnte ebenfalls ein additiver TMZ-Effekt in Gruppe 3 bestätigt werden. Therapeutische Dosen um 50 µM reduzierten nur in Gruppe 3 die Lymphozytenzahl signifikant. Im Vergleich der Empfindlichkeit zwischen T- und B-Lymphozyten gegenüber TMZ konnte kein eindeutiger Unterschied determiniert werden.

In vivo wurde bereits mehrfach festgestellt, dass TMZ und Bestrahlung selektiv CD4⁺ Zellen reduzieren^{143,421}. In anderen Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass die Lymphozytenzahl durch TMZ-Therapie nur geringfügig gesenkt wurde³⁵⁸. In Einzelfällen blieb eine Reduktion der T-Lymphozyten durch TMZ sogar ganz aus³⁸⁹.

Eine dosisabhängige Immunmodulation wurde auch für weitere Immunzellpopulationen bzw. durch andere Chemotherapeutika berichtet. Beispielsweise könnte Cyclophosphamid nicht nur die Zahl und Proliferation regulatorischer T-Lymphozyten vermindern, sondern auch ihre Funktion beeinflussen⁴²².

In der bereits erwähnten Studie von Fadul *et al.*³⁴⁵, erzeugte TMZ eine Lymphopenie mit Reduktion der Gesamtzahl von CD4⁺ T-Lymphozyten. Demgegenüber wurden die Monozytenzahl und die CD8⁺ Population nicht signifikant verändert. Der Anteil zirkulierender T_{reg} war 4 Wochen nach Beendigung der Therapie signifikant höher, ihre absolute Zahl hingegen ließ vor und nach der Therapie keinen signifikanten Unterschied erkennen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Chiba *et al.*⁴²³. Als weitere T-Lymphozytenpopulation können CD3⁺/CD8⁺/CD56⁺ NK-Zellen sowohl eine MHC-abhängige wie auch -unabhängige Zytotoxizität induzieren und sind daher für die Tumorabwehr von Bedeutung⁴²⁴. Die absolute Zahl und relative Verteilung dieser Zellen im peripheren Blut von Glioblastompatienten war nach Radiochemotherapie signifikant niedriger³⁴⁵. T_{reg} scheinen demzufolge weniger sensitiv als sonstige T-Lymphozytenpopulationen gegenüber dem toxischem Effekt von Bestrahlung und Chemotherapie mit TMZ zu sein.

Die aus der GBM-Therapie resultierende Veränderung des Lymphozytenverhältnisses muss nicht automatisch die Immuntherapie beeinflussen. Noch ist unklar, ob eine T_{reg}-Depletion zusätzlich zur Radiochemotherapie mit TMZ den Effekt einer adjuvanten Immuntherapie verstärken könnte. Solch eine Depletion konnte bereits *in vitro* die Immunantwort der T-Lymphozyten von Glioblastompatienten verbessern²⁵³.

Interessanterweise zeigten T-Lymphozyten, die therapeutischen Dosen TMZ ausgesetzt waren, nach 7 Tagen gemischter Lymphozyten-Peptid-Kultur keine Beeinträchtigung ihrer spezifischen CD8⁺ T-Lymphozytenreaktivität und IFN- γ -Sekretion, was eine ungestörte Funktion bestätigte³³².

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf eine weitere Untersuchung der Subpopulationen von T-Lymphozyten verzichtet, da der Schwerpunkt bei den dendritischen Zellen liegen sollte.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte sind natürlich nur Auszüge dessen, was sich in dem Immunsystem abspielt und geben nur unvollständige Informationen darüber, welche Veränderungen tatsächlich in den Lymphknoten oder der Mikroumgebung des Gehirns stattfinden. Weitergehende Analysen sind unverzichtbar.

4.4 Einfluss von TMZ auf die Zellvitalität

Zur Untersuchung der Zellvitalität wurden im Rahmen dieser Arbeit Calcein- und PI-Färbungen durchgeführt und die Ergebnisse einerseits mittels Multiplate Reader und im Anschluss nach vorsichtigem Ablösen der Zellen nochmals mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 2.2.3).

4.4.1 Vitalitätsmessung mittels Calcein

Die Analyse der dosisabhängigen Zell-Vitalität von DC auf zytotoxische Effekte von Chemotherapeutika kann nicht durch einen Standard-MTT-Assay gemessen werden, da viele Medikamente in niedriger Dosierung mitochondriale Dehydrogenasen in DC aktivieren³⁷⁸. Wir wählten daher die Calcein-AM-Färbung. Sie ist ein etabliertes Protokoll für die Vitalitätsbestimmung. Calcein zeigt Esterase-Aktivität auf und identifiziert so lebende Zellen⁴²⁵⁻⁴²⁷ und hat dabei einen vernachlässigbaren Einfluss auf normale Zellfunktionen^{428,429}.

Bereits Kummrow *et al.*⁴³⁰ verglichen durchflusszytometrische Analysen mit mikroskopischer Vitalitätsquantifizierung nach Calcein-Färbung und kamen zu dem Ergebnis, dass beide Methoden vergleichbar sind. Ein Störfaktor, der beschrieben wird, ist, dass Thrombozyten ebenfalls durch Calcein angefärbt werden können. Mikroskopisch konnte jedoch weder im Rahmen unserer Untersuchungen noch durch Kummrow *et al.* eine Adhärenz von Thrombozyten an Monozyten bzw. DC festgestellt werden, sodass eine falsch positive Vitalitätsmessung unwahrscheinlich ist.

In der vorliegenden Arbeit sind die Resultate der Vitalitätsanalysen nach TMZ-Applikation vereinbar mit den erhaltenen Daten bezüglich der Anzahl dendritischer Zellen sowie T- und B-Lymphozyten. Vergleicht man die Ergebnisse der Vitalitätsmessung mittels Durchflusszytometer mit denen des Multiplate Reader, so war durchflusszytometrisch eine stärker reduzierte Vitalität messbar. Ursachen hierfür könnten die längere Vorbereitungszeit der Zellen für die Messung oder die bessere Genauigkeit des Durchflusszytometers sein. Die Zellen könnten Schaden durch das Ablösen mittels Zellschaber genommen haben, auch wenn dies mit einem sehr schonenden Verfahren geschah.

Kummrow *et al.* fanden bei mikroskopischer Untersuchung von Monozyten heraus, dass lebende Monozyten eine verstärkte Adhäsion im Vergleich zu toten aufwiesen⁴³⁰. Dieser Sachverhalt könnte auch bei DC eine Rolle spielen, sodass

fest am Boden haftende Zellen bei der Messung im Multiplate Reader ein Signal abgeben konnten, im Durchflusszytometer aber nicht mehr gemessen wurden.

Auch Briegert *et al.*^{393,414} untersuchten die Vitalität von Monozyten und unreifen DC nach 72-stündiger Inkubation mit TMZ. Sie betrug für Monozyten in der Trypanblauemessung bei 200 μM TMZ ca. 75% und bei 600 μM ca. 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung gemessen, führten bei ihnen 200 μM TMZ zu einer Apoptose von 15% und 600 μM zu einer Apoptose von 30% der Monozyten. Diese Ergebnisse sind mit den Vitalitätsanalysen von Gruppe 1 der vorliegenden Arbeit vergleichbar. TMZ an d 0 wirkte hier auch vornehmlich auf Monozyten.

Für unreife dendritische Zellen betrug die Vitalität laut Briegert *et al.* in der Trypanblauemessung sowohl bei 200 μM TMZ als auch bei 600 μM ca. 90% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung gemessen führten 200 μM TMZ zu einer Apoptose von 2,5% und 600 μM zu einer Apoptose von 5% der dendritischen Zellen. Auch diese Resultate sind mit denen in der vorliegenden Arbeit vergleichbar, insbesondere mit den Analysen von Gruppe 2, wo TMZ an d +6 auf unreife DC wirkte.

Die Doppelanalyse sowohl mittels Durchflusszytometer als auch mittels Multiplate Reader ergab keinen Informationszugewinn, daher könnte man sich bei zukünftigen Messungen auf eine Methode beschränken.

4.4.2 PI-Färbung

Initial erwarteten wir, dass die Zahl toter dendritischer Zellen mit zunehmender TMZ-Konzentration steigen würde, und führten PI-Messungen durch. Interessanterweise zeigte sich aber bei hohen TMZ-Konzentrationen bis 500 μM eine Reduktion der absoluten Zahl PI-aufnehmender Zellen.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Zellen nach dem Absterben während der langen Kulturzeit degradieren. Zudem können DC, die sich ebenfalls in der Kultur befinden, apoptotische Zellen phagozytieren. Dies könnte insbesondere der Fall sein, wenn es sich bei den toten Zellen um eine Population handelt, die am Anfang der Kulturzeit degradiert war, wie beispielsweise in Gruppe 1 der vorliegenden Arbeit. Eine Reduktion der Gesamtzahl vitaler Zellen konnte mittels Calceinfärbung bestätigt werden (siehe Kapitel 4.4.2).

Kim *et al.*⁴³¹ führten ebenfalls durchflusszytometrisch quantitative Vitalitätsmessungen mit PI an mononukleären Zellen durch und verglichen diese mit

Trypanblaufärbung und mikroskopischer Auszählung. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die durchflusszytometrischen Messungen gut geeignet und genauer waren.

4.5 Mikroskopische Analysen

Die mikroskopische Analyse der dendritischen Zellen diente lediglich der optischen Bestätigung der bereits durch andere quantitative Methoden gewonnenen Ergebnisse und nicht der absoluten Quantifizierung. Die Morphologie von reifen DC konnte in den Fotografien dargestellt werden, denn sie zeigen typischerweise multiple zytoplasmatischen Ausläufer. Diese Fortsätze sind sowohl für die Bewegung als auch für die Funktion der DC von Bedeutung, Antigene zu präsentieren und mit spezifischen T-Lymphozyten zu interagieren¹⁸².

Es konnte hier auch gezeigt werden, dass nach Inkubation mit höheren Dosen TMZ die Zellen eine veränderte Morphologie mit apoptotischen Körperchen aufwiesen und ihre Zahl vermindert war, was mit den vorgenommenen Messungen sehr gut vereinbar ist.

Zur Erfassung genauerer Daten wären immunhistochemische Methoden und Auswertung mittels Quantifizierungsprogrammen notwendig.

4.6 Funktionalität behandelter DC

Um einen Eindruck von der Funktionalität der DC nach TMZ-Applikation zu gewinnen, wurden zunächst CD14⁺ Zellen mittels magnetischer Zellsortierung isoliert und diese anschließend zu dendritischen Zellen ausgereift sowie TMZ an d 0 und Tumorlysat an d +6 hinzugegeben.

Fluoreszenzparameter, Light Scatter, Vitalität und Zellproliferation werden durch magnetische Zellsortierung nicht verändert⁴³². Die Monozytenisolation durch magnetisch markierte Antikörper (MACS®) sollte daher keinen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben. Insofern ist sie mit der Adhärenzmethode, welche für die vorhergehenden Experimente genutzt wurde, vergleichbar. Die Vitalität von Monozyten lag bei anderen Arbeitsgruppen nach Isolation durch magnetisch markierte Antikörper MACS® bei 95%⁴³⁰. Dieses Ergebnis ist mit unseren Beobachtungen vereinbar (nicht dargestellt).

Eine Kontamination der U138 Glioblastomzellen, die als Lysatquelle dienten, mit Mykoplasmen wurde durch eine PCR ausgeschlossen. Hinweise für Bakterienkontamination, welche die Ergebnisse ebenfalls verfälschen könnte, gab es zu keinem Zeitpunkt. Der optimale Herstellungsmechanismus des Lysats und

die Darbietungsweise des Tumorantigens bleiben umstritten (siehe Kapitel 4.8.1). In der vorliegenden Arbeit wurden $75 \mu\text{g}$ pro 10^6 DC genutzt, andere Autoren bevorzugten $100 \mu\text{g}$ Tumorlysat pro 10^6 DC³²¹.

Zu den reifen lysatbeladenen DC wurden an d +8 autologe Lymphozyten gegeben, die durch die DC zur Proliferation angeregt wurden. Das Verhältnis 1:10 von dendritischen Zellen zu Lymphozyten wurde gewählt, da von anderen Autoren so eine angemessene Stimulation der Lymphozyten bewirkt wurde^{321,378}. Diese gemischte Lymphozytenkultur wurde nach 3 Tagen mittels MTT-Assay analysiert. Als Kontrolle dienten DC, die nicht mit Tumorlysat inkubiert wurden, aber trotzdem zusammen mit T-Lymphozyten.

In den vorliegenden Messungen führte die vorhergehende Behandlung der DC mit TMZ zu keiner signifikanten Reduktion der Lymphozytenproliferation. Selbst hohe Konzentrationen um $500 \mu\text{M}$ führten nicht zu einem gleichartig veränderten Signal. Wie bereits zuvor war die Variabilität zwischen den Spendern sehr groß.

Kaneno *et al.* untersuchten ebenfalls die Wirkung diverser Chemotherapeutika auf die Stimulationsfähigkeit der DC in einer gemischten Lymphozytenkultur. Interessanterweise verbesserten Decitabin, Methotrexat und Mitomycin C die Fähigkeit humaner DC, allogene T-Lymphozyten zu stimulieren. Die Resultate waren, wie in der vorliegenden Arbeit, stark spender- und substanzabhängig³⁷⁸.

Jiga *et al.* beobachteten, dass das Alkylanz Mitomycin C in hohen Konzentrationen tolerante DC mit niedriger CD80- und CD86-Expression induzierte, die in einer gemischten Lymphozytenreaktion eine geringe Aktivität aufwiesen⁴³⁵. Auch Chao *et al.* berichteten, dass Doxorubicin und Vinblastin in höherer Konzentration stark spenderabhängig die antigenpräsentierende Funktion humaner DC in der MLR signifikant reduzierten, wohingegen eine relative Resistenz gegenüber Etoposid und 5-Fluorouracil bestand⁴³⁶. Dendritische Zellen scheinen demzufolge verschiedene immunbiologische Antworten in Abhängigkeit der jeweiligen Chemotherapeutika und ihrer Konzentration zu geben.

Eine genauere Methode zur Bestimmung der T-Lymphozyten-Funktion stellt die gemischte Lymphozyten-Peptid-Kultur dar. Monozyten aus dem peripheren Blut werden dabei mit den Ziel-Antigenpeptiden inkubiert. Nach Proliferation können die vermehrten antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten dann z.B. mittels Tetrameren weiter analysiert werden. Dies erfolgte auch in Kooperation mit diesem Projekt. Hohe Dosen ($500 \mu\text{M}$) Temozolomid verminderten die T-Lymphozyten-Proliferation in einer gemischten Lymphozyten-Peptid-Kultur über

8 Tage. Niedrigere Dosen im therapeutischen Bereich hingegen beeinflussten die Proliferation relevanter antigenspezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten nicht³³².

In der vorliegenden Arbeit wurde aus den Überständen der gemischten Lymphozytenkultur ein Interferon- γ ELISA zur Beurteilung der T-Lymphozyten-Aktivität durchgeführt. Eine deutliche Spenderabhängigkeit wurde erneut offensichtlich. Die INF- γ -Ausschüttung war nicht einheitlich vermindert und nach den Proliferationsanalysen der T-Lymphozyten mittels MTT auch nicht zu erwarten. In der Kontrollgruppe ohne Inkubation mit Tumorlysat war der verminderte IFN- γ -Nachweis der meisten Spender erwünscht (siehe Kapitel 4.8.1). Mit dem Anliegen, eine spezifische INF- γ -Produktion zu detektieren, führten Xu *et al.* einen ELISpot Assay durch. TMZ bis 50 μ M veränderte dabei nicht die Dichte detektierbarer Spots³³².

Im Rahmen der Kooperation mit der vorliegenden Arbeit bedienten sich Xu *et al.* zudem eines IL-12 ELISA, um die Beeinflussung der Ausschüttung des Zytokins durch DC nach TMZ-Applikation zu beurteilen. Innerhalb therapeutischer TMZ-Spiegel konnte die Arbeitsgruppe sogar eine Steigerung der IL-12p70 Ausschüttung feststellen³³².

Die Morphologie und der Phänotyp der dendritischen Zellen, die von Glioblastompatienten unter TMZ-Therapie generiert wurden, zeigten im Vergleich zu gesunden Spendern keine signifikanten Unterschiede. Daneben waren DC von GBM-Patienten unter TMZ-Therapie im FITC-Dextran-Assay funktionsfähig³³².

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* ebenfalls kein eindeutiger Anhalt für eine negative Beeinflussung der DC-Funktion durch therapeutisch dosiertes TMZ gefunden werden. Der Vergleich von Chemotherapiedosen *in vitro* und *in vivo* bleibt aufgrund der komplexen Pharmakodynamik vieler Medikamente jedoch leider begrenzt³⁷⁸.

Auch Fadul *et al.*³⁸⁸ generierten reife DC mit ihren typischen Oberflächenmarkern aus dem peripheren Blut von GBM-Patienten 3-7 Wochen nach der 6-wöchigen Radiochemotherapie. Die Phänotypanalysen und funktionellen Tests deuteten darauf hin, dass DC auch aus PBMC von GBM-Patienten generiert werden können, sogar wenn das periphere Blut unter Standardtherapie analysiert wird. In der Studie erfolgte dann in drei Sitzungen die Injektion der DC in zervikale Lymphknoten. Die DC-Vakzinierung führte trotz Bestrahlung und TMZ zu einer tumorspezifischen Immunantwort durch CD4⁺ T-Lymphozyten mit verbessertem Gesamtüberleben.

Der genaue Mechanismus, wie die Kombination aus Radiotherapie und Chemotherapie mit TMZ die Immunantwort beeinflusst, bleibt jedoch unklar³⁴⁵.

4.7 Die Kombination einer DC-Vakzinetherapie mit der Standardtherapie gegen das Glioblastoma multiforme ist sinnvoll

Es gibt viele Gründe, warum man immuntherapeutische Ansätze mit der Standardtherapie gegen das GBM kombinieren sollte^{437,438}. Eine DC-Vakzine wird gut toleriert und ist möglicherweise besonders vorteilhaft für Patienten mit minimaler Tumorlast. Sie sollte daher als Add-on-Therapie zur Standardtherapie als vierte onkologische Behandlungsmodalität in die konventionelle Therapie, bestehend aus maximaler neurochirurgischer Tumorexzision, Radiotherapie mit begleitender TMZ-Chemotherapie sowie einer TMZ-Erhaltungstherapie, integriert werden³⁵⁸.

Klinische Studien deuten darauf hin, dass eine Chemotherapie nach bzw. additiv zu einer Vakzinierung *vice versa* bei GBM-Patienten das klinische Ansprechen verstärkt. Vakzinierter Patienten, die eine Chemotherapie erhielten, zeigten signifikant längere rezidiv- bzw. progressionsfreie Überlebenszeiten und ein längeres Gesamtüberleben nach Chemotherapie als diejenigen, welche nur mit Chemotherapie behandelt wurden^{318,322,324,358,388,439-441}. Immuntherapie kann zudem die Sensitivität von Glioblastomzellen gegenüber Chemotherapeutika wie TMZ erhöhen^{358,441}.

Radiochemotherapie interferiert nicht negativ mit Immuntherapie und beide Therapiemethoden können miteinander kombiniert werden, ohne den therapeutischen Effekt eines der beiden Ansätze zu verlieren³⁵⁸.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen eine Kombinationstherapie aus TMZ mit autologer DC Immuntherapie als eine viel versprechende Therapieoption gegen das Glioblastoma multiforme.

Auch konnten präklinische und klinische Daten zeigen, dass viele andere Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid und Gemcitabin in der Lage sind, die Effektivität von Immuntherapie sogar zu verstärken^{417,442,443}. Erklärungen dafür könnten die Verstärkung der Antigenpräsentation durch den Tumor oder Veränderungen in der Tumor-Mikroumgebung sowie die Verbesserung des T-Lymphozyten-Tumorzell-Verhältnisses nach Chemotherapie sein⁴³⁷.

Durch Chemotherapie oder Bestrahlung bedingter Tumorzelltod kann einen immunadjuvanten Weg initiieren, welcher zum Erfolg von zytotoxischen Behandlungsstrategien beiträgt⁴⁴⁴. Sowohl Anthrazykline als auch alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid induzieren einen immunogenen Zelltod durch Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie TLR. Als Resultat wird die Fähigkeit von DC, den T- und B-Lymphozyten Tumorantigene von sterbenden Tumorzellen zu präsentieren, verbessert^{358,445-447}.

Die Idee der Kombination von Standard- mit immunologischen Therapieoptionen ist nicht auf die Neuroonkologie beschränkt^{448,449}. Die Gabe von Gemcitabin erhöhte beispielsweise das Überleben von Mäusen mit Pankreas-Karzinom in Kombination mit einer DC-basierten Vakzine⁴⁵⁰. In einem murinen Fibrosarkom-Modell führte eine Kombinationstherapie aus Paclitaxel und DC-Injektion zu einer kompletten Tumorrückbildung, während es bei Monotherapie mit DC bzw. Paclitaxel nur zu einer partiellen Regression kam⁴⁵¹.

Insbesondere eine moderate niedrigdosierte – metronomische – Chemotherapie, beispielsweise 10-30% der maximal tolerierten Dosis, könnte effizient mit einer Immuntherapie in Form einer dendritischen Zellvakzine kombiniert werden, um den Therapieerfolg z.B. durch Hemmung der Angiogenese zu verbessern^{378,452,453}. Letztendlich sollten Kombinationen aus toxin-, chemotherapeutikum- oder radionukleotidmarkierten monoklonalen Antikörpern mit Impfverfahren, die auf eine durch T-Lymphozyten vermittelte Immunität abzielen, als Immuntherapie gegen Malignome am wirksamsten sein¹⁸⁰ⁱ.

Zusammengefasst hat die Kombination von Neurochirurgie, Radiotherapie, Chemotherapie und Immuntherapie das Potential für eine effektive und sichere antitumorale Aktivität gegen das maligne Gliom bei minimal residuellem Tumor, wenn es in einer wohlüberlegten Gesamtstrategie angewandt wird^{144,299,358}.

4.8 Herausforderungen einer DC-Vakzine

Eine prospektive doppelblinde randomisierte Studie mit DC-Vakzinierung als experimentellem Arm, verglichen mit der Standard-Therapie, wird derzeit noch erwartet. Da aktuell solche Phase-III-Studien im Rahmen der Immuntherapie des GBM noch fehlen, ist es bis zur Einführung als Standardtherapie noch ein weiter Weg.

Momentan erfolgt die Herstellung einer DC-Vakzine für jeden Patienten individuell. In der Regel wird eine Kombination aus autologen PBMC, die *ex vivo* zu DC

differenziert werden, und dem patienteneigenen Tumorlysate verwendet. Daher ist eine Kooperation zwischen Chirurgie, Blutbank, Zellkultur, Qualitätskontrolle und Behörden unabdingbar. In der Regel ist das nur in großen akademischen medizinischen Zentren realisierbar. Eine Herausforderung wird es daher sein, die klinische Effektivität einer DC-Vakzine zu etablieren und sie für ein größeres Patientenkollektiv leichter erreichbar zu machen⁴⁵⁴.

Trotz der Tatsache, dass unser Wissen über die Glioblastom-Immunbiologie schnell wächst, ist das Verständnis der komplexen pathologischen Interaktionen in der Tumorumgebung noch immer limitiert. Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, inwiefern Tumoren die Induktion einer wirksamen Immunantwort unterdrücken können und wie Glioblastome gegenüber der körpereigenen Immunaktivität resistent werden⁴⁵⁴. Weitere Untersuchungen der tumorinduzierten Immunsuppression sind von herausragender Bedeutung. Dadurch könnten neue Wege gefunden werden, die körpereigene, gegen den Tumor gerichtete, Immunantwort zu potenzieren¹⁴⁴.

Die aktuelle Situation, in der es noch keine einheitlichen klinischen Standards bzgl. der Quelle des Tumormaterials, des optimalen Zytokincocktails für die Induktion der Differenzierung und Reifung zu DC, der zu injizierenden Zellzahl, des idealen Orts der Injektion, des sinnvollsten Vakzinierungszeitplans und der Kombination mit anderen immunmodulatorischen Therapien gibt, stellt eine weitere Hürde dar²⁹⁷. Abgestimmte *Standard Operating Procedures* für die Herstellung des Tumorlysates und der DC sind notwendig^{322,455,456}.

Die neurochirurgische subtotale Resektion muss sorgfältig geplant werden und die Verarbeitung des Zellmaterials in einem Team erfolgen, welches eine sterile Präparation des Tumors unter strengen Auflagen zur *Good Manufacturing Practice* vornimmt. Nur damit können eine gute Qualität des Tumorlysates gesichert und die Möglichkeit von sekundärer Übertragung lebender Tumorzellen reduziert werden³²⁴.

Ein weiteres generelles Problem der Vakzinierung ist die genetische Instabilität von Tumoren und der Verlust ihrer Antigene durch Mutation. Das Entkommen der Immunantwort geschieht hierbei möglicherweise infolge einer Selektion durch T-Lymphozyten, die für ein bestimmtes präsentiertes Peptid spezifisch sind^{180f}.

In Anwesenheit eines großen Tumors konnte Immuntherapie bisher aufgrund der immunsuppressiven Faktoren, die vom Tumor ausgehen, keinen durchgreifenden Erfolg erreichen^{362,363}. Die makroskopisch totale Tumoresektion ist und bleibt

daher ein wesentlicher unabhängiger Prognosefaktor bei Patienten, die eine adjuvante postoperative DC-Vakzine erhalten³²². Beim GBM ist es entscheidend die mikroskopisch kleinen verteilten Tumorausläufer, die der OP entgehen und unvermeidlich zu einem Rezidiv führen, zu eliminieren⁴⁵⁴. Dies ist offenbar durch eine DC-Vakzine grundsätzlich möglich.

Daneben sollten einheitliche Bewertungsgrundlagen für ein radiologisches Follow-up entwickelt werden, welche die Unterscheidung zwischen einem Rezidiv und einer Reaktion auf die Immuntherapie erleichtern (siehe Kapitel 1.3.4.1).

Die Heterogenität von Patienten und ihres Immunsystems lässt annehmen, dass Immunaktivierung und regulatorische Wege hoch individualisiert sind. Die Identifizierung sensitiverer und spezifischer Biomarker von Immunaktivierung würde zu besseren prognostischen Aussagen und so zu einem besseren Verständnis des Krankheitsprozesses führen. Letztendlich ergäbe sich daraus die Möglichkeit einer weiteren Therapieoptimierung⁴⁵⁷. Ideal wären Biomarker, die eine Immunantwort vorhersagen könnten und uns so helfen, Patienten zu identifizieren, die von einer Immuntherapie profitieren^{324,325,458}.

4.8.1 Antigenaufarbeitung

Eine Schlüsselrolle bei der Wirkung einer DC-Vakzine spielt die effektive Aufnahme von TAA durch DC und ihre Präsentation in Verbindung mit MHC-Komplexen. Von besonderer Bedeutung wird es daher sein, die Präparation von Tumorzellantigenen zu optimieren um ein effektives Priming naiver T-Lymphozyten bewirken⁴⁶⁰.

Trotz der Tatsache, dass mehrere Antigene für GBM beschrieben worden sind (siehe Kapitel 1.1.2.1), konnte ein universelles Tumorantigen bisher nicht identifiziert werden^{50–53,461–464}.

Eluierte Membranpeptide^{317–319}, apoptotische Körperchen nach γ -Bestrahlung³²⁰, Tumorlysat^{319,321–327} und Fusions-DC mit Tumorzellen^{307,328} wurden in der Vergangenheit genutzt, um DC zu beladen. Die Beladung von DC mit spezifischen Antigenen, die eine Schlüsselrolle in der Tumorummunologie darstellen, wurde ebenfalls evaluiert^{329–331}. Es gibt daneben die Möglichkeit, *ex vivo* DNA, die ein Tumorantigen codiert, auf dendritische Zellen zu übertragen^{180h}. Aufgrund der Heterogenität der TAA-Expression werden derzeit jedoch Tumorzelllysate als Quelle der TAA für DC-Beladung favorisiert. Die Nutzung von komplettem Tumorlysat zur Beladung von DC umgeht dieses Problem nämlich, da die

relevanten Antigene sämtlich enthalten sind. Leider ist diese Methode theoretisch mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunreaktionen assoziiert. Autoimmunität wurde im Fall der Melanomvakzinierung beschrieben⁴⁶⁵. Beim GBM wurde dieses Phänomen allerdings noch nicht beobachtet^{297,388}. Es traten lediglich leichte Nebenwirkungen wie lokaler Ausschlag und grippeähnliche Symptome auf⁴⁵⁴.

De Vleeschouwer *et al.* konnten zudem zeigen, dass T-Lymphozyten, die mit lysatbeladenen DC und Zytokinen inkubiert wurden, eine starke zytotoxische Aktivität gegen Glioblastomzellen hatten. Die Zytotoxizität fiel geringer aus, wenn sie mit unbeladenen DC und Zytokinen oder nur in Anwesenheit von Zytokinen kultiviert wurden³²¹. Auch in der vorliegenden Arbeit kam es zu einer geringeren IFN- γ Produktion durch T-Lymphozyten, wenn sie mit DC ohne Tumorlysat inkubiert wurden.

Zukünftige Studien sollten demnach klären, ob DC am besten mit Tumorlysat, HLA-restringierten Peptiden oder mRNA zu beladen sind⁴⁶⁶. Tumor-RNA ist möglicherweise eine Grundlage für DC-Immuntherapie bei GBM-Patienten ohne ausreichend entnommenes Tumorgewebe, da die RNA *ex vivo* amplifiziert werden kann. Dies ist der Fall bei Patienten mit sehr kleinen Tumoren oder Rezidiv-Glioblastomen in einem zuvor bestrahlten Gebiet. Techniken wie passive Transfektion, Lipid-vermittelte Transfektion und Elektroporation kommen hierbei zum Einsatz^{467,468}. Die aktuell vorliegenden Daten sprechen am ehesten für eine Nutzung von ganzem Tumorlysat als Antigenquelle, so wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

4.9 Ausblick auf zukünftige Entwicklungen

Aufgrund der unbefriedigenden Prognose von GBM-Patienten sollten weitere multizentrische Studien mit größeren und homogeneren Patientenkollektiven durchgeführt werden⁴⁵⁵. Definierte Einschlusskriterien und einheitliche Vakzinierungsprotokolle sind notwendig, um in der GBM-Immuntherapie Fortschritte zu verzeichnen. Zudem sind in naher Zukunft randomisierte Studien gefragt, welche vakzinierte Patienten mit einem Kontrollkollektiv vergleichen. Vorzugsweise sollte zusätzlich eine molekulare Tumoranalyse erfolgen^{297,469}. Groß angelegte Studien könnten darüber hinaus die Wirkungsevidenz einer DC-Vakzinierung beim Glioblastom fördern und dadurch die finanziellen Rahmenbedingungen für die weiterführende Forschung und die Anwendung beim Patienten verbessern⁴⁵⁴.

Beim Prostatakarzinom wurden beispielsweise bereits 3 doppelblinde Placebo-kontrollierte multizentrische Studien für eine DC-Vakzine durchgeführt und es konnte eine Steigerung des Gesamtüberlebens gezeigt werden. Aufgrund dieser Studien erlangte Sipuleucel-T aus autologen DC als erste antigenspezifische Zell-basierte Immuntherapie in den USA 2010 die Zulassung⁴⁷⁰⁻⁴⁷³.

Daneben ist es notwendig eine immunsupportive Therapie zusammen mit der Radiochemotherapie zeitlich genau zu planen, um die Immunantwort zu optimieren. Dazu ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, sichere quantitative Assays zu entwickeln, die eine vakzininduzierte Immunantwort erfassen^{356,474}. Idealerweise sollten Proben vor, während und nach der Vakzinierung analysiert und zeitgleich die klinischen Parameter bewertet werden. Die vakzininduzierte zelluläre und humorale Antwort sollte in verschiedenen Kompartimenten messtechnisch überwacht werden, insbesondere an den Vakzinierungsstellen und im Bereich des Primärtumors. Möglichkeiten dafür stellen ein Spät-Typ Hypersensitivitätstest (DTH) oder Biopsien dar (siehe Kapitel 1.3.4.1)¹⁴⁴. Diese Verfahren sind zudem wichtig, um Immunantworten, welche das normale Hirngewebe schädigen könnten, zu detektieren und zu limitieren. Nach einer Vakzinierung sollte im Rahmen einer Evaluation eine Nachsorge, bestehend aus Immunmonitoring, neuroradiologischen Untersuchungen und Analysen der Lebensqualität, durchgeführt werden⁴⁵⁵.

Zudem ist es entscheidend, die Details des Immunsystems bei einzelnen Patienten zu verstehen, da es hier offenbar sehr große interindividuelle Unterschiede gibt und nur so die Entwicklung von maßgeschneiderten Therapien ermöglicht wird, welche dann spezifisch Resistenzmechanismen überwinden könnten¹⁴⁴.

In Zukunft könnten auch weitere molekulare Tumoranalysen wie Microarray-basierte Genomanalysen und Expressionsprofile neue molekulare Eigenschaften identifizieren, die für Langzeitüberlebende bei Glioblastomen spezifisch sind³².

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Therapieoptimierung könnten Strategien sein, endogene DC zu mobilisieren und gegen Tumorantigene *in vivo* zu aktivieren. Dies kann durch Applikation von synthetischen Antigenen zusammen mit endogenen DC-Aktivatorsubstanzen wie TLR-Agonisten oder Hitzeschockproteinen möglich sein. Diese Entwicklung ist bisher jedoch noch in den Anfangsstadien⁴⁵⁴.

Zusätzlich zu den oben genannten Punkten sollten in Zukunft neue Chemotherapiekombinationen untersucht werden, um bessere kumulative Wirkungen gegen das GBM zu erzielen.

Des Weiteren sollte man im Rahmen von Studien die Monozytenzahl von Patienten genauer beobachten, wenn sie mit alkylierenden Medikamenten wie Dacarbazin, Procarbazin oder Streptozocin behandelt werden³⁹². In Anbetracht der Schlüsselrolle von Monozyten und Makrophagen bei der Immunantwort und während der Tumorthherapie ist es natürlich wünschenswert, Monozyten und von ihnen abstammende dendritische Zellen vor den Nebenwirkungen zytotoxischer Medikamente zu schützen³⁹³.

Da RT-TMZ Therapie einen Shift in Richtung Immunsuppression induziert, sollten Strategien entwickelt werden, die selektiv regulatorische Immunzellen depletieren, eine Lymphopenie vermindern, immunsuppressive Zytokine blockieren und T-Gedächtniszellen und zytotoxische T-Lymphozyten vermehren³⁴⁵.

Zudem müssen zusätzliche Behandlungsansätze entwickelt und mit einer tumorspezifischen Vakzine kombiniert werden, die die lokale immunsuppressive Umgebung von Glioblastomen durchbrechen, ohne eine Autoimmunität zu induzieren. Dies würde das Andauern einer vakzininduzierten Immunantwort verbessern und die Wahrscheinlichkeit erhöhen, alle residuellen, diffus infiltrierenden Tumorzellen zu eliminieren, sogar die RCT-resistenten CD133⁺ Glioma-Stammzellen^{144,358,479,480}.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den letzten Jahren viele Fortschritte im Bereich der Vakzinierung mit dendritischen Zellen, insbesondere beim Glioblastoma multiforme, gemacht wurden. Der Weg bis zu einer standardisierten Vakzineherstellung und Zulassung ist jedoch noch weit. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass therapeutische Level von TMZ bis zu 50 µM die Generierung dendritischer Zellen aus PBMC gesunder Spender *in vitro* nicht beeinträchtigen. Somit konnte das Anliegen der vorliegenden Arbeit erfüllt werden, durch direkte Quantifizierung und funktionelle Analysen die Zweckmäßigkeit einer Kombinationstherapie von Temozolomid und dendritischen Zellen zu bestätigen. Der Fortschritt in der GBM-Therapie sollte nach weiterführender Forschung nicht durch komplizierte Zulassungsverfahren blockiert und bei Unbedenklichkeit zeitnah einem breiten Patientenkollektiv zugänglich gemacht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastoma multiforme ist einer der aggressivsten malignen Tumoren. Das mittlere Gesamtüberleben beträgt mit der aktuellen Standardtherapie aus neurochirurgischer Tumorresektion, Radiotherapie und begleitender Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) 12-15 Monate^{29,30}. Limitierend sind häufig Rezidive, die wahrscheinlich durch Migration maligner Zellen in umliegendes Hirngewebe entstehen^{32-34,39}. Eine tumorspezifische Therapie, die die körpereigene Tumorabwehr unterstützt, wird daher dringend benötigt. Ein viel versprechender Ansatzpunkt dafür ist eine Vakzinierung mit autologen dendritischen Zellen (DC), welche mit Tumorslysate inkubiert wurden. In klinischen Studien konnte bereits mehrfach die Wirksamkeit gezeigt werden^{297,322,323,338}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von TMZ auf solch eine Vakzine *in vitro* zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte nicht nur der Reifungszustand von DC analysiert werden, sondern durch Zugabe von Latexkugeln auch ihre absolute Zahl sowie die Zahl von B- und T-Lymphozyten. Bei niedrigen Dosen TMZ (5 μM) kam es interessanterweise zu einer leicht erhöhten Zahl reifer DC, bei therapeutischen Dosen (50-100 μM) war sie stabil und reduzierte sich dann bei hohen Dosen (250-500 μM) signifikant. B- und T-Lymphozyten reagierten stärker auf Temozolomid als DC. Vitalitätsbestimmungen mittels Calcein mit zwei verschiedenen Methoden (Multiplate Reader und Durchflusszytometrie) bestätigten eine weitgehende Unbedenklichkeit von therapeutischen Dosen TMZ auf dendritische Zellen. Funktionelle Analysen mittels gemischter Lymphozytenkultur und INF- γ -ELISA aus den Kulturüberständen konnten zudem zeigen, dass TMZ die T-Lymphozytenfunktion nicht signifikant hindert.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit veranschaulicht werden, dass therapeutische Level von TMZ die Generierung funktionsfähiger dendritischer Zellen aus peripheren Blutmonozyten gesunder Spender *in vitro* nicht beeinträchtigen, so dass eine gleichzeitige Durchführung von Chemo- und Immuntherapie möglich ist. Insofern konnte ein weiterer Beitrag zur zeitnahen Einführung einer solchen multimodalen Kombinationstherapie des Glioblastoms in die Klinik geleistet werden.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: MRT-Darstellung eines malignen Hirntumors.....	1
Abb. 1.2: Pharmakokinetik von Temozolomid.....	4
Abb. 1.3: Therapieschema der EORTC-Studie.....	5
Abb. 1.4: Kaplan-Meier Überlebenskurve der EORTC-Studie.....	6
Abb. 1.5: Rolle der Methylierung des Promotors der O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase (MGMT).....	7
Abb. 1.6.: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dendritischer Zellen in verschiedenen Reifestadien.....	11
Abb. 1.7: Eigenschaften, die sich während der DC-Reifung verändern.....	13
Abb. 1.8: DC-vermittelte T-Lymphozyten-Polarisierung.....	15
Abb. 1.9: Die zentrale Rolle von DC bei der Initiierung einer Immunantwort.....	16
Abb. 1.10: Prinzip der aktiven Immunisierung mittels einer dendritischen Zellvakzine.....	20
Abb. 1.11: Erste klinische Studie einer DC-Vakzine beim primär diagnostizierten Glioblastoma multiforme.....	24
Abb. 1.12: Radiologisches Follow-up eines Patienten mit rezidiviertem Glioblastom unter Therapie mit einer DC-Vakzine.....	25
Abb. 2.1: Prinzip der Ficoll-Paque Dichtegradienten-Zentrifugation.....	32
Abb. 2.2: Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
Abb. 2.3: Standardpunktdiagramm einer durchflusszytometrischen Analyse.....	37
Abb. 2.4: Isotypkontrolle am Beispiel der Oberflächenmarker CD83 und CD86.....	37
Abb. 2.5: Calcein-Färbung zur Vitalitätsbestimmung.....	38
Abb. 2.6: Ablauf von der Isolierung von PBMC bis zu den Versuchen.....	40
Abb. 2.7: Prinzip der magnetischen Zellsortierung.....	44
Abb. 2.8: Prinzip des double-Antibody Sandwich ELISA.....	47
Abb. 2.9: Ablauf der Arbeitsschritte für eine gemischte Zellkultur von DC und Lymphozyten und deren Analysen.....	48
Abb. 3.1: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC vor Adhärenz.....	49
Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC nach Adhärenz.....	50
Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von CD83 und CD86 an d +8 nach TMZ-Applikation an d 0.....	51
Abb. 3.4: Exemplarische durchflusszytometrische Messung von CD83 und CD86 mithilfe von Latexkugeln nach TMZ-Applikation.....	52

Abb. 3.5: Durchflusszytometrische Analyse von CD83 und CD86 nach TMZ- Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	54
Abb. 3.6: Durchflusszytometrische Analyse von der Expression von CD3 und CD19	55
Abb. 3.7: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 und CD19 an d +8 nach TMZ-Applikation an d 0	56
Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 und CD19 nach TMZ-Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	58
Abb. 3.9: Exemplarische durchflusszytometrische Messung von Calcein und PI ..	60
Abb. 3.10: Calcein-Färbung mittels Multiplate Reader und durchflusszytometrische Analyse mit Beads an d +8	62
Abb. 3.11: Reife dendritische Zellen in Kulturmedium	63
Abb. 3.12: Fotografien reifer dendritischen Zellen nach May-Grünwald-Giemsa- Färbung	64
Abb. 3.13: Fotografie nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung	65
Abb. 3.14: Gelelektrophorese nach Mykoplasmen-PCR	65
Abb. 3.15: Extinktionswerte von MTT-Assays nach gemischter Zellkultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten	66
Abb. 3.16: Erstellen einer Eichgerade zur Proteinquantifizierung	67
Abb. 3.17: Interferon- γ ELISA	68

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben der EORTC-Studie.....	6
Tabelle 1.2: Effekt der Promotormethylierung der O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase auf das Überleben unter Temozolomidtherapie.....	7
Tabelle 1.3: Übersicht über ausgewählte zelluläre Moleküle, deren Lokalisation und Funktion.....	14
Tabelle 2.1: Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung.....	30
Tabelle 2.2: Zytokine für die DC-Generierung.....	30
Tabelle 2.3: Farbstoffe für die durchflusszytometrischen Messungen.....	35
Tabelle 2.4: Parameter des Mikroplatten Reader Tecan Infinite® 200 zur Calcein-Messung.....	39
Tabelle 2.5: Primer für den Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR.....	42
Tabelle 2.6: Standardansatz für den Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR.....	42
Tabelle 2.7: Standardreaktionsbedingungen für die Mykoplasmen-PCR.....	42

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dresemann G: Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther* 2010, 3:139–146.
2. Stupp R, Roila F: Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009, 20 Suppl 4:126–128.
3. Bondy M, Scheurer M, Malmer B, Barnholtz-Sloan J, Davis F, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy B, Rajaraman P, Schwartzbaum J, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels J, Wrensch M, Buffler P: Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 2008, 113:1953–1968.
4. Tamber M, Rutka J: Pediatric supratentorial high-grade gliomas. *Neurosurg Focus* 2003, 14:e1.
5. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Schwartz AG: Relative survival rates and patterns of diagnosis analyzed by time period for individuals with primary malignant brain tumor, 1973-1997. *J Neurosurg* 2003, 99:458–466.
6. Ohgaki H, Kleihues P: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, 64:479–489.
7. Eoli M, Menghi F, Bruzzone M, De S, Valletta L, Pollo B, Bissola L, Silvani A, Bianchessi D, D'Incerti L, Filippini G, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G: Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res* 2007, 13:2606–2613.
8. Lobera A, Zee C, Coombs B, Robert K: *Imaging in Glioblastoma Multiforme*. Medscape Reference.
9. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B: The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995, 332:839–847.
10. Kleihues P, Schauble B, Zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H: Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 1997, 150:1–13.
11. Pelloski C, Ballman K, Furth A, Zhang L, Lin E, Sulman E, Bhat K, McDonald J, Yung W, Colman H, Woo S, Heimberger A, Suki D, Prados M, Chang S, Barker F, Buckner J, James C, Aldape K: Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol* 2007, 25:2288–2294.
12. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992, 359:845–848.
13. Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD: Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer* 1995, 60:168–173.
14. Carapancea M, Alexandru O, Fetea A, Dragutescu L, Castro J, Georgescu A, Popa-Wagner A, Backlund M, Lewensohn R, Dricu A: Growth factor receptors signaling in glioblastoma cells: therapeutic implications. *J Neurooncol* 2009, 92:137–147.
15. Jain R, di T, Duda D, Loeffler J, Sorensen A, Batchelor T: Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007, 8:610–622.

16. Schlehofer B, Hettinger I, Ryan P, Blettner M, Preston-Martin S, Little J, Arslan A, Ahlbom A, Giles GG, Howe GR, Menegoz F, Rodvall Y, Choi WN, Wahrendorf J: Occupational risk factors for low grade and high grade glioma: results from an international case control study of adult brain tumours. *Int J Cancer* 2005, 113:116–125.
17. Zheng T, Cantor KP, Zhang Y, Chiu BC, Lynch CF: Risk of brain glioma not associated with cigarette smoking or use of other tobacco products in Iowa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10:413–414.
18. Huncharek M, Kupelnick B, Wheeler L: Dietary cured meat and the risk of adult glioma: a meta-analysis of nine observational studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003, 22:129–137.
19. Lee M, Wrensch M, Miike R: Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes Control* 1997, 8:13–24.
20. Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, Ahlbom A, Choi WN, Giles GG, Howe GR, Little J, Menegoz F, Ryan P: Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer* 1999, 82:155–160.
21. Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M: History of allergies among adults with glioma and controls. *Int J Cancer* 2002, 98:609–615.
22. Theriault G, Goldberg M, Miller AB, Armstrong B, Guenel P, Deadman J, Imbernon E, To T, Chevalier A, Cyr D: Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada, and France: 1970-1989. *Am J Epidemiol* 1994, 139:550–572.
23. INTERPHONE Study Group: Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol* 2010, 39:675–694.
24. Cardis E, Armstrong BK, Bowman JD, Giles GG, Hours M, Krewski D, McBride M, Parent ME, Sadetzki S, Woodward A, Brown J, Chetrit A, Figuerola J, Hoffmann C, Jarus-Hakak A, Montestrucq L, Nadon L, Richardson L, Villegas R, Vrijheid M: Risk of brain tumours in relation to estimated RF dose from mobile phones: results from five Interphone countries. *Occup Environ Med* 2011, 68:631–640.
25. Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Shapiro WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Loeffler JS, Linet MS: Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* 2001, 344:79–86.
26. Brustle O, Ohgaki H, Schmitt HP, Walter GF, Ostertag H, Kleihues P: Primitive neuroectodermal tumors after prophylactic central nervous system irradiation in children. Association with an activated K-ras gene. *Cancer* 1992, 69:2385–2392.
27. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD: Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991, 325:1330–1336.
28. Cavenee WK: High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 2000, 92:1080–1081.
29. Stupp R, Mason W, van d, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger K, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J, Eisenhauer E, Mirimanoff R: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352:987–996.

30. Stupp R, Hegi M, Mason W, van d, Taphoorn M, Janzer R, Ludwin S, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes A, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht C, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross J, Mirimanoff R: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009, 10:459–466.
31. Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, Desideri S, Nabors LB, Rosenfeld M, Fisher J: Survival of Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Treated with Radiation and Temozolomide in Research Studies in the United States. *Clinical Cancer Research* 2010, 16:2443–2449.
32. Krex D, Klink B, Hartmann C, von D, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach J, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G: Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007, 130:2596–2606.
33. Smith JS, Jenkins RB: Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 2000, 5:D213-31.
34. Claes A, Idema A, Wesseling P: Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 2007, 114:443–458.
35. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P: Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann Neurol* 1999, 46:183–188.
36. Song K, Phi J, Cho B, Wang K, Lee J, Kim D, Kim I, Ahn H, Park S, Kim S: Long-term outcomes in children with glioblastoma. *J Neurosurg Pediatr* 2010, 6:145–149.
37. Wolff J, Classen CF, Wagner S, Kortmann R, Palla S, Pietsch T, Kuhl J, Gnekow A, Kramm C: Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J Neurooncol* 2008, 87:155–164.
38. Estlin EJ, Lashford L, Ablett S, Price L, Gowing R, Gholkar A, Kohler J, Lewis IJ, Morland B, Pinkerton CR, Stevens MC, Mott M, Stevens R, Newell DR, Walker D, Dicks-Mireaux C, McDowell H, Reidenberg P, Statkevich P, Marco A, Batra V, Dugan M, Pearson AD: Phase I study of temozolomide in paediatric patients with advanced cancer. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Br J Cancer* 1998, 78:652–661.
39. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC: Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 1995, 15:211–221.
40. Hart M, Grant R, Garside R, Rogers G, Somerville M, Stein K: Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD007415.
41. Nieder C, Grosu AL, Molls M: A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev* 2000, 26:397–409.
42. Sanai N, Berger M: Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 2008, 62:753-64; discussion 264-6.
43. Stummer W, van d, Westphal M: Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien)* 2011, 153:1211–1218.
44. Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, JR, Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER: Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA* 2005, 293:557–564.

45. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O, Zanella F, Reulen H: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006, 7:392–401.
46. Chang S, Barker F: Marital status, treatment, and survival in patients with glioblastoma multiforme: a population based study. *Cancer* 2005, 104:1975–1984.
47. Burger PC, Green SB: Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987, 59:1617–1625.
48. Curran WJ, JR, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE: Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:704–710.
49. Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ: Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome. *J Neurosurg* 1993, 78:767–775.
50. McLendon RE, Wikstrand CJ, Matthews MR, Al-Baradei R, Bigner SH, Bigner DD: Glioma-associated antigen expression in oligodendroglial neoplasms. Tenascin and epidermal growth factor receptor. *J Histochem Cytochem* 2000, 48:1103–1110.
51. Kurpad SN, Zhao XG, Wikstrand CJ, Batra SK, McLendon RE, Bigner DD: Tumor antigens in astrocytic gliomas. *Glia* 1995, 15:244–256.
52. Ventimiglia JB, Wikstrand CJ, Ostrowski LE, Bourdon MA, Lightner VA, Bigner DD: Tenascin expression in human glioma cell lines and normal tissues. *J Neuroimmunol* 1992, 36:41–55.
53. 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* 2003, 99:738–745.
54. Okada H, Lieberman F, Walter K, Lunsford L, Kondziolka D, Bejjani G, Hamilton R, Torres-Trejo A, Kalinski P, Cai Q, Mabold J, Edington H, Butterfield L, Whiteside T, Potter D, Schold S, Pollack I: Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med* 2007, 5:67.
55. Chi DD, Merchant RE, Rand R, Conrad AJ, Garrison D, Turner R, Morton DL, Hoon DS: Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol* 1997, 150:2143–2152.
56. Dunn G, Dunn I, Curry W: Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immun* 2007, 7:12.
57. Liu G, Khong H, Wheeler C, Yu J, Black K, 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* 2003, 26:301–312.
58. Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler C, Black K, Yu J: HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res* 2004, 64:4980–4986.
59. Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM: Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 1999, 5:335–341.
60. Liu G, Black KL, Yu JS: Sensitization of malignant glioma to chemotherapy through dendritic cell vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2006, 5:233–247.

61. Hatano M, Eguchi J, Tatsumi T, Kuwashima N, Dusak JE, Kinch MS, Pollack IF, Hamilton RL, Storkus WJ, Okada H: EphA2 as a glioma-associated antigen: a novel target for glioma vaccines. *Neoplasia* 2005, 7:717–722.
62. Schmitz M, Wehner R, Stevanovic S, Kiessling A, Rieger MA, Temme A, Bachmann M, Rieber EP, Weigle B: Identification of a naturally processed T cell epitope derived from the glioma-associated protein SOX11. *Cancer Lett* 2007, 245:331–336.
63. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000, 343:1350–1354.
64. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000, 60:2368–2371.
65. Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de T, Weller M, Kros J, Hainfellner J, Mason W, Mariani L, Bromberg J, Hau P, Mirimanoff R, Cairncross J, Janzer R, Stupp R: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352:997–1003.
66. Hiesiger EM, Hayes RL, Pierz DM, Budzilovich GN: Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). *J Neurooncol* 1993, 16:93–104.
67. Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM: Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, 34:809–815.
68. Etienne MC, Formento JL, Lebrun-Frenay C, Gioanni J, Chatel M, Paquis P, Bernard C, Courdi A, Bensadoun RJ, Pignol JP, Francoual M, Grellier P, Frenay M, Milano G: Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. *Clin Cancer Res* 1998, 4:2383–2390.
69. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Pronin I: Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J Clin Pathol* 1999, 52:574–580.
70. Quan AL, Barnett GH, Lee S, Vogelbaum MA, Toms SA, Staugaitis SM, Prayson RA, Peereboom DM, Stevens GHJ, Cohen BH, Suh JH: Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 63:695–703.
71. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre J, Hoang-Xuan K, Sanson M: Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* 2006, 106:2218–2223.
72. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB: PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1246–1256.

73. Chen Y, Hakin-Smith V, Teo M, Xinarianos GE, Jellinek DA, Carroll T, McDowell D, MacFarlane MR, Boet R, Baguley BC, Braithwaite AW, Reddel RR, Royds JA: Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Res* 2006, 66:6473–6476.
74. Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, Beck M, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U: Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* 2001, 101:311–320.
75. Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, Makino K, Kochi M, Saya H, Kuratsu J, Ushio Y: Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer* 2002, 95:249–257.
76. Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BKA, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M: Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res* 2005, 65:4051–4058.
77. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004, 64:6892–6899.
78. Carson K, Grossman S, Fisher J, Shaw E: Prognostic factors for survival in adult patients with recurrent glioma enrolled onto the new approaches to brain tumor therapy CNS consortium phase I and II clinical trials. *J Clin Oncol* 2007, 25:2601–2606.
79. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna G, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martini M, Maira G, Larocca L, De M: Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008, 14:8205–8212.
80. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke B, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende C: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008, 14:123–129.
81. Ridolfi R, Romanini A, Sileni V, Michiara M, Guida M, Biasco G, Poletti P, Amaducci L, Leoni M, Ravaioli A: Temozolomide and interferon-alpha in metastatic melanoma: a phase II study of the Italian Melanoma Intergroup. *Melanoma Res* 2004, 14:295–299.
82. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N: Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000, 18:158–166.
83. Agarwala S, Kirkwood J, Gore M, Dreno B, Thatcher N, Czarnetski B, Atkins M, Buzaid A, Skarlos D, Rankin E: Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2004, 22:2101–2107.
84. Biasco G, Pantaleo MA, Casadei S: Treatment of brain metastases of malignant melanoma with temozolomide. *N Engl J Med* 2001, 345:621–622.
85. Brada M, Judson I, Beale P, Moore S, Reidenberg P, Statkevich P, Dugan M, Batra V, Cutler D: Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br J Cancer* 1999, 81:1022–1030.

86. O'Reilly SM, Newlands ES, Glaser MG, Brampton M, Rice-Edwards JM, Illingworth RD, Richards PG, Kennard C, Colquhoun IR, Lewis P: Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours. *Eur J Cancer* 1993, 29A:940–942.
87. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C: Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 1997, 23:35–61.
88. Quinn J, Reardon D, Friedman A, Rich J, Sampson J, Provenzale J, McLendon R, Gururangan S, Bigner D, Herndon J, Avgeropoulos N, Finlay J, Tourt-Uhlig S, Affronti M, Evans B, Stafford-Fox V, Zaknoen S, Friedman H: Phase II trial of temozolomide in patients with progressive low-grade glioma. *J Clin Oncol* 2003, 21:646–651.
89. Levin N, Lavon I, Zelikovitch B, Fuchs D, Bokstein F, Fellig Y, Siegal T: Progressive low-grade oligodendrogliomas: response to temozolomide and correlation between genetic profile and O6-methylguanine DNA methyltransferase protein expression. *Cancer* 2006, 106:1759–1765.
90. Pace A, Vidiri A, Galie E, Carosi M, Telera S, Cianciulli AM, Canalini P, Giannarelli D, Jandolo B, Carapella CM: Temozolomide chemotherapy for progressive low-grade glioma: clinical benefits and radiological response. *Ann Oncol* 2003, 14:1722–1726.
91. Dziadziuszko R, Ardizzoni A, Postmus PE, Smit EF, Price A, Debruyne C, Legrand C, Giaccone G: Temozolomide in patients with advanced non-small cell lung cancer with and without brain metastases. a phase II study of the EORTC Lung Cancer Group (08965). *Eur J Cancer* 2003, 39:1271–1276.
92. Antonadou D, Paraskevaidis M, Sarris G, Coliarakis N, Economou I, Karageorgis P, Throuvalas N: Phase II randomized trial of temozolomide and concurrent radiotherapy in patients with brain metastases. *J Clin Oncol* 2002, 20:3644–3650.
93. Ebert BL: Use of Temozolomide with Other Cytotoxic Chemotherapy in the Treatment of Patients with Recurrent Brain Metastases from Lung Cancer. *The Oncologist* 2003, 8:69–75.
94. Park DM, Shah DD, Egorin MJ, Beumer JH: Disposition of temozolomide in a patient with glioblastoma multiforme after gastric bypass surgery. *J Neurooncol* 2009, 93:279–283.
95. Riccardi A, Mazzarella G, Cefalo G, Garrè ML, Massimino M, Barone C, Sandri A, Ridola V, Ruggiero A, Mastrangelo S, Iazzareschi I, Caldarelli M, Maira G, Madon E, Riccardi R: Pharmacokinetics of temozolomide given three times a day in pediatric and adult patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2003, 52:459–464.
96. Baker SD, Wirth M, Statkevich P, Reidenberg P, Alton K, Sartorius SE, Dugan M, Cutler D, Batra V, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK: Absorption, metabolism, and excretion of ¹⁴C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 1999, 5:309–317.
97. Marzolini C, Decosterd LA, Shen F, Gander M, Leyvraz S, Bauer J, Buclin T, Biollaz J, Lejeune F: Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, 42:433–440.

98. Diez BD, Statkevich P, Zhu Y, Abutarif MA, Xuan F, Kantesaria B, Cutler D, Cantillon M, Schwarz M, Pallotta MG, Ottaviano FH: Evaluation of the exposure equivalence of oral versus intravenous temozolomide. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, 65:727–734.
99. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA: NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994, 33:9045–9051.
100. Tsang LL, Quarterman CP, Gescher A, Slack JA: Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991, 27:342–346.
101. Hickman JA, Stevens MF, Gibson NW, Langdon SP, Fizames C, Lavelle F, Atassi G, Lunt E, Tilson RM: Experimental antitumor activity against murine tumor model systems of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (mitozolomide), a novel broad-spectrum agent. *Cancer Res* 1985, 45:3008–3013.
102. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA: Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 1987, 47:5846–5852.
103. Tsang LL, Farmer PB, Gescher A, Slack JA: Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990, 26:429–436.
104. Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA, Margison GP: Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer* 1993, 67:1299–1302.
105. Hickman MJ, Samson LD: Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:10764–10769.
106. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B: Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 2007, 26:186–197.
107. D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J: Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* 1998, 54:334–341.
108. van Rijn J, Heimans JJ, van den Berg J, van der Valk P, Slotman BJ: Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, 47:779–784.
109. Wedge SR, Porteous JK, Glaser MG, Marcus K, Newlands ES: In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs* 1997, 8:92–97.
110. Chakravarti A, Erkkinen M, Nestler U, Stupp R, Mehta M, Aldape K, Gilbert M, Black P, Loeffler J: Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clin Cancer Res* 2006, 12:4738–4746.
111. Essex Pharma GmbH: Temodal. Wissenschaftliche Produktinformation, 2006.

112. Portnow J, Badie B, Chen M, Liu A, Blanchard S, Synold T: The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2009, 15:7092–7098.
113. Brock CS, Newlands ES, Wedge SR, Bower M, Evans H, Colquhoun I, Roddie M, Glaser M, Brampton MH, Rustin GJ: Phase I trial of temozolomide using an extended continuous oral schedule. *Cancer Res* 1998, 58:4363–4367.
114. Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E: Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol* 2001, 2:552–560.
115. Brandes A, Franceschi E: Primary brain tumors in the elderly population. *Curr Treat Options Neurol* 2011, 13:427–435.
116. Chamberlain M, Chalmers L: A pilot study of primary temozolomide chemotherapy and deferred radiotherapy in elderly patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2007, 82:207–209.
117. Iwamoto F, Cooper A, Reiner A, Nayak L, Abrey L: Glioblastoma in the elderly: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Experience (1997-2007). *Cancer* 2009, 115:3758–3766.
118. Minniti G, De S, Muni R, Rasio D, Lanzetta G, Bozzao A, Osti MF, Salvati M, Valeriani M, Cantore GP, Maurizi E: Hypofractionated radiotherapy followed by adjuvant chemotherapy with temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2009, 91:95–100.
119. Chinot O, Barrie M, Frauger E, Dufour H, Figarella-Branger D, Palmari J, Braguer D, Hoang-Xuan K, Moktari K, Peragut J, Martin P, Grisoli F: Phase II study of temozolomide without radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme in an elderly populations. *Cancer* 2004, 100:2208–2214.
120. Brandes A, Vastola F, Basso U, Berti F, Pinna G, Rotilio A, Gardiman M, Scienza R, Monfardini S, Ermani M: A prospective study on glioblastoma in the elderly. *Cancer* 2003, 97:657–662.
121. Glantz M, Chamberlain M, Liu Q, Litofsky N, Recht L: Temozolomide as an alternative to irradiation for elderly patients with newly diagnosed malignant gliomas. *Cancer* 2003, 97:2262–2266.
122. Jen JF, Cutler DL, Pai SM, Batra VK, Affrime MB, Zambas DN, Heft S, Hajian G: Population pharmacokinetics of temozolomide in cancer patients. *Pharm Res* 2000, 17:1284–1289.
123. MacConnachie AM: Temozolomide (Temodal) for treatment of primary brain tumours. *Intensive Crit Care Nurs* 2000, 16:59–60.
124. Taphoorn M, Stupp R, Coens C, Osoba D, Kortmann R, van d, Mason W, Mirimanoff R, Baumert B, Eisenhauer E, Forsyth P, Bottomley A: Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2005, 6:937–944.
125. Stupp R, Dietrich P, Ostermann K, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de T, Mirimanoff R, Leyvraz S: Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002, 20:1375–1382.
126. Roa W: Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2004, 22:1583–1588.

127. Charfi S, Ayadi L, Khabir A, Daoud E, Kallel R, Kharrat O, Mnif Z, Boudawara Z, Makni S, Boudawara T: Gliosarcoma with osteosarcomatous features: a short illustrated review. *Acta Neurochir* 2009, 151:809–813.
128. Stupp R, Hegi M, Gilbert M, Chakravarti A: Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 2007, 25:4127–4136.
129. Wick W, Steinbach JP, Kuker WM, Dichgans J, Bamberg M, Weller M: One week on/one week off: a novel active regimen of temozolomide for recurrent glioblastoma. *Neurology* 2004, 62:2113–2115.
130. Wick A, Felsberg J, Steinbach J, Herrlinger U, Platten M, Blaschke B, Meyermann R, Reifenberger G, Weller M, Wick W: Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *J Clin Oncol* 2007, 25:3357–3361.
131. Liu L, Tavema P, Whitacre CM: Pharmacologic Disruption of Base Excision Repair Sensitizes Mismatch Repair-deficient and -proficient Colon Cancer Cells to Methylating Agents. *Clinical Cancer Research* 1999:2908–2917.
132. Yoshino A, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Naruse N, Sano E, Tsumoto K: Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *Int J Oncol* 2010, 36:1367–1377.
133. Gerson SL: MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:296–307.
134. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA: Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 1986, 7:745–749.
135. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Benjamin E: Repair of O6-alkylguanine during DNA synthesis in murine bone marrow hematopoietic precursors. *Cancer Res* 1987, 47:89–95.
136. Wiestler O, Kleihues P, Pegg AE: O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors. *Carcinogenesis* 1984, 5:121–124.
137. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999, 59:793–797.
138. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman AJ, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin OM, Provenzale JM, Bigner DD, Haglund MM, Friedman AH, Modrich PL: DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* 1998, 16:3851–3857.
139. Hegi M, Diserens A, Godard S, Dietrich P, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van M, de T, Stupp R: Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004, 10:1871–1874.
140. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, Schulman S, Knudson HM, Belanich M, Yarosh DB, Bearman SI, Giroux DJ, Schold SC: Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998, 16:3310–3315.

141. Criniere E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre J, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M: MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *J Neurooncol* 2007, 83:173–179.
142. Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier A: Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother* 2009, 58:1627–1634.
143. Su YB, Sohn S, Krown S, Livingston P, Wolchok J, Quinn C, Williams L, Foster T, Sepkowitz K, Chapman P: Selective CD4+ lymphopenia in melanoma patients treated with temozolomide: a toxicity with therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2004, 22:610–616.
144. Grauer O, Wesseling P, Adema G: Immunotherapy of diffuse gliomas: biological background, current status and future developments. *Brain Pathol* 2009, 19:674–693.
145. Glas M, Happold C, Rieger J, Wiewrodt D, Bahr O, Steinbach J, Wick W, Kortmann R, Reifenberger G, Weller M, Herrlinger U: Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *J Clin Oncol* 2009, 27:1257–1261.
146. Westphal M, Hilt D, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke P, Whittle I, Jaaskelainen J, Ram Z: A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003, 5:79–88.
147. Wolff J, Berrak S, Koontz W, Zhang M: Nitrosourea efficacy in high-grade glioma: a survival gain analysis summarizing 504 cohorts with 24193 patients. *J Neurooncol* 2008, 88:57–63.
148. Van den Bent M, Brandes A, Rampling R, Kouwenhoven M, Kros J, Carpentier A, Clement P, Frenay M, Campone M, Baurain J, Armand J, Taphoorn M, Tosoni A, Kletzl H, Klughammer B, Lacombe D, Gorlia T: Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* 2009, 27:1268–1274.
149. Stewart LA: Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002, 359:1011–1018.
150. Prados M, Yung A, Fine H, Greenberg H, Junck L, Chang S, Nicholas K, Robins I, Mehta M, Fink K, Jaeckle K, Kuhn J, Hess K, Schold C: Phase 2 study of BCNU and temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme: North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncol* 2004, 6:33–37.
151. Raizer J, Malkin M, Kleber M, Abrey L: Phase 1 study of 28-day, low-dose temozolomide and BCNU in the treatment of malignant gliomas after radiation therapy. *Neuro Oncol* 2004, 6:247–252.
152. Silvani A, Eoli M, Salmaggi A, Lamperti E, Maccagnano E, Broggi G, Boiardi A: Phase II trial of cisplatin plus temozolomide, in recurrent and progressive malignant glioma patients. *J Neurooncol* 2004, 66:203–208.
153. Chen T, Su S, Fry D, Liebes L: Combination therapy with irinotecan and protein kinase C inhibitors in malignant glioma. *Cancer* 2003, 97:2363–2373.
154. Korones DN, Benita-Weiss M, Coyle TE, Mechtler L, Bushunow P, Evans B, Reardon DA, Quinn JA, Friedman H: Phase I study of temozolomide and escalating doses of oral etoposide for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 2003, 97:1963–1968.

155. Nicholas M, Lukas R, Jafri N, Faoro L, Salgia R: Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 2006, 12:7261–7270.
156. Prados M, Chang S, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, Kabuubi P, Ayers-Ringler J, Rabbitt J, Page M, Fedoroff A, Sneed P, Berger M, McDermott M, Parsa A, Vandenberg S, James D, Lamborn K, Stokoe D, Haas-Kogan D: Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:579–584.
157. Dresemann G, Weller M, Rosenthal MA, Wedding U, Wagner W, Engel E, Heinrich B, Mayer-Steinacker R, Karup-Hansen A, Fluge O, Nowak A, Mehdorn M, Schleyer E, Krex D, Olver IN, Steinbach JP, Hosius C, Sieder C, Sorenson G, Parker R, Nikolova Z: Imatinib in combination with hydroxyurea versus hydroxyurea alone as oral therapy in patients with progressive pretreated glioblastoma resistant to standard dose temozolomide. *J Neurooncol* 2010, 96:393–402.
158. Miralbell R, Mornex F, Greiner R, Bolla M, Storme G, Hulshof M, Bernier J, Denekamp J, Rojas AM, Pierart M, van G, Mirimanoff RO: Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide in glioblastoma multiforme: report of European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 22933. *J Clin Oncol* 1999, 17:3143–3149.
159. Medical Research Council Brain Tumor Working Party: Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol* 2001, 19:509–518.
160. van den Bent MJ: Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Improves Progression-Free Survival but Not Overall Survival in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendrogliomas and Oligoastrocytomas: A Randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24:2715–2722.
161. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J, Bernsen HJJA, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WNM, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K: Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Follow-Up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2012.
162. Hau P, Baumgart U, Pfeifer K, Bock A, Jauch T, Dietrich J, Fabel K, Grauer O, Wismeth C, Klinkhammer-Schalke M, Allgauer M, Schuierer G, Koch H, Schlaier J, Ulrich W, Brawanski A, Bogdahn U, Steinbrecher A: Salvage therapy in patients with glioblastoma: is there any benefit? *Cancer* 2003, 98:2678–2686.
163. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP: Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993, 71:2585–2597.
164. Quinn J, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan E, Delaney S, Vredenburgh J, Rich J, Friedman A, Reardon D, Sampson J, Pegg A, Moschel R, Birch R, McLendon R, Provenzale J, Gururangan S, Dancey J, Maxwell J, Tourt-Uhlig S, Herndon J, Bigner D, Friedman H: Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2005, 23:7178–7187.

165. Quinn J, Jiang S, Reardon D, Desjardins A, Vredenburgh J, Rich J, Gururangan S, Friedman A, Bigner D, Sampson J, McLendon R, Herndon J, Walker A, Friedman H: Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* 2009, 27:1262–1267.
166. Vredenburgh J, Desjardins A, Herndon J, Dowell J, Reardon D, Quinn J, Rich J, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner D, Friedman A, Friedman H: Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007, 13:1253–1259.
167. Batchelor T, Sorensen G, di Tomaso E, Zhang W, Duda D, Cohen K, Kozak K, Cahill D, Chen P, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala M, Plotkin S, Drappatz J, Louis D, Ivy P, Scadden D, Benner T, Loeffler J, Wen P, Jain R: AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007, 11:83–95.
168. Kreisl T, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, Garren N, Mackey M, Butman J, Camphausen K, Park J, Albert P, Fine H: Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:740–745.
169. Omuro A, Faivre S, Raymond E: Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 2007, 6:1909–1919.
170. Wen P, Kesari S: Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008, 359:492–507.
171. Boskovitz A, Wikstrand C, Kuan C, Zalutsky M, Reardon D, Bigner D: Monoclonal antibodies for brain tumour treatment. *Expert Opin Biol Ther* 2004, 4:1453–1471.
172. Kunwar S: Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir Suppl* 2003, 88:105–111.
173. Weaver M, Laske D: Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol* 2003, 65:3–13.
174. Nam D, Park K, Park C, Im Y, Kim M, Lee S, Hong S, Shin H, Kim J, Eoh W, McDonnell TJ: Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol Rep* 2004, 11:263–268.
175. Schonthal AH: Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: implications for glioma therapy. *Neurosurg Focus* 2006, 20:E21.
176. Reardon D, Fink K, Mikkelsen T, Cloughesy T, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer J, Rich K, Schiff D, Shapiro W, Burdette-Radoux S, Dropcho E, Wittemer S, Nippgen J, Picard M, Nabors L: Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2008, 26:5610–5617.
177. Reardon D, Nabors L, Stupp R, Mikkelsen T: Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17:1225–1235.

178. Stupp R, Hegi M, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement P, Grabenbauer G, Ochsenbein A, Simon M, Dietrich P, Pietsch T, Hicking C, Tonn J, Diserens A, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M: Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010, 28:2712–2718.
179. Kaal E, Vecht C: The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* 2004, 16:593–600.
180. Murphy K, Travers P, Walport M: *Janeway Immunologie*. 7.Auflage, Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag, 2009.
a: S. 9-14, b: S. 430, c: S. 419, d: S. 424-426, e: S. 537-540, f: S.852-853, g: S. 865, h: S. 955, i: S. 862
181. Crane C, Han S, Barry J, Ahn B, Lanier L, Parsa A: TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 2010, 12:7–13.
182. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392:245–252.
183. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig P, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay J, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005, 202:1075–1085.
184. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG: B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001, 2:1126–1132.
185. Wang H, Wang R: Antigen-specific CD4+ regulatory T cells in cancer: implications for immunotherapy. *Microbes Infect* 2005, 7:1056–1062.
186. Steinman RM, Nussenzweig MC: Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev* 1980, 53:127–147.
187. Porgador A, Snyder D, Gilboa E: Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 1996, 156:2918–2926.
188. Rescigno M, Winzler C, Delia D, Mutini C, Lutz M, Ricciardi-Castagnoli P: Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *J Leukoc Biol* 1997, 61:415–421.
189. Steinmann RM in Paul W: *Fundamental immunology*, Lippincott-Raven, 1999.
190. Rock KL, Clark K: Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol* 1996, 156:3721–3726.
191. Rock KL, Gamble S, Rothstein L: Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 1990, 249:918–921.
192. Clarke SR: The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol* 2000, 67:607–614.
193. Dredge K, Marriott J, Todryk S, Dalglish A: Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2002, 51:521–531.

194. Levitsky HI, Lazenby A, Hayashi RJ, Pardoll DM: In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression. *J Exp Med* 1994, 179:1215–1224.
195. Tanaka H, Shimizu K, Hayashi T, Shu S: Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells. *Cell Immunol* 2002, 220:1–12.
196. Dhodapkar K, Cirignano B, Chamian F, Zagzag D, Miller D, Finlay J, Steinman R: Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. *Int J Cancer* 2004, 109:893–899.
197. Basse PH, Whiteside TL, Chambers W, Herberman RB: Therapeutic activity of NK cells against tumors. *Int Rev Immunol* 2001, 20:439–501.
198. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995, 182:389–400.
199. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM: Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993, 178:479–488.
200. Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M: Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993, 23:1595–1601.
201. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993, 178:509–519.
202. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ: Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997, 158:4229–4236.
203. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995, 375:151–155.
204. 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* 1994, 179:1109–1118.
205. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van K, Durand I, Banchereau J: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994, 180:1263–1272.
206. Flores-Romo L, Bjorck P, Duvert V, Van K, Saeland S, Banchereau J: CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med* 1997, 185:341–349.
207. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P: Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997, 185:317–328.

208. Buelens C, Verhasselt V, De G, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1997, 27:1848–1852.
209. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992, 176:1693–1702.
210. Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K: Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1996, 184:2185–2196.
211. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:767–811.
212. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J: B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994, 180:1841–1847.
213. Granelli-Piperno A, Pope M, Inaba K, Steinman RM: Coexpression of NF-kappa B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:10944–10948.
214. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM: High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997, 186:665–672.
215. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ: Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996, 183:87–97.
216. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP: Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996, 183:317–322.
217. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, DeLeo AB: Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995, 1:1297–1302.
218. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996, 2:52–58.
219. Bhardwaj N, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM: Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 1994, 94:797–807.
220. Bender A, Bui LK, Feldman MA, Larsson M, Bhardwaj N: Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med* 1995, 182:1663–1671.
221. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998, 392:86–89.

222. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De I, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer E, Littman D, Lang R: In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002, 17:211–220.
223. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I: Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997, 388:787–792.
224. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A: Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997, 388:782–787.
225. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996, 184:747–752.
226. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G: High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996, 184:741–746.
227. Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A: In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997, 186:1819–1829.
228. Trinchieri G: Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 1993, 14:335–338.
229. O'Garra A: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998, 8:275–283.
230. Banerjee D, Dhodapkar M, Matayeva E, Steinman R, Dhodapkar K: Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 2006, 108:2655–2661.
231. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH: Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000, 192:1213–1222.
232. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman R: Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003, 198:235–247.
233. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y: TRANCE (tumor necrosis factor TNF-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997, 186:2075–2080.
234. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997, 390:175–179.
235. Steinman R: Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Found Symp* 2006, 279:101-9; discussion 109-13, 216-9.
236. Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van K, Briere F, Banchereau J, Caux C: Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997, 185:941–951.
237. Walker P, Calzascia T, Dietrich P: All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology* 2002, 107:28–38.

238. Walker P, Calzascia T, de T, Dietrich P: T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Res Brain Res Rev* 2003, 42:97–122.
239. Roszman T, Elliott L, Brooks W: Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunol Today* 1991, 12:370–374.
240. Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ: Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 1996, 6:275–288.
241. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner N, Toscano M, Ilarregui J, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer O, Rabinovich G: Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004, 5:241–251.
242. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss E, Melms A, Weller M: A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 2002, 168:4772–4780.
243. Wischhusen J, Friese M, Mittelbronn M, Meyermann R, Weller M: HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, 64:523–528.
244. Wilmotte R, Burkhardt K, Kindler V, Belkouch M, Dussex G, Tribolet N, Walker P, Dietrich P: B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *Neuroreport* 2005, 16:1081–1085.
245. Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H: Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 2003, 63:7462–7467.
246. Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de T, Heid I, Fontana A: Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol* 1989, 143:3222–3229.
247. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA: Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1995, 55:727–730.
248. Buccoliero AM, Caldarella A, Gheri CF, Taddei A, Paglierani M, Pepi M, Mennonna P, Taddei GL: Inducible cyclooxygenase (COX-2) in glioblastoma--clinical and immunohistochemical (COX-2-VEGF) correlations. *Clin Neuropathol* 2006, 25:59–66.
249. Grant RS, Naif H, Espinosa M, Kapoor V: IDO induction in IFN-gamma activated astroglia: a role in improving cell viability during oxidative stress. *Redox Rep* 2000, 5:101–104.
250. Nitta T, Hishii M, Sato K, Okumura K: Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme. *Brain Res* 1994, 649:122–128.
251. El A, Lesniak M: An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2006, 8:234–243.
252. Jacobs J, Idema A, Bol K, Nierkens S, Grauer O, Wesseling P, Grotenhuis J, Hoogerbrugge P, de V, Adema G: Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro Oncol* 2009, 11:394–402.

253. Fecci P, Mitchell D, Whitesides J, Xie W, Friedman A, Archer G, Herndon J, Bigner D, Dranoff G, Sampson J: Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2006, 66:3294–3302.
254. Carson M, Doose J, Melchior B, Schmid C, Ploix C: CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 2006, 213:48–65.
255. Cserr HF, DePasquale M, Harling-Berg CJ, Park JT, Knopf PM: Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF-administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *J Neuroimmunol* 1992, 41:195–202.
256. Matyszak MK, Perry VH: The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 1996, 74:599–608.
257. McMahon E, Bailey S, Miller S: CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int* 2006, 49:195–203.
258. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H: Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001, 124:480–492.
259. Weller R, Djuanda E, Yow H, Carare R: Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* 2009, 117:1–14.
260. Ransohoff R, Kivisakk P, Kidd G: Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:569–581.
261. Hochmeister S, Zeitelhofer M, Bauer J, Nicolussi E, Fischer M, Heinke B, Selzer E, Lassmann H, Bradl M: After injection into the striatum, in vitro-differentiated microglia- and bone marrow-derived dendritic cells can leave the central nervous system via the blood stream. *Am J Pathol* 2008, 173:1669–1681.
262. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999, 5:405–411.
263. Ling C, Sandor M, Fabry Z: In situ processing and distribution of intracerebrally injected OVA in the CNS. *J Neuroimmunol* 2003, 141:90–98.
264. Serafini B, Columba-Cabezas S, Di R, Aloisi F: Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2000, 157:1991–2002.
265. Calzascia T, Masson F, Di B, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Ruegg C, Dietrich P, Walker P: Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 2005, 22:175–184.
266. Calzascia T, Di B, Wilmotte R, Masson F, de T, Dietrich P, Walker P: Cutting edge: cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain. *J Immunol* 2003, 171:2187–2191.
267. Wekerle H: T-cell autoimmunity in the central nervous system. *Intervirology* 1993, 35:95–100.
268. Masson F, Calzascia T, Di B, de T, Dietrich P, Walker P: Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8+ T cells. *J Immunol* 2007, 179:845–853.

269. Gordon LB, Knopf PM, Cserr HF: Ovalbumin is more immunogenic when introduced into brain or cerebrospinal fluid than into extracerebral sites. *J Neuroimmunol* 1992, 40:81–87.
270. Itano A, McSorley S, Reinhardt R, Ehst B, Ingulli E, Rudensky A, Jenkins M: Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003, 19:47–57.
271. Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z: Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004, 173:2353–2361.
272. Fischer HG, Reichmann G: Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 2001, 166:2717–2726.
273. Olson J, Miller S: Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004, 173:3916–3924.
274. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R: Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:6295–6300.
275. McMahan E, Bailey S, Castenada C, Waldner H, Miller S: Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005, 11:335–339.
276. Miller S, McMahan E, Schreiner B, Bailey S: Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1103:179–191.
277. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB: Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 1987, 74:269–277.
278. Safdari H, Hochberg FH, Richardson E: Prognostic value of round cell (lymphocyte) infiltration in malignant gliomas. *Surg Neurol* 1985, 23:221–226.
279. Safdari H, Hochberg FH, Richardson E: Histological correlations with survival in malignant gliomas. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1979, 28:485–488.
280. Heimberger A, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang D, Sun W, Qiao W, Hiraoka N, Fuller G: Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res* 2008, 14:5166–5172.
281. Wersall P, Ohlsson I, Biberfeld P, Collins VP, von K, Larsson S, Mellstedt H, Boethius J: Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother* 1997, 44:157–164.
282. Boethius J, Blomgren H, Collins VP, Greitz T, Strander H: The effect of systemic human interferon-alpha administration to patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 1983, 68:239–251.
283. Farkkila M, Jaaskelainen J, Kallio M, Blomstedt G, Raininko R, Virkkunen P, Paetau A, Sarelin H, Mantyla M: Randomised, controlled study of intratumoral recombinant gamma-interferon treatment in newly diagnosed glioblastoma. *Br J Cancer* 1994, 70:138–141.
284. Merchant RE, McVicar DW, Merchant LH, Young HF: Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant interleukin-2 alone or in combination with systemic interferon-alpha. Results of a phase I clinical trial. *J Neurooncol* 1992, 12:75–83.

285. Yoshida J, Wakabayashi T, Mizuno M, Sugita K, Yoshida T, Hori S, Mori T, Sato T, Karashima A, Kurisu K: Clinical effect of intra-arterial tumor necrosis factor-alpha for malignant glioma. *J Neurosurg* 1992, 77:78–83.
286. Yung WK, Prados M, Levin VA, Fetell MR, Bennett J, Mahaley MS, Salzman M, Eteubanas E: Intravenous recombinant interferon beta in patients with recurrent malignant gliomas: a phase I/II study. *J Clin Oncol* 1991, 9:1945–1949.
287. Grauer O, Suttmüller R, van M, Jacobs J, Bennink E, Toonen L, Nierkens S, Adema G: Elimination of regulatory T cells is essential for an effective vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells in a murine glioma model. *Int J Cancer* 2008, 122:1794–1802.
288. Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ: Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:4645–4649.
289. Quattrocchi KB, Miller CH, Cush S, Bernard SA, Dull ST, Smith M, Gudeman S, Varia MA: Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 1999, 45:141–157.
290. Saris SC, Spiess P, Lieberman DM, Lin S, Walbridge S, Oldfield EH: Treatment of murine primary brain tumors with systemic interleukin-2 and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Neurosurg* 1992, 76:513–519.
291. Blancher A, Roubinet F, Grancher AS, Tremoulet M, Bonate A, Delisle MB, Calot JP, Pourreau C, Franks C, Ducos J: Local immunotherapy of recurrent glioblastoma multiforme by intracerebral perfusion of interleukin-2 and LAK cells. *Eur Cytokine Netw* 1993, 4:331–341.
292. Dillman R, Duma C, Schiltz P, DePriest C, Ellis R, Okamoto K, Beutel L, De L, Chico S: Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother* 2004, 27:398–404.
293. Kitahara T, Watanabe O, Yamaura A, Makino H, Watanabe T, Suzuki G, Okumura K: Establishment of interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line specific for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor. *J Neurooncol* 1987, 4:329–336.
294. Kruse CA, Cepeda L, Owens B, Johnson SD, Stears J, Lillehei KO: Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1997, 45:77–87.
295. Plautz GE, Miller DW, Barnett GH, Stevens GH, Maffett S, Kim J, Cohen PA, Shu S: T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2209–2218.
296. Wood GW, Holladay FP, Turner T, Wang YY, Chiga M: A pilot study of autologous cancer cell vaccination and cellular immunotherapy using anti-CD3 stimulated lymphocytes in patients with recurrent grade III/IV astrocytoma. *J Neurooncol* 2000, 48:113–120.
297. Van Gool S, Maes W, Ardon H, Verschuere T, Van Cauter S, De Vleeschouwer S: Dendritic cell therapy of high-grade gliomas. *Brain Pathol* 2009, 19:694–712.
298. Gilboa E: DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007, 117:1195–1203.

299. Kim T, Kim C, Park J, Park S, Kim CK, Chung D, Hong Y: Immunological Factors Relating to the Antitumor Effect of Temozolomide Chemoimmunotherapy in a Murine Glioma Model. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009, 17:143–153.
300. Okada H, Lieberman F, Edington H, Witham T, Wargo M, Cai Q, Elder E, Whiteside T, Schold S, Pollack I: Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: preliminary observations in a patient with a favorable response to therapy. *J Neurooncol* 2003, 64:13–20.
301. Steiner H, Bonsanto M, Beckhove P, Brysch M, Geletneky K, Ahmadi R, Schuele-Freyer R, Kremer P, Ranaie G, Matejic D, Bauer H, Kiessling M, Kunze S, Schirmacher V, Herold-Mende C: Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol* 2004, 22:4272–4281.
302. 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* 1996, 196:137–151.
303. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N: A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997, 90:3640–3646.
304. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Saint-Vis B de, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996, 184:695–706.
305. Szabolcs P, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW: Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood* 1996, 87:4520–4530.
306. Insug O, Ku G, Ertl H, Blaszczyk-Thurin M: A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002, 22:613–621.
307. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan J, Kufe D, Ohno T: Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother* 2004, 27:452–459.
308. Yamanaka R, Tsuchiya N, Yajima N, Honma J, Hasegawa H, Tanaka R, Ramsey J, Blaese RM, Xanthopoulos KG: Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered Semliki Forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin-12. *J Neurosurg* 2003, 99:746–753.
309. Barba D, Saris SC, Holder C, Rosenberg SA, Oldfield EH: Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J Neurosurg* 1989, 70:175–182.
310. Hayes RL, Koslow M, Hiesiger EM, Hymes KB, Hochster HS, Moore EJ, Pierz DM, Chen DK, Budzilovich GN, Ransohoff J: Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 1995, 76:840–852.

311. Fujita M, Zhu X, Ueda R, Sasaki K, Kohanbash G, Kastenhuber E, McDonald H, Gibson G, Watkins S, Muthuswamy R, Kalinski P, Okada H: Effective immunotherapy against murine gliomas using type 1 polarizing dendritic cells--significant roles of CXCL10. *Cancer Res* 2009, 69:1587–1595.
312. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P: alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004, 64:5934–5937.
313. Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, Pohla H, Kremmer E, Bigalke I, Schendel DJ: Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007, 5:18.
314. Grauer O, Poschl P, Lohmeier A, Adema GJ, Bogdahn U: Toll-like receptor triggered dendritic cell maturation and IL-12 secretion are necessary to overcome T-cell inhibition by glioma-associated TGF-beta2. *J Neurooncol* 2007, 82:151–161.
315. Moser M: Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity* 2003, 19:5–8.
316. Prins R, Craft N, Bruhn K, Khan-Farooqi H, Koya R, Stripecke R, Miller J, Liao L: The TLR-7 agonist, imiquimod, enhances dendritic cell survival and promotes tumor antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity. *J Immunol* 2006, 176:157–164.
317. Liao LM, Black KL, Martin NA, Sykes SN, Bronstein JM, Jouben-Steele L, Mischel PS, Belldegrun A, Cloughesy TF: Treatment of a patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides. *Case Report. Neurosurg Focus* 2000, 9:e8.
318. Liao L, Prins R, Kiertscher S, Odesa S, Kremen T, Giovannone A, Lin J, Chute D, Mischel P, Cloughesy T, Roth M: 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* 2005, 11:5515–5525.
319. Yu J, Liu G, Ying H, Yong W, Black K, Wheeler C: Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2004, 64:4973–4979.
320. Walker D, Laherty R, Tomlinson F, Chuah T, Schmidt C: Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy. *J Clin Neurosci* 2008, 15:114–121.
321. De Vleeschouwer S, Arredouani M, Ade M, Cadot P, Vermassen E, Ceuppens J, Van Gool S: Uptake and presentation of malignant glioma tumor cell lysates by monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:372–382.
322. De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, Van Calenbergh F, Van Loon J, Goffin J, Sciot R, Wilms G, Demaerel P, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Wolff J, Wagner S, Kaempgen E, Van Gool S: Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008, 14:3098–3104.
323. Rutkowski S, De Vleeschouwer S, Kaempgen E, Wolff JE, Kuhl J, Demaerel P, Warmuth-Metz M, Flamen P, Van Calenbergh F, Plets C, Sorensen N, Opitz A, Van Gool S: Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *Br J Cancer* 2004, 91:1656–1662.

324. Wheeler C, Black K, Liu G, Mazer M, Zhang X, Pepkowitz S, Goldfinger D, Ng H, Irvin D, Yu J: Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res* 2008, 68:5955–5964.
325. Wheeler C, Black K, Liu G, Ying H, Yu J, Zhang W, Lee P: Thymic CD8+ T cell production strongly influences tumor antigen recognition and age-dependent glioma mortality. *J Immunol* 2003, 171:4927–4933.
326. 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* 2003, 89:1172–1179.
327. 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* 2005, 11:4160–4167.
328. 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* 2001, 50:337–344.
329. Ciesielski M, Kozbor D, Castanaro C, Barone T, Fenstermaker R: Therapeutic effect of a T helper cell supported CTL response induced by a survivin peptide vaccine against murine cerebral glioma. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:1827–1835.
330. Wu A, Xiao J, Anker L, Hall W, Gregerson D, Cavenee W, Chen W, Low W: Identification of EGFRvIII-derived CTL epitopes restricted by HLA A0201 for dendritic cell based immunotherapy of gliomas. *J Neurooncol* 2006, 76:23–30.
331. Ciesielski M, Apfel L, Barone T, Castro C, Weiss T, Fenstermaker R: Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1491–1503.
332. Xu X, Stockhammer F, Schmitt A, Casalegno-Garduno R, Enders A, Mani J, Classen CF, Linnebacher M, Freund M, Schmitt M: Therapeutical doses of temozolomide do not impair the function of dendritic cells and CD8+ T cells. *Int J Oncol* 2012, 40(3):764-72
333. Yoshida S, Morii K, Watanabe M, Saito T, Yamamoto K, Tanaka R: The generation of anti-tumoral cells using dendritic cells from the peripheral blood of patients with malignant brain tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50:321–327.
334. Okada H, Tahara H, Shurin MR, Attanucci J, Giezeman-Smits KM, Fellows WK, Lotze MT, Chambers WH, Bozik ME: Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms. *Int J Cancer* 1998, 78:196–201.
335. Siesjo P, Visse E, Sjogren HO: Cure of established, intracerebral rat gliomas induced by therapeutic immunizations with tumor cells and purified APC or adjuvant IFN-gamma treatment. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996, 19:334–345.
336. Maes W, Rosas GG, Verbinnen B, Boon L, De Vleeschouwer S, Ceuppens J, Van Gool S: DC vaccination with anti-CD25 treatment leads to long-term immunity against experimental glioma. *Neuro Oncol* 2009, 11:529–542.

337. Maes W, Deroose C, Reumers V, Krylyshkina O, Gijssbers R, Baekelandt V, Ceuppens J, Debyser Z, Van Gool SW: In vivo bioluminescence imaging in an experimental mouse model for dendritic cell based immunotherapy against malignant glioma. *J Neurooncol* 2009, 91:127–139.
338. De Vleeschouwer S, Rapp M, Sorg R, Steiger H, Stummer W, Van G, Sabel M: Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery* 2006, 59:988-99; discussion 999-1000.
339. Kim C, Woo S, Park J, Kim H, Park M, Park S, Hong Y, Kim T: Enhanced antitumor immunity by combined use of temozolomide and TAT-survivin pulsed dendritic cells in a murine glioma. *Immunology* 2007, 122:615–622.
340. Park S, Kim C, Kim C, Park J, Sohn H, Hong Y, Kim T: Cross-priming by temozolomide enhances antitumor immunity of dendritic cell vaccination in murine brain tumor model. *Vaccine* 2007, 25:3485–3491.
341. Kjaergaard J, Wang L, Kuriyama H, Shu S, Plautz G: Active immunotherapy for advanced intracranial murine tumors by using dendritic cell-tumor cell fusion vaccines. *J Neurosurg* 2005, 103:156–164.
342. Tsugawa T, Kuwashima N, Sato H, Fellows-Mayle WK, Dusak JE, Okada K, Papworth GD, Watkins SC, Gambotto A, Yoshida J, Pollack IF, Okada H: Sequential delivery of interferon-alpha gene and DCs to intracranial gliomas promotes an effective antitumor response. *Gene Ther* 2004, 11:1551–1558.
343. Kuwashima N, Nishimura F, Eguchi J, Sato H, Hatano M, Tsugawa T, Sakaida T, Dusak J, Fellows-Mayle W, Papworth G, Watkins S, Gambotto A, Pollack I, Storkus W, Okada H: Delivery of dendritic cells engineered to secrete IFN-alpha into central nervous system tumors enhances the efficacy of peripheral tumor cell vaccines: dependence on apoptotic pathways. *J Immunol* 2005, 175:2730–2740.
344. Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G: Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002, 32:3235–3245.
345. Fadul CE, Fisher JL, Gui J, Hampton TH, Cote AL, Ernstoff MS: Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2011, 13:393–400.
346. Binder R, Srivastava P: Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2005, 6:593–599.
347. Shi Y, Evans J, Rock K: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003, 425:516–521.
348. Skoberne M, Beignon A, Bhardwaj N: Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* 2004, 10:251–257.
349. Grauer O, Nierkens S, Bennink E, Toonen L, Boon L, Wesseling P, Suttmuller R, Adema G: CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int J Cancer* 2007, 121:95–105.
350. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E: Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996, 184:465–472.

351. Erdmann M, Dorrie J, Schaft N, Strasser E, Hendelmeier M, Kampgen E, Schuler G, Schuler-Thurner B: Effective clinical-scale production of dendritic cell vaccines by monocyte elutriation directly in medium, subsequent culture in bags and final antigen loading using peptides or RNA transfection. *J Immunother* 2007, 30:663–674.
352. Saito R, Mizuno M, Nakahara N, Tsuno T, Kumabe T, Yoshimoto T, Yoshida J: Vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells augments the effect of IFN-beta gene therapy for malignant glioma in an experimental mouse intracranial glioma. *Int J Cancer* 2004, 111:777–782.
353. Heese O, Schmidt M, Nickel S, Berger H, Goldbrunner R, Tonn JC, Bhar O, Steinbach JP, Simon M, Schramm J, Krex D, Schackert G, Reithmeier T, Nikkhah G, Loffler M, Weller M, Westphal M: Complementary therapy use in patients with glioma: an observational study. *Neurology* 2010, 75:2229–2235.
354. Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN, Lee PK, Yong WH, Incardona F, Thompson RC, Riedinger MS, Zhang W, Prins RM, Black KL: Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 2001, 61:842–847.
355. De Vleeschouwer S, Van Calenbergh F, Demaerel P, Flamen P, Rutkowski S, Kaempgen E, Wolff J, Plets C, Sciote R, Van Gool S: 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* 2004, 100:492–497.
356. Tuybaerts S, Aerts J, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A: Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1513–1537.
357. Jouanneau E, Poujol D, Gulia S, Le M, Blay JY, Belin MF, Puisieux I: Dendritic cells are essential for priming but inefficient for boosting antitumor immune response in an orthotopic murine glioma model. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:254–267.
358. Ardon H, Van Gool S, Lopes I, Maes W, Sciote R, Wilms G, Demaerel P, Bijttebier P, Claes L, Goffin J, Van Calenbergh F, De Vleeschouwer S: Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study. *J Neurooncol* 2010, 99:261–272.
359. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken U, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003, 198:615–621.
360. Nair S, McLaughlin C, Weizer A, Su Z, Boczkowski D, Dannull J, Vieweg J, Gilboa E: Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation. *J Immunol* 2003, 171:6275–6282.
361. Prins R, Shu C, Radu C, Vo D, Khan-Farooqi H, Soto H, Yang M, Lin M, Shelly S, Witte O, Ribas A, Liao L: Anti-tumor activity and trafficking of self, tumor-specific T cells against tumors located in the brain. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:1279–1289.
362. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, Rong H, Chen J, Wang XY, Catino JJ, King I: Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996, 184:579–584.

363. Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten D, Schachner M, Fontana A: Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* 1992, 148:1404–1410.
364. Macdonald DR, Cascino TL, Schold S, Cairncross JG: Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990, 8:1277–1280.
365. Lesterhuis WJ, Aarntzen E, De V, Schuurhuis DH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ: Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol* 2008, 66:118–134.
366. Di C, Scarabino T, Trojsi F, Popolizio T, Catapano D, Giannatempo G, Bonavita S, Portaluri M, Tosetti M, d'Angelo V, Salvolini U, Tedeschi G: Proton MR spectroscopy of cerebral gliomas at 3 T: spatial heterogeneity, and tumour grade and extent. *Eur Radiol* 2008, 18:1727–1735.
367. Gruber S, Stadlbauer A, Mlynarik V, Gatterbauer B, Roessler K, Moser E: Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in brain tumor diagnosis. *Neurosurg Clin N Am* 2005, 16:101-14, vi.
368. Oh J, Henry R, Pirzkall A, Lu Y, Li X, Catalaa I, Chang S, Dillon W, Nelson S: Survival analysis in patients with glioblastoma multiforme: predictive value of choline-to-N-acetylaspartate index, apparent diffusion coefficient, and relative cerebral blood volume. *J Magn Reson Imaging* 2004, 19:546–554.
369. Provenzale J, Mukundan S, Barboriak D: Diffusion-weighted and perfusion MR imaging for brain tumor characterization and assessment of treatment response. *Radiology* 2006, 239:632–649.
370. Hirai T, Murakami R, Nakamura H, Kitajima M, Fukuoka H, Sasao A, Akter M, Hayashida Y, Toya R, Oya N, Awai K, Iyama K, Kuratsu J, Yamashita Y: Prognostic value of perfusion MR imaging of high-grade astrocytomas: long-term follow-up study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008, 29:1505–1510.
371. Price S, Jena R, Burnet N, Carpenter TA, Pickard J, Gillard J: Predicting patterns of glioma recurrence using diffusion tensor imaging. *Eur Radiol* 2007, 17:1675–1684.
372. Weller M, Stupp R: Approval of new drugs for glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 2009, 22:617–618.
373. Jahnke A: Charakterisierung Tumor-infiltrierender B-Zell-Klone des Kolorektalen Karzinoms. Diplomarbeit. Rostock, August / 2010.
374. Li L, Giannopoulos K, Reinhardt P, Tabarkiewicz J, Schmitt A, Greiner J, Rolinski J, Hus I, Dmoszynska A, Wiesneth M, Schmitt M: Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol* 2006, 28:855–861.
375. Li L, Reinhardt P, Schmitt A, Barth TF, Greiner J, Ringhoffer M, Dohner H, Wiesneth M, Schmitt M: Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:685–693.
376. Schmitt A, Li L, Giannopoulos K, Greiner J, Reinhardt P, Wiesneth M, Schmitt M: Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Transfusion* 2008, 48:861–870.
377. Li L, Schmitt A, Reinhardt P, Greiner J, Ringhoffer M, Vaida B, Bommer M, Vollmer M, Wiesneth M, Dohner H, Schmitt M: Reconstitution of CD40 and CD80 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Immun* 2003, 3:8.

378. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin: Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med* 2009, 7:58.
379. Rahman M: Introduction to Flow Cytometry. AbD Serotec 2006:7.
380. Bangen P: Untersuchung zur Expression des Hitze-Schock Proteins 70 in Monozyten bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Dissertation. Münster, 2003.
381. Harms I: Einfluss flüchtiger bakterieller Metabolite auf tierische Zellen. Dissertation. Rostock, April / 2009.
382. Yikrazuul: Calcein-AM, 2007. <http://it.wikipedia.org/wiki/File:Calcein-AM.png>. Accessed 7 February 2013.
383. BD: BD Product Catalog. Product Number 353502, 2011. <http://catalog.bd.com/bdCat/viewProduct.doCustomer?productNumber=353502>. Accessed 7 February 2013.
384. Namvong R: Calcein-AM, 2009. <http://calceinam.wikispaces.com/>. Accessed 4 June 2011.
385. Sysmex: Die Theorie des Färbeprotokolls der Sysmex SP-Serie, 2006. http://www.sysmex.de/files/articles/Xtra_SP_1000d.pdf. Accessed 7 February 2013.
386. Bernas T, Dobrucki J: Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002, 47:236–242.
387. Berridge MV, Tan AS, McCOY K, Wang R: The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 1996:S. 14–19.
388. Fadul C, Fisher J, Hampton T, Lallana E, Li Z, Gui J, Szczepiorkowski Z, Tosteson T, Rhodes C, Wishart H, Lewis L, Ernstoff M: Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. *J Immunother* 2011, 34:382–389.
389. Heimberger AB, Sun W, Hussain SF, Dey M, Crutcher L, Aldape K, Gilbert M, Hassenbusch SJ, Sawaya R, Schmittling B, Archer GE, Mitchell DA, Bigner DD, Sampson JH: Immunological responses in a patient with glioblastoma multiforme treated with sequential courses of temozolomide and immunotherapy: Case study. *Neuro-Oncology* 2008, 10:98–103.
390. Prins RM, Soto H, Konkankit V, Odesa SK, Eskin A, Yong WH, Nelson SF, Liao LM: Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2011, 17:1603–1615.
391. Maes W, Gool SW: Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother* 2011, 60:153–160.
392. Bauer M, Goldstein M, Heylmann D, Kaina B, Jacobs R: Human Monocytes Undergo Excessive Apoptosis following Temozolomide Activating the ATM/ATR Pathway While Dendritic Cells and Macrophages Are Resistant. *PLoS ONE* 2012, 7:e39956.
393. Briegert M, Kaina B: Human Monocytes, but not Dendritic Cells Derived from Them, Are Defective in Base Excision Repair and Hypersensitive to Methylating Agents. *Cancer Research* 2007, 67:26–31.
394. Asavaroengchai W: Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, 99:931–936.

395. Baccala R, Gonzalez-Quintial R, Dummer W, Theofilopoulos AN: Tumor immunity via homeostatic T cell proliferation: mechanistic aspects and clinical perspectives. *Springer Semin Immun* 2005, 27:75–85.
396. Hu H, Poehlein CH, Urba WJ, Fox BA: Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts. *Cancer Res* 2002, 62:3914–3919.
397. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Aqui N, Badros A, Cotte J, Chrisley L, Veloso E, Zheng Z, Westphal S, Mair R, Chi N, Ratterree B, Pochran MF, Natt S, Hinkle J, Sickles C, Sohal A, Ruehle K, Lynch C, Zhang L, Porter DL, Luger S, Guo C, Fang H, Blackwelder W, Hankey K, Mann D, Edelman R, Frasch C, Levine BL, Cross A, June CH: Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nat Med* 2005, 11:1230–1237.
398. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27:3135–3142.
399. Saito A, Narita M, Yokoyama A, Watanabe N, Tochiki N, Satoh N, Takizawa J, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Shinada S, Takahashi M: Enhancement of anti-tumor cytotoxicity of expanded gammadelta T Cells by stimulation with monocyte-derived dendritic cells. *J Clin Exp Hematop* 2007, 47:61–72.
400. Levine B, Mizushima N, Virgin HW: Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011, 469:323–335.
401. Barnett, Granger, Whitby, Storie, Reilly: Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward. *Br J Haematol* 1999, 106:1059–1062.
402. O’Gorman MRG, Nicholson JKA: Adoption of Single-Platform Technologies for Enumeration of Absolute T-Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood. *Clinical and Vaccine Immunology* 2000, 7:333–335.
403. Cao F, Xu L, Peng B, Xie Q, Uzan G, Zhang D: A routinely applicable way for using FCM in cell enumeration with CFSE-labeled CellBeads as internal standard. *Cytometry* 2009, 75:975–978.
404. Strauss K, Hannel I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, Jinguji MG, Valinsky J, Barnett D, Orfao A, Kestens L: Performance evaluation of the FACSCount System: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 1996, 26:52–59.
405. Nicholson JK, Stein D, Mui T, Mack R, Hubbard M, Denny T: Evaluation of a method for counting absolute numbers of cells with a flow cytometer. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997, 4:309–313.
406. Nantakomol D, Nuchnoi P, Noulsri E, Lerdwana S, Krisin S, Chanprasert S, Pattanapanyasat K: Enumeration of the absolute CD4 T-lymphocyte count by cell-bead assay. *Cytometry* 2010:n/a.
407. Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Noulsri E, Lerdwana S, Sukapirom K, Siritanaratkul N, Fucharoen S: Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia. *Br J Haematol* 2007, 136:462–471.
408. Pattanapanyasat K, Noulsri E, Fucharoen S, Lerdwana S, Lamchiagdhas P, Siritanaratkul N, Webster HK: Flow cytometric quantitation of red blood cell vesicles in thalassaemia. *Cytometry* 2004, 57:23–31.
409. Montes M, Jaensson EA, Orozco AF, Lewis DE, Corry DB: A general method for bead-enhanced quantitation by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2006, 317:45–55.

410. Anton PA, Ibarrondo FJ, Boscardin WJ, Zhou Y, Schwartz EJ, Ng HL, Hausner MA, Shih R, Elliott J, Hultin PM, Hultin LE, Price C, Fuerst M, Adler A, Wong JT, Yang OO, Jamieson BD: Differential immunogenicity of vaccinia and HIV-1 components of a human recombinant vaccine in mucosal and blood compartments. *Vaccine* 2008, 26:4617–4623.
411. Reeves RK, Evans TI, Gillis J, Wong FE, Connole M, Carville A, Johnson RP: Quantification of mucosal mononuclear cells in tissues with a fluorescent bead-based polychromatic flow cytometry assay. *Journal of Immunological Methods* 2011, 367:95–98.
412. Roos W, Baumgartner M, Kaina B: Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 2004, 23:359–367.
413. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K: Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 2010, 327:656–661.
414. Briegert M, Enk A, Kaina B: Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA Repair (Amst)* 2007, 6:1255–1263.
415. Manzur S, Cohen S, Haimovich J, Hollander N: Enhanced therapeutic effect of B cell-depleting anti-CD20 antibodies upon combination with in-situ dendritic cell vaccination in advanced lymphoma. *Clin Exp Immunol.* 2012, 170(3):291-9.
416. Shurin MR, Yurkovetsky ZR, Tourkova IL, Balkir L, Shurin GV: Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int. J. Cancer* 2002, 101:61–68.
417. Liu J, Wu Y, Zhang X, Yang J, Li H, Mao Y, Wang Y, Cheng X, Li Y, Xia J, Masucci M, Zeng Y: Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1597–1604.
418. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, Collins EJ, Frelinger JA, Robinson BWS: Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2003, 170:4905–4913.
419. Schlom J, Arlen PM, Gulley JL: Cancer Vaccines: Moving Beyond Current Paradigms. *Clinical Cancer Research* 2007, 13:3776–3782.
420. Nowak AK, Lake RA, Robinson BWS: Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58:975–990.
421. Hughes M, Parisi M, Grossman S, Kleinberg L: Primary brain tumors treated with steroids and radiotherapy: low CD4 counts and risk of infection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 62:1423–1426.
422. Lutsiak MEC: Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005, 105:2862–2868.
423. Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Oka Y, Murao A, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Sugiyama H, Yoshimine T: Effects of Concomitant Temozolomide and Radiation Therapies on WT1-specific T-cells in Malignant Glioma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2010, 40:395–403.
424. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB: Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:123–131.

425. Fritzsche M, Mandenius C: Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. *Anal Bioanal Chem* 2010, 398:181–191.
426. King MA: Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000, 243:155–166.
427. Zhou S, Cui Z, Urban J: Dead cell counts during serum cultivation are underestimated by the fluorescent live/dead assay. *Biotechnology Journal* 2011, 6:513–518.
428. Clerck LS de, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ: Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Methods* 1994, 172:115–124.
429. Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M: An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994, 177:101–111.
430. Kummrow A, Frankowski M, Bock N, Werner C, Dziekan T, Neukammer J: Quantitative assessment of cell viability based on flow cytometry and microscopy. *Cytometry* 2012:n/a.
431. Kim JS, Nam MH, An SSA, Lim CS, Hur DS, Chung C, Chang JK: Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. *J. Clin. Lab. Anal.* 2011, 25:90–94.
432. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990, 11:231–238.
433. He S, Wang L, Wu Y, Li D, Zhang Y: CCL3 and CCL20-recruited dendritic cells modified by melanoma antigen gene-1 induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 29:37.
434. Bach G, Perrin-Cocon L, Gerossier E, Guironnet-Paquet A, Lotteau V, Inchauspe G, Fournillier A: Single lysophosphatidylcholine components exhibit adjuvant activities in vitro and in vivo. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17:429–438.
435. Jiga LP, Bauer TM, Chuang J, Opelz G, Terness P: Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86. *Transplantation* 2004, 77:1761–1764.
436. Chao D, Bahl P, Houlbrook S, Hoy L, Harris A, Austyn JM: Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotherapy agents as assessed by the MTS assay. *Br J Cancer* 1999, 81:1280–1284.
437. Lake R, Robinson B: Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:397–405.
438. Van der Most R, Himbeck R, Aarons S, Carter S, Larma I, Robinson C, Currie A, Lake R: Antitumor efficacy of the novel chemotherapeutic agent coramsine is potentiated by cotreatment with CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunother* 2006, 29:134–142.
439. Wheeler C, Das A, Liu G, Yu J, Black K: Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clin Cancer Res* 2004, 10:5316–5326.
440. Cho D, Yang W, Lee H, Hsu D, Lin H, Lin S, Chen C, Harn H, Liu C, Lee W, Ho L: Adjuvant immunotherapy with whole-cell lysate dendritic cells vaccine for glioblastoma multiforme: a phase II clinical trial. *World Neurosurg* 2012, 77:736–744.

441. Liu G, Akasaki Y, Khong HT, Wheeler CJ, Das A, Black KL, Yu JS: Cytotoxic T cell targeting of TRP-2 sensitizes human malignant glioma to chemotherapy. *Oncogene* 2005, 24:5226–5234.
442. Holtl L, Ramoner R, Zelle-Rieser C, Gander H, Putz T, Papesh C, Nussbaumer W, Falkensammer C, Bartsch G, Thurnher M: Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:663–670.
443. Nowak A, Robinson B, Lake R: Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res* 2002, 62:2353–2358.
444. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G: Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:59–73.
445. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, Edwards MR, Michelsen KS, Kroeger KM, Liu C, Muhammad AKMG, Clark MC, Arditi M, Comin-Anduix B, Ribas A, Lowenstein PR, Castro MG, Weil R: HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. *Plos Med* 2009, 6:e10.
446. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Ender P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2006, 13:54–61.
447. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L: Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007, 13:1050–1059.
448. Muller A, Prendergast G: Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer Res* 2005, 65:8065–8068.
449. Nowak A, Robinson B, Lake R: Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res* 2003, 63:4490–4496.
450. Bauer C, Bauernfeind F, Sterzik A, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A, Dauer M: Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut* 2007, 56:1275–1282.
451. Choi G, Lee M, Kim S, Kim C, Lee H, Im M, Kil H, Seong D, Lee J, Kim W, Lee M, Song SU: Combined Treatment of an Intratumoral Injection of Dendritic Cells and Systemic Chemotherapy (Paclitaxel) for Murine Fibrosarcoma. *Yonsei Med J* 2005, 46:835.
452. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS: Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J. Clin. Invest.* 2000, 105:R15.
453. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J: Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000, 60:1878–1886.

454. Wheeler C: Dendritic cell vaccines to combat glioblastoma. *Expert Rev Neurother* 2010, 10:483–486.
455. Schlegel PG, Eyrich M, Kramm C, Van Gool S: Tumor vaccination for high-grade glioma. *Pediatr. Blood Cancer* 2010, 55:1437.
456. Ardon H, Vleeschouwer S de, Van Calenbergh F, Claes L, Kramm CM, Rutkowski S, Wolff JE, van Gool SW: Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours. *Pediatr. Blood Cancer* 2009:n/a.
457. Dancey JE, Dobbin KK, Groshen S, Jessup JM, Hruszkewycz AH, Koehler M, Parchment R, Ratain MJ, Shankar LK, Stadler WM, True LD, Gravell A, Grever MR: Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res* 2010, 16:1745–1755.
458. Kammula US, Marincola FM, Rosenberg SA: Real-time quantitative polymerase chain reaction assessment of immune reactivity in melanoma patients after tumor peptide vaccination. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1336–1344.
459. Brandsma D, van den Bent MJ: Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas. *Curr Opin Neurol* 2009, 22:633–638.
460. Mineharu Y, King G, Muhammad A, Bannykh S, Kroeger K, Liu C, Lowenstein P, Castro M: Engineering the brain tumor microenvironment enhances the efficacy of dendritic cell vaccination: implications for clinical trial design. *Clin Cancer Res* 2011, 17:4705–4718.
461. Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Bresseur F, Ashley DM: Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 1999, 5:335–341.
462. Okano F, Storkus WJ, Chambers WH, Pollack IF, 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* 2002, 8:2851–2855.
463. Bigner DD, Bigner SH, Ponten J, Westermarck B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ: Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981, 40:201–229.
464. Chi DD, Merchant RE, Rand R, Conrad AJ, Garrison D, Turner R, Morton DL, Hoon DS: Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol* 1997, 150:2143–2152.
465. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J: Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001, 61:6451–6458.
466. Bonehill A, Van N, Corthals J, Tuybaerts S, Heirman C, Francois V, Colau D, van d, Neyns B, Thielemans K: Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2009, 15:3366–3375.
467. Grunebach F, Muller MR, Nencioni A, Brossart P: Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther* 2003, 10:367–374.

468. Gilboa E, Vieweg J: Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004, 199:251–263.
469. Foreman NK, Donson AM: Tumor vaccination for malignant brain tumors. *Pediatr. Blood Cancer* 2010:n/a.
470. Cellular & gene therapy products: Cellular & gene therapy products, approved products: PROVENGE (sipuleucel-T), Rockville, MD: FDA. Accessed 2010.
471. Higano C, Schellhammer P, Small E, Burch P, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, Frohlich M: Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009, 115:3670–3679.
472. Small EJ: Placebo-Controlled Phase III Trial of Immunologic Therapy with Sipuleucel-T (APC8015) in Patients with Metastatic, Asymptomatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24:3089–3094.
473. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF: Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2010, 363:411–422.
474. Aarntzen EHJG, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJA, Vries IJM: Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:1559–1568.
475. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira J, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007, 220:47–59.
476. Dong XDE, Ito N, Lotze MT, Demarco RA, Popovic P, Shand SH, Watkins S, Winikoff S, Brown CK, Bartlett DL, Zeh HJ3: High mobility group box I (HMGB1) release from tumor cells after treatment: implications for development of targeted chemoimmunotherapy. *J Immunother* 2007, 30:596–606.
477. Melief CJM: Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 2008, 29:372–383.
478. van der Most RG, Currie AJ, Robinson BWS, Lake RA: Decoding dangerous death: how cytotoxic chemotherapy invokes inflammation, immunity or nothing at all. *Cell Death Differ* 2008, 15:13–20.
479. Bao S, Wu Q, McLendon R, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland A, Dewhirst M, Bigner D, Rich J: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, 444:756–760.
480. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Larocca LM, Peschle C, De M: Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 2006, 13:1238–1241.
481. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P: The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol.* 2007, 114(2):97-109
Übersetzung: <http://www.hirntumorhilfe.de/hirntumor/klassifikation/who/>;
Accessed 07.02.2013

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Anne Pichorner, geb. Enders
Geburtsdatum	20.09.1986
Geburtsort	Berlin
Familienstand	verheiratet, kinderlos

Berufliche Laufbahn

Seit 05/2012	Assistenzärztin für Innere Medizin in der Notaufnahme des Sana Hanseklinikum Wismar
--------------	---

Kongressteilnahmen

08/2013	Vortrag zum Thema „Specialization without Curriculum“ beim Mediterranean Emergency Medicine Congress
11/2013	Teilnahme am ersten deutschen Sim-Cup auf der 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft Interdisziplinäre Notfall- und Akutmedizin (2. Platz)

Hochschulausbildung

10/2006-12/2012	Studentin für Humanmedizin an der Universität Rostock
-----------------	---

Promotion

08/2009- 12/2013	Experimentelle Doktorarbeit zum Thema „Einfluss von Temozolomid in vitro auf Ausreifung und Funktion dendritischer Zellen zur Vakzinetherapie des Glioblastoma multiforme“ Doktorvater: PD Dr. Carl Friedrich Classen, Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock Abschluss mit „Magna cum laude“
------------------	---

Praktisches Jahr

04/2012-07/2012	Viszeral-, Gefäß- und Unfallchirurgie, Sana Hanseklinikum Wismar
12/2011-03/2012	Neurologie, Zentrum für Nervenheilkunde, Rostock
08-12/2011	Kardiologie und interdisziplinäre Wachstation, Sana Hanseklinikum Wismar

Famulaturen

02/2011	Notfallambulanz Ruppiner Kliniken, Neuruppin
08/2010	Kinderonkologie, Universität Rostock
07/2010	Neurologie, Zentrum für Nervenheilkunde, Rostock
03/2010	Unfallchirurgie, Hospital Santo Tomás, Panama City
07/2009	Herzchirurgie, Deutsches Herzzentrum, Berlin
03/2009	Emergency Department, Nepean Hospital, University of Sydney

Zusatzerfahrungen

11/2011	Erwerb des Scheins zum Basic Life Support-Instructor
seit 2010	Mitglied des SkillsLab Rostock – Zentrum zum Ausbau praktischer Fertigkeiten von Medizinstudenten

Schullaufbahn

06/2006	Erwerb des Abiturs und des Latinums
1997- 2006	Johann-Gottfried-Herder Oberschule, Berlin
1993-1997	Grundschule am Roederplatz, Berlin Lichtenberg

Auslandsaufenthalte

06-12/2003	Orewa College, Orewa, Neuseeland (7 Monate)
07/2003	Colegio Aleman Humboldt, Guayaquil, Ecuador (4 Wochen)
04-05/2002	Schule Nr. 1941, Moskau (6 Wochen), Russland

Fremdsprachen

Englisch	verhandlungssicher
Russisch	konversationssicher
Spanisch, Französisch	Grundkenntnisse

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Publikation:

X. Xu, F. Stockhammer, A. Schmitt, R. Casalegno-Garduno, **A. Enders**, J. Mani, CF. Classen, M. Linnebacher, M. Freund, M. Schmitt. Therapeutical doses of temozolomide do not impair the function of dendritic cells and CD8+ T Cells
International Journal of Oncology, 2012 Mar; 40(3):764-72

Kongressteilnahmen:

Teilnahme am HGG-Immuno-Group Meeting 2009, Leuven, Belgien

Teilnahme am HGG-Immuno-Group Meeting 2010, Leuven, Belgien

Teilnahme am 5. Rostocker Symposium für Tumorimmunologie im Kindesalter 2011, Rostock und Vortrag zum Thema „Einfluss von low-dose Temozolomid auf die in vitro-Reifung von dendritischen Zellen“

Teilnahme am 6. Rostocker Symposium für Tumorimmunologie im Kindesalter 2012, Rostock

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Anne Enders, geb. 20.09.1986, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss von Temozolomid *in vitro* auf Ausreifung und Funktion dendritischer Zellen zur Vakzinetherapie des Glioblastoma multiforme“ selbst verfasst und bei der Anfertigung keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit diese Arbeit zu schreiben und die exzellente Betreuung bedanke ich mich bei PD Dr. med. Carl Friedrich Classen. Er führte mich in das wissenschaftliche Arbeiten ein und ließ mich an Tagungen und Kongressen teilhaben um mein Projekt vorzustellen und zu verteidigen. Nur durch ihn konnte ich dieses interessante Projekt nach anfänglichen Rückschlägen motiviert weiter führen. Nicht zuletzt haben seine Verbesserungsvorschläge in der Schreibphase das vorliegende Resultat optimiert, da er auf Fragen und Probleme immer schnell und unkompliziert reagierte. Darüber hinaus hat mir der persönliche Kontakt viel Freude bereitet.

Besonderer Dank geht ebenfalls an PD Dr. Michael Linnebacher, der mich während der experimentellen Phase dieser Arbeit nicht nur mit praktischen Hinweisen, sondern auch mit immer wieder tollen neuen Ideen und deren Umsetzung unterstützte.

Claudia Maletzki, Anika Jahnke und Ulrike Klier hatten einen großen Anteil daran, die Tage im Labor zu immer wieder spannenden und netten Stunden zu machen.

An Christina Mullins geht mein Dank für die Bereitstellung und Pflege von Zellmaterial. Mit ihr verbinde ich viele gemeinsame Erlebnisse. Bei Mathias Krohn bedanke ich mich vor allem für die Einarbeitung. Frau Dr. Fischer stellte das Mikroskop für die Photographien bereit und unterstützte mich bei der Arbeit damit. Der Arbeitsgruppe um Professor Schmitt danke ich für die erfolgreiche Kooperation bei der Veröffentlichung von Anteilen dieser Arbeit, besonders Xun.

Meine Eltern haben nach anfänglichen Misserfolgen immer geduldig zugehört, mich wieder aufgebaut und zum Weitermachen animiert. Auch wenn meine Mutter die Fertigstellung der Arbeit leider nicht erleben kann, war sie in Gedanken immer bei mir. Meine Großeltern waren mir, besonders in den letzten Monaten der Fertigstellung der Arbeit, nicht nur eine immense Stütze sondern auch eine große Hilfe. Sylvia danke ich für die Korrekturen und die liebe Aufnahme in der Familie.

Ein großer Dank geht auch an Anika Sievert, Mathias Kersten und Manuela Helmecke, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Dir, lieber Andreas, danke ich besonders, dass du immer an meiner Seite warst, und mir in jeder Situation den Rücken gestärkt hast. Du hast mir nicht nur viele sachliche, sondern auch zwischenmenschliche Hinweise gegeben und mich mit so viel Geduld und Liebe bis zur Abgabe dieser Arbeit begleitet.

ANHANG

Anhang Nr.1: WHO- Klassifikation von Tumoren des ZNS⁴⁸¹

Bezeichnung des Tumors	Grad
1. Tumoren des neuroepithelialen Gewebes	
1.1. astrozytäre Tumoren	
Pilozytisches Astrozytom	I
• Pilomyxoides Astrozytom	II
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II, III
Diffuses Astrozytom	II
• Fibrilläres Astrozytom	II
• Protoplasmatisches Astrozytom	II
• Gemistozytisches Astrozytom	II
Anaplastisches Astrozytom	III
Glioblastom (multiforme)	IV
• Riesenzellglioblastom	IV
• Gliosarkom	IV
Gliomatosis cerebri	III, IV
1.2 Oligodendrogliale Tumoren	
Oligodendrogliom	II
Anaplastisches Oligodendrogliom	III
1.3 Oligoastrozytäre Tumoren	
Oligoastrozytom	II
Anaplastisches Oligoastrozytom	III
1.4 Ependymale Tumoren	
Subependymom	I, II
Myxopapilläres Ependymom	I
Ependymome	II
• Zelluläres Ependymom	II
• Papilläres Ependymom	II
• Klarzelliges Ependymom	II
• Tanyzytisches Ependymom	II
Anaplastisches Ependymom	III
1.5 Tumoren des Plexus choroideus	
Plexuspapillom	I
Atypisches Plexuspapillom	II
Plexuskarzinom	III
1.6 Neuroepitheliale Tumoren unsicheren Ursprungs	
Astroblastom	II, III
Chordoid-Gliom des 3. Ventrikels	II

Angiozentrisches Gliom	I
1.7 Neuronale und neuronal-glial gemischte Tumoren	
Dysplastisches Gangliozytom des Cerebellums	I
Desmoplastisches infantiles Astrozytom/Gangliogliom	I
Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor (DNT)	I
Gangliozytom	I
Gangliogliom	I, II
Anaplastisches Gangliogliom	III
Zentrales Neurozytom	II
Extraventrikuläres Neurozytom	II
Zerebelläres Liponeurozytom	I, II
Papillärer glioneuronaler Tumor (PGNT)	I
Rosettenbildender glioneuronaler Tumor (RGNT)	I
Paragangliogliom	I
1.8 Tumoren der Pinealisregion	
Pineozytom	I
Mischtumor des Pinealisparenchyms	II, III
Papillärer Tumor der Pinealisregion (PTPR)	II, III
Pineoblastom	IV
1.9 Embryonale Tumoren	
Medulloblastom	IV
• Desmoplastisches/noduläres Medulloblastom	IV
• Medulloblastom mit extensiver Nodularität	IV
• Anaplastisches Medulloblastom	IV
• Großzelliges Medulloblastom	IV
Primitive neuroektodermale Tumoren (PNETs)	IV
• Neuroblastom	IV
• Ganglioneuroblastom	IV
• Ependymoblastom	IV
• Medulloepitheliom	IV
Atypischer Teratoid-/Rhabdoidtumor	IV
2. Tumoren der kranialen und paraspinalen Nerven	
Schwannom (Neurinom)	I
• Zelluläres Schwannom	I
• Plexiformes Schwannom	I
• Melanotisches Schwannom	I
Neurofibrom	I
• Plexiformes Neurofibrom	I
Perineuriom	I - III
• Perineuriom, NOS	I, II
• Malignes Perineuriom	III
Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	III, IV

• Epitheloider MPNST	III, IV
• Melanotischer MPNST	III, IV
3. Tumoren der Meningen	
3.1 Tumoren meningothelialer Zellen	
Menigeom	I
• Meningotheliomatöses Meningeom	I
• Fibroblastisches Meningeom	I
• Transitinales Meningeom	I
• Psammomatöses Meningeom	I
• Angiomatöses Meningeom	I
• Mikrozystisches Meningeom	I
• Sekretorisches Meningeom	I
• Lymphoplasmazellreiches Meningeom	I
• Metaplastisches Meningeom	I
• Chordoides Meningeom	II
• Klarzelliges Meningeom	II
• Atypisches Meningeom	II
• Papilläres Meningeom	II, III
• Rhabdoides Meningeom	III
• Anaplastisches Meningeom	III
3.2 Mesenchymale Tumoren	
Lipom	
Angiolipom	
Hibernom	
Liposarkom	
Solitärer fibröser Tumor (SFT)	
Fibrosarkom	
Malignes fibröses Histiocytom	
Leiomyom	
Leiomyosarkom	
Rhabdomyom	
Rhabdomyosarkom	
Chondrom	
Chondrosarkom	
Osteom	
Osteosarkom	
Osteochondrom	
Hämangiom	I
Epitheloides Hämangioendotheliom	
Hämangioperizytom	II
Anaplastisches Hämangioperizytom	III
Angiosarkom	

Kaposi-Sarkom	
Ewing-Sarkom	
3.3 Primär melanozytische Läsionen	
diffuse Melanozytose	I
Melanozytom	I
Malignes Melanozytom	III, IV
Meningeale Melanomatose	III, IV
3.4 Andere Neoplasien	
Hämangioblastom	I
4. Lymphome und hämatologische Neoplasien	
Malignes Lymphom	
Plasmozytom	
Granulozytäres Sarkom	
5. Keimzelltumoren	
Germinom	II, III
Embryonalzellkarzinom	IV
Dottersacktumor	IV
Chorionkarzinom	IV
Teratom	I - IV
• reifes Teratom	
• unreifes Teratom	
• Teratom mit maligner Transformation	
Gemischter Keimzelltumor	II - IV
6. Tumoren der Sella-Region	
Kraniopharyngeom	I
• Adamantinomatöses Kraniopharyngeom	I
• Papilläres Kraniopharyngeom	I
Granularzelltumor	I
Pituizytom	
Spindelzell-Onkozytom (SCO) des Hypophysenvorderlappens	I
Rhabdomyom	
7. Metastasen	IV

Anhang Nr. 2: Karnofsky Performance Status Scale⁴⁰

Score	ECOG	Definition
100	0	Keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit
90	0	Fähig zu normaler Aktivität, kaum oder geringe Symptome
80	1	Normale Aktivität mit Anstrengung möglich. Deutliche Symptome.
70	1	Selbstversorgung. Normale Aktivität oder Arbeit nicht möglich.
60	2	Einige Hilfestellung nötig, selbstständig in den meisten Bereichen.
50	2	Hilfe und medizinische Versorgung wird oft in Anspruch genommen.
40	3	Behindert. Qualifizierte Hilfe benötigt.
30	3	Schwerbehindert. Hospitalisation erforderlich.
20	4	Schwerkrank. Intensive medizinische Maßnahmen erforderlich.
10	4	Moribund. Unaufhaltsamer körperlicher Verfall
0	5	Tod

Anhang Nr. 3: Macdonald Kriterien³⁶⁴

Response	Criteria
Complete Response	Requires all of the following: complete disappearance of all enhancing measurable and nonmeasurable disease sustained for at least 4 weeks; no new lesions; no corticosteroids, and stable or improved clinically
Partial Response	Requires all of the following: $\geq 50\%$ decrease compared with baseline in the sum of products of perpendicular diameters of all measurable enhancing lesions sustained for at least 4 weeks; no new lesions; stable or reduces corticosteroid dose; and stable or improved clinically
Stable Disease	Requires all of the following: does not qualify for complete response, partial response, or progression; and stable clinically
Progression	Defined by any of the following: $\geq 25\%$ increase in the sum of the products of perpendicular diameters of enhancing lesions; any new lesion; or clinical deterioration