

Aus der Klinik für Anaesthesiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus der  
Photodynamischen Therapie bei der Behandlung von Glioblastomen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von  
David Effinger  
aus Friedrichshafen

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatlerin:** Prof. Dr. Dr. med. Simone Kreth

**Mitberichterstatler:** Prof. Dr. Ronald Sroka  
Prof. Dr. med. Andreas Leunig

**Dekan:** Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.01.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1	GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....	7
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	7
1.1.2	Histopathologie und Histochemie .....	7
1.1.3	Molekulargenetik.....	8
1.1.4	Klinik und Diagnostik .....	9
1.1.5	Therapie und Prognose .....	10
1.2	IMMUNSYSTEM UND GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	11
1.2.1	Immunoediting und Tumormikromilieu .....	11
1.3	TEMOZOLOMID-CHEMOTHERAPIE .....	12
1.3.1	Pharmakologische Hintergründe.....	12
1.3.2	Chemotherapie mit Temozolomid bei Glioblastoma multiforme .....	13
1.4	PHOTODYNAMISCHE THERAPIE .....	13
1.4.1	Geschichtliche Entwicklung .....	13
1.4.2	Physikalische und Molekularbiologische Hintergründe.....	14
1.4.3	Lichtquelle und Photosensitizer .....	16
1.4.4	Photodynamische Therapie bei Glioblastoma multiforme .....	18
1.4.5	Photodynamische Therapie und Immunsystem .....	19
1.5	FRAGESTELLUNG DES DISSERTATIONSPROJEKTES .....	20
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>21</b>
2.1	GERÄTE.....	21
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL.....	22
2.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	23
2.4	SOFTWARE .....	26
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	ZELLKULTUR U87-GLIOBLASTOMZELLEN .....	27
3.1.1	Auftauen von Zellen.....	27
3.1.2	Inkubation und Zellsplitting .....	27
3.1.3	Kryokonservierung .....	27
3.2	ZELLKULTUR PRIMÄRER TUMORZELLEN.....	28
3.2.1	Isolation primärer Glioblastomzellen .....	28
3.2.2	Inkubation und Zellsplitting primärer Tumorzellen .....	29
3.2.3	Kryokonservierung primärer Tumorzellen .....	29
3.2.4	Immunhistochemische Färbung primärer Tumorzellen.....	29

3.3	ERMITTLUNG VON ZELLZAHL UND ZELLVIABILITÄT .....	30
3.4	BLUTENTNAHMEN .....	30
3.5	PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC) .....	30
3.5.1	PBMC-Isolation.....	30
3.5.2	Standard-Kryokonservierung von PBMC .....	31
3.5.3	Auftauen von PBMC .....	31
3.6	T-ZELL-ISOLATION .....	32
3.7	PHOTODYNAMISCHE THERAPIE DER U87-ZELLEN IN-VITRO .....	32
3.7.1	Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA).....	32
3.7.2	in-vitro-PDT-Bestrahlung .....	33
3.7.3	Kultivierung der PBMC und U87-Zellen nach PDT .....	33
3.8	PHOTODYNAMISCHE THERAPIE DER PRIMÄRZELLEN IN-VITRO .....	34
3.9	ERMITTLUNG DER PDT-ÄQUIVALENTEN TEMOZOLOMID-DOSIS.....	34
3.9.1	Vorbereitung der TMZ-Stock-Solution.....	34
3.9.2	TMZ-Titration .....	34
3.9.3	Bestimmung der Zellschädigung durch PDT .....	35
3.10	TEMOZOLOMID-BEHANDLUNG DER U87-ZELLEN IN-VITRO .....	35
3.10.1	in-vitro-TMZ-Behandlung.....	35
3.10.2	Kultivierung von PBMC und U87-Zellen nach TMZ-Behandlung.....	35
3.11	ANALYSE KRYOKONSERVIERTER PBMC .....	36
3.12	CO-KULTUREN MIT KRYOKONSERVIERTEN PBMC .....	37
3.13	QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION .....	38
3.13.1	RNA-Isolation .....	38
3.13.2	cDNA-Synthese.....	38
3.13.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	39
3.14	FUNKTIONELLE ASSAYS .....	41
3.14.1	Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot) .....	41
3.14.2	Calcein-Acetoxy-methylester-Toxizitäts-Assay.....	42
3.14.3	MTT Cell Proliferation Assay.....	44
3.15	STATISTIK.....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1	ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-TMZ-MODELLS .....	47
4.1.1	Analyse des Therapie-induzierten Zellschadens.....	47
4.1.2	Durchführung der in-vitro-Behandlung mit TMZ.....	48
4.2	ANALYSE DER CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN NACH KONTAKT MIT PDT- ODER TMZ-BEHANDELTEN U87-ZELLEN .....	49

4.2.1	Analyse der mRNA-Expression sensibilisierter CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	49
4.2.2	Analyse der Perforin-Sekretion sensibilisierter CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	53
4.2.3	Quantifizierung der Lysekapazität sensibilisierter PBMC.....	54
4.2.4	Korrelation von PRF1-Genexpression und Lysekapazität.....	56
4.3	ANALYSE ZUVOR KRYOKONSERVIERTER PBMC .....	58
4.3.1	Viabilitäts- und Stoffwechselanalysen der PBMC nach Kryokonservierung.....	59
4.4	ANALYSE DER CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN IM ALLOGENEN PDT-MODELL MIT KRYOKONSERVIERTEN PBMC.....	61
4.4.1	Analyse der mRNA-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Kultivierung PDT-behandelter U87-Zellen mit kryokonservierten PBMC .....	62
4.4.2	Quantifizierung der Lysekapazität sensibilisierter PBMC nach Kultivierung PDT-behandelter U87-Zellen mit kryokonservierten PBMC .....	64
4.5	ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-PDT-MODELLS MIT PRIMÄREN GLIOBLASTOMZELLEN .....	65
4.5.1	Immunhistochemische Analyse primärer Glioblastomzellen .....	65
4.5.2	Zusammenfassung des in-vitro-PDT-Modells mit primären Glioblastomzellen.....	66
4.6	ANALYSE DER CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN IM AUTOLOGEN PDT-MODELL.....	67
4.6.1	Analyse der mRNA-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell .....	67
4.6.2	Quantifizierung der PBMC-vermittelten Lyserate im autologen PDT-Modell.....	70
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
5.1	ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-TMZ-MODELLS UND ANALYSE DER CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN IM VERGLEICH ZUR IN-VITRO-PDT .....	74
5.2	ETABLIERUNG EINES AUTOLOGEN IN-VITRO-PDT-MODELLS .....	76
5.2.1	Quantifizierung der immunologischen Funktionalität zuvor kryokonservierter PBMC .	77
5.2.2	Analyse der CD8-spezifischen Immunantwort im autologen PDT-Modell.....	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>83</b>
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	83
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	85
7.3	LITERATURVERZEICHNIS .....	88
7.4	PUBLIKATIONEN.....	94
7.5	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	95
7.6	DANKSAGUNG .....	96



# 1 Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland rund 7000 Menschen an einem Hirntumor. Hierbei handelt es sich in fast 20 % der Fälle um ein Glioblastoma multiforme (GBM)<sup>1</sup>. Trotz frühzeitiger Diagnostik und multimodaler Therapieansätze gilt diese Form bösartiger Hirntumore immer noch als unheilbar<sup>2</sup>. Mit der photodynamischen Therapie (PDT) ist eine neue, adjuvante Option bei der Gliombehandlung in den Fokus des Interesses gerückt. Der zugrundeliegende antitumorogene Wirkmechanismus ist jedoch immer noch Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben und soll in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

## 1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Glioblastoma multiforme gehört zur Gruppe der Astrozytome. Hier stellt es in der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation WHO nach dem diffusen Astrozytom (Grad II) und dem Anaplastischen Astrozytom (Grad III) die aggressivste Hirntumorentität bei Erwachsenen dar (Grad IV) und ist mit einem Anteil von 40 % unter den Gliomen auch der häufigste maligne hirneigene Tumor<sup>3-5</sup>. Der Median der Altersverteilung liegt bei ca. 64 Jahren<sup>2,6</sup>. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen<sup>3</sup>. Primäre Glioblastome (de-novo) treten spontan und ohne klinische oder histopathologische Hinweise auf präexistente Vorläuferläsionen auf, wohingegen sekundäre Glioblastome sich infolge maligner Transformationen ehemals niedergradiger (WHO Grad II/III) Gliome entwickeln<sup>2,3</sup>.

Eine genetische Prädisposition zur Entwicklung von Gliomen ist bei verschiedenen Syndromen, wie der Neurofibromatose, dem Li-Fraumeni- oder dem Turcot-Syndrom, bekannt. Jedoch tritt die Mehrheit der Glioblastome sporadisch und ohne Zusammenhang mit familiären Veranlagungen auf<sup>7,8</sup>.

### 1.1.2 Histopathologie und Histochemie

Glioblastome gehen aus malignen Entartungen der Gliazellen im zentralen Nervensystem hervor<sup>9</sup>. Makroskopisch erscheint die Schnittfläche des Glioblastoms heterogen und vielgestaltig (multiforme). Diese typische „bunt“ erscheinende Schnittfläche basiert auf dem abwechselnden Auftreten von gelblichen Nekrosen, zystischen Arealen, Neovaskularisationen mit dunklen Tumorblutungen und narbigen Reaktionen des umliegenden Gewebes<sup>2,10</sup>. Infolge einer kompromittierten Blut-Hirn-Schranke mit konsekutiv erhöhter Gefäßpermeabilität ist die Tumorerkrankung

meist von einem perifokalen Ödem als Reaktion des Gewebes auf die maligne Neubildung umgeben<sup>11</sup>. Häufig wirkt das Glioblastom makroskopisch scharf gegenüber den gesunden Hirnarealen abgegrenzt. Mikroskopisch zeigen sich palisadenförmig angeordnete, oft spindelförmige oder ovale Tumorzellen mit ausgeprägter pleomorpher und hyperchromatischer Zellkernmorphologie mit umgebenden mehrkernigen Riesenzellen<sup>2,12</sup>. Neben einer erhöhten Mitoseaktivität und einer gesteigerten Proliferationsrate zeigen sich zentrale Nekroseareale, Endothelproliferationen und glomerulär angeordnete Gefäßproliferationen mit einer typischen girlandenförmigen Struktur und (teil-)thrombosierte Gefäß- und Blutungsresiduen<sup>10,12</sup>.

Immunhistochemisch zeigt sich eine Expression von saurem Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) und Mikrotubuli-assoziiertem Protein 2 (Microtubule-associated protein 2, MAP2). GFAP stellt den Hauptbestandteil glialer Intermediärfilamente dar und ist vor allem in Gliazellen des Zentralnervensystems (ZNS) nachweisbar<sup>2</sup>. MAP2, als das am häufigsten vorkommende Mikrotubuli-assoziierte Protein, ist verantwortlich für Stabilisierungsprozesse des Zytoskelettes und ist assoziiert mit der Bildung des Mikrotubulusapparates und der Neurogenese<sup>13,14</sup>. Sie werden daher u.a. als Marker für Astrozyten und zur histologischen Diagnostik glialer Hirntumore verwendet und können in unterschiedlichen malignen Hirntumorentitäten nachgewiesen werden<sup>2,13</sup>.

### 1.1.3 Molekulargenetik

Neben der histopathologischen Klassifikation spielen die Identifikation und Analyse verschiedener genetischer Modifikationen eine immer größere Rolle<sup>15,16</sup>. Die Charakterisierung molekularbiologischer Marker und ihrer Konstellation führt nicht nur zu einem besseren Verständnis der Tumorbilogie, sondern ist auch Grundlage für die Entwicklung individueller Therapieregime<sup>6,15</sup>. Molekulargenetische Analysen glialer Hirntumore basieren meist auf der Untersuchung des Methylierungsstatus des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen-Promotors (MGMT), der Mutationsrate des Isocitratdehydrogenase-Gens 1 und 2 sowie der Mutationen in der Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT)-Promoterregion<sup>2,5</sup>. Die MGMT entfernt als DNA-Reparaturenzym Alkylreste an der O6-Position des Guanins. Einerseits schützt sie so DNA vor potentiell prokarzinogenen Schäden, jedoch relativiert sie dadurch auch die Wirkung alkylirender Chemotherapeutika, wie Temozolomid (TMZ), welche standardmäßig bei der Behandlung des GBM eingesetzt werden. Eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors kann bei 40-50 % der Glioblastome nachgewiesen werden und führt zur Reduktion der MGMT-Genexpression („epigenetic silencing“)<sup>6,16</sup>. Damit stellt sie einen bedeutungsvollen positiven Prädiktor für das Ansprechen auf eine TMZ-haltige Chemotherapie dar<sup>4,5</sup>.

Der Enzymkomplex der Isocitratdehydrogenase (IDH) katalysiert die oxidative Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat. Bei einer Punktmutation im IDH-1 bzw. IDH-2 Gen kommt es infolge zur Abnahme der  $\alpha$ -Ketoglutaratsynthese zugunsten des neuen Metaboliten 2-Hydroxyglutarat (2-HG) („gain of function“-Mutation). 2-HG beeinflusst die Induktion weiterer DNA-Methylierungen<sup>6</sup>. IDH-Mutationen sind besonders charakteristisch für niedergradige Astrozytome, wohingegen primäre Glioblastome meist als IDH-Wildtypen (ohne Mutation) vorliegen. Bei ca. 10 % der Glioblastome lässt sich eine IDH-Mutation nachweisen. Diese ist als Hinweis auf eine sekundäre Transformation aus niedergradigen Gliomen zu werten und geht üblicherweise mit einer besseren Prognose einher<sup>2,3</sup>. Die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) ist die katalytische Untereinheit des Telomerase Enzyms. Mutationen in der TERT-Promoterregion kommen am häufigsten bei primären Glioblastomen älterer Patienten und Oligodendrogliomen vor und korrelieren mit einer reduzierten Überlebenszeit<sup>3,4</sup>.

#### 1.1.4 Klinik und Diagnostik

Die Anamnese bei Glioblastoma multiforme ist in der Regel kurz. Patienten klagen erst spät – jeweils abhängig von der Tumorlokalisation – über unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel oder Bewusstseinsstörungen als klinische Hirndruckzeichen, Sehstörungen, Wesensveränderungen bis hin zu fokalneurologischen Ausfällen und fokalen oder generalisierten epileptischen Krampfanfällen<sup>2,6</sup>. Bei Diagnosestellung ist der Tumor deshalb häufig bereits weit fortgeschritten.

Die Verdachtsdiagnose eines GBM wird meist mittels kontrastmittelunterstützter Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) gestellt<sup>3</sup>. Hierbei zeigt sich in der MRT, neben der inhomogenen Raumforderung mit ödematösem Randsaum, in der T2-Gewichtung ein girlandenförmiges, hyperintenses Kontrastmittel-Enhancement um eine zentrale Nekrose<sup>4,6</sup>. In der CT stellt sich der Tumor hypo- bis isodens dar. Die Sicherung der Diagnose und eine Beurteilung molekularbiologischer Marker erfolgt nach offener Resektion oder Durchführung einer stereotaktischen Probenentnahme.

Bei Erwachsenen ist das GBM meist im Marklager der Großhirnhemisphären lokalisiert und wächst primär unifokal. Nur wenige Glioblastome sind primär multizentrisch. Jedoch kann es in Laufe der Erkrankung durchaus zur intrazerebralen Dissemination oder – in seltenen Fällen – zur Ausbildung spinaler Abtropfmetastasen kommen. Bei bilateralem Auftreten mit Überschreitung des Corpus Collosum wird vom „Schmetterlingsgliom“ gesprochen. Bei Kindern kann es ebenfalls zum primären Auftreten im Bereich des Hirnstammes kommen<sup>1</sup>. Eine Metastasierung außerhalb des ZNS ist äußerst selten<sup>17</sup>. Durch die loko-regionale Kompromittierung

lebenswichtiger Hirnstammareale im Laufe des Tumorprogresses kommt es final zum Bewusstseinsverlust und zum Tod des Patienten.

### 1.1.5 Therapie und Prognose

Die Entwicklung eines spezifischen neuroonkologischen Therapiekonzepts basiert auf den histopathologischen und molekularbiologischen Befunden. Die Standardtherapie bei Glioblastoma multiforme besteht aus der möglichst radikalen mikrochirurgischen Resektion gefolgt von der Radiotherapie der erweiterten Tumorregion mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid<sup>2,18</sup>. Das Resektionsausmaß ist hierbei maßgeblich für die postoperative Prognose verantwortlich<sup>3,4</sup>. Eine signifikante Verlängerung des medianen Überlebens wird lediglich bei Kompletresektionen erreicht. Aufgrund der Tumorlokalisation an neurofunktionell kritischen Stellen ist eine Kompletresektion trotz fluoreszenzgesteuerter Resektionsverfahren nur in ca. 40-50 % aller Fälle möglich. Teilresektionen bieten jedoch gegenüber einer alleinigen Biopsie keinen signifikanten Vorteil hinsichtlich der Überlebenszeit<sup>19</sup>. Alternativ erfolgt eine stereotaktische Biopsie zur Diagnosesicherung und Bestimmung molekularer Marker<sup>4</sup>.

Der Median der Überlebenszeit aller GBM-Patienten liegt trotz Maximaltherapie aktuell bei lediglich 15 Monaten<sup>3,7</sup>. Hierbei hat jedoch der MGMT-Methylierungsstatus einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit<sup>5</sup>. So liegt die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter bei 22,1 Monaten, bei einem medianen progressionsfreien Intervall von 10,3 Monaten, wohingegen die mediane Überlebenszeit für Patienten mit einem unmethylierten Glioblastom fast unverändert bei lediglich 12,7 Monaten, mit einem medianen progressionsfreien Zeitraum von 5,3 Monaten, liegt<sup>19,20</sup>.

Diese Daten verdeutlichen die Notwendigkeit neuer und effektiverer Strategien bei der Behandlung von Glioblastompatienten. Diese kommen jedoch bisher nur im Rahmen klinisch-experimenteller Studienprotokolle zum Einsatz. Darunter finden sich Therapien mit elektrischen Wechselfeldern (Tumortherapiefelder), Checkpoint-Inhibitoren, monoklonale Antikörper gegen die Checkpoint-Moleküle, Tumorstoffe und CAR-T-Zell-Therapien<sup>3,4,9</sup>. Der antiangiogene Wirkstoff Bevacizumab (Avastin®), ein monoklonaler VEGF-Antikörper, besitzt derzeit nur die Zulassung für die Rezidivtherapie des Glioblastoms außerhalb der Europäischen Union (u.a. USA und Schweiz)<sup>2,21</sup>. In Deutschland wird Bevacizumab auf individueller Basis bei Tumorprogress nach Radiochemotherapie eingesetzt<sup>9</sup>. Durch das wachsende Verständnis immunologischer Vorgänge im Kontext tumoriger Erkrankungen rücken immunomodulatorische Therapieansätze zunehmend in den Fokus aktueller klinisch-experimenteller Forschungsvorhaben und Pilotstudien.

## 1.2 IMMUNSYSTEM UND GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Bei der Analyse immunologischer Prozesse im Kontext maligner Erkrankungen ist die differenzierte Betrachtung des tumorassoziierten Entzündungsprozesses maßgeblich. Hierbei ist die Unterscheidung zwischen der spezifischen antitumoralen Immunreaktion und einer ungerichteten Entzündung von ausschlaggebender Bedeutung<sup>22</sup>. Die APC (Antigenpräsentierende Zellen)-vermittelte Präsentation von Tumorantigenen führt als Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem zur Aktivierung spezifischer Effektor-CD8<sup>+</sup> T-Zellen und bildet so die Grundlage der gezielten Reaktion gegen den malignen Prozess<sup>23,24</sup>. In den Granula dieser zytotoxischen T-Zellen finden sich u.a. Perforin und Granzyme, die bei Aktivierung ausgeschüttet werden. Nach Degranulation von Perforin formt dieses Poren in die Zellwand der jeweiligen Zielzelle, durch welche Proteasen, wie beispielsweise GranzymB, eindringen und apoptotische Signalwege initiieren können<sup>25,26</sup>. Neoplastische Zellen sezernieren jedoch ebenfalls proinflammatorische Mediatoren, durch welche – direkt oder indirekt – Proliferation, Angiogenese und Metastasierung forciert werden. Dieses diffuse chronisch-proinflammatorische Milieu (Tumormikromilieu, TME) begünstigt die Tumorprogression und darf nicht mit der gerichteten antitumoralen Immunreaktion verwechselt werden<sup>22,27</sup>.

### 1.2.1 Immunoediting und Tumormikromilieu

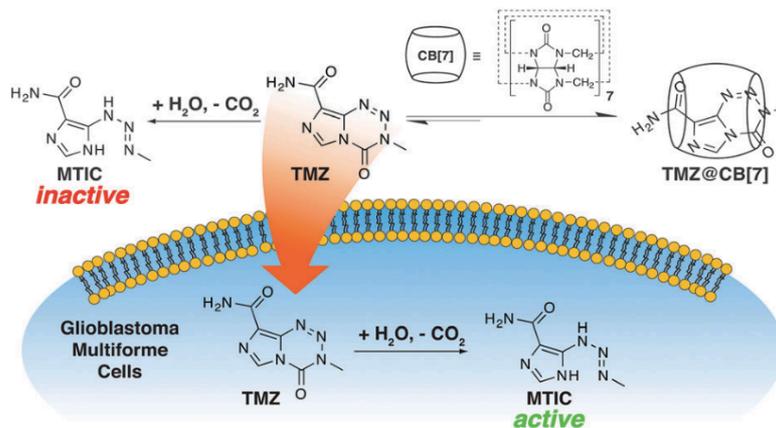
Die immunologische Reaktion auf maligne bzw. pathogene Zellen wird unter dem Begriff „Immunoediting“ zusammengefasst. Er beschreibt die ablaufenden dynamischen Prozesse zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems im Laufe der Erkrankung<sup>28,29</sup>. Anfangs kommt es nach Erkennung körperfremder Oberflächenantigene zur Aktivierung von Makrophagen, Natural-Killer-Zellen und Granulozyten und infolgedessen zur Ausbildung einer spezifischen und effektiven antitumoralen Immunantwort durch CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Einzelne Tumorzellen entwickeln jedoch „Escape“-Mechanismen, um dem Eliminationsprozess zu entgehen (Immunevasion). Das Tumormikromilieu ist charakterisiert durch verschiedene proinflammatorische, aber auch immunsuppressive Zytokine und Enzyme, die entweder direkt von Glioblastomzellen oder aber von Immunzellen innerhalb des Tumormikromilieus (TME) sezerniert werden<sup>27–29</sup>. Diese Moleküle, wie beispielsweise IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF $\beta$  oder Indolamin-2,3-Dioxygenase, fördern die unspezifische Inflammation im TME, kompromittieren somit jedoch eine gezielte antitumorale Immunantwort. Zusätzlich fördern sie die Ausbildung immunregulatorischer T-Zellen (Tregs) und myeloider Suppressorzellen (MDSC) sowie die Expression immunsuppressiver Checkpoint-Moleküle wie PD1, PD-L1 und CTLA-4<sup>30–33</sup>. Auch durch eine verminderte Expression der MHC-I Moleküle können Glioblastome der effektiven T-Zell-

Immunantwort entgehen. So kommt es im Laufe der Erkrankung zur Selektion nicht-immunogener Tumorzellen und damit zur Progression des Glioblastoms<sup>34,35</sup>.

### 1.3 TEMOZOLOMID-CHEMOTHERAPIE

#### 1.3.1 Pharmakologische Hintergründe

Eines der am häufigsten bei der Behandlung des Glioblastoms eingesetzten Chemotherapeutika ist Temozolomid (TMZ) (Temodal®). Es handelt sich hierbei um ein alkylierendes Zytostatikum. Die Applikation erfolgt meist peroral, prinzipiell ist es jedoch auch intravenös anwendbar. Nach Aufnahme passiert TMZ als Prodrug die Bluthirnschranke und wird hydrolytisch in die Agens 5-(3-N-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid (MTIC) umgewandelt. MTIC zerfällt weiter hydrolytisch in 5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid (AIC) und Methylhydrazin. Methylhydrazin kann nun Guaninreste an der O6-Position methylieren<sup>36</sup>. In der Folge kommt es bei der DNA-Replikationsphase zur Basenfehlpaarung des Methylguanins mit einer Thyminbase anstelle eines Cytosinmoleküls<sup>37</sup>. Anschließend Reparaturmechanismen führen daraufhin zu Doppelstrangbrüchen und zur DNA-Fragmentierung, welche zur Apoptose oder Autophagolyse der Tumorzelle führt<sup>9</sup>. Findet die Umwandlung von TMZ in MTIC jedoch bereits im peripheren Blutkreislauf statt, verliert TMZ seine Wirkung, da MTIC nicht die Bluthirnschranke überwinden kann (Abb. 1)<sup>37</sup>.



**Abb. 1:** Schematische Übersicht über den Temozolomid (TMZ)-Metabolismus. Als Prodrug passiert TMZ die Bluthirnschranke und zerfällt weiter in seine aktiven Metabolite<sup>37</sup>.

### 1.3.2 Chemotherapie mit Temozolomid bei Glioblastoma multiforme

Ist eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) bei Patienten mit resektablem Glioblastom geplant, so beginnt diese zumeist vier bis sechs Wochen nach der operativen mikrochirurgischen Resektion als kombinierte Radio-/Chemotherapie. Zunächst erfolgt die Applikation des Chemotherapeutikums parallel zur Bestrahlung an sieben Tagen in der Woche mit einer Dosis von 75 mg pro m<sup>2</sup> KOF (Körperoberfläche). Diese konkomitante Chemotherapie wird bis zum letzten Tag der Radiotherapie, jedoch maximal für 49 Tage fortgesetzt. Nach einer anschließenden Pause von ca. vier Wochen erfolgen sechs Zyklen TMZ-Chemotherapie ohne Bestrahlung. Ein Zyklus dauert hierbei 28 Tage. An den ersten 5 Tagen des Zyklus erfolgt die tägliche Einnahme von zunächst 150 mg pro m<sup>2</sup> KOF im ersten Zyklus, und ab dem zweiten Zyklus von 200 mg pro m<sup>2</sup> KOF (Stupp-Protokoll)<sup>2,3</sup>.

Die antitumorale Wirkung kann hierbei durch das Reparaturenzym MGMT abgeschwächt werden. MGMT wirkt der Alkylierung der DNA und damit dem zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums entgegen. So stellt der MGMT-Methylierungsstatus einen wichtigen Prädiktor bezüglich des Ansprechens auf eine TMZ Chemotherapie dar<sup>3</sup>.

## 1.4 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

Die Photodynamische Therapie (PDT) stellt ein relativ neues und minimalinvasives Verfahren zur Behandlung verschiedener Tumore dar. Sie basiert auf der Bestrahlung des Tumorgewebes mit Licht spezifischer Wellenlänge (Laser) nach vorheriger Sensibilisierung mit einem sich im Tumorgewebe anreichernden Photosensibilisator (Photosensitizer)<sup>38</sup>.

### 1.4.1 Geschichtliche Entwicklung

Das therapeutische Potenzial des Lichtes wurde schon früh in der Geschichte erkannt und zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten eingesetzt. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte der färöisch-dänische Arzt Niels Ryberg Finsen eine Lichttherapie zur Behandlung von Windpocken und Hauttuberkulose, wofür er 1903 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurde. Die Münchner Oscar Raab und Prof. Hermann von Tappeiner entdeckten das therapeutische Potential von Belichtung nach Gabe eines Photosensibilisators<sup>39</sup>. Zusammen mit Albert Jodlbauer führten sie den Begriff der „Photodynamik“ ein. Die ersten Experimente mit Porphyrin-haltigen Photosensitizern wurden 1913 vom deutschen Arzt Friedrich Meyer-Betz in Selbstversuchen durchgeführt<sup>40,41</sup>.

Der Einsatz der PDT für die Behandlung maligner Gliome wurde erstmals 1972 von Ivan Diamond entwickelt, der zeigen konnte, dass die PDT den Tumorprogress in Ratten verminderte. Thomas Dougherty verhalf der PDT als neues Therapeutikum zum Durchbruch, nachdem er 1973 nachweisen konnte, dass Mammakarzinome nach medikamentöser Photosensibilisierung und nachfolgender Bestrahlung eine deutlich reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit aufzeigten. Es folgte der experimentelle Einsatz bei Gallenblasenkarzinomen, Hautkrebs, Brust-, Lungen-, Kolorektal- und Pankreaskarzinomen. 1993 wurde der Photosensitizer Photofrin erstmals für die Behandlung bei Gallenblasenkarzinomen zugelassen<sup>40-42</sup>.

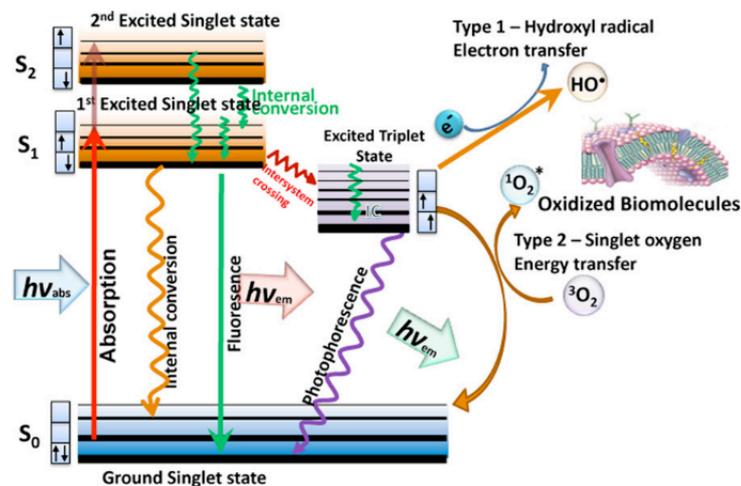
Seitdem erfolgt die Entwicklung neuer Photosensitizer und die Etablierung PDT-basierter Behandlungsprotokolle für verschiedenste onkologische Indikationen<sup>43</sup>.

#### 1.4.2 Physikalische und Molekularbiologische Hintergründe

Die Photodynamische Therapie beruht auf den photophysikalischen Eigenschaften eines angeregten Photosensibilisators (PS). PS sind Substanzen, die durch Übertragung zuvor absorbierter Energie mit umliegenden Molekülen, beispielsweise gewebsständigem Sauerstoff, reagieren können<sup>44</sup>. Sie besitzen gepaarte Elektronen mit jeweils gegensätzlichem Spin, also dem Gesamtspin von 0. Dieser Zustand wird Singulett-Zustand genannt<sup>45</sup>. Durch die Absorption von Energie nach Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (Laser) wird eines der Elektronen angeregt und verlagert sich bei unveränderter Multiplizität vom energetischen Grundzustand in ein energiereicheres Orbital. In diesem angeregten Singulett-Zustand verbleibt das Molekül jedoch nur wenige Nano- bis Pikosekunden und kann somit nicht mit Molekülen in der Umgebung reagieren. Um zum ursprünglichen Grundzustand zurückzukehren, kommt es zur Emission von Licht (Fluoreszenz) oder zur Abgabe von Wärmeenergie (innere Umwandlung). In beiden Fällen bleibt der Spin beider Elektronen und damit die Multiplizität erhalten. Wechselt das angeregte Elektron jedoch seinen Spin, kommt es zur Änderung der Multiplizität. Dieser strahlungslose Übergang des elektronischen Anregungszustandes in einen Triplett-Zustand wird Intersystem Crossing genannt<sup>45,46</sup>. Durch Emission von Licht (Phosphoreszenz) oder Wärmeabgabe gelangt das Elektron wieder in den Grundzustand. Im Gegensatz zum angeregten Singulett-Zustand verbleibt das Elektron länger im Triplett-Zustand (Milli- bis Mikrosekunden) und kann mit zellulären Bestandteilen in seiner Umgebung interagieren. Hierbei kann es durch Elektronentransfer auf umliegende Moleküle zur Radikalbildung kommen (Typ I Reaktion). Alternativ kann die Energie direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Hierbei wird das Sauerstoffmolekül vom Triplett-Grundzustand in den hochreaktiven Singulett-Zustand überführt (Typ II Reaktion). Die so generierten reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen

species, ROS) können daraufhin mit Molekülen und Zellorganellen in ihrer unmittelbaren Umgebung reagieren (Abb. 2)<sup>43,44</sup>. Beide Reaktionstypen treten gleichzeitig auf und sind abhängig von der Art des verwendeten Photosensitizers. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der ROS von nur  $< 0,04 \mu\text{s}$  und dem damit einhergehenden eingeschränkten Radius von ca.  $0,02 \mu\text{m}$  bleiben die Effekte lokal begrenzt<sup>39,41</sup>. Die exakten Auswirkungen hängen neben der Wahl des Photosensibilisators auch maßgeblich von der Lichtdosis, dem Sauerstoffgehalt und der zellulären Lokalisation des Photosensitizers ab.

Die hochreaktiven ROS können direkt die Tumorzellen angreifen. Diese Reaktion ist abhängig vom Sauerstoffgehalt und aufgrund der kurzen Halbwertszeit nur sehr lokal wirksam. Zusätzlich kommt es aufgrund der Reaktion mit tumorassoziiertem Gefäßendothel zur Mikrothrombosierung und Vasokonstriktion und somit infolge auch zur indirekten Schädigung des Tumorgewebes<sup>43</sup>.



**Abb. 2:** Jablonski-Diagramm zur Übersicht der Anregungszustände des Photosensitizers bei der PDT: Nach Energieabsorption ( $h\nu_{\text{abs}}$ ) wird ein Valenzelektron des Photosensitizers aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen energetisch höheren Anregungszustand gehoben ( $S_1$ ). Durch Intersystem Crossing kommt es zum Spin-Wechsel des angeregten Elektrons und damit zum Übergang in einen Triplett-Zustand. Zur Relaxation in den Grundzustand kann die Energie nun auf umliegende Moleküle bzw. Sauerstoff übertragen werden (Type I/II Reaktion)<sup>46</sup>.

Die PDT induzierte Zytotoxizität kann über die Aktivierung verschiedener Signalwege erfolgen. Akkumulation des Photosensitizers in den Mitochondrien führt zur Störung membrangebundener antiapoptotischer Proteine wie BCL-2 und damit zur gestörten Integrität der Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization). Durch die konsekutive Freisetzung von Cytochrom c und SMAC/DIABLO aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma kommt es zur Initiierung der Apoptose<sup>43,47</sup>. Im Gegensatz zur Apoptose

stellt die Nekrose den pathologischen und unkontrollierten Zelltod dar. Es kommt zur Zellschwellung und aufgrund PS-vermittelter Membrandefekte zur Porenbildung in der Zellmembran. Die damit einhergehende Freisetzung von Zellmaterial in die extrazelluläre Umgebung führt zur Entzündungsreaktion<sup>43,47,48</sup>. Geringere Dosierungen und die intra-mitochondriale Lokalisation des PS begünstigen proapoptische Signalwege, wohingegen höherer Dosen und die Anreicherung des PS in der Zellmembran eher zur Nekrose führen. Neben diesen beiden Signalwegen kommt es auch zur PDT-induzierten Autophagie, bei der es durch Aktivierung lysosomaler Prozesse zur Degradation intrazellulärer Proteine bzw. Zellorganellen kommt<sup>44</sup>.

### 1.4.3 Lichtquelle und Photosensitizer

Die Durchführung der PDT beinhaltet neben der Gabe des Photosensitizers die anschließende Bestrahlung des Tumors. Verschiedene Lichtquellen stehen hierfür zur Verfügung. Während bei dermatologischen Anwendungen aufgrund des größeren Bestrahlungsfeldes und der einfacheren und kostengünstigeren Durchführung selten Laser-Licht benutzt wird, kommt für die Behandlung anderer Tumore Licht spezifischer Wellenlänge zum Einsatz. Das monochromatische, polarisierte und phasensynchrone Licht kann hierbei über fiberoptische Lichtdiffusoren — mit geringer Lichtstreuung und geringem Energieverlust — auch bei ansonsten unerreichbaren Tumorlokalisationen verwendet werden<sup>44</sup>. Laser mit der Wellenlänge zwischen 600 und 850 nm sind für die Verwendung bei PDT optimal. Dieser Wellenlängenbereich stellt das „therapeutische/optische Fenster“ dar. Größere Wellenlänge besitzen nicht genügend Energie für die effiziente Initiierung der phototoxischen Reaktionen. Licht kürzerer Wellenlänge ist zwar energiereicher, weist jedoch eine geringere Eindringtiefe in das Gewebe auf<sup>47</sup>. Bei der Wahl des Lasers mit der optimalen Wellenlänge ist ebenfalls der verwendete PS und das damit zusammenhängende optimale Absorptionsspektrum zu beachten.

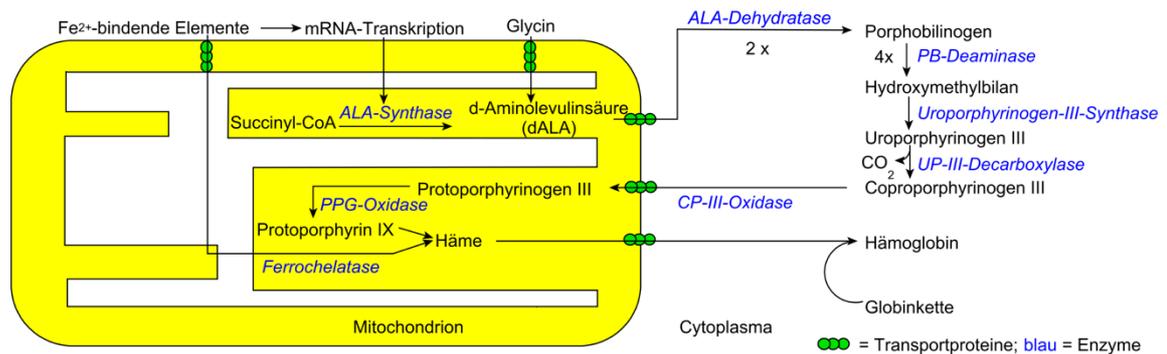
Verschiedene Gruppen an Photosensibilisatoren werden aktuell in der klinisch-experimentellen Behandlung angewendet. Neben den PS der ersten Generation, den Hämatorporphyrin-Derivaten wie Porfimer sodium (Photofrin®), stehen verschiedene Protoporphyrinderivate wie 5-Aminolävulinsäure (Gliolan®) und Methylaminolevulinat (Metvix®) sowie verschieden Chlorin-/Bakteriochlorinabkömmlinge (Talaporfin®, FOSCAN®) zur Verfügung<sup>45,49</sup>.

#### *5-Aminolävulinsäure*

Als Prodrug ist 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) selber nicht phototoxisch wirksam. Die Wirkung als Photosensitizer beruht auf der Umwandlung in den Metaboliten Protoporphyrin IX (PPIX)<sup>50</sup>. 5-Aminolävulinsäure ist eine Aminosäure und gehört zur Gruppe der Ketocarbonsäuren. In der Porphyrinsynthese wird sie im Mitochondrium aus Succinyl-Co und der Aminosäure

## EINLEITUNG

Glycin synthetisiert und anschließend im Zytosol durch die 5-ALA-Dehydratase in Porphobilinogen umgewandelt. Aus vier Molekülen Porphobilinogen entsteht über weitere Zwischenschritte Coproporphyrinogen III, welches wieder in den mitochondrialen Intermembranraum zurückgeschleust wird. Hier dient es als Substrat für Protoporphyrin IX (PPIX). Im letzten Schritt katalysiert die Ferrochelatase aus PPIX das Endprodukt Häm (Abb. 3)<sup>50</sup>.

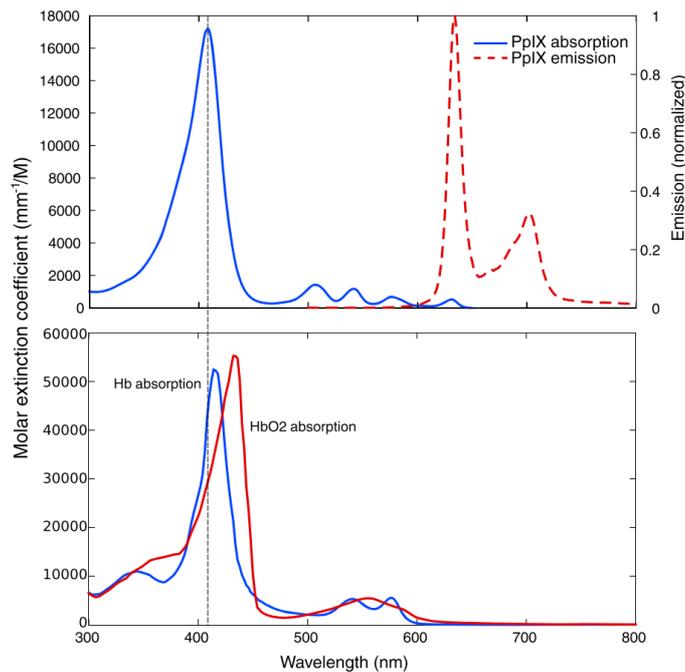


**Abb. 3:** Häm-Synthese im schematischen Überblick. Vermehrte Bildung von Protoporphyrin IX (PPIX) bei exogener Zufuhr von 5-Aminolävulinat (5-ALA). Abbildung modifiziert<sup>51</sup>.

Aufgrund von tumorspezifischen Enzymfunktionen werden die Vorstufen des PPIX innerhalb der Tumorzellen vermehrt synthetisiert, wohingegen die Umwandlung des PPIX zu Häm durch eine reduzierte Aktivität der Ferrochelatase gehemmt wird<sup>50</sup>. Die negative Rückkopplung durch vermehrt synthetisiertes Häm auf die 5-ALA-Synthase wird bei exogener Zufuhr umgangen. In der Folge reichert sich exogen zugeführtes 5-ALA in den Tumorzellen verstärkt an mit konsekutiver intratumoraler PPIX-Akkumulation<sup>52</sup>.

Das Absorptionsmaximum von PPIX liegt bei 405 nm (Soret-Bande) mit vier weiteren, jedoch deutlich kleineren Peaks zwischen 500-650 nm (Q-Banden). Von besonderer Bedeutung ist jedoch auch die Absorption des oxygenierten und desoxygenierten Hämoglobins, welche ebenfalls ihre Maxima im Bereich von 405-410 nm Wellenlänge besitzen. Bei der PDT wird das PPIX daher durch einen Laser mit 635 nm angeregt. Somit wird eine Abschwächung des Lasers durch Hämoglobin verhindert und eine größere Eindringtiefe gewährleistet (Abb. 4)<sup>53</sup>.

## EINLEITUNG



**Abb. 4:** Absorptions- und Emissionsbereich von Protoporphyrin IX (PPIX) (oben). Absorptionsbereich von oxygeniertem (rot) und desoxygeniertem Hämoglobin (blau) (unten). Aufgrund der überlappenden Absorptionsmaxima von PPIX und Hämoglobin im Bereich von 300-500 nm wird zur Exzitation des Photosensitizers ein Laser mit der Wellenlänge von 635 nm verwendet<sup>53</sup>.

5-ALA ist in den therapeutischen Dosen nicht toxisch, zeigt keine Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und ein nur geringes Nebenwirkungspotential<sup>54</sup>. Der Zeitraum mit einer erhöhten Phototoxizität ist mit ca. 24-72h relativ kurz<sup>55</sup>.

Neben der PDT wird 5-ALA auch zur fluoreszenz-gestützten, mikrochirurgischen Tumoresektion hirneigener Tumore genutzt. Durch die tumorspezifische Anreicherung ist somit eine bessere Abgrenzung des Tumorrandes zum gesunden Hirngewebe möglich<sup>4,56</sup>.

### 1.4.4 Photodynamische Therapie bei Glioblastoma multiforme

Bei der PDT im Rahmen der Gliomtherapie erfolgt die präoperative 5-ALA Applikation (20-30 mg/kgKG) zumeist peroral ca. 2-4 Stunden vor Beginn des Eingriffes. Anschließend wird das photosensibilisierte Tumorgewebe mittels stereotaktisch implantierter Lichtdiffusoren bestrahlt (interstitielle PDT, iPDT)<sup>57,58</sup>. In einer von der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Klinik der Universität München durchgeführten Pilotstudie wurde die PDT erstmalig als Initialtherapie bei Patienten mit nicht komplett resektablen de-novo Glioblastomen eingesetzt.

Als Kontrollgruppe diente eine Patientenkohorte mit primärer totaler, mikrochirurgischer Tumoresektion. Zusätzlich erfolgte bei allen Patienten eine Radiotherapie mit konkomitanter und

adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid. Hierbei konnten deutliche Unterschiede bezüglich des Behandlungserfolges zwischen den Therapieansätzen nachgewiesen werden. So zeigte sich bei den PDT-Patienten ein deutlich verbessertes Outcome im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das progressionsfreie Intervall war mit 16 Monaten signifikant verlängert (10,2 Monate nach Resektion), wobei manche Patienten der PDT-Gruppe im Follow-Up über 5 Jahre progressionsfrei blieben. Betrug die 3-Jahresüberlebensrate nach konventioneller Resektion lediglich 21 % konnte diese in der PDT-Gruppe auf 65 % gesteigert werden. Hierbei war in beiden Gruppen der MGMT-Promotorstatus der stärkste prognostische Faktor für den Therapierfolg<sup>59</sup>.

### 1.4.5 Photodynamische Therapie und Immunsystem

Die erfolgversprechenden anti-tumorigenen Effekte der PDT sind nicht allein durch den induzierten oxidativen Stress und die damit einhergehende lokale Destruktion des bestrahlten Tumorgewebes zu erklären. Zunehmend werden auch die Auswirkungen auf immunologische Prozesse diskutiert. Der PDT-induzierte Untergang bestrahlter Tumorzellen führt zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile (u.a. HSP70). Durch die Bindung dieser „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) an Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) wird eine erste und unspezifische Reaktion innater Immunzellen initiiert<sup>44,60</sup>. Hierbei kommt es zunächst zur Invasion neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Dendritischer Zellen<sup>43</sup>. Zusätzlich steigt die Permeabilität tumorassoziierter Gefäße mit konsekutiver Einwanderung weiterer Immunzellen und in der Folge kommt es zur vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-8<sup>43,44</sup>. Für die beobachtete prolongierte Tumorkontrolle nach PDT erscheint jedoch die alleinige Induktion einer unspezifischen Entzündungsreaktion nicht suffizient. Vielmehr bedarf es hierfür der Differenzierung tumor-spezifischer Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Für Lungen- und Kolonkarzinome konnte bereits tierexperimentell gezeigt werden, dass es nach PDT zur Induktion CD8-positiver T-Zellen mit vermehrter Tumorinvasion kommt und dass Tiere mit reduzierter MHC-I-Expression – dem Proteinkomplex zur Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen – deutlicher schlechter auf eine PDT-Behandlung ansprechen<sup>33,43,61</sup>.

Es liegt also nahe, dass das adaptive Immunsystem und eine Gedächtniszell-Bildung für den langanhaltende anti-tumorigenen Effekt der PDT eine maßgebliche Rolle spielen. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch noch Gegenstand aktueller Forschung.

## 1.5 FRAGESTELLUNG DES DISSERTATIONSPROJEKTES

In einer Pilotstudie der Klinik für Neurochirurgie des Klinikums der Universität München konnte erstmalig gezeigt werden, dass Patienten mit irresektablem GBM nach photodynamischer Behandlung im Vergleich zu Patienten nach operativer Tumorsektion ein signifikant verlängertes progressionsfreies Intervall sowie eine deutlich prolongierte 3-Jahresüberlebensrate aufweisen<sup>59</sup>. Der insbesondere für die langanhaltende Tumorkontrolle verantwortliche Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht entschlüsselt. Zunehmend werden hier mögliche Auswirkungen der PDT auf die adaptive Immunität und die Initiierung einer gezielten anti-tumoralen Immunreaktion diskutiert<sup>33,61</sup>.

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits ein *in-vitro*-Modell zur experimentellen PDT-Behandlung von Glioblastomzelllinien entwickelt und hierbei eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems nach PDT nachgewiesen werden<sup>62</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob es sich bei der Aktivierung einer T-Zell-vermittelten Immunität um einen PDT-spezifischen Effekt handelt. Daher soll zunächst ein *in-vitro*-Modell zur Temozolomid-Behandlung entwickelt werden. Anschließend soll mit Hilfe beider Modelle untersucht werden, welchen Einfluss eine Temozolomid-Chemotherapie im Vergleich zur PDT auf die T-Zell-spezifische antitumorale Immunität hat.

Da die bisherigen Experimente in allogenen Modellen durchgeführt wurden, soll zusätzlich das PDT-Modell auf ein autologes Setting übertragen werden

## 2 Materialien

### 2.1 GERÄTE

(Tisch-) Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg
autoMACS /autoMACSPro	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Bestrahlungskammer	LIFE-Zentrum LMU, München
Inkubationsschrank (Kendro BB6220)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Cell Separation Magnet	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fieldmaster Powermeter	Coherent, Inc., USA
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
ImmunoSpot Analyzer	CTL Europe GmbH, Bonn
Kühlschrank	Liebherr-International GmbH, Biberach
Laser 635 nm (Ceralas)	CeramOptec GmbH, Bonn
Lichtmikroskop	Leica Microsystems Inc., USA
LightCycler® 480 Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikro-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
MrFrosty™ Freezing Container	Thermo Scientific Inc., USA
NanoDrop	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette boy (Easypet)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank (Hera Safe Kendro)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stickstofftank	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen (Sieg)
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoshaker	Thermo Scientific Inc., USA
ViCell XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter Inc., USA
Vortex	Thermo Scientific Inc., USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

## 2.2 VERBRAUCHSMATERIAL

15 ml / 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
PCR-Gefäße 0,5 ml, 1,6 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe-Lock-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
50 ml Leucosep Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
Zellkulturflaschen 25/75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
75 cm <sup>2</sup> Advanced TC™ Flaschen	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 1000-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Filterspitzen 0,5-10 µl	Biozym Scientific GmbH & Co. KG
Filterspitzen 2-200 µl	Biozym Scientific GmbH & Co. KG
Serologische Pipetten 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten 25 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten 50 ml	Eppendorf AG, Hamburg
RNA Isolationstubes	Life Technologies, USA
RNA Isolation Filter	Life Technologies, USA
96-Multiwell-Platte	Life Technologies, USA
6-Well Multiwell-Platte	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
12-Well Multiwell-Platte	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
24-Well Multiwell-Platte	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
Advanced TC™ 6-Well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
8-Well Zellkulturkammer auf Glas	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser, Mikroskopie 18 x 18 mm	CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck
Menzel™ Mikroskop-Deckelgläschen	Thermo Fisher Scientific; USA
Kryoröhrchen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
EASYstrainer™ (100 µM, 70 µM, 40 µM)	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich

## MATERIALIEN

Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
gentleMACS C Tubes	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
S-Monovette, Lithium-Heparin, 7,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safety-Multifly™- Kanüle	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## 2.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

### **Zellkulturmedium (U87):**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), +/- Phenolrot	Biochrom AG, Berlin
+ 10 % fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Minimum Essential Medium	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin

### **Zellkulturmedium (PBMC):**

RPMI-1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
+ 10 % fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
+ 2 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin

### **Zellkulturmedium (primäre Tumorzellen):**

MACS Neuro Medium	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
+ 10 % fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
+ 1 % Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
+ 2 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
+ 2 % Neurobrew ohne Vitamin A	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA (10X)	Biochrom AG, Berlin

## MATERIALIEN

Biotase	Biochrom AG, Berlin
Accutase	Sigma-Aldrich, USA
Temzolomid $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck Millipore, USA
5-Aminolävulinsäure-Hydrochlorid	medac GmbH, Wedel
Ficoll-Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100 (1 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
DMSO (anhydrous)	Life-Technologies, USA
Human Perforin ELISpot <sup>PLUS</sup> Kit	Mabtech AB, Schweden
rh Interleukin-2	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
CTL Test <sup>TM</sup> Medium	CTL Europe GmbH, Bonn
Dynabeads <sup>TM</sup> Human T-Activator CD3/CD28	Thermo Fisher Scientific; USA
autoMACS Running Buffer – MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
autoMACS Washing Buffer – MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
CD8 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Brain Tumor Dissociation Kit (P)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
UPL-Sonden	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligonukleotid -Primer für qRT-PCR	Metabion, Martinsried, München
Lightcycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ambion <sup>TM</sup> RNAqueous total RNA Isolation Kit	Life Technologies, USA
miRNeasy Mini Kit (50)	Quiagen, Hilden
QIAzol Lysepuffer	Quiagen, Hilden

## MATERIALIEN

SignalStain® DAB Substrate Kit	Cell Signaling Technology, USA
SignalStain® Antibody Diluent	Cell Signaling Technology, USA
SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Mouse)	Cell Signaling Technology, USA
SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit)	Cell Signaling Technology, USA
Wasserstoffperoxid-Lösung	Sigma-Aldrich, USA
Anti-GFAP Antikörper, monoklonal, Rabbit	Sigma-Aldrich, USA
Anti-MAP2 Antikörper, monoklonal, Mouse	Sigma-Aldrich, USA
Ziegenserum, Normal Goat Serum	Cell Signaling Technology, USA
Mayers Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, USA
Entellan®	Merck Millipore, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific; USA
+ GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific; USA

### Oligonukleotid-Primer (qRT-PCR)

Ziel-mRNA	Primersequenz - forward	Primersequenz - reverse
PRF1 (Perforin)	5'-CAC TCA CAG GCA GCC AAC T -3'	5'- GGG AGT GTG TAC CAC ATG -3'
IFNG (IFN- $\gamma$ )	5'- GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA -3'	5'- TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT -3'
GZMB	5'- GGG GGA CCC AGA GAT TAA -3'	5'- CCA TTG TTT CGT CCA TAG -3'
IL1B (IL-1 $\beta$ )	5'-GAG GCA CAA GGC ACA ACA G-3'	5'- CCA TGG CTG CTT CAG ACA C-3'
beta-Aktin	5'- CCA ACC GCG AGA AGA TGA -3'	5'- CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG -3'
TBP	5'- GAA CAT CAT GGA TCA GAA CAA CA -3'	5'- ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT -3'

## 2.4 SOFTWARE

Bestrahlungssoftware der Bestrahlungskammer: Laser Forschungslabor, München

ImmunoSpot® Software: CTL Europe GmbH, Bonn

Fluostar Optima series und Optima MARS: BMG LABTECH GmbH, Ortenberg

Statistik: GraphPad PRISM 7, GraphPad Software, Inc., USA

Light Cycler® 480 Relative Quantification Software: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Literaturverwaltung: Mendeley Ltd, London, UK

## 3 Methoden

### 3.1 ZELLKULTUR U87-GLIOBLASTOMZELLEN

#### 3.1.1 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte U87-Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in ein steriles 15 ml-Tube transferiert und dieses mit vorgewärmtem Tumormedium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 5 min) und der Überstand abgenommen, um den zytotoxischen Effekt des bei der Kryokonservierung verwendeten DMSO zu minimieren. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen gezählt und entsprechend ihrer Zellzahl kultiviert.

#### 3.1.2 Inkubation und Zellsplitting

Die U87-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C im Inkubationsschrank kultiviert. Als Medium diente 12 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplementiert mit 10 % fetalem bovinen Serum (FBS/FCS), 1 % Natrium Pyruvat (100 mM), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 % Penicillin/Streptomycin. Alle 72 Stunden wurden die Zellen passagiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, damit eine Zellzahl von 3x10<sup>6</sup> Zellen pro Kulturschale nicht überschritten wurde. Hierfür wurde das Medium über den adhärennten U87-Zellen abgenommen. Nach dreiminütiger Inkubation mit Trypsin / EDTA im Brutschrank wurden die Zellen mit FCS-haltigem Nährmedium abgespült, gezählt und anschließend auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt oder für experimentelle Ansätze ausgesät.

#### 3.1.3 Kryokonservierung

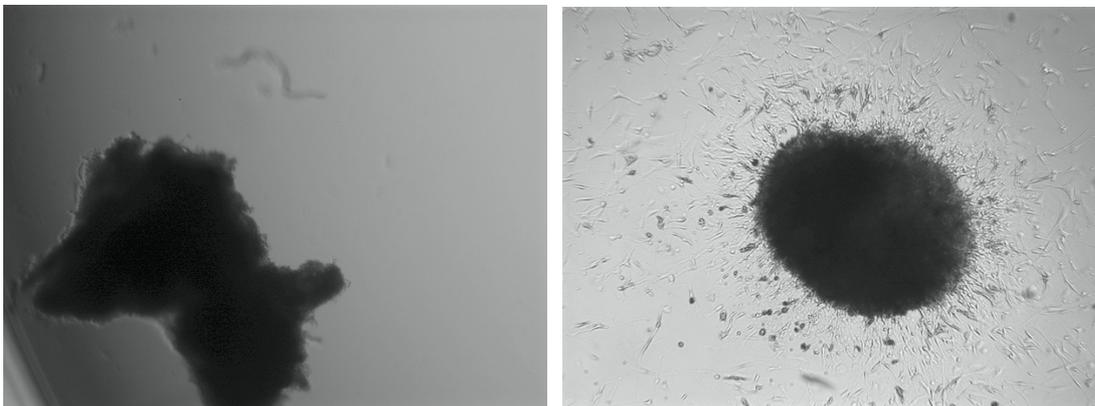
U87-Zellen wurden aus der Kulturflasche abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Mindestens 2x10<sup>6</sup> Zellen wurden in 500 µl Tumormedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen transferiert. Anschließend wurde 500 µl Kryokonservierungslösung (40 % DMEM, 40 % FCS und 20 % DMSO) tropfenweise hinzugegeben. Für eine kontrollierte Temperaturreduktion von 1 °C pro Stunde wurden die Kryoröhrchen 24 Stunden im Mr. Frosty Freezing Container (befüllt mit 2-Propanol) bei -80 °C gelagert und im Anschluss in die Stickstofftonne (-196 °C) überführt. Die Lagerung im Freezing Container gewährleistete eine schonende Temperaturreduktion der Proben um 1 °C/ pro Stunde.

## 3.2 ZELLKULTUR PRIMÄRER TUMORZELLEN

### 3.2.1 Isolation primärer Glioblastomzellen

Bei 5-ALA-fluoreszenzgestützten, mikrochirurgischen Tumorresektionen, durchgeführt in der Neurochirurgischen Klinik am Campus Großhadern des Klinikums der Universität München (LMU), wurde Tumorgewebe entnommen. Die Zellisolation erfolgte mittels des Brain Tumor Dissociation Kit (P) im gentleMACS™ Dissociator nach Vorschrift unter sterilen Bedingungen und im abgedunkelten Labor. Hierfür wurde das Gewebe zunächst in einer Petrischale mittels Skalpell mechanisch zerkleinert und anschließend in gentleMACS C Tubes überführt. Die chemische und weitere mechanische Dissoziation erfolgte im gentleMACS™ Dissociator. Abschließend wurde die Zellsuspension durch Filter mit absteigender Porendichte (100 µm, 70 µm, 40 µm) gefiltert, zentrifugiert, in Neuromedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die stereotaktisch-gewonnenen Biopsate wurden direkt in eine 12-Well-Platte mit Neuromedium transferiert. Es erfolgte weder eine mechanische noch chemische Dissoziation. Nach 24 bis 72 Stunden konnte eine Aussprossung einzelner Zellen aus dem Biopsat beobachtet werden (Abb. 5) Nach einer Woche wurden die Zellen mit Neuromedium vorsichtig abgespült und zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche (Advanced TC™) überführt.



**Abb. 5:** Kultivierung primärer Tumorzellen aus stereotaktischen GBM-Biopsaten direkt nach Probenentnahme (links) und nach 24-stündiger Kultivierung (rechts). Deutliche Aussprossung einzelner Tumorzellen sichtbar.

### 3.2.2 Inkubation und Zellsplitting primärer Tumorzellen

Die Kultivierung primärer Glioblastomzellen erfolgte in Neuromedium (Neuromedium mit 10 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin, 2 % L-Glutamin, 2 % Neurobrew ohne Vitamin A). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Abhängig vom Zellwachstum wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert. Die adhärennten Primärzellen wurden anschließend mit Accutase nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst und mit Neuromedium abgespült. Nach Ermittlung der Zellzahl erfolgte die Aufteilung auf neue Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> mit 10 ml Medium). Für die weitere Kultivierung wurde Medium der alten Passage und frisches Medium im Verhältnis 1:1 genutzt.

### 3.2.3 Kryokonservierung primärer Tumorzellen

Primäre Tumorzellen wurden wie beschrieben abgelöst und gezählt. Mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Kryokonservierungslösung bestehend aus Neuromedium mit 2 % Neurobrew ohne Vitamin A, 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in ein Kryoröhrchen transferiert. Auch hier erfolgte die Lagerung zunächst im Mr. Frosty-Freezing Container mit anschließender Überführung in die Stickstofftonne (siehe 3.1.3.).

### 3.2.4 Immunhistochemische Färbung primärer Tumorzellen

Primärzellen wurden auf eine 8-Well Zellkulturkammer mit Deckglas-Objektträger in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in Aceton (-20°C) permeabilisiert und fixiert. Nach erneutem Waschen der Zellen erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen durch 10-minütige Inkubation in Wasserstoffperoxid (1 %, verdünnt in Methanol). Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in Blocking Serum (5 % Ziegen Serum) inkubiert und anschließend der jeweilige Primärantikörper hinzugegeben: Microtubule-associated protein 2 (MAP2) verdünnt 1:20.000, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) verdünnt 1:40.000. Die Inkubation erfolgte auf dem Kippmischer bei 4 °C. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit TBST gewaschen und in der Polymer-Meerrettichperoxidase (HRP)-Sekundärantikörper Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gewaschen und das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) hinzugefügt. Durch die HRP-vermittelte Oxidierung des DAB kommt es zur Ablagerung brauner Farbpigmente am Ort der Antikörperbindung. Sobald mikroskopisch erste Ablagerungen erkennbar waren, wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit TBST und destilliertem Wasser gestoppt. Es erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin. Die Zellkulturkammern wurden vom Deckglas ge-

löst, der Objektträger in Aqua dest. gewaschen und die Präparate mittels aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %) dehydriert, gefolgt von zweimaliger Prozessierung mit Xylol. Abschließend wurden die Zellen mit Deckglas und Entellan® als Eindeckmedium manuell eingedeckt und 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch.

### 3.3 ERMITTLUNG VON ZELLZAHL UND ZELLVIABILITÄT

Für die Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität wurde der Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer verwendet. Basierend auf der automatisierten Färbung mit Trypanblau und der parallelen Bildaufnahme werden lebende von toten Zellen bzw. Zellresten unterschieden und so die Gesamtanzahl, die Anzahl der lebenden Zellen sowie die Größe der gemessenen Zellen ermittelt. Alternativ wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und lichtmikroskopisch, manuell in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 3.4 BLUTENTNAHMEN

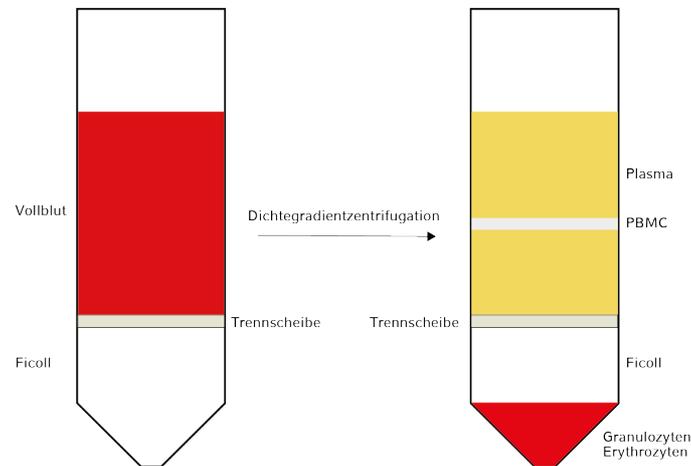
Blut gesunder Probanden und Patienten wurde mittels steriler Punktion einer peripheren Vene mit Flügelkanülen/Butterflys entnommen. Die Abnahme erfolgte in Sarstedt® S-Monovetten. Die PBMC-Isolation erfolgte aus Lithium-Heparin-Monovetten. Diese enthalten Heparin (16 I.E. / ml Blut) als Antikoagulans. Zusätzlich wurde Blut in Serum-Monovetten abgenommen. Das in den Serum-Monovetten enthaltene Silikat diente als Gerinnungsaktivator. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur werden die Serum-Monovetten bei 3000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum als Überstand abpipettiert und weiterverarbeitet oder ggf. bei -80°C gelagert.

### 3.5 PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC)

#### 3.5.1 PBMC-Isolation

Leucosep®-Röhrchen mit poröser Trennscheibe aus Polyethylen wurden mit 15 ml Ficoll (1.077 g/mL) befüllt. Nach der Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten befindet sich das Ficoll unter der Trennmembran. So wird eine Vermischung von Blut und Ficoll verhindert und das Risiko einer Kontamination durch Erythrozyten und Granulozyten minimiert. Gesunden Probanden bzw. Patienten wurde das benötigte Volumen Vollblut in Li-Hep-Monovetten abgenommen, mit PBS verdünnt und je 25 ml in ein vorbereitetes Leucosep®-Röhrchen gegeben.

Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation (2000 rpm, 17 min, ohne Bremse) erfolgte die Separation des Vollblutes aufgrund der Dichteunterschiede der Zellpopulationen (Abb. 6). Die PBMC-haltige Interphase wurde im Anschluss abgenommen, mehrfach in PBS gewaschen und die Zellzahl ermittelt.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der PBMC-Isolation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Leucosep®-Röhrchen.

### 3.5.2 Standard-Kryokonservierung von PBMC

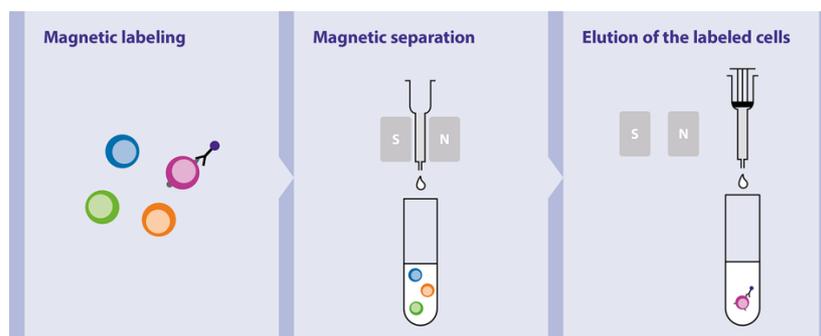
Zur Standard-Kryokonservierung der PBMC wurden die Zellen in einer Resuspensionslösung (95 % RPMI und 5 % HSA) aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Kryokonservierungslösung (80 % HSA und 20 % DMSO) langsam hinzugefügt. Die maximale Zellzahl pro Kryoröhrchen lag bei  $20 \times 10^6$ . Die Kryoröhrchen wurden umgehend in den Mr. Frosty Freezing Container (2-Propanol) transferiert und dieser im  $-80\text{ °C}$  Tiefkühlschrank für 24 Stunden gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Proben in den stickstoffgefüllten Kryotank ( $-196\text{ °C}$ ) überführt.

### 3.5.3 Auftauen von PBMC

Als Vorbereitung wurden die benötigten Medien und das Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  erwärmt und 2 ml erwärmtes RPMI-Nährmedium in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden nach Entnahme aus der Kryotonne auf Trockeneis gelagert und im Wasserbad aufgetaut. Daraufhin wurden die Zellen in das vorbereitete Röhrchen überführt, mit erwärmten FCS-Nährmedium auf 15 ml aufgefüllt und 4 Minuten bei 300 g abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Zellen anschließend gezählt.

### 3.6 T-ZELL-ISOLATION

Die T-Zell-Isolation aus isolierten PBMC wurde mittels MicroBead-Separation im AutoMACS bzw. AutoMACSPro nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die MicroBead-Separation basiert auf der Markierung der gesuchten Antigen-Zielstruktur mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, welche mit superparamagnetischen Nanopartikeln gekoppelt sind. Anschließend durchläuft die Zellsuspension im AutoMACSPro-Separator eine Säule mit ferromagnetischer Beschichtung innerhalb eines Magnetfeldes. Die MicroBead-markierten Zellen werden somit am Magneten zurückgehalten, die ungelabelten Zellen aufgefangen. Anschließend werden die gelabelten Zellen automatisch eluiert und separat gewonnen (positive Selektion) (Abb. 7)<sup>63</sup>. Durch die Antikörper-Antigen-Bindung kommt es weder zur Aktivierung der Zelle noch zur Beeinflussung der Oberflächenstruktur oder der Zellfunktionalität<sup>64</sup>. Als Vorbereitung für die Isolation wurde die benötigte Zentrifuge auf 4 °C heruntergekühlt und der Puffer A auf Eis schonend aufgetaut. Zur Antigenmarkierung werden die PBMC in Puffer A und für 15 Minuten bei 4 °C mit CD8 MicroBeads inkubiert. Anschließend werden die PBMC gewaschen und es erfolgt die Isolation im AutoMACSPro-Separator.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Zellseparation mittels magnetischer MicroBeads (Miltenyi Biotec) durch Positivselektion der zu isolierenden Zellpopulation und anschließendem Durchlaufen der magnetischen Säule im AutoMACSPro<sup>63</sup>.

### 3.7 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE DER U87-ZELLEN IN-VITRO

Die PDT Behandlung setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen. Zunächst werden die Tumorzellen mit dem Photosensitizer 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) inkubiert. Im Anschluss folgt die Bestrahlung mit Laserlicht mit einer Wellenlänge von 635 nm.

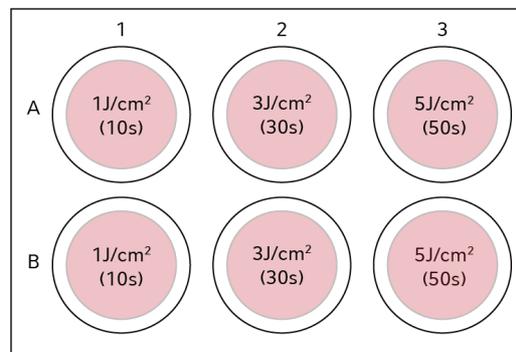
#### 3.7.1 Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

U87-Zellen wurden in 6-Well-Platten mit einer Konzentration von  $0,4 \times 10^6$  Zellen pro Well in 4 ml Tumormedium ausgesät. Nach einer Inkubationsphase von 18 Stunden im Brutschrank

erfolgte die Inkubation mit 5-ALA. Die dafür benötigten Arbeitsschritte fanden auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Photosensitizers im abgedunkelten Labor statt. Zunächst wurde mit PBS eine 5-ALA-Lösung mit der Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Der pH-Wert wurde anschließend mittels Natronlauge an das physiologische Niveau (7,35-7,45) angeglichen, um während der Inkubationszeit keinen Zellschaden zu induzieren. Für die vierstündige Inkubation erfolgte die Verdünnung mit DMEM (ohne FCS) auf eine finale 5-ALA Konzentration von 25 µg/ml. Für die Bestrahlung wurde das Nährmedium der Tumorzellen durch jeweils 4 ml 5-ALA-Lösung, das Medium der Kontrollzellen (ohne PDT) durch FCS-freies DMEM ersetzt.

### 3.7.2 in-vitro-PDT-Bestrahlung

Bei der intraoperativen stereotaktischen PDT-Behandlung erfahren die an der Oberfläche des Tumors liegende Zellen eine höhere Strahlungsenergie als die weiter innen liegenden Zellschichten. So wurde auch im *in-vitro*-Modell mit unterschiedlichen Energielevel gearbeitet. Anhand verschiedener Bestrahlungszeiten (Sekunden, s) bei einer konstanten Zielleistung von 100 mW/cm<sup>2</sup> wurden die gewünschten Bestrahlungsenergielevel (J/cm<sup>2</sup>) von 1 J/cm<sup>2</sup> (10s), 3 J/cm<sup>2</sup> (30s) und 5 J/cm<sup>2</sup> (50s) für die jeweiligen Wells festgelegt. Für die Bestrahlung wurde das Medium durch FCS-freies, farbloses DMEM ersetzt. Die Platten wurden in die Laservorrichtung eingespannt und nach folgendem Schema bestrahlt (Abb. 8):



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der 6-Well-Platte für die *in-vitro*-PDT-Behandlung. Die unterschiedlichen Bestrahlungsenergien wurden anhand der Bestrahlungszeit (in Sekunden, s) reguliert.

Anschließend wurden die bestrahlten Zellen mittels Biotase enzymatisch aus den Wells gelöst und die Zellen unterschiedlicher Bestrahlungsenergien zu gleichen Teilen zusammengefügt. Ebenso wurden die unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe gelöst und gezählt.

### 3.7.3 Kultivierung der PBMC und U87-Zellen nach PDT

Für die Co-Kulturen von U87-Tumorzellen mit PBMC gesunder Probanden wurden die PDT-behandelten Tumorzellen bzw. die Kontrollzellen zusammen mit PBMC im Verhältnis 1:10 in

6-Well-Platten bzw. 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM kultiviert. Zusätzlich erfolgte die T-Zell-Stimulation durch Zugabe von Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® in einer Konzentration von 2,5 µl pro 1x10<sup>6</sup> PBMC. Diese paramagnetischen Beads sind konjugiert mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 Oberflächenmoleküle. Somit wurde eine physiologische T-Zellaktivierung durch antigenpräsentierende Zellen (APC) über MHC-I und CD80 (B7-1) bzw. CD86 (B7-2) imitiert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C im abgedunkelten Brutschrank wurden die Zellen ohne enzymatische Ablösung geerntet, in PBS gewaschen, in 2.0 ml Eppendorfreaktionsgefäße transferiert und diese für 3 Minuten im Cell Separation Magnet platziert. Die magnetischen Dynabeads® verblieben am Rand der Tubes, die restliche Zellsuspension konnte entnommen, gezählt und analysiert werden.

### 3.8 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE DER PRIMÄRZELLEN IN-VITRO

Die *in-vitro*-PDT im autologen Ansatz erfolgte analog zur PDT der U87-Zelllinie. Primäre Glioblastom-Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die 5-ALA Konzentration betrug 25 µg/ml in FCS-freiem Neuromedium. Nach der PDT wurden die Zellen mittels Accutase aus den Wells gelöst und gezählt. Für die anschließende Co-Kultivierung wurden die primären Tumorzellen und autologe PBMC vom selben Patienten benutzt. Als Nährmedium der Co-Kultur diente Neuromedium. Stimulation und Inkubation unterschieden sich nicht vom Ansatz mit U87-Zellen und PBMC gesunder Probanden.

### 3.9 ERMITTLUNG DER PDT-ÄQUIVALENTEN TEMOZOLOMID-DOSIS

#### 3.9.1 Vorbereitung der TMZ-Stock-Solution

Zur Herstellung einer 50 mM TMZ Stock-Lösung wurden 25 mg Temozolomid (194,15 g/mol) in 2,6 ml DMSO gelöst, in Eppendorf-Tubes aliquotiert und im Gefrierschrank bei -24 °C gelagert.

#### 3.9.2 TMZ-Titration

Um die benötigte Temozolomid-Dosis zu ermitteln, bei welcher der provozierte Zellschaden dem der PDT-Behandlung entspricht, wurden U87-Zellen mit einer Dichte von 0,1x10<sup>6</sup> Zellen pro Well auf einer 24-Well-Platte in Nährmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde eine definierte Menge der TMZ Stock-Solution hinzugefügt um – je nach Well – eine TMZ-Endkonzentrationen im Nährmedium zwischen 0 und 500 µM

zu erreichen. Nach insgesamt 72 Stunden Inkubation erfolgte die Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Assay.

### 3.9.3 Bestimmung der Zellschädigung durch PDT

Auf 6-Well-Platten wurden  $0,4 \times 10^6$  Tumorzellen pro Well ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die vierstündige 5-ALA-Inkubation und PDT-Behandlung nach dem oben beschriebenen Schema. Hierbei wurden in Doppelbestimmungen die Wells entweder mit 1, 3 oder 5 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt und zusätzlich Zellen in 5-ALA, jedoch ohne anschließende Bestrahlung oder nur in Zellmedium ohne 5-ALA-Applikation/ohne Bestrahlung, inkubiert. Nach der PDT wurden die Zellen mittels Biotase gelöst und jeweils  $0,1 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Gruppen in 1 ml Zellmedium auf eine 24-Well-Platte transferiert. Zusätzlich wurden die restlichen PDT-behandelten U87-Zellen zu gleichen Teilen zusammengeführt und hiervon ebenfalls  $0,1 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen, analog zu den Co-Kulturen, für 48 Stunden und die Viabilitätsbestimmungen wurden mittels MTT-Assay durchgeführt. Als Referenzgruppe dienten unbehandelte Zellen.

## 3.10 TEMOZOLOMID-BEHANDLUNG DER U87-ZELLEN IN-VITRO

### 3.10.1 in-vitro-TMZ-Behandlung

$0,25 \times 10^6$  U87-Zellen pro Well wurden auf 6-Well-Platten in 2 ml Tumormedium ausgesät. Analog zu den TMZ-Vorversuchen erfolgte nach 24 Stunden die Zugabe von 14 µl TMZ der 50 mM Stock Solution (finale Konzentration 350 µM). Die Zellen der Kontrollgruppe blieben unbehandelt. Nach insgesamt 72 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Biotase gelöst, die Zellen der jeweiligen Gruppe zusammengefügt und mehrmals in PBS gewaschen, um eine Kontamination der Co-Kultur mit Temozolomidrückständen zu verhindern. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

### 3.10.2 Kultivierung von PBMC und U87-Zellen nach TMZ-Behandlung

Die Co-Kultivierung TMZ-behandelter U87-Zellen mit PBMC gesunder Probanden erfolgte analog zu den *in-vitro*-PDT Versuchen. Das Verhältnis von Tumorzellen zu PBMC betrug 1:10. Zusätzlich erfolgte zur Stimulation die Zugabe von Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® in einer Konzentration von 2,5 µl pro  $1 \times 10^6$  PBMC. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die PBMC geerntet, die Dynabeads® entfernt und die Zellzahl für weitere Analysen ermittelt.

### 3.11 ANALYSE KRYOKONSERVIERTER PBMC

PBMC gesunder Spender wurden isoliert und die Zellzahl sowie die Viabilität bestimmt. Lag die ermittelte Viabilität der PBMC bei mindestens 90 %, wurden die Zellen in einer 24-Well-Platte mit einer Dichte von  $0,6 \times 10^6$  Zellen pro Well in 1 ml RPMI-Nährmedium kultiviert. Die eine Hälfte der Zellen wurde direkt durch Zugabe von 2,5 µl Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® stimuliert, die andere Hälfte blieb unstimuliert. Als Negativkontrolle dienten nur mit Zellmedium gefüllte Wells. Die Zellen wurden 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Stoffwechselaktivität wurde alle 24 Stunden mittels MTT-Assay bestimmt. Das erste MTT-Assay erfolgte 4 Stunden nach Beginn der Inkubationsphase. Die restlichen, isolierten PBMC wurden in verschiedenen Kryomedien aufgenommen und kryokonserviert.

Folgende Kryokonservierungsmedien wurden benutzt:

1)

50 %	IMDM, GlutaMAX™ Supplement
40 %	Serum des jeweiligen PBMC Spenders
10 %	DMSO

2)<sup>65</sup>

50 %	RPMI-1640 Medium, 1% L-Glutamin
40 %	Serum des jeweiligen PBMC Spenders
10 %	DMSO

3)

47,5 %	RPMI-1640 Medium, 1% L-Glutamin
42,5 %	Human-Albumin 20%
10 %	DMSO

4)

100%	PromoCell Cryo-SFM
------	--------------------

Die PBMC wurden hierbei jeweils entweder im IMDM-GlutaMAX™ Supplement oder im RPMI-1640 Medium (1 % L-Glutamin) resuspendiert und in die Kryoröhrchen transferiert. Die maximale Anzahl an Zellen pro Kryoröhrchen betrug  $20 \times 10^6$ . Das Spenderserum bzw. das Human-Albumin 20 % wurde mit DMSO versetzt und tropfenweise den jeweiligen Kryotubes hinzugefügt. PromoCell Cryomedium wurde unverdünnt und nach Herstellerangaben benutzt. Die Zellen wurden 24 Stunden im Mr. Frosty-Gefrierbehälter bei  $-80\text{ °C}$  gelagert und anschließend für 96 Stunden in den stickstoffgefüllten Kryotank ( $-196\text{ °C}$ ) überführt. Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung wurden die Zellen aufgetaut, gewaschen und gezählt. Die Viabilität wurde ermittelt und die Zellen in 24-Well-Platten transferiert ( $6 \times 10^6$  Zellen/Well, 1 ml Zellmedium). Die erste Gruppe wurde direkt mit  $2,5\ \mu\text{l}$  Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® stimuliert, die zweite Gruppe blieb unstimuliert. Analog zu den Versuchen mit frischen PBMC erfolgte die erste MTT Messung nach 4 Stunden und anschließend erneut nach 24, 48 und 72 Stunden im Inkubationsschrank.

### 3.12 CO-KULTUREN MIT KRYOKONSERVIERTEN PBMC

Alle Co-Kultur-Experimente mit kryokonservierten PBMC wurden analog zu den bei 3.7 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Die PBMC wurden hierfür nach der Isolation in Kryokonservierungsmedium bestehend aus 50 % RPMI-1640 Medium mit 1 % L-Glutamin, 40 % Serum des jeweiligen Spenders und 10 % DMSO aufgenommen und für 96 Stunden in Stickstoff gelagert. Für die Co-Kulturen wurden die PBMC aufgetaut, die Viabilität bestimmt und anschließend in Co-Kultur mit PDT-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen gegeben. Gegebenenfalls erfolgte zuvor eine 24-72-stündige Vorinkubation der PBMC unter T-Zell-spezifischer Stimulation. Die T-Zell-Stimulation erfolgte mit Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads®. Nach 48-stündiger Co-Kultivierung bei  $37\text{ °C}$  im Inkubationsschrank wurden die PBMC geerntet bzw. die anschließend isolierten  $\text{CD8}^+$  T-Zellen mittels qRT-PCR oder Calcein-AM-Assay analysiert.

### 3.13 QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION

#### 3.13.1 RNA-Isolation

Zellen wurden im Vorfeld in RNAqueous® Lysis/Binding Solution (Probanden) oder QIAzol Lysis Reagent (Patienten) lysiert und bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte mittels Ambion™ RNAqueous total RNA Isolation Kit bzw. miRNeasy Mini Kit.

##### 3.13.1.1 RNA-Isolation bei gesunden Probanden

Den bereits im RNAqueous® Lysis/Binding Solution aufgeschlossenen Zellen wurde Ethanol (64 %) hinzugefügt und anschließend das Lysat in RNA-Isolation-Tubes mit Glasfaser-Filter transferiert. Nach drei Reinigungsschritten mit RNAqueous® Waschpuffern erfolgte die Elution der RNA aus den Filtern mittels 75 °C warmem nukleasefreiem Wasser. Bei diesem und allen noch folgenden Arbeitsschritten wurden Pipettenspitzen mit Filter benutzt.

Möglicherweise verbliebenden DNA-Moleküle wurden mittels Inkubation mit Turbo-DNase (Ambion1907) und 10xDNase Puffer bei 37 °C für 30 Minuten entfernt und die Reaktion durch Zugabe von DNase inactivation reagent beendet. Im Anschluss wurden die Proben abzentrifugiert, die im Überstand befindliche RNA abgenommen und in ein neues RNase-freies Tube transferiert. Quantifizierung der extrahierten RNA (ng/µl) und der Grad der Reinheit wurden am NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer ermittelt.

##### 3.13.1.2 RNA-Isolation bei Patienten

Die geernteten Zellen wurden in QIAzol Lysis Reagent aufgenommen. Nach Zugabe von Chloroform erfolgt durch Zentrifugation die Separation in eine wässrige und eine organische Phase. RNA-Moleküle verblieben in der wässrigen Phase, wohingegen denaturierte Proteine und Lipide in der organischen Phase gelöst wurden. Die obere, wässrige Phase wurde abpipettiert, Ethanol hinzugegeben und auf die Siliciumdioxid-Membran der RNA-Isolation-Tubes gegeben. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mittels Elutionslösung aus der Membran gelöst und in ein nukleasefreies Tube transferiert. Die Menge der extrahierte RNA (ng/µl) und der Reinheitsgrad wurden am NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer ermittelt.

#### 3.13.2 cDNA-Synthese

Die zu transkribierenden RNA-Proben wurden vor der Umschrift mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 1000 ng/µl in 10 µl verdünnt. Lagen geringere Mengen an RNA

vor, wurde die geringste Konzentration als Verdünnungskonzentration gewählt. Zu den verdünnten RNA-Proben wurden in einem ersten Schritt jeweils 1 µl Oligo-dt Primer 0,4 µg/µl, 1 µl dNTP Mix 10 nM und 1 µl Random Hexamer Primer 0,4 µg/µl hinzugefügt und die RNA im Eppendorf Mastercycler für 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Bei der anschließenden einminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Anlagerung der Oligo-dt Primer und Hexamer Primer als Startpunkte der darauffolgenden cDNA-Synthese. Für diese wurde jeweils 4 µl 5x First Strand Buffer, 1 µl 0,1M DTT, 1 µl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U/µl) hinzugefügt und die Probe gut durchmischt. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels drei Inkubationsphasen: zunächst 5 Minuten bei 25 °C anschließend 45 Minuten bei 50 °C und in der letzten Phase 15 Minuten bei 70 °C. Die nun fertigen cDNA-Ansätze wurden bei -80 °C gelagert oder direkt im Anschluss für die quantitative real-time PCR verwendet.

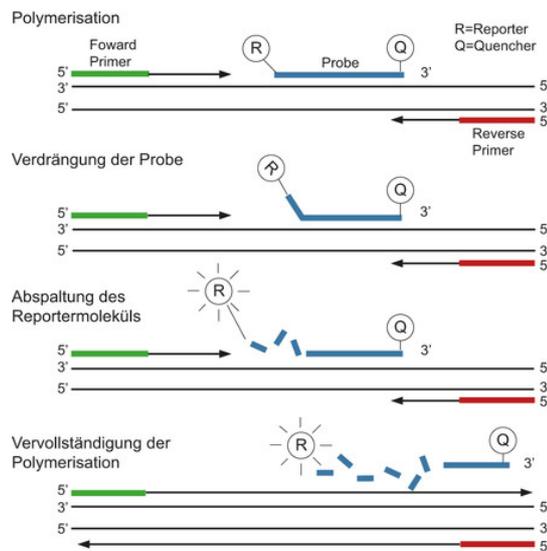
### 3.13.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time PCR (polymerase chain reaction) ermöglicht neben der Amplifikation die gleichzeitige Quantifizierung der gesuchten und vervielfältigten Genabschnitte. Grundlage dafür ist, neben der PCR-Amplifikation, die vorherige Markierung der bekannten Zielregion mittels UPL-Oligonukleotid-Sonden. Diese enthalten am 5' Ende einen Reporter-Farbstoff. Basierend auf dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) wird die Fluoreszenz-Emission durch einen am 3' Ende sitzenden Dark-Quencher unterdrückt. Wird dieser während der Elongationsphase durch die *Taq*-Polymerase hydrolytisch abgespalten, kann nach Anregung durch eine Lichtquelle spezifischer Wellenlänge die Signalmessung der Fluoreszenz in Echtzeit („real time“) erfolgen. Die qRT-PCR erfolgt im LightCycler®480 in drei Phasen. Zunächst wird der Ansatz auf 95 °C erwärmt. Hierbei kommt es zur Denaturierung und Auftrennung der dsDNA. Während der darauffolgenden Annealing-Phase bei 50 °C kommt es zur Anlagerung der Primer und Sonden. In der abschließenden Elongationsphase bei 72 °C erfolgt die eigentliche Amplifikation der DNA. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur Menge des gesuchten PCR-Amplikons zu. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der Amplifikation in dem Template, Primer und Polymerase in einer optimalen Konzentration zueinander vorliegen. Bestimmt wird hierbei der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals den Schwellenwert der Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt (Cp-Wert = crossing point). Je früher der Cp Wert erreicht wird, desto mehr cDNA ist in der Probe vorhanden (Abb. 9).

Zunächst wurden die cDNA-Proben mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 2 ng/ml verdünnt. Hiervon wurden 5 µl pro Well in eine 96-Multiwell-Platte pipettiert (10 ng cDNA pro Well). Anschließend wurden jeweils 15 µl des Mastermixes bestehend aus 4,4 µl

## METHODEN

PCR-Grade nukleasefreiem Wasser, 0,2 µl Forward Primer (20 µM), 0,2 µl Reverse Primer (20 µM), 0,2 µl fluoreszierender UPL-Sonde (10 µM) sowie 10 µl DNA Probes Master hinzugefügt, die Platte mit einer Folie verschlossen, zentrifugiert und die qRT-PCR im LightCycler480 gestartet. Nach Ablauf der qRT-PCR konnte mittels der LightCycler® RelativeQuantification Software die mRNA-Expression der gesuchten Zielgene, jeweils in Bezug zur Expression der Housekeeping Genes beta-Aktin und TBP, bestimmt werden. Die Bestimmung der Expression erfolgte für Zielgene (Targets) und Referenzgene (Houskeeper) in Duplikaten.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der qRT-PCR unter Verwendung von UPL-Oligonukleotid-Sonden (Hydrolyse-Sonden). Während der Elongationsphase kommt es zur hydrolytischen Trennung von Reporter und Quencher mit anschließender Fluoreszenzmessung der Lichtemission<sup>66</sup>.

### 3.14 FUNKTIONELLE ASSAYS

#### 3.14.1 Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot)

Die Quantifizierung von Perforin-sezernierenden CD8-positiven T-Zellen erfolgte mittels Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot). Das ELISpot-Assay ermöglicht den direkten Nachweis von sezernierten Zytokinen oder Antikörpern. Nach Fixierung der zu detektierenden Zytokine an eine mit spezifischen Antikörpern beschichteten PVDF-Membran erfolgt die Markierung der Ziel-Zytokine mit biotinylierten, monoklonalen Zweitantikörpern. Diese sind an ein Enzym gekoppelt, welches mittels Umsetzung eines hinzugefügten Farbstoffsubstrates den Ort der Zytokinsekretion farbig markiert. Anschließend können diese Spots mittels Mikroskopkamera gezählt werden. Die hierbei ermittelte Anzahl ist proportional zur Menge der sezernierten Zytokine (Abb. 10).

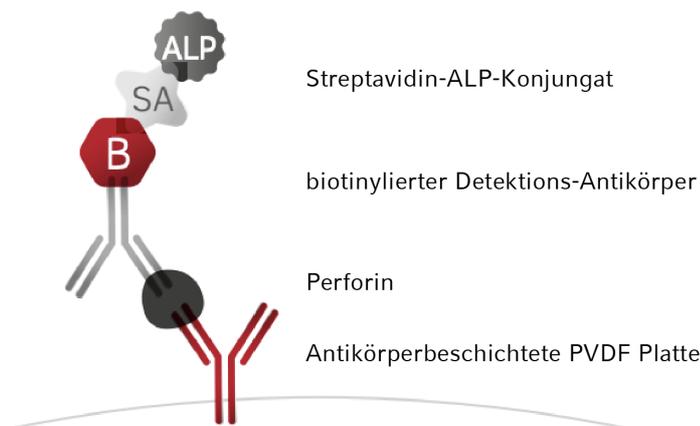
Zur Quantifizierung der Perforin-Sekretion wurde das ELISpot-Assay mit dem ELISpot<sup>PLUS</sup> Human Perforin-Kit nach Herstellerprotokoll unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden aus vorherigen Co-Kultivierungs-Experimenten mit PDT- bzw. TMZ-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen die jeweiligen CD8-positiven T-Zellen kryokonserviert. Für die Durchführung des ELISpot-Assay wurden die T-Zellen aller Probanden gleichzeitig aufgetaut, separat gezählt und anschließend jeweils  $0,3 \times 10^6$  Zellen in 150  $\mu$ l CTL-Medium aufgenommen. Die nativen U87-Zellen für die erneute Stimulation wurden geerntet, gezählt und ebenfalls in CTL-Medium resuspendiert (5000 Zellen/75  $\mu$ l). Verwendet wurde CTL-Medium (CTL-Test<sup>TM</sup> Medium), supplementiert mit IL-2 (2 U/ml), CD3/CD28 Stimulation-Beads (1  $\mu$ g/ml) und L-Glutamin (10 %).

Die bereits mit Perforin-spezifischen Antikörpern beschichteten ELISpot Platten wurden viermal mit sterilen PBS (200  $\mu$ l/Well) gewaschen. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Wells anschließend mit 200  $\mu$ l Nährmedium mit 10 % CTL-Zellmedium für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für jeden Probanden wurden ein Stimulations-Well und ein Basal-Well angelegt. In alle Wells wurde 75  $\mu$ l der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Lösung gegeben. Dieses entsprach einer Konzentration  $0,15 \times 10^6$  Zellen pro Well. Bei den Stimulations-Wells erfolgte die Zugabe von 5000 Zellen nativer U87-Zellen (75  $\mu$ l). Die Basal-Wells wurden auf das Gesamtvolumen von 150  $\mu$ l mit CTL-Medium aufgefüllt. Jede Probe wurde als Doppelmessung aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils drei Wells ausschließlich mit Medium oder nur mit U87-Zellen befüllt.

Die Platte wurde bei 37 °C im Inkubationsschrank gelagert. Während dieser Zeit wurde sichergestellt, dass die Platten nicht bewegt wurden und es zu keinerlei Erschütterungen der Proben

kommen konnte. Nach 72 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Platte fünfmal mit sterilen PBS (200 µl/Well) gewaschen.

100 µl des biotinylierten monoklonalen Antikörpers (Pf-344-biotin, verdünnt in 0,5 % FCS-haltigem-PBS auf eine Konzentration von 1 µg/ml) wurde in jedes Well gegeben und die Platte anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Wells wurden erneut gewaschen (5x mit je 200 µl PBS) und pro Well 100 µl des Farbstoff-umsetzenden Enzymkonjugats Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:1000 verdünnt in 0,5 % FCS-haltigem-PBS) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte mehrfach mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Farbstoffsubstrat BCIP/NBT 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat Nitroblau-Tetrazoliumchlorid durch einen sterilen 0,45 µm Filter gereinigt und pro Well jeweils 100 µl zugegeben. Dieser Schritt erfolgte zügig, um für alle Wells eine annähernd gleiche Inkubationszeit für den Umsatz des Farbstoffes zu gewährleisten. Die Platte wurden nun erneut bei Raumtemperatur inkubiert bis blaue Farbstoffpunkte (Spots) zu erkennen waren. Die Reaktion wurde nun durch mehrmaliges Waschen der Platte mit Aqua bidest gestoppt und die Platte 48 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zählung der Spots erfolgte automatisiert am ELISpot-Reader.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot) zur Quantifizierung der Perforin-Sekretion. Auf eine mit Antikörpern vorbeschichtete Platte werden Zellen ausgesät und stimuliert. Das sezernierte Perforin bindet an die Antikörper. Die Zellen werden abgewaschen und biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben. Das nun hinzugefügte Streptavidin (SA)-Alkalische Phosphatase (ALP)-Konjugat bindet den Detektionsantikörper und setzt ein Farbsubstrat in unlösliche Präzipitate um (hier nicht dargestellt), die anschließend mikroskopisch quantifiziert werden<sup>67</sup>.

### 3.14.2 Calcein-Acetoxy-methylester-Toxizitäts-Assay

Die Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten Zytotoxizität erfolgte mittels Calcein-AM-Lyse-Assay. Hierbei wurde die Lysekapazität PDT- bzw. TMZ-geprimter CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei erneuter

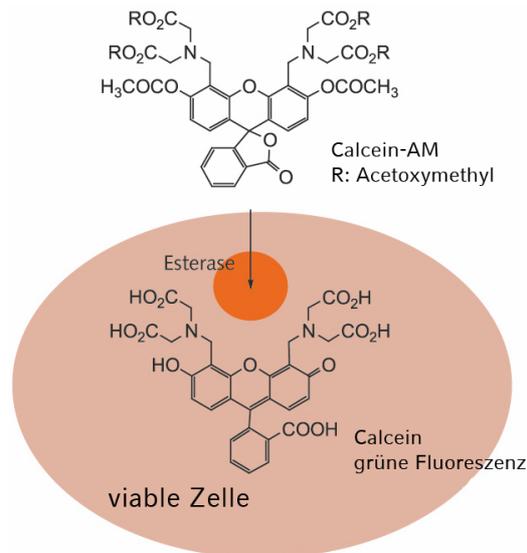
Inkubation mit nativen U87-Zellen bestimmt. Nach Calcein-AM-Aufnahme in lebende und stoffwechselaktive Zielzellen, kommt es zur enzymatischen Abspaltung des Acetoxymethylesters (AM) des zellpermeablen Calcein-AM Moleküls. Komplexierung intrazellulärer Calciumionen führt zur Fluoreszenz des hydrophilen Moleküls. Dieses kann die Zellmembran nun nicht mehr passieren und verbleibt in der intakten Zelle. Kommt es nach Kontakt mit zytotoxischen Zellen zur Lyse der mit Calcein-markierten Zielzellen, wird der emittierende Farbstoff in das gemeinsame Zellmedium freigesetzt und kann nun im Überstand quantifiziert werden. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der lysierten Zielzellen und damit ein Maß für die Lysekapazität der eingesetzten zytotoxischen Zellen (Abb. 11).

Als Zielzellen wurden native U87-Zellen am Vortag der Messung mit einer Konzentration von 20.000 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte in 200 µl Nährmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Fluoreszenzmarkierung. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 60 Minuten in 8 µM Calcein-AM-Lösung (gelöst in DMSO, verdünnt in PBS) inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells mehrfach mit PBS gewaschen, um mögliche Calceinreste zu entfernen.

Nach 48-stündiger Inkubation mit behandelten (PDT oder TMZ) bzw. unbehandelten U87-Zellen wurden die PBMC geerntet, gewaschen und die Stimulation-Beads magnetisch entfernt. Zu den Calcein-gelabelten U87-Zellen wurden nun jeweils  $0,2 \times 10^6$  PBMC pro Well hinzugefügt. Zusätzlich wurde die basale Autolyserate der Tumorzellen (Spontanrelease) durch Inkubation gelabelter U87-Zellen ohne PBMC ermittelt. Zur Ermittlung der maximalen Lyserate wurden U87-Zellen in Zellmedium mit 1 % Triton X inkubiert (Maximumrelease). Mehrere Wells wurden als Blindwerte lediglich mit Medium gefüllt. Nach 8 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Platte zentrifugiert, die Hälfte des Überstandes abgenommen und die Fluoreszenzintensität des Calceins detektiert. Die Messungen erfolgten am FLUOstar OPTIMA bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionsmessung bei 520 nm. Die Berechnung der Lyserate erfolgte durch folgende Formel:

$$Lyserate [\%] = \frac{Probe - Spontanrelease}{Maximalrelease - Spontanrelease} * 100$$

## METHODEN



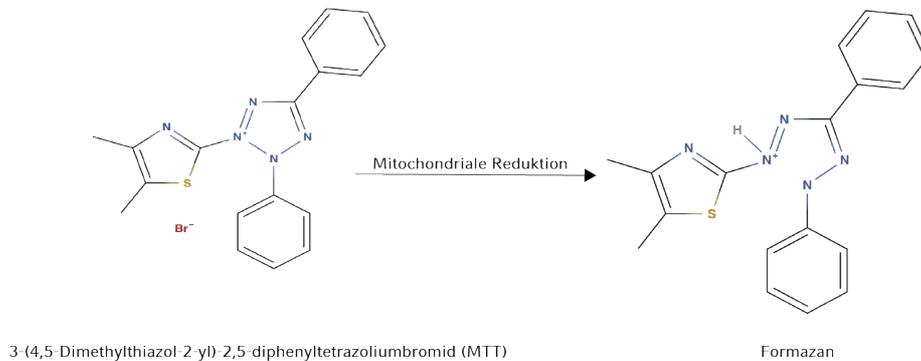
**Abb. 11:** Schematische Darstellung des Calcein-Acetoxy-methylester-Assays. Nach Aufnahme von Calcein-AM in die viable Zielzelle kommt es zur Abspaltung der Acetoxy-methylester-Reste durch cytoplasmatische Esterasen. Calcein kann die intakte Zellmembran nun nicht mehr passieren und verbleibt als grünlich fluoreszierendes Molekül in der Zelle. Zur Bestimmung der Lyseaktivität zytotoxischer T-Zellen wird das bei Lyse der Zielzellen freigesetzte Calcein im Überstand quantifiziert<sup>68</sup>.

### 3.14.3 MTT Cell Proliferation Assay

Das MTT Cell Proliferation Assay diente der Ermittlung der metabolischen Zellaktivität. Der Nachweis basiert auf der Aufnahme des MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid) durch stoffwechselaktive Zellen. Diese metabolisieren MTT über NADPH-abhängige Enzymreaktionen, wobei wasserunlösliche, violette Formazankristalle entstehen. Formazankristalle beeinträchtigen anschließend die Absorptionsmessung und geben so Rückschluss auf die Zellaktivität (Abb. 12).

Die folgenden Schritte wurden im abgedunkelten Labor durchgeführt, um die lichtempfindlichen Substanzen zu schützen. 25 mg des MTT-Pulvers wurden in 5 ml PBS gelöst (5 mg/ml). Die MTT Stock Solution wurde anschließend mittels steriler Filter (0,2 µm) gereinigt, um möglichen Kristalle zu entfernen und Sterilität zu gewährleisten. Das Medium der zu untersuchenden Zellen (6-Well- oder 96-Well-Platten) wurde entfernt und das MTT hinzugefügt. Hierbei entsprach die Menge an MTT-Lösung 10 % des ursprünglichen Zellmediums. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und die Formazankristalle in DMSO (Menge = ursprüngliche Zellmediumsmenge) gelöst. Die violette Lösung wurde auf eine neue 96-Well-Platte mit Flachboden transferiert, sofern die Zellen nicht auf diesen kultiviert und inkubiert wurden. Die Messung der Absorption bzw. der optischen Dichte (OD) erfolgte im FilterMax F3 Multi-Mode Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm. Der

Anteil der stoffwechselaktiven Zellen wurde durch Bildung des Quotienten aus der OD behandelte und unbehandelte Kontrollzellen ermittelt (OD behandelte Zellen / OD unbehandelte Zellen x 100). Die ermittelte Absorption ist proportional zur Stoffwechselaktivität.



**Abb. 12:** Chemische Grundlage des MTT-Assays. Metabolisierung von MTT durch NADPH-abhängige Enzymreaktionen in stoffwechselaktiven Zellen zu wasserunlöslichen Formazan-Kristallen<sup>69</sup>.

### 3.15 STATISTIK

Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM), sofern nicht anders beschrieben. Alle Datensätze wurden mittels Kolmogorov Smirnov und D'Agostino & Pearson Test auf Normalverteilung und die p-Werte mittels t-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test oder Mann-Whitney-U-Test auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von  $< 0,05$  angenommen, mit  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

Die Studie wurde nach Prüfung und positiver Bewertung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München gemäß der Deklaration von Helsinki mit ihren Revisionen und Ergänzungen (von Tokio/1975, Venedig/1983, Hongkong/1989, Somerset West/1996, Edinburgh/2000, Seoul/2008 und Fortaleza/2013) durchgeführt (Projekt-Nr.: 216/14).

## METHODEN

## 4 Ergebnisse

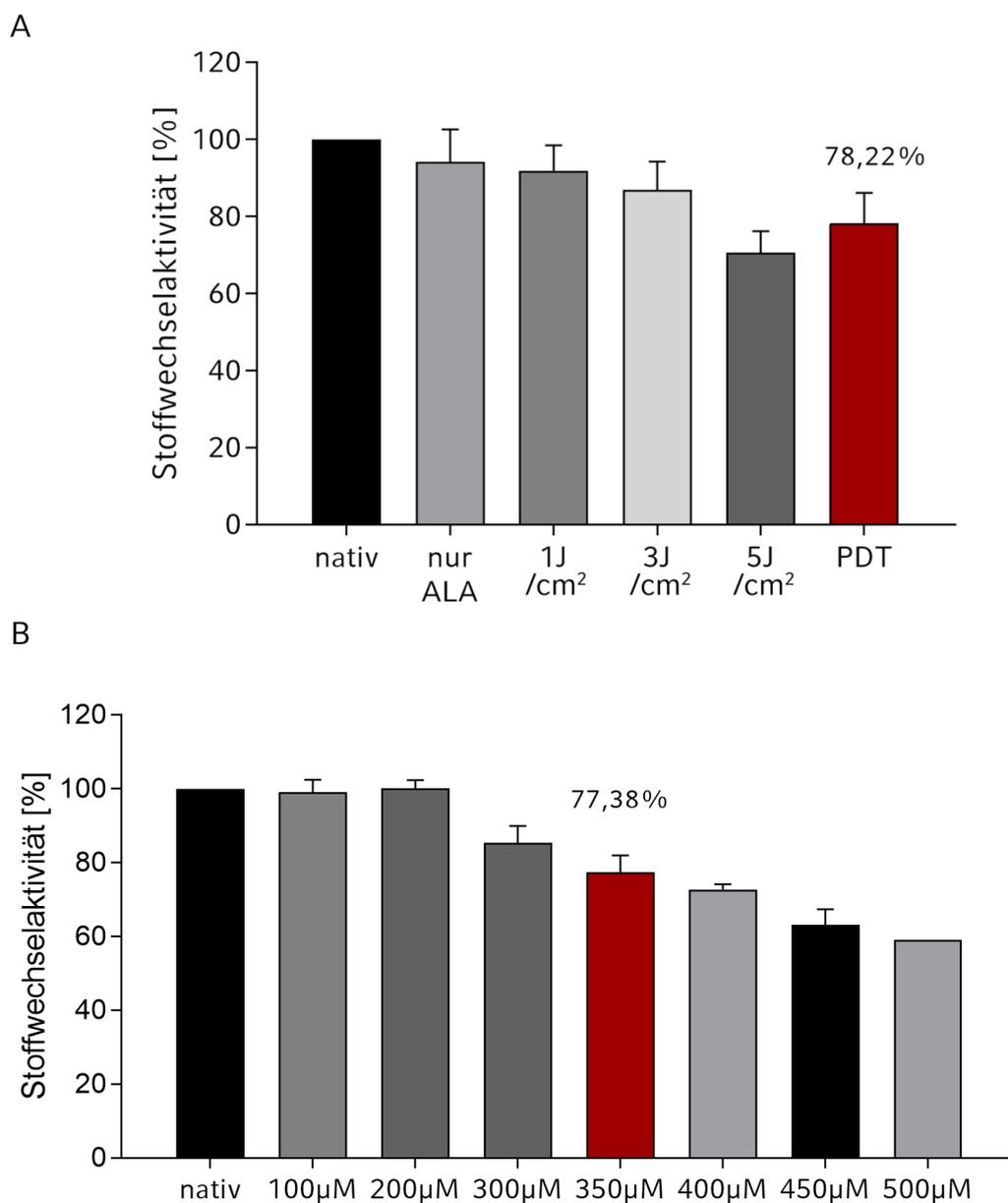
### 4.1 ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-TMZ-MODELLS

Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Charakterisierung der adaptiven Immunreaktion nach unterschiedlichen Therapieregimen bei Glioblastoma multiforme. Hierbei sollten die Auswirkungen einer Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) im Vergleich zur Photodynamischen Therapie (PDT) auf die T-Zell-spezifische Immunität untersucht werden. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte hierfür bereits ein *in-vitro*-PDT-Modell entwickelt werden. Um eine entsprechende Vergleichbarkeit der beiden grundsätzlich unterschiedlichen Behandlungsansätze *in-vitro* zu gewährleisten, war es zunächst nötig, ein TMZ-Modell mit einer geeigneten Konzentration des Chemotherapeutikums zu etablieren, bei dem ein zur *in-vitro*-PDT-Behandlung äquivalenter Zellschaden provoziert werden würde.

#### 4.1.1 Analyse des Therapie-induzierten Zellschadens

Zunächst wurde der durch die *in-vitro*-PDT induzierte Zellschaden ermittelt. Hierfür wurde die Stoffwechselaktivität der Glioblastomzellen nach PDT mittels MTT-Assay quantifiziert. U87-Tumorzellen wurden nach photodynamischer Behandlung mit 1, 3 bzw. 5 J/cm<sup>2</sup> im gleichen Verhältnis zusammengeführt und die Stoffwechselaktivität wurde quantifiziert. Zusätzlich erfolgte die isolierte Analyse für jede Gruppe. Durch die Verwendung verschiedener Strahlungsdosen wurde versucht, die unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten verschiedener Tumorzellen in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Tumorgewebe bei der *in-vivo*-Behandlung nachzuempfinden. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tumorzellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich 48 Stunden nach PDT-Behandlung eine Reduktion der Stoffwechselaktivität der Tumorzellen auf 78,22 % ± 7,82 % (Abb. 13A). Anschließend wurde die Stoffwechselreduktion nach Behandlung mit Temozolomid bestimmt. Hierfür wurde eine Titrationsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen des Chemotherapeutikums angesetzt und nach 48 Stunden Behandlungsdauer ebenfalls die Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten native Zellen ohne Temozolomid-Applikation. Es zeigte sich eine zu den PDT-Versuchen äquivalente Stoffwechselreduktion auf 77,38 % ± 4,56 % bei einer Temozolomid-Konzentration von 350 µM (Abb. 13B). Alle weiteren Versuche wurden daher mit einer TMZ Konzentration von 350 µM durchgeführt.

## ERGEBNISSE



**Abb. 13:** Analyse der Stoffwechselreduktion mittels MTT-Assay nach photodynamischer Behandlung von U87-Zellen (A) bzw. nach Temozolomid-Behandlung (B). Auswirkungen der unterschiedlichen PDT-Lichtdosen (J=Joule) sind einzeln dargestellt und nach Zusammenführung der Zellen (PDT, rot). Normalisiert wurde auf die Stoffwechselaktivität jeweils unbehandelter U87-Zellen (nativ, 100%). Rot markiert sind die Balken der äquivalenten Stoffwechselreduktion. n = 7

### 4.1.2 Durchführung der *in-vitro*-Behandlung mit TMZ

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche konnte ein Modell zur *in-vitro*-Behandlung von Glioblastomzellen mit Temozolomid etabliert werden. Dieses Modell führte zu einem PDT-äquivalenten Zellschaden, definiert durch die gleichwertige Reduktion der Stoffwechselaktivität der Tumorzellen. U87-Zellen wurden auf 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $0,25 \times 10^6$  Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Applikation von Temozolomid. Nach insgesamt 72 Stunden wurden PBMC gesunder Probanden isoliert und mit

TMZ-behandelten bzw. unbehandelten U87-Zellen kultiviert. Das Verhältnis von Tumorzellen und PBMC betrug 1:10. Nach 48 Stunden gemeinsamer Kultivierung wurden die PBMC geerntet und gegebenenfalls die CD8<sup>+</sup> T-Zellen für weitere Analysen isoliert.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden für die Durchführung der TMZ- und PDT-*in-vitro*-Behandlungen PBMC derselben Probanden verwendet.

Im Folgenden wird die Kultivierung von PBMC mit TMZ- bzw. PDT-behandelten Tumorzellen auch als TMZ- bzw. PDT-Priming oder TMZ- bzw. PDT-Sensibilisierung bezeichnet.

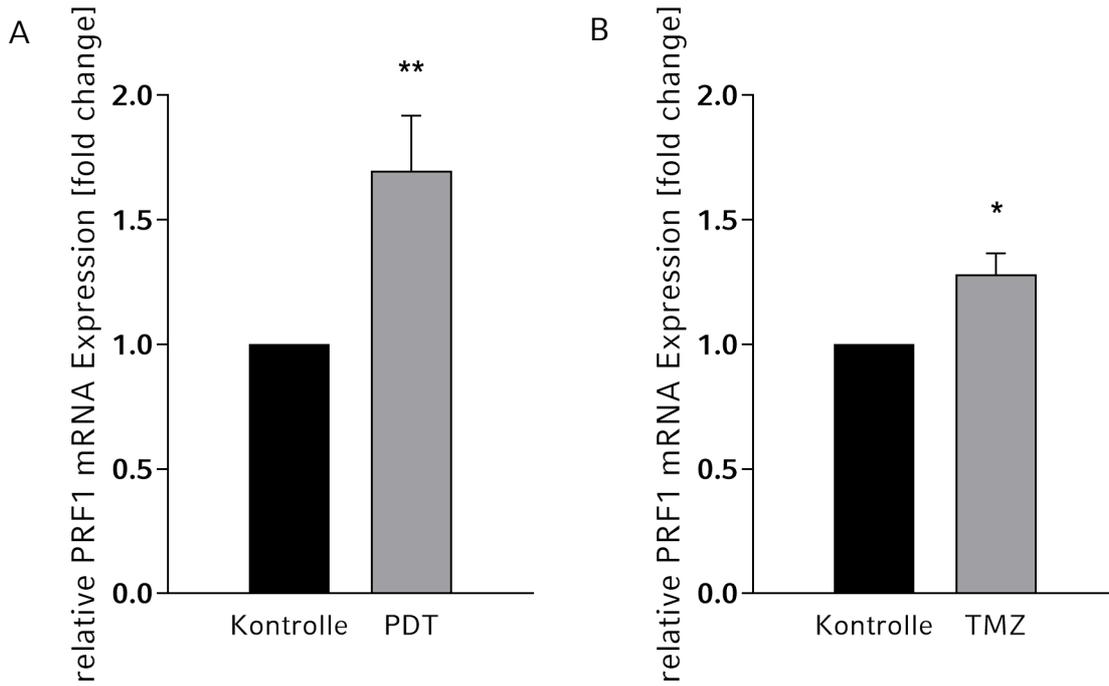
## 4.2 ANALYSE DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN NACH KONTAKT MIT PDT- ODER TMZ-BEHANDELTEN U87-ZELLEN

### 4.2.1 Analyse der mRNA-Expression sensibilisierter CD8<sup>+</sup> Zellen

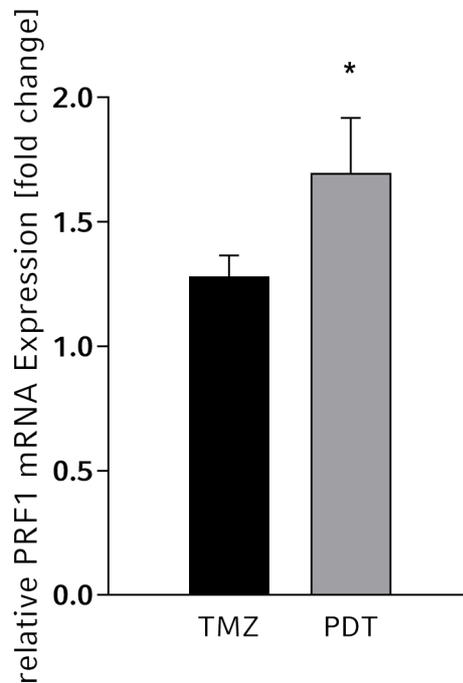
Für die Analyse der mRNA-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Durchführung des jeweiligen Behandlungsregimes wurden mit TMZ- bzw. PDT-behandelte U87-Zellen zusammen mit PBMC gesunder Probanden inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die PBMC geerntet, die CD8-postiven-Zellen isoliert und die Genexpression mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Kontrollgruppe diente die Inkubation von PBMC mit unbehandelten Tumorzellen.

Wie in ersten Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen, zeigte sich bei Analysen CD8-positiver T-Zellen nach Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen ein signifikanter Anstieg der Genexpression des zytolytischen Proteins Perforin (PRF1) (+69,71% ± 22,18%; p=0,008) (Abb. 14A). Es wurde daher untersucht, ob der Kontakt mit TMZ-behandelten Tumorzellen ebenfalls eine vergleichbare Genexpression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren kann. Überraschenderweise zeigte sich, dass es nach Priming mit TMZ-behandelten U87-Zellen ebenfalls zu einem Anstieg der mRNA-Expression von PRF1 in den CD8-positiven T-Zellen kam (+28,09% ± 8,49%; p=0,032) (Abb. 14B). Diese PRF1-Induktion war jedoch in den PDT-geprimten T-Zellen signifikant höherer als nach Kultivierung mit TMZ-behandelten Tumorzellen (+48,17% ± 20,0%; p=0,048) (Abb. 15).

## ERGEBNISSE



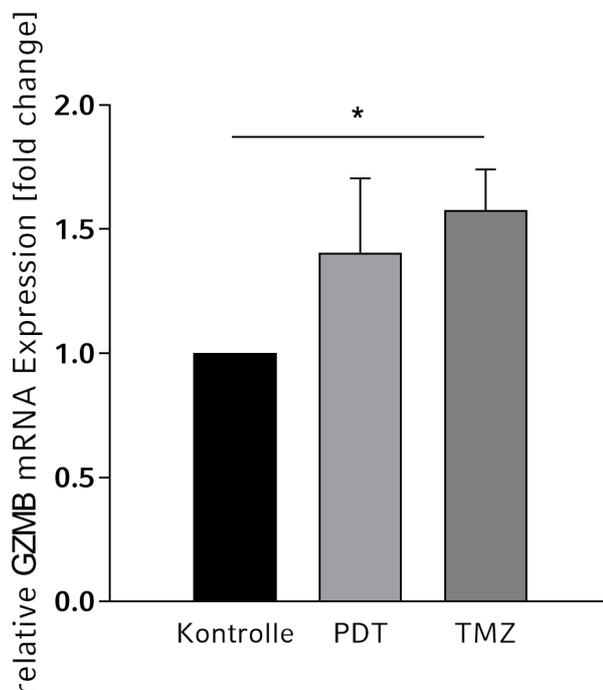
**Abb. 14:** PRF1-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT-(A) bzw. TMZ-behandelten (B) oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle) wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1). n = 17 (TMZ); n = 17 (PDT); \*p < 0,05, \*\*p < 0,01



**Abb. 15:** Vergleich der PRF1-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach TMZ- bzw. nach PDT-Behandlung. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit behandelten (TMZ oder PDT) U87-Zellen wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. n = 17 (TMZ); n = 17 (PDT) \*p = 0,048

## ERGEBNISSE

Nach PDT-Priming kam es ebenfalls zur mRNA-Induktion der Protease GranzymB (GZMB) ( $+40,48\% \pm 29,90\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ), jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. In den T-Zellen nach TMZ-Behandlung konnte jedoch eine deutlichere, signifikante Induktion der GZMB-mRNA-Expression nachgewiesen werden ( $+57,66\% \pm 16,42\%$ ;  $p = 0,01$ ) (Abb. 16).

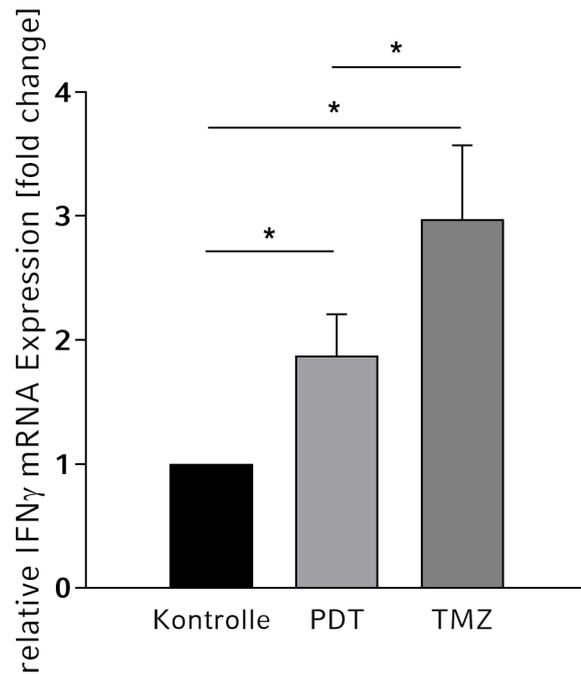


**Abb. 16:** GZMB-Expression in  $CD8^+$  T-Zellen. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT- bzw. TMZ-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle) wurden  $CD8^+$  T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1).  $n = 17$  (TMZ);  $n = 17$  (PDT); \* $p < 0,05$

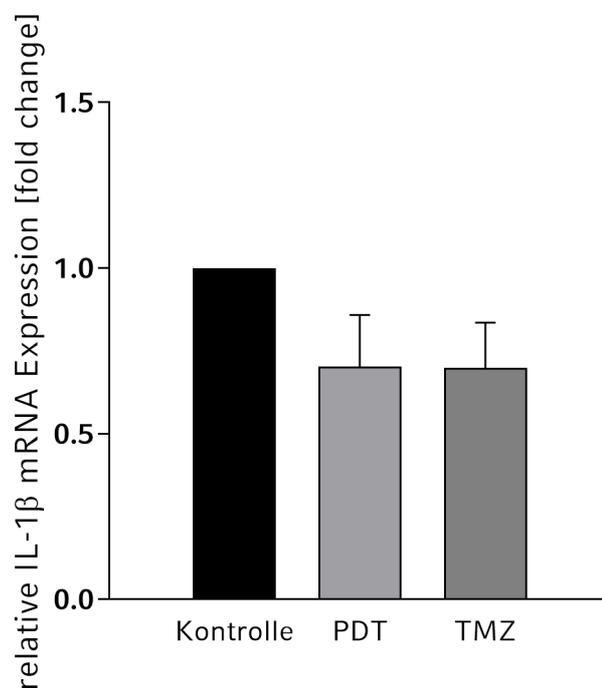
Sowohl Priming mit PDT- als auch mit TMZ-behandelten Tumorzellen führte zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression des proinflammatorischen Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (PDT:  $+87,14\% \pm 33,72\%$ ;  $p = 0,030$ ; TMZ:  $+197,3\% \pm 59,6\%$ ;  $p = 0,048$ ). Die Geninduktion nach TMZ-Priming war hierbei auch im Vergleich mit der PDT-Gruppe signifikant erhöht ( $+126,4\% \pm 37,16\%$ ;  $p = 0,028$ ) (Abb. 17).

Zusätzlich zeigte sich nach PDT eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Expression ( $-30,81\% \pm 15,66\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ). Auch das Priming der PBMC mit TMZ-behandelten U87-Zellen führte zur einer reduzierten Genexpression von IL-1 $\beta$  ( $-30,07\% \pm 13,62\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ). In beiden Gruppen wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 18).

## ERGEBNISSE



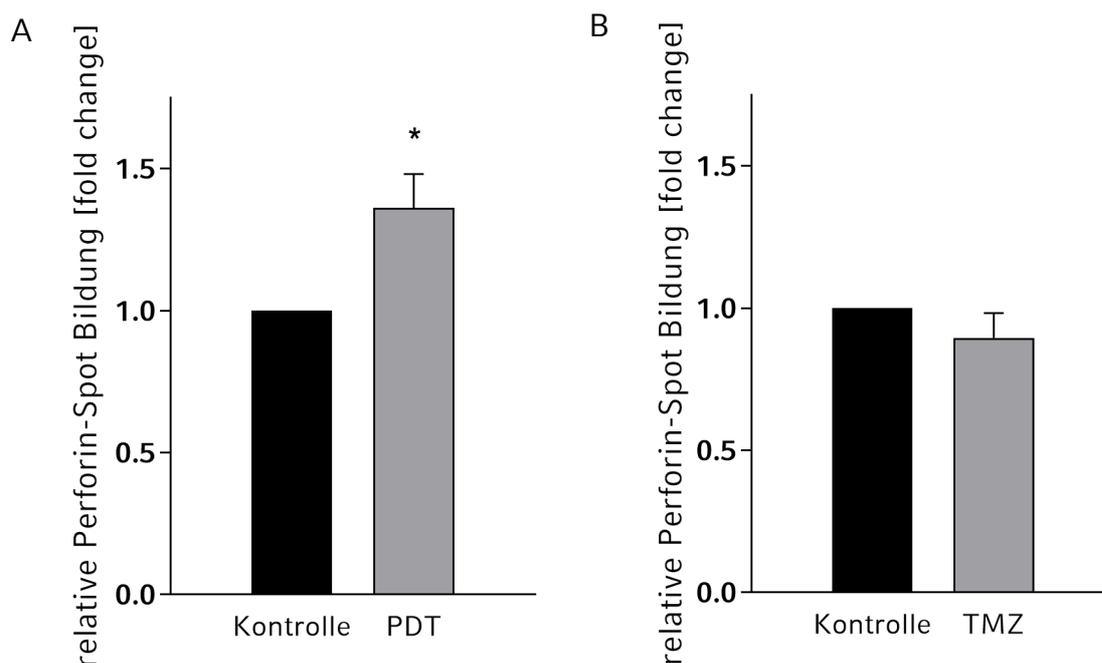
**Abb. 17:** IFN- $\gamma$ -Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT- bzw. TMZ-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle) wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1). n = 17 (TMZ); n = 17 (PDT); \*p < 0,05



**Abb. 18:** IL-1 $\beta$ -Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT- bzw. TMZ-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle) wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1). n = 17 (TMZ); n = 17 (PDT)

PDT- und TMZ-Priming führten beide zur verstärkten Genexpression des zytolytischen Effektor-Proteins Perforin. Jedoch war die relative Induktion in der PDT-Gruppe im Vergleich mit der TMZ-geprimten Gruppe signifikant erhöht. Da Perforin als Schlüsselmolekül der T-Zell-Funktion agiert, stellte sich nun die Frage, ob diese verstärkte Genexpression auch zu einer verstärkten Perforin-Expression auf Proteinebene führte.

#### 4.2.2 Analyse der Perforin-Sekretion sensibilisierter CD8<sup>+</sup> Zellen



**Abb. 19:** Quantifizierung der Perforin-Sekretion CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels ELISpot. Priming der CD8-positiven T-Zellen durch 48-stündige Inkubation mit PDT-(A) bzw. TMZ-behandelten (B) U87-Zellen und anschließender erneuter Stimulation mit nativen Tumorzellen. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1). n = 6; \*p < 0,05

Für die Analyse der Perforin-Expression auf Proteinebene wurde die Perforin-Sekretion der CD8-positiven T-Zellen mittels ELISpot-Assay untersucht. Hierfür wurden nach 48-stündiger Kultivierung mit PDT- oder TMZ-behandelten bzw. unbehandelten U87-Zellen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den PBMC isoliert. Zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen erfolgte die erneute Stimulation mit nativen U87-Zellen (Stimulations-Wells). Die basale Perforin-Sekretion wurde in Wells ohne erneuten Stimulus durch Tumorzellen bestimmt (Basal-Wells). Die Perforin-Spots wurden automatisch erfasst und die stimulationsspezifische Sekretion durch Bildung des Quotienten (Stimulations-Well / Basal-Well) bestimmt. Anschließend konnte der Einfluss der jeweiligen Behandlung auf die Perforin-Sekretion CD8-positiver T-Zellen quantifiziert werden.

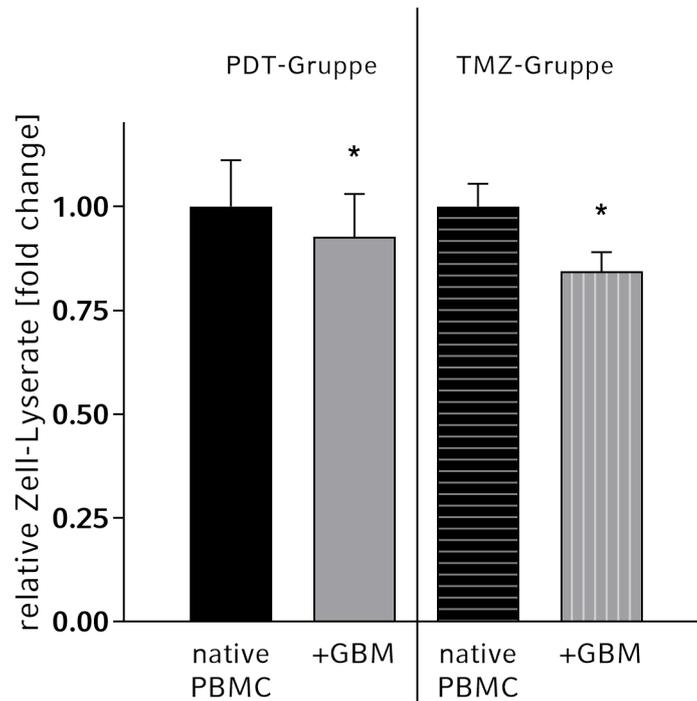
In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte in den PDT-geprimten CD8<sup>+</sup> T-Zellen — im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe — nach erneutem Stimulus mit nativen Glioblastomzellen eine signifikant erhöhte Perforin-Sekretion nachgewiesen werden (+36,16% ± 11,97%; p = 0,027) (Abb. 19A). Demgegenüber kam es jedoch nach TMZ-Priming, im Gegensatz zu den mRNA-Expressions-Analysen, zu keiner signifikanten Induktion der Perforin-Sekretion durch zytotoxische T-Zellen nach erneutem Kontakt mit Glioblastomzellen. Hierbei zeigte sich sogar eine Reduktion der Perforin-Sekretion, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (-10,44% ± 8,75%; p = n.s.) (Abb. 19B).

### 4.2.3 Quantifizierung der Lysekapazität sensibilisierter PBMC

In den vorherigen Untersuchungen zeigte sich, dass PDT-Priming im Gegensatz zur Behandlung mit Temozolomid zu einer erhöhten Perforin-Sekretion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Die spezifische Tumorzelllyse wird maßgeblich durch Perforin als das Schlüssel-molekül für die zytotoxischen Eigenschaften dieser Zellen vermittelt. Im nächsten Schritt wurde nun die tumorspezifische Lysekapazität der PDT- oder TMZ-geprimten Immunzellen untersucht. Die Analyse der zytotoxischen Aktivität der PBMC bei erneutem Kontakt mit nativen Tumorzellen erfolgte nach 48-stündiger Co-Kultur mit PDT- bzw. TMZ-behandelten U87-Zellen mittels Calcein-AM (Acetoxymethylester)-Assay.

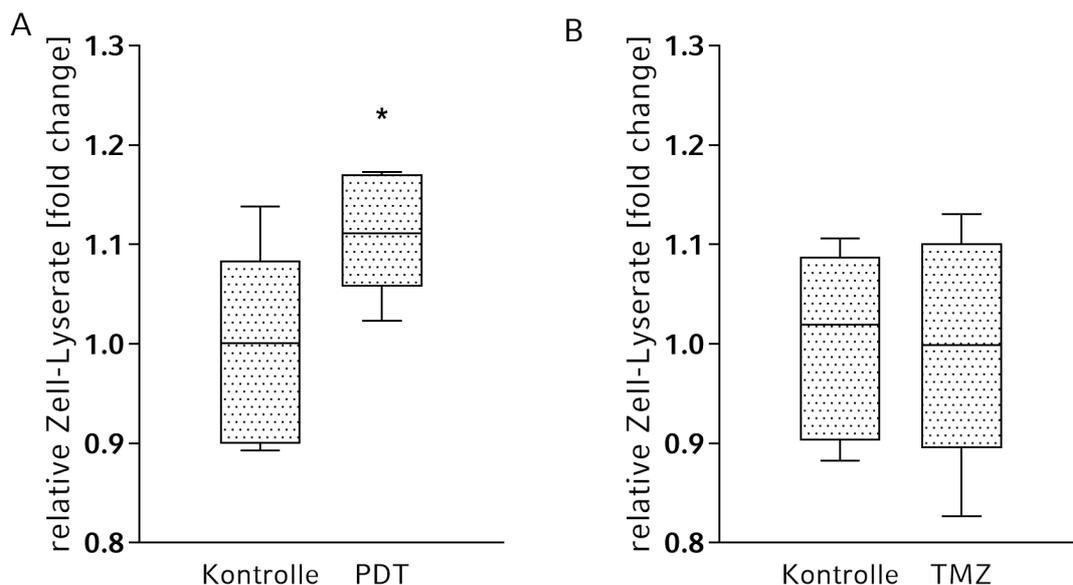
In beiden Gruppen wiesen die PBMC ohne vorherigen Tumorkontakt die höchste Lysekapazität bei Erstkontakt mit Glioblastomzellen auf. Nach Kultivierung mit U87-Zellen ließ sich in beiden Behandlungsgruppen eine Glioblastom-vermittelte Immunparalyse durch eine reduzierte Lyserate nach Tumorkontakt nachweisen (PDT: -7,32% ± 0,81%; p = 0,048; TMZ: -15,58% ± 0,85%; p = 0,023) (Abb. 20).

## ERGEBNISSE



**Abb. 20:** Quantifizierung der PBMC-vermittelten Lyse-Aktivität nach 48 Stunden bei erneutem Kontakt mit nativen U87-Zellen. Vergleich der Lyserate nativer PBMC mit PBMC nach Kontakt mit unbehandelten Tumorzellen. Normalisierung der Ergebnisse auf die Lyserate nativer PBMC. n = 6, \*p < 0,05

Das Priming durch PDT-behandelte Tumorzellen führte zu einer signifikant erhöhten PBMC-vermittelten Lysekapazität bei erneutem Tumorkontakt (+10,94% ± 3,39%; p = 0,023) (Abb. 21A). Nach Sensibilisierung mit TMZ-behandelten U87-Zellen konnte jedoch die Tumor-vermittelte Suppression der Lyseaktivität nicht abgeschwächt werden. Hier zeigte sich keine Induktion der Lyseaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21B).

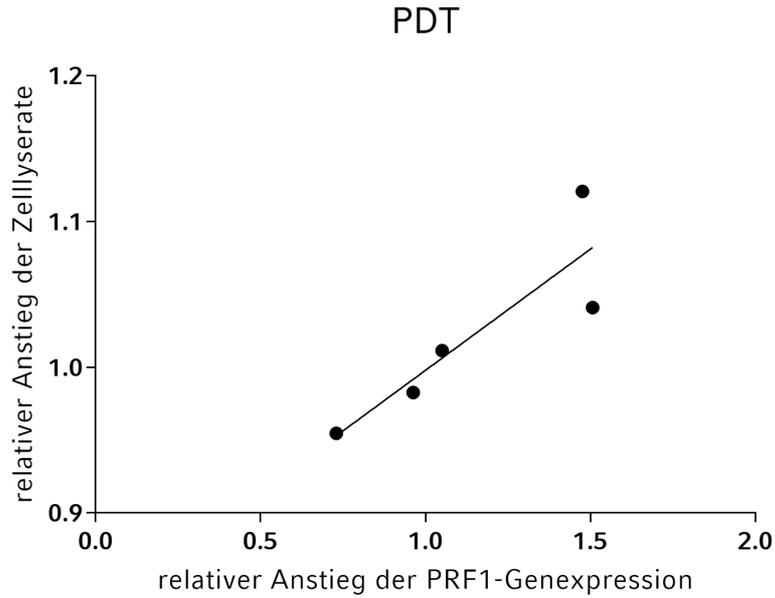


**Abb. 21:** Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC nach 48-stündiger Co-Kultur mit (A) PDT- bzw. (B) TMZ-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle). Normalisierung der Ergebnisse auf die Lyserate der Kontrollgruppe. n = 6; \*p < 0,05

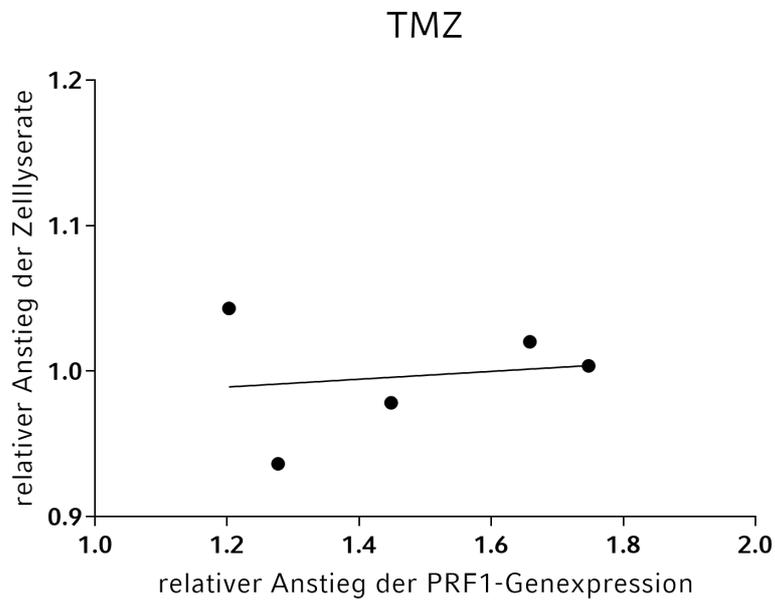
#### 4.2.4 Korrelation von PRF1-Genexpression und Lysekapazität

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von PBMC mit PDT-behandelten U87-Zellen zu einer Induktion der Perforin-Expression auf mRNA-Ebene in zytotoxischen T-Zellen führt. Auch funktionell konnte eine verstärkte Lyseaktivität dieser PDT-geprägten PBMC mittels Calcein-Lyse-Assay quantifiziert werden. Interessanterweise ließ sich hier eine deutliche Korrelation zwischen dem Anstieg der PBMC-vermittelten Zellyseaktivität und der PRF1-Induktion nach PDT-Behandlung nachweisen ( $r = 0,88$ ,  $p = 0,049$ ) (Abb. 22). TMZ-geprägte  $CD8^+$  T-Zellen wiesen zwar ebenfalls eine — wenn auch im Vergleich zu den PDT-Versuchen signifikant geringere — Induktion der PRF1-Genexpression auf, jedoch kam es funktionell zu keiner verbesserten Lyserate bei erneutem Tumorkontakt. Hierbei bestand auch keine Korrelation zwischen der PRF1-Induktion und der Induktion der Lyseaktivität der PBMC nach TMZ-Behandlung ( $r = 0,15$ ,  $p = \text{n.s.}$ ) (Abb. 23).

## ERGEBNISSE



**Abb. 22:** Zusammenhang zwischen Expressionsinduktion der PRF1-mRNA und der induzierten PBMC-vermittelten Lyseaktivität nach vorherigem Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen. Darstellung der Regressionslinie.  $r = 0,88$ ,  $p = 0,049$ ,  $n = 5$



**Abb. 23:** Zusammenhang zwischen Expressionsinduktion der PRF1-mRNA und der induzierten PBMC-vermittelten Lyseaktivität nach vorherigem Kontakt mit TMZ-behandelten U87-Zellen. Darstellung der Regressionslinie.  $r = 0,15$ ,  $p = \text{n.s.}$ ,  $n = 5$

### 4.3 ANALYSE ZUVOR KRYOKONSERVIERTER PBMC

Die bisherigen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Experimente zur Analyse des Einflusses verschiedener Therapieansätze auf die adaptive Immunität erfolgten jeweils in Modellen mit einer U87-Glioblastomzelllinie und mit PBMC gesunder Probanden. Da kultivierte Tumorzellen und Immunzellen aus unterschiedlichen Spenderorganismen und ohne vorherige HLA-Typisierung isoliert wurden, konnten mögliche allogene Effekte nicht ausgeschlossen werden. Um eine Interferenz allogener Immunreaktionen zu minimieren wurden daher bei allen Experimenten mit unbehandelten Tumorzellen gepriete PBMC als Kontrollgruppen mitgeführt.

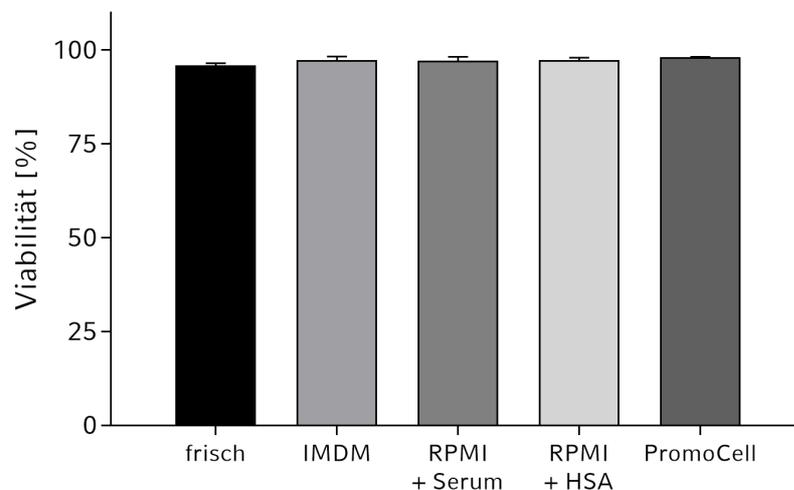
Dennoch stellte, insbesondere für eine adäquate Vergleichbarkeit mit der *in-vivo*-Behandlung, die Durchführung der Experimente im autologen Modell den nächsten Schritt zur Reevaluation der Ergebnisse dar. Dabei sollte das bei mikrochirurgischen Tumorresektionen oder stereotaktischen Biopsien gewonnene Tumorgewebe nach *in-vitro*-PDT-Behandlung mit PBMC desselben Patienten kultiviert werden (autolog).

Um den Einfluss einer möglicherweise peri- oder postoperativ begonnenen Therapie mit Glukokortikoiden bzw. einer darauffolgenden adjuvanten Chemo- und/oder Strahlentherapie auf die Immunzellen zu verhindern, war zunächst vorgesehen, die Blutentnahme zur Isolation der PBMC bereits präoperativ durchzuführen. In diesem Setting würde der Zeitraum zwischen präoperativer Blutentnahme und Durchführung der *in-vitro*-PDT ca. ein bis drei Wochen betragen. Grund hierfür war die zunächst benötigte Zeit für eine postoperative Tumorzellextraktion aus dem gewonnen soliden Tumorgewebe. Damit wurde es jedoch nötig, die präoperativ isolierten PBMC kryokonserviert zu lagern und anschließend für die jeweiligen Kultivierungsexperimente nach Tumorresektion aufzutauen. Allerdings war jedoch unklar, ob nach Kryokonservierung die immunologische Funktionalität der PBMC, insbesondere der T-Zellen noch gewährleistet war. Daher wurden zunächst Viabilitätsmessungen und Stoffwechselanalysen kryokonservierter PBMC gesunder Spender durchgeführt und anschließend die Genexpressionslevel und Zytotoxizitätskapazitäten im autologen PDT-Modell mit U87-Zellen und kryokonservierten PBMC analysiert.

### 4.3.1 Viabilitäts- und Stoffwechselanalysen der PBMC nach Kryokonservierung

Zur Viabilitäts- und Stoffwechselanalyse nach Kryokonservierung wurden PBMC gesunder Spender isoliert. Bei einem Teil der Zellen wurde direkt nach Isolation die Zellviabilität ermittelt und die Stoffwechselaktivität über 72 Stunden mittels MTT-Assays analysiert. Die restlichen Zellen wurden in verschiedenen Kryokonservierungslösungen (siehe 3.11) aufgenommen. Nach einer initialen Inkubation für 24 Stunden im Mr. Frosty Freezing Container erfolgte der Transfer in den Stickstofftank (-196 °C). Nach 96 Stunden wurden die Zellen aufgetaut, die Zellviabilität wurde ermittelt und die Stoffwechselaktivität erneut im Verlauf über 72 Stunden gemessen. Bei allen Versuchen wurde ein Teil der Zellen mit CD3/CD28 Dynabeads® stimuliert, der andere Teil verblieb unstimuliert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde auf die Stoffwechselaktivität der frischen PBMC (ohne Kryokonservierung) nach 72 Stunden Stimulation als Referenzwert (=100%) normalisiert.

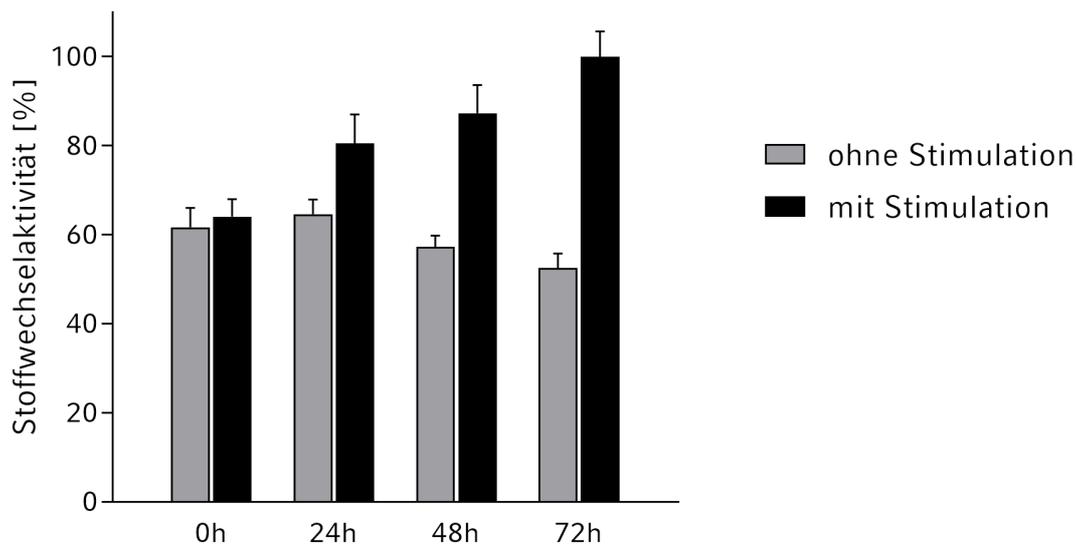
Bei der Analyse zuvor kryokonservierter PBMC war keine Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu frisch isolierten Zellen nachweisbar. Hierbei spielte es keine Rolle welches Kryokonservierungsmedium verwendet wurde (Abb. 24).



**Abb. 24:** Analyse der Zellviabilität mittels Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer direkt nach Isolation (frisch) und nach 96 Stunden Kryokonservierung in verschiedenen Kryokonservierungslösungen im Stickstofftank. Rohwerte [%], ohne Normalisierung. n = 8

Frische PBMC zeigten nach Isolation unter Stimulation eine deutliche Induktion der Stoffwechselaktivität im Verlauf der 72 Stunden (+56,01% ± 4,87%). Unstimuliert zeigte sich hingegen eine Reduktion der Aktivität im Zeitverlauf der Messungen (-14,92% ± 9,17%) (Abb. 25).

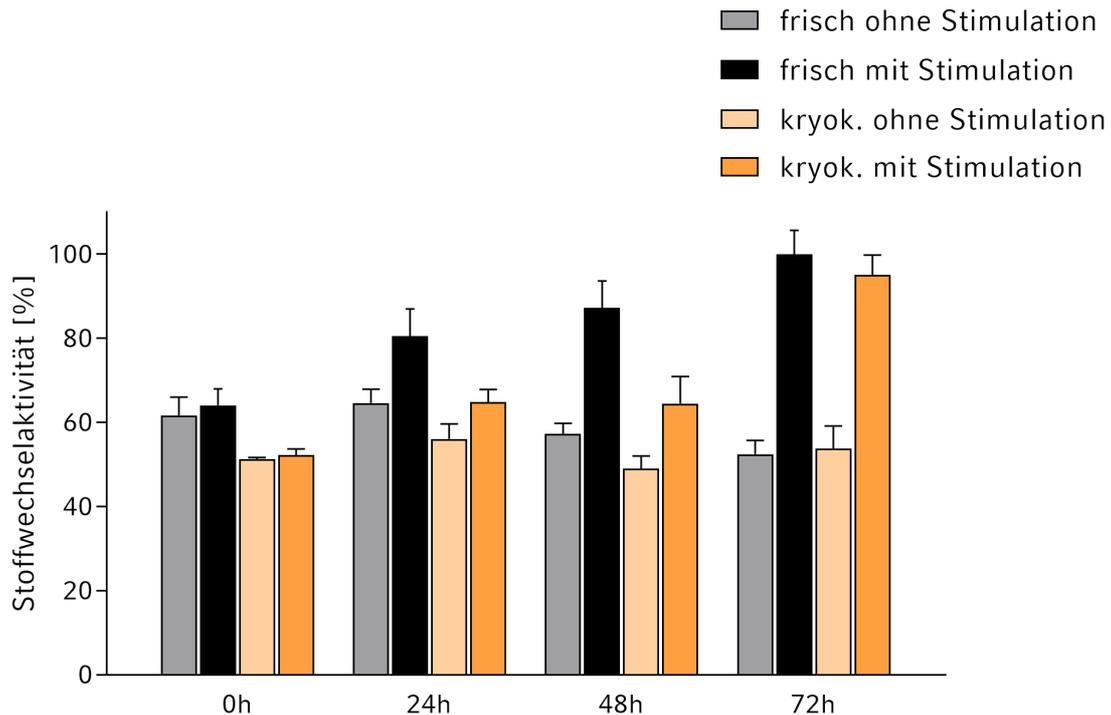
## ERGEBNISSE



**Abb. 25:** Analyse der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay nach Isolation der PBMC gesunder Spender. Die Inkubation erfolgte ohne bzw. unter Stimulation mit CD3/CD28 Dynabeads®. Normalisierung auf die Stoffwechselaktivität stimulierter PBMC nach 72 Stunden. n = 6

Bei der Stoffwechselanalyse nach Kryokonservierung wurden die Werte auf die Stoffwechselaktivität stimulierter, frisch-isolierter PBMC nach 72 Stunden normalisiert. Auch dabei waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Einfrierlösungen nachweisbar. Dargestellt ist hier deshalb exemplarisch die Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung in 50 % RPMI-1640-Medium, 40 % Probandenserum und 10 % DMSO (Lösung 2). Die Quantifizierung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay zeigte, dass kryokonservierte PBMC unter Stimulation erst nach 72 Stunden das Aktivitätsniveau frisch isolierter Zellen erreichten (Abb. 26).

## ERGEBNISSE



**Abb. 26:** Analyse der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay nach 96-stündiger Kryokonservierung, hier am Beispiel des Einfriermediums 50 % RPMI-1640, 40 % Probandenserum und 10 % DMSO. Normalisierung auf die Stoffwechselaktivität stimulierter frischer PBMC nach 72 Stunden. n = 8

### 4.4 ANALYSE DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN IM ALLOGENEN PDT-MODELL MIT KRYOKONSERVIERTEN PBMC

Nach isolierter Analyse der Stoffwechselaktivität der PBMC nach Kryokonservierung stellte sich nun die Frage, ob die PDT-vermittelte Immunomodulation auch bei Sensibilisierung zuvor kryokonservierter PBMC mit PDT-behandelten Glioblastomzellen nachweisbar ist. Analog zu den vorherigen Versuchen sollte die Genexpression der zytolytischen Schlüsselmoleküle in CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Zytotoxizitätskapazität der Immunzellen bei erneutem Tumorkontakt im bekannten autologen PDT-Modell mit U87-Zellen, jedoch unter Verwendung zuvor kryokonservierter PBMC, analysiert werden. Als Kontrollgruppe wurden Co-Kulturen mit frischen (ohne Kryokonservierung) PBMC mitgeführt.

Zunächst wurden PBMC gesunder Spender isoliert. Ein Teil dieser Zellen wurde direkt nach Isolation mit zuvor PDT-behandelten U87-Zellen kultiviert. Zellzahl und Zellstimulation entsprachen den vorherigen Experimenten im *in-vitro*-PDT-Modell für 48 Stunden. Die restlichen PBMC wurden in Kryokonservierungslösungen aufgenommen und kryokonserviert. Nach 96 Stunden wurden die PBMC aufgetaut, gewaschen und es wurde die Zellviabilität ermittelt. Hierbei konnte keine Reduktion der Viabilität der PBMC festgestellt werden und die Zellen

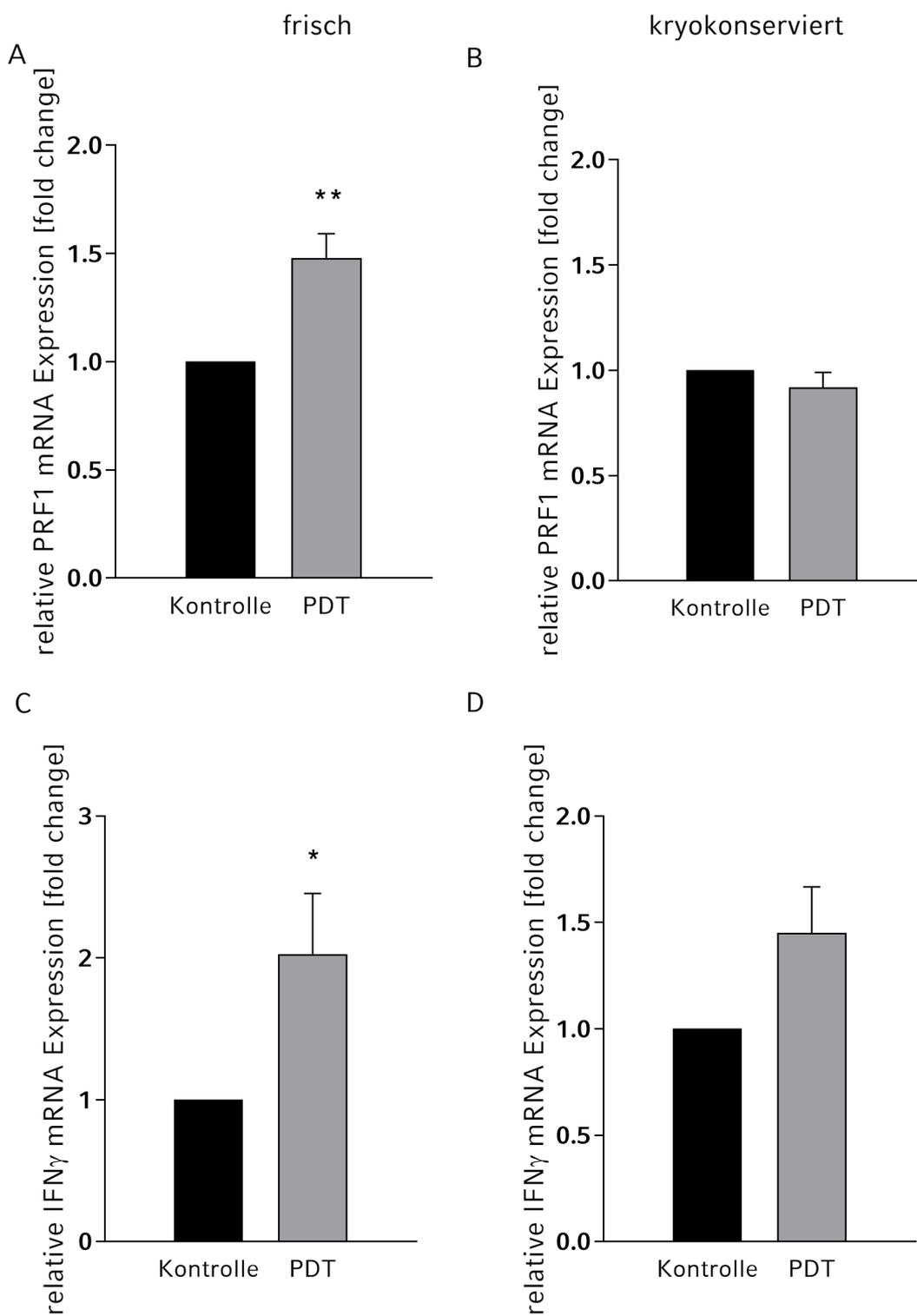
wurden mit PDT-behandelten Tumorzellen inkubiert. Basierend auf den zuvor durchgeführten Stoffwechseluntersuchungen der PBMC nach Kryokonservierung wurde zusätzlich ein Teil der aufgetauten PBMC zunächst für 24, 48 oder 72 Stunden mit CD3/CD28 Dynabeads® stimuliert, um die Stoffwechselreduktion nach Kryokonservierung auszugleichen. Anschließend erfolgte die Kultivierung mit PDT-behandelten Glioblastomzellen. Im Anschluss wurden die PBMC geerntet, die Dynabeads magnetisch entfernt, die CD8-positiven T-Zellen separiert und in RNA-Lysepuffer aufgenommen. Alternativ erfolgte die Analyse der PBMC-vermittelten Lysekapazität nach erneuter Stimulation mit nativen Tumorzellen.

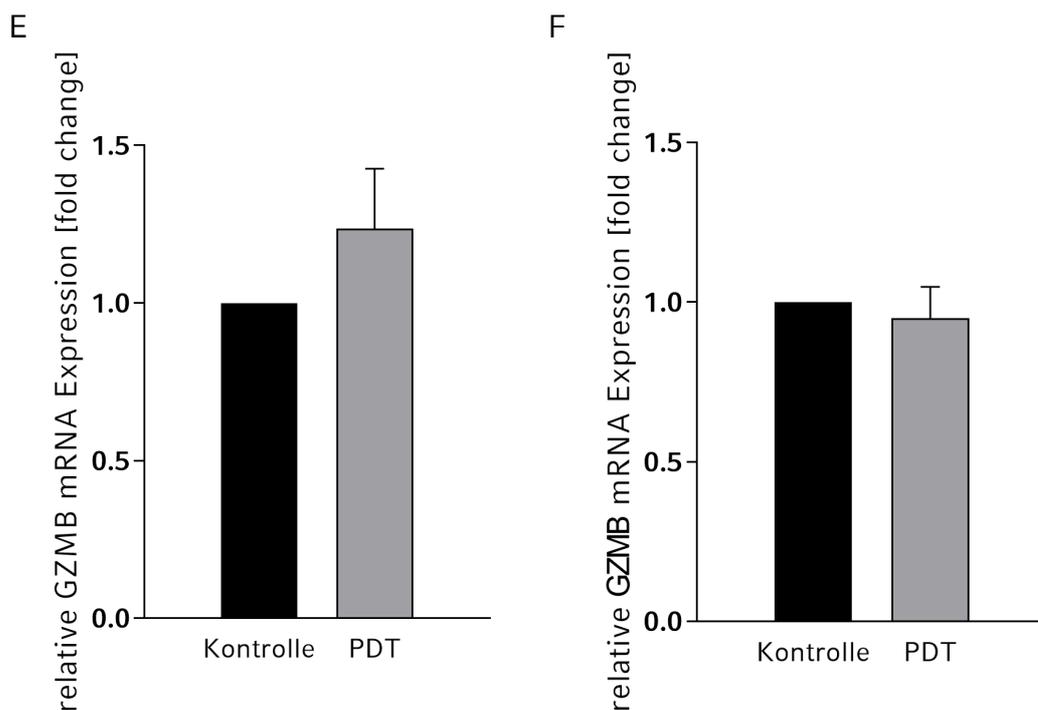
Zwischen den unterschiedlichen Co-Kultur-Modellen mit kryokonservierten PBMC (unterschiedliche Einfrierlösungen und unterschiedliche Stimulationsdauer vor Kultur) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dargestellt werden daher exemplarisch die Ergebnisse der Co-Kulturen mit vorheriger 48-stündiger Stimulation der kryokonservierten PBMC mit Einfrierlösung 2 (siehe Kapitel 3.11).

#### **4.4.1 Analyse der mRNA-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kultivierung PDT-behandelter U87-Zellen mit kryokonservierten PBMC**

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, kam es auch hierbei in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ohne vorherige Kryokonservierung nach Priming mit PDT-behandelten U87-Zellen zu einer signifikant induzierten mRNA-Expression des zytolytischen Effektorproteins Perforin (PRF1) (+48,01% ± 11,08%; p = 0,001) und des Zytokins IFN-γ (+102,8% ± 42,72%; p = 0,037). Die Expressionssteigerung von GranzymB (GZMB) erreichte auch hier nicht das Signifikanzniveau (+23,59% ± 19,01%; p = n.s.) (Abb. 27A, C, E). Analysen der PDT-geprimten CD8<sup>+</sup> T-Zellen derselben Probanden aus den Kulturen mit zuvor kryokonservierten PBMC zeigten zwar ebenfalls einen Anstieg der IFN-γ-Expression, jedoch verblieb dieser im Vergleich zu den direkt nach Isolation kultivierten Immunzellen unterhalb des Signifikanzniveaus (+45,00% ± 21,69%; p = n.s.) (Abb. 27D). Darüber hinaus konnte allerdings weder eine Induktion der PRF1- (-8,16% ± 7,11%; p = n.s.) noch der GZMB-Genexpression (-5,81% ± 9,83%; p = n.s.) nachgewiesen werden (Abb. 27B, F).

ERGEBNISSE





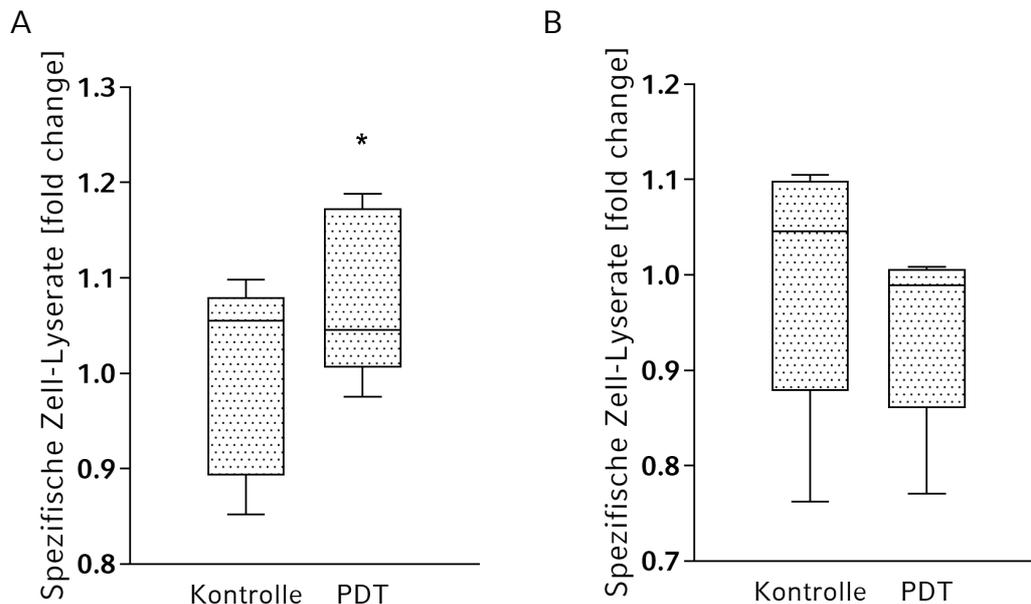
**Abb. 27:** Genexpression von PRF1, GZMB und IFN- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit PDT-behandelten U87-Zellen. Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Jeweils gegenübergestellt sind die Expressionen aus Kulturen mit frischen (A, C, E) und kryokonservierten PBMC (B, D, F). Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert (Kontrolle = 1). n = 6; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01

Der bereits nachgewiesene Effekt der PDT auf die Geninduktion zytotoxischer T-Zellen konnte nach vorheriger Kryokonservierung der PBMC nicht erzielt werden. Insbesondere die fehlende Induktion der Perforin-Expression nach Priming mit PDT-behandelten Tumorzellen stellte damit die Verwendung kryokonservierter PBMC für spätere autologe *in-vitro*-PDT-Ansätze in Frage.

#### 4.4.2 Quantifizierung der Lysekapazität sensibilisierter PBMC nach Kultivierung PDT-behandelter U87-Zellen mit kryokonservierten PBMC

Kryokonservierung der PBMC führte zu einer fehlenden Perforin-Geninduktion nach PDT-Priming. Angesichts der Schlüsselfunktion von Perforin als maßgebliches Effektorenzym zytotoxischer T-Zellen war somit auch von einer kompromittierten antitumoralen Immunantwort auszugehen. Die PBMC-vermittelte antitumorale Lyseaktivität nach Priming mit PDT-behandelten Tumorzellen wurde im Calcein-Assay nach erneutem Kontakt mit nativen U87-Zellen analysiert. Bei Verwendung der frischen PBMC direkt nach Isolation bestätigte sich, wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, eine erhöhte Lyserate der PBMC nach vorheriger Kultivierung mit PDT-behandelten U87-Zellen (+8,01%  $\pm$  2,03%; p = 0,034) (Abb. 28A). Nach PDT-Priming

der kryokonservierten PBMC kam es jedoch zu keiner Induktion der Zytotoxizitätsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $-5,55\% \pm 2,10\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ) (Abb. 28B).



**Abb. 28:** Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC nach 48-stündiger Co-Kultur mit PDT-behandelten (PDT) oder unbehandelten U87-Zellen (Kontrolle). Gegenübergestellt ist die Lyserate aus Co-Kulturen mit frischen (A) und kryokonservierten PBMC (B). Normalisierung der Ergebnisse auf die Lyserate der mit unbehandelten Tumorzellen geprimten PBMC.  $n = 5$ ;  $*p < 0,05$

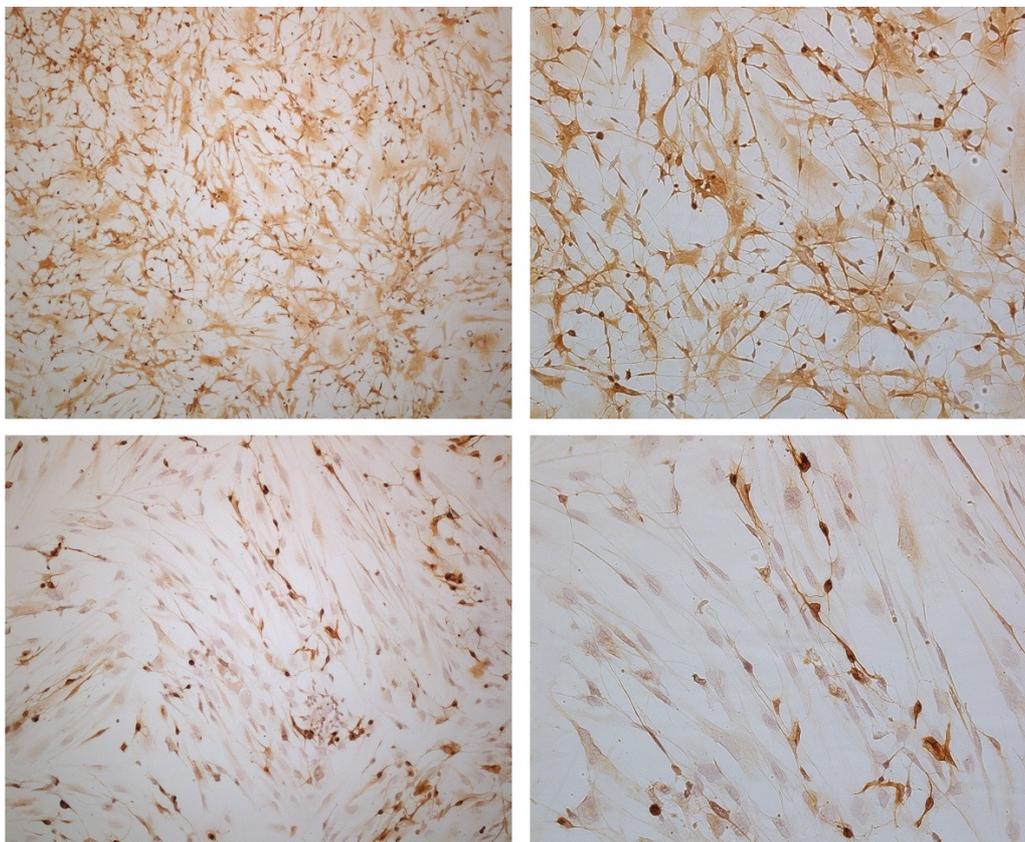
#### 4.5 ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-PDT-MODELLS MIT PRIMÄREN GLIOBLASTOMZELLEN

Zusammenfassend ließen sich in den vorherigen Ergebnissen weder auf mRNA-Ebene noch im Funktionalitätsassay die zuvor beobachteten immunomodulatorischen Effekte bei Verwendung zuvor kryokonservierter PBMC nach Sensibilisierung mit PDT-behandelten Tumorzellen nachweisen. Somit konnte eine kompetente immunologische Funktionalität zuvor kryokonservierter T-Zellen im *in-vitro*-PDT-Modell nicht gewährleistet werden und es wurde entschieden, die PBMC erst nach operativer Tumoresektion und erfolgreicher Kultivierung der jeweiligen primären Glioblastomzellen für die autologen *in-vitro*-Ansätze zu isolieren.

##### 4.5.1 Immunhistochemische Analyse primärer Glioblastomzellen

Nach Isolation primärer Glioblastomzellen aus Tumorsektaten bzw. stereotaktischen Biopsaten erfolgte zunächst der immunhistochemische Nachweis von saurem Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) und Mikrotubuli-assoziiertem Protein 2 (Microtubule-associated protein 2, MAP2) zur Bestätigung des glialen Ursprungs der Zellen. Somit konnte eine

mögliche Kreuzkontamination der Zellkultur, beispielsweise durch Fibroblasten, ausgeschlossen werden. Primäre Glioblastomzellen wurden nach Isolation und mindestens einwöchiger Kultivierung im Brutschrank auf 8-Well Zellkulturkammern mit Deckglas-Objekträger ausgesät. Durch den immunhistochemischen Nachweis GFAP- und MAP2-doppelt-positiver Zellen ließ sich der gliale Ursprung der Zellen bestätigen (Abb. 29).



**Abb. 29:** Immunhistochemische Analyse von isolierten primären Glioblastomzellen. Nachweis von GFAP (oben) und MAP2 (unten). Darstellung eines repräsentativen Patienten in 10x (links) und 20x (rechts) Vergrößerung, n = 6

#### 4.5.2 Zusammenfassung des *in-vitro*-PDT-Modells mit primären Glioblastomzellen

Die *in-vitro*-PDT im autologen Modell wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) Zunächst wurde Tumorgewebe von Patienten bei 5-ALA-Fluoreszenz-unterstützten Tumoresektionen oder stereotaktischen Probeentnahmen (PE), durchgeführt von der Neurochirurgischen Klinik am Campus Großhadern des Klinikums der Universität München (LMU), gewonnen. Voraussetzung hierfür war die vorherige histopathologisch gesicherte Diagnose eines GBM.
- 2) Nach Isolation und Aufreinigung primärer Tumorzellen aus dem Gewebe erfolgte die Kultivierung in Neuromedium und der immunhistochemische Nachweis von GFAP und

MAP2 in der primären Zelllinie zum Ausschluss einer möglichen Kreuzkontamination mit Zellen nicht glialen Ursprungs.

- 3) Sobald nach ca. ein bis drei Wochen Glioblastomzellen in ausreichender Anzahl für die Durchführung der Experimente vorhanden waren, wurden PBMC des/der jeweiligen Patienten/in isoliert. Hierbei wurde ein Mindestabstand zur letzten Glukokortikoidtherapie oder Chemotherapie von zwei Wochen eingehalten, um mögliche immunomodulatorischen Interferenzen zu minimieren.
- 4) Die am Vortag auf 6-Well-Platten ausgesäten primären Tumorzellen wurden nach vierstündiger 5-ALA-Inkubation der PDT-Behandlung unterzogen.
- 5) Anschließend wurden PDT-behandelte bzw. unbehandelten Tumorzellen mit den PBMC des jeweiligen Patienten unter T-Zell spezifischer Stimulation analog zu den allogenen Experimenten kultiviert. Mit unbehandelten Tumorzellen sensibilisierte PBMC dienten als Kontrollgruppe.
- 6) Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Analyse der Zellyseaktivität der Immunzellen.

#### 4.6 ANALYSE DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN IM AUTOLOGEN PDT-MODELL

##### 4.6.1 Analyse der mRNA-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell

Aufgrund der in den Vorversuchen gezeigten Geninduktion zytolytischer Proteine wurde nachfolgend zunächst die mRNA-Expression in CD8-positiven T-Zellen nach Kontakt mit PDT-behandelten primären Glioblastomzellen im autologen Setting analysiert. Hierbei wurden PBMC und Tumorzellen desselben Patienten isoliert und anschließend die PBMC mit PDT-behandelten bzw. mit unbehandelten (Kontrolle) primären Tumorzellen kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die PBMC geerntet und die T-Zellen für die spezifischen qRT-PCR Analysen separiert

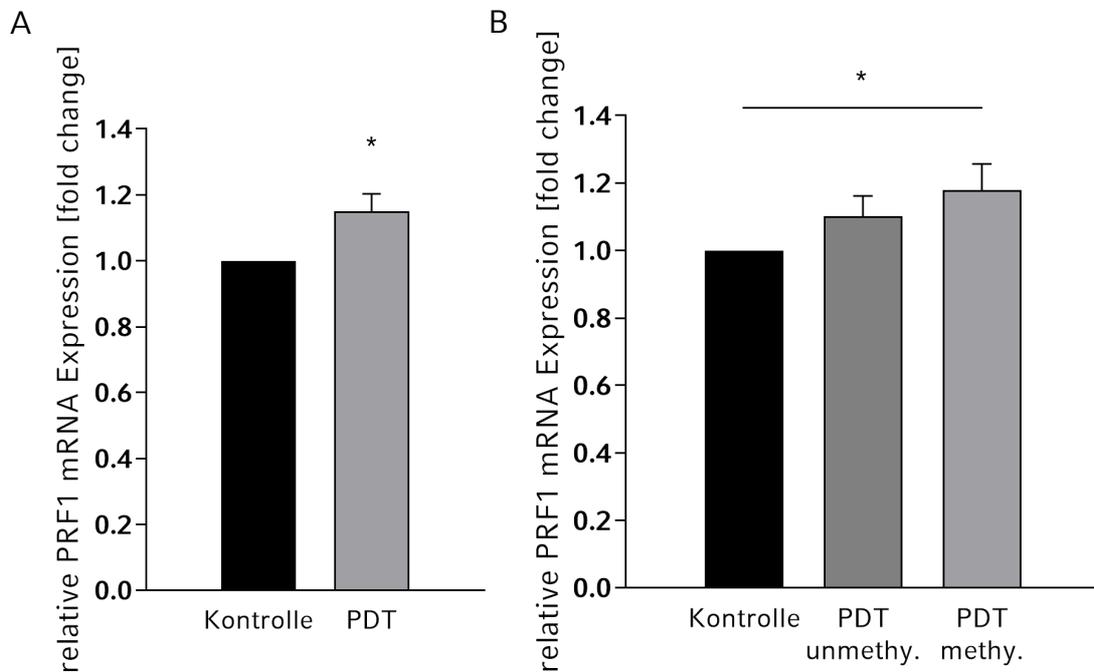
Da sich im Rahmen der Pilotstudie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des KUM gezeigt hatte, dass der Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion den stärksten prognostischen Prädiktor für die Therapieantwort darstellt<sup>59</sup>, wurden die Genexpressionslevel zusätzlich auch stratifiziert nach MGMT-Methylierungsstatus des jeweiligen Patienten (unmethyliert / methyliert) quantifiziert.

In der qRT-PCR der zytolytischen Proteine konnten die bisherigen Ergebnisse der allogenen Ansätze auch im autologen Setting gezeigt werden. Bei der gemeinsamen Analyse aller Patienten konnte eine verstärkte mRNA-Expression von PRF1 in den CD8-positiven T-Zellen nach

## ERGEBNISSE

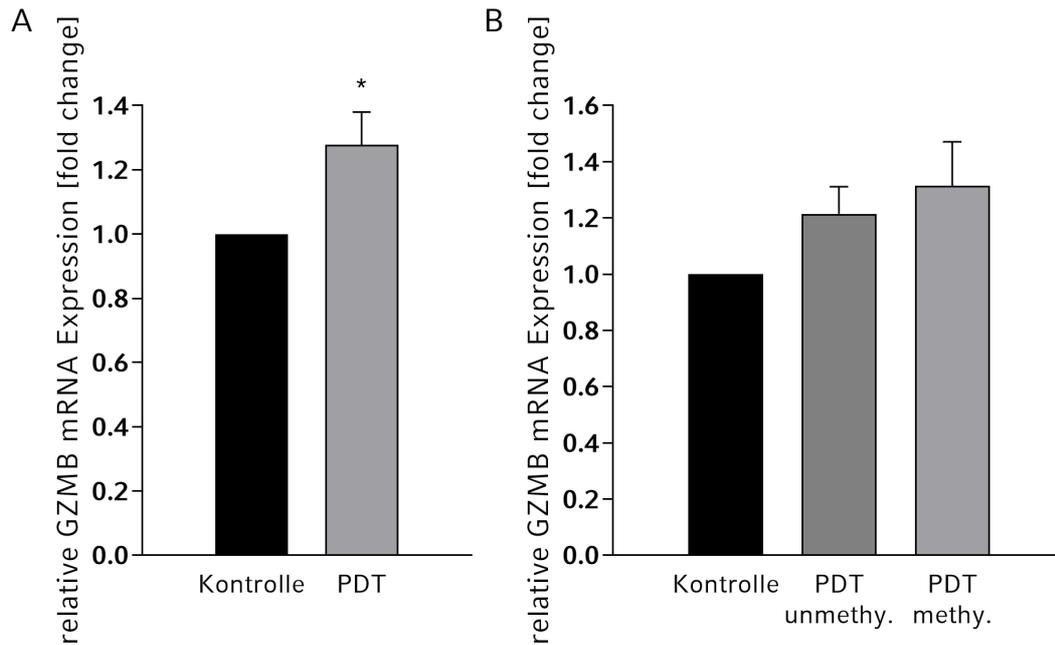
Kontakt mit PDT-behandelten Tumorzellen nachgewiesen werden ( $+14,97\% \pm 5,33\%$ ;  $p = 0,013$ ) (Abb. 30A). Bei differenzierter Betrachtung des MGMT-Promotorstatus zeigten sich jedoch Unterschiede. In T-Zellen von Patienten mit methyliertem Promotor kam es zu einer deutlichen und signifikanten PRF1-Induktion ( $+17,87\% \pm 7,81\%$ ;  $p = 0,047$ ), wohingegen der Anstieg bei nicht-methyliertem Promotor geringer ausfiel, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen ( $+10,12\% \pm 6,07\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ) (Abb. 30B).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Analyse der GZMB mRNA-Level. Gemittelt über alle Patienten zeigte sich eine signifikant verstärkte Genexpression ( $+27,71\% \pm 10,28\%$ ;  $p = 0,017$ ) (Abb. 31A). Auch diese Geninduktion war in den T-Zellen von Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor stärker als in der Gruppe mit unmethyliertem Promotor (methy.:  $+31,44\% \pm 15,71\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ; unmethy.:  $+21,51\% \pm 9,55\%$ ;  $p = \text{n.s.}$ ) (Abb. 31B).



**Abb. 30:** PRF1-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT-behandelten (PDT) oder unbehandelten (Kontrolle) primären Glioblastomzellen desselben Patienten wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert (A).  $n = 16$ . Zusätzlich wurde die relative Geninduktion differenziert nach MGMT-Promotor-Status aufgetragen (B): unmethy.: unmethylierter Promotor,  $n = 7$ ; methy.: methylierter Promotor,  $n = 9$ , \* $p < 0,05$

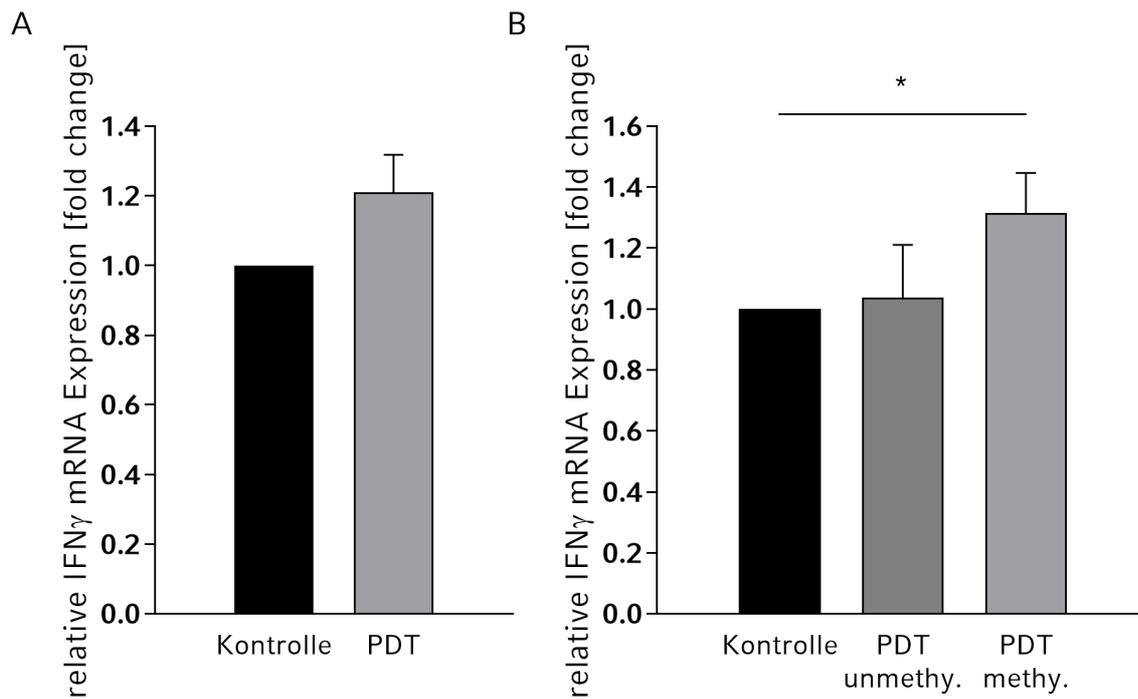
## ERGEBNISSE



**Abb. 31:** GZMB-Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT-behandelten (PDT) oder unbehandelten (Kontrolle) primären Glioblastomzellen desselben Patienten wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert (A). n = 16. Zusätzlich wurde die relative Geninduktion differenziert nach MGMT-Promotor-Status aufgetragen (B): unmethy.: unmethylierter Promotor, n = 7; methy.: methylierter Promotor. n = 9, \*p < 0,05

Auch bei der Quantifizierung der Genexpression von IFN- $\gamma$  konnte ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression nachgewiesen werden, dieser verblieb jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (+21,04%  $\pm$  10,74%; p = n.s.) (Abb. 32A). Bei der nach MGMT-Promotorstatus stratifizierten Analyse zeigte sich jedoch, dass PDT-Priming bei unmethyliertem Promotorstatus keinen maßgeblichen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Expression zur Folge hatte (+3,74%  $\pm$  17,29%; p = n.s.), wohingegen die Gruppe der methylierten Patienten einen signifikanten IFN- $\gamma$  Anstieg nach PDT-Priming aufwies (+31,42%  $\pm$  13,26%; p = 0,042) (Abb. 32B).

## ERGEBNISSE



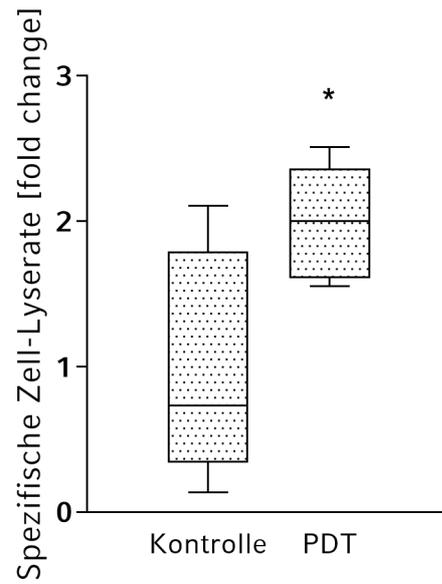
**Abb. 32:** IFN- $\gamma$ -Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. Nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT-behandelten (PDT) oder unbehandelten (Kontrolle) primären Glioblastomzellen desselben Patienten wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert (A). n = 16. Zusätzlich wurde die relative Geninduktion differenziert nach MGMT-Promotor-Status aufgetragen (B): unmethy.: unmethylierter Promotor, n = 7; methy.: methylierter Promotor. n = 9, \*p < 0,05

### 4.6.2 Quantifizierung der PBMC-vermittelten Lyserate im autologen PDT-Modell

Die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Induktion zytolytischer Proteine wurde mittels Calcein-AM-Assays auch funktionell untersucht. Dafür wurde die Lysekapazität der PBMC nach autologer Kultivierung mit PDT-behandelten oder unbehandelten Tumorzellen bei erneutem Kontakt mit nativen Glioblastomzellen desselben Patienten quantifiziert.

Hierbei zeigten, analog zu den allogenen Versuchen, auch im autologen Modell PDT-sensibilisierte PBMC eine signifikant erhöhte Lyserate bei erneutem Kontakt mit nativen primären Tumorzellen im Vergleich zu PBMC der Kontrollgruppe (+103,1%  $\pm$  39,95%; p = 0,048) (Abb. 33). Eine Stratifizierung nach Promotorstatus konnte aufgrund einer ungleichmäßigen Verteilung des Methylierungsmusters dieser Patienten nicht erfolgen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 33:** Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC im autologen Modell nach 48-stündiger Co-Kultur von PBMC mit PDT-behandelten (PDT) oder unbehandelten (Kontrolle) primären Glioblastomzellen desselben Patienten bei erneutem Kontakt mit nativen primären autologen Tumorzellen. Normalisierung der Ergebnisse auf die Lyserate der mit unbehandelten Tumorzellen geprimten PBMC. n = 6, \*p < 0,05

## ERGEBNISSE

## 5 Diskussion

Das Glioblastoma multiforme gehört zu den aggressivsten Hirntumorentitäten. Zur Standardtherapie gehören die mikrochirurgische- und 5-ALA fluoreszenzunterstützte Tumorresektion mit adjuvanter und konkomitanter Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid<sup>2,15,18</sup>. Trotz der Entwicklung multimodaler Therapieregime liegt die 3-Jahres-Überlebenszeit auch aufgrund der späten Diagnosestellung und der raschen Tumorprogredienz immer noch bei unter 10 Prozent<sup>70-72</sup>. Somit rückt die Entwicklung neuer Therapieansätze in den Vordergrund aktueller Forschungsvorhaben<sup>3</sup>.

Die interstitielle Photodynamische Therapie (iPDT) stellt eine neuartige mikroinvasive Therapieoption bei Tumorerkrankungen dar<sup>73</sup>. Dabei wird nach oraler Gabe des Photosensibilisator-Prodrugs 5-ALA der Tumor mit Licht einer spezifischen Wellenlänge bestrahlt<sup>57,58</sup>. Durch Metabolisierung von 5-ALA kommt es zur verstärkten Akkumulation von Protoporphyrin IX (PPIX) im Tumor, welches dort als eigentlicher Photosensibilisator wirkt<sup>50,57</sup>. Nach Bestrahlung des PPIX-angereicherten Tumorgewebes kommt es durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur partiellen Destruktion des umliegenden Tumorgewebes<sup>43,44</sup>. In einigen Studien wurde bereits versucht, das mögliche Potential einer solchen Behandlung bei Patienten mit hirneigenen Tumoren aufzuzeigen. Aufgrund der heterogenen Patientenkohorten und der unterschiedlichen Studienprotokolle war es jedoch bisher nicht möglich, die PDT standardmäßig als adjuvante Therapie bei GBM zu etablieren<sup>74,75</sup>.

In einer Pilotstudie der Klinik für Neurochirurgie des Klinikums der Universität München in Kooperation mit der eigenen Arbeitsgruppe wurde die iPDT erstmals als initiales Therapieregime bei Patienten mit nichtresektablem GBM eingesetzt. Diese Patienten zeigten im Vergleich zu Patienten nach kompletter Tumorresektion ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben, wobei 40 % der Patienten nach iPDT ein außerordentlich langes progressionsfreies Intervall von 32-68 Monaten aufwiesen<sup>59</sup>. Beide Gruppen erhielten eine adjuvanter Radio-/Chemotherapie. Auch in weiteren Studien konnten Beck et al. und Stummer et al. verlängerte Überlebenszeiten bei Patienten mit Glioblastomrezidiv nach photodynamischer Behandlung nachweisen<sup>58,76</sup>. Die in diesen Studien erstmals beschriebene Zunahme des progressionsfreien Überlebens nach PDT ist jedoch nicht alleine durch die Sauerstoffradikal-vermittelten, lokoregionalen Reaktionen des aktivierten Photosensitizers mit dem umliegenden Tumorgewebe und einer damit einhergehenden unspezifischen Entzündungsreaktion zu erklären. So wird in aktuellen Studien die PDT-vermittelte Modulation der adaptiven Immunität als möglicher Mechanismus für die Langzeittumorkontrolle diskutiert<sup>43,44</sup>.

In tierexperimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und die Einwanderung zytotoxischer T-Zellen nach PDT als potentielle Mechanismen der Tumorkontrolle eine wichtige Rolle spielen<sup>61,77–79</sup>. Jedoch fehlten bisher etablierte Modelle zur Untersuchung des immunomodulatorischen Potentials der PDT bei Patienten mit GBM. Auch die klinischen PDT-Studien mit Glioblastompatienten haben bisher die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen eines Therapieerfolges nicht adressiert.

Um den Einfluss der PDT auf die adaptive Immunität zu charakterisieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ein *in-vitro*-PDT-Tumorzell-Immunzell-Modell entwickelt, mithilfe dessen erstmals die Interaktion zwischen Glioblastom- und Immunzellen nach PDT charakterisiert werden konnte. Hierbei zeigte sich eine Induktion antitumorogener, zytolytischer Effektorproteine in CD8-positiven T-Zellen und eine verstärkte Immunzell-vermittelte Tumorzelllyse bei erneutem Tumorkontakt<sup>62</sup>.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es sich hierbei um einen spezifischen PDT-vermittelten Effekt handelte, oder ob sich bei Verwendung anderer Therapieregime, hier am Beispiel einer TMZ-Therapie, eine vergleichbare Modulation der T-Zell-spezifischen Immunantwort beobachten lässt.

In der zweiten Projektphase sollte zusätzlich die Übertragung des *in-vitro*-PDT-Modells auf ein autologes *in-vitro*-Modell unter Verwendung von bei Tumorresektionen oder Biopsien gewonnenem Tumorgewebe und Immunzellen derselben Patienten erfolgen. Hierdurch würde zusätzlich die differenzierte Analyse der Immunantwort in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus des jeweiligen Patienten ermöglicht werden.

## 5.1 ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-TMZ-MODELLS UND ANALYSE DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN IM VERGLEICH ZUR IN-VITRO-PDT

Für die Etablierung eines *in-vitro*-Modells zur TMZ-Behandlung von Glioblastomzellen wurde zunächst die TMZ-Dosis ermittelt, die einen zur *in-vitro*-PDT-Behandlung äquivalenten Zellschaden induziert. Als Parameter des Zellschadens wurde hierfür die Reduktion der Stoffwechsellaktivität der TMZ- oder PDT-behandelten Glioblastomzellen herangezogen. Hierbei wurde eine TMZ-Konzentration von 350  $\mu$ M ermittelt. U87-Glioblastomzellen wurden daraufhin entweder mit TMZ behandelt oder einer *in-vitro*-PDT unterzogen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit PBMC gesunder Spender. Nach 48 Stunden wurden die PBMC geerntet und die Modulation einer antitumoralen Immunantwort charakterisiert.

Zunächst erfolgte die Analyse der Zytokinexpression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese T-Zellsubpopulation ist nachweislich von herausragender Bedeutung für eine spezifische antitumorale Immunantwort<sup>80,81</sup>. Hierfür wurde die Genexpression der zytotoxischen Effektorproteine Perforin (PRF1) und GranzymB (GZMB) in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Sensibilisierung mit PDT-behandelten, sowie nach Kontakt mit TMZ-behandelten Tumorzellen, analysiert. Perforin ist das Schlüsselenzym zytotoxischer T-Zellen, da es durch Polymerisierung und Integration in die Membran der Zielzellen die Infiltration von Granzymen wie GZMB ermöglicht<sup>82,83</sup>. Diese Serinproteasen, ebenfalls sezerniert von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, führen aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität zum Untergang der Tumorzellen<sup>82-85</sup>. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Perforin und GZMB mit einer insuffizienten Immunreaktion und in der Folge auch mit einem verstärkten Tumorwachstum einhergeht<sup>86,87</sup>.

Interessanterweise führte sowohl eine Immunzellsensibilisierung mit PDT- als auch mit TMZ-behandelten Tumorzellen zu einer signifikanten Geninduktion von Perforin in den jeweiligen T-Zellen. Jedoch war diese nach Behandlung mit PDT, im Vergleich zur TMZ-Gruppe, deutlich ausgeprägter. Bei Analyse der Proteinsekretion von Perforin durch zytotoxische T-Zellen bei erneutem Kontakt mit nativen Tumorzellen im ELISpot Assay zeigte sich eine signifikante Induktion der Perforinsekretion durch die PDT-sensibilisierten T-Zellen, wohingegen bei den T-Zellen der TMZ-Gruppe keine vermehrte Freisetzung von Perforin nachgewiesen werden konnte.

Zudem kam es in den T-Zellen beider Gruppen zu einer verstärkten Genexpression von GZMB. Diese war sogar nach TMZ-Priming deutlich stärker ausgeprägt als nach PDT. Grund hierfür könnte eine kompensatorisch verstärkte GZMB-Induktion aufgrund einer, im Gegensatz zur PDT-Gruppe, verringerten Perforininduktion sein. Ohne ausreichende Perforin-Level kann GZMB nicht in die Tumorzellen gelangen und damit auch nicht zur einer effektiven antitumorigen Immunreaktion beitragen.

Dies zeigte sich insbesondere bei der funktionellen Untersuchung der Lyseaktivität der sensibilisierten Immunzellen bei erneutem Kontakt mit nativen Glioblastomzellen. Priming mit PDT-behandelten Tumorzellen schwächte nicht nur die Glioblastom-vermittelte Immunparalyse ab, sondern führte auch zur signifikant verstärkten Tumorzellyse durch die sensibilisierten Immunzellen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Perforin ELISpot-Analysen kam es zu keiner verbesserten tumorspezifischen Lysekapazität der TMZ-sensibilisierten PBMC bei erneutem Kontakt mit Tumorzellen.

Nach Inkubation mit TMZ- oder PDT-behandelten Tumorzellen konnte eine verstärkte mRNA-Expression von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Hier fiel, im

Vergleich mit der PDT-Gruppe, der Anstieg der IFN- $\gamma$ -Expression in den TMZ-sensibilisierten T-Zellen signifikant stärker aus. IFN- $\gamma$  ist bekannt als ein multifunktionelles proinflammatorische Molekül und spielt in der antitumoralen Immunabwehr eine wichtige Rolle<sup>88</sup>. Insbesondere durch Induktion des Major Histocompatibility Complex (MHC) I und II sowie durch Stimulation der Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und phagozytierenden Makrophagen kann es die antitumorale Immunabwehr fördern<sup>89-91</sup>. Die verstärkte IFN- $\gamma$ -Expression in T-Zellen nach TMZ-Priming führte jedoch nicht zu einer verbesserten antitumoralen Reaktion der T-Zellen. Studien konnten jedoch nachweisen, dass IFN- $\gamma$  auch protumorigene Eigenschaften besitzt<sup>88,92</sup>. So haben Brody et al beschrieben, dass IFN- $\gamma$  über die Induktion immunsuppressiver Zellpopulationen und Ausbildung immunsuppressiver Oberflächenproteine wie PD-L1 (programmed cell death ligand 1) auf GBM-Zellen die spezifische Immunreaktion kompromittieren kann<sup>90,93-95</sup>. Bei einer Induktion von IFN- $\gamma$  bei Tumorerkrankungen ohne verbesserte antitumorale Kompetenz der Immunzellen muss die Expression proinflammatorischer Zytokine und insbesondere die Rolle von IFN- $\gamma$  zunehmend kritisch hinterfragt und kontrovers diskutiert werden.

Zusammenfassend konnte zunächst gezeigt werden, dass die nach photodynamischer *in-vitro* Behandlung verbesserte antitumorale Immunreaktion zytotoxischer T-Zellen nicht durch eine Behandlung mit Temozolomid induziert werden kann. Die beobachtete Induktion der tumorspezifischen adaptiven Immunität ist somit als eine PDT-spezifische Immunmodulation anzusehen.

## 5.2 ETABLIERUNG EINES AUTOLOGEN IN-VITRO-PDT-MODELLS

Die bisher im Rahmen dieser Fragestellung durchgeführten Experimente zur Analyse des Einflusses verschiedener Therapieansätze auf die adaptive Immunität wurden in allogenen *in-vitro*-Modellen mit U87-Glioblastomzellen und PBMC gesunder Probanden durchgeführt. Mögliche immunologische Auswirkungen der allogenen Co-Kultivierung wurden jedoch aus Gründen der Praktikabilität zunächst nicht berücksichtigt. Daher sollte in einer zweiten Projektphase die Übertragung der Experimente in ein autologes Modell, in dem Tumor- und Immunzellen vom selben Patienten stammen, erfolgen. Zudem würde durch ein solches Modell die differenzierte Charakterisierung der PDT-vermittelten Immunomodulation in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus des jeweiligen Patienten möglich. Dieser stellt den stärksten positiven Prädiktor für das Langzeitüberleben bei GBM dar<sup>72,96</sup> und wurde auch von Schwartz et al. als wichtigster prognostischer Faktor für den Therapieerfolg nach iPDT als Initialtherapie bei GBM beschrieben<sup>59</sup>.

### 5.2.1 Quantifizierung der immunologischen Funktionalität zuvor kryokonservierter PBMC

Für das autologe PDT-Modell sollte das bei mikrochirurgischen Tumorsektionen oder stereotaktischen Biopsien gewonnene Tumorgewebe nach *in-vitro*-PDT-Behandlung mit PBMC desselben Patienten kultiviert werden. Da für die Isolation und Kultivierung der primären GBM-Zellen ein Zeitraum von bis zu drei Wochen benötigt werden würde, war es zunächst vorgesehen, die PBMC bereits präinterventionell zu isolieren und im Anschluss kryokonserviert zu lagern. Sobald die benötigte Anzahl primärer Tumorzellen des jeweiligen Patienten für die Durchführung der *in-vitro*-PDT vorlägen, sollten die PBMC des Patienten aufgetaut und anschließend mit den behandelten Tumorzellen analog zum allogenen Modell inkubiert werden. Somit sollte verhindert werden, dass durch eine möglicherweise postoperativ begonnene Glukokortikoidtherapie die Immunanalysen beeinflusst werden könnten. Aufgrund der heterogenen morphologischen Struktur der Resektate und einer damit einhergehenden kompromittierten Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurde bewusst auf die Durchführung einer PDT mit undissoziiertem Tumorgewebe direkt nach Resektion oder Biopsie verzichtet.

In mehreren Studien konnte bisher gezeigt werden, dass die Kryokonservierung von PBMC weder zu einer reduzierten Zellviabilität noch zu einer kompromittierten Immunantwort nach erneutem Antigen-Stimulus führt<sup>97,98</sup>. Jedoch konnten Owen et al., nach Langzeit-Kryokonservierung von mehreren Monaten, eine eingeschränkte Zytokinsekretion von T-Zellen bei erneutem Antigenkontakt beobachten<sup>99</sup>. Damit war zunächst die Verifikation der kompetenten immunologischen Funktionalität zuvor kryokonservierter PBMC für das *in-vitro*-PDT-Modell notwendig. Hierzu wurden neben der bereits im Institut etablierten Kryokonservierungslösung<sup>65</sup>, auch modifizierte Versionen<sup>100</sup> sowie ein industriell vorgefertigtes Kryokonservierungsmedium verwendet.

In den zunächst durchgeführten vergleichenden Viabilitätsanalysen frisch isolierter und zuvor kryokonservierter PBMC konnte keine Reduktion der Zellviabilität nach Kryokonservierung nachgewiesen werden. Jedoch erreichten die zuvor kryokonservierten Zellen auch unter T-Zellspezifischer Stimulation erst nach 72 Stunden das Aktivitätsniveau der analog inkubierten und stimulierten frischen PBMC. Auch Kutscher et al. haben beschrieben, dass eine 5-24-stündige Ruhephase nach dem Auftauprozess kryokonservierter Zellen die T-Zell vermittelte Immunreaktion in anschließenden Funktionalitätsassays deutlich verbessern kann<sup>101,102</sup>. Daher wurden die aufgetauten PBMC vor Kultivierung mit behandelten Tumorzellen für 24, 48 oder 72 Stunden vorinkubiert (Ruhephase). Bei der Charakterisierung der CD8-spezifischen Immunantwort nach PDT konnte jedoch in den zuvor kryokonservierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich mit den

direkt nach Isolation sensibilisierten T-Zellen, weder eine signifikante Induktion der zytolytischen Effektormoleküle Perforin und GranzymB nachgewiesen werden, noch kam es zu einer Induktion der Tumorzelllysekapazität der Immunzellen bei erneutem Tumorkontakt. Auch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kryokonservierungsmedien oder der Dauer der präinterventionellen Inkubationsphase der aufgetauten PBMC. Bei Rücksprache mit verschiedenen Herstellerfirmen der Kryokonservierungsmedien konnte zusätzlich festgestellt werden, dass durch die firmeneigenen Qualitätsanalysen der PBMC nach Kryokonservierung lediglich eine ausreichende Viabilität der Zellen gewährleistet wurde. Die Frage nach der intakten immunologischen Funktionalität der PBMC, insbesondere der T-Zellen, nach Kryokonservierung, wurde hierbei bisher nicht adressiert. Aufgrund der nachgewiesenen kompromittierten Effektorfunktion nach Kryokonservierung wurde das autologe *in-vitro*-PDT-Modell mit frisch isolierten PBMC der Patienten durchgeführt. Auch stellen diese Ergebnisse die Verwendung zuvor kryokonservierter PBMC für immunologische Fragestellungen der adaptiven Immunität weiterhin deutlich in Frage.

### 5.2.2 Analyse der CD8-spezifischen Immunantwort im autologen PDT-Modell

Für die Durchführung des autologen *in-vitro*-Modells wurden zunächst primäre Glioblastomzellen aus bei mikrochirurgisch reseziertem oder stereotaktisch gewonnenem Tumorgewebe isoliert. Hierbei wurde nur Tumorgewebe von Patienten mit histopathologisch gesicherter Diagnose eines GBM verwendet und lediglich GFAP/MAP2 doppelpositive Primärzelllinien eingesetzt. Sobald eine ausreichende Anzahl primärer Glioblastomzellen kultiviert werden konnte, wurden PBMC des/der jeweiligen Patienten/in isoliert. Um die Auswirkung immunomodulatorischer Medikamente zu minimieren, wurde ein Mindestabstand zur letzten Glukokortikoid- und Chemotherapie von mindestens zwei Wochen eingehalten.

Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte zunächst die Analyse der Genexpression zytolytischer Effektormoleküle in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierfür wurden die mRNA-Expression sowohl gemittelt über alle Patienten sowie zusätzlich stratifiziert nach MGMT-Methylierungsstatus des jeweiligen Patienten (unmethyliert bzw. methyliert) quantifiziert. Analog zu den Ergebnissen der allogenen Experimente zeigte sich auch hier insgesamt eine signifikante Geninduktion des Schlüsselenzyms Perforin in den PDT-geprimten T-Zellen. Interessanterweise kam es bei Patienten mit methyliertem MGMT-Promotorstatus zu einer signifikanten Perforin-Induktion, wohingegen die mRNA-Expression bei Patienten mit unmethyliertem Promotor geringer ausfiel und unterhalb des Signifikanzniveaus blieb. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte sich auch bei der Quantifizierung der GranzymB Genexpression. Bei Promotor-unabhängiger Untersuchung konnte eine deutliche und signifikante Induktion nachgewiesen werden. Diese war

in der Gruppe mit methyliertem MGMT-Promoter ausgeprägter als bei Patienten mit unmethyliertem Promotorstatus. Allerdings blieb die Geninduktion beider Gruppen bei MGMT-differenzierter Betrachtung unterhalb des Signifikanzniveaus. Bei MGMT-unabhängiger Analyse der IFN- $\gamma$ -Expression in den T-Zellen erreichte die beobachtete Geninduktion nicht das Signifikanzniveau. Bei der differenzierten Analyse zeigte sich jedoch, dass der IFN- $\gamma$ -Anstieg in der Gruppe der Patienten mit unmethyliertem Promotor auf dem Level der Kontrollgruppe blieb, wohingegen es bei Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor zu einer deutlichen und signifikanten IFN- $\gamma$ -Geninduktion kam, die hier in Kombination mit der zuvor beschriebenen verbesserten Zellyserate als antitumorigener Faktor bei der PDT zu werten ist.

Auch im autologen Setting zeigten die PDT-sensibilisierten PBMC bei erneutem Kontakt mit nativen Glioblastomzellen desselben Patienten eine deutlich verbesserte Zellysekapazität im Vergleich mit PBMC, die mit unbehandelten Tumorzellen inkubiert wurden. Es ließ sich somit auch funktionell die Induktion einer effizienteren antitumorigenen Immunantwort nachweisen. Eine differenzierte Betrachtung der Lysekapazität, stratifiziert nach MGMT-Promotorstatus, war jedoch aufgrund der ungleichen Verteilung methylierter und unmethylierter Patienten bei diesem Assay noch nicht möglich.

Die in den allogenen Versuchen nachgewiesene PDT-vermittelte Immunomodulation ließ sich im Rahmen des hier diskutierten Forschungsprojektes somit erstmalig auch in einem autologen *in-vitro*-Modell mit primären Glioblastom- und Immunzellen nachweisen. Auch kam es in den PDT-sensibilisierten zytotoxischen T-Zellen zur Induktion antitumoraler Effektormoleküle und infolge zu einer verbesserten Tumorlyserate. Die Ausprägung dieser PDT-vermittelten Immunomodulation war abhängig vom Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion, wobei insbesondere zytotoxische T-Zellen von MGMT-methylierten Patienten eine verstärkte Genexpression der Effektormoleküle aufzeigten.

Eine unterschiedlich ausgeprägte Induktion der adaptiven Immunität nach photodynamischer Therapie, basierend auf dem Methylierungsmuster der MGMT-Promotorregion, sollte als eine mögliche Ursache für eine reduzierte oder prologierte Tumorkontrolle nach iPDT bei GBM in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Die zugrundeliegenden, multifaktoriell beeinflussten Mechanismen der PDT-vermittelten Verbesserung der T-Zell-spezifischen Immunität bei GBM-Patienten sind ebenfalls noch nicht ausreichend verstanden. Diskutiert werden hier u.a. die verstärkte Aufnahme PDT-behandelter Tumorantigene durch dendritische Zellen (DC) sowie eine dadurch effizientere Aktivierung und Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen als Grundlage für eine verbesserte adaptive Immunreaktion<sup>103,104</sup>.

## DISKUSSION

Die PDT stellt eine innovative und vielversprechende Option bei der Therapie von Patienten mit GBM dar. Die Charakterisierung der für den Therapieerfolg nach PDT verantwortlichen Mechanismen ist ein essentieller Schritt für die Etablierung dieser neuartigen Therapieform und für die Identifikation derjenigen Glioblastompatienten, die von einer photodynamischen Behandlung besonders profitieren könnten.

Die vorliegende Arbeit hat nun weitere notwendige Grundlagen geschaffen, um diese Untersuchungen durchführen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist die aggressivste Hirntumorentität bei Erwachsenen und der häufigste maligne hirneigene Tumor<sup>2-4</sup>. Trotz radikaler mikrochirurgischer Resektion und konkomitanter bzw. adjuvanter Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid liegt die mediane Überlebenszeit bei ca. 15 Monaten, wobei der MGMT-Promotorstatus den stärksten positiven Prädiktor für das Langzeitüberleben darstellt<sup>4,5</sup>.

Basierend auf der Bestrahlung des Tumorgewebes mittels stereotaktisch implantierter faseroptischer Diffusoren mit Licht spezifischer Wellenlänge nach vorheriger Sensibilisierung mit einem sich im Tumorgewebe anreichernden Photosensibilisator, stellt die Photodynamische Therapie (PDT) eine neuartige mikroinvasive Therapieoption bei GBM dar. In einer Pilotstudie der Klinik für Neurochirurgie des Klinikums der Universität München, bei der erstmals die PDT als Initialtherapie bei Patienten mit nichtresektablem GBM eingesetzt wurde, zeigten PDT-behandelte Patienten, im Vergleich zu Patienten mit kompletter Tumorsektion, ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben sowie eine deutlich verlängerte 3-Jahresüberlebensrate. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der langanhaltenden Tumorkontrolle nach PDT ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben. Erste Ergebnisse der eigenen Forschungsgruppe zeigten eine verbesserte Tumorlysekompetenz PDT-sensibilisierter zytotoxischer T-Zellen in einem etablierten *in-vitro*-Modell.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die nach photodynamischer *in-vitro*-Behandlung verbesserte antitumorale adaptive Immunität – charakterisiert durch vermehrte Perforinsekretion und eine gesteigerte Tumorlysekompetenz zytotoxischer T-Zellen – eine PDT-spezifische Modulation darstellt und nicht durch eine Behandlung mit Temozolomid induziert werden kann. Zudem konnte erstmals ein autologes *in-vitro*-PDT Modell etabliert werden. Bei Tumorsektionen oder Biopsien gewonnenes Tumorgewebe wurde nach PDT-Behandlung mit Immunzellen derselben Patienten inkubiert und anschließend das Zytokinexpressionsmuster der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom MGMT-Promotormethylierungsstatus sowie die Zelllysekapazität der Immunzellen charakterisiert. Insbesondere in den zytotoxischen T-Zellen von Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor kam es zu einer Geninduktion der zytolytischen Effektormoleküle Perforin und GranzymB, sowie zur verstärkten mRNA-Expression von IFN- $\gamma$ . Auch funktionell zeigte sich eine insgesamt verbesserte Zelllysekapazität der PDT-geprimten primären Immunzellen bei erneutem Tumorkontakt.

Die in dieser Arbeit beschriebene Charakterisierung der tumorspezifischen adaptiven Immunität nach PDT im autologen *in-vitro*-Modell stellt einen wichtigen Schritt dar, um zukünftig den

## ZUSAMMENFASSUNG

Mechanismus der prolongierten Tumorkontrolle nach PDT aufklären zu können. Dies ist Voraussetzung, um PDT-sensitive Patienten zu identifizieren und die PDT als adjuvante Therapieoption bei GBM zu etablieren.

## 7 Anhang

### 7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b> Schematische Übersicht über den Temozolomid (TMZ)-Metabolismus. ....	12
<b>Abb. 2:</b> Jablonksi-Diagramm zur Übersicht der Anregungszustände des Photosensitizers bei der PDT .....	15
<b>Abb. 3:</b> Häm-Synthese im schematischen Überblick. ....	17
<b>Abb. 4:</b> Absorptions- und Emissionsbereich von Protoporphyrin IX (PPIX) .....	18
<b>Abb. 5:</b> Kultivierung primärer Tumorzellen aus stereotaktischen GBM-Biopsaten .....	28
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der PBMC-Isolation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Leucosep®-Röhrchen. ....	31
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung der Zellseparation mittels magnetischer MicroBeads.....	32
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung der 6-Well-Platte für die <i>in-vitro</i> -PDT-Behandlung.....	33
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung der qRT-PCR .....	40
<b>Abb. 10:</b> Schematische Darstellung des Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot).....	42
<b>Abb. 11:</b> Schematische Darstellung des Calcein-Acetoxymethylester-Assays.....	44
<b>Abb. 12:</b> Chemische Grundlage des MTT-Assays. ....	45
<b>Abb. 13:</b> Analyse der Stoffwechselreduktion mittels MTT-Assay .....	48
<b>Abb. 14:</b> PRF1-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	50
<b>Abb. 15:</b> Vergleich der PRF1-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach TMZ- bzw. nach PDT-Behandlung.....	50
<b>Abb. 16:</b> GZMB-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	51
<b>Abb. 17:</b> IFN- $\gamma$ -Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	52
<b>Abb. 18:</b> IL-1 $\beta$ -Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	52
<b>Abb. 19:</b> Quantifizierung der Perforin-Sekretion CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mittels ELISpot.....	53
<b>Abb. 20:</b> Quantifizierung der PBMC-vermittelten Lyse-Aktivität.....	55
<b>Abb. 21:</b> Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC nach 48-stündiger Co-Kultur .....	56
<b>Abb. 22:</b> Zusammenhang zwischen Expressionsinduktion der PRF1-mRNA und der induzierten PBMC-vermittelten Lyseaktivität nach vorherigem Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen. ....	57

<b>Abb. 23:</b> Zusammenhang zwischen Expressionsinduktion der PRF1-mRNA und der induzierten PBMC-vermittelten Lyseaktivität nach vorherigem Kontakt mit TMZ-behandelten U87-Zellen. ....	57
<b>Abb. 24:</b> Analyse der Zellviabilität mittels Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer .....	59
<b>Abb. 25:</b> Analyse der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay nach Isolation der PBMC..	60
<b>Abb. 26:</b> Analyse der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay nach 96-stündiger Kryokonservierung.....	61
<b>Abb. 27:</b> Genexpression von PRF1, GZMB und IFN- $\gamma$ in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit PDT-behandelten U87-Zellen.....	64
<b>Abb. 28:</b> Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC nach 48-stündiger Co-Kultur .....	65
<b>Abb. 29:</b> Immunhistochemische Analyse von isolierten primären Glioblastomzellen. ....	66
<b>Abb. 30:</b> PRF1-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. ....	68
<b>Abb. 31:</b> GZMB-Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. ....	69
<b>Abb. 32:</b> IFN- $\gamma$ -Expression in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im autologen PDT-Modell. ....	70
<b>Abb. 33:</b> Analyse der Lyse-Aktivität der PBMC im autologen Modell.....	71

## 7.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AIC	5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid
APC	Antigenpräsentierende Zellen
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAR-T-Zellen	chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (dsDNA)	Desoxyribonukleinsäure (doppelsträngig)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FBS/FCS	Fetales bovines Serum / Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	saures Gliafaserprotein
GZMB	GranzymB
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
HSA	Humanalbumin
HSP	Hitzeschockproteine
$h\nu_{\text{abs}}$	Energieabsorption durch Licht
IDH	Isocitratdehydrogenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco Medium

## ANHANG

iPDT	Interstitielle PDT
J	Energie in Joule
KUM	Klinikum der Universität München
Li-Hep	Lithium-Heparin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
m <sup>2</sup> KOF	m <sup>2</sup> Körperoberfläche
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MDSC	Myeloide Suppressorzellen
MGMT	O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MRT	Magnetresonanztomographie
MTIC	5-(3-N-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p-Wert	Signifikanzniveau
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD1 / PD-L1	Programmed cell death protein 1 / ligand
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
PRF	Perforin
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
PS	Photosensibilisators
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion
r-Wert	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
TBP	TATA-Bindeprotein
TBST	Tris-buffered saline with Tween20

## ANHANG

TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TME	Tumormikromilieu
TMZ	Temozolomid
Tregs	Regulatorische T-Zellen
UPL	Universal Probe Library
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
W	Leistung in Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystems
$\mu$ M	Mikromolar

## 7.3 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Die Gliome des Erwachsenen. *Dtsch Arztebl.* 2010;107(45):799-808. doi:10.3238/arztebl.2010.0799
2. Fernandes C, Costa A, Osório L, et al. *Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy.*; 2017. doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11
3. Oberheim Bush NA, Hervey-Jumper SL, Berger MS. Management of Glioblastoma, Present and Future. *World Neurosurg.* 2019;131:328-338. doi:10.1016/j.wneu.2019.07.044
4. Thon N, Tonn JC, Kreth FW. The surgical perspective in precision treatment of diffuse gliomas. *Onco Targets Ther.* 2019;12:1497-1508. doi:10.2147/OTT.S174316
5. Gately L, McLachlan SA, Philip J, Rathi V, Dowling A. Molecular profile of long-term survivors of glioblastoma: A scoping review of the literature. *J Clin Neurosci.* 2019;68:1-8. doi:10.1016/j.jocn.2019.08.017
6. Nguyen HS, Shabani S, Awad AJ, Kaushal M, Doan N. Molecular markers of therapy-resistant glioblastoma and potential strategy to combat resistance. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6). doi:10.3390/ijms19061765
7. Sander C, Reuschel V, Eisenlöffel C, Nestler U, Meixensberger J. Familial glioblastoma clustering in adult patients: a case report of two non-twin siblings and review of the literature. *Int Med Case Rep J.* 2019;Volume 12:205-211. doi:10.2147/imcrj.s201488
8. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol.* 2010;12(1):104-113. doi:10.1093/neuonc/nop011
9. Geraldo LHM, Garcia C, da Fonseca ACC, et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends in Cancer.* 2019;5(1):46-65. doi:10.1016/j.trecan.2018.11.002
10. Schlegel U. et al. Neuroepitheliale Tumoren. In: *Neuroonkologie.* Thieme; 2003:12-14. doi:DOI: 10.1055/b-0034-10684
11. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO open.* 2016;1(6):e000144. doi:10.1136/esmoopen-2016-000144
12. Karl F. Masuhr, Florian Masuhr MN. Hirntumoren. In: *Duale Reihe Neurologie.* Thieme; 2013:307.
13. Blümcke I, Müller S, Buslei R, Riederer BM, Wiestler OD. Microtubule-associated protein-2 immunoreactivity: A useful tool in the differential diagnosis of low-grade neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol.* 2004;108(2):89-96. doi:10.1007/s00401-004-0873-8
14. More S, More S. Expression of MAP2 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164933-SLC25A32/pathology>. Published 2019. Accessed January 3, 2020.
15. Thon N, Kreth S, Kreth F-W. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *Onco Targets Ther.* 2013;6:1363-1372. doi:10.2147/OTT.S50208
16. Kreth S, Thon N, Kreth FW. Epigenetics in human gliomas. *Cancer Lett.* 2014;342(2):185-192. doi:10.1016/j.canlet.2012.04.008
17. Granados AM, Zuñiga N, Ospina C, Merchancano L. Secondary glioblastoma with abdominal metastasis: Case report. *Radiol Case Reports.* 2018;13(2):347-351. doi:10.1016/j.radcr.2018.01.004
18. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(21):2402-

2409. doi:10.1200/JCO.2017.73.0119
19. Kreth FW, Thon N, Simon M, et al. Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. *Ann Oncol.* 2013;24(12):3117-3123. doi:10.1093/annonc/mdt388
  20. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
  21. Diaz R, Sheikh D, Mehreen A, et al. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2017;133(3):455-467. doi:10.1007/s11060-017-2477-x
  22. Wang D, Du Bois RN. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. *Carcinogenesis.* 2015;36(10):1085-1093. doi:10.1093/carcin/bgv123
  23. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv Physiol Educ.* 2013;37(4):273-283. doi:10.1152/advan.00066.2013
  24. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007;13(7):828-835. doi:10.1038/nm1609
  25. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):239-252. doi:10.1038/nri3174
  26. Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):153-161. doi:10.1038/nri2496
  27. Taniguchi K, Karin M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):309-324. doi:10.1038/nri.2017.142
  28. Dunn GP, Fecci PE, Curry WT. Cancer immunoediting in malignant glioma. *Neurosurgery.* 2012;71(2):201-222. doi:10.1227/NEU.0b013e31824f840d
  29. Pellegatta S, Cuppini L, Finocchiaro G. Brain cancer immunoediting: novel examples provided by immunotherapy of malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(11):1759-1774. doi:10.1586/era.11.102
  30. Liu M, Wang X, Wang L, et al. Targeting the IDO1 pathway in cancer: From bench to bedside. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s13045-018-0644-y
  31. Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D, Mulholland P. Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br J Cancer.* 2018;119(10):1171-1181. doi:10.1038/s41416-018-0258-8
  32. Fleming V, Hu X, Weber R, et al. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol.* 2018;9(March):398. doi:10.3389/fimmu.2018.00398
  33. Kleinovink JW, Fransen MF, Löwik CW, Ossendorp F. Photodynamic-Immune Checkpoint Therapy Eradicates Local and Distant Tumors by CD8 + T Cells . *Cancer Immunol Res.* 2017;5(10):832-838. doi:10.1158/2326-6066.cir-17-0055
  34. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci.* 2017;75(4):689-713. doi:10.1007/s00018-017-2686-7
  35. Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/149185
  36. Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *Am J Neuroradiol.* 2010;31(8):1383-1384. doi:10.3174/ajnr.A2170

37. Appel EA, Rowland MJ, Loh XJ, Heywood RM, Watts C, Scherman OA. Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit[n]uril. *Chem Commun.* 2012;48(79):9843. doi:10.1039/c2cc35131e
38. Jain KK. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Front Oncol.* 2018;8(October):1-19. doi:10.3389/fonc.2018.00419
39. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46(1):24-29. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24
40. Moan J PQ. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003;23(5):3591-3600.
41. Dennis E.J.G.J. Dolmans DF and RKJ. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):375-380. doi:10.1038/nrc1070
42. Szeimies R-M. Geschichte der Photodynamischen Therapie. In: *Akt Dermatol.* ; 2005:193-197.
43. Hwang HS, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *J Pharm Investig.* 2018;48(2):143-151. doi:10.1007/s40005-017-0377-x
44. Maeding N, Verwanger T, Krammer B. Boosting tumor-specific immunity using PDT. *Cancers (Basel).* 2016;8(10). doi:10.3390/cancers8100091
45. Abrahamse, Heidi, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2017;176(1):139-148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
46. Silva ZS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Huang Y-Y, Hamblin MR. Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Biosci Rep.* 2015;35(6):e00265-e00265. doi:10.1042/BSR20150188
47. Agostinis P, Berg K, Cengel K a, et al. Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *Am Cancer Soc.* 2011;61:250-281. doi:10.3322/caac.20114. Available
48. Coupienne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(12):1868-1878. doi:10.1039/c1pp05213f
49. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec.* 2017;17(8):775-802. doi:10.1002/tcr.201600121
50. Stepp H, Stummer W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg Med.* 2018;50(5):399-419. doi:10.1002/lsm.22933
51. Mattern R. Häme synthese - Porphyrine. Wikipedia. [https://de.wikipedia.org/wiki/Porphyrine#/media/Datei:Häme\\_synthese.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Porphyrine#/media/Datei:Häme_synthese.svg). Published 2009. Accessed January 18, 2020.
52. Inoue K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int J Urol.* 2017;24(2):97-101. doi:10.1111/iju.13291
53. Marois M, Bravo J, Davis SC, Kanick SC. Characterization and standardization of tissue-simulating protoporphyrin IX optical phantoms. *J Biomed Opt.* 2016;21(3):035003. doi:10.1117/1.jbo.21.3.035003
54. Teixidor P, Arraez MA, Villalba G, et al. Safety and efficacy of 5-aminolevulinic acid for high grade glioma in usual clinical practice: A prospective cohort study. *PLoS One.* 2016;11(2):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0149244
55. Kelty CJ, Brown NJ, Reed MWR, Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1(3):158-168. doi:10.1039/b201027p
56. Lakomkin N, Hadjipanayis CG. Fluorescence-guided surgery for high-grade gliomas. *J*

- Surg Oncol.* 2018;118(2):356-361. doi:10.1002/jso.25154
57. Johansson A, Faber F, Kniebühler G, et al. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med.* 2013;45(4):225-234. doi:10.1002/lsm.22126
  58. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, et al. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med.* 2007;39(5):386-393. doi:10.1002/lsm.20507
  59. Christoph Schwartz, Adrian Ruehm, Joerg-Christian Tonn, Simone Kreth and F-WK. Interstitial Photodynamic Therapy of de-novo glioblastoma multiforme WHO IV. *Neuro Oncol.* 2015;17:2015. doi:10.1093/neuonc/nov235.25
  60. Hirschberg H, Berg K PQ. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(1):9-19. doi:doi:10.20517/2347-8659.2018.31
  61. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey K, Gollnick S. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1839-1848. doi:10.1038/sj.bjc.6603792
  62. Strauß G. Untersuchung der T-Zell-Antwort nach photodynamischer Therapie von Glioblastomen. *Diss - Ludwig-Maximilians-Universität München.* November 2019.
  63. Cell separation strategies using MACS® Technology - Deutschland. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macs-cell-separation/macs-cell-separation-strategies.html>. Published 2019. Accessed November 4, 2019.
  64. Magnetic cell separation - Cell separation - Miltenyi Biotec technologies - MACS Handbook - Resources - Miltenyi Biotec - Deutschland. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macs-handbook/macs-technologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html>. Published 2019. Accessed November 4, 2019.
  65. Helmholtz Zentrum Munich CCG Immune Monitoring Protocol: PBMC Isolation, cryopreservation and thawing. <http://www.helmholtz-muenchen.de/>. Accessed January 12, 2020.
  66. Real-Time PCR. <https://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>. Accessed January 4, 2020.
  67. ELISpot Assay Principle. <https://www.mabtech.com/knowledge-center/assay-principles/elispot-assay-principle>. Accessed January 4, 2020.
  68. -Cellstain-Calcein-AM | Dojindo. <https://www.dojindo.com/store/p/160-Cellstain-Calcein-AM.html>. Accessed January 4, 2020.
  69. Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>. Accessed January 4, 2020.
  70. Tykocki T, Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J Clin Neurosci.* 2018;54:7-13. doi:10.1016/j.jocn.2018.05.002
  71. Adeberg S, Bostel T, König L, Welzel T, Debus J, Combs SE. A comparison of long-term survivors and short-term survivors with glioblastoma, subventricular zone involvement: A predictive factor for survival? *Radiat Oncol.* 2014;9(1):1-6. doi:10.1186/1748-717X-9-95
  72. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, et al. Long-term survivors of glioblastoma: Clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien).* 2009;151(11):1349-1358.

- doi:10.1007/s00701-009-0387-1
73. Dos Santos AF, De Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat.* 2019;2019. doi:10.20517/2394-4722.2018.83
  74. Donlon S, Mang TS, LaViolette PS, et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(3):530-544. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.04.009
  75. Bechet D, Mordon SR, Guillemin F, Barberi-Heyob MA. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(2):229-241. doi:10.1016/j.ctrv.2012.07.004
  76. Stummer W, Beck T, Beyer W, et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: Case report. *J Neurooncol.* 2008;87(1):103-109. doi:10.1007/s11060-007-9497-x
  77. Kleinovink JW, Van Driel PB, Snoeks TJ, et al. Combination of photodynamic therapy and specific immunotherapy efficiently eradicates established tumors. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1459-1468. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0515
  78. Gollnick SO. Photodynamic Therapy and Antitumor Immunity. *J Natl Compr Canc Netw.* 2012;10:40-43.
  79. Brackett CM, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(5):649-652. doi:10.1039/c0pp00354a
  80. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1-13. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.004
  81. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8509-8521. doi:10.1002/jcp.27782
  82. Brennan AJ, Chia J, Trapani JA, Voskoboinik I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):607-615. doi:10.1038/cdd.2009.212
  83. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015;21(22):5047-5056. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0685
  84. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: An important player in immune response. *Cent Eur J Immunol.* 2014;39(1):109-115. doi:10.5114/ceji.2014.42135
  85. Krepela E RI. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *Int J Oncol.* 2010;37(6). doi:10.3892/ijo\_00000788
  86. Street SEA, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001;97(1):192-197. doi:10.1182/blood.V97.1.192
  87. Van Den Broek MF, Kägi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):1781-1790. doi:10.1084/jem.184.5.1781
  88. Ivashkiv LB. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(9):545-558. doi:10.1038/s41577-018-0029-z
  89. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol.* 2018;9(MAY):1-19. doi:10.3389/fimmu.2018.00847
  90. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The dark side of IFN- $\gamma$ : Its role in promoting cancer

- immuno-evasion. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1). doi:10.3390/ijms19010089
91. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2836. doi:10.1038/cddis.2017.67
  92. Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J Interf Cytokine Res.* 2019;39(1):30-38. doi:10.1089/jir.2018.0087
  93. Jiang X, Wang J, Deng X, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer.* 2019;18(1):10. doi:10.1186/s12943-018-0928-4
  94. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, et al. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2016;18(2):195-205. doi:10.1093/neuonc/nov172
  95. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle.* 2009;8(12):1930-1934. doi:10.4161/cc.8.12.8745
  96. Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007;130(10):2596-2606. doi:10.1093/brain/awm204
  97. Disis ML, Dela Rosa C, Goodell V, et al. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *J Immunol Methods.* 2006;308(1-2):13-18. doi:10.1016/j.jim.2005.09.011
  98. Maecker HT, Moon J, Bhatia S, et al. Impact of cryopreservation on tetramer, cytokine flow cytometry, and ELISPOT. *BMC Immunol.* 2005;6. doi:10.1186/1471-2172-6-17
  99. Owen RE, Sinclair E, Emu B, et al. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J Immunol Methods.* 2007;326(1-2):93-115. doi:10.1016/j.jim.2007.07.012
  100. Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):88-93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551763>. Accessed January 12, 2020.
  101. Mata MM, Mahmood F, Sowell RT, Baum LL. Effects of cryopreservation on effector cells for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) cell activity in 51Cr-release and CD107a assays. *J Immunol Methods.* 2014;406:1-9. doi:10.1016/j.jim.2014.01.017
  102. Kutscher S, Dembek CJ, Deckert S, et al. Overnight Resting of PBMC Changes Functional Signatures of Antigen Specific T- Cell Responses: Impact for Immune Monitoring within Clinical Trials. *PLoS One.* 2013;8(10):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0076215
  103. Gollnick SO, Vaughan L, Henderson BW. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2002;62(6):1604-1608.
  104. Etminan N, Peters C, Lakbir D, et al. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. *Br J Cancer.* 2011;105(7):961-969. doi:10.1038/bjc.2011.327

## 7.4 PUBLIKATIONEN

### **Posterpräsentation**

2015 Society for NeuroOncology Annual Meeting, San Antonio, TX (USA)

Max Hübner, Gabriele Strauss, **David Effinger**, Heike Pohla, Friedrich-Wilhelm Kreth, and Simone Kreth; PDT-Treated GBM Cells Increase Effectorfunctions of Human CD8+ T-Cells *Neuro-Oncology*, Volume 17, Issue suppl\_5, 1 November 2015, Page v116,

<https://doi.org/10.1093/neuonc/nov217.15>

Published: 09 November 2015

## 7.5 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus der  
Photodynamischen Therapie bei der Behandlung von Glioblastomen“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.01.2020

**Ort, Datum**

David Effinger

**Unterschrift**

## 7.6 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe der letzten Jahre bei der Erstellung der Dissertation begleitet haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt dabei zunächst meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Dr. med. Simone Kreth. In vielen fachlichen, aber auch persönlichen Gesprächen hatte sie stets ein offenes Ohr und stand helfend, beratend und motivierend zur Seite. Mit ihrem leidenschaftlichen Interesse für die Wissenschaft hat sie mich auch weit über die Dissertation hinaus für die Forschung begeistern können.

Herrn Prof. Dr. med. Friedrich-Wilhelm Kreth und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Thon danke ich für die hervorragende Kooperation und die Bereitstellung der Patientenproben, die die Basis eines Großteils dieser Arbeit bilden.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler für die Freistellung zur Durchführung der Forschungsprojekte.

Ich empfinde es als großen Luxus nicht nur mit Kollegen, sondern mit Freunden zusammenarbeiten zu dürfen. Daher gilt Gabriele Strauß, Gabriele Gröger, Gudrun Prangenberg, Jessica Drexler, Max Hübner und dem ganzen Team der Arbeitsgruppe ein großes Dankeschön. Die tolle Atmosphäre hat die Grundlage für eine wunderbare und produktive Zusammenarbeit geschaffen.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Kollegen im LIFE-Zentrum der LMU für die geduldige Unterstützung bei technischen Fragen bedanken.

Der letzte Dank gilt meinen Eltern und Matthias Moosburger. Mit ihrer uneingeschränkten Unterstützung, ihrem Rückhalt und ihrer Geduld, insbesondere in stressigen Zeiten, waren sie stets eine große Stütze.