

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie  
(Direktion: Prof. Dr. Claudia Baldus)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## **Generierung von dendritischen Zellen bei Patienten mit einem Multiplen Myelom**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
JASMIN REISCHUK, geb. Catalcali  
aus Heidelberg

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Roland Repp, 2. Medizinische Klinik Städtisches Krankenhaus Kiel

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Daniela Wesch, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.10.2021

gez.: PD. Dr. med. Martin Neumann

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

---

# Inhaltsverzeichnis

I

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1.  EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Prinzipien der zellulären Immuntherapie.....	1
1.2. Dendritische Zellen.....	2
1.3. Reifung von dendritischen Zellen und Antigenpräsentation.....	3
1.4. Das Multiple Myelom.....	5
1.4.1. Diagnose des Multiplen Myeloms.....	6
1.4.2. Therapie des Multiplen Myeloms.....	8
1.5. HM1.24 als therapeutisches Zielantigen.....	9
1.6. Ziel der Arbeit.....	10
<b>2.  MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
2.1. Reagenzien, Zellkulturen und Zytokine.....	11
2.2. Patienten und Probanden.....	13
2.3. Gewinnung von Monozyten aus peripherem venösen Vollblut.....	15
2.3.1. Adhärenzmethode.....	15
2.3.2. Monozytenapherese und Elutration.....	15
2.3.3. Aufreinigung durch „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS).....	16
2.4. Herstellung unreifer dendritischer Zellen.....	16
2.5. Kryokonservierung von Lymphozyten und unreifen dendritischen Zellen.....	16
2.6. Maturation der dendritischen Zellen.....	17
2.6.1. Reifung der dendritischen Zellen.....	17
2.6.2. Durchflusszytometrische Untersuchung zur Charakterisierung des Reifegrades und der Vitalität dendritischer Zellen.....	17
2.7. Antigenbeladung dendritischer Zellen.....	18
2.7.1. In vitro-Synthese von 5'-Cap mRNA für HM1.24.....	18
2.7.2. Elektrotransfektion.....	19
2.7.3. Peptidbeladung der dendritischen Zellen.....	20
2.8. Interferon- $\gamma$ -Sekretionstests (Capture Assay).....	21
<b>3.  ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
3.1. Voruntersuchungen am Blut gesunder Probanden.....	23
3.1.1. Isolation von Monozyten.....	23

---

3.1.1.1. Monozytenisolation durch Adhärenzmethode.....	24
3.1.1.2. Monozytenisolation durch CD14 Positivselektion.....	26
3.1.1.3. Monozytenisolation durch Monozytenapherese.....	28
3.1.2. Generierung unreifer dendritischer Zellen.....	29
3.1.3. Generierung reifer dendritischer Zellen.....	30
3.1.4. Antigenbeladung durch Elektrotransfektion.....	32
3.2. Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom...	34
3.3. Stimulation von Lymphozyten: Interferon- $\gamma$ -Freisetzung.....	36
3.3.1. Stimulation mit pp65-beladenen dendritischen Zellen.....	36
3.3.2. Stimulation mit HM1.24-transfizierten dendritischen Zellen.....	38
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>41</b>
4.1. Herstellung von dendritischen Zellen.....	41
4.1.1. Wahl der Zytokine für die Ausreifung.....	41
4.1.2. Wahl der Monozytenpräparation.....	42
4.1.3. Einfluss des Plastikmaterials auf die Reifung.....	43
4.1.4. Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom.....	43
4.2. Antigenbeladung der dendritischen Zellen.....	44
4.3. Funktionalität der dendritischen Zellen.....	45
4.4. Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom.....	46
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>48</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>50</b>
<b>7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNG.....</b>	<b>59</b>
<b>8. DANKSAGUNG.....</b>	<b>60</b>
<b>9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>61</b>
<b>10. ANHANG.....</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D (Zellfarbstoff, der tote Zellen markiert)
BST	engl. bone marrow stromal antigen
BWS	Brustwirbelsäule
CAR-T	Chimäre Antigenrezeptor T-Zellen, engl. chimeric antigen receptor T-cell)
CD	engl. cluster of differentiation
CRAB	Akronym für Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie, Knochenläsion engl. hyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesion
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxische T-Zelle, engl. cytotoxic T-lymphocyte
DC	Dendritische Zellen
Dex	Dexamethason
eGFP	Verstärkt exprimiertes GFP, engl. enhanced GFP
ECD	Electron Coupled Dye
FACS	Durchflusszytometrie, engl. fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum, engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, engl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GMP	engl. Good Manufacturing Practice, gute Herstellungspraxis
IU	Internationale Einheit, engl. International Unit
ID	Idarubicin und Dexamethason
IEV	Ifosfamid, Epirubicin und Vepesid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid

LWS	Lendenwirbelsäule
m	männlich
MACS	engl. Magnetic Activated Cell Sorting
MEL	Melphalan
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
Min	Minute
mol	Molar
MRI/MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl. Messenger RNA
ms	Millisekunde
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Mononukleäre Zelle aus dem peripheren Blut, engl. peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, engl. phosphate buffered saline
PBSCT	Periphere Blutstammzelltransplantation, engl. peripheral blood stem cell transplantation
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
p.o.	per os, (orale Gabe)
Poly-(I:C)	Polyinosin:Polycytosin-Säure
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. revolutions per minute
R-ISS	Revised International Staging System
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SLiM	Akronym für Sixty, Light chain und MRI
TNF	Tumornekrosefaktor
VAD	Vincristin, Adriamycin, Dexamethason
VID	Vincristin, Idarubicin und Dexamethason
w	weiblich

# 1. Einleitung

## 1.1. Prinzipien der zellulären Immuntherapie

Neben der Chemotherapie, Operation und Strahlentherapie ist die Immuntherapie eine vierte Säule der Behandlung maligner Erkrankungen. Klinisch hat sich dabei insbesondere der Einsatz von Checkpointinhibitoren sehr bewährt, die über eine Blockade hemmender Signale zur Reaktivierung von Tumor-gerichteten T-Lymphozyten führen können [1]. Voraussetzung ist, dass ein Tumor vom spezifischen Immunsystem als fremd erkannt wird. Dies geschieht über den T-Zell-Rezeptor, der auf der Membran von Tumorzellen Peptide erkennen kann, die an MHC-Klasse I bzw II gebunden sind. Zytotoxische T-Zellen, die in der Regel CD8 positiv sind, erkennen dabei MHC-Klasse I gebundene Peptide, T-Helferzellen (CD4 positiv) erkennen MHC Moleküle der Klasse II. Zur Aktivierung der T-Zellen ist neben der Bindung über den T-Zell Rezeptor ein kostimulatorisches Signal notwendig[2]. Dies kann z.B. über die Stimulation von CD28 nach Bindung von CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) erreicht werden. Fehlt ein kostimulatorisches Signal oder wird ein negatives Signal vermittelt, kam es zur Auslösung einer Immuntoleranz kommen. Bei erfolgreicher Stimulierung von zytotoxischen T-Zellen kann es zum direkten Zelltod der Tumorzellen über eine Freisetzung von Perforinen und Granzymen kommen.

Ein Tumor kann unter dem Druck des Immunsystems im Sinne eines Immunoeditings Strategien entwickeln, um einer spezifischen T-Zell Antwort zu entgehen (Escape) [1]. Neben einer Reaktivierung von T-Zellen in vivo durch Checkpointinhibitoren können auch Tumor-infiltrierende Lymphozyten ex-vivo stimuliert und vermehrt werden und dann im Sinne einer adoptiven Zelltherapie verabreicht werden. Die ex-vivo Stimulation kann zum Beispiel über Antigen-präsentierende Zellen erreicht werden, die bestimmte Epitope von tumorspezifischen Antigenen präsentieren. Eine weitere Möglichkeit zur Generierung einer Immunantwort ist die Vakzinierung. Hierzu können sowohl Proteine als auch Peptide sowie komplette Tumorzellen verwendet werden [3]. Des Weiteren ist auch die Applikation kodierender Sequenzen in Form von DNA oder RNA Vakzinen möglich. Um die Präsentation von Tumorzellantigenen zu verstärken ist auch eine Vakzinierung mit entsprechend antigenbeladenen dendritischen Zellen möglich [4].

## 1.2. Dendritische Zellen

Bei einer Immunreaktion werden zunächst fremde Antigene, wie zum Beispiel mutierte Proteine von Tumorzellen, von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und nach einer Spaltung in kleinere Peptide im Proteasom der Zelle auf der Oberfläche zusammen mit MHC Klasse I oder II Molekülen präsentiert. Dendritische Zellen (DC) haben sich auf die Präsentation von Antigenen spezialisiert. Erstmals beschrieben wurden sie 1973 von Steinmann und Cohen, die die Zellen in der Milz von Mäusen extrahieren konnten [5]. Die Präsentation von Antigenen kann sowohl eine Toleranz als auch eine starke Immunantwort auslösen [6]. Es gibt vier verschiedene Arten von DC [7].

So werden unterschieden:

- myeloische DC,
- plasmacytoide DC,
- aus Monozyten gereifte DC,
- und Langerhanszellen.

Myeloische DC exprimieren die Antigene CD11b, CD11c, CD13, CD33 und CD172 und CD45RO. Sie werden in CD1c<sup>+</sup> DC und CD141<sup>+</sup> DC unterschieden [7, 8]. Diese beiden Zelltypen werden außerdem durch die unterschiedliche Expression von dendritischen Zellantigenen (BDCA, engl. blood dendritic cell antigen) charakterisiert. So exprimieren CD1c<sup>+</sup> Zellen das BDCA1 und CD141<sup>+</sup> Zellen das BDCA3 [9]. Die CD1c<sup>+</sup> Zellen machen nach Collin et al. den größten Teil der DC aus. Die myeloischen DC entstehen wie die plasmacytoiden DC im Knochenmark [10] Die plasmacytoiden DC befinden sich vor allem in Lymphknoten und im Blut. Die myeloischen DC finden sich in Lymphknoten, sowie lymphoiden Organen wie Tonsillen, Milz und dem Knochenmark, aber auch in nicht lymphoiden Geweben wie Lunge, Haut, Darm und Leber [11]. Die plasmacytoiden DC haben keine typischen myeloischen Antigene. Sie zirkulieren im lymphoiden System und produzieren Interferon-I [12]. Die Funktion dieser Zellen liegt in der Abwehr von Viren. Ihnen wird zudem eine Überaktivität bei Autoimmunerkrankungen zugewiesen [13]. Langerhanszellen bilden eine besondere Art der DC und kommen in der Haut vor. Sie machen etwa 1-2% der Hautzellen aus und entstammen ebenfalls dem Knochenmark [14]. Sie sind hauptverantwortlich für die immunologischen Antworten in der Haut, da sie besonders CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren können [15]. Die für diese Arbeit besonders wichtige Sorte von DC ist die Zelle, die sich aus unspezifischen Monozyten durch die Stimulation mit Zytokinen



entwickelt. Die Methode, dass aus Monozyten DC entstehen können, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [16, 17]. Monozyten befinden sich zu jedem Zeitpunkt im Blut und können in jedes Gewebe einwandern. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten bei Infektionen in das infizierte Areal einwandern [18]. Diese CD14<sup>+</sup> Monozyten konnten auch in erhöhter Zahl bei Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden [19].

### **1.3. Reifung von dendritischen Zellen und Antigenpräsentation**

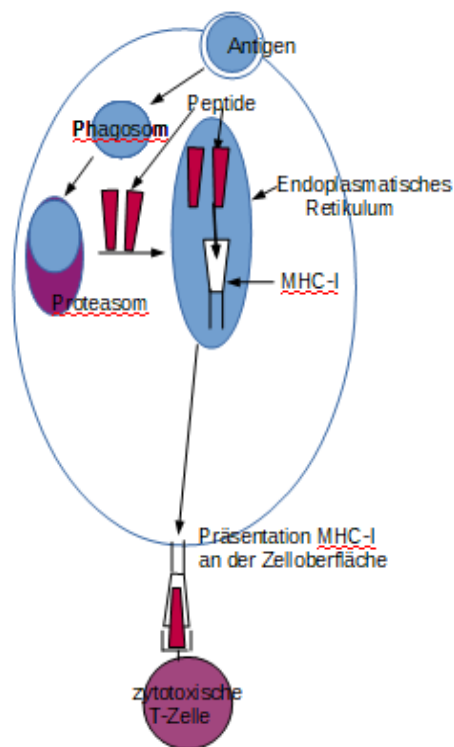
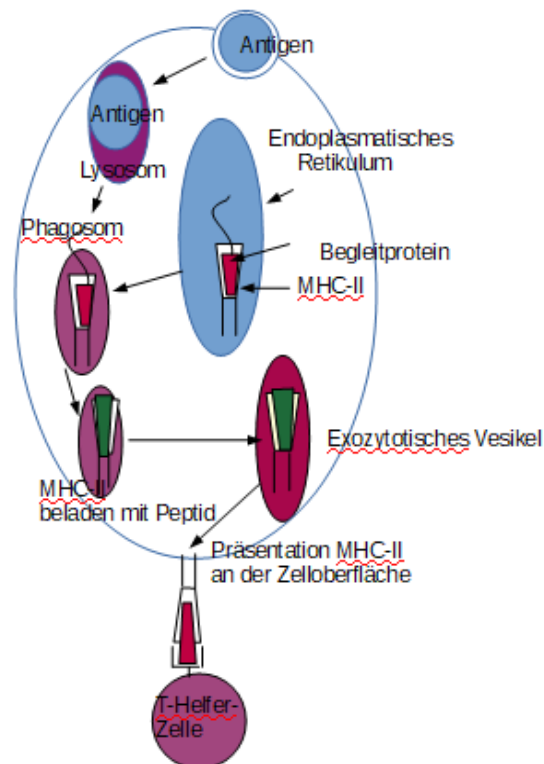
Die Generierung von DC aus Monozyten wird *in vitro* genutzt, da weniger als 1% der Zellen im Blut dendritische Zellen sind. Im peripheren venösen Vollblut liegt der Anteil an Monozyten zwischen 5% und 12% der mononukleären Zellen. Daher ist die Möglichkeit der Separation von Monozyten aus dem peripher venösen Vollblut und deren Ausreifung deutlich einfacher als die Generierung von DC aus dem peripher venösen Vollblut. Den Monozyten werden die Zytokine IL-4 und GM-CSF zugesetzt, und dadurch differenzieren sie zu unreifen DC heran. Die unreifen DC verlieren den Oberflächenmarker CD14. Sie exprimieren andere Oberflächenmarker wie CD80, CD83 und CD86 und können Antigene aufnehmen und prozessieren. Die Aufnahme der Antigene ist für die immunologische Aktivierung der T-Lymphozyten notwendig. Die immunologische Aktivierung der T-Lymphozyten ist höher, wenn es sich um reife dendritische Zellen handelt [20]. Die DC entwickeln in ihrer Maturation die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86, welche notwendig sind zur Kostimulation von T-Zellen. Die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 werden auch als B7-1 und B7-2 bezeichnet [21]. Unreife DC haben häufig noch nicht das Oberflächenmolekül CD83 [22].

Durch Bindung von CD80 und CD86 an CD28 auf T-Lymphozyten erfolgt eine Stimulation der T-Lymphozyten. Sind die T-Lymphozyten aktiviert, exprimieren sie das Oberflächenmolekül CD152 (CTLA-4). Dieses Oberflächenmolekül kann ebenfalls die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 binden und vermittelt allerdings ein negatives Signal in die Zelle, die hierüber supprimiert wird [23]. Durch diesen Regelmechanismus wird eine überschießende Immunantwort verhindert.

Die Antigenpräsentation geschieht über Moleküle der MHC-Klasse-I oder der MHC-Klasse-II. Dabei ist sowohl die Expression der MHC-Moleküle als auch die Verarbeitung des Antigens unterschiedlich. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Diese Oberflächenmoleküle haben eine Bindungsgrube, in der Peptide gebunden werden können. Die Peptide sind in der Regel Bruchstücke endogener Antigene wie

bakterielle und virale Proteine oder Tumorantigene. Um auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert zu werden, muss das Antigen von der Zelle aufgenommen werden. Es wird durch das Proteasom gespalten, im endoplasmatischen Retikulum an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und auf der Oberfläche präsentiert. Durch diese Präsentation kommt es zur Aktivierung von zytotoxischen-T-Zellen (Abbildung 1A) [24].

MHC-Klasse-II-Moleküle werden von allen antigenpräsentierenden Zellen wie DC, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Auf MHC-Klasse-II-Molekülen werden exogene Antigene präsentiert. Die Präsentation auf einem MHC-Klasse-II-Molekül erfolgt ebenfalls durch Aufnahme des Antigens. Dieses wird dann im Lysosom in ein Peptidfragment gespalten. Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden im rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und an ein Begleitprotein gebunden, damit es zu keiner Bindung im endoplasmatischen Retikulum kommt. Der gesamte Komplex wird dann in das Phagosom transportiert und das Begleitprotein wird entfernt. Nun kommt es zu einer Bindung des Peptids an das MHC-Klasse-II-Molekül und als exozytotisches Vesikel zur Präsentation auf der Zelloberfläche. Die MHC-Klasse-II-Rezeptoren führen zu einer Stimulation von T-Helfer-Zellen (Abbildung 1B) [25].

**A****B**

**Abb. 1: Darstellung der Antigenaufnahme in die Zelle.**

(A) Antigenaufnahme, Bildung des Phagosoms und Transport zum Proteasom. Aufspaltung des Antigens zu Peptiden und Transport in das endoplasmatische Retikulum. Bindung an ein MHC-Klasse-I Protein und Transport an die Zelloberfläche und Präsentation des Peptids an der Oberfläche.

(B) Antigenaufnahme und Transport ins Lysosom. Dort wird das Antigen aufgespalten und ein Peptid wird in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Es erfolgt die Bindung an ein MHC-Klasse-II-Molekül und zusätzlich erfolgt eine Kopplung an ein Bindungsprotein. Im Phagosom wird das Bindungsprotein entfernt und das MHC-Klasse-II-Molekül wird an die Membran transportiert.

Die DC können gleichzeitig T-Helfer-Zellen und Supressorzellen aktivieren. Die DC sind auch der Kreuzpräsentation fähig. Das bedeutet, dass DC auch endogene Peptide auf MHC-Klasse II-Molekülen präsentieren können und exogene Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen [26].

## 1.4. Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung der terminal differenzierten B-Zelle [27]. Die Erkrankung zeichnet sich dadurch aus, dass es zu einer Ansammlung von monoklonalen Plasmazellen meist im Knochenmark kommt, die ein identisches Immunglobulin produzieren, in der Regel vom Typ IgG oder IgA. Diese neoplastischen Immunglobuline werden auch

Paraprotein genannt. Werden von den Immunglobulinen nur Leichtketten gebildet nennt man diese Bence-Jones-Proteine. Es gibt allerdings auch seltene Fälle, in denen es zu keiner Sekretion eines Paraproteins kommt (<3%) [27]. Das Paraprotein hat keine Funktion und im Gegensatz zu den Immunglobulinen wird die Sekretion nicht reguliert. Die Plasmazellen verdrängen die normale Hämatopoese im Knochenmark. In der Regel tritt die Erkrankung systemisch auf, Ausnahme bildet das solitäre Plasmozytom [28]. In Deutschland beträgt die Gesamtinzidenz ca. 6-8/100000 Einwohner. Es erkranken in Deutschland etwa 7000 Personen pro Jahr, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen [29]. Das mediane Erkrankungsalter beträgt bei Männern 72 Jahre und bei Frauen 74 Jahre. Die Ätiologie der Entstehung ist bislang nicht geklärt [30]. Das asymptomatische oder schwelende Myelom (engl. smoldering myeloma) ist eine Vorstufe des Multiplen Myeloms. Es zeigt sich ein Paraprotein von  $\geq 30\text{g/l}$  und 10-60% klonale Plasmazellen im Knochenmark. Darüber hinaus bestehen keine Endorganschäden und es liegen keine CRAB-Kriterien vor [31]. Das Risiko eines Progresses zu einem Multiplen Myelom ist hoch [32].

#### 1.4.1. Diagnose des Multiplen Myeloms

Die Diagnose des Multiplen Myeloms ist gesichert, wenn eine klonale Plasmazellpopulation vorliegt und eines oder mehr der CRAB-Kriterien (Tabelle 1) oder SLiM-Kriterien erfüllt sind (Tabelle 2) [30]. Die CRAB-Kriterien sind ein Akronym, das für Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen steht (engl. HyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesion). Sie werden bei der Diagnose einer monoklonalen Gammopathie erhoben und können über Progress und Schweregrad Aufschluss geben. Die SLiM-Kriterien sind ein Akronym für Sixty, Light chain und MRI.

**Tabelle 1: Die CRAB-Kriterien** [32]. Sie enthalten die Laborwerte für Kalzium, Nierenfunktion und Hämoglobin. Zusätzlich werden osteolytische Knochenläsionen mit bestimmt.

Hyperkalzämie	Kalzium > 2,75 mmol/l
Anämie	Hämoglobin < 10,0 g/dl
Niereninsuffizienz	Kreatinin > 2,0 mg/dl
Osteolysen oder Osteoporose mit Kompressionsfraktur	

**Tabelle 2: Die SLiM-Kriterien** [32]. Die SLiM-Kriterien sind eine Erweiterung der CRAB-Kriterien und kündigtigen Organschäden an.

Sixty	$\geq 60\%$ monoklonale Plasmazellen im Knochenmark
Light chain	Quotient der betroffenen Leichtketten zu nicht betroffenen Leichtketten $\geq 100$
MRI	$< 1$ fokale Läsion die $< 5\text{mm}$ im Ganzkörper-MRT ist

Um eine Diagnose des Multiplen Myeloms zu stellen sind somit - neben der Anamnese und der körperlichen Untersuchung - eine Blutentnahme, eine Knochenmarkpunktion, eine Urinprobe, sowie eine bildgebende Untersuchung wie MRT oder CT notwendig. Durch diese Untersuchungen werden auch MGUS und das schwelende Myelom unterschieden. Klinisch bestehen bei den Patienten häufig eine Anämie mit Leistungsminderung durch die Knochenmarksinfiltration, eine Infektneigung durch den sekundären Antikörpermangel, sowie eine Nierenfunktionsstörung und/oder Knochenschmerzen [30]. Durch das Paraprotein, das klein genug ist die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können, werden die Nierentubuli undurchlässig und geschädigt. Osteolysen führen zu Knochenschmerzen und beim Fortschreiten zu pathologische Frakturen. Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms erfolgt gemäß des revidierten Einteilungssystems (engl. Revised International Staging System, R-ISS) aus dem Jahr 2005 [33]. Diese Einteilung wurde 2015 um die Kriterien Lactatdehydrogenase (LDH) und zytogenetische Abberation erweitert (Tabelle 3) [34]. Diese Einteilung hat die zuvor bestehende Einteilung nach Salmon und Durie aus dem Jahr 1975 abgelöst [35].

**Tabelle 3: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach R-ISS** [32].

Stadium	Kriterien
I	Serum- $\beta 2$ -Mikroglobulin $\leq 3,5 \text{ mg/l}$ <b>und</b> Serumalbumin $\geq 3,5 \text{ g/dl}$ <b>und</b> Zytogenetik Standardrisiko <b>und</b> LDH $\leq$ oberer Normwert
II	weder Stadium I noch Stadium III
III	Serum- $\beta 2$ -Mikroglobulin $\geq 5,5 \text{ mg/l}$ <b>und</b> entweder Zytogenetik Hochrisiko <b>oder</b> LDH $>$ oberer Normwert

## 1.4.2 Therapie des Multiplen Myeloms

Die Therapie des Multiplen Myeloms ist abhängig vom Alter und dem gesundheitlichen Zustand des Patienten. Durch Veränderungen im Therapieregime und einer Vielzahl neuer Chemotherapeutika, die in den letzten Jahren zugelassen wurden, konnte die Überlebenszeit deutlich verlängert werden [36]. So hat sich die Überlebenszeit von 4-5 Jahren um die Jahrtausendwende auf inzwischen 8-10 Jahre verdoppelt [37]. Patienten ohne CRAB- und SliM-Kriterien werden engmaschig beobachtet und erhalten zunächst keine Chemotherapie, da dies zu keiner Besserung der Prognose führt. Die Therapie mit den verschiedenen Substanzen ist neben der Stadieneinteilung auch von der Eignung des Patienten für eine Hochdosistherapie abhängig. Die Hochdosistherapie beinhaltet eine Chemotherapie mit Melphalan (140-200 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche) mit anschließender Stammzelltransplantation [32]. Bei dieser Therapie kommt es zu einer Phase der Myelosuppression. Die Chemotherapie wird in eine Induktion, autologe Transplantation und Erhaltungstherapie eingeteilt. Die Induktionstherapie erfolgt in der Regel zunächst mit einer Kombinationstherapie. Derzeit werden für die Erstlinienherapie folgende Kombinationen empfohlen:

- Bortezomib/Lenalidomid/Dexamethason (VRD),
- Bortezomib/Thalidomid/Dexamethason (VTD),
- Bortezomib/Cyclophosphamid/Dexamethason (VCD),
- Bortezomib/Dexamethason.

Patienten, die sich für eine Hochdosistherapie eignen, erhalten in der Regel zunächst die Induktionstherapie mit einer der o.g. Substanzkombinationen. Die Entnahme der Stammzellen sollte innerhalb von 6 Wochen nach dem Ende der Induktionstherapie erfolgen und die autologe Stammzelltransplantation sollte zeitnah zur Sammlung der Zellen erfolgen [32]. Die autologe Stammzelltransplantation beinhaltet die Übertragung eigener Stammzellen des Patienten. Die autologe Stammzelltransplantation kann einmal oder zweimal (im Sinne einer Tandemtransplantation) erfolgen. Die zweimalige autologe Transplantation ist für Patienten im R-ISS Stadium III, sowie einer genetischen Hochrisikokonstellation oder für Patienten, die keine komplette Remission erreichen [38]. Patienten mit einer oder mehreren Osteolysen erhalten zusätzlich Bisphosphonate oder eine Therapie mit dem anti-RANKL-Antikörper Denusomab [32].

Patienten, die nicht für eine Hochdosistherapie geeignet sind erhalten z.T. Eine andere Kombinationstherapie, in der Regel eine Kombination aus Lenalidomid und Dexamethason.

Eine Kombination mit immunmodulierenden Substanzen, monoklonalen Antikörpern und Proteasominhibitoren ist ebenfalls möglich, insbesondere auch in der Zweitlinientherapie [32]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Behandlung des Multiplen Myeloms ist die allogene Stammzelltransplantation. Dabei ist ein Transplantat-gegen-Myelom-Effekt beschrieben worden. Die allogene Stammzelltransplantation hat eine hohe therapiebedingte Mortalitätsrate von 10-15% und wird im Rahmen von Studien untersucht [31]. Trotz der aufwendigen Therapien und der Verlängerung der Überlebenszeiten zeigt sich immer ein protrazierter Verlauf [39]. Dadurch wird deutlich, dass andere Therapieansätze nötig sind, um das Überleben zu verbessern oder gar eine Heilung anzustreben. Ein innovativer Therapieansatz ist die Immuntherapie, die sowohl Mikrometastasen als auch minimale Resterkrankungen bekämpft. Diese Therapieansätze bestehen aus der Gabe von Antikörpern als auch die sog. CAR-T-Zell-Therapie, CAR steht dabei für chimärer Antigenrezeptor. Bei der CAR-T-Zell-Therapie handelt es sich um genetisch modifizierte T-Zellen. Die körpereigenen T-Zellen werden in vitro mit chimären Antigenrezeptoren ausgestattet. Dies erfolgt durch Transfektion mit viralen Vektoren, die Information wird in das Genom der T-Zellen inseriert. [40] Diese Gentransfektion macht die T-Zellen vom HLA-Typ und von der Immuntoleranz des Patienten unabhängig [41]. Die Zellen werden in vitro vermehrt und können eingefroren und zum passenden Zeitpunkt dem Patienten transfundiert werden [41]. Bislang sind in Europa zwei Medikamente zugelassen. Bei der Therapie des Multiplen Myeloms befinden sich CAR-T-Zellen gegen das B-Zell-Reifungsantigen (BCMA) in Testung. Die bisherigen Ergebnisse zeigen gute Ansprechraten auf die Therapie [42].

## **1.5. HM1.24 als therapeutisches Zielantigen**

Das HM1.24-Antigen ist ein Oberflächenmolekül, das u.a. auf Plasmazellen exprimiert wird. Es wird auch als Tetherin oder BST-2 bezeichnet und wurde dem CD317 zugeordnet. Es ist ein Typ II-Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 30-36 kDa [43].

HM1.24 wird auf Myelozyten, B- und T-Zellen, aber auch auf Epithelzellen und Zellen in der Lunge, am Herzen und in der Milz sowie auf Blutgefäßen exprimiert [44]. Maligne Plasmazellen von Patienten mit MM zeigen eine Überexpression von HM1.24 im Vergleich zu nichtmalignen Plasmazellen [43].

Dem HM1.24-Transmembranprotein wird eine Interaktion bei der Abwehr von Viren zugeschrieben. Die genauen Interaktionswege sind jedoch noch unklar [43].

Die Nutzung des HM1.24-Proteins als Zielantigen erscheint für die Immuntherapie sinnvoll, da es auf Myelomzellen überexprimiert wird. Eine suffiziente Immuntherapie würde somit zu einer Zerstörung der Myelomzellen führen. Es könnte aber auch zur Zerstörung der Zellen in der Lunge, Herzen, Milz und den Gefäßen kommen und damit zu ungewollten Nebenwirkungen. Eine Untersuchung an Myelom-Xenograftmodellen konnte zeigen, dass die Gabe von HM1.24-spezifischen Antikörpern in einem großen Teil der Mäuse die Krankheit nicht ausbrechen lässt, und diese Mäuse sich am Ende des Kontrollzeitraums von 180 Tagen keinen Tumor ausbildeten [45].

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Die Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit war zu untersuchen, ob und in welcher Form bei Patienten mit einem Multiplen Myelom eine Ausreifung dendritischer Zellen *in vitro* erreicht werden kann. Zunächst sollten die grundlegenden Kulturbedingungen an den Monozyten gesunder Probanden evaluiert werden, die zur Ausreifung und Expression DC-spezifischer Oberflächenmarker führen. Anschließend sollten Zellen aus dem Blut von Myelompatienten herangezogen werden. Im zweiten Schritt sollte getestet werden, ob eine Elektrotransfektion der dendritischen Zellen mit RNA von HM1.24, einem auf der Oberfläche von malignen Plasmazellen exprimierten Antigen, zu einer T-Zellstimulation führt. Dies könnte für die Therapie von Patienten mit Multiplem Myelom im Sinne einer Vakzinierung mit dendritischen Zellen ein neuer immunologischer Ansatz sein.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Reagenzien, Zellkulturmedien und Zytokine

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Zellkulturmedien und Zytokine.

Name	Hersteller
<b>Reagenzien und Lösungen</b>	
Cell Line Nucleofector Solution	Lonza, Basel, CH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Wack Chemie, Steinbach, DE
Ficoll-Paque-Lösung	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE
Gentamycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Humanalbumin	R&D Systems, Wiesbaden, DE
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Staphylokokken Enterotoxin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau 0,4 %	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
7-AAD	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
<b>Zellkulturmedien</b>	
Humanes AB Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cell Gro®-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Fötale Kälberserum (FCS)	Perbio Science, Erembodegem, BE
Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MEM, nichtessentielle Aminosäuren	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Opti-MEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Penicillin und Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
<b>Zytokine</b>	
humaner GM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden, DE
humanes IL-1 $\beta$ , rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden, DE
humanes IL-4, rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden, DE
humanes IL-6, rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden, DE
humanes PGE <sub>2</sub> , rekombinant	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
humaner TNF- $\alpha$ , rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden, DE

**Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte.**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Amaxa Nucleofector Device	Lonza, Basel, CH
Auto-MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
CO <sub>2</sub> -Brutschrank, HERAcell240	Kendro, Langenselbold, DE
Durchflußzytometer Cytomics FC500	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
Easyject Plus-Einheit	PEQLAB Biotechnology, Erlangen, DE
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank -80°C	Kirschmann, Kendro, Langenselbold, DE
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsort, DE
Sterilbank, HERAsafe	Kendro, Langenselbold, DE
Vi-Cell Zellenzählgerät	Beckmann Coulter, Krefeld, DE

**Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Plastikmaterialien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Combitips	Eppendorf, Hamburg, DE
Einfrierröhrchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Einfriercontainer	Nalgene®, Rochester, NY, USA
Ficollröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Schwerte, DE
Leucosept-Röhrchen 50 ml, steril	Greiner Bio-One, Schwerte, DE
MS-Säule (MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettiergefäß	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipetten 10 µl, 50 µl, 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
3-Schichten-Zellkulturflasche	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Transfektionsküvetten	PEQLAB Biotechnology, Erlangen, DE
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Falcon, CH
Zellkulturplatte 6-Well/96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, DE

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper.** Alle Antikörper sind aus der Maus und, mit Ausnahme eines CD14-Antikörpers, direkt mit Fluorochrom konjugiert. k. A., keine Angabe.

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-IFN- $\gamma$ (PE)	REA600	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
CD3 (PC5)	UCHT1	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD3 (FITC)	UCHT1	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD4 (FITC)	13B8.2	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD8 (FITC)	B9.11	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD8 (PE)	B9.11	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD14 (PE)	M5E2	BD Falcon, CH
CD14 MicroBeads	k. A.	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
CD19 (ECD)	B89	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD45 (ECD)	J33	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD56 (PE)	N901	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
CD80 (PE)	L307.4	BD Falcon, CH
CD83 (PE)	HB15e	BD Falcon, CH
CD86 (PE)	2331	BD Falcon, CH
HLA-DR (ECD)	Immu-357	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
IgG1-Isotypkontrolle (FITC)	679.1Mc7	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
IgG1-Isotypkontrolle (PE)	679.1Mc7	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
IgG1-Isotypkontrolle (ECD)	6791Mc7	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
IgG1-Isotypkontrolle (PC5)	2T8-2F5	Beckmann Coulter, Krefeld, DE

## 2.2. Patienten und Probanden

Für die Untersuchung von Blutzellen von Patienten und gesunden Probanden wurde zunächst ein Votum der Ethikkommission eingeholt. Die Gewinnung der DC erfolgte aus mononukleären Zellen, welche aus peripher venösem Vollblut isoliert wurden. Das Blut wurde sowohl von gesunden Probanden wie auch von Patienten mit Multiplem Myelom zur Verfügung gestellt. Die sechs Probanden sind mit den Buchstaben A-F bezeichnet (Tabelle 8), die Patienten mit den Nummern 1-18 sind in Tabelle 9 gelistet. Für jeden Ansatz wurden etwa 60 ml Vollblut gespendet, nachdem sowohl die Probanden als auch die Patienten eine Einverständniserklärung unterzeichnet hatten.

**Tabelle 8: Übersicht über die gesunden Spender.**

<b>Proband</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
A	23	w
B	24	m
C	30	m
D	30	w
E	39	m
F	52	w

**Tabelle 9: Übersicht über die Patienten mit Multiplem Myelom.** Alle Patienten mit einer Ausnahme hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits mindestens eine Therapielinie erhalten (s. Tabelle 24 im Anhang).

<b>Patient</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Zeitpunkt Erstdiagnose und Stadieneinteilung nach Salmon/Durie</b>
1	65	m	08/2005 II A
2	67	m	05/2005 III A
3	69	w	03/2003 I
4	46	m	09/2004 III A
5	54	w	03/2004 III A
6	70	m	02/2001 I A
7	64	m	08/2005 I A
8	56	w	09/2004 III
9	63	m	03/2001 III A
10	65	w	12/1998 I A
11	62	m	12/2001 III A
12	64	w	01/2004 III A
13	67	w	07/2005 III B
14	53	m	08/2005 II A
15	56	w	06/2005 III B
16	47	m	07/2005 III A
17	58	m	04/2003 II A
18	49	m	12/2001 III A

## **2.3. Gewinnung von Monozyten aus peripherem venösen Vollblut**

### **2.3.1. Adhärenzmethode**

Für die Monozytengewinnung durch Plastikadhärenz müssen zuerst PBMC gewonnen werden. Dazu wurde peripher venöses Vollblut in Heparinröhrchen entnommen. In Ficollröhrchen (Leucosep®, Greiner) wurden je 15 ml Ficoll-Lösung gegeben und diese mit je 20 ml Vollblut überschichtet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 850 x g für 20 Min erfolgte die Auftrennung des Vollblutes. Die Schicht der mononukleären Zellfraktion wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen, um Serum- und Ficollreste zu minimieren. Die übrigen Blutbestandteile wurden verworfen. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit RPMI 1640-Medium. Die gewonnene mononukleäre Zellfraktion wurden nun mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und eine Gesamtzahl von maximal  $50 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Cell Gro®-Medium aufgenommen und in einer sterilen Kulturflasche oder Petrischale bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für zwei Stunden inkubiert. Nachfolgend wurden die nichtadhärenten Zellen mit PBS vorsichtig abgewaschen, gezählt und kryokonserviert (vgl. 2.5.). Die adhärennten Zellen wurden direkt weiterverwendet für die Herstellung von unreifen DC.

### **2.3.2. Monozytenapherese und Elutration**

Die Stammzellapherese ist ein etabliertes Verfahren zur Gewinnung von Blutstammzellen für die Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen (Stammzelltransplantation). Alternativ zur Standard-Plastikadhärenz können Monozyten mittels Monozytenapherese und anschließender Elutration des Präparates gewonnen werden; der Vorteil liegt hier in der großen Zellausbeute un behandelter Monozyten unter GMP-konformen Bedingungen.

Den Probanden wurde über einen großvolumigen venösen Zugang Vollblut entnommen und mit Citrat antikoaguliert; die nach der Zentrifugation im COBE Spectra-Apheresegerät isolierten Fraktionen mit hoher Monozyten- und Lymphozytendichte wurden weiterverarbeitet, die nicht verwendeten Blutbestandteile wurden über einen zweiten venösen Zugang zurück infundiert. Im Anschluss wurde das gewonnene Monozytenpräparat weiter aufgereinigt (s. 2.3.1.). Die lymphozytäre Fraktion wurde kryokonserviert (vgl. 2.5.). Dieses Verfahren wurde an drei Probanden durchgeführt.

### **2.3.3 Aufreinigung durch „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS)**

Das MACS dient der Sortierung verschiedener Zellen aus einer Suspension aufgrund der von ihnen exprimierten Oberflächenmoleküle mittels spezifischer Antikörper. Die Präparation der Monozyten erfolgt in diesem Fall über CD14, einem für Monozyten spezifischen Glykoprotein. Zunächst wurde auch bei dieser Methode das Vollblut über Ficoll dichte-zentrifugiert. Danach wurden den abgenommenen mononukleären Zellen CD14-Micro-Beads (Miltenyi) nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dabei handelt es sich um CD14-Antikörper, an die etwa 50 nm große Metallpartikel gebunden sind. Diese wurden neben der an ihnen gebundenen CD14-positiven Zellen im Auto-MACS (Miltenyi) mittels eines Magneten aus der Suspension nach Protokoll des Herstellers abgetrennt (Positivselektion). Die Positivfraktion wurde im Anschluss mit RPMI 1640-Medium gewaschen. Die Negativfraktion wurde kryokonserviert.

### **2.4. Herstellung unreifer dendritischer Zellen**

Die präparierten Monozyten wurden in Cell Gro®-Medium unter Zugabe von GM-CSF (800 IU/ml) und IL-4 (500 IU/ml) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für einen Zeitraum von sechs Tagen kultiviert. GM-CSF und IL-4 wurden am Tag 3 und Tag 5 erneut zugegeben. Am Tag 6 wurden die Zellen geerntet, indem die Kulturflasche auf Eis gelegt wurde und die Zellen mit drei mal 10 ml PBS gelöst wurden. Die unreifen dendritischen Zellen wurden dann entweder für nachfolgende Versuche eingesetzt oder für den späteren Gebrauch kryokonserviert.

### **2.5. Kryokonservierung von Lymphozyten und unreifen dendritischen Zellen**

Die Lymphozyten sowie, abhängig von der Versuchskonzeption, Teile der dendritischen Zellen wurden kryokonserviert. Dazu wurde ein Einfriermedium bestehend aus 5 Anteilen RPMI 1640, 4 Anteilen humanem Serumalbumin (20%ig) und 1 Anteil DMSO hergestellt. Pro Milliliter des Einfriermediums wurden maximal 10<sup>7</sup> Zellen in Einzelportionen kryokonserviert. Das Einfriermedium sowie die Zellen wurden vor dem Kontakt gekühlt, um die Zelltoxizität zu reduzieren. Um einen kontrollierten Einfriervorgang zu gewährleisten, wurden die Zellen unter Verwendung eines Gefrierbehälters (Nalgene Cryo 1° Freezing Container) mit einer Geschwindigkeit von 1°C/Stunde auf -80°C abgekühlt. Im Anschluss

wurden die Zellportionen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt, in welchem sie dann weiter gelagert wurden. Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen mit den Zellen kurz in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Nachfolgend wurden sie in 37°C warmem RPMI 1640-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das DMSO zu entfernen, und nachfolgend in RPMI 1640-Medium aufgenommen.

## **2.6. Maturation der dendritischen Zellen**

### **2.6.1. Reifung der dendritischen Zellen**

Die unreifen dendritischen Zellen wurden mit PBS aus der Kulturflasche oder Petrischale gelöst. Nach dreifachem Waschen in PBS wurden die Zellen in Cell Gro®-Medium resuspendiert. Zur Induktion der Reifung wurden die Zytokine mit 500 IU/ml IL-4, 800 IU/ml GM-CSF, 1000 IU/ml IL-6, 1 µg/ml PGE<sub>2</sub>, 10 ng/ml TNF-α, und 10 ng/ml IL-1β zugesetzt. Es wurden 4 x 10<sup>7</sup> Zellen in vier 6-Well-Plates überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zum nächsten Tag inkubiert und dann weiterverwendet.

### **2.6.2. Durchflusszytometrische Untersuchung zur Charakterisierung des Reifegrades und der Vitalität dendritischer Zellen**

Um zu kontrollieren, ob aus den Monozyten ausgereifte dendritische Zellen entstanden sind, wurden sie auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die für die dendritischen Zellen und ihre Antigenpräsentation spezifisch und relevant sind, hin getestet. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). Die Durchflusszytometrie ist eine Möglichkeit, Zellen durch optische Messungen zu charakterisieren. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom durch den Strahlengang eines Lasers geleitet, so dass Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften gemessen werden. Über die Streulichteigenschaften werden dann Aussagen über Größe und Granularität der Zellen ermöglicht. Zudem kann die relative Expressionsdichte von Oberflächenmarkern nach Inkubation mit fluorochrom-gekoppelten, spezifisch gegen die Marker gerichteten Antikörpern bestimmt werden. Zunächst wurden die Zellen aus der Kulturschale bzw. Flasche entnommen, pelletiert (Zentrifugation bei 850 x g für 5 Min) und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden je FACS-Ansatz 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in ein FACS-Röhrchen in 100 µl PBS resuspendiert. Den Zellen wurden jeweils 5 µl der ausgewählten fluoreszenzmarkierten Antikörper (Beckman Coulter) zugegeben. Die

Inkubation erfolgte für 30 Min dunkel im Kühlschrank bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert (850 x g, 5 min), und in 0,5 ml PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte sodann im Durchflusszytometer FC500 (Beckman Coulter) mittels 4-Farben-FACS nach folgendem Schema:

**Tabelle 10: Schema der verwendeten Oberflächenmarker zum Nachweis der DC-Reifung.**

<b>Ansatz</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>	<b>PC5</b>
1	CD45	-	-	7-AAD
2	CD14	CD83	HLA-DR	CD33
3	CD80	CD86	HLA-DR	CD33
4	IgG	IgG	IgG	CD33

Das für Monozyten charakteristische CD14-Oberflächenmolekül wird nicht auf DC exprimiert. CD83 wird von reifen DC exprimiert und ist somit ein guter Marker für die Ausreifung. CD80 und CD86 sind kostimulatorische Oberflächenmoleküle auf reifen DC. HLA-DR hingegen ist ein MHC-II-Oberflächenmolekül reifer und unreifer DC und steigt mit dem Reifegrad der DC. Der myeloische CD33-Marker diente als Erkennungsmerkmal von sowohl Monozyten/Makrophagen als auch DC, und deckt somit die Gesamtzellpopulation ab. Um die Vitalität zu bestimmen, wurde eine Anfärbung mit 7-AAD vorgenommen. Als Isotyp-Kontrollen wurden entsprechend Fluoreszenzfarbstoff-markierte Maus-IgG-Antikörper eingesetzt. Für die Auswertung wurden jeweils 10000 der CD33-positiven Zellen analysiert.

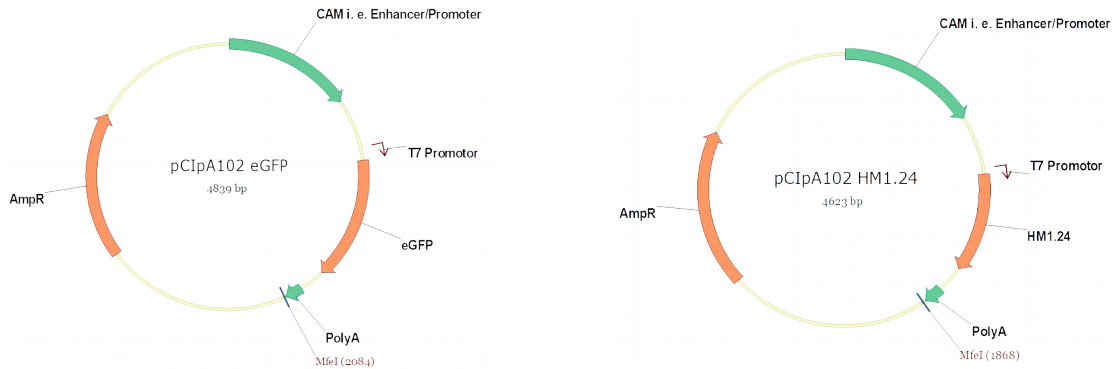
## **2.7. Antigenbeladung dendritischer Zellen**

### **2.7.1. In vitro-Synthese einer 5'-Cap-mRNA für HM1.24**

Die Synthese der 5'-Cap-mRNA erfolgte mit dem mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transkriptionskit der Firma Ambion (Berlin) nach Angabe des Herstellers unter Verwendung der mit der Restriktionsendonuklease *MfeI* (Ambion) hydrolysierten Plasmide pCIP<sub>A102</sub> eGFP und pCIP<sub>A102</sub> HM1.24 (Abb. 2). Die uns für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Professor Gustav Gaudernack (Sektion für Immuntherapie am norwegischen Radium Hospital der Universität Oslo) zur Verfügung gestellten Plasmide enthalten neben der kodierenden Sequenz des eGFP bzw. HM1.24 (NCBI Accession-No. 7262372) einen Promotor für die



Initiation der Transkription mittels T7-RNA-Polymerase sowie im Anschluss an die Kodierungssequenz einen 102 Nukleotide langen Poly-Adenosin-Schwanz. Das Anfügen der 5'-Cap-Struktur wird durch ein im Kit enthaltenes Enzym katalysiert.



**Abb. 2: Darstellung der verwendeten Plasmide pCIpA<sub>102</sub> eGFP und pCIpA<sub>102</sub> HM1.24.** Quelle: Herr Professor Gustav Gaudernack (Sektion für Immuntherapie am norwegischen Radium Hospital der Universität Oslo). AmpR, Ampicillinresistenz; CAM, Crassulaceen-Säurestoffwechsel; T7-Promoter, Promoter des Phagen T7; Poly-A, Polyadenylierung.

## 2.7.2. Elektrotransfektion

Die Elektrotransfektion ermöglicht es, fremde Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in eine Zelle einzubringen. Durch einen elektrischen Impuls wird die Permeabilität der Membran kurzfristig erhöht, so dass RNA - und DNA - Moleküle in die Zelle diffundieren können.

Die unreifen DC wurden direkt nach der Generierung verwendet oder aufgetaut. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit Cell Gro® Medium gewaschen. Dann wurden  $10^7$  Zellen in 200  $\mu$ l Opti-MEM aufgenommen und mit 10  $\mu$ g in vitro transkribierter eGFP oder HM1.24 mRNA versetzt. Die Suspension wurde anschließend in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 4 mm, Peqlab) überführt. Mit Hilfe einer Easyject Plus-Einheit (Peqlab) wurde die Elektroporation bei 260 V für 231 Millisekunden durchgeführt. Nachfolgend wurden die Zellen in Cell Gro®-Medium, das mit den Zytokinen zur DC-Reifung supplementiert wurde, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 6-Well-Plates für 24 Stunden kultiviert. In einer 6-Well-Platte wurden  $2 \times 10^7$  Zellen kultiviert. In dieser Zeit sollte es zur Expression der mRNA und zeitgleichen Reifung der DC gekommen sein. Die Kontrolle für eine gelungene Transfektion erfolgte durch die eingebrachte eGFP-mRNA, im Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle

dienten nichttransfizierte Zellen. Gleichzeitig erfolgte die Färbung der DC mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen CD14, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR zum durchflusszytometrischen Nachweis der DC-Reifung nach dem Schema in Tab. 11. Pro Messung wurden 10000 Zellen eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit dem Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter.

**Tabelle 11: Schema zur Messung der Effizienz der DC-Transfektion und Reifung.**

<b>Ansatz</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>
1	IgG	IgG
2	CD86	IgG
3	IgG	HLA-DR
4	CD14	HLA-DR
5	CD80	HLA-DR
6	CD83	HLA-DR
7	CD86	HLA-DR

### **2.7.3. Peptidbeladung der dendritischen Zellen**

Es wurden  $10^6$  DC eines HLA-A2 positiven Spenders der eine CMV Infektion durchgemacht hatte, im Wasserbad aufgetaut und zweifach mit CTL-Medium (20  $\mu$ l Gentamycin und 100  $\mu$ l MEM nichtessentielle Aminosäuren in 10 ml RPMI-1640) gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Das so erhaltene Pellet wurde in 80  $\mu$ l CTL-Medium aufgenommen. Es wurden 10% autologes oder AB-Serum sowie 1  $\mu$ g/ml des HLA-A2 restringierten pp65-Peptids des humanen Cytomegalievirus (HCMV) (freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Axel Heiser, Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel zur Verfügung gestellt) zugegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann über eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubationszeit wurden die DC erneut mit CTL-Medium gewaschen und jeweils bei 850 x g für fünf Minuten zentrifugiert, um das überschüssige Peptid zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen in 90  $\mu$ l CTL-Medium und 10% autologem oder AB-Serum resuspendiert und in einer 96-Well-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiterkultiviert.

## 2.8. Interferon- $\gamma$ -Sekretionstests (Capture Assay)

Zum Nachweis der Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen wurden mit der HM1.24-mRNA transfizierte, oder mit dem pp65-Peptid beladene DC als antigenpräsentierende Zellen für den Interferon- $\gamma$ -Sekretionstest (Capture Assay, Miltenyi) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die verwendeten T-Zellen stammten aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom bzw. einem gesunden Spender der nichtadhärenten kryokonservierten PBMC-Fraktion. Es wurden  $10^7$  T-Zellen zweimal mit 1 ml CTL-Medium (20 ml RPMI 1640 + 40  $\mu$ l Gentamycin + 0,2 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren) gewaschen und im Anschluss mit 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die T-Zellen in 90  $\mu$ l T-Zell-Medium (5 ml CTL Medium + 10  $\mu$ l IL-2 + 10  $\mu$ l AB Serum) aufgenommen und in eine 96-Well-Platte zu den frisch gepulsten DC im Verhältnis 10:1 gegeben. Die kultivierten T-Zellen wurden viermal mit beladenen DC stimuliert. Bei der vierten und letzten Stimulation wurden die T-Zellen über einen Zeitraum von 16 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 100  $\mu$ l CTL Medium mit den DCcokultiviert. Zu Kontrollzwecken wurden nicht stimulierte autologe T-Zellen, die ebenfalls der nichtadhärenten kryokonservierten PBMC-Fraktion entstammen, mit den gepulsten DC inkubiert. Als Positivkontrolle wurden unstimulierte, nichtadhärente Zellen mit 2  $\mu$ l Staphylococcus Enterotoxin B (SEB, 100 ng/ml) versetzt und ebenso über 16 h kultiviert. Nicht stimulierte T-Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach den 16 Stunden Inkubationszeit wurde jede Probe mit 4 ml kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (850 x g, 5 Min). Die Zellen wurden in 90  $\mu$ l Cell Gro® aufgenommen und jeweils 10  $\mu$ l IFN- $\gamma$ -Catch-Reagenz zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden 500  $\mu$ l warmes Cell Gro®-Medium zugegeben. Die Proben inkubierten für eine weitere Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, die Röhrchen wurden alle 5 Minuten geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 4 ml kaltem PBS aufgenommen, abzentrifugiert (850 x g bei 4°C) und in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Es wurden sodann der Tabelle 12 entsprechend Antikörper zum Nachweis von Interferon- $\gamma$  sekretierenden T-Zellen (CD8/CD3) zugegeben. Maus-IgG-Antikörper wurden als Isotypkontrolle verwendet. Die Proben inkubierten nachfolgend für 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C. Danach erfolgten zwei Waschgänge mit PBS und für die FACS-Messung die Aufnahme in 500  $\mu$ l PBS.

**Tabelle 12: Schema zum durchflusszytometrischen Nachweis aktivierter T-Zellen.**

<b>Ansatz</b>	<b>Zellen/Stimulation</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PC5</b>	<b>ECD</b>
1	Unstimulierte T-Zellen + SEB	IgG	IgG	IgG	CD45
2	Unstimulierte T-Zellen + SEB (Positivkontrolle)	CD8	Anti-IFN- $\gamma$	CD3	CD45
3	Unstimulierte T-Zellen + ungepulste DC (Negativkontrolle)	CD8	Anti-IFN- $\gamma$	CD3	CD45
4	Unstimulierte T-Zellen + gepulste DC	CD8	Anti-IFN- $\gamma$	CD3	CD45
5	Stimulierte T-Zellen + gepulste DC	CD8	Anti-IFN- $\gamma$	CD3	CD45

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Voruntersuchungen am Blut gesunder Probanden**

Das Ziel der Arbeit war die Herstellung von DC aus dem Blut von Patienten mit einem Multiplen Myelom. Wir führten zunächst Voruntersuchungen an den MNC gesunder Spender durch, um zu testen welche Herstellungsmethode wir für die MNC der Patienten mit Multiplem Myelom nutzen werden.

#### **3.1.1. Isolation von Monozyten**

Die Herstellung von ausgereiften dendritischen Zellen erfolgte aus Monozyten, welche aus mononukleären Zellen des venösen peripheren Bluts von gesunden Probanden oder Patienten mit Multiplem Myelom isoliert wurden. Es wurden drei unterschiedliche Methoden zur Gewinnung der Monozyten verwendet: Plastikadhärenz, CD14-Positivselektion durch MACS und Apherese. Der Einfluss der jeweiligen Methoden auf die Ausreifung und Funktion der DC sollte näher untersucht werden. Der Reifungsgrad der DC zeigt sich im Immunphänotyp: reife DC sind im FACS positiv für HLA-DR und haben im Verlauf der Maturation den Monozytenmarker CD14 verloren. Des Weiteren exprimieren reife DC die Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86. Unreife DC zeigen die gleichen Oberflächenmoleküle, allerdings ist CD83 geringer vorhanden als auf reifen DC. Als funktionale Eigenschaft der DC wurde ihre Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, untersucht. Dies erfolgte über die Sekretion von IFN- $\gamma$ .

Aus ca. 60 ml Vollblut von gesunden Probanden konnten im Durchschnitt etwa  $4 \times 10^7$  MNC in der Adhärenzmethode eingesetzt werden. Die Anzahl der erhaltenen Zellen ist in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13: Anzahl der erhaltenen Zellen nach der Adhärenzmethode und Ausreifung bei gesunden Probanden.**

<b>Proband</b>	<b>Anzahl an Zellen</b>
A	$5 \times 10^7$
B	$4 \times 10^7$
C	$4 \times 10^7$
D	$4 \times 10^7$
E	$3 \times 10^7$
F	$3 \times 10^7$
G	$10 \times 10^7$
H	$7 \times 10^7$
I	$13 \times 10^7$

Um zu untersuchen, ob die kultivierten Zellen dem Immunphänotyp von DC entsprechen, erfolgten durchflusszytometrische Messungen der Ausgangszellpopulation (MNC), der Zellen im Überstand nach Adhärenz, sowie die Messungen der unreifen DC nach Stimulation mit IL-4 und GM-CSF, und die Messungen der DC nach der Ausreifung mit dem Zytokingemisch. In diesen Messungen wurde die Größe und Granularität der Zelle im Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht ermittelt, der Immunphänotyp wurde nach Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bestimmt.

### **3.1.1.1. Monozytenisolation durch Adhärenzmethode**

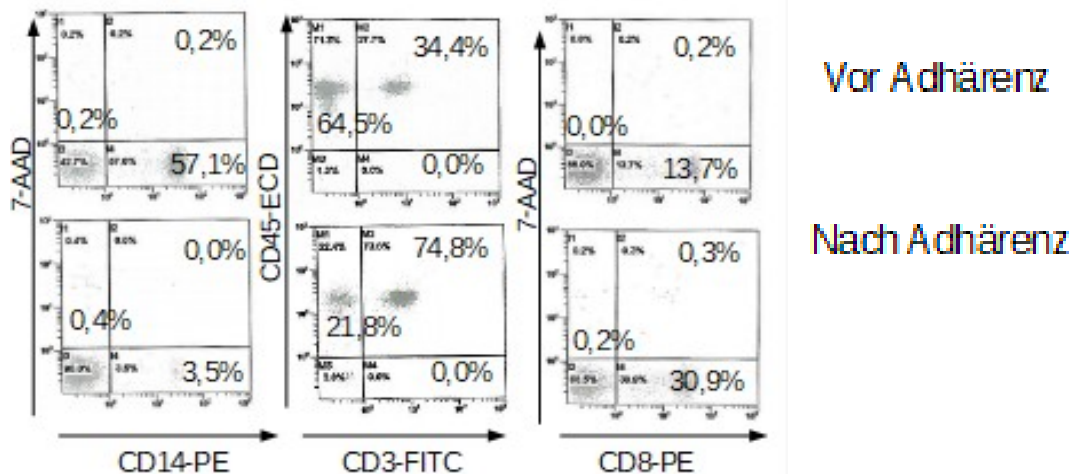
Ein erster Ansatz erfolgte mit Blutzellen eines gesunden Spenders (Proband A). Bevor die PBMC in die Kulturflasche gegeben wurden, erfolgte die erste Messung. Die restlichen PBMC wurden in die Kulturflasche gegeben. Nach 2 Stunden wurden die nichtadhärenten Zellen entfernt und ebenfalls gemessen. Es wurde untersucht, wie groß der Anteil an Monozyten und T-Zellen ist, indem Antikörper gegen CD14 sowie gegen CD3 und CD8 eingesetzt wurden. Der Oberflächenmarker CD4 wird sowohl auf T-Helferzellen als auch auf Monozyten exprimiert. Der Oberflächenmarker CD45 ist ein Oberflächenmarker für Leukozyten. Untersucht wurde außerdem der Anteil an apoptotischen Zellen durch eine Markierung mit 7-AAD. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

**Tabelle 14: Ergebnisse der FACS-Analyse.** Mononukleäre Zellen vor Adhärenz und nichtadhärente Zellen nach zweistündiger Kultivierung in einem sterilen Zellkulturgefäß aus Plastik wurden untersucht. Angegeben sind jeweils die Werte des Anteils positiver Zellen in Prozent.

Spender A	CD3	CD4	CD8	CD14	CD19	CD45	7-AAD
vor Adhärenz	34,4	17,6	13,8	57,1	4,8	98,9	0,4
nach Adhärenz	74,8	44,6	31,2	3,5	1,1	96,6	0,5

Es zeigte sich, dass die Anzahl an Monozyten (CD14<sup>+</sup>) nach Adhärenz von 57,1% der gemessenen Zellen auf 3,5% deutlich abgenommen hat. Die Anzahl der CD19-positiven B-Zellen hat ebenfalls abgenommen (von 4,8% auf 1,1%). Der Anteil an CD3-positiven T-Zellen ist von 34,4% auf 74,8% gestiegen. Es zeigte sich zudem, dass der Anteil der T-Zellsubpopulationen nach der Adhärenz deutlich zugenommen hat: von 13,8% auf 31,2% für CD8-Positive und von 17,6% auf 44,6% für CD4-Positive.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in den zwei Stunden der Inkubation in der Kulturflasche zu einer Adhärenz der Monozyten kommt. Dies ist durch die deutliche Abnahme der CD14<sup>+</sup> Zellen bei nichtadhärenten Zellen zu erkennen (Abb. 3). Es zeigte sich auch eine Zunahme der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass die T-Zellen zu einem hohen Anteil in der nichtadhärenten Zellpopulation enthalten sind. Wichtig ist, dass es bei der Adhärenzmethode zu keiner Zunahme an apoptotischen Zellen kam, die Ausgangsvitalität von 99% blieb unverändert (Abb. 3).



**Abb. 3: Anteil CD14-, CD3-, und CD8-positiver Zellen vor und nach Adhärenz.** Untersucht wurden die PBMC vor Adhärenz und die nichtadhärenten Zellen nach der Adhärenz. Die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse zeigen zudem den Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen. Achsen: Fluoreszenzintensität. Der Anteil an CD3- und CD8-positiven Zellen steigt nach Adhärenz prozentual an, und der Anteil an CD14-positiven Zellen sinkt. PE, Phycoerythrin, FITC, Fluorescein..

### 3.1.1.2. Monozytenisolation durch CD14-Positivselektion

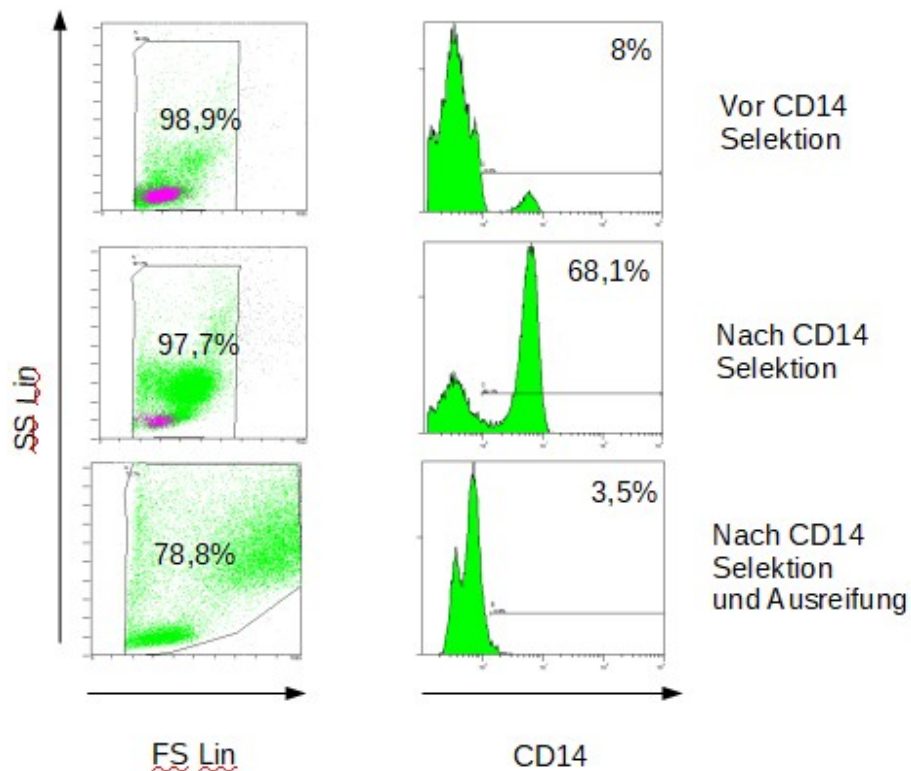
Eine weitere Methode, die gewählt wurde, um eine möglichst hohe Anzahl an dendritischen Zellen zu erhalten, ist die initiale Selektion von Monozyten mit CD14-Antikörpern und der anschließenden magnetischen Zellsortierung (MACS) (s. Kapitel 2.4.3). Die so aus dem Blut eines gesunden Spenders (Probandin D) gewonnene Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch auf ihren Gehalt an CD14-positiven Zellen hin überprüft und mit den für die Aufreinigung eingesetzten PBMC verglichen. Eine dritte Messung erfolgte nach Ausreifung der Zellen zu DC unter Zytokingabe, um die Expression DC-spezifischer Antigene nachzuweisen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 15.



**Tabelle 15: Ausreifung der DC nach CD14-Selektion durch MACS.** Angegeben sind die Prozentsätze der positiven Zellen nach durchflusszytometrischer Analyse. n.t., nicht getestet.

Spender D	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	Großgranulierte Zellen
PBMC vor CD14-Selektion	8,0	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	98,9
Zellen nach CD14-Selektion	68,1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	97,7
DC nach CD14-Selektion und Ausreifung	3,5	60,0	85,0	22,1	92,6	78,8

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD14-Selektion effektiv ist, der Prozentsatz der Monozyten stieg von 8% auf 68% (Abb. 4). Die Ausreifung der DC war in der prozentualen Expression der Oberflächenmoleküle deutlich schlechter als die Ausreifung der Zellen, die durch Adhärenz gewonnen wurden. Die Selektion ist aber suffizient und die Maturation ist ebenfalls möglich. Die magnetische Sortierung der Monozyten nach Antikörpermarkierung ist allerdings deutlich aufwendiger als die Aufarbeitung durch Adhärenz, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.



**Abb. 4: Prozentsatz CD14-positiver Zellen vor und nach CD14-Selektion und nach DC-Ausreifung.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Scattereigenschaften (linke Seite) und der Fluoreszenzintensität nach CD14-Antikörperfärbung (rechte Seite). Es zeigte sich eine Zunahme der CD14-positiven Zellen gegenüber der Ausgangszellpopulation nach CD14-Selektion und eine Abnahme nach der Ausreifung. SS Lin, linearer side scatter (Seitwärtsstreulicht); FS Lin, linearer forward scatter (Vorwärtsstreulicht). Die Zellen in Pink vor und nach CD14-Selektion sind Lymphozyten.

### 3.1.1.3. Monozytenisolation durch Monozytenapherese

Bei dieser Untersuchung wurde Blut aus Monozytenapheresen von drei gesunden Spendern gewonnen. Die Monozytenapherese bietet die Chance, dass man eine größere Menge an Monozyten erhält und als Ausgangspopulation für die DC-Generierung eine hohe Reinheit hat im Gegensatz zu Zellen aus peripherem venösen Vollblut. Man erwartet somit, dass eine bessere Ausreifung erfolgen sollte und die Zellen die DC-spezifischen Oberflächenmoleküle vermehrt exprimieren. Diese Annahme ließ sich in diesen drei Testreihen nicht bestätigen. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der ausgereiften Zellen nach Zytokinstimulierung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16: Ergebnisse der Ausreifung von Zellen aus Monozytenapheresen.** Die Tabelle zeigt die Expression von CD14 und DC-spezifischen Markern in Prozent nach der Ausreifung mit Zytokinen. Gezeigt sind die Ergebnisse der FACS-Analysen von drei Spendern.

Spender	Ausgangsmenge Zellen	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	Großgranulierte Zellen
G	$2 \times 10^8$	1,9	89,8	49,9	67,4	75,7	64,4
H	$2 \times 10^8$	4,3	75,1	16,1	52,8	90,7	63,5
I	$2 \times 10^8$	10,7	43,2	11,8	61,4	81,7	44,6

### 3.1.2. Generierung unreifer dendritischer Zellen

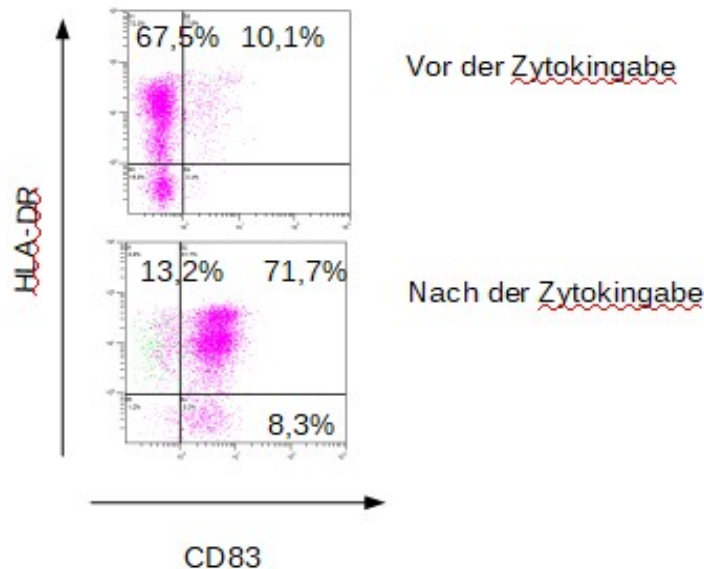
Die Generierung unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten erfolgte durch eine dreitägige Inkubation in einer Kulturflasche oder einer Petrischale und die Zellen erhielten alle 2 Tage GM-CSF und IL-4. In einem weiteren Untersuchungsschritt sollte nun untersucht werden, ob die Monozyten zu unreifen DC werden und ob diese durch die Zugabe der Zytokine IL-4, GM-CSF, IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (s. Kapitel 2.6.1) zu reifen DC maturieren. Um die Ausreifung nachzuweisen, wurden kultivierte Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders (Probandin F) vor und nach dem Erhalt der Zytokine im Durchflusszytometer gemessen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

**Tabelle 17: Expression von Monozyten- und DC-Oberflächenmolekülen auf Zellen vor und nach Zytokingabe.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen der Gesamtzellpopulation, gemessen im Durchflusszytometer.

Spender F	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	Großgranulierte Zellen
vor Zytokingabe	7,6	90,6	10,1	58,9	77,6	33,0
nach Zytokingabe	3,4	95,3	80,0	94,5	84,9	30,2

Die Zellen haben vor dem Erhalt des Zytokingemisches bereits an den Tagen eins, drei und fünf IL-4 und GM-CSF erhalten (s. Kapitel 2.4.). Die DC-spezifischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 waren danach bereits exprimiert, CD83 war in diesem Stadium kaum vorhanden. Vom Immunphänotyp entsprechen diese Zellen den unreifen dendritischen Zellen. Nach Gabe des Zytokingemisches stieg die Zahl CD80-positiver Zellen von 90,6% auf 95,3% an, CD86-positive Zellen erhöhten sich von 58,93% auf 94,5%. Auffällig war der Anstieg der CD83-positiven Zellen von 10,1% auf 80,0% (Abb. 5). Auch die Expression der

Oberflächenmoleküls HLA-DR stieg von 77,6% auf 84,9% an. Beide Populationen haben nur noch einen geringen Anteil CD14-positiver Zellen (7,6% bzw. 3,4%). Diese Zahlen legen dar, dass die Ausreifung der Monozyten zu DC erfolgreich war und die Zellen somit ihre CD14-Positivität verloren haben. Des Weiteren sind die unreifen DC nach dem Erhalt der Zytokine weiter ausgereift, gekennzeichnet durch die Expression von CD83. Ebenso ist der Anteil an Zellen, die CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren, gestiegen.



**Abb. 5: Immunphänotyp der DC vor und nach der Zytokingabe.** Gezeigt ist die Expression von HLA-DR und CD83 in der durchflusszytometrischen Analyse. Die Skala der Achsen gibt die Fluoreszenzintensität an. Die Zahlen repräsentieren den Prozentsatz positiver Zellen aus der Gesamtzellpopulation. Es zeigt sich deutlich, dass die DC nach der Zytokingabe stärker positiv für CD83 und HLA-DR sind als vor Zytokingabe.

### 3.1.3. Generierung reifer dendritischer Zellen

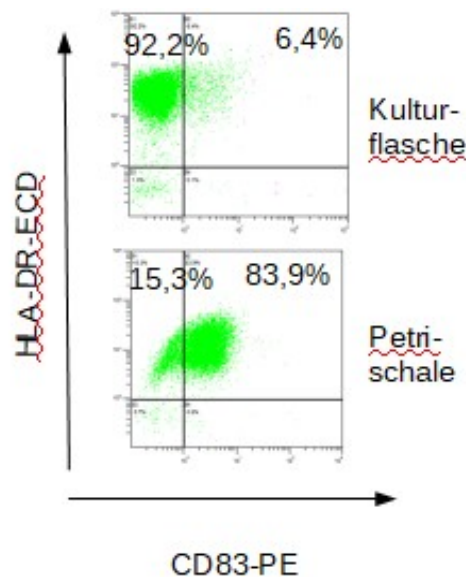
Es sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der DC-Ausreifung gibt, wenn die Zellen in unterschiedlichem Plastikmaterial kultiviert werden. Diese Untersuchung wurde an Zellen eines gesunden Probanden (Probandin D) durchgeführt. Die PBMC wurden in zwei gleiche Teile geteilt und der eine Teil der Zellen wurde in eine Kulturflasche gegeben und die andere Hälfte in eine Petrischale. Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden die nichtadhärenten Zellen entfernt. Die Zellen erhielten die Zytokine IL-4 und GM-CSF an den Tagen eins, drei und fünf, an Tag 6 erfolgte die Zugabe des Zytokingemisches bestehend aus

IL-4, GM-CSF, IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (s. Kapitel 2.6.1). Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

**Tabelle 18: Prozentuale Zusammensetzung der Zellpopulation nach Ausreifung in einer Petrischale und in einer Kulturflasche.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen der großgranulierten Zellen, ermittelt aus der durchflusszytometrischen Messung.

Spender D	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	Großgranulierte Zellen
Petrischale	4,0	98,3	83,9	97,5	99,2	99,9
Kulturflasche	3,4	49,2	6,4	65,6	98,6	99,7

Die Ausreifung in der Petrischale ergab eine ähnliche Anzahl an großgranulierten Zellen, wie im FACS Streulicht zu erkennen ist, wie die Ausreifung in der Kulturflasche. Der prozentuale Anteil an CD14-positiven Zellen war annähernd gleich. Die Expression der Oberflächen Moleküle CD83, CD80, CD86 und HLA-DR war deutlich höher auf Zellen, welche in der Petrischale kultiviert wurden (Tab. 18 und Abb. 6). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ausreifung von Monozyten in der Petrischale hinsichtlich der Expression von DC-spezifischen Oberflächenmolekülen besser war als in einer Kulturflasche.



**Abb. 6: Expression von HLA-DR und CD83 auf in einer Petrischale und in einer Kulturflasche ausgereiften DC.** Gezeigt sind die Punktehistogramme aus der FACS-Analyse. Die Achsen zeigen die Fluoreszenzintensität an.

### 3.1.4. Antigenbeladung durch Elektrotransfektion

Um die funktionelle Aktivität der generierten DC untersuchen zu können, mussten die Zellen mit Antigen beladen werden. Dies geschah durch Elektrotransfektion mit einem HM1.24-exprimierenden Plasmid, die erfolgreiche Transfektion wurde kontrolliert über die Expression von GFP.

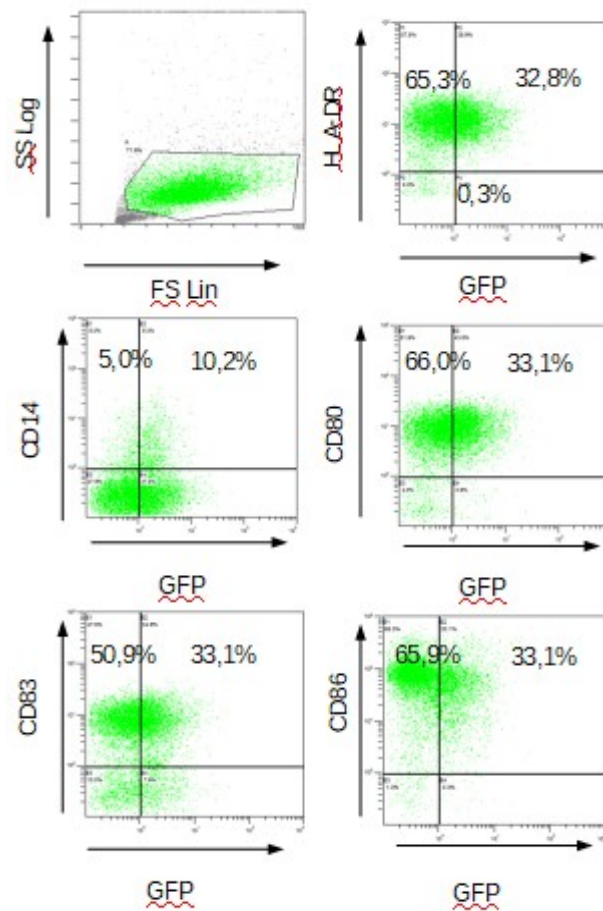
In dieser Untersuchung wurde die Elektrotransfektion unreifer DC mit GFP-RNA und Zytokingabe von mehreren gesunden Probanden getestet. Die unreifen DC wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen und an Tag 6 erfolgte die Elektrotransfektion der Zellen mit dem Plasmid pCIP<sub>A102</sub> eGFP (s. Kapitel 2.8.1). Es wurden jeweils  $10^7$  Zellen und 10 µg mRNA verwendet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Zytokine IL-4, GM-CSF, IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF-α und IL-1β für 24 Stunden im Brutschrank. An Tag 7 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Neben der GFP-Expression wurden wieder die DC-spezifischen Oberflächenmoleküle CD80, CD83, CD86 und HLA-DR und deren prozentuale Präsenz auf der Oberfläche der untersuchten Zellen im Durchflusszytometer untersucht (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Anteil der GFP-positiven Zellen und der Expression von DC-spezifischen Markern nach Transfektion und anschließender Ausreifung.** Angegeben sind die Prozentzahlen positiver Zellen aus dem Anteil der großgranulierten Zellen.

Proband	GFP	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	Großgranulierte Zellen
A	33,1	15,2	99,1	84,0	99,0	98,1	69,6
B	53,1	21,5	92,5	59,6	96,1	95,9	79,0
C	35,5	28,8	98,6	38,4	83,3	87,4	87,1
D	46,2	29,8	71,3	27,9	80,3	42,2	45,7
E	30,3	0,3	1,9	24,9	80,3	47,2	57,3

Bei den gesunden Probanden zeigten sich deutliche Differenzen in der Ausreifung, zwischen 45,7% und 87,1% waren großgranulierte Zellen. Der Anteil an HLA-DR-positiven Zellen variierte zwischen 42,2% und 98,1%, bei CD80 zeigten sich Werte zwischen 1,9% und 99,1%. Bei CD83 lag der Prozentsatz zwischen 24,9% und 84%, bei CD86 waren es zwischen 80,3% und 99%. Zwischen 0,3% und 29,8% der Zellen waren noch CD14-positiv. Die Anzahl von Zellen mit GFP-Expression war mit Werten zwischen 30,3% und 53,1% weit höher als nach Transfektion von unreifen DC (Tab. 19 und Abb. 7). Bei Proband E zeigte sich

insgesamt eine schlechte Ausreifung. Auffällig war zudem, dass auch bei einer guten Ausreifung der Zellen mit einer hohen prozentualen Expression von CD80, CD83 und CD86 häufig eine CD14-Positivität persistierte.



**Abb. 7: GFP- und Markerexpression von dendritischen Zellen nach Maturation und Elektrotransfektion.** Gezeigt sind hier exemplarisch die Histogramme der FACS-Messung von Zellen des gesunden Spenders A. SS Log, logarithmisches Seitwärtsstreulicht (side scatter); FS Lin, lineares Vorwärtsstreulicht (forward scatter). Achsen: Fluoreszenzintensität.

### 3.2. Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom

Die Voruntersuchungen mit Zellen aus dem Blut gesunder Probanden dienten dazu, die Ausreifung der dendritischen Zellen aus dem Blut von Patienten zu optimieren. Die aus Monozyten gewonnenen reifen DC wurden durch Adhärenzmethode und anschließender Stimulation mit Zytokinen generiert. Bei Patienten mit einem Multiplem Myelom konnten ca.  $2 \times 10^7$  MNC gewonnen werden wie in Tabelle 20 angegeben ist. Insgesamt konnten von 18 Patienten reife DC generiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse der Expression DC-spezifischer Oberflächenmarker ist in Tabelle 21 zusammengefasst. Zusätzlich erfolgte eine Messung zur Bestimmung des Anteils toter Zellen durch eine Markierung mit 7-AAD.

**Tabelle 20: Anzahl der erhaltenen Zellen nach der Adhärenzmethode und Ausreifung bei Patienten mit einem Multiplen Myelom.**

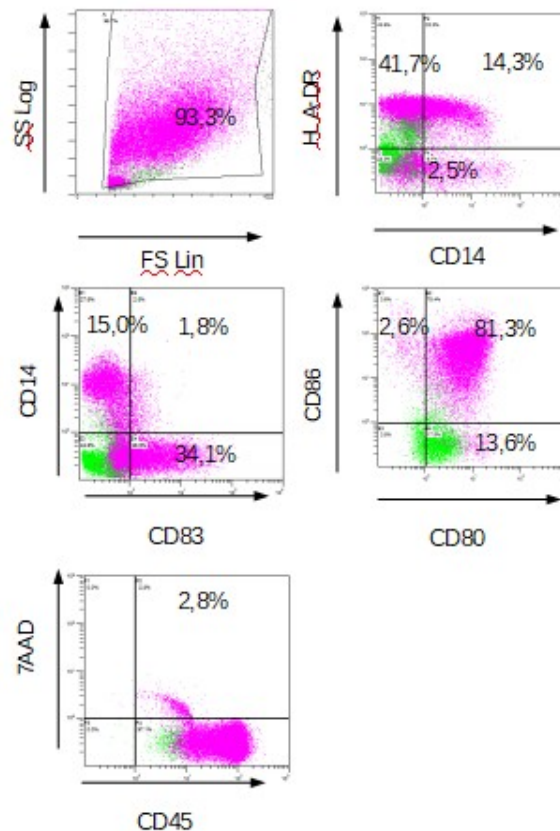
Patient	Anzahl an Zellen
1	$2 \times 10^7$
2	$2 \times 10^7$
3	$3 \times 10^7$
4	$1 \times 10^7$
5	$2 \times 10^7$
6	$2 \times 10^7$
7	$1 \times 10^7$
8	$7 \times 10^7$
9	$2 \times 10^7$
10	$2 \times 10^7$
11	$1 \times 10^7$
12	$1 \times 10^7$
13	$3 \times 10^7$
14	$7 \times 10^7$
15	$3 \times 10^7$
16	$2 \times 10^7$
17	$2 \times 10^7$
18	$2 \times 10^7$



**Tabelle 21: Expression von CD14 und DC-spezifischen Oberflächenmarkern auf reifen DC aus dem Blut von Patienten mit Multiplem Myelom.** Angegeben ist der Anteil der Zellen in Prozent der großgranulierten Zellen, gemessen am Durchflusszytometer nach Färbung mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern.

Patient	CD14	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	7AAD	Großgranulierte Zellen
1	42,8	98,7	78,3	89,1	98,4	13,5	72,3
2	61,9	90,8	69,7	92,8	92,2	18,1	68,6
3	20,4	98,0	75,9	89,6	84,1	13,4	45,9
4	70,0	97,9	78,1	89,6	91,5	26,2	84,5
5	72,8	99,3	57,3	94,9	76,8	14,6	86,2
6	47,3	96,1	49,8	92,2	21,0	16,1	76,3
7	78,5	97,9	83,9	86,9	65,1	24,7	87,4
9	24,0	98,6	50,6	89,7	38,3	22,5	56,1
10	13,2	99,4	82,9	97,0	48,9	14,9	49,7
11	18,9	97,7	66,3	95,8	18,2	9,9	59,8
12	31,1	99,0	85,5	95,8	68,2	23,5	64,7
13	53,4	95,6	41,2	97,7	89,1	13,8	62,2
14	78,5	94,0	64,9	92,9	65,1	19,5	42,8
15	5,3	77,8	78,7	82,6	77,7	2,6	39,1
16	16,8	94,9	35,9	83,9	56,0	2,8	93,3
17	9,2	63,7	29,8	86,0	73,5	8,2	83,9
18	0,9	61,0	0,2	2,3	58,5	0,5	34,7

Bei den Patienten zeigten sich deutliche Differenzen in der Ausreifung. So lag der Anteil an HLA-DR-positiven Zellen zwischen 18,2% und 98,4%, bei CD80 ergaben sich Werte zwischen 61% und 99,3%. Mit wenigen Ausnahmen bestand eine gute Korrelation von CD80 zu CD86, der Prozentsatz war bei letzterem zwischen 2,3% und 97,7%. Der Prozentsatz bei CD83 lag zwischen 0,2% und 96,5%. Zwischen 0,9% und 78,5% aller großgranulierten Zellen blieben positiv für den Monozytenmarker CD14. Ein exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abb. 8 gezeigt. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Ausreifung von DC aus peripher venösem Vollblut bei Patienten mit einem Multiplem Myelom möglich ist. Es zeigten sich deutlich unterschiedliche Expressionsstärken der DC-spezifischen Oberflächenmoleküle.



**Abb. 8: Markerexpression von dendritischen Zellen nach Maturation aus einem Patienten mit Multiplem Myelom.** Exemplarisch gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Messung bei DC des Patienten Nr. 16. SS Log, logarithmisches Seitwärtsstreulicht (side scatter); FS Lin lineares Vorwärtsstreulicht (forward scatter). Achsen: Fluoreszenzintensität.

### 3.3. Stimulation von Lymphozyten: Interferon- $\gamma$ -Freisetzung

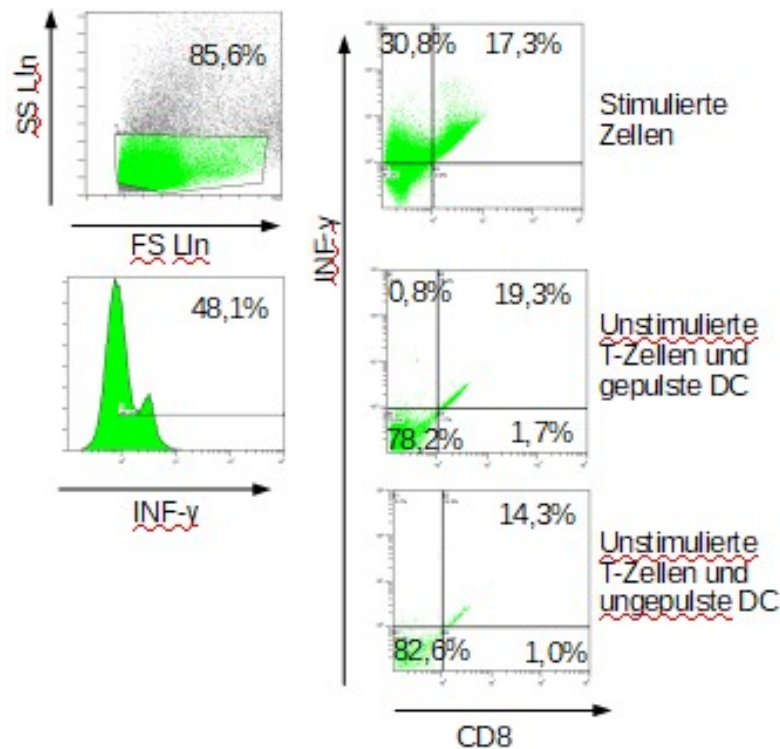
#### 3.3.1. Stimulation mit pp65-beladenen dendritischen Zellen

Die aus Monozyten generierten DC sollten funktionell auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Stimulation von Lymphozyten überprüft werden. Für diese Untersuchung wurden PBMC eines HLA-A2-positiven Spenders, der eine CMV Infektion durchgemacht hat, isoliert und die Monozyten durch Adhärenz gewonnen. Die nichtadhärenten Zellen wurden kryokonserviert. Nach 6 Tagen Inkubation mit IL-4 und GM-CSF konnten  $3 \times 10^6$  unreife DC kryokonserviert werden. Von den unreifen DC wurden  $1 \times 10^6$  Zellen für 1 Stunde mit  $0,1 \mu\text{l}$  pp65-Peptid versetzt und die DC dann zu  $10^8$  aufgetauten

nichtadhärenten Zellen gegeben. Im Verlauf wurden zweimal  $10^6$  unreife DC im Abstand von einer Woche aufgetaut, mit dem Peptid gepulst und den nichtadhärenten Zellen. Nach zweimaliger Restimulation wurde der IFN- $\gamma$ -Capture Assay durchgeführt und die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen, die in der nichtadhärenten Population stimuliert werden, sind in der Hauptsache die T-Zellen, dabei wird unterschieden zwischen zytotoxischen CD8-positiven T-Supressorzellen und CD4-positiven T-Helferzellen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der T-Zellen erfolgreich möglich war. Es waren 17,3% der Zellen CD8-positiv, also zytotoxische T-Supressorzellen, die alle IFN- $\gamma$  produzierten. Insgesamt waren 48,1% der Zellen positiv für IFN- $\gamma$  (Tabelle 22 und Abb. 9). Die übrige IFN- $\gamma$ -Produktion ist dann durch die T-Helferzellen erfolgt. Der positive Anteil IFN- $\gamma$  produzierender Zellen in den Negativkontrollen ist unspezifisch und deutet auf eine suboptimale Kompensierung hin.

**Tabelle 22: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von pp65-stimulierten nichtadhärenten mononukleären Zellen.** Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den Anteil der großgranulierten Zellen. Bei den gemessenen Zellen sind die gepulsten DC enthalten sowie die Lymphozyten.

	IFN- $\gamma$	CD8	CD8/IFN- $\gamma$	CD45	Großgranulierte Zellen
Gesunder Proband	48,1%	17,3%	17,3%	95,2%	85,6 %



**Abb. 9: IFN- $\gamma$ -Produktion der nichtadhärenten Zellen nach Stimulation mit pp65-beladenen autologen DC.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. Unstimulierte T-Zellen dienten als Negativkontrollen. SS Lin, lineares Seitwärtsstreulicht (side scatter); FS Lin. lineares Vorwärtsstreulicht (forward scatter). Achsen: Fluoreszenzintensität.

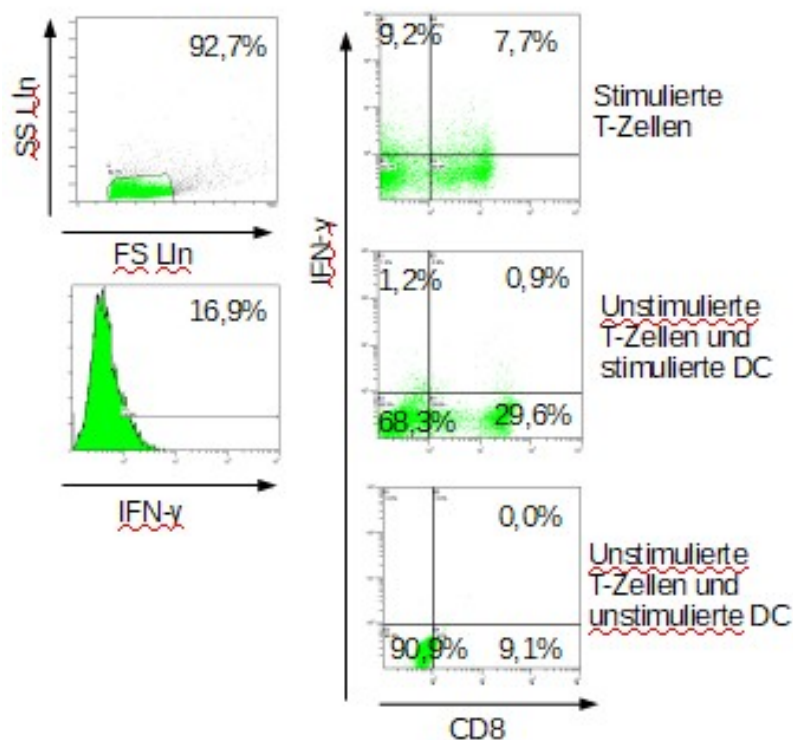
### 3.3.2. Stimulation mit HM1.24-transfizierten dendritischen Zellen

In diesem Versuch wurden unreife DC eines gesunden Probanden (Proband A) und eines Myelompatienten (Patient Nummer 8) durch Elektrotransfektion mit HM1.24-RNA beladen und mit diesen Zellen die autologen Lymphozyten (nichtadhärente Zellen) stimuliert. Der Versuchsansatz der beiden Proben erfolgte zeitgleich und es erfolgten dreimalige Stimulationen der Lymphozyten. Die DC hatten somit die gleichen Bedingungen, da sie gemeinsam im Brutschrank gelagert und gleichzeitig stimuliert wurden. Bei der durchflusszytometrischen Messung der großgranulierten Zellen ( $10^7$  nichtadhärente Zellen und  $10^6$  DC) sind die CD8-Expression und der Nachweis von IFN- $\gamma$  von Bedeutung. Jeweils ein Kontrollansatz enthielt unstimulierte Lymphozyten mit jeweils beladenen bzw. unbeladenen DC.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Stimulation von Lymphozyten eines gesunden Probanden und eine Myelompatienten mit HM1.24-beladenen DC.** Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die großgranulierten Zellen.

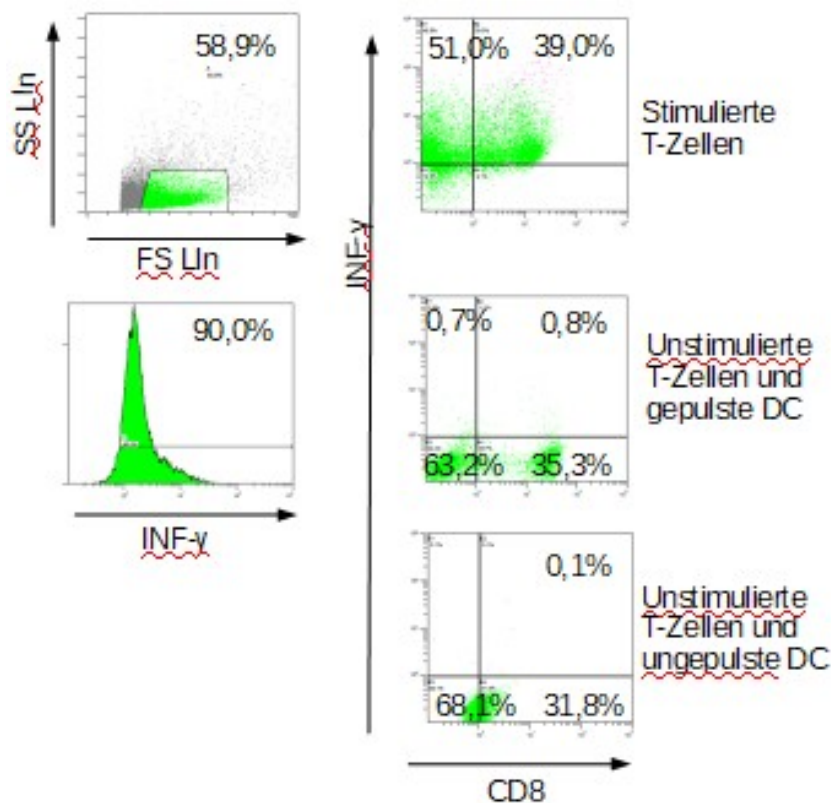
	IFN- $\gamma$	CD8	CD8/IFN- $\gamma$	CD45	Großgranulierte Zellen
Gesunder Proband	16,9 %	35,9 %	7,7 %	98,7 %	92,7 %
Myelompatient	90,0 %	38,5 %	39,0 %	98,1 %	58,9 %

Bei dem gesunden Probanden bestanden 92,7 % der Ereignisse aus großgranulierten Zellen (Tabelle 23 und Abb. 10). Von diesen großgranulierten Zellen waren 98,7% CD45-positiv. Zudem bestand eine Mischpopulation von Zellen wovon 35,9% CD8-positiv waren. Der gemeinsame Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen betrug 16,9%, davon waren 7,7% CD8-positiv zytotoxische T-Zellen. Der Kontrollansätze (Negativkontrollen) mit unstimulierten Lymphozyten enthielten keine IFN- $\gamma$ -positiven Zellen.



**Abb. 10: IFN- $\gamma$  auf der Oberfläche HM1.24-stimulierter Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Spenders.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. SS Lin, lineares Seitwärtsstreulicht (side scatter); FS Lin, lineares Vorwärtsstreulicht (forward scatter). Achsen Fluoreszenzintensität.

Bei dem Myelompatienten bestanden 58,9% der Ereignisse aus großgranulierten Zellen (Tabelle 23 und Abb. 11). Von diesen großgranulierten Zellen waren 98,1% CD45-positiv. Zudem bestand eine Mischpopulation von Zellen, davon waren 38,5% CD8-positiv, also T-Suppressor- und zytotoxische T-Zellen. Die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen war mit 90% deutlich höher als bei dem gesunden Probanden. Die Negativkontrollen der unstimulierten Lymphozyten zeigten kaum eine IFN- $\gamma$ -Produktion.



**Abb. 11: IFN- $\gamma$  auf der Oberfläche HM1.24 -stimulierter Lymphozyten aus dem Blut eines Patienten mit Multiplem Myelom.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. SS Lin, lineares Seitwärtsstreulicht (side scatter); FS Lin, lineares Vorwärtsstreulicht (forward scatter). Achsen: Fluoreszenzintensität.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Herstellung von dendritischen Zellen**

DC sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Körpers und daher auch für die Immuntherapie auch die interessantesten. [46] Sie machen im peripheren venösen Vollblut weniger als 1% der Zellen aus. Um eine höhere Anzahl an Zellen zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die Generierung der DC aus Monozyten untersucht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten um CD14-positive Monozyten zu erhalten. In dieser Arbeit wurden die Monozyten aus PBMC, sowohl aus dem peripheren venösen Vollblut als auch aus Monozytenapheresen gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden aus dem Blut durch Dichtezentrifugation extrahiert und die Monozyten dann durch die Adhärenzmethode oder CD14-Positivselektion mittels MACS gewonnen. Die verschiedenen Gewinnungsmethoden der Monozyten wurden miteinander verglichen und die Zellen wurden zunächst zu unreifen und später zu reifen DC maturiert. Um die Methoden vergleichen zu können wurde die Expression DC-spezifischer Oberflächenmoleküle auf den DC analysiert. Die Plastikadhärenzmethode ist bereits von verschiedenen Forschungsgruppen genutzt worden und gilt als etabliert [16, 47].

#### **4.1.1. Wahl der Zytokine für die Ausreifung**

Die Reifung von DC durch Inkubation der Monozyten mit IL-4 und GM-CSF ist bereits etabliert [48]. Für die terminale Ausreifung erhielten die Zellen ein Zytokingemisch bestehend aus IL-4, GM-CSF, IL-6, PGE, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Um zu überprüfen, ob das Zytokingemisch zu einer Ausreifung der unreifen DC zu reifen DC führte, erfolgte eine durchflusszytometrische Messung. Es zeigte sich eine Zunahme der Expression von DC-spezifischen Oberflächenmolekülen. Damit konnten die bereits mehrfach beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden [49]. Diese Zytokine werden auch noch immer zur Ausreifung dendritischer Zellen genutzt [50]. In der Literatur wird auch von einer Zytokinzusammenstellung aus IL-6, PGE, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  berichtet, die ebenfalls zu einer Ausreifung der DC führt [51]. Es existieren auch andere Möglichkeiten, die Maturation unreifer DC zu reifen DC anzustoßen. So werden den unreifen DC auch Lipopolysaccharide (LPS), CD40 Ligand, TNF- $\alpha$ , INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  oder Kombinationen aus den verschiedenen Interleukinen zugesetzt [52].

Die Ergebnisse und die in der Literatur beschriebenen Ausreifungsmöglichkeiten zeigen, dass eine Ausreifung der Zellen durch die Stimulation mit GM-CSF und IL-4 und dem abschließenden Zytokingemisch aus GM-CSF und IL-4, IL-6, PGE, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den erprobten Mengen gut funktioniert.

#### **4.1.2. Wahl der Monozytenpräparation**

Eine Methode, die zur Gewinnung von DC aus Monozyten genutzt wird, ist die CD14-Positivselektion mittels MACS. Über diese Sortierung wurden die Monozyten aus den mononukleären Zellen des peripheren venösen Vollbluts gewonnen und zu DC ausgereift. Es zeigte sich, dass die Selektion funktionierte. Die Ausreifung zu DC war ebenfalls erfolgreich. Allerdings war die Maturation nach Adhärenz weniger erfolgreich als die Ausreifung ohne CD14-Positivselektion. Einschränkend muss dazu gesagt werden, dass wir diesen Versuch lediglich einmalig durchführten und die Ausreifung mittels Adhärenzmethode mehrfach. Delirezh et al. untersuchten die Plastikadhärenzmethode im Vergleich zur MACS. In dieser Studie zeigte sich, dass durch die MACS weniger Zellen generiert werden können [47]. El-Sahrigy et al. konnten zeigen, dass es keine Unterschiede in der Ausreifung der DC nach MACS und der DC nach Adhärenz gab [53]. Nach MACS konnte eine höhere Reinheit der DC als nach Adhärenzmethode erzielt werden [54]. Die Generierung der Zellen durch Plastikadhärenz ist wesentlich einfacher und weniger kostenintensiv als die Gewinnung der Monozyten mittels MACS. Da in unseren Untersuchungen keine Unterschiede in der Ausreifung und Anzahl der Zellen gab entschieden wir uns für die Ausreifung der Zellen der Patienten mittels Plastikadhärenzmethode.

In der Klinik wurden Monozytenapheresen durchgeführt und wir erhielten Proben der Aphereseprodukte. Die Zellen wurden durch Plastikadhärenz ausgereift und maturiert. Insgesamt wurden drei Monozytenapheresen untersucht. In unseren Untersuchungen konnten erwartungsgemäß mehr Zellen als über die Entnahme des peripheren venösen Vollblutes generiert werden. Es zeigte sich eine ähnliche Ausreifung der Monozyten aus dem Apherese material im Vergleich zu den Monozyten aus dem peripheren Blut. Ebenso war die Anzahl an GFP-positiven DC nicht größer als bei DC generiert aus dem peripheren Blut. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da im Apherese material die Anzahl an MNC größer ist. Für die Patienten mit Multiplem Myelom ist die Gewinnung der Zellen mittels Monozytenapherese im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht worden. Obwohl eine Monozytenapherese sehr viele Zellen zur weiteren Aufarbeitung hervorbringt, wäre der Aufwand für die geringe Zellzahl, die benötigt wird, zu groß und die Belastung für den Patienten ebenfalls.



### **4.1.3. Einfluss des Plastikmaterials auf die Reifung**

Es zeigten sich in den Untersuchungen an verschiedenen Probanden unterschiedliche Ausprägungen der DC-spezifischen Oberflächenmarkerexpression nach der Reifung. Infolgedessen wurde die Adhärenzmethode in unterschiedlichen Plastikmaterialien (in diesem Fall Kulturflasche und Petrischale) durchgeführt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden Zellen desselben Spenders verwendet. Es zeigte sich, dass die Zellen aus der Petrischale eine höhere Expressionsstärke der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86 hatten als Zellen aus der Kulturflasche. Die HLA-DR-Expression war geringer ausgeprägt. Trotz der deutlich besseren Ausreifung der DC in der Petrischale verzichteten wir aus Gründen der höheren Kontaminationsgefahr auf die Ausreifung der DC in der Petrischale.

### **4.1.4. Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Blut von Patienten mit Multiplen Myelom**

Die Voruntersuchungen erfolgten um die bestmögliche Ausreifungsmethode für Monozyten aus peripherem Blut zu finden. Für die Generierung von DC aus Patienten mit Multiplen Myelom entschieden wir uns für die Gewinnung der Monozyten nach der Adhärenzmethode mit Kultivierung in der Kulturflasche. Unsere Ergebnisse mit gesunden Probanden zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen Adhärenzmethode, MACS und Monozytenapherese. Im Gegensatz zur Monozytenapherese ist die Gewinnung von peripherem venösen Vollblut mit geringem Aufwand verbunden. Die MACS-Methode haben wir nicht genutzt. In den durchflusszytometrischen Messungen nach der Ausreifung zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR zwischen den Proben der verschiedenen Patienten. Eine persistierende Problematik sowohl bei den Zellen der gesunden Probanden als auch bei den Zellen der Patienten mit einem Multiplen Myelom war eine Persistenz der CD14-Positivität auch bei guter Ausreifung. So zeigte sich beispielsweise bei Proband A eine sehr gute Expression der DC-spezifischen Oberflächenmoleküle CD80 (99,1%), CD83 (84%), CD86 (99%) und HLA-DR (98,1%). Es bestand in den Messungen aber auch eine CD14-Positivität von 15,2%. Die Ursache der CD14-Persistenz bleibt unklar.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme scheint gemäß einer Studie von Ratta et al. keinen Einfluss auf die Zellzahl zu haben. So zeigte sich bei 25 Patienten mit Multiplen Myelom, dass die DC bei den Patienten im Blut bei Erstdiagnose und bei fortgeschrittener Erkrankung in der

Anzahl gleich sind [55]. Es wurden DC aus Monozyten hergestellt. Sie sind aber in der Anzahl wesentlich niedriger als bei gesunden Spendern im gleichen Alter. Dies wurde von Shinde et al. [56] bestätigt und unsere Untersuchungen generierten ebenfalls weniger adhärenzte Zellen aus der gleichen Menge an Blut von Patienten als bei gesunden Spendern. Eine Untersuchung von Dosani et al. zeigte, dass das Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten einen prognostischen Hinweis für das mediane Überleben des Patienten darstellt [57]. Die Anzahl an zirkulierenden Monozyten scheint somit für den Verlauf der Erkrankung und die Aktivität des Immunsystems gegen die Myelomzellen wichtig zu sein. Die unterschiedliche Ausreifung der DC in unseren Untersuchungen deckt sich allerdings nicht mit anderen Studien. So hatten Oostvogels et al. [58] sowohl eine gute HLA-DR-Positivität als auch eine sehr gute Expression von CD80, CD83 und CD86 erzielen können. Auch in der Untersuchung von Shinde et al. [56] konnten HLA-DR, CD80, und CD86 Expressionen von über 90% nachgewiesen werden. Lediglich die CD83 Expression lag mit 39,5% noch geringer ausgeprägt vor, im Vergleich zu unseren Untersuchungen. Mögliche Ursachen für die schlechtere Ausreifung von Monozyten in unseren Untersuchungen ist unklar. Die Zytokinzusammenstellung, die in der Studie von Oostvogels et al. genutzt wurde, war die gleiche die auch wir genutzt haben, es handelte sich lediglich um einen anderen Hersteller [58]. Auch wurden die Zellen durch Plastikadhärenz ausgereift, allerdings wurden die Zellen mit dem keyhole limpet hemocyanin-Protein (KLH) der Firma Biosyn gereift. Dieses KLH wird aus der Hämolymphe der kalifornischen Meeresschnecke *Megathura crenulata* gewonnen und der Wirkstoff ist Immunocyanin. [59] Dieser Unterschied könnte eine Änderung in der Stärke der Expression der Oberflächenmarker darstellen.

## **4.2. Antigenbeladung der dendritischen Zellen**

Hinsichtlich der Transfektionseffizienz der DC zeigten sich deutliche Unterschiede in unseren Untersuchungen zu denen, die in der Literatur beschrieben sind: in keiner Untersuchung konnten die Werte aus anderen Studien erreicht werden. Um eine Verunreinigung auszuschließen wurden die Kulturmedien und Zytokine ausgetauscht. Die Ausreifung der dendritischen Zellen besserte sich dadurch zwar, doch die GFP-Transfektionseffizienz blieb in einem niedrigen zweistelligen Bereich.

Eine andere Untersuchung zeigte, dass die Ausreifung der DC zu einer geringeren GFP-Expression führt [60]. In dieser Studie zeigten sich ebenfalls auch für reife DC eine deutlich höhere Transfektionsrate als wir sie in unserer Untersuchung feststellen konnten. Die unreifen

DC zeigten eine Expressionsrate von  $77,9 \pm 12,4\%$  und von den reifen DC waren  $59,4 \pm 15,4\%$  GFP-positiv. In dieser Studie wurden die DC mittels Plastikadhärenz gewonnen und wurden mit  $40 \mu\text{g}$  mRNA elektrotransfiziert und sie erhielten 1-3 Pulse mit jeweils  $700 \text{ V}$ . Dies könnte auch die Problematik zeigen. In unserer Untersuchung wurden die Zellen nur einmalig gepulst. Und wir führten die Elektrotransfektion mit  $10 \mu\text{g}$  mRNA durch.

### **4.3 Funktionalität der dendritischen Zellen**

Um die Funktionalität der generierten DC zu überprüfen erfolgte eine Stimulation der autologen Lymphozyten mit beladenen DC. Die stimulierten Lymphozyten sollen eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung zeigen wenn sie durch die DC stimuliert worden sind. Eine IFN- $\gamma$ -Sekretion von CTL nach mehrfache Stimulation konnte bereits von Bae et al. 2013 [61] nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit waren mit dem pp65-Peptid des CMV beladenen DC in der Lage, T-Lymphozyten zur IFN- $\gamma$ -Sekretion zu stimulieren. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Kim et al. die zeigen konnten, dass T-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, wenn sie mit einem pp65-Peptid stimuliert werden [62]. Eine Untersuchung von Barabas et al. zeigte ebenfalls das die Stimulation mit pp65 möglich ist und Die T-Zell-Antwort scheint dabei von der Antigen dosis abhängig zu sein [63].

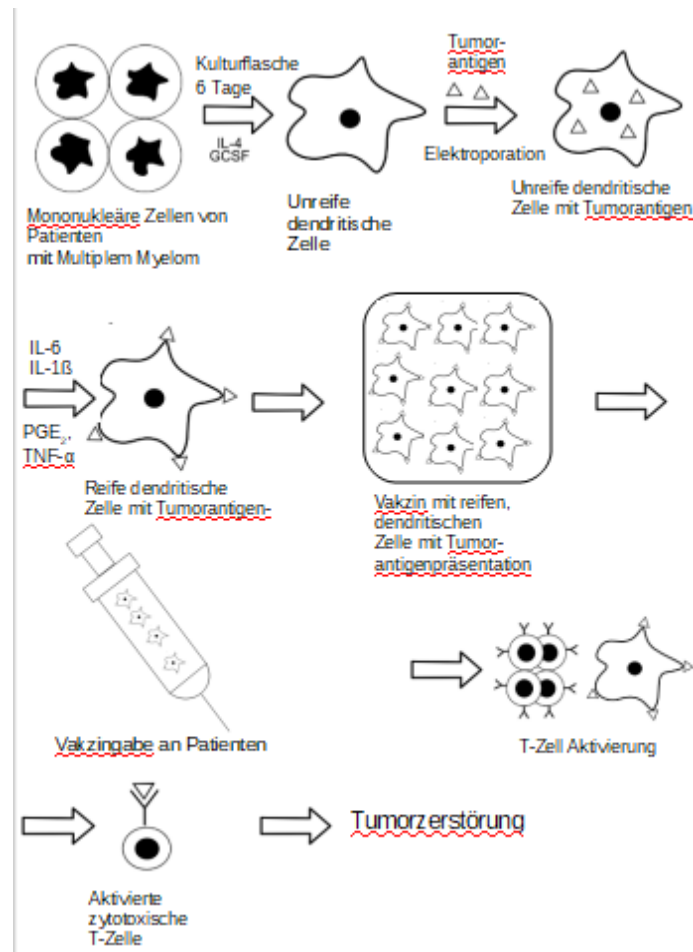
Auch mit HM1.24-mRNA transfizierten DC gelang es, autologe T-Zellen zu einer IFN- $\gamma$ -Freisetzung anzuregen, und zwar sowohl bei einem gesunden Spender als auch bei einem Myelompatienten. Eine Untersuchung von Schmitt et al. zeigte, dass bei allen 458 untersuchten Blutproben von Myelompatienten das HM1.24 Oberflächenmolekül auf den Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. Eine IFN- $\gamma$ -Antwort konnte in vitro in dieser Untersuchung bei 6/12 Patienten nachgewiesen werden [64]. Somit erscheint eine IFN- $\gamma$  -Antwort nach Stimulation von Lymphozyten auf HM1.24 möglich, aber je nach Patient unterschiedlich stark ausgeprägt.

#### **4.4. Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom**

Die aktuelle Behandlung des Multiplen Myeloms ist noch immer stark auf Chemotherapie und autologe Stammzelltransplantation ausgerichtet. Es gibt allerdings auch einige Studien, in denen den Patienten körpereigene DC entnommen und zurückgegeben wurden. So zeigte eine jüngere Studie von Jung et al., dass eine Beladung von DC mit abgetöteten Myelomzellen zu einer klinischen Verbesserung von 66,7% der zwölf in die Studie eingeschlossenen Patienten kam, bei einer viermaligen Gabe der DC [65]. Auch ältere Studien, die von Weinstock et al. untersucht wurden, zeigten ein Ansprechen einiger Patienten auf die Vakzinierung und Gabe dendritischer Zellen [66]. So konnte bei Lacy et al. an 27 Patienten mit Multiplem Myelom, die ein Vakzin mit DC erhalten haben, eine deutlich längere Überlebenszeit von 5,3 Jahren im Vergleich zu 3,4 Jahren gezeigt werden [67]. Diese Studien von Lacy et al und die zitierten Untersuchungen von Weinstock et al [66] sind älter und mit dem Hintergrund der inzwischen neu zugelassenen Therapeutika und Behandlungsstrategien nicht mehr unbedingt vergleichbar in der Effizienz zu etablierten Therapien. In den aktuellen Therapieempfehlungen zeigen sich neben den bekannten Chemotherapeutika und neuen Proteasomeninhibitoren der zusätzliche Einsatz von Antikörpern, insbesondere in der Zweitlinientherapie, und die Entwicklung von CAR-T- Zellen als zelluläre Immuntherapie.

Bei der Antikörpertherapie stellten sich bisher CD38 und BCMA als die wichtigsten Antigene heraus [68]. Auch bei der CAR-T-Zelltherapie ist BCMA eine häufig genutzte Zielstruktur. Eine weitere Neuerung bei der Therapie ist die Kombination zweier Antigene für bispezifische Antikörper. Eines der Antigene befindet sich auf den T-Zellen und das zweite Antigen ist ein tumorassoziiertes Antigen [69]. Diese Antikörper sind bereits im Rahmen klinischer Studien genutzt worden wie z. B. AMG 420 [70].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herstellung von DC effektiv ist. Eine Beladung der Zellen mit einem Antigen wie HM1.24 ist ebenfalls möglich und in vitro zeigen sie die reaktion einer normalen DC. Somit ist die DC Vakzinierung, wie in Abbildung 14 beispielhaft dargestellt, eine Möglichkeit der Behandlung von Patienten. Die hier erfolgten Versuche können eine Vorarbeit für die Etablierung DC spezifischer Vakzine darstellen. Eine Beladung der DC ist auch mit anderen Antigenen möglich und somit ist ein therapeutisches Behandeln bei Patienten mit einem Multiplen Myelom möglich. Es sollten aber weitere systematische Untersuchungen durchgeführt werden.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der Herstellung reifer dendritischer Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom.** Mononukleäre Zellen aus dem Blut (PBMC) von Patienten mit einem Multiplem Myelom werden aus peripher venösem Vollblut isoliert und in der Kulturflasche 6 Tage mit IL-4 und GM-CSF zu DC ausgereift. Die unreife dendritische Zelle wird durch die Elektroporation mit Tumorantigen beladen und anschließend durch Zugabe der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> ausgereift. Die reifen dendritischen Zellen präsentieren das Tumorantigen, dies führt zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und zu einer Tumorzerstörung.

## 5. Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung des Multiplen Myelom in den letzten Jahren ist die Erkrankung in der Regel nicht heilbar und es besteht weiterhin eine dringende Notwendigkeit innovativer Therapieansätze. Ein Ansatz stellt eine aktive Immuntherapie mit Vakzinierung mittels dendritischen Zellen (DC) dar. Ziel dieser Arbeit war es, dendritische Zellen aus Monozyten des peripheren Bluts von Patienten mit einer Myelomerkrankung zu generieren und mit Antigenen zu beladen. Für die Anreicherung von Monozyten aus dem peripheren Blut wurden drei verschiedenen Methoden evaluiert: Plastikadhärenz, CD14-Positivselektion und Monozytenapherese. Prinzipiell erwiesen sich alle 3 Methoden als gut machbar, am besten praktikabel und gut reproduzierbar ist jedoch die Methode der Plastikadhärenz mit einem nur sehr geringen Anteil von Monozyten in der nichtadhärenten Zellpopulation. Durch die Adhärenz kam es zu keinem Vitalitätsverlust. Durch Gabe von IL-4 und GM-CSF wurde nach 6 Tagen eine Maturation der Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen erreicht. Die endgültige Ausreifung erfolgte nach einem weiteren Tag Kultivierung mit einem Zytokin-Cocktail, bestehend aus IL-4, GM-CSF, IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die Ausreifung der DC konnte mit einer durchflusszytometrischen Analyse der Expression von DC-spezifischen Oberflächenmolekülen nachgewiesen werden. Der Anteil CD14-positiver Zellen verringerte sich, während die Expression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR anstieg. Die so gewonnenen DC wurden auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation getestet. Hierzu wurde das auf Myelomzellen exprimierte HM1.24/CD317-Antigen gewählt, da dieses Antigen von malignen Plasmazellen stark überexprimiert wird. Dazu erfolgte eine Elektrotransfektion mit einem HM1.24-kodierenden Plasmid. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die DC mit GFP-mRNA transfiziert. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte die Expression von GFP nachgewiesen werden. Um die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Präsentation von immunogenen Peptiden zu überprüfen, wurden die generierten DC mit einem Peptidgemisch des CMV Antigen pp65 inkubiert und ein IFN- $\gamma$ -Stimulationstest mit Lymphozyten eines CMV-positiven gesunden Spenders durchgeführt. Die Koinkubation der Zellen löste wie erwartet eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus. Die reifen DC wurden daraufhin mit HM1.24 transfiziert und mit den autologen T-Zellen desselben Myelompatienten koinkubiert. Es konnte eine Sekretion von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

Zusammenfassend gelang es in der vorliegenden Arbeit reife dendritische Zellen aus Blutmonozyten von Patienten mit Multiplem Myelom zu generieren. Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten durch die dendritischen Zellen konnte nachgewiesen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Hausschild A, Mohr P. Rationale, Vision und Grenzen der Immunonkologie: Checkpoint-Inhibition als neue Therapiesäule der Tumorthherapie. *Oncol Res Treat* 2015; 38: 2-5.
2. Lamos C, Hunger RE. Checkpoint-Inhibitoren- Indikation und Verwendung bei Melanompatienten. *Z Rheumatol* 2020; 79: 18-25.
3. Weise J, Maune S, Kabelitz D, Heiser A. Bedeutung dendritischer Zellen für die Immuntherapie von Tumorerkrankungen. *HNO* 2005; 53: 117-120.
4. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S. Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99: 2408–2416.
5. Steinmann R, Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 1973; 137: 1142–1162.
6. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davost J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767–811.
7. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *J Immunol* 2013; 140: 22–30.
8. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 571–578.



9. Worah K, Mathan T, Manh TPV, Keerthikumar S, Schreibelt G, Tel J, Duiveman de Boer T, Sköld, AE, van Spriël AB, de Vries IJM, Huynen MA, Wessel HJ, Gloerich J, Dalod M, Lasonder E, Figdor CG, Buschow SI. Proteomics of human dendritic cell subsets reveal subset-specific surface markers and differential inflammasome function. *Cell Reports* 2016; 16: 2953–2966.
10. Murphy K, Weaver C. Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität. In: *Janeway Immunologie*, 9. Auflage 2018, S. 95-173. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
11. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subset an update. *Immunology* 201; 154: 3-20.
12. Ausselin – Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 2005; 4: 461–465.
13. Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function. *Immunity* 2019; 50: 37–50.
14. Pogorzelska–Dyrbuś J, Szepietowski JC. Density of Langerhans cells in nonmelanoma skin cancers: a systematic review. *Mediators Inflamm* 2020; 2020: 8745863.
15. Bennet C, Noordegraaf M, Martina C, Clausen BE. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol* 2007; 179: 6830-6835.
16. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Bancherau J. GM–CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360: 258–261.
17. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179: 1109–1118.

18. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte – derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 2007; 26: 519–531.
19. Eguíluz – Garcia I, Bosco A, Dollner R, Melum GR, Lexberg MH, Jones AC, Dheyauldeen SA, Holt PG, Bækkvold ES, Jahnsen FL. Rapid recruitment of CD14<sup>+</sup> monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 1872–1881.
20. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003; 170: 4069–4076.
21. Greaves P, Gribben J. The role of the B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* 2013; 5: 734-744.
22. Liang-Yi Z, Tedder T. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunology* 1996; 93: 2588–2592.
23. Chen X, Shao Q, Hao S, Zhao Z, Wang Y, Guo X, He Y, Gao W, Mao H. CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. *Oncotarget* 2017; 8: 13703-13715.
24. Renz H, Gierten B, Major Histocompatibility Complex. In: Gressner AM, Arndt T. (Hrsg), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* 2019; S. 1560, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
25. Lipscomb M, Masten B. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Phys Rev* 2002; 82: 97–130.
26. Embgenbroiche M, Burgdorf S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front Immunol* 2018; 9: 1643.

27. Sinisalo M, Laine O. Multiples Myelom. Schweiz Med Forum 2019; 19: 659–660.
28. Corradini S, Belka C, Plasswilm L. Strahlentherapie bei solitärem Plasmozytom oder multiplem Myelom. Onkologe 2010; 16: 294–297.
29. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut (Hrsg). Berlin, 2016.  
Online unter URL:  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples\\_myelom\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html) [letzter Abruf 08.12.2020].
30. Goede V. Multiples Myelom bei Älteren. Z Gerontol Geriat 2020; 53: 263–272.
31. Schmalzing M, Tony HP, Knop S. Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz und multiples Myelom. Z Rheumatol 2017; 76: 33-37.
32. Griesshammer M, Minden JWK. Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms. 2019. Online unter URL: [https://www.cme-point.de/Fortbildungen/2228\\_Myelom\\_Diagnostik\\_CME\\_web.pdf](https://www.cme-point.de/Fortbildungen/2228_Myelom_Diagnostik_CME_web.pdf) [letzter Abruf 12.12.2020].
33. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Harousseau JL, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol 2005; 23: 3412-3420.
34. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltafirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spender A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BGM, Anderson KC, Sonneveld P, Miguel JS, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international Myeloma Working Group. J Clin Oncol 2015; 33: 2863-2869.

35. Durie BGM, Salmon SE: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975; 36: 842-854.
36. Dimopoulos MA, Jakubowiak AJ, McCarthy PL, Orlowski RZ, Attal M, Bladé J, Goldschmidt H, Weisel KC, Ramasamy K, Zweegman S, Spencer A, Huang JSY, Lu J, Sunami K, Lida S, Chng WJ, Holstein SA, Rocci A, Skacel T, Labotka R, Palumbo A, Anderson KC. Developments in continuous therapy and maintenance treatment approaches for patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2020; 10: 17.
37. Baertsch MA, Goldschmidt H. Multiples Myelom. *Internist* 2017; 58: 1250–1257.
38. Soekojo CY, Kumar SK. Stem-cell transplantation in multiple myeloma: how far have we come? *Ther Adv Hematol* 2019; 10: 1-16.
39. Einsele H, Höffken K. Multiples Myelom. *Onkologe* 2018; 24: 574-577.
40. Buchholz CJ, Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Keller-Stanislawski B. CAR-T-Zell-Therapie: Aussichten und Risiken. *Dtsch Ärztebl* 2018; 1: 38-41.
41. Siegmund-Schultze N. CAR-T-Zellen in der Praxis Lebende Onkologika in der “Routineversorgung” *Dtsch Ärztebl*. 2019; 116: 26-31.
42. Wudhikarn K, Mailankody S, Smith EL. Future of CAR T cells in multiple myeloma. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2020; 1: 272-279.
43. Fukimoto K, Nakashima S, Uchida S, Amen RNS, Ishii Y, Hirota Y, Tanaka Y. HM1.24/BST-2 is constitutively poly-ubiquitinated at the N-terminal amino acid in the cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Rep* 2020; 23: 100784.
44. Erikson E, Adam T, Schmidt S, Lehmann-Koch J, Over B, Goffinet C, Harter C, Bekerredjian-Ding I, Sertel S, Lasitschka F, Keppler OT. In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 13688-13693.

45. Ozaki S, Kosaka M, Wakatsuki S, Abe M, Koishihara Y, Matsumoto T. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood* 1997; 8: 3179-3186.
46. Wang Y, Xiang Y, Xin VW, Wang XW, Peng XC, Liu XC, Wong D, Li N, Cheng JT, Lyv YN, Cui SZ, Ma Z, Zhang Q, Xin HW. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2020; 13: 107.
47. Delirez N, Shojaeefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J* 2013; 15: 218-223.
48. Singh MV, Suwunnakorn S, Simpson SR, Weber EA, Singh VB, Kalinski P, Maggirwar SB. Monocytes complexed to platelets differentiate into functionally deficient dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2020; 10: 1-14.
49. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tütung T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cells as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-Cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer*. 2001; 93: 243–251.
50. Schaller T, Sampson J. Advances and challenges: dendritic cell vaccination strategies for glioblastoma. *Expert Rev Vaccines* 2017; 16: 27-36.
51. Zhang H, Wang Y, Wang QT, Sun SN, Li SY, Shang H, He YW. Enhanced human T lymphocyte antigen priming by cytokine-matured dendritic cells overexpressing Bcl-2 and IL-12. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 205.
52. Castiello L, Sabatton M, Jin P, Clayberger C, Marincola FM, Krensky AM, Stroncek DF. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 457-466.

53. El-Sahrigy SA, Mohamed NA, Talkhan HA, Rahman AM. Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial. *Cent Eur J Immunol* 2015; 40: 18-24.
54. Hopewell E, Cox C. Manufacturing dendritic cells for immunotherapy: monocyte enrichment. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020; 16: 155-160.
55. Ratta M, Fagnoni F, Curti, Vescovini R, Sansoni P, Oliveiro B, Fogli M, Ferri E, Robustelli Della Cuna G, Tura Sante, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic cell are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 2002; 100: 230-237.
56. Shinde P, Fernandes S, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Compromised functionality of monocyte-derived dendritic cells in multiple myeloma patients may limit their use in cancer immunotherapy. *Sci Rep* 2018 8: 5705.
57. Dosani T, Covut F, Beck R, Driscoll JJ, de Lima M, Malek E. Significance of the absolute lymphocyte/monocyte ratio as a prognostic immune biomarker in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2017; 7(6): e579.
58. Oostvogel R, Kneppers E, Minnema MC, Doorn RC, Franssen LE, Aarts T, Emmelot ME, Spierings E, Slaper-Cortenbach I, Westinga K, Goulmy E, Lokhorst HM, Mutis T. Efficiency of host-dendritic cell vaccinations with or without minor histocompatibility antigen loading, combined with donor lymphocyte infusion in multiple myeloma patients. *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 228-237.
59. Vorstellung des KLH der Firma biosyn Arzneimittel GmbH auf der Firmenwebseite. Online unter URL: <https://biosyn.at/klh/> [letzter Abruf 27.03.2021].

60. Chung D, Romano E, Pronschinske KB, Shyer JA, Mennecozzi M, St Angelo ET, Young JW. Langerhans-type and monocyte-derived human dendritic cells have different susceptibilities to mRNA electroporation with distinct effects on maturation and activation: implications for immunogenicity in dendritic cell-based immunotherapy. *J Transl Med* 2013; 11: 1-10.
61. Bae J, Tai YT, Anderson KC, Munshi NC. Novel epitope evoking CD138 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Br J Cancer* 2013; 155: 349-361.
62. Kim N, Nam YS, IM KI, Lim JY, Jeon YW, Song Y, Lee JW, Cho SG. Robust production of cytomegalovirus pp65-specific T cells using a fully automated IFN- $\gamma$  cytokine capture system. *Transfus Med Hemother* 2018; 45: 13-22.
63. Barabas S, Spindler T, Kiener R, Tonar C, Lunger T, Batzilla J, Bendfeld H, Rasclé A, Asbach B, Wagner R, Demi L. An optimized IFN- $\gamma$  ELISpot assay for the sensitive and standardized monitoring of CMV protein-reactive effector cells of cell-mediated immunity. *BMC Immunol* 2017; 18: 14.
64. Schmitt M, Hückelhoven AG, Hundemer M, Schmitt A, Lipp S, Emde M, Salwender H, Hänel M, Weisel K, Bertsch U, Düring J, HO AD, Blau IW, Goldschmidt H, Seckinger A, Hose D. Frequency of expression and generation of T-cell responses against antigens on multiple myeloma cells in patients included in the GMMG-MM5 trial. *Oncotarget* 2016; 8: 84847-84862.
65. Jung SH, Lee HJ, Lee YK, Yang DH, Kinm HJ, Rhee JH, Emmrich F, Lee JJ. A phase I clinical study of autologous dendritic cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8: 41538-41548.
66. Weinstock M, Rosenblatt J, Aviban D. Dendritic cell therapies for hematologic malignancies. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 5: 66-75.

67. Lacy MQ, Madrekar S, Dispenzieri A, Hayman S, Kumar S, Buadi F, Dingli D, Litzow M, Wettstein P, Douglas P, Kabat B, Gastineau D, Rajkumar SV, Gertz MA. Idiotypic-pulsed antigen presenting cells following autologous transplantation for multiple myeloma may be associated with prolonged survival. *Am J Hematol* 2009; 84: 799-802.
68. Kriegsmann K, Kriegsmann M, Cremer M, Schmitt M, Dreger P, Goldschmidt H, Müller-Tidow C, Hundemer M. Cell-based immunotherapy approaches for multiple myeloma. *Br J Canc* 2019; 120: 38-44.
69. Zanwar S, Nandakumar B, Kumar S. Immune-based therapies in the management of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2020; 10: 84
70. Topp MS, Duell J, Zugmaier G, Attal M, Moreau P, Langer C, Krönke J, Facon T, Salnikow AV, Lesley R, Beutner K, Kalabus J, Rasmussen E, Riemann K, Minella AC, Munzert G, Einsele H. Anti-B-cell maturation antigen BiTE molecule AMG 420 induces responses in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2020; 38: 775-783.



## **7. Eigene Veröffentlichungen**

Schub N, Gahn B, Catalcali J, Staudinger M, Humpe A, Heiser A, Repp R, Gramatzki M.  
Dendritic cells generated from elutriated monocytes under GMP-conditions can be  
electrotransfected with superior efficiency. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 413.  
DOI 10.1007/s00262-006-0201-3 (Poster 21)

## 8. Danksagung

Bei Prof. Dr. Roland Repp bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Martin Gramatzki und Frau Professor Claudia Baldus für die Möglichkeit, die Arbeit im Dr. Mildred Scheel Haus durchführen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Matthias Staudinger und Dr. Natalie Schub für die Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ein ganz großer Dank gilt PD Dr. Renate Burger, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt hat. Ihre freundliche Betreuung hat die Vollendung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Ich möchte mich bei Kathrin Richter und Tanja Ahrens bedanken, die mich bei der praktischen Arbeit im Labor unterstützt haben. Des Weiteren möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des GMP-Labors bedanken, die mir bei Problemen jederzeit zur Seite standen.

Ein ganz großer Dank gilt meinem Ehemann Michael, der mir immer zur Seite stand und mich geduldig unterstützte.

Großer Dank gebührt auch meiner Mutter und Schwiegermutter, die die Betreuung unserer Tochter übernahmen und somit großen Anteil an der Fertigstellung der Arbeit hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Patienten, die freundlicherweise ihr Blut zur Verfügung gestellt haben und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

## 9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass ich meine vorliegende Abschlussarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel - insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen - benutzt habe.

Die Arbeit wurde vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht und die eingereichte schriftliche Fassung entspricht derjenigen auf dem elektronischen Speichermedium.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Kiel, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift (Vor- und Nachname)

## 10. Anhang

**Tabelle 24: Übersicht über die Patienten mit Multiplem Myelom.** Die Auflistung beinhaltet die Therapielinien bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

<b>Patient</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Zeitpunkt Erstdiagnose und Stadieneinteilung nach Salmon/Durie (34)</b>	<b>Therapielinien</b>
1	65	m	08/2005 II A	08-09/2005 ID 10/2005 IEV
2	67	m	05/2005 III A	05-09/2005 4x VAD 12/05 IEV
3	69	w	03/2003 I	06-08/2005 3x Velcade 5x MEL
4	46	m	09/2004 III A	11/04-02/2005 VID 03/2005 IEV 05/2005 MEL 200 und autologe PBSCT
5	54	w	03/2004 III A	04-05/2004 2x VAD 04-05/2004 Radiatio 07/2004 IEV 09/2004 MEL und autologe PBSCT 12/2004 MEL und autologe PBSCT 01/2006 Thalidomid
6	70	m	02/2001 I A	12/2004 + 02/2005 MEL und Prednisolon 02-09/2005 Thalidomid 09/2005-03/2006 Bortezomib
7	64	m	08/2005 I A	03-05/2005 3x ID 05/2005 IEV 07/2005 MEL 140 und autologe PBSCT

Patient	Alter	Geschlecht	Zeitpunkt Erstdiagnose und Stadieneinteilung nach Salmon/Durie	Vortherapie
8	56	w	09/2004 III	10-11/2004 2x ID 12/2004-01/2005 2x IEV 02-05/2005 3x TCED 05/2005 Cyclophosphamid 10/2005 Cyclophosphamid 11/2005 Thalidomid und Dex
9	63	m	03/2001 III A	04-07/2001 4x ID 05-06/2001 Radiatio der BWS/LWS 10/2001 IEV 02/2002 MEL seit 01/2005 Velcade
10	65	w	12/1998 I A	01-03/99 3x MEL 09/02-01/2003 4x VAD 02-06/2003 IFN- $\gamma$ 02-03/2005 IEV 05/2005 MEL und autologe PBSCT 12/2005 MEL und autologe PBSCT
11	62	m	12/2001 III A	3x ID 05/2002 IEV 11/2002 MEL 200 und autologe PBSCT 05/2003–06/2004 2x Velcade 12/2005 IEV
12	64	w	01/2004 III A	07/2004-02/2005 6x ID 06/2005 IEV 11/2005 MEL 140 und autologe PBSCT
13	67	w	07/05 III B	Keine Therapie

<b>Patient</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Zeitpunkt Erstdiagnose und Stadieneinteilung nach Salmon/Durie</b>	<b>Vortherapie</b>
14	53	m	08/2005 II A	08-11/2005 3x ID 11/2005 IEV 02/2006 MEL 200 und autologe PBSCT
15	56	w	06/2005 III B	08-11/2005 3x VAD 12/2005 IEV
16	47	m	07/2005 III A	07-10/2005 3x VAD 11/2005 IEV
17	58	m	04/2003 II A	12/2004-02/2005 3x VAD 03/2005 IEV 06/2005 MEL 140 und autologe PBSCT
18	49	m	12/2001 III A	09-12/2003 ID 01/2004 IEV 05/2004 Dex 06/2004 MEL 200 und autologe PBSCT 11/2004 MEL 200 und autologe PBSCT 09-11/2005 Thalidomid 15/2005 Velcade 10.01.2006 MEL 220 und autologe PBSCT