

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Untersuchungen zum Einfluss des Deubiquitinase Inhibitors
b-AP15 auf Phänotyp und Funktion humaner dendritischer
Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Aldörfer, Vanessa Sophie

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach
2. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 13.07.2021

Für meine Eltern.

*Zum Gedenken und in ewiger Liebe für meine
beiden Großmütter Anne und Irene.*

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	7
II.	Abbildungsverzeichnis	9
III.	Tabellenverzeichnis	10
1.	Einleitung	11
1.1	Das Immunsystem	11
1.1.1	Angeborene und erworbene Immunität	11
1.1.2	Zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems	12
1.2	Dendritische Zellen (DC)	13
1.2.1	Subtypen und Entwicklung der DC	14
1.2.2	DC-Ausreifung, Phänotyp und T-Zell-Interaktion	15
1.2.3	DC-Vakzinierung	16
1.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System	18
1.4	Bortezomib	20
1.4.1	Effekte von Bortezomib auf DC	21
1.5	Der Deubiquitinase Inhibitor b-AP15	21
1.6	Zielsetzung der Arbeit	23
2.	Material	24
2.1	Geräte	24
2.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.3	Reagenzien	27
2.4	Pharmaka	28
2.5	Zytokine	29
2.6	Mitogene	29
2.7	Enzyme	29

2.8	Antikörper.....	30
2.9	Medien	31
2.10	Computerprogramme	32
3.	Methoden.....	33
3.1	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation	33
3.2	Bestimmung der Zellzahl.....	34
3.3	MoDC-Generierung aus plastikadhärenten Monozyten	34
3.4	Ernte der MoDC	35
3.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
3.5.1	Kompensation	36
3.5.2	FACS-Färbung der MoDC.....	38
3.6	Durchflusszytometrische Analyse von MoDC.....	39
3.7	Messung der Migrationsfähigkeit von MoDC in Transwell-Migration-Assays	40
3.8	Phagozytoseassay (FITC-Dextran-Phagozytose)	41
3.9	CFSE-Proliferationsassay	42
3.10	Statistische Analyse	43
4.	Vorarbeiten zu dieser Arbeit.....	44
5.	Ergebnisse.....	46
5.1	Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von MoDC.....	46
5.1.1	Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von unreifen (immature) iMoDC	46
5.1.2	Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von reifen mMoDC	49
5.2	Einfluss von b-AP15 auf die Funktion von MoDC	53
5.2.1	Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von iMoDC	53
5.2.2	Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von mMoDC	57

5.2.3	Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von unreifen iMoDC	58
5.2.4	Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von reifen mMoDC	59
5.3	Proliferationsassays (CFSE)	61
5.3.1	Proliferationsassays (CFSE) mit unreifen iMoDC als Stimulator-Zellen	61
5.3.2	Proliferationsassays (CFSE) mit reifen mMoDC als Stimulator-Zellen	62
6.	Diskussion	64
6.1	Adoptive Immuntherapie unter Verwendung von DCs	64
6.2	Zielgerichtete Therapien („targeted therapies“) – Proteasomeninhibitoren	64
6.3	Bortezomib beeinflusst Phänotyp und Funktion von DC	65
6.4	Effekte von b-AP15 auf MoDC	66
6.5	Klinische Relevanz und Ausblick	70
6.6	Limitierende Faktoren dieser Arbeit	71
7.	Zusammenfassung	72
8.	Literaturverzeichnis	73
9.	Erklärung zum Eigenanteil	85
10.	Veröffentlichungen	86
11.	Danksagung	87

I. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
cDC	konventionelle dendritische Zellen
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUB	Deubiquitinase
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host Reaktion
HLA	Humane Leukozytenantigene
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-4	Interleukin-4
iMoDC	unreife (immature) MoDC
INF- γ	Interferon- γ
LPS	Lipopolysaccharid
MCL	Mantelzelllymphomzellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mip-3 β	Macrophage inflammatory protein 3 β
mMoDC	reife (mature) MoDC
MoDC	Monocyte derived DC
NK-Zellen	natürliche Killer Zellen
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS	Phosphate Buffered Saline
pDC	plasmazytoide dendritischen Zellen
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PHA	Phytohämagglutinin
PRR.....	Mustererkennungsrezeptor
SFI.....	spezifische Fluoreszenzintensität
SSC.....	Seitwärtsstreulicht
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UCHL5	Ubiquitin-C-Terminal-Hydrolase 5
UPS.....	Ubiquitin-Proteasom-System
USP14.....	Ubiquitin-spezifische Protease 14

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veränderung des Phänotyps durch die Ausreifung von DC	16
Abbildung 2: Verteilungsschema der Zellsuspension auf die Röhrchen b - e	37
Abbildung 3: Dosisabhängiger Einfluss von b-AP15 auf die Lebensfähigkeit von MCL	44
Abbildung 4: Zeitabhängiger Einfluss von b-AP15 auf die Lebensfähigkeit von MCL	45
Abbildung 5: Effekte von Bortezomib und b-AP15 auf den Phänotyp von iMoDC	47
Abbildung 6: Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von iMoDC	49
Abbildung 7: Effekte von Bortezomib und b-AP15 auf den Phänotyp von mMoDC	50
Abbildung 8: Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von mMoDC	52
Abbildung 9: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von iMoDC (Zeitspanne: 3h)	54
Abbildung 10: Exemplarische Migrationsmessung (iMoDC)	55
Abbildung 11: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von iMoDC (Zeitspanne: 16h)	56
Abbildung 12: Exemplarische Migrationsmessung (mMoDC)	57
Abbildung 13: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von mMoDC (Zeitspanne: 16h)	58
Abbildung 14: Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von iMoDC	59
Abbildung 15: Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von mMoDC	60
Abbildung 16: Einfluss von b-AP15 auf die T-Zell-Aktivierung durch iMoDC	62
Abbildung 17: Einfluss von b-AP15 auf die T-Zell-Aktivierung durch mMoDC	63

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	24
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3: Reagenzien	27
Tabelle 4: Pharmaka	28
Tabelle 5: Zytokine	29
Tabelle 6: Mitogene	29
Tabelle 7: Enzyme	29
Tabelle 8: Antikörper	30
Tabelle 9: Zellkulturmedien	31
Tabelle 11: Computerprogramme	32
Tabelle 12: Vorlegen der Antikörper für die FACS-Kompensation	37
Tabelle 13: Herstellung der Antikörper-Mastermixe für die FACS-Färbung	38

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist fortwährend an der Abwehr vielfältiger Bedrohungen für den menschlichen Körper durch unterschiedliche Krankheitserreger beteiligt. Hierfür ist eine große Variationsbreite spezialisierter Zellen sowie auch anatomische und physikalische Barrieren notwendig.

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem wird in eine angeborene und eine erworbene Komponente unterteilt. Zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Mastzellen, Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) sowie Granulozyten. Ihre Aufgabe ist es möglichst schnell auf potenzielle Krankheitserreger zu reagieren. Hierfür erkennen diese Zellen spezifische Muster, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (englisch: pathogen-associated molecular patterns; PAMPs), welche charakteristisch für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind. Hierzu gehören bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, mannosereiche Oligosaccharide oder auch unmethylierte CpG-DNA. Alle PAMPs haben gemeinsam, dass sie zwar in vielen Krankheitserregern nicht aber in körpereigenen Zellen vorkommen [1]. Im Gegensatz zur erworbenen Immunität, welche auf antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten beruht und in der Lage ist spezifisch auf bestimmte Krankheitserreger zu reagieren, besitzt die angeborene Immunität eine geringe Spezifität. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass die Effektorzellen der angeborenen Immunität nur eine begrenzte Anzahl an sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (englisch: pattern recognition receptors, PRRs), zu denen auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören, zur Erkennung von Krankheitserregern exprimieren. Die Lymphozyten der erworbenen (adaptiven oder spezifischen) Immunität hingegen exprimieren spezialisierte

Antigenrezeptoren: Jeder Lymphozyt trägt eine spezifische Variante des Antigenrezeptors, wodurch im menschlichen Organismus ein erhebliches Repertoire an unterschiedlichen, aber dafür hochspezifischen Antigenrezeptoren entsteht. Nach Antigenkontakt kommt es zur selektiven Aktivierung und klonalen Proliferation der Lymphozyten, die den entsprechend passenden Antigenrezeptor tragen. Allerdings nimmt der Vorgang der klonalen Proliferation einige Tage in Anspruch, weshalb das erworbene Immunsystem mehr Zeit benötigt, bis ausreichend Effektorzellen zur Bekämpfung des Pathogens zur Verfügung stehen als dies beim angeborenen Immunsystem der Fall ist. Desweiteren besitzt das adaptive Immunsystem die Fähigkeit Gedächtniszellen und somit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, wodurch bei einem erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Krankheitserreger die Abwehrreaktion schneller und stärker ausfallen kann. Die Lymphozyten der erworbenen Immunität müssen erst durch die Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) sowie costimulatorische Signale der angeborenen Immunität aktiviert werden. So aktivieren beispielsweise DC, als professionelle APZ, T-Lymphozyten, regen diese zur Proliferation an und stellen somit eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Für eine effektive Immunabwehr ist also das Zusammenspiel von erworbener und angeborener Immunität essenziell.

1.1.2 Zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems

Das Immunsystem wird in zelluläre sowie humorale Anteile gegliedert. Die Leukozyten stellen hierbei den zellulären Anteil dar und entstehen im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Hierbei gehen Monozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie Granulozyten jeweils aus gemeinsamen myeloischen Progenitorzellen hervor, während sich B-, T- sowie NK-Zellen jeweils aus gemeinsamen lymphoiden Progenitorzellen entwickeln [2, 3]. Die humoralen Bestandteile des Immunsystems setzen sich zusammen aus den Akute-Phase-Proteinen, dem Komplementsystem, diversen Immunglobulinen sowie verschiedenen Zytokinen, körpereigenen regulatorischen Proteinen, die der Signalübertragung zwischen den Zellen

dienen [4].

1.2 Dendritische Zellen (DC)

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit in den 1970er Jahren durch Ralph Steinman und Zanvil Cohn entdeckten DC [5–8]. DC sind professionelle APZ, mit der einzigartigen Fähigkeit primäre Immunantworten zu initiieren. Zur Aktivierung von bis zu 3000 antigenspezifischen T-Zellen ist nur eine DC notwendig [9]. Dies macht sie zu den potentesten APZ des menschlichen Immunsystems [10, 11]. Sogenannte „unreife DC“ residieren im extrazellulären Milieu der meisten peripheren Gewebe und sind somit in der Lage jederzeit die Anwesenheit von Pathogenen zu detektieren [10, 11]. Hierfür exprimieren sie PRRs an der Zelloberfläche, welche der Erkennung von für Krankheitserreger spezifischen PAMPs dienen und somit, im Zusammenspiel mit diversen inflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen, zur „Ausreifung“ der DC führen [1]. Diese aktivierten, „reifen DC“ präsentieren auf der Zelloberfläche prozessierte Antigene auf MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex; englisch: Major histocompatibility complex; MHC) und wandern via Chemotaxis in den nächstgelegenen Lymphknoten. Dort treten sie mit T-Zellen in Kontakt und induzieren die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Sie stellen somit das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar [12]. Die Art der induzierten Immunantwort (T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (T_H1), vom Typ 2 (T_H2), regulatorische T-Zellen (T_{reg})) wird des Weiteren durch die Sekretion von Zytokinen und Expression von Chemokinen/Chemokinrezeptoren entscheidend geprägt. Moleküle von Pathogenen, wie LPS, bakterielle CpG-DNA, und ds RNA, die ihre Effekte über TLRs mediiieren, sowie T-Zellsignale, wie der CD40-Ligand und INF- γ induzieren in DC eine IL-12-Produktion und damit T_H1 -Antworten. Antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10, TGF- β , Prostaglandin-D2 und Kortikosteroide inhibieren dagegen eine Ausreifung der DC und die IL-12-Produktion und induzieren damit T_H2 - oder regulatorische T-Zell Antworten [13, 14]. Die einzigartige Rolle dieser APZ als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität sowie ihre erhebliche immunogene Potenz führte auch zur

Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze im Sinne einer DC-Vakzinierung [15, 16].

1.2.1 Subtypen und Entwicklung der DC

Es hat sich gezeigt, dass DC eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen, welche in der Lage ist, unterschiedliche und teils gegensätzliche immunregulatorische Funktionen zu erfüllen [17]. Als einzige Zellen des Immunsystems können DC sowohl lymphoide als auch myeloide Progenitorzellen besitzen [18–23].

Die verschiedenen DC-Typen tragen in unterschiedlicher Weise dazu bei Immunreaktionen gegen spezifische Pathogene zu induzieren [9]. DC können in zwei Hauptkategorien unterschieden werden: die konventionellen DC (cDC) und die plasmazytoiden DC (pDC) [9]. Beide entwickeln sich über verschiedene Zwischenstufen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Während pDC große Mengen an Interferon produzieren und ihre Aktivierung unerlässlich bei der Einleitung antiviraler Immunreaktionen ist, lassen sich die cDC wiederum in zwei Untergruppen einteilen [9, 24]. Die residuellen DC, welche direkt in den lymphatischen Organen Antigene aufnehmen und präsentieren und die migratorischen DC (z. B. Langerhans-Zellen und interstitielle DC), welche sich in ihrer unreifen Form in den peripheren Geweben aufhalten und dann als reife DC über die afferenten Lymphbahnen in die Lymphknoten wandern [9].

Im Rahmen eines akuten Entzündungsgeschehens können sich z. B. inflammatorische DC aus Monozyten entwickeln [19, 25]. Auch die migratorischen DC, insbesondere die Langerhans-Zellen der Haut, sind monozytären Ursprungs [26].

Sallusto und Lanzavecchia [27] sowie Romani *et al.* [28] konnten 1994 zeigen, dass sich humane CD14⁺ Monozyten in der Zellkultur (*in vitro*) mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (englisch: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) sowie IL-4 zu sogenannten „Monocyte derived DC“ (MoDC) differenzieren lassen. Da MoDC den cDC des peripheren Blutes bei der Antigeninternalisierung und -prozessierung sowie auch der

immunstimulatorischen Funktion sehr ähnlich und zudem leicht verfügbar bzw. herstellbar sind, dienen sie als *In-vitro*-Modell für experimentelle Untersuchungen [19, 24, 27, 29, 30] und als Adjuvanz bei verschiedenen Vakzinierungsstrategien.

1.2.2 DC-Ausreifung, Phänotyp und T-Zell-Interaktion

Unreife und reife DC unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrem Phänotyp. Während unreife DC vor allen Dingen dem Erkennen und der Aufnahme von Antigenen über Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose, unter anderem über den Mannose-Rezeptor DC-SIGN [31], oder Makropinozytose dienen, besteht die vorrangige Aufgabe der reifen DC in der Antigenpräsentation und Induktion der T-Zell-vermittelten Immunität [22, 31–33]. Unreife DC, welche in fast allen Organen und peripheren Geweben als „Wächter des Immunsystems“ patrouillieren, werden durch Kontakt zu Pathogenen oder inflammatorischen Stimuli wie bspw. LPS oder bakterielle DNA zur Ausreifung gebracht. Hierfür exprimieren sie Rezeptoren aus der TLR- sowie TNF-Rezeptor-Familie [33]. Während des Ausreifungsprozesses vermindern die DC ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme (Endozytose- und Phagozytose-Rezeptoren wie DC-SIGN werden herabreguliert) und verstärken dafür die Expression costimulatorischer Moleküle wie beispielsweise CD80 und CD86, welche für die T-Zell-Aktivierung als costimulatorische Signale notwendig sind [22]. Ein weiterer Reifungsmarker ist CD83, der ebenfalls der T-Zell-Aktivierung dient [34–36]. Desweiteren kommt es zur vermehrten Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7, welcher die Migration zu den drainierenden Lymphknoten steuert [37]. Dort treten die DC in der sogenannten T-Zellzone in Kontakt mit T-Zellen. Die aufgenommenen Antigene werden prozessiert und können im Falle von phagozytierten extrazellulären Antigenen über MHC-Klasse-II oder im Falle von intrazellulär prozessierten Proteinfragmenten, die z. B. von zytoplasmatischen Bakterien, Viren oder körpereigenen Proteinen stammen über MHC-Klasse-I präsentiert werden. Über MHC-I werden CD8⁺ zytotoxische T-Zellen der zellulären Immunantwort und über MHC-II CD4⁺ T-Helferzellen der humoralen Immunantwort aktiviert. HLA-DR ist ein ausschließlich von APZ exprimierter

MHC-Klasse-II-Oberflächenrezeptor, der bei der Ausreifung der DC ebenfalls hochreguliert wird [9]. Bei der Ausreifung verändert sich also der Phänotyp der DC entsprechend ihrer veränderten Funktion (siehe **Abbildung 1**).

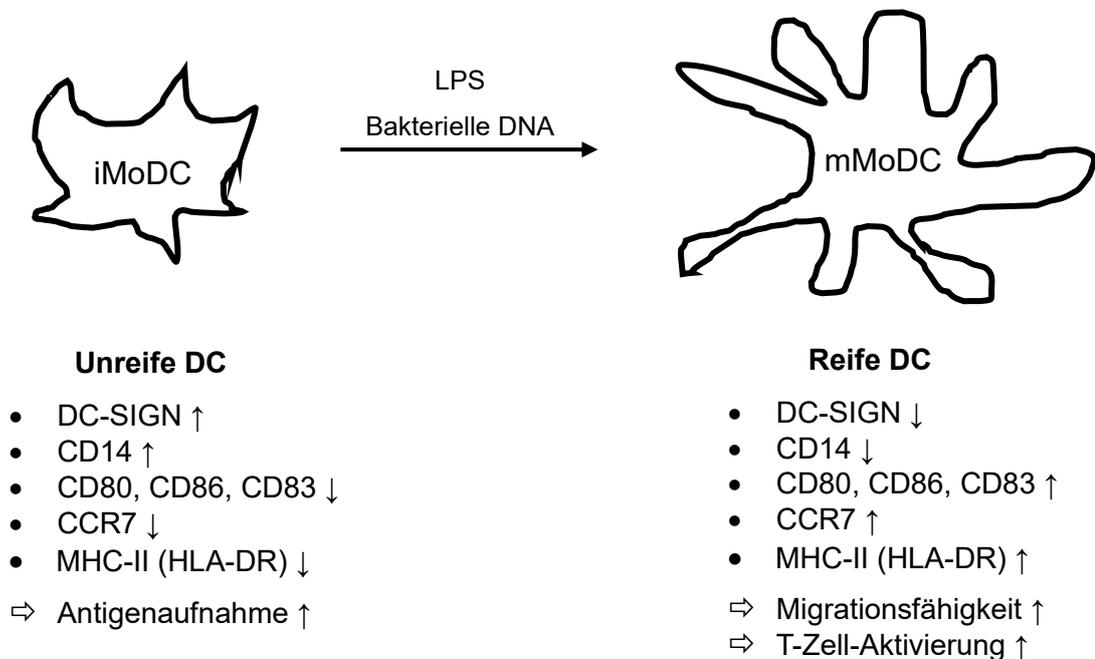


Abbildung 1: Veränderung des Phänotyps durch die Ausreifung von DC. Unreife DC (iMoDC) können durch verschiedene Stimuli wie bspw. LPS zur Ausreifung gebracht werden. Während dieses Vorgangs kommt es zu typischen Veränderungen des Phänotyps entsprechend der neu gelagerten Funktion der reifen DC (mMoDC).

1.2.3 DC-Vakzinierung

Schon 1995 konnte für Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem Melanom gezeigt werden, dass durch die DC-Vakzinierung mit autologen peptidbeladenen MoDC eine antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort ausgelöst wird [38]. Seither wurden zahlreiche präklinische und klinische Studien mit den unterschiedlichsten Tumorarten unter anderem Prostatakarzinomen, Lymphomen, Myelomen, Nierenzellkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen durchgeführt [14, 39–44]. Zusammengefasst konnten sie zeigen, dass die DC-Vakzinierung eine sichere Methode zur Bekämpfung von

Tumoren darstellen könnte. Allerdings war die Effizienz der DC-Vakzinierung in mehreren bisher durchgeführten klinischen Studien nicht wie erhofft [14, 39, 45, 46]. Hieraus lässt sich die im Sinne einer Effektivitätssteigerung notwendige Kombination der DC-Vakzinierung mit anderen antitumoralen Therapien ableiten. Für die DC-Vakzinierung werden autologe DC *in vitro* aus CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen oder aus Monozyten des peripheren Blutes des entsprechenden Patienten generiert [45]. Diese DC werden dann *ex vivo* mit tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen des jeweiligen Tumors des Patienten beladen und zur Ausreifung gebracht. Als Antigene können hierbei beispielsweise Tumorzelllysate, vom Tumor stammende bzw. abgeleitete Proteine/Peptide, sowie (synthetische) DNA oder RNA dienen. Die reifen, beladenen DC werden dem Patienten zurückinjiziert, um eine spezifisch gegen die malignen Zellen des jeweiligen individuellen Tumors des Patienten gerichtete T-Zellantwort zu induzieren [45, 47, 48].

Mit Sipuleucel-T (Provenge[®], APC8015) war kurzzeitig bereits ein DC-Vakzin für Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom bei Progress trotz Androgendeprivation zugelassen [49, 50]. Die Zulassung erfolgte in den USA im April 2010 und in der EU im September 2013, wurde dann jedoch auf Antrag des Zulassungsinhabers 2015 ohne Angabe von Gründen widerrufen. Zuvor konnte zudem durch das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen in seiner Nutzerbewertung kein Zusatznutzen des Präparats festgestellt werden. Sipuleucel-T setzte sich zusammen aus autologen DC, die *ex vivo* mit dem Fusionsprotein PA2024 beladen wurden. Bei PA2024 handelt es sich um die prostataspezifische saure Phosphatase als Tumorantigen, die mit GM-CSF fusioniert ist [49]. Für Patienten mit metastasiertem progredientem Prostatakarzinom konnte im Vergleich zu Placebo ein um 4 Monate verlängertes medianes Überleben für die Therapie mit Sipuleucel-T gezeigt werden [50]. Zudem ergab sich eine erhöhte 3-Jahres-Überlebensrate [50], jedoch ohne eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens [51]. Die beobachteten Nebenwirkungen waren reversibel, direkt infusionsassoziiert und gut beherrschbar [51]. Autoimmunphänomene wie sie bei Immuntherapien auftreten können, wurden nicht beobachtet [51].

1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Als elementarer Bestandteil für die funktionelle Integrität der Zellen stellt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) die Regulierung der Proteinaktivität sowie die Qualitätskontrolle durch Beseitigung bspw. fehlgefalteter Proteine sicher. Schätzungsweise werden mehr als 80 % der intrazellulären Proteine über dieses System abgebaut [52, 53]. Neben der regulatorischen Funktion während des Zellzyklus, bei der Apoptose sowie der Reaktion der Zelle auf z. B. oxidativen Stress oder DNA-Schädigungen ist das UPS auch an der Signaltransduktion innerhalb der Zelle sowie am Prozess der Antigenpräsentation über HLA-Moleküle wesentlich beteiligt.

Für den Abbau durch das Proteasom müssen Proteine mit Polyubiquitin markiert werden. Es handelt sich dabei um einen reversiblen Prozess, der durch sogenannte Deubiquitinasen (DUBs) rückgängig gemacht werden kann [53, 54]. Das zylinderförmige Proteasom setzt sich aus einer katalytischen 20S-Untereinheit sowie einer oder zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten zusammen. Während die 20S-Untereinheit für die Hydro- bzw. Proteolyse und somit den Abbau der eingeschleusten Proteine zuständig ist, dienen die 19S-Untereinheiten unter anderem der Erkennung der polyubiquitinierten Proteine [53, 54].

Es hat sich gezeigt, dass das UPS, als Mediator zwischen Synthese und Abbau von Proteinen, unter anderem bei altersbedingten Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder auch dem Morbus Huntington, eine wesentliche Rolle spielt [55]. Desweiteren ist es beteiligt am Fortschreiten vieler Tumorentitäten [56]. Maligne Zellen nutzen das UPS zu ihrem Vorteil um bspw. der Apoptose zu entgehen oder auch durch den Abbau negativer Zellzyklusregulatoren, wie p27 oder p53 sowie der gesteigerten Aktivierung des NFκ-B-Pathways, unkontrolliert proliferieren zu können [57]. Da maligne Zellen zudem hoch proliferative Zellen mit einem hohen Proteinumsatz darstellen, sind diese in höherem Maße auf ein funktionierendes UPS angewiesen als normale

Zellen [57, 52, 58]. Daher ist das UPS als Angriffspunkt in der Entwicklung neuartiger Medikamente zur Bekämpfung verschiedener Tumorentitäten in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des UPS das Überleben maligner Zellen *in vitro* einschränkt und für mehrere Tumorentitäten vielversprechende klinische Effekte erzielt werden können [59–63].

Der erste Vertreter dieser Medikamentengruppe ist der Proteasomeninhibitor Bortezomib (Velcade[®], PS-341) [64]. Nachdem sich das Prinzip der Proteasomeninhibition durch Bortezomib als erfolgversprechend herausstellte, folgte die Entwicklung einer zweiten Generation von Proteasomeninhibitoren. Wirksamkeit zeigte hier Carfilzomib (Kyprolis[®], PX-171-007), mit dem ein verlängertes Überleben bei Patienten mit Multiplem Myelom, die ein Rezidiv erlitten hatten, erreicht werden konnte [65–67].

Eine weitere Gruppe an Medikamenten, die das UPS als Zielstruktur nutzt, sind die sogenannten „small molecules“, zu denen auch das in dieser Arbeit verwendete b-AP15 gehört [68].

Die Inhibition des UPS hat natürlich auch Auswirkungen auf normale Zellen. Daher ist es wichtig, die Wirkung von Substanzen, die das UPS als Angriffsstruktur nutzen, auch auf gesunde Zellen zu untersuchen. Im Hinblick auf die Verwendung in Kombination mit einer Immuntherapie im Sinne einer DC-Vakzinierung, gilt es vor allem den Einfluss dieser Medikamente auf DC genauer zu explorieren.

1.4 Bortezomib

Der erste von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA 2003 und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) in Europa 2004 zugelassene Vertreter der Gruppe der Proteasomeninhibitoren ist Bortezomib (Velcade[®], PS-341). Zugelassen wurde Bortezomib für die Therapie des Mantelzelllymphoms [69, 70] sowie des Multiplen Myeloms [64]. Angriffspunkt für Bortezomib ist die 20S-Untereinheit des Proteasoms: es inhibiert durch die reversible Blockade der chymotrypsinartigen Untereinheit des proteolytisch aktiven Zentrums der 20S-Untereinheit das Proteasom [71].

Bortezomib kommt nicht nur als Monotherapie, sondern auch in Kombination mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder immunmodulatorisch wirksamen Substanzen wie Thalidomid oder Lenalidomid eine Bedeutung zu. Durch die Kombination soll die Wirksamkeit der Chemotherapeutika gesteigert sowie die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den Kombinationspartnern verringert werden [71].

Leider zeigen sich in den bisherigen klinischen Studien für die Anwendung von Bortezomib bei soliden Tumoren eher enttäuschende Resultate [71, 72]. Ein Problem stellt die Resistenz vieler Tumore gegen Bortezomib dar, welche sowohl primär vorhanden sein als aber auch im Verlauf der Therapie entwickelt werden kann [56, 73].

Daher wurden zwischenzeitlich weitere Proteasomeninhibitoren der zweiten Generation, wie z. B. Carfilzomib (Kyprolis[®], PX-171-007) entwickelt. Für Carfilzomib konnten sowohl für das Mantelzelllymphom [74] als auch für die Therapie des rezidivierenden Multiplen Myeloms [65] vielversprechende therapeutische Effekte gezeigt werden. Carfilzomib ist daher in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason in der Zweitlinien-Therapie des Multiplen Myeloms von der FDA seit 2012 [75] und von der EMA für Erwachsene, die zuvor mindestens eine Therapie erhalten haben, ab dem ersten Rezidiv ebenfalls in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason seit 2015 zugelassen [75].

Desweiteren ist mit Ixazomib (Ninlaro[®], MLN2238) von der FDA seit 2015 und der EMA seit 2016 ein weiterer Proteasomeninhibitor der zweiten Generation in

Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason ebenfalls in der Zweitlinien-Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen [72, 76, 77].

1.4.1 Effekte von Bortezomib auf DC

Die Auswirkungen von Bortezomib auf DC wurden bereits in früheren Studien, u. a. auch von Nencioni *et al.* (Arbeitsgruppe Prof. Peter Brossart, ehemals Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin II), eingehend untersucht. Es wurde gezeigt, dass Bortezomib sowohl Phänotyp als auch Funktion von MoDC auf verschiedene Arten beeinflusst [78–83]. Zum einen wurde die Ausreifung der MoDC eingeschränkt, was sich u. a. in einer verringerten Expression der Reifungsmarker bzw. costimulatorischen Moleküle wie CD80, CD83, CD86 und DC-SIGN sowie von HLA-DR auf der Zelloberfläche zeigte [81–83]. Zum anderen schränkte Bortezomib die Fähigkeit der MoDC, Antigene via Rezeptor-vermittelter Endozytose oder Makropinozytose aufzunehmen, ein [81, 83]. Auch die Produktion von Zytokinen und die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation wurde durch Bortezomib reduziert [81, 83]. Desweiteren wurde die Migrationsfähigkeit durch eine verminderte Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche der MoDC herabgesetzt [81]. Zudem wurde durch Bortezomib die Reaktion der MoDC sowohl auf endogene inflammatorische Zytokine und Prostaglandine wie auch auf bakterielle Stimuli wie LPS negativ beeinflusst [81]. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass bei einer Kombinationstherapie von Bortezomib und DC-Vakzinierung mit einer erheblich verringerten Funktionsfähigkeit der (Mo)DC zu rechnen ist.

1.5 Der Deubiquitinase Inhibitor b-AP15

Mit dem „small molecule“ b-AP15 wurde eine neue Klasse von Proteasomeninhibitoren mit einem alternativen Wirkmechanismus entwickelt [56]. Auch b-AP15 greift an der 19S-Untereinheit des Proteasom an, indem es die Deubiquitinierung der markierten Proteine durch die Blockade der Ubiquitin-spezifischen Protease 14 (USP14) und der Ubiquitin-C-Terminal-Hydrolase 5

(UCHL5) verhindert [68, 56]. Bei USP14 und UCHL5 handelt es sich um zwei der insgesamt drei DUBs, die mit der 19S-Untereinheit assoziiert sind [56]. Während die Hemmung nur einer dieser beiden DUBs zu einer ansteigenden Proteasomenaktivität führt, bewirkt die Hemmung von sowohl USP14 als auch UCHL5 eine deutliche Beeinträchtigung der Proteasomen Funktion [84]. In der Zelle akkumulieren dadurch ubiquitinierte Proteine, was letztlich zu deren Absterben führt [56].

Präklinische Daten belegen die Wirksamkeit von b-AP15 für sowohl hämatologische als auch solide Tumorentitäten [85–90]. Besonders bedeutend ist hierbei die Beobachtung, dass b-AP15 auch bei Tumorzellen, die gegen Bortezomib resistent sind, wirksam ist [56, 88] und somit als Ergänzung bzw. Alternative für bereits bestehende Therapieschemata interessant werden könnte. Mit dem Strukturanalogon VLX1570 wurde zudem ein weiterer Deubiquitinase Inhibitor mit analogem Wirkmechanismus zu b-AP15 entwickelt, der zwischenzeitlich für klinische Studien zugelassen ist. VLX1570 zeichnet sich vor allem durch eine bessere Löslichkeit als b-AP15 aus und ist somit für die intravenöse Gabe noch besser einsetzbar [91]. Wie auch b-AP15 führt VLX1570 in Multiplen Myelom Zellen zur Induktion der Apoptose *in vitro* und zeigt zudem antitumorale Wirkungen *in vivo* [92]. Die Wirksamkeit sowie Verträglichkeit von VLX1570 wird derzeit in einer Phase I/ II Studie an Patienten mit refraktärem oder rezidivierenden Multiplen Myelom in Kombination mit Dexamethason getestet (NCT02372240) [92].

Der Einfluss von b-AP15 auf Phänotyp und Funktion von DC ist bislang noch nicht untersucht. Da b-AP15 genau wie Bortezomib und andere Proteasomeninhibitoren durch die Blockade des für alle Zellen essenziellen UPS wirkt, kann b-AP15 potenziell auch Zellen des Immunsystems beeinträchtigen. Dieses zu eruieren ist von grundlegendem Interesse, vor allem auch im Hinblick auf mögliche Auswirkungen auf DC-basierte Immuntherapien.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Multimodale Therapieansätze auch mit auf DC basierenden Tumorstimmungen gewinnen bei der Behandlung maligner Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. In vorangegangenen Arbeiten [81–83] wurde gezeigt, dass der Proteasomeninhibitor Bortezomib in therapeutischen Dosen einen negativen Einfluss auf die Funktion von aus humanen Monozyten *in vitro* generierter MoDC hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss des Vertreters einer neuen Klasse von Proteasomeninhibitoren b-AP15 auf den Phänotyp und die Funktion von MoDC zu untersuchen, um so die Auswirkungen auf eine potenzielle Kombinationstherapie abschätzen zu können.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe Comfort	IBS Integra Biosciences AG; 7205 Zizers, Schweiz
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)	Binder GmbH; Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer: BD FACS Calibur™	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
Einkanal-Pipetten Transferpette S 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Brand GmbH & Co KG; Wertheim, Deutschland
Gammacell® 1000 Elite	Best™ Theratronics; Ottawa, Kanada
HandyStep repeating pipette	Brand GmbH & Co KG; Wertheim, Deutschland
Handzähler 4-stellig (1-7510)	Neolab; Heidelberg, Deutschland
Heidolph Top-Mix 94323	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach, Deutschland
Kühlschrank -20 °C	Liebherr Comfort; Kirchdorf an der Iller, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr Comfort; Kirchdorf an der Iller, Deutschland
Kühlschrank -80 °C (Model: 8936; HFU320BV)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts; USA
Lichtmikroskop Carl Zeiss Axiovert 25 (HBO 50)	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG; Staufen, Deutschland

Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Karl Hecht GmbH & Co KG (Assistent); Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences AG; 7205 Zizers, Schweiz
Pipetten Eppendorf Research Plus Einkanal 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Schüttelwasserbad Typ 1083	(GFL) Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, Deutschland
Sterilbank: Heraeus Instruments HeraSafe	Kendro Laboratory Products GmbH; Hanau, Deutschland
Zentrifugen: 1) Eppendorf Centrifuge 5840R 2) Megafuge 1.0 R 3) Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland Kendro Laboratory Products GmbH; Hanau, Deutschland Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts; USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 µl Filter Tips, steril	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Brand Präzisions-Dispenser-Tips (1 Hub = 100 ml)	Brand GmbH & Co KG; Wertheim, Deutschland
Cell culture insert; transparent PET membrane 24 Well 8.0 µm pore size	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Cellstar 96 Well Cell Culture Plate, steril, F- bottom, with lid	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland

Cellstar 96 Well Cell Culture Plate, steril, U-bottom, with lid	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tubes; 15 ml PP, graduated, conical bottom, steril, blue screw can (Cat.-No.: 188271)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Companion Plate; 24 Well with low evaporation lid, notched for use with cell culture inserts; tissue culture treated by vacuum gas plasma; polystyrene; non-pyrogenic	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Costar 10 ml Stripette, Disposable Serological Pipette, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Costar 25 ml Stripette, Disposable Serological Pipette, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Costar 2 ml Stripette, Disposable Serological Pipette, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Costar 50 ml Stripette, Disposable Serological Pipette, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Costar 5 ml Stripette, Disposable Serological Pipette, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Cryo.s PP, 2 ml, 12,5 /47 MM, steril, Verschl. Natur, Außengewinde	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
DeckWorks™ Low Binding Barrier Pipet Tips 1-100 µl, Graduated, Natural, Hinged Rack, Steril, Polypropylene	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Eppendorf Combitips advanced (1 Hub = 50 ml)	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland

FACS-Tubes; Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes (12 x 75mm style), nonsteril, no cap (Supplier No. 352008)	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Falcon 50 ml Polypropylene Conical Tubes, 30 x 115 mm style, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Falcon 75 cm ² Zellkulturflaschen, steril	Corning Inc.; Corning, New York, USA
Parafilm „M“, Laboratory Film American National Can, Chigaco IL 60631	Rexam Beverage Can Americas Inc; Chiagco, Illinois, USA
Reaction tubes; 1,5 ml; PP; graduated; attached cap; natural (Eppendorf Cups)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
SafeSeal SurPhob Spitzen, 100 µl, steril, Low Binding, graduiert	BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH; Hamburg, Deutschland
SafeSeal SurPhob Spitzen, 10 µl, steril, Low Binding, graduiert	BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH; Hamburg, Deutschland
SafeSeal-Tips Premium, Micropoint Graduated Pipette Tips 100 - 1250 µl, Natural, Steril	BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH; Hamburg, Deutschland

2.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
BD FACS Flow™	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
Cell WASH	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
CFSE 5 mM	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts; USA

DMSO 500 ml	Fluka Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
FCR Blocking Reagenz Human 2 ml	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Ficoll Biocoll Separating Solution	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
Formalin Solution 10 % Neutral Buffered	Sigma; St. Louis, USA
Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X); 1 ml Productnumber: 1862209	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts; USA
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma; St. Louis, USA
Penstrep 5000 IU/ml 100 ml	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
RIPA Buffer, 1X; 250 ml Productnumber: 89901	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts; USA
Trypanblau (0,4 %) 100 ml	Sigma; St. Louis, USA

2.4 Pharmaka

Tabelle 4: Pharmaka

Pharmakon	Hersteller
b-AP15 [10 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM]	Active Biochem; Bonn, Deutschland
Bortezomib [Arbeitskonzentration 10 ng/ml]	Selleckchem; München, Deutschland

2.5 Zytokine

Tabelle 5: Zytokine

Zytokin	Hersteller
GM-CSF [Arbeitskonzentration 100 ng/ml]	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
IL-10 [Arbeitskonzentration 10 ng/ml]	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
IL-4 [Arbeitskonzentration 20 ng/ml]	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH; Frankfurt, Deutschland
Mip-3 β [Arbeitskonzentration 100 ng/ml]	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland

2.6 Mitogene

Tabelle 6: Mitogene

Mitogen	Hersteller
LPS (Lipopolysaccharid) [Arbeitskonzentration 100 ng/ml]	Sigma; St. Louis, USA
PHA (Phytohämagglutinin) [Stock 1 mg/ml; Arbeitskonzentration 3 μ g/ml]	Sigma; St. Louis, USA

2.7 Enzyme

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Hersteller
Pulmozyme	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland

2.8 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Human CD80 FITC	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
Anti-Human CD83 PE	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
Anti-Human DC-SIGN, PerCP Conjugated Mouse IgG _{2B}	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
Anti-Human DC-SIGN, Phycoerythrin Conjugated, Mouse IgG _{2B}	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
Anti-human HLA-DR APC	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
Anti-Human Osteoaktivin Mouse Monoclonal IgG _{2b} => wird konjugiert mit Lightning-Link-RPE- Conjugation Kit der Firma Innova Biosciences Cambridge, United Kingdom	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
APC Mouse Anti-Human CD209 [DC Sign APC]	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
APC Mouse Anti-Human CD86	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
CD14 PerCP	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
CD4 Mouse Anti-Human PE	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human CD1a	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland

FITC Mouse Anti-Human-CD209 [DC Sign-FITC]	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
FITC-Dextran	Sigma; St. Louis, USA
IgG Isotype Control, Allophycocyanin Conjugated Mouse IgG ₁	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
IgG _{2B} Isotype Control, PerCP Conjugated Mouse IgG _{2B}	R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland
Mouse IgG1 Iso Control, PE [1:5 verdünnt mit FACS-Puffer]	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
Mouse γ 1 FITC (x 40) Antikörper [IgG1 FITC]	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland

2.9 Medien

Tabelle 9: Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Hersteller
RP10-Medium Medium RPMI 1640 mit Glutamax. 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
X-VIVO 20 Medium Mit L-Glutamin, Gentamicin, und Phenol Red	Lonza; Basel, Schweiz

2.10 Computerprogramme

Tabelle 10: Computerprogramme

Programm	Hersteller
Cellquest Pro	BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH); Heidelberg, Deutschland
Flow Jo Version 7.6.4	Tree Star Inc.; Ashland, OR, USA
IBM SPSS Statistics Version 24	IBM Deutschland GmbH; Ehningen, Deutschland

3. Methoden

3.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (englisch: peripheral blood mononuclear cells; PBMC) wurden per Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Lösung (Biocoll Separating Solution) aus den Buffy Coats gesunder Blutspender isoliert (Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen. Es wurden ausschließlich anonymisierte Buffy Coats verwendet, d. h. es wurden keine personenbezogenen Daten einbezogen). Buffy Coats entstehen als Nebenprodukt bei der Verarbeitung einer Vollblutspende und enthalten dann vor allem noch Leukozyten sowie Thrombozyten. Das für die Dichtegradientenzentrifugation verwendete Ficoll ist ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte während der Zentrifugation die Polymerschicht passieren, sammeln sich die PBMC aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Interphase zwischen Ficoll-Lösung und Blutplasma an, so dass sie leicht abgenommen werden können.

Das Blut aus dem Buffy Coat wurde in eine T75-Zellkulturflasche überführt und mit PBS auf ein Volumen von 120 ml verdünnt. Dieses Blut-PBS-Gemisch wurde anschließend auf vier 50-ml-Falconröhrchen verteilt, in welche zuvor 12 ml Ficoll-Lösung vorgelegt wurden. Diese Ficoll-Lösung wurde mit je 30 ml Blut-PBS-Gemisch langsam überschichtet und im nächsten Schritt 20 min bei 1900 rpm (650 x g) ohne Bremse in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren die PBMC als weiße Zellschicht in der Interphase zwischen der Ficoll-Lösung und dem Blutplasma sichtbar. Diese Zellschicht konnte nun mit einer 5-ml-Pipette vorsichtig abgenommen werden. Hierbei wurden die PBMC aus je zweien der vier Falconröhrchen auf ein neues 50-ml-Falconröhrchen gepoolt. Die abgenommene Zellsuspension wurde dann zweimal mit PBS gewaschen, um Reste der Ficoll-Lösung zu entfernen. Hierzu wurden die beiden 50-ml-Falconröhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und dann 5 min bei 1500 rpm

(400 x g) zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde jeweils nach der Zentrifugation vorsichtig abgesaugt. Anschließend folgte ein dritter Waschgang, um die Thrombozyten zu entfernen. Die Falconröhrchen wurden mit PBS auf 25 ml aufgefüllt und 12 min bei 900 rpm (145 x g) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in ein Falconröhrchen gepoolt und in 40 ml PBS aufgenommen, so dass nun die Zellzahl bestimmt werden konnte.

3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und 1:10 mit Trypanblau (10 µl) sowie PBS (80 µl) verdünnt. Durch das Trypanblau konnte zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden. Tote Zellen nehmen das Trypanblau auf, während bei den vitalen nur die Membran angefärbt wird. Die Zellzahlbestimmung erfolgte per Neubauer-Zählkammer, in welcher die vitalen Zellen in zwei der vier Großquadranten gezählt und hieraus dann der Mittelwert gebildet wurde. Die Neubauer-Zählkammer ermöglicht es Zellen in einem definierten Volumen von 0,1 µl auszuzählen. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurde die ermittelte Zellzahl mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Somit ergab sich folgende Formel zur Berechnung der absoluten Zellkonzentration:

$$\frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Quadranten}} \times \frac{1}{0,1\mu\text{l}} \times 10^3 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{aufgenommene ml PBS} = \text{Zellzahl/ml}$$

beziehungsweise:

$$\frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{2} \times \frac{1}{0,1\mu\text{l}} \times 10^3 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}} \times 10 \times 40 \text{ ml PBS} = \text{Zellzahl/ml}$$

3.3 MoDC-Generierung aus plastikadhärenten Monozyten

Zur Generierung von MoDC wurden die PBMC mit dem Medium X-VIVO 20 so eingestellt, dass pro T75-Zellkulturflasche 1×10^8 Zellen in 10 ml X-VIVO 20 Medium angesetzt werden konnten. Es folgte die Inkubation der PBMC für 1,5 - 2,0 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Während der Inkubationszeit adhärirten

die Monozyten an den Plastikboden der Zellkulturflasche. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenen Zellen mehrfach mit dem in der Flasche vorhandenen X-VIVO 20 Medium abgewaschen. Anschließend folgten zwei bis drei weitere Waschgänge mit PBS. Die verbliebenen adhärenen Monozyten wurden mit dem Medium RPMI 1640 (+ 10 % FCS/ 2 % PenStrep) für insgesamt 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Zur Generierung von MoDC aus den Monozyten wurden an den Tagen 0, 2, 4 und 6 die Zytokine Interleukin-4 (IL-4; 20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) zu den Zellen gegeben. Die Zugabe von b-AP15 in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM, sowie des DMSO als Negativ-Kontrolle und des IL-10 (10 ng/ml) und/oder Bortezomib (10 ng/ml) als Positiv-Kontrolle(n), erfolgte 24 Stunden vor der Ernte, also an Tag 6. Um reife mMoDC (englisch: mature monocyte derived dendritic cells) zu erhalten erfolgte 16 Stunden vor der Ernte, also ebenfalls an Tag 6, die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS 100 ng/ml).

3.4 Ernte der MoDC

An Tag 7 konnten die Zellen geerntet werden. Hierfür wurden die Zellkulturflaschen mit dem RPMI-1640-Medium ungefähr 10 x gespült. Die entstehende Zellsuspension wurde in jeweils ein 50-ml-Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen noch ca. 10 x mit PBS gespült und die hierbei entstehende Zellsuspension wurde ebenfalls in das entsprechende 50-ml-Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde ein weiteres Mal 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert, die Überstände vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 3 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.2.).

3.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse des Expressionsmusters verschiedener Oberflächenmarker und somit der Phänotypisierung der MoDC.

3.5.1 Kompensation

Bei der Mehrfarbenfluoreszenz-Analyse, die für die Untersuchung des Expressionsmusters der Oberflächenmarker auf MoDC notwendig ist, stellt die Kompensation einen wichtigen Bestandteil der durchflusszytometrischen Messung dar. Notwendig wird sie dadurch, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome zum Teil überlappen. Für die Färbung wurden im vorliegenden Fall die an die entsprechenden Antikörper gekoppelten Fluorochrome Fluorescein-Isocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet.

Die MoDC wurden jeweils in ein FACS-Röhrchen (Röhrchen a) gegeben. Pro Versuchsansatz wurden ca. 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Soweit möglich wurde für Kompensation und Färbung immer die gleiche Menge an MoDC eingesetzt. Zuerst wurden die frisch geernteten Zellen mit PBS gewaschen: hierfür wurden die Röhrchen mit 4 ml PBS aufgefüllt und dann für 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Nun wurden in jedes Röhrchen jeweils 20 µl FcR Blocking Reagenz gegeben und für 10 - 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zwischenzeitlich konnten die für die Kompensation benötigten weiteren Röhrchen vorbereitet werden (Röhrchen b - e). In diese Röhrchen wurden nun wie in **Tabelle 12** aufgeführt je 2 µl des entsprechenden Antikörpers vorgelegt:

Tabelle 11: Vorlegen der Antikörper für die FACS-Kompensation

Röhrchen a	= ungefärbte Zellen
Röhrchen b	+ 2 µl DC Sign FITC
Röhrchen c	+ 2 µl DC Sign PE
Röhrchen d	+ 2 µl DC Sign PerCP
Röhrchen e	+ 2 µl DC Sign APC

Nach der Inkubation wurden in jedes Röhrchen a je 900 µl PBS gegeben, so dass die Zellen anschließend auf die vorbereiteten Röhrchen b - e verteilt werden konnten. Dies geschah wie folgt: aus dem zum Versuchsansatz gehörigen Röhrchen a wurden nach gründlicher Resuspension je 100 µl Zellsuspension in die entsprechenden Röhrchen b - e pipettiert (siehe **Abbildung 2**):

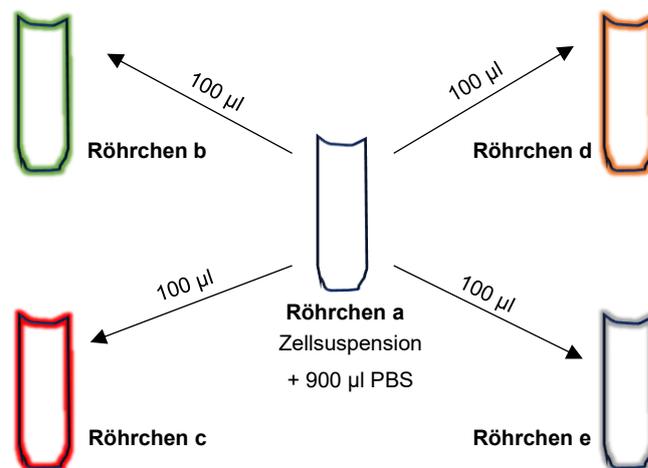


Abbildung 2: Verteilungsschema der Zellsuspension auf die Röhrchen b – e

Die restliche Zellsuspension verblieb im jeweiligen Röhrchen a als ungefärbte Zellen. Im Anschluss wurden alle Röhrchen für 10 – 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation folgten zwei Waschgänge mit je 2 ml FACS-Puffer pro FACS-Röhrchen. Hierfür wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Nach dem zweiten Waschgang wurden die Zellen in den Röhrchen b - e in je 100 µl und die

ungefärbten Zellen in den Röhrcchen a in je 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung am Durchflusszytometer BD FACS Calibur™.

3.5.2 FACS-Färbung der MoDC

Für die Färbung der MoDC wurden je 1 x 10⁶ DC pro FACS-Röhrcchen eingesetzt. Die Röhrcchen wurden dann mit je 2 ml PBS aufgefüllt. Zuerst wurden die Zellen bei 1500 rpm (400 x g) für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen resuspendiert und es erfolgte die Zugabe von je 20 µl FcR Blocking Reagenz pro Röhrcchen und Inkubation für 10 - 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. In der Zwischenzeit wurden die FACS-Antikörper Mastermixe angesetzt und in die vorbereiteten beschrifteten Röhrcchen vorgelegt (**Tabelle 13**). Die Volumina der Antikörper wurden jeweils auf ein Färbevolumen von 50 µl berechnet. Das Ansetzen der 3 Mastermixe erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 12: Herstellung der Antikörper-Mastermixe für die FACS-Färbung

Röhrcchen	FITC	PE	PerCP	APC
a	0,5 µl Mouse IgG1 FITC	1,25 µl Mouse IgG1 PE	0,5 µl Mouse IgG2b PerCP	0,5 µl Mouse IgG1 APC
b	1 µl CD1a FITC	2 µl CD83 PE	2 µl CD14 PerCP	2 µl HLA DR APC
c	1,25 µl CD80 FITC	5 µl Osteoaktivin PE	1 µl DC Sign PerCP	1 µl CD86 APC

Nun wurden in die zu diesem Messansatz zugehörigen Röhrcchen aus Röhrcchen a je 2,75 µl des Mastermix vorgelegt. Analog dazu wurden aus Röhrcchen b je 7 µl und aus Röhrcchen c je 8,25 µl des Mastermix in die jeweils zum entsprechenden Messansatz gehörigen Röhrcchen pipettiert.

Nach der Inkubation mit dem FcR-Blocking-Reagenz wurden 75 - 100 µl FACS-Puffer pro Röhrcchen hinzugegeben, so dass sich ein Endvolumen von ca. 150 µl

pro Röhrchen ergab. Nun wurden je 50 µl Zellsuspension in die mit dem jeweiligen Antikörper-Mastermix vorbereiteten Röhrchen pipettiert. Es folgte eine zweite Inkubation der Zellsuspension mit den Antikörpern im Dunkeln bei Raumtemperatur für weitere 10 - 20 min. Nach der Inkubation wurde jedes Röhrchen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zuletzt wurden in jedes Röhrchen 200 µl FACS-Puffer gegeben und das Zellpellet gut resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer BD FACS Calibur™.

3.6 Durchflusszytometrische Analyse von MoDC

Hierfür wurden Antikörper gekoppelt mit den Fluorochromen FITC, PE, PerCP und APC verwendet. Diese Antikörper sind gegen bestimmte Oberflächenproteine der DC gerichtet. Bei der Messung am Durchflusszytometer wird die Zellsuspension mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit, die eine laminare Strömung, den sogenannten Hüllstrom, erzeugt, in die Messküvette gesaugt. Hierbei kommt es durch die Verkleinerung des Querschnitts der Küvette zur Beschleunigung des Proben- sowie auch des Hüllstroms, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden Strömungen kommt. Diese Beschleunigung führt dazu, dass die Zellen nun nacheinander wie an einer Perlenkette aufgereiht durch den Messbereich an den Lasern vorbeigeleitet werden können. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Die einzelnen Fluorochrome werden durch Laser angeregt und das emittierte fluoreszierende Licht wird über Photodetektoren registriert. Zusätzlich wird die Streuung des Lichts an den Zellen erfasst. Das Vorwärtsstreulicht (englisch: Forward scatter; FSC) verhält sich hierbei proportional zur Zelloberfläche und ist somit ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (englisch: Sidewards scatter; SSC) hingegen ist ein Maß für die Granularität der Zellen. Mittels dieser beiden Parameter können die MoDC anhand ihrer Position im Dot-Plot von anderen Zellen des Blutes abgegrenzt und das Gate zur Auswertung entsprechend gesetzt werden. Die Intensität des emittierten fluoreszierenden Lichts ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und somit ein Maß für die

Expressionsstärke des jeweils zugehörigen Oberflächenproteins. Zum Vergleich der Expressionsstärke kann die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) eines Antikörpers genutzt werden, welche sich mit folgender Formel berechnen lässt:

$$\text{SFI} = \frac{\text{mittlere Fluoreszenzintensität (spezifischer Antikörper)}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität (Isotyp)}}$$

Gemessen wurden die Zellen am Durchflusszytometer BD FACS Calibur™ mit der zugehörigen Software Cellquest Pro. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software Flow Jo Version 7.6.4.

3.7 Messung der Migrationsfähigkeit von MoDC in Transwell-Migration-Assays

Zur Messung der Migrationsfähigkeit der MoDC wurden nach der Ernte pro Ansatz je 2×10^5 Zellen aus den entsprechenden 50-ml-Falconröhrchen entnommen. Von jeder b-AP15-Konzentration, sowie den Kontrollen, wurde jeweils ein dreifacher Ansatz angesetzt, so dass insgesamt pro Probe 6×10^5 Zellen entnommen und in je ein 15-ml-Falconröhrchen überführt wurden. Zu den Zellen wurde dann je 1 ml PBS hinzugegeben und die Zellsuspension 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix aus RMPI-Medium und Mip-3 β hergestellt. Hierzu wurden 4 μ l Mip-3 β pro Milliliter RMPI-Medium und je 1 ml RMPI-Medium pro Ansatz benötigt. Anschließend wurde pro Ansatz je 1 ml des Mastermixes in eine 24-Well-Platte vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden die Transwellkammern in die 24-Well-Platte eingehängt. Nach der Zentrifugation der entnommenen MoDC wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden dann in je 3 ml RMPI-Medium aufgenommen und es wurde je 1 ml der Zellsuspension in die Transwellkammern pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde nun für 3 oder für 16 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Transwellkammern vorsichtig entfernt. Zum Zählen mit dem BD FACS Calibur™ wurden die migrierten MoDC anschließend aus den unteren Vertiefungen abgewaschen und in vorbereitete FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden 5 min bei 1500 rpm (400 x g) zentrifugiert, der Überstand

wurde abgekippt und in jedes Röhrchen wurden 200 µl FACS-Puffer gegeben. Zur Messung wurde jedes FACS-Röhrchen genau 1 min ausgezählt und der Mittelwert aus den 3 Ansätzen gebildet. Um die Ergebnisse aller Versuche zusammengefasst darstellen zu können, wurde wiederum der Mittelwert aus den einzelnen Versuchsergebnissen gebildet.

3.8 Phagozytoseassay (FITC-Dextran-Phagozytose)

Die Aufnahme von FITC-Dextran durch MoDC stellt einen Assay zur Messung ihrer Phagozytosefähigkeit dar. Hierfür wurden die MoDC in RMPI-Medium auf 1×10^6 Zellen pro ml Medium eingestellt. Nun wurden jeweils 1×10^5 MoDC in FACS-Röhrchen gegeben. Die FACS-Röhrchen wurden jeweils mit 900 µl RMPI-Medium aufgefüllt und dann für 1 h entweder bei Raumtemperatur, 4 °C oder 37 °C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 5 µl FITC-Dextran in die bei 4°C bzw. 37°C inkubierten FACS-Röhrchen. Als Negativ-Kontrolle dienten die bei Raumtemperatur inkubierten Ansätze ohne FITC-Dextran. Nun wurden die Röhrchen für eine weitere Stunde bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert oder bei Raumtemperatur. Die MoDC wurden dann mit 4 ml FACS-Puffer 2 x gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl FACS-Puffer und die sofortige Messung der Proben mit dem BD FACS Calibur™ mit der Software Cellquest Pro. Die Messdaten wurden mit der Software Flow Jo Version 7.6.4 analysiert.

3.9 CFSE-Proliferationsassay

Die für den CFSE-Proliferationsassay benötigten allogenen PBMC-Responderzellen wurden am Vortag aufgetaut und über Nacht in pulmozymhaltigem Medium regeneriert. Pulmozym sorgt hierbei als DNase für die Entfernung der DNA von durch den Auftauprozess abgestorbener Zellen und verhindert gleichzeitig eine Verklumpung der PBMC. MoDC als Stimulatoren wurden pro Versuchsansatz auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt, mit 30 Gray (Caesium¹³⁷) bestrahlt und in eine 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät (2×10^4 Zellen/Well). Es wurde ein dreifacher Ansatz vorbereitet. Zur Herstellung der CFSE-Lösung wurden 500 µg aus dem CFDA-Stock in 180 µl DMSO gelöst. PBS mit 0,1 % BSA hergestellt wurde bei 37 °C temperiert inkubiert. Es folgte die Färbung der allogenen PBMC: hierfür wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml in warmem PBS/0,1 % BSA eingestellt. Es folgte die Zugabe von 0,5 µl CFSE-Lösung zur Zellsuspension, die für 10 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde das fünffache Volumen an kaltem Medium zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit je 50 ml kaltem Medium gewaschen. Danach wurde erneut die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^6 /ml in warmem RPMI/BSA-Medium eingestellt. Nun wurden je 2×10^5 der allogenen PBMC zu den MoDC gegeben. Zusätzlich wurden noch sechs Wells mit je 2×10^5 der allogenen PBMC, jeweils drei für die Positiv- und drei für die Negativ-Kontrolle ausgesät und mit je 200 µl RPMI/BSA-Medium aufgefüllt. In die Wells für die Positiv-Kontrolle erfolgte die Zugabe von jeweils 3 µg/ml PHA. Im letzten Schritt wurde in alle Wells 200 µl PBS gegeben, um ein Austrocknen zu verhindern. Es folgte die Inkubation für 6 Tage bei 37 °C/5 % CO₂ im Brutschrank. Am Tag 6 erfolgte die Ernte der Zellen sowie deren CD4-Färbung und anschließend die Messung am BD FACS Calibur™ mit der Software Cellquest Pro. Die Messdaten wurden mit der Software Flow Jo Version 7.6.4 ausgewertet.

3.10 Statistische Analyse

Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Daten, bei welchen keine Normalverteilung vorhanden war, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Dies ist in den Diagrammen jeweils mit „*“ gekennzeichnet. Für die graphische Darstellung der Daten wurden zum Teil Box-Plots (Box-and-Whisker-Plots) verwendet. Bei den Boxplots sind Median, unteres und oberes Quartil, sowie die jeweiligen Ausreißer und Extremwerte, welche in den Diagrammen mit „○“ und „●“ gekennzeichnet sind, dargestellt. Hierbei wurden Datenpunkte, die mehr als 1,5 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegen, durch „○“ gekennzeichnet und gelten als Ausreißer. Datenpunkte, die mehr als 3 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegen, wurden durch „●“ markiert und gelten als Extremwerte.

Bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen wurden alle Experimente mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Daten und Erstellung der Diagramme wurde IBM SPSS (Version 24) verwendet.

4. Vorarbeiten zu dieser Arbeit

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte durch Kropp *et al.* (Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie im Deutschen Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK) am DKFZ, Standort Tübingen in Kooperation mit Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin II) gezeigt werden, dass b-AP15 sowohl direkte als auch durch NK-Zellen vermittelte antitumorale Effekte induziert [87]. Untersucht wurden die humanen Mantelzelllymphom-Zelllinien GRANTA-519 (DSMZ-Nr. ACC 342), JEKO-1 (DSMZ-Nr. ACC 553) REC-1 (DSMZ-Nr. ACC 584), MINO (DSMZ-Nr. ACC 687) und Z-138 (ATCC-Nr. CRL-3001).

Zusammengefasst ergaben diese Experimente, dass b-AP15 dosis- sowie zeitabhängig die Lebensfähigkeit der verschiedenen Mantelzelllymphomzellen (MCL) einschränkt, indem es Caspase-abhängig zur Induktion der Apoptose führt (**Abbildungen 3 und 4**).

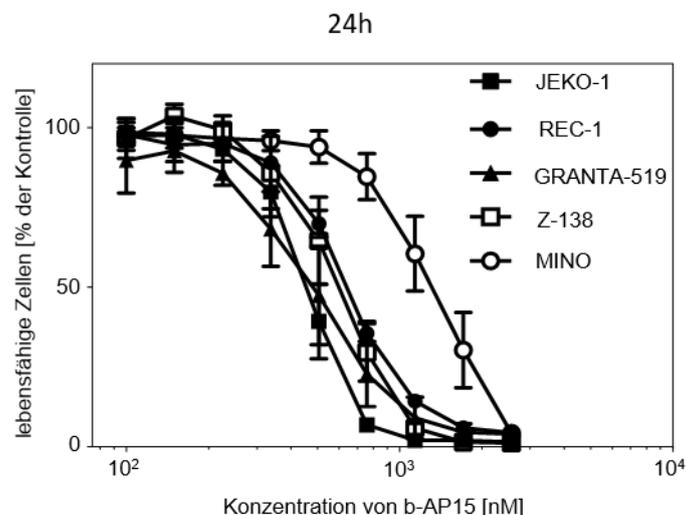


Abbildung 3: Dosisabhängiger Einfluss von b-AP15 auf die Lebensfähigkeit von MCL-Zellen (modifiziert nach Kropp *et al.* [87]). Die verschiedenen Mantelzelllymphomzelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen von b-AP15 für 24 h inkubiert. Dann wurde die Zell-Viabilität mittels WST-1-Assay gemessen. Die lebensfähigen Zellen sind in Prozent der DMSO-Kontrolle angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei Experimenten.

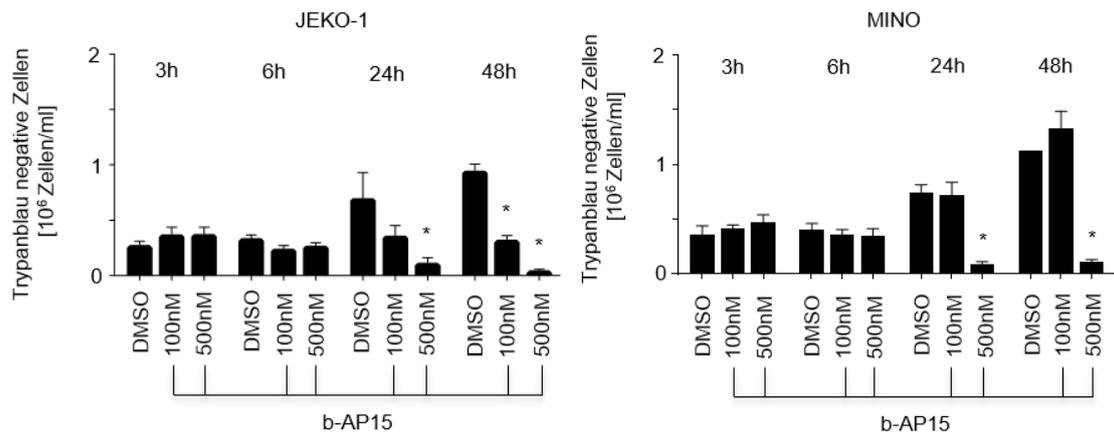


Abbildung 4: Zeitabhängiger Einfluss von b-AP15 auf die Lebensfähigkeit von MCL (modifiziert nach Kropp *et al.* [87]). Die MCL-Zelllinien JEKO-1 und MINO wurden jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von b-AP15 ausgesetzt. DMSO diente als Negativkontrolle. Gemessen wurde die Anzahl der vitalen Zellen jeweils zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt sind Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die p-Werte wurden mit dem student's t-test berechnet: *p < 0,05.

Desweiteren führte b-AP15 zur vermehrten Expression von NKG2D-Liganden auf den Mantelzelllymphomzellen, welche an den NKG2D-Rezeptor der NK-Zellen banden und somit zur Tumorzelllyse durch NK-Zellen führten.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen an b-AP15 verwendet, die signifikante antitumorale Effekte auf verschiedene Mantelzelllymphomzellen haben.

5. Ergebnisse

5.1 Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von MoDC

Eine wichtige Voraussetzung für die potenzielle Kombination einer Therapie mit b-AP15 und DC-Vakzination ist, dass b-AP15 in den für Tumorzellen toxischen Konzentrationen nicht bzw. nur geringfügig toxisch auf DC wirkt. Dies wurde *in vitro* sowohl für unreife als auch für reife MoDC getestet. Als erstes wurde hierbei der Einfluss von b-AP15 auf das Expressionsmuster ausgewählter, für MoDC und ihre Funktion charakteristischer, Oberflächenmarker betrachtet.

5.1.1 Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von unreifen (immature) iMoDC

Bei diesen ersten Experimenten wurden die aus primären humanen plastikadhärenten Monozyten generierten MoDC 24 h vor der Ernte mit steigenden Konzentrationen von b-AP15 (10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM) inkubiert. Wie in den Vorarbeiten (Pkt. 4.) gezeigt wurde, reduzierten diese Konzentrationen die Viabilität von und induzierten Apoptose in Mantelzelllymphom-Zelllinien und wurden deshalb auch für diese Arbeit verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO und als Positiv-Kontrolle das bereits eingehend untersuchte Bortezomib verwendet. Bei einigen Experimenten wurde zudem IL-10, dessen hemmende Wirkung auf DC bekannt ist, als Kontrolle verwendet. Die Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR und Osteoaktivin wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Osteoaktivinexpression wurde mit aufgenommen, da die Arbeitsgruppe von Prof. Brossart (ehemals Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen) u. a. zeigen konnte, dass es auf DC als negativer Regulator der T-Zell-Aktivität fungiert. Die FACS-Histogramme in **Abbildung 5** zeigen exemplarisch den Einfluss von b-AP15 im Vergleich zu DMSO und Bortezomib auf die Expression der oben genannten Oberflächenmarker.

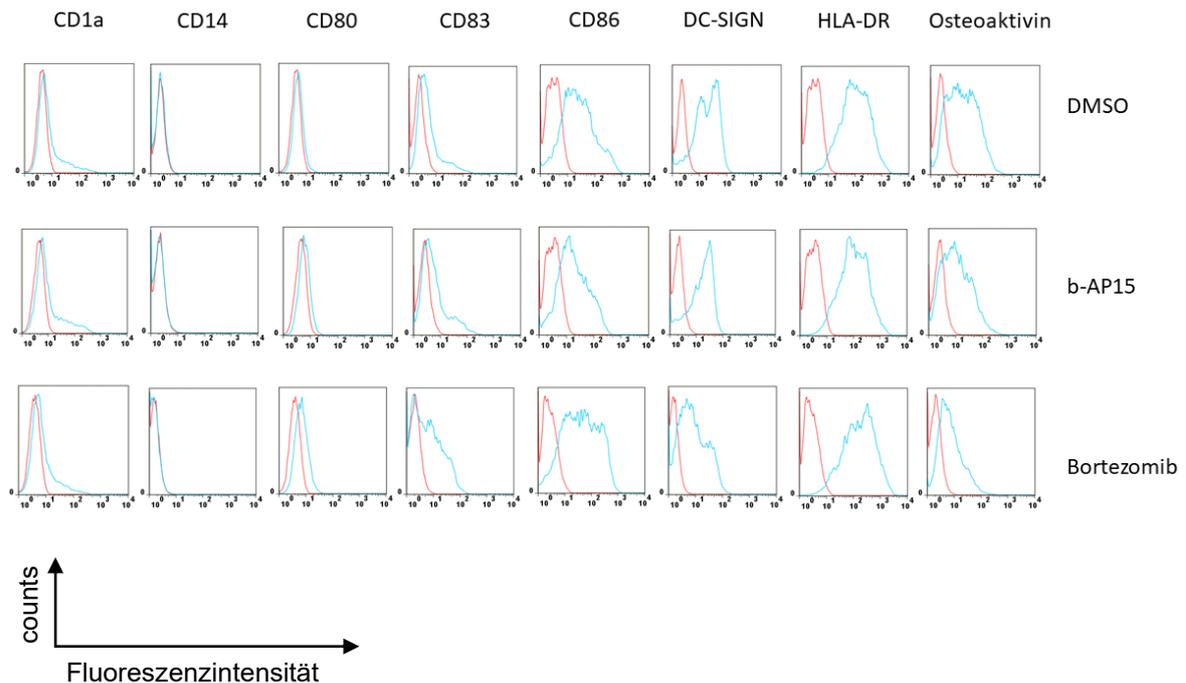
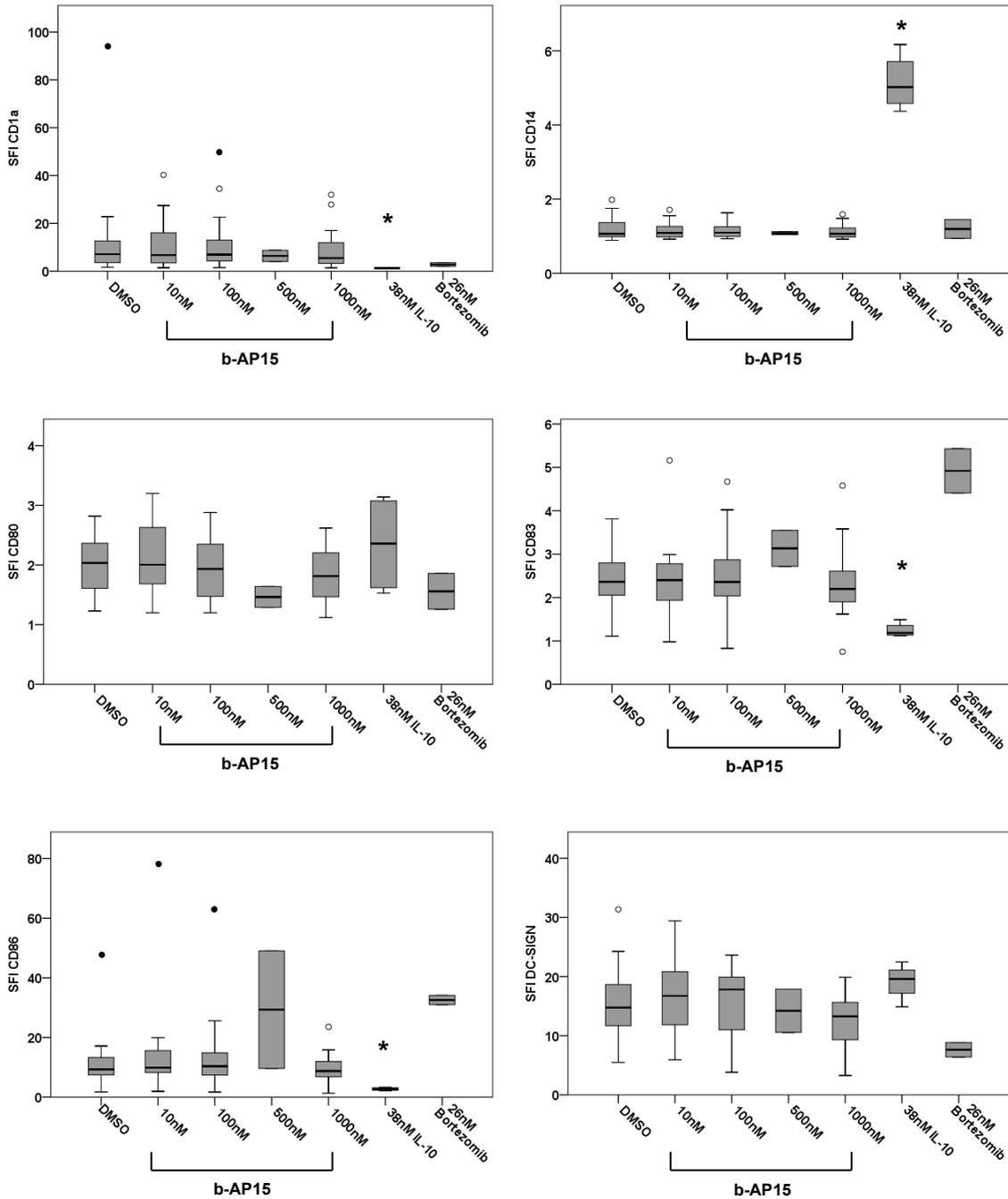


Abbildung 5: Effekte von b-AP15 und Bortezomib auf den Phänotyp von unreifen iMoDC. Repräsentatives FACS-Histogramm der für MoDC charakteristischen Oberflächenmarker. Adhärenzte Monozyten des peripheren Bluts wurden für sechs Tage mit IL-4/GM-CSF kultiviert und anschließend mit DMSO, b-AP15 (1000 nM) oder Bortezomib (26 nM) als (Positiv-) Kontrolle für weitere 24 h inkubiert. Danach wurden die generierten iMoDC geerntet und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die Expression der Oberflächenmarker ist dargestellt als spezifische Fluoreszenzintensität (SFI). Rote Histogramme: Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrollen, blaue Histogramme: Fluoreszenzintensität des spezifischen Antikörpers.

In **Abbildung 6** sind die Ergebnisse aller durchgeführten Messungen ($n = 16$ für DMSO, 10 nM, 100 nM und 1000 nM; $n = 2$ für 500 nM und Bortezomib sowie $n = 4$ für IL-10) zusammengefasst dargestellt. Wie die SFI-Werte zeigten, ließ sich zwischen den verschiedenen b-AP15-Konzentrationen im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle DMSO für keinen der untersuchten Oberflächenmarker ein signifikanter Unterschied feststellen. Für Bortezomib sowie die b-AP15-Konzentration von 500 nM mit lediglich $n = 2$ war jedoch keine Signifikanztestung möglich. Für die Kontrolle IL-10 im Vergleich zu DMSO ergab sich, wie erwartet, ein signifikanter Unterschied für die Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD83, CD86 und Osteoaktivin.

IL-10 hemmte die Differenzierung der Monozyten, was sich im Erhalt der Expression von CD14, im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, widerspiegelte. Bortezomib schränkte, im Gegensatz zu b-AP15, lediglich die Expression von

DC-SIGN ein, ließ jedoch die weiteren Oberflächenmarker, genau wie b-AP15, unbeeinflusst. Zusammenfassend hatte b-AP15 in den untersuchten Konzentrationen also keinen Einfluss auf Differenzierung und Phänotyp von iMoDC.



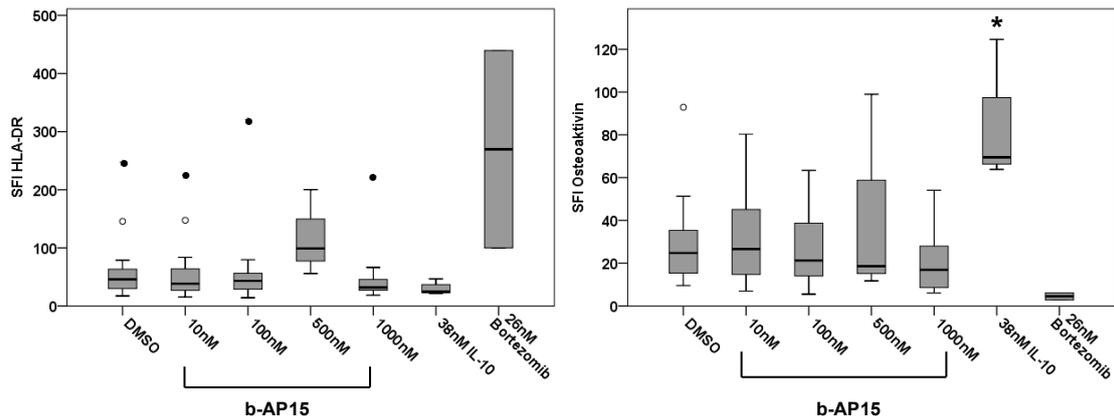


Abbildung 6: Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von unreifen iMoDC, Statistik. Unreife iMoDC wurden jeweils für 24 h mit 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM b-AP15 inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente DMSO und als Positiv-Kontrolle IL-10 bzw. Bortezomib (n = 16 für DMSO, 10 nM, 100 nM und 1000 nM b-AP15; n = 2 für 500 nM b-AP15 und Bortezomib, sowie n = 4 für IL-10). Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR und Osteoaktivin mittels Durchflusszytometrie gemessen. Box-Plots der spezifischen Fluoreszenzintensität (SFI). Ausreißer: ○ = Datenpunkt, der > 1,5 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegt. Extremwert: ● = Datenpunkt, der > 3 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegt. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bzw. dem T-Test für unabhängige Stichproben berechnet: *p < 0,05.

5.1.2 Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von reifen mMoDC

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von mMoDC untersucht. Analog zu Punkt 5.1.1 wurden die aus plastikadhärenten Monozyten generierten MoDC 24 h vor der Ernte mit steigenden Konzentrationen an b-AP15 (10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM) inkubiert. DMSO diente wiederum als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde Bortezomib verwendet. Um die MoDC zur Ausreifung zu bringen, erfolgte 16 h vor Ernte der Zellen die Zugabe von LPS als Maturationsstimulus.

Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR und Osteoaktivin mittels Durchflusszytometrie untersucht. In **Abbildung 7** sind die FACS-Histogramme einer repräsentativen Messung abgebildet.

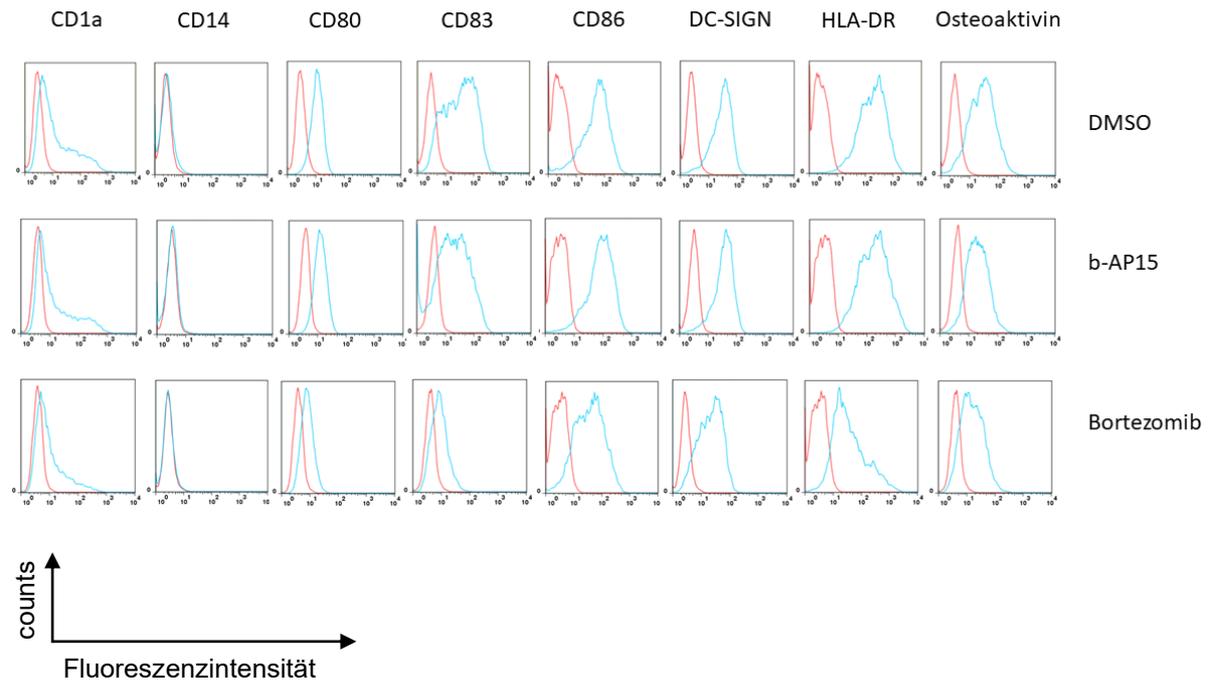
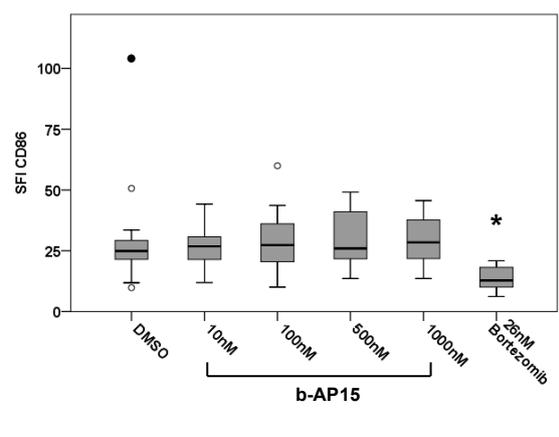
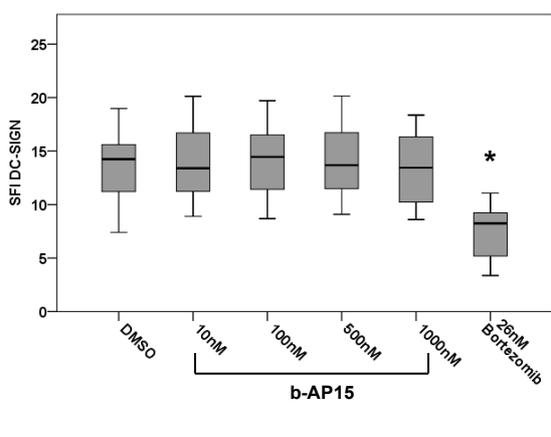
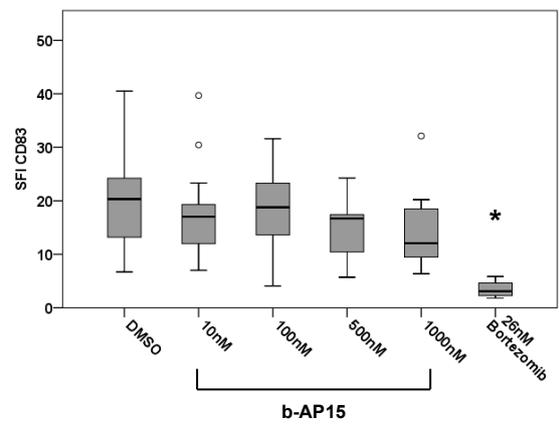
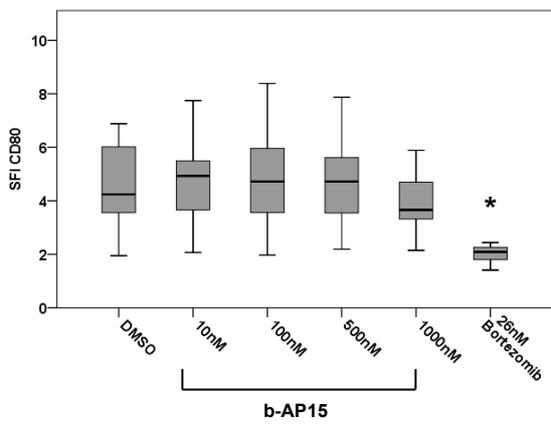
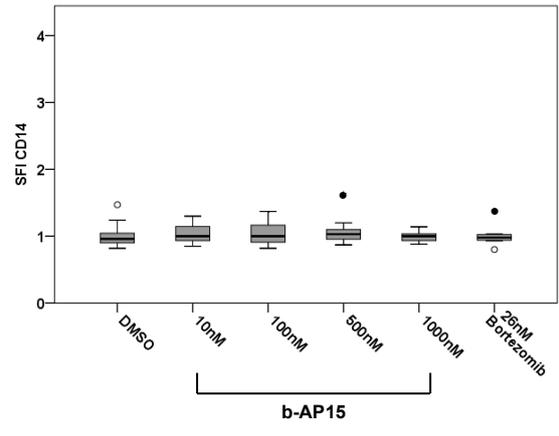
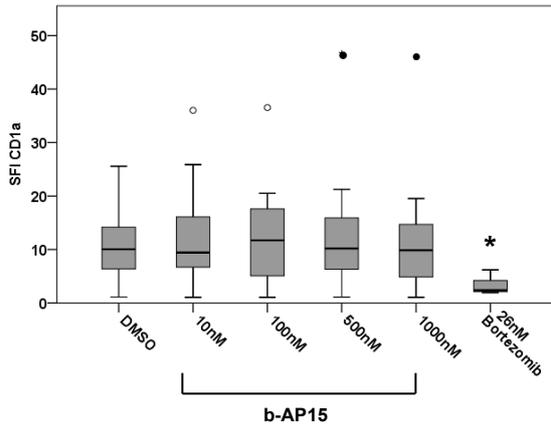


Abbildung 7: Effekte von b-AP15 und Bortezomib auf den Phänotyp von reifen mMoDC. Repräsentatives FACS-Histogramm der für MoDC charakteristischen Oberflächenmarker nach 24-stündiger Inkubation mit b-AP15 (1000 nM) bzw. Bortezomib. DMSO diente als Negativ-Kontrolle. Die roten Histogramme stellen die Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrollen und die blauen Histogramme die Fluoreszenzintensität des jeweils dazugehörigen spezifischen Antikörpers dar.

Die zusammengefassten Ergebnisse aller durchgeführten Messungen ($n = 15$ für DMSO, 10 nM, 100 nM und 1000 nM; $n = 11$ für 500 nM sowie $n = 8$ für Bortezomib) sind in **Abbildung 8** dargestellt. Die statistische Analyse ergab für die ansteigenden Konzentrationen von b-AP15 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle DMSO keinen signifikanten Unterschied in der Expression der MoDC-Oberflächenmarker. Die Bortezomibkontrolle führte hingegen zu einer signifikant reduzierten Expression der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 sowie der Oberflächenmarker CD1a, DC-SIGN und Osteoaktivin im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Insgesamt ließ sich aus den Messergebnissen ableiten, dass die verwendeten Konzentrationen von b-AP15, im Gegensatz zu Bortezomib, keinen signifikanten Einfluss auf den Phänotyp der mMoDC ausübten.



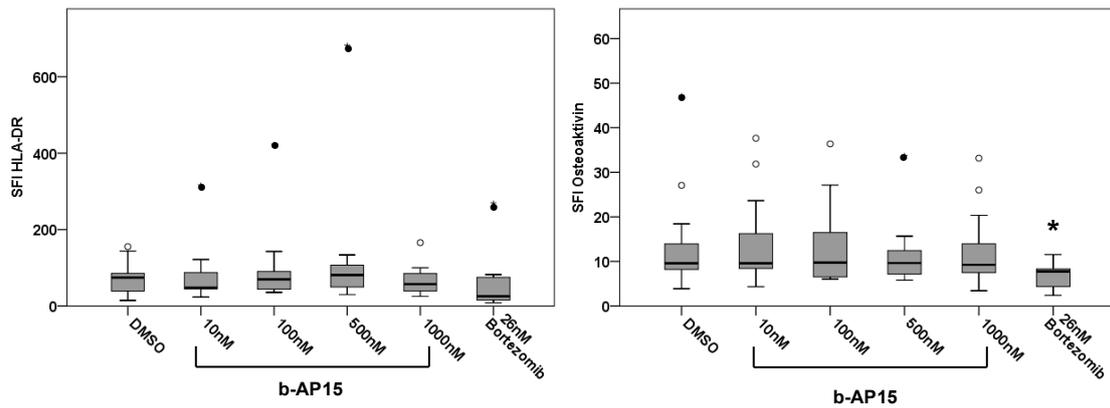


Abbildung 8: Einfluss von b-AP15 auf den Phänotyp von reifen mMoDC, Statistik.

Die reifen mMoDC wurden jeweils für 24 h mit 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM b-AP15 bzw. DMSO als Negativ- und Bortezomib als Positiv-Kontrolle inkubiert (n = 15 für DMSO, 10 nM, 100 nM und 1000 nM b-AP15; n = 11 für 500 nM b-AP15, sowie n = 8 für Bortezomib). 16 h vor der Ernte wurde LPS als Maturationsstimulus hinzugegeben. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR und Osteoaktivin mittels Durchflusszytometrie gemessen. Box-Plots der spezifischen Fluoreszenzintensität (SFI). Ausreißer: ○ = Datenpunkt, der > 1,5 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegt. Extremwert: ● = Datenpunkt, der > 3 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegt. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bzw. dem T-Test für unabhängige Stichproben berechnet: *p < 0,05.

5.2 Einfluss von b-AP15 auf die Funktion von MoDC

Die Fähigkeit der DC innerhalb des Blutkreislaufes zu migrieren, ist für ihre immunologische Funktion als „Wächter des Immunsystems“ und APZ unerlässlich. Daher sollte untersucht werden, ob b-AP15 einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von unreifen oder reifen MoDC hat.

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die DC besitzen, um ihre Funktion als APZ wahrnehmen zu können, ist die Fähigkeit zur Phagozytose extrazellulärer Bestandteile. Deshalb wurde im nächsten Schritt auch untersucht, ob b-AP15 die Phagozytosefähigkeit unreifer oder reifer MoDC beeinflusst.

5.2.1 Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von iMoDC

Zuerst wurde der Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von unreifen iMoDC in einem geeigneten *In-vitro*-Modellsystem (Transwell-Migration-Assay) untersucht. Hierbei wurden die iMoDC 24 h vor der Ernte mit den entsprechenden Konzentrationen an b-AP15 (10 nM, 100nM, 500 nM und 1000 nM), DMSO als Negativ- oder IL-10 bzw. Bortezomib als Positiv-Kontrolle inkubiert. Nach der Ernte wurden die iMoDC jeweils durch das Chemokin Mip-3 β (CCL19), welches durch seine chemotaktische Funktion eine zentrale Rolle bei der Migration der DC zu den Lymphknoten spielt, zur Migration angeregt. Dazu wurden die iMoDC in sogenannten Transwells und der Anwesenheit von Mip-3 β jeweils für 3 h oder für 16 h inkubiert. Es wurde von jeder b-AP15-Konzentration sowie von den Kontrollen, wie in 3.7. beschrieben, jeweils ein 3fach-Ansatz angesetzt. Als sich wie in **Abbildung 9** dargestellt nach 3 h noch kein Effekt auf die Migration der iMoDC zeigte wurde die Inkubationszeit auf 16 h verlängert.

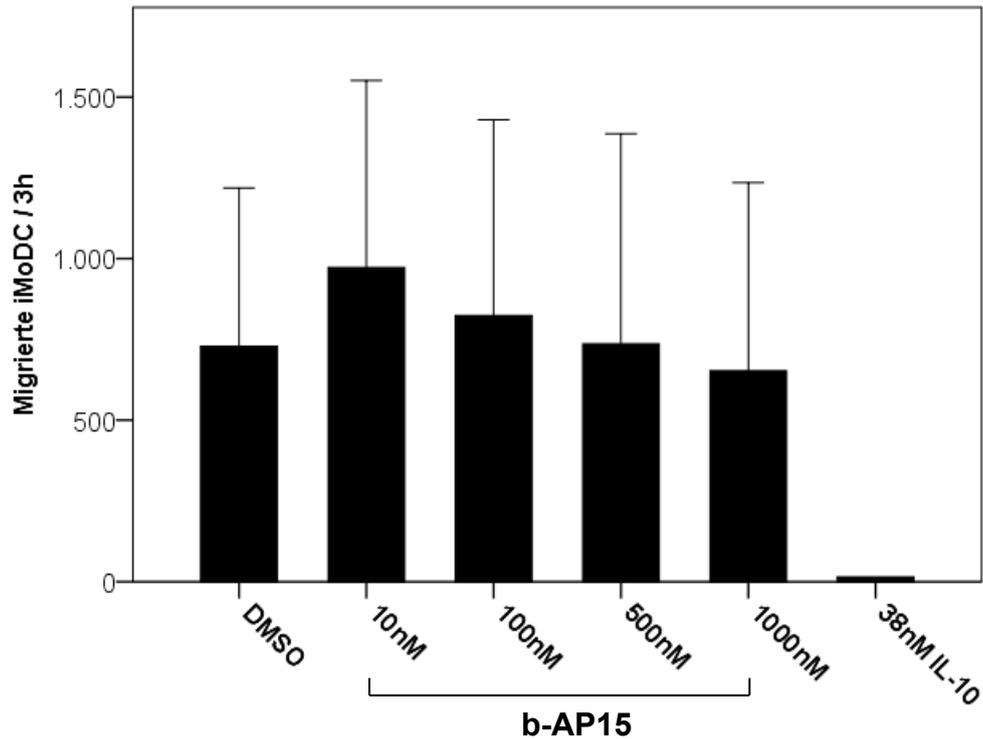


Abbildung 9: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von unreifen iMoDC nach 3 h Inkubation mit Mip-3 β , Statistik. Unreife iMoDC wurden jeweils als Triplikate in Transwell-Migration-Assays in der Anwesenheit von Mip-3 β für 3 h inkubiert. 24 h vor der Ernte erfolgte die Zugabe von b-AP15 in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM bzw. von DMSO als Negativ- oder IL-10 als Positiv-Kontrolle. Anschließend wurde die Anzahl der migrierten iMoDC am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf bzw. vier (500 nM b-AP15) unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern. Für IL-10 ist der Mittelwert des Triplikats aus nur einem Experiment dargestellt. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: Mean \pm 1 SD, $p > 0,05$.

In **Abbildung 10** ist ein repräsentativer FACS-Dot-Plot der Auszählung der im Transwell-Assay nach 16 h migrierten iMoDC gezeigt. Die Anzahl der Zellen unterschied sich unter dem Einfluss von sowohl b-AP15 als auch Bortezomib nicht signifikant von der DMSO-Kontrolle.

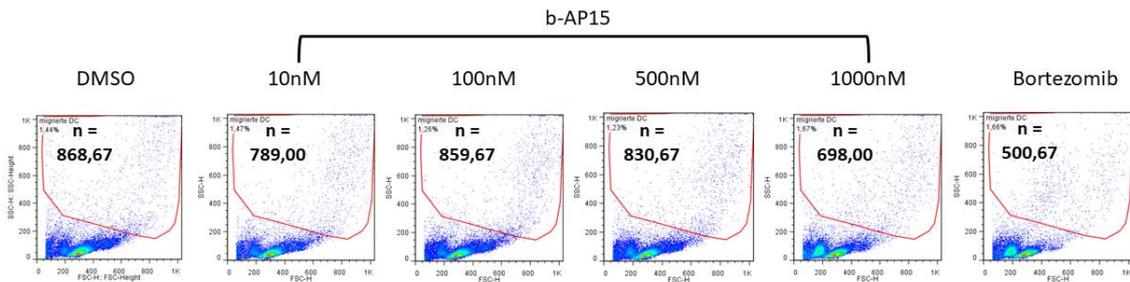


Abbildung 10: Exemplarische Zellzählung der migrierten unreifen iMoDC. Repräsentative FACS-Dot-Plot-Analysen von unreifen iMoDC nach Inkubation mit Mip-3 β für 16 h in Transwell-Migration-Assays. Jeweils 24 h vor der Ernte der Zellen erfolgte die Zugabe von b-AP15 in den angegebenen Konzentrationen bzw. von Bortezomib als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente DMSO. Der Anteil insgesamt migrierter Zellen ist in Prozent angegeben. Die Zellzahl n als Mittelwert der Anzahl migrierter iMoDC der jeweiligen Dreifachansätze.

Die zusammengefassten Ergebnisse der Migration von iMoDC nach 16 h (n = 5) sind in **Abbildung 11** dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte für die einzelnen Konzentrationen jeweils mit der DMSO-Negativ-Kontrolle ergab keine signifikanten Unterschiede. Bortezomib bewirkte im Vergleich zu DMSO ebenfalls keinen signifikanten Rückgang der Migrationsfähigkeit. Zusammenfassend ergaben diese Ergebnisse also, dass weder b-AP15 noch Bortezomib die Migrationsfähigkeit von iMoDC signifikant beeinflussen.

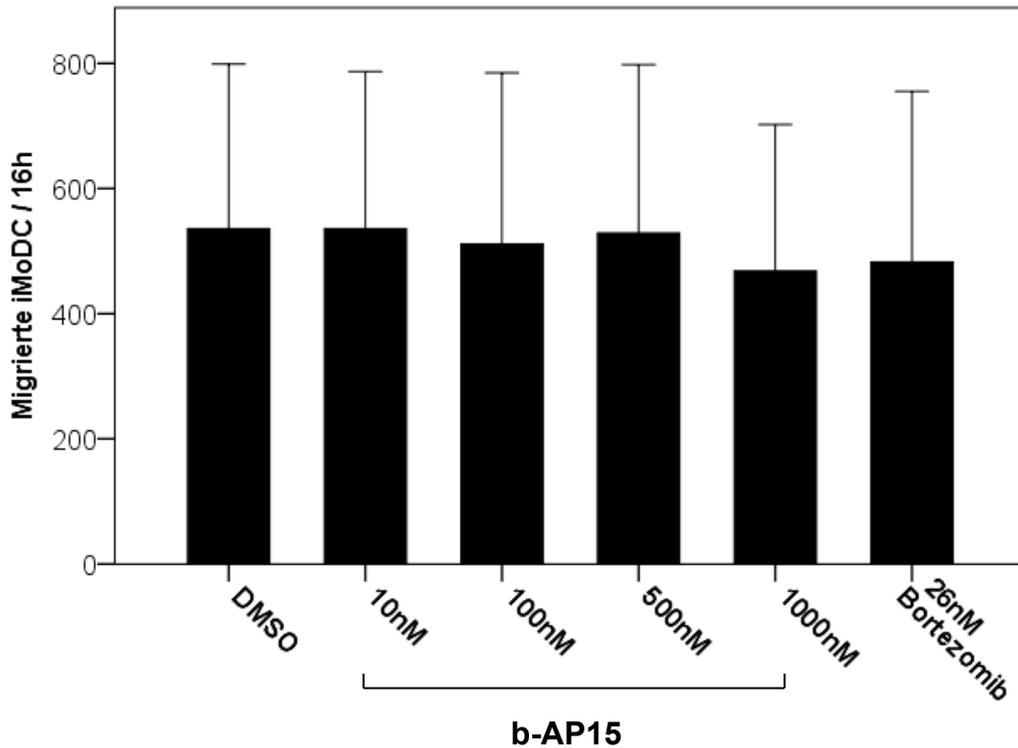


Abbildung 11: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von unreifen iMoDC nach 16 h Inkubation mit Mip-3 β , Statistik. Unreife iMoDC wurden jeweils als Triplikate in Transwells in der Anwesenheit von Mip-3 β für 16 h inkubiert. 24 h vor der Ernte erfolgte die Zugabe von b-AP15 in den entsprechenden Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM bzw. von DMSO als Negativ- oder Bortezomib als Positiv-Kontrolle. Nach der Inkubation wurde die Anzahl der migrierten iMoDC am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern. Die p-Werte wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben berechnet: Mean \pm 1 SD, $p > 0,05$.

5.2.2 Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von mMoDC

Im Weiteren sollte der Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von reifen mMoDC untersucht werden. Der Versuchsaufbau war analog zu den iMoDC. Aufgrund der Versuche mit iMoDC wurde auf die kürzere Inkubationszeit von 3 h verzichtet und die Zellen direkt für 16 h mit Mip-3 β inkubiert. Jeweils 24 h vor der Ernte wurden die unterschiedlichen Konzentrationen an b-AP15 sowie DMSO und Bortezomib zu den Zellen gegeben. Die migrierten mMoDC wurden mit dem Durchflusszytometer ausgezählt. In **Abbildung 12** sind eine exemplarische FACS-Messung und in **Abbildung 13** die zusammengefassten Ergebnisse für mMoDC (n = 7, Bortezomib n = 5), die zeigen, dass im Gegensatz zu Bortezomib b-AP15 auch keinen signifikanten Effekt auf die Migrationsfähigkeit der mMoDC hatte, dargestellt.

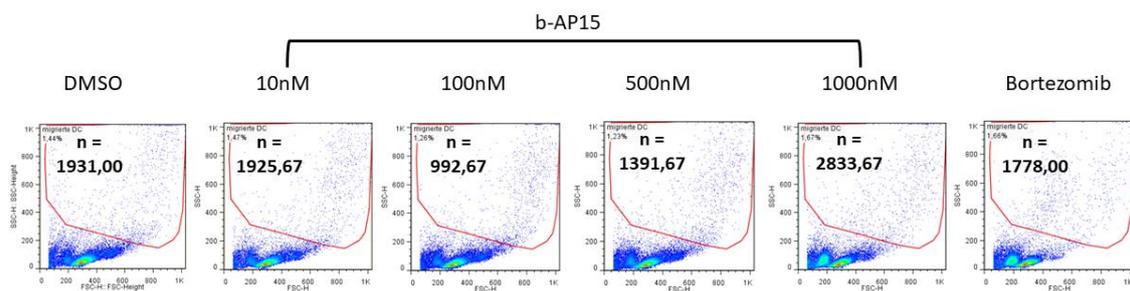


Abbildung 12: Exemplarische Zellzählung der migrierten reifen mMoDC. Repräsentative FACS-Dot-Plot-Analysen von reifen mMoDC nach Inkubation mit Mip-3 β für 16 h in Transwell-Migration-Assays. Jeweils 24 h vor der Ernte der Zellen erfolgte die Zugabe von b-AP15 in den angegebenen Konzentrationen bzw. von Bortezomib. Als Negativ-Kontrolle diente DMSO. Der Anteil insgesamt migrierter Zellen ist in Prozent angegeben. Die Zellzahl n als Mittelwert der Anzahl migrierter mMoDC der jeweiligen Dreifachansätze.

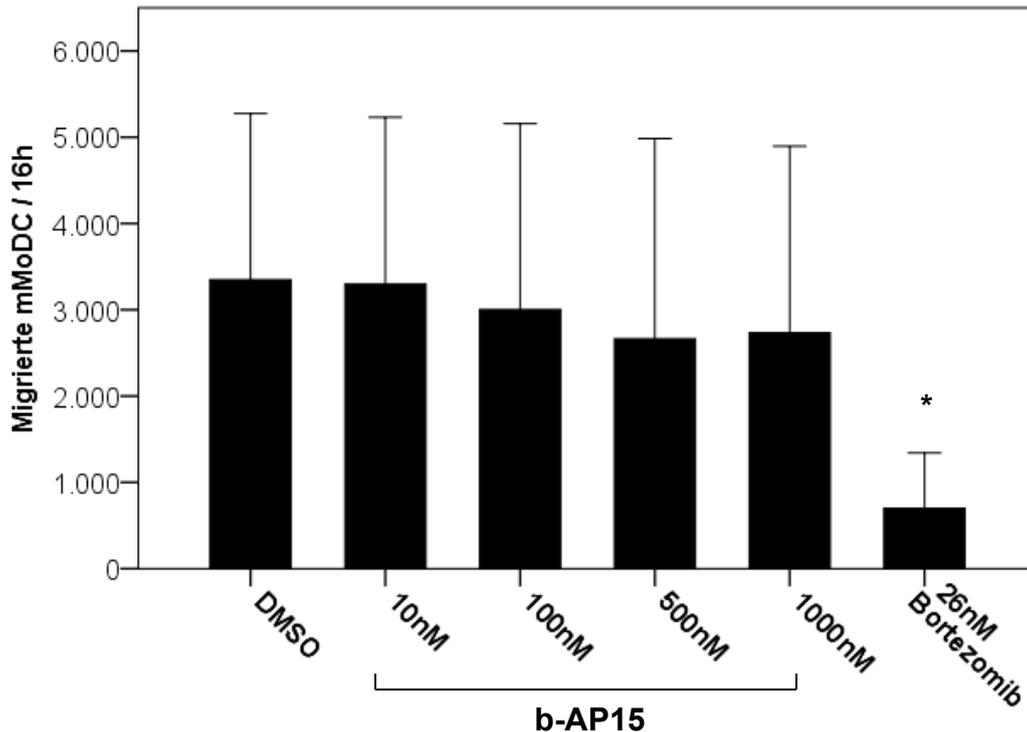


Abbildung 13: Einfluss von b-AP15 auf die Migrationsfähigkeit von reifen mMoDC nach 16 h Inkubation mit Mip-3 β , Statistik. mMoDC wurden nach der Ernte in Transwells in der Anwesenheit von Mip-3 β für 16 h inkubiert. 24 h vor der Ernte erfolgte die Zugabe von b-AP15 in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM bzw. von DMSO als Negativ- oder Bortezomib als Positiv-Kontrolle (n = 7, außer für Bortezomib n = 5). Nach der Inkubation wurde die Anzahl der migrierten mMoDC durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der migrierten mMoDC aller ausgezählten Stichproben. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: Mean \pm SD, *p < 0,05.

5.2.3 Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von unreifen iMoDC

Der Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von iMoDC wurde *in vitro* mittels eines Modellsystems, wie unter 3.8 beschrieben, untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte unverzüglich die Messung der Zellen am Durchflusszytometer. Gemessen wurde hierbei die mediane Fluoreszenzintensität der Zellen, welche ein Maß dafür darstellte, wieviel FITC-Dextran von den iMoDC durch Phagozytose aufgenommen wurde. Die bei 4 °C inkubierten Zellen dienten hierbei als Negativ-Kontrolle. Weiterhin stellten die nicht mit FITC-Dextran versetzten iMoDC eine zusätzliche Negativ-Kontrolle dar (nicht dargestellt). Die Ergebnisse für 4 °C und 37 °C wurden zusammengefasst

und die Mittelwerte der jeweiligen medianen Fluoreszenzintensität in **Abbildung 14** dargestellt. Wie zu erwarten, zeigte sich bei 4 °C eine deutlich geringere Phagozytoseaktivität als bei 37 °C. Vergleicht man die Werte der bei 37 °C inkubierten iMoDC, zeigte sich, dass erst 1000 nM b-AP15 zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytosefähigkeit führten. Auch die Kontrolle Bortezomib schränkte die Fähigkeit der iMoDC zur Phagozytose signifikant ein.

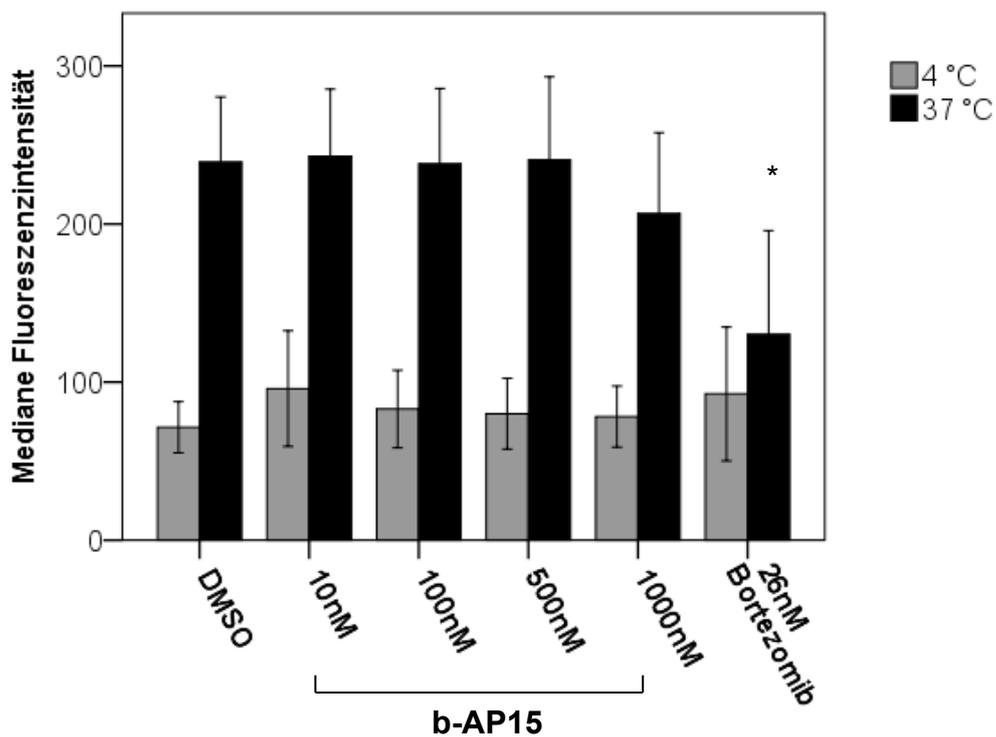


Abbildung 14: Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von unreifen iMoDC, Statistik. Mit b-AP15, Bortezomib oder DMSO behandelte unreife iMoDC wurden bei 4 °C bzw. 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurde für eine weitere Stunde FITC-Dextran zugegeben und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. Mittelwert der medianen Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Messungen (n = 10). Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: Mean ± SD, *p < 0,05.

5.2.4 Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von reifen mMoDC

In den nächsten Experimenten wurde der Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von mMoDC, in analoger Weise zu den iMoDC, untersucht. Die zusammengefassten Messergebnisse (n = 4) sind in **Abbildung 15**

dargestellt. Wie für mMoDC typisch zeigte sich insgesamt eine geringere Phagozytoseaktivität als bei den iMoDC. Desweiteren ergab sich, wie zu erwarten, eine geringere Phagozytoseaktivität der bei 4 °C inkubierten im Vergleich zu den bei 37 °C inkubierten Zellen. Vergleicht man die gemessenen Werte der bei 37 °C inkubierten Zellen lässt sich kein signifikanter Einfluss des b-AP15 auf die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose feststellen. Die Kontrolle Bortezomib hingegen reduzierte die Phagozytosefähigkeit auch der mMoDC signifikant.

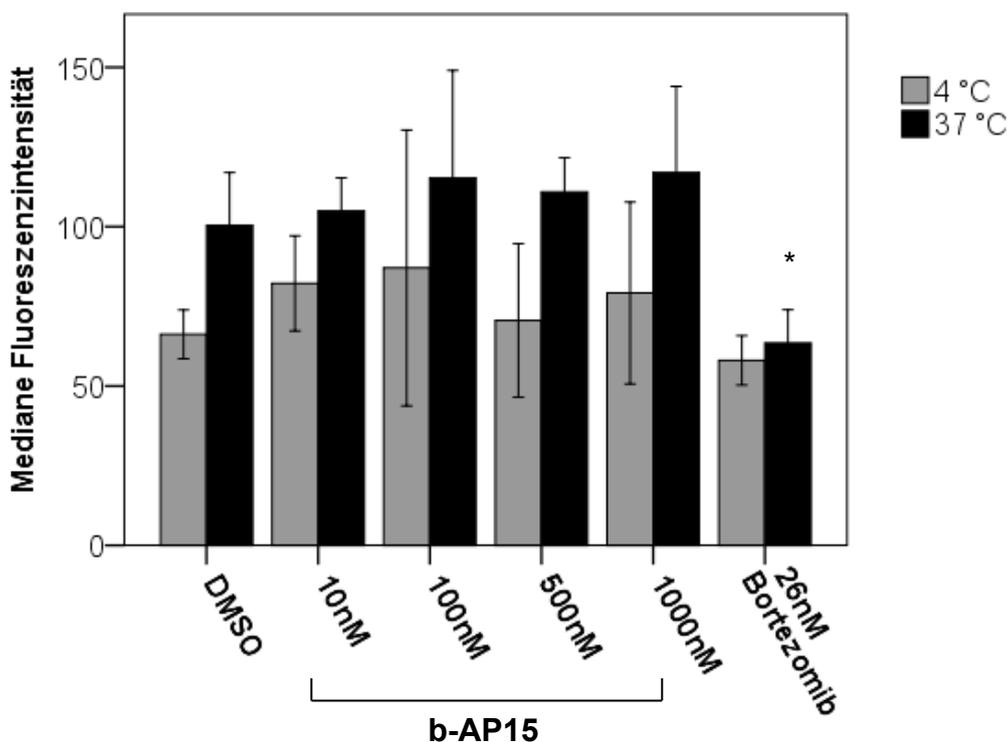


Abbildung 15: Einfluss von b-AP15 auf die Phagozytosefähigkeit von reifen mMoDC, Statistik. Mit b-AP15, Bortezomib und DMSO behandelte reife mMoDC wurden bei 4 °C bzw. 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurde für eine weitere Stunde FITC-Dextran zugegeben und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. Mittelwert der medianen Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Messungen (n = 4). Die p-Werte wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben berechnet: Mean \pm 1 SD, *p < 0,05.

5.3 Proliferationsassays (CFSE)

Wie oben ausgeführt, sind DC in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren und damit primäre Immunantworten zu initiieren. Als *In-vitro*-Nachweistest zur Erfassung dieses Parameters der DC-Funktion (allogene stimulatorische Kapazität), wurden im Folgenden CFSE-Proliferationsassays eingesetzt.

5.3.1 Proliferationsassays (CFSE) mit unreifen iMoDC als Stimulator-Zellen

Im ersten Schritt wurde getestet, ob b-AP15 die Fähigkeit von iMoDC zur Stimulation allogener PBMC beeinflusst. Hierfür wurden die mit b-AP15, Bortezomib und DMSO behandelten Zellen nach der Ernte jeweils 6 Tage in Anwesenheit allogener PBMC inkubiert, die zuvor mit dem zellpermeablen Farbstoff CFSE gefärbt wurden. Desweiteren dienten als Negativ-Kontrolle allogene PBMC ohne iMoDC und als Positiv-Kontrolle allogene PBMC, zu denen PHA gegeben wurde. PHA stellt ein Mitogen dar, welches auf T-Lymphozyten als starker unspezifischer Stimulus der Zellteilung wirkt. Die Analyse der iMoDC erfolgte mit dem Durchflusszytometer. Hierbei konnte anhand der sukzessiven Verdünnung der CFSE-Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung die Proliferation der allogenen PBMC nachgewiesen und der prozentuale Anteil proliferierender Zellen quantifiziert werden. Die Ergebnisse aller Messungen mit iMoDC (n = 7, Bortezomib n = 6) sind in **Abbildung 16** zusammengefasst. Hierbei wurde jeweils der Mittelwert der Einzelmessungen gebildet. Vergleicht man den Anteil der proliferierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen b-AP15-Konzentrationen und der Negativ-Kontrolle feststellen. Bortezomib hingegen schien die Proliferation der PBMC tendenziell einzuschränken, wenn auch bei n = 6 (noch) nicht signifikant. Die Positivkontrolle PHA bewirkte eine deutliche Steigerung der Zellproliferation. Somit zeigten diese Experimente, dass b-AP15 keinen negativen Einfluss auf die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung von iMoDC hat.

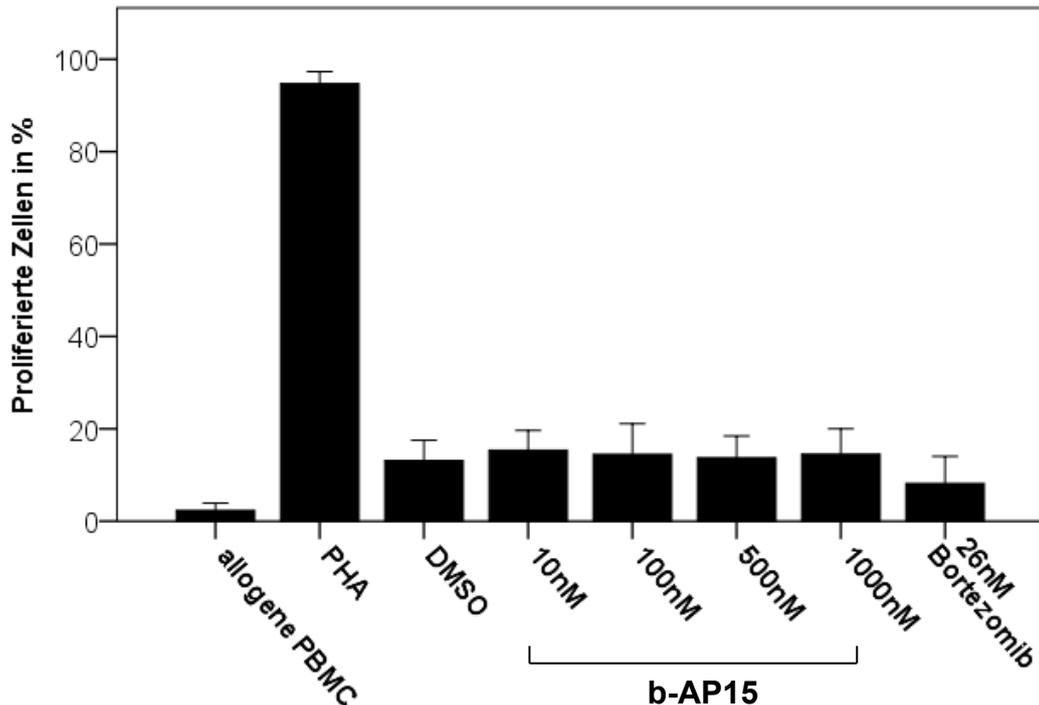


Abbildung 16: Einfluss von b-AP15 auf die T-Zell-Stimulation durch unreife iMoDC, Statistik. Allogene PBMC wurden nach Färbung mit CFSE mit unreifen iMoDC, die mit b-AP15 behandelt wurden, für 6 Tage kokultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten allogene PBMC, die ohne iMoDC kultiviert wurden und als Positiv-Kontrolle allogene PBMC, die mit PHA stimuliert wurden. DMSO diente als Negativ- und Bortezomib als Positiv-Kontrolle. Nach 6 Tagen Inkubation wurde der Anteil proliferierter Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen (n = 7, Bortezomib n = 6). Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: Mean ± SD, p > 0,05.

5.3.2 Proliferationsassays (CFSE) mit reifen mMoDC als Stimulator-Zellen

In den folgenden Experimenten wurde mittels des gleichen Versuchsaufbaus auch für mMoDC getestet ob und inwiefern b-AP15 ihre Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation beeinflusst. **Abbildung 17** stellt die zusammengefassten Ergebnisse aller Messungen (n = 5, Bortezomib n = 3) dar. Es wurde der Mittelwert für die entsprechenden Konzentrationen und Kontrollen aus allen Messergebnissen gebildet. Insgesamt war bei den mMoDC erwartungsgemäß der Anteil proliferierter Zellen höher als bei den iMoDC. Auch hier ließ sich jedoch kein signifikanter Rückgang der T-Zellproliferation unter dem Einfluss von b-AP15

feststellen. Bortezomib bewirkte tendenziell eine Einschränkung der Proliferationsfähigkeit, wenn auch bei den hier durchgeführten Experimenten (n = 3) statistisch (noch) nicht signifikant. Die Positivkontrolle PHA hingegen bewirkte auch hier einen deutlichen Anstieg der Zellproliferation.

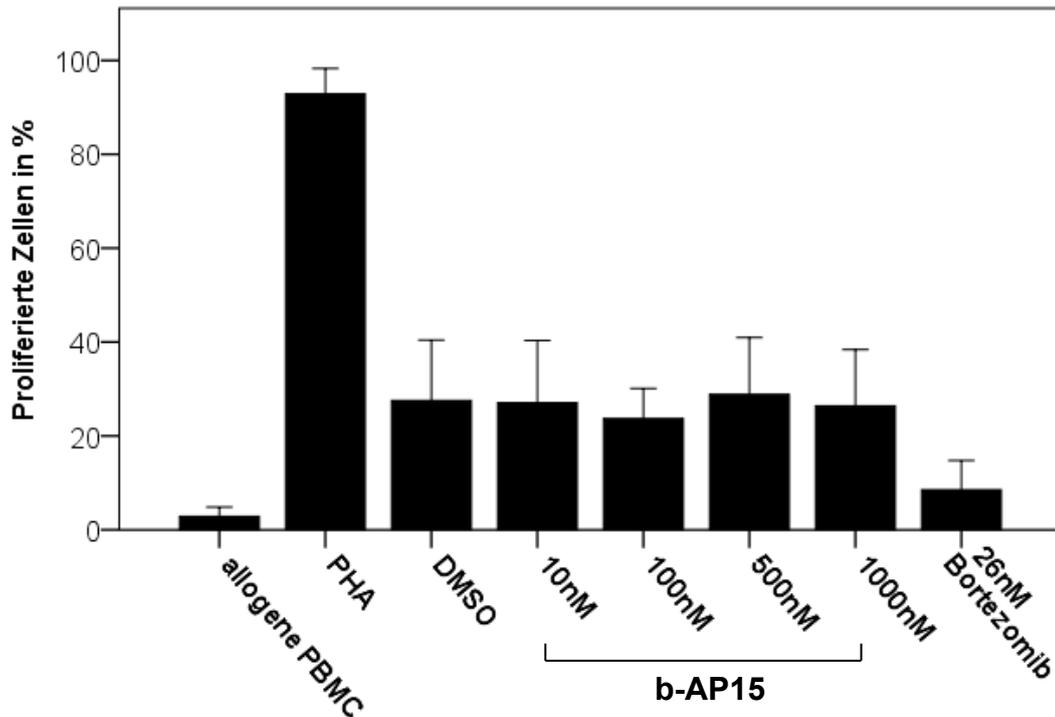


Abbildung 17: Einfluss von b-AP15 auf die T-Zell-Stimulation durch reife mMoDC, Statistik. Allogene PBMC wurden nach Färbung mit CFSE mit reifen mMoDC, die mit b-AP15 behandelt wurden, für 6 Tage kokultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten allogene PBMC, die ohne mMoDC kultiviert wurden und als Positiv-Kontrolle allogene PBMC, die mit PHA stimuliert wurden. DMSO diente als Negativ- und Bortezomib als Positiv-Kontrolle. Nach 6 Tagen Inkubation wurde der Anteil proliferierter Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus allen durchgeführten Messungen (n = 5, Bortezomib n = 3). Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet: Mean ± SD, p > 0,05.

6. Diskussion

6.1 Adoptive Immuntherapie unter Verwendung von DCs

Die großen Fortschritte der Tumorummunologie während der letzten Jahre ermöglichten die Entwicklung neuartiger Immuntherapien zur Behandlung maligner Erkrankungen, die unterschiedliche Ansätze verfolgen. Sowohl die passive T-Zell-Immuntherapie (z. B. adoptive Transfusion von chimären Antigenrezeptor-T-Zellen, sog. CAR-T-Zellen), als auch die aktive Immuntherapie (Vakzinierung) sind bereits in der klinischen Testung bzw. Anwendung.

DC sind professionelle APZ, die im Gegensatz zu anderen APZ in der Lage sind, ruhende, naive T-Zellen zu stimulieren und damit primäre Immunantworten zu initiieren. Dadurch spielen sie bei der Aktivierung und Regulation der Immunantwort eine herausragende Rolle.

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften werden autologe *in vitro* generierte MoDC, im Rahmen von Vakzinierungsstudien, als Adjuvantien genutzt, um, nach ihrer Beladung mit Tumorantigenen und Retransfusion, Immunantworten gegen Tumorzellen zu generieren.

Mit Sipuleucel-T (Provenge[®], APC8015) war bereits eine Form von DC-basierter Immuntherapie für das fortgeschrittene Prostatakarzinom zugelassen [49, 50]. Auch bezüglich weiterer Tumorentitäten konnten vielversprechende Ergebnisse durch weitere Ansätze mit DC-basierter Immuntherapie erzielt werden [40–44].

6.2 Zielgerichtete Therapien („targeted therapies“) – Proteasomeninhibitoren

Parallel zur Entwicklung dieser immuntherapeutischen Strategien haben sog. zielgerichtete Therapien („targeted therapies“) die Behandlung von Krebs in den letzten 15 Jahren auf breiter Front revolutioniert. Zielgerichtete Arzneimittel sind niedermolekulare Verbindung („small molecules“) oder monoklonale Antikörper, die spezifisch in die Signalübertragung von Tumorzellen eingreifen um deren Wachstum, Vermehrung und/oder Angiogenese einzudämmen. Eine völlig neue Substanzklasse ist hierbei die der Proteasomeninhibitoren, die in

Tumorzellen die Aktivität der Proteasomen hemmt und dadurch Apoptose induziert.

Zielgerichtete Therapie können allein oder in Kombination mit anderen, wie z. B. Chemo- oder Radiotherapie oder auch Immuntherapie durchgeführt werden. So konnten Spisek *et al.* nach Bortezomibgabe eine verbesserte Immunantwort durch tumorspezifische DCs gegenüber Tumorzellen des Multiplen Myeloms zeigen [93]. Die Analyse ihrer Auswirkungen auf DC ist daher, nicht zuletzt im Hinblick auf eine potenzielle Kombinationstherapie mit einer DC-basierten Immuntherapie im Sinne einer für den jeweiligen Patienten spezifischen DC-Vakzinierung, essenziell. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss des neuen „small-molecule“ Proteasomeninhibitors b-AP15, im Vergleich mit Bortezomib (Velcade®), dem vor ca. 15 Jahren ersten zugelassenen Proteasomeninhibitor, auf *in vitro* generierte MoDC zu untersuchen.

6.3 Bortezomib beeinflusst Phänotyp und Funktion von DC

Während Bortezomib, wie u. a. auch in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Brossart (ehemals Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen) bereits gezeigt, unreife wie auch reife MoDC sowohl in ihrem Phänotyp als auch ihrer immunogenen Funktion in signifikantem Maß einschränkte [81–83], konnte dies in der vorliegenden Arbeit für b-AP15 nicht festgestellt werden. Bortezomib beeinträchtigte insbesondere die Ausreifung von iMoDC zu mMoDC, wobei iMoDC insgesamt empfänglicher für die negativen Effekte von Bortezomib waren als mMoDC [81, 82]. So führte Bortezomib zu einer abgeschwächten Reaktion der MoDC auf exogene wie auch endogene Stimuli [81–83]. Zudem war die Zytokin-Produktion, sowie die Endozytose- und Migrationsfähigkeit ebenso wie die T-Zell stimulatorische Kapazität der MoDC herabgesetzt [81, 83, 94]. Desweiteren ergaben diese Analysen, dass Bortezomib erhebliche Auswirkungen auf zentrale Signaltransduktionskaskaden, wie des NF- κ B und der MAP-Kinase, hatte [81]. Auch konnte gezeigt werden, dass Bortezomib die Apoptose in MoDC induziert und somit einen immunsupprimierenden Einfluss hat [80]. In Kontrast hierzu gibt

es aber auch Hinweise, dass Bortezomib zu einer verstärkten Immunantwort von DC gegen diverse Tumorentitäten führt [93, 95]. Mit einem Mausmodell wiederum wurde festgestellt, dass die Injektion von Bortezomib einen supprimierenden Einfluss auf die Ausreifung der nachfolgend *ex vivo* generierten DC hat [96]. Passend zu diesen Erkenntnissen wird Bortezomib auch als potenzieller Therapieansatz für Graft-versus-host Reaktionen (GvHR) bei Stammzelltransplantationen diskutiert [94, 97–99]. In diesem Kontext wird vermutet, dass Bortezomib durch Hemmung der DC-Funktion eine Abschwächung der unerwünschten Immunreaktion gegen das Transplantat zur Folge haben könnte. Koreth *et al.* konnten allerdings keinen klinischen Vorteil eines Behandlungsschemas mit Bortezomib gegenüber dem mit Tacrolimus/Methotrexat nachweisen [100].

Die (negativen) Effekte von Bortezomib beschränken sich indes nicht nur auf DC, sondern betreffen auch andere Immunzellen, wie T-Zellen oder NK-Zellen [78, 79, 81, 94, 101, 102]. Bortezomib bewirkte bspw. einen Rückgang der Population an CD4⁺ T-Zellen sowie auch deren Fähigkeit zur Zytokinproduktion, was wiederum zur vermehrten Reaktivierung von Varizella-Zoster-Infektionen führte [103]. NK-Zellen sind Teil der angeborenen Immunität mit zytotoxischer Aktivität, die entartete Zellen, wie virusinfizierte Zellen und Tumorzellen, sehr effektiv attackieren [104–106]. NK-Zellen sind grundsätzlich anfällig für die toxischen Effekte von Proteasomeninhibitoren [107, 108]. Dementsprechend wurde gezeigt, dass b-AP15 in der äquipotenten Dosis toxischer für NK-Zellen ist als Bortezomib [109].

6.4 Effekte von b-AP15 auf MoDC

In der vorliegenden Arbeit bewerteten und stellten wir die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der Auswirkungen von Bortezomib auf MoDC denen des neu identifizierten Deubiquitinase-Inhibitors b-AP15 gegenüber. Aufgrund der bereits umfassend beschriebenen starken Beeinträchtigung von MoDC durch Bortezomib diente diese Substanz als Referenz und Positivkontrolle bei den hier durchgeführten Untersuchungen. Dabei wurde b-AP15 in Konzentrationen

eingesetzt, die signifikante antitumorale Effekte auf verschiedene Mantelzellymphomzellen hatten [87]. Die antitumoralen Effekte von b-AP15 werden zum einen über eine Reihe an Deubiquitinationen, welche letztlich in der extrinsischen Apoptose von verschiedenen Tumorzellen resultiert, sowie zum anderen über die Sensibilisierung von Tumorzellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose durch T- und NK-Zellen vermittelt [85–89, 110].

Wie Bortezomib scheint auch b-AP15 neben malignen auch nicht-maligne Zellen zu beeinflussen. Beispielsweise wurde die Zellviabilität von PBMCs von gesunden Spendern durch b-AP15 geringfügig reduziert [86, 88]. Wohingegen die zytotoxischen Effekte von b-AP15 besonders in Bezug auf NK-Zellen deutlich werden, da diese auf b-AP15 im Vergleich zu Bortezomib viel empfindlicher reagieren [87, 109].

In den ersten Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp von MoDC, die mit b-AP15 behandelt wurden, durchflusszytometrisch analysiert. Im Gegensatz zu Bortezomib beeinflusste b-AP15 die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, welche gemeinsam mit CD83 als Reifungsmarker dienen, sowie des ebenfalls an der T-Zell-Interaktion beteiligten Oberflächenmoleküls CD1a auf unreifen iMoDC und reifen mMoDC nicht. Wie bereits beschrieben, führte die Bortezomibkontrolle zu einer verringerten Expression dieser DC-Oberflächenmarker [81, 82]. Auch das Oberflächenmolekül HLA-DR, welches der Antigenpräsentation dient und ausschließlich von APZ exprimiert wird, wurde von b-AP15 nicht beeinflusst. Für die HLA-DR-Expression unter Bortezomib zeigt die einschlägige Literatur kein einheitliches Bild [80–83, 94].

In den folgenden Analysen wurden wichtige funktionelle Parameter, wie Phagozytose, Migration und T-Zell stimulatorische Kapazität, von MoDC unter dem Einfluss von b-AP15 evaluiert. Dabei zeigte sich, dass die für die immunogene Funktion essenzielle Aufnahme von Antigenen durch Phagozytose, sowohl für mMoDC als auch für iMoDC durch b-AP15 nicht eingeschränkt war, während insbesondere bei iMoDC diese Funktion durch Bortezomib herabgesetzt wurde. Dies könnte in der per se höheren Endozytoseaktivität der iMoDC begründet liegen [111]. Eine weitere essenzielle Eigenschaft reifer DC ist

ihre Fähigkeit nach der Antigenaufnahme in die entsprechenden drainierenden Lymphknoten zu wandern, um dort mit T-Zellen zu interagieren. Die Migration der DC wird ausgelöst durch unterschiedliche chemotaktische Signalmoleküle, wie das in dieser Arbeit verwendete Chemokin Mip-3 β /CCL19, welches an den von DC exprimierten Rezeptor CCR7 bindet. b-AP15 beeinflusste, in dem hier verwendeten Transwell-Migration-Assay, die Migrationsfähigkeit von sowohl unreifen wie auch reifen MoDC nicht. Die Kontrollsubstanz Bortezomib hingegen hemmte, wie bereits beschrieben, die Migrationsfähigkeit von reifen mMoDC signifikant [81]. Dass der supprimierende Einfluss von Bortezomib auf die Migrationsfähigkeit unreifer iMoDC nur sehr gering war, ließe sich dadurch erklären, dass CCR7 vermehrt auf der Oberfläche von reifen DC exprimiert wird, was sich in der generell niedrigeren Migrationsrate der iMoDC im Vergleich zu den mMoDC widerspiegelte (Abb. 11 und 13) [112].

Die zentrale Aufgabe von DC ist es antigenspezifische T-Zell Antworten zu induzieren. In den hier durchgeführten Proliferationsassays zur Ermittlung der T-Zell stimulatorischen Kapazität der MoDC, war auch diese Funktion durch b-AP15 nicht signifikant eingeschränkt. Bortezomib hingegen führte, wie bereits vorbeschrieben, wenn auch in der vorliegenden Arbeit (noch) nicht signifikant, tendenziell zu einer reduzierten Stimulation der Proliferation allogener T-Zellen [81, 82]. Dass (noch) keine statistische Signifikanz erreicht wurde, könnte in der geringen Anzahl der hier durchgeführten Experimente (iMoDC n = 6, mMoDC n = 3) begründet liegen. Diese Ergebnisse können in einen Kausalzusammenhang gestellt werden, mit den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente, die gezeigt haben, dass die Expression der an der T-Zellinteraktion beteiligten co-stimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 durch b-AP15, im Gegensatz zu Bortezomib, nicht beeinträchtigt war.

DCs sind zudem durch verschiedene Zytokine wie z. B. IL-6 oder TNF an essentiellen Prozessen wie der Induktion einer Immunantwort oder auch des Entzündungsprozesses beteiligt [113]. In Experimenten, die die der vorliegenden Arbeit ergänzen, konnten Schmidt *et al.* unter dem Einfluss von Bortezomib eine signifikante Reduktion der IL-6-, IL-10- und TNF-Sekretion durch mMoDC feststellen [114]. Interessanterweise war in diesen weiterführenden

Untersuchungen die IL-10-Sekretion von mMoDC unter b-AP15 in Konzentrationen > 500 nM signifikant verringert, wohingegen keine Reduktion von IL-6 oder TNF gesehen wurde [114].

Maligne Zellen können verschiedene Mechanismen entwickeln, um den Auswirkungen einer Proteasomeninhibition zu entgehen. Dazu gehören u. a. Veränderungen im Proteasom-Komplex selbst, die zu einer verminderten Funktionsfähigkeit und dadurch zu einer erhöhten Effizienz alternativer Mechanismen des Proteinabbaus, dem Aggresom-Pathway, Multidrug-Efflux-Transporter und Autophagie führen [115]. Präklinische Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass die selektive Blockade der Deubiquitinasen USP14 und UCHL5 im Ubiquitin-Proteasom-System durch b-AP15 Resistenzen gegenüber Bortezomib durchbrechen können [88]. Aktuelle Erkenntnisse zeigen zudem, dass sich Resistenzen gegen b-AP15, anders als gegen Bortezomib, *in vitro* nur sehr schwer ausbilden [116]. Die Gründe für diese Unterschiede zwischen Bortezomib und b-AP15 liegen wahrscheinlich zum Teil in möglicherweise divergenten Auswirkungen auf relevante Signaltransduktionskaskaden, wie z. B. auf verschiedene Caspasen, die in einem Zusammenhang mit der Regulation und Kontrolle der Apoptose und/oder des Zellzyklus stehen [88]. Die nur sehr geringen Auswirkungen von b-AP15 auf MoDC sowie die langsame und unvollständige Ausbildung von Resistenzen gegenüber dieser Substanz machen sie zu einem attraktiven Kandidaten für einen zukünftigen klinischen Einsatz.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit für b-AP15, in für verschiedene Tumorzelllinien toxischen Konzentrationen [87], *in vitro* kein signifikanter Einfluss auf Funktion oder Phänotyp sowohl unreifer als auch reifer MoDC festgestellt. Die für Bortezomib bereits durch Nencioni *et al.* beschriebenen Auswirkungen auf MoDC konnten bestätigt werden [80, 81]. Eine interessante Frage, die in zukünftigen Experimenten beantwortet werden muss, ist, inwieweit sich b-AP15 *in vivo* auf Phänotyp und Funktion von DC-Populationen des peripheren Bluts auswirkt. Da die Substanz für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen ist, müssten diese Experimente allerdings zunächst *in vitro* und/oder an einem Mausmodell durchgeführt werden.

6.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Kenntnis, sowohl unerwünschter als auch erwünschter Auswirkungen medikamentöser Tumortherapien auf das Immunsystem ist von großer Bedeutung, insbesondere im Rahmen potenzieller zellulärer Tumormimmuntherapien. Zudem können stimulierende oder inhibitorische Effekte zugelassener Medikamente auf Zellen des Immunsystems z. B. bei der Prävention einer akuten GvHR nach allogener Stammzelltransplantation, oder der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eine therapeutische Rolle spielen. Ein strukturell verwandtes Analogon von b-AP-15, VLX1570, befand sich bereits in einer Phase-1/2-Studie in Kombination mit Dexamethason bei Patienten mit rezidiviertem/refraktärem Multiplen Myelom (NCT02372240). Leider musste die Studie aufgrund des Auftretens von pulmonaler Toxizität mit Todesfolge bei Applikation von Dosen mit antikanzerogenen Effekten abgebrochen werden [117]. Nichtsdestotrotz konnten moderate antitumorale Effekte von VLX1570 nachgewiesen werden, so dass es lohnend erscheint analog wirkende DUB-Inhibitoren ausfindig zu machen, die ein besseres Wirkungs-/Nebenwirkungsspektrum aufweisen [117]. Interessanterweise scheinen in verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise beim Multiplen Myelom die Fähigkeit der DC zur Immunstimulation bereits per se eingeschränkt zu sein [118, 119]. Während Bortezomib die Effizienz von Therapiealgorithmen durch die Einschränkung der DC-Funktionalität sogar noch weiter reduzieren könnte, konnten wir keine solche Nebenwirkung von b-AP15 *in vitro* auf MoDC feststellen. Zudem ist Bortezomib bei Myelompatienten assoziiert mit der Reaktivierung latenter Virusinfektionen [120, 121]. Dementsprechend konnten Basler *et al.* im Mausmodell mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus auch zeigen, dass Bortezomib zu einer Einschränkung des virusspezifischen T-Zell-Primings führte [122]. Auch unter diesem Gesichtspunkt könnten b-AP15 und seine Derivate eine Alternative zu Bortezomib darstellen. Dies müsste jedoch in weiteren präklinischen und klinischen Studien geprüft werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen also zusammengefasst, dass b-

AP15 im Vergleich zu Bortezomib *in vitro* deutlich geringere Auswirkungen auf Phänotyp und Funktion humaner DC hat. Sie könnten daher dazu dienen, eine DC-basierte Immuntherapie und die Behandlung mit Proteasomeninhibitoren sinnvoll aufeinander abzustimmen. Zudem liefern sie erste Daten, auf deren Grundlage die immunsupprimierenden Eigenschaften von Proteasomeninhibitoren, für ihren möglichen Einsatz bei GvHR oder Autoimmunerkrankungen, weiter evaluiert werden können.

6.6 Limitierende Faktoren dieser Arbeit

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit einer experimentellen Substanz, die für die Anwendung beim Menschen nicht zugelassen ist, *in vitro* an MoDC durchgeführt. Demzufolge können die Ergebnisse nur bedingt auf die *In-vivo*-Situation im Menschen übertragen werden.

Zudem wurden die Effekte von b-AP15 noch nicht erschöpfend analysiert: Nicht getestet wurde z. B. der Einfluss auf die Zytokinproduktion der MoDC wie IL-6, TNF- α oder IL-12. Die Untersuchung relevanter Signaltransduktionskaskaden, wie NF- κ B, IRF-3, IRF-8 oder der MAP-Kinase, wie für Bortezomib bereits erfolgt, wären ebenfalls von großem Interesse. Auch Untersuchungen zum Einfluss von b-AP15 auf andere Immunzellen, insbesondere auf T-Zellen, sind indiziert.

7. Zusammenfassung

Die Entdeckung, dass die Inhibition von Proteasomen bei malignen Zellen zur Wachstumshemmung und Apoptose führt, ermöglichte die Entwicklung von Proteasomeninhibitoren als neuartiges Therapieprinzip. Neben den bereits klinisch zugelassenen Substanzen Bortezomib (Velcade®), Carfilzomib (Kyprolis®) und Ixazomib (Ninlaro®), wurde mit b-AP15 eine neue Klasse von Proteasomeninhibitoren entwickelt, die die DUB-Aktivität der 19S-Untereinheit hemmen, ohne die 20S-Untereinheit zu beeinträchtigen.

Innovative Kombinationstherapien aus Chemo-, Immun- und zielgerichteten Therapien gewinnen bei der Behandlung maligner Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. Eine Form der Immuntherapie ist die Vakzinierung mit *ex vivo* manipulierten autologen DC. Die Analyse der Auswirkungen der Medikamente auf das Immunsystem im Allgemeinen und DC im Besonderen ist hierbei von grundlegendem Interesse. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Bortezomib den Phänotyp und die Funktion von *in vitro* aus Monozyten generierten MoDC stark beeinträchtigt. [80–83]. In der vorliegenden Arbeit sollte daher auch der Einfluss von b-AP15 auf MoDC untersucht werden.

Die hierbei durchgeführten Zellkulturexperimente und durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben, dass b-AP15 keinen wesentlichen Einfluss auf den Phänotyp von MoDC hatte: die Expression von für die Aufnahme von Antigenen und die Vermittlung der T-Zell-Antwort essenziellen Oberflächenmarkern wie DC-SIGN, CD14, CD1a oder CD80/86 war nicht beeinträchtigt. Untersuchungen zur Funktion der MoDC unter dem Einfluss von b-AP15, in Form von Migrations- und Proliferationsassays, erbrachten ebenfalls keine negativen Auswirkungen der Substanz.

Diese Daten könnten dazu beitragen, eine DC-basierte Immuntherapie und die Behandlung mit Proteasomeninhibitoren sinnvoll aufeinander abzustimmen. Zudem sind sie ein weiterer Baustein bei der Evaluation der immunsupprimierenden Eigenschaften von Proteasomeninhibitoren.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Gordon, Siamon. Pattern Recognition Receptors. *Cell*. 7. 2002. 927–930.
- 2 Lai, Anne Y.; Kondo, Motonari. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in immunology*. 4. 2008. 207–212.
- 3 Ceredig, Rhodri; Rolink, Antonius G.; Brown, Geoffrey. Models of haematopoiesis. *Nature reviews. Immunology*. 4. 2009. 293–300.
- 4 Turvey, Stuart E.; Broide, David H. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2 Suppl 2. 2010. S24-32.
- 5 Steinman, R. M.; Adams, J. C.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *Journal of Experimental Medicine*. 4. 1975. 804–820.
- 6 Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*. 5. 1973. 1142–1162.
- 7 Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 2. 1974. 380–397.
- 8 Steinman, R. M.; Lustig, D. S.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 6. 1974. 1431–1445.
- 9 Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 6673. 1998. 245–252.
- 10 Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology*. 1991. 271–296.
- 11 Mellman, Ira; Steinman, Ralph M. Dendritic Cells. *Cell*. 3. 2001. 255–258.
- 12 Mellman, Ira. Dendritic cells. *Cancer immunology research*. 3. 2013. 145–149.
- 13 Hackstein, Holger; Thomson, Angus W. Dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*. 1. 2004. 24–34.
- 14 Dong, Wei; Wei, Ran; Shen, Hongchang; Ni, Yang; Meng, Long; Du, Jiajun. Combination of DC Vaccine and Conventional Chemotherapeutics. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 5. 2016. 558–567.
- 15 Harari, Alexandre; Graciotti, Michele; Bassani-Sternberg, Michal; Kandalaft, Lana E. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nature reviews. Drug discovery*. 9. 2020. 635–652.

- 16 Wang, Yingying; Xiang, Ying; Xin, Victoria W.; Wang, Xian-Wang; Peng, Xiao-Chun; Liu, Xiao-Qin; Wang, Dong; Li, Na; Cheng, Jun-Ting; Lyv, Yan-Ning; Cui, Shu-Zhong; Ma, Zhaowu; Zhang, Qing; Xin, Hong-Wu. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*. 1. 2020. 107.
- 17 Merad, Miriam; Manz, Markus G. Dendritic cell homeostasis. *Blood*. 15. 2009. 3418–3427.
- 18 Merad, Miriam; Sathe, Priyanka; Helft, Julie; Miller, Jennifer; Mortha, Arthur. The dendritic cell lineage. *Annual review of immunology*. 2013. 563–604.
- 19 Shortman, Ken; Naik, Shalin H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology*. 1. 2007. 19–30.
- 20 Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 3. 2001. 259–262.
- 21 Liu, Y. J.; Kanzler, H.; Soumelis, V.; Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature immunology*. 7. 2001. 585–589.
- 22 Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J.; Pulendran, B.; Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000. 767–811.
- 23 Shortman, Ken; Liu, Yong-Jun. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*. 3. 2002. 151–161.
- 24 Qu, Chunfeng; Brinck-Jensen, Nanna-Sophie; Zang, Mengya; Chen, Kun. Monocyte-derived dendritic cells. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014. 1–5.
- 25 Randolph, Gwendalyn J.; Inaba, Kayo; Robbiani, Davide F.; Steinman, Ralph M.; Muller, William A. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells In Vivo. *Immunity*. 6. 1999. 753–761.
- 26 Sun, Tian; Nguyen, Albert; Gommerman, Jennifer L. Dendritic Cell Subsets in Intestinal Immunity and Inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 5. 2020. 1075–1083.
- 27 Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 4. 1994. 1109–1118.
- 28 Romani, N. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*. 1. 1994. 83–93.
- 29 Nencioni, Alessio; Grunebach, Frank; Schmidt, Susanne M.; Muller, Martin R.; Boy, Davide; Patrone, Franco; Ballestrero, Alberto; Brossart, Peter. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 3. 2008. 191–199.

- 30 Sung, Sun-Sang J. Monocyte-Derived Dendritic Cells as Antigen-Presenting Cells in T-Cell Proliferation and Cytokine Production. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2019. 131–141.
- 31 Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 3. 2001. 263–266.
- 32 Cella, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology*. 1. 1997. 10–16.
- 33 Steinman, Ralph M.; Hawiger, Daniel; Liu, Kang; Bonifaz, Laura; Bonnyay, David; Mahnke, Karsten; Iyoda, Tomonori; Ravetch, Jeffrey; Dhodapkar, Madhav; Inaba, Kayo; Nussenzweig, Michel. Dendritic cell function in vivo during the steady state. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003. 15–25.
- 34 Baleeiro, R. B.; Bergami-Santos, P. C.; Tomiyoshi, M. Y.; Gross, J. L.; Haddad, F.; Pinto, C. A. L.; Soares, F. A.; Younes, R. N.; Barbuto, J. A. M. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2. 2008. 265–270.
- 35 Lechmann, Matthias; Berchtold, Susanne; Steinkasserer, Alexander; Hauber, Joachim. CD83 on dendritic cells. *Trends in Immunology*. 6. 2002. 273–275.
- 36 Prechtel, Alexander T.; Steinkasserer, Alexander. CD83. *Archives of dermatological research*. 2. 2007. 59–69.
- 37 Hauser, Mark A.; Legler, Daniel F. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *Journal of leukocyte biology*. 6. 2016. 869–882.
- 38 Mukherji, B.; Chakraborty, N. G.; Yamasaki, S.; Okino, T.; Yamase, H.; Sporn, J. R.; Kurtzman, S. K.; Ergin, M. T.; Ozols, J.; Meehan, J. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 17. 1995. 8078–8082.
- 39 Garg, Abhishek D.; Vara Perez, Monica; Schaaf, Marco; Agostinis, Patrizia; Zitvogel, Laurence; Kroemer, Guido; Galluzzi, Lorenzo. *Trial watch. Oncoimmunology*. 7. 2017. e1328341.
- 40 Cox, Maria Christina; Lapenta, Caterina; Santini, Stefano M. Advances and perspectives of dendritic cell-based active immunotherapies in follicular lymphoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 6. 2020. 913–925.

- 41 Fröbom, Robin; Berglund, Erik; Berglund, David; Nilsson, Inga-Lena; Åhlén, Jan; Sivers, Karin von; Linder-Stragliotto, Christina; Suenart, Peter; Karlsson-Parra, Alex; Brånström, Robert. Phase I trial evaluating safety and efficacy of intratumorally administered inflammatory allogeneic dendritic cells (ilixadencel) in advanced gastrointestinal stromal tumors. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 11. 2020. 2393–2401.
- 42 Matsui, Hiroto Matsui; Hazama, Shoichi; Nakajima, Masao; Xu, Ming; Matsukuma, Satoshi; Tokumitsu, Yukio; Shindo, Yoshitaro; Tomochika, Shinobu; Yoshida, Shin; Iida, Michihisa; Suzuki, Nobuaki; Takeda, Shigeru; Yoshino, Shigefumi; Ueno, Tomio; Oka, Masaaki; Nagano, Hiroaki. Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2020.
- 43 Sarivalasis, Apostolos; Boudousquié, Caroline; Balint, Klara; Stevenson, Brian J.; Gannon, Philippe O.; Iancu, Emanuela Marina; Rossier, Laetitia; Martin Lluesma, Silvia; Mathevet, Patrice; Sempoux, Christine; Coukos, George; Dafni, Urania; Harari, Alexandre; Bassani-Sternberg, Michal; Kandalaft, Lana E. A Phase I/II trial comparing autologous dendritic cell vaccine pulsed either with personalized peptides (PEP-DC) or with tumor lysate (OC-DC) in patients with advanced high-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of translational medicine*. 1. 2019. 391.
- 44 Wang, Qian-Ting; Nie, Ying; Sun, Sheng-Nan; Lin, Tao; Han, Ru-Jin; Jiang, Jun; Li, Zhe; Li, Jun-Qi; Xiao, Yun-Peng; Fan, Yu-Ying; Yuan, Xiao-Hui; Zhang, Hui; Zhao, Bin-Bin; Zeng, Ming; Li, Shi-You; Liao, Hua-Xin; Zhang, Jian; He, You-Wen. Tumor-associated antigen-based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 7. 2020. 1375–1387.
- 45 Banchereau, Jacques; Palucka, A. Karolina. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews. Immunology*. 4. 2005. 296–306.
- 46 Rosenberg, Steven A.; Yang, James C.; Restifo, Nicholas P. Cancer immunotherapy. *Nature medicine*. 9. 2004. 909–915.
- 47 Palucka, Karolina; Banchereau, Jacques. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer*. 4. 2012. 265–277.
- 48 Guo, Chunqing; Manjili, Masoud H.; Subjeck, John R.; Sarkar, Devanand; Fisher, Paul B.; Wang, Xiang-Yang. Therapeutic cancer vaccines. *Advances in cancer research*. 2013. 421–475.
- 49 Kantoff, Philip W.; Higano, Celestia S.; Shore, Neal D.; Berger, E. Roy; Small, Eric J.; Penson, David F.; Redfern, Charles H.; Ferrari, Anna C.; Dreicer, Robert; Sims, Robert B.; Xu, Yi; Frohlich, Mark W.; Schellhammer, Paul F. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 5. 2010. 411–422.
- 50 Cheever, Martin A.; Higano, Celestia S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 11. 2011. 3520–3526.

- 51 Wörmann, Bernhard; Bokemeyer, Carsten; Heidenreich, Axel; Honecker, Friedemann; Miller, Kurt. Stellungnahme zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V Sipuleucel-T. IQWiG Bericht Nr. 269. 2015.
- 52 Adams, Julian. The proteasome. *Nature reviews. Cancer.* 5. 2004. 349–360.
- 53 Amm, Ingo; Sommer, Thomas; Wolf, Dieter H. Protein quality control and elimination of protein waste. *Biochimica et biophysica acta.* 1. 2014. 182–196.
- 54 Mevissen, Tycho E. T.; Komander, David. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual review of biochemistry.* 2017. 159–192.
- 55 Vilchez, David; Saez, Isabel; Dillin, Andrew. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature communications.* 2014. 5659.
- 56 D'Arcy, Pádraig; Linder, Stig. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 11. 2012. 1729–1738.
- 57 Shen, Min; Schmitt, Sara; Buac, Daniela; Dou, Q. Ping. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets.* 9. 2013. 1091–1108.
- 58 Adams, Julian. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.* 5. 2004. 417–421.
- 59 Imajoh-Ohmi, S.; Kawaguchi, T.; Sugiyama, S.; Tanaka, K.; Omura, S.; Kikuchi, H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 3. 1995. 1070–1077.
- 60 Shinohara, K.; Tomioka, M.; Nakano, H.; Toné, S.; Ito, H.; Kawashima, S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *The Biochemical journal.* 1996. 385–388.
- 61 Drexler, H. C. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 3. 1997. 855–860.
- 62 Kane, Robert C.; Farrell, Ann T.; Sridhara, Rajeshwari; Pazdur, Richard. United States Food and Drug Administration approval summary. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 10. 2006. 2955–2960.
- 63 Hambley, Bryan; Caimi, Paolo F.; William, Basem M. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Therapeutic advances in hematology.* 4. 2016. 196–208.

- 64 Richardson, Paul G.; Sonneveld, Pieter; Schuster, Michael W.; Irwin, David; Stadtmauer, Edward A.; Facon, Thierry; Harousseau, Jean-Luc; Ben-Yehuda, Dina; Lonial, Sagar; Goldschmidt, Hartmut; Reece, Donna; San-Miguel, Jesus F.; Bladé, Joan; Boccadoro, Mario; Cavenagh, Jamie; Dalton, William S.; Boral, Anthony L.; Esseltine, Dixie L.; Porter, Jane B.; Schenkein, David; Anderson, Kenneth C. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 24. 2005. 2487–2498.
- 65 Dimopoulos, Meletios A.; Goldschmidt, Hartmut; Niesvizky, Ruben; Joshua, Douglas; Chng, Wee-Joo; Oriol, Albert; Orlowski, Robert Z.; Ludwig, Heinz; Facon, Thierry; Hajek, Roman; Weisel, Katja; Hungria, Vania; Minuk, Leonard; Feng, Shibo; Zahlten-Kumeli, Anita; Kimball, Amy S.; Moreau, Philippe. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR). *The Lancet Oncology*. 10. 2017. 1327–1337.
- 66 Stewart, A. Keith; Rajkumar, S. Vincent; Dimopoulos, Meletios A.; Masszi, Tamás; Špička, Ivan; Oriol, Albert; Hájek, Roman; Rosiñol, Laura; Siegel, David S.; Mihaylov, Georgi G.; Goranova-Marinova, Vesselina; Rajnics, Péter; Suvorov, Aleksandr; Niesvizky, Ruben; Jakubowiak, Andrzej J.; San-Miguel, Jesus F.; Ludwig, Heinz; Wang, Michael; Maisnar, Vladimír; Minarik, Jiri; Bensinger, William I.; Mateos, Maria-Victoria; Ben-Yehuda, Dina; Kukreti, Vishal; Zojwalla, Naseem; Tonda, Margaret E.; Yang, Xinqun; Xing, Biao; Moreau, Philippe; Palumbo, Antonio. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2. 2015. 142–152.
- 67 Kuhn, Deborah J.; Chen, Qing; Voorhees, Peter M.; Strader, John S.; Shenk, Kevin D.; Sun, Congcong M.; Demo, Susan D.; Bennett, Mark K.; van Leeuwen, Fijis W. B.; Chanan-Khan, Asher A.; Orlowski, Robert Z. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 9. 2007. 3281–3290.
- 68 D'Arcy, Pádraig; Brnjic, Slavica; Olofsson, Maria Hägg; Fryknäs, Mårten; Lindsten, Kristina; Cesare, Michelandrea de; Perego, Paola; Sadeghi, Behnam; Hassan, Moustapha; Larsson, Rolf; Linder, Stig. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nature medicine*. 12. 2011. 1636–1640.
- 69 Robak, Tadeusz; Huang, Huiqiang; Jin, Jie; Zhu, Jun; Liu, Ting; Samoilova, Olga; Pylypenko, Halyna; Verhoef, Gregor; Siritanaratkul, Noppadol; Osmanov, Evgenii; Alexeeva, Julia; Pereira, Juliana; Drach, Johannes; Mayer, Jiri; Hong, Xiaonan; Okamoto, Rumiko; Pei, Lixia; Rooney, Brendan; van de Velde, Helgi; Cavalli, Franco. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*. 10. 2015. 944–953.

- 70 Fisher, Richard I.; Bernstein, Steven H.; Kahl, Brad S.; Djulbegovic, Benjamin; Robertson, Michael J.; Vos, Sven de; Epner, Elliot; Krishnan, Amrita; Leonard, John P.; Lonial, Sagar; Stadtmauer, Edward A.; O'Connor, Owen A.; Shi, Hongliang; Boral, Anthony L.; Goy, André. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30. 2006. 4867–4874.
- 71 Crawford, Lisa J.; Walker, Brian; Irvine, Alexandra E. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of cell communication and signaling*. 2. 2011. 101–110.
- 72 Roeten, Margot S. F.; Cloos, Jacqueline; Jansen, Gerrit. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2. 2018. 227–243.
- 73 Pérez-Galán, Patricia; Mora-Jensen, Helena; Weniger, Marc A.; Shaffer, Arthur L.; Rizzatti, Edgar G.; Chapman, Colby M.; Mo, Clifton C.; Stennett, Lawrence S.; Rader, Christoph; Liu, Poching; Raghavachari, Nalini; Stetler-Stevenson, Maryalice; Yuan, Constance; Pittaluga, Stefania; Maric, Irina; Dunleavy, Kieron M.; Wilson, Wyndham H.; Staudt, Louis M.; Wiestner, Adrian. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood*. 2. 2011. 542–552.
- 74 Zhang, Liang; Pham, Lan V.; Newberry, Kate J.; Ou, Zhishuo; Liang, Rong; Qian, Jianfei; Sun, Luhong; Blonska, Marzenna; You, Yun; Yang, Jing; Lin, Xin; Rollo, Alex; Tamayo, Archito T.; Lee, John; Ford, Richard J.; Zhao, Xiurong; Kwak, Larry W.; Yi, Qing; Wang, Michael. In vitro and in vivo therapeutic efficacy of carfilzomib in mantle cell lymphoma. *Molecular cancer therapeutics*. 11. 2013. 2494–2504.
- 75 Kortuem, K. Martin; Stewart, A. Keith. Carfilzomib. *Blood*. 6. 2013. 893–897.
- 76 Moreau, Philippe. Oral therapy for multiple myeloma. *Blood*. 7. 2014. 986–987.
- 77 Kumar, S. K.; LaPlant, B.; Roy, V.; Reeder, C. B.; Lacy, M. Q.; Gertz, M. A.; Laumann, K.; Thompson, M. A.; Witzig, T. E.; Buadi, F. K.; Rivera, C. E.; Mikhael, J. R.; Bergsagel, P. L.; Kapoor, P.; Hwa, L.; Fonseca, R.; Stewart, A. K.; Chanan-Khan, A.; Rajkumar, S. V.; Dispenzieri, A. Phase 2 trial of ixazomib in patients with relapsed multiple myeloma not refractory to bortezomib. *Blood cancer journal*. 2015. e338.
- 78 Nencioni, Alessio; Grunebach, Frank; Patrone, Franco; Ballestrero, Alberto; Brossart, Peter. The proteasome and its inhibitors in immune regulation and immune disorders. *Critical reviews in immunology*. 6. 2006. 487–498.
- 79 Nencioni, A.; Grunebach, F.; Patrone, F.; Ballestrero, A.; Brossart, P. Proteasome inhibitors. *Leukemia*. 1. 2007. 30–36.

- 80 Nencioni, Alessio; Garuti, Anna; Schwarzenberg, Karin; Cirmena, Gabriella; Dal Bello, Giovanna; Rocco, Ilaria; Barbieri, Eleonora; Brossart, Peter; Patrone, Franco; Ballestrero, Alberto. Proteasome inhibitor-induced apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology*. 3. 2006. 681–689.
- 81 Nencioni, Alessio; Schwarzenberg, Karin; Brauer, Katharina M.; Schmidt, Susanne M.; Ballestrero, Alberto; Grunebach, Frank; Brossart, Peter. Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood*. 2. 2006. 551–558.
- 82 Naujokat, Cord; Berges, Carsten; Höh, Alexandra; Wieczorek, Hubert; Fuchs, Dominik; Ovens, Jörg; Miltz, Marion; Sadeghi, Mahmoud; Opelz, Gerhard; Daniel, Volker. Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 1. 2007. 120–132.
- 83 Subklewe, Marion; Sebelin-Wulf, Kathrin; Beier, Carola; Lietz, Andreas; Mathas, Stephan; Dörken, Bernd; Pezzutto, Antonio. Dendritic cell maturation stage determines susceptibility to the proteasome inhibitor bortezomib. *Human immunology*. 3. 2007. 147–155.
- 84 Koulich, Elena; Li, Xiaohua; DeMartino, George N. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Molecular biology of the cell*. 3. 2008. 1072–1082.
- 85 Cai, Jianyu; Xia, Xiaohong; Liao, Yuning; Liu, Ningning; Guo, Zhiqiang; Chen, Jinghong; Yang, Li; Long, Huidan; Yang, Qianqian; Zhang, Xiaolan; Xiao, Lu; Wang, Xuejun; Huang, Hongbiao; Liu, Jinbao. A novel deubiquitinase inhibitor b-AP15 triggers apoptosis in both androgen receptor-dependent and -independent prostate cancers. *Oncotarget*. 38. 2017. 63232–63246.
- 86 Chitta, Kasyapa; Paulus, Aneel; Akhtar, Sharoon; Blake, Maja Kristin K.; Caulfield, Thomas R.; Novak, Anne J.; Ansell, Stephen M.; Advani, Pooja; Ailawadhi, Sikander; Sher, Taimur; Linder, Stig; Chanan-Khan, Asher. Targeted inhibition of the deubiquitinating enzymes, USP14 and UCHL5, induces proteotoxic stress and apoptosis in Waldenström macroglobulinaemia tumour cells. *British journal of haematology*. 3. 2015. 377–390.
- 87 Kropp, Korbinian N.; Maurer, Stefanie; Rothfelder, Kathrin; Schmied, Bastian J.; Clar, Kim L.; Schmidt, Moritz; Strunz, Benedikt; Kopp, Hans-Georg; Steinle, Alexander; Grünebach, Frank; Rittig, Susanne M.; Salih, Helmut R.; Dörfel, Daniela. The novel deubiquitinase inhibitor b-AP15 induces direct and NK cell-mediated antitumor effects in human mantle cell lymphoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2018.

- 88 Tian, Ze; D'Arcy, Padraig; Wang, Xin; Ray, Arghya; Tai, Yu-Tzu; Hu, Yiguo; Carrasco, Ruben D.; Richardson, Paul; Linder, Stig; Chauhan, Dharminder; Anderson, Kenneth C. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood*. 5. 2014. 706–716.
- 89 Xia, Xiaohong; Liao, Yuning; Guo, Zhiqiang; Li, Yanling; Jiang, Lili; Zhang, Fangcheng; Huang, Chuyi; Liu, Yuan; Wang, Xuejun; Liu, Ningning; Liu, Jinbao; Huang, Hongbiao. Targeting proteasome-associated deubiquitinases as a novel strategy for the treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogenesis*. 9. 2018. 75.
- 90 Oh, You-Take; Deng, Liang; Deng, Jiusheng; Sun, Shi-Yong. The proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15 enhances DR5 activation-induced apoptosis through stabilizing DR5. *Scientific reports*. 1. 2017. 8027.
- 91 Wang, Xin; D'Arcy, Pádraig; Caulfield, Thomas R.; Paulus, Aneel; Chitta, Kasyapa; Mohanty, Chitralakha; Gullbo, Joachim; Chanan-Khan, Asher; Linder, Stig. Synthesis and evaluation of derivatives of the proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15. *Chemical biology & drug design*. 5. 2015. 1036–1048.
- 92 Wang, Xin; Mazurkiewicz, Magdalena; Hillert, Ellin-Kristina; Olofsson, Maria Hägg; Pierrou, Stefan; Hillertz, Per; Gullbo, Joachim; Selvaraju, Karthik; Paulus, Aneel; Akhtar, Sharoon; Bossler, Felicitas; Khan, Asher Chanan; Linder, Stig; D'Arcy, Padraig. The proteasome deubiquitinase inhibitor VLX1570 shows selectivity for ubiquitin-specific protease-14 and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Scientific reports*. 2016. 26979.
- 93 Spisek, Radek; Charalambous, Anna; Mazumder, Amitabha; Vesole, David H.; Jagannath, Sundar; Dhodapkar, Madhav V. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells. *Blood*. 11. 2007. 4839–4845.
- 94 Straube, C.; Wehner, R.; Wendisch, M.; Bornhäuser, M.; Bachmann, M.; Rieber, E. P.; Schmitz, M. Bortezomib significantly impairs the immunostimulatory capacity of human myeloid blood dendritic cells. *Leukemia*. 7. 2007. 1464–1471.
- 95 Schumacher, Lana Y.; Vo, Dan D.; Garban, Hermes J.; Comin-Anduix, Begoña; Owens, Sharla K.; Dissette, Vivian B.; Glaspy, John A.; McBride, William H.; Bonavida, Benjamin; Economou, James S.; Ribas, Antoni. Immunosenitization of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 8. 2006. 4757–4765.
- 96 Zinser, Elisabeth; Rössner, Susanne; Littmann, Leonie; Lüftenegger, Daniel; Schubert, Ulrich; Steinkasserer, Alexander. Inhibition of the proteasome influences murine and human dendritic cell development in vitro and in vivo. *Immunobiology*. 9-10. 2009. 843–851.

- 97 Hill, LaQuisa; Alousi, Amin; Kebriaei, Partow; Mehta, Rohtesh; Rezvani, Katayoun; Shpall, Elizabeth. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Therapeutic advances in hematology*. 1. 2018. 21–46.
- 98 Wang, Ying; Liang, Yong; Zhang, Yanming; Wu, Depei; Liu, Haiyan. Bortezomib inhibits bone marrow-derived dendritic cells. *International journal of clinical and experimental pathology*. 5. 2015. 4857–4862.
- 99 Wagner, J. L.; Mookerjee, B.; Filicko-O'Hara, J. E.; Grosso, D. A.; Flomenberg, N. Bortezomib for Steroid Refractory Acute Graft Versus Host Disease (GVHD). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2. 2012. S370.
- 100 Koreth, John; Kim, Haesook T.; Lange, Paulina B.; Poryanda, Samuel J.; Reynolds, Carol G.; Rai, Sharmila Chamling; Armand, Philippe; Cutler, Corey S.; Ho, Vincent T.; Glotzbecker, Brett; Yusuf, Rushdia; Nikiforow, Sarah; Chen, Yi-Bin; Dey, Bimalangshu; McMasters, Malgorzata; Ritz, Jerome; Blazar, Bruce R.; Soiffer, Robert J.; Antin, Joseph H.; Alyea, Edwin P. Bortezomib-based immunosuppression after reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 3. 2018. 522–530.
- 101 Berges, Carsten; Haberstock, Heinrich; Fuchs, Dominik; Miltz, Marion; Sadeghi, Mahmoud; Opelz, Gerhard; Daniel, Volker; Naujokat, Cord. Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4+ T cells. *Immunology*. 2. 2008. 234–246.
- 102 Blanco, Belén; Pérez-Simón, José A.; Sánchez-Abarca, Luis I.; Carvajal-Vergara, Xonia; Mateos, Juan; Vidriales, Belén; López-Holgado, Natalia; Maiso, Patricia; Alberca, Mercedes; Villarón, Eva; Schenkein, David; Pandiella, Atanasio; San Miguel, Jesús. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood*. 9. 2006. 3575–3583.
- 103 Pellom, Samuel Troy; Dudimah, Duafalia Fred; Thounaojam, Menaka Chanu; Sayers, Thomas Joseph; Shanker, Anil. Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions. *Immunotherapy*. 9. 2015. 1011–1022.
- 104 Guerra, Nadia; Tan, Ying Xim; Joncker, Nathalie T.; Choy, Augustine; Gallardo, Fermin; Xiong, Na; Knoblaugh, Susan; Cado, Dragana; Greenberg, Norman M.; Greenberg, Norman R.; Raulet, David H. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 4. 2008. 571–580.
- 105 Caligiuri, Michael A. Human natural killer cells. *Blood*. 3. 2008. 461–469.
- 106 Smyth, Mark J.; Cretney, Erika; Kelly, Janice M.; Westwood, Jennifer A.; Street, Shayna E. A.; Yagita, Hideo; Takeda, Kazuyoshi; van Dommelen, Serani L. H.; Degli-Esposti, Mariapia A.; Hayakawa, Yoshihiro. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*. 4. 2005. 501–510.

- 107 Wang, Xiangling; Ottosson, Astrid; Ji, Chunyan; Feng, Xiaoli; Nordenskjöld, Magnus; Henter, Jan-Inge; Fadeel, Bengt; Zheng, Chengyun. Proteasome inhibition induces apoptosis in primary human natural killer cells and suppresses NKp46-mediated cytotoxicity. *Haematologica*. 4. 2009. 470–478.
- 108 Feng, Xiaoli; Yan, Jie; Wang, Yibiao; Zierath, Juleen R.; Nordenskjöld, Magnus; Henter, Jan-Inge; Fadeel, Bengt; Zheng, Chengyun. The proteasome inhibitor bortezomib disrupts tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression and natural killer (NK) cell killing of TRAIL receptor-positive multiple myeloma cells. *Molecular immunology*. 14. 2010. 2388–2396.
- 109 Feng, Xiaoli; Holmlund, Teresa; Zheng, Chengyun; Fadeel, Bengt. Proapoptotic effects of the novel proteasome inhibitor b-AP15 on multiple myeloma cells and natural killer cells. *Experimental hematology*. 3. 2014. 172–182.
- 110 Sarhan, Dhifaf; Wennerberg, Erik; D'Arcy, Pdraig; Gurajada, Deepthy; Linder, Stig; Lundqvist, Andreas. A novel inhibitor of proteasome deubiquitinating activity renders tumor cells sensitive to TRAIL-mediated apoptosis by natural killer cells and T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 8. 2013. 1359–1368.
- 111 Platt, Craig D.; Ma, Jessica K.; Chalouni, Cécile; Ebersold, Melanie; Bou-Reslan, Hani; Carano, Richard A. D.; Mellman, Ira; Delamarre, Lélia. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9. 2010. 4287–4292.
- 112 Xin, Hai-ming; Peng, Yi-zhi; Yuan, Zhi-qiang; Guo, Hao. In vitro maturation and migration of immature dendritic cells after chemokine receptor 7 transfection. *Canadian journal of microbiology*. 7. 2009. 859–866.
- 113 Blanco, Patrick; Palucka, A. Karolina; Pascual, Virginia; Banchereau, Jacques. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. 1. 2008. 41–52.
- 114 Schmidt, Moritz; Altdörfer, Vanessa; Schmitte, Sarah; Fuchs, Alexander Rolf; Kropp, Korbinian Nepomuk; Maurer, Stefanie; Müller, Martin Rudolf; Salih, Helmut Rainer; Rittig, Susanne Malaika; Grünebach, Frank; Dörfel, Daniela. The Deubiquitinase Inhibitor b-AP15 and Its Effect on Phenotype and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 7. 2019. 653–664.
- 115 Niewerth, Denise; Jansen, Gerrit; Assaraf, Yehuda G.; Zweegman, Sonja; Kaspers, Gertjan J. L.; Cloos, Jacqueline. Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2015. 18–35.

- 116 Mofers, Arjan; Perego, Paola; Selvaraju, Karthik; Gatti, Laura; Gullbo, Joachim; Linder, Stig; D'Arcy, Pdraig. Analysis of determinants for in vitro resistance to the small molecule deubiquitinase inhibitor b-AP15. *PLoS one*. 10. 2019. e0223807.
- 117 Rowinsky, Eric K.; Paner, Agne; Berdeja, Jesus G.; Paba-Prada, Claudia; Venugopal, Parameswaran; Porkka, Kimmo; Gullbo, Joachim; Linder, Stig; Loskog, Angelica; Richardson, Paul G.; Landgren, Ola. Phase 1 study of the protein deubiquitinase inhibitor VLX1570 in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Investigational new drugs*. 5. 2020. 1448–1453.
- 118 Brown, R. D.; Pope, B.; Murray, A.; Esdale, W.; Sze, D. M.; Gibson, J.; Ho, P. J.; Hart, D.; Joshua, D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*. 10. 2001. 2992–2998.
- 119 Ma, Yang; Shurin, Galina V.; Peiyuan, Zhu; Shurin, Michael R. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer*. 1. 2013. 36–44.
- 120 Kim, Seok Jin; Kim, Kihyun; Kim, Byung Soo; Lee, Hyo-Jin; Kim, Hawk; Lee, Na-Ri; Nam, Seung-Hyun; Kwon, Jung Hye; Kim, Hyo Jung; Sohn, Sang Kyun; Won, Jong-Ho; Lee, Jae Hoon; Suh, Cheolwon; Yoon, Sung-Soo; Kim, Hye Jin; Kim, Inho; Do, Young-Rok; Lee, Won-Sik; Joo, Young-Don; Shin, Ho Jin. Bortezomib and the increased incidence of herpes zoster in patients with multiple myeloma. *Clinical lymphoma & myeloma*. 4. 2008. 237–240.
- 121 Li, Juan; Huang, Beihui; Li, Ying; Zheng, Dong; Zhou, Zhenhai; Liu, Junru. Hepatitis B virus reactivation in patients with multiple myeloma receiving bortezomib-containing regimens followed by autologous stem cell transplant. *Leukemia & lymphoma*. 6. 2015. 1710–1717.
- 122 Basler, Michael; Lauer, Christoph; Beck, Ulrike; Groettrup, Marcus. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the susceptibility to viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 10. 2009. 6145–6150.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik, Innere II, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte durch Frau Dr. med. Daniela Dörfel.

Die in Abbildung 5 - 13 dargestellten Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Sylvia Klein von mir eigenständig durchgeführt. Für die Migrationsmessungen mit 16 h Dauer, die in Abbildung 11 und 13 dargestellt sind, wurden ergänzend zu meinen Daten weitere Rohdaten von Frau Sylvia Klein erhoben und mir zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Die Messungen zur Phagozytosefähigkeit und die Proliferationsassays, welche in Abbildung 14 - 17 dargestellt sind, wurden von Frau Sylvia Klein durchgeführt und die erhobenen Rohdaten mir zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung sowie Erstellung der Diagramme erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Unterschrift: _____

10. Veröffentlichungen

- Funk, Tanja; Fuchs, Alexander Rolf; Altdörfer, Vanessa Sophie; Klein, Reinhild; Autenrieth, Stella E.; Müller, Martin Rudolf; Salih, Helmut Rainer; Henes, Jörg; Grünebach, Frank; Dörfel, Daniela. Monocyte-derived dendritic cells display a highly activated phenotype and altered function in patients with familial Mediterranean fever. Clin. Exp. Immunol. 2020 Jul;201(1):1-11

- Schmidt, Moritz *; Altdörfer, Vanessa *; Schütte, Sarah; Fuchs, Alexander Rolf; Kropp, Korbinian Nepomuk; Maurer, Stefanie; Müller, Martin Rudolf; Salih, Helmut Rainer; Rittig, Susanne Malaika; Grünebach, Frank; Dörfel, Daniela. The Deubiquitinase Inhibitor b-AP15 and Its Effect on Phenotype and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells. Neoplasia (New York, N.Y.). 7. 2019. 653–664.
* Both authors contributed equally to this work

- Altdörfer, Vanessa; Kropp, Korbinian Nepomuk; Haen, Sebastian Peter, Grünebach, Frank; Rittig, Susanne Malaika; Kanz, Lothar; Salih, Helmut Rainer; Dörfel, Daniela. The deubiquitinase inhibitor b-AP15 and its effect on phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells. Oncology Research and Treatment. Volume 39 (Supplement 3): Meeting Abstract P258. 2016. 1–348. (Poster, DGHO-Jahrestagung, Leipzig).

11. Danksagung

An Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach
für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation und die Chance
hierdurch an mir selbst sowie auch inhaltlich zu wachsen. Für die konstante
Betreuung sowie seinen fachlichen Rat zu jeder Zeit sowie auch für die Korrektur
der Doktorarbeit. Danke für den stetigen Glauben an diese Arbeit.

An Frau Dr. med. Daniela Dörfel
für die Konzeption der Arbeit, die Betreuung, Unterstützung und ihren fachlichen
Rat.

An Frau Sylvia Klein
für das Heranführen an eine gewissenhafte Laborarbeit und die Einarbeitung in
die Methodik, ihre Geduld bei der Beantwortung aller meiner Fragen und ihre
sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung.

An meine Eltern
für eure stetige Unterstützung während meines gesamten Studiums und euren
unermüdlichen Glauben an mich. Danke, dass ihr stets ein offenes Ohr für meine
Sorgen und Probleme habt und für eure unschätzbare Liebe.

An meine Großeltern
für euren unschätzbaren wertvollen Rat in allen Lebenslagen und eure große Liebe.

An Tobias,
Danke, dass du nie den Glauben an mich verloren hast, auch wenn ich es selbst
tat. Für deine geduldige Art und deine unermessliche Unterstützung und Liebe.

An meine Freunde und meinen Bruder Pascal,
für all die aufmunternden Worte und Unterstützung.

