

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss Immunstimulatorischer Komplexe (ISCOMs) auf die
Antigenaufnahme und -prozessierung dendritischer Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martin Orban

aus Dessau

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Maximilian Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Christoph Prinz
Priv. Doz. Dr. med. Dominik Rüttiger

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres
Dr. rer. biol. Klaus Heckelsmiller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2010

Meiner Familie in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Immuntherapie von Tumoren	7
1.1.1 Hintergrund	7
1.1.2 Verschiedene Ansätze in der Immuntherapie von Tumoren	7
1.2 Dendritische Zellen	11
1.2.1 Dendritische Zellpopulationen im murinen Immunsystem	12
1.2.2 Dendritische Zellpopulationen im humanen Immunsystem	14
1.2.3 Funktionen der dendritischen Zellen innerhalb des Immunsystems	15
1.2.4 Antigenpräsentation dendritischer Zellen	16
1.2.5 Mechanismen der Kreuzpräsentation dendritischer Zellen	17
1.3 Dendritische Zellen in der Immuntherapie von Malignomen	21
1.3.1 <i>In vivo</i> Gewinnung von dendritischen Zellen für die Tumorthherapie	21
1.3.2 <i>In vitro</i> Gewinnung von dendritischen Zellen für die Tumorthherapie	21
1.3.3 Tumorantigene	22
1.3.4 Die Formulierung von Tumorantigenen	23
1.4 Antigenformulierung mit immunstimulatorischen Komplexen	24
1.4.1 ISCOM und ISCOMATRIX™-Adjuvans	24
1.4.2 ISCOMATRIX™-Vakzine	25
1.4.3 Immunstimulatorische Komplexe im klinischen Einsatz	27
1.4.4 Kreuzpräsentation von mit ISCOMATRIX™-Adjuvans formuliertem Antigen	28
1.4.5 Antigenpräsentation von ISCOMATRIX™-Vakzinen durch diverse antigenpräsentierende Zelltypen	29
1.4.6 Mechanismen der Antigenprozessierung von ISCOMATRIX™-Vakzinen	29
1.5 Fragestellung	30
2. Material und Methoden	32
2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Reagenziensätze	33
2.1.4 Materialien für die Zellkultur	33
2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen	33
2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	33
2.1.7 Antikörper	34
2.1.8 Sonstige fluoreszenzmarkierte Stoffe	34

2.1.9 Proteinformulierungen.....	35
2.1.10 Generierung der Ovalbumin-Formulierungen für die konfokale Mikroskopie.....	35
2.2. Zellulär-immunologische Methoden	36
2.2.1 Zellkultur	36
2.2.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen	37
2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen.....	37
2.2.4 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	39
2.2.5 Antigenpräsentationsversuche.....	39
2.3. Konfokale Mikroskopie.....	40
2.3.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie	40
2.3.2 Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper und Modellantigene.....	41
2.3.3 Digitale Bildbearbeitung	41
2.3.4 Erstellung von Fluoreszenzintensitätsprofilen.....	42
2.3.5 Statistische Auswertung der Translokation von Antigen in das Zytosol.....	43
2.3.6 Herstellung des Einbettmediums Mowiol	43
2.3.7 Präparatherstellung für die konfokale Lasermikroskopie	44
2.3.8 Mikroskopie unfixierter, vitaler Leukozytensubpopulationen.....	45
2.4. Statistische Analyse	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Aufnahme der Antigenformulierungen durch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen	46
3.2 Intrazelluläre Kompartimentierung der endozytierten Antigenformulierungen	50
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Antigenformulierungen in Monozyten- abgeleiteten dendritischen Zellen	50
3.2.2 Translokation von ISCOMATRIX™-formuliertem OVA in das Zytosol von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	51
3.2.3 Konfokale Mikroskopie von vitalen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	52
3.2.4 Abhängigkeit der zytosolischen Translokation von der lysosomalen Ausreifung	55
3.2.5 Die zytosolische Translokation von ISCOMATRIX™-formuliertem Ovalbumin ist nicht die Folge von Lysosomaler Schädigung.....	57
3.3 Unterschiede bei diversen antigenpräsentierenden Zelltypen bezüglich ihrer Fähigkeit zur zytosolischen Translokation	58
4. Diskussion	63

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	63
4.1.1 Aufnahme der Antigenformulierungen durch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen	63
4.1.2 Translokation des ISCOMATRIX™-formulierten Ovalbumin in das Zytosol von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	63
4.1.3 Abhängigkeit der Translokationseffizienz und Kreuzpräsentationsfähigkeit vom Entwicklungsgrad der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	64
4.1.4 Zelltyp-Spezifität der Translokation	64
4.2 Methodendiskussion	65
4.2.1 Bestimmung der zytosolischen Antigentranslokation mittels konfokaler Mikroskopie	65
4.3 Vergleich mit der Literatur	66
4.3.1 Aufnahme und intrazelluläre Kompartimentierung der Antigenformulierungen	67
4.3.2 Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine und von Immunkomplexen vom Lysosom in das Zytosol	68
4.3.3 Zelltyp-spezifische Unterschiede bei der Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine in das Zytosol	70
4.4 Klinische Relevanz der erhobenen Befunde	72
4.4.1 ISCOMATRIX™-Adjuvans-basierte Tumorstoffimpfung	72
4.4.2 Zukunft der Vakzinierung mit dendritischen Zellen	74
5. Zusammenfassung	77
6. Abbildungsverzeichnis	79
7. Literaturverzeichnis	80
8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	87
9. Danksagung	89
10. Veröffentlichungen	90

1. Einleitung

1.1 Immuntherapie von Tumoren

1.1.1 Hintergrund

Nach Angaben der Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) versterben weltweit 25 % der Weltbevölkerung an bösartigen Neubildungen. Laut der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden nehmen bösartige Erkrankungen in Deutschland mit 25 % den zweiten Platz hinter den Herz- und Kreislaufkrankheiten ein. Trotz deutlicher Verbesserung in der Behandlung von Malignomen in Frühstadien stellen die meisten Neoplasien in fortgeschrittenen, metastasierten Stadien immer noch mit nur geringem Erfolg zu therapierende Erkrankungen dar. In den vergangenen 60 Jahren hat sich insbesondere bei den metastasierten Stadien die Überlebenszeit kaum verlängert (Bailar and Gornik, 1997). Zudem nimmt die Inzidenz von bösartigen Tumoren zu. Es bleibt eine Herausforderung an die medizinische Forschung, wirksame und nebenwirkungsarme Therapien gegen verschiedene Tumorentitäten zu entwickeln. Neben den klassischen Therapien Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie bietet die Immuntherapie von Tumoren viel versprechende Ansätze.

1.1.2 Verschiedene Ansätze in der Immuntherapie von Tumoren

Die klassischen Therapien Bestrahlung und Chemotherapie bei bösartigen Erkrankungen betreffen nicht nur die malignen Zellen sondern auch das gesunde Gewebe, was beträchtliche Nebenwirkungen zur Folge hat. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Durchfall sowie Knochenmarkdepression mit daraus folgender Infektanfälligkeit. Im Gegensatz dazu stellt die Immuntherapie von Tumoren einen Versuch dar, das patienteneigene Immunsystem präzise auf bösartige Zielzellen zu richten. Solch eine Therapie birgt das Potenzial, mit einer erheblichen Reduktion von unerwünschten Wirkungen einherzugehen. Die wichtigsten Therapieansätze sind im Folgenden erläutert.

1.1.2.1 Immunstimulanzen

Erste Ansätze stellten die Behandlung mit Interleukin-2 (IL-2) und anderen T-Zell aktivierenden Zytokinen dar, die beabsichtigen, Anzahl und Aktivität der T-Zellen zu erhöhen, die spezifisch Tumor-assoziierte Antigene (TAA) erkennen. Diese T-Zellen

infiltrieren den Tumor und zerstören gerichtet Tumorzellen (Rosenberg et al., 1985). Obwohl diese immunstimulatorischen Versuche teilweise zu einem therapeutischen Ansprechen führten, hatten sie keine signifikante Auswirkung auf die Sterblichkeit bei fortgeschrittenen Tumoren (Rosenberg, 2001). Andere Immunstimulanzien, wie Bacillus Calmette-Guérin (BCG), das beim Blasenkarzinom eingesetzt wird (Kassouf and Kamat, 2004) sowie Levamisole (beim Nierenkarzinom) werden in die Blase instilliert oder direkt in den Tumor des Patienten injiziert. Imiquimod, ein *Toll-like-receptor* (TLR)-7-Agonist wird als Lokalthherapie des Basalzell-Karzinoms der Haut (Saprijaszko, 2005), sowie bei Präkanzerosen, wie der aktinischen Keratose (Hadley et al., 2006), eingesetzt.

1.1.2.2 Monoklonale Antikörper, Immuntoxine und Radioimmuntherapie

Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (mAK) zeigt Erfolge bei der Behandlung von Neoplasien der hämatopoetischen Reihe wie Leukämien, Lymphomen und multiplen Myelomen. Bei der Therapie von B-Zell Lymphomen kommt Rituximab, ein mAK gegen das auf B-Lymphozyten vorhandene Oberflächenmolekül *cluster of differentiation* (CD) 20 zum Einsatz (Leonard et al., 2005). Alemtuzumab, der an CD52 von Leukozyten bindet, wird bei der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie genutzt (Cheson, 2006). Trastuzumab (Herceptin[®]) blockiert den Rezeptor Her2, an den der *epidermal growth factor* (EGF) bindet und wird mit Erfolg bei soliden Tumoren wie dem Mammakarzinom, eingesetzt (Adams et al., 2004). Cetuximab sowie Panatimumab sind ebenfalls blockierende anti-EGF-Antikörper, die zur Therapie des Kolonkarzinoms verwendet werden (Lievre et al., 2008). Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) kann durch Bevacizumab blockiert werden. So kann zum Beispiel die für das Tumorwachstum erforderliche Gefäßneubildung verhindert werden (Gralow et al., 2008; Rosen and Gordon, 2006).

Das Wirkprinzip der Immuntoxine begründet sich aus der direkten Kopplung eines mAK mit einem zytotoxischen Medikament. Der mAK ist spezifisch gegen Krebszellen gerichtet. Zum Beispiel kombiniert das Medikament Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg[®]), einen mAK gegen CD33 mit dem Immuntoxin Calicheamicin. CD33 befindet sich auf Krebszellen der akuten myeloischen Leukämie (AML). Calicheamicin ist ein komplexes Oligosaccharid. Dieses induziert nach intrazellulärer Freisetzung Doppelstrangbrüche in der Desoxyribonukleinsäure der Krebszellen (Jurcic, 2005).

Die Radioimmuntherapie stellt eine Kombination eines monoklonalen Antikörpers mit einem radioaktiven Isotop dar. Tositumomab, ein mAK gegen CD20 von B-Zellen in Kombination mit radioaktivem Iod¹³¹ wird bereits erfolgreich beim B-Zell Lymphom angewendet (Kaminski et al., 2005).

1.1.2.5 Immuntherapie mit T-Zellen

T-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen nach Erkennung von Tumorantigenen auf deren Zelloberfläche abzutöten. Das Prinzip der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) setzt die Annahme voraus, dass der Organismus prinzipiell Tumorantigen-spezifische T-Zellen besitzt, die in der Lage sind, neoplastische Zellen zu eliminieren. Der Tumor entgeht seiner Überwachung durch das Immunsystem (Prinzip der *Immunosurveillance*) jedoch durch verschiedenste Mechanismen. So wurde die Beobachtung gemacht, dass T-Zellen den Tumor infiltrieren, ihn aber nicht abtöten (Muul et al., 1987). Nach chirurgischer Entfernung des Tumors, werden die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen identifiziert und *in vitro* mit Zusatz des lymphozytenexpandierenden Zytokins IL-2 auf eine Anzahl von 10^{10} bis 10^{11} Zellen expandiert, stimuliert und dem Patienten zurückinfundiert. Es wurden Ansprechraten bis zu 35 % bei Patienten mit malignem Melanom beobachtet (Rosenberg, 2001).

1.1.2.6 Tumor-Vakzinierung mit dendritischen Zellen

Effektive T-Zell Aktivierung hängt von der Präsentation von Tumorantigenen durch antigenpräsentierende Zellen ab. Zu diesen zählen Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (DC). Von diesen können lediglich DC naive T-Zellen aktivieren und deren Differenzierung in Tumorantigen-spezifische Effektorzellen bewirken. Diese Eigenschaft von DC ist schon lange bekannt, aber die geringe verfügbare Anzahl (0,1 % der Leukozyten im peripheren Blut) verhinderte den schnellen Fortschritt auf diesem Gebiet. Erst durch die Möglichkeit der *ex vivo* Generation großer Mengen an DC konnten zahlreiche klinische Studien durchgeführt werden, die das Potenzial einer Tumorthherapie mit DC erahnen ließen (Curiel and Curiel, 2002). Die Mehrzahl der Studien untersuchte die Therapie des malignen Melanoms (insgesamt 27 klinische Studien). Weitere Anwendungsgebiete betreffen das Nierenzell-Karzinom, das Prostata-Karzinom, das hepatozelluläre Karzinom sowie Karzinome des Halsbereiches.

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über bisher durchgeführte klinische Studien (Auswahl von Studien mit einer Patientenzahl größer 10).

Karzinom (CA)	DC-Typ	Tumorantigene und Formulierung	Patientenzahl, IA Klinisches Ansprechen	Autor
Kolon-CA	FLT-3 Ligand expandierte DC	CEA Peptid	12, 7 2 KR, 2 SE, 1 MR	Fong et al., 2001
	Unreife MoDC	Peptide: gp100, Mage-1 und -3, Mart 1	16, 7 2 SE, 3 PR, 1 MR	Nestle et al., 1998
Melanom	Reife MoDC	Peptide: Mage-3	11, 6 6 MR	Thurner et al., 1999
	CD34+ SZ abg. ausgereifte DC	Peptide: gp100, Mage-1, Melan A	14, 5 1MR, 7SE	Mackensen et al., 2000
	CD34+ SZ abg. ausgereifte DC	Peptide: gp100, Mage-1 und -3, Mart 1	18, 16 3 KR, 1 PR, 3 MR, 3 SE	Banchereau et al., 2001
Multiples Myelom	Unreife Blut-DC	Immunglobulin-Ideotyp	12, 4 1SE	Reichardt et al., 1999
	CD34+ SZ abg. ausgereifte DC	Immunglobulin-Ideotyp	11, 2	Titzer et al., 2000
Prostata-CA	Unreife MoDC	Peptid: PSMA	37, 6 1KR, 10 PR, 8SE	Murphy et al., 1999
	Unreife Blut-DC	Peptid: PAP	12, 12 3 mit Abfall PSA Wert>50%	Burch et al., 1999
	Unreife Blut-DC	Peptid: PAP, Xenogen	21, 21 7SE	Fong et al., 2002
	Unreife MoDC	PSA kodierte mRNA	13, 13 1 MR	Heiser et al., 2001

Tab.1 Auswahl von bisher durchgeführten klinischen Studien mit dendritischen Zellen

Legende Tab.1:

n = Anzahl der Patienten; IA = immunologische Antwort, SZ = Stammzellen; abg. = abgeleitet, DC = dendritische Zellen, MoDC = Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

KR = komplette Remission (100 % Rückbildung aller Tumormanifestationen);

PR = partielle Remission (> 50 % Tumorrückbildung länger 1 Monat)

MR = geringe (*minor*) Remission (> 25 % -50 % Tumorrückbildung länger als 1 Monat oder > 50 % Tumorrückbildung kürzer als 1 Monat)

SE = stabile Erkrankung = weder Progression noch Regression des Tumors

G = gemischte Tumorreaktion (Regression einiger Metastasen bei gleichzeitiger Progression anderer Metastasen)

1.2 Dendritische Zellen

Ralph Steinman und Zanvil Cohn entdeckten 1973 als erste DC. DC stellen eine Subpopulation der Leukozyten dar, die von Knochenmarksvorläufern abstammen. Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden enorme Erkenntnisse gewonnen, wie DC das Immunsystem beeinflussen (Banchereau and Steinman, 1998). DC sind im Immunsystem für die Aufnahme, den Transport, die Verarbeitung und die Präsentation von Antigenen an T-Zellen verantwortlich. In einem unreifen Zustand zirkulieren DC im Blut und wandern in Gewebe ein. In den Geweben funktionieren DC als Wächter, die ununterbrochen ihre Umgebung nach Antigenen absuchen. Kontakte mit Antigenen bewirken eine Migration der DC in den drainierenden Lymphknoten. Auf dem Weg in den Lymphknoten werden die aufgenommenen Antigene von den DC verarbeitet und als Peptide (kurze Aminosäuresequenzen) auf der Oberfläche auf „*major histocompatibility complex*“ (MHC)–Molekülen fixiert. Gleichzeitig werden vermehrt kostimulierende Moleküle gebildet, die für eine effektive Aktivierung von Lymphozyten notwendig sind. Der Prozess, in dem die DC die Fähigkeit zur Aktivierung von Lymphozyten erwerben, wird als Reifung bezeichnet. DC interagieren mit T- und B-Lymphozyten sowie mit anderen Zelltypen, wie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Diese Aufgaben machen eine Spezialisierung unter den DC nötig. So sind bis heute

zahlreiche Subtypen von DC beschrieben worden. Im Folgenden wird auf diese Subtypen im murinen sowie humanen System näher eingegangen.

1.2.1 Dendritische Zellpopulationen im murinen Immunsystem

Im murinen Immunsystem konnten durch Isolation von Geweben und Blut Erkenntnisse über DC *in vivo* gewonnen werden. In der Maus sind mindestens sechs verschiedene DC-Typen bekannt, die sich durch die Expression des Oberflächenmarkers CD11c auszeichnen (Heath et al., 2004; Shortman and Liu, 2002). Nach aktuellem Kenntnisstand werden DC im murinen System in konventionelle und plasmazytoide DC unterteilt (Shortman and Naik, 2007; Villadangos and Schnorrer, 2007). Innerhalb der konventionellen Gruppe sind fünf Subtypen von DC in lymphatischen Organen bekannt: Drei in lymphatischen Organen „sesshafte“ DC und zwei migrierende DC-Typen (Langerhanszellen und dermale interstitielle DC). Diese fünf Zelltypen exprimieren je nach Subtyp unterschiedlich die auf DC funktionslosen T-Zell Marker CD4 und CD8 sowie andere Marker wie CD11b und CD205 (DEC205) und Langerin (wird lediglich von Langerhanszellen exprimiert). Diese fünf Marker sind für die Identifizierung der fünf Subtypen geeignet.

Jede dieser Subtypen nimmt innerhalb des Immunsystems unterschiedliche Aufgaben wahr, die auch dementsprechend eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb des lymphatischen Systems bedingt. Zuerst sollen die drei in lymphatischen Organen sesshaften DC-Subtypen beschrieben werden. In der Milz kommen alle drei Subtypen vor ($CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^+$). Die $CD8^+$ DC sind in den T-Zell-Arealen und die $CD4^+$ DC in den Marginalzonen der Milz lokalisiert. Der Subtyp, der den größten Anteil der in der Milz vorkommenden DC ausmacht, trägt die Oberflächenexpression $CD4^+CD8^-CD205^-CD11b^+$. Die $CD4^-CD8^{high}CD205^+CD11b^-$ DC machen den größten Anteil der im Thymus vorkommenden DC aus. Hervorzuheben ist hierbei Ihre Funktion, die Aktivierung von $CD8^+$ T-Lymphozyten durch die Ausschüttung von IL-12p70 und durch den Prozess der Kreuzpräsentation zu initiieren. Die $CD8^+$ DC ist der Hauptproduzent von IL-12p70 im murinen System. DC mit dem Phänotyp $CD4^-CD8^-CD205^-CD11b^+$ sind vorwiegend in den mesenterialen Lymphknoten zu finden und sind für die Ausschüttung von Interferon- γ (nach Kontakt mit IL-12 und IL-18) maßgeblich verantwortlich. Alle drei Subtypen zusammen machen circa die Hälfte aller DC in den Lymphknoten aus.

Den Rest aller DC in den Lymphknoten stellen die migrierenden DC, die aus peripheren Geweben, wie der Haut, in die Lymphknoten eingewandert sind. So werden die migrierenden DC in Langerhanszellen der Epidermis ($CD4^-CD8^{low}CD205^+CD11b^+$, Langerin⁺) sowie in interstitielle DC ($CD4^-CD8^-CD205^+CD11b^+$) unterteilt. Interstitielle DC der Haut werden auch als dermale DC bezeichnet. Im Gegensatz zu den im lymphatischen System sesshaften DC, kommen die migrierenden DC nicht in der Milz oder im Thymus vor. Obwohl diese beiden Populationen Antigene im Gewebe aufnehmen und in den Lymphknoten transportieren, ist deren Fähigkeit zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen umstritten (Allan et al., 2003). Unklar bleibt, wie konventionelle, in lymphatischen Organen sesshafte $CD8^+CD4^-$ DC ihr Antigen erhalten, da sie weder den Lymphknoten verlassen, noch an Orten zu finden sind, an denen sie mit diesen Antigenen in Kontakt treten könnten. Es wird diskutiert, ob Langerhanszellen oder interstitielle DC in der Lage sind, Antigene $CD8^+CD4^-$ DC zu übertragen (Heath et al., 2004).

Eine zweite Gruppe von DC konnte als die Typ-I-Interferon produzierende Zelle identifiziert werden. Die Morphologie dieser Zellen ähnelt denen von Plasmazellen. Aus diesem Grund wird sie als plasmazytoide DC bezeichnet. Diese Zellen kommen im gesamten lymphatischen System vor. Sie entsprechen den im humanen System vorkommenden plasmazytoiden DC und exprimieren ein ähnliches Oberflächenmuster. Murine plasmazytoide DC exprimieren den B-Zell-Marker B220, $CD45RA^{high}$, $CD11c^{low}$ sowie $MHCII^{low}$.

Im Prozess der Ausreifung nach Antigenexposition exprimieren DC im murinen System zusätzlich zu den oben genannten Markern die Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 und hohe Level von MHC-II Molekülen. In der Vergangenheit ist es gelungen, aus Monozyten (RA^- , $CD11c^+$, $CD11b^+$) durch Stimulation mit *granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor* (GM-CSF) und $TNF-\alpha$ *in vitro* ausgereifte DC zu generieren (O'Keeffe et al., 2003).

Dieses *in vitro* Modell hat Ähnlichkeiten mit *in vivo* Prozessen im murinen System. So konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten über das Gefäßendothel in die Lymphe und folgend in den Lymphknoten migrieren und sich dort zu reifen DC ($CD8^+CD11^{low}$) entwickeln (Randolph et al., 1999). Kürzlich konnte ebenfalls im murinen System der Beweis erbracht werden, dass sich Monozyten aus dem Blut nach Einwanderung in periphere Gewebe in DC differenzieren können (Tacke and Randolph, 2006). Dieser DC-Subtyp ist allerdings noch wenig erforscht und kann im Augenblick noch

unzureichend in das oben beschriebene Differenzierungssystem eingeordnet werden. Mit dem Aufkommen dieser Erkenntnis besteht Grund zu der Annahme, dass aus Monozyten abgeleitete DC *in vitro* im humanen System ein Pendant *in vivo* besitzen könnten.

1.2.2 Dendritische Zellpopulationen im humanen Immunsystem

Die gewonnenen Erkenntnisse im humanen Immunsystem über DC stammen im Gegensatz zur Maus nicht aus der direkten Isolation von Geweben, sondern hauptsächlich von *in vitro* Experimenten. Im menschlichen Organismus sind *in vivo* wie im murinen System mehrere Populationen von DC bekannt. Man unterscheidet DC im Gewebe von denen im Blut. Im Gewebe wird zwischen DC der Haut und denen in allen peripheren Geweben im Organismus vorkommenden DC unterschieden. DC der Haut stellen nach aktuellem Kenntnisstand eine heterogene Gruppe dar. Bislang sind drei Subpopulationen bekannt: Die Langerhanszellen der Epidermis (Vorhandensein von Birbeck-Granula, Expression von Langerin und CD1a), die dermalen DC sowie eine Langerin und CD103⁺ DC (Bedoui et al., 2009). DC, die direkt in der Milz und den Tonsillen nachgewiesen werden konnten, zeigen unterschiedliche Expression an CD4, CD11b und CD11c und ähneln in der Hinsicht den murinen Subtypen der Milz. Im Thymus liegt eine CD11c⁺, CD11b⁻, CD45RO^{low} DC vor. Diese entspricht der im murinen System vorkommenden CD8⁺ Zelle.

Im Blut finden sich zwei Subtypen. Die myeloiden DC zeichnen sich durch eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD11c und eine niedrige von CD123 (IL-3-Rezeptor) aus. Sie exprimieren die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) 1, 2, 4, 5 und 8 (Kadowaki et al., 2001). DC, die kein CD11c, aber CD123 und CD4 exprimieren, sowie morphologische Ähnlichkeiten mit Plasmazellen haben, werden als plasmazytoide DC bezeichnet. Plasmazytoide DC kommen auch in lymphatischen Organen vor. Kultiviert man plasmazytoide DC mit IL-3, CD154, mikrobiellen Stimuli (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin [CpG]-Oligonukleotiden) oder Viren (z.B. Herpes-simplex-Virus), reifen diese aus. Sie exprimieren die TLR 3, 7 und 9 (Alexopoulou et al., 2001). Der Unterschied zwischen den zwei Subtypen des Blutes liegt weiterhin in deren prozentualer Verteilung im Blut, in der Zytokinproduktion, der Fähigkeit der Antigenpräsentation und den Wachstumsbedingungen.

Über humane DC ist *in vivo* im Gegensatz zum murinen System aufgrund des Mangels an untersuchbarem Gewebe relativ wenig bekannt. Die Hauptquelle stellt das Blut dar. Eine *in vivo* Generierung von DC gelang erstmalig aus CD34⁺ Stammzellen bzw. Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (Young et al., 1995). Die am häufigsten angewandte Methode zur Erzeugung von humanen DC *in vitro* stellt ähnlich wie bei der Generierung von murinen DC die Generierung von Monozyten-abgeleiteten DC dar (MoDC, weitere Ausführungen darüber siehe unten). Eine Aktivierung dieser Zellen (durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder mikrobielle Lipopolysaccharide) bedingt die Expression der Oberflächenmarker CD38⁺CD86⁺MHCII^{high}. Die Zellen tragen im Unterschied zu Makrophagen kein CD14 auf der Oberfläche.

Abschließend ist bei dem Vergleich der beiden Systeme zu bedenken, dass ein *in vivo* gut erforschtes System in der Maus mit einem *in vitro* Kultursystem menschlicher DC verglichen wird und sich daraus zwangsläufig Unterschiede ergeben. Bei Vorhandensein von ähnlichen Isolationsmethoden könnten DC des murinen mit denen des humanen Systems verglichen werden (Shortman and Liu, 2002). Einer der bekannten Unterschiede des humanen Systems zum murinen System stellt die Abwesenheit des Oberflächenmarkers CD8 im humanen System dar.

1.2.3 Funktionen der dendritischen Zellen innerhalb des Immunsystems

Im humanen wie auch im murinen Immunsystem nehmen DC in peripheren Geweben, ähnlich den Makrophagen, körpereigene und körperfremde Substanzen (Antigene) auf. Diese werden von DC intrazellulär prozessiert und in Form von Peptiden an ihrer Zelloberfläche auf MHC-Molekülen gebunden. Peptid-MHC-Komplexe werden T-Zellen präsentiert (Trombetta and Mellman, 2005). Der Prozess der Antigenpräsentation durch DC ist sehr effektiv. DC werden deshalb auch als professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichnet. Zudem interagieren DC auch mit Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie können Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) aktivieren. Kommt die DC in Kontakt mit infektiösen Stimuli oder entzündlichen Mediatoren, schüttet sie IL-12 aus und unterläuft einen Prozess, der Reifung genannt wird. Ausgereifte DC verlieren die Fähigkeit zur Antigenaufnahme. Sie erlangen die Fähigkeit, in sekundäre lymphatische Organe einzuwandern und Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Im Gegensatz dazu führt die Antigenpräsentation von unreifen DC, z. B. bei Fehlen von Infektion oder Entzündung, zu Toleranz (Steinman and Nussenzweig, 2002).

Im murinen Immunsystem teilen alle DC die Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen an T-Zellen. Die Art der Interaktion zwischen T-Zellen und DC ist jedoch unterschiedlich und bestimmt die Differenzierung der T-Zelle entscheidend. So führen Kontakte von CD8⁺ DC mit CD4⁺ T-Helferzellen (Th) zu einer Th-1 Antwort, die durch die Ausschüttung von IL-12p70 mediiert wird. Kontakte von CD8⁻ DC fördern Th2 Antworten. CD8⁺ DC können im murinen System zytotoxische T-Zellantworten auslösen, in dem sie Antigene prozessieren und antigene Peptide auf MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche präsentieren. CD8⁻ DC sind dazu nicht in der Lage, prozessieren aber ebenfalls Antigene und präsentieren diese auf MHC-II-Molekülen CD4⁺ T-Lymphozyten. Bislang ist nicht abschließend geklärt, ob sich die unterschiedliche Funktion aus einer unterschiedlichen Bestückung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder einer anders ausgestatteten intrazellulären Prozessierungsmaschinerie ergibt. Murine plasmazytoide DC bilden Typ-I-Interferone (Interferon α und β) als Reaktion auf bakterielle DNA mit CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-Motiven oder virale Infektionen. Weiterhin sind sie fähig, die Zytokine IL-6 und IL-10 auszuschütten.

Im humanen System ist die myeloide DC *in vivo* als auch die MoDC *in vitro* zur Produktion von IL-12p70 fähig und leitet somit die T-Zellaktivitäten in Richtung Th-1 (eher als Th-2). Daraus resultieren Immunantworten mit Produktion von IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ) (Kalinski et al., 1999; Tanaka et al., 2000). Weiterhin kommt der myeloiden DC die Funktion der professionellen antigenpräsentierenden Zellen im humanen System zu. Sie allein ist nach aktuellem Kenntnisstand zur Kreuzpräsentation von Antigenen auf MHC-I-Molekülen fähig. Plasmazytoide DC bilden im humanen System (wie im murinen System) Typ I Interferone (Interferon α und β) in Reaktion auf bakterielle DNA mit CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-Motiven oder virale Infektionen. Per CD154 aktivierte plasmazytoide DC induzieren Th-2 gerichtete Antworten (Rissoan et al., 1999).

1.2.4 Antigenpräsentation dendritischer Zellen

DC sind Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität. Sie nehmen Antigene auf, werden durch Liganden von Pathogenerkennungsrezeptoren (zum Beispiel LPS, als Ligand für TLR 4) aktiviert (Blander and Medzhitov, 2006) und migrieren in den drainierenden Lymphknoten. Als professionelle antigenpräsentierende Zelle präsentiert die DC im Lymphknoten körpereigene und körperfremde

Peptidfragmente auf MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche Zellen des adaptiven Immunsystems. Durch die Präsentation von Peptiden auf MHC-II-Molekülen, ist die DC in der Lage, naive $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren. Diese entwickeln sich zu T-Helferzellen, die wiederum die Umwandlung von B-Zellen in Plasmazellen bewirken und zur humoralen Antikörperproduktion führen. Die Antigene werden in Endosomen aufgenommen, die sich zu Lysosomen entwickeln. Durch saure Hydrolasen werden die Proteinantigene in Peptide der Länge 10 bis 15 Aminosäuren (AS) degradiert. Peptid-MHC-II-Komplexe zirkulieren von der Zelloberfläche über endosomale und lysosomale Kompartimente zurück zur Zellmembran. Im sauren Milieu der Lysosomen löst sich das Peptidfragment vom MHC-II-Komplex. Damit steht die Peptidbindungsstelle neuen Peptiden im Lysosom zur Verfügung. Zur Präsentation von Antigenen im Kontext der MHC-II-Moleküle sind neben DC auch andere antigenpräsentierende Zellen in der Lage. Dazu gehören Makrophagen, B-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten. DC sind zudem in der Lage naive $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren. Nach Aktivierung wandeln sich naive $CD8^+$ T-Zellen in zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) um. Diese können virusinfizierte Zellen und auch Tumorzellen spezifisch abtöten. Naive $CD8^+$ T-Zellen erkennen Antigene assoziiert mit MHC-I-Molekülen. Dies setzt voraus, dass DC aufgenommene Antigene als Peptide auf MHC-I präsentieren. Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Nach derzeitigem Wissenstand sind lediglich DC zur Kreuzpräsentation fähig (Banchereau and Steinman, 1998; Mellman and Steinman, 2001). Die intrazelluläre Prozessierung von Peptiden für den MHC-I- und MHC-II-Komplex ist unterschiedlich.

1.2.5 Mechanismen der Kreuzpräsentation dendritischer Zellen

Jede Zelle des Organismus präsentiert konstitutiv intrazelluläre, körpereigene Proteine in Form von Peptiden auf MHC-I-Molekülen. MHC-I-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche stellen somit einen Spiegel der intrazellulär synthetisierten und wieder degradierten Proteine dar. Exogen aufgenommene Proteine werden nicht auf MHC-I präsentiert. Damit weist sich eine Zelle gegenüber Abwehrzellen als körpereigen oder während einer Virusinfektion bzw. als Tumorzelle als körperfremd aus. DC haben einen Mechanismus entwickelt, der es ermöglicht, exogene Proteine in den MHC-I-Präsentationsweg zu schleusen. Sie durchkreuzen somit den endogenen MHC-I-Prozessierungs-Weg. Der Erkenntnisstand über die zellulären Mechanismen der Kreuzpräsentation ist bisher noch lückenhaft. Die Erkenntnisse stammen hauptsächlich aus Arbeiten im murinen System (Ackerman and Cresswell, 2004; Kloetzel, 2004; Rock et al., 2004). Die murinen konventionellen, im lymphatischen

System sesshafter $CD8^+$, $CD4^-$ DC bilden die einzige Population im murinen System, die exogenes Antigen auf MHC-I kreuzpräsentieren und dadurch zytotoxische T-Zellen aktivieren kann.

Vereinfachend lässt sich die Kreuzpräsentation in sechs Einzelschritte unterteilen, die in Abb. 1 schematisch dargestellt sind: 1) Antigenaufnahme, 2) Ausbildung des Phagosoms, 3) Translokation des Antigen in das Zytosol, 4) Prozessierung des Antigen durch zytosolische Proteasen, 5) Transport der generierten Peptide in das endoplasmatische Retikulum, und 6) Transport von MHC-I-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche.

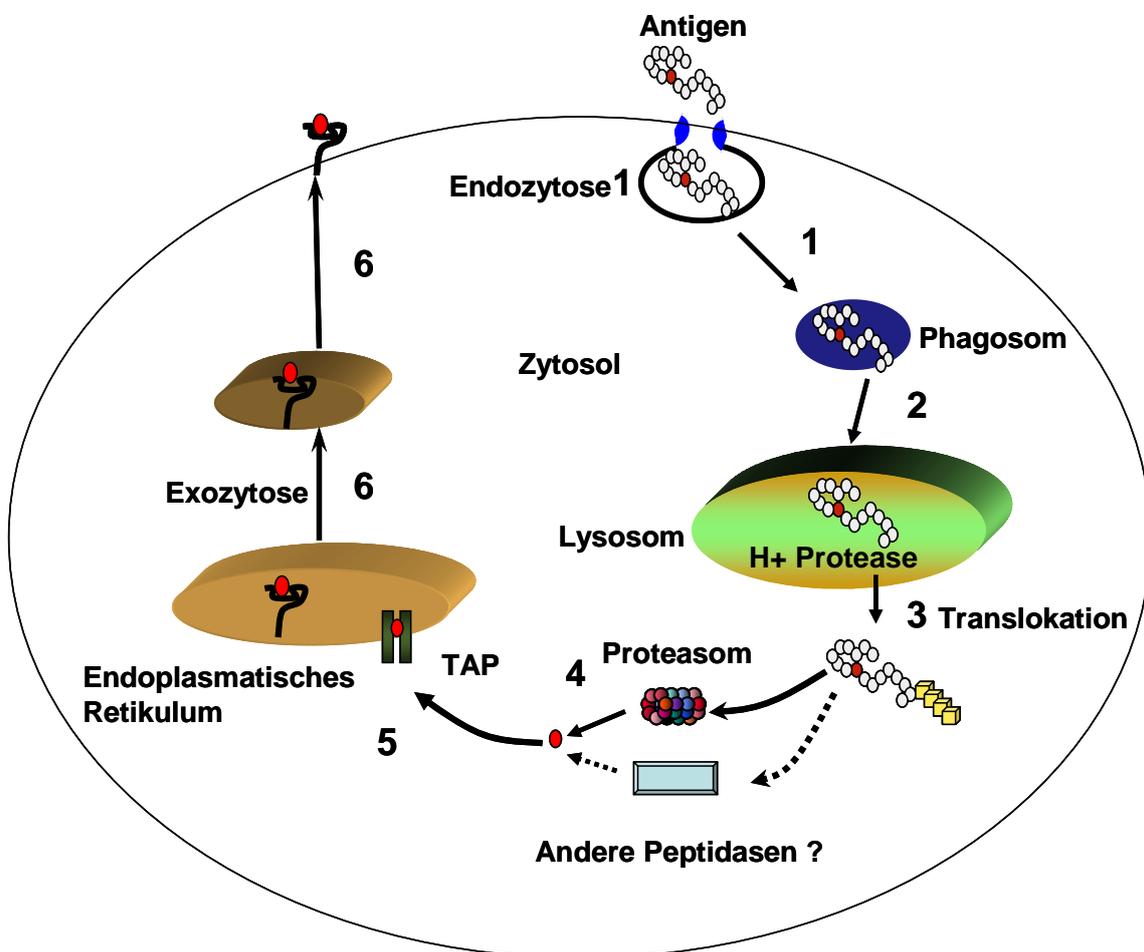


Abb. 1: Teilschritte der Kreuzpräsentation: Die Nummern entsprechen den im Text beschriebenen Einzelschritten.

ad 1) DC nehmen effektiv Antigen auf. Der Mechanismus der Antigenaufnahme kann dabei entscheidend für die Immunantwort sein. So führt die Aufnahme von löslichen Proteinen, z. B. über Pinozytose, fast ausschließlich zur Präsentation auf MHC-II. Effiziente Kreuzpräsentation findet statt, wenn das gleiche Antigen z. B. als

Immunkomplex über Fc-Rezeptoren (Regnault et al., 1999; Rodriguez et al., 1999) oder über den Oberflächenrezeptor DEC-205 aufgenommen wird (Bonifaz et al., 2002).

ad 2) Nach Aufnahme gelangt das Antigen in lysosomale Organellen. Dort ist es Enzymen mit niedrigen pH-Optima ausgesetzt. Die Bedeutung lysosomaler Organellen für die MHC-II-Präsentation ist etabliert. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese auch für die Kreuzpräsentation essenziell sind. Die genaue Zusammensetzung dieser Organelle ist Gegenstand der Forschung. Zwei Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass durch eine Fusion von Phagosom und Endoplasmatischem Retikulum (ER) ein Misch-Organell entsteht, welches die strukturelle und enzymatische Ausstattung für die MHC-I-Präsentation enthält (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Jutras and Desjardins, 2005).

ad 3) Das Antigen wird aus dem Phagosom in das Zytosol transloziert, wodurch das Antigen Zugang zum Proteasom, einem zytosolischen Proteasekomplex, erhält. Der Mechanismus der Translokation ist unbekannt. Vermutlich sind spezialisierte Transporter in der Membran des Phagosoms, z. B. der Sec61-Komplex, beteiligt (Guermonprez et al., 2003).

ad 4) Das Proteasom ist ein aus multiplen regulatorischen und katalytischen Untereinheiten bestehender Enzymkomplex, der für den Abbau von zellulären Proteinen verantwortlich ist. Er übernimmt durch die Generierung von MHC-I-Epitopen zudem eine wichtige immunologische Funktion (Goldberg et al., 2002). Durch seine endoproteolytische Aktivität generiert es C-Termini von Polypeptiden, die als Anker für die Peptidbindung an MHC-I Moleküle dienen. Das Zytokin IFN- γ , das von aktivierten T-Lymphozyten ausgeschüttet wird, bewirkt einen Austausch regulatorischer Untereinheiten. Es entsteht ein Immunproteasom, welches von DC konstitutiv exprimiert wird (Morel et al., 2000). Das Immunproteasom unterscheidet sich vom Proteasom in seiner katalytischen Aktivität. Dadurch wird in der Regel die Generierung von T-Zellepitopen optimiert.

Es wurden auch alternative, Proteasom-unabhängige Mechanismen der MHC-I-epitopgenerierung beschrieben (Gromme and Neefjes, 2002). In diesem Zusammenhang wurden zytosolische Aminopeptidasen, wie z.B. Leucin Aminopeptidase, Bleomycin Hydrolase, Puromycin-sensitive Aminopeptidase, Thimet-Oligopeptidase und Tripeptidylpeptidase II (TPP-II) diskutiert (Geier et al.,

1999). Bei TPP-II handelt es sich um einen großen, stabförmigen Enzymkomplex, der sowohl exo- als auch endoproteolytische Aktivität besitzt. Belege für eine Rolle von TPP-II in der Kreuzpräsentation wurde für ein Selbstantigen (Levy et al., 2002) und ein virales Antigen (Seifert et al., 2003) gefunden. Eine aktuelle Arbeit zeigte zudem, dass TPP-II bei der Generierung von MHC-I-Epitopen aus langkettigen Peptidprodukten des Proteasoms eine zentrale Rolle spielt (Reits et al., 2004).

ad 5 und 6) Im Zytosol generierte Peptide werden über das membran-ständige Transportmolekül TAP in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) importiert. Im ER lokalisierte Aminopeptidasen, wie z.B. ERAP, können die Peptide am N-Terminus auf eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren verkürzen, wodurch deren Bindung an MHC-I-Moleküle optimiert wird (Saric et al., 2002; York et al., 2002). Innerhalb des ER liegen MHC-I-Komplexe vor, die keine Peptide tragen. Durch Bindung der importierten Peptide an die MHC-I-Moleküle entstehen MHC-I-Peptid-Komplexe. Über das Golgi-Netzwerk gelangen die MHC-I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche, wo sie naiven CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden.

Trotz des enormen Fortschritts im Verständnis der molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation im murinen System (Untersuchungen an DC, die aus Knochenmarkszellen generiert wurden), ist über die Kreuzpräsentation auf subzellulärer Ebene im humanen System bisher weit weniger bekannt. Nach Aufnahme von Antigenen durch DC ist die Antigentranslokation aus Phagosomen in das Zytosol entscheidend für den Zugang zum Proteasom und damit für die Generierung der MHC-I-Epitope (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury et al., 1995; Rodriguez et al., 1999). Weiterhin scheint die Antigenaufnahme in bestimmte Organellen entweder die MHC-I- oder MHC-II-Präsentation zu favorisieren (Burgdorf et al., 2007). Ackerman et. al. zeigten, dass humane MoDC prinzipiell die MHC-I-Prozessierungsmaschinerie in frühen Phagosomen enthalten und zur Kreuzpräsentation fähig sind (Ackerman et al., 2003). Schnurr et al. beschrieben verschiedene Prozessierungswege von mit Immunkomplex auf der einen und mit ISCOMATRIX™ formulierten Antigenen auf der anderen Seite in humanen MoDC (Schnurr et al., 2005) (weitere Ausführungen siehe unten).

1.3 Dendritische Zellen in der Immuntherapie von Malignomen

Tumorzellen exprimieren bestimmte Proteine, so genannte Tumorantigene, die dem Immunsystem eine Angriffsfläche bieten, Tumore spezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Für die Regulation dieser Immunantworten gegen Tumore sind DC verantwortlich. Das macht sie zu einem vielversprechenden Instrument zur Entwicklung von spezifischen Vakzinen gegen Krebs (Dauer et al., 2008).

1.3.1 *In vivo* Gewinnung von dendritischen Zellen für die Tumorthherapie

DC stellen eine im humanen peripheren Blut selten vorkommende Leukozytenpopulation mit einem Anteil von unter 0,2 % der mononukleären Zellen dar. Das erschwert eine Gewinnung einer für die Tumorthherapie ausreichenden Anzahl von DC aus dem Blut von Patienten. Durch Expansion der DC durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF oder Flt-3 Ligand vor einer geplanten Aphaese wird eine ausreichende Anzahl im peripheren Blut erreicht (Jefford et al., 2001; Maraskovsky et al., 1996). Aus Praktikabilitätsgründen wird die *in vitro* Generierung von DC der *in vivo* Anreicherung vorgezogen.

1.3.2 *In vitro* Gewinnung von dendritischen Zellen für die Tumorthherapie

Im letzten Jahrzehnt war es möglich, durch zahlreiche murine Studien, die Grundlage für heutige Tumorstimmungsprotokolle zu etablieren. In diesen Studien wurden DC aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen und *ex vivo* mit Tumorantigenen beladen. Die prophylaktische Vakzinierung verhinderte die Entstehung von Tumoren und auch die Heilung von Tumoren war prinzipiell möglich (Gilboa et al., 1998; Schreurs et al., 2000).

Die meisten Studien im humanen System nutzten die Möglichkeit, DC *ex vivo* aus hämatopoetischen CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarkes oder aus monozytären Zellen des peripheren Blutes von Tumorkranken zu gewinnen. Kultiviert man Monozyten des peripheren Blutes über einen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 gewinnt man DC, deren Funktion und Morphologie denen der unreifen myeloiden DC ähnelt (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Diese MoDC werden mit Tumorantigenen beladen und den Patienten injiziert. Verschiedene Strategien wurden klinisch evaluiert (Cerundolo et al., 2004; den Brok et al., 2005; Figdor et al., 2004; Gunzer and Grabbe, 2001; Tuyaerts et al., 2007). In einzelnen Patienten wurden nach einer solchen Vakzinierung Immunantworten gegen Tumore

sowie ein klinisches Ansprechen beobachtet. Eine schnellere und vergleichbare Möglichkeit, MoDC zu generieren, stellt die Kultivierung dieser Monozyten mit GM-CSF und IL-4 für 48 Stunden dar (sogenannte *fastDC*) (Dauer et al., 2003; Dauer et al., 2008). Um DC zum Auslösen einer effizienten Immunantwort zu befähigen und damit deren Potenzial in der Immuntherapie von Tumoren auszunutzen, müssen viele Parameter berücksichtigt werden. Wichtige Kriterien betreffen die Wahl des DC-Typs, den Ausreifungsgrad, die Migrationsfähigkeit, die Wahl der Tumorantigene sowie deren Formulierung.

1.3.3 Tumorantigene

Multiple Tumorantigene wurden identifiziert (Rosenberg, 2001). Eine Einteilung erfolgt einerseits in Antigene, die durch Tumore im Vergleich zu normalem Gewebe überexprimiert sind. Weiterhin wurden Antigene auf soliden Tumoren identifiziert, die ansonsten nur von immunprivilegierten Geweben (Keimbahnzellen des Hodens und der Plazenta) gebildet werden (sogenannte *cancer testis antigens*). Zusätzlich sind mutierte Tumorantigene beschrieben worden, die Mutationen in normalen Proteinen enthalten. Für die Tumorentität des Melanoms sind spezifische Antigene bekannt, die auch in normalen Melanozyten vorkommen. Eine Übersicht der bekannten Tumorantigene wird in folgender Tabelle gegeben.

Tumorantigene			
Überexprimiert	Mutiert	cancer testis	Melanom- und Melanozytenspezifisch
alpha Fetoprotein	β -Catenin	MAGE-1	MART-1 (Melan-A)
Telomerase catalytic protein	MUM-1	MAGE-2	gp100 (pmal-17)
G-250	CDK-4	MAGE-3	Tyrosinase
MUC-1	Caspase-8	MAGE-12	Tyrosinase related protein-1
Carcinoembryonic antigen	KIA 0205	BAGE	Tyrosinase related protein-2
p53	HLA-A2-R1701	GAGE	Melanocyte-stimulating hormone receptor
Her-2/neu	p53	NY-ESO-1	

Tab.2 Übersicht über tumorassoziierte Antigene

Zu den Antigenen, die MHC-I-restringierte Epitope enthalten, gehören die Melanom-Antigenabkömmlinge, mutierte und nicht mutierte, auf Krebszellen überexprimierte Antigene und schließlich die *cancer-testes*-Antigene. Antigene, in denen MHC-II-restringierte Epitope vorkommen werden in mutierte und nicht-mutierte Proteine unterteilt. Unter diesen zwei großen Gruppen befinden sich auch antigene Proteine, die gleichzeitig MHC-I- und MHC-II-restringierte Epitope enthalten. Dazu zählen die *cancer-testes*-Antigene MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1 sowie die melanomspezifischen Antigene gp100 und Tyrosinase. Die *cancer-testes*-Antigene sind für die Tumorstimmung mit DC besonders geeignet, da sie im Gegensatz zu den melanom- und melanozytenspezifischen Antigenen nicht auf für das Immunsystem erreichbarem gesundem Gewebe vorkommen.

1.3.4 Die Formulierung von Tumorantigenen

Tumorantigene können Immunzellen undefiniert als Lysat, ganze Tumorzellen, oder als Fusionszellen aus Tumoren und DC angeboten werden (Enomoto et al., 2006; Schnurr et al., 2001). Eine definierte Möglichkeit stellt die Verwendung von MHC-I- und MHC-II-restringierter Peptide, mRNA, DNA und ganzer Proteine dar (Schnurr et al., 2005). In bisherigen Studien wurden DC hauptsächlich *in vitro* mit Tumorzelllysaten oder Tumorantigenen in Form von MHC-I-restringierten Peptiden beladen. Der Einsatz von Tumorzelllysaten stellt ein unselektives Verfahren dar, in dem die DC aus einer Vielzahl von Proteinen zufällig immunogene Peptide generieren.

Eine gezielte Immunantwort kann durch die Verwendung von Peptiden (MHC-I- und MHC-II-restringiert) generiert werden. Jedoch hat die Verwendung MHC-I-restringierter Peptide Nachteile. Die Halbwertszeit eines Peptid-MHC-Komplexes beträgt nur wenige Stunden, so dass nur etwa 1 % der DC, die in den Lymphknoten migrieren, zur Präsentation fähig sind (De Vries et al., 2003). Weiterhin ist die Immunantwort auf die verwendeten Epitope beschränkt und die Behandlung nur Patienten mit einem entsprechenden HLA-Typ zugänglich.

Die Verwendung ganzer Proteine als Tumorstimmung stellt einen neuen, vielversprechenden Ansatz dar. Proteine können rekombinant in großen Mengen sowie in definierter und einheitlicher Qualität hergestellt werden und sind lagerbar. Weiterhin bergen sie keine Risiken, die mit lebenden Vektoren verbunden sind.

Die Limitierungen, die die Verwendung von einzelnen Peptiden mit sich bringt, kann durch die Beladung von DC mit Proteinen, die sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Epitope enthalten, umgangen werden. Die Kreuzpräsentation ist jedoch für lösliches Protein

ineffektiv, es wird hauptsächlich auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Da jedoch auch eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen für die Ausbildung effektiver zytotoxischer T-Zell-Antworten notwendig ist (Ridge et al., 1998; Sun and Bevan, 2003), wurde das therapeutische Potenzial von DC möglicherweise nur unvollständig genutzt. Durch Formulierung von Proteinantigenen als Immunkomplex mit spezifischen Antikörpern (Dhodapkar et al., 2002; Nagata et al., 2002; Regnault et al., 1999; Rodriguez et al., 1999), als Konjugat mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle auf DC, wie z.B. DEC-205 (Wang et al., 2009) und *C-type lectine* (Dominguez-Soto and Corbi, 2007; Sancho et al., 2008) oder durch Formulierung mit immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) (Schnurr et al., 2005) kann eine effiziente Antigenpräsentation auf MHC-I sowie MHC-II erzielt werden.

1.4 Antigenformulierung mit immunstimulatorischen Komplexen

1.4.1 ISCOM und ISCOMATRIX™-Adjuvans

ISCOMs sind eine Mischung aus triterpenoiden Saponinen (gewonnen aus der Rinde des Seifenrindenbaumes *Quillaja saponaria Molina aus Südamerika*), Phospholipiden und Cholesterin, die durch hydrophobe Kräfte zusammengehalten wird und spontan immunstimulatorische, micellenförmige, käfigartige Strukturen von typischerweise 30 bis 40 nm Durchmesser ausbildet (Erstbeschreibung durch Morein, 1984) (Kensil et al., 1991; Kersten and Crommelin, 2003; Kersten et al., 1991; Morein et al., 1984). Als Vakzine führen ISCOMs in Formulierung mit Antigenen zu einer starken Immunantwort *in vivo*.

Eine ISCOM-Vakzine entsteht durch Formulierung mit einem Antigen. Diese Bindung wird durch hydrophobe Wechselwirkungen aufrechterhalten (Lovgren and Morein, 1988). So binden hydrophobe Antigene spontan an die ISCOM-Matrix. Dabei ist die Zusammensetzung der ISCOM-Matrix für jedes gebundene Antigen unterschiedlich (Behboudi et al., 1995). Für die Immunogenität und die Toxizität bei Überdosierung einer ISCOM-Vakzine ist der Anteil der Saponine an der ISCOM-Matrix entscheidend (Behboudi et al., 1995). *Quillaja saponaria Molina* Komponenten oder formuliert als ISCOM-Matrix hatten dabei keine oder allenfalls geringe toxische Effekte und zeigten keine lokalen Hautreaktionen in gebräuchlichen Konzentrationen im Mausmodell (Ronnberg et al., 1995). Die vorbeschriebenen hydrophoben Kräfte innerhalb des ISCOM sind für die Formulierung mit einem Antigen entscheidend. So können nur Antigene mit ISCOM formuliert werden, die ebenfalls hydrophob sind. Diese

Eigenschaft schränkt die Verwendung zahlreicher Proteine ein und erschwert einen standardisierten Generierungsprozess nach *Good (Manufacturing) Practise (GMP)*.

Aufgrund der Nachteile der ISCOMs entwickelte man das in der vorliegenden Arbeit verwendete ISCOMATRIX™-Adjuvans, das prinzipiell dem ISCOM-Partikel ähnelt. ISCOMATRIX™ besteht ebenfalls aus Phospholipiden und Cholesterin aber im Gegensatz zu klassischen ISCOMs nur aus einer Fraktion von *Quillaja saponaria Molina*. Keine der zusammengesetzten Komponenten ist tierischen Ursprungs und der Anteil von Verunreinigungen in ISCOMATRIX™ ist minimal. Es entsteht ein 40 bis 50nm großes, käfigartiges virusähnliches Partikel, das damit etwas größer als das vorher beschriebene ISCOM ist (Andrews et al., 2008; Maraskovsky et al., 2009). Die Herstellung erfolgt unter GMP-Bedingungen. Die immunstimulatorischen Effekte werden bei ISCOMATRIX™-Adjuvans wie bei ISCOMs durch den Saponinanteil bewirkt, wobei der Mechanismus bisher ungeklärt ist. Studien in der Maus (Schnurr et al., Manuskript in Bearbeitung) und Schaf (Windon et al., 2000) konnten eine Zytokinproduktion (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ) im lokalen Lymphknoten kurz nach subkutaner Applikation von ISCOMATRIX™-Adjuvans detektieren. Damit gehen eine Aktivierung von DC und eine effektivere Antigenpräsentation einher. Weiterhin steigt die Anzahl rekrutierter Zellen im drainierenden Lymphknoten rapide an. Gleichzeitig sinkt in den ersten sechs bis zwölf Stunden die Zahl der Zellen, die den Lymphknoten verlassen. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass antigenspezifische Effektorzellen auf antigenpräsentierende Zellen treffen. Zwischen 24 und 48 Stunden wandern dann zunehmend mehr Zellen aus dem Lymphknoten aus.

In vitro Arbeiten mit humanen MoDC zeigten lediglich eine milde Hochregulation der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und MHC-II nach Exposition mit ISCOMATRIX™-Adjuvans im Vergleich zu den Immunstimulanzien LPS oder CD40-Ligand. Wird ISCOMATRIX™-Adjuvans dagegen *in vivo* appliziert, kommt es zu einer starken Hochregulation der Aktivierungsmarker. Damit spiegeln die Ergebnisse *in vitro* lediglich die direkte Wirkung auf DC, nicht jedoch das Zusammenwirken des ganzen Immunsystems wider. Eine Aktivierung von DC über TLR-Rezeptoren konnte für ISCOMATRIX™-Adjuvans nicht nachgewiesen werden (Drane et al., 2007).

1.4.2 ISCOMATRIX™-Vakzine

Die neue Generation der Vakzine, die als *subunit vaccines* bezeichnet werden, verwendet definierte Antigene aus Mikroorganismen oder Tumorzellen. Die Gentechnologie ermöglicht die Herstellung dieser Antigene in ausreichender Menge.

Voraussetzungen einer guten Vakzine sind ein immunogenes Antigen, ein geeigneter Vakzinträger (Matrix), sowie die Kombination mit einem immunstimulatorischen Adjuvans. Die aktuell gebräuchlichen Vakzine fungieren entweder als Träger (z. B. Aluminiumsalze sowie Öl-in-Wasser-Emulsionen) oder als Immunstimulanz (z.B. TLR-Agonisten, wie der TLR4-Agonist mpl™, der TLR7/8-Agonist 3M-012™ sowie der TLR9-Agonist CpG-Oligonukleotide). Der Nachteil der Verwendung der aktuell gebräuchlichen Vakzine gegenüber der ISCOMATRIX™-Vakzine wird am Beispiel Aluminiumsalz deutlich. So sind Aluminiumsalze in der Lage, CD4⁺ T-Zellen und damit B-Zellen zur Antikörperproduktion zu stimulieren. Aluminiumsalze sind dagegen nicht in der Lage, eine Immunantwort durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen zu generieren.

ISCOMATRIX™-Adjuvans erfüllt die Bedingungen eines Antigenträgers und gleichzeitig eines Immunstimulanz. Formuliert man ISCOMATRIX™-Adjuvans mit einem Antigen, wird das entstehende Konstrukt als ISCOMATRIX™-Vakzine bezeichnet. Im Unterschied zu ISCOMs kann ISCOMATRIX™-Adjuvans mit jedem denkbaren Antigen zu einer ISCOMATRIX™-Vakzine formuliert werden (Sjolander et al., 1998).

ISCOMATRIX™-Vakzine wird *in vivo* gut von antigenpräsentierenden Zellen wie DC in der Haut oder im drainierenden Lymphknoten aufgenommen und in die T-Zell- und B-Zell-Areale transportiert. Bisher ist allerdings unklar, über welchen Mechanismus es zur intrazellulären Aufnahme der Vakzine kommt. Weiterhin führt die Aufnahme der Vakzine zur Aktivierung der DC und zur subsequenten Zytokinausschüttung im Rahmen der angeborenen Immunantwort. Dadurch werden weitere Immunzellen in den Lymphknoten rekrutiert. Die Verwendung der ISCOM-Vakzine oder ISCOMATRIX™-Vakzine induziert spezieübergreifend durch die Aktivierung von DC eine breite humorale Antikörperproduktion verschiedener Subklassen (z. B. IgG₁ und IgG_{2a}), welche weitere Prozesse der Immunabwehr zur Folge hat (Komplementaktivierung, Virusneutralisation, antikörpervermittelte zelluläre Toxizität, Opsonisierung und Phagozytose). Weiterhin bewirkt die Verwendung der Vakzine sowohl eine CD4⁺ als auch eine CD8⁺ T-Zell-Antwort (Beacock-Sharp et al., 2003). Die Aufnahme von ISCOMATRIX™-Vakzine durch DC führt zu einer Immunantwort durch CD4⁺ T-Helferzellen, die IL-2 und IFN-γ ausschütten (Th-1 Antwort) sowie zu einer Th-2 Antwort mit Ausschüttung von IL-4. Für die Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen wird sowohl die immunstimulatorische als auch die Antigenträgerfunktion benötigt (Drane et al., 2007). Die Immunisierung von Mäusen mit ISCOMATRIX™-Vakzine (mit Ovalbumin) führte zu einer schnellen

MHC-I-restringierten Immunantwort im drainierenden Lymphknoten. In der Milz konnte dies nicht nachgewiesen werden. Dadurch wurde gezeigt, dass eine ISCOMATRIX™-Vazine während der initialen Immunantwort lokal und nicht systemisch wirkt. Interessanterweise konnten Fifis et al. nachweisen, dass die Aufnahme von 40 bis 50nm großer Partikel durch DC für die Induktion einer zytotoxischer T-Zellantwort optimal ist (Fifis et al., 2004). Somit scheint die virusähnliche Partikelgröße des ISCOMATRIX™-Adjuvans (40 bis 50nm) förderlich für die Induktion von zytotoxischen T-Zellen zu sein.

Zusammenfassend sind die immunstimulatorischen Effekte der Vakzine so stark, dass eine Reduktion des Antigens (in der Formulierung um den Faktor 10 bis 100) möglich ist (gezeigt in der Maus und im Schwein mit Hepatitis-C-Virus-Core-Antigen sowie im Affen mit humanem-Immundefizienz-Virus-gp130-Antigen (Boyle et al., 2007)). In Mausmodellen führten ISCOM-Vakzine zu einem Schutz vor viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen sowie vor einer Tumorentstehung (Hoglund et al., 1989). In Makaken konnte die Vakzinierung mit ISCOMATRIX™ formuliert mit Hepatitis-C-Virus-Core-Antigen eine starke CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Antwort generieren, die noch ein Jahr nach der letzten Vakzinierung nachweisbar war (Polakos et al., 2001). Im prophylaktischen Mausmodell konnte eine ISCOMATRIX™-Vakzine vor der Entstehung von Ovalbumin exprimierenden Tumoren schützen (Lenarczyk et al., 2004; Maraskovsky et al., 2004). Im therapeutischen Ansatz in Kombination mit TLR-Liganden führte die Verwendung von ISCOMATRIX™-Vakzine zu einer Regression eines Pankreaskarzinoms (Jacobs et al., *Int. J.Cancer*, 2010, in press).

1.4.3 Immunstimulatorische Komplexe im klinischen Einsatz

Für den potenziellen klinischen Einsatz von ISCOMs wurde ISCOMATRIX™-Adjuvans entwickelt (Sjolander et al., 1998). ISCOMATRIX™-Vakzine haben sich in klinischen Studien als sicher und effektiv bei der Induktion von humoralen und zellulären Immunantworten gegen Viren und Tumore erwiesen (Sjolander et al., 2001). Aktuell werden sieben präventive als auch therapeutische klinische, randomisierte, kontrollierte Phase-I- und -II-Studien in der Infektiologie oder der Onkologie durchgeführt (Drane et al., 2007), während sieben weitere Studien bereits abgeschlossen sind (Drane et al., 2007). 2004 wurde eine klinische Studie im Menschen unter Verwendung des Tumorantigens NY-ESO-1 (formuliert mit ISCOMATRIX™) abgeschlossen, die eine breite humorale Antikörperproduktion sowie eine CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort gegen Epitope von NY-ESO-1 nachweisen konnte (Davis et al., 2004). 2009 wurde eine weitere klinische Phase-I-Studie publiziert, die

eine CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort auf Hepatitis-C-Virus-Core-Antigen formuliert mit ISCOMATRIX™-Adjuvans in gesunden Probanden nachweisen konnte (Drane et al., 2009). Die ISCOMATRIX™-Vakzine wurde gut toleriert und war stark immunogen (Drane et al., 2007). Diese Eigenschaft macht die Vakzine brauchbar für einen prophylaktischen sowie therapeutischen Einsatz.

Somit haben ISCOMATRIX™-Vakzine entscheidende Vorteile gegenüber anderen Vakzinierungen: a) Das Fehlen von Sicherheitsrisiken, die mit lebenden Vektoren verbunden sind. b) Die Möglichkeit wiederholter Anwendung, da keine neutralisierenden Antikörper gegen die Vakzine auftreten. c) Die Möglichkeit der Generierung einer Antikörperantwort sowie T-Zellantwort gegen multiple MHC-I- und MHC-II-Epitope.

1.4.4 Kreuzpräsentation von mit ISCOMATRIX™-Adjuvans formuliertem Antigen

Interessanterweise bedienen sich DC bei der Kreuzpräsentation von ISCOMATRIX™-Vakzinen eines alternativen Prozessierungsweges, der unabhängig vom Proteasom ist (Schnurr et al., 2005). Demgegenüber werden Immunkomplexe Proteasom-abhängig, d. h. über den klassischen Weg, prozessiert. Der neu identifizierte Prozessierungsweg stellt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als sehr effizient und lang anhaltend dar (Maraskovsky et al., 2004). Durch Formulierung von rekombinantem NY-ESO-1-Protein mit ISCOMATRIX™-Adjuvans wurde eine Tumorstoffvakzine (NY-ESO-1/ISCOMATRIX™) hergestellt und in der humanen Gewebekultur sowie in Mausmodellen getestet. In C57BL/6 Mäusen induzierte die subkutane Gabe von NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ eine ausgeprägte antigenspezifische IFN-γ-Produktion, sowie hohe Antikörpertiter vom Typ IgG_{2a}. Im HLA-A2-transgenen HHDII-Mausmodell wurden CTL generiert, die spezifisch gegen das HLA-A2-restringierte Epitop NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ gerichtet sind und in der Lage waren, humane NY-ESO-1-positive Tumorzellen abzutöten. Zudem erfolgte durch eine prophylaktische Vakzinierung von C57BL/6 Mäusen eine Tumorstoffprotektion im aggressiven B16-Melanommodell (Maraskovsky et al., 2004). Gegenüber der herkömmlichen Strategie, humane MoDC mit spezifischen Peptiden zu beladen, konnte durch die ISCOMATRIX™-Formulierung von NY-ESO-1 eine signifikante Verlängerung des Zeitfensters (über drei Tage) für produktive Interaktionen zwischen DC und T-Zellen erzielt werden (Schnurr et al., 2005). Somit stellen Protein-basierte Vakzinierungen mit ISCOMATRIX™ eine vielversprechende Alternative zu Peptid-Vakzinierungen dar.

1.4.5 Antigenpräsentation von ISCOMATRIX™-Vakzinen durch diverse antigenpräsentierende Zelltypen

Im murinen System wurde die Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen durch verschiedene antigenpräsentierende Zellen untersucht. Dabei waren nur DC in der Lage gleichzeitig CD4⁺ und CD8⁺ vermittelte T-Zellantworten zu generieren (Beacock-Sharp et al., 2003). Andere antigenpräsentierende Zellen, wie B-Zellen, Makrophagen waren dazu nicht in der Lage (Robson et al., 2003; Robson et al., 2003). 2008 konnten Robson et al. allerdings den Nachweis erbringen, dass auch B-Zellen in geringem Maße im murinen System ISCOMATRIX™-Vakzine kreuzpräsentieren können (Robson et al., 2008).

In einem *in vitro* Modell wurde die Fähigkeit verschiedener humaner DC-Populationen untersucht, das Tumorantigen NY-ESO-1 auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen zu präsentieren. Von Tumorpatienten wurden NY-ESO-1-spezifische T-Helferzellen (HLA-DP4-restringiert) und zytotoxische T-Lymphozyten (HLA-A2-restringiert) gewonnen. Diese wurden mit in den HLA-Allelen übereinstimmenden DC kokultiviert, die zuvor mit NY-ESO-1-Proteinformulierungen gepulst wurden. Durch den Nachweis der IFN- γ -Produktion aktivierter T-Zellen konnte die Effizienz der Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass MoDC und CD1c⁺ myeloide DC, nicht jedoch plasmazytoide DC, Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen, zur Kreuzpräsentation befähigt waren. Auch in der MHC-II-Präsentation waren MoDC und CD1c⁺ myeloide DC den anderen antigenpräsentierenden Zellen überlegen (Schnurr et al., 2005).

1.4.6 Mechanismen der Antigenprozessierung von ISCOMATRIX™-Vakzinen

Der genaue Wirkmechanismus von ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen ist unbekannt. Ein direkter aktivierender Effekt auf humane DC wurde nicht gefunden, jedoch eine sehr effiziente intrazelluläre Aufnahme. Möglicherweise erleichtert der lipophile Charakter der Partikel die Translokation des Antigens vom Phagosom in das Zytosol. Interessanterweise waren DC bereits wenige Stunden nach Pulsung mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ in der Lage, zytotoxische T-Lymphozyten (und T-Helferzellen) zu aktivieren und behielten diese Fähigkeit über drei Tage bei. Im Vergleich zu Immunkomplexen (NY-ESO-1/IC), die von DC ebenfalls effektiv kreuzpräsentiert wurden, war dieser Prozess bei der ISCOMATRIX™ Formulierung stark beschleunigt. Die lang anhaltende Antigenpräsentation war ein signifikanter Vorteil im Vergleich zur Beladung mit NY-ESO-1-Peptiden. Die T-Zell-stimulatorische Kapazität ging bereits nach einem Tag verloren. Da DC nach subkutaner Injektion ein

bis zwei Tage für die Wanderung in drainierende Lymphknoten benötigen (De Vries et al., 2003; Morse et al., 1999), bieten ISCOMATRIX™ bzw. Immunkomplex-basierte DC-Vakzine durch die Verlängerung des Zeitfensters für mögliche Interaktionen zwischen DC und T-Zellen einen entscheidenden Vorteil gegenüber Peptid-gepulsten DC. Interessanterweise schleusten die beiden NY-ESO-1-Formulierungen das Antigen in unterschiedliche Prozessierungswege ein. Die Prozessierung von NY-ESO-1 Immunkomplexen erfolgte ausschließlich durch das Proteasom, während NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ von den DC sowohl durch das Proteasom (Ebert et al., 2009) als auch durch einen Proteasom-unabhängigen Mechanismus kreuzpräsentiert wurde (Schnurr et al., 2005). Durch die Verwendung von ISCOMATRIX™-Vakzine werden damit verschiedene Wege der Antigenprozessierung angesteuert und es entstehen daher möglicherweise mehr immunogene Peptide für die MHC-I-Präsentation. Letztendlich ergibt sich daraus die Möglichkeit einer breiteren zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Tumore.

1.5 Fragestellung

Vorarbeiten zeigten, dass DC das Tumorantigen NY-ESO-1 über zwei alternative Wege kreuzpräsentieren können: formuliert als Immunkomplex erfolgte die Prozessierung Proteasom-abhängig, formuliert mit ISCOMATRIX™-Adjuvans hingegen Proteasom-unabhängig (Schnurr et al., 2005). Ziel der Arbeit war es, Proteasom-abhängige und -unabhängige Präsentationswege in DC näher zu charakterisieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Antigenaufnahme von Immunkomplexen bzw. der ISCOMATRIX™-Vakzine in unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente, das Antigen Zugang zu verschiedenen Prozessierungswegen erhält. Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Wie werden die verschiedenen Antigenformulierungen von DC aufgenommen?
2. In welche intrazellulären Kompartimente wird das Antigen transportiert?
3. Erfolgt eine Translokation des Antigens von endosomalen Kompartimenten in das Zytosol?
4. Gibt es zelltypspezifische Unterschiede in der Fähigkeit zur Antigentranslokation?

Um die intrazelluläre Antigenverteilung und Prozessierung visualisieren zu können, wurde in Kooperation mit *CSL Limited* (Parkville, Australien) ein palmityliertes Ovalbumin-Protein (OVA) mit dem Fluorochrom Alexa-Fluor488 markiert und mit ISCOMATRIX™-Adjuvans formuliert (OVA/ISCOMATRIX™). Die Generierung von OVA-Immunkomplexen (OVA/IC) erfolgte durch Inkubation von OVA-Protein mit einem

spezifischen Antiserum. Durch die Pulsung von humanen MoDC mit löslichem OVA, OVA/IC bzw. OVA/ISCOMATRIX™ sollten Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Antigenformulierungen mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Geräte

CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine AF 200	Fa. Scotsman-Enodis (Bettolino, ML, ITA)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Filme für Immunoblot	Fa. Amersham Biosciences (Little Chalfont Buckinghamshire, GB)
Filmentwickler	Fa. Agfa (Köln, D)
Hamilton Spritze	Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA)
Konfokales Mikroskop (LSM510 Meta)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Lamin Air Flow (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MACS Multi Stand	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACS Elutionssäule	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Marienfeld Deckgläser (10; 15mm)	Fa. Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Marienfeld Objektträger Superfrost	Fa. Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Multifuge	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer Zählkammer	Fa. Optik Labor, D
Nikon Diaphot Mikroskop	Fa. Nikon (Düsseldorf, D)
Nylon Membran	Fa. Boehringer Mannheim (Mannheim, D)
QuadroMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Rührheizer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Schüttler	Fa. Neolab Migge (Heidelberg, D)
Schwenktisch	Fa. Neolab Migge (Heidelberg, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Chemikalien

Ammoniumchlorid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Aqua dest.	Fa. Braun-Melsungen AG (Melsungen, D)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Cytochalasin D	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>ECL Western Blotting Detection Reagents</i>	Fa. Amersham Biosciences (Little Chalfont Buckinghamshire, GB)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Glycerin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Lactacystin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Mowiol 40-88	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natrium-Chlorid Lösung	Fa. Baxter (Lessines, B)
BD Pharm Lyse Lysing Buffer	Fa. BD/Pharmingen (Heidelberg, D)
To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3)	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.3 Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD14 Monocyte Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Biochrom AG (Berlin, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterrillin (Stone, Staffordshire, GB), Corning (Corning, USA), Falcon (Heidelberg, D) und Greiner (Frickenhausen, D) bezogen.

2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

GM-CSF	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
IL-3	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
IL-4	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Lipopolysaccharid (LPS) (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i>)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

RPMI-Vollmedium:

100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1,5 mM L-Glutamin
 10 Vol % AB Serum
 in RPMI 1640-Medium

MACS-Puffer:

2 mM EDTA
 0,5 Vol % FCS
 pH 7,4
 in PBS

2.1.7 Antikörper

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

für die konfokale Mikroskopie (fluoreszenzmarkiert-Sekundärantikörper)

Bezeichnung	Spezies	Fluorochrom	Herkunft
Anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 555	Molecular Probes
Anti-rat IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Anti-rabbit IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 555	Molecular Probes
Anti-human IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Anti-human IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 555	Molecular Probes

für die konfokale Mikroskopie (nicht fluoreszenzmarkiert-Primärantikörper)

Bezeichnung	Spezies	Klon	Herkunft
Anti EEA1	Maus IgG1	14	BD/ Pharmingen
Anti CD107a / Anti LAMP-1	Maus IgG1	H4A3	BD/ Pharmingen
Anti Calreticulin	Hase	-	BD/ Pharmingen
Anti TPP2	Mensch	Serum	Universitätsklinik Saarland

Für die Durchflusszytometrie (fluoreszenzmarkiert-Primärantikörper)

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Herkunft
Anti CD80	L307.4	PE	BD/ Pharmingen
Anti CD83	HB15e	PE	BD/ Pharmingen
Anti CD86	IT2.2	FITC, APC	BD/ Pharmingen
Anti HLA-DR	L243	FITC, APC	BD/ Pharmingen
Anti HLA-A2		FITC	BD/ Pharmingen

Für die Zellisolation mittels MACS

Bezeichnung	Klon	Herkunft
Anti BDCA-2	AC144	Miltenyi Biotec
Anti BDCA-4	AD5-17F6	Miltenyi Biotec

Für die Generierung der Immunkomplexe

Bezeichnung	Spezies	Herkunft
Anti OVA	Hase	Sigma

2.1.8 Sonstige fluoreszenzmarkierte Stoffe

Bezeichnung	Spezies	Fluorochrom	Herkunft
Dextran 10000D MW	-	Alexa Fluor 546	Molecular Probes
Dextran 500KD MW	-	FITC	Sigma-Aldrich

2.1.9 Proteinformulierungen

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine und Proteinformulierungen mit ISCOMATRIX™ jeweils fluoreszenzmarkiert oder unmarkiert.

Bezeichnung	Spezies	Fluorochrom	Herkunft
DQ OVA	Huhn	-	Molecular Probes
OVA	Huhn	-	Sigma-Aldrich
OVA	Huhn	Alexa Fluor 488	Sigma-Aldrich
OVA	Huhn	Alexa Fluor 555	CSL Limited
OVA	Huhn	Alexa Fluor 555	Molecular Probes
OVA	Huhn	-	Sigma-Aldrich
OVA	Huhn	Alexa Fluor 488	CSL Limited
OVA	Huhn	Alexa Fluor 488	Sigma-Aldrich
OVA	Huhn	Alexa Fluor 555	CSL Limited
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	-	Sigma-Aldrich
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	Alexa Fluor 488	CSL Limited
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	Alexa Fluor 488	Sigma-Aldrich
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	Alexa Fluor 555	CSL Limited
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	Alexa Fluor 555	Sigma-Aldrich
OVA-ISCOMATRIX™	Huhn	Alexa Fluor 555	CSL Limited

2.1.10 Generierung der Ovalbumin-Formulierungen für die konfokale Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) als Antigen verwendet, da OVA Protein (im Gegensatz zu NY-ESO-1 Protein) als Monomer vorliegt und kostengünstig hergestellt werden kann. OVA ist palmytiliert worden, um die Bindung an ISCOMATRIX™ zu verbessern. Dazu wurde OVA in einer Konzentration von 6,6 mg/ml in 50 mM Na₂CO₃, 5 % Deoxycholsäure (DOC), pH 9,0 gelöst. Humane Serumpalmytilsäure (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Dimethylformamid gelöst und 50 µl davon wurden zu 950 µl OVA Lösung hinzugefügt. Palmytiliertes OVA wurde durch Ausschlusschromatographie in 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,15 % DOC, pH 8,0 nach Größe angereichert und mittels Bradford Proteinassay quantifiziert. Die Konzentration des OVA wurde in einer Lösung von PBS, 0,15 % DOC, pH 7,4 auf 3 mg/ml eingestellt. Tributylphosphine (Sigma-Aldrich) wurde hinzugefügt (5 mM) und die Mischung für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung erneut auf 0,15 % DOC PBS eingestellt.

Um die Antigenformulierungen im FACS und mittels konfokalem Mikroskop zu detektieren, erfolgte die Konjugation des OVA Proteins 1 mg der Fluoreszenzfarbstoffe

(Firma Invitrogen, Karlsruhe) Alexa-Fluor-488 (OVA-488) und Alexa-Fluor-555 (OVA-555)-Succinimide-Ester für 3 Stunden bei Raumtemperatur. OVA-488 wird als grüne Fluoreszenz und OVA-555 als rote Fluoreszenz mittels spezieller Fluoreszenzfilter detektiert. Das gefärbte Protein wurde durch Ausschlusschromatographie nach Größe in PBS angereichert und bei einer optischen Dichte (OD) von 280 nm quantifiziert. Der berechnete Grad der Bindung (DOL; mol Farbstoff:mol Protein) beträgt:

Bezeichnung	DOL
OVA-488	2
pOVA-488	3,3
OVA-555	2,4
pOVA-555	4

Palmytiliertes (fluorochromgekoppeltes oder ungekoppeltes) OVA wurde entweder mit ISCOMATRIX™-Adjuvans (OVA/ISCOMATRIX™) oder als Immunkomplex mit polyklonalem Antikörperserum (OVA/IC) formuliert. Zur Herstellung von OVA/ISCOMATRIX™ wurde OVA von der Firma *CSL Limited, Parkville, Australien* mit ISCOMATRIX™ im Verhältnis 16:1 (ISCOMATRIX™:Ovalbumin) mittels ISCOPREP™ (enthält Saponin, Phospholipide und Cholesterin) gemischt. Der OVA-Immunkomplex wurde durch Mischung von 1 µg/ml OVA mit 20 µg/ml Anti-OVA Serum pro Bedingung in RPMI Vollmedium hergestellt.

2.2. Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC)

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %-igen CO₂-Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde entweder der Trypanblauausschlusstest im Durchlichtmikroskop oder der Propidium-Iodid-Test in der Durchflusszytomtrie durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus,

tote Zellen nehmen ihn auf. Ein Indikator für die Vitalität und Funktionalität von DC ist deren Fähigkeit auszureifen und Zytokine zu produzieren. Nach erfolgtem Stimulus (TLR4-Ligand LPS oder CD40-Ligand) wurden 48 Stunden später die Expression von Reifemarkern in Form von Oberflächenmolekülen (CD80, CD83, CD86, MHC-II-Moleküle) mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen.

2.2.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 1×10^5 - 5×10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Für die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Antigenformulierungen durch MoDC wurden die Zellen für eine Stunde mit den Formulierungen bei 36°C inkubiert (je nach Experiment mit vorhergehender Inkubation eines bestimmten Inhibitors der Aufnahmeprozesse), daraufhin zwei mal mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz der Zellen per FACS gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten können dann miteinander verglichen werden. Zur Bestimmung der Reifemarkerexpression von DC (CD80, CD86 und MHCII) wurden die Zellen 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) in einer 1/100 Verdünnung (z.B. auf 100 µl Zellsuspension jeweils 1 µl von CD80-FITC, CD86-PE und MHCII-APC) inkubiert und anschließend mit PBS zweimal gewaschen. Wenn nötig wurde Propidium Jodid zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star, San Carlos, Californien, USA) analysiert.

2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen

2.2.3.1 *Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels Adhärenzmethode*

10 Separationsröhrchen wurden mit jeweils 15 ml Biocoll Separationslösung befüllt und anschließend zentrifugiert (1000 g, 20 °C, 1 min). Die Lösung gelangt dabei unter die Separationsmembran. Gesunden Spendern wurden 200 ml Blut abgenommen, wobei pro 50 ml Blut 200 µl Heparin zugesetzt wurde. Im Folgenden wurde das Blut auf 10 Separationsröhrchen à 22,5 ml verteilt. Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 20 min) fand man in jedem Separationsröhrchen von oben nach unten die folgende Schichtung

vor: Plasma, Leukozyten-Ring, Biocoll, Erythrozyten. Es konnten circa 10 ml Plasma aus jedem Separationsröhrchen abpipettiert werden. Der Leukozyten-Ring aller zehn 50 ml Röhrchen wurde mit dem restlichen Plasma in drei Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt, mit NaCl 0.9 % auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (400 g, 20°C, 7 min). Anschließend folgte die Zusammenführung der drei Zellpellets in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml). Nach Auffüllen mit NaCl 0.9 % wurde erneut zentrifugiert (400 g, 20 °C, 7 min). Falls das Pellet zu viele Erythrozyten enthielt, wurde es in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese mononukleären Zellen wurden dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung gezählt, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.3.2 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert werden, wäscht man sie und suspendiert sie anschließend in MACS-Puffer. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten geklemmt. Somit werden alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die retinierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds mit 5 ml PBS eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Aufreinigung von CD14+ Monozyten, BDCA-4+ plasmazytoiden DC und CD19+ B-Zellen aus dem Vollblut nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec nach den entsprechenden Hersteller-Protokollen verwendet.

2.2.4 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Aufgereinigte Monozyten wurden in 24-Well Rundboden-Platten mit einer Zelldichte von 5×10^5 pro ml in RPMI-Vollmedium kultiviert. Für die Generierung von MoDC wurden die Monozyten 5 Tage mit IL-4 (500 IU/ml) und GM-CSF (1000IU/ml) im Inkubator ohne Mediumwechsel bei 37°C kultiviert(Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Nach 5 Tagen wurde die Vitalität mittels Durchflusszytometrie wie oben beschrieben ermittelt.

2.2.5 Antigenpräsentationsversuche

HLA-A2⁺ Spender wurden mittels FACS unter Verwendung eines Antikörpers gegen das MHC-I Molekül HLA-A2 identifiziert. Der Test wurde an 2ml Vollblut von gesunden Spendern durchgeführt. Nach Identifikation der Spender wurden nach oben aufgeführter Methode MoDC isoliert. 5×10^5 MoDC/ml von HLA-A2⁺ Spendern wurden mit Formulierungen des Tumorantigens NY-ESO-1 (NY-ESO-1/IC oder NY-ESO-1/ISCOMATRIX™) in einer Konzentration von 10 µg/ml für 2 Stunden bei 37° inkubiert, gewaschen und über Nacht kultiviert. Als Positivkontrolle dienen mit dem HLA-A2-restringiertem Peptid NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQC, Auspep, Parkville, Australia) gepulste MoDC. Die mit Antigen beladenen MoDC wurden mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinien kokultiviert. Die IFN-γ-Produktion CD8⁺ T-Zellen wurde entweder mit intrazellulärem Zytokinnachweis oder mittels Elispot nachgewiesen.

2.2.5.1 Nachweis der intrazellulären Interferon-γ-Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten mittels FACS

Für den intrazellulären Zytokinnachweis wurden 1×10^5 DC und $1-2 \times 10^4$ T-Zellen für vier Stunden in 200 ml RPMI / 10 % FCS in 96 Rundbodenplatten in der Gegenwart von 10 µg/ml Brefeldin A kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Antikörper gegen CD8 für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und mit Anti-IFN-γ Antikörper in 0,25 % Saponinpuffer gefärbt. Im FACS konnte dann der prozentuale Anteil der IFN-γ-sezernierenden CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden.

2.2.5.2 Nachweis der Interferon- γ -Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten mittels ELISPOT-Assay

Für ELISPOT-Versuche wurden ELISPOT-Platten (Millipore multiscreen, MAHA S45, Bedford, MA) mit Antikörpern gegen IFN- γ (Konzentration: 5 μ g/ml, CSL Limited) übernacht beschichtet und mit PBS / 10 % FCS geblockt. DC wurden mit CD8⁺ T-Lymphozyten für 16-18 Stunden kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen entfernt und die ELISPOT-Platten mit Wasser gewaschen und mit Antikörpern gegen IFN- γ inkubiert (polyklonaler anti-IFN- γ , rabbit Antikörper, CSL Limited). Nach einem Waschschiitt mit PBS / 0.05 % Tween 20 wurde AEC-Substrat (Sigma) zugegeben. Die Entwicklung wurde nach 6-8 Minuten gestoppt. Anschließend wurden die einzelnen Punkte, die für eine IFN- γ produzierende T-Zelle stehen, maschinell ausgezählt.

2.3. Konfokale Mikroskopie

2.3.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Bei der konventionellen Lichtmikroskopie entsteht das Bild eines Objekts nicht nur durch Licht aus der Brennebene, sondern auch durch unfokussiertes Licht aus anderen Ebenen des Objekts. Bei der Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht kommt es zu Unschärfen und unerwünschten Überlagerungseffekten. Marvin Minsky beschrieb 1955 zum ersten Mal das Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Hierbei wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Diese Ausblendung wird durch eine Lochblende gewährleistet, die sich am Ende des optischen Systems befindet. Das fokussierte Licht, das die Information eines einzelnen Punktes aus der Brennebene trägt, passiert die Lochblende und wird durch einen *Photomultiplier* (PMT) aufgefangen (Abb. 2). In der konfokalen Mikroskopie kommt Laserlicht zur Anwendung, da ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussiert. Um ein vollständiges zweidimensionales Bild zu erhalten, muss der Laser das Objekt in x- und y-Achse Punkt für Punkt abrastern. Die gesammelten Bildpunkte werden von einem Rechner zu einem Bild zusammengesetzt. Um ein dreidimensionales Abbild vom Objekt zu erhalten, kann es in Richtung der z-Achse bewegt werden.

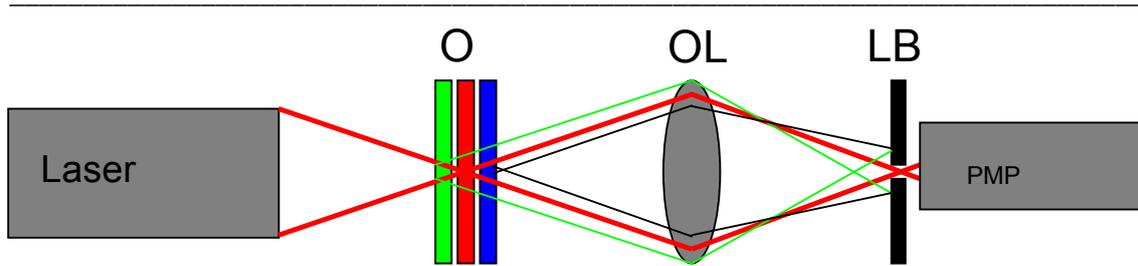


Abb. 2: Funktionsprinzip der konfokalen Lasermikroskopie

Ein Laser liefert hochenergetisches Licht einer Wellenlänge, welches auf das Objekt (O) trifft. Licht aus der Brennebene und anderen Bereichen des Objekts wird durch die Sammellinse (SL) in Richtung Photomultiplier (PMP) gelenkt. Die Größe der Lochblende (LB) bewirkt, dass nur fokussiertes Licht aus der Brennebene des Objekts (rot dargestellt) vom PMP detektiert wird. Unfokussiertes Licht (grüne und blaue Strahlen) wird ausgeblendet.

2.3.2 Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper und Modellantigene

Für die konfokale Mikroskopie wurden mit Alexa-Farbstoffen direkt konjugierte Modellantigene (OVA) verwendet. Um Zellkompartimente anzufärben, wurden organellespezifische Primärantikörper verwendet, die anschließend mit einem Sekundärantikörper angefärbt wurden. Alexa-Farbstoffe senden nach Aktivierung mit Laserlicht einer definierten Wellenlänge wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge (488 nm oder 555 nm) aus. Diese Wellenlängen werden vom PhotoMultiplier detektiert. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Proteine oder Oberflächenmoleküle.

2.3.3 Digitale Bildbearbeitung

Mit Hilfe des Programms *Zeiss Image Examiner* konnten Fluoreszenzintensitätsprofile der mikroskopischen Bilder erstellt und diese statistisch ausgewertet werden. Die Bilder wurden teilweise mit Adobe Photoshop (Adobe Systems GmbH, München) bearbeitet. Informationen wurden weder hinzugefügt, noch entfernt. Die rechnerische Auswertung sowie graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

2.3.4 Erstellung von Fluoreszenzintensitätsprofilen

Die Fluoreszenzintensität kann für eine definierte Stelle im Bild berechnet werden. Dieser Stelle wird ein numerischer Wert zugewiesen, der linear die relative Fluoreszenzintensität wiedergibt (Abb. 3A). Werden die Fluoreszenzintensitäten mehrerer Punkte entlang einer Linie berechnet, entsteht ein Fluoreszenzprofil (Abb. 3B). Es können auch verschiedene Farbkanäle entlang einer Linie verglichen werden (zum Beispiel grün und rot). Dadurch können Rückschlüsse auf die Lokalisation der Fluoreszenz-markierten Strukturen zueinander gezogen werden (siehe Ergebnisse 3.2. „Abhängigkeit der Translokation von der Antigenformulierung“). Fluoreszenzintensitätsprofile wurden mit dem Programm *Image J* (National Institute of Health, NIH) erstellt.

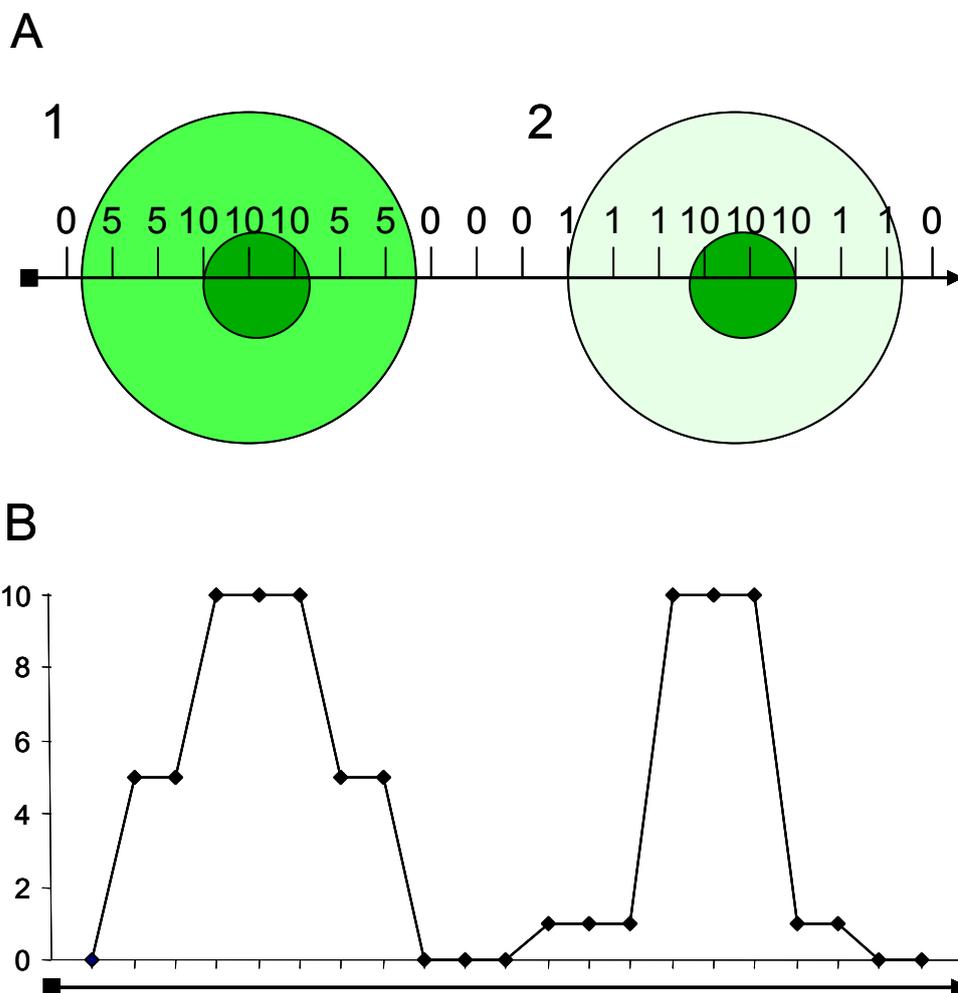


Abb. 3: Fluoreszenzintensitätsprofil

Schematische Darstellung von verschiedenen Intensitäten der Farbe Grün in 2 Zellen. Abb.3A: In Zelle 1 und Zelle 2 ist eine Zellorganelle abgebildet, die starke Fluoreszenz ausstrahlt (Stärke (S) 10). In Zelle 1 ist ein Fluoreszenzmarkiertes Protein aus der Organelle in das Zytosol transloziert. Das Zytosol der Zelle 1 ist daher diffus grün (S 5). In Zelle 2 ist das nicht der Fall, im Zytosol ist lediglich unspezifischer Fluoreszenzhintergrund zu detektieren (S 1). Abb.3B: Die Farbintensität entlang der

dargestellten Linie ist numerisch zugeordnet und rechts durch einen Graphen dargestellt.

2.3.5 Statistische Auswertung der Translokation von Antigen in das Zytosol

Insgesamt wurden pro Bedingung in den Translokationsexperimenten zwischen 300 und 1200 Zellen ausgezählt. Pro Gesichtsfeld im Mikroskop konnten zwischen 50 und 250 Zellen hinsichtlich der Translokationseffektivität beurteilt werden. Die Translokation des fluoreszenzmarkierten OVA/ISCOMATRIX™ in das Zytosol der Zellen wurde durch mehrere Bedingungen mikroskopisch bestätigt: 1. Die diffuse Verteilung des fluoreszenzmarkierten OVA/ISCOMATRIX™ im Zytosol der Zellen. Mit Hilfe von Fluoreszenzintensitätsdiagrammen konnte die Prozentzahl mit zytosolischem Verteilungsmuster errechnet werden. Unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurde gemessen anhand von Zellen, die nicht mit OVA-Formulierungen inkubiert wurden. Wenn die zytosolische Fluoreszenzintensität bei MoDC, die mit einer OVA/ISCOMATRIX™-Konzentration von 0,4 µg/ml inkubiert wurden, mindestens 5 mal so hoch war wie die unspezifische Hintergrundfluoreszenz, konnte eine zytosolische Verteilung der Antigenformulierung angenommen werden. 2. Sichtbare Zellmembranen, die durch die zytosolische Verteilung der Fluoreszenz klar abgegrenzt werden können. 3. Zellkerne, die sich normalerweise als dunkler Fleck innerhalb der Zelle darstellen, sind mit Fluoreszenz ausgefüllt. Moleküle mit einer Größe unter 40 KD können die Kernmembran passieren. Das OVA-Protein ist 45 KDa groß. Durch saure Hydrolasen in lysosomalen Kompartimenten wird es gespalten und erreicht eine Größe unter 40 KDa. Nach erfolgter Translokation kann es durch die Kernporen gelangen und den Kern grün färben.

2.3.6 Herstellung des Einbettmediums Mowiol

Für die Einbettung von organischen Präparaten für die konfokale Mikroskopie eignet sich zähflüssige Mowiollösung, die bei 4°C erhärtet und das Objekt für einen Monat fixiert. Zur Herstellung wurden 2,4 g Mowiol 40-88, 6 g Glycerin und 6 ml destilliertes Wasser in einem 50 ml Falcon für zwei Stunden bei RT geschüttelt. Anschließend gibt man 12 ml 0,2 M TRIS - Lösung (pH 8,5) hinzu schüttelt nochmal circa eine Stunde bei 60°C. Die Suspension wird 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, um die ungelösten Bestandteile von den gelösten zu trennen. Der Überstand wird aliquotiert und ist bei -20 °C für ein Jahr haltbar.

2.3.7 Präparatherstellung für die konfokale Lasermikroskopie

2.3.7.1 Aufnahme von Antigenformulierungen

Deckgläser (Durchmesser 10 mm, Stärke 1, Firma Marienfeld) wurden bei 4 °C über Nacht mit Poly-L-Lysin (100 µg/ml) beschichtet. DC oder andere Leukozytenpopulationen wurden auf den Deckgläsern in einer 6-Well Platte eine Stunde adhärirt. Die Leukozytenpopulationen wurden in einem Waschschrift dreimal mit 5 ml PBS pro Well gewaschen und mit den Antigenformulierungen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit zwischen 10 und 60 min je nach Experiment werden die Zellen für 20 Minuten mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Die fixierten DC wurden zur Verringerung der Autofluoreszenz zehn Minuten mit Ammoniumchloridlösung (50 mM) versetzt. Die Deckgläser wurden mit der Zell-beschichteten Seite auf einen kleinen Mowioltropfen auf einen Objektträger gebettet und über Nacht bei 4 °C ausgehärtet. Die Präparate konnten dann am nächsten Tag mikroskopiert werden.

2.3.7.2 Kolokalisation von Antigenformulierungen mit organellspezifischen Markern

Zur Lokalisation intrazellulärer Prozessierungswege der Antigenformulierungen wurden organellspezifische Marker eingesetzt. Endosomale Kompartimente wurden mit dem Antikörper gegen das *Early Endosome Antigen-1* (EEA-1) nachgewiesen. Mit einem Antikörper gegen das *Lysosome associated Membrane Protein-1* (LAMP-1) ließen sich lysosomale Zellorganellen nachweisen. Das Endoplasmatische Retikulum ließ sich mit einem Antikörper gegen das membranständige Calreticulin anfärben. Diese Antikörper wurden als Primärantikörper verwendet und sind in folgenden Konzentrationen eingesetzt worden:

Bezeichnung	Verdünnung	Konzentration
Anti-EEA-1	1:500	0,1 µg/ml
Anti-CD107a / Anti-LAMP-1	1:1000	1 µg/ml
Anti-Calreticulin	1:300	1 µg/ml

DC wurden wie in 2.3.7.1 ohne Einbettung in Mowiol präpariert und 10 min mit 10 % PBS-FCS inkubiert. PBS-FCS blockt Proteinbindungsstellen der Zellen und verhindert so unspezifische Antikörperbindungen. Daraufhin wurden die DC entweder 20 min mit 0,1 %-iger Saponinlösung (für EEA-1, LAMP-1) oder eine min mit 0,1 %-iger Triton X Lösung (für Calreticulin) permeabilisiert (anschließender Waschschrift). Die einzelnen Primärantikörper wurden dann für 30 min in 10 % PBS-FCS auf die Zellen gegeben. Im nächsten Schritt wurden mit Alexa555 konjugierte Sekundärantikörper (jeweils spezifisch gegen den Fc-Teil der primären organellspezifischen Maus- oder Ratteantikörper) eingesetzt:

2.3.8 Mikroskopie unfixierter, vitaler Leukozytensubpopulationen

Die verschiedenen *in vitro* aufgereinigten Leukozytenpopulationen wurden auf runden, 15 mm großen, mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern in 6-Well Platten eine Stunde adhärert. Die Zellen wurden mit Antigenformulierungen bei 37°C inkubiert und auf einen für die Lebendmikroskopie entworfenen Aluminiumobjektträger gegeben (Abb. 4). Die Temperatur des Aluminiumobjektträgers wurde mit Hilfe eines Wärmeaggregates konstant auf 37° C gehalten.

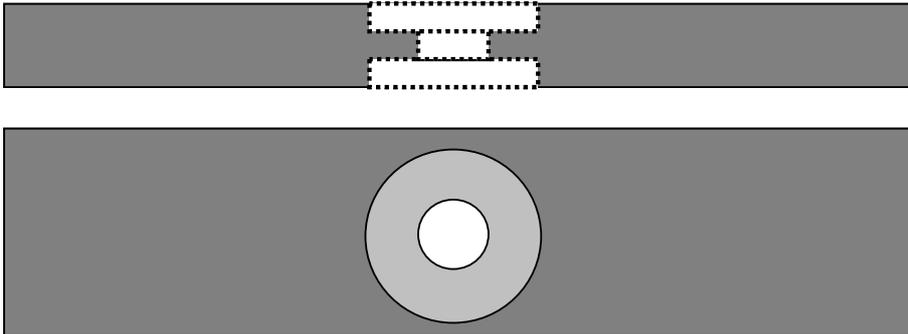


Abb.4 Aluminiumobjektträger für die Mikroskopie lebender Zellen (Seitenansicht und Aufsicht)

Der Träger hat auf jeder Seite eine Vertiefung, in die jeweils ein 15mm großes, rundes Deckglas hinein gegeben werden kann. Zwischen beiden Vertiefungen besteht zusätzlich ein Loch und somit ein Raum zwischen den Deckgläsern, in den Pufferlösung in Form von Medium gegeben werden kann.

2.4. Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung der Werte ist jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt. Die rechnerische Auswertung sowie graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Aufnahme der Antigenformulierungen durch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

Die Antigenaufnahme von löslichem Protein, Immunkomplexen und ISCOMATRIX™-Adjuvans-formuliertem Protein durch MoDC wurde mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie anhand von Fluorochrom-markiertem OVA-Protein untersucht. Nach 10-minütiger bzw. einstündiger Pulsung von humanen MoDC mit 1 µg/ml OVA, OVA-Immunkomplex (OVA/IC) bzw. OVA/ISCOMATRIX™ wurden die Zellen zweimal gewaschen und die Aufnahme der Formulierungen direkt im Anschluss oder nach weiterer Inkubation im Brutschrank (2 h, 4 h bzw. 6 h) durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 5). Lösliches OVA-Protein wurde am effizientesten von den MoDC aufgenommen. Die Formulierungen OVA/IC und OVA/ISCOMATRIX™ wurden in etwa gleichwertig aufgenommen. Da die Fluoreszenzintensität im Wesentlichen in den folgenden sechs Stunden nicht abnahm, konnte eine relevante Farbstoffausbleichung (*photobleaching*) ausgeschlossen werden.

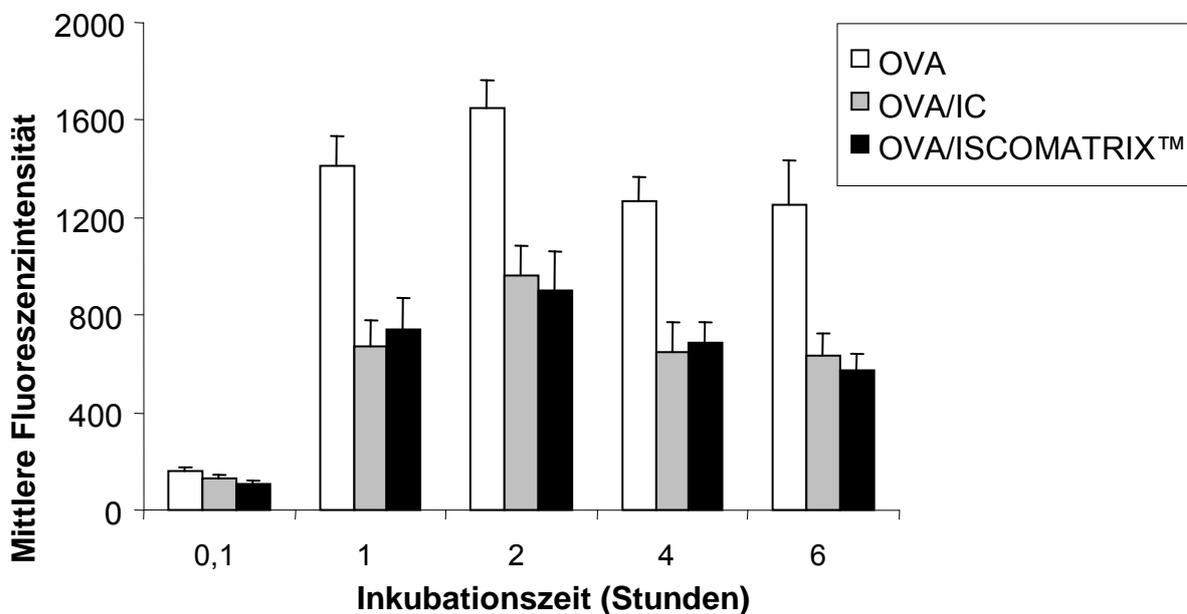


Abb. 5: Intrazelluläre Aufnahme der Antigenformulierungen gemessen mittels der Durchflusszytometrie

Dargestellt ist die Aufnahme der Antigenformulierungen OVA, OVA/IC bzw. OVA/ISCOMATRIX™ durch MoDC. MoDC wurden mit den drei Antigenformulierungen in der Konzentration 1 µg/ml für eine Stunde inkubiert und anschließend gewaschen (n=4-8). Lösliches OVA wurde am effizientesten von MoDC aufgenommen. Die

Formulierungen OVA/IC und OVA/ISCOMATRIX™ wurden in etwa gleichwertig aufgenommen.

Im nächsten Schritt wurde der Aufnahmemechanismus genauer untersucht. Die MoDC wurden vor der Antigenbeladung 30 min lang mit verschiedenen Konzentrationen der spezifischen Endozytosehemmstoffe Wortmannin bzw. Phenylarsine-Oxid inkubiert. Wortmannin hemmt die Phosphatidyl-Inositose-3-Kinase (Bellette et al., 2003) und Phenylarsine-Oxid die rezeptorvermittelte Endozytose (Kato et al., 1992). Daraufhin folgte die Pulsung mit 1 µg/ml der jeweiligen Antigenformulierungen. Die Inhibitoren reduzierten die Aufnahme aller Antigenformulierungen dosisunabhängig in gleicher Weise. Bei der Verwendung von 5 µM Wortmannin kam es zur Reduktion der Aufnahme von 100 % auf 7 bis 11 %. 5 µM Phenylarsine-Oxid senkte die Aufnahme von 100 % auf 1,5 bis 4 % (siehe Abb. 6).

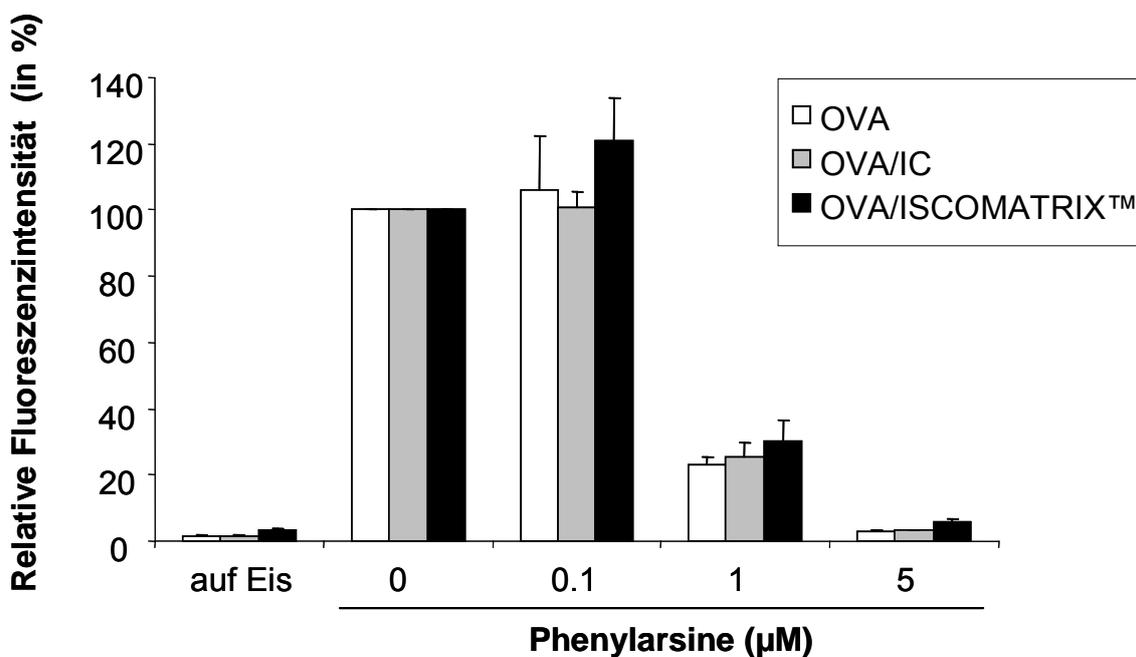
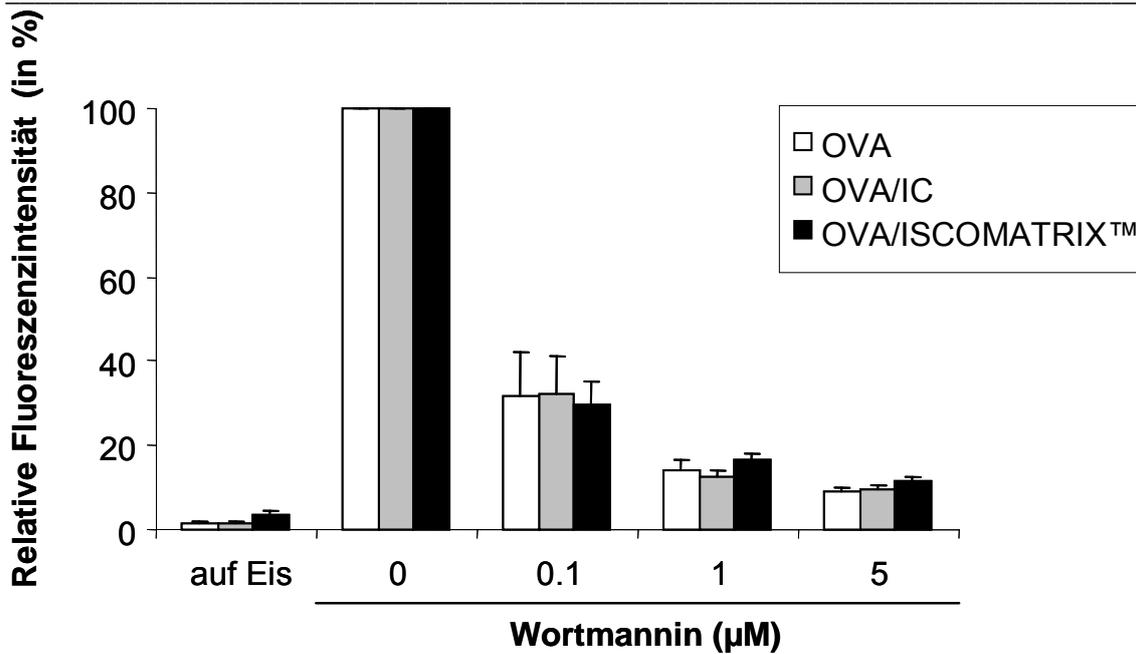
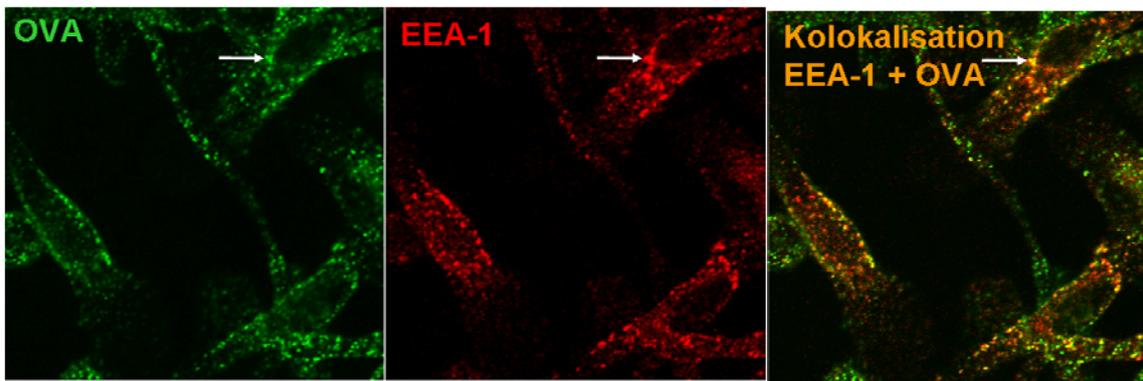


Abb. 6: Inhibition der Antigenaufnahme durch Wortmannin und Phenylarsine-Oxid

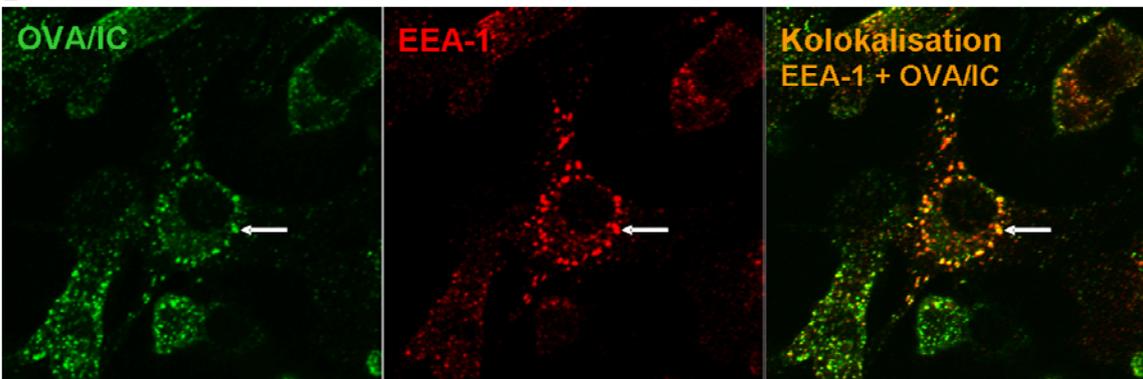
Dargestellt ist die Aufnahme der Antigenformulierungen OVA, OVA/IC bzw. OVA/ISCOMATRIX™. Die MoDC wurden vor der Antigenbeladung 30 min lang mit verschiedenen Konzentrationen der spezifischen Endozytosehemmstoffe Wortmannin oder Phenylarsine-Oxid inkubiert. Gezeigt ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität vom Ausgangswert in Abwesenheit von Inhibitoren, der als 100 % definiert wurde. Die Mittelwerte und der SEM aus 4 Experimenten sind dargestellt.

Die intrazelluläre Kompartimentierung der aufgenommenen Antigenformulierungen wurde mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert. Dazu wurden MoDC für 10 min mit der jeweiligen Antigenformulierung inkubiert. Anschließend wurden endosomale (EEA-1) und lysosomale (LAMP-1) Organellen mit spezifischen Antikörpern angefärbt (siehe Abb.7). Innerhalb von 10 min kolokalisieren alle drei OVA-Formulierungen mit EEA-1 (rot), einem Marker für frühe Endosomen.

A



B



C

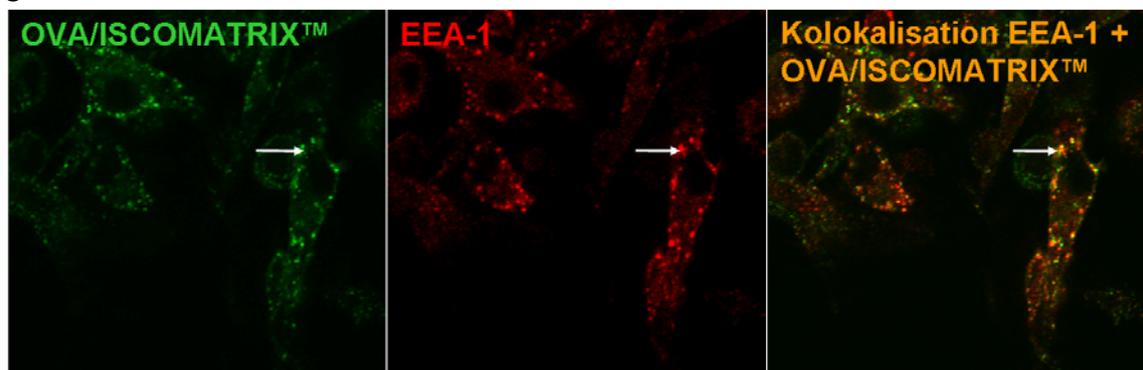


Abb. 7: Aufnahme der Antigenformulierungen visualisiert mittels konfokaler Lasermikroskopie sowie Kolokalisation mit endosomalen, lysosomalen und ER-Markern

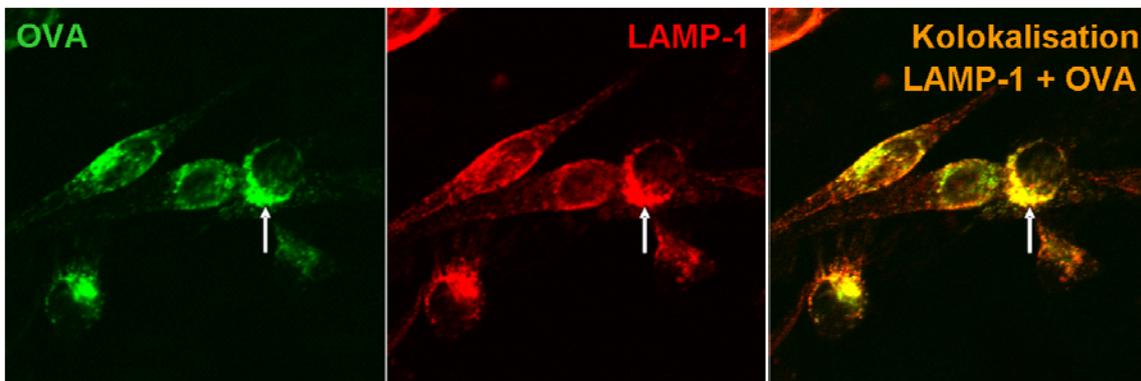
Intrazelluläre Verteilung der drei OVA-Formulierungen – lösliches Protein (OVA), Immunkomplex (OVA/IC) und OVA/ISCOMATRIX™ (grün): analysiert mit konfokaler Mikroskopie. Innerhalb von 10 min kolokalisieren die OVA-Formulierungen mit EEA-1 (rot), einem Marker für frühe Endosomen (Pfeile).

3.2 Intrazelluläre Kompartimentierung der endozytierten Antigenformulierungen

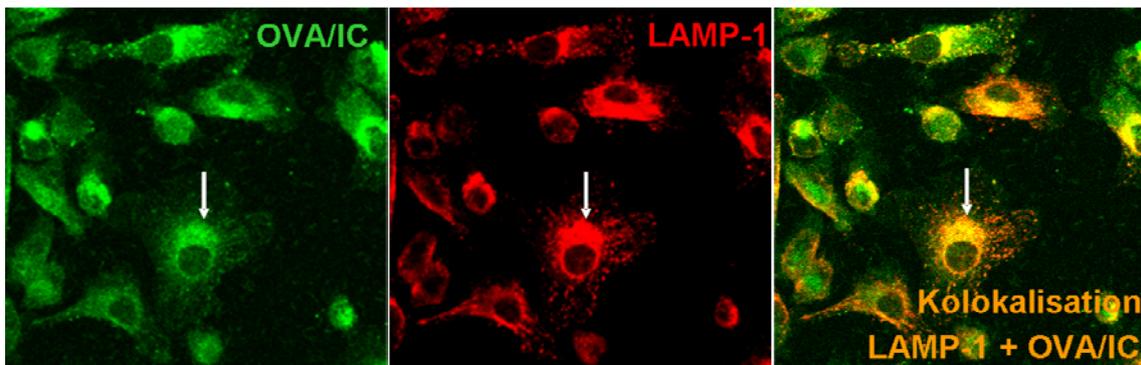
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Antigenformulierungen in Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Nach Pulsung von humanen MoDC mit OVA, OVA/IC bzw. OVA/ISCOMATRIX™ wurde der zeitliche Verlauf der intrazellulären Verteilung der verschiedenen Proteinformulierungen mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Antigenformulierungen wurden initial in EEA-1⁺ endosomale Kompartimente aufgenommen (siehe Abb. 7). Nach 1 bis 2 Stunden reiften diese Kompartimente zu Lysosomen aus, welche sich mit Antikörpern gegen LAMP-1 anfärbten (siehe Abb. 8).

A



B



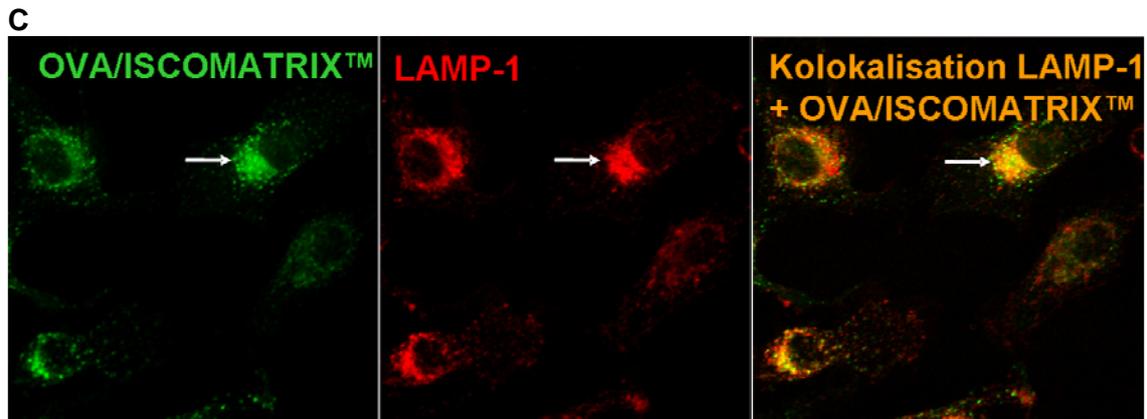


Abb. 8: Intrazelluläre Verteilung der Antigenformulierungen in MoDC nach 2 h. Nach 1h Pulsung mit Antigenformulierungen wurden die MoDC eine weitere Stunde kultiviert und anschließend konfokal mikroskopiert. Nach 2 h erkennt man die Kolokalisation aller Antigenformulierungen (grün, Abb. A, B, C) mit LAMP-1⁺ lysosomalen Kompartimenten (rot, Abb. A, B, C). Repräsentative Ergebnisse aus mindestens 10 Experimenten sind dargestellt.

3.2.2 Translokation von ISCOMATRIX™-formuliertem OVA in das Zytosol von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Fixierte MoDC, die mit OVA/ISCOMATRIX™ gepulst wurden, zeigten nach ca. 4 bis 6 h neben einer Anfärbung lysosomaler Kompartimente eine diffuse Färbung des Zytosols. Die Zellmembranen waren in deren Umrissen erkennbar und die Zellkerne waren ebenfalls mit grüner Fluoreszenz ausgefüllt (siehe Abb. 9). Dies weist auf eine zytoplasmatische Lokalisation und damit auf eine effiziente Translokation des mit ISCOMATRIX™ formulierten OVA in das Zytosol hin. Diese Translokation fand sich nicht bei löslichem Protein oder Immunkomplexen. Hier lagen die Antigenformulierungen weiterhin in lysosomalen Kompartimenten vor.

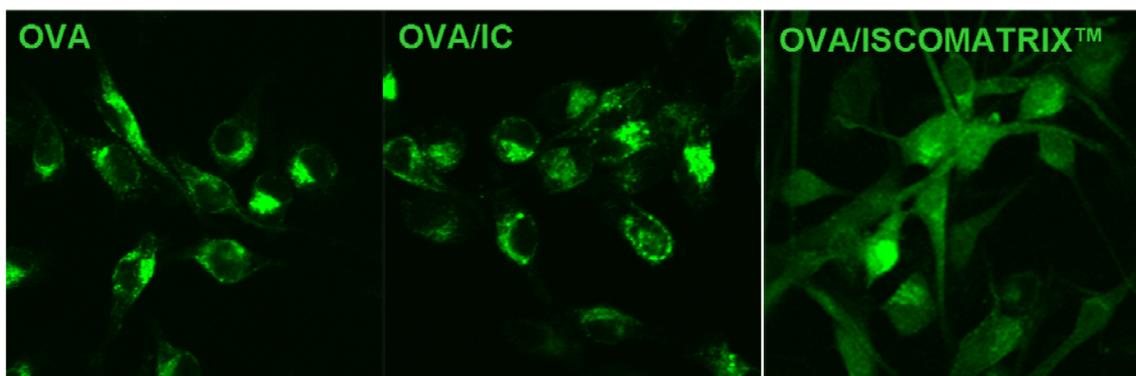


Abb. 9: Selektive Translokation von OVA/ISCOMATRIX™ in das Zytosol von MoDC

Nach 4 bis 6 h zeigen MoDC, die mit OVA/ISCOMATRIX™ gepulst wurden, ein diffuses intrazelluläres Färbemuster, was für die Translokation des Antigens in das Zytosol spricht. Diese fand sich nicht bei löslichem Protein oder Immunkomplexen. Repräsentative Abbildungen aus zehn Experimenten sind dargestellt.

3.2.3 Konfokale Mikroskopie von vitalen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Um eine bessere Vorstellung von den Prozessen der zytosolischen Translokation *in vivo* zu bekommen, wurden vitale, unfixierte MoDC mikroskopiert. Mit OVA/ISCOMATRIX™ gepulste MoDC zeigten bereits nach 15 min eine diffuse intrazelluläre Färbung, die mit der Zeit zunahm (siehe Abb. 10, Mikroskopie nach 1 h). Für OVA und OVA/IC, war dies bei bis zu 4-fach höherer Konzentration auch nach 6 h nicht auszumachen (nicht gezeigt). Der Vorgang der Translokation von mit ISCOMATRIX™ formuliertem Antigen ist konzentrations- und zeitabhängig (siehe Abb. 11). Je höher die Konzentration der ISCOMATRIX™-Formulierung, desto mehr Zellen translozierten das Antigen. Zudem war auch bei längerer Inkubationszeit eine höhere Translokationsrate zu erfassen. Nach 1 h zeigten 90 % der MoDC, die mit 1 µg/ml Alexa-488 markiertem OVA/ISCOMATRIX™ gepulst wurden, ein diffuses intrazelluläres Muster.

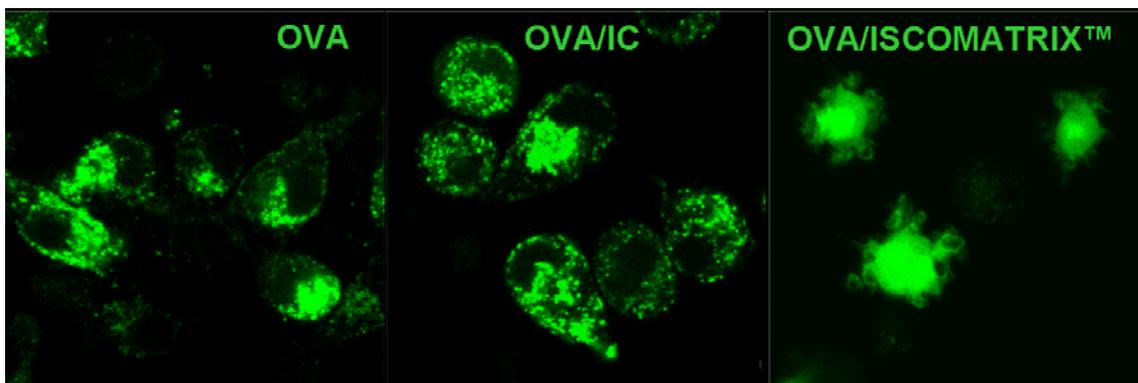


Abb. 10: Zytosolische Translokation von löslichem OVA, OVA/IC bzw. OVA/ISCOMATRIX™ in lebenden MoDC

MoDC wurden mit 1 µg/ml der jeweiligen Antigenformulierungen (OVA-Alexa-488) 1 h inkubiert. Lediglich mit OVA/ISCOMATRIX™ beladene MoDC zeigten ein diffuses intrazelluläres Verteilungsmuster. Bei den anderen Antigenformulierungen befand sich das Antigen durchwegs kompartimentiert in intrazellulären lysosomalen Organellen. Repräsentative Ergebnisse aus mindestens fünf Experimenten sind dargestellt.

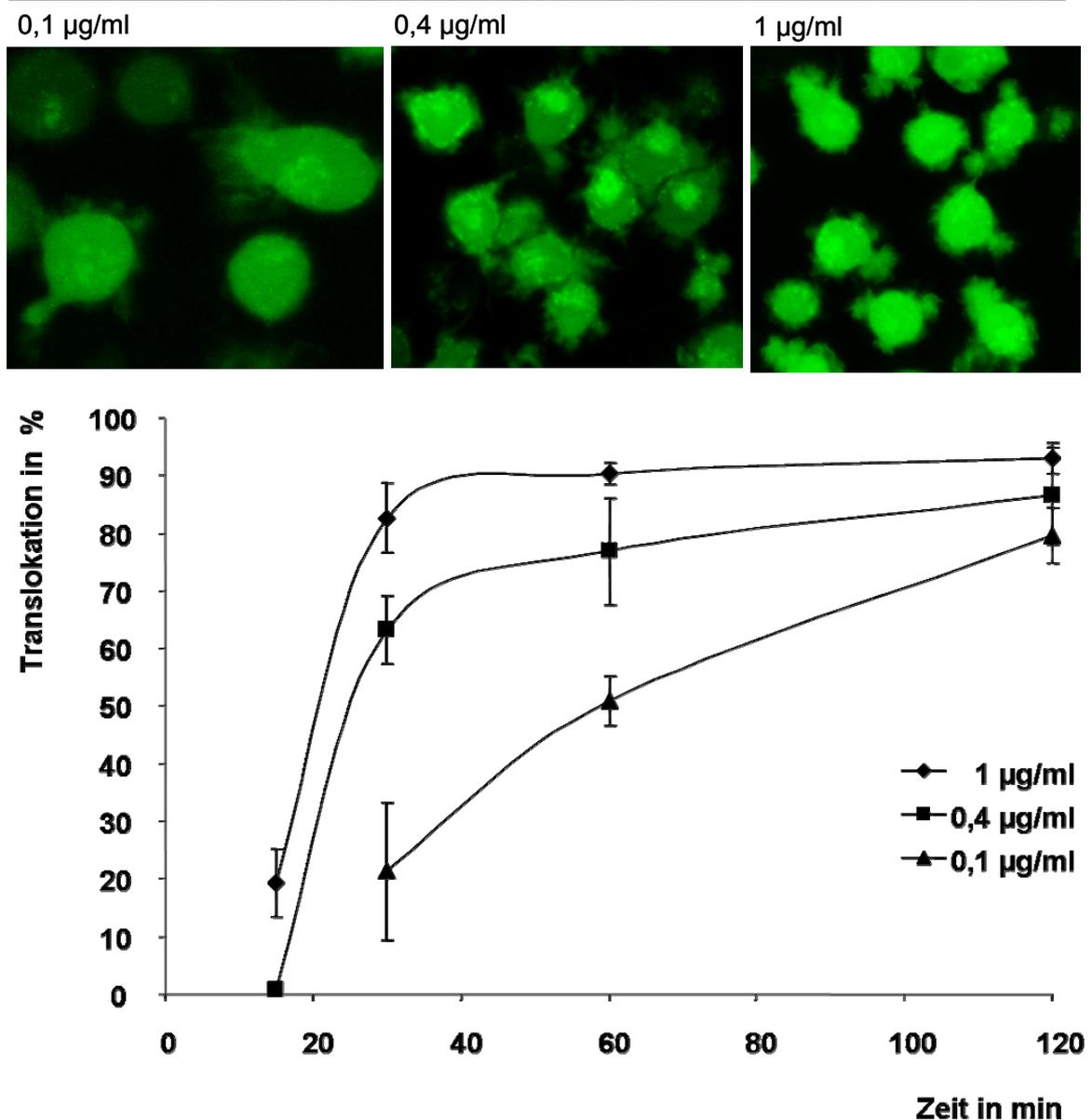


Abb. 11: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der zytosolischen Translokation

Vitale MoDC wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen von OVA/ISCOMATRIX™ bis zu einer Stunde gepulst, gewaschen und für den 2 h Wert eine weitere Stunde kultiviert. Die Mittelwerte von vier Experimenten inklusive Standardabweichung sind dargestellt.

In der experimentellen Tumorthherapie mit DC werden in der Regel *in vitro* generierte MoDC eingesetzt. Diese werden nach Standardprotokoll aus Monozyten generiert, die 5 bis 7 Tage lang mit IL-4 und GM-CSF kultiviert werden. Es ist unklar, wann innerhalb dieser 7 Tage die aus Monozyten abgeleiteten Zellen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation erlangen. Die Translokationsfähigkeit von Antigen in das Zytosol bestimmt möglicherweise die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation. Um dies zu untersuchen wurden Monozyten isoliert und mit IL-4 und GM-CSF inkubiert. Von Tag 0 bis Tag 7 wurden diese sich zu MoDC entwickelnden Zellen auf die Fähigkeit zur Translokation von mit ISCOMATRIX™ formuliertem OVA konfokal untersucht (siehe Abb.12). Frische

Monozyten zeigten kein zytosolisches Verteilungsmuster. Bereits 25 % der 2 Tage alten MoDC waren in der Lage, OVA/ISCOMATRIX™ in das Zytosol zu translozieren. Diese Fähigkeit erlangten in etwa 80 % der Zellen am sechsten Entwicklungstag. Interessanterweise waren Monozyten, die lediglich mit GM-CSF differenziert wurden, nicht in der Lage, OVA/ISCOMATRIX™ in das Zytosol zu translozieren (siehe Abb. 12).

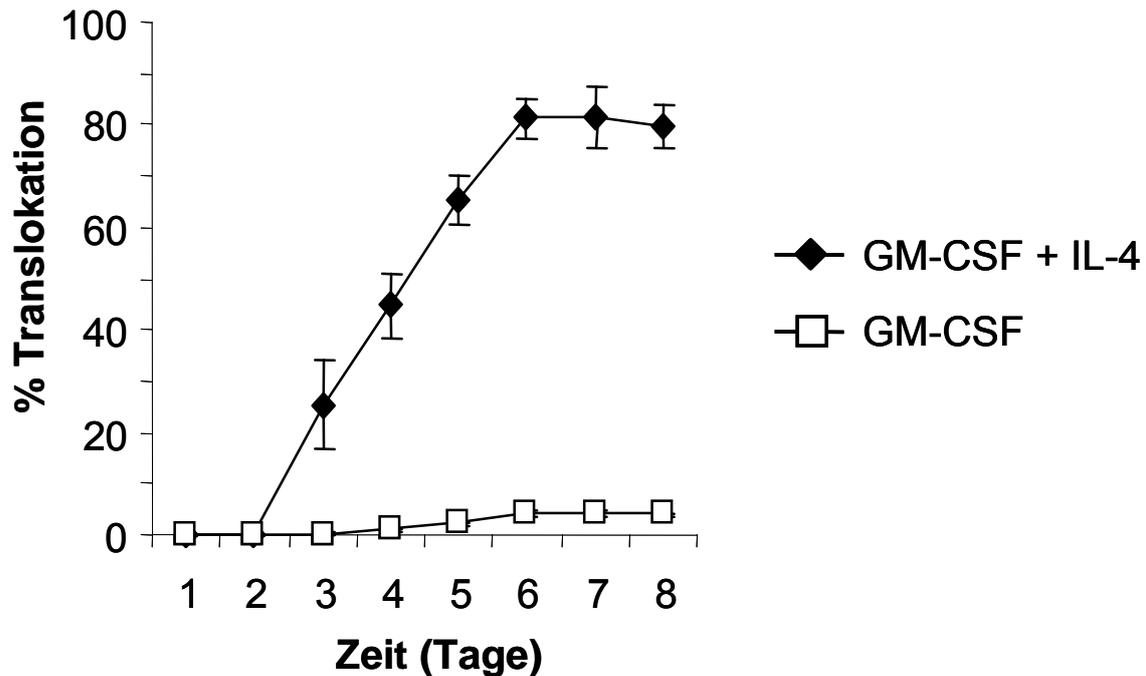


Abb. 12: Die Translokationseffektivität ist abhängig vom Entwicklungsgrad der MoDC

Monozyten, die frisch isoliert wurden (Tag 1), zeigten kein diffuses, intrazelluläres Verteilungsmuster nach Pulsung mit OVA/ISCOMATRIX™. Ab Tag 3 nahm die Translokationsfähigkeit der mit GM-CSF und IL-4 inkubierten MoDC stetig zu. Nach 5 bis 6 Tagen erreichten MoDC ihre maximale Translokationseffizienz von ca. 80 %. Monozyten, die nur mit GM-CSF inkubiert wurden, translozieren das Antigen nur zu einem geringen Prozentsatz. Die Mittelwerte von 4 Experimenten mit Standardabweichung sind gezeigt.

Um festzustellen, ob die Translokationsfähigkeit mit der Fähigkeit zur Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen korreliert (Kreuzpräsentation), wurden analog zum vorherigen Versuch Monozyten mit GM-CSF bzw. GM-CSF und IL-4 inkubiert, mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ gepulst und mit NY-ESO-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels Nachweis von IFN- γ im Zellüberstand mit ELISPOT nachgewiesen. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit NY-ESO-1-Peptid (HLA-A2-restringiert) exogen gepulst wurden. Diese Versuche ergaben, dass lediglich die Zellen, die mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, zur

Kreuzpräsentation befähigt waren. Somit korreliert die Fähigkeit zur Antigenstranslokation mit effizienter Kreuzpräsentation.

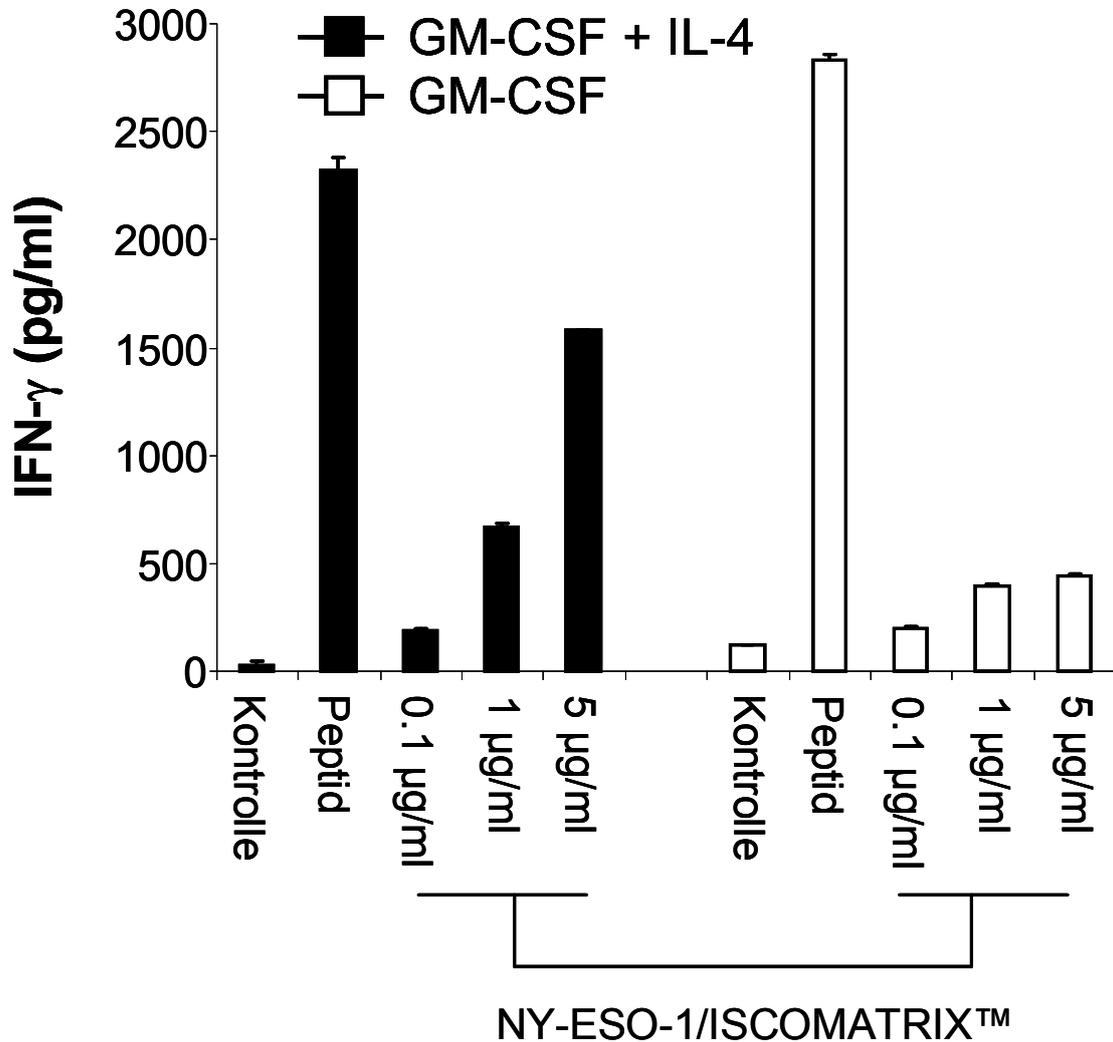


Abb. 13 Korrelation der Translokationsfähigkeit mit der Fähigkeit zur Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Kreuzpräsentation)

Monozyten wurden mit GM-CSF bzw. GM-CSF und IL-4 inkubiert und nach 7 Tagen mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ (Konzentrationen: 0,1, 1,0 and 5,0 µg/ml) oder Peptid gepulst und mit HLA-A2 restringierten NY-ESO-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels Nachweis von IFN-γ im Überstand mittels ELISA nachgewiesen. Lediglich Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, können CD8⁺ T-Zellen effizient aktivieren und führen zur Ausschüttung von IFN-γ. Darstellung von Mittelwerten und SEM aus 3 Experimenten.

3.2.4 Abhängigkeit der zytosolischen Translokation von der lysosomalen Ausreifung

Um den Einfluss der lysosomalen Reifung auf die zytosolische Translokation von OVA/ISCOMATRIX™ zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren verwendet. Chloroquin, Concanamycin B und Bafilomycin A1 hemmen die Ausreifung von

Lysosomen, indem sie spezifisch saure Hydrolasen an ihrer Wirkung der Substratspaltung hindern (Palliser et al., 2005). MoDC wurden mit verschiedenen Konzentrationen dieser Inhibitoren 30 min inkubiert, bevor sie 1 h mit 1 µg/ml OVA/ISCOMATRIX™ gepulst wurden. Die Translokationseffizienz wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 14 bis 16).

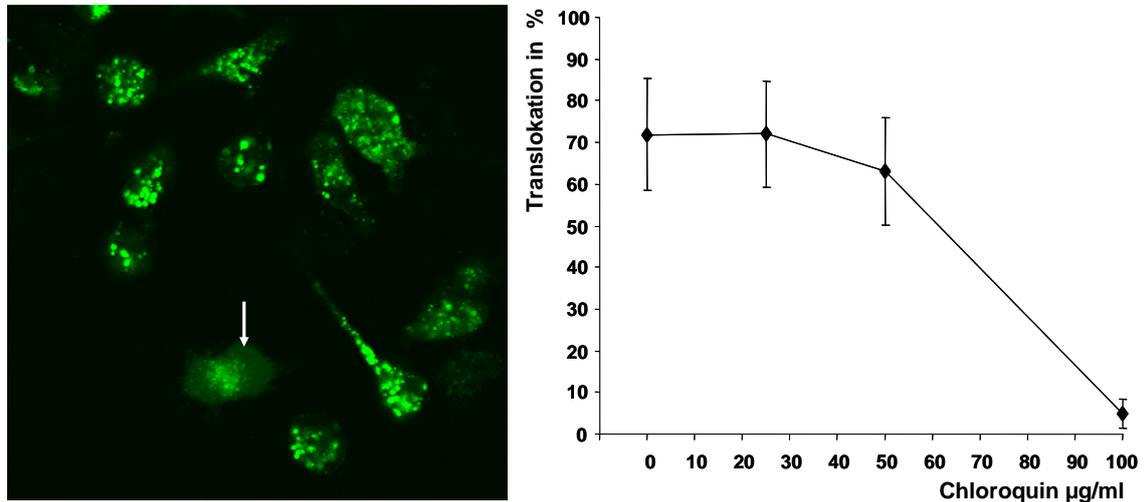


Abb. 14: Hemmung der Translokation durch Chloroquin

MoDC, die mit Chloroquin OVA/ISCOMATRIX™ inkubiert wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Frequenz von Zellen mit zytosolischer Fluoreszenz. Endozytiertes Antigen verweilte weiterhin in endosomalen Organellen. Die linke Graphik zeigt eine repräsentative konfokale Aufnahme von MoDC, die in Anwesenheit von 100 µM Chloroquin kultiviert wurden (mit Pfeil markierte MoDC mit zytosolischem Verteilungsmuster). Die rechte Graphik zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

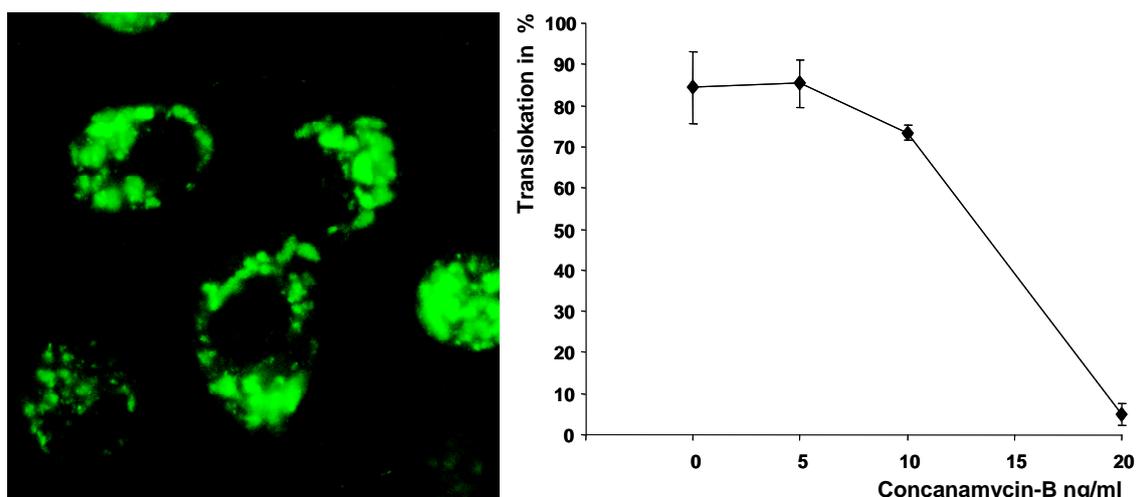


Abb. 15: Hemmung der Translokation durch Concanamycin B

MoDC, die mit Concanamycin B inkubiert wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Frequenz von Zellen mit zytosolischer Fluoreszenz. Die linke Graphik zeigt eine repräsentative konfokale Aufnahme von MoDC, die in Anwesenheit von 20 nM

Concanamycin B kultiviert wurden. Die rechte Graphik zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

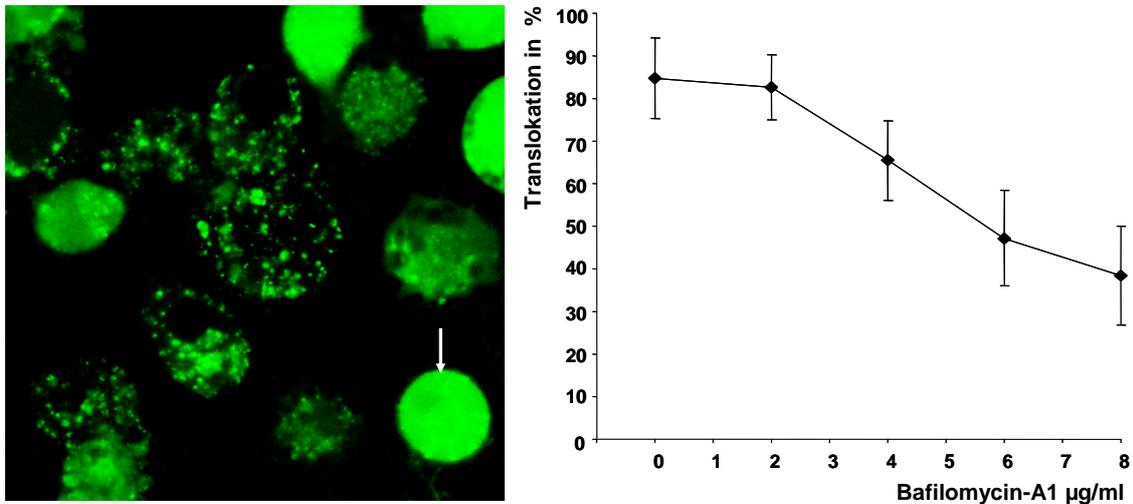


Abb. 16: Hemmung der Translokation durch Bafilomycin A1

MoDC, die mit Bafilomycin A1 inkubiert wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Frequenz von Zellen mit zytosolischer Fluoreszenz. Die linke Graphik zeigt eine repräsentative konfokale Aufnahme von MoDC, die in Anwesenheit von 8 μM Bafilomycin A1 kultiviert wurden (mit Pfeil markierte MoDC mit zytosolischem Verteilungsmuster). Die rechte Graphik zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

3.2.5 Die zytosolische Translokation von ISCOMATRIX™-formuliertem Ovalbumin ist nicht die Folge von lysosomaler Schädigung

Um zu untersuchen, ob die Antigen-translokation vom Endo-Lysosom in das Zytosol durch eine lysosomale Schädigung durch das ISCOMATRIX™-Adjuvans verursacht wird, wurden MoDC simultan mit OVA/ISCOMATRIX™ (Alexa488, grün) und löslichem OVA (Alexa555, rot) inkubiert. Bei einer Schädigung wird erwartet, dass beide Antigenformulierungen in das Zytosol gelangen. Bei einer selektiven Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine hingegen sollte nur das ISCOMATRIX™-formulierte OVA (grün) in das Zytosol gelangen. Wie Abb. 17 zeigt, wurde das lösliche OVA-Protein (rot) in Endo-Lysosomen retiniert, während das ISCOMATRIX™-formulierte OVA (grün) in das Zytosol translozierte. Somit ist die Translokation spezifisch für die Vakzine und kann nicht auf eine Schädigung der lysosomalen Integrität zurückgeführt werden.

OVA + OVA/ISCOMATRIX™

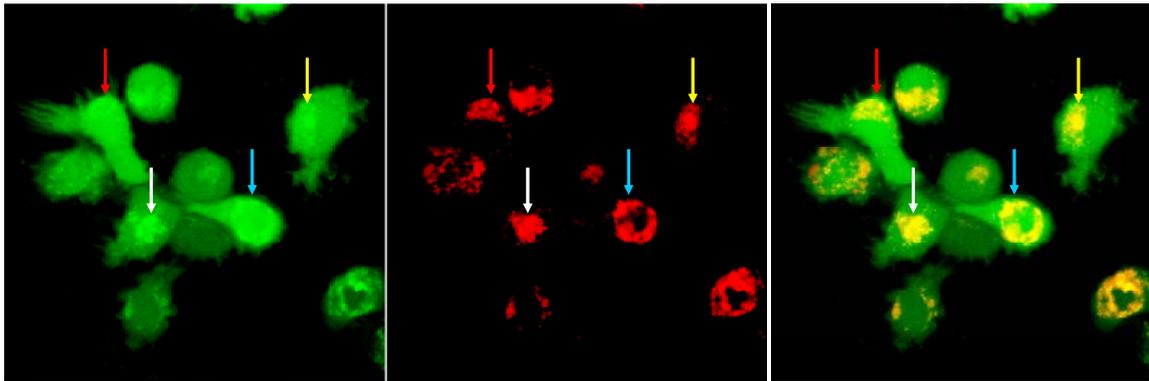


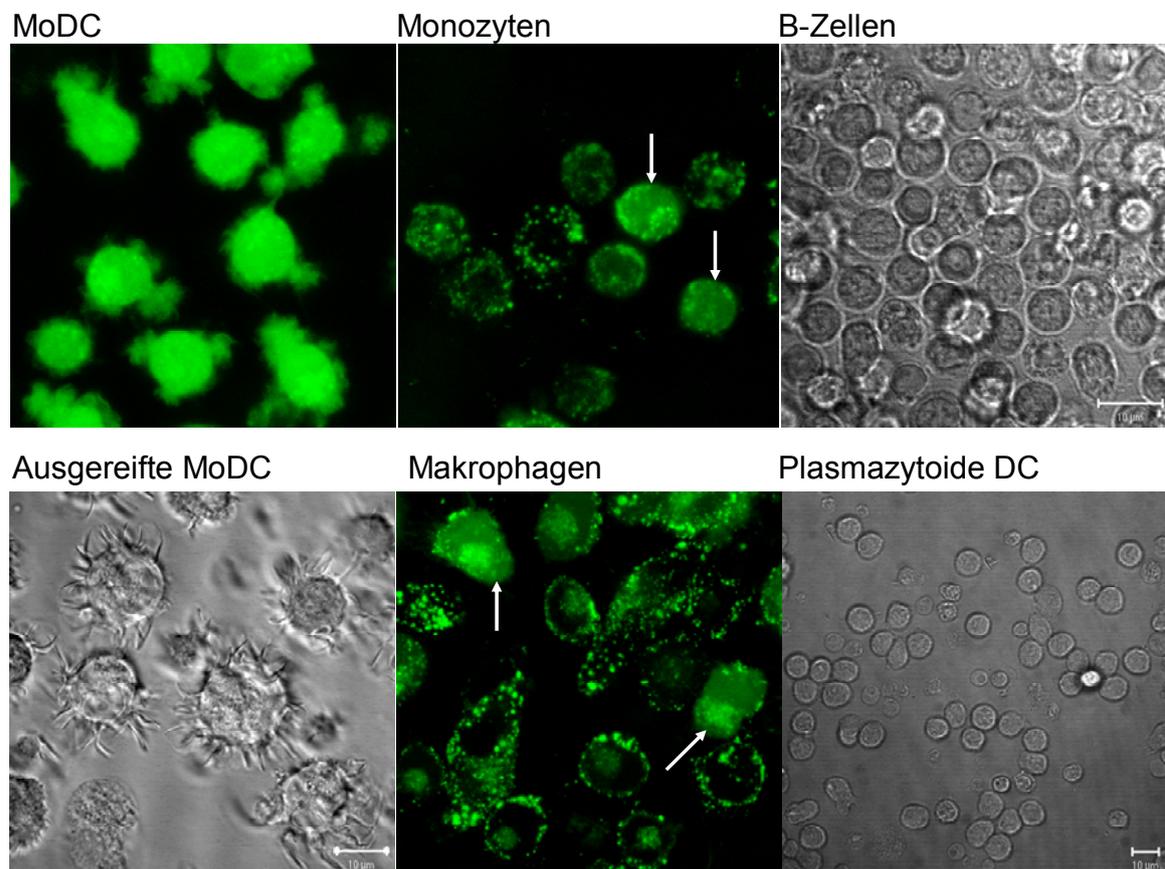
Abb.17: Simultaninkubation von MoDC mit löslichem OVA (rote Fluoreszenz) und OVA/ISCOMATRIX™ (grüne Fluoreszenz)

MoDC wurden für 1 h mit löslichem OVA (Alexa555, rot) und OVA/ISCOMATRIX™ (Alexa488, grün) formuliert inkubiert und konfokal mikroskopiert. Lediglich das formulierte OVA wurde in das Zytosol transloziert, während das lösliche OVA in endo-lysosomalen Kompartimenten retiniert wurde (Pfeile markieren lysosomale Strukturen). Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme von drei unabhängigen Versuchen.

3.3 Unterschiede bei diversen antigenpräsentierenden Zelltypen bezüglich ihrer Fähigkeit zur zytosolischen Translokation

Eine Voraussetzung für die Kreuzpräsentation ist der Zugang des Antigens in das Zytosol von DC, wo es von zytosolischen Proteasen, wie dem Proteasom, prozessiert wird. Es wird vermutet, dass DC Transportermoleküle besitzen, die sie in die Lage versetzen, aufgenommene Antigene aus endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten in das Zytosol zu translozieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich unterschiedliche Zelltypen antigenpräsentierender Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation unterscheiden. Lediglich MoDC und myeloide DC aus dem peripheren Blut waren nach Pulsung mit einer ISCOMATRIX™-Vakzine in der Lage, Tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren (Schnurr et al., 2005). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob mit ISCOMATRIX™ formuliertes Antigen ausschließlich von MoDC in das Zytosol transloziert werden kann, oder ob dazu auch andere antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen, oder plasmazytoide DC in der Lage sind. Diese Zellpopulationen wurden mit magnetischen *Beads* (MACS) aus PBMC aufgereinigt, eine Stunde lang mit OVA/ISCOMATRIX™ (1 µg/ml) inkubiert, vital konfokal mikroskopiert und hinsichtlich ihrer Translokationseffizienz analysiert. Es zeigte sich, dass Makrophagen, plasmazytoide DC sowie B-Zellen mit ISCOMATRIX™ formuliertes Antigen im Gegensatz zu MoDC nicht in das Zytosol translozieren können.

Der größte Teil der MoDC (86 %) zeigte ein zytosolisches Verteilungsmuster. Unter den peripheren mononukleären Zellen des Blutes waren es 0,01 %, unter den Makrophagen 4 %, die ein zytosolisches Verteilungsmuster zeigten. Die Mehrzahl der Monozyten und Makrophagen zeigten eine vesikuläre Verteilung des OVA/ISCOMATRIX™. Im Gegensatz dazu waren plasmazytoide DC und B-Zellen nicht in der Lage, die Antigenformulierung in mikroskopisch sichtbaren Mengen aufzunehmen. Zudem zeigte keine der plasmazytoiden DC und der B-Zellen eine grüne intrazelluläre Fluoreszenz (siehe Abb. 18). MoDC, die mit CD40L ausgereift wurden, verloren ihre Fähigkeit zur Antigentranslokation. Somit sind nur myeloide DC und ein geringer Prozentsatz von Makrophagen zur zytosolischen Antigentranslokation in der Lage.

A

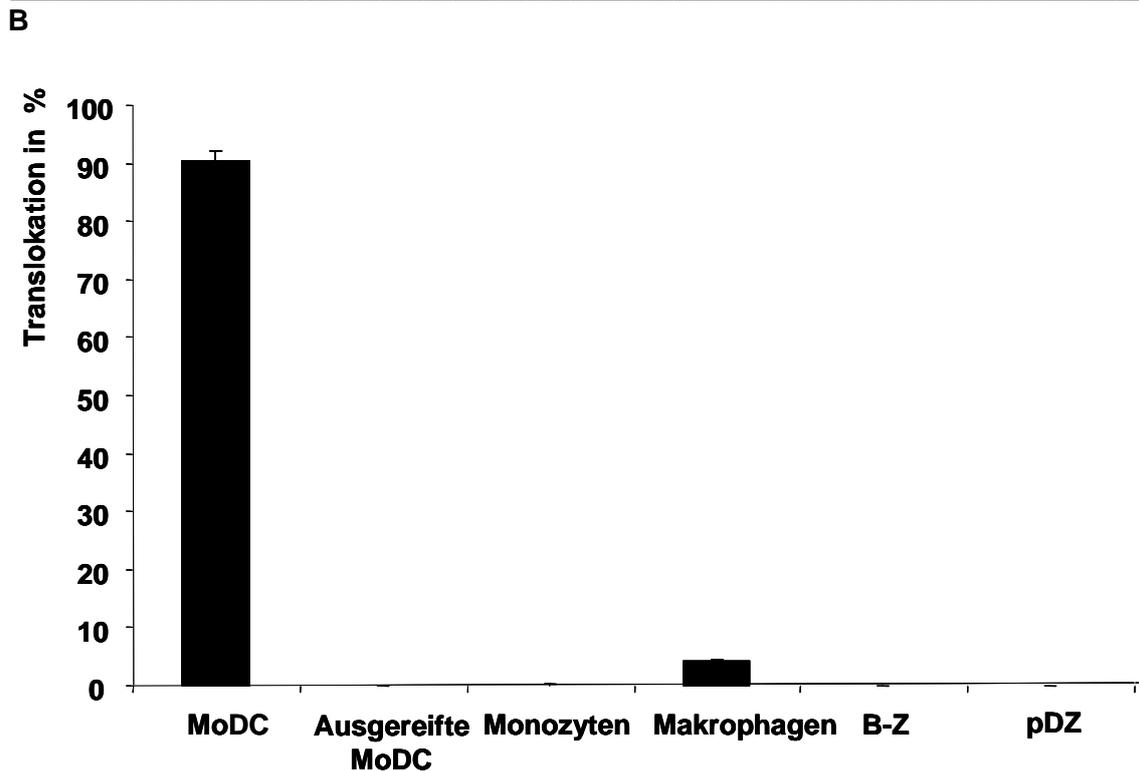


Abb. 18: Zellspezifität der Translokation von OVA/ISCOMATRIX™

A MoDC, Makrophagen, B-Zellen, sowie plasmazytoide DC (jeweils 300.000 Zellen pro Deckglas) wurden eine Stunde lang mit OVA/ISCOMATRIX™ (1 µg/ml) auf Deckgläsern inkubiert, und vital konfokal mikroskopiert. Die weißen Pfeile signalisieren Zellen der verschiedenen Leukozytenpopulationen mit zytosolischem Verteilungsmuster.

B Zellen wurden mit 0,4 µg/ml OVA/ISCOMATRIX™ inkubiert und hinsichtlich ihrer Translokationseffizienz mit dem konfokalen Mikroskop untersucht. Lediglich ein geringer Prozentsatz an Makrophagen, nicht jedoch Monozyten, B-Zellen oder plasmazytoide DC waren in der Lage, das Antigen zu translozieren. MoDC, die mit CD40L ausgereift wurden, verloren ihre Fähigkeit zur Antigentranslokation. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit den korrespondierenden Standardabweichungen aus einem Experiment mit drei verschiedenen Spendern.

3.4.1 Nachweis und Darstellung von intrazellulären Tripeptidyl-Peptidase-II-Komplexen in Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

TPP-II ist ein zytosolischer Peptidasekomplex, der bei der Antigenprozessierung durch DC eine Rolle spielen kann. Schnurr et al. konnten nachweisen, dass mit ISCOMATRIX™-Adjuvans formulierte Antigene in einen Proteasom-unabhängigen, alternativen MHC-I-Prozessierungsweg eingeschleust werden, bei dem TPP-II eine Rolle spielt (Schnurr et al., 2005). Hierzu sollte der Nachweis über die zytosolische Verteilung der Peptidase mittels konfokaler Mikroskopie erbracht werden. MoDC wurden auf Deckgläsern bei 36°C fixiert. Nach Permeabilisierung wurden die MoDC mit

einem nicht fluoreszenzmarkierten humanen Antiserum gegen TPP-II (freundliche Überlassung von Prof. Pfreundschuh, Universität des Saarlandes, Homburg, Saar) inkubiert. Nach 30 min wurde das Präparat gewaschen und die Zellen mit einem sekundären Fluoreszenzantikörper (anti human) gefärbt. Nach Färbung des Enzymkomplex stellt sich dieser in der konfokalen Mikroskopie als ein feingranuläres, intrazelluläres Verteilungsmuster dar, was für eine zytosolische Verteilung von TPP-II spricht (Abb. 19) Damit ist die in das Zytosol translozierte ISCOMATRIX™-Vakzine (siehe Ergebnis oben) einer Prozessierung durch TPP-II potenziell zugänglich.

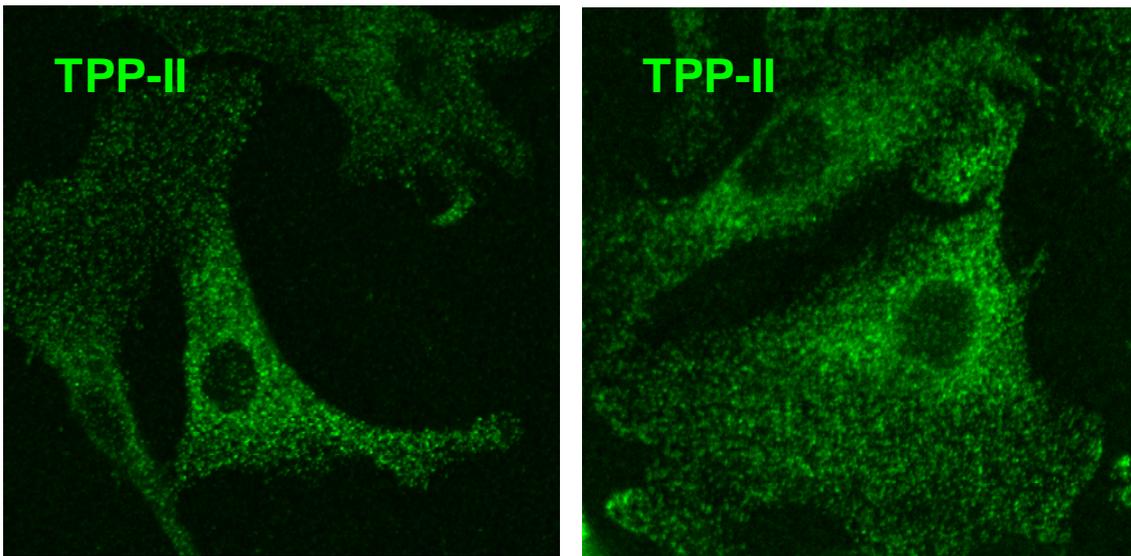


Abb.19 Nachweis und Darstellung der Tripeptidyl-Peptidase-II innerhalb von MoDC

MoDC wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem Antiserum gegen TPP-II inkubiert. Im Anschluss wurden die MoDC mit einem Sekundärantikörper (grüne Fluoreszenz) gegen den Primärantikörper gefärbt, der die Peptidase zur Darstellung bringt. Man erhält das Bild eines feingranulären, intrazellulären Musters, das für eine zytosolische Lokalisation der Peptidase spricht. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von 2 Spendern sind dargestellt.

3.4.1 Untersuchung der Kolo-kalisation von OVA/ISCOMATRIX™ mit dem endoplasmatischen Retikulum in Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

Proteasome sind intrazelluläre Enzymkomplexe, die Proteine und Aminosäureketten in kurze Peptidfragmente spalten, die prinzipiell für die Präsentation auf MHC-I-Molekülen geeignet sind. Im Rahmen der Kreuzpräsentation wurde durch Ackermann et al. vermutet, dass von DC aufgenommene Antigene durch Fusion von Phagosomen mit dem endoplasmatischen Retikulum Zugang zur Kreuzpräsentationsmaschinerie des Proteasoms erhalten (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Jutras and Desjardins, 2005). Um eine potenzielle Kolo-kalisation von

aufgenommenem OVA/ISCOMATRIX™ mit dem endoplasmatischen Retikulum darzustellen und damit Rückschlüsse auf die Prozessierungswege zu ziehen, wurden MoDC auf einem Deckglas bei 36°C adhärirt und mit den Antigenformulierungen inkubiert, nach einer Stunde gewaschen, weitere fünf Stunden inkubiert, danach fixiert und permeabilisiert. Das endoplasmatische Retikulum wurde mit dem Primärantikörper gegen Calretikulin und einem Sekundärantikörper (Alexa-555, rote Fluoreszenz) angefärbt und stellt sich als netzartige intrazelluläre Struktur in MoDC dar. OVA/ISCOMATRIX™ liegt zytosolisch verteilt vor. Die zytosolische Verteilung des OVA/ISCOMATRIX™ kolokalisiert nicht mit der netzartigen Struktur des endoplasmatischen Retikulums. Aus diesem Ergebnis ergibt sich kein Hinweis auf eine Prozessierung über den durch Ackermann et al. beschriebenen Kreuzpräsentationsweg. OVA und OVA/IC befinden sich nach sechs Stunden Inkubation in MoDC in lysosomalen Kompartimenten und kolokolisieren ebenfalls nicht mit dem endoplasmatischen Retikulum (Abb. 20).

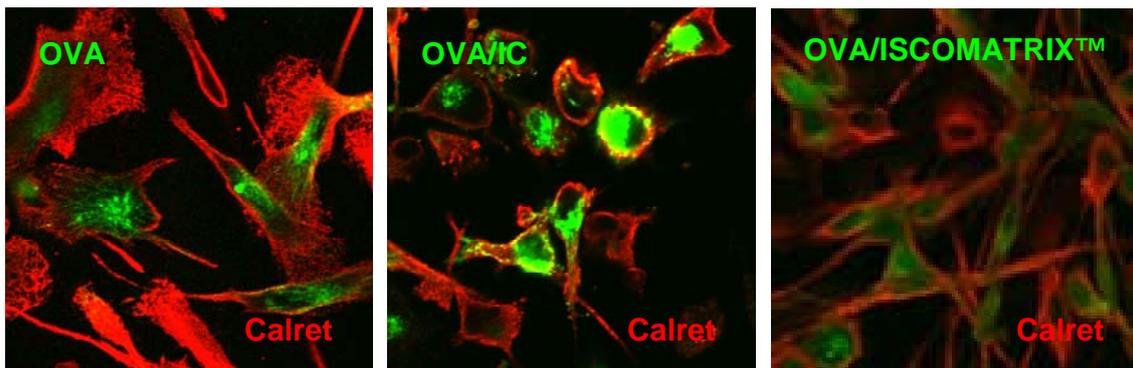


Abb. 20 Untersuchung der Kolokalisation der Antigenformulierungen OVA, OVA/IC und OVA/ISCOMATRIX™ mit dem endoplasmatischen Retikulum in MoDC

MoDC wurden auf einem Deckglas bei 36°C adhärirt, mit den Antigenformulierungen OVA, OVA/IC sowie OVA/ISCOMATRIX™ inkubiert, nach einer Stunde gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Das endoplasmatische Retikulum wurde mit einem Primärantikörper gegen Calretikulin (Calret) und einem Sekundärantikörper (Alexa-555, rote Fluoreszenz) angefärbt und stellt sich als netzartige intrazelluläre Struktur in MoDC dar. OVA/ISCOMATRIX™ liegt zytosolisch verteilt vor. OVA und OVA/IC befinden sich in lysosomalen Kompartimenten. Die zytosolische Verteilung des OVA/ISCOMATRIX™ sowie die in den Lysosomen befindlichen Antigenformulierungen OVA und OVA/IC kolokolisieren nicht mit der netzartigen Struktur des endoplasmatischen Retikulums.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1 Aufnahme der Antigenformulierungen durch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

Alle drei Antigenformulierungen, lösliches OVA-Protein, OVA-Immunkomplexe und mit ISCOMATRIX™ formuliertes Protein, wurden effektiv von humanen MoDC aufgenommen, wobei lösliches Protein am stärksten internalisiert wurde. Durch Inkubation auf Eis sowie durch die spezifischen Endozytosehemmer Wortmannin und Phenylarsine-Oxid konnte die Aufnahme aller drei Antigenformulierungen nahezu komplett gehemmt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich um einen energieabhängigen, endozytotischen Aufnahmevorgang handelt. Da ISCOMATRIX™ Saponin enthält, das biologische Zellmembranen permeabilisieren kann, konnte damit auch ausgeschlossen werden, dass ISCOMATRIX™ energieunabhängig durch die Membran hindurch tritt (Wu and Yang, 2004). Die Aufnahme erfolgte initial in Endosomen (EEA-1⁺ Kompartimente) und schließlich in Lysosomen (LAMP-1⁺ Kompartimente).

4.1.2 Translokation des ISCOMATRIX™-formulierten Ovalbumin in das Zytosol von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

MoDC, die mit ISCOMATRIX™ gepulst wurden und anschließend fixiert wurden, zeigten nach ca. 4 bis 6 Stunden eine diffuse intrazelluläre Färbung, was auf eine effiziente Translokation des Antigens vom Lysosom in das Zytosol hinweist (Abb. 10). Bei den mit Immunkomplexen oder löslichem Protein beladenen MoDC befand sich das Antigen zu diesen Zeitpunkten weiterhin in Lysosomen (LAMP1-positive Kompartimente). Die Mikroskopie vitaler, unfixierter MoDC erbrachte, dass OVA/ISCOMATRIX™ schon nach 15 min mikroskopisch sichtbar in das Zytosol transloziert. Dies war nicht der Fall bei OVA oder Immunkomplexen. Die Translokation von OVA/ISCOMATRIX™ war durch verschiedene Inhibitoren der lysosomalen Ausreifung, Chloroquin, Bafilomycin und Concanamycin D, blockierbar. Das Antigen verblieb in Vesikeln, was daraufhin deutet, dass das saure Milieu der Lysosomen entscheidend an der Translokation beteiligt ist. Weiterhin beweist es, dass das Antigen sich erst im Lysosom befinden muss, um zu translozieren. Entscheidend am Prozess

der Translokation ist, dass aufgenommenes Antigen Zugang zu zytosolischen Proteasen, wie das Proteasom oder die Tripeptidylpeptidase II, erhält, welche als Endoproteasen eine wichtige Rolle bei der Generierung von MHC-I-Epitopen, und somit der Kreuzpräsentation, spielen (Gromme and Neefjes, 2002; Ramirez and Sigal, 2004; Robson et al., 2008). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass ein möglicher Wirkmechanismus von ISCOMATRIX™ die Vermittlung einer effizienten Antigenstranslokation vom Phagosom in das Zytosol darstellt.

4.1.3 Abhängigkeit der Translokationseffizienz und Kreuzpräsentationsfähigkeit vom Entwicklungsgrad der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Der Entwicklungsgrad der MoDC ist entscheidend dafür verantwortlich, ob MoDC in der Lage sind, Antigen zu translozieren oder nicht. Frühe MoDC, die bis zu zwei Tage Zeit hatten, sich mit GM-CSF und IL-4 zu DC zu differenzieren, konnten die OVA/ISCOMATRIX™ noch nicht translozieren. Mit fortschreitender Differenzierung stieg die Translokationsrate und Kreuzpräsentationsfähigkeit an, um ein Maximum am fünften Tag zu erreichen. Man kann annehmen, dass MoDC in ihrer Differenzierung Transporter und andere Moleküle hochregulieren, um effektive Kreuzpräsentation auszuführen. Dazu gehört wahrscheinlich auch die Fähigkeit, Antigen in das Zytosol zu translozieren.

4.1.4 Zelltyp-Spezifität der Translokation

DC, welche professionelle antigenpräsentierende Zellen des menschlichen Immunsystems darstellen, waren als einzige in der Lage, mit ISCOMATRIX™ formuliertes Antigen effektiv in das Zytosol zu translozieren. Andere Leukozytenpopulationen, wie Monozyten, Makrophagen, plasmazytoide DC und B-Zellen waren dazu nicht in der Lage. Dies korreliert mit der spezialisierten Zellfunktion der Kreuzpräsentation, die nur bei DC gefunden wird.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Bestimmung der zytosolischen Antigentranslokation mittels konfokaler Mikroskopie

Die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie ist in der Zellbiologie ein unverzichtbares Instrument zur Darstellung von intrazellulären Prozessen *in vitro* und *ex vivo*. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erreicht sie eine höhere Auflösung und damit Sensitivität (Egger and Petran, 1967). Dies wird durch die klare Definierung der Dicke der visualisierten Schicht durch Verstellung des *Pin Holes* am Mikroskop erreicht. So können potenziell kleinste Einzelstrukturen (z.B. Vesikel) in einer im Prinzip unendlich dünnen Schicht innerhalb der Zelle dargestellt und von räumlich gesehen unterhalb und oberhalb gelegenen Strukturen diskriminiert werden (siehe Methoden). Gerade in der Erforschung der Antigenprozessierung spielt die Methode eine wichtige Rolle. Die konfokale Mikroskopie ist in der aktuellen biologischen Forschung eine etablierte Methode und stellt einen Goldstandard dar, um intrazelluläre Prozessierungswege der Kreuzpräsentation zu charakterisieren.

So wurden zahlreiche neue Erkenntnisse zu intrazellulären Prozessierungsschritten mittels konfokaler Mikroskopie in folgenden Arbeiten belegt. Rodriguez et al., Kovacsovics-Bankowski et al. und Norbury et al. konnten per konfokaler Mikroskopie zeigen, dass nach Aufnahme von Antigenen durch DC die Antigentranslokation aus Phagosomen in das Zytosol von DC entscheidend für den Zugang zum Proteasom und damit für die Generierung der MHC-I-Epitope ist (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury et al., 1995; Rodriguez et al., 1999). Weiterhin wurde visualisiert, dass die Antigenaufnahme in bestimmte Organelle entweder die MHC-I- oder MHC-II-Präsentation favorisiert (Burgdorf et al., 2007). Ackerman et. al zeigten, dass humane MoDC prinzipiell die MHC-I-Prozessierungsmaschinerie in frühen Phagosomen enthalten und zur Kreuzpräsentation fähig sind (Ackerman et al., 2003). Houde et al. konnten mittels konfokaler Mikroskopie nachweisen, dass sich ubiquitinierte Antigene auf der zytoplasmatischen Seite von Phagosomen innerhalb von DC befinden (Houde et al., 2003). Die Darstellung der intrazellulären Kolo-kalisation und Translokation der Proteinformulierungen in dieser Arbeit wurden wie in den vorher zitierten Arbeiten durch die Erstellung von Fluoreszenzintensitätsdiagrammen quantitativ analysiert (siehe Methoden).

Eine andere Methode der Bestimmung der Translokation ist die biochemische Bestimmung von Antigenen im Zytoplasma von Zellen mittels des *Western Blot* Verfahrens. Hierzu werden Zellen mit Proteinen oder Antigenformulierungen inkubiert und daraufhin die zytosolische Fraktion von der vesikulären Fraktion mittels Ultrazentrifugation getrennt. Von beiden Fraktionen können im Anschluss per *Western Blot* Verfahren die zuvor inkubierten Proteine nachgewiesen und somit eine mögliche Translokation eines Proteins aus Vesikeln in das Zytoplasma nachgewiesen werden. Hierzu sind allerdings höhere Konzentrationen im Vergleich zu den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Proteinen (und als Immunkomplex formulierte Proteine) notwendig. Rodriguez et al. sowie Gil-Torregrosa et al. verwendeten für diese Methode Proteinkonzentrationen von mindestens 15 µg/ml bis 1 mg/ml (Protein: HRP, *Horse-Raddish-Peroxidase*), die damit bis zu 150 mal so hoch wie in der vorliegenden Arbeit waren (Gil-Torregrosa et al., 2004; Rodriguez et al., 1999). Wir verzichteten zur Vermeidung von artifiziellen Ergebnissen durch die Verwendung solch hoher Konzentrationen deshalb auf diese Methode.

Schlussfolgernd ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete konfokale Mikroskopie eine valide Methode, um intrazelluläre Mechanismen der Antigenprozessierung mittels fluoreszenzmarkierter Antigenformulierungen zu untersuchen.

4.3 Vergleich mit der Literatur

Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Mechanismen der Kreuzpräsentation im murinen System (Untersuchungen an DC, die aus Knochenmarkszellen generiert wurden) ist die Kenntnis über die Kreuzpräsentation im humanen System sehr limitiert. Nach Aufnahme von Antigen durch DC ist die Antigentranslokation aus Phagosomen in das Zytosol von DC entscheidend für den Zugang zum Proteasom und damit für die Generierung der MHC-I-Epitope (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995; Norbury et al., 1995; Rodriguez et al., 1999). Weiterhin scheint die Antigenaufnahme in bestimmte Organelle entweder die MHC-I- oder MHC-II-Präsentation zu favorisieren (Burgdorf et al., 2007). Schurr et al. beschrieben verschiedene Prozessierungswege für Immunkomplexe auf der einen und mit ISCOMATRIX™ formulierten Antigenen auf der anderen Seite in humanen MoDC (Schnurr et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die möglichen Unterschiede in der intrazellulären Kompartimentierung zwischen den beiden Kreuzpräsentationswegen herauszuarbeiten. Um den intrazellulären Antigentransport intrazellulär mittels konfokaler Mikroskopie

darzustellen, wurden Immunkomplexe oder ISCOMATRIX™-Adjuvans mit Fluorochrom-markiertem OVA-Protein formuliert.

4.3.1 Aufnahme und intrazelluläre Kompartimentierung der Antigenformulierungen

Um den intrazellulären Antigentransport mittels konfokaler Mikroskopie darzustellen, wurden Immunkomplexe oder eine ISCOMATRIX™-Vakzine mit einem fluorochrommarkiertem OVA generiert. Die hierzu durchgeführten Versuche mit fixierten MoDC zeigten keinen Unterschied zwischen den Antigenformulierungen hinsichtlich: 1) der Effektivität der Antigenaufnahme; 2) der Sensitivität der Antigenaufnahme nach Behandlung der DC mit den Endozytoseinhibitoren Phenylarsine oder Wortmannin oder Inkubation auf Eis und 3) des Transportes der Antigenformulierungen aus EEA1-positiven Endosomen in LAMP-1-positive Lysosomen.

Alle drei Antigenformulierungen (lösliches, als Immunkomplex bzw. als ISCOMATRIX™ formuliertes OVA) wurden effektiv von humanen MoDC aufgenommen, wobei lösliches Protein am stärksten internalisiert wurde. In der Literatur zeigten Rodriguez et al., dass die murine DC-Zelllinie D1 Immunkomplexe aufgrund der Bindung an Fc-Rezeptoren leichter und in größeren Mengen aufgenommen hatte als lösliches Protein (Rodriguez et al., 1999). Einen Erklärungsansatz bietet die Verwendung unterschiedlicher Spezies und Zelltypen. Unterschiede zwischen den einzelnen OVA-Formulierungen konnten hinsichtlich des Aufnahmemechanismus nicht festgestellt werden. Durch Inkubation auf Eis sowie durch die spezifischen Endozytosehemmer Wortmannin (Hemmer der Makropinozytose) (Shpetner et al., 1996) und Phenylarsine-Oxid (Hemmer der rezeptorvermittelten Endozytose) konnte die Aufnahme aller drei Antigenformulierungen nahezu komplett gehemmt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich um einen energieabhängigen, endozytotischen Aufnahmeprozess der OVA Formulierungen handelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aufnahme von löslichen Proteinen durch murine DC, z.B. über Pinozytose, fast ausschließlich zur Präsentation auf MHC-II führt. Effiziente Kreuzpräsentation findet statt, wenn das gleiche Antigen als Immunkomplex über Fc-Rezeptoren (Regnault et al., 1999; Rodriguez et al., 1999) aufgenommen wird. Möglicherweise können die verwendeten Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit nicht sensitiv genug zwischen den unterschiedlichen Aufnahmemechanismen in humanen MoDC unterscheiden. Spezies-

und Zelltypunterschiede können ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

Die Endosomen reifen in wenigen Stunden zu lysosomalen Kompartimenten aus. Dies ist im Einklang mit der Literatur (Trombetta and Mellman, 2005). Eine initiale Verschmelzung von endo-lysosomalen Membranen mit ER-Membranen konnte nicht belegt werden (Ackerman et al., 2003; Guernonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Jutras and Desjardins, 2005). Damit wurden neuere Studien von Nicolas et al. bestätigt, die nachwies, dass es bei der Aufnahme von Antigenen zu keiner Fusion von Endosom mit dem Endoplasmatischen Retikulum kommt (Touret et al., 2005).

4.3.2 Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine und von Immunkomplexen vom Lysosom in das Zytosol

Die Verwendung von ISCOMATRIX™-Adjuvans bewirkt eine sehr schnelle Freisetzung des Antigens aus Lysosomen in das Zytosol der DC. Im Gegensatz dazu wurde das mit Immunkomplexen formulierte OVA in Lysosomen gehalten. Dabei ergab sich auch bis sechs Stunden nach Antigenaufnahme kein Hinweis auf eine Translokation in das Zytosol. In lebenden MoDC war die Sensitivität für die Erfassung von zytosolischer Fluoreszenz im Vergleich zu fixierten Zellen noch zusätzlich erhöht. Es ließ sich jedoch auch in lebenden MoDC, die mit OVA/IC inkubiert wurden, mittels konfokaler Mikroskopie keine Translokation aus Lysosomen in das Zytoplasma feststellen.

Morein et al. koppelten Goldpartikel an ISCOM und zeigten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass ISCOM und daran gekoppelte Moleküle in das Zytosol von Zellen gelangen (Morein et al., 1984). Für an ISCOM gebundene Proteine wurde dies bisher nicht bewiesen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Translokation eines an ISCOMATRIX™ gekoppelten Antigens (Ovalbumin) in das Zytosol von humanen MoDC gezeigt werden. Damit wird ein möglicher Erklärungsansatz für die effiziente und schnelle Kreuzpräsentation von mit ISCOMATRIX™ formulierten Tumorproteinen durch DC erbracht (Davis et al., 2004; Maraskovsky et al., 2004). Möglicherweise erleichtert der lipophile Charakter der Partikel die Translokation des Antigens vom Phagosom in das Zytosol. Interessanterweise waren MoDC in der Arbeit von Schnurr et al. bereits wenige Stunden nach Pulsung mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ in der Lage, zytotoxische T-Lymphozyten (und T-Helferzellen) zu aktivieren (Schnurr et al., 2005). Für NY-ESO/IC dauerte dieser Prozess wesentlich länger.

Rodriguez et al. demonstrieren, dass Immunkomplexe aus polyklonalem Antikörper und OVA oder HRP (*Horse Raddish Peroxidase*) in das Zytosol der murinen DC-Zelllinie D1 translozieren. Nach Pulsung der D1-Zellen mit den Immunkomplexen, weiteren fünf Stunden Inkubation und anschließender Fixierung war in 40 bis 60 % der Zellen ein zytosolisches Verteilungsmuster auszumachen. Damit wurde die Kreuzpräsentation von Proteinen in Form von Immunkomplexen erklärt. Die Proteinkonzentration betrug jedoch 15 µg/ml und liegt damit zwischen 15- bis 150-mal so hoch wie in der vorliegenden Arbeit. Gil-Torregrosa et al. zeigten in einer weiteren Arbeit derselben Arbeitsgruppe, dass Protein-Immunkomplex-Formulierungen im Gegensatz zu löslichen Proteinen in das Zytosol von murinen DC translozieren (aus Knochenmarkszellen generierte DC). Hierbei wurde ebenfalls eine Proteinkonzentration von 15 µg/ml eingesetzt. Die DC wurden 30 min mit Immunkomplexen gepulst, vier Stunden kultiviert, fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Es zeigte sich, dass 2 % der unreifen, 20 % der intermediär ausgereiften und 2 % der voll ausgereiften DC ein zytosolisches Verteilungsmuster zeigten (Gil-Torregrosa et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Translokation von OVA/IC in das Zytosol humaner MoDC festgestellt werden. In neuen Übersichtsarbeiten wurde postuliert, dass humane *in vitro* durch GM-CSF und IL-4 Kultivierung gewonnene MoDC *in vivo* im murinen System eher inflammatorischen aus Monozyten abstammenden DC ähneln (Shortman and Naik, 2007). So könnten auch murine *in vitro* aus Knochenmarkszellen generierte DC diesen *in vivo* inflammatorischen DC gleichen und so die geringe Translokationseffizienz erklären. Im Vergleich zur Arbeit von Rodriguez und Gil-Torregrosa betrug die Proteinkonzentration in den vorliegenden Experimenten mit lebenden MoDC 0,1 bis 1 µg/ml. Die bis zu 150-fach höhere Proteinkonzentration in den zitierten Arbeiten kann dafür verantwortlich sein, dass es zu einer artifiziell hohen Translokationsrate kam bzw. bei physiologischen Antigenkonzentrationen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, die Sensitivität für den Nachweis der Translokation mittels der konfokalen Mikroskopie nicht ausreicht. Einen anderen Erklärungsansatz bietet die Verwendung unterschiedlicher Spezies und Zelltypen in den murinen Studien.

Eine Erklärung für effektive Kreuzpräsentation von Immunkomplexen durch humane MoDC könnte eine geringe Menge an translozierten Immunkomplexen bieten, die

unterhalb der Detektionsgrenze für konfokale Mikroskope liegt. Schnurr et al. zeigten, dass Antigen formuliert als Immunkomplex später als mit ISCOMATRIX™ formuliertes Antigen präsentiert wird (Schnurr et al., 2005). Möglicherweise ist der klassische Präsentationsweg bei immunkomplexiertem Antigen so langsam, dass es erst nach 24 Stunden nach Antigenaufnahme zu einer ausreichenden Translokation kommt und somit in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde.

4.3.3 Zelltyp-spezifische Unterschiede bei der Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine in das Zytosol

Über die Translokation von aufgenommenem Antigen in das Zytosol von verschiedenen humanen antigenpräsentierenden Zellen ist bisher wenig bekannt. Schnurr et al. zeigten, dass mit ISCOMATRIX™ formuliertes Antigen nur von humanen MoDC und myeloiden DC kreuzpräsentiert wurde. Andere antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen und plasmazytoide DC waren dazu nicht in der Lage (Schnurr et al., 2005). In einem *in vitro* Modell wurde die Fähigkeit verschiedener humaner DC-Populationen untersucht, das Tumorantigen NY-ESO-1 auf MHC-I und MHC-II zu präsentieren. Von Tumorpatienten wurden NY-ESO-1-spezifische T-Helferzellen (HLA-DP4-restringiert) und zytotoxische T-Lymphozyten (HLA-A2-restringiert) gewonnen. Diese wurden mit in den HLA-Allelen übereinstimmenden DC kokultiviert, die zuvor mit NY-ESO-1-Proteinformulierungen gepulst wurden. Durch den Nachweis der Interferon- γ -Produktion aktivierter T-Zellen konnte die Effizienz der Antigenpräsentation auf MHC-I und MHC-II quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass lediglich MoDC und CD1c⁺ myeloide DC im peripheren Blut, nicht jedoch plasmazytoide DC, Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen, zur Kreuzpräsentation befähigt waren. Auch in der MHC-II-Präsentation waren MoDC und CD1c⁺ myeloide DC den anderen antigenpräsentierenden Zellen überlegen (Schnurr et al., 2005).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bieten dafür eine plausible Erklärung. Die Translokation der ISCOMATRIX™-Vakzine war nur bei humanen MoDC nachzuweisen, nicht jedoch bei anderen antigenpräsentierenden Zellen. In der vorliegenden Arbeit erhalten wir Hinweise, dass diese Funktion eine hochspezialisierte Fähigkeit myeloider DC ist. Andere antigenpräsentierenden Zellen wie phagozytierende Makrophagen oder Monozyten halten das Antigen in Lysosomen und translozieren es nicht in das Zytosol. B-Zellen und plasmazytoide DC nehmen erst gar kein Antigen auf. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen von Schnurr et al., die

zeigen konnten, dass lediglich myeloide DC, wie MoDC und CD1⁺ DC des peripheren Blutes CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktivieren können (Schnurr et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit zeigt eine entscheidende Rolle für IL-4 in der Entwicklung von MoDC aus monozytären Vorläufern und deren Erwerb der Antigentranslokationsfähigkeit auf. MoDC mussten 5 bis 6 Tage mit IL-4 und GM-CSF kultiviert werden, um diese Fähigkeit zu erwerben. Somit stellt das Standardverfahren der Generierung von MoDC *in vitro* für 5 bis 7 Tagen für diese wichtige Zellfunktion einen idealen Zeitraum dar (Romani et al., 1994).

Einen weiterhin ungeklärten Aspekt stellt die Frage nach der gerichteten Einschleusung des Antigens in die unterschiedlichen Prozessierungswege dar, einmal über das Proteasom oder über TPP-II. Eine mögliche Erklärung bietet die Kompartimentierung in unmittelbarem Kontakt zu einer der beiden Prozessierungsmaschinen. Houde et al. konnten nachweisen, dass sich ubiquitinierte Antigene auf der zytoplasmatischen Seite von Phagosomen befinden (Houde et al., 2003). Ob TPP-II Kompartimenten in DC zugeordnet werden kann, ist unklar. Wir analysierten die Verteilung von TPP-II mit einem monoklonalem Antikörper. Es zeigte sich ein diffuses zytoplasmatisches Verteilungsmuster ohne Kolo-kalisation mit EEA-1, LAMP-1 oder Calretikulin. Dies spricht für die Lokalisation von TPP-II im Zytosol.

Die schnelle Freisetzung der ISCOMATRIXTM-Vakzine aus lysosomalen Kompartimenten umgeht möglicherweise die Prozessierung durch das Proteasom. Ob TPP-II eine Rolle in der Kreuzpräsentation bestimmter Epitope spielt oder das Repertoire von MHC-I- und MHC-II-Epitopen von DC beeinflusst, stellt ein sehr interessantes Forschungsfeld dar. Obwohl man zeigen konnte, dass die ISCOMATRIXTM-Vakzine Antigene in einen proteasomunabhängigen Prozessierungsweg einschleust (TPP-II abhängig), konnten Robson et al. (Manuskript in Revision) zeigen, dass die Antigene teilweise auch über das Proteasom prozessiert werden. Im Endeffekt erhält man durch die Prozessierung von kompletten Tumorproteinen mittels ISCOMATRIXTM-Adjuvans über unterschiedliche Prozessierungswege eine breite zytotoxische T-Zell Antwort gegen Tumore.

4.4 Klinische Relevanz der erhobenen Befunde

4.4.1 ISCOMATRIX™-Adjuvans-basierte Tumorstoffe

Durch Formulierung von rekombinantem NY-ESO-1-Protein mit ISCOMATRIX™-Adjuvans wurde eine Tumorstoffe (NY-ESO-1/ISCOMATRIX™) hergestellt und in der humanen Zellkultur sowie in Mausmodellen getestet. Der neu identifizierte, über TPP-II vermittelte Prozessierungsweg stellte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als sehr effizient und lang anhaltend dar (Maraskovsky et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte hierfür eine Erklärung gefunden werden. ISCOMATRIX™-Vakzine wurde effektiv von humanen MoDC in endosomale Vesikel aufgenommen und schnell aus den reifen Lysosomen in das Zytosol der Zellen transloziert. Im Zytosol kann die Vakzine durch Peptidasen wie TPP-II prozessiert werden. Dadurch entstehen immunogene Peptide für die MHC-I-Präsentation, wodurch CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden können.

Ebert et al. konnten zeigen, dass eine ISCOMATRIX™-Vakzine auch über das Proteasom prozessiert werden kann (Ebert et al., 2009). Durch die Verwendung von ISCOMATRIX™-Vakzine werden damit verschiedene Wege der Antigenprozessierung angesteuert und es entstehen dadurch möglicherweise mehr immunogene Peptide für die MHC-I-Präsentation. Letztendlich ergibt sich daraus die Möglichkeit einer vielseitigeren zytotoxischen T-Zell Antwort. Im Gegensatz zu mit ISCOMATRIX™ formulierten Tumorstoffen werden immunkomplexierte Antigene ausschließlich Proteasom-abhängig über den klassischen Weg prozessiert. Im Gegensatz zu Proteinen, die als Immunkomplex vorliegen, entstehen durch Formulierung mit ISCOMATRIX™ somit andere MHC-I sowie MHC-II Epitope. Das Spektrum der peptidspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten, die gegen einen Tumor aktiviert werden, ist demnach unterschiedlich (Davis et al., 2004).

Durch Kombination der Antigenformulierungen mittels Immunkomplexen und als ISCOMATRIX™-Vakzine könnte es gelingen, die Zahl der tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten nochmals zu erhöhen. Dabei spielt die Applikationsart der Vakzine nach neuesten Erkenntnissen eine entscheidende Rolle. In präklinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass DC, die *in vitro* mit Antigen-Immunkomplexen beladen wurden, mindestens 1000mal effektiver in der prophylaktischen Tumorstoffantwort waren, als die alleinige subkutane *in vivo* Applikation von Antigen-Immunkomplexen (Schuurhuis et al., 2006). In diesem Kontext

stellt die subkutane *in vivo* Gabe von NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ im Mausmodell (Maraskovsky et al., 2004), als auch in klinischen Phase-I-Studien (Davis et al., 2004) eine vielversprechende Alternative zur kosten- und zeitintensiven *in vitro* Beladung von DC dar. In diesen Studien konnte eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort gegen eine Vielzahl von NY-ESO-1-Epitopen detektiert werden.

Die Möglichkeit, Proteinantigene mit ISCOMATRIX™ oder Immunkomplexen zu formulieren bietet den zusätzlichen Vorteil, Patienten mit diversen HLA-Loci zu behandeln und die Therapie einem breiten Patientenkollektiv zugänglich zu machen. Diese war in der Vergangenheit im Zuge der Peptid-Vakzinierungen überwiegend den HLA-A2 positiven Patienten vorbehalten, die nur einen Anteil von ca. 30 % der kaukasischen Bevölkerung ausmachen.

Die Formulierung von Tumorantigenen in Form von Proteinen hat generell einen weiteren Vorteil gegenüber Peptid-Vakzinierungen. Werden DC *ex vivo* mit Peptiden beladen und subkutan in den Patienten appliziert, lösen sich diese Peptide zu 90 % innerhalb von 24 Stunden wieder von den MHC-I-Komplexen ab. Diese Zeit brauchen DC jedoch, um vom Ort der Injektion in den drainierenden Lymphknoten zu gelangen. Interaktionen von MHC-I Molekülen und naiven CD8⁺ T-Zellen bleiben daher auf wenige DC beschränkt. Als Konsequenz entsteht nur eine ineffiziente Immunantwort. Die notwendige intrazelluläre Prozessierung von mit ISCOMATRIX™ formulierten Tumorproteinen verlängert das Zeitfenster für Interaktionen von DC mit spezifischen T-Zellen im Lymphknoten (Schnurr et al., 2005). Folge ist eine adäquate lang anhaltende Stimulation von T-Zellen durch DC.

In der Tumorthherapie mit DC in klinischen Studien mangelte es in der Vergangenheit an einheitlichen Generierungsprotokollen von humanen MoDC (Figdor et al., 2004). Die vorliegende Arbeit kann Empfehlungen geben, wann der optimale Zeitpunkt für die Pulsung von humanen MoDC *in vitro* mit ISCOMATRIX™-Vakzine vor Rückgabe der Zellen in den Patienten erreicht ist. Fünf Tage nach Beginn der Generierung von MoDC aus Monozyten durch Inkubation mit IL-4 und GM-CSF erwarben die MoDC ein Maximum an Translokationseffektivität der ISCOMATRIX™-Vakzine.

Zusammenfassend ist das Vakzine-Adjuvans ISCOMATRIX™ eine vielversprechende Alternative zu bisher etablierten Applikationsformen von Tumorantigenen.

Phase-I-/II-Studien mit Melanompatienten sind bereits durchgeführt worden, in denen die immunologische Funktionalität bestätigt wurde. Weitere Studien, an Patienten mit Tumoren werden das Potenzial von ISCOMATRIX™ offen legen.

4.4.2 Zukunft der Vakzinierung mit dendritischen Zellen

Die erste klinische Studie mit DC zur Antitumortherapie liegt bereits 14 Jahre zurück (Hsu et al., 1996). In der Folge konnte gezeigt werden, dass die Immuntherapie von verschiedensten Tumoren mit DC nebenwirkungsarm und bei einigen Patienten effektiv ist. Jedoch wurde die klinische Weiterentwicklung durch das Fehlen von Vakzinierungsstandards, das unterschiedliche Design von Pilotstudien sowie uneinheitliche Methoden bei der *ex vivo* Generierung und Manipulierung von DC behindert (Cerundolo et al., 2004). Insbesondere hat das schlechtere Abschneiden der Tumortherapie mit DC gegenüber der Standardchemotherapie beim malignen Melanom in der ersten randomisierten Phase-III-Studie die Erwartungen gedämpft (Schadendorf et al., 2006). Zudem wurde deutlich, dass Tumore in der Lage sind, die durch Immuntherapie ausgelösten Antitumor-Immunantworten erfolgreich zu unterdrücken (Gilboa, 2007).

Ein besseres Verständnis, wie DC das Immunsystem modulieren, ist nötig, um das volle Potenzial dieser Therapie auszuschöpfen. Es sollte ein Goldstandard für die Verwendung von DC in klinischen Studien erstellt werden. Dies betrifft 1) die Präparation geeigneter DC; 2) die Identifizierung geeigneter Subtypen von DC; 3) die Dosis und das zeitliche Intervall der Vakzinierung; 4) die Darreichungsform; 5) die Art der Antigenbeladung; 5) den Reifegrad der DC.

In den zurückliegenden Jahren wurden hauptsächlich *ex vivo* generierte DC dazu verwendet, das Immunsystem gegen Tumore zu aktivieren. Die *ex vivo* Generierung von MoDC kann in hoher Qualität und Quantität durchgeführt werden. Dies ist allerdings mit erheblichen Laboraufwand sowie hohen Kosten verbunden. Hier bieten kurze Generierungsprotokolle von MoDC Abhilfe, indem sie Kosten und Zeit reduzieren. Inwiefern dadurch jedoch die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation beeinflusst wird, muss zuvor bestimmt werden.

Neue Möglichkeiten der *in vivo* Antigenbeladung von DC sind viel versprechend, kostengünstig und mit erheblich weniger Laboraufwand verbunden. Ergebnisse aus

klinischen Studien, die eine zellfreie Vakzine zur Aktivierung von DC *in vivo* verwenden sind Gegenstand aktueller klinischer Studien. Die *in vivo* Antigenbeladung wird aber nur Erfolg haben, wenn man den besten *in vivo* Reifungsstimulus definiert. TLR-Agonisten können DC aktivieren, die daraufhin IL-12p70 ausschütten, in den drainierenden Lymphknoten migrieren und Th-1 gerichtete T-Zellantworten auslösen. Um eine optimale Kreuzpräsentation und damit die bestmögliche zytotoxische T-Zellantwort gegen Tumore zu erhalten, ist es von erheblicher Bedeutung, die Wechselwirkungen zwischen der Prozessierung von *in vivo* applizierten Antigenen und adäquaten Reifestimulus, sowie deren zeitlichen Gabe zu kennen.

Weiterhin stellt sich die Frage, mit welchen anderen antitumoralen Therapiemodalitäten die Therapie mit DC kombiniert werden kann. Eine Möglichkeit wäre, DC in ihrer Funktion der Immunaktivierung indirekt zu unterstützen, indem man regulatorische T-Zellen an ihrer Funktionsausübung hindert oder immuninhibitorische Moleküle ausschaltet. Um diese T-Zellfunktionen am Patienten zu überprüfen und zu steuern ist ein verbessertes Immunmonitoring notwendig. Anhand des Immunmonitoring sollten auch Endpunkte in klinischen Studien neu definiert werden (Tumorantwort, Messung zirkulierender Tumorzellen). Ziel ist es, mit Hilfe des Immunmonitoring, Therapieversager schnell zu identifizieren, neue Therapiestrategien zu wählen oder wirksame Therapien zu optimieren (Dauer et al., 2008).

Die Antitumor-Therapie mit DC im Kontext der multimodalen Therapie mit Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz dar. Aktuelle Studien untersuchen die Antitumor-Therapie mit DC in Verbindung mit Chemotherapie-Schemata. Allerdings sind die Anzahl der Studien bisher noch zu gering, um eine generelle Aussage über den Erfolg des kombinierten Therapiekonzepts machen zu können.

Die Entwicklung von synthetischen Vakzinen von hoher Qualität (GMP), die die Immunreaktionen *in vivo* beeinflussen, könnten die Durchführung von großen Multizenterstudien, unterstützt durch die Pharmaindustrie, erleichtern. Dies würde weitere kleine Einzelzentrumstudien mit ungenügendem Design, Vergleichbarkeit und kleiner Patientenzahl verringern. So könnten Tumorimmunologen und Onkologen in Zukunft auf standardisierte, für die alltägliche Therapieanwendung fähige,

tumorspezifische Immuntherapeutika (*off-the-shelf vaccines*) zurückgreifen. Diesbezüglich sind ISCOMATRIX™-Vakzine vielversprechend.

Zukünftige Studien an Patienten mit gering fortgeschrittenen, nicht metastasierten, nicht infiltrativ wachsenden Tumoren werden das volle Potenzial von DC offenlegen und werden deren Platz neben den etablierten Therapieoptionen Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie bei bösartigen Neubildungen bestimmen (den Brok et al., 2005).

5. Zusammenfassung

Die Immuntherapie mit dendritischen Zellen stellt einen viel versprechenden Therapieansatz für die Induktion von zytotoxischen T-Zellantworten gegen Tumore dar. Tumorantigene in Form von rekombinanten Proteinen sind besonders interessant, da sie multiple T-Zellepitope für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen enthalten und Patienten, im Gegensatz zu präformierten Peptiden, unabhängig von ihrem HLA-Haplotyp vakziniert werden können (Davis et al., 2004). Jedoch ist die Formulierung von Proteinantigenen mit Adjuvantien eine wichtige Voraussetzung, dass Epitope des Antigens auf MHC-I an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden, ein Vorgang, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird. Protein-basierte Vakzine mit ISCOMATRIX™-Adjuvans (CSL Limited, Australien) haben sich in Tiermodellen und klinischen Studien als effektiv bei der Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene erwiesen (Davis et al., 2004; Maraskovsky et al., 2004). *In vitro* ergaben sich Hinweise, dass ISCOMATRIX™-Adjuvans in DC einen neuen, Proteasom-unabhängigen Mechanismus der Kreuzpräsentation ansteuert (Schnurr et al., 2005). Ziel der Arbeit war es, diesen Kreuzpräsentationsweg mittels konfokaler Mikroskopie zu charakterisieren.

Zuerst wurde die Aufnahme der Vakzine und intrazelluläre Kompartimentierung des Antigens in DC mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass ISCOMATRIX™-Vakzine von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC) innerhalb weniger Minuten mittels Endozytose in sogenannte frühe Endosomen aufgenommen werden. Daraufhin fand ein Transport in reife Lysosomen statt, aus denen das Antigen innerhalb von 30 min effektiv in das Zytosol transloziert wurde. Diese Translokation wurde durch Hemmstoffe der lysosomalen Azidifizierung, Concanamycin B und Chloroquin, nahezu vollständig gehemmt, was auf die Rolle funktionell aktiver lysosomaler Kompartimente bei dieser Zellfunktion hindeutet. Ferner war die Translokation spezifisch für Antigen, welches mit ISCOMATRIX™ formuliert wurde, da bei gleichzeitiger Beladung der DC mit unformuliertem Antigen lediglich das formulierte in das Zytosol freigesetzt wurde. Interessanterweise beschränkte sich die Translokationsfähigkeit auf myeloide DC. Andere antigenpräsentierende Zelltypen, wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und plasmazytoide DC konnten die Vakzine entweder nicht aufnehmen oder aber nicht in das Zytosol translozieren. Dieses Ergebnis korreliert mit funktionellen Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass lediglich myeloide DC zur Kreuzpräsentation von ISCOMATRIX™-Vakzinen in der Lage sind (Schnurr et al., 2005). Somit bestätigt diese Arbeit die Hypothese, dass die

zytosolische Translokation eine wesentliche Voraussetzung für eine effektive Kreuzpräsentation ist und demonstriert zudem, dass diese Fähigkeit im humanen System auf myeloide dendritische Zellen beschränkt ist.

Zudem konnte gezeigt werden, dass das Zytokin IL-4 einen wesentlichen Faktor bei der Differenzierung von Monozyten zu DC darstellt, der darüber entscheidet ob die Fähigkeit zur Translokation erlangt wird oder nicht. Monozyten, die mit GM-CSF alleine kultiviert wurden, waren nicht nur unfähig zur Antigentranslokation, sondern auch zur Stimulation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellklone. Somit korreliert der mikroskopische Befund der Antigentranslokation mit der entscheidenden Funktion der Kreuzpräsentation. Der exakte Mechanismus der Antigentranslokation ist bis heute nicht befriedigend erklärt. Möglicherweise bietet dieses Modell die Möglichkeit, anhand von DC, die in An- bzw. Abwesenheit von IL-4 kultiviert werden, über eine differenzielle Expressionsanalyse den Transporter im Lysosom zu identifizieren, der die Antigentranslokation vermittelt.

Interessanterweise erreichten MoDC ab dem sechsten Tag ihre maximale Translokationseffizienz. Dies ist der Zeitpunkt, ab dem die Zellen auch andere wichtige Differenzierungsschritte durchlaufen haben, die sie als DC definieren, und DC typischerweise in klinischen Studien zum Einsatz kommen. Somit könnte die Bestimmung der Translokationseffizienz ein wichtiges Merkmal für die Qualitätskontrolle von DC in klinischen Studien werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen das klinische Potenzial von Tumorstoffen, die auf ISCOMATRIX™-Adjuvans basieren. In einer von unserer Arbeitsgruppe inzwischen publizierten Arbeit wurde gezeigt, dass die effiziente Translokation zu einer Antigenprozessierung führt, die über den zytosolischen Enzymkomplex Tripeptidyl-Peptidase-II vermittelt wird (Schnurr, JI 2009). Inwieweit diese alternative Antigenprozessierung auch zur Generierung von T-Zellepitopen führt, die über das Proteasom nicht oder nur unzureichend generiert werden können, bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

6. Abbildungsverzeichnis

Tab.1 Übersicht über bisher durchgeführte klinische Studien mit dendritischen Zellen

Tab.2 Übersicht über Tumorassoziierte Antigene

Abb.1 Teilschritte der Kreuzpräsentation

Abb.2 Funktionsprinzip der konfokalen Mikroskopie

Abb.3 Fluoreszenzintensitätsprofil

Abb.4 Aluminiumobjektträger für die Mikroskopie lebender Zellen

Abb.5 Aufnahme der Antigenformulierungen im FACS

Abb.6 Inhibition der Antigenaufnahme durch Wortmannin und Phenylarsine-Oxid

Abb.7 Aufnahme der Antigenformulierungen in der konfokalen Lasermikroskopie und Kolokalisation mit endosomalen, lysosomalen und ER Markern

Abb.8 Intrazelluläre Verteilung der Antigenformulierungen in MoDC nach 1-2 h

Abb.9 Intrazelluläre Verteilung der Antigenformulierungen in MoDC nach 4-6 h

Abb.10 Translokation von Antigenformulierung OVA, OVA/IC und OVA/ISCOMATRIX™ in vitalen, nicht fixierten MoDC

Abb.11 Konzentrationsabhängigkeit der Translokation

Abb.12 Translokationseffektivität ist abhängig vom Entwicklungsgrad der MoDC

Abb.13 Korrelation der Translokationsfähigkeit mit der Aktivierbarkeit von Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen (Kreuzpräsentation)

Abb.14 Hemmung der Translokation durch Chloroquin

Abb.15 Hemmung der Translokation durch Concanamycin

Abb.16 Hemmung der Translokation durch Bafilomycin A1

Abb.17 Parallelinkubation von MoDC mit OVA(555) und OVA/ISCOMATRIX™

Abb.18 Zellspezifität der Translokation von OVA/ISCOMATRIX™ formuliertem Antigen

Abb.19 Nachweis und Darstellung der Tripeptidyl-Peptidase-II innerhalb von MoDC

Abb.20 Kolokalisation von OVA/ISCOMATRIX™ mit dem endoplasmatischen Retikulum in MoDC

7. Literaturverzeichnis

1. Ackerman, AL, Cresswell, P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 2004;5:678-84.
2. Ackerman, AL, Kyritsis, C, Tampe, R, Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003.
3. Adams, GP, Shaller, CC, Dadachova, E, et al. A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A"-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Res* 2004;64:6200-6.
4. Alexopoulou, L, Holt, AC, Medzhitov, R, Flavell, RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
5. Allan, RS, Smith, CM, Belz, GT, et al. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 2003;301:1925-8.
6. Andrews, DM, Maraskovsky, E, Smyth, MJ. Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunol Rev* 2008;222:242-55.
7. Bailar, JC, 3rd, Gornik, HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997;336:1569-74.
8. Banchereau, J, Steinman, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
9. Beacock-Sharp, H, Donachie, AM, Robson, NC, Mowat, AM. A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. *Int Immunol* 2003;15:711-20.
10. Bedoui, S, Whitney, PG, Waithman, J, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2009;10:488-95.
11. Behboudi, S, Morein, B, Ronnberg, B. Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms. *Vaccine* 1995;13:1690-6.
12. Bellette, BM, Woods, GM, Wozniak, T, Doherty, KV, Muller, HK. DEC-205lo Langerinlo neonatal Langerhans' cells preferentially utilize a wortmannin-sensitive, fluid-phase pathway to internalize exogenous antigen. *Immunology* 2003;110:466-73.
13. Blander, JM, Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006;440:808-12.
14. Bonifaz, L, Bonnyay, D, Mahnke, K, Rivera, M, Nussenzweig, MC, Steinman, RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002;196:1627-38.
15. Boyle, J, Eastman, D, Millar, C, et al. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. *Vaccine* 2007;25:2541-4.
16. Burgdorf, S, Kautz, A, Bohnert, V, Knolle, PA, Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 2007;316:612-6.
17. Cerundolo, V, Hermans, IF, Salio, M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 2004;5:7-10.
18. Cheson, BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:188-96.
19. Curiel, TJ, Curiel, DT. Tumor immunotherapy: inching toward the finish line. *J Clin Invest* 2002;109:311-2.

20. Dauer, M, Obermaier, B, Herten, J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003;170:4069-76.
21. Dauer, M, Schnurr, M, Eigler, A. Dendritic cell-based cancer vaccination: quo vadis? *Expert Rev Vaccines* 2008;7:1041-53.
22. Davis, ID, Chen, W, Jackson, H, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10697-702.
23. De Vries, IJ, Krooshoop, DJ, Scharenborg, NM, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003;63:12-7.
24. den Brok, MH, Nierkens, S, Figdor, CG, Ruers, TJ, Adema, GJ. Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:699-710.
25. Dhodapkar, KM, Krasovsky, J, Williamson, B, Dhodapkar, MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:125-33.
26. Dominguez-Soto, A, Corbi, AL. Myeloid dendritic cell lectins and their role in immune responses. *Curr Opin Investig Drugs* 2007;8:910-20.
27. Drane, D, Gittleson, C, Boyle, J, Maraskovsky, E. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007;6:761-72.
28. Drane, D, Maraskovsky, E, Gibson, R, et al. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 2009;5:151-7.
29. Ebert, LM, Liu, YC, Clements, CS, et al. A long, naturally presented immunodominant epitope from NY-ESO-1 tumor antigen: implications for cancer vaccine design. *Cancer Res* 2009;69:1046-54.
30. Egger, MD, Petran, M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 1967;157:305-7.
31. Enomoto, Y, Bharti, A, Khaleque, AA, et al. Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J Immunol* 2006;177:5946-55.
32. Fifis, T, Gamvrellis, A, Crimeen-Irwin, B, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 2004;173:3148-54.
33. Figdor, CG, de Vries, IJ, Lesterhuis, WJ, Melief, CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10:475-80.
34. Geier, E, Pfeifer, G, Wilm, M, et al. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 1999;283:978-81.
35. Gil-Torregrosa, BC, Lennon-Dumenil, AM, Kessler, B, et al. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 2004;34:398-407.
36. Gilboa, E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007;117:1195-203.
37. Gilboa, E, Nair, SK, Lyerly, HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:82-7.
38. Goldberg, AL, Cascio, P, Saric, T, Rock, KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 2002;39:147-64.
39. Gralow, J, Ozols, RF, Bajorin, DF, et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2008;26:313-25.
40. Gromme, M, Neefjes, J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002;39:181-202.

41. Guernonprez, P, Saveanu, L, Kleijmeer, M, Davoust, J, Van Endert, P, Amigorena, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003;425:397-402.
42. Gunzer, M, Grabbe, S. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 2001;21:133-45.
43. Hadley, G, Derry, S, Moore, RA. Imiquimod for Actinic Keratosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Invest Dermatol* 2006.
44. Heath, WR, Belz, GT, Behrens, GM, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004;199:9-26.
45. Hoglund, S, Dalsgaard, K, Lovgren, K, Sundquist, B, Osterhaus, A, Morein, B. ISCOMs and immunostimulation with viral antigens. *Subcell Biochem* 1989;15:39-68.
46. Houde, M, Bertholet, S, Gagnon, E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003;425:402-6.
47. Hsu, FJ, Benike, C, Fagnoni, F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-8.
48. Jefford, M, Maraskovsky, E, Cebon, J, Davis, ID. The use of dendritic cells in cancer therapy. *Lancet Oncol* 2001;2:343-53.
49. Jurcic, JG. Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2005;7:339-46.
50. Jutras, I, Desjardins, M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:511-27.
51. Kadowaki, N, Ho, S, Antonenko, S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863-9.
52. Kalinski, P, Schuitemaker, JH, Hilkens, CM, Wierenga, EA, Kapsenberg, ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 1999;162:3231-6.
53. Kaminski, MS, Tuck, M, Estes, J, et al. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med* 2005;352:441-9.
54. Kassouf, W, Kamat, AM. Current state of immunotherapy for bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:1037-46.
55. Kato, Y, Sato, H, Ichikawa, M, et al. Existence of two pathways for the endocytosis of epidermal growth factor by rat liver: phenylarsine oxide-sensitive and -insensitive pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8507-11.
56. Kensil, CR, Patel, U, Lennick, M, Marciani, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol* 1991;146:431-7.
57. Kersten, GF, Crommelin, DJ. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 2003;21:915-20.
58. Kersten, GF, Spiekstra, A, Beuvery, EC, Crommelin, DJ. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). *Biochim Biophys Acta* 1991;1062:165-71.
59. Kloetzel, PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004;5:661-9.
60. Kovacsovics-Bankowski, M, Rock, KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;267:243-6.
61. Lenarczyk, A, Le, TT, Drane, D, et al. ISCOM based vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2004;22:963-74.

62. Leonard, JP, Furman, RR, Ruan, J, Coleman, M. New developments in immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Oncol Rep* 2005;7:364-71.
63. Levy, F, Burri, L, Morel, S, et al. The final N-terminal trimming of a subamino-terminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol* 2002;169:4161-71.
64. Lievre, A, Landi, B, Mitry, E, Taieb, J. [Antiangiogenic agents and gastrointestinal cancers]. *Gastroenterol Clin Biol* 2008;32:504-20.
65. Lovgren, K, Morein, B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). *Biotechnol Appl Biochem* 1988;10:161-72.
66. Maraskovsky, E, Brasel, K, Teepe, M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953-62.
67. Maraskovsky, E, Schnurr, M, Wilson, NS, Robson, NC, Boyle, J, Drane, D. Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunol Cell Biol* 2009;87:371-6.
68. Maraskovsky, E, Sjolander, S, Drane, DP, et al. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:2879-90.
69. Mellman, I, Steinman, RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-8.
70. Morein, B, Sundquist, B, Hoglund, S, Dalsgaard, K, Osterhaus, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 1984;308:457-60.
71. Morel, S, Levy, F, Burlet-Schiltz, O, et al. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000;12:107-17.
72. Morse, MA, Coleman, RE, Akabani, G, Niehaus, N, Coleman, D, Lyerly, HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:56-8.
73. Muul, LM, Spiess, PJ, Director, EP, Rosenberg, SA. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* 1987;138:989-95.
74. Nagata, Y, Ono, S, Matsuo, M, et al. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10629-34.
75. Norbury, CC, Hewlett, LJ, Prescott, AR, Shastri, N, Watts, C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 1995;3:783-91.
76. O'Keefe, M, Hochrein, H, Vremec, D, et al. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* 2003;101:1453-9.
77. Palliser, D, Guillen, E, Ju, M, Eisen, HN. Multiple intracellular routes in the cross-presentation of a soluble protein by murine dendritic cells. *J Immunol* 2005;174:1879-87.
78. Polakos, NK, Drane, D, Cox, J, et al. Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J Immunol* 2001;166:3589-98.
79. Ramirez, MC, Sigal, LJ. The multiple routes of MHC-I cross-presentation. *Trends Microbiol* 2004;12:204-7.
80. Randolph, GJ, Inaba, K, Robbiani, DF, Steinman, RM, Muller, WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999;11:753-61.
81. Regnault, A, Lankar, D, Lacabanne, V, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class

- I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999;189:371-80.
82. Reits, E, Neijssen, J, Herberts, C, et al. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2004;20:495-506.
83. Ridge, JP, Di Rosa, F, Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393:474-8.
84. Rissoan, MC, Soumelis, V, Kadowaki, N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-6.
85. Robson, NC, Beacock-Sharp, H, Donachie, AM, Mowat, AM. Dendritic cell maturation enhances CD8+ T-cell responses to exogenous antigen via a proteasome-independent mechanism of major histocompatibility complex class I loading. *Immunology* 2003;109:374-83.
86. Robson, NC, Beacock-Sharp, H, Donachie, AM, Mowat, AM. The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4+ T cells by immune stimulating complexes. *Immunology* 2003;110:95-104.
87. Robson, NC, Donachie, AM, Mowat, AM. Simultaneous presentation and cross-presentation of immune-stimulating complex-associated cognate antigen by antigen-specific B cells. *Eur J Immunol* 2008;38:1238-46.
88. Rock, KL, York, IA, Goldberg, AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 2004;5:670-7.
89. Rodriguez, A, Regnault, A, Kleijmeer, M, Ricciardi-Castagnoli, P, Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999;1:362-8.
90. Romani, N, Gruner, S, Brang, D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
91. Ronnberg, B, Fekadu, M, Morein, B. Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine* 1995;13:1375-82.
92. Rosen, L, Gordon, MS. Overview of anti-VEGF therapy and angiogenesis. Part 1: Angiogenesis inhibition in solid tumor malignancies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006;4:suppl 1-10; quiz 1-2.
93. Rosenberg, SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-4.
94. Rosenberg, SA, Lotze, MT, Muul, LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985;313:1485-92.
95. Sallusto, F, Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
96. Sancho, D, Mourao-Sa, D, Joffre, OP, et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 2008;118:2098-110.
97. Sapijaszko, MJ. Imiquimod 5% cream (Aldara) in the treatment of basal cell carcinoma. *Skin Therapy Lett* 2005;10:2-5.
98. Saric, T, Chang, SC, Hattori, A, et al. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 2002;3:1169-76.
99. Schadendorf, D, Ugurel, S, Schuler-Thurner, B, et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006;17:563-70.

100. Schnurr, M, Chen, Q, Shin, A, et al. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005;105:2465-72.
101. Schnurr, M, Galambos, P, Scholz, C, et al. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 2001;61:6445-50.
102. Schreurs, MW, Eggert, AA, Punt, CJ, Figdor, CG, Adema, GJ. Dendritic cell-based vaccines: from mouse models to clinical cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncog* 2000;11:1-17.
103. Schuurhuis, DH, van Montfoort, N, Ioan-Facsinay, A, et al. Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *J Immunol* 2006;176:4573-80.
104. Seifert, U, Maranon, C, Shmueli, A, et al. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 2003;4:375-9.
105. Shortman, K, Liu, YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-61.
106. Shortman, K, Naik, SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:19-30.
107. Shpetner, H, Joly, M, Hartley, D, Corvera, S. Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *J Cell Biol* 1996;132:595-605.
108. Sjolander, A, Cox, JC, Barr, IG. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* 1998;64:713-23.
109. Sjolander, A, Drane, D, Maraskovsky, E, et al. Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. *Vaccine* 2001;19:2661-5.
110. Steinman, RM, Nussenzweig, MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:351-8.
111. Sun, JC, Bevan, MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003;300:339-42.
112. Tacke, F, Randolph, GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006;211:609-18.
113. Tanaka, H, Demeure, CE, Rubio, M, Delespesse, G, Sarfati, M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000;192:405-12.
114. Touret, N, Paroutis, P, Terebiznik, M, et al. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 2005;123:157-70.
115. Trombetta, ES, Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005;23:975-1028.
116. Tuybaerts, S, Aerts, JL, Corthals, J, et al. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1513-37.
117. Villadangos, JA, Schnorrer, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7:543-55.
118. Wang, B, Kuroiwa, JM, He, LZ, Charalambous, A, Keler, T, Steinman, RM. The human cancer antigen mesothelin is more efficiently presented to the mouse immune system when targeted to the DEC-205/CD205 receptor on dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1174:6-17.
119. Windon, RG, Chaplin, PJ, Beezum, L, et al. Induction of lymphocyte recruitment in the absence of a detectable immune response. *Vaccine* 2000;19:572-8.
120. Wu, CA, Yang, YW. Induction of cell death by saponin and antigen delivery. *Pharm Res* 2004;21:271-7.

121. York, IA, Chang, SC, Saric, T, et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002;3:1177-84.
122. Young, JW, Szabolcs, P, Moore, MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995;182:1111-9.

8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AK	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cpm	<i>Counts per minute</i>
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HEV	Hohe endotheliale Venolen
HSA	Humanes Serum-Albumin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LK	Lymphknoten
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MoDC	Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen
MP-IVM	Multi Photonen- <i>In Vivo</i> Mikroskopie
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zelle
OVA	Ovalbumin
OVA/IC	Ovalbumin formuliert als Immunkomplex
OVA/ISCOMATRIX™	Ovalbumin formuliert als ISCOMATRIX™-Vakzine
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PI	Propidiumiodid
PMP	<i>Photomultiplier</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
Tetramere	Tetramere MHC-I-Komplexe
TH	T-Helfer

TIL	Tumor-Infiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TOPRO-3	To-Pro-3-Iodid
TZR	T-Zellrezeptor

9. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Aufnahme in die hervorragende Arbeitsatmosphäre seiner Abteilung. Insbesondere möchte ich mich für die außerordentliche Unterstützung und die Möglichkeit zum Besuch des CBR-Institutes an der Harvard Medical School im Sommer 2005 bedanken.

Für die Überlassung des interessanten Themas, die herausragende Betreuung und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinem Betreuer PD Dr. med. Max Schnurr von ganzem Herzen danken.

Herrn Prof. Dr. med. Veit Hornung und Dr. hum. biol. Klaus Heckelsmiller danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und das Erlernen zahlreicher immunologischer Methoden.

Meinem Mitdoktoranden Franz Bauernfeind danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Amanda Shin bin ich für die begleitende Unterstützung bei der Zellkultur außerordentlich dankbar.

Dem Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. C. Haass danke ich für die Möglichkeit, deren konfokales Mikroskop nutzen zu dürfen. Den Mitarbeitern Dr. rer. nat. Christoph Kaether und Dr. rer. nat. Michael Willem danke ich für Ihre Unterstützung bei der Erlernung der Mikroskopietechnik.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann danke ich für die Aufnahme in das hervorragende Programm zur Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU, das Medizinstudenten bei der Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit unterstützt.

10. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Bauer CA, Bauernfeind F, Sterzik A, **Orban M**, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A, Dauer M. *Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model.*
Gut. 2007 Sep;56(9):1275-82. Epub
 2007 Mar 29.; (journal impact factor, JIF 9,1)

2. Schnurr M., **Orban M.**, Robson N., Shin A., Endres S., Chen W., Cebon J., Maraskovsky E. *ISCOMATRIX™ adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II.*
J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):5152. (JIF 7,0)

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als *Abstract* in Fachzeitschriften veröffentlicht:

1. Max Schnurr*, **Martin Orban***, Eugene Maraskovsky, Marc Dauer, Stefan Endres, Andreas Eigler
 * *M.S. und M.O. haben zu gleichen Anteilen beigetragen*
Entwicklung einer Tumorstoffe mit Immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) und dendritischen Zellen
Z Gastroenterol 2005; 43: 1158 – 1184

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen in Form von Postern vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. Schnurr M., Chen Q., Shin A., Chen W., Toy T., **Orban M.**, Jenderek C., Green S., Milcradovic L., Drane D., Davis L.D., Maraskovsky E. and Cebon J.
 Targeting of the tumor antigen NY-ESO-1 to two distinct processing pathways induces effective presentation on MHC class I and II by human dendritic cells
8th International Symposium on Dendritic Cells, Brügge, Belgium, 2004.
2. Max Schnurr, Eugene Maraskovsky, Qian Chen, Amanda Shin, Weisan Chen, Marc Dauer, **Martin Orban**, Walter Heldwein, Stefan Endres, Andreas Eigler, Jonathan Cebon
 Entwicklung einer dendritischen Zell-basierten Tumorstoffe zur Behandlung von Patienten mit NY-ESO-1-positiven Tumoren
XXXII. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Garmisch-Partenkirchen, 2004.
3. Bauernfeind F., Bauer C., Schnurr M., **Orban M.**, Kiefl R., Endres S., Eigler A., Dauer M.
 Combination with chemotherapy enhances the therapeutic efficacy of a dendritic cell-based vaccine in a murine model of pancreatic cancer
Tegernsee Conference on Immunotherapy of Solid Cancer, 2005.
4. Bauernfeind F., Bauer C., Schnurr M., **Orban M.**, Kiefl R., Heldwein W., Endres S., Eigler A., Dauer M.
 Kombination einer dendritischen Zellstoffe mit Gemcitabin und selektiven Cyclooxygenase-2 Inhibitoren in einem murinen Pankreaskarzinommodell

Jahrestagung der DGVS, Köln, 2005.

5. Max Schnurr*, **Martin Orban***, Christian Bauer, Franz Bauernfeind, Eugene Maraskovsky, Marc Dauer, Stefan Endres, Andreas Eigler
* *M.S. und M.O. haben zu gleichen Anteilen beigetragen*
Entwicklung einer Tumorstoffimpfung mit immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) und dendritischen Zellen
XXXIII. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Amberg, 2005
6. **Orban M.**, Bauernfeind F., Zaborsky N., Heckelsmiller K., Shin A., Kisser U., Maraskovsky E., Endres S., Dauer M., Eigler A., Schnurr M.
Tumorstoffimpfung mit dendritischen Zellen und immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs)
112. Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 2006
7. **Orban M.**, Shin A., Chen W., Endres S., Davis I.D., Cebon J., Maraskovsky E. and Schnurr M.
Tumor antigen formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant is rapidly translocated from endosome into cytosol and effectively cross-presented by human DC
9th International Symposium on Dendritic Cells, Edinburgh, Scotland, Great Britain, 2007
8. Kisser U., **Orban M.**, Zaborsky N., Heckelsmiller K., Bauernfeind F., Dauer M., Eigler A., Endres S., Maraskovsky E. and Schnurr M.
Effects of antigen formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant on draining lymph nodes and the induction of CTL responses
9th International Symposium on Dendritic Cells, Edinburgh, Scotland, Great Britain, 2007