

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 von Immunstimulatorischen Komplexen (ISCOM) auf
die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozytenpopulationen
im drainierenden Lymphknoten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Kisser

aus Gunzenhausen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dolores J. Schendel
Prof. Dr. Judith P. Johnson

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2011

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Impfstoffe in der Tumorthherapie	1
1.2 Dendritische Zellen (DC)	3
1.2.1 DC als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem	3
1.2.2 Subtypen dendritischer Zellen bei Mäusen	6
1.2.2.1 Gewebe-abgeleitete DC	7
1.2.2.2 Blut-abgeleitete DC	8
1.2.3 Therapeutischer Einsatz von DC in der Tumorthherapie	10
1.3 Adjuvantien in der Tumorthherapie	12
1.3.1 Immunstimulatorische Komplexe (ISCOM) - Zusammensetzung und Eigenschaften	13
1.3.2 ISCOM-Vakzine in der Tumorthherapie	14
1.3.3 OVA/ISCOM - eine ISCOMATRIX™-Vakzine mit Ovalbumin als Modellantigen	15
1.4 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Substanzen	16
2.1.1 Ovalbumin (OVA)	16
2.1.2 ISCOMATRIX™-Adjuvans	16
2.1.3 ISCOM-Vakzine	16
2.2 Versuchstiere	17
2.3 Praktische Durchführung der Versuche	17
2.3.1 Anästhesie der Mäuse und Beendigung der Versuche	17
2.3.2 Subkutane Injektionen	18
2.3.3 Präparation der Lymphknoten	18
2.3.4 Gewinnung der Zellen aus dem Lymphknoten und Zellzählung	19
2.3.5 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen	20
2.3.6 Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels FACS	22
2.3.7 Auswertung der FACS-Daten	23
2.3.8 Zytokindetektion mittels ELISA	23
2.3.9 Färbung nach Pappenheim	24
2.3.10 Analyse der Vakzine-induzierten CD8 ⁺ T-Zell-Antwort	25
2.3.11 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität OVA-spezifischer CTL	26
2.3.12 Tumorinduktion	27

2.3.13 Bestimmung der Anti-OVA-Antikörper-Titer im Serum	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Auswirkungen von ISCOMATRIX™ auf die zelluläre Zusammensetzung des drainierenden Lymphknotens	28
3.1.1 Größenzunahme des drainierenden Lymphknotens nach subkutaner Injektion von ISCOMATRIX™	28
3.1.2 Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen in den drainierenden Lymphknoten nach Injektion von ISCOMATRIX™	30
3.2 Aktivierung verschiedener Leukozytenpopulationen und Zytokinproduktion	36
3.2.1 Aktivierung von Lymphozyten und NK-Zellen durch die ISCOM-Vakzine	36
3.2.2 Einfluss des ISCOMATRIX™-Adjuvans auf DC-Populationen im drainierenden Lymphknoten	39
3.2.3 Induktion von IL-6 durch die ISCOM-Vakzine	42
3.3 Zelluläre Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch Leukozytenpopulationen des drainierenden Lymphknotens	43
3.3.1 Zelluläre Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch DC	43
3.3.2 Endozytose der ISCOM-Vakzine durch Granulozyten	46
3.4 Induktion antigenspezifischer CTL durch die ISCOM-Vakzine	47
3.5 Zytotoxische Aktivität OVA-spezifischer CTL	49
3.6 Antitumorale Immunität gegen OVA-exprimierende Tumore	50
3.7 Induktion OVA-spezifischer Antikörper durch die ISCOM-Vakzine	51
4 Diskussion	53
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4.1.1 Rekrutierung von Leukozytenpopulationen in den ISCOM-Vakzine drainierenden Lymphknoten und deren Aktivierung	53
4.1.2 Aktivierung von DC im drainierenden Lymphknoten und Aufnahme der ISCOM-Vakzine	54
4.1.3 Induktion antigenspezifischer CTL und Antikörperproduktion	54
4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur	55
4.2.1 Antitumorale Aktivität des Immunsystems und ihre Grenzen	55
4.2.2 Konzentrierung verschiedener Immunzellepopulationen im drainierenden Lymphknoten	57
4.2.3 Dauer der DC-Migration von der Haut in den drainierenden	

Lymphknoten.....	58
4.2.4 Effektive Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch CD8 α^+ DC.....	59
4.2.5 Induktion der DC-Reifung durch ISCOMATRIX™.....	60
4.2.6 Kreuzpräsentation der ISCOM-Vakzine auf MHC-I.....	61
4.2.7 IL-12-Produktion durch DC.....	62
4.2.8 IFN- γ -Sekretion durch aktivierte NK- und NKT-Zellen nach Injektion der ISCOM-Vakzine.....	62
4.2.9 Induktion einer humoralen Immunantwort durch die ISCOM-Vakzine....	64
4.2.10 ISCOMATRIX™-vermittelte Entzündungsreaktion im drainierenden Lymphknoten.....	64
4.2.11 Reduktion der Antigenosidose durch Verwendung von ISCOMATRIX™.	65
4.3 Klinische Bedeutung von ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen.....	66
5 Zusammenfassung	69
6 Literaturverzeichnis	70
7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	84
8 Danksagung	87
9 Veröffentlichungen	88
10 Lebenslauf	90

1 Einleitung

1.1 Impfstoffe in der Tumorthherapie

Impfstoffe finden routinemäßige Verwendung zur Prävention von bakteriellen und viralen Infektionen. Ein moderneres und stark beforschtes Anwendungsgebiet des Prinzips der Immunisierung ist daneben die Therapie von malignen Tumoren, denen durch andere Therapieverfahren wie Chemotherapie, Strahlentherapie und operative Entfernung oft nur ungenügend begegnet werden kann. Zwar gibt es auch in der konventionellen Tumorthherapie Fortschritte, oftmals kann jedoch das entscheidende Ziel, nämlich eine signifikante Verbesserung der Lebenserwartung des Patienten, nicht erreicht werden. So gilt beispielsweise für das metastasierte Melanom, dass bei Anwendung verschiedener Chemotherapeutika die Rate der Patienten mit messbarem Ansprechen auf die Therapie unter 20% liegt. Randomisierte klinische Studien haben gezeigt, dass auch mit verschiedenen Kombinationstherapien keine guten Erfolge bezüglich einer Verbesserung der Lebenserwartung erzielt werden können [Mandara 2006]. Nach Gabe von Temozolomide und Cisplatin konnte in einer klinischen Phase-II-Studie die Tumorprogression im Vergleich zur Monotherapie lediglich um durchschnittlich 72 Tage verzögert werden, die Gesamtüberlebenszeit der Probanden betrug im Schnitt 120 Tage [Tas 2005]. Auch bei anderen Krebserkrankungen wie beispielsweise dem Lungenkarzinom können Chemotherapien nur unbefriedigende Therapieerfolge erwirken. Eine kombinierte Therapie mit Carboplatin, Docetaxel und Gemcitabine konnte im Rahmen einer Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom eine Einjahresüberlebensrate von nur etwa 50% sowie eine durchschnittliche Überlebenszeit von etwa 13,5 Monaten bewirken [Pectasides 1999].

Die Dringlichkeit neuer Therapiestrategien in der Onkologie kann mit solchen Daten verdeutlicht werden. Ein vielversprechender Ansatz, eine Alternative zu herkömmlichen Therapiemodalitäten zu finden, ist die aktive Immunisierung mit tumorspezifischen Antigenen. Hierbei soll die Potenz des körpereigenen Immunsystems genutzt werden, Tumoren effektiv zu bekämpfen. Die Abwehrzellen sollen – wie bei einer Impfung gegen Antigene von Mikroorganismen – für Proteine sensibilisiert werden, die entweder tumorspezifisch sind oder zumindest von Tumorzellen in stärkerem Maße exprimiert werden als von gesunden Zellen. Leider sind jedoch die Immunantworten gegen diese Tumorantigene in der Regel nicht ausreichend für eine effektive

Tumorkontrolle. Tumore bedienen sich verschiedener Mechanismen, um dem Immunsystem zu entkommen. So besagt die Theorie des *Cancer Immunoediting*, dass im Zuge eines dreistufigen Entwicklungsprozesses (*Elimination* → *Equilibrium* → *Escape*) Tumorzellen selektiert werden, die eine sehr geringe Immunogenität aufweisen. Diese Zellen werden vom Immunsystem nicht als körperfremd erkannt und können so im Organismus überleben. Dies kann unter anderem dadurch erreicht werden, dass durch eine Anhäufung von Defektmutationen im β -2-Mikroglobulin-Gen der stark proliferierenden Tumorzellen die MHC-gebundene Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche abnimmt. Daneben sind Tumorzellen in der Lage, tumorspezifische regulatorische T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften zu induzieren. Diese und weitere Mechanismen führen dazu, dass Tumore also in gewissem Maße vom Immunsystem toleriert werden [Steinman 2003, Rabinovich 2007]. Ziel der Immuntherapie ist es, diese Toleranz durch Tumorstimulation zu durchbrechen. Um dies zu erreichen bedient man sich einerseits eines bestimmten Typs von Antigenpräsentierenden Zellen – der dendritischen Zellen (DC) – und zum anderen werden neue Adjuvantien entwickelt. Adjuvantien sind wirkungsverstärkende pharmazeutische Hilfsstoffe, die zur Steigerung der Immunantwort auf eine verabreichte Substanz eingesetzt werden. Sowohl der Einsatz von DC als auch die Verwendung neuer Adjuvantien konnten dazu beitragen, Erfolge in der Tumorthherapie zu erzielen. So zeigten in einer Tumorstimulationsstudie sieben von 16 Melanompatienten eine signifikante klinische Antwort nachdem sie mit tumorantigenbeladenen DC (sogenannten „Mono-DC“, die aus mononukleären Zellen des Blutes gewonnen wurden) behandelt worden waren. Bei zwei Patienten konnte sogar eine vollständige Tumorregrression erreicht werden [Nestle 1998]. Ferner konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass TLR-Liganden, wie CpG-Oligodesoxynukleotide als Adjuvantien zu einer effektiven Bekämpfung von experimentellen Tumoren führen [Carpentier 2000, Kawarada 2001, Heckelsmiller 2002]. Auf der Basis präklinischer Erkenntnisse über die potentielle Wirksamkeit von CpG-Oligodesoxynukleotiden im Rahmen der Tumorthherapie wurden klinische Studien mit diesen Adjuvantien durchgeführt. Manegold et al. kombinierten das CpG-Oligodesoxynukleotid PF-3512676 mit einer Taxan/Platin-Standardchemotherapie. 111 unbehandelte Patienten, die an einem nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinom erkrankt waren, wurden in zwei Gruppen unterteilt und erhielten entweder die Taxan/Platin-Standardchemotherapie oder die Kombination aus PF-3512676 und Taxan/Platin. Die Patienten, welche die Taxan/Platin-Standardchemotherapie erhielten, zeigten eine Ansprechrate von 19 %, die durchschnittliche Gesamtüberlebensrate lag bei 6,8 Monaten. Bei den Patienten, die zusätzlich das CpG-Oligodesoxynukleotid PF-3512676 erhalten hatten, lag die

Ansprechrate bei 38 %, die durchschnittliche Überlebenszeit bei 12,3 Monaten [Manegold 2008].

Damit die Erfolge bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen in dieser Richtung weiter ausgebaut werden können, ist die Erprobung neuer Adjuvantien Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Dendritische Zellen (DC)

1.2.1 DC als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem

Das Immunsystem des Säugers kann in das unspezifische (angeborene) und das spezifische, adaptive Immunsystem unterteilt werden. Ersteres ist für die schnelle Reaktion auf Pathogene verantwortlich, während letzteres für die spezifische Bekämpfung eines bestimmten potentiellen Pathogens und für die Etablierung des so genannten immunologischen Gedächtnisses zuständig ist. Eine Sonderstellung in diesem System nehmen die DC ein, die ein Bindeglied zwischen der unspezifischen und der spezifischen Abwehr darstellen.

DC sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die sich aus hämatopoetischen Zellen im Knochenmark ableiten. Dort differenzieren sie sich aus Vorläuferzellen unter dem Einfluss bestimmter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) oder Flt-3-Ligand (*fms-like tyrosine kinase-3 ligand*). Es lassen sich funktionell drei Differenzierungsstufen unterscheiden: DC-Vorläufer, unreife DC und reife DC [O'Neill 2004, Karsunky 2003].

Unreife DC sind als eine Art Wächterzellen in verschiedensten Geweben zu finden und haben in diesem Zustand die ausgeprägte Fähigkeit, Antigene durch Phagozytose, Endozytose oder Pinozytose aufzunehmen. So wird durch diese Zellen ständig das Vorhandensein körpereigener, aber auch körperfremder, möglicherweise von Pathogenen stammender Moleküle geprüft. Verschiedenartige Rezeptoren auf der Zelloberfläche dienen dabei der Aufnahme diverser Partikel, die sowohl von körpereigenen Zellen als auch von Mikroorganismen stammen können. So besitzen DC beispielsweise F_c-Rezeptoren um Immunkomplexe aufzunehmen, Scavenger-Rezeptoren (beispielsweise CD36) um Hitzeschockproteine absterbender Zellen oder apoptotische Zellen selbst zu phagozytieren und C-Type Lectin-Like Rezeptoren (LLR)

für die Aufnahme verschiedener Pathogene. Zu diesen LLR gehören beispielsweise der *Macrophage-Mannose-Receptor* (MMR), DEC-205 oder DC-SIGN, ein Rezeptor, der für die Erkennung von HIV1 verantwortlich ist [Peiser 2002, Cambi 2003, Geijtebeek 2000].

Neben diesen der Antigenaufnahme dienenden Rezeptoren befinden sich in der Membran der DC auch so genannte *Toll-like-Rezeptoren* (TLR). Sie sind auf die Erkennung von Fremdantigenen spezialisiert, führen jedoch – anders als die LLR – nicht zu deren Phagozytose, sondern zur Aktivierung der DC. Diese Aktivierung kann ferner durch Ligandenbindung von Zytokinrezeptoren (beispielsweise für TNF- α) bei Vorhandensein einer Entzündung bzw. einer Gewebsschädigung oder durch Zell-Zell-Kontakte zwischen DC und anderen Abwehrzellen (beispielsweise CD40–CD40L-Interaktionen) erfolgen und stellt ein Gefahrensignal für die DC dar [Ito 2009, Hernandez 2007].

Die Aktivierungssignale induzieren eine Reihe zellbiologischer Prozesse, die unter dem Begriff „DC-Reifung“ zusammengefasst werden. Dabei verliert die DC ihre Phagozytosefähigkeit und gewinnt dafür das Potential, durch eine veränderte Expression von Chemokinrezeptoren (CCR) von einem Entzündungsherd in regionale sekundäre lymphatische Organe (beispielsweise Lymphknoten) zu migrieren. Reife DC exprimieren den Chemokinrezeptor 7 (CCR7), dessen Liganden CCL19 und CCL21 von T-Lymphozyten in Lymphknoten und von hochendothelialen Venolen sekundärer lymphatischer Organe exprimiert werden [O'Neill 2004]. CCR7 wird auch als *lymph node homing receptor* bezeichnet [Langenkamp 2000]. Reife DC haben darüber hinaus die Fähigkeit, aufgenommene Antigene zu prozessieren und die entstehenden Epitope in hoher Dichte, gebunden an MHC-Moleküle, auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Dabei besitzen die DC die besondere Fähigkeit, exogene Antigene nicht nur mit Hilfe von MHC-II-Molekülen, sondern auch gebunden an MHC-I-Molekülen, zu präsentieren. Die Präsentation exogener Antigene in Verbindung mit MHC-I wird als Kreuzpräsentation bezeichnet [Mellman 2001]. Eine weitere wichtige Veränderung, die mit der DC-Reifung einhergeht, ist die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD83 oder CD86 auf der Zelloberfläche. Diese Moleküle dienen der Interaktion mit anderen Abwehrzellen, insbesondere T-Lymphozyten. So interagiert CD86 beispielsweise mit CD28 sowie CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) auf der Oberfläche von T-Zellen [Fuse 2006, Lozanoska-Ochser 2008].

Die ausgeprägte Fähigkeit auf Pathogene vermittelt durch Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) zu reagieren und nach Aktivierung in drainierende Lymphknoten zu migrieren, wo sie aufgenommene Antigene T- und B-Zellen präsentieren, machen DC zu einem Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. In sekundären lymphatischen Organen, wie beispielsweise Lymphknoten, treten DC mit T-Lymphozyten in direkten Kontakt und präsentieren ihnen die aufgenommenen Antigene. Im Fall einer Aktivierung der DC werden die T-Zellen, die einen passenden T-Zell-Rezeptor besitzen, durch Bindung an den Antigen-MHC-Komplex und durch Kontakt zu den kostimulatorischen Molekülen der DC aktiviert. Durch die Fähigkeit der DC zur Kreuzpräsentation können sie nicht nur mit CD4⁺ T-Zellen, sondern auch mit CD8⁺ T-Zellen, den Vorläufern zytotoxischer T-Zellen, in Kontakt treten. So werden die antigenspezifischen T-Lymphozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt, wodurch die Etablierung einer an das jeweilige Pathogen angepassten Immunantwort, inklusive der Bildung von Gedächtniszellen, erfolgt. Da verschiedene Fremdanigene verschiedene Immunantworten erfordern, steuern DC die Art der T-Zell-Reaktion. Je nachdem, welcher Stimulus auf die DC einwirkt, können sie durch Freisetzung entsprechender Zytokine die Differenzierung der T-Zellen beeinflussen. Schütten DC beispielsweise nach Kontakt zu LPS IL-12p70 aus, so entwickeln sich CD4⁺ T-Lymphozyten vorwiegend zu T_{H1}-Zellen, die IFN- γ produzieren und damit die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen fördern. Nehmen DC dagegen Antigene von Eiern aus *Schistosoma* auf, bleibt die Freisetzung von IL-12 aus und es erfolgt eine T_{H2}-Polarisation, die eine humorale Immunantwort zur Folge hat [O'Neill 2004]. DC können neben T-Zellen auch B-Zellen und NK-Zellen aktivieren [Balazs 2002, Ferlazzo 2004].

DC induzieren nicht nur Immunantworten, sondern üben auch tolerogene Funktionen aus. Auch in intaktem Gewebe nehmen sie Antigene aus ihrer Umgebung auf und präsentieren diese, wobei es sich dabei in der Regel um körpereigene Antigene handelt, gegen die eine Immunantwort unerwünscht ist. Da in diesem Fall kein Kontakt der DC zu pathogenassoziierten molekularen Mustern (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) oder proinflammatorischen endogenen Gefahrensignalen (*damage associated molecular pattern*, DAMP) stattfindet, erfolgt kein aktivierendes Signal und die Zellen verweilen im unreifen Zustand. Dennoch können sie mit naiven T-Lymphozyten in Kontakt treten, sofern diese den passenden T-Zell-Rezeptor für das präsentierte Selbstantigen besitzen. Dieser Kontakt führt jedoch zur Toleranzinduktion. DC können Antigene also in einer immunogenen oder in einer tolerogenen Art und Weise präsentieren, je nachdem ob sie zugleich Kontakt zu Gefahrensignalen haben

oder nicht [Finkelman 1996]. Ob bestimmte Subtypen von DC auch im reifen Zustand tolerogen sein können, ist umstritten [Villadangos 2005]. Eine Toleranzinduktion erfolgt dadurch, dass reaktive T-Zellen keine Überlebenssignale von DC erhalten. Darüber hinaus können tolerogene DC die Vermehrung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) induzieren, die wiederum immunsuppressiv wirken [Steinman RM 2003].

1.2.2 Subtypen dendritischer Zellen bei Mäusen

Die vorliegende Arbeit basiert auf Tierversuchen, die an Mäusen durchgeführt wurden. Bei Mäusen, wie auch bei Menschen, lässt sich die Gesamtheit der DC in Subpopulationen unterteilen. Die verschiedenen DC-Typen unterscheiden sich voneinander hinsichtlich ihres Potentials zur Antigenpräsentation, ihres Zytokinproduktionsmusters und in der Art und Weise, wie sie mit anderen Zellen interagieren.

Alle DC leiten sich von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Dabei ist der genaue Entstehungsweg der einzelnen Subtypen noch unvollständig aufgeklärt. Es gibt zwei Modelle für die Entstehung der DC-Vielfalt: Das funktionale Plastizitätsmodell geht davon aus, dass die DC einer gemeinsamen Linie angehören und die Subtypen je nach äußeren Gegebenheiten ineinander übergehen können. Das spezialisierte Zellreihenmodell geht dagegen von mehreren, sich separat entwickelnden Zellreihen aus, welche DC unterschiedlicher Spezialisierung hervorbringen [Shortman 2002]. Für beide Modelle finden sich Belege. Einerseits können sowohl aus myeloiden wie auch aus lymphoiden hämatopoetischen Vorläufern alle DC-Subtypen – sowohl myeloid als auch lymphoid – hervorgehen [Shortman 2002], was für das erstgenannte Modell sprechen würde. Andererseits lassen sich diese dann nicht mehr ineinander überführen [Kamath 2000]. Da noch recht wenig über die Übergangsformen zwischen frühen Vorläufern und Endprodukten bekannt ist, lässt sich schwer sagen, wann eine Trennung der Entwicklungslinien verschiedener DC-Subtypen stattfindet. Ferner ist die Frage, inwieweit bestimmte DC unter besonderen Bedingungen auf alternativen Wegen entstehen können, Gegenstand aktueller Forschung. So nimmt man beispielsweise an, dass DC *in vivo* auch aus Monozyten hervorgehen können, wenn im Organismus eine Entzündung stattfindet [Naik 2006, Ginhoux 2006].

DC und ihre Subtypen lassen sich anhand der Expression von Oberflächenmarkern identifizieren und unterscheiden. Es handelt sich dabei um zellmembranständige

Proteine, die verschiedene Funktionen erfüllen, beispielsweise die der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten oder der Aufnahme von Antigenen. Ein Oberflächenmolekül, das sich auf allen bisher bekannten DC von Mäusen findet, ist CD11c, ein fibrinogenbindendes Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine [Murphy 2007].

Man unterscheidet zunächst zwei Gruppen von DC, die im angloamerikanischen Sprachgebrauch als *tissue-derived dendritic cells* beziehungsweise *blood-derived dendritic cells* bezeichnet werden. Erstere findet man nur in den Lymphknoten, während letztere sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz zu finden sind.

1.2.2.1 Gewebe-abgeleitete DC (*Tissue-derived dendritic cells*)

Die Untergruppe der *tissue-derived DC* der Haut lässt sich unterteilen in die interstitiellen DC und die Langerhans-Zellen (LC). LC wurden bereits im Jahre 1868 durch Langerhans entdeckt [Langerhans]. Beide Subtypen lassen sich in der Haut finden und wandern von dort sowohl im *steady state* als auch verstärkt unter dem Einfluss von Fremdartigen in die Lymphknoten der Haut [Itano 2003], weshalb sie auch als migratorische DC zusammengefasst werden.

Interstitielle DC sind auf den bindegewebigen Teil der Haut – die Dermis – beschränkt. Sie kommen ferner in Geweben anderer Organe vor, von wo aus kontinuierlich eine Migration dieser Zellen in regionale Lymphknoten stattfindet [Henri 2001].

Die Langerhans-Zellen sind in der epithelialen Schicht der Haut, der Epidermis, ansässig und finden sich zusätzlich in Lymphknoten, welche die Lymphe der Haut drainieren. Sie bilden ein dichtes Netzwerk von Abwehrzellen, das - zusammen mit dem Organ Haut - die gesamte Körperoberfläche als erste Barriere gegen äußere Umwelteinflüsse schützt. Ob Langerhans-Zellen im Lymphknoten selbst mit T-Zellen in Kontakt treten, um diese zu aktivieren, oder ob sie in der Haut internalisierte Antigene zu anderen DC-Typen transportieren, ist letztlich nicht geklärt [Ginhoux 2006].

Ein Oberflächenmolekül, das von beiden migratorischen DC-Subtypen exprimiert wird, ist CD205, ein Rezeptor aus der Gruppe der Typ-I-Transmembranproteine, der die Internalisierung und die Präsentation von Antigenen vermittelt [Jiang 1995, Wang 2009]. Dabei exprimieren interstitielle DC moderate Mengen und LC hohe Mengen

dieses Moleküls. Die Langerhans-Zellen exprimieren im Lymphknoten ferner schwach CD8 α , die interstitiellen DC hingegen nicht. In der Haut exprimieren LC ebenfalls kein CD8 α [Henri 2001].

Zusammen machen die migratorischen DC einen beträchtlichen Teil der im Haut-drainierenden Lymphknoten vorhandenen DC aus, wobei genaue Zahlen in der Literatur schwer zu finden sind. Etwa 20% aller Lymphknoten-DC entfallen auf die interstitiellen DC [Shortman 2002]. Für die Langerhans-Zellen finden sich in verschiedenen Veröffentlichungen Zahlen zwischen 25% [Henri 2001] und 33% [Shortman 2002]. Die Variabilität beruht dabei wohl nicht zuletzt auf den unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Mäuse. Die Zahlen gelten für gesunde Labormäuse.

1.2.2.2 Blut-abgeleitete DC (*Blood-derived dendritic cells*)

Auch die *blood-derived DC* lassen sich weiter in Subtypen unterteilen, die sich aus einer unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen ergeben. Eine Untergruppe stellen die CD8 α^+ DC dar, die auch als lymphoide DC bezeichnet werden und als einzige der *blood-derived DC* CD8 α exprimieren. Die CD8 α -Expressionsstärke übertrifft deutlich die der Langerhans-Zellen. Auch CD8 α^+ DC besitzen den Oberflächenmarker DEC-205. Ursprünglich ging man davon aus, dass sie nur aus lymphoiden Vorläufern hervorgehen. Inzwischen weiß man, dass sie auch aus myeloiden Vorläufern entstehen können [Shortman 2002]. CD8 α^+ DC nehmen eine zentrale Rolle ein, da sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen. Einige Jahre galten die CD8 α^+ DC als die einzige Population, die *in vivo* aufgenommenes Antigen über MHC-I-Moleküle präsentiert. So kamen den Haan und Mitarbeiter in ihrer im Jahre 2000 veröffentlichten Arbeit zu dem Schluss, dass nur CD8 α^+ DC, nicht jedoch CD8 α^- DC *in vivo* zur Aktivierung von CTL durch Kreuzpräsentation in der Lage sind [den Haan 2000]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Pooley et al. in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2001 [Pooley 2001]. Diese Ansicht wurde später von anderen Wissenschaftlern angezweifelt. Schulz & Reis e Sousa kamen zu dem Ergebnis, dass auch CD8 α^- DC unter bestimmten Umständen zur Kreuzpräsentation in der Lage sind [Schulz 2002]. Eine besondere Stellung wurde den CD8 α^+ DC auch von anderen Autoren zugeschrieben, die beobachtet hatten, dass sie unter bestimmten aktivierenden Bedingungen viel mehr IL-12p70 produzieren als andere DC-Typen. Allerdings stammen diese Beobachtungen aus *in-vitro*-Versuchen

und hängen von der Art des verwendeten Stimulus ab [Pulendran 2001]. Der Anteil der $CD8\alpha^+$ DC an der Gesamtheit der DC im Lymphknoten beträgt etwa 17 % [Shortman 2002].

Unterschieden werden die eben beschriebenen lymphoiden DC von den myeloiden DC, die ihren Namen der Expression des myeloiden Markers CD11b (auch unter der Bezeichnung Mac-1 bekannt) verdanken, der bei den $CD8\alpha^+$ DC nicht zu finden ist [Anjuère 1999]. Myeloide DC besitzen auf ihrer Oberfläche weder $CD8\alpha$ noch CD205.

Daneben existieren noch weitere Subtypen von DC, die sich funktionell und morphologisch von den anderen Subpopulationen abgrenzen. Die plasmazytoiden DC (pDC) sind durch ihre morphologische Ähnlichkeit zu Plasmazellen sowie die Expression von CD45 (B220) und LY-6C (Gr1) gekennzeichnet. Ihnen fehlt der myeloide Marker CD11b. In C57BL/6-Mäusen machen sie nur einen kleinen Teil der DC aus [Nakano 2001]. Im Gegensatz zu anderen DC exprimieren plasmazytoide DC nur schwach CD11c. Charakteristisch für plasmazytoide DC ist die Produktion von Typ-I-Interferon und IL-12 auf einen viralen Stimulus hin, was vermuten lässt, dass sie vor allem bei der Induktion einer Immunantwort gegen Viren eine Rolle spielen. Das Potential dieser Zellen, Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren, scheint sehr gering zu sein [Asselin-Paturel 2001]. Dennoch könnten sie auch bei der Tumorbekämpfung eine Rolle spielen. Suto und Mitarbeiter konnten zeigen, dass plasmazytoide DC nach Stimulierung mit IL-4, einem Zytokin, welches eine T_{H2} -Polarisation bewirkt, IFN- γ produzieren, welches der T_{H2} -Polarisation entgegenwirkt [Suto 2005]. Durch Steuerung der Immunantwort in Richtung einer T_{H1} -Polarisation mit Hilfe von IFN- γ könnten plasmazytoide DC zur Entstehung von zytotoxischen T-Zellen beitragen. In Abgrenzung zu den plasmazytoiden DC fasst man die zuvor beschriebenen Subtypen unter der Bezeichnung „konventionelle DC“ zusammen.

Eine Übersicht über die verschiedenen DC-Subtypen und ihrer Oberflächenmarker gibt

Tabelle 1.

DC-Subtyp	CD11c	CD11b	CD8a	CD45	CD205	Ly6C	MHCII
Interstitielle DC	+++	++	-	-	++	-	+++
Langerhans-Zellen	+++	+	++	-	+++	-	+++
Lymphoide DC	+++	-	+++	-	+	-	+
Myeloide DC	+++	++	-	-	-	-	+
Plasmazytoide DC	++	-	-/+	++	-	++	+

Tabelle 1: Verschiedene DC-Subtypen in Lymphknoten und deren Oberflächenmarker.

1.2.3 Therapeutischer Einsatz von DC in der Tumortherapie

Wie in Kapitel 1.1 bereits angesprochen, ist es der körpereigenen Immunabwehr möglich, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Darauf deuten unter anderem Fälle spontaner Tumorrückbildungen hin [Nakajima 2006]. Der Grund, warum sich Tumore dennoch etablieren können, liegt in der Tatsache, dass die Tumorzellen einen ständigen Wettkampf mit dem Immunsystem führen. Wenn es Tumorzellen gelingt, dem Immunsystem durch geeignete Selbstschutzmaßnahmen zu entkommen, können sie vom Immunsystem ungestört existieren und proliferieren. Dabei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle, so zum Beispiel das in Kapitel 1.1 beschriebene *Immunoediting* oder die Schaffung eines tolerogenen Mikromilieus [Zou 2005]. Teilweise gehen Tumorzellen sogar aktiv gegen das Immunsystem vor, beispielsweise indem sie den Fas-Liganden exprimieren und damit bei T-Zellen Apoptose induzieren [Ibrahim 2006].

Bei der Beseitigung kranker – das heißt virusinfizierter oder entarteter – Zellen spielen CTL eine entscheidende Rolle. Sie erkennen Antigene mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren, die ihnen - an die Peptidbindungsstelle von MHC-I-Molekülen gebunden – präsentiert werden [Pamer 1998]. Für diese Antigenpräsentation sind die DC von zentraler Bedeutung, denn nur sie haben die Fähigkeit, exogene Antigene in Form von Peptid-MHC-I-Komplexen zu präsentieren, was für die Induktion von CTL erforderlich ist. Andere Antigen-präsentierende Zellen hingegen präsentieren exogene Antigene ausschließlich auf MHC-II-Molekülen und können somit nur CD4⁺ T-Zellen aktivieren. Dies liegt darin begründet, dass DC über einen Mechanismus verfügen, der es ihnen erlaubt, aufgenommene Antigene vom Endosom in das Zytosol freizusetzen. Damit gelangen die exogenen Antigene in den zytosolischen Prozessierungsprozess, der in der Assoziation von Peptiden mit MHC-I-Molekülen endet und bei anderen Zelltypen nur für endogene Proteine zugänglich ist. Der genaue Transportmechanismus, der Antigene vom Endosom in das Zytosol befördert, ist unbekannt. Rodriguez et al. schließen eine unspezifische Permeabilisierung der endosomalen Membran aus und postulieren einen neuen, speziellen Membrantransportmechanismus oder die Permeabilisierung eines speziellen postendosomalen Vesikels, in das nur kleinere Moleküle gelangen [Rodriguez 1999]. Dieser Transportmechanismus scheint auf DC beschränkt zu sein. Zwar gibt es auch Veröffentlichungen über die Kreuzpräsentation durch andere antigenpräsentierende Zellen, etwa Makrophagen, jedoch ist sie dort nur unter unphysiologischen Bedingungen möglich, beispielsweise bei extrem hoher Antigenkonzentration, Induktion der Makropinozytose durch externe Stimuli oder durch

artifizielle Permeabilisierung der Endosomenmembran [Norbury 1997, Moore 1988, Rodriguez 1999].

Die beschriebenen Eigenschaften der DC machen diese interessant für die Immuntherapie von Tumoren. Denn es ist die zelluläre CTL-vermittelte Immunantwort, die Krebszellen effektiv beseitigen kann, und DC haben dank ihrer Fähigkeit zur effizienten Kreuzpräsentation das Potential, diese Art der Immunantwort zu induzieren. Mit DC-Vakzinen besteht also die Möglichkeit, Tumoren mit Hilfe des Immunsystems zu bekämpfen.

Sowohl in Tierversuchen als auch in klinischen Studien konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese Form der Tumorthherapie grundsätzlich funktionieren kann. Beispielsweise vakzinieren Thurner und Mitarbeiter Melanompatienten mit DC, die *in vitro* aus autologen Monozyten hergestellt und mit Tumorantigenen beladen worden waren. Bei 8 von 11 Probanden konnte eine signifikante Vermehrung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Eine Regression von Metastasen trat bei 6 Patienten ein, wobei histologische Untersuchungen von rückläufigen Hautmetastasen eine Infiltration mit CD8⁺ T-Zellen zeigten, die sich bei den Patienten auch durch Erythembildung und Juckreiz bemerkbar gemacht hatten. Eine weitere sehr interessante Beobachtung dieser Studie war, dass persistierende Hautmetastasen durch ein Fehlen der Expression des Antigens, gegen welches vakziniert wurde, gekennzeichnet waren. Die Impfung mit nur einem Antigen birgt somit also die Gefahr einer Selektion der Tumorzellen, die dieses Antigen nicht oder nicht mehr exprimieren. Erwähnenswert ist ferner die Tatsache, dass bei dieser Studie keine nennenswerten Nebenwirkungen auftraten [Thurner 1999].

Im Jahr 2001 veröffentlichten Fong et al. eine klinische Studie, im Rahmen derer sie Patienten mit CEA-exprimierenden Tumoren mit Hilfe von DC gegen CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) geimpft hatten. Dieses Antigen wird von vielen gastrointestinalen Tumoren sowie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarinom exprimiert. Zunächst wurden die DC im Blut der Patienten durch systemische Gabe von Flt3L expandiert, anschließend isoliert, *in vitro* mit dem Peptid CEA₆₀₅₋₆₁₃ (610D) inkubiert, bevor sie dann den Patienten wieder injiziert wurden. Einer von insgesamt 12 Patienten zeigte eine Totalremission, die länger als zehn Monate bestehen blieb. Bei einer Patientin bildete sich eine Lungenmetastase vollständig zurück. Ein dritter Proband konnte von einem Teil seiner Lebermetastasen befreit werden [Fong 2001].

Diese Erfolge sind besonders hervorzuheben, da CEA als ein onkofetales Protein, das während der Embryonalzeit auch von gesunden Zellen exprimiert wird, vergleichsweise schwach immunogen ist.

Trotz dieser Erfolge bleiben Immuntherapien von Tumoren noch deutlich hinter den Erwartungen zurück. Manche Ansätze sind Chemotherapien lediglich hinsichtlich der geringeren Nebenwirkungen überlegen, können aber keine Verbesserung der Überlebensdauer der Patienten bewirken. Andere Tumorimpfstoffe führen zwar zu einer besseren Überlebensrate als Standardchemotherapien, der Unterschied ist jedoch relativ gering [Finn 2003]. Bei der im vorangehenden Absatz beschriebenen Patientin mit Remission der Lungenmetastasen entwickelten sich 10 Monate später intraabdominelle Metastasen. Zwei weitere Patienten derselben Studie konnten durch die Vakzinierung stabilisiert werden, das heißt die Tumormarker im Serum stiegen nicht weiter an und die Tumorherde weiteten sich nicht aus. Allerdings hielt diese Stabilisierung nur drei beziehungsweise sechs Monate an [Fong 2001]. Schadendorf et al. führten bisher als einzige eine randomisierte klinische Phase-III-Studie durch, deren Ziel es war, die Überlegenheit einer DC-basierten Immuntherapie gegenüber einer Standardchemotherapie mit Dacarbazin bei Melanompatienten zu demonstrieren. Sie verwendeten dabei reife Mono-DC, die mit tumorrelevanten Peptiden beladen und anschließend den Patienten lymphknotennah subkutan verabreicht wurden. Die Überlegenheit der DC-Vakzine gegenüber der Standardchemotherapie konnte in dieser Studie nicht belegt werden, wodurch der Enthusiasmus für die DC-Therapie stark gebremst wurde [Schadendorf 2006]. Die Beispiele verdeutlichen, dass vor allem die Induktion einer Langzeitimmunität gegen die Tumoren noch eine große Herausforderung darstellt.

1.3 Adjuvantien in der Tumorthherapie

Eine Erweiterung des DC-basierten Therapieverfahrens ist die Kombination einer Tumorkvakzine auf DC-Basis mit dem immunstimulatorischen Effekt eines Adjuvans *ex vivo*. Grundlage dieses Ansatzes ist die Beobachtung, dass stärker ausgereifte DC ein größeres T-Zell-Aktivierungspotential besitzen als schwächer ausgereifte (vgl. Kapitel 1.2). Diese Ausreifung von DC kann unter dem Einfluss von Adjuvantien erfolgen. Der Begriff Adjuvans bezeichnet eine Substanz, die bei gemeinsamer Applikation mit einem Antigen eine Verstärkung der Immunantwort auf dieses Antigen hervorruft. Diese Verstärkung kann beispielsweise eine erhöhte Bildung von antigenspezifischen Immunglobulinen oder eine stärkere Proliferation von spezifischen T-Zellen beinhalten.

Ferner sind Adjuvantien in der Lage, Immunantworten zu lenken, das heißt beispielsweise, eine T_{H1} -Polarisation der Immunantwort zu bewirken. Als Adjuvantien werden in der Medizin unter anderem Aluminiumverbindungen, Mineralöle und im Tierexperiment das sogenannte Freund'sche Adjuvans (bestehend aus inaktivierten Mycobakterien in einer Wasser-Öl-Emulsion) verwendet. Daneben befinden sich neuere Substanzen in klinischer Erprobung, wie etwa CpG-Oligodesoxynukleotide [Krieg 2004, Vollmer 2009].

Die meisten Arbeitsgruppen verwenden *in vitro* generierte und mit Antigenen beladene DC für ihre Vakzinierungsstudien. Dabei entsteht für jeden Patient ein individueller Impfstoff, beispielsweise wenn die DC aus dessen eigenen Monozyten hergestellt werden [Schuler 2003, Cerundolo 2004]. Da sich herausgestellt hat, dass die Aktivierung der DC für die Induktion einer effektiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, werden entsprechende Aktivierungsschritte in den Herstellungsprozess mit eingeschlossen [de Vries 2003]. Die Herstellung solcher individueller, *ex vivo* generierter Vakzine ist jedoch sehr aufwendig und bedarf teurer Verfahren, wie zum Beispiel der Zytapherese, und entsprechend zertifizierter Labore. Deshalb wird nach neuen Strategien gesucht, die es ermöglichen, DC *in vivo* mit Tumorantigenen zu beladen und zugleich zu aktivieren. Auf diese Weise könnte ein zellfreies, kostengünstigeres Produkt hergestellt werden, das nicht mehr für jeden Patienten individuell zusammengesetzt sein müsste und damit besser für Patienten zugänglich wäre.

1.3.1 Immunstimulatorische Komplexe (ISCOM) - Zusammensetzung und Eigenschaften

Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist die Verwendung des ISCOMATRIX™-Adjuvans. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung von sogenannten Immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs), die erstmals durch Morein et al. beschrieben wurden [Morein 1984]. Das ISCOMATRIX™-Adjuvans besteht aus Saponin, Cholesterin und Phospholipiden (Dipalmitoylphosphatidylcholin), die sich unter geeigneten Bedingungen (pH=6,2, 25°C) zu etwa 40 nm großen Partikeln zusammenlagern. Ein entscheidender Bestandteil ist dabei das immunstimulatorische Saponin, das aus der Rinde des Quillaia-saponaria-Baumes gewonnen wird. Durch die Komplexierung des Saponins mit Cholesterin und Phospholipiden kann die hämolytische Aktivität des Saponins deutlich reduziert werden. Zugleich werden die

Stabilität und die Fähigkeit, Antigene zu binden, erhöht [Maraskovsky 2004, Pearse 2005, Schnurr 2005].

1.3.2 ISCOM-Vakzine in der Tumortherapie

Wird das ISCOMATRIX™-Adjuvans mit einem Antigen assoziiert, so entsteht eine ISCOM-Vakzine. Solche Vakzine wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich in Mausmodellen und klinischen Studien getestet. So wurde ISCOMATRIX™ beispielsweise mit dem Tumorantigen NY-ESO-1 assoziiert, welches unter anderem von Melanomen, Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen exprimiert wird. Mit Ausnahme von bestimmten Zellen des Hodens, der Ovarien und des Trophoblasten kommt NY-ESO-1 in gesundem Gewebe nicht vor. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein hohes Potential besitzt, antigenspezifische Immunantworten zu induzieren. Deutlich geringer fielen die Immunantworten aus, wenn lösliches NY-ESO-1-Protein verwendet wurde [Maraskovsky 2004, Schnurr 2005].

Im Zuge einer klinischen Studie mit Melanompatienten konnte gezeigt werden, dass die NY-ESO-1/ISCOMATRIX™-Vakzine bei einem deutlich höheren Prozentsatz der Probanden eine Immunantwort auslöst als lösliches NY-ESO-1. Die Immunantwort wurde anhand des Titers spezifischer Antikörper und an der Zahl spezifischer T-Zellen nach mehrmaliger Vakzinierung gemessen. Nur 25% der mit unadjuvantiertem Protein behandelten Patienten zeigten einen Anstieg des Antikörpertiters. Im Gegensatz dazu konnte bei 100% der Patienten ein Anstieg beobachtet werden, wenn NY-ESO-1 mit ISCOMATRIX™ formuliert wurde. Ferner wurde bei geimpften Probanden ein Hypersensitivitätstest der Haut durchgeführt. Dazu erfolgte eine intradermale Applikation von NY-ESO-1-Protein. Während in der Kontrollgruppe (Protein ohne ISCOMATRIX™) nur einer von 16 Probanden eine Hautreaktion zeigte, waren es in der Gruppe der Personen, die zuvor mit der ISCOMATRIX™-Tumorstoffe behandelt worden waren, 10 von 16. Die Autoren der Studie kamen darüber hinaus zu dem Ergebnis, dass ISCOMATRIX™-basierte Impfstoffe ausreichend sicher für die Anwendung am Menschen und gut verträglich sind [Davis ID 2004].

1.3.3 OVA/ISCOM – eine ISCOMATRIX™-Vakzine mit Ovalbumin als Modellantigen

In den Experimenten, die Grundlage dieser Arbeit sind, wurde eine Modellvakzine verwendet, die aus ISCOMATRIX™ und damit assoziiertem OVA-Protein besteht. Um eine bessere Formulierung von OVA mit dem lipophilen ISCOMATRIX™-Adjuvans zu erreichen, wurde das OVA-Protein mit Palmitylsäure verestert. OVA eignet sich gut für Versuche mit Mäusen, da eine bestimmte immundominante Aminosäuresequenz aus dem Protein bekannt ist, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert wird, das H-2k(b)-restringierte Peptid SIINFEKL. Ferner gibt es transgene Mäuse, deren T-Zellen einen für SIINFEKL-H-2k(b)-Komplexe spezifischen T-Zell-Rezeptor besitzen, so genannte OT-1-Mäuse. Mit Hilfe der genannten Komponenten lässt sich die Effektivität der Antigenpräsentation durch DC quantitativ ermitteln und die Vakzine präklinisch optimieren.

1.4 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Optimierung und damit für deren rationalen klinischen Einsatz im Rahmen der Tumorthherapie. Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Von welchen Zellen des Immunsystems wird die ISCOM-Vakzine nach subkutaner Injektion aufgenommen?
2. Welchen Einfluss haben ISCOM-Vakzine auf den Aktivierungsgrad von DC und anderen Abwehrzellen im drainierenden Lymphknoten?
3. Wie verändert sich das Zytokinmilieu im drainierenden Lymphknoten?
4. Kann durch eine Impfung mit einer OVA/ISCOM-Vakzine eine effektive zelluläre und humorale Immunantwort etabliert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

2.1.1 Ovalbumin (OVA)

Als Modellantigen wurde für die Versuche dieser Arbeit das Glykoprotein OVA verwendet. Dabei handelt es sich um das Hauptprotein in Hühnereiern [Huntington 2001]. OVA besteht aus 385 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45 kD [Nisbet 1981]. Es ist immunologisch in der Maus sehr gut charakterisiert. Für Mäuse des Stammes C57BL/6 ist für OVA ein MHC-I-restringiertes Epitop (SIINFEKL) bekannt, gegen welches durch Vakzinierung eine Immunantwort induziert werden kann. OVA wurde von der Firma Sigma bezogen und von der Firma CSL Limited (Australien) aufgereinigt. In kommerziellen Testkits war im aufgereinigten Protein LPS unterhalb der Nachweisgrenze.

2.1.2 ISCOMATRIX™-Adjuvans

ISCOMATRIX™-Adjuvans wurde freundlicherweise von ISCOTEC AB, Australien, einer Firma der CSL Limited Company, Melbourne, Australien, zur Verfügung gestellt. Es besteht aus Saponin, Cholesterin und dem Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholin. Diese Bestandteile lagern sich durch hydrophobe Kräfte unter geeigneten Bedingungen (25 °C, pH 6,2) zusammen und ergeben 40 nm große, käfigartig strukturierte Partikel, die bei einer Lagerung von 2 – 8 °C über mindestens zwei Jahre stabil bleiben [Maraskovsky 2004, Pearse 2005].

2.1.3 OVA/ISCOM-Vakzine

Daneben wurde von CSL Limited ISCOMATRIX™-assoziiertes, palmityliertes Ovalbumin (OVA/ISCOM) bereitgestellt. Zur Herstellung wurden 6,6 mg/ml OVA in 50 mM Na₂CO₃- / 5 % Deoxycholsäurelösung gelöst (pH = 9). Palmitylsäure (Sigma Aldrich) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Dimethylformamid gelöst. Davon wurden 50 µl zu 950 µl OVA-Lösung gegeben. Palmityliertes OVA wurde dann mittels Gel-Permeations-Chromatographie aufgereinigt. Für einzelne Versuche wurde OVA zusätzlich mit dem Fluorochrom Alexa488 konjugiert, damit es mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Aufnahme in zu untersuchende Zellen sichtbar gemacht werden konnte. Palmityliertes OVA wurde durch Formulierung mit Saponin

(ISCOPREP, CSL Limited), Phospholipiden und Cholesterin mit ISCOMATRIX™ assoziiert (OVA/ISCOM-Vakzine).

2.2 Versuchstiere

Für alle Versuchsvorhaben, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurde gemäß § 8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) für die Bundesrepublik Deutschland in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGBl I S. 1105) ein Tierversuchsantrag an die Regierung von Oberbayern gestellt. Dieser Antrag wurde gemäß § 9, Absatz 1, Satz 4 TierSchG bewilligt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531.8-119-05).

Für die Versuche wurden 8 - 10 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse mit einem Gewicht von 20 - 22 Gramm verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland, bezogen und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase in der neuen Umgebung für Versuche herangezogen. Die Mäuse wurden in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechenden Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München gehalten. Die Versorgung und Pflege der Tiere einschließlich der Fütterung mit Pelletfutter und Wasser *ad libitum* erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. Es wurden maximal 8 Mäuse pro Käfig gehalten. Bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 65 % wurde ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit Hilfe einer automatischen Zeitschaltuhr eingehalten. Die Versuche wurden stets tagsüber durchgeführt.

2.3 Praktische Durchführung der Versuche

2.3.1 Anästhesie der Mäuse und Beendigung der Versuche

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte unter Verwendung des Inhalationsnarkotikums Isofluran (1 – Chlor - 2,2,2 – trifluorethyl - difluormethylether) (Forene™, Abbott GmbH, Wiesbaden), welches sowohl gut hypnotisch als auch muskelrelaxierend wirkt und auf Grund seiner relativ geringen Blutlöslichkeit schnell anflutet [Klöss 2004, Karow 2009].

Dazu wurden die Tiere in einen Glasbehälter gesetzt, der mit Isofluran getränkten Zellstoff enthielt und durch einen Deckel verschließbar ist. Auf diese Weise konnte eine maximal 30-60 Sekunden dauernde Betäubung der Mäuse erreicht werden. Die Inhalationsnarkose erfolgte entweder um eine eventuell durch Abwehrbewegungen entstehende Verletzung der Tiere zu vermeiden oder um durch zervikale Dislokation den Tod der Maus herbeizuführen.

2.3.2 Subkutane Injektionen

Zur Charakterisierung der Effekte von ISCOMATRIX™ auf die Zellen des drainierenden Lymphknotens wurde das Adjuvans – teilweise mit, teilweise ohne assoziiertes OVA – subkutan im Bereich der hinteren Extremität der Mäuse appliziert. Für Versuche, die zur Analyse der Antigenaufnahme durch Abwehrzellen durchgeführt wurden, kam die Fluorochrom-gekoppelte Vakzine (mit Alexa488 assoziiertes OVA) zum Einsatz. Verwendet wurden für die Injektion sterile 300 µl - Spritzen (Microfine U – 100 - Insulinspritzen, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Es wurde stets ein Volumen von 20 µl verabreicht, das aus der salinen Lösung PBS (Dulbecco's PBS, Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, IL, USA) und darin gelöstem ISCOMATRIX™ (1,6 µg) beziehungsweise OVA/ISCOM (0,1 µg/1,6 µg) bestand.

2.3.3 Präparation der Lymphknoten

Im Abstand von vier bis maximal 120 Stunden nach der Injektion erfolgte die Entnahme der poplitealen Lymphknoten, die das entsprechende Hautgebiet um den Injektionsort drainierten. Dazu wurden die Mäuse wie oben beschrieben narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach gründlicher äußerer Desinfektion mit Ethanol (70 %) und Fixierung der Maus auf einer Arbeitsunterlage erfolgten die Eröffnung des Fells und das zügige Freipräparieren der gesuchten Lymphknoten (**Abbildung 1**). Diese wurden nach ihrer Entnahme sofort in eine sterile Kulturschale (Falcon™, BD, NJ, USA) überführt, in der sich eisgekühltes Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin) befand, welches die Austrocknung der Organe verhindern sollte.

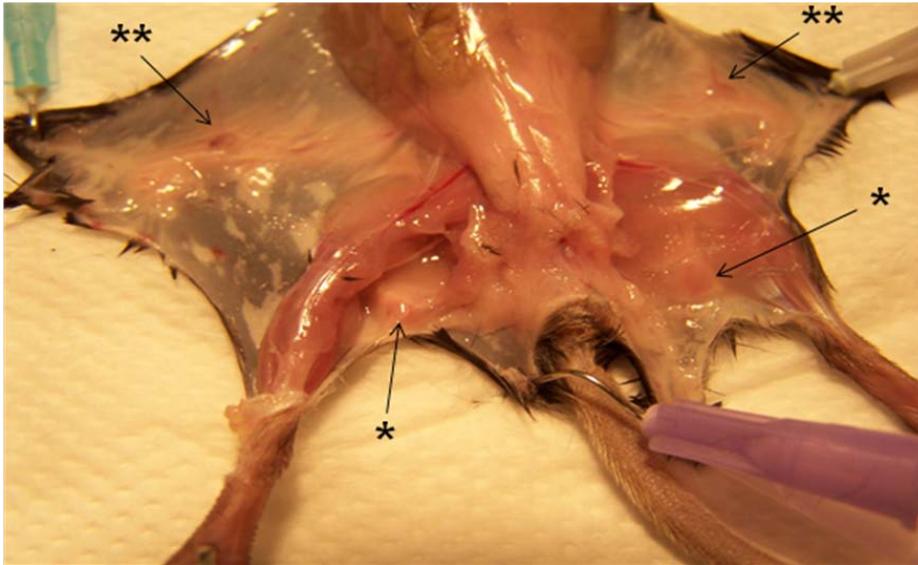


Abbildung 1: Nach Eröffnung der Haut können die poplitealen Lymphknoten (*) im subkutanen Fettgewebe aufgesucht und freipräpariert werden. Zu sehen sind in der Abbildung auch die inguinalen Lymphknoten (**) der Maus.

2.3.4 Gewinnung der Zellen aus dem Lymphknoten und Zellzählung

Mit Hilfe eines Skalpells und sehr feiner Pinzetten wurde die Kapsel der Lymphknoten eröffnet um dann die Zellen aus dieser Kapsel heraus zu lösen und mittels einer Pipette heraus zu spülen. Dazu wurden etwa 400 μ l eisgekühlten Zellkulturmediums verwendet. Die sich in den Kulturschalen ergebenden Zellsuspensionen wurden dann mit einer Pipette in sterile 2,0-ml-Eppendorf-Gefäße überführt und diese mit Eis gekühlt.

Anschließend erfolgte eine Zellzählung. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 μ l Zellsuspension in einer 96-Well-Platte (BD, NJ, USA) im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Lösung (Sigma, München) (90 μ l) versetzt. Von der entstehenden Suspension wurden dann wiederum 10 μ l in eine Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim) pipettiert, um die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop zu bestimmen. Gezählt wurden dabei stets nur intakte Zellen, das heißt solche, die den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen. Durch Multiplikation der Zelldichte mit dem Volumen der Probe ergibt sich die absolute Zellzahl für das jeweilige Organ.

2.3.5 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Die Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) genannt, ermöglicht es, mittels fluoreszierender Marker verschiedene Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden und zu quantifizieren. Hierzu werden die Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern versetzt, die gegen definierte Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Im Durchflusszytometer passieren die Zellen dann einzeln einen Laserstrahl, wodurch einerseits Streulicht entsteht und andererseits bei den Zellen, welche die zum Antikörper passenden Oberflächenmoleküle tragen, auch Fluoreszenzsignale emittiert werden. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*), welches von einer Linse gesammelt wird, die im Verlauf des Laserstrahls liegt, und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*), welches von einer Linse gesammelt wird, die im rechten Winkel zum Laserstrahl angebracht ist. Das Streulicht wird photometrisch detektiert und gibt Aufschluss über die Zellgröße (*forward scatter*) beziehungsweise die Granularität der Zellen (*sideward scatter*). Es können bei Geräten mit zwei verschiedenen Lasern bis zu vier sich in der Art des gekoppelten Farbstoffs unterscheidende Antikörper gleichzeitig verwendet werden. Das von ihnen emittierte Licht wird nach Passage von Lichtfiltern von verschiedenen Photodetektoren registriert, wodurch die verschiedenen Signale getrennt aufgenommen und quantitativ analysiert werden können.

Um die relativen Anteile verschiedener Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmen zu können, wurden jeweils gleiche Volumina der verschiedenen Proben einer Versuchsreihe in FACS-Röhrchen überführt und anschließend mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Dabei wurde die jeweilige Antikörperlösung der Zellsuspension in der Regel in einem Volumenverhältnis von 1:100 zugesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss bei 4°C für etwa 20 Minuten.

Bei allen Versuchen wurde zu jedem der in **Tabelle 2** genannten spezifischen Antikörper ein isotypengleicher Kontrollantikörper ohne spezifische Bindungsregion, aber mit gleichem Fluorochrom, in gleicher Konzentration verwendet, um die Fluoreszenz, die aus unspezifischer Bindung des F_c-Teils an die Zelle resultiert, von der Fluoreszenz subtrahieren zu können, die aus spezifischer Bindung resultiert.

Oberflächenmarker	Art des gebundenen Fluorochroms	Hersteller
CD3	Allophycocyanin (APC)	BD (NJ, USA)
CD4	R-Phycoerythrin (PE)	BD (NJ, USA)
CD8 α	R-Phycoerythrin (PE)	BD (NJ, USA)
CD11b	Peridinin chlorophyll protein (Per-CP)	BD (NJ, USA)
CD11c	Allophycocyanin (APC)	BD (NJ, USA)
CD19	R-Phycoerythrin (PE)	BD (NJ, USA)
CD69	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)	Caltag GmbH (Hamburg)
CD86	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)	BD (NJ, USA)
LY6G	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)	BD (NJ, USA)
MHC-II	R-Phycoerythrin (PE)	Caltag GmbH (Hamburg)

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper.

Um eine unspezifische Bindung der spezifischen Antikörper an F_c-Rezeptoren der Zellen zu minimieren, wurden diese mit Antikörpern gegen CD16 und CD32 (Caltag GmbH, Hamburg) vorbehandelt, welche nicht mit einem Fluorochrom assoziiert waren. Dadurch ließ sich die Hintergrundfluoreszenz bei der FACS-Analyse reduzieren. Als Kontrollfärbung diente ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter isotypengleicher IgG-Antikörper ohne spezifischen F_{ab}-Teil.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension (etwa 100 μ l) mit 3 - 4 ml PBS versetzt und bei 4°C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 370 g drei Minuten lang zentrifugiert, um die Zellen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern zu trennen. Nach Abkippen des Überstandes und erneuter Resuspension in etwa 100 μ l zurückgebliebener Flüssigkeit wurde dieser Waschschrift wiederholt. Schließlich erfolgte die Analyse der Zellen mit Hilfe eines FACS-Calibur-Gerätes (Becton Dickinson, Heidelberg), welches mit zwei Lasern (Anregungswellenlängen 488 nm beziehungsweise 635 nm) ausgestattet ist.

2.3.6 Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels FACS

Die in den Abschnitten 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Vorgehensweisen zur Verarbeitung der Lymphknotenzellen sowie zur Analyse von deren Oberflächenmarkern wurden für den Nachweis intrazellulärer Proteine folgendermaßen modifiziert: Die Lymphknoten wurden nach ihrer Entnahme zwei- bis dreimal mit dem Skalpell angeschnitten und dann sofort in Eppendorfgefäße mit 300 µl Medium überführt, welches auf 37°C vorgewärmt worden war und das makrozyklische Lakton Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in einer Konzentration von 1 µg/ml enthielt. Brefeldin A inhibiert den anterograden Proteintransport in der Zelle, indem es den Vesikeltransport des Golgi-Apparats hemmt [Nebenführ 2002]. Ziel dieser Vorgehensweise war es, durch eine Hemmung der Sekretion von Zytokinen eine intrazelluläre Anreicherung derselben zu erreichen, um ihren Nachweis mittels Durchflusszytometrie zu erleichtern. Die Zellen wurden dazu zunächst für eine Stunde nicht aus ihrem Gewebsverband gelöst, um möglichst physiologische Bedingungen aufrechtzuerhalten. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben in Suspension gebracht und weitere drei Stunden mit Brefeldin A inkubiert, wozu nochmals 100 µl der Brefeldin-A-Lösung zugegeben wurden. Die Temperatur von 37°C wurde mit Hilfe eines Wärmeblocks beibehalten.

Nach Ablauf von insgesamt vier Stunden wurde die Suspension drei Minuten lang bei 4°C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 370 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und verworfen. Das Zell-Pellet wurde dann in 100 µl PBS-Lösung resuspendiert, welche die gewünschten gegen Oberflächenmarker gerichteten fluoreszierenden Antikörper enthielt (Verhältnis 1:100). Nach 20 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss und bei 4°C erfolgte die Zugabe von 150 µl Paraformaldehyd-Lösung (Konzentration: 2 %, Lösungsmittel: PBS, Paraformaldehyd-Pulver von Fluka, München), um die Zellen zu fixieren. Nach einer 15-minütigen Einwirkung bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurden die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen überführt und diese mit PBS (3 ml) aufgefüllt, um erneut zu zentrifugieren (3 min, 4°C, 370 g) und überschüssiges Paraformaldehyd und ungebundene Antikörper zu entfernen. Das Zell-Pellet wurde nach Absaugen des Überstands in 150 µl Saponinlösung (Fluka, München, 0,5 % in PBS) resuspendiert, welche als Zusatz *bovine serum albumin (BSA)* (Konzentration: 0,5 %) enthielt. Saponin führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, so dass eine Diffusion fluorochrom-gekoppelter Antikörper, die gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle ermöglicht wird. Nach Zugabe des gewünschten Anti-Zytokin-Antikörpers wurde erneut für 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. **Tabelle 3**

zeigt die Antikörper, die zum intrazellulären Nachweis von Zytokinen verwendet wurden.

Zytokin	Art des gebundenen Fluorochroms	Hersteller
IFN- γ	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)	Caltag GmbH (Hamburg)
IL-12p40/70	R-Phycoerythrin (PE)	BD (NJ, USA)

Tabelle 3: Verwendete Antikörper zur Intrazellulärfärbung.

Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen noch zweimal mit 3 ml PBS gewaschen, bevor dann die FACS-Analyse folgte.

2.3.7 Auswertung der FACS-Daten

Die Erhebung und vorläufige Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest-Software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Zur genaueren Analyse wurde die FlowJo-Software der Version 6.4.7 für Macintosh-Computer (Tree Star Inc., OR, USA) verwendet.

2.3.8 Zytokindetektion mittels ELISA

Zum Nachweis der Zytokinproduktion von Leukozyten aus Lymphknoten wurden mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Zytokinkonzentrationen im Überstand von Zellsuspensionen gemessen. Zunächst wurde den Versuchstieren die Vakzine beziehungsweise das Adjuvans subkutan verabreicht. Nach einem Zeitintervall von 24 Stunden erfolgte dann die Gewinnung der Zellen des drainierenden Lymphknotens wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden dann in 200 μ l Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin) aufgenommen, welches mit 20 mM L-Glutamin (PAA, Linz), 100 U/ml Penicillin (PAA, Linz), 100 μ g/ml Streptomycin (PAA, Linz) sowie fetalem Kälberserum (10 Vol%) (Gibco BRL, Paisley, GB) supplementiert war (im Folgenden als Vollmedium bezeichnet). Das Kälberserum (FCS) wurde vorher bei 56°C für 30 Minuten wärmebehandelt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation wurden endotoxinarme Substanzen verwendet. Außerdem wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank (Lamin Air HB 2448, Heraeus, München) durchgeführt. Die

Suspensionen lagerten dann in einer 96-Loch-Platte für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden die Überstände in Eppendorfgeläße aufgenommen und die Zellen verworfen.

Die Detektion und Quantifizierung von Interleukin-6 (IL-6) im Überstand erfolgte mit Hilfe eines OptEIA™-Mouse-IL-6-ELISA-Sets (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Kulturschalenböden einer 96-Mikrowell-Platte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C mit je 100 µl eines gegen IL-6 gerichteten Antikörpers inkubiert und beschichtet. Nach gründlichem Waschen mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) wurde mit FCS-Lösung (10 % in PBS) eine Stunde lang geblockt. Nun wurden je 100 µl der verschiedenen Überstände einer Versuchsreihe sowie je 100 µl einer Standardreihe von Proteinlösungen mit bekannter Konzentration auf die Platten aufgetragen. Letztere dienten zur Eichung bei der späteren Messung. Nach erneuter Inkubation (zwei Stunden bei Raumtemperatur) und anschließendem Waschen erfolgte die Zugabe eines zweiten gegen IL-6 gerichteten und mit Streptavidin-Myeloperoxidase gekoppelten Antikörpers. Es wurde wiederum eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem gründlichem Waschen wurden die Proben jeweils mit 100 µl eines Substratgemisches aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (beide waren Bestandteile Teil des ELISA-Sets) beschickt. Die daraufhin ablaufende chemische Reaktion, bei der unter dem Einfluss des oben genannten Enzyms aus dem Chromogen TMB ein farbiges Endprodukt entsteht, wurde durch Zugabe von je 50 µl Schwefelsäure (2 N H₂SO₄) pro Well nach 30 Minuten gestoppt. Die resultierende Farbintensität in jedem Well war so der Menge des zu untersuchenden Zytokins (IL-6) in der Probe oder in den Standardlösungen proportional. Mit einem photometrischen ELISA-Reader (LB940 Multilabel Plattenleser, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) erfolgte die Messung der IL-6-Konzentrationen der einzelnen Proben.

2.3.9 Färbung nach Pappenheim

Zur morphologischen Differenzierung der Zellen der drainierenden Lymphknoten diente die Pappenheim-Färbung (benannt nach Artur Pappenheim, 1870 - 1916). Dazu wurden die Organe wiederum 24 Stunden nach der Verabreichung der Vakzine entnommen und unmittelbar weiterverarbeitet. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Lymphknoten möglichst mittig in zwei Hälften geteilt, um dann die Schnittflächen auf einem Objektträger auszustreichen. Dadurch blieben – ähnlich wie bei einem Blutausschlag – Zellen auf dem Glas haften ohne sich zu überlagern. Anschließend

wurden die Ausstriche für einige Minuten luftgetrocknet, bevor sie für drei Minuten in einer Färbekammer in May-Grünwald-Lösung (May-Grünwalds Eosin-Methylenblau-Lösung, Hollborn, Leipzig) lagerten. Als nächstes wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie erneut für weitere 15 Minuten in einer Färbekammer lagerten, die diesmal Giemsa-Gebrauchslösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Hollborn, Leipzig) enthielt. Zuletzt wurden die Präparate wieder mit destilliertem Wasser gespült und dann luftgetrocknet. Basische Farbstoffe wie Methylenblau bilden in wässriger Lösung aktive Farbstoffanteile mit positiver Ladung und färben daher Zellbestandteile mit negativer Ladung. Der saure Farbstoff Eosin bildet in wässriger Lösung dagegen aktive Farbstoffanteile mit negativer Ladung und bindet somit an Eiweißstrukturen mit positiver Ladung [Dörner 2003]. Die Präparate konnten dann mittels Lichtmikroskopie betrachtet und fotografiert werden.

2.3.10 Analyse der Vakzine-induzierten CD8⁺ T-Zell-Antwort

Um zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß die ISCOM-Vakzine in der Lage ist, eine spezifische, von zytotoxischen T-Lymphozyten getragene Immunantwort zu induzieren, wurde folgende Vorgehensweise gewählt: Die Versuchstiere erhielten zu Versuchsbeginn eine subkutane Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine, die 0,1 µg OVA-Protein enthielt. Nach einem Zeitintervall von einer Woche wurde die Prozedur im Sinne einer Impfauffrischung wiederholt. Weitere sieben Tage später erfolgte dann die Entnahme der Milzen der Mäuse. Die Organe wurden in 50-ml-Bluecap-Behälter (Falcon, BD Bioscience, NJ, USA), welche mit eisgekühltem Kulturmedium gefüllt waren, aufgenommen.

Nachdem sie von Fett- und Bindegewebe befreit waren, erfolgte die Zerkleinerung der Milzen mit Hilfe eines Skalpell in einer Zellkulturschale. Mit Hilfe des Kolbens einer 10-ml-Einweg-Kunststoffspritze (HSW GmbH, Tuttlingen) wurden die Gewebestücke mit sanftem Druck durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 70 µm (Falcon™ cell strainer, BD Bioscience) gepresst. Zwischendurch wurde immer wieder mit Vollmedium gespült (insgesamt 20 ml). Die Suspension wurde in einem 50-ml-Bluecap-Behälter aufgefangen und anschließend bei einer Temperatur von 4°C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 350 g für vier Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die Beseitigung von Erythrozyten aus dem Zellpellet durch Resuspendierung in 4 ml Erylysepuffer (Ortho-Clinical Diagnostics GmbH, Neckargemünd). Nach fünf Minuten wurde die Lysereaktion durch Zugabe von 30 ml Vollmedium gestoppt, erneut zentrifugiert und anschließend die Zellzahl ermittelt.

Danach wurden von jeder Milz 5×10^5 Zellen zusammen mit je 100 μ l Vollmedium in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit dem MHC-I-restringierten OVA-Peptid SIINFEKL (1 μ g/ml) bei 37°C im Brutschrank, gefolgt von weiteren drei Stunden Bebrütung nach Zugabe von Brefeldin A (1 μ g/ml).

Um den prozentualen Anteil der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der Splenozyten zu ermitteln, erfolgte dann zunächst eine Inkubation mit FACS-Antikörpern gegen das Oberflächenmolekül CD8 α . Dann erfolgte eine Intrazellulärfärbung von IFN- γ mit Hilfe von FITC-gekoppelten FACS-Antikörpern nach Permeabilisierung der Zellen mittels Saponin (wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben). Schließlich wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die Frequenz OVA-spezifischer CTL bezogen auf die Gesamtpopulation der CD8⁺ T-Lymphozyten mittels FloJo-Software bestimmt.

2.3.11 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität SIINFEKL-spezifischer CTL

Die zytolytische Aktivität der antigenspezifischen CTL wurde mit Hilfe SIINFEKL-beladener Splenozyten quantifiziert. Ein Teil der Milzzellen von C57BL/6-Mäusen wurde mit SIINFEKL (1 μ g/ml) beladen und mit CFDA-SE (Carboxyfluoresceindiacetate-succinimidyl-ester, Sigma Aldrich, USA) in der Konzentration von 1 μ M markiert. Der andere Teil der Milzzellen blieb ohne Peptidbeladung und wurde mit CFDA-SE in der Konzentration von 10 μ M markiert. Beladene und unbeladene Splenozyten wurden zu gleichen Teilen vermischt. Jede Maus bekam 10^6 Zellen aus diesem Gemisch intravenös verabreicht, nachdem sie zuvor zweimal im Abstand von einer Woche entweder mit der OVA/ISCOM-Vakzine oder mit PBS (Kontrolle) vakziniert worden war. 16 Stunden nach Übertragung der Splenozyten wurde den Mäusen peripheres Blut abgenommen. Der relative Anteil der verschiedenen Splenozytenpopulationen konnte mittels FACS-Analyse anhand der unterschiedlichen CFDA-SE-Konzentrationen bestimmt werden. Die antigenspezifische Lyse wurde dann folgendermaßen berechnet: $100 - [(\% \text{ peptidbeladener Zellen im Blut OVA/ISCOM-vakzinierter Tiere} / \% \text{ unbeladener Zellen im Blut OVA/ISCOM-vakzinierter Tiere}) / (\% \text{ peptidbeladener Zellen im Blut PBS-behandelter Tiere} / \% \text{ unbeladener Zellen im Blut PBS-behandelter Tiere})] \times 100$.

2.3.12 Tumorinduktion

Die Melanom-Zelllinie B16/F10-OVA (H2-K^b) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. J. Hess aus Erlangen zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM-Lösung (*Dulbecco's modified eagle medium*, Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, IL, USA), die 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 U/l Penicillin enthält, kultiviert. Zur Tumorinduktion wurden den Mäusen jeweils 10⁶ B16-OVA-Zellen (in 100 µl PBS) subkutan in die Flanke injiziert. Die Tumorgroße wurde dreimal pro Woche bestimmt. Ab einer Tumorgroße von 225 mm² oder äußeren Anzeichen von Leiden wurden die Mäuse getötet.

2.3.13 Bestimmung der Anti-OVA-Antikörper-Titer im Serum

Um die Effektivität der durch die ISCOM-Vakzine induzierten spezifischen Antikörperbildung zu quantifizieren wurden die Mäuse zweimal mit löslichem OVA-Protein beziehungsweise mit der OVA/ISCOM-Vakzine geimpft. Der zeitliche Abstand zwischen den Vakzinierungen betrug eine Woche. Weitere drei Wochen später wurden dann die Anti-OVA-Antikörper-Titer im Blutserum der Mäuse bestimmt. Hierzu wurde den Tieren entnommenes Vollblut zehn Minuten lang bei 6000 g zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils zwei Serumproben pro Maus parallel analysiert. Mit den Serumproben (Verdünnung 1:200 in PBS) wurden 96-Loch-ELISA-Platten (CostarTM, Corning Inc., N.Y., USA) beschickt, die zuvor über Nacht mit OVA-Protein (10 µg/ml in PBS) bei 4°C inkubiert und anschließend mit 0,05 % Tween 20 (in PBS) gewaschen worden waren. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ELISA-Platten gewaschen und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-Antikörper, Biozol, Deutschland) gegen IgG, IgG₁ beziehungsweise IgG_{2a} (Verdünnung 1:2000 in PBS) beschickt. Nach erneutem Waschen wurde SIGMAFASTTM-OPD-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) zugegeben. Die resultierende Farbreaktion wurde dann nach zehn Minuten mittels 2 N Schwefelsäure gestoppt bevor die Proben abschließend mit dem photometrischen ELISA Reader (LB940, Multilabel Plattenleser, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) analysiert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von ISCOMATRIX™ auf die zelluläre Zusammensetzung des drainierenden Lymphknotens

3.1.1 Größenzunahme des drainierenden Lymphknotens nach subkutaner Injektion von ISCOMATRIX™

Um den Einfluss des ISCOMATRIX™-Adjuvans auf die zelluläre Zusammensetzung des den Injektionsort drainierenden Lymphknotens zu untersuchen, wurden zehn Gruppen von Versuchstieren zu je fünf Mäusen gebildet. Die Tiere der Gruppe 1 blieben unbehandelt (Kontrollgruppe). Die anderen Mäuse erhielten entweder 0,1 µg OVA in 20 µl PBS (Gruppen 2 - 4), 0,1 µg OVA/1,6 µg ISCOMATRIX™ in 20 µl PBS (Gruppen 5 - 7) oder 1,6 µg ISCOMATRIX™ in 20 µl PBS (Gruppen 8 - 10). Die Untersuchung der Lymphknoten erfolgte dann zu drei verschiedenen Zeitpunkten (4, 12 und 24 h) nach der Injektion. Eine Übersicht zu der Versuchsanordnung zeigt **Tabelle 4**.

Gruppe	Verabreichte Substanz (je in 20 µl PBS)	Zeitpunkt der LK-Entnahme
1	PBS	24 h
2	OVA (0,1 µg)	4 h nach Injektion
3	OVA (0,1 µg)	12 h nach Injektion
4	OVA (0,1 µg)	24 h nach Injektion
5	OVA/ISCOM (0,1 µg /1,6 µg)	4 h nach Injektion
6	OVA/ISCOM (0,1 µg /1,6 µg)	12 h nach Injektion
7	OVA/ISCOM (0,1 µg /1,6 µg)	24 h nach Injektion
8	ISCOMATRIX™-Adjuvans (1,6 µg)	4 h nach Injektion
9	ISCOMATRIX™-Adjuvans (1,6 µg)	12 h nach Injektion
10	ISCOMATRIX™-Adjuvans (1,6 µg)	24 h nach Injektion

Tabelle 4: Versuchsanordnung: Die Entnahme der Lymphknoten (LK) erfolgte 4, 12 bzw. 24 Stunden nach der Injektion.

Die subkutane Injektion sowohl der ISCOM-Vakzine als auch des ISCOMATRIX™-Adjuvans (ohne Antigen) führte zu einer makroskopisch sichtbaren Vergrößerung des drainierenden Lymphknotens innerhalb von 24 Stunden. Dagegen war der Lymphknoten einer mit OVA-Protein behandelten Maus nicht von dem einer unbehandelten Maus zu unterscheiden. **Abbildung 2** zeigt normale und vergrößerte Lymphknoten im Vergleich.

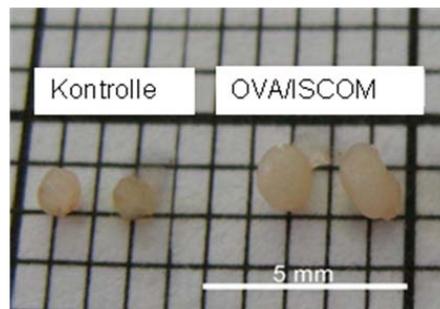


Abbildung 2: Auf der linken Seite sind zwei native popliteale Lymphknoten auf Millimeterpapier gezeigt. Rechts sind die deutlich vergrößerten Lymphknoten von mit der ISCOM-Vakzine behandelten Mäusen zu sehen.

Die Vergrößerung der Lymphknoten ist auf eine massive Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen zurückzuführen. In **Abbildung 3** ist die Kinetik der Zellrekrutierung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der subkutanen Applikation der oben genannten Substanzen dargestellt. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen makroskopischen Veränderungen zeigte sich nur nach Injektion der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIX™-Adjuvans eine bedeutende Zunahme der Gesamtzellzahl im drainierenden Lymphknoten. Nach Verabreichung von OVA alleine veränderte sich die Zellzahl hingegen nicht signifikant gegenüber der eines nativen Lymphknotens. Ein besonders deutlicher Anstieg war im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden nach der Injektion für die ISCOM-Vakzine und das ISCOMATRIX™-Adjuvans zu verzeichnen. Die beschriebenen Veränderungen ließen sich nur im drainierenden Lymphknoten der entsprechenden Injektionsstelle nachweisen. Ferner gelegene bzw. kontralaterale Lymphknotenstationen blieben unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Auch zeigten sich im Bereich der Injektionsstelle keinerlei makroskopische Veränderungen, die auf eine lokale Entzündungsreaktion hinweisen würden. So konnten weder eine Schwellung noch eine Rötung der Haut beobachtet werden.

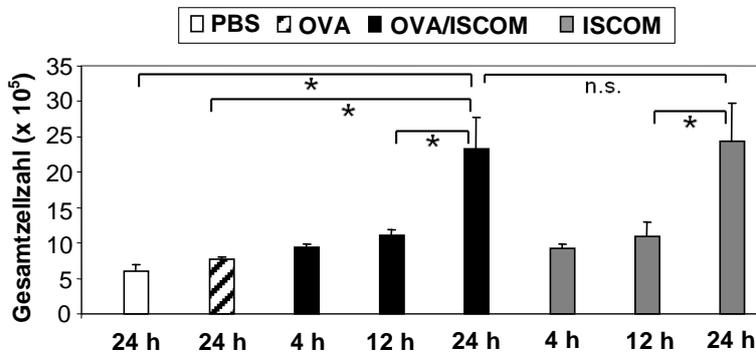


Abbildung 3: Nach Injektion der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIX™-Adjuvans zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl im drainierenden Lymphknoten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm Standardabweichung (SD); *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

3.1.2 Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen in den drainierenden Lymphknoten nach Injektion von ISCOMATRIX™

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde untersucht, durch welche Zelltypen die LK-Vergrößerung verursacht wird. Dazu wurden die Lymphknoten 24 Stunden nach der subkutanen Injektion der in Abschnitt 3.1.1 aufgeführten Substanzen zu Zellsuspensionen verarbeitet, welche dann mit fluoreszierenden Antikörpern gegen definierte Zelloberflächenmoleküle inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass Lymphozyten, welche den Hauptanteil der Zellen eines nativen Lymphknotens ausmachen, auch die dominante Population unter den einwandernden Zellen darstellen. Die Zahl der B-Lymphozyten (CD19⁺) stieg um den Faktor 5,1 an, während die Zahl der CD4⁺ T-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen um den Faktor 3,0 beziehungsweise 2,5 zunahm (**Abbildung 4**).

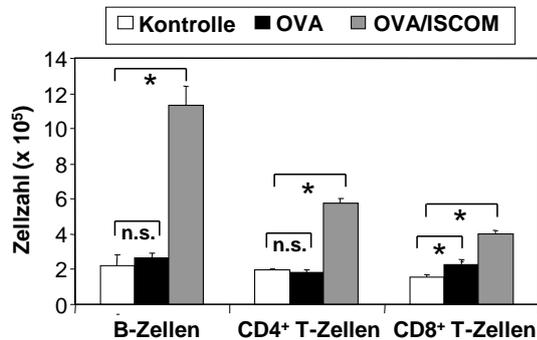


Abbildung 4: Die ISCOM-Vakzine induziert einen starken Anstieg der Lymphozytenzahl im drainierenden LK. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. B-Zellen ($CD3^- CD19^+$), T-Helferzellen ($CD3^+ CD4^+$), $CD8^+$ T-Zellen ($CD3^+ CD8^+$). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; * $P < 0,05$.

Wie in **Abbildung 5** gezeigt wird, verschob sich unter dem Einfluss der ISCOM-Vakzine das Verhältnis zwischen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten innerhalb von 24 Stunden zu Gunsten der B-Lymphozyten. Während der relative Anteil der B-Zellen von 36 % (± 10 %) auf 48 % (± 5 %) zunahm, fiel der prozentuale Anteil der T-Zellen von 60 % (± 8 %) auf 42 % (± 6 %). OVA-Protein ohne Adjuvans führte zu keiner signifikanten Veränderung. Das Verhältnis zwischen $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen blieb unter dem Einfluss der ISCOM-Vakzine unverändert.

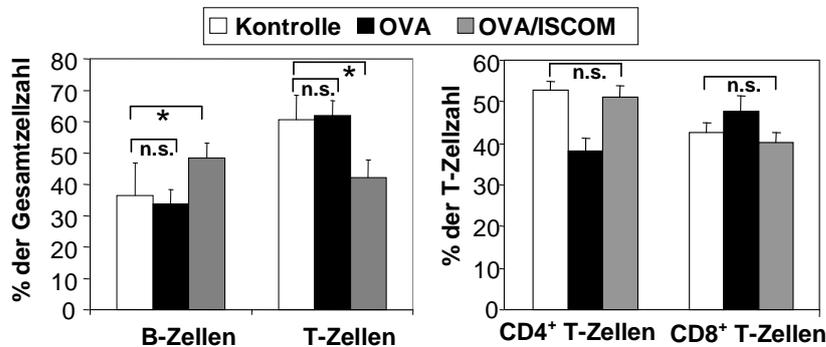


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der B- bzw. T-Zellen an der Gesamtzellzahl im drainierenden Lymphknoten (links) und prozentualer Anteil der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Subtypen an der Gesamtzahl der T-Zellen im drainierenden Lymphknoten (rechts). 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse des drainierenden Lymphknotens ließen sich neben Lymphozyten auch Zelltypen der sogenannten angeborenen Abwehr als Teil der immigrierenden Zellpopulation nachweisen. So wurden nach der Behandlung der Mäuse mit der ISCOM-Vakzine beziehungsweise dem ISCOMATRIX™-Adjuvans im drainierenden Lymphknoten Ly6G⁺/CD11b⁺ Zellen gefunden, die in nicht drainierenden Lymphknoten nicht nachweisbar waren (**Abbildungen 6 und 7**). Um diese Zellen genauer zu charakterisieren wurden – analog zur herkömmlichen Herstellung von Blutausstrichpräparaten – Lymphknotenausstriche auf Objektträgern hergestellt und mit May-Grünwald-Giemsa-Färbelösung angefärbt (Färbung nach Pappenheim). Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, dass es sich bei den Ly6G⁺/CD11b⁺ Zellen in erster Linie um polymorphkernige neutrophile Granulozyten handelt (**Abbildung 6**).

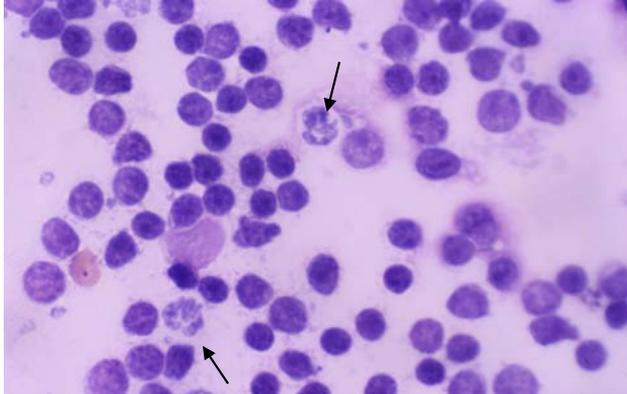


Abbildung 6: Lymphknotenausstrich einer Maus mit zwei polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (→). 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt. Nach Eröffnung der Lymphknoten mittels Skalpell wurde auf einem Objektträger ein Ausstrichpräparat angefertigt und mit May-Grünwald-Lösung angefärbt (nach Pappenheim). Vergrößerung: 400-fach.

In **Abbildung 7** ist die Zellzahl der 24 Stunden nach Vakzinierung im drainierenden Lymphknoten vorhandenen Granulozyten ($\text{Ly6G}^+/\text{CD11b}^+$ Zellen) dargestellt (linkes Diagramm). Ferner wird im mittleren Diagramm der Einfluss von ISCOMATRIX™-Adjuvans auf die Zahl der $\text{NK1.1}^+/\text{CD3}^-$ natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gezeigt. Deren Population vergrößerte sich innerhalb von 24 Stunden nach der Applikation der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIX™-Adjuvans um den Faktor 13,4. Injizierte man hingegen nur das OVA-Protein, so war kein signifikanter Anstieg der NK-Zellzahl im drainierenden Lymphknoten zu beobachten. Dem rechten Diagramm ist zu entnehmen, dass sowohl die Vakzine als auch das Adjuvans auch die Einwanderung von $\text{NK1.1}^+/\text{CD3}^+$ natürlichen Killer-T-Lymphozyten (NKT-Zellen) induzierten. Innerhalb von 24 Stunden stieg deren Zahl auf das 11,3-fache an. Nach der Injektion von OVA-Protein alleine konnte ebenfalls kein signifikanter Anstieg der NKT-Zellzahl verzeichnet werden.

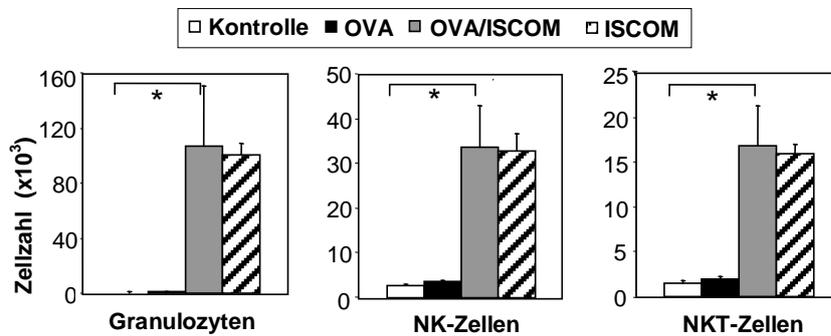


Abbildung 7: Anstieg der Zahl verschiedener Effektorzellen des angeborenen Immunsystems im drainierenden Lymphknoten. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. Granulozyten (Ly6G⁺/CD11b⁺), NK-Zellen (NK1.1⁺/CD3⁺), NKT-Zellen (NK1.1⁺/CD3⁺). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Von zentraler Bedeutung für die antigenspezifische Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sind DC – insbesondere die CD8 α ⁺ DC, welche zur Kreuzpräsentation befähigt sind [Heath, 2004]. Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf diese DC-Population gelegt. Es zeigte sich bei der FACS-Analyse, dass die Zahl der CD11c⁺ DC 24 Stunden nach der Injektion der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIXTM-Adjuvans auf das 7,8-fache angestiegen war. OVA alleine induzierte keine signifikante Zunahme der DC. Um genauere Einblicke in die Rolle der DC im Rahmen der lokalen Reaktion auf die Vakzinierung zu bekommen, erfolgte eine separate Analyse der CD8 α ⁺ DC. Die absolute Zahl der CD8 α ⁺/CD11c⁺ DC, die 20 % (\pm 4 %) der Lymphknoten-DC ausmachten, stieg nach der Injektion der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIXTM-Adjuvans innerhalb von 24 Stunden auf das 4-fache an. OVA-Protein alleine induzierte keine signifikante Expansion dieser DC-Population. Die Zahl der CD8 α ⁺/CD11c⁺ DC wuchs auf das 7,6-fache an, wenn die Mäuse die Vakzine oder das Adjuvans verabreicht bekamen (**Abbildung 8**).

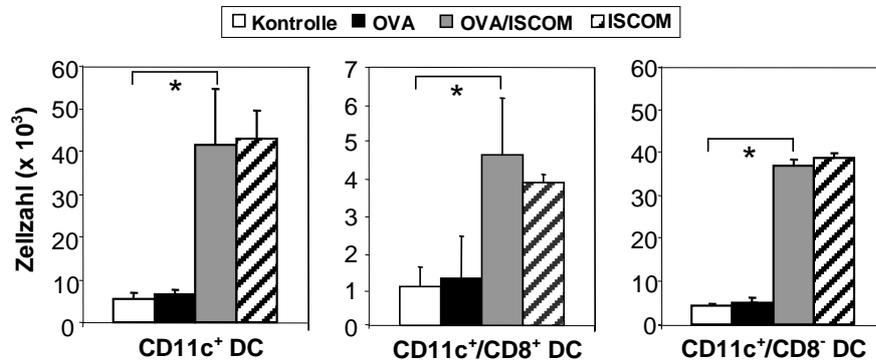


Abbildung 8: Zellzahl von DC im drainierenden Lymphknoten. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Die Einwanderung der DC erfolgte überwiegend zwischen 12 und 24 Stunden nach der Injektion. Nach 4 -12 Stunden war lediglich eine sehr geringe Zunahme der DC-Zahl im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. In **Abbildung 9** ist der Zuwachs der Lymphknoten-DC-Populationen nach der Injektion der ISCOM-Vakzine in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

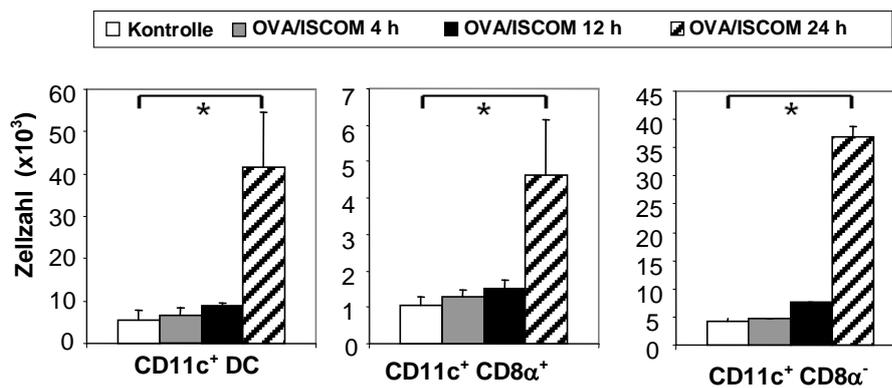


Abbildung 9: Gezeigt ist die Zellzahl der CD8 α ⁺ und CD8 α ⁻ DC-Populationen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation der ISCOM-Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Formatiert: Schriftart: 9 pt, Fett

3.2 Aktivierung verschiedener Leukozytenpopulationen und Zytokinproduktion

3.2.1 Aktivierung von Lymphozyten-Populationen durch die ISCOM-Vakzine

Nachdem sich gezeigt hatte, dass ISCOMATRIX™-Adjuvans einen starken Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung des drainierenden Lymphknotens ausübt, sollte untersucht werden, ob die an der Reaktion auf die Vakzinierung beteiligten Leukozyten sich hinsichtlich ihres Aktivierungsgrads und ihrer Zytokinproduktion von nativen Leukozyten unterscheiden. Dazu wurde einerseits die Expression von Oberflächenmolekülen, die typischerweise von aktivierten Zellen verstärkt exprimiert werden, durchflusszytometrisch gemessen. Ferner wurde die Zytokinproduktion mit Hilfe fluoreszierender FACS-Antikörper quantifiziert.

Die Verabreichung der ISCOM-Vakzine bzw. des ISCOMATRIX™-Adjuvans alleine führten zu einer verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf diversen Lymphozyten-Populationen. Sowohl B-Zellen als auch T-Zellen zeigten 24 Stunden nach der Vakzinierung eine signifikant erhöhte CD69-Expression. Dabei fiel die Steigerung am deutlichsten bei den CD8⁺ T-Lymphozyten aus. Von diesen exprimierten bei den Kontrolltieren 8 % (± 2 %) CD69, bei vakzinierten Tieren dagegen waren es 33 % (± 5 %). Bei den CD4⁺ T-Zellen stieg der Anteil von 8 % ($\pm 0,5$ %) auf 11,5 % ($\pm 0,5$ %), bei den B-Zellen von 3,5 % (± 1 %) auf 6 % ($\pm 0,5$ %) (**Abbildung 10**).

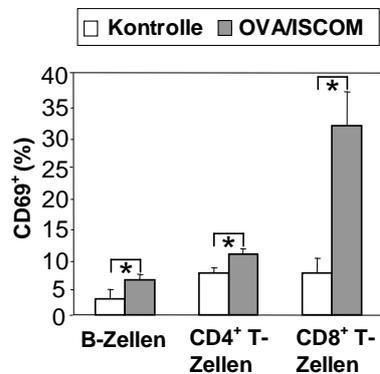


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der CD69-exprimierenden B- und T-Zellen von vakzinieren Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. B-Zellen (CD3⁻ CD19⁺), T-Helferzellen (CD3⁺ CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Eine Zunahme der CD69-Expression wurde ferner bei NK1.1⁺/CD3⁻ NK-Zellen sowie NK1.1⁺/CD3⁺ NKT-Zellen beobachtet. Bei den Kontrolltieren exprimierten 6 % (\pm 2 %) der NK-Zellen CD69, dagegen waren es bei den vakzinieren Tieren nach 24 Stunden 41 % (\pm 8 %). Der Anteil der CD69-exprimierenden NKT-Zellen konnte durch die Applikation der ISCOM-Vakzine innerhalb von 24 Stunden von 26 % (\pm 4 %) auf 53 % (\pm 11 %) gesteigert werden. Dass diese Aktivierung im Anschluss an die Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine bis zu 120 Stunden lang anhält wird in **Abbildung 11** verdeutlicht. Analyierte man die Vakzine-drainierenden Lymphknoten 72 Stunden nach der Gabe der ISCOM-Vakzine, so zeigte sich ein etwa gleich hoher Anteil aktivierter Zellen wie nach 24 Stunden. Erst nach 72 Stunden kam es zu einer allmählichen Verminderung der Zahl aktivierter NK- und NKT-Zellen. Aber selbst nach 120 Stunden war der Anteil CD69⁺ NK-/NKT-Zellen an der Gesamtmenge der NK-/NKT-Zellen noch signifikant erhöht.

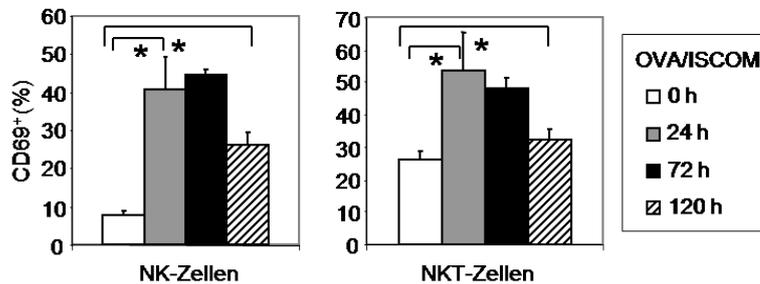


Abbildung 11: Nach der Vakzinierung kam es zu einer lang anhaltenden Aktivierung von NK-Zellen und NKT-Zellen. 24 h, 72 h bzw. 120 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Mit Hilfe des intrazellulären Zytokinnachweises mit fluoreszierenden Anti-IFN- γ -Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die NK- und NKT-Zellen nach der Verabreichung der ISCOM-Vakzine nicht nur den Oberflächenmarker CD69 hochregulieren, sondern auch IFN- γ in gesteigertem Maße produzieren. In **Abbildung 12** ist der prozentuale Anteil der IFN- γ -exprimierenden NK-Zellen beziehungsweise NKT-Zellen 24 Stunden nach der Vakzinierung dargestellt. Im Falle der NK-Zellen waren dies 16 % (\pm 6 %). Bei den Kontrolltieren waren es 1,4 % (\pm 0,4 %). Hatten die Mäuse statt der ISCOM-Vakzine lediglich das OVA-Protein erhalten, so war der Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen mit 2,3 % (\pm 0,4 %) geringfügig höher als bei den Kontrolltieren. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den NKT-Zellen. Hier konnte der Anteil der IFN- γ -produzierenden NKT-Zellen durch die Vakzinierung von 1,1 % (\pm 0,8 %) (Kontrolle) auf 7 % (\pm 1,3 %) gesteigert werden. Verabreichte man nur das OVA-Protein, so kam es zu keinem signifikanten Effekt.

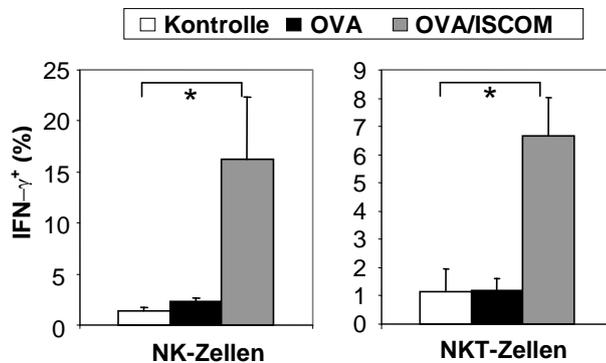


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der IFN- γ -produzierenden NK- bzw. NKT-Zellen. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde eine Intrazellulärfärbung für IFN- γ durchgeführt und die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

3.2.2 Einfluss des ISCOMATRIX™-Adjuvans auf die Aktivierung von DC-Populationen im drainierenden Lymphknoten

Die Induktion effektiver CTL-getragener Immunantworten gegen ein im Impfstoff enthaltenes Antigen erfordert die Kreuzpräsentation dieses Antigens durch aktivierte DC. Unaktivierte DC bergen hingegen die Gefahr, Immuntoleranz gegenüber einem Antigen zu fördern [Steinman 2002], was im Falle einer Tumorstoffvakzine unerwünscht ist. Es war daher ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob DC unter dem Einfluss des ISCOMATRIX™-Adjuvans einen höheren Aktivierungs- und Reifegrad entwickeln und zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten in der Lage sind. Zum einen wurde dazu die Expression von MHC-II und CD86 auf DC mittels FACS-Analyse bestimmt. Zum anderen wurde die Expression von intrazellulärem IL-12p40/p70 durchflusszytometrisch gemessen. Dieses Zytokin lenkt die Immunantwort des Organismus in Richtung einer T_{H1}-Dominanz, was für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen von Bedeutung ist.

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression von MHC-II innerhalb von 24 Stunden für CD11c⁺ DC. **Abbildung 13** zeigt die Zunahme der MHC-II-Expression. Die Expression von MHC-II von DC bei den Kontrolltieren wurde als 100% definiert. In Relation dazu ergab sich für die Gesamtpopulation der DC 24 Stunden nach der Injektion der ISCOM-Vakzine eine 2,2-fache MHC-II-Expressionszunahme. Am ausgeprägtesten war der Effekt für die Gruppe der CD8 α ⁺/CD11c⁺ DC. Dort stieg die

MHC-II-Expressionsdichte auf das 3,9-fache des Ausgangswertes an. Für die Population der $CD8\alpha^+/CD11c^+$ DC war eine Steigerung auf das 1,9-fache zu beobachten. Injizierte man den Mäusen lediglich OVA-Protein so kam es zu keiner signifikanten Intensitätszunahme.

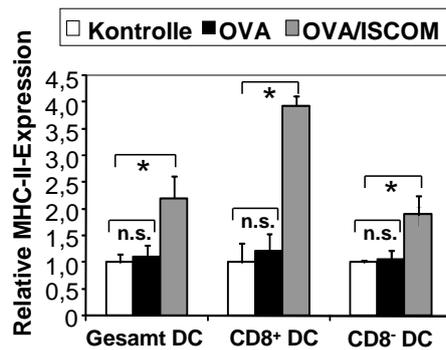


Abbildung 13: Relative MHC-II-Expression der $CD11c^+$ DC bei Mäusen die mit der ISCOM-Vakzine geimpft wurden im Vergleich zu unbehandelten Tieren. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Die Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine führte darüber hinaus zu einer verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86. Auch hier war der Effekt für die Gruppe der $CD8\alpha^+/CD11c^+$ DC am stärksten ausgeprägt. **Abbildung 14** zeigt die CD86-Expression 24 Stunden nach der Injektion des OVA-Proteins bzw. der ISCOM-Vakzine. Die Werte sind – analog zur Abbildung 12 – als relative Expressionszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

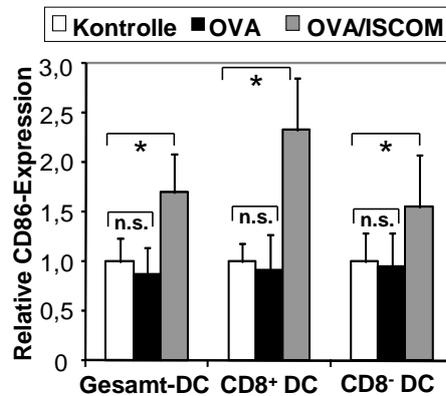


Abbildung 14: Relative CD86-Expression der CD11c⁺ DC bei Mäusen die mit der ISCOM-Vakzine vakziniert wurden im Vergleich zu DC von unbehandelten Tieren. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

Die CD8 α ⁺ DC des drainierenden Lymphknotens ließen sich ferner - nach der Permeabilisierung der Zellmembranen - mit Antikörpern gegen IL-12p40/p70 anfärben. Dieses frühzeitig im Rahmen einer Immunreaktion gebildete Zytokin war bereits 12 Stunden nach der Gabe der ISCOM-Vakzine in den Zellen nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt waren 11,6 % (\pm 2,0 %) der CD8 α ⁺ DC positiv für IL-12. Führte man den IL-12-Nachweis 24 Stunden nach der Vakzinierung durch, so ergab sich für die CD8 α ⁺ DC ein ähnliches Bild. Der Anteil der IL-12-produzierenden Zellen lag bei 11,8 % (\pm 3,9 %). Zu keinem Zeitpunkt konnte dagegen innerhalb der Population der CD8 α ⁻ DC eine Zunahme der IL-12-Produktion im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden. Lösliches OVA-Protein induzierte bei keiner der beiden DC-Populationen IL-12 (**Abbildung 15**).

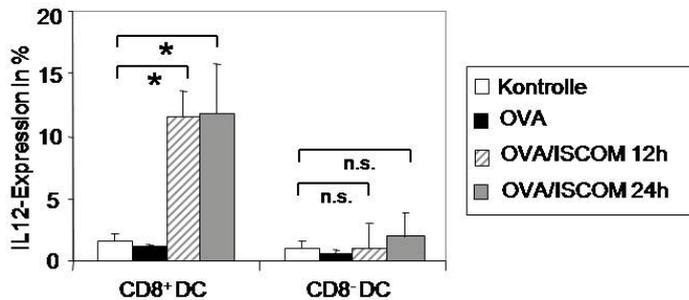


Abbildung 15: IL-12 ist bereits 12 Stunden nach Injektion der ISCOM-Vakzine in CD8 α^+ DC nachweisbar. CD8 α^- DC produzieren kein IL-12. 12 h bzw. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde eine Intrazellulärfärbung für IL-12p40/70 durchgeführt und die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

3.2.3 Induktion von IL-6 durch die ISCOM-Vakzine

Für die Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten ist neben IL-12 auch IL-6 von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die einen IL-6-Mangel aufweisen, eine eingeschränkte Bildung von T_{Helfer}-Zellen des Typs 1 (T_{H1}-Zellen) zeigen [McLoughlin 2005, Hurst 2001, Teague 1997, Kovalovich 2001, Kishimoto 1995, Kopf 1995]. Diese wiederum sind für die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich im drainierenden Lymphknoten einer vakzinierten Maus vermehrt IL-6 nachweisen lässt. Dazu wurden die Lymphknoten 24 Stunden nach der Injektion der Vakzine entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Diese wurden für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und im Überstand wurde die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Wie in **Abbildung 16** dargestellt, lag bei den Kontrolltieren die IL-6-Konzentration mit 15 pg/ml im Bereich der Nachweisgrenze des ELISA. Bei Mäusen, welche die ISCOM-Vakzine erhalten hatten, ergab sich eine durchschnittliche IL-6-Konzentration von 1876,1 (\pm 205 pg/ml) pg/ml. Deutlich niedrigere Werte wiesen die Mäuse auf, die lösliches OVA-Protein erhalten hatten. Hier lag die durchschnittliche IL-6-Konzentration bei 123,1 pg/ml (\pm 27,3 pg/ml).

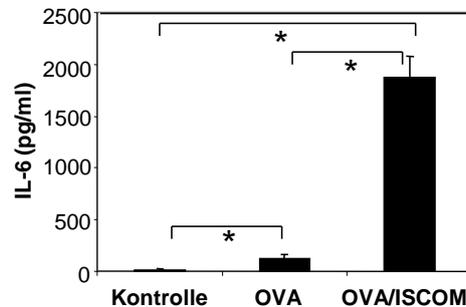


Abbildung 16: IL-6-Konzentration im Überstand von Einzelzellsuspensionen aus drainierenden Lymphknoten. 24 h nach Injektion der ISCOM-Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurde im Überstand die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

3.3 Zelluläre Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch Leukozytenpopulationen des drainierenden Lymphknotens

3.3.1 Zelluläre Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch DC

Da es für die Induktion von zytotoxischen T-Zell-Antworten erforderlich ist, dass DC Antigen aufnehmen, prozessieren und auf MHC-I-Molekülen kreuzpräsentieren, wurde untersucht, ob die ISCOM-Vakzine von DC des drainierenden Lymphknotens aufgenommen wird. Dazu wurde eine ISCOM-Vakzine verwendet, bei der OVA mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa-488 assoziiert wurde ($OVA_{Alexa488}/ISCOM$). Zum Vergleich stand lösliches Alexa-488-assoziiertes OVA-Protein zur Verfügung. Die zelluläre Aufnahme der Vakzine beziehungsweise des löslichen Proteins wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. In **Abbildung 17A** ist ein Beispiel einer solchen FACS-Analyse gezeigt. Im linken Diagramm sind $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^- CD11c^+$ DC-Populationen zu erkennen. Im Beispiel wurde bei der Analyse der Daten auf die $CD8\alpha^+$ DC ein *Gate* gesetzt. Diese Zellen wurden dann hinsichtlich der Antigenaufnahme untersucht. Im mittleren Diagramm ist das Ergebnis für eine Kontrollmaus gezeigt, welche kein fluoreszierendes Antigen bekommen hat. Das rechte Diagramm zeigt die Antigenaufnahme durch $CD8\alpha^+$ DC nach Injektion der ISCOM-Vakzine (20 % der Zellpopulation).

Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte bei dieser Versuchsreihe vier, zwölf beziehungsweise 24 Stunden nach der subkutanen Injektion der oben genannten Substanzen. Bereits vier Stunden nach der Applikation konnten DC detektiert werden, die fluoreszierendes Antigen aufgenommen hatten. 6,6 (\pm 1,2) % aller CD11c⁺ DC hatten das lösliche OVA-Protein aufgenommen und 8,7 (\pm 2,3) % die ISCOM-Vakzine. Zwischen zwölf und 24 Stunden nach der Injektion stieg der Anteil der Zellen, welche die Vakzine endozytiert hatten auf 15,4 (\pm 6,4) %. Der Anteil der DC, die lösliches OVA-Protein aufgenommen hatten blieb dagegen etwa gleich. Die Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch DC war also signifikant effizienter als die des löslichen Proteins.

Interessanterweise war die Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch die CD8 α ⁺ DC besonders effektiv. 24 Stunden nach der Injektion hatten 19,8 (\pm 3,8) % dieses DC-Subtyps das Antigen aufgenommen. Hätten die Mäuse statt der Vakzine lösliches Protein erhalten, so lag die Antigenaufnahme durch die CD8 α ⁺ DC bei 15,3 (\pm 5,4) %. In **Abbildung 17B** sind die beschriebenen Ergebnisse graphisch dargestellt.

Von den CD8 α ⁻ DC wurde die ISCOM-Vakzine deutlich effektiver aufgenommen als lösliches OVA-Protein. 24 Stunden nach der Injektion hatten 5,6 (\pm 3,4 %) der CD8 α ⁻ DC lösliches OVA-Protein aufgenommen. Die ISCOM-Vakzine hingegen hatten 14,4 (\pm 6,5) % der CD8 α ⁻ DC aufgenommen.

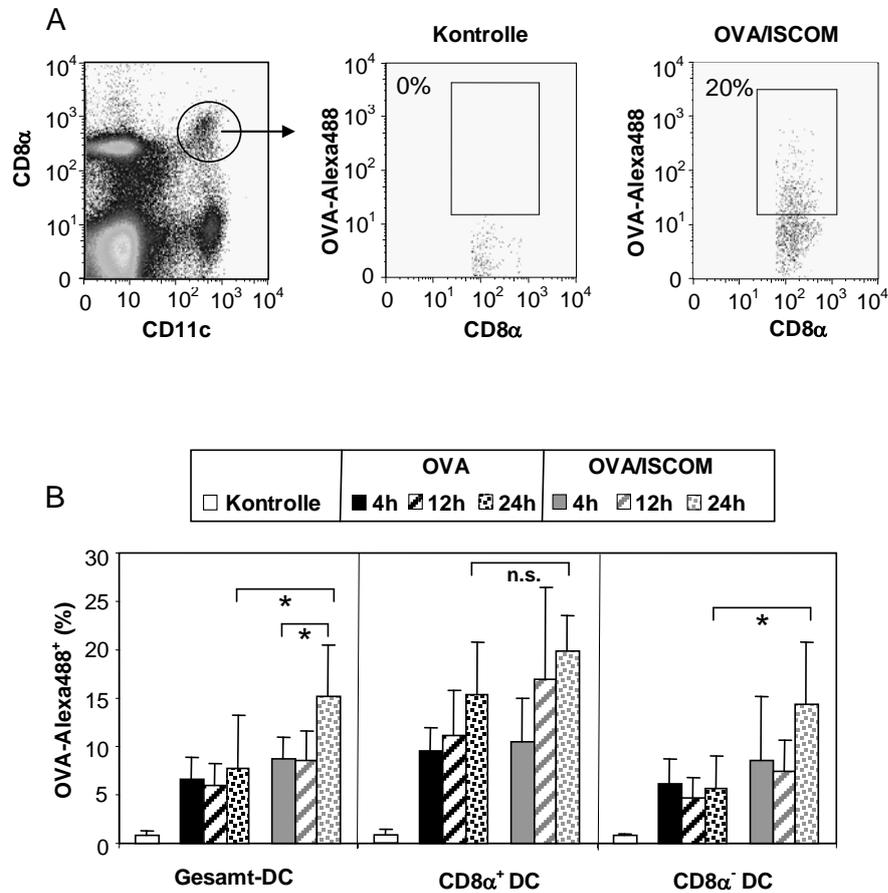


Abbildung 17: (A) Durchflusszytometrische Analyse der Antigenaufnahme durch CD11c⁺ DC im drainierenden LK. Bei der Kontrollmaus ist keine Antigenaufnahme nachweisbar (0 %), bei der vakzinierter Maus lässt sich in 20 % der CD8α⁺ DC des drainierenden LK fluoreszierendes Antigen nachweisen. (B) Prozentualer Anteil der CD11c⁺ DC die nach verschiedenen Zeitintervallen fluoreszierendes Antigen aufgenommen haben. Vier, zwölf bzw. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension durchflusszytometrisch analysiert. Die Fluoreszenzintensitätsgrenze wurde stets so definiert, dass der Anteil der positiven Zellen bei den Kontrollen unter 1% lag. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen ± SD; *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

3.3.2 Endozytose der ISCOM-Vakzine durch Granulozyten

Neben den DC nahmen auch die in Folge der Vakzinierung in den drainierenden Lymphknoten eingewanderten neutrophilen Granulozyten (Ly6G⁺/CD11b⁺) die ISCOM-Vakzine auf. Untersuchte man die Granulozyten 24 Stunden nach der Injektion des fluoreszierenden Antigens, so zeigte sich, dass 25,1 (± 6,6) % der Zellen die Vakzine aufgenommen hatten (**Abbildung 18**).

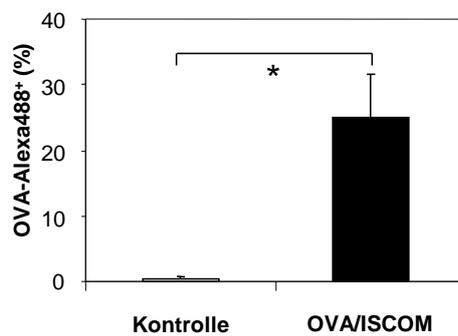


Abbildung 18: Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch Ly6G⁺/CD11b⁺ Granulozyten im drainierenden LK. 24 h nach Injektion der Vakzine wurden die drainierenden LK entfernt und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Suspension mittels FACS-Analyse analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen ± SD; *P < 0,05.

Weder bei B-Lymphozyten noch bei T-Lymphozyten bzw. NK-Zellen konnte während des gesamten Zeitraums eine Antigenaufnahme nachgewiesen werden.

3.4 Induktion einer antigenspezifischen CTL-Antwort durch die OVA/ISCOM-Vakzine

Um die Effektivität der ISCOM-Vakzine bezüglich der Induktion von CTL zu bestimmen, wurde die Frequenz OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut bzw. in der Milz quantifiziert. Es erfolgten zwei subkutane Injektionen der OVA/ISCOM-Vakzine. Zwischen den Impfungen wurde ein Zeitintervall von einer Woche eingehalten. Eine Woche nach der zweiten Vakzinierung wurden dann Blut bzw. die Milzen der Mäuse entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Lymphozyten wurden dann mit dem H2-K^b-restringierten OVA-Peptid SIINFEKL inkubiert bevor mit Hilfe einer intrazellulären Anfärbung des Zytokins IFN- γ mittels fluoreszierender FACS-Antikörper der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Kontrolltiere erhielten entweder PBS oder lösliches OVA-Protein.

Die FACS-Analysen ergaben, dass die OVA/ISCOM-Vakzine eine hocheffiziente Proliferation von antigenspezifischen CTL induzierte. 7,5 (\pm 1,5) % aller CD8⁺ T-Zellen der Milz hatten sich durch das Peptid SIINFEKL zur IFN- γ -Synthese anregen lassen, was der Frequenz OVA-spezifischer CTL entspricht. Bei Kontrolltieren war der Anteil SIINFEKL-spezifischer T-Zellen dagegen unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,05 %). Verwendete man als Vakzine lösliches OVA-Protein, so lag der Anteil SIINFEKL-spezifischer CTL ebenfalls unter 0,05 %. Auch eine Steigerung der OVA-Dosis um den Faktor 100 brachte keine relevante Zunahme des prozentualen Anteils OVA-spezifischer CTL, was die insuffiziente Induktion von CTL durch lösliches Protein reflektiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 19** dargestellt.

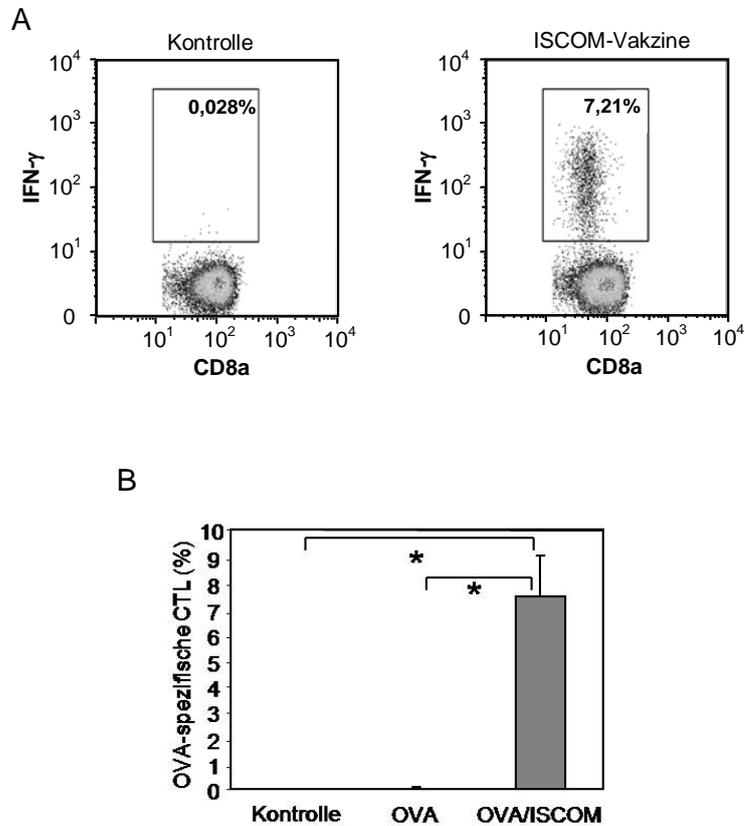


Abbildung 19: (A) Induktion antigenspezifischer CTL: Sieben Tage nach der zweiten Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine wurden die Milzen entnommen und zu Einzelsuspensionen verarbeitet. Nach der Stimulation der Milzzellen mit dem Peptid SIINFEKL erfolgte der intrazelluläre IFN- γ -Nachweis mittels FACS-Analyse. Links ist ein Beispiel für Kontrolltiere gezeigt, das rechte Diagramm ist repräsentativ für vakzinierter Tiere. (B) Der Anteil OVA-spezifischer CTL nach Vakzinierung mit löslichem OVA (30 μ g) lag unterhalb der Nachweisgrenze. Dagegen bewirkte die ISCOM-Vakzine (0,1 μ g OVA) eine effiziente Induktion von OVA-spezifischen CTL. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

3.5 Zytotoxische Aktivität OVA-spezifischer CTL

Im nächsten Schritt wurde die funktionelle zytotoxische Aktivität der durch die Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine induzierten OVA-spezifischen CTL quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden den Mäusen je 10^6 Splenozyten intravenös übertragen, von denen die Hälfte mit SIINFEKL-Peptid beladen war, die andere Hälfte nicht. Um die beiden Splenozytenpopulationen unterscheiden zu können wurden sie vorher mit verschiedenen Konzentrationen des durchflusszytometrisch detektierbaren Markers CFSE angefärbt. Die spezifische Lyse der SIINFEKL-beladenen Milzzellen wurde an den Tagen 10 und 35 nach der zweiten Vakzinierung ermittelt. Zehn Tage nach der zweiten Vakzinierung betrug die antigenspezifische Lyse der Splenozyten 85 %. An Tag 35 nach der zweiten Vakzinierung betrug die spezifische Lyse immer noch 62 %. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 20** dargestellt.

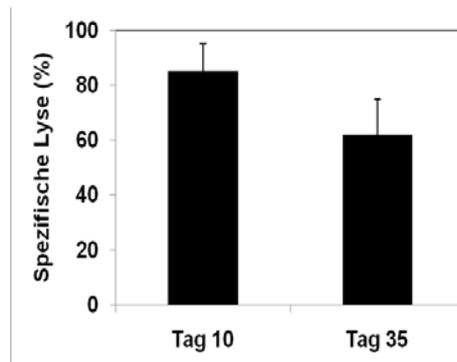


Abbildung 20: *In-vivo*-Elimination SIINFEKL-beladener Splenozyten durch OVA-spezifische CTL. Die Mäuse wurden an den Tagen 0 und 7 mit der OVA/ISCOM-Vakzine geimpft. Zehn beziehungsweise 35 Tage nach der zweiten Vakzinierung wurden den Mäusen SIINFEKL-beladene, CFSE-markierte Splenozyten übertragen. Jeweils nach 16 Stunden wurde den Tieren Blut abgenommen und die spezifische Lyse der Splenozyten durchflusszytometrisch bestimmt (vgl. 2.3.11). Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD.

3.6 Antitumorale Immunität gegen OVA-exprimierende Tumore

In einem weiteren Schritt wurde getestet, ob die OVA/ISCOM-Vakzine einen effektiven Schutz vor OVA-exprimierenden Tumoren verleihen kann. Dazu wurden zwei Gruppen von Mäusen verwendet, wobei die Tiere der ersten Gruppe unbehandelt waren (Kontrolltiere), während die Tiere der zweiten Gruppe zuvor zweimal mit der ISCOM-Vakzine behandelt worden waren. 21 Tage nach der zweiten Vakzinierung wurden den Mäusen jeweils 10^6 OVA-exprimierende B16-Melanomzellen (MO5-Zellen) subkutan in die Flanke verabreicht. Es zeigte sich, dass die zuvor geimpften Tiere gegen die Entwicklung eines OVA-exprimierenden Melanoms zu 100% geschützt waren, während die unbehandelten Tiere frühzeitig rasch wachsende Tumore entwickelten. An Tag 17 nach der Tumorzellinjektion hatte sich bei den unbehandelten Tieren ein durchschnittlich 180 mm^2 großer Tumor entwickelt. Die vakzinierten Tiere wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen beobachtet und blieben während dieses Zeitraums vollständig tumorfrei. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 21** dargestellt.

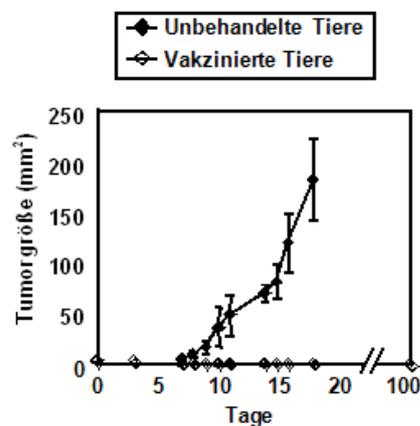


Abbildung 21: Entwicklung OVA-exprimierender B16-Tumore bei vakzinierten beziehungsweise unbehandelten Mäusen. 30 Tage nach der zweiten Impfung mit der OVA/ISCOM-Vakzine wurden den Mäusen je 10^6 M05-Melanomzellen subkutan verabreicht. Während geimpfte Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum tumorfrei blieben, entwickelten die unbehandelten Tiere rasch einen Tumor. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD.

3.7 Induktion OVA-spezifischer Antikörper durch die ISCOM-Vakzine

Um die Effektivität der ISCOM-Vakzine hinsichtlich der Induktion OVA-spezifischer Antikörper zu bestimmen, wurden die Mäuse zweimal im Abstand von einer Woche mit PBS (Kontrolle), OVA, beziehungsweise mit der OVA/ISCOM-Vakzine vakziniert. Weitere drei Wochen später (Tag 28) wurden die Serumspiegel spezifischer IgG-, IgG₁ und IgG_{2a}-Antikörper gemessen. Bei Mäusen, die mit der OVA/ISCOM-Vakzine geimpft wurden, kam es zu einem deutlichen Anstieg OVA-spezifischer IgG-Antikörper gegenüber Kontrolltieren, wobei die IgG₁-Subklasse dominierte, während die IgG_{2a}-Antikörper-Konzentration deutlich weniger zunahm. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Tieren, die mit OVA-Protein allein geimpft wurden keine signifikante IgG-Antikörper-Antwort. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 22** dargestellt.

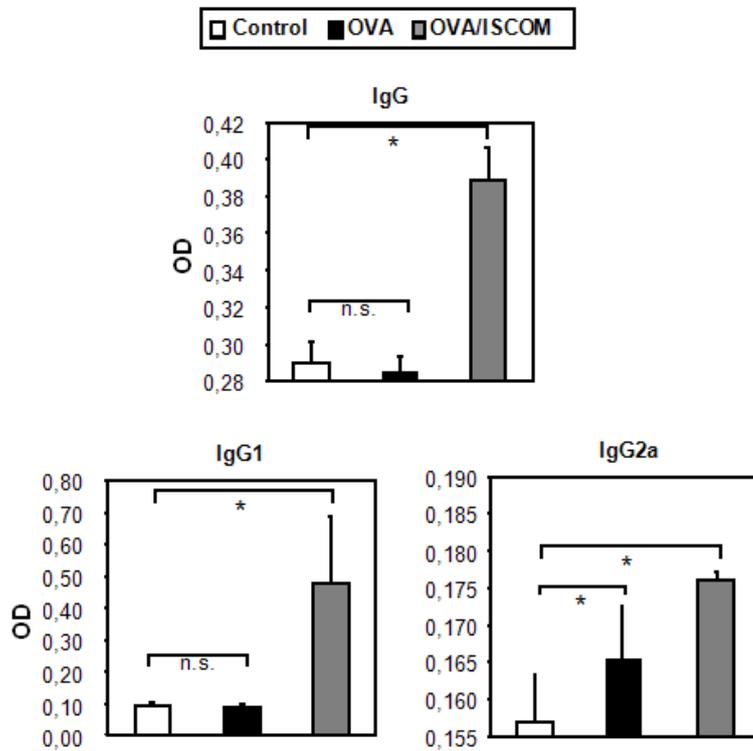


Abbildung 22: Nach zwei Vakzinierungen mit PBS, OVA oder der OVA/ISCOM-Vakzine (jeweils 0,3 μ g OVA) im Abstand von einer Woche wurde die Konzentration von IgG-Antikörpern (und den Subklassen IgG₁ und IgG_{2a}) im Blutserum an Tag 28 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 5 Mäusen \pm SD; *P < 0,05.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1 Rekrutierung von Leukozytenpopulationen in den ISCOM-Vakzine drainierenden Lymphknoten und deren Aktivierung

Um den lokalen immunstimulatorischen Effekt einer ISCOM-Vakzine auf die Leukozytenpopulationen *in vivo* zu charakterisieren, wurden PBS, lösliches OVA-Protein, eine OVA/ISCOM-Vakzine oder ISCOMATRIX™ ohne Antigen Mäusen subkutan injiziert, nach verschiedenen Zeitintervallen die drainierenden Lymphknoten entfernt und hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung, der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche von Leukozyten sowie deren Zytokinproduktion analysiert. Sowohl ISCOMATRIX™ alleine als auch die OVA/ISCOM-Vakzine induzierten innerhalb von 24 Stunden eine ausgeprägte Vergrößerung des drainierenden Lymphknotens, was auf eine Zunahme der Zellzahl um den Faktor 4 im Vergleich zu Lymphknoten einer mit PBS oder OVA behandelten Maus zurückgeführt werden konnte. Die FACS-Analyse ergab einen Anstieg der B-Zellen um den Faktor 5, der CD4⁺ T-Zellen um den Faktor 3 sowie der CD8⁺ T-Zellen um den Faktor 2,5. Der CD4⁺/CD8⁺-Quotient änderte sich dabei nicht signifikant. Ferner nahm nach Injektion der OVA/ISCOM-Vakzine beziehungsweise des ISCOMATRIX™-Adjuvans die Zahl der Effektorzellen des angeborenen Immunsystems deutlich zu. Die Anzahl der NK-Zellen stieg um den Faktor 13, die der NKT-Zellen um den Faktor 11. Interessanterweise wurden auch neutrophile Granulozyten in den drainierenden Lymphknoten rekrutiert, was bei den Kontrolltieren nicht der Fall war. Der immunstimulatorische Effekt war auf die drainierenden Lymphknoten beschränkt und unterschied sich nicht signifikant für die ISCOM-Vakzine und das ISCOMATRIX™-Adjuvans ohne Antigen.

ISCOMATRIX™-Adjuvans induzierte neben der Zunahme der Zellzahl auch eine ausgeprägte Aktivierung sowohl von Effektorzellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. So fand sich eine Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen. Außerdem konnte eine gesteigerte IFN- γ -Produktion durch NK- und NKT-Zellen beobachtet werden. Somit vermitteln ISCOM-Vakzine einen potenten immunstimulatorischen Effekt im drainierenden LK.

4.1.2 Antigenaufnahme und Aktivierung dendritischer Zellen im Vakzine-drainierenden Lymphknoten

Das ISCOMATRIX™-Adjuvans induzierte eine 7-fache Zunahme von DC im drainierenden Lymphknoten. Die Zahl der CD8 α ⁻ DC stieg um den Faktor 7,6 und der CD8 α ⁺ DC um den Faktor 4. Die Immigration der DC erfolgte überwiegend im Zeitraum zwischen zwölf und 24 Stunden nach der Injektion. Das ISCOMATRIX™-Adjuvans führte ferner zu einer Aktivierung der DC mit einer verstärkten Expression von MHC-II und CD86. Dieser Effekt war bei den CD8 α ⁺ DC am stärksten ausgeprägt. Zudem induzierte die Vakzine in CD8 α ⁺ DC die Produktion von IL-12, ein Zytokin, welches bei der Induktion einer CTL-Antwort eine zentrale Rolle spielt. Studien mit Fluorochrom-markiertem OVA-Protein ergaben, dass 15,4 % der DC im drainierenden Lymphknoten nach 24 Stunden die OVA/ISCOM-Vakzine inkorporiert hatten, lösliches OVA-Protein hingegen nur 6,6 % der DC. Interessanterweise hatten sogar 20 % der CD8 α ⁺ DC, eine auf die Kreuzpräsentation spezialisierte DC-Population, die Vakzine inkorporiert. Somit scheint ein effektives *in vivo* Targeting von DC mit ISCOM-Vakzinen möglich zu sein, was mit einer dramatisch erhöhten Anzahl aktivierter und Antigen-aufnehmender DC einhergeht.

4.1.3 Induktion antigenspezifischer CTL

Ein zentrales Ziel der Arbeit war festzustellen, ob ISCOM-Vakzine effektive CTL-Antworten induzieren. Nach zweifacher Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine betrug der Anteil OVA-spezifischer CTL durchschnittlich 7,5 % aller CD8⁺ T-Zellen. Im Vergleich hierzu induzierte lösliches OVA-Protein sogar in 100-fach höherer Konzentration keine messbare CTL-Antwort. Wie *in vivo*-Zytotoxizitätsassays zeigten, waren die CTL in der Lage, peptidgepulste Targetzellen zu erkennen und effektiv abzutöten. An den Tagen 10 und 35 nach zweifacher Vakzinierung lag die spezifische Lyse bei 80 % bzw. 60 % der Targetzellen. Die ISCOM-Vakzine verlieh den Mäusen darüber hinaus einen prophylaktischen Schutz gegen Tumore. So entwickelten ungeimpfte Mäuse nach Tumorzellinjektion rasch OVA-exprimierende B16-Melanome, während vakzinierte Tiere über den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen tumorfrei blieben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur

4.2.1 Antitumorale Aktivität des Immunsystems und ihre Grenzen

Der Grundgedanke hinter der Entwicklung einer Tumorstoffimpfung ist die Erkenntnis, dass das Immunsystem grundsätzlich in der Lage ist, maligne entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren [Dunn 2004]. Verschiedene Mechanismen können jedoch dazu führen, dass es den Tumorzellen gelingt, dem Immunsystem zu entkommen und zu proliferieren (*tumor immune escape*). Zu diesen Mechanismen gehören die Ausschüttung apoptoseinduzierender oder immunsupprimierender Substanzen (z.B. VEGF, TGF- β), die Toleranzinduktion durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen [Zou 2006, Jarnicki 2006], sowie die verminderte Expression von MHC-I-Molekülen. Letztlich kommt es dadurch zu einer Selektion der Tumorzellen, welche die geringste Immunogenität aufweisen. Dieser Vorgang wird auch als *Immunoediting* bezeichnet [Dunn 2004, Rabinovich 2007]. Auch im Falle einer Etablierung eines soliden Tumors kann eine Aktivität des Immunsystems beobachtet werden. So können im Tumorgewebe zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden [Galon 2006]. Diese scheinen jedoch aufgrund der tumorinduzierten Immunsuppression keine ausreichende Aktivität aufzuweisen. Die Idee hinter der Generierung einer Tumorstoffimpfung ist die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Aktivierung und Hemmung des Immunsystems in der Umgebung eines Tumors auf die Seite der Aktivierung. So soll durch eine Verstärkung der Immunantwort die Potenz des körpereigenen Immunsystems zur Bekämpfung von Malignomen genutzt werden.

In einer Reihe von Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Toleranz gegenüber Tumoren durch eine Vakzinierung mit DC durchbrochen werden kann. In klinischen Studien konnte die prinzipielle Wirksamkeit einer Vakzinierung mit DC bezüglich immunologischer und klinischer Endpunkte demonstriert werden [Thurner 1999]. Die Therapieerfolge waren in der Regel jedoch nur von limitiertem Umfang und von kurzer Dauer. Viele Autoren, die sich mit der Thematik der DC-basierten Vakzinierung auseinandersetzen kommen zu dem Schluss, dass es sich hierbei um eine vielversprechende Methode handelt, die jedoch bisher eindeutiger Belege für eine nachhaltige klinische Wirksamkeit schuldig geblieben ist [Schuler 2003]. Hierfür gibt es eine Vielzahl möglicher Ursachen. So verwenden die meisten Arbeitsgruppen im Rahmen experimenteller und vor allem klinischer Studien *ex vivo* generierte DC, wie

beispielsweise die sogenannten Mono-DCs, die durch eine *in-vitro*-Kultur von Monozyten in Anwesenheit bestimmter Zytokine (z.B. GM-CSF und IL-4) gewonnen werden können. Zwar sind die Methoden der DC-Gewinnung ständig weiterentwickelt worden, so dass inzwischen innerhalb von 48 Stunden reife Mono-DC mit einer Reinheit von über 95 % generiert werden können [Dauer 2003], aber dennoch handelt es sich dabei um Zellen, die unter unphysiologischen Bedingungen generiert werden und aus dem komplexen Kontext des Immunsystems – zumindest vorübergehend – entfernt werden. Ein weiteres Problem bei der Generierung von DC stellt die Verwendung von Zytokinen dar, die auch unerwünschte Effekte haben können. So wurden in klinischen Studien DC verwendet, die unter dem Einfluss von Prostaglandin E₂ (PGE₂) generiert wurden. PGE₂ unterdrückt jedoch die Sekretion von IL-12p70, wodurch die Fähigkeit zur T-Zellaktivierung gemindert wird [Kalinski 2001].

Ein Schritt in die richtige Richtung könnte dabei die Verwendung eines Adjuvans sein, das es ermöglicht, sich die DC zu Nutze zu machen, ohne sie dabei aus ihrem physiologischen Milieu zu entfernen. Ein solches Adjuvans sollte für die Induktion von CTL-Antworten folgende Eigenschaften haben: es sollte als Trägersubstanz für ein vollständiges Protein fungieren, die Vakzine sollte effektiv von DC *in vivo* aufgenommen werden und diese aktivieren sowie die Kreuzpräsentation der Proteinantigene fördern. Zudem muss die Vakzine aus medizinischer Sicht sicher und gut verträglich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ISCOMATRIX™-Adjuvans verwendet. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der ursprünglich von Morein et al. beschriebenen immunstimulierenden Komplexe (*immunostimulating complex*, „ISCOM“, [Morein 1984]). Die ursprünglichen ISCOM™-Vakzine konnten nur mit Hilfe amphipathischer Proteine mit einem zentralen lipophilen Abschnitt generiert werden, was die Auswahl der verwendbaren Proteine deutlich einschränkte. Das moderne ISCOMATRIX™ kann hingegen mit praktisch jedem Protein assoziiert werden [Maraskovsky 2009]. In mehreren klinischen Studien wurde die gute Verträglichkeit von ISCOMATRIX™ demonstriert, die unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass keine tierischen Bestandteile enthalten sind. Inzwischen wurde die Vakzine an über 1300 Patienten mit chronischen Virusinfektionen oder Tumorerkrankungen erprobt, ohne dass schwerwiegende Nebenwirkungen aufgetreten sind [Drane 2007, Maraskovsky 2009]. Um die immunologischen Mechanismen, die der Vakzinierung mit ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen zu Grunde liegen, näher charakterisieren zu können, wurde eine OVA/ISCOM-Vakzine generiert, welche in dieser Arbeit verwendet

wurde. Nachfolgend werden die Effekte diskutiert, die nach der *in-vivo*-Applikation der ISCOM-Vakzine beobachtet werden konnten.

4.2.2 Konzentrierung verschiedener Immunzellpopulationen im drainierenden Lymphknoten

Eine Voraussetzung für die Induktion einer nachhaltigen Immunreaktion ist die Interaktion der verschiedenen Zelltypen des Immunsystems im Kontext des zu bekämpfenden Fremdantigens. So kann beispielsweise die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder die Bildung langlebiger T-Gedächtniszellen nicht ohne deren direkte oder indirekte Wechselwirkung mit T-Helfer-Zellen erfolgen [Schoeneberger 1998, Wang 2003, Sun 2003]. Die T-Helfer-Zellen selbst benötigen ebenfalls aktivierende Signale, beispielsweise von DC, die wiederum mit anderen Abwehrzellen interagieren [Moser 2000]. Es wird vermutet, dass die Wechselwirkung zwischen DC und NK-Zellen eine wichtige Rolle im Rahmen der immunvermittelten Tumorabwehr spielt. So können reife DC die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen induzieren [Fernandez 1999]. Umgekehrt können NK-Zellen die Reifung von DC fördern und sie zur Zytokinproduktion anregen [Gerosa 2002]. Um derartige Wechselwirkungen zu ermöglichen ist es erforderlich, dass die verschiedenen Zellen des Immunsystems in einem gemeinsamen Reaktionsmilieu zusammentreffen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ISCOMATRIXTM-Adjuvans eine effektive Rekrutierung von Immunzellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems in den drainierenden Lymphknoten bewirkt. Der makroskopisch sichtbar vergrößerte Lymphknoten wies 24 Stunden nach der Injektion des ISCOMATRIXTM-Adjuvans bzw. der ISCOM-Vakzine eine deutlich erhöhte Zellzahl auf. B- und T-Lymphozyten, die auch im nativen Lymphknoten die Mehrzahl der Zellen ausmachen, stellten dabei die dominierenden einwandernden Populationen dar. Daneben konnten NK-Zellen, NKT-Zellen, Granulozyten und verschiedene DC-Subtypen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der drainierende Lymphknoten im Anschluss an die subkutane Injektion des ISCOMATRIXTM-Adjuvans das Reaktionszentrum einer komplexen Immunreaktion darstellt.

Von besonderer Bedeutung für eine erfolgreiche Vakzinierung dürfte der deutliche Expansion der DC-Population um den Faktor 7,7 sein. Martin-Fontecha et al. konnten zeigen, dass eine effektive Migration von DC in den drainierenden Lymphknoten die Voraussetzung für eine suffiziente Aktivierung von T-Zellen ist. Sie transferierten CFSE-markierte transgene T-Zellen mit einem spezifischen T-Zell-Rezeptor in syngene Mäuse und injizierten dann aktivierte DCs, die mit dem relevanten OVA-Peptid beladen

waren unter die Haut. Anschließend wurde die Aktivierung der T-Zellen anhand der CFSE-Verdünnung durch Zellteilung gemessen. Eine Halbierung der Zahl der injizierten DC führte dabei zu einer vierfach verringerten T-Zell-Proliferation [Martin-Fontecha 2003].

4.2.3 Dauer der DC-Migration von der Haut in den drainierenden Lymphknoten

In klinischen Studien zur Immuntherapie von Tumoren wurden die Kenntnisse, mit Hilfe welcher Zytokine sich die Reifung und Migration von DC induzieren lässt, am Patienten angewendet. Schadendorf et al. führten eine randomisierte klinische Phase-III-Studie durch, deren Ziel es war, die Überlegenheit einer DC-basierten Immuntherapie gegenüber einer Standardchemotherapie mit Dacarbazin bei Melanompatienten zu demonstrieren. Sie verwendeten dabei Mono-DC, die mit Hilfe von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ zur Reifung gebracht wurden. Diese wurden dann mit tumorrelevanten Peptiden beladen und anschließend den Patienten lymphknotennah subkutan verabreicht. Die Überlegenheit der DC-Vakzine gegenüber der Standardchemotherapie konnte in dieser Studie nicht belegt werden, wodurch der Enthusiasmus für die DC-Therapie stark gebremst wurde [Schadendorf 2006]. Für den fehlenden Therapieeffekt kommen zahlreiche Gründe in Frage. Es ist denkbar, dass DC-basierte Immuntherapien noch nicht optimal funktionieren, weil die Kenntnisse über die Reifung und Migration von DC noch nicht ausreichend sind. Möglicherweise hat der Prozess der DC-Generierung und der DC-Reifung *ex vivo* bei dieser Studie zu lange gedauert, so dass die Migrationsfähigkeit und die Zytokinproduktion der Zellen nicht mehr optimal waren [Andrews 2008]. In einer klinischen Studie wurden den Patienten DC, die mit einem radioaktiven Tracer markiert waren, subkutan injiziert. Die Migration dieser DC in den drainierenden Lymphknoten wurde dann mittels Bildgebung nachverfolgt. Dabei zeigte sich, dass die DC-Migration etwa 1-2 Tage dauerte und nur ein geringer Prozentsatz der Zellen den Lymphknoten erreichte [Morse 1999, Ridolfi 2004]. Es wurde ferner gezeigt, dass Mono-DC, die mit Peptiden beladen wurden, ihre Fähigkeit zur T-Zellstimulation nach ein bis zwei Tagen nahezu vollständig verlieren, ein Nachteil, der in dieser Studie durch Beladung der DC mit Proteinantigenen beseitigt werden konnte [Schnurr 2005]. Möglicherweise ist jedoch die aufwändige und kostspielige *ex-vivo*-Generierung und Antigenbeladung von DC gar nicht erforderlich, da sowohl in der Haut als auch im lymphatischen Gewebe DC in großer Anzahl vorhanden sind. Es erscheint vorteilhaft, die DC nicht aus ihrem physiologischen Milieu zu entfernen, sondern *in vivo* auszunutzen. In der vorliegenden Arbeit kam es innerhalb der ersten zwölf Stunden nach der Injektion der ISCOM-Vakzine zu einer Zunahme der DC-Zahl im drainierenden Lymphknoten um den Faktor 1,7, in den

folgenden zwölf Stunden um den Faktor 7,7 bezogen auf den Ausgangswert (0 h). Es dauerte also circa 12 Stunden, bis die ersten migratorischen DC der Haut den Impfstoff aufnahmen, die Fähigkeit zur Migration erlangten und den drainierenden Lymphknoten erreichten. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen, die Allan et al. 2006 publizierten. Sie behandelten die Haut von Mäusen mit dem durchflusszytometrisch nachweisbaren Farbstoff FITC und Dibutylphthalat, welches als ein starker Induktor der DC-Migration bekannt ist [Macatonia 1987]. Innerhalb der ersten 8-12 Stunden beobachteten Sie die Ankunft der ersten dermalen DC im drainierenden Lymphknoten. Innerhalb der folgenden 12 Stunden kam es zu einer deutlich gesteigerten Immigration (Zunahme um etwa den Faktor 6 gegenüber den ersten 12 Stunden). In den folgenden 24 Stunden blieb die Zahl FITC⁺ DC konstant und nahm dann wieder ab [Allan 2006]. Es ist anzunehmen, dass innerhalb der Beobachtungszeit in erster Linie dermale DC in den Lymphknoten einwanderten, da die Vakzine sub-/intra-dermal injiziert wurde. Für die in der Epidermis angesiedelten Langerhans-Zellen wurde eine Migrationsdauer von 24 – 72 h beschrieben [Kissenpfennig 2005, Allan 2006].

4.2.4 Effektive Aufnahme der ISCOM-Vakzine durch CD8 α ⁺ DC

DC sind eine heterogene Gruppe antigenpräsentierender Zellen, die eine Art immunologisches Überwachungsnetzwerk in praktisch allen Geweben bilden, ständig Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen und zwischen körpereigenen und fremden Strukturen unterscheiden können [Villadangos 2007]. Ihnen wird aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation eine bedeutende Rolle bei der Induktion antitumorale Immunität zugeschrieben [Mellman 2001]. Bei Mäusen sind vor allem die CD8 α ⁺ DC darauf spezialisiert, durch die Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen antigenspezifische zytotoxische T-Zellen zu aktivieren und zur Expansion anzuregen [den Haan 2000, Allan 2003]. Ob auch Langerhanszellen zur Induktion von CTL befähigt sind ist umstritten [Allan 2003, Stoitzner 2008]. Die effektive Aufnahme und Prozessierung der Vakzine durch CD8 α ⁺ DC ist daher von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass 24 h nach der subkutanen Injektion der ISCOM-Vakzine circa 20 % der CD8 α ⁺ DC im drainierenden Lymphknoten die Vakzine inkorporiert hatten. Ein Grund, warum ISCOMATRIXTM-assoziiertes Antigen so effektiv von DC aufgenommen wird dürfte die Partikelgröße des Adjuvans sein. Mit einem Durchmesser von 40-50 nm ähneln die ISCOMATRIXTM-Partikel viralen Partikeln, auf die das Immunsystem spezialisiert ist. So konnten Fifis et al. unter Verwendung von Polystyrene-Nanopartikeln zeigen, dass diese Partikelgröße am besten geeignet ist, um eine Aktivierung von DC und zytotoxischen T-Zellen zu induzieren [Fifis 2004].

Die Aufnahme der ISCOM-Vakzine konnte auch bei den CD205⁺/CD8 α ⁻ DC, die überwiegend dermalen DC entsprechen [Allan 2006], beobachtet werden. Vermutlich aktivieren dermale DC nicht direkt zytotoxische T-Zellen im drainierenden Lymphknoten, sondern dienen als Transportvehikel, welche die ISCOM-Vakzine oder Bestandteile davon auf DC8 α ⁺ DC im drainierenden Lymphknoten übertragen. So konnten Allan et al., nachdem sie die Haut von Mäusen mit Herpes-simplex-Viren infiziert hatten, zeigen, dass eine Aktivierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen nur nach MHC-I-abhängiger Antigenpräsentation durch CD8⁺ DC im Lymphknoten erfolgte, nicht jedoch durch die dermalen DC oder Langerhanszellen. Blockierten sie aber die Migration der dermalen DC zum drainierenden Lymphknoten, so wurde die Aktivierung der CTL unterbunden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass migratorische DC das Antigen zum drainierenden Lymphknoten transportieren und es dort auf CD8 α ⁺ Lymphknoten-DC übertragen, die es dann MHC-I-gebunden den CTL präsentieren [Allan 2006]. Diese Theorie steht auch in Einklang mit der gängigen Meinung, dass die Kreuzpräsentation eine spezialisierte Funktion der CD8 α ⁺ DC ist [den Haan 2000, Pooley 2001].

4.2.5 Induktion der DC-Reifung durch ISCOMATRIX™

Die Reifung der DC ist charakterisiert durch eine Abnahme der Antigenaufnahme, die Migration in lymphatische Organe sowie einen terminalen Differenzierungsprozess, bei dem sich DC in Zellen umwandeln, die auf die Aktivierung von T-Lymphozyten spezialisiert sind. Voraussetzung für die CTL-Aktivierung ist die Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 und CD86, auf der DC-Oberfläche [Banchereau 1998, O'Neill 2004]. Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, wie wichtig die Aktivierung der DC im Rahmen der Immuntherapie von Tumoren für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist. So haben de Vries et al. Melanompatienten mit peptidgepulsten DC behandelt, wobei die Hälfte der Patienten reife, die andere Hälfte unreife DC erhielt. Nur bei den Patienten, die mit reifen DC behandelt worden waren, zeigte sich eine effektive zelluläre und humorale Immunantwort [de Vries 2003]. Antigenpräsentation durch unreife DC birgt gar das Risiko einer Toleranzinduktion. So gehört die Akkumulation unreifer DC zu einem der Mechanismen, durch die Tumore sich gegen das Immunsystem schützen [Gabrilovich 1997, Wakkach 2003, O'Neill 2004]. Daher sollten Adjuvanz-basierte Tumorkvakzine nicht nur effektiv von DC aufgenommen werden, sondern auch zu einer Aktivierung und Reifung der DC führen. Nach der subkutanen Injektion der ISCOM-Vakzine zeigte sich eine erhöhte Expression der Reifemarker MHC-II und CD86 auf den DC im drainierenden Lymphknoten. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auf die

adjuvante Wirkung des ISCOMATRIX™-Adjuvans zurückzuführen ist. Injizierte man das OVA-Protein ohne ISCOMATRIX™, so zeigte sich keine gesteigerte Expression dieser Aktivierungsmarker. Interessanterweise ist dieser DC-aktivierende Effekt nur *in vivo* nachweisbar. Werden DC *in vitro* mit der ISCOM-Vakzine inkubiert, findet keine relevante DC-Reifung statt [Maraskovsky 2004].

4.2.6 Kreuzpräsentation der ISCOM-Vakzine auf MHC-I

DC haben die einzigartige Fähigkeit, exogenes Antigen nicht nur auf MHC-II-Komplexen, sondern auch auf MHC-I-Komplexen zu präsentieren, ein Vorgang, der Kreuzpräsentation genannt wird. Auf diese Weise können DC eine integrierte T-Zell-Antwort hervorrufen, an der sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten beteiligt sind, was die Voraussetzung für eine optimale Aktivierung von CTL und die Induktion von Gedächtniszellen ist [Banchereau 1998, O'Neill 2004]. Die Antigenbeladung von DC im Rahmen einer Tumorstimmung sollte darauf abzielen, eine effektive Kreuzpräsentation und somit die Aktivierung antitumoraler CTL zu induzieren. Dass ISCOMATRIX™-gebundenes OVA-Protein nach subkutaner Applikation effektiv kreuzpräsentiert wird, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. So führte die zweimalige Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine zur Induktion spezifischer CTL, welche sich durch Inkubation mit dem OVA-Peptid SIINFEKL *in vitro* aktivieren und zur IFN- γ -Synthese stimulieren ließen. Bei unbehandelten Mäusen lag der Anteil OVA-spezifischer CTL in der Milz unterhalb der Nachweisgrenze (<0.05%), während er bei vakzinieren Tieren auf durchschnittlich 7,5 % anstieg. Diese zytotoxischen T-Zellen zeigten lytische Aktivität gegenüber SIINFEKL-beladenen Splenozyten. Außerdem konnte die Vakzinierung den Mäusen einen prophylaktischen Schutz vor OVA-exprimierenden Tumorzelllinien verleihen. Eine effektive Kreuzpräsentation einer ISCOM-Vakzine durch DC konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden. Unter Verwendung humaner Mono-DC, die mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ beladen wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass die Kreuzpräsentation über mindestens drei Tage anhält [Schnurr 2005]. Eine derart lang anhaltende Kreuzpräsentation erhöht sehr wahrscheinlich die Chancen einer produktiven Interaktion zwischen DC und Antigen-spezifischen T-Zellen im Vakzine-drainierenden Lymphknoten.

4.2.7 IL-12-Produktion durch DC

IL-12 besitzt eine zentrale Funktion in der Induktion einer T-Helferzell-1(T_{H1})-Immunantwort, die durch eine verstärkte Produktion des Zytokins IFN- γ

gekennzeichnet ist. Es fördert die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Helfer-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen und reduziert die IL-4-vermittelte Suppression der IFN- γ -Synthese. Dies führt letztlich zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen, NKT-Zellen sowie von CTL, also zu einer gesteigerten zellvermittelten Abwehr, wie sie im Rahmen der Tumorbekämpfung erforderlich ist [Macatonia 1995, Heufler 1996, Carnaud 1999, Smith 2004]. Bereits 1994 demonstrierten Trinchieri et al., dass IL-12 eine T-Zell-vermittelte antitumorale Wirkung besitzt, die auf einer Induktion der IFN- γ -Synthese beruht [Trinchieri 1994]. Villacres-Eriksson et al. fanden heraus, dass die Verabreichung von Anti-IL-12-Antikörpern nach der Vakzinierung mit ISCOM-Vakzinen zu einer reduzierten Produktion spezifischer Antikörper führte [Villacres-Eriksson 1997]. Smith et al. konnten zeigen, dass die antigenspezifische Immunantwort nach Vakzinierung mit ISCOM-Vakzinen bei IL-12-*Knock-out*-Mäusen deutlich verringert ist [Smith 1999]. Unklar blieb in der Studie von Smith et al., von welchen Zellen das IL-12 nach der Vakzinierung gebildet und sezerniert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass IL-12p40/70 ab etwa 12 Stunden nach der subkutanen Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine von den CD8 α^+ DC im drainierenden Lymphknoten gebildet wird. CD8 α^- DC hingegen bildeten kein IL-12. Somit kommt den CD8 α^+ DC nicht nur durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, sondern auch durch die Synthese von IL-12 eine besondere Rolle im Rahmen der Induktion einer antigenspezifischen, zytotoxischen T-Zell-Antwort zu.

4.2.8 IFN- γ -Sekretion durch aktivierte NK- und NKT-Zellen nach Injektion der ISCOM-Vakzine

In Folge der Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine konnte im drainierenden Lymphknoten eine erhöhte Zahl aktivierter NK-Zellen und NKT-Zellen gemessen werden. Die Aktivierung dieser Zellen spiegelte sich in einer erhöhten Expression des Oberflächenmarkers CD69 wider. Martin-Fontecha et al. konnten zeigen, dass durch Adjuvantien, die eine verstärkte Rekrutierung von NK-Zellen in den drainierenden Lymphknoten bewirken, eine stärker ausgeprägte T_{H1}-Immunantwort induziert wird als durch Adjuvantien, die nicht zu einer signifikanten Immigration dieser Zellen führen [Martin-Fontecha 2004]. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass nach der Applikation der ISCOM-Vakzine die NK- und NKT-Zellen im drainierenden Lymphknoten das T_{H1}-Zytokin IFN- γ exprimierten. Die Wirkung von IFN- γ besteht unter anderem darin, dass es die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen wie DC steigert und somit die Antigenerkennung durch

CTL verbessert [Schröder 2004]. Hieraus resultiert eine Verstärkung der zellvermittelten Immunantwort auf das jeweilige Fremdprotein. Die Bandbreite und die Menge der präsentierten Antigene werden wahrscheinlich durch einen IFN- γ -induzierten Ersatz des normalen Proteasoms durch das Immunproteasom erhöht [Groettrup 2001]. Auch die Antigenpräsentation durch Tumorzellen wird unter dem Einfluss von IFN- γ gesteigert. Ferner induziert IFN- γ im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus die Produktion von IL-12 durch DC und unterhält dadurch die Verlagerung des T_{H1} - T_{H2} -Gleichgewichts auf die Seite des T_{H1} -Phänotyps [Schröder 2004, Jonasch 2001].

NK-Zellen und DC können sich somit im drainierenden Lymphknoten gegenseitig aktivierend beeinflussen. DC können durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-12 und IL-18 (das nach der Injektion der ISCOM-Vakzine auch im drainierenden Lymphknoten nachweisbar ist [Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe]) NK-Zellen in den drainierenden Lymphknoten rekrutieren, diese aktivieren und zur Produktion des T_{H1} -Zytokins IFN- γ anregen [Fernandez 1999, Martin-Fontecha 2004]. NK-Zellen wiederum verstärken die Antigenpräsentation sowie die IL-12-Sekretion durch DC [Gerosa 2002]. Letztlich resultiert eine antigenspezifische Immunantwort, die von zytotoxischen T-Zellen getragen ist, so dass die antigenpräsentierenden DC als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem betrachtet werden können.

Die ISCOM-Vakzine induzierte einen Anstieg der NKT-Zellzahl im drainierenden Lymphknoten um den Faktor 11,3. Zudem aktivierte sie in dieser Zellpopulation die Synthese von IFN- γ . Welche Rolle NKT-Zellen bei der Tumorabwehr spielen ist nicht eindeutig geklärt. Es zeichnet sich jedoch ab, dass sie *in vivo* funktionell mit den NK-Zellen verknüpft sind und dass die Aktivierung des einen Zelltyps zur Aktivierung des anderen führt. Die ursprüngliche Meinung, dass nur NK-Zellen eine lytische Aktivität gegenüber Tumorzellen zeigen, wohingegen NKT-Zellen eine vornehmlich regulatorische Funktion haben, musste korrigiert werden. Vielmehr scheinen beide Zelltypen beide Funktionen zu haben und dabei zu kooperieren [Cui 1997, Kawano, 1998]. So konnte gezeigt werden, dass NKT-Zellen eine rasche IFN- γ -vermittelte Aktivierung von NK-Zellen (erhöhte Expression von CD69 und IFN- γ) bewirken [Carnaud, 1999]. Mäuse mit einem Mangel an NKT-Zellen zeigen eine verminderte antitumorale Immunantwort. Cui et al. konnten demonstrieren, dass die Prävention von Lebermetastasen eines B16-Melanoms mit IL-12 von der Anwesenheit von NKT-Zellen abhängig ist [Cui 1997].

4.2.9 Induktion einer humoralen Immunantwort durch die ISCOM-Vakzine

Für eine effektive antitumorale Aktivität des Immunsystems ist neben der zellulären Immunantwort eine gleichzeitige humorale, antikörpervermittelte Immunantwort von Bedeutung. Hierdurch können über die zellvermittelte Zytotoxizität hinausgehende Effektormechanismen in Gang gesetzt werden, wie beispielsweise die Komplementaktivierung oder die Antikörper-vermittelte Zytolyse durch Zellen des unspezifischen Immunsystems [Drane 2007]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine OVA-spezifische IgG₁- und IgG_{2a}-Antikörper induziert werden. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte von Maraskovsky et al. gezeigt werden, dass ISOMATRIXTM-basierte Impfstoffe eine gemischte T_{H1}-/T_{H2}-Zytokinantwort hervorrufen und spezifische Antikörper sowohl des IgG₁- als auch des IgG_{2a}-Isotyps induzieren [Maraskovsky 2004].

4.2.10 ISCOMATRIXTM-vermittelte Entzündungsreaktion im drainierenden Lymphknoten

Die Injektion der ISCOM-Vakzine beziehungsweise des ISCOMATRIXTM-Adjuvans führte zu einer lokalen Entzündungsreaktion im drainierenden Lymphknoten. Dort konnten neutrophile Granulozyten sowie die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-1 β [Ergebnis aus der eigenen Arbeitsgruppe] und IL-6 nachgewiesen werden. Diese lokale inflammatorische Reaktion ist für die Induktion einer effektiven Immunantwort von Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Migration von DC in den drainierenden Lymphknoten von der Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6 abhängig ist [Cumberbatch 2001]. IL-6 ist darüber hinaus an der Induktion der DC-Reifung beteiligt [Schadendorf 2006, Maraskovsky 2009]. Ein proinflammatorisches Milieu wirkt sich ferner auf Lymphozyten aus, die sich während einer Entzündungsreaktion vermehrt im drainierenden Lymphknoten einfinden und zugleich am Verlassen des lymphatischen Gewebes gehindert werden [Cahill 1976, Mackay 1992]. Hierdurch erhöhen sich sowohl die Zahl als auch die Verweildauer der T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe und dadurch die Wahrscheinlichkeit produktiver Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen und spezifischen T-Zellen. In IL-6-*Knockout*-Mäusen sind die T-Zell-Rekrutierung in den drainierenden Lymphknoten sowie die Entwicklung und Aktivierung von CTL gestört [McLoughlin 2005, Hurst 2001, Teague 1997, Kovalovich 2001, Kishimoto 1995, Kopf 1995]. Ein weiterer Vorteil der Induktion einer Entzündungsreaktion im Rahmen der Immuntherapie von Tumoren könnte ein positiver Einfluss auf das peritumorale immunsuppressive Milieu sein. Immunsuppressive Zytokine und regulatorische T-

Zellen verhindern, dass antitumorale Effektorzellen in der Umgebung des Tumors ihre Wirkung entfalten [Dunn 2004, Rabinovich 2007]. Proinflammatorische Zytokine können diese tumorinduzierte Immunsuppression verringern [Andrews 2008]. So konnte für IL-6 eine hemmende Wirkung auf immunsuppressive CD4⁺/CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) demonstriert werden [Pasare 2003].

4.2.11 Reduktion der Antigendosis durch Verwendung von ISCOMATRIX™

In mehreren Tierversuchsstudien konnte gezeigt werden, dass das ISCOMATRIX™-Adjuvans eine deutliche Reduktion der Antigendosis einer Vakzine ermöglicht, ohne deren Effektivität zu verringern. So konnten Boyle et al. unter Verwendung von ISCOMATRIX™ die Proteindosis einer Vakzine gegen Glykoprotein-120 (gp120) gegenüber einem gp120-Impfstoff auf der Basis von Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) um den Faktor 100 senken ohne die Effektivität der Impfung zu reduzieren [Boyle 2007]. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte das ISCOMATRIX™-Adjuvans den Einsatz sehr geringer Proteinmengen. Mit 0,1 µg OVA-Protein ließen sich die oben beschriebenen Effekte wie die Zytokininduktion, die Kreuzpräsentation sowie die Rekrutierung von Effektorzellen in den drainierenden Lymphknoten induzieren, wenn OVA mit ISCOMATRIX™ assoziiert war. Wurde nur OVA injiziert, blieben diese Effekte aus. Der Anteil antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen, der nach zweimaliger Verabreichung der ISCOM-Vakzine bei 7,5 (± 1,5) % lag, betrug nach zweimaliger Gabe des OVA-Proteins weniger als 0,1 %. Eine Steigerung der OVA-Dosis um den Faktor 100 führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Effektivität. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich mit Hilfe der ISCOM-Vakzine bei einer Proteinmenge von 0,3 µg die Bildung von Antikörpern induzieren lässt, wohingegen diese ausbleibt, wenn nur das lösliche OVA ohne ISCOMATRIX™ verwendet wird, auch wenn die Proteinmenge auf 300 µg gesteigert wird.

Die Reduktion der Proteindosis durch die Verwendung eines potenten Adjuvans ermöglicht die Produktion ausreichender Mengen eines Impfstoffs auch dann, wenn die Bereitstellung des entsprechenden Proteinantigens aufgrund eines schwierigen Herstellungsprozesses quantitativ limitiert ist oder wenn die Nachfrage sehr hoch ist, so zum Beispiel im Falle einer Pandemie. Ferner eröffnen geringe Proteindosen die Möglichkeit kombinierte Impfstoffe gegen mehrere Antigene herzustellen, was sonst aufgrund der limitierten Proteinmasse, die an ein Adjuvans gekoppelt werden kann, nicht möglich wäre [Boyle 2007]. Letzteres ist für die Entwicklung einer Tumorstoffe von Bedeutung, da Tumore durch Mutationsprozesse Zellen hervorbringen können, die die ursprünglich synthetisierten Proteine nicht mehr exprimieren und damit dem

Immunsystem entgehen (*tumor immune escape*) [Rabinovich 2007]. Somit erscheinen ISCOM-Vakzine geeignet, polyvalente Impfstoffe, z.B. gegen Infektionskrankheiten oder Tumore, zu generieren.

4.3 Klinische Bedeutung von ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen

Mit Hilfe gentechnischer Verfahren können heutzutage Tumorantigene als vollständige Proteine rekombinant hergestellt werden, was die Produktion spezifischer Impfstoffe gegen Tumorproteine möglich macht. Lösliches Protein allein hat nur eine geringe immunogene Potenz und muss deshalb mit Substanzen formuliert werden, die eine Steigerung der Immunantwort bewirken, so genannte Adjuvantien. Bis heute gibt es nur sehr wenige, für die Anwendung am Menschen zugelassene Adjuvantien. Das am häufigsten eingesetzte Adjuvans Alum verbessert die Induktion von Antikörperantworten, hat aber auf die Induktion von CTL keinen signifikanten Einfluss [Rook, 1998, Hanly 1995, Neuzil 1997]. Deshalb ist es erforderlich, dass neue Substanzen mit Eigenschaften entwickelt werden, die den Ansprüchen an ein effektives Adjuvans zur Herstellung von Tumorkvakzinen genügen und gleichzeitig ausreichend sicher und verträglich sind, um Anwendung am Menschen finden zu können.

Das ISCOMATRIX™-Adjuvans hat immunmodulierende Wirkungen und führt zur Rekrutierung, Aktivierung und Reifung von antigenpräsentierenden Zellen und Effektorzellen des Immunsystems *in vivo*. Vermittler dieser Wirkungen sind proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ . Neben der immunmodulierenden Wirkung hat ISCOMATRIX™ eine Trägerfunktion. Durch die Kombination von ISCOMATRIX™ mit einem Protein entsteht eine ISCOM-Vakzine. ISCOMATRIX™ kann mit vollständigen Proteinen assoziiert werden, die eine Vielzahl an MHC-I und MHC-II-Epitopen beinhalten [Schnurr 2005] und fördert die Aufnahme der Vakzine durch antigenpräsentierende DC. Dort findet eine Translokation des Antigens ins Zytosol der Zelle statt, was zu einer effektiven Kreuzpräsentation führt [Schnurr 2009]. Letztlich entsteht eine verstärkte, gemischte zelluläre und humorale Immunantwort [Maraskovsky 2009].

Erste klinische Studien zur Immuntherapie von Tumoren mit autologen DC wurden bereits vor über zehn Jahren durchgeführt, nachdem in Tierexperimenten effektive

Immunantworten demonstriert worden waren [Hsu 1996]. Nach ersten vielversprechenden Ergebnissen zeigte sich, dass lang anhaltende Erfolge die Ausnahme waren. Je größer die zu behandelnden Tumore waren, desto geringer war das Ansprechen der Therapie. In einer klinischen Phase-III-Studie aus dem Jahr 2006 konnte die bessere Wirksamkeit von DC-Vakzinen gegenüber der Standard-Chemotherapie bei Melanompatienten nicht nachgewiesen werden [Schadendorf 2006]. Für den ausbleibenden Erfolg kommen zahlreiche methodische Ursachen in Frage. So ist die Verwendung *ex vivo* generierter DC problematisch, da diese hinsichtlich Morphologie, Aktivierung und Funktion nicht den DC *in vivo* entsprechen. So konnte gezeigt werden, dass sich Mono-DC, die in die Haut injiziert werden, von dermalen DC hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern wie CD52 unterscheiden [Ratzinger 2003]. Ferner ist die Rekrutierung von Mono-DC nach subkutaner Injektion in den drainierenden Lymphknoten sehr ineffizient, wodurch nur eine sehr geringe Anzahl der DC mit antigenspezifischen T-Zellen interagieren können [Verdijk 2009]. Außerdem wurden überwiegend MHC-I-restringierte Peptide eingesetzt, die gegenüber Proteinen als Quelle für Tumorantigen entscheidene Nachteile, wie Limitationen durch die HLA-Restriktion und relativ kurze Bindung an MHC-I-Molekülen auf den DC, mit sich bringen.

Tumorvakzine auf der Basis von ISCOMATRIX™ haben den Vorteil, dass die DC nicht aus ihrem physiologischen Milieu entfernt werden müssen, um mit Antigen beladen und aktiviert zu werden. *In vivo* können Differenzierungsprozesse und Zell-Zell-Interaktionen stattfinden, die *in vitro* nicht auftreten. So kommt es beispielsweise bei der Exposition humaner DC gegenüber ISCOMATRIX™ *in vitro* nur zu einer schwachen Steigerung der CD86- und MHC-II-Expression auf der Zelloberfläche, wohingegen eine ausgeprägte Expressionssteigerung bei DC im drainierenden Lymphknoten zu sehen ist, wenn ISCOMATRIX™ subkutan injiziert wird [Drane 2007]. Eine Aktivierung von DC *ex vivo* birgt außerdem die Gefahr, dass die Injektion in den Organismus zum falschen Zeitpunkt geschieht, wenn die Zellen noch nicht ausreichend aktiviert sind oder bereits die Fähigkeit zur Migration wieder abnimmt [Andrews 2008]. ISCOMATRIX™ bietet die Möglichkeit, *in vivo* in das Immunsystem einzugreifen und die Schwierigkeiten, die sich bei einer DC-Manipulation *ex vivo* ergeben, zu umgehen. Weitere Vorteile zellfreier Vakzine sind geringere Herstellungskosten sowie eine bessere Verfügbarkeit, da keine aufwändigen Verfahren wie die Zytapherese zur Gewinnung autologer Zellen erforderlich sind. Außerdem sind klinische Studien besser vergleichbar, da Qualitätsschwankungen bei der Herstellung entfallen, die dann auftreten, wenn Zellen von verschiedenen Spendern an verschiedenen Zentren

gewonnen werden müssen [Dauer 2008]. Aufgrund seiner ausgeprägten immunmodulierenden Eigenschaften ist es denkbar, eine Tumorstoffvakzine auf der Basis von ISCOMATRIX™ entwickeln zu können, ohne auf immunstimulierende TLR-Liganden angewiesen zu sein. Dies könnte sich in so fern als Vorteil erweisen, als für ISCOMATRIX™ bereits in klinischen Studien eine gute Verträglichkeit und Sicherheit nachgewiesen wurde [Drane 2007] und eine Impfstoffzulassung durch die Kombination mit anderen Substanzen sicherlich erschwert würde. Es wurden bereits über 1000 Patienten mit ISCOMATRIX™-basierten Vakzinen behandelt, ohne dass schwere Nebenwirkungen aufgetreten sind.

ISCOMATRIX™-Vakzine wurden in klinischen Studien der Phasen I und II erprobt, so dass Aussagen über Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und die Verträglichkeit gemacht werden können [Drane 2007]. Ein signifikanter Wirkungsnachweis bei Tumorstoffpatienten steht noch aus. Phänomene wie *cancer immune escape*, *cancer immunoediting* und *cancer immunosuppression* [Rabinovich 2007] werden auch bei der Anwendung von ISCOMATRIX™ in der Tumorstofftherapie Schwierigkeiten bereiten. Ob sich ISCOMATRIX™ als Adjuvans durchsetzen kann bleibt abzuwarten und hängt unter anderem davon ab, ob sich Wege finden lassen, die immunsupprimierende Aktivität von Tumoren, die umso ausgeprägter ist, je größer der Tumor ist [Tuettenberg 2006], weiter zu verringern. Denkbar ist beispielsweise eine Kombination von ISCOMATRIX™ mit Standard-Chemotherapeutika [Menard 2008, Zitvogel 2008], TLR-Liganden [Napolitani 2005, Jacobs 2010] oder mit der Depletion regulatorischer T-Zellen durch Cyclophosphamid [Jacobs 2010]. Denkbar ist auch der kombinierte Einsatz mit einer Chemo- oder Radiotherapie zur Eliminierung residueller Tumorstoffzellen [Dauer 2008].

Wenn die komplexe Funktionsweise des Immunsystems mit seiner Vielfalt an Effektorzellen sowie deren Mediatoren und Wechselwirkungen besser verstanden wird, könnte eines Tages der Durchbruch bei der Immuntherapie von Tumoren gelingen.

5 Zusammenfassung

Eine der Herausforderungen beim Design einer effektiven Tumorstoffimpfung ist die Entwicklung eines Adjuvans, das es ermöglicht, dendritische Zellen (DC) *in vivo* mit Antigenen zu beladen und so zu aktivieren, dass eine effektive, T-Zell-vermittelte Immunantwort resultiert. Ein vielversprechender Ansatz ist die Verwendung des ISCOMATRIX™-Adjuvans, einer Substanz aus der Gruppe der ISCOMs, mit der bereits erste Erfolge in tierexperimentellen und klinischen Studien erzielt werden konnten. Um die klinische Anwendung von ISCOM-Vakzinen zu optimieren bedarf es eines besseren Verständnisses der Wirkungsweise dieses Adjuvans. In dieser Arbeit wurde im Mausmodell der immunstimulatorische Effekt des ISCOMATRIX™-Adjuvans auf verschiedene Leukozytenpopulationen *in vivo* charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden nach der Vakzinierung die drainierenden Lymphknoten entnommen und hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung, der Zellaktivierung und des Zytokinmilieus analysiert.

ISCOMATRIX™-Adjuvans induzierte die Einwanderung von Effektorzellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems in den drainierenden Lymphknoten, darunter verschiedene DC-Populationen, natürliche Killerzellen und natürliche Killer-T-Zellen, sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die Zellen wiesen einen aktivierten Phänotyp auf und exprimierten Th1-Zytokine wie Interferon- γ und Interleukin-12. Eine ISCOM-Vakzine mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) wurde effektiv von DC im Vakzine-drainierenden Lymphknoten aufgenommen, insbesondere von CD8 α ⁺ DC, die besonders zur Kreuzpräsentation befähigt sind. Es resultierte eine potente, durch zytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelte Immunantwort, was sich unter anderem in einer hohen Frequenz OVA-spezifischer CTL im Blut vakzinierter Mäuse widerspiegelte. Diese CTL zeigten lytische Aktivität gegenüber antigenbeladenen Zielzellen und verliehen den Mäusen einen effektiven prophylaktischen Schutz gegenüber OVA-exprimierenden Tumorzellen.

Bis zum heutigen Tage ist für die meisten Tumorerkrankungen im fortgeschrittenen Stadium noch keine befriedigende Therapiemöglichkeit verfügbar. Eine vielversprechende neue Therapieform ist die Immuntherapie von Tumoren mit Vakzinen, die CTL-Antworten gegen tumorspezifische Antigene induzieren. Hierfür wird ein Adjuvans benötigt, das den immunsuppressiven Mechanismen von Tumoren

effektiv entgegenwirkt. Die Verwendung von ISCOMATRIX™ hat in klinischen Studien bereits erste klinische Erfolge bezüglich der Induktion von T-Zellantworten bei Tumorpatienten gezeigt. ISCOM-Vakzine gelten derzeit als hoffnungsvolle Kandidaten für die Tumorstimmung. Die Charakterisierung der Wirkungsmechanismen, wie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen, kann hoffentlich die Optimierung ISCOMATRIX™-basierter Vakzine ermöglichen, um letztlich neue Therapieoptionen für tumorkranke Patienten zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, Carbone FR (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8 α^+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 2003; 301: 1925-28.

Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR and Carbone FR (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming *Immunity* 2006; 25: 153-62.

Andrews DM, Maraskovsky E, Smyth MJ (2008). Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunological Reviews* 2008; 222: 242-55.

Anjuère F, Martin P, Ferrero I, Martinez del Hoyo G, Wright N, Ardavin C (1999). Definition of dendritic cell subpopulation present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes and skin of the mouse. *Blood* 1999; 93(2): 590-98.

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Brière F, Trinchieri G (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature Immunology* 2001; 2(12): 1144-50.

Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002; 17: 341-52.

Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673): 245-52.

Boyle J, Eastman D, Millar C, Camuglia S, Cox J, Pearse M, Good J, Drane D (2007). The utility of ISCOMATRIXTM adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. *Vaccine* 2007; 25: 2541-44.

Cahill RNP, Frost H, Tranka Z (1976). The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* 1976; 143: 870-88.

Cambi A, Figdor CG (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 539-46.

Carnaud, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuky Y, Bendelac A (1999). Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *Journal Immunology* 1999; 163 (9): 4647.

- Carpentier AF**, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY (2000). Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 2469-73.
- Cerundolo V**, Hermans IF, Salio M (2004). Dendritic cells: A journey from laboratory to clinic. *Nature Immunology* 2004; 5(1): 7-10.
- Cui J**, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M and Taniguchi M (1997). Requirement for Va14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 2001; 278: 1623.
- Cumberbatch M**, Dearman RJ, Antonopoulos C, Groves R W, and Kimber I (2001). Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- α - and IL-1 β -dependent mechanism. *Immunology* 2001; 102(3): 317-322.
- Dauer M**, Obermaier B, Herten J (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *Journal of Immunology* 2003; 170 (8): 4069-76.
- Dauer M**, Schnurr M, Eigler A (2008). Dendritic cell-based cancer vaccination: quo vadis? *Expert Reviews Vaccines* 2008; 7(7): 1041-53.
- Davis ID**, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Luke T, Murphy R, Maraskovsky E, McArthur G, Cebon JS et al (2004). 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 USA* 2004; 101(29): 10697-702.
- Dörner K** (2003). Klinische Chemie und Hämatologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York* 2003; Seite 263.
- Drane D**, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky E (2007). ISCOMATRIX™ adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2007; 6(5): 761-772.
- Dunn GP**, Old LJ and Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2): 137-48.
- Ferlazzo G**, Munz C, (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *Journal of Immunology* 2004; 172: 1333-39.
- Fernandez NC**, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine* 1999; 5(4): 405-11.
- Fifis T**, Mottram P, Bogdaoska V, Hanley J, Plebanski M (2004). Short peptide sequences containing MHC class I and/or class II epitopes linked to nano-beads

induce strong immunity and inhibition of growth of antigen-specific tumour challenge in mice. *Vaccine* 2004; 23(2): 258-66.

Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *Journal of Immunology* 1996; 157: 1406-14.

Finn OJ, (2003). Cancer Vaccines: Between the idea and the reality. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 630-41.

Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *PNAS* 2001; 98(15):8809-14.

Fuse S, Obar JJ, Bellfy S, Leung EK, Zhang W, Usherwood EJ (2006). CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology* 2006; 80(18): 9159-9170.

Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP (1997). Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research* 3(3): 483-90.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. (2006). Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313 (5795): 1960-4.

Geijtebeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, Figdor CG (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575-85.

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195(3): 327-33.

Ghiringhelli F, Menard C, Puing PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007; 56: 641-48.

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* 2006; 7(3): 265-73.

Groettrup M, Kahn S, Schwaz K, Schmidtke G (2001). Interferon gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 2001; 83: 367-72.

Haan, den, MM, Lehar SM, Bevan MJ (2000). CD 8⁺ but not CD 8⁻ Dendritic cells cross-prime cytotoxic T-cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192(12): 1685-96.

Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT (1995). Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *Institute for Laboratory Animal Research* 1995; 37: 93–118.

Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 2004; 199(1): 9-26.

Heckelsmiller K, Rall K, Beck, S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer Bernd, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G (2002). Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *Journal of Immunology* 2002; 169: 3892-99.

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, Shortman K (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 741-48.

Hernandez H, Shen L and Rock KL (2007). CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8 T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4 T Cell help1. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 2844–2852.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Roman N and Schuler G (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *European Journal of Immunology* 1996; 26: 659-668.

Hsu FJ, Benike C, Fagoni F et al. (2006). Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 1996; 2(1): 52-58.

Huntington JA, Stein PE (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography* 2001; B 756(1-2): 189-198.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001). Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001; 14: 705–714.

Ibrahim R, Frederickson H, Parr A, Ward Y, Moncur J, Khleif SN (2006). Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism. *Cancer* 2006; 106(5): 1065-77.

Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, Jenkins MK (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003; 19: 47-57.

Ito T, Matthew S, Hogaboam CS, Lukacs NW, Chensue SW, Kunkel SL (2009). TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(1): 33-46.

Jacobs C, Düwell P, Heckelsmiller K, Wei J, Bauernfeind F, Ellermeier J, Kissler U, Bauer C, Dauer M, Eigler A, Maraskovsky E, Endres S, Schnurr M (2010). An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion and leads to tumor regression of orthotopic murine pancreatic carcinoma. *International Journal of cancer* 2010;

Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH (2006). Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF- β -producing T-cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T-cells. *Journal of Immunology* 2006; 177(2): 896-904.

Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Steinman RM, Nussenzweig MC (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151–155.

Jonasch E, Haluska FG (2001) Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6: 34–55.

Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML (2001). Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97(11): 3466-69.

Kamath A, Pooley J, O’Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D’Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K (2000). The development, maturation and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 6762-70.

Karow T, Roth RL (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Seite 493.

Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG (2003). Flt-3-ligand regulates dendritic cell development from Flt-3+ lymphoid and myeloid committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198: 305-13.

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y and Taniguchi M (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Va14 NKT cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 5690.

Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ (2001). NK- and CD8⁽⁺⁾ T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology* 2001; 167: 5247-53.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243–1254.

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Leserman L, Davoust J and Malissen B (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005; 22: 643-654.

Klöss T (2004). Anästhesie. *Urban & Fischer Verlag München/Jena* 2004; Seite 140.

Kopf M, Ramsay A, Brombacher F et al. (1995). Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early haematopoiesis, T and B cell function, and acute phase response. *Annals of the New York Academy of Science* 1995; 762: 308–318.

Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R (2001). Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 26605–26613.

Krieg AM (2004). Antitumor applications of stimulating Toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Current Oncology Reports* 2004; 6: 88-95.

Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T_{h1}, T_{h2} and nonpolarized T cells. *Nature Immunology* 2000; 1(4): 311-16.

Langerhans P (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie*, Band XLIV, Kapitel XVIII: 325-337.

Lozanoska-Ochser B, Klein NJ, Huang GC, Alvarez RA, Peakman M (2008). Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. *Journal of Immunology* 2008; 181: 6109-6116.

Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S and Fryer P (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *Journal of Experimental Medicine* 1987; 166: 1654–1667.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M et al. (1995). dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th-1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, 1995; 154: 5071-5079.

Mackay CR, Marston W, Dudler L (1992). Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *European Journal of Immunology* 1992; 22(9): 2205-10.

Mandara M, Nortilli R, Sava T, Cetto GL (2006). Chemotherapy for metastatic melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2006; 6(1): 121-30.

Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, Al-Adhami M, Readett D, Krieg AM, Leichman CG (2008). Randomized phase II trial of a Toll-Like Receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(24): 3979-87.

Maraskovsky E, Sjölander S, Drane DP, Schnurr M, Lee TT, Luft T, Masterman KE, Tai TY, Chen Q, Green S, Pearse MJ, Lemonnier FA, Chen W, Cebon J, Suhbier A (2004). NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX™ adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD 8+ T-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 2879-90.

Maraskovsky E, Schnurr M, Wilson MS, Robson MC, Boyle J, Drane D (2009). Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology and Cell Biology* 2009; 87: 371–376.

Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T-lymphocyte traffic and priming. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198: 615-21.

Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature Immunology* 2004; 5(12): 1260-5.

McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA (2005). IL-6 *trans*-signaling via STAT3 directs T-cell infiltration in acute inflammation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2005; 102: 9589–9594.

Mellman I, Steinman RM (2001). Dendritic cells: specialised and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-58.

Menard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F (2008). Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2008; 57(11): 1579-87.

Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 1988; 9;54(6): 777-85.

Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A (1984). Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 1984; 308(5958): 457-60.

Murphy KM, Travers P, Walport M (2007). *Janeway's Immunobiology - Seventh Edition* (2007).

Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lyerly HK (1999). Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Research* 1999; 59: 56–58.

Moser M, Murphy KM (2000). Dendritic cell regulation of T_{H1}- T_{H2} development. *Nature Immunology* (2000); 1: 199–205.

Naik H, Metcalf D, Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu, O'Keeffe, Shortman K (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nature Immunology* 2006; 7(6): 663-71.

Nakajima T, Suzuki M, Ando S, Iida T, Araki A, Fujisawa T, Kimura H (2006). Spontaneous regression of bone metastasis from renal cell carcinoma; A case report. *BMC Cancer* 2006; 6: 11.

Nakano H, Yanagita M, Gunn MG (2001). CD11c+ B220+ Gr-1+ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(8): 1171-78.

Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A (2005). Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type-1-polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology* 2005; 6(8): 769-776.

- Nebenführ A**, Ritzenthaler C, Robinson DG (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology* 2002; 130: 1102-1108.
- Nestle FO**, Alijagic S, Gillet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 1998; 4(3): 328-32.
- Neuzil KM**, Johnson JE, Tang YW (1997). Adjuvants influence the quantitative and qualitative immune response in BALB:c mice immunized with respiratory syncytial virus FG subunit vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 525-32.
- Nisbet AD**, Saundry RH, Moir AJG, Fothergill LA, Fothergill JE (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry* 115(2): 335.
- Norbury CC**, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology* 1997; 27(1): 280-88.
- O'Neill**, Adams S, Bhardwaj N (2004). Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104(8): 2235-46.
- Pamer E**, Cresswell P, (1998). Mechanisms of MHC class I – restricted antigen processing. *Annual Review of Immunology* 1998; 16: 323-58.
- Pasare C**, Medzhitov R (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299: 1033-1036.
- Pearse MJ**, Drane D (2005). ISCOMATRIXTM adjuvant for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Review* 2005; 57(3): 465-74.
- Pectasides S**, Asproptomidis A, Halikia A, Visvikis A, Antoniou F, Kalantaridou A, Batzios S, Athanasiou A (1999). Combination chemotherapy with carboplatin, docetaxel and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17(12): 3816-21.
- Peiser L**, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Advanced Drug Delivery Review* 2005; 57(3): 465-74.
- Pooley JL**, Heath WR, Shortman K (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD 4 T-cells by CD 8- dendritic cells, but cross-presented to CD 8 T cells by CD 8+ dendritic cells. *Journal of Immunology* 2001; 166(9): 5327-30.
- Pulendran B**, Banchereau J, Maraskowski E, Meliszewski C (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunology* 2001; 22: 41-47.

- Rabinovich GA**, Gabrilovich D, Sotomayor EM (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annual Review of Immunology* 2007; 25: 267-96.
- Ratzinger G**, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW (2003). Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogenic graft-versus-host interactions in transplantation. *Blood* 2003; 101: 1422-29.
- Ratzinger G** et al. (2004). Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of IL12p70, by either single peptide presentation or cross priming, than do dermal interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 2004; 173: 2780-91.
- Ridolfi R**, and Riccobon A, Galassi R, Giorgetti G, Petrini M, Fiammenghi L, Stefanelli M, Ridolfi L, Moretti A, Migliori G, Fiorentini G (2004). Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. *Journal of Translational Medicine* 2004; 2: 27-38.
- Rodriguez A**, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature cell biology* 1999; 1(6): 362-8.
- Rook GWA**, Stanford JL (1998). Give us this day our daily germs. *Immunology Today* 1998; 19(3): 113-116.
- Schadendorf D**, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO et. al (2006). 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. *Annals of Oncology* 2006; 17: 563-70.
- Schnurr M**, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID, Villasangos J, Shortman K, Maraskovsky E, Cebon J (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005; 105(6): 2465-72.
- Schnurr M**, Orban M, Robson NC, Shin A, Braley H, Airey D, Cebon J, Maraskovsky E, Endres S (2009). ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 1253-59.
- Schoenberger SP**, Toes RE, van der Voort EI, Offringa I, Melief CJ (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393: 480-483.

- Schröder K**, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75 (2): 163-189.
- Schuler G**, Schuler-Thurner B, Steinman RM (2003). The use of dendritic cells in immuno therapy. *Current opinion in immunology* 2003; 15(2): 138-47.
- Schulz O**, Reis e Sousa C, (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 2002; 107: 183-89.
- Shortman K**, Liu YJ (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature* 2002; 2: 151-61.
- Smith CM**, Wilson NS, Waithman J et al. (2004). Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nature Immunology* 2004; 5(11): 1143-48.
- Smith RE**, Donachie AM, Grdic D, Lycke N and Mowat IM (1999). Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 5536-5546.
- Steinman, RM**, Nussenzweig, MC (2002). Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* 2002; 99: 351–358.
- Steinman RM**, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 685-711.
- Stoitzner P**, Green LK, Jung JY et al. (2008). Tumor immunotherapy by epicutaneous immunization requires Langerhans cells. *Journal of Immunology* 2008; 180: 1991-98.
- Sun JC**, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003; 300: 339–342.
- Suto A**, Nakajima H, Tokumasa N, Takatori H, Kagami S, Suzuki K, Iwamoto I (2005). Murine plasmacytoid dendritic cells produce IFN- γ upon IL-4 stimulation. *Journal of Immunology* 2005; 175(8): 5686-89.
- Tas F**, Argon A, Camlica H, Topuz E (2005). Temozolomide in combination with cisplatin in patients with metastatic melanoma: a phase II trial. *Melanoma Research* 2005; 16(6): 543-48.
- Teague TK**, Marrack P, Kappler JW, Vella AT (1997). IL-6 rescues resting mouse T-cells from apoptosis. *Journal of Immunology* 1997; 158: 5791–5796.

Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi, Jonuleit H, Bender A, Meczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Bröcker E, Steinman RM, Enk A, Kämpgen E, Schuler G (1999). Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190(11): 1669-78.

Trinchieri G, Scott P (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunology Today* 1994; 15(10): 460-63.

Tuettenberg A, Becker C, Huter E et al. (2006). Induction of strong and persistent MelanA/MART-1-specific immune responses by adjuvant dendritic cell-based vaccination of stage II melanoma patients. *International Journal of Cancer* 2006; 118 (10): 2617-27.

Verdijk P, Aarntzen EH, Lesterhuis WJ, Boullart AC, Kok E, van Rossum MM, Strijk S, Eijckeler F, Bonenkamp JJ, Jacobs JF, Blokx W, Vankrieken JH, Joosten I, Boerman OC, Oyen WJ, Adema G, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ (2009). Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2009, 15(7):2531-40.

Villadangos JA, Heath WR (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cell paradigm. *Seminars in immunology* 2005; 17: 262-72.

Villacres-Eriksson M, Behboudi S, Morgan AJ, Trinchieri G and Morein B (1997). Immunomodulation by *Quillaja saponaria* adjuvant formulations: in vivo stimulation of interleukin 12 and its effects on the antibody response. *Cytokine* 9: 73.

Villadangos JA, Schnorrer P (2007): Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic cell subsets in vivo. *Nature Reviews in Immunology* 2007; 7(7): 543-55.

Vollmer J, Krieg AM (2009). Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2009); 61(3): 195–204.

Vries, de, IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LP, Ruiter DJ, Gerritsen MJ, Croockewit S, Britten CM, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG, Punt CJ (2003). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(14): 5091-100.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003; 18: 605-17.

Wang B, Kuroiwa JM, He LZ, Charalambous A, Keler T, Steinman RM (2009). 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. *Annals of the New York Academy of Science* 2009; 1174: 6-17.

Wang JC, Livingstone AM (2003). Cutting edge: CD4⁺ T cell help can be essential for primary CD8⁺ T cell responses in vivo. *Journal of Immunology* 2003; 171: 6339–6343.

Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G (2008). Immunological aspects of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 8(1): 59-73.

Zou W, (2005). Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews* 2005; 5: 263-74.

Zou W (2006). Regulatory T-cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6(4): 295-307.

7 Verzeichnis der Abkürzungen, Akronyme und Einheiten

BFA	Brefeldin-A
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Albumin aus Rinderserum
°C	Grad Celsius
CCL	Chemokinrezeptorligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen
CD40-L	CD40-Ligand
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxischer T-Lymphozyt
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i> , bei Zellschädigung freigesetzte Moleküle, die dem Immunsystem Gefahr signalisieren
DC	<i>Dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin</i> , DC-spezifisches Oberflächenadhäsionsmolekül (CD209)
DEC-205	<i>Dendritic and Epithelial Cells 205</i> (=CD205)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
F _{ab} -Teil	Antigenbindender Teil eines Antikörpers, ab steht für ‚antigen-binding‘
Fc-Rezeptor	Rezeptor, der den nicht antigenbindenden Teil eines Antikörpers (Fc-Teil) bindet. F steht für ‚Fragment‘, c steht für ‚crystallizable‘
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
Flt-3	<i>fms-like tyrosine kinase-3 ligand</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gp120	Glykoprotein 120 (HIV-assoziiertes Protein)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IKDC	Interferon-producing killer dendritic cell, Interferon-produzierende Killer-DC
IL	Interleukin
ISCOM	<i>Immunostimulating complex</i> , Immunstimulatorischer Komplex
kD	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
LC	<i>Langerhans cell</i> , Langerhans-Zelle
LK	Lymphknoten
LLR	<i>Lectin-like Receptor</i> , Lektin-ähnlicher Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
ml	Milliliter (10 ⁻³ Liter)
mM	Millimolar
MMR	<i>Macrophage-Mannose-Receptor</i> , Mannoserezeptor von Makrophagen
Mono-DC	Aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
nm	Nanometer
OT-1	Mausstamm, der transgen für einen OVA-Peptid-spezifischen T-Zellrezeptor ist
P	Signifikanzniveau
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , pathogenassoziierte molekulare Muster
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i> , plasmazytoide dendritische Zelle
pg	Pikogramm
OVA	Ovalbumin

SIINFEKL	Oktapeptid mit folgender Aminosäuresequenz: Serin-(Isoleucin) ₂ -Asparagin-Phenylalanin-Glutamat-Lysin-Leucin
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
U/ml	<i>Units per milliliter</i> (Maß für biochemische Enzymaktivität)

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. med. Max Schnurr danke ich für die hervorragende Betreuung, die Motivation an Kongressen teilzunehmen, die fruchtbaren Diskussionen und die Verbesserungsvorschläge für die Doktorarbeit. Er hatte stets ein offenes Ohr und hat die Arbeit stets vorangetrieben.

Ferner gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres für die Aufnahme in seine Abteilung sowie die kontinuierliche Unterstützung über die vergangenen Jahre. Unter seiner Leitung herrschte stets ein äußerst angenehmes Arbeitsklima.

Franz Bauernfeind und Martin Orban danke ich dafür, dass sie mich freundschaftlich und uneigennützig in die wissenschaftlichen Arbeitstechniken eingewiesen haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Kollegen Dr. rer. hum. biol. Klaus Heckelsmiller und Peter Düwell für die gute Zusammenarbeit und die Mitarbeit an der Erarbeitung von Publikationen.

Allen anderen Kollegen aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für das stets gute und kollegiale Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Sprecher des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München, möchte ich ebenfalls herzlich danken. Durch sein Engagement hatte ich die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Rahmen eines Promotionsstudiums mit großzügiger finanzieller Unterstützung anzufertigen.

Nicht zuletzt möchte ich allen danken, die mir privat ein Umfeld geschaffen haben, ohne welches diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Jacobs C, Düwell P, Heckelsmiller K, Wie J, Bauerfeind F, Ellermeier J, **Kisser U**, Bauer C, Dauer M, Eigler A, Maraskovsky E, Endres S, Schnurr M. An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma *International Journal of Cancer*, 2010 (in press).
2. Gürkov R, **Kisser U**, Spletstösser W, Hogardt M, Krause E. Tularaemia of middle ear with suppurative lymphadenopathy and retropharyngeal abscess. *The Journal of Laryngology and Otology*, 2009; Mar 2: 1-6.
3. **Kisser U**, Düwell P, Heckelmiller K, Bauernfeind F, Orban M, Anz D, Bourquin C, Boyle J, Drane D, Maraskovsky E, Endres S, Schnurr M. ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8⁺ T-cells. (in Vorbereitung).

Kongressbeiträge

1. **Kisser U**, Bauernfeind F, Zaborsky N, Heckelsmiller K, Shin A, Orban M, Maraskovsky E, Endres S, Dauer M, Eigler A, Schnurr M (2006). Effects of antigen formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant on draining lymph nodes and the induction of CTL-responses. *9th International Conference on Dendritic Cells 2006, Edinburgh, Schottland.*
2. Orban M, Bauernfeind F, Zaborsky N, Heckelsmiller K, Shin A, **Kisser U**, Maraskovsky E, Endres S, Dauer M, Eigler A, Schnurr M (2006). Tumorkonzinierungen mit dendritischen Zellen und immunstimulatorischen Komplexen. *9th International Conference on Dendritic Cells 2006, Edinburgh, Schottland.*

3. Düwell P, **Kisser U**, Latz E, Bauernfeind F, Ellermeier J, Endres S, Schnurr M.
Enhanced cross-priming of cytotoxic T cells by combining TLR ligands with ISCOMATRIX™ adjuvant-mediated NALP3 inflammasome activation.
Annual Retreat des Graduiertenkollegs "Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie", 2009, München.
4. Jacobs C, Düwell P, Heckeslmiller K, **Kisser U**, Wei J, Bauernfeind F, Ellermeier J, Bauer C, Dauer M, Eigler, Maraskovsky E, Endres S, Schnurr M.
An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion and leads to tumor regression of murine pancreatic carcinoma.
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2008, Wiesbaden.