

III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Technische Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Induktion Her-2/neu spezifischer T-Zellen durch infizierte autologe dendritische Zellen  
mittels rekombinatem viralen Vektor MVA und Charakterisierung MVA infizierter DC's

Wolfgang Kastenmüller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H. Bernhard
2. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel
3. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 18.09.2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Tumorassoziierte Antigene sind Zielstrukturen für eine natürliche Immunantwort.....</i>	1
1.2 <i>Das HER-2/neu Protein – Charakter und immunologische Bedeutung.....</i>	2
1.3 <i>Das modifizierte Vaccinia Virus Ankara dient als potenter und sicherer Vektor für tumorassoziierte Antigene.....</i>	3
1.4 <i>Die Dendritische Zelle als Prototyp einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle.....</i>	5
1.5 <i>Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....</i>	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1 <i>Gesunde Spender.....</i>	8
2.2 <i>Materialien.....</i>	8
2.2.1 <i>Chemikalien, Plastikmaterialien und Geräte.....</i>	8
2.2.2 <i>Kulturmedien und Supplemente.....</i>	9
2.2.3 <i>Antikörper.....</i>	10
2.2.4 <i>Zytokine.....</i>	10
2.2.5 <i>Zelllinien und Viren.....</i>	11
2.3 <i>Methoden.....</i>	12
2.3.1 <i>Allgemeine Zellkultur.....</i>	12
2.3.1.1 <i>Kultivierung verschiedener Zelllinien.....</i>	12
2.3.1.2 <i>Zellzählung und Vitalitätstest.....</i>	12
2.3.1.3 <i>Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.....</i>	12
2.3.1.4 <i>Verarbeitung von autologem und AB-Spender Plasma.....</i>	13
2.3.1.5 <i>Transfektion von B-Zellen mit B 95-8-Zell-Überstand.....</i>	13
2.3.1.6 <i>Infektion mit MVA-Her-2/neu bzw. MVA-WT.....</i>	13
2.3.1.7 <i>Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....</i>	14
2.3.1.8 <i>Herstellung von Zelllysat MVA-infizierter Zellen.....</i>	15
2.3.1.9 <i>Pulsen von DC mit Zelllysat.....</i>	15
2.3.1.10 <i>Apoptose-Induktion von DC und EBV transformierten B-Zellen.....</i>	15
2.3.2 <i>T-Zell Kulturen.....</i>	16
2.3.2.1 <i>Priming und Restimulationen von T-Zellen.....</i>	16
2.3.2.2 <i>T-Zell Klonierung und Expansion.....</i>	16
2.3.2.3 <i>T-Zell Kultivierung auf OKT3 gecoateten Platten.....</i>	17
2.3.3 <i>Funktionelle Tests.....</i>	17
2.3.3.1 <i>Chromium-Release-Assay.....</i>	17
2.3.3.2 <i>ELISPOT-Assay.....</i>	18
2.3.3.3 <i>Durchflußzytometrie (FACS-Analyse).....</i>	20

3. Ergebnisse.....	24
3.1 <i>Reife und unreife DC exprimieren Her-2/neu nach Infektion mit MVA-Her-2/neu.....</i>	24
3.2 <i>Eine MVA-Her-2/neu Infektion dendritischer Zellen führt zur Apoptose.....</i>	26
3.3 <i>Die Expression kostimulatorischer Moleküle ist bei vitalen MVA-Her-2/neu infizierten reifen DC unbeeinträchtigt.....</i>	31
3.4 <i>Reifungszytokine induzieren in unreifen dendritischen MVA-Her-2/neu infizierten DC eine Maturierung.....</i>	37
3.5 <i>Ausreifungsinduktion von unreifen dendritischen Zellen mit Hilfe von MVA-Her-2/neu infizierten Zellen.....</i>	39
3.6 <i>Generierung von Her-2/neu spezifischen T-Zellen mit Hilfe des MVA-Her-2/neu Vektors und dendritischen Zellen.....</i>	41
4. Diskussion.....	47
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	52
7. Danksagung.....	62

## Liste der Abkürzungen :

APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderalbumin
CD	Cluster of differentiation
CTL	zytotoxische T-Zelle
CRA	chromium release assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme linked immunosorbent spot
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
FS/SS	Forwardscatter/Sidewardscatter
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Gp	Glykoprotein
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA	Leucocyte function associated antigen
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MVA	Modifizierter Vaccinia Virus Ankara
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat Puffer
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
RT	Raumtemperatur
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
Th	T-Helfer Zelle
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
VV	Vaccinia Virus

# **1. Einleitung**

## **1.1. Tumorassoziierte Antigene sind Zielstrukturen für eine natürliche Immunantwort**

Das Konzept der Tumorimmunologie basiert auf der Vorstellung, daß das Immunsystem die Fähigkeit besitzt, entartete Zellen zu erkennen und unter gewissen Umständen zu zerstören. Eine Voraussetzung dafür ist, daß sich die Tumorzellen immunologisch von Normalzellen unterscheiden. Es handelt sich dabei um die sogenannten Tumorantigene, die sich in verschiedene Gruppen einteilen lassen.

Eine an Bedeutung gewinnende Gruppe bilden tumorassoziierte virale Antigene. Es gibt eine zunehmende Zahl an Viren die für eine maligne Transformation verantwortlich gemacht werden. Struktur- und Funktionsproteine der Viren gelangen in das Zytosol der infizierten Zellen und werden über den MHC-Klasse-I-Weg zu Peptiden prozessiert. Zusammen mit dem MHC-Klasse-I-Molekül werden die viralen Peptide dann an der Oberfläche präsentiert und dienen  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen als Antigen. Ein Beispiel für ein tumorassoziiertes Virus ist das humane Papilloma Virus (HPV) das durch die Infektion der Cervixschleimhaut zum Cervixcarcinom führt. Es wurden HPV-Peptide identifiziert, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, wenn sie mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (51, 80). Auch für das mit Lymphomen assoziierte Epstein-Barr-Virus konnten spezifische CTL isoliert werden, die infizierte Lymphomzellen lysieren (44, 92).

Eine weitere Gruppe bilden die sogenannten „tumor-specific shared antigens“. Es handelt sich hierbei um Antigene, dessen Gene zwar im Normalgewebe vorhanden sind, jedoch nicht exprimiert werden. Eine Ausnahme bilden Hoden, Plazenta und Ovar. Es wurden davon eine ganze Reihe von Genfamilien identifiziert MAGE, GAGE, BAGE, RAGE und NY-ESO, die vor allem in malignen Melanomen aber auch in einer Reihe anderer Tumoren exprimiert werden. Gegen diese Antigene wurden sehr erfolgreich spezifische CTL und spezifische Antikörper aus erkrankten Patienten isoliert (11, 42, 110, 111).

Die dritte Gruppe bilden Antigene, die aufgrund von Mutationen entstehen, welche in Tumorzellen wegen einer häufigen Defizienz der Reparatursysteme akkumulieren. Weiterhin können diese Mutationen zu einem Wachstumsvorteil führen, wenn sie z.B. Regulationsmechanismen der Zellteilung, -adhäsion oder -differenzierung betreffen. Punktmutationen können zu neuen Epitopen führen, die von CTL als fremd erkannt werden (1, 12, 39, 82, 115). Ein weiteres Beispiel sind chromosomale Translokationen, der Entstehungsmechanismus für das Fusionsprotein bcr-abl. Peptide dieses Proteins können bei der chronisch myeloischen Leukämie als Epitope für CTL dienen (20).

Schließlich erkennen CTL Antigene, die nicht nur in transformierten Zellen sondern auch im Normalgewebe exprimiert werden. Zum einen gibt es Differenzierungsantigene, die nur von einer Gruppe nicht-transformierter Zellen exprimiert werden. Dazu gehören Antigene wie Tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp100/Pmel17 und gp75. Diese werden sowohl in Melanomzellen als auch in Melanozyten gebildet und dienen CTL als Antigene (8, 13, 20, 22, 53). Zum anderen gibt es Proteine, die ubiquitär in nicht-transformierten Zellen produziert werden. In Tumorzellen hingegen findet eine Überexpression statt. Beispiele hierfür sind die Onkogene p53 und Her-2/neu. Durch eine Mutation des Tumor-Suppressorgens p53 kommt es zu einer Störung des Abbauprozesses des Proteins mit nachfolgender Akkumulation im Zytosol der Tumorzelle. Das Protein steht somit für die Prozessierung und Antigenpräsentation verstärkt zur Verfügung. Die Immunantwort richtet sich hier jedoch nicht gegen die Mutation selbst, sondern gegen nicht-mutierte Sequenzen des p53-Proteins (105, 106). Beim Her-2/neu kommt es durch eine Genamplifikation zur Überexpression des Proteins und somit zur verstärkten Präsentation daraus entstehender Peptide, die wiederum als Zielstrukturen für eine zelluläre Abwehr dienen.

## **1.2. Das HER-2/neu Protein – Charakter und immunologische Bedeutung**

Das Proto-Onkogen HER-2/neu (erbB2) kodiert für ein 185 kD großes Transmembranprotein mit Homologien zu dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R, c-erbB, erbB1) (23, 55, 90, 118). Das Her-2/neu Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne (ECD), die als Wachstumsfaktor-Rezeptor fungiert, einer kurzen Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne (ICD) mit einer Tyrosinkinase-Aktivität zur Signaltransduktion. Her-2/neu ist in epithelialen Zellen des Gastrointestinal-, Respirations-, und Urogenitaltraktes, der Haut, der Brust, sowie in den korrespondierenden fötalen Geweben und der Plazenta exprimiert (75). Verglichen mit entarteten Zellen, ist die Expression im Normalgewebe jedoch nur gering. Die Suche nach der biologischen Rezeptorfunktion von Her-2/neu hat zur Identifizierung der Liganden, den Heregulinen oder Neuregulinen, geführt. Obwohl bisher kein Ligand gefunden wurde, der direkt an das Homodimer von Her-2/neu bindet, ist die Heterodimerisierung von Her-2/neu mit anderen erbB-Rezeptoren Voraussetzung für bestimmte Signalübertragungen durch Hereguline (2, 46, 58, 113). Insgesamt weisen die bisherigen Daten darauf hin, daß Her-2/neu in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Für die Frage, ob sich das Her-2/neu Protein als Zielstruktur für eine Immuntherapie eignet, lassen sich eine Reihe von Argumenten finden. Die Überexpression von Her-2/neu ist insgesamt mit einer schlechteren Prognose der einzelnen Tumorentitäten verbunden. Trotzdem fand sich eine Subpopulation Her-2/neu überexprimierender Mammakarzinom Patientinnen, die ein verlängertes Überleben hatten. Diese Patientinnen hatten kleine, Lymphknoten-negative Mammakarzinome mit einem inflammatorischen Infiltrat (76). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den

inflammatorischen Infiltraten um eine erfolgreiche Immunantwort gegen das Her-2/neu Molekül handelt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, daß Her-2/neu im Normalgewebe verglichen zu den korrespondierenden malignen Entartungen nur niedrig exprimiert wird (93). Zudem ist die Her-2/neu Überexpression ein Phänomen das in vielen verschiedenen Tumorentitäten vorkommt (75) und somit eine ganze Reihe von Tumoren mit einer Strategie angegangen werden können. Im Gegensatz zu anderen tumorassoziierten Antigenen, die im Laufe des Tumorwachstums, der klonalen Expansion einzelner Populationen und der therapeutischen Maßnahmen verloren gehen (4, 48), bleibt die Überexpression des Her-2/neu Proteins stabil und findet sich auch in den Metastasen wieder (70). Verantwortlich ist wohl der onkogene Charakter des Proteins, der für die ursprüngliche Transformation der Tumorzelle mitbegründend war und für ihr Wachstum essentiell bleibt. Diese Vermutung wird durch die beeindruckende Tumorregression bei einigen Her-2/neu überexprimierenden Brustkrebs Patientinnen gestützt, die durch eine Behandlung mit einem anti-Her-2/neu Antikörper erreicht wurde (10, 21). Die Immunogenität des Proteins bestätigte sich bei einigen Patienten, bei denen bereits eine präexistente gegen Her-2/neu gerichtete T-Zell und Antikörper Antwort nachgewiesen werden konnte (27, 28). Natürlicherweise findet eine Sekretion der extrazellulären Domäne statt, die von der Membran abgelöst und in die Umgebung abgegeben wird (57, 122). Auf diese Weise kann es als exogenes Antigen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, über den MHC-Klasse-II-Weg prozessiert und CD4<sup>+</sup> MHC-Klasse-II restringierten T-Helferzellen präsentiert werden. Das Her-2/neu Protein mit 1255 Aminosäuren ein großes Protein dessen Proteinsequenz somit T-Zell-Epitope für die meisten wenn nicht für alle MHC-Klassen enthalten sollte, die damit für alle Patienten trotz individueller MHC-Expression immunogen sein sollten (26). Im Gesamtbild erscheint das Her-2/neu Molekül als Target für eine Immuntherapie als sinnvoll und vielversprechend.

### **1.3. Das modifizierte Vaccinia Virus Ankara dient als potenter und sicherer Vektor für tumorassoziierte Antigene**

Lebende attenuierte Viren, die zur Vakzinierung verwendet werden, schützen effektiv gegen virale Erkrankungen. Mit der steigenden Anzahl an tumor-assoziierten Antigenen, die in letzter Zeit entdeckt wurden (109), bietet es sich an, Viren als Vektoren für diese Antigene zu benutzen, und dabei von der intrinsischen Kapazität der Viren, das Immunsystem zu aktivieren, zu profitieren. Jedoch hat die Vergangenheit gelehrt, daß Impfungen mit lebenden Viren auch Gefahren in sich bergen. Somit ist die Gewährleistung der Ungefährlichkeit ein absolut kritischer Punkt, der mit der Effizienz der erwünschten Genexpression all zu oft reziprok korreliert.

Das Vaccinia Virus (VV), der Prototyp lebender viraler Impfungen, diente als Basis für etablierte virale Vektoren. Diese Vektoren konnten bereits erfolgreich in verschiedenen

Tiermodellen eingesetzt werden, und brachten somit Tumore zur Regression oder verhinderten ihr Anwachsen im Sinne einer protektiven Immunität (83, 84).

Das Vaccinia Virus selbst, erfüllt jedoch nicht die geforderten Sicherheitsvoraussetzungen, da es sich in humanen Zellen replizieren kann. Das modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) hingegen, ein Abkömmling des VV-Ankara (Wild Typ), ist extrem attenuiert (114). VV-Ankara wurde über 570 mal in "chicken embryo fibroblast cells" (CEF) passagiert (63). Das resultierende MVA verlor die Fähigkeit sich in humanen Zellen zu vermehren, und erlitt sechs große, 31.000 Basenpaare umfassende, wenigstens zwei "host-range Gene" beinhaltende DNA-Deletionen (3, 66). Die "host range Genes" sind die Grundlage für einen Virus, verschiedene Zellen zu infizieren. Diese Gene kodieren unter anderem für Rezeptoren, die es dem Virus ermöglichen an die Zielzelle zu haften und zu infizieren. Sie stehen somit für das spezifische Wirtsspektrum eines Erregers. In verschiedenen Tiermodellen getestet, erwies sich MVA sogar in immunsupprimierten Tieren als avirulent. Als noch wichtiger erwies sich die klinische Erfahrung mit MVA. Dabei wurden über 140.000 Menschen gegen Pocken geimpft (61). Während extensiven Feldstudien, die auch Hochrisiko-Patienten mit einschlossen, konnten keine MVA assoziierten Nebenwirkungen festgestellt werden (63, 64, 98). Das MVA kann man als außergewöhnlich sicheren viralen Vektor (68, 100) bezeichnen. Die Replikationsfähigkeit des MVA wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien exzessiv getestet, wobei sich das Virus in keinem Fall replizieren konnte (31). In "baby hamster kidney cells" (BHK) hingegen konnten sich die Viren vermehren wodurch ein praktikables System für die Virusgeneration etabliert wurde (31).

Neben der Sicherheit, spielt natürlich die Genexpression die entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Vakzinierung. Viele attenuierte VV, z.B. die Copenhagen Linie, sind zwar auch in ihrer "host-range" beschränkt, weisen jedoch eine geringe Genexpression auf, da sie bereits in der frühen Phase der Infektion inhibiert werden (32, 33). Das MVA hingegen, hat eine starke im Vergleich zum Wild Typ unbeeinträchtigte Genexpression (99). Ein MVA Konstrukt konnte erfolgreich dazu verwendet werden, das Bakteriophagen T7 RNA Polymerase Gen zu exprimieren (101, 116). Aber nicht nur die gute Genexpression, sondern auch die erfolgreiche protektive Immunisierung gegen Viren, parasitären Infektionen und Tumore konnte bereits gezeigt werden (15, 45, 69, 89, 102, 117).

Schließlich konnten im humanen System HLA-A2 restringierte Tyrosinase- und Melanom-spezifische zytotoxische T-Zellen in vitro induziert werden (30), was das Potential des Vektors noch einmal eindrucksvoll unterstreicht.

Zusammenfassend ergeben sich fünf Argumente, die das MVA für eine therapeutische Impfung attraktiv machen:

1. Die etablierte, einfache Virusvervielfältigung in CEF und vor allem in BHK-Zellen
2. Die Unfähigkeit, infektiöse Viren in humanen Zellen zu bilden
3. Die Ungefährlichkeit sogar unter immunsupprimierten Bedingungen
4. Die hohe unbeeinträchtigte Genexpression in humanen Zellen
5. Die erfolgreiche Induktion spezifischer T-Zellen im humanen System

#### **1.4. Die Dendritische Zelle als Prototyp einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle**

Obwohl Tumorzellen zumindest am Anfang ihrer Entwicklung eine ausreichende Dichte an MHC- Molekülen an ihrer Oberfläche aufweisen, sind sie doch nicht in der Lage, naive T-Zellen zu primen und somit eine Immunantwort zu initiieren. Hierfür sind andere Voraussetzungen erforderlich, welche durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) erfüllt werden (9). So findet zwischen der APC und der naiven T-Zelle während des "Priming" eine ganze Sequenz von interzellulären Wechselwirkungen statt. Der erste Schritt ist die Zelladhäsion zwischen beiden Zellen, welche seitens der APC über ICAM-1 bzw. LFA-3 bei der naiven T-Zelle über LFA-1 und CD2 stattfindet (34, 35). Falls nun der T-Zell-Rezeptor der naiven T-Zelle das auf den MHC-Molekülen präsentierte Peptid erkennt, erfolgt das erste Signal. Dabei kommt es zur Konformationsänderung der Adhäsionsmoleküle und dadurch zu einer erhöhten interzellulären Affinität. Dies allein reicht aber wie gesagt nicht zum "primen" aus. Dafür benötigt die naive T-Zelle ein zweites Signal über kostimulatorische Moleküle wie B 7.1 (CD 80) und B 7.2 (CD86) oder CD83 (49, 59, 60). Diese kostimulatorischen Moleküle werden nur von APC exprimiert, was sie somit fürs "Priming" essentiell macht. Ist das zweite Signal erfolgt, verliert die T-Zelle ihren naiven Status. Für jede weitere Aktivierung ist das zweite Signal nicht mehr nötig. Eine Erkennung der Tumorzellen mit anschließender Lyse ist nun möglich. Bei der Interaktion zwischen T-Zelle und APC ist das weitere Schicksal der T-Zelle jedoch nicht immer gleich. Abhängig vom Differenzierungsgrad der T-Zelle und dem Phänotyp bzw. dem Charakter der APC bleibt die T-Zelle von den Signalen unberührt, wird aktiviert oder sogar abgeschaltet (40). Kürzlich konnte auch der Zusammenhang zwischen der Antigenkonzentration bzw. die Effektor-Target-Ratio und der Differenzierung in eine Th 1 bzw. Th 2 Antwort gezeigt werden (104). Es werden also professionelle antigenpräsentierende Zellen benötigt, um eine Immunantwort zu initiieren und zu steuern (37, 96). Dabei konnten verschiedene Arbeiten zeigen, daß sich dendritische Zellen besser als B-Zellen oder Monozyten für eine primäre Induktion einer Immunantwort und das "Priming" von T-Zellen eignen (37, 43). Die DC stammen aus dem Knochenmark und entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen (16, 47, 77). Die einzelnen Entwicklungsstufen sind bisher noch unklar, aber derzeit Gegenstand intensiver Forschung. So können sich DC einerseits unter dem Einfluß von GM-CSF aus der myeloischen Zellreihe entwickeln, die gemeinsam oder getrennt von der monozytären Zellreihe verlaufen kann (13, 16, 19, 47, 74, 77, 86, 103, 121, 123). Andererseits gibt es Hinweise dafür, daß DC – im Gegensatz zu Monozyten – sich auch aus der lymphoiden Reihe differenzieren können. (6, 41, 62, 88). Außerdem wurden plasmazytoide DC beschrieben, die in entzündete Lymphknoten wandern und dort große Mengen Interferon Typ I produzieren (18). Der Ursprung dieser Subpopulation ist bisher aber noch unklar. Schließlich gibt es eine ganze Reihe zur DC-Familie gehörende Zell-Populationen, wie in der Haut die Langerhans Zellen, in der Leber die Kupferschen Sternzellen, oder im Gehirn Astrozyten (38, 52).

Offensichtlich bilden die dendritischen Zellen also keineswegs eine homogene Population.

Der Lebenszyklus einer dendritischen Zelle durchläuft verschiedene Stadien. Zuerst wandern unreife DC aus dem Knochenmark aus. Als eine der ersten Zellen wandern sie dann zu inflammatorischen Prozessen in nicht-lymphatischen Organen ein. Dort nehmen sie, ausgerüstet mit einer starken Phagozytosefähigkeit Antigene auf (7, 50, 79, 87, 97). Durch verschiedene Zytokinsignale beginnt nun die Migration der DC über afferente Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten bzw. auch zur Milz. (94, 95). Während dieser Wanderung kommt es zur Ausreifung der DC. Dabei werden verschiedene Oberflächenmoleküle, wie MHC-Klasse –I und –II, Adhäsions- sowie kostimulatorische Moleküle hochreguliert. Im ausgereiften Zustand erfüllt die dendritische Zelle somit idealerweise die Voraussetzungen zum primen von T-Zellen (17). Mit der Ausreifung geht auch ein Verlust der Phagozytosefähigkeit einher und somit die Möglichkeit neue Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Dies ist jedoch physiologisch sinnvoll, weil dadurch die ursprünglich aufgenommenen Antigene länger und in einer höheren Dichte präsentiert werden. Die dendritische Zelle präsentiert Antigene aus einem Entzündungsherd und erzeugt somit eine Art "Fingerabdruck" der Erreger aus diesem Herd. Durch die darauffolgende, eingeschränkte Phagozytose bleibt dieser Fingerabdruck erhalten und vermittelt sozusagen den T-Zellen einen genauen Eindruck über die Lage vor Ort.

Im Lymphknoten bzw. der Milz angekommen, beginnt die Antigenpräsentation an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen. Dabei kann die Immunantwort in eine Th1 oder Th2 Richtung gelenkt werden. Die ursprüngliche Annahme, daß myeloide DC eine Th1-, plasmazytoide eine Th2-Antwort initiieren (18, 81, 91), scheint nun mehr und mehr fragwürdig. So konnte gezeigt werden, daß von Monozyten abstammende DC sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Antwort, abhängig von der Stimulator/Responder Ratio hervorrufen können (104). Man muß also von weitaus komplexeren Verhältnissen ausgehen und kann deshalb eine derartige funktionale Trennung der DC nur eingeschränkt gelten lassen. Schließlich konnten in vitro bereits CTL direkt von DC aktiviert und restimuliert werden. Diese T-Zellen konnten dann spezifisch Tumorzellen erkennen und lysieren (30, 71). Seit der Entdeckung der dendritischen Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen, hat man zurecht große Hoffnungen für die Tumorthherapie beim Menschen.

## **1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, zytotoxische T-Zellen zu generieren, die spezifisch gegen das tumorassoziierte Antigen Her-2/neu gerichtet sind. Dabei ergeben sich folgende Fragestellungen und methodische Ansätze:

1. Als Modell eines tumorassoziierten Antigens wurde Her-2/neu gewählt. Da Her-2/neu ein Selbstantigen darstellt, ist es von besonderem Interesse, ob eine vorbestehende Toleranz in vitro durchbrochen werden kann und dadurch eine Her-2/neu spezifische Immunantwort induziert werden kann.

2. Als Vehikel für Her-2/neu wird ein MVA-Her-2/neu Vektorkonstrukt verwendet. Zunächst wird geprüft, ob dieses Konstrukt dafür geeignet ist, das Her-2/neu-Gen in humanen Zellen zur Expression zu bringen. Eine wichtige Rolle spielt dabei auch das Expressionsniveau, das durch den Vergleich mit humanen Her-2/neu überexprimierenden Tumorzellen abgeschätzt werden soll.

3. Als Zielzellen für das MVA dienen von Monozyten abstammende dendritische Zellen. Ziel ist es, diese Zellen in hoher Reinheit zu kultivieren. Der Phänotyp dieser DC soll charakterisiert und mit dem MVA infizierter DC verglichen werden. Dadurch ist es möglich Veränderungen der DC nach der Infektion zu erkennen und in ihrem Ausmaß abzuschätzen. Kritisch ist dabei ob, DC nach einer MVA-Infektion in ihrer Funktionalität als antigenpräsentierende Zellen und in ihrem Vitalitätsstatus beeinträchtigt sind.

4. MVA-Her-2/neu-infizierte DC dienen als APC zur Stimulation von autologen T-Zellen, Dazu müssen die Kulturbedingungen für die T-Zellen etabliert werden. Diese Bedingungen sollen so gewählt werden, daß die spezifischen T-Zellen möglichst stark proliferieren, und unspezifische T-Zellen in ihrem Wachstum zurückbleiben. Zur Optimierung der Kulturbedingungen werden verschiedene Parameter verglichen: reife und unreife DC, die Höhe der MOI (Multiplicity of infection) und das Verhältnis von APC zu Effektor Zellen. Das Modell wird dafür genutzt, Interaktionen zwischen DC und T-Zellen besser zu verstehen sowie den funktionellen Unterschied von reifen und unreifen DC herauszuarbeiten. Die Her-2/neu Spezifität der T-Zellen wird anhand verschiedener Assays überprüft.

Diese Forschungsarbeit hat die Etablierung einer Methode zum Ziel, die es ermöglicht tumorreaktive Her-2/neu-spezifische T-Zellen in vitro zu generieren, die zum adoptiven T-Zelltransfers, eingesetzt werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Gesunde Spender**

Um die Fragestellung der vorliegenden Arbeit zu beantworten, wurde ausschließlich im humanen System gearbeitet. Zu diesem Zweck wurden gesunde männliche und weibliche Spender, im Alter zwischen 20 und 35 Jahren herangezogen. Dabei wurden T-Zellen, B-Zellen und Monozyten, die für weitere Experimente benutzt wurden, aus dem peripheren Blut gewonnen.

### **2.2. Materialien**

#### **2.2.1. Chemikalien, Plastikmaterialien und Geräte**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
Ammoniumchlorid	(Sigma, Deisenhofen)
AEC-Tabletten	(Sigma, Deisenhofen)
Ammoniumchlorid	(Sigma, Deisenhofen)
Bestrahlungsanlage	BP 221 S (Sartorius, Göttingen)
Bovines Serum Albumin	(Sigma, Deisenhofen)
Cr <sup>51</sup> Isotop, 5mCi/ml	(ICN Biomedicals, Eschwege)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Revco Ultima (GS Laboratory Equipment)
Desinfektionsmittel	Barricidal® 36 (Interchem AG, Zug, CH) Lyso FD 10® (Schülke & Mayr, Norderstedt)
Digitalwaage	LC 1200 S (Sartorius, Göttingen)
EDTA	(Fa. Fluka, Neu-Ulm)
Einfrierröhrchen	1,8 ml (Nunc, Wiesbaden)
Facs-Gerät	Epics XL (Beckman-Coulter, Krefeld)
Ficoll	Ficoll Separation Solution (Biochrom, Berlin)
Gefrierschränke	-20°C, Premium (Liebherr, Biberach) -80°C, MDF-U70V (Sanyo, Japan)
γ-Counter	Cobra II Auto-Gamma (Packard Company, Canberra)
Heparin	Liquemin® (Roche AG, Grenzach-Wyhlen)
H <sub>2</sub> O bidestilliert	(Firma Delta-Pharma, Pfullingen)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Fluka, Neu-Ulm)

Kaliumcarbonat	(Fa. Merck, Darmstadt)
Kühlzentrifugen	Model JS-HS (Beckman-Coulter, Krefeld) Model 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
Kulturplatten (steril):	
- 96-Loch-Rundbodenplatte	Costar ® (Corning incorporated, New York)
- 96-Loch-V-Bodenplatte	(Greiner, Nürtingen)
- 24-Loch-Flachbodenplatte	(Greiner, Nürtingen)
- 6-Loch-Flachbodenplatte	(Greiner, Nürtingen)
- 550 ml Kulturflasche	Cellstar (Greiner, Nürtingen)
- 250 ml Kulturflasche	Cellstar (Greiner Nürtingen)
- 50 ml Kulturflasche	Cellstar (Greiner, Nürtingen)
Mikroskope	Model Axiostar (Zeiss, Hallbermoos) Model Axiovert 25 (Zeiss, Halbergmoos)
Neubauer-Zählkammer	Profondeur 0,1 nm (Brand, Wertheim)
Netzteile	Power Pack 200 (Bio-Rad, München) Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
P 40 Ersatzprodukt	Nonidet® P 40 Substitute (Fluka, Neu-Ulm)
PBS, Phosphate Buffered Saline	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Petrischalen	(Techno Plastic Products AG, Arau, Schweiz)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Tecnorama, Zürich)
ph-Meter	Φ 32 (Beckman, Krefeld)
Reagenzglasschüttler	REAX top (Heidolph-Elektro GmbH, Kelheim)
Röhrchen 15ml, 50ml	(TPP AG, Arau, Schweiz)
Sterile Werkbank	Microflow (Nunc, Wiesbaden)
Serologische Pipetten	Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Stickstofftank	WSN-100 (Cryoson GmbH, Schöllkrippen)
Tischzentrifuge	Model 5414 C (Eppendorf, Hamburg)
Trypanblau	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Tween® 20	(Calbiochem, La Jolla, USA)
UV-Tisch mit Integrator- und Kameraeinheit	Integration Control Unit (Bio-Rad, München)
Verstellbare Pipetten	1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
Wasserbad	Model 1083 (GFL, Bremen)
Zentrifugenröhrchen	5ml Rundboden (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)

### 2.2.2. Kulturmedien und Supplemente

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
AB-Serum	Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB, (Deutsches Rotes Kreuz, Ulm)
Autologes Serum	Serum der verwendeten Spender
Cyclosporin A	Sandimmun® (Novartis, Nürnberg)
DMEM	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Erythrozyten-Lysispuffer	8,3g Ammoniumchlorid 1,0g Kaliumcarbonat 37mg EDTA
FCS, fötales Kälberserum	Charge 536S (Biochrom KG, Berlin)
Glutamin-Lösung	(Gibco BRL Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	(Gibco BRL, Karlsruhe)
RPMI 1640	(Gibco BRL, Karlsruhe)
T-Stim Culture Supplement	(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
T-Zell-Medium	RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum
Trypsin/EDTA	(Gibco BRL, Karlsruhe)
X-VIVO 15	(Bio Whittaker, Maryland, USA)

Zu allen Medien wurde 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) L-Glutamin und 10% FCS bzw. 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum addiert.

### 2.2.3. Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Annexin V Kit		Fitc	Facs	Immunotech, Marseille, F
CD20	2H7	PE	Facs	PharMingen, USA
CD71	M-A712	PE	Facs	Immunotech, Marseille, F
CD80	BB1	PE	Facs	PharMingen, USA
CD83	HB15A	PE	Facs	Immunotech, Marseille, F
CD86	IT2.2	PE	Facs	PharMingen, USA
F(ab') <sub>2</sub> Goat				
anti Mouse	polyclonal	Fitc	Facs	Zymed, USA
FcR-Blocking-Reagent	polyclonal	unkonjugiert	Facs	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
HLA-DR	TÜ 36	PE	Facs	PharMingen, USA
HLA-DR	G46-6	Fitc	Facs	PharMingen, USA
c-neu (Ab-2)	9G6	unkonjugiert	Facs	Oncogene, Boston, USA
Maus IgG <sub>1</sub>	679.1Mc7	Fitc	Facs	Immunotech, Marseille, F

Zusätzlich wurde der CD 3 Antikörper OKT 3 der Fa. Janssen-CILAG (Neuss) zur T-Zell-Expansion, sowie die Antikörper 1-D1K und 7-B6-1 der Fa. Mabtech (Schweden) im Rahmen des ELISpot verwendet.

#### 2.2.4. Zytokine

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
GM-CSF	IC-Chemikalien, Ismaning
IL-1 $\beta$	Strathmann, Hannover
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
IL-4	Strathmann, Hannover
IL-6	Strathmann, Hannover
IL-7	Pharmingen, SanDiego,USA
PGE <sub>2</sub>	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
TNF $\alpha$	Strathmann, Hannover
T-Stim Culture Supplement (Aufgereinigter Zellüberstand ConcanavalinA – stimulierter PBMC's)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ

#### 2.2.5. Zelllinien und Viren

<u>Bezeichnung</u>	<u>Spezifizierung und Herkunft</u>
B 95-8 (Maryland,USA),	EBV-sezernierende humane Leukozytenzelllinie von ATCC
EBV Überstand	Eppstein-Barr-Virus Überstand gewonnen aus B95-8 Zellen
Knapp-EBV (MZ 1257 EBV) Johannes-Gutenberg-Universität Mainz	EBV-transformierte B-Zellen eines Nierenkarzinompatienten
MVA-H2n 10 <sup>7</sup> bzw. 10 <sup>8</sup>	Rekombinanter <u>Modifizierter Vaccinia Virus Ankara</u> mit stabiler Expression von Her-2/neu. Mit 10 <sup>7</sup> bzw. 10 <sup>8</sup> virale Einheiten pro ml. (GSF-Institut für molekulare Virologie, Dr. Gerd Sutter und Dr. Ingo Drexler)
MVA-WT 10 <sup>7</sup> bzw. 10 <sup>8</sup>	nicht-rekombinanter <u>Modifizierter Vaccinia Virus Ankara</u> wild type. Mit 10 <sup>7</sup> bzw. 10 <sup>8</sup> virale Einheiten pro ml. (GSF-Institut für molekulare Virologie, Dr. Gerd Sutter und Dr. Ingo Drexler)
PBMC gesunder Spender	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes verschiedener
SK-BR-3 Mammaadenokarzinom-Zelllinie von ATCC (Maryland, USA)	Her-2/neu überexprimierende humane
SK-BR-3 tA2	zusätzlich HLA-A2 transduziert
SK-OV-3 Zelllinie von ATCC (Maryland,USA)	Her-2/neu überexprimierende humane Ovarialadenokarzinom-
SK-OV-3 tA2	zusätzlich HLA-A2 transduziert

### 2.3. Methoden

### **2.3.1. Allgemeine Zellkultur**

#### **2.3.1.1. Kultivierung verschiedener Zelllinien**

Die adhärenenten Tumorzelllinien wie SK-OV-3 oder SK-BR-3 wurden in DMEM, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10% (v/v) fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Bei einer Konfluation von etwa 90% wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:2 gesplittet. Nicht adhärenente Zelllinien wie B 95-8 oder Knapp-EBV wurden oben entsprechend, aber in RPMI kultiviert. Diese Zellen wurden abhängig von der Zelldichte im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gesplittet.

#### **2.3.1.2. Zellzählung und Vitalitätstest**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl einer Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 versetzt, in eine Neubauerkammer gegeben und mikroskopisch untersucht. Trypanblau färbt selektiv tote Zellen an, und ermöglicht somit eine Differenzierung, da es eine intakte Zellwand vitaler Zellen nicht durchdringen kann. Alle 4 Eckquadrate der Zählkammer wurden nun ausgezählt und das Ergebnis anschließend auf 1 Eckquadrat gemittelt. Da das Fassungsvermögen eines solchen Quadrates 0,1µl ist, muß das Ergebnis mit dem Faktor 10000 multipliziert werden, um eine auf 1ml bezogene Angabe zu erhalten. Unter weiterer Berücksichtigung 1:2 Verdünnung ergibt sich schließlich folgende Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zahl der intakten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

#### **2.3.1.3. Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut**

Heparinisertes Spenderblut wird mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend werden je 30ml des verdünnten Blutes in ein 50ml Röhrchen gegeben und mit 15ml Ficoll-Lösung vorsichtig unterschichtet, so dass zwei voneinander getrennte Phasen entstehen. Durch die nun folgende 15-minütige Zentrifugation bei 2100 rpm, bildet sich eine Interphase aus, in der sich die mononukleären Zellen befinden. Um die Phasentrennung aufrecht zu erhalten, läßt man die Zentrifuge ungebremst auslaufen. Erythrozyten, Granulozyten sowie tote Zellen, sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte. Über der Interphase befindet sich ein 1:2 Gemisch aus PBS und Serum. Davon werden 10ml entfernt und später zu autologem Plasma weiterverarbeitet. Die Interphase wird zusammen mit dem restlichem Serum abgenommen, in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Nun wird 10 Minuten bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, die Zellpellets der verschiedenen Röhrchen werden in PBS aufgenommen und vereinigt.

Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei 1300rpm wird wieder der Überstand dekantiert, und das Zellpellet anschließend in 5ml Erythrozyten-Lysis-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Dann werden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 1300 rpm 5 min zentrifugiert.

#### **2.3.1.4. Verarbeitung von autologem und AB-Spender Plasma**

Das Gemisch aus Plasma und PBS das sich nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gebildet hat, wird wie oben beschrieben abgenommen. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren, wird das Plasma 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Ausgefällene Proteine werden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 11000 rpm pelletiert. Das Plasma wird anschließend durch einen 0,2µm-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

Vom „Roten Kreuz“ bezogenes Plasma von gesunden Spendern der Blutgruppe AB wird auf gleiche Art und Weise hitzeinaktiviert, zentrifugiert und sterilfiltriert.

#### **2.3.1.5. Transfektion von B-Zellen mit B 95-8-Zell-Überstand**

B 95-8 Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert und der gewonnene Überstand durch einen 0,45µm Filter gespritzt. Zur Transfektion wurden  $1 \times 10^7$  PBMC's eingesetzt. Diese wurden in ein 50ml Röhrchen mit 2,5ml RPMI gegeben. Anschließend wurden 2,5 ml des B 95-8 Zellüberstands addiert und 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden weitere 5ml RPMI mit 1µg/ml Cyclosporin hinzugegeben. Die somit erhaltene 10ml Zellsuspension wurde in eine 50 ml Kulturflasche transferiert und anschließend aufrecht in den Brutschrank gestellt. Nach etwa 2-3 Wochen haben die transformierten B-Zellen soweit proliferiert, daß die Zellen gesplittet werden konnten. Die Zellen teilen sich kontinuierlich und können stabil in Kultur gehalten werden. Transformierte B-Zellen eignen sich als „Feeder-Zellen“ in T-Zell Kulturen, da sie verschiedene Wachstumsfaktoren sezernieren. Weiterhin eignen sie sich als Targets in Zytotoxizitäts-Assays oder im ELISPOT-Assay.

#### **2.3.1.6. Infektion mit MVA-Her-2/neu bzw. MVA-WT**

Die zu infizierenden Zellen wurden geerntet, genau gezählt und in einem 15ml Röhrchen pelletiert, der Überstand dekantiert. Entsprechend der erwünschten MOI, die zwischen 1 und 100 variierte, wurde die benötigte Menge an Virus-Überstand berechnet und zu dem Zellpellet addiert. Es folgte eine 2-stündige Inkubation im Brutschrank, wobei alle 20 min das Zellpellet aufgeschüttelt wurde, um die Effizienz der Infektion zu steigern.

Die viralen Überstände wurden bei -80°C gelagert und nach dem Auftauen gevortext um Aggregationen der Viruspartikel zu lösen.

### 2.3.1.7. Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Monozyten aus einer PBMC-Präparation werden durch Adhärenz an eine Plastikoberfläche von den übrigen mononukleären Zellen separiert. Mit Hilfe der Zytokine IL-4 und GM-CSF werden diese Zellen zu Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (DC) differenziert. Werden weitere, pro-inflammatorische Zytokine dazugegeben, so nimmt die Zelle einen „ausgereiften“ Phänotyp an. DC werden als Antigen-präsentierende Zellen in einer Kultur mit T-Zellen eingesetzt.

#### Material:

RPMI-Medium	1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % autologes Plasma in RPMI-1640
X-Vivo-Medium	1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % autologes Plasma in X-Vivo 15
Maturierungscocktail	10 ng/ml IL-1 $\beta$ 10 ng/ml TNF $\alpha$ 1000 U/ml IL-6 1 $\mu$ g/ml Prostaglandin E <sub>2</sub> in X-Vivo 15

PBMC werden in RPMI-Medium aufgenommen und in einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$ /Loch in den Kavitäten einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank ist der überwiegende Teil der Monozyten adhärent. Zur Entfernung aller übrigen Zellen wird die Oberfläche mehrmals mit Medium gespült. Durch den feinen Strahl der Pipette lösen sich die nicht bzw. nur schwach adhärierenden Zellen ab und werden mitsamt dem Medium abgezogen. Auf die adhärenen Zellen in der Platte wird frisches RPMI-Medium gegeben und der Ansatz über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen erneut gespült. Auf diese Weise wird eine Monozyten-Kultur hoher Reinheit erhalten. Statt RPMI wird im weiteren Verlauf der Kultur das für Lymphozyten und Monozyten besser geeignete X-VIVO-Medium verwendet. Dem Medium werden zusätzlich noch die Zytokine IL-4 und GM-CSF in einer Konzentration von 1000 U/ml bzw. 800 U/ml addiert. An den Tagen 2, 4 und 6 werden die Zellen mit 1 ml X-VIVO-Medium plus 1000 U IL-4 und 1600 U GM-CSF gefüttert. Durch die Zytokin-Behandlung ändern die Zellen ihren Phänotyp und verlieren das für Monozyten typische CD14 Oberflächenmolekül. Sie lösen sich von der Plastikoberfläche ab, desweiteren werden dendritische Zellausläufer sichtbar.

Die Zellen sind als unreife DC bezeichnet. In diesem Differenzierungszustand sind sie in der Lage große Mengen an solublen Antigen und Zellschutt aufzunehmen. Die DC werden an Tag 7 mit einer Pipette abgenommen und einmal mit Medium gewaschen. Anschließend werden sie in X-VIVO-Medium mit 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF aufgenommen und in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  in den Kavitäten einer neuen 6 Loch-Platte ausgesät. Um nun eine Ausreifung einzuleiten, wird der Maturierungscocktail mit den inflammatorischen Zytokinen, in den oben aufgeführten Endkonzentration addiert. Nach 3 weiteren Tagen, also Tag 10 ist die Ausreifung abgeschlossen. Die nun reifen DC exprimieren an ihrer Oberfläche Moleküle wie CD80, CD83, CD86 und HLA-DR.

#### **2.3.1.8. Herstellung von Zellysat MVA-infizierter Zellen**

Unreife dendritische Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit MVA-Her-2/neu infiziert. Anschließend wurden sie wieder in X-Vivo Medium mit 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 aufgenommen und zurück in 6-Loch Kulturplatten gesetzt. Nach 24h Stunden wurden die DC geerntet und zentrifugiert. In einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen 3 mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, um die Zellen aufzubrechen und somit das Lysat herzustellen.

#### **2.3.1.9. Pulsen von DC mit Zellysat**

Unreife DC wurden wie oben beschrieben an Tag 7 umgesetzt. Anschließend wurde Zellysat aus 500.000 infizierten Zellen in 500µl "Tag 7 – Medium" addiert. Um die besondere Phagozytosefähigkeit unreifer DC optimal zu nutzen, wurde der Reifungscocktail, in einem Volumen von 500µl, erst nach 24h addiert. An Tag 10 bzw. 11 wurden die nun gepulsten DC geerntet, in FACS-Analysen untersucht oder zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt.

#### **2.3.1.10. Apoptose-Induktion von DC und EBV transformierten B-Zellen**

Da eine MVA-Infektion zur Apoptose führt, wurden als Kontrolle nicht infizierte Zellen mit ultraviolettem Licht bestrahlt, um somit ebenfalls eine Apoptose zu induzieren. Dafür wurden die Zellen in 6-Loch Kulturplatten oder 15ml Röhrchen pipettiert und 45 min bei Raumtemperatur auf dem UV-Tisch bestrahlt. Das UV-Licht führt unter anderem zur Thymidin-Dimerisierung. Durch diese DNA-Schäden leitet die Zelle schließlich den programmierten Zelltod ein.

### **2.3.2. T-Zell Kulturen**

#### **2.3.2.1. Priming und Restimulationen von T-Zellen**

T-Zell-Kulturen wurden bevorzugt in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Zum einen, um eine optimale Nähe zwischen Effektor- und Target- Zelle herzustellen und somit eine erfolgreiche Interaktion zu gewährleisten. Andererseits entstehen durch die relativ geringe ursprüngliche Zahl an T-Zellen pro Loch, sogenannte Mikromilieus, innerhalb welcher die Varianz verschiedener T-Zell-Rezeptoren beschränkt ist. In weiterer Konsequenz, minimiert man also die Gefahr, daß in einzelnen Kavitäten, die spezifische T-Zellen enthalten, diese von anderen unspezifischen T-Zellen überwuchert werden.

Die T-Zellen wurden zum Priming als PBMC, ohne weitere Aufreinigung bestimmter Populationen, eingesetzt. Als APC wurden reife DC Tag 10 oder unreife DC Tag 7 eingesetzt, die entweder direkt mit MVA-Her-2/neu infiziert, oder im Falle der unreifen DC auch mit Zelllysate infizierter Zellen gepulst und anschließend ausgereift wurden. Das Verhältnis zwischen APC's und T-Zellen lag beim Priming zwischen 1:2 und 1:10, bei den Restimulation zwischen 1:10 und 1:100. Es wurde wöchentlich restimuliert und wie beim Priming 50 U/ml IL-2 und 5ng/ml IL-7 addiert. Weiterhin wurden die Zellen an Tag 3 bzw. Tag 4 nach einer Restimulation mit frischem T-Zell-Medium und genannten Zytokinen gefüttert. Bei starker Proliferation wurden die Zellen zusätzlich im Verhältnis 1:2 gesplittet.

#### **2.3.2.2. T-Zell Klonierung und Expansion**

Die zu klonierenden Zellen werden in einem großen Volumen an T-Zellmedium aufgenommen, so daß nach der Aussaat in 96- Loch-Rundbodenplatten nur noch eine statistische Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Zelle pro Kavität besteht. Um die Proliferation der Zelle anzuregen werden  $5 \times 10^4$  PBMC und  $1 \times 10^5$  allogene mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisierte B-Zellen addiert. Die PBMC sind in der Lage über ihre Fc-Rezeptoren den Antikörper OKT-3 zu binden. Dieser wurde dem Medium in einer Konzentration von 30 ng/ml zugegeben. Gebunden an Oberflächen ist mAb OKT-3 in der Lage, den mit dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex zu aktivieren und auf diese Weise eine Proliferation der T-Zelle ungeachtet ihrer eigentlichen Spezifität auszulösen. Die allogenen EBV-B-Zellen setzen Zytokine frei, welche von der T-Zelle als Wachstumsfaktoren benötigt werden. Die PBMC und B-Zellen werden mit 3000 bzw. 10 000 rad bestrahlt, damit diese Zellen nicht mehr proliferieren können.

Desweiteren wird rekombinant hergestelltes IL-2 in einer Konzentration von 50 U/ml addiert. 7 Tage nach dem Ansetzen der Klonierung werden 100 µl Medium entfernt und anschließend 100 µl frisches T-Zellmedium mit 50 U/ml rekombinantem IL-2 in die Kavitäten pipettiert. Nach 14 Tagen zeigt eine Verfärbung des Mediums und die sichtbare Proliferation die erfolgreiche klonale Expansion einer T-Zelle an. Positive Ansätze werden im IFN $\gamma$ -ELISpot

oder im CRA getestet. Antigen-spezifische Klone werden weiter expandiert, indem  $5 \times 10^4$  Zellen in 25 ml T-Zellmedium zusammen mit  $2,5 \times 10^7$  bestrahlten und Okt-3-gecoateten PBMC und  $5 \times 10^6$  bestrahlten allogenen EBV-B-Zellen in einer 50ml Kulturflasche kultiviert werden. An den Tagen 1, 3, 5, 8 und 11 nach Ansetzen der Expansionskultur werden 50 U/ml IL-2 addiert. Desweiteren wird an Tag 5 die Hälfte des Mediums gegen frisches ausgetauscht. Ab dem 13. Tag können die Klone wieder getestet und weiterexpandiert werden. Ein Teil der Zellen wird nach der Ernte in Einfriermedium mit Humanserum aufgenommen, direkt in Einfrieröhrchen überführt und eingefroren.

### **2.3.2.3. T-Zell Kultivierung auf OKT3 gecoateten Platten**

Eine alternative Möglichkeit T-Zellen schnell zu expandieren und trotzdem jederzeit für funktionelle Tests zur Verfügung zu haben, ist die Expansion auf OKT3 gecoateten Platten. Je nach der zur Verfügung stehenden Zellzahl, wählt man 24- bzw. 96-Loch Kulturplatten. Zu serumfreien RPMI wird OKT-3 in einer Endkonzentration von  $2 \mu\text{g/ml}$  addiert und dann in die Kavitäten pipettiert, so daß diese gut bedeckt sind. Nach einer 3-stündigen Inkubation im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ , wird das Medium abgenommen und dann 2 x mit RPMI gewaschen. Die T-Zellen werden nun in T-Zellmedium mit  $5 \text{ng/ml}$  Il-7 und Il-2 50 U/ml aufgenommen und in die nun mit OKT-3 beschichteten Kavitäten gegeben.

## **2.3.3. Funktionelle Tests**

### **2.3.3.1. Chromium-Release-Assay**

Um die funktionelle Spezifität zytotoxischer T-Zellen zu untersuchen, eignet sich der Chromium-Release-Assay. Hierfür werden die verschiedenen Targetzellen z.B. Tumorzellen mit radioaktivem,  $\gamma$ -Strahlen emittierendem  $\text{Cr}^{51}$  markiert. Die Target-Zellen nehmen aktiv das Chrom auf. Bei der nun folgenden Koinkubation mit den zu untersuchenden T-Zellen, kommt es zur Interaktion mit den Targets. Falls die Targets die gleichen HLA-Moleküle wie die CTL besitzen, und zudem auf ihren MHC-Molekülen die passenden Peptide präsentieren, kommt es zur Lyse der Targets und somit zur Freisetzung des radioaktiven Chrms. Dieses kann dann im Überstand gemessen werden. Um die Quantität der Lyse verlässlich zu messen, ist es notwendig, Kontrollen mit spontaner und maximaler Chromfreisetzung mitzuführen. Außerdem werden die CTL im Assay titriert und Doppelwerte bestimmt.

**Vorbereitung der Targetzellen.** Adhärenente Zellen werden mit Trypsin/EDTA abgelöst, danach ebenso wie nicht-adhärenente Zellen, 2 mal mit RPMI-Medium gewaschen und gezählt. Es sollten  $>90\%$  der Zellen viabel sein. Anschließend werden  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert und trocken dekantiert. Die Zellen werden in  $100 \mu\text{l}$  warmem FCS aufgenommen.

**Cr<sup>51</sup>-Labeling der Targetzellen.** Zu den in FCS gelösten Zellen werden 100µCi Cr<sup>51</sup> addiert und anschließend bei 37°C, 1 h lang inkubiert. Bei Zellen die das radioaktive Chrom schlecht aufnehmen, wie z.B. B-Zellen, bietet es sich an 200µCi Cr<sup>51</sup> zu addieren und die Inkubation auf 1h 30 min zu verlängern. Alle 15 min werden die Zellen aufgeschüttelt, um die Aufnahme des Chroms zu optimieren. Nach der Inkubation werden die Zellen 3 x mit RPMI-Medium gewaschen und dann gezählt. Die Zellzahl wird nun auf eine Konzentration von 1 x 10<sup>4</sup>/ml eingestellt.

**Vorbereitung der T-Zellen.** Die CTL werden während der Inkubation der Target-Zellen in RPMI-Medium aufgenommen, gewaschen und gezählt. Dann werden sie auf eine 96-Loch-V-Bodenplatte pipettiert. Dabei wird eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei sich in der geringsten Verdünnung 90.000 T-Zellen pro Loch befinden. Die Zellen werden in fünf Schritten jeweils im Verhältnis 1:3 verdünnt. Es wird so verfahren, daß sich die CTL jeweils in 100µl RPMI-Medium pro Loch befinden. In die Löcher für die Minimum-Kontrolle werden 100µl RPMI-Medium pipettiert. Bis zum Inkubationsschluß der Targets werden die Platten in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt.

**Koinkubation der CTL und der Targets.** Die wie oben beschrieben, gelabelten und auf die richtige Zellzahl eingestellten Targets werden auf die vorbereitete 96-Loch-Platte pipettiert. Dabei werden je 100µl Zellsuspension pro Loch addiert. In die Kavitäten der Maximum-Kontrolle werden anschließend 100µl NP40 addiert, ein Detergenz, das die Zellen zum Platzen bringt, und somit zur maximalen Freisetzung des aufgenommenen Chroms führt. Das Endvolumen in jedem Loch beträgt nun 200µl. Die fertig pipettierten Platten werden anschließend für 4h bei 37°C inkubiert. Danach werden je 100µl Überstand pro Loch abgenommen und im γ-Counter die freigesetzte Aktivität gemessen.

### 2.3.3.2. ELISPOT-Assay

Diese Methode der Quantifizierung der spezifischen T-Zell-Aktivität, bedient sich des enzymatischen Nachweises von IFN $\gamma$  in speziellen Nitrocellulose-Platten. Auf gleiche Art und Weise wie bei der ELISA-Technik wird der Boden der Kavität mit einem Fängerantikörper beschichtet. Danach werden T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen in den Platten kokultiviert. Nach einer bestimmten Zeit werden die Zellen entfernt und das gebundene IFN $\gamma$  über einen Detektionsantikörper in einer Farbreaktion nachgewiesen.

#### Spezielle Materialien

Nitrocellulose-Mikrotiter-Platte

ELISpot-Mikroskop

ELISpot-Kamera

Auswerte-Software

Multi-Sreen<sup>®</sup>-HA (Millipore, Molsheim)

Axioplan 2 (Zeiss, Hallbergmoss)

DX 950P (Sony, Japan)

KS ELISpot, Version 4.1.103 (Zeiss)

**Spezielle Antikörper und Reagenzien:**

Fängerantikörper:	anti-IFN $\gamma$ -mAk 1-D1K
Detektionsantikörper:	anti-IFN $\gamma$ -mAk 7-B6-1-Biotin
Avidin-Peroxidase-Komplex	Vectastain Elite Kit (Vector)
Peroxidase-Substrat	Aminoethylcarbazol (AEC)

**Puffer und Lösungen:**

ELISpot-Puffer:	17,4 mM Natriumhydrogencarbonat 7,5 mM Natriumcarbonat 0,2% Natriumazid
ELISpot-Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Puffer für 7-B6-1	0,5 % BSA in PBS
Avidin-Peroxidase-Lösung:	je 1 Tropfen Reagenz A und B in 10 ml 0,1% Tween/PBS-Puffer
Acetatpuffer	15 mM Essigsäure 35 mM Natriumacetat in Aqua dest.
AEC-Entwicklerlösung	1 Tablette gelöst in 2,5 ml Dimethylformamid mit Acetat-Puffer auf 50 ml vor Gebrauch 25 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zugeben

**Methode**

Eine Nitrocellulose-Mikrotiter-Platte wird mit 50  $\mu$ l pro Kavität einer 10  $\mu$ g/ml-konzentrierten 1-D1K-Antikörper-Lösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Antikörper wird hierfür in ELISpot-Puffer aufgenommen. Am nächsten Tag wird die Lösung dekantiert und die Platte viermal für 15 Minuten mit 200  $\mu$ l PBS pro Kavität inkubiert, um die Platte zu waschen. Auf diese Weise wird nichtgebundener Antikörper beseitigt. Zum Blocken unspezifischer Bindungen werden als nächstes 150  $\mu$ l T-Zellmedium mit 10% AB-Serum addiert. Der Ansatz wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach dem Dekantieren des Mediums werden die T-Zellen in die Kavitäten pipettiert. Letztere wurden vorher zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und gezählt. Die Zellzahl wird so eingestellt, daß sich die Zellen für eine Kavität in einem Volumen von 50  $\mu$ l befinden. Nach der Aussaat wird die Platte für 30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit setzen sich die T-Zellen auf dem Boden ab. Nach diesem Schritt sollte die Platte nicht mehr zu stark bewegt werden. Als nächstes werden die Antigen-präsentierenden Zellen in einer Konzentration von  $1-3 \times 10^4$  pro Kavität vorsichtig addiert. Beim Pipettieren wird darauf geachtet, daß die T-Zellen in der Platte nicht aufgewirbelt werden. Anschließend wird die Platte für mindestens 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der 20 Stunden werden die Zellen dekantiert und die Platte sechsmal in einer Wanne gefüllt mit Wasch-Puffer für jeweils 3 Minuten inkubiert. Danach werden in jedes Loch 100 µl 0,5%BSA/PBS Puffer mit 2 µg/ml 7-B6-1-Biotin-Antikörper pipettiert. Nach der 2-stündigen Inkubation bei 37°C wird wieder sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird 100 µl der 30 Minuten zuvor angesetzten Avidin-Peroxidase-Lösung dazugegeben. Das Avidin bindet an das Biotin des Detektionsantikörpers und der Antikörper wird auf diese Weise mit einer Peroxidase-Funktion ausgestattet. Die 30-minütige Inkubation wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Dekantieren der Lösung wird zuerst mit Waschpuffer und dann mit PBS je dreimal gewaschen. Durch das PBS wird das die Peroxidase-Reaktion störende Tween entfernt. Die Entwicklung erfolgt mit 100 µl einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-aktivierten AEC-Lösung. Nach 4 Minuten und 30 Sekunden wird die Farbreaktion durch intensives Spülen der Platte unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Danach wird die Platte über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag können die Spots mit Hilfe des ELISpot-Mikroskops ausgezählt und mit der Software ausgewertet werden.

### **2.3.3.3. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich Zellpopulationen bezüglich ihrer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle charakterisieren. Dabei bietet die FACS-Analyse den Vorteil, daß man innerhalb einer kurzen Zeit viele tausend Zellen analysieren kann. Die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle werden hierzu mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei trägt der gegen das Oberflächenmolekül gerichtete Antikörper entweder bereits den fluoreszierenden Farbstoff (direkte Immunofluoreszenz) oder er wird durch einen zweiten Fluoreszenz – gekoppelten Antikörper gebunden und damit sichtbar gemacht (indirekte Immunofluoreszenz). Durch die Verwendung zweier in verschiedener Wellenlänge fluoreszierender Farbstoffe, ist die gleichzeitige Analyse verschiedener Oberflächenmoleküle möglich. Im Durchflußzytometer werden die Zellen einzeln an einer Lichtquelle (Argon-Laser, Wellenlänge 488nm) zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe vorbeigeführt. Die somit entstehenden Fluoreszenzemissionen werden von Photodetektoren erfasst. Auch das gestreute sichtbare Licht wird von Photozellen gemessen, wobei zwischen der Streuung parallel zum Laserstrahl (Vorwärtsstreuung) und senkrecht dazu (Seitwärtsstreuung) unterschieden wird. Die Vorwärtsstreuung erlaubt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen, die Seitwärtsstreuung hingegen korreliert mit der Granularität der Zellen. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional der Dichte der auf der Zelle gebundenen markierten Antikörper und erlaubt damit eine Beurteilung der Expressionshöhe und des Expressionsmusters. Die gleichzeitige Messung zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe wird durch die Verwendung optischer Filtersysteme ermöglicht, welche die gemischte emittierte Fluoreszenz in die den einzelnen Farbstoffen entsprechenden Wellenlängenbereiche aufspaltet. Das Überschneiden dieser Bereiche muß durch geeignete Signalprozessierung kompensiert werden. Um Zellen die FcRezeptoren besitzen, wie z.B. Dendritische Zellen, mit Antikörpern zu markieren,

muß man verhindern, daß die eingesetzten Antikörper unspezifisch über ihren Fc-Anteil gebunden werden. Dies wurde mit Hilfe eines FcR-Blocking Reagent, welches zu jedem Ansatz addiert wurde, erreicht.

**Markieren der Zellen:** Die Zellen wurden in FACS-Puffer (0,5% PBS/BSA Lösung) suspendiert, 50µl FcR-Blocking-Reagent addiert und für 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Für jede Probe wurden 100µl der Suspension in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die minimale Zellzahl in einer Probe lag bei  $5 \times 10^4$  Zellen, maximal wurden  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die Antikörper wurden in den von den Herstellern empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Zur Markierung der Zellen bei einer Doppelfärbung unter Verwendung eines direkt PE-gekoppelten monoklonalen Antikörpers und eines ungekoppelten primären Antikörpers in Verbindung mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper wurde wie folgt vorgegangen.

Nach der 30 minütigen Inkubation des FcR-Blocking –Reagents, wurde der primäre nicht gekoppelte Antikörper addiert. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen, und anschließend bei 1500 rpm 5min zentrifugiert. Die Zellen wurden wieder in 100µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe der Fitc-markierten Ziege.anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-Fragments, und 30 minütiger Inkubation, wurde erneut gewaschen, zentrifugiert und in 100µl FACS-Puffer resuspendiert. Jetzt wurde der PE-markierte Antikörper hinzugefügt, und 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurde noch einmal gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer resuspendiert und dann frisch gemessen. Auf eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurde verzichtet, da ein exaktes Gating für diese Messungen essentiell war, und somit eventuelle Größenveränderungen der Zellen, welche durch die Fixierung entstehen, vermieden wurden. Bei Einfachfärbungen wurde wie folgt verfahren:

Einfachfärbung mit indirekter Immunofluoreszenz

Zugabe des FcR-Blocking-Reagent, 30 min 4°C

Zugabe des primäre Antikörpers, 30 min 4°C

Waschen, resuspendieren

Zugabe des Ziege-F(ab')<sub>2</sub>-Fitc, 30 min bei 4°C

Waschen und resuspendieren

Einfachfärbung mit direkter Immunofluoreszenz

Zugabe des FcR-Blocking-Reagent, 30 min 4°C

Zugabe des Fitc- oder PE-gekoppelten Maus-Antikörpers, 30 min 4°C

Waschen und resuspendieren

**Untersuchung der Zellvitalität mit Propidiumjodid und Annexin-Fitc.** Propidiumjodid ist eine rotfluoreszierende Substanz, die die Fähigkeit besitzt, sich in die DNA der Zellkerne anzulagern. Aufgrund seiner Polarität kann es die Zellmembran intakter Zellen nicht durchdringen. Tote Zellen weisen dagegen eine defekte Zellmembran auf. Dies ermöglicht die Permeation des Farbstoffes in das Zellinnere, wo es in die DNA interkaliert. Nekrotische Zellen lassen sich auf diese Weise bei durchflußzytometrischen Messungen eindeutig von lebenden Zellen unterscheiden. Eine der frühesten Merkmale apoptotischer Zellen ist der Verlust der Asymmetrie in der Phospholipidmembran. Dabei gelangt Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, während die Integrität der Plasmamembran gewahrt bleibt. Über die hohe Bindungsaffinität des Annexin V zu Phosphatidylserin können apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Das Annexin V stammt aus einer E.coli-Kultur, die mit der humanen cDNA transformiert wurde. Durch eine Doppelfärbung mit Propidiumjodid lassen sich nekrotische von apoptotischen Zellen unterscheiden, und man kann somit sicherstellen, nur vitale Zellen zu "gaten". Durchgeführt wurde diese Doppelfärbung mit Hilfe des Annexin V Kit (Immunotech, Marseille, F). Hierfür wurde zuerst die Pufferstocklösung im Verhältnis 1:10 mit aqua dest. verdünnt. Mit der nun erhaltenen Pufferlösung wurde das Annexin V ebenfalls im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 500µl Pufferlösung versetzt. Anschließend wurde je 5µl der Propidiumjodidlösung und der verdünnten Annexin V -Lösung addiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 4°C im Kühlschrank, in Dunkelheit. Ohne weiteres Waschen konnte die Probe nun direkt im analysiert werden.

**Kontrollen.** Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen in einer untersuchten Zellpopulation, die ein bestimmtes Oberflächenprotein exprimieren ("positive Zellen") wurden negative Kontrollen verwendet, um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz der Zellen, auf deren Oberfläche dieses Antigen nicht exprimiert wird ("negative Zellen"), abzuschätzen. Hierfür wurde bei direkter Fluoreszenzfärbung irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps und desselben Fluoreszenzfarbstoffs eingesetzt. Bei der indirekten Immunofluoreszenz wurde ein unkonjugierter Antikörper des gleichen Isotyps verwendet, ansonsten entsprechend der normalen Färbung verfahren.

**Messung der Fluoreszenz im Durchflußzytometer.** Vor der eigentlichen Fluoreszenzmessung der Proben, mußten einige Einstellungen am FACScan-Gerät vorgenommen werden. Zunächst wurde die Empfindlichkeit der Detektoren von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) für die zu messende Probe so optimiert, daß die gesamte Zellpopulation erfaßt, d.h. im FSC/SSC-Punkt-Diagramm sichtbar war. Die intakten Einzelzellen können in diesem Diagramm von Zelltrümmern, toten Zellen und Zellaggregaten unterschieden werden (siehe auch: Untersuchung der Zellvitalität). Sie zeichnen sich als Anhäufung von dicht beieinander liegenden Punkten ab, während sich Zelltrümmer und tote Zellen aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Vorwärtsstreuung erkennen lassen.

Zellaggregate hingegen zeichnen sich durch eine hohe Seitwärtsstreuung aus. Durch Anlegen sogenannter "Gates" um die Populationen der vitalen Einzelzellen, deren Lage zuvor mit Hilfe von Propidiumjodid und Annexin genau bestimmt wurde, wurde gewährleistet, daß nur diese Zellen für die Fluoreszenzanalyse herangezogen wurden. Mit Hilfe einer negativen Isotyp-Kontrolle wurde nun die Verstärkung der Fluoreszenzsignale auf die untersuchten Zellen abgestimmt. Wurden Doppelfärbungen gemessen, so mußte noch anhand von stark positiven Einzelzellen die Fluoreszenzkomensation korrekt justiert werden. Hierfür wurden die Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR), welche auf den untersuchten Zellen stark exprimiert wurden, verwendet. Schließlich wurden die Proben analysiert, wobei mindestens 500 Einzelzellen erfaßt wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Reife und unreife DC exprimieren Her-2/neu nach Infektion mit MVA-Her-2/neu

Zunächst wurde die MVA-Her-2/neu Infektion von dendritischen Zellen etabliert. Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz, wurde eine Virustitration durchgeführt und anhand einer FACS-Analyse die Expression beurteilt. Dabei war der Vergleich zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen von besonderem Interesse. Es wurde dabei mit einer MOI von 1 – 100 gearbeitet, wobei das Gesamtvolumen während der Infektion jeweils 50µl war, um die einzelnen Proben vergleichen zu können. Die “Multiplicity of Infection“ (MOI) gibt das Verhältnis von viralen Einheiten zu den zu infizierenden Zellen an. **Abb. 1a** zeigt unreife dendritische Zellen, 12h nach einer MVA-Her-2/neu Infektion. Als Histogramm wird die Her-2/neu Expression gegen die Zellzahl dargestellt, wobei die nicht infizierte Kontrolle, als auch infizierte Zellen mit einer MOI von 1, 2, 5, 10 und 100 abgebildet sind. Dabei zeigt sich, daß bei einer MOI von 10 das Maximum der Her-2/neu Expression erreicht ist. Bei einer weiteren Steigerung auf eine MOI von 100, scheint die Her-2/neu-Expression wieder abzunehmen (siehe Pfeil). Dies ist wohl auf eine frühe Apoptose derjenigen Zellen zurückzuführen, die aufgrund der hohen Viruslast mehrfach infiziert wurden. **Abb. 1b** zeigt reife dendritische Zellen, 12h nach einer MVA-Her-2/neu Infektion. Als Histogramm wird die Her-2/neu Expression gegen die Zellzahl dargestellt. Abgebildet sind infizierte Zellen bei einer MOI von 1, 2, 5, 10 und 100. Nicht- infizierte Zellen dienen als Negativ-Kontrolle. Dabei zeigt sich, daß erst bei einer MOI von 100 das Maximum der Her-2/neu Expression erreicht ist. Im Vergleich zu den unreifen DC sind die reifen DC also weniger empfänglich für MVA-Her-2/neu Infektion. Beide sind also erfolgreich infizierbar und zeigen bereits 12h nach der Infektion mit MVA-Her-2/neu eine beachtlich hohe Her-2/neu Expression.

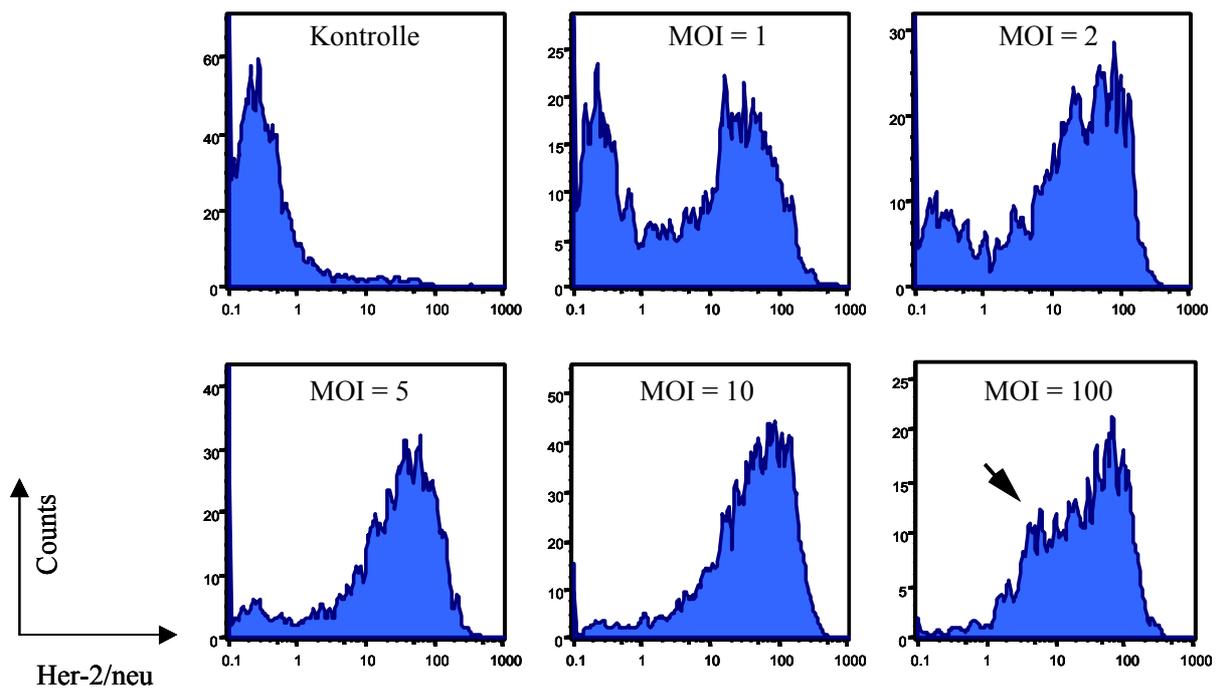


Abb. 1.a: MVA-Her-2/neu Infektion unreifer dendritischer Zellen, bei verschiedenen MOI (1-100). Facsanalyse der Her-2/neu Expression 12h nach der Infektion. Die Her-2/neu positiven Zellen werden kontinuierlich mehr. Das Expressionsniveau von Her-2/neu ist sehr hoch.

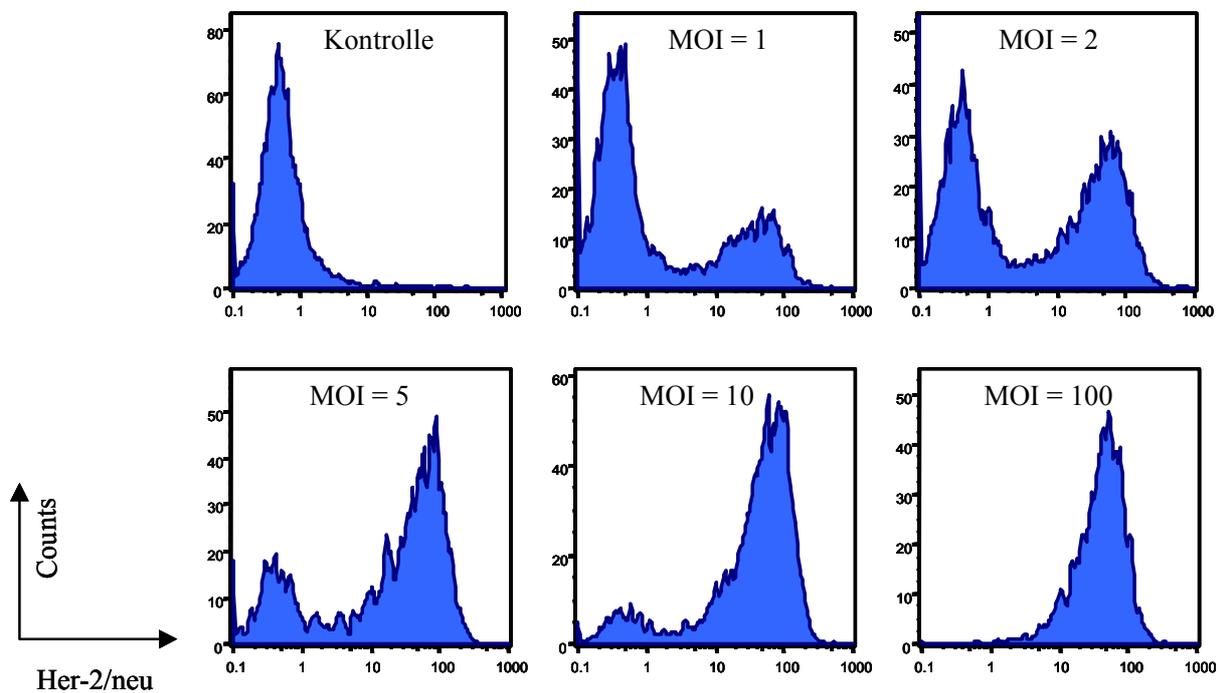


Abb. 1.b: MVA-Her-2/neu Infektion reifer dendritischer Zellen, bei verschiedenen MOI (1-100). Facsanalyse der Her-2/neu Expression 12h nach der Infektion. Die Her-2/neu positiven Zellen werden kontinuierlich mehr. Das Expressionsniveau von Her-2/neu ist sehr hoch.

### 3.2. Eine MVA-Her-2/neu Infektion dendritischer Zellen führt zur Apoptose

Nach dem Beweis der hohen Effizienz einer MVA-Her-2/neu Infektion in dendritischen Zellen, war es von besonderer Bedeutung wie lange diese Infektion stabil bleibt, ob, wann und wie sie zum Untergang der infizierten Zelle führt. Einen ersten Hinweis auf die Auswirkungen einer MVA-Her-2/neu Infektion auf dendritische Zellen, ergab sich durch morphologische Veränderungen, die man deutlich in der *FS/SS Dot Plot* Darstellung einer FACS Analyse sehen kann. **Abb. 2a** zeigt eine solche Darstellung von reifen dendritischen Zellen 48h nach einer MVA-Her-2/neu Infektion bei einer MOI von 10. Man kann drei verschiedene Populationen unterscheiden. Bei Population 1 handelt es sich um dendritische Zellen, deren *FS/SS* Signal, dem nicht infizierter dendritischer Zellen entspricht. In Population 2 befinden sich lymphozytäre Verunreinigungen der DC – Kultur, sowie Zelltrümmer. Population 3 hingegen, sieht man nur bei infizierten Zellen. Diese Population ist direkt nach einer MVA-Her-2/neu Infektion zahlenmäßig klein, wird jedoch im Verlauf der Stunden und Tage nach der Infektion größer. In Kenntnis dieser verschiedenen Populationen wurde nun die Zellvitalität mittels Propidiumjodid und Annexin-FITC über einen Zeitraum von 60h in Intervallen von 12h untersucht.

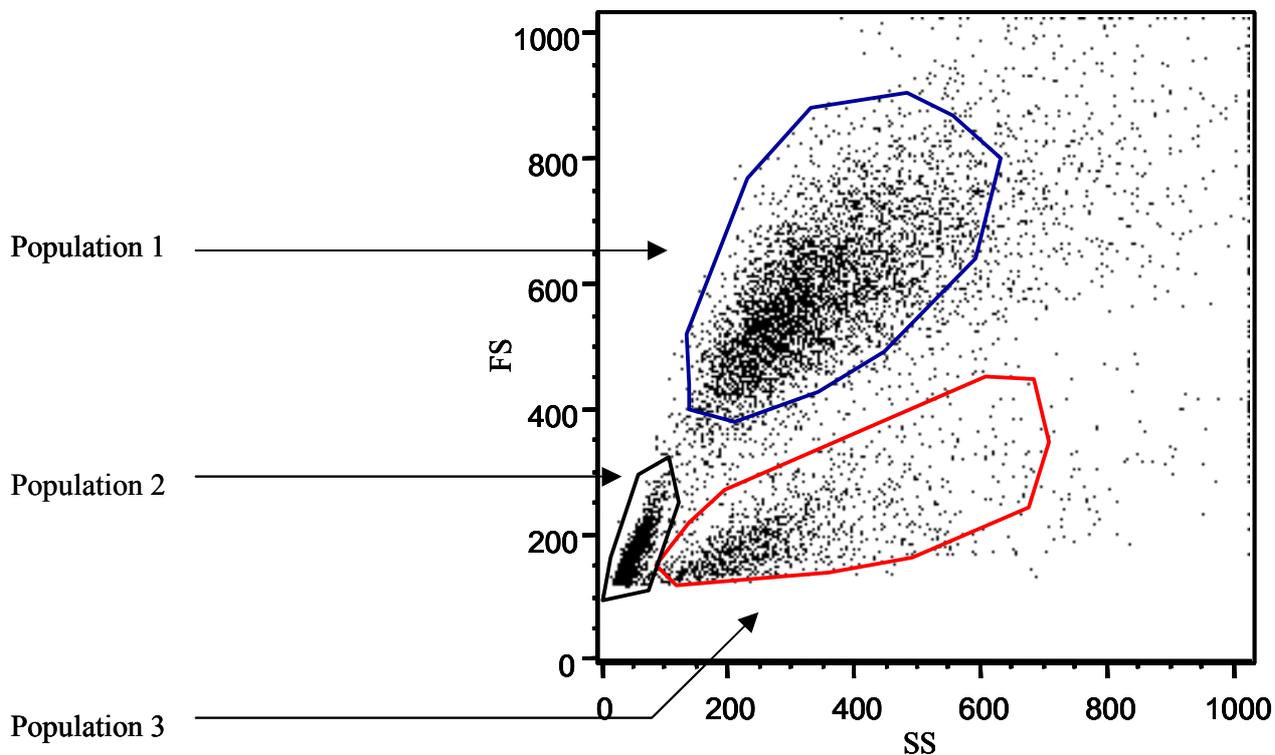
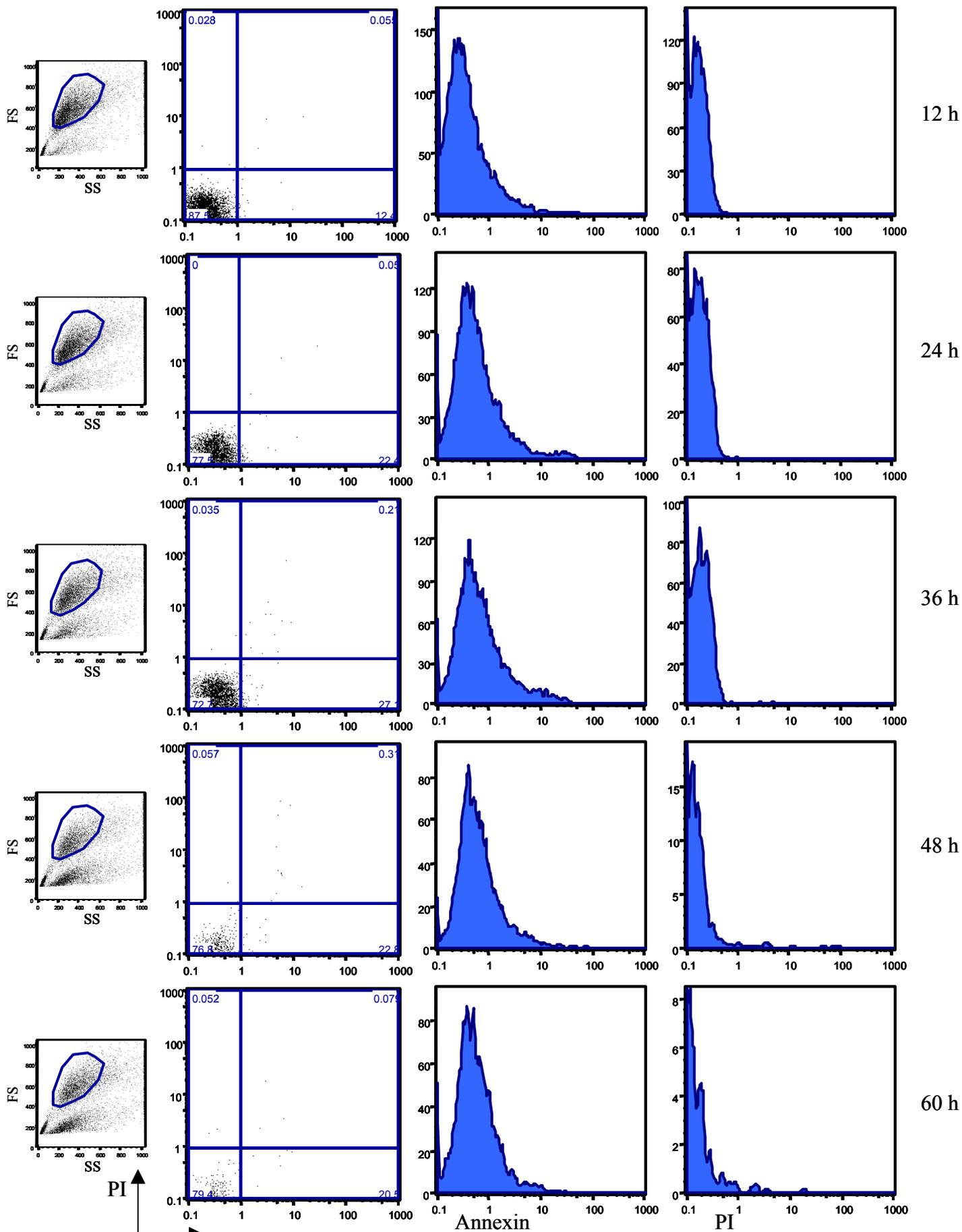


Abb. 2.a: Reife dendritische Zellen 48h nach einer MVA-Her-2/neu Infektion . Der Dot Plot im FS/SS Diagramm zeigt drei zu unterscheidende Populationen.

In **Abb. 2b** sind FACS-Analysen reifer dendritischer Zellen nach einer MVA-Her-2/neu Infektion bei einer MOI von 10 dargestellt. Die Analysen wurden zu den Zeitpunkten 12h, 24h, 36h, 48h und 60h nach der Infektion durchgeführt, wobei mit Propidiumjodid und Annexin gefärbt wurde. Die Dot Plots zeigen zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils ein *FS/SS* Diagramm, indem das Gate nach dem die weitere Analyse durchgeführt wurde, eingezeichnet ist. Hier entspricht das eingezeichnete "Gate" der Population 1 der Abb. 2a. Im weiteren Verlauf wird es als *OptiGate* bezeichnet. Weiterhin sind im zeitlichen Verlauf je ein Annexin/Propidiumjodid Dot Plot Diagramm und ein Annexin bzw. Propidiumjodid Histogramm einzeln abgebildet. Es zeigt sich, daß die Zellen im *OptiGate* sowohl Propidiumjodid als auch Annexin negativ sind und es auch im zeitlichen Verlauf bleiben. Da bei einer MOI von 10, über 95% der reifen dendritischen Zellen infiziert sind (siehe Abb 1b), muß man davon ausgehen, daß sich im *Optigate* auch infizierte Zellen befinden. Entscheidend ist aber, daß sich im *Optigate* nur vitale Zellen befinden, die eine objektive Untersuchung im FACScan zulassen. Jedoch nimmt die Zellzahl im *OptiGate* in Abhängigkeit der Zeit ab und liegt nach 36h nur bei etwa 50% aller gemessenen DC. In **Abb. 2c** sind FACS-Analysen reifer dendritischer Zellen nach einer MVA-Her-2/neu Infektion bei einer MOI von 10 dargestellt. Die Analysen wurden zu den Zeitpunkten 12h, 24h, 36h, 48h und 60h nach der Infektion durchgeführt, wobei mit Propidiumjodid und Annexin gefärbt wurde. Die Dot Plots zeigen zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils ein *FS/SS* Diagramm indem das Gate, nach dem die weitere Analyse durchgeführt wurde eingezeichnet ist. Hier entspricht das eingezeichnete "Gate" der Population 3 der Abb. 2a. Im weiteren Verlauf wird es als *ApoGate* bezeichnet. Weiterhin sind im zeitlichen Verlauf je ein Annexin/Propidiumjodid Dot Plot Diagramm und ein Annexin bzw. Propidiumjodid Histogramm einzeln abgebildet. Dabei erkennt man, daß die Zellen im *ApoGate* sowohl Propidiumjodid als auch Annexin positiv sind und im weiteren zeitlichen Verlauf stark positiv bleiben. In diesem "Gate" befinden sich praktisch nur apoptotische und nekrotische DC, die einer Beurteilung im FACScan nur sehr bedingt zur Verfügung stehen. Die Zellzahl im *ApoGate* nimmt laufend zu, die Zellzahl im *OptiGate* nimmt entsprechend ab. Abschließend kann man sagen, daß MVA-Her-2/neu infizierte reife dendritische Zellen nach einer Infektion in den programmierten Zelltod, also in die Apoptose gehen. Der Großteil der infizierten reifen DC bleibt jedoch bis 36h vital. Unreife dendritische Zellen sind wesentlich empfänglicher für eine MVA-Her-2/neu Infektion als reife DC wie in Abb. 1.a und b bereits erörtert wurde.



Annexin

Abb. 2.b: Reife DC MVA-Her-2/neu infiziert, MOI = 10. Annexin-, PI-Färbung. Im blauen Opti-Gate befinden sich nur vitale Zellen.

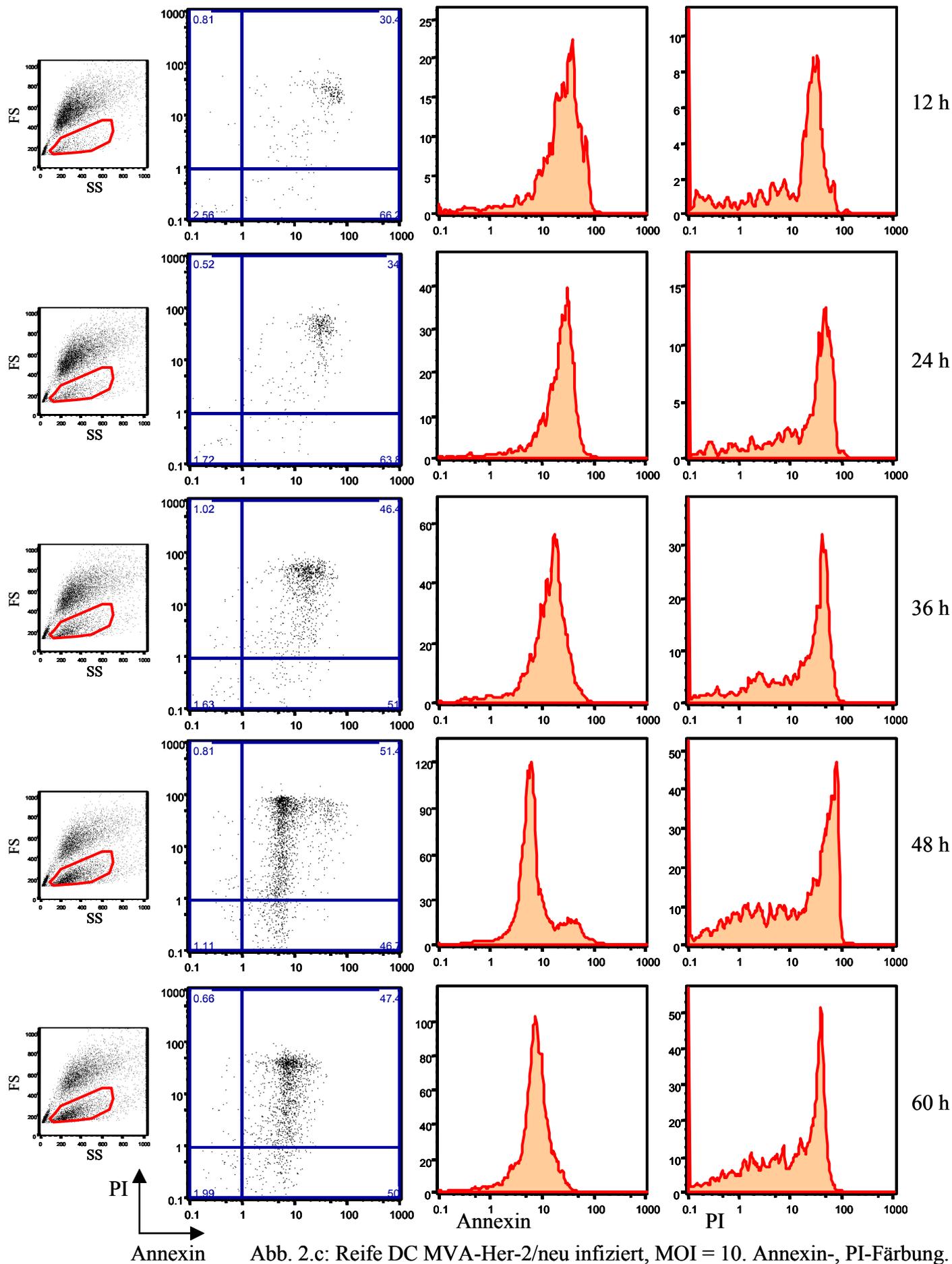
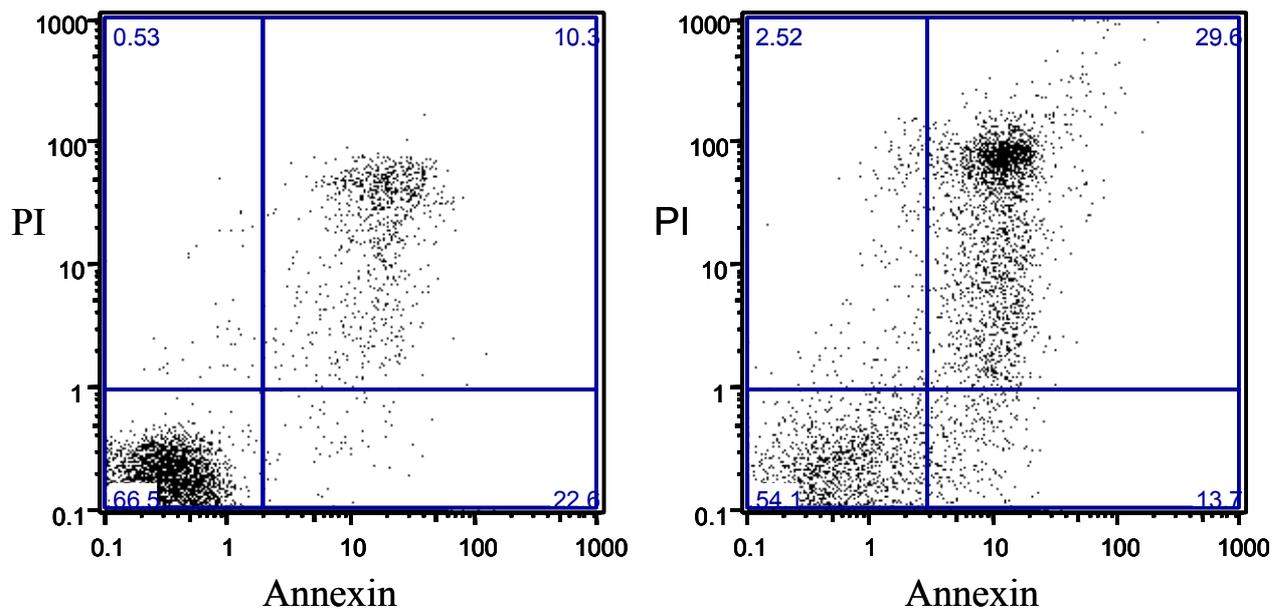


Abb. 2.c: Reife DC MVA-Her-2/neu infiziert, MOI = 10. Annexin-, PI-Färbung. Im roten Apo-Gate befinden sich apoptotische Zellen.



Reife DC, MOI = 10

Unreife DC, MOI = 5

Abb. 2.d: MVA-Her-2/neu Infektion reifer DC (MOI = 10) und unreifer DC (MOI = 5). Annexin Fitc und PI- Färbung 36h nach der Infektion. Der Vitalitätsstatus zeigt, daß unreife DC empfindlicher gegenüber dieser Infektion sind als reife DC, bei vergleichbarer Infektionshöhe.

### **3.3. Die Expression kostimulatorischer Moleküle ist bei vitalen MVA-Her-2/neu infizierten reifen DC unbeeinträchtigt**

Kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD83 oder CD86 sind für die Funktionalität reifer DC von entscheidender Bedeutung. Es stellt sich die Frage, ob eine MVA-Her-2/neu Infektion zu einer Beeinflussung dieser Oberflächenmoleküle, im Sinne einer Verminderung des Expressionsniveaus führt. Um auch sicher zu gehen, daß nur infizierte Zellen im FACS analysiert werden, war es notwendig eine Doppelfärbung mit Her-2/neu durchzuführen. **Abb. 3.a** zeigt eine solche Doppelfärbung mit Her-2/neu und den Oberflächenmolekülen CD80, CD83 und CD86, nach einer MVA-Her-2/neu Infektion reifer, dendritischer Zellen, bei drei verschiedenen MOI: 5, 10 und 100. Die *Density Plots* zeigen nicht nur die Höhe der Expression der Oberflächenmoleküle, sondern spiegeln auch durch die Dichte der Ringe, die Anzahl der Zellen optimal wider. Ähnlich wie bei der Titration von Abb. 1.b erkennt man die kontinuierliche Steigerung der Her-2/neu positiven Zellen die von 50% über 80% bis 99% reicht. Die Analyse wurde 36h nach der MVA-Her-2/neu Infektion durchgeführt. Es ist nötig die Expression der einzelnen Moleküle als Histogramm im zeitlichen Verlauf zu beurteilen, um einen genauen Überblick über das Verhalten der Oberflächenmoleküle von reifen dendritischen Zellen nach einer MVA-Her-2/neu Infektion zu erhalten. **Abb. 3.b** zeigt FACS-Analysen der Oberflächenmoleküle CD80, CD83, CD86 und HLA-DR von reifen dendritischen Zellen nach einer MVA-Her-2/neu Infektion bei einer MOI von 10.

Die Auswertung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 60h, wobei in Intervallen von 12h gemessen wurde. Die Expressionshöhen sind jeweils im Overlay dargestellt, wobei die Zellen des *OptiGate* ausgefüllte Histogramme sind, die des *ApoGate* hingegen, sind als unausgefüllte Histogramme dargestellt. Wendet man sich zuerst den ausgefüllten Histogrammen, also dem *OptiGate* zu, erkennt man, daß sich die Expressionshöhen der Moleküle CD80, CD83, CD86 und HLA-DR nicht ändern. Die Zellen des *ApoGate* hingegen zeigen starke Veränderungen bei den hoch exprimierten Molekülen CD80 und CD86, geringe Veränderungen bei den weniger hoch exprimierten Molekülen wie CD83 und HLA-DR. Es sei hier noch einmal darauf hingewiesen, daß eine objektive, wissenschaftliche Beurteilung von apoptotischen Zellen in einem FACScan nicht möglich ist, weil Phänomene wie Autofluoreszenz und unspezifische Absorption überhand nehmen. Das *ApoGate* ist hier nur dargestellt, um die Daten des *OptiGate* zu veranschaulichen und eventuelle Fehlerquellen aufzuzeigen.

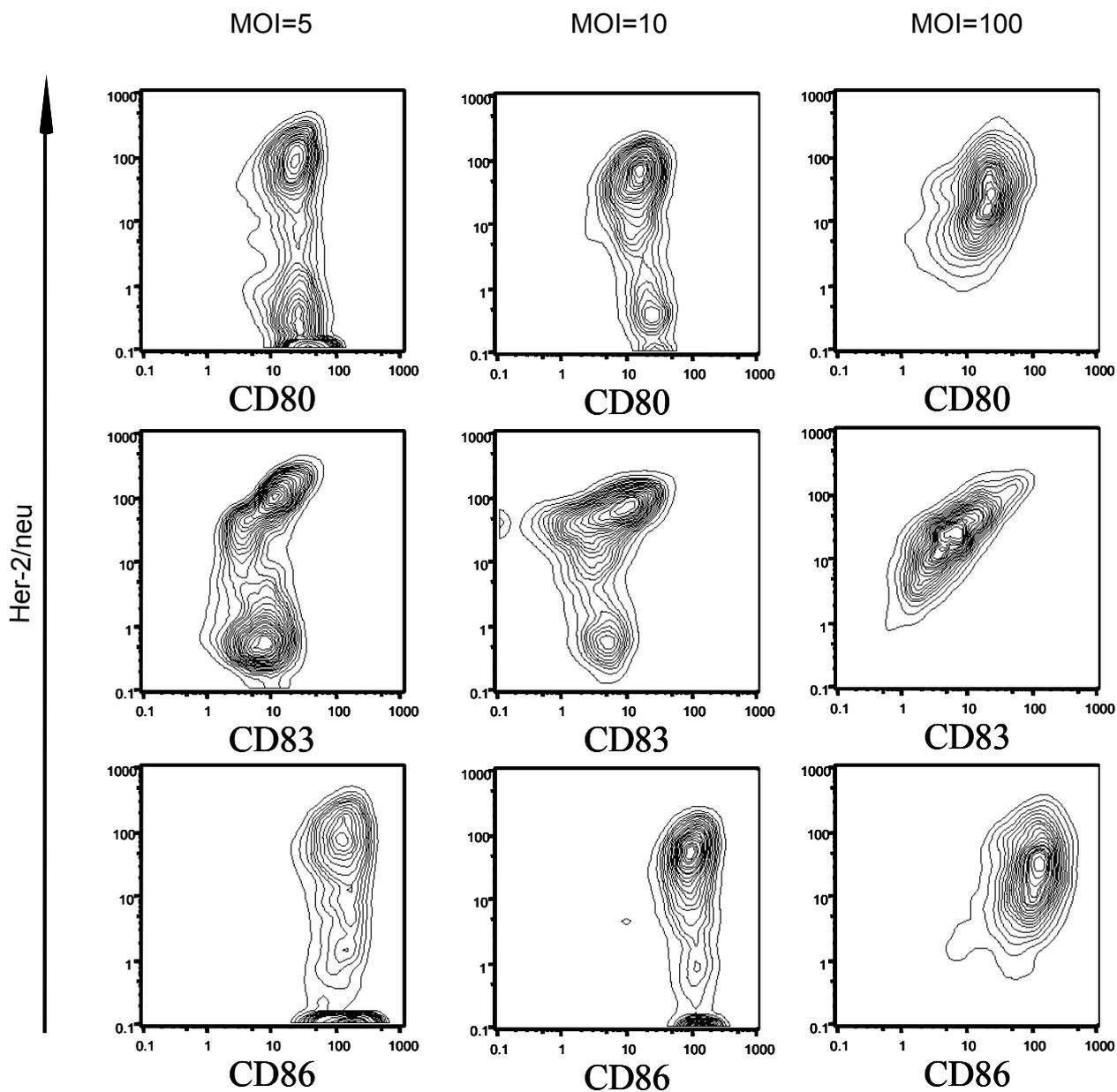


Abb. 3. a: MVA-Her-2/neu Infektion reifer DC. Facsanalysen von CD80, CD83 und CD86 in Doppelfärbung mit Her-2/neu, 36h nach der Infektion bei verschiedenen MOI. In der Auswertung im *Opti-Gate* zeigt sich die Homogenität der Population sowie mit steigender MOI die kontinuierliche Zunahme Her-2/neu positiver Zellen.

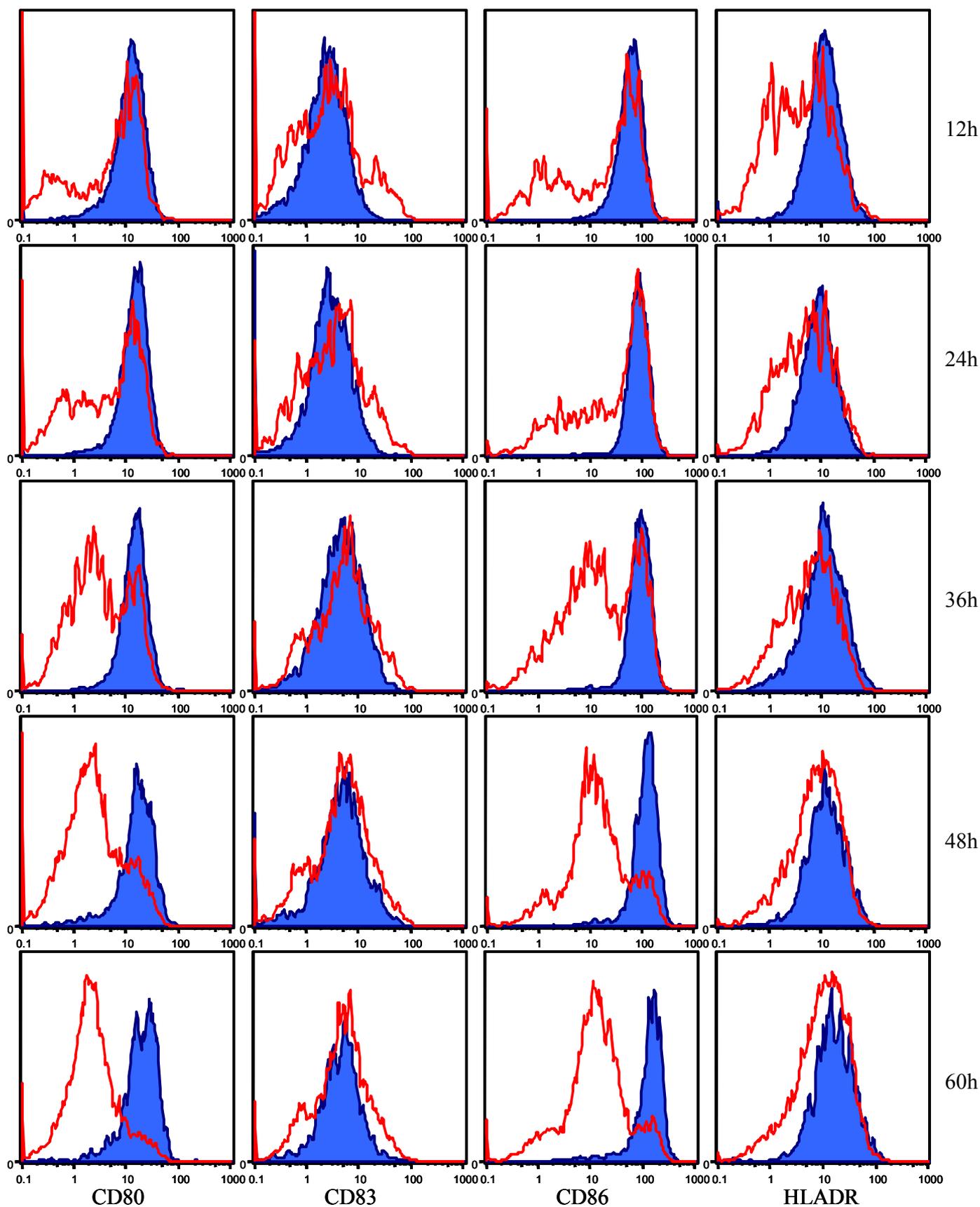


Abb. 3.b: MVA-Her-2/neu Infektion reifer DC bei einer MOI = 10. Facsanalysen von CD80, CD83, CD86 und HLADR über 60 h in Intervallen von 12h. Die Zellen des *OptiGate* sind als aufgefüllte, blaue Histogramme dargestellt und bleiben in ihrer Expressionshöhe konstant. Die Zellen des *ApoGate* sind als rote Histogramme gezeigt und erwecken den Eindruck einer “Downregulation“.

Es galt entsprechende Untersuchungen auch bei verschiedenen MOI durchzuführen, da auch die jeweils gewählte MOI einen starken Einfluß auf das weitere Schicksal der infizierten Zelle hat (z.B. Mehrfach-Infektionen). **Abb. 3.c** zeigt FACS-Analysen der Oberflächenmoleküle CD71, CD80, CD83 und CD86 nach einer MVA-Her-2/neu Infektion reifer dendritischer Zellen bei einer MOI von 5. Die Auswertung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 60h, wobei in Intervallen von 12h gemessen wurde. Die Expressionshöhen sind jeweils im Overlay dargestellt, wobei die Zellen des *OptiGate* ausgefüllte Felder sind, die des *ApoGate* hingegen sind als durchgezogene Linie dargestellt. Auch hier zeigt sich, daß die Zellen des *OptiGate* keine Änderung ihrer Expressionshöhen der einzelnen Oberflächenmoleküle erfahren. Es wurde auch speziell CD71, der Transferrin-Rezeptor mitgemessen um auch einen Eindruck vom Verhalten nicht-kostimulatorischer Moleküle zu erhalten. Bei den Zellen des *ApoGate* zeigt sich wieder ein Bild entsprechend Abb. 3.b. Stark exprimierte Moleküle wie CD80 und CD86 verlieren scheinbar an Expressionsniveau, geringer exprimierte Moleküle wie CD71 und CD83 bleiben in ihrem Niveau gleich. Durch die Doppelfärbungen, die auch Grundlage dieser Auswertung sind, konnte sichergestellt werden, daß Her-2/neu positive Zellen analysiert wurden. Deren Anteil sinkt im *OptiGate* von ursprünglich 50% nach 60h auf 30% aufgrund von Apoptose, ab.

Schließlich wurden reife dendritische Zellen bei einer MOI von 100 mit MVA-Her-2/neu infiziert, um erstens eventuelle, geringe Effekte durch die starke Infektion besser herauszuarbeiten, und zweitens eine homogene Her-2/neu positive Population zu erhalten. Die **Abb. 3.d** zeigt FACS-Analysen der Oberflächenmoleküle CD71, CD80, CD83 und CD86 nach einer MVA-Her-2/neu Infektion reifer dendritischer Zellen bei einer MOI von 100. Die Auswertung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 60h, wobei in Intervallen von 12h gemessen wurde. Die Expressionshöhen sind jeweils im Overlay dargestellt, wobei die Zellen des *OptiGate* ausgefüllte Histogramme sind, die des *ApoGate* hingegen sind als unausgefüllte Histogramme dargestellt. Das Expressionsniveau der verschiedenen Oberflächenmoleküle bleibt im *OptiGate* auch bei dieser hohen MOI konstant. Im *ApoGate* hingegen zeigen nun auch niedriger exprimierte Moleküle wie CD71 und CD83 Veränderungen und Abweichungen im Vergleich zum *OptiGate*.

Als Zusammenfassung kann man sagen, daß es erstens zu **keiner** Änderung der Dichte bestimmter Oberflächenmoleküle MVA-Her-2/neu infizierter reifer DC kommt. Dies trifft für einen Zeitraum von 60h und auch für verschiedene MOI zu. Zweitens verleitet das "Gating" apoptotischer Zellen und deren weitere Auswertung zur Hypothese, daß doch Änderungen bezüglich z.B. CD80 oder CD86 auftreten. Diese Hypothese kann man aber aufgrund der Tatsache, daß apoptotische Zellen im FACS schlichtweg nicht objektiv beurteilbar sind, nicht aufrechterhalten.

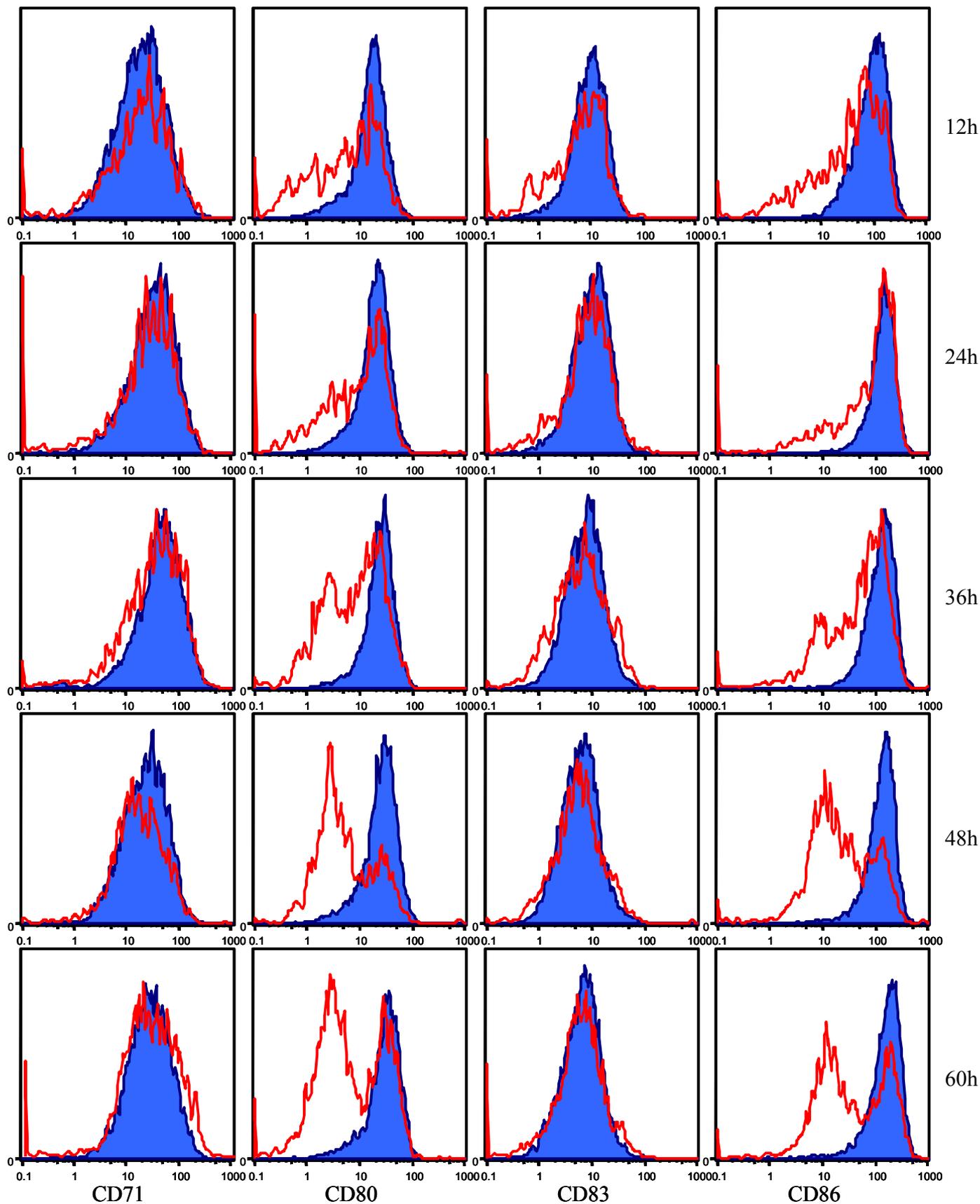


Abb. 3.c: MVA-Her-2/neu Infektion reifer DC bei einer MOI = 5. Facsanalysen von CD71, CD80, CD83 und CD86 über 60 h in Intervallen von 12h. Die Zellen des *OptiGate* sind als ausgefüllte, blaue Histogramme dargestellt und bleiben in ihrer Expressionshöhe konstant. Die Zellen des *ApoGate* sind als rote Histogramme gezeigt und erwecken den Eindruck einer “Downregulation“.

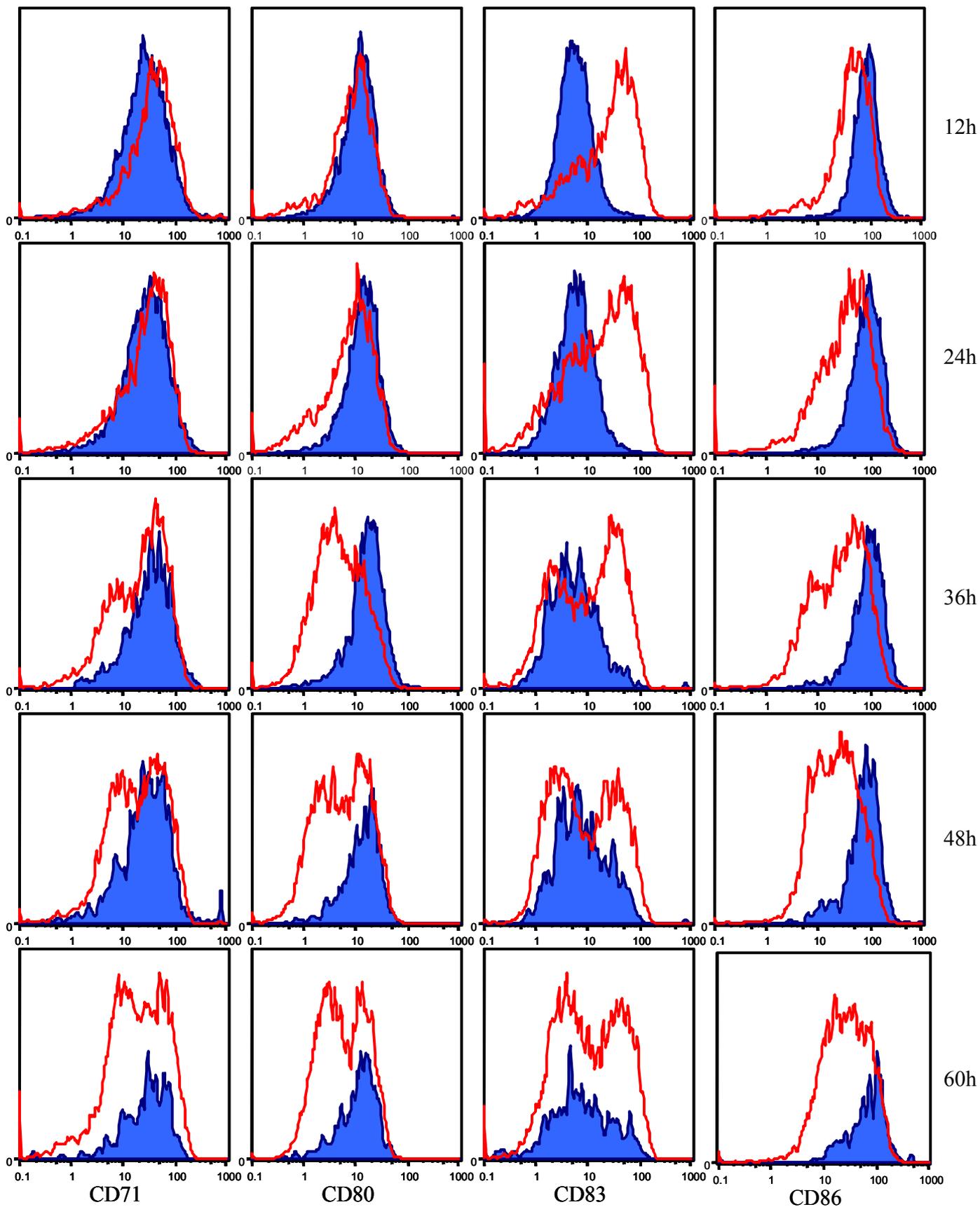
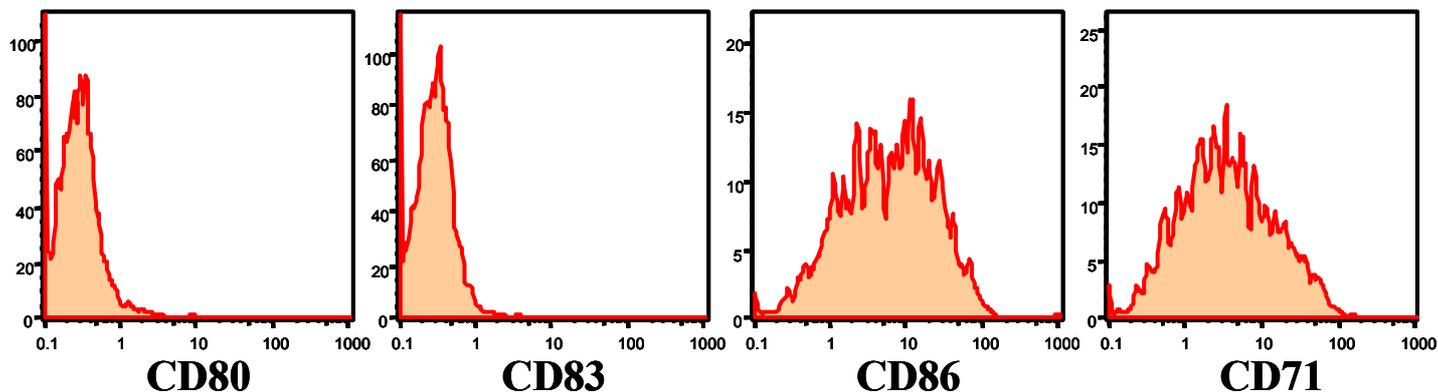


Abb. 3.d: MVA-Her-2/neu Infektion reifer DC bei einer MOI = 100. Facsanalysen von CD71, CD80, CD83 und CD86 über 60 h in Intervallen von 12h. Die Zellen des *OptiGate* sind als ausgefüllte, blaue Histogramme dargestellt und bleiben in ihrer Expressionshöhe konstant. Die Zellen des *ApoGate* sind als rote Histogramme gezeigt und erwecken den Eindruck einer “Downregulation“.

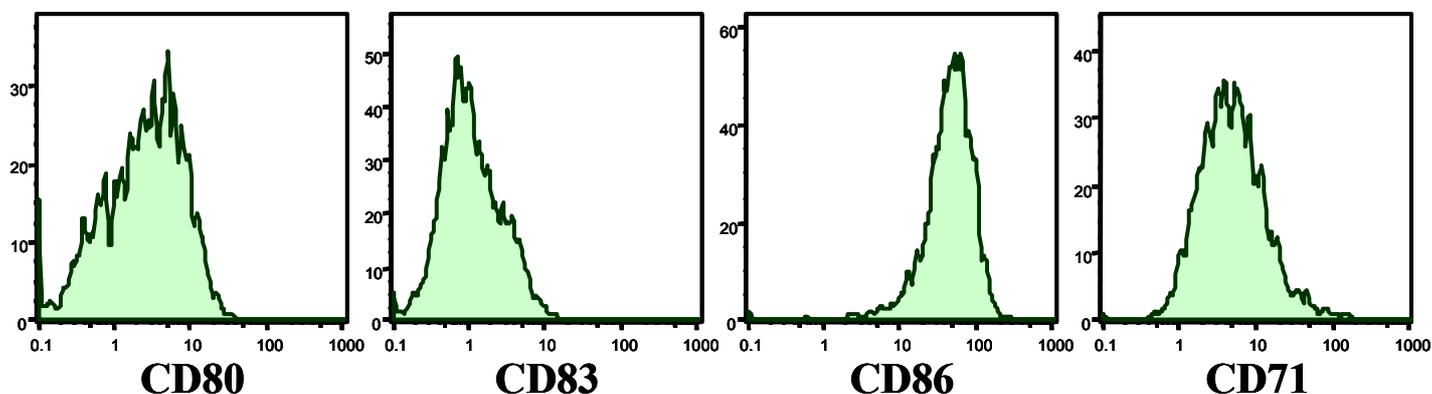
### **3.4. Reifungszytokine induzieren in unreifen dendritischen MVA-Her-2/neu infizierten DC eine Maturierung**

Nach der Erkenntnis, daß reife dendritische Zellen nach einer MVA-Her-2/neu Infektion ihre kostimulatorischen Moleküle nicht herunterregulieren, stellt sich die Frage, ob unreife dendritische Zellen nach einer Infektion noch zu einer Ausreifung fähig sind. Da unreife DC gegenüber einer MVA-Her-2/neu Infektion empfindlicher sind als reife DC, wurde eine MOI von 5 gewählt, welche trotzdem eine Infektionsrate, gemessen an der Her-2/neu Expression, von 90% ergibt (siehe Abb. 1.a). Nach zweistündiger MVA-Her-2/neu Infektion, wurden die Zellen mehrfach gewaschen und anschließend die Reifungszytokine addiert. In **Abb. 4.** sind FACS-Analysen unreifer dendritischer Zellen in der ersten Reihe, 24h nach Addition der Reifungszytokine in der mittleren Reihe und unreife DC infiziert mit MVA-Her-2/neu bei einer MOI von 5 in der unteren Reihe gezeigt. Dargestellt sind Histogramme des Expressionsniveaus der Oberflächenmoleküle CD71, CD80, CD83 und CD86. Die unreifen DC spiegeln das basale Level der Expression der Oberflächenmoleküle wider. Verglichen mit den infizierten DC zeigt sich, daß alle gemessenen kostimulatorischen Moleküle, trotz synchroner MVA-Her-2/neu Infektion, durch die Reifungszytokine hochreguliert werden. Auch CD71 wird in seiner Expression verstärkt, was in diesem Zusammenhang im Rahmen der allgemeinen Aktivierung der Zelle zu sehen ist. Diese Ergebnisse sind sehr erstaunlich, da eine MVA-Infektion zu einem "Shut-down" der zelleigenen Proteinbiosynthese führt. Die Hochregulation dieser Oberflächenmoleküle muß deshalb vor diesem "Shut-Down" stattfinden. Es ist offensichtlich, daß dadurch einer Maturierung enge Grenzen gesetzt sind. Dementsprechend ist im Vergleich zu nicht infizierten reifen DC ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle geringer. Nur CD71 ist in beiden verschiedenen Population praktisch auf dem gleichen Niveau. Zusammenfassend ist es also möglich in unreifen DC, nach einer MVA-Her-2/neu Infektion, mittels Ausreifungszytokinen eine Maturierung zu initiieren, jedoch entspricht das damit zu erreichende Niveau, nicht dem gleichbehandelter nicht-infizierter DC.

Unreife DC



Unreife DC, 24h nach Zugabe der Reifungszytokine



Unreife DC, 24h nach einer MVA-Her-2/neu Infektion (MOI = 5) und Zugabe von Reifungszytokinen

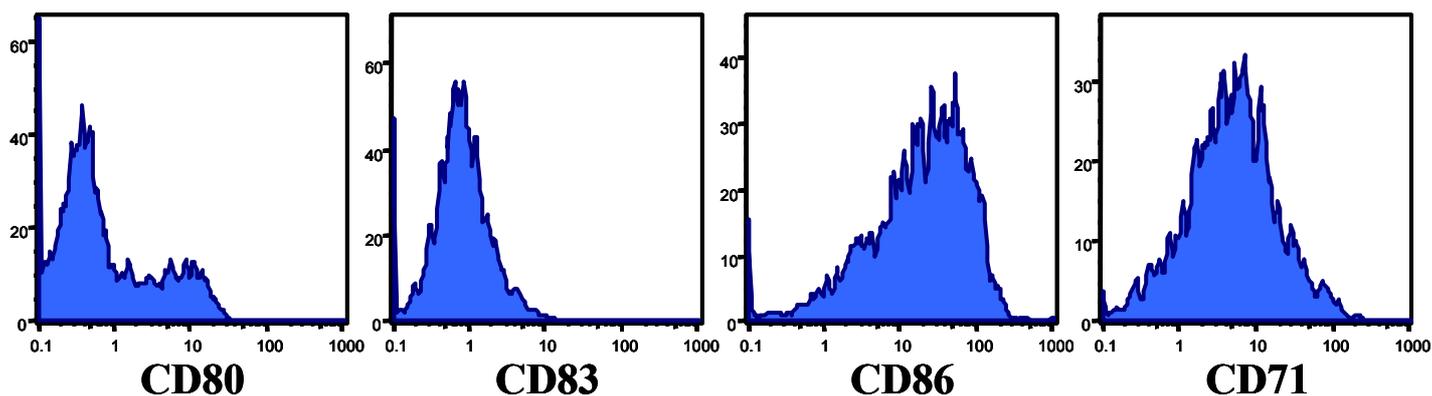


Abb. 4: Vergleich des Expressionsniveaus verschiedener Oberflächenmoleküle, zwischen unreifen DC (rote Histogramme), unreifen DC 24h nach Zugabe von Reifungszytokinen (grüne Histogramme) und unreifen DC 24h nach Zugabe von Reifungszytokinen bei synchroner MVA-Her-2/neu Infektion, bei einer MOI = 5 (blaue Histogramme). Trotz Infektion ist eine Ausreifung induzierbar. Der durch die Infektion verursachte "Shut-Down" der zelleigenen Proteinbiosynthese erlaubt eine Ausreifung nur in gewissen Grenzen.

### **3.5. Ausreifungsinduktion von unreifen dendritischen Zellen mit Hilfe von MVA-Her-2/neu infizierten Zellen**

Physiologisch gesehen, dienen dendritische Zellen sicher nicht als primäre Zielzelle für eine Vaccinia Virus Infektion. *In vivo* werden z.B. Fibroblasten infiziert, welche letztendlich sterben und anschließend von DC aufgenommen werden, die dann wiederum eine Immunantwort initiieren. Es bot sich also an, dieses Modell *in vitro* zu imitieren. Der Erfolg sollte zunächst anhand von FACS-Analysen überprüft werden, mit der Frage ob eine derartige "Verfütterung" von infizierten Zellen an unreife DC eventuell zur Ausreifung letzterer führt, als Indiz einer erfolgreichen Aufnahme der Antigene. Aufgrund der Verfügbarkeit und den gewonnenen Erfahrungen mit DC, wurden anstatt Fibroblasten unreife DC mit MVA-Her-2/neu infiziert und dann an frische unreife DC verfüttert. In **Abb. 5** sind FACS-Analysen der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86 von unreifen DC jeweils 24h bzw. 48h nach dem Pulsen dargestellt. Zum Zeitpunkt 0h wurden die unreifen DC mit drei, verschieden vorbehandelten DC gepulst. Erstens unbehandelte DC (schwarze gestrichelte Linie), zweitens UV bestrahlte DC (schwarze durchgezogene Linie) und drittens MVA-Her-2/neu infizierte DC (ausgefüllte Histogramme). Die UV-Bestrahlung wurde 60 min durchgeführt, die MVA-Her-2/neu Infektion wurde bei einer MOI von 10 durchgeführt und die Zellen anschließend 12h inkubiert. Alle drei Populationen wurden vor ihrer Verfütterung dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut. Nach 24h Stunden liegen die 3 Kurven sowohl bei CD80,CD83 als auch bei CD86 praktisch übereinander. Nach 48h erkennt man jedoch deutliche Ausreifungstendenzen bei den MVA-Her-2/neu infizierten verfütterten Zellen. Bei CD80 und CD83 bilden sich Subpopulation mit einer verstärkten Expression genannter Moleküle aus. Sie sind mit Pfeilen markiert. Bei CD86 entsteht sogar ein kompletter Shift der ganzen Population, siehe horizontaler Pfeil. Dieser Shift ist aufgrund der logarithmischen Skala weitaus stärker als er augenscheinlich wirkt. Eine Ausreifungsinitiierung durch eine Verfütterung MVA-Her-2/neu infizierter Zellen in unreifen DC ist also mit signifikantem Unterschied zu den Kontrollen möglich.

Eine entsprechende Versuchsreihe bei der nicht die unterschiedlich behandelten Zellen, sondern nur deren Überstände verfüttert wurden, führte zu keinerlei Ausreifung der DC. Ebenso wurden verschiedene Versuche durchgeführt, bei denen die zu verfütternden Zellen nicht vorher schockgefroren, sondern frisch zu den unreifen DC addiert wurden. Hier ergaben sich zwar ebenfalls Ausreifungstendenzen, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen.

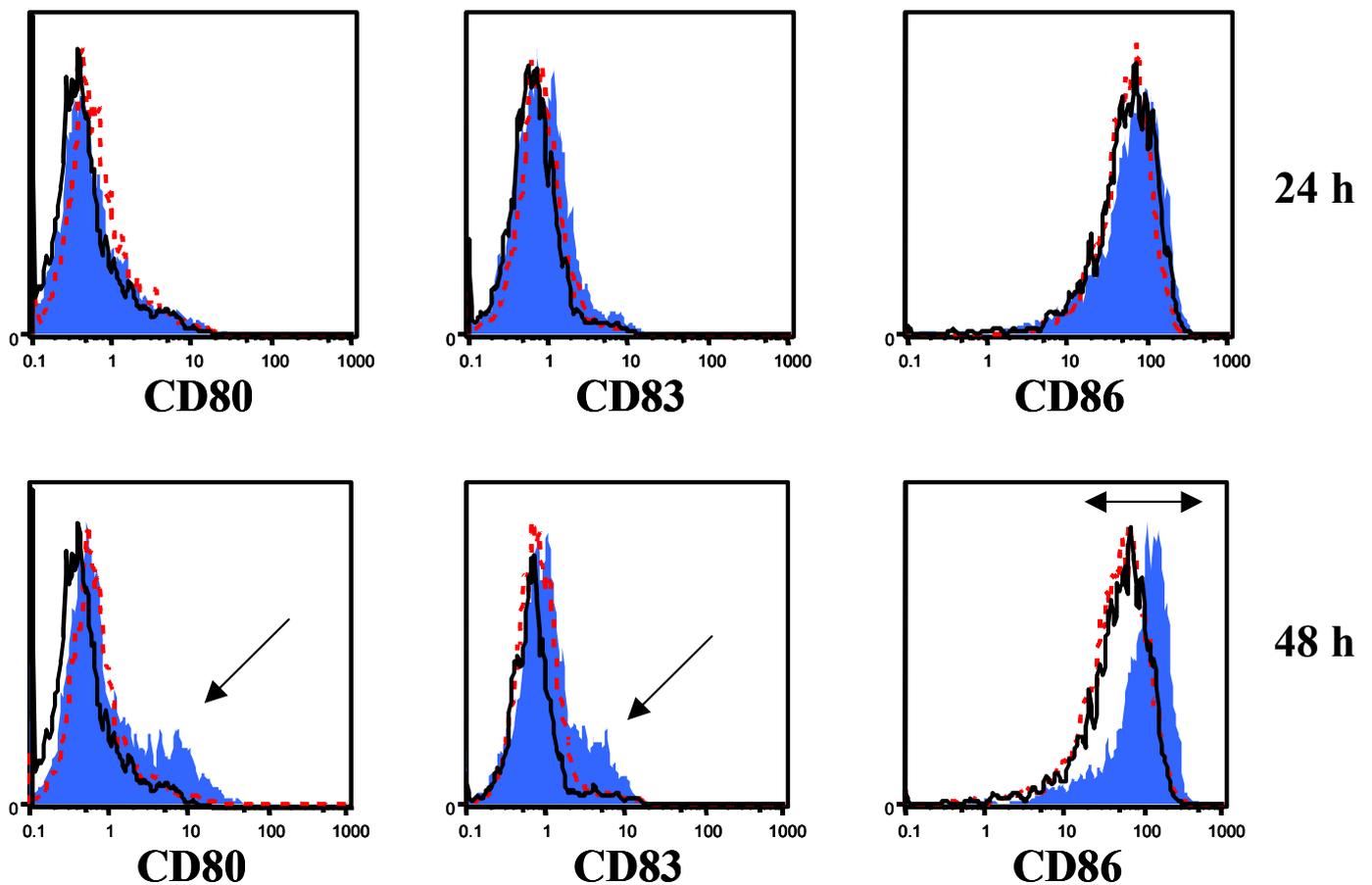


Abb. 5: Facsanalysen der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86 bei unreifen DC nach 24h und 48h. Zum Zeitpunkt 0h wurden die unreifen DC mit drei verschieden vorbehandelten Zellen gefüttert. Die ausgefüllten, blauen Histogramme entsprechen unreifen DC, die mit MVA-Her-2/neu infizierten unreifen DC gepulst wurden. Die gestrichelte rote Linie zeigt unreife DC, die mit UV-bestrahlten unreifen DC gepulst wurden. Die durchgezogene, schwarze Linie zeigt unreife DC, die mit unbehandelten unreifen DC gepulst wurden. Die Verfütterung infizierter DC führt zu einer Induktion der Ausreifung (siehe Pfeile).

### **3.6. Generierung von Her-2/neu spezifischen T-Zellen mit Hilfe des MVA-Her-2/neu Vektors und dendritischen Zellen**

Nach den Erkenntnissen der oben beschriebenen FACS-Analysen bot es sich an, T-Zellen mit Hilfe von direkt MVA-Her-2/neu infizierten reifen dendritischen Zellen zu generieren. Die dendritischen Zellen wurden bei einer MOI von 10 infiziert und nach 24h Inkubation und mehrfachen Waschgängen zu den T-Zellen gegeben. Nach dem Priming und zwei bis drei weiteren Stimulationen, wurden die T-Zellen im ELISpot-Assay nach ihrer Spezifität geprüft. Diese Versuche führten jedoch nicht zum Erfolg. Auch bei entsprechenden Versuchen mit unreifen DC konnten keine Her-2/neu spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die Tatsache, daß der ELISpot-Assay nur unter streng etablierten Bedingungen zu einem objektiven und reproduzierbarem Ergebnis führt. Das Problem des Read-out des ELISpot-Assay konnte durch Einführung des Chromium-Release-Assay behoben werden. Zugleich wurde zur Generierung von T-Zellen ein Versuchsaufbau herangezogen, der den Abläufen *in vivo* näher kommt. Wie unter 3.5 beschrieben, werden die APC *in vivo* zur Initiierung einer Immunantwort nicht direkt infiziert, sondern nehmen die Antigene durch Phagozytose, zugrunde gegangener, anderer infizierter Zellen auf. Dementsprechend wurden unreife DC mit Zelllysat MVA-Her-2/neu infizierter unreifer DC gepulst. Erst nach 24h Inkubation wurden die Reifungszytokine addiert, um die starke Phagozytosefähigkeit unreifer DC voll auszunutzen. Die in 3.5 beschriebene, allein durch das Pulsen initiierte Ausreifung, wurde deshalb durch Reifungszytokine unterstützt, um schließlich homogen ausgereifte DC zu erhalten, welche naive T-Zellen optimal primen können. In der Praxis erwies sich dieses Modell nun als äußerst effizient. Es wurde ein gesunder Spender (als EDE bezeichnet) mit dem HLA - Profil A2, A24, B14, B35, C4 und C8 ausgewählt, in der Absicht HLA-A2 restringierte, Her-2/neu spezifische T-Zellen zu erhalten. In einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden in 60 wells je 20.000 PBMC und 4000 gepulste autologe DC zum Priming gegeben. Zytokine und Medium wurden wie im Material und Methoden Teil beschrieben addiert. An Tag 7 wurden die T-Zellen unspezifisch durch Zugabe T-Zell Medium mit 5% T-Stim sowie IL-2 und IL-7 restimuliert. Dies führte zu einer starken Proliferation, so daß die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet wurden. An Tag 14 wurde wieder spezifisch restimuliert, indem je 10.000 gepulste autologe DC pro well addiert wurden. Nach weiteren 6 Tagen wurde ein Screening mittels des CRAssay durchgeführt. Die Targets waren SKOV 3 A2 (HLA A2, A3, A24, B18, B35 und Cw5) sowie SKOV 3 Zellen (entsprechend ohne HLA A2). Von 60 wells wurden 12 wells entsprechend den höchsten Lysen ausgewählt und weitergeführt. Die Zellen der 12 wells wurden jeweils separat auf OKT3 beschichteten 24-Loch Flachbodenplatten gegeben und expandiert. Nach 4 Tagen und entsprechender Proliferation konnten die 12 ausgewählten wells nun mit entsprechender Titration und Doppelwerten im CRA getestet werden.

In **Abb. 6.a** und **Abb. 6.b** ist das Ergebnis dieses Tests dargestellt. Es sind jeweils die spezifischen Lysen von T-Zellen aus 6 verschiedenen wells auf der Ordinate und die Effektor zu Target Ratio auf der Abszisse wiedergegeben. Zu beachten ist, daß die Lyseraten in verschiedenen Maßstäben aufgetragen sind. Es fällt auf, daß neben den SKOV3 A2 Zellen auch SKOV3 3- Zellen ebenfalls titrierbar lysiert werden. Ursprünglich sollte diese Zelllinie als negativ Kontrolle für A2 restringierte Her-2/neu spezifische T-Zellen dienen. Das oben im Text erwähnte HLA-Muster des Spenders EDE und das der Tumorzelllinie SKOV3 zeigt aber, daß sie ein Allel gemeinsam besitzen: HLA-B35, mit der Tumorzelllinie SKOV3 A2 demnach also zwei Allele HLA-A2 und HLA-B35. Da es sich nicht um Klone handelt, liegt die Annahme nahe, daß sich sowohl A2 als auch B35 restringierte Her-2/neu spezifische T-Zellen in den Löchern befinden. Auch das Muster der Lysen der beiden Targets passt in dieses Bild. SKOV3 A2 hat zwei Übereinstimmungen im HLA-Muster und wird auch etwa doppelt so hoch lysiert wie SKOV3 mit einer Übereinstimmung.

Die Mikrokultur E8 wurde wegen marginaler Lyse verworfen, C10, F3, F7 und G11 wurden weitergeführt indem sie weiterhin auf OKT-3 beschichteten Platten expandiert wurden. Außerdem wurde ein "Bulk" geschaffen, in welchem Zellen aller Mikrokulturen, außer E8, vereinigt wurden. Die restlichen Zellen wurden separat eingefroren. Nun galt es eine Her-2/neu exprimierende Tumorzelllinie als Target einzusetzen, die keine HLA-Übereinstimmung mit dem Spender aufweist. Eine mögliche Tumorzelllinie hierfür ist SKBR3 (HLA A11 homozygot, Bw22 +/-, B40<sup>+</sup> und B18<sup>+</sup>). Sie wurde im folgenden CRA wie **Abb. 6.c** zeigt mit eingesetzt. In **Abb. 6.c** sind die spezifischen Lysen verschiedener Her-2/neu exprimierender Tumorzelllinien durch Her-2/neu spezifische T-Zellen der Mikrokulturen C10, F3, F7 und G11 dargestellt. Auf der Ordinate sind die Prozente der spezifischen Lyse aufgetragen, auf der Abszisse ist die Effektor zu Target Ratio angegeben. Wie erwartet wird SKBR3 von den verschiedenen Mikrokulturen nicht lysiert. Das Verteilungsmuster der Lysen von SKOV3 und SKOV3 A2 bleibt gleich, obgleich sie in ihrer Höhe deutlich im Vergleich zum letzten Test abgenommen haben. So ist z.B. die Lyse von SKOV3 A2 von well F7 von 59% auf 37% gesunken.

Nach diesem Test wurde noch die Mikrokultur F7 sowie die "Bulkkultur" weitergeführt. Um auszuschließen, daß die generierten T-Zellen autoreaktiv oder sogar doch unspezifisch lysieren, wurden von dem Spender EDE autologe EBV transformierte B-Zellen generiert. **Abb. 6.d** zeigt nun die Lysen je einer Her-2/neu exprimierender Zelllinie mit zwei gemeinsamen HLA-Typen (SKOV3 A2) bzw. keinen HLA-match (SKBR3) mit den T-Zellen der Mikrokultur F7 und der "Bulkkultur", sowie die Lyse von autologen EBV-B Zellen. Auf der Ordinate sind die Prozente der Lysen dargestellt, auf der Abszisse ist die Effektor zu Target Ratio angegeben. Weder die autologe EBV-B Zelllinie noch SKBR3 werden lysiert. SKOV3 A2 hingegen wird zu über 40% titrierbar lysiert. Um endgültig den Beweis zu bringen, daß sowohl A2 also auch B35 restringierte T-Zellen generiert wurden, wurden Klonierungen durchgeführt, um somit A2 restringierte von B35 restringierten T-Zellen zu separieren. Der Versuch einer Klonierung ist bis jetzt gescheitert, wird aber derzeit wiederholt.

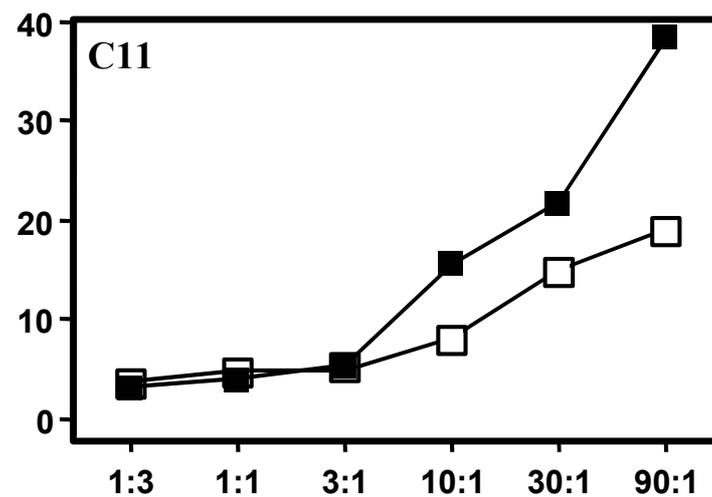
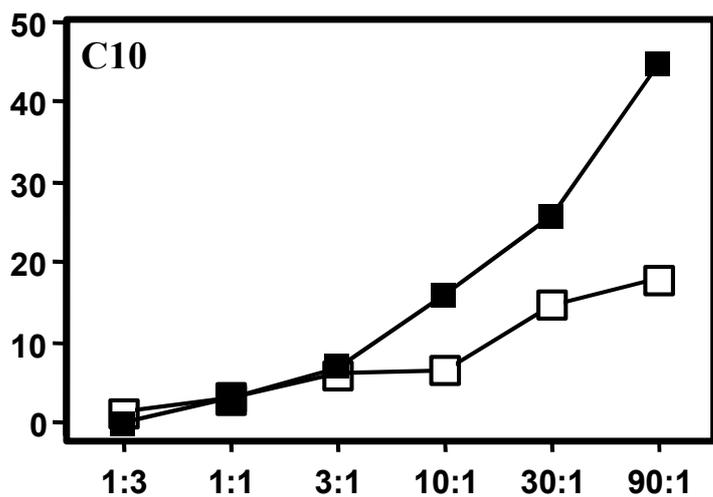
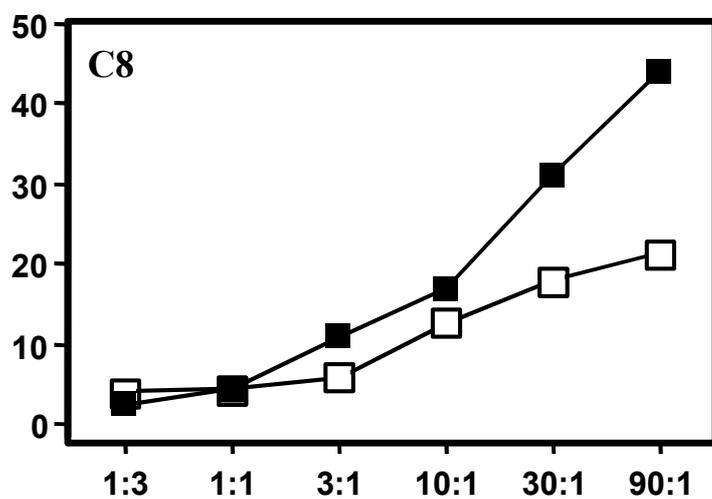
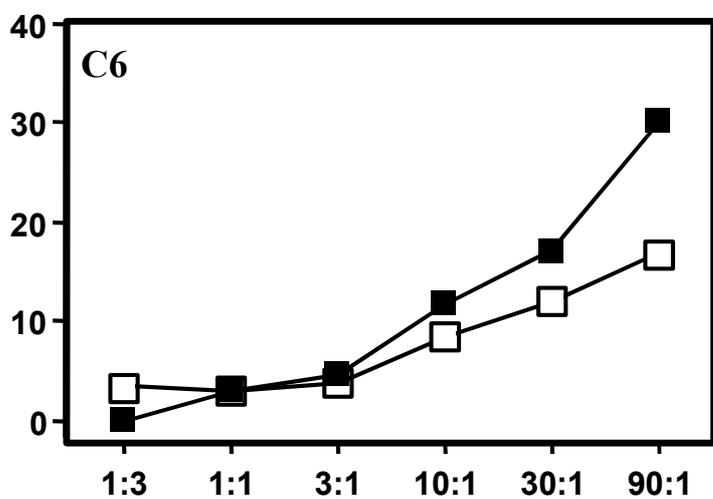
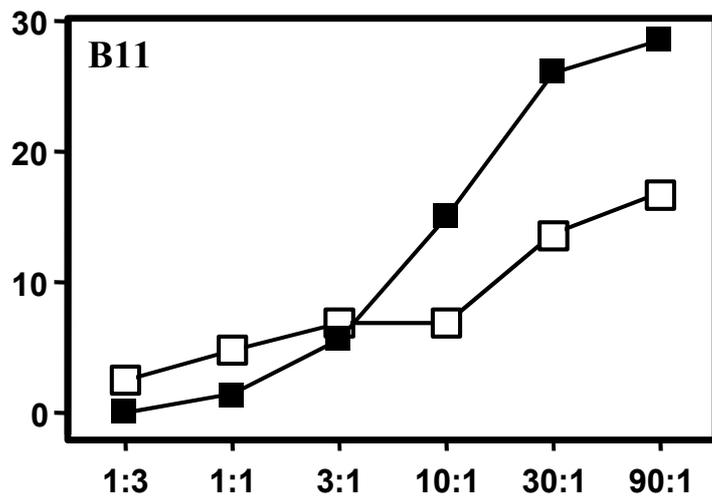
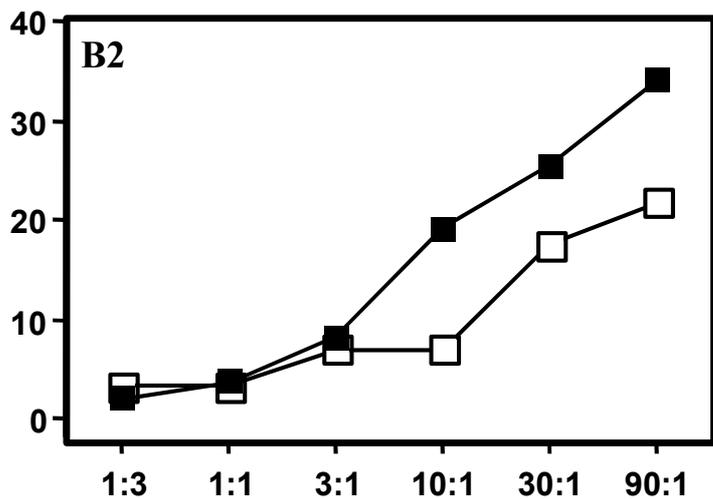


Abb. 6.a. Spezifische Lyse Her-2/neu exprimierender Tumorzelllinien SKOV 3 (□) und SKOV3 A2 (■) durch Her-2/neu spezifische T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit DC generiert, die zuvor mit Zellysat MVA-Her-2/neu infizierter Zellen gepulst wurden. Auf der Ordinate sind die Prozente der spezifischen Lyse, auf der Abszisse sind die Effektor zu Target Ratio dargestellt.

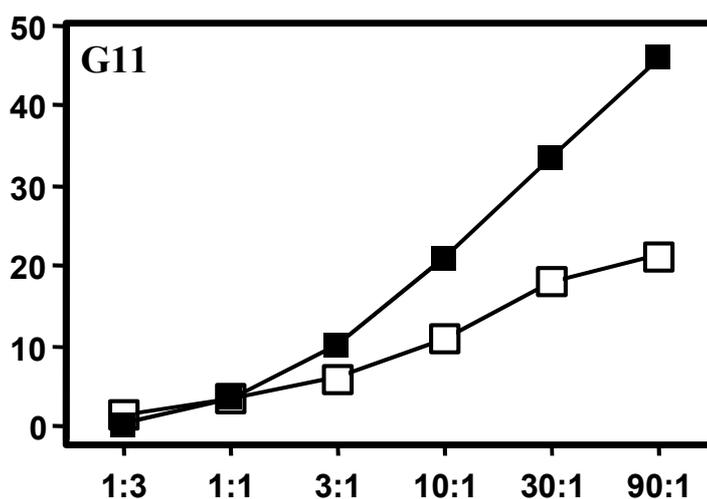
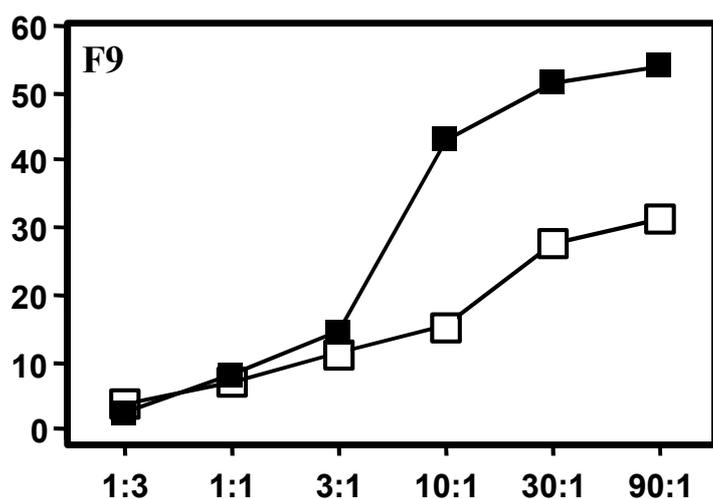
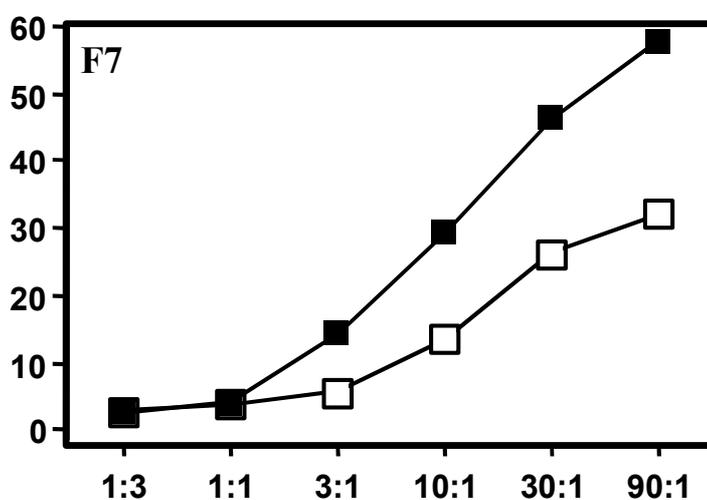
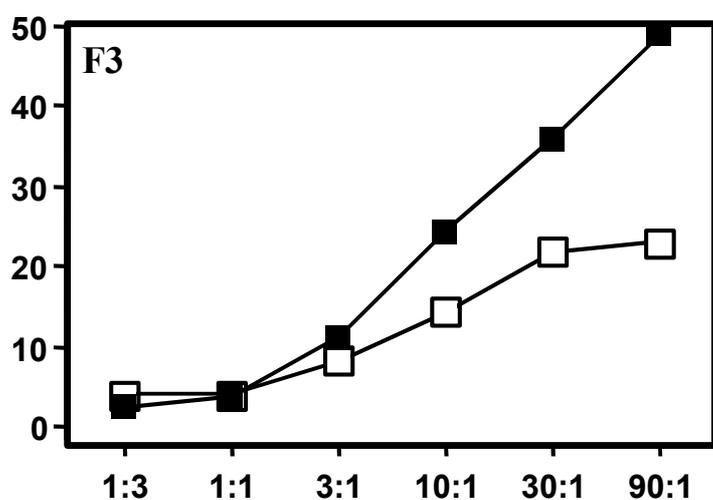
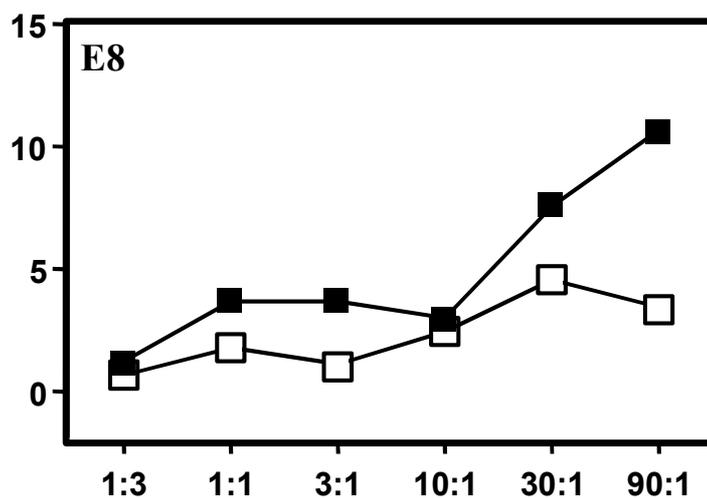
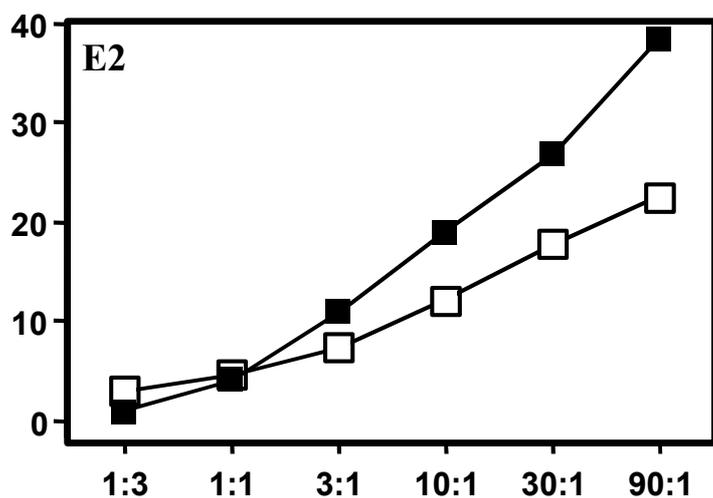


Abb. 6.b. Spezifische Lyse Her-2/neu exprimierender Tumorzelllinien SKOV 3 (□) und SKOV3 A2 (■) durch Her-2/neu spezifische T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit DC generiert, die zuvor mit Zellysat MVA-Her-2/neu infizierter Zellen gepulst wurden. Auf der Ordinate sind die Prozente der spezifischen Lyse, auf der Abszisse sind die Effektor zu Target Ratio dargestellt.

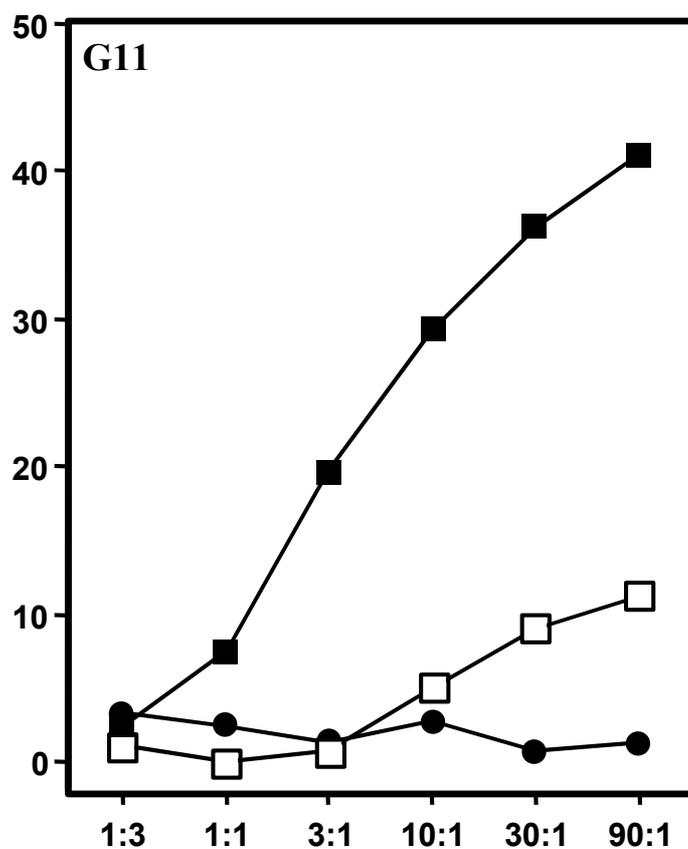
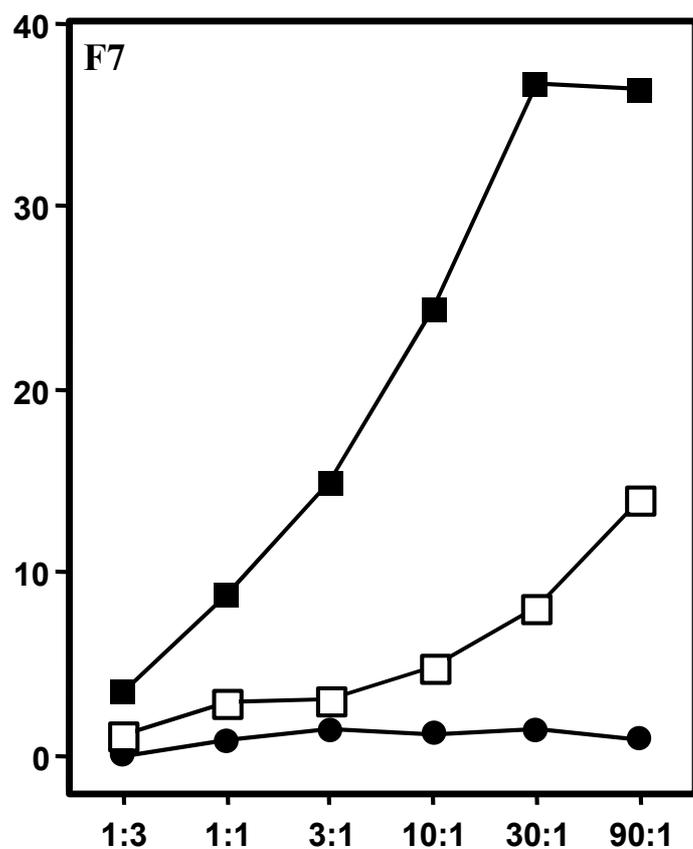
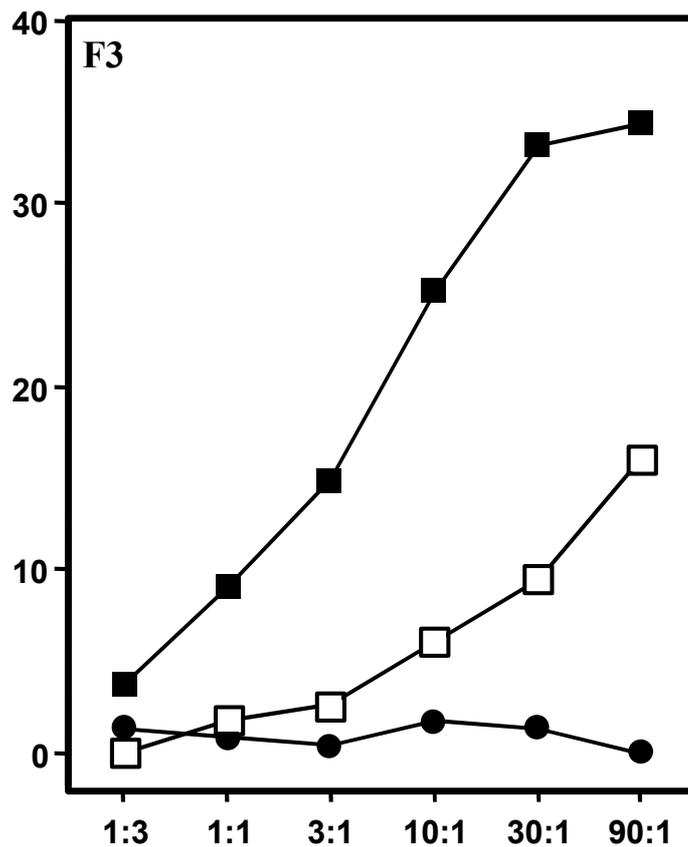
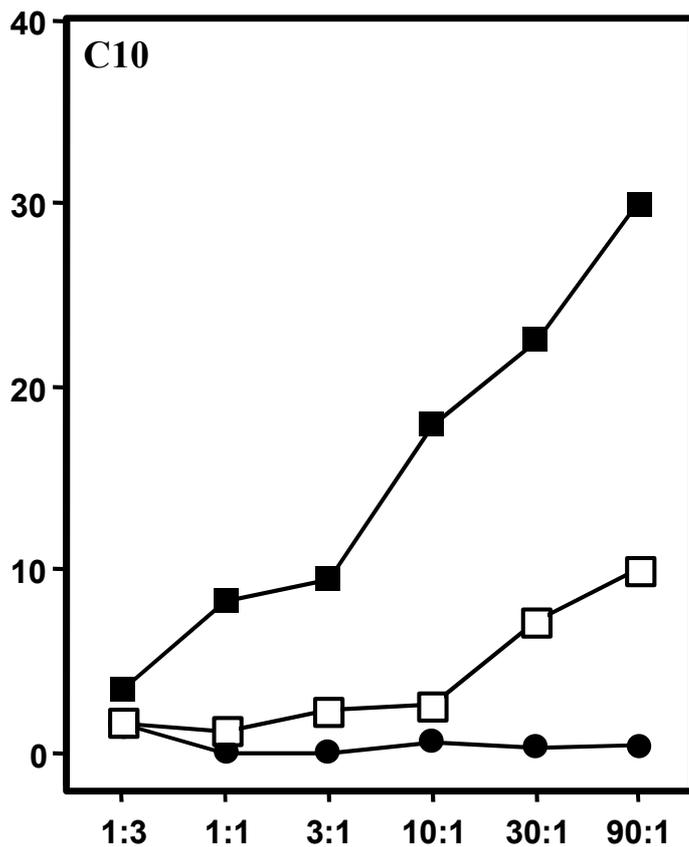


Abb. 6.c: Spezifische Lyse Her-2/neu exprimierender Tumorzelllinien durch Her-2/neu spezifische T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit DC generiert, die zuvor mit Zelllysate MVA-Her-2/neu infizierter Zellen gepulst wurden. Auf der Ordinate sind die Prozente der spezifischen Lyse dargestellt, auf der Abszisse ist die Effektor zu Target Ratio angegeben. Dabei besitzt SKOV 3 A2 (■) zwei Übereinstimmungen mit dem HLA-Muster des Spenders, SKOV3 (□) eine und SKBR3 (●) keine Übereinstimmung im HLA-Muster.

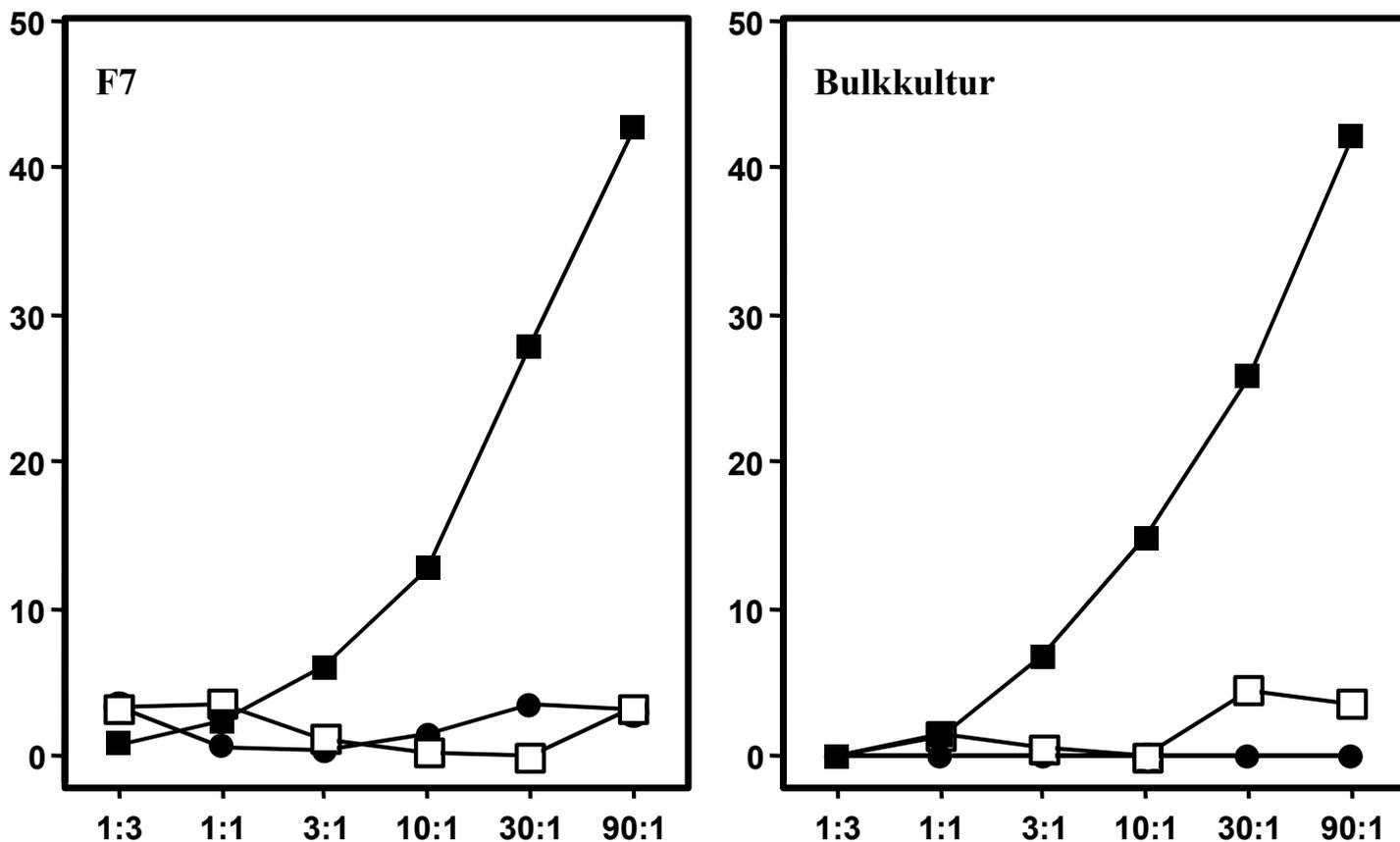


Abb. 6.d: Spezifische Lyse Her-2/neu exprimierender Tumorzelllinien durch Her-2/neu spezifische Zellen. Die T-Zellen wurden mit DC generiert, die zuvor mit MVA-Her-2/neu infizierten Zellen gepulst wurden. Auf der Ordinate sind die Prozente der Lyse dargestellt, auf der Abszisse ist die Effektor zu Target Ratio angegeben. Dabei besitzt SKOV3 A2 (■) zwei Übereinstimmungen mit dem HLA-Muster des Spenders und SKBR3 (●) keine Übereinstimmung. EDE EBV (□) ist die autologe EBV transformierte B-Zelllinie, Her-2/neu negativ, mit komplettem HLA-Match.

## **4. Diskussion**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten einer Tumorstimmung, bzw. von Antigen Vehikel, welche in letzter Zeit untersucht und erfolgreich etabliert wurden. Die Variationen reichen dabei vom "einfachen" Tumorstoff, über apoptotische Tumorzellen, zu Hitzeschockproteinen Hsp 70 und gp 96, rekombinanten Proteinen, synthetischen oder von MHC-Klasse-I gestripten Peptiden, Gentransfer mit nackter DNA und RNA und schließlich zu viralen Vektoren wie Retroviren, Adenoviren und Vaccinia-Viren (14, 30, 72, 107, 119). In letzter Zeit wurden retrovirale Vektoren, als Vehikel für das Her-2/neu Gen sehr erfolgreich eingesetzt (65). Die Vorteile dieser Methode liegen zum einen in der stabilen Expression des gewünschten Gens ohne dabei die Zielzelle in ihrer Vitalität zu beeinflussen, zum anderen sind sie in der multiplen Präsentation "natürlich" prozessierter Peptide zu sehen. Schließlich erlaubt diese Methode eine Antigenpräsentation auf potentiell allen MHC-Klassen, und somit die Induktion von spezifischen CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen die ganz unterschiedliche, auch bis jetzt unbekannte Epitope erkennen. Der große Nachteil ist jedoch die Tatsache, daß der retrovirale Gentransfer nur in Zellen funktioniert, die sich aktiv während der Infektion teilen (67). Dadurch ist man auf proliferierende CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Progenitor Zellen angewiesen, deren Kultivierung zwar mittlerweile etabliert ist, aber sich über einen Zeitraum von 4 Wochen erstreckt. Damit ist die Praktikabilität, verglichen mit Vektoren die auf von Monozyten abstammende DC zurückgreifen können, deren Kultivierung nur 7-10 Tage beansprucht, wesentlich eingeschränkt. Gerade bei der Absicht der klinischen Einführung, und somit der Therapie könnte wertvolle Zeit verloren gehen.

Mit Vaccinia Virus Konstrukten konnten erstaunliche Erfolge erzielt werden (15, 25, 29, 45, 119). Im Mausmodell wurde mittels MVA eine schützende Immunität sowohl gegen die tödlich verlaufende, japanische Enzephalitis als auch gegen eine Influenza-Virus Infektion erzeugt (69, 102). Weiterhin konnten im Mausmodell Tyrosinase spezifische, HLA-A2 restringierte T-Zellen generiert werden (30). Auf MVA-basierende Vektoren haben einige Vorteile. Die hohe Gen-Expression, sowie ihre Stabilität, das hohe Maß an Sicherheit die der Vektor gewährt und die starke Immunogenität des Vektors, also eine Adjuvanz-Wirkung, machen dieses Konstrukt höchst attraktiv für eine klinische Anwendung. So wurde bereits in München mit einer Phase I Studie, IT-Mel-98.2, begonnen. Dabei werden primär operierte Melanompatienten, im Sinne eines adjuvanten Therapiekonzepts, mit dem MVA-hTyr Konstrukt mehrmals vakziniert.

Es zeigte sich, daß Individuen die im Kindesalter gegen Pocken geimpft wurden, eine lange andauernde (bis zu 50 Jahren) Vaccinia Virus spezifische T-Zell Immunität aufweisen (24). Es wäre deshalb möglich, daß bereits vorhandene Memory T-Zellen, die Immunogenität von rekombinanten MVA-Vektor Konstrukten beeinträchtigt. So könnten infizierte, antigenpräsentierende Zellen anhand Vaccinia spezifischer Antigene erkannt und lysiert werden, bevor eine Immunantwort gegen das eingebrachte tumorassoziierte Antigen induziert werden kann. Ein ähnlicher Effekt wurde nämlich beim Versagen einer adenoviralen Immunisierung verantwortlich gemacht. Hier fand man in den Seren der Patienten hohe Level an präexistenter, neutralisierender Antikörper (85). Trotzdem konnten bei 50% der Patienten, welche alle bereits während der Kindheit gegen Pocken geimpft wurden, eine Tyrosinase- bzw. Melanom-spezifische CTL Antwort mit Hilfe des MVA-hTyr Vektors induziert werden (30). Auch dies unterstreicht eindrucksvoll, welches Potential dieser Vektor besitzt.

Es gibt beim Versuch einer Immuntherapie, unabhängig der Strategie, das Problem der Toleranzüberwindung bei Autoantigenen wie z.B. Her-2/neu. Dagegen steht die Gefahr der Induktion einer Autoimmunität. Es ist also eine Gradwanderung bei der das empfindliche Gleichgewicht des immunologischen Systems des Menschen manipuliert, aber nicht zerstört werden darf. Erstaunlicherweise kam es bei Versuchen mit MVA-hTyr bis jetzt zu keinerlei Autoimmunität. Weder Depigmentierungen, noch neurologische Ausfälle wurden beobachtet (30). Dennoch kann durch adoptiven T-Zelltransfer eine Autoimmunität provoziert und so z. B. eine Vitiligo ausgelöst werden (120).

Die Überwindung der Toleranz bestimmter Tumorantigene konnte eindrucksvoll im Mausmodell gegenüber Her-2/neu (56) und wie erwähnt im humanen System gegen Tyrosinase gezeigt werden (30). Zum Beispiel konnten in Her-2/neu transgenen Mäusen eine protektive Immunität gegen Her-2/neu exprimierenden Tumoren erreicht werden (78). Sicherlich lassen sich diese Erfolge nicht auf alle TAA übertragen, da die Unterschiede in ihrer Immunogenität und ihrem Ausmaß an immunologischer Toleranz, ein weites Spektrum umfassen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten passen in das positive Gesamtbild, das man über rekombinante MVA Konstrukte bis jetzt gewonnen hat.

Es wurde die hohe Genexpression des Her-2/neu Proteins in Abhängigkeit von der Infektionshöhe gezeigt, welche den Schluß zuläßt, daß dendritische Zellen als APC in Verbindung mit MVA als Vektor geeignet sind. Der Bericht, daß eine Vaccinia Virus Infektion in dendritischen Zellen zu einer Herunterregulierung von kostimulatorischen Molekülen, die für die immunstimulatorische Funktion der DC kritisch sind, führt (36), ist jedoch konträr zu den hier gezeigten Daten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, daß selbst 60 h nach einer erfolgreichen MVA-Her-2/neu Infektion reife DC sowohl Her-2/neu als auch die kostimulatorischen Moleküle in unverändert hohem Maße exprimieren (Abb. 3.b, c und d). Zusätzlich konnte eine Ausreifung von unreifen DC bei gleichzeitiger MVA-Her-2/neu Infektion induziert werden, wenngleich diese Ausreifung, den der nicht infizierter DC hinterherhängt. Es wurde im oben genannten Bericht ein anderer Vektor, Western Reserve Vaccinia Virus eingesetzt, doch wurden in den entscheidenden Versuchen weder eine Doppelfärbung durchgeführt, noch die beschriebene, eintretende Apoptose mit der

Morphologie der Zellen korreliert. Die in den Abbildungen 3.b, c und d gezeigten Daten wird ersichtlich, welche Gefahr der Mißinterpretation durch FACS-Analysen apoptotischer Zellen ausgeht.

Besonders diskussionswürdig ist die Tatsache, daß es in vorliegender Arbeit nicht gelang, T-Zellen mit Hilfe direkt infizierter DC zu primen und zu stimulieren. MVA-infizierte DC bilden nach ihrer Infektion eine Reihe von Zytokinen, z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und IFN Typ I (30, 89). Dies führt beim ELISpot-Assay beim Einsatz von infizierten Zellen als Targets, zu einem extrem hohen "Background", der eine weitere Auswertung unmöglich macht. Der ELISpot Assay ist als Read-out in diesem System ungeeignet, dennoch würde man eine erfolgreiche Induktion Her-2/neu spezifischer T-Zellen, angesichts der Facsdaten, die Her-2/neu exprimierende DC mit hohen Levels kostimulatorischer Moleküle zeigen, erwarten. Möglicherweise führt die überwältigende Antigenpräsenz die in diesem System erzeugt wurde, zur Anergie. Dazu passt die Erfahrung, daß in retroviralen Systemen nach einer Transduktion, im FACS nur etwa 15% der Zellen positiv für das Antigen sind und trotzdem die Induktion antigenspezifischer T-Zellen äußerst effizient ist (65). Auch die unter 3.6 geschilderten Bedingungen die letztendlich sehr erfolgreich zur Induktion Her-2/neu spezifischer T-Zellen führten, unterscheiden sich von einer direkten Stimulation infizierter DC gewissermaßen nur durch die Antigendichte.

Andererseits gibt es eine Reihe von Anhaltspunkten, dass reife DC nicht mehr in der Lage sind Proteine im ausreichenden Maße zu prozessieren und die entsprechenden Peptide zu präsentieren. Dies führt zu einer gegenteiligen These über das Versagen direkt infizierte DC beim primen und restimulieren von T-Zellen – anstatt einer hohen Antigenpräsenz das Fehlen einer antigenspezifischen Peptidpräsentation.

Reife dendritische Zellen können möglicherweise keine neuen MHC I-Moleküle mehr synthetisieren. Dies würde eine Antigenpräsentation über MHC I von neu eingebrachten Genen praktisch unmöglich machen. Unreife DC bilden zwar im hohen Maße neue MHC II-Moleküle, andererseits besitzen sie weniger kostimulatorische Moleküle. Dadurch wird die Fähigkeit zum "Primen" von naiven T-Zellen eingeschränkt. Außerdem wurden bei den Versuchen spezifische T-Zellen mittels direkt infizierter unreifer DC zu generieren, sehr hohe MOI (MOI = 10) verwendet. Dies führt bei unreifen DC zu einer rasch einsetzenden Apoptose und macht somit ein "Priming" wahrscheinlich unmöglich.

Erstaunlicherweise wurden direkt infizierte DC, reif und vor allem auch unreife, nicht im CRAssay lysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden als Effektor Zellen die unter 3.6 generierten CTL und HLA-A2 restringierte peptidspezifische T-Zellen eines anderen Spenders verwendet (ECD 369-377 : KIFGSLAFL). MVA-Her-2/neu infizierte DC imitieren durch ihre hohe Her-2/neu Expression, den Phänotyp Her-2/neu überexprimierender Tumorzellen. Für die Tatsache, daß sie dennoch nicht immunologisch erkannt wurden, gibt es eine Reihe möglicher Erklärungen. Immunodominante Peptide eines Proteins können mit stark unterschiedlicher Effizienz generiert werden und werden dadurch in unterschiedlicher Dichte auf der Zelloberfläche präsentiert (5). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Generierung antigener Peptide durch Proteasomen in verschiedenen Zellen, durch selektive Inhibition bestimmter enzymatischer Aktivitäten moduliert wird (108). Durch posttranskriptionale Mechanismen der Genmodulation kann ebenfalls die endogene Präsentation von Antigenen stark beeinflusst werden (54).

Trotzdem gelang es in dieser Arbeit Her-2/neu spezifische T-Zellen mit dem MVA-Her-2/neu Vektorkonstrukt zu generieren. Um die Problematik der mangelnden Stimulation durch direkt infizierter DC zu umgehen, wurden infizierte DC an unreife DC verfüttert und anschließend zur Ausreifung gebracht. Durch dieses Cross-priming nähert man sich auch den in vivo ablaufenden Vorgängen an.

Die damit erreichte Effizienz des Priming und der Restimulation ist außerordentlich. Es konnten mehrere spezifische Zelllinien generiert werden die auch multiple HLA-Restriktionen aufweisen (HLA-A2 und HLA-B35).

Abschließend lässt sich festhalten, daß MVA-Her-2/neu ein äußerst vielversprechender Vektor ist. Er ermöglicht eine Antigenpräsentation auf potentiell allen MHC-Klassen, und somit die Induktion von spezifischen CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen die ganz unterschiedliche, auch bis jetzt unbekannte Epitope erkennen. Daß dies von besonderer Wichtigkeit ist, zeigen Erfahrungen mit tyrosinase- und peptidspezifischen CTL welche in etwa 50% der Fälle Tyrosinase exprimierende A2 Tumorzellen nicht erkennen konnten (112). Durch die Generierung verschiedener T-Zellen welche gegen unterschiedliche HLA-Klassen restringiert sind, wird die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Tumorzellerkennung und damit einer erfolgreichen Therapie entscheidend erhöht. Die einfache Handhabung, das hohe Maß an Sicherheit und das große Potential legen in diesen Vektor viele Hoffnungen für die zukünftige Tumorthherapie. Die Untersuchungen stehen jedoch erst am Anfang und es wird sich zeigen, ob sich die berechtigten Erwartungen bestätigen.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Forschungsarbeit befaßt sich mit der Vorbereitung einer Immuntherapie zur Behandlung maligner Erkrankungen beim Menschen. Ziel ist es, eine spezifische T-Zellantwort gegen das tumorassoziierte Antigen Her-2/neu bei Tumorpatienten zu induzieren. Als Grundlage für dieses Ziel dienen zwei wesentliche Komponenten. Erstens das modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA). Es ist das Vehikel für das tumorassoziierte Antigen, um somit eine spezifische Immunreaktion hervorzurufen und die Toleranz gegenüber diesem Autoantigen zu überwinden. Dabei erfüllt das MVA sowohl einen hohen Sicherheitsstandard als auch eine hohe Fremdgenexpression. Die zweite Komponente sind die dendritischen Zellen. Sie sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und nehmen damit eine entscheidende Rolle im Immunsystem ein. Durch *in vitro* Versuche mit MVA und dendritischen Zellen wurde es möglich, die Auswirkungen von MVA auf DC zu untersuchen. Weiterhin konnte damit die tatsächliche Fähigkeit des Vektors eine gezielte Immunantwort zu initiieren abgeschätzt werden und beteiligte Mechanismen besser verstanden werden. In diesem System ist es möglich, eine spezifische Immunantwort zu generieren, ohne die Kenntnis über die HLA-Allele des Patienten oder bestimmte Peptidepitope zu haben. Somit können zwei klinische Endziele erreicht werden.

Erstens, die direkte Vakzinierung von Patienten mit MVA. Grundlage hierfür sind die Erfahrungen die mit der Infektion von dendritischen Zellen gewonnen wurden. Die Versuche fokussierten zum einen auf der erfolgreichen Expression des Fremdgens in den dendritischen Zellen, zum anderen auf die phänotypischen und die funktionellen Veränderung der dendritischen Zellen nach einer Infektion. Wichtig war gewonnene Erkenntnis über die optimale Höhe der Infektion (multiplicity of infection). Diese korreliert direkt mit der Fremdgenexpression und indirekt mit dem Vitalitätsstatus der infizierten Zelle.

Zweitens, die Etablierung von spezifischen T-Zellen *in vitro* und deren Anwendung im Sinne eines adoptiven T-Zelltransfers als Immuntherapie. Dafür schafften die Versuche mehrere Voraussetzungen. Wichtig waren optimale Kultivierungsmethoden für T-Zellen, um diese auch im benötigten Maße zu vermehren. Funktionelle Assays dienten dazu, die Spezifität der T-Zellkultur zu überprüfen und dementsprechend die Restimulationsbedingungen neu zu wählen. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß *in vitro* Her-2/neu spezifische T-Zellen generiert werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abrams, S. I., M. J. Dobrzanski, D. T. Wells, S. F. Stanziale, S. Zaremba, L. Masuelli, J. A. Knator, J. Schlom, and L. Masuelle. (1995). Peptide-specific activation of cytolytic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes against tumor cells bearing mutated epitopes of K-ras p21. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2588-2597.
2. Alimandi, M., A. Romano, M. C. Curia, R. Muraro, P. Fedi, S. A. Aaronson, P. P. Di Fiore, and M. H. Kraus. (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* **10**: 1813-1821.
3. Altenburger, W., Suter, C. P. & Altenburger, J. (1989). *Arch. Virol.* **105**: 15-27.
4. Anichini, A., A. Molla, R. Mortarini, G. Tragni, I. Bersani, M. DiNicola, A. M. Gianni, S. Plotti, R. Dunbar, V. Cerundolo, et al. (1999). An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTL but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J. Exp. Med.* **190**: 651.
5. Antón, L. C., Yewdell, J. W., and Bennick J. R. (1997). MHC Class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J. Immunol.* **158**: 2535-2542.
6. Ardavin, C., L. Wu, C.-L. Li, and K. Shortman. (1993). Thymic dendritic cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**: 761-763.
7. Austyn, J. M. (1992) Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Sem. Immunol.* **4**: 227-236.
8. Bakker, A. B., M. W. Schreurs, A.J. BeBoer, Y. Kawakami, S. A. Rosenberg, G. J. Adema, and C. G. Figdor. (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanom-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**: 1005-1009.
9. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**: 245-252.
10. Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C. C. Benz, L. Dantis, N. T. Sklarin, A. D. Seidman, C. A. Hudis, J. Moore; et al. (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185<sup>Her2</sup> monoclonal antibody in patients with Her-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **14**: 737.
11. Boel, P., C. Wildmann, M. L. Sensi, R. Brasseur, J. C. Renauld, P. Coulie, and T. Boon. (1995). BAGE: a gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* **2**: 167-175.

12. Brändle, D., F. Brasseur, P. Weynants, T. Boon, and B. J. Van den Eynde. (1996) A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* **183**: 2501-2508.
13. Brichard, V., A. Van Pel, T. Wölfel, C. Wölfel, E. De Plaen, B. Lethé, P. Coulie, and T. Boon. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T Lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**: 489-495.
14. Butterfield, L. H., S. M. Jilani, N. G. Chakraborty, L. A. Bui, A. Ribas, V. B. Dissete, R. Lau, S. C. Gamradt, J. A. Glaspy, W. H. McBride, et al. (1998). Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with MART-1 adenovirus. *J. Immunol.* **161**: 5607.
15. Carroll, M.W., Overwijk, W. W., Chamberlain, R. S., Rosenberg, S. A., Moss, B., and Restifo, N. P. (1997). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* **15**: 387-394.
16. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. (1992). GM-CSF and TNFalpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**: 258-261.
17. Cella, M. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Origin. (1997). Maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 10-16.
18. Cella, M. D., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* **5**: 919-923.
19. Chapuis, F., M. Rosenzweig, M. Yagello, M. Ekman, P. Bierfeld, and J. C. Gluckman. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* **27**: 431-441.
20. Choudhury, A., J. L. Gajewski, J.C. Liang, U. Papat, D. F. Claxton, K.-O. Kliche, M. Andreeff, and R. E. Champlin. (1997). Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **89**: 1133-1142.
21. Cobleigh, M. A., C. L. Vogel, D. Tripathy, N. J. Robert, S. Scholl. L. Fehrenbacher, J. M. Wolter, V. Paton, S. Shak, G. Lieberman, et al. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-Her2 monoclonal antibody in women who have Her2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **17**: 2639.
22. Coulie, P. G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wölfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. De Plaen, C. Lurquin, J.-P. Szikora. J.-C. Renauld, and T. Boon. (1994). A new coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**: 35-42.
23. Coussens, L., T. L. Yang-Feng, Y. L. E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Liberman, J. Schlessinger, U. Francke, A. Levinson, and A. Ullrich. (1985). Tyrosinase kinase receptor with extensiv homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**: 1132-1139.

24. Demkowicz, W. E., Littaua, R. A., Wang, J. M., and Ennis, F. A. (1996). Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J. Virol.*, **70**: 2627-2631.
25. Di Nicola M., S. Siena, M. Bregni, P. Longoni, M. Magni, M. Milanesi, P. Matteucci, R. Mortarini, A. Anichini, G. Parmiani, I. Drexler, V. Erfle, G. Sutter, A. M. Gianni. (1998). Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther.* **5 (6)**: 350-356.
26. Disis, M. L., J. W. Smith, A. E. Murphey, W. Chen, and M. A. Cheever. (1994). *In vitro* generation of human cytolytic T cells specific for peptides derived from the Her-2/neu protooncogene protein. *Cancer Res* **54**: 1071-1076.
27. Disis, M. L., E. Calenoff, G. McLaughlin, A. E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R. B. Livingston, et al. (1994). Existent T-cell and antibody immunity to Her-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* **54**: 16.
28. Disis, M. L., S. M. Pupa, J. R. Gralow, R. Dittadi, S. Menard, and M. A. Cheever. (1997). High-titer Her-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**: 3363.
29. Dorrell L., C. A. O'Callaghan, W. Britton, S. Hambleton, A. McMichael, G. L. Smith, S. Rowland-Jones, T. J. Banchar. (2000) *Vaccine* **19(2-3)**: 327-336.
30. Drexler, I., Antunes, E., Schmitz, M., Wölfel, T., Huber, C., Eifle, V., Rieber, P., et al. (1999). Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as Melanoma-associated antigen: Induction of tyrosinase- and Melanoma-specific human leukocyte antigen A\*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **59**: 4955-4963.
31. Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., and Sutter, G. (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not for various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.*, **79**: 347-352.
32. Drillien, R. D., Spohner, D. & Kirn, A. (1978). *J. Virol.* **28**: 843-850.
33. Drillien, R., Koehren, F. & Kirn, A. (1981). *Virology* **111**: 488-499.
34. Dustin, M. L., and T. A. Springer. (1989). Role of lymphocyte cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**: 619-624.
35. Dustin, M. L., and T. A. Springer. (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 27-66.
36. Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Coc, W. I., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1999). Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: A novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* **163**: 6762-6768.
37. Epstein, M. M., F. DiRosa, D. Jankovic, A. Sher, and P. Matzinger. (1995). Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* **182**: 915-922.
38. Fierz, w., B. Endler, K. Reske, H. Wekerle, and A. Fontana. (1985). Astrocytes as antigen presenting cells. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol.* **134**: 3785-3793.

39. Fossum, B., T. G.-D. III, J. Breivik, J. A. Eriksen, A. Spurkland, E. Thorsby, and G. Gaudernack. (1994). P21-ras-Peptide-specific T-cell responses in a patient with colorectal cancer. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recognize a peptide corresponding to a common mutation (13Gly→Asp). *Int. J. Cancer* **56**: 40-45.
40. Fuchs, E. J., and P. Matzinger. (1992). B cells turn off virgin but not memory cells. *Science* **258**: 1156-1159.
41. Galy, A., M. Travis, D. Cen, and B. Cen. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**: 459-473.
42. Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. Van der Brueggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethé, F. Brasseur, and T. Boon. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**: 921-930.
43. Guery, J.-C., F. Rita, and L. Adorini. (1996). Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *J. Exp. Med.* **183**: 751-757.
44. Heslop, H. E., C. Y. C. Ng, C. Li, C. A. Smith, S. K. Loftin, R. A. Krance, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. (1996). Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Med.* **2**: 551-555.
45. Hirsch, V., Fuerst, T., Sutter, G., Carroll, M., Yang, L., Goldstein, S., Piatak, M., Elkins, W., Alvord, G., Montefiori, D., Moss, B. & Lifson, J. (1996). Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol.* **70**: 3741-3752.
46. Horan, T., J. Wen, T. Arakawa, N. Liu, D. Brankow, S. Hu, B. Ratzkin, and J. S. Philo. (1995). Binding of neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J. Biol. Chem.* **270**: 24604-24608.
47. Inaba, K., M. Inaba, M. Deguchi, K. Hagi, R. Yasumizu, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3038-3042.
48. Jäger, E., M. Ringhoffer, J. Karbach, M. Arand, F. Oesch, and A. Knuth. (1996). Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants *in vivo*. *Int. J. Cancer* **66**: 470
49. Janeway, C. A., and K. Bottomly. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**: 721-730.
50. Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, and M. C: Nussenzweig. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**: 151-155.

51. Kast, W. M., R. M. P. Brandt, J. Sidney, J.-W. Drijfhout, R. T. Kubo, H. M. Grey, C. J. M. Melief, and A. Sette (1994). Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J. Immunol.* **152**: 3904-3911.
52. Katz, S. I., K. Tamaki, and D. H. Sachs. (1979). Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**: 324-326
53. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, L. Rivoltini, S. L. Topalian, T. Miki, and S. A. Rosenberg. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**: 3515-3519.
54. Kienzle, N., Buck, m., Silins, S. L., Burrows, S. R., Moss, D. J., Winterhalter, A., Brooks, A., and Khanna, R. (2000). Differential splicing of antigen-encoding RNA reduces endogenous epitope presentation that regulates the expansion and cytotoxicity of T cells. *J. Immunol.* **165**: 1840-1846.
55. King, C. R., M. H. Kraus, and S. A. Aaronson. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* **229**: 974-978.
56. Kurt, R. A., Whitaker, R., Baher, A., Seung, S., and Urba, W. J. (2000). Spontaneous mammary carcinomas fail to induce an immune response in syngenic FVBN202 neu transgenic mice. *Int. J. Cancer.* **87**: 688-694.
57. Leitzel, K., Y. Teramoto, E. Sampson, J. Mauceri, B. C. Langton, L. Demers, E. Podczaski, H. Harvey, S. Shambaugh, G. Volas, S. Weaver, and A. Lipton. (1992). Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **10**: 1436-1443.
58. Lewis, G. D., J. A. Lofgren A. E. McMurtey, A. Nuijens, B. M. Fendly, K. D. Bauer, and M. X. Sliwkowski. (1996). Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of erbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res* **56**: 1457-1465.
59. Linsley, P. S., W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**: 721-730.
60. Liu, Y., and C. A. Janeway. (1992). Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3845-3949.
61. Mahnel, H. & Mayr, A. (1994). Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **107**: 253-256.
62. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, and H. J. McKenna. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* **96**: 1953-1962.
63. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* **3**: 6-14.

64. Mayr, A., Stickl, H., Müller, H., Danner, K. & Singer, H. (1978). Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. B* **167**: 375-390.
65. Meyer zum Büschenfelde C., N. Nicklisch, S. Rose-John, C. Peschel and H. Bernhard. (2000). Generation of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes against the tumor-associate-antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34<sup>+</sup> hemapoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **165**:
66. Meyer, H., Sutter, G. & Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* **72**: 1031-1038.
67. Miller, D. G., M. A. Adam, and A. D. Miller. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4239.
68. Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11341-11348.
69. Nam, J. H., Wyatt, L. S., Chae, S. L., Cho, H. W., Park, Y. K., and Moss, B. (1999). Protection against lethal Japanese encephalitis virus infection of mice by immunization with highly attenuated MVA strain of vaccinia virus expressing JEV *prM* and *E* genes. *Vaccine*, **17**: 261-268.
70. Niehans, G. A., T. P. Singleton, D. Dykoski, and D. T. Kiang. (1993). Stability of Her-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 1230
71. Paglia, P., C. Chiodoni, M. Rodolfo, and M. P. Colombo. (1996). Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against antigen *in vivo*. *J. Exp. Med.* **183**: 317-322.
72. Pardoll, D. M. (1998). Cancer vaccines. *Nat. Med.* **4**: 525.
73. Peters, J. H., J. Ruppert, R. K. H. Gieseler, H. M. Najar, and H. Xu. (1991). Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from monocytic lineage? *Pathobiol.* **59**: 122-126.
74. Pickl, W. F., O. Majdic, P. Kohl, J. Stöckl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, and W. Knapp. (1997). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14<sup>+</sup> peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **157**: 3850-3859.
75. Press, M., C. Cordon-Carlo, and D. Slamon. (1990). Expression of Her-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* **5**: 953-962.
76. Prost, S., M. G. Le, S. Douc-Rasy, J. C. Ahomadegbe, M. Spielmann, M. Guerin, and G. Riou. (1994). Association of c-erbB2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of inflammatory type. *Int. J. Cancer* **58**: 763-768.

77. Reid, C. D., P. R. Fryer, C. Clifford, A. Kirk, J. Tikerpae, and S. C. Knight. (1990). Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* **76**: 1139-1149.
78. Reilly, R. T., Gottlieb, M. B. C., Ercolini, A. M., Machiels, J.-P. H., Kane, C. E., Okoye, F. I., Muller, W. J., Dixon, K. H., and Jaffee, E. M. (2000). Her-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res.* **60**: 3569-3576.
79. Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, and J. M. Austyn. (1993). Phagocytosis of antigen by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**: 509-519.
80. Rensing, M. E., Sette, R. M. P. Brandt, J. Ruppert, P. A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H. M. Grey, C. J. M. Melief, and W. M. Kast. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J. Immunol* **154**: 5934-5943.
81. Rissoan, M.-C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y.-J. Liu. (1999). Reciprocal control of helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**: 1183-1186.
82. Robbins, P. F., M. El-Gamil, Y. F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S. A. Rosenberg. (1996). A mutated  $\beta$ -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**: 1185-1192.
83. Rosenberg, S. A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1635-1644.
84. Rosenberg, S. A. (1997). Cancer vaccines based on the identification of the genes encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* **18**: 175-182.
85. Rosenberg, S. A., Zhai, Y. F., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., Roberts, B., and White, D. E. (1998). Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**: 1864-1900
86. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**: 1109-1118.
87. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**: 389-400.
88. Saunders, D., K. Lucas, J. Ismaili, L. Wu, E. Maraskovsky, A. Dunn, and K. Shortman. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **184**: 2185-2196.

89. Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., et al. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8<sup>+</sup> T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* **4**: 397-402.
90. Semba, K., N. Kamata, K. Toyoshima, and T. Yamamoto. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **82**: 6497-6501.
91. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y.-J. Liu. (1999). The nature of the principle type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. **284**: 1835-1837.
92. Sing, A. P., R. F. Ambinder, D. J. Hong, M. Jensen, W. Batten, E. Petersdorf, and P. D. Greenberg. (1997). Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes that lyse Reed-Sternberg cells: implications for immune-mediated therapy of EBV + Hodgkin's disease. *Blood* **89**: 1978-1986.
93. Slamon, D. J., and G. M. Clark. (1998). Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* **240**: 1795
94. Steinman, R.M., and Z. A. Cohn. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* **137**: 1142-1162.
95. Steinman, R. M., D. S. Lustig, and Z. A. Cohn. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* **139**: 1431-1446.
96. Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 271-296.
97. Steinman, R. M., and J. Swanson. (1995). The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**: 283-288.
98. Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H., Schäfer, H. & Holzner, A. (1974). MVA-Schutzimpfungen gegen Pocken. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **99**: 2386-2392.
99. Sutter, G. & Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 10847-10851.
100. Sutter, G. & Moss, B. (1995). Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Develop. Biolog. Standard.* **84**: 195-200.
101. Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett.*, **371**: 9-12.
102. Sutter, G., Wyatt, L. S., Foley, P. L., Bennick, J. R., and Moss, B. (1994). A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. **12**: 1032-1040.

103. Szabolcs, P., D. Avigan, S. Gezelter, D. H. Ciocon, M. A. S. Moore, R. M. Steinman, and J. W. Young. (1996). Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood*. **87**: 4520-4530.
104. Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2000). Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 Effectors: Role of stimulator/responder ratio. *J. Exp. Med.* **192**: 405-411.
105. Theobald, M., J. Biggs, D. Dittmer, A. J. Levine, and L. A. Sherman. (1995). Targeting p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 11993-11997.
106. Tilkin, A. F., R. Lubin, T. Soussi, V. Lazar, N. Janin, M. C. Mathieu, I. Lafrere, C. Carlu, M. Roy, M. Kayibanda, D. Beller, J.-G. Guillet, and B. Bressac-de Paillerets. (1995). Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1765-1769.
107. Tüting, T., C. C. Wilson, D. M. Martin, Y. L. Kasamon, J. Rowles, D. I. Ma, C. L. Slingluff, S. N. Wagner, P. van der Bruggen, J. Baar, et al. (1998). Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the TH1-biasing cytokines IL-12 and IFN- $\alpha$ . *J. Immunol.* **160**: 1139.
108. Valmori, D., Gileadi, U., Servis, C., Dunbar, P. R., Cerottini, J.-C., Romero, P., Cerundolo, V., and Lévy F. (1999), Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J. Exp. Med.* **189**: 895-905.
109. Van den Eynde, B. J. and Van der Bruggen, B. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr. Opi. Immunol.* **9**: 684-693.
110. Van den Eynde, B. J., O. Peeters, O. DeBacker, B. Gaugler, S. Lucas, and T. Boon. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* **182**: 689-698.
111. Van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**: 1643-1647.
112. Visseren, M. J. W., A. van Elsas, E. I. H. van der Voort, M. E. Rensing, W. M. Kast, P. I. Schrier, and C. J. M. Melief. (1995). CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J. Immunol.* **154**: 3991.
113. Wallasch, C., F. U. Weiß, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing, and A. Ullrich. (1995). Heregulin-dependent regulation of Her-2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J.* **14**: 4267-4275.
114. Werner, G. T., Jentsch, U., Metzger, E. & Simon, J. (1980). Studies on poxvirus infections in irradiated animals. *Arch. Virol.* **64**: 247-256.

115. Wölfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serreano, C. Wölfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, and D. Beach. (1995). A p16INK-4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**: 1281-1284.
116. Wyatt, L., Moss, B. & Rozenblatt, S. (1995). Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* **210**: 202-205.
117. Wyatt, L. S., Shors, S. T., Murphy, B. R. & Moss, B. (1996). Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* **14**: 1451-1458.
118. Yamamoto, T., S. Ikawa, T. Akiyama, K. Semba, N. Nomura, N. Miyajima, T. Saito, and K. Toyoshima. (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319**: 230-234.
119. Yee C., M. J. Gilbert, S. R. Riddell, V. G. Brichard, A. Fefr, J. A. Thompson, T. Boon, and P. D. Greenberg. (1996). Isolation of tyrosinase-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell clones from peripheral blood of melanoma patients following in vitro stimulation with recombinant vaccinia virus. *J. Immunol.* **157**: 4079-4086.
120. Yee C., Thompson J. A., Roche P., Byrd D. R., Lee P. P.; Piepkorn M., Kenyon K., Davis M. M., Riddell S. R., Greenberg P.D. (2000). Melanocyte destruction after antigen –specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med* **192**:1637-1644
121. Young, J. W., P. Szabolcs, and M. A. S. Moore. (1995). Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **182**: 111-1120.
122. Zabrecky, J. R., T. Lam, S. J. McKenzie, and W. Carney. (1991). The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J. Biol. Chem.* **271**: 4974-4977.
123. Zhou, L.-J., and T. F. Tedder. (1996). CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2588-2592.

## **7. Danksagung**

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. habil. Helga Bernhard, die die Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen hat. Sie hat mich intensiv betreut und stand mir mit ihrer fachlichen Kompetenz stets zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. Gerd Sutter und Dr. Ingo Drexler bedanken. Sie haben mir den MVA-Her-2/neu Vektor sowie sämtliche Informationen zur Handhabung zur Verfügung gestellt. Darüberhinaus haben sich mich stets in meiner Arbeit bestärkt und mir neue Möglichkeiten aufgewiesen.

Mein größter Dank geht an die Menschen mit denen ich jeden Tag zusammengearbeitet habe. Allen voran Frau Kristina Fleischer, die mir die praktische Umsetzung im Labor und die Frustverarbeitung durch Spaß beibrachte. Ebenso Frau Nicole Nicklisch die neben ihrer fachlichen Kompetenz es immer wieder schaffte den Tag abwechslungsreich zu gestalten. Außerdem Herrn Jochen Metzger dem ich neben viel Spaß auch einige gute Einfälle zu verdanken habe. Weiterhin Herrn Dr. Burckhard Schmidt, sowie Frau Christine Herrmann der ich neben einer lustigen Zusammenarbeit auch die Fortsetzung meiner Forschungsarbeit verdanke. Schließlich danke ich Frau Budak für ihr großes Engagement im Labor, den Leckereien und den Spaß.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Günther Edenharter. Er war bereit mir fast wöchentlich sein Blut zu spenden und das über einen Zeitraum von über 6 Monaten! Dies hat im hohen Maße zum Erfolg dieser Forschungsarbeit beigetragen und wird mir unvergeßlich bleiben.

Ich möchte mich auch bei meiner Freundin Nicole bedanken, die mich immer unterstützt hat und meinen Frust ertragen mußte.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken und besonders meiner Mutter die immer hinter mir steht und mich stets unterstützt.