

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

Induktion der Cross-Präsentation durch antikörpergebundene Antigene in murinen dendritischen Zellen

Seong Hwan Jeon

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. (UMF Temeschburg) H.-H. Horch

Die Dissertation wurde am 26. 01. 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 14. 06. 2006 angenommen.

Meinen Eltern und meiner Frau Verena gewidmet.

0 Abkürzungsverzeichnis

APC:	Antigenpräsentierende Zelle
ATP:	Adenosyltriphosphat
BMDC:	Bone marrow derived dendritic cell
CRBG:	Chlorphenol Red- β -Galactosidase
CTL:	Zytotoxische T Lymphozyten
DC:	Dendritische Zelle
ELISA:	Enzyme linked immuno sorbent assay
Fc γ :	Fragment crystallisable γ
FCS:	fatales Kälberserum
FITC:	Fluoreszein-Isothiozyanat
GM-CSF :	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
IC:	Immune complex (Immunkomplex)
IL:	Interleukin
LPS:	Lipopolysaccharide
MG:	Molekulargewicht
MHC:	Haupthistokompatibilität
NFAT:	nuclear factor of activated T-cells
OVA:	Ovalbumin
OVA-DNP:	Ovalbumin-Dinitrophenyl
PE:	Phycoerythrin
POD:	Peroxidase
rG-CSF:	rekombinanter Granulozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor
TAP:	Transporters associated with Antigen Processing

0	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1	EINLEITUNG	6
1.1	Erkrankungsrelevanz	6
1.1.1	Autoimmunkrankheiten	6
1.1.2	Tumor	6
1.1.3	Infektion	7
1.2	Charakteristik dendritischer Zellen	8
1.3	Antigenpräsentation	9
1.4	Cross-Präsentation	9
1.5	Antikörper-vermittelte Internalisierung über den Fcγ-Rezeptor in DCs	10
1.6	Induktion der Immunantwort	11
2	UNTERSUCHUNGSZIEL	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
3.2	Methoden	15
3.2.1	Aufreinigung der Antikörper (IgG1, IgG2a und IgG3).....	15
3.2.1.1	Vorbereitung für Aufreinigung.....	15
3.2.1.2	Aufreinigung.....	15
3.2.1.3	Änderung des Kulturmediums zur Produktion der monoklonalen Antikörper	16
3.2.2	Gelelektrophorese.....	16
3.2.2.1	Testprinzip	16
3.2.2.2	Probenvorbereitung	17
3.2.2.3	Gelelektrophorese.....	17
3.2.2.4	Anfärben des Gels	17
3.2.2.5	Trocknen des Gels	18
3.2.3	Isolierung Dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark	18
3.2.3.1	Vorbereitung des Kulturmediums	18
3.2.3.2	Durchführung der Isolierung von DCs	18
3.2.3.3	Zellzählung	19
3.2.4	Kultivieren von DCs.....	19
3.2.5	Antigen-Präsentationsassay	20
3.2.5.1	Vorbereitung.....	20
3.2.5.2	Durchführung des Präsentationsassays.....	21
3.2.6	Kopplung von OVA-DNP an Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC).....	22
3.2.6.1	Vorbereitung.....	22
3.2.6.2	Kalkulation der benötigten Komponente A.....	22
3.2.6.3	Konjugationsreaktion	23

3.2.6.4	Aufreinigung.....	23
3.2.7	ELISA zum Nachweis von murinen Immunglobulinen	23
3.2.7.1	Testprinzip	23
3.2.7.2	Herstellung der Lösungen.....	24
3.2.7.3	Testdurchführung	25
3.2.7.4	Auswertung.....	26
3.2.8	Durchflusszytometrie.....	26
3.2.9	Messung der SIINFEKL:H-2K ^b - Komplexe mittels Konfigurations- spezifischem Antikörper 25.D1.16.....	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	ELISA-Nachweis von murinem Hybridom IgG	28
4.2	Charakterisierung der LPS-vermittelten Reifung von isolierten dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark	28
4.3	Nachweis der SIINFEKL:H-2K^b- Präsentation in unreifen und reifen DCs	31
4.4	Antikörper-Isotyp-abhängige Aufnahme von OVA-DNP Immunkomplexen in murine DCs	33
4.5	Qualitativer Nachweis der Antikörperklassen mittels Streifentest und Phänotypisierung muriner BMDCs nach Inkubation mit IC	36
4.6	Effekt von Immunkomplexen auf die Antigenpräsentation unreifer und reifer DCs	41
4.7	Dosiskurve der Cross-Präsentation der unreifen DCs	43
4.8	Gelelektrophorese von IgG3-Anti-DNP	44
4.9	Dendritische Zelllinie	45
5	DISKUSSION	46
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	ANHANG	66
9	DANKSAGUNG	69
10	LEBENS LAUF	70

1 Einleitung

1.1 Erkrankungsrelevanz

Das Ziel der gezielten Beeinflussung der Immunantwort ist entweder die Unterdrückung ungewollter Immunantworten bei Autoimmunität, Allergie und Transplantatabstoßung oder aber die Stimulierung eines Immunschutzes bei Krankheiten, die sich heute noch weitgehend der Immunabwehr entziehen. Schon seit langem denkt man über Möglichkeiten nach, wie man die hochwirksamen, spezifischen Mechanismen der adaptiven Immunität zur Zerstörung von Tumoren einsetzen kann. [26]

1.1.1 Autoimmunkrankheiten

Das Hauptziel der Immuntherapie von Autoimmunkrankheiten besteht in einem gezielten Eingriff, um die Toleranz gegenüber den betreffenden Autoantigenen wiederherzustellen. Dazu wird gegenwärtig ein experimenteller Ansatz verfolgt. Man identifiziert bestimmte MHC (Haupthistokompatibilität)-Moleküle der Klasse I oder II, die für die Präsentation der Autoantigenpeptide verantwortlich sind, und versucht, ihre Funktion durch Antikörper oder blockierende Peptide selektiv zu hemmen. [26]

1.1.2 Tumor

Ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie ist die Verstärkung der Immunogenität (Auslösen einer adaptiven Immunantwort) von Tumoren. Man weiß, dass kostimulierende Signale für die Proliferation von T-Lymphozyten erforderlich sind. Diese erhalten die T-Zellen durch kostimulierende Moleküle, die an der Oberfläche von antigenpräsentierenden

Zellen exprimiert werden und an das T-Zell-Oberflächenmolekül CD28 binden. Ein Tumor, der keine kostimulierenden Moleküle exprimiert, induziert auch keine Immunantwort. Dies ist selbst dann nicht der Fall, wenn Tumorabstoßungsantigene exprimiert werden. Tumorabstoßungsantigene sind Peptide, die auf der Oberfläche der Tumorzellen an MHC exprimiert werden und eine tumorzellspezifische T-Zell-Antwort induzieren. Für die Aktivierung von naiven CD8-T-Zellen zu zytotoxischen CD8-T-Zellen sind demnach kostimulierende Moleküle Voraussetzung. Der Tumor wächst daher in normalen Mäusen weiter und tötet schließlich das Wirtstier. Transfiziert d.h. schleust man ein Gen für ein kostimulierendes Molekül in solche Tumorzellen ein, erhalten Tumorabstoßungsantigen-spezifische CD8-T-Zellen nun sowohl ein Signal, dass ein Antigen erkannt wurde, als auch ein zweites Signal, das zur Aktivierung der naiven T-Zelle nötig ist, von derselben Zelle. Sie können daher aktiviert werden. Den gleichen Effekt erzielt man durch eine Transfektion des Tumors mit dem Gen für GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor), das für die Anlockung und Differenzierung von Vorläufern von dendritischen Zellen verantwortlich ist. [26] Bei beiden Verfahren, die bei Mäusen erprobt wurden, entstehen T-Gedächtniszellen, also Lymphozyten, die bei erneutem Kontakt mit dem Antigen, das sie ursprünglich aktiviert hat, schnell mit einer Immunantwort reagieren. Durch die mittels Transfektion erreichte Aktivierung der Tumorabstoßungsantigen-spezifischen CD8-Zellen kommt es auch zu einer Abstoßung der Tumorzellen, die nicht mit einem Gen für kostimulierende Moleküle oder GM-CSF transfiziert wurden. [26]

1.1.3 Infektion

Der empirische Ansatz für die Bekämpfung von Infektionen ist in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts einem eher rationalen Ansatz auf der Grundlage eines detaillierten molekularen Verständnisses der Pathogenität von Mikroorganismen, der Analyse von Schutzreaktionen des Wirts auf die pathogenen Keime und der Kenntnis der Regulation des Immunsystems gewichen, um wirkungsvolle Reaktionen von T- und B-Lymphozyten zu erzeugen. Bis heute ist die Impfung die erfolgreichste Manipulation des Immunsystems. Dennoch gibt es noch keine wirksamen Schutzimpfungen gegen viele bedeutsame Infektionskrankheiten. Die Immunogenität eines Impfstoffes hängt unter anderem von den zugefügten Adjuvantien ab.

Diese werden als Substanz definiert, die die Immunogenität von Antigenen erhöhen, da gereinigte Antigene für sich allein genommen nicht in allen Fällen ausreichend immunogen sind. Die meisten (oder sogar alle) Adjuvantien tragen direkt oder indirekt dazu bei, die zur Auslösung der Immunantwort benötigten antigenpräsentierende Zellen, besonders dendritische Zellen, zu aktivieren. [26]

1.2 Charakteristik dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen, die angeborene und erworbene Immunität verbinden. [6] Sie stellen ein Bindeglied zwischen Organismus und Umwelt sowie dem lymphatischem Gewebe dar. Die DCs (Dendritische Zellen) sind in einzigartiger Weise zur Erkennung und Aufnahme von Pathogenen geeignet, sowie für die Prozessierung von makromolekularen Antigenen zu Peptiden. Zusätzlich können DCs inaktive T-Zellen zu zytotoxische T Lymphozyten (CTL) beziehungsweise T-Helfer Zellen aktivieren. Zur Aktivierung der inaktiven T-Zellen müssen DCs selbst erst aktiviert werden, um sich zu differenzieren. Dabei durchlaufen sie drei Entwicklungsstadien und werden entsprechend als unreife, reife oder apoptotische DCs bezeichnet.

Die unreifen DCs weisen eine schwache Expression der kostimulierenden Moleküle (CD 80 = B 7.1, CD 83 und CD 86 = B 7.2), ein gut organisiertes Zytoskelett und eine langsame Mobilität auf. Zusätzlich sind sie sehr effizient bei der Aufnahme der Antigene und bei der Prozessierung von löslichen Proteinen. In diesem Stadium befinden sich die meisten MHC (Haupthistokompatibilität)-Klasse-II-Moleküle mit einer schwachen allostimulatorischen Fähigkeit innerhalb der zytoplasmatischen Kompartimente. [67]

Die Reifung der DCs ist charakterisiert durch eine starke Änderung der MHC-Klasse II-Verteilung, eine Reduktion der Kapazität der Antigenprozessierung [53], eine starke Expression der kostimulierenden Moleküle [22] und durch eine ausgeprägte Veränderung des Adhäsionsmolekülmusters, das die Wanderung von DCs zu Lymphknoten veranlasst. [46] Die phänotypische Reifung der DCs, die durch eine Depolymerisation von F-Aktin und durch Verlust von Vinkulin begleitet ist, kann durch Mikroben, Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine sowie Tumornekrosefaktor α und Interleukin (IL)- 1β veranlasst werden. [66] Diese

funktionelle Reifung endet durch den apoptotischen Zelltod, eine Rückkehr zu den unreifen Phänotypen wurde nicht beobachtet. [67]

1.3 Antigenpräsentation

DCs internalisieren extrazelluläre Antigene durch Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. Anschließend werden die Antigene durch das Proteasom bzw. Lysosom gespalten. Peptide aus extrazellulären Antigenen werden dann bereits in den endophagosomalen Vesikeln auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. [49] Diese Peptide können gemeinsam mit MHC-Klasse-II-Molekülen CD 4-T-Zellen aktivieren, sobald sie an der Oberfläche exprimiert werden. [41, 63] Naive T-Zellen reagieren zuerst auf ihre spezifischen Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexe, indem sie IL (Interleukin)-2 synthetisieren und proliferieren. Diese Zellen entwickeln sich dann zu einem Zelltyp, den man als T_H0 bezeichnet und der einige Effektorfunktionen aufweist, die für T_H1 - und T_H2 -Zellen charakteristisch sind. Die T_H0 -Zelle kann sich entweder zu einer T_H1 - oder zu einer T_H2 -Zelle entwickeln. Werden T_H1 -Zellen gebildet, so kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort, während die überwiegende Produktion von T_H2 -Zellen eine humorale Immunität hervorruft. [24]

1.4 Cross-Präsentation

MHC-Klasse-I-Moleküle werden im allgemeinen mit Peptiden aus intrazellulären Antigenen, z. B. Tumorantigenen oder eingehüllten Virusproteinen, präsentiert, können aber auch mit extrazellulären Antigenen nach Internalisierung in die Zelle präsentiert werden. [10, 28, 62] Diese Präsentation der extrazellulären Antigene mit MHC-Klasse-I-Molekülen wird „Cross-Präsentation“ genannt. Die Präsentation von extrazellulären Antigenen mit MHC-Klasse-I-Molekülen durch APCs (Antigenpräsentierende Zellen) ist notwendig für die Induktion der Immunantwort gegen Transplantate, Tumore oder virus-infizierte non-hämatopoetische Zellen. [7, 20, 56] Zytotoxische CD 8-Zellen töten Zielzellen, die auf ihrer Zelloberfläche an MHC-Klasse-I-Moleküle gebundene Peptidfragmente von Pathogenen aus dem Zytosol, hauptsächlich Viren, tragen. [23]

Die Präsentation der aus extrazellulären Antigenen stammenden Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle geschieht auf folgende Weise. [44, 65] Internalisierte Antigene verlassen die Endosomen und gelangen in das Zytosol. Diese Antigene werden ins Zentrum des Proteasoms geleitet und dort zu kurzen Peptiden verarbeitet. Diese kurzen Peptide werden mit Hilfe der TAP (Transporters associated with Antigen Processing)-1- und TAP-2-Transporter aktiv vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Der TAP1:TAP2-Komplex ist ein ATP (Adenosyltriphosphat) - abhängiger Peptidtransporter und besitzt vier Domänen - zwei hydrophobe Transmembrandomänen mit jeweils mehreren Transmembranregionen und zwei ATP-bindende Domänen. Beim Menschen lagern sich neu synthetisierte MHC-I- α -Ketten im endoplasmatischen Retikulum mit dem membrangebundenen Protein Calnexin zusammen. Wenn dieser Komplex an β_2 -Mikroglobulin (β_2m) bindet, löst sich das MHC-I- α : β_2m -Dimer von Calnexin und das partiell gefaltete MHC-I-Molekül bindet dann an den Peptidtransporter TAP, indem es mit einem Molekül des TAP-assoziierten Proteins Tapasin in Wechselwirkung tritt. Die Chaperonmoleküle Calretikulin und Erp57 (eine Proteindisulfidisomerase) tragen ebenfalls durch ihren Qualitätskontrollmechanismus der Zelle zu dem Komplex bei. Das MHC-I-Molekül wird im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten, bis es durch die Bindung an ein Peptid freigesetzt wird und dabei seine Faltung vollendet. Sobald das Peptid an das MHC-Molekül gebunden ist, verlässt der Peptid:MHC-Komplex das endoplasmatische Retikulum und wird dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. [25] Kürzlich wurde nachgewiesen, dass Phagosomen mit dem endoplasmatischen Retikulum fusionieren, kurz nachdem sie Peptide aufgenommen haben oder während sie diese aufnehmen. Die durch das Proteasom verarbeiteten Peptide werden via TAP-Komplex in das Lumen desselben Phagosoms transportiert, bevor diese Peptide an phagosomalen MHC-Klasse-I-Moleküle binden. [18]

1.5 Antikörper-vermittelte Internalisierung über den Fc γ -Rezeptor in DCs

Dendritische Zellen können aufgrund der Expression von Fc-Rezeptoren Antigen-Antikörper-Komplexe (Immunkomplexe) aufnehmen und den T-Zellen antigene Peptide präsentieren. Bei der Antigenpräsentation durch einen Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex nach Internalisierung

von Antigen-IgG-Komplex spielen Fc γ (fragment crystallizable γ)-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Maus-DCs exprimieren alle drei Hauptklassen von Fc γ -Rezeptoren. (Fc γ RI, Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb2, Fc γ RIII) [44] Die Fc γ -Rezeptoren binden die Fc-Domäne von IgG-Molekülen. Das Fc-Fragment ist ein Teil des IgG-Antikörpers und wird durch das Enzym Papain von IgG gespalten. Für die „Cross-Präsentation“, bei der extrazelluläre Antigene durch MHC-Klasse-I-Moleküle den CTLs (zytotoxische T-Lymphozyten) präsentiert werden, sind Proteasome, TAP-Transporter und Fc γ -Rezeptoren nötig. Die „Cross-Präsentation“ nach der Aufnahme von Immunkomplexen in DCs benötigt eine mit Fc γ -Rezeptor assoziierte γ -Kette, die eine Sequenz ITAM (Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren: immunoreceptor tyrosin-based activation motif) enthält. [4, 9]

1.6 Induktion der Immunantwort

Dendritische Zellen sind die effektivsten Antigen präsentierenden Zellen (APCs), die für die Aktivierung der naiven T-Zellen und die primäre Antigen-abhängige T-Zell-Antwort verantwortlich sind. [58] Die Antigenrezeptoren von T-Zellen erkennen die Komplexe aus Peptiden des Pathogens und einem daran gebundenen MHC-Molekül auf der Oberfläche einer Zielzelle. Die Erkennung ist vermittelt durch einen TCR (T-Zell-Rezeptor), der für eine bestimmte Peptid-MHC Kombination spezifisch ist. Zwei wichtige Untergruppen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen lassen sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 und durch die zwei Klassen von MHC-Molekülen, die sie erkennen, unterscheiden. CD4 bindet an das MHC-II-Molekül, während CD8 das MHC-I-Molekül erkennt. Bei der Antigenerkennung assoziieren je nach T-Zell-Typ CD4-oder CD8-Moleküle auf der T-Zell-Oberfläche mit dem TCR und binden an unveränderliche Stellen auf dem MHC-Teil des MHC-Peptid-Komplexes. Die Peptide, die mit MHC-Klasse-I präsentiert werden, haben eine einheitliche Länge und eine spezifische Aminosäuresequenz. Die Länge und die Aminosäuresequenz sind abhängig von jeweiligen MHC-Allelen. [12] Ein auf H-2K^b (MHC-Klasse-I-Molekül bei C57BL/6-Maus-DCs) beschränktes Epitop besteht aus 8 Aminosäuren, wobei die zweite und achte Aminosäure als Verankerungsreste fungieren. Ein exemplarisches Epitop ist das SIINFEKL, das einen Teil des Ovalbumins darstellt. [48]

Um ein effizientes Priming von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) zu erreichen, brauchen DCs ein Signal für die Reifung. *In vitro* kann eine Fc γ -vermittelte Internalisierung von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen eine Reifung von DCs hervorrufen. Unabhängig von CD4-T-Zellen können DCs aufgrund der durch Immunkomplexe induzierten Reifung Peptid-spezifische CD8-T-Zellen (CTLs) *in vivo* aktivieren. DCs, die mit einem Ovalbumin (OVA)-Anti-OVA-Immunkomplex inkubiert wurden, konnten nicht nur CD8-T-Zellen (CTLs) gegenüber extrazellulären Antigenen aktivieren, die nicht aus OVA stammten, sondern auch gegenüber aus OVA stammenden CTL-Epitopen. [54]

2 Untersuchungsziel

Ziel der experimentellen Untersuchungen war es zu untersuchen

- ob man durch Antikörper-vermittelte Aufnahme von Immunkomplexen in BMDCs („bone marrow derived dendritic cells“: Dendritische Zellen aus dem Knochenmark) die „Cross-Präsentation“ verstärken kann und
- wenn ja, welche Antikörperklasse (IgG1, IgG2a, IgG3 und IgE) als Immunkomplex mit OVA-DNP die stärkste Cross-Präsentation bei BMDCs aufweist.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse-DCs aus dem Knochenmark gewonnen. Diese BMDCs sollten nach dem Kultivierungsschritt einen unreifen Phänotyp sowie nach Inkubation mit LPS (Lipopolysaccharid) den reifen Phänotyp aufweisen. Für die Herstellung von verschiedenen Immunkomplexen, wurden zunächst monoklonale Antikörper, die von Hybridomen produziert wurden, aufgereinigt und quantitativ mit Hilfe von ELISA sowie qualitativ mit Hilfe eines modifizierten Immunblots und einer Gelelektrophorese gemessen. Diese gereinigten Antikörper sollten anschließend mit Antigen inkubiert werden. Die Internalisierung der Antigene bzw. der Immunkomplexe in DCs sollte in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer Durchflusszytometrie analysiert werden. Durch den Nachweis der MHC-Klasse-I-Moleküle und SIINFEKL an der Oberfläche der DCs durch eine FACS-Analyse (mit 25.D1.16 - ein monoklonaler Antikörper) sowie durch einen Präsentationsassay mit Hilfe der B3Z-Zellen sollte die „Cross-Präsentation“ nachgewiesen werden. [29]

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Protein G Sepharose HP zur Aufreinigung der Antikörper [MabTrap Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg]
- SDS-PAGE zur Elektrophorese [Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Fa. Novex, San Diego, USA]
- GelCode[®] Blue Stain Reagent zum Anfärben des SDS-PAGE Gels [Pierce Chemical Company, Rockford, USA]
- FluoReporter[®] FITC Protein Labeling Kit zur Kopplung von OVA-DNP an FITC [Molecular Probes, Eugene, USA]
- Maus-IgG ELISA-Kit zur Konzentrationsbestimmung von monoklonalen Antikörpern der Maus in Hybridoma-Überständen [Roche Molecular Biochemicals, Mannheim]

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen verwendet:

Fa. Gibco BRL (Berlin), Sigma (Deisenhofen),
Merck (Darmstadt), Fa. Roche (Mannheim)

Verbrauchsmaterial stammte von den folgenden Firmen:

Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürnberg),
Falcon (Becton Dickinson, Plymouth, England)

3.2 Methoden

3.2.1 Aufreinigung der Antikörper (IgG1, IgG2a und IgG3)

3.2.1.1 Vorbereitung für Aufreinigung

Zusammensetzung des Kits:

- Bindungspuffer 50 ml
- Elutionspuffer 15 ml
- Neutralisierender Puffer 25 ml
- HiTrap Protein G HP : Aufreinigungssäule

Der Bindungspuffer wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt, der Elutionspuffer im Verhältnis 1:10. Eine Probe, die serumfreies Medium und Antikörper enthielt, wurde mit dem verdünnten Bindungspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, um die Bindungskapazität zu erhöhen. Ein Sammelröhrchen wurde pro 1 ml eluierter Fraktion mit 100 µl neutralisierendem Puffer versehen, d.h. in vorliegendem Fall mit 500 µl neutralisierendem Puffer.

3.2.1.2 Aufreinigung

Die Aufreinigungssäule wurde zunächst mit 5 ml destilliertem Wasser gespült, indem man diese an beiden Enden öffnete und an eine mit destilliertem Wasser gefüllte Spritze anschloss. Dieser Vorgang diente der Reinigung der Säule von vorhandenem Ethanol. Die Säule wurde dann mit 5 ml Bindungspuffer gefüllt. Anschließend wurden die Probe und zusätzlich noch einmal 5 ml Bindungspuffer in die Säule gegeben. Daraufhin wurde die Säule mit 5 ml Elutionspuffer gespült, um dann die so gewonnene Fraktion in einem vorbereiteten Sammelröhrchen zu sammeln. Abschließend wurde die Säule mit 10 ml 20% Ethanol zur Lagerung konditioniert.

3.2.1.3 Änderung des Kulturmediums zur Produktion der monoklonalen Antikörper

Wir verwendeten drei verschiedene Zellhybridome, die folgende monoklonale Antikörper produzieren : Anti-DNP-IgG1, Anti-DNP-IgG3 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Waxman, University of Oklahoma, USA) und Anti-DNP-IgG2a (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Zelig Eshhar, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Zusätzlich verwendeten wir gereinigtes Anti-DNP-IgE von der Fa. Sigma, Deisenhofen. Die Zellhybridome zeigten Probleme im Wachstum nachdem sie eingefroren und wieder aufgetaut worden waren. Nicht alle Zellhybridome produzierten monoklonale Antikörper in suffizienter Menge. Deshalb wurde die Zusammensetzung des Kulturmediums zur Produktion der monoklonalen Antikörper in folgende Weise verändert. Zunächst wurden die Zellhybridome in einem Kulturmedium angezüchtet. Dieses Kulturmedium enthielt 500 ml RPMI 1640 (enthält Hepes und Glutamin), 50 ml inaktiviertes FCS (fötales Kälberserum, entspricht 10%), 5 ml Natriumpyruvat (100 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (5000 Units/ml) und 250 µl β-Mercaptoethanol (0,1 M).

Nachdem die Hybridome angewachsen waren, wurden sie in serumfreies Medium umgesetzt, die Konzentration von FCS verändert und gleichzeitig nach folgendem Schema Nutridoma-SP (Roche) zugegeben:

- RPMI 1640 + 2,5% FCS + 1% Nutridoma-SP für 2 Tage
- RPMI 1640 + 1% FCS + 1% Nutridoma-SP für 2 Tage
- RPMI 1640 + 0% FCS + 1% Nutridoma-SP

Unter diesen serumfreien Wachstumsbedingungen produzierten alle Hybridome Antikörper in ausreichender Menge.

3.2.2 Gelelektrophorese

3.2.2.1 Testprinzip

Eine häufige Methode, Proteine zu analysieren, ist die Polyacrylamidelektrophorese (PAGE), die durch das starke ionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) eine negative Ladung erhalten. Das Verfahren wird als SDS-PAGE abgekürzt. SDS bindet gleichmäßig an Proteine

und verleiht ihnen eine negative Ladung, die das Molekül im elektrischen Feld durch das Gel wandern lässt. Die Geschwindigkeit ist vor allem von der Proteingröße bestimmt.

3.2.2.2 Probenvorbereitung

Die Proben (Protein) wurden folgendermaßen aufbereitet:

31,0	µl	Probe
12,5	µl	NuPage Sample Buffer [Novex]
5,0	µl	NuPage (10x) Reducing Agent [Novex]
1,5	µl	Aqua dest.(A.d.)

werden zusammenpipettiert und anschließend für 10 min bei 70°C erhitzt.

Der Elektrophoresepuffer (MOPS SDS-Running Buffer [Novex]) wurde im Verhältnis 1:20 mit A.d. verdünnt (1x Running Buffer). 200 ml des 1x Running Buffers wurden mit 500 µl NuPage Running Buffer Antioxidant gemischt. Nun wurde die benötigte Gelkassette (NuPage Bis-Tris-HCL gepufferte pH 6,4 Polyacrylamidgele) mit A.d. gespült, Kamm und Klebestreifen entfernt und die Geltaschen dreimal mit 1x Running Buffer gespült.

3.2.2.3 Gelelektrophorese

Das Gel wurde in die Elektrophorese-Einheit eingesetzt und die 200 ml 1x Running-Buffer + 500 µl Antioxidant in die innere Kammer eingefüllt. Daraufhin folgte das Laden der Geltaschen mit den vorbereiteten Proben. Pro Tasche wurden 25 µl Probe bzw. 3 µl Standard einpipettiert. Nun wurde der restliche 1x Running-Buffer in die äußere Kammer gefüllt und die Elektrophorese-Einheit angeschlossen. Die Elektrophorese lief bei 200 V für ca. 40 min.

3.2.2.4 Anfärben des Gels

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Wasch-Schale dreimal mit A.d. jeweils 5 min durch leichtes Schütteln gewaschen. Anschließend wurde das Gel in das Tablett mit 20 ml GelCode[®] Blue Stain Reagent eingelegt und für ca. 1 h durch leichtes Schütteln angefärbt.

Die Anfärbung wurde durch Nachwaschen mit A.d. für ca. 1 h unter leichtem Schütteln besser sichtbar gemacht. Daraufhin wurden die durch die Farbstoffe angefärbten Proteinbanden zur Archivierung unter Tageslicht fotografiert.

3.2.2.5 Trocknen des Gels

Das Gel wurde über Nacht bei 4°C gelagert und mit Hilfe von 2 durchsichtigen Plastikfolien und Spannrahmen getrocknet. Beim Spannen wurde besonders darauf geachtet, Blasenbildung möglichst zu vermeiden, um ein Zerreißen des Gels nach dem Trockenvorgang zu verhindern.

3.2.3 Isolierung Dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark

3.2.3.1 Vorbereitung des Kulturmediums

500 ml RPMI 1640 (enthält Hapes und Glutamin) wurde ergänzt mit 50 ml inaktiviertem FCS (fötale Kälberserum), 5 ml Natriumpyruvat (100 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (5000 Units/ml) und 250 µl β-Mercaptoethanol (0,1 M).

3.2.3.2 Durchführung der Isolierung von DCs

DCs wurden aus dem Knochenmark von 6-8 Wochen alten Mäusen (C57BL/6, Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) isoliert. Nach operativer Entfernung aus der durch Genickbruch getöteten Maus wurden Femur, Humerus und Tibia in ein komplett mit Kulturmedium gefülltes Röhrchen gegeben und sofort bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer Schere bzw. Pinzette wurden Sehnen und Muskeln entfernt. Die Knochen wurden für 1 min in einer mit 70% Alkohol gefüllten Petrischale gesäubert, um sie anschließend in eine vollständig mit Kulturmedium gefüllte Petrischale zu geben. Ab diesem Schritt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis (4°C) unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Arbeitsbank durchgeführt. Dann wurden die beiden Epiphysen der Knochen mit Hilfe einer Schere bzw. Pinzette eröffnet, um das Knochenmark mit einer mit Kulturmedium komplett gefüllten Spritze durchzuspülen. Dieser in einem Röhrchen (Falcon) aufgefangene Knochenmarkinhalt wurde nun für 4 min mit 1.400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde mit einer Kapillare abpipettiert ohne das Zellpellet zu lösen. Das Pellet wurde daraufhin mit 1 ml NH₄Cl für 2 min durchmischt, um die darin enthaltenen Erythrozyten zu lysieren und anschließend mit Kulturmedium aufgefüllt und für 4 min mit 1.400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum mit einer Kapillare abpipettiert. Das Pellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, in einen Filter (70 µm²) gegeben und in einem Röhrchen (Falcon) aufgefangen. Es wurde für 4 min mit 1.400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet erneut in 5 ml Kulturmedium resuspendiert.

3.2.3.3 Zellzählung

Die so gewonnenen Zellen wurden mit Methylenblau in einer Konzentration von 1:20 verdünnt und angefärbt, um die Zellen mikroskopisch zu zählen. Die Zählung der Zellen wurde durch Doppelbestimmung auf Genauigkeit überprüft. Zur Rechnung der Zellzahlen wurden Verdünnungsfaktor, Volumen und Kammerfaktor (10.000) berücksichtigt.

Wichtig zu erwähnen ist, dass alle Arbeitsschritte auf Eis (4°C) durchgeführt wurden und sämtliche Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen an der Bench ausgeführt wurden, um das Risiko einer Kontamination so gering wie möglich zu halten.

3.2.4 Kultivieren von DCs

Die Zellen wurden in einer mit 20 ml Kulturmedium gefüllten Flasche (Falcon) mit einer Konzentration von 200 U/ml Maus rG-CSF (rekombinanter Granulozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor, TEBU-bio GmbH, Offenbach) bei 37°C, 95% H₂O und 5% CO₂ inkubiert. Die Flasche wurde liegend gelagert, damit nicht adhaesiv wachsende DCs selektiert werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette in ein Röhrchen (Falcon) überführt, um die Isolation von DCs oder den Mediumwechsel zu ermöglichen. Der Überstand wurde für 4 min mit 1.400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Kapillare abgesaugt, das Pellet in 20 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche (Falcon) gegeben. Anschließend wurden 4.000 U rG-CSF der Zellsuspension zugefügt und durchmischt. Abschließend wurde diese Flasche noch mal unter gleichen Bedingungen für 72 h inkubiert.

Danach enthielt der Überstand vorwiegend nicht gereifte DCs, deren Phänotyp – eine schwache Expression der kostimulierenden Moleküle (CD 80 = B 7.1, CD 83 und CD 86 = B 7.2) sowie der MHC-Klasse-II-Moleküle - mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) bestätigt wurde.

3.2.5 Antigen-Präsentationsassay

3.2.5.1 Vorbereitung

Wie unter 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben, wurden die gewonnenen unreifen DCs für 4 min mit 1400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 1 ml Kulturmedium durchmischt und anschließend die Konzentration dieser Zellsuspension wie in 3.2.3.3 beschrieben durch Zählung der DCs mikroskopisch bestimmt. Die genaue Menge der Zellsuspension konnte nun so berechnet werden, dass 250.000 Zellen in jede Vertiefung einer 96-Loch Platte gegeben wurden. Danach wurde eine jeweils berechnete Menge an Kulturmedium in jede Vertiefung einer 96-Loch Platte pipettiert, so dass nach Zugabe von OVA oder OVA-DNP [Ovalbumin-DNP, Biosearch Technologies, Inc.] bzw. OVA-Peptid 257-264 [SIINFEKL, Biosyntan GmbH, Berlin, Germany] ein Gesamtvolumen von 200 µl in jeder Vertiefung einer 96-Loch Platte erreicht wurde. Die B3Z-Zelle [freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Bauer, Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München] ist ein T-Zell-Hybridom, das mit dem LacZ-Gen transfiziert ist und H-2K^b mit dem Peptid 257-264 (SIINFEKL) von OVA erkennt. [51] Die B3Z-Zelle trägt eine β-Galaktosidase-Konstruktion, die durch einen Kernfaktor aktivierter T-Zellen (NFAT: nuclear factor of activated T-cells) vom Interleukin(IL)-2-Promotor reguliert wird. Erkennt die B3Z-Zelle durch den T-Zell-Rezeptor den SIINFEKL:H-2K^b-Komplex, wird die Synthese verschiedener Transkriptionsfaktoren induziert. Einer von diesen Faktoren ist NFAT, der mit einem kostimulierenden Signal die Synthese von IL-2 induziert. Dadurch wird LacZ aktiviert. Daraufhin zeigt sich eine kolormetrische Änderung der B3Z-Zellen, deren Extinktionsverhalten mit dem ELISA-Reader bestimmbar ist. Zur Messung der Extinktion wurde Chlorphenol Red-β-Galactosidase (CRBG) zugesetzt, die die Aktivität von LacZ vermittelt.

Der Z-Puffer 100 ml (Lyse- und Substratpuffer) wurde wie folgt angesetzt;

100 mM Mercaptoethanol	700 µl
9 mM MgCl ₂	910 µl
0,125% Nonidet P-40	125 µl
PBS (phosphate-buffered saline)	98,265 ml
jeweils frisch zugegeben:	
0,15 mM Chlorphenol Red-β-Galactosidase (CRBG) aus 15 mM Stock	1:100

3.2.5.2 Durchführung des Präsentationsassays

250.000 DCs je Well einer 96-Well Rundbodenplatte wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben mit OVA oder OVA-DNP bzw. mit SIINFEKL in einem Gesamtvolumen von 200 µl pipettiert. DCs mit OVA oder OVA-DNP wurden für 18 Stunden bei 37°C, 95% H₂O und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und DCs mit SIINFEKL für 4 Stunden unter gleichen Bedingungen. Daraufhin wurde die Rundbodenplatte für 4 min mit 1.400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut mit 200 µl Kulturmedium gewaschen, woraufhin sich nochmals ein Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingung anschloss. Der Überstand wurde erneut verworfen. In jedes Well wurden 50.000 B3Z-Zellen in 200 µl mit dem Zellpellet durchmischt. Anschließend wurde die Rundbodenplatte, um einen guten Kontakt dieser beiden Zelltypen zu erreichen, für 4 min mit 1400 U/min bei 4°C zentrifugiert und zwischen 12 und 18 h (je nach Versuchsansatz) über Nacht bei 37°C, 95% H₂O und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Platten erneut für 4 min mit 1400 U/min bei 4°C zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand erneut verworfen. Zum Zellpellet wurde jeweils 150 µl Z-Puffer gegeben, woraufhin alles gut durchmischt und für 8 bis 12 h bei 37°C, 95% H₂O und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert wurde. Im ELISA-Reader wurde die Extinktion bei 570 nm (Referenz 650 nm) gemessen, um unterschiedliche Reaktionen von DCs mit OVA oder OVA-DNP bzw. SIINFEKL mit Kontrollversuchen vergleichen zu können.

3.2.6 Kopplung von OVA-DNP an Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)

3.2.6.1 Vorbereitung

Es wurde das FITC Protein Labeling Kit der Firma Pierce verwendet, das folgende Komponenten enthält:

- Komponente A (Jedes Fläschchen enthält 500 µg reaktive FITC Farbstoffe)
- Komponente B (Dimethylsulfoxid: DMSO)
- Komponente C (Reaktionsröhrchen)
- Komponente D (Schleudersäule, die Resin (Gelfiltrationsmatrix mit einem Ausschlussmolekulargewicht von 30.000 Da) in PBS (phosphate-buffered saline) mit 2 mM Natriumacetat enthält)
- Komponente E (Sammelröhrchen)
- 1 M Natriumbikarbonatpuffer, pH 9

Es wurden 200 µl von der Protein-Lösung (OVA-DNP) in einer Konzentration von 1-10 mg/ml im PBS-Puffer für jede Kopplungsreaktion benötigt.

3.2.6.2 Kalkulation der benötigten Komponente A

Für jede Konjugationsreaktion ist die Menge der Komponente A abhängig von der Konzentration der Protein-Lösung (OVA-DNP).

$$\mu\text{l Stocklösung von Komponente A} = \frac{\text{mg/ml Protein} \times 0,2 \text{ ml}}{\text{MG}_{\text{Protein}}} \times 389 \times 100 \times \text{MR}$$

- 0,2 ml ist das Volumen der Proteinlösung
- 389 ist das Molekulargewicht (MG) von Komponente A
- 100 ist ein Einheit-Umrechnungs-Faktor
- MG für OVA-DNP ist ~60.000 Da

- MR ist die molekulare Ratio von Komponente A zum Protein in Reaktionsmischung
Eine MR = 40 wurde vom Hersteller empfohlen.

3.2.6.3 Konjugationsreaktion

In ein Reaktionsröhrchen wurden 200 µl Protein-Lösung pipettiert. Dazu wurden 20 µl einer 1 M Bikarbonat-Lösung zugegeben. Eine 10 mg/ml reaktive FITC-Farbstoff-Stocklösung wurde vorbereitet. Komponente A und B wurden bis zur Raumtemperatur erwärmt. Kurz vor dem Beginn der Reaktion wurden 50 µl DMSO in das Reaktionsröhrchen dazugegeben und mit einer Pipette gut durchmischt. Während des Schüttelvorgangs wurden 50 µl von der FITC-Stocklösung dazugegeben. Dieser Schüttelvorgang wurde für 1 h unter Lichtschutz durchgeführt.

3.2.6.4 Aufreinigung

Die Säule wurde in ein Sammelröhrchen eingesetzt und zum vollständigen Abfließen des Puffers für 3 min mit 1.100 U/min (mittels eines fixierten Winkelrotors) zentrifugiert. Dann wurde die Probe tropfenweise in die Mitte der Schleudersäule gegeben, wo sie vom Gel absorbiert wurde. Diese Schleudersäule wurde ins Sammelröhrchen eingesetzt und für 5 min mit 1.100 U/min zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt enthielt das Sammelröhrchen das markierte Protein in ca. 200-250 µl PBS mit 2 mM Natriumacetat.

3.2.7 ELISA zum Nachweis von murinen Immunglobulinen

3.2.7.1 Testprinzip

Im ersten Schritt wird ein spezieller Fangantikörper adsorptiv an der Wand von Mikrotiterplatten gebunden. Dabei handelt es sich um per Immunabsorption gereinigtes, polyklonales Anti-Maus-Fcγ aus Schafen, dessen Zusammensetzung so ausgewogen ist, dass die IgG-Subklassen gleich gut erkannt werden. Nach Beschichtung mit dem Blockierungsreagenz wird mit der Antikörper-haltigen Lösung (z.B. Hybridoma-Überstand) inkubiert, wobei die zu messenden Antikörper an den an der Wand adsorbierten Wand-

Antikörper binden. Durch ein Peroxidase (POD)-markiertes, ausgewogenes Gemisch von Anti-Maus- λ - und Anti-Maus- κ -Antikörpern (immunsorbierte Fab-Fragmente) wird anschließend POD an das Maus-IgG fixiert. Bei Inkubation mit dem hochempfindlichen ABTS-Perborat-System entsteht durch Reaktion mit der fixierten Peroxidase ein dunkelgrüner Farbstoff. Die Auswertung erfolgt über eine Standard-Kurve.

3.2.7.2 Herstellung der Lösungen

- Fang-Antikörper-Lösung: 25 μ l Fang-Antikörper (eine Flasche von immunsorptiv gereinigtem, lyophilisiertem Anti-Maus-Fc γ aus Schaf in 0,5 ml bidest. Wasser) pro 1 ml Beschichtungs-Puffer (10 ml Natriumcarbonat-Puffer, 0,5 mol/l, und Natriumazid, 0,1%, mit bidest. Wasser auf 100 ml)
Der Wand-Antikörper wurde bei -15 bis -25°C aufbewahrt.
- Wasch-Lösung: 1 ml Tween 20 und 9 g NaCl in bidest. Wasser auf 1 l
Tween 20 wurde vor Gebrauch auf $15-20^{\circ}\text{C}$ erwärmt.
- Blockierungsreagenz: 25 ml Blockierungsreagenz-Konzentrat (Pulvergemisch bestehend aus einem proteolytisch aus Gelatine gewonnenen Peptidgemisch, Tris-HCl-Puffer und NaCl in 100 ml bidest. Wasser) wurde mit bidest. Wasser auf 250 ml (1:10) verdünnt.
- Standard-Lösung: Standard-Flasche (Monoklonaler Maus-IgG2a, per Immunabsorption gereinigt und lyophilisiert) wurde mit 500 μ l bidest. Wasser aufgefüllt und 30 min bei $15-25^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen und anschließend bei -15 bis -25°C aufbewahrt.
- Antikörper-Lösung (Probe): unverdünnt und etwa 1:100 bis 1:10000 mit Blockierungsreagenz verdünnt
- Konjugat-Verdünnung: 50 μ l Konjugat-Lösung (Konjugatgemisch (Anti-Maus- κ -POD und Anti-Maus- λ -POD) aus Schaf, F_{ab}-Fragmente und per Immunabsorption gereinigt in 1 ml bidest. Wasser gelöst) mit Blockierungsreagenz auf 1 ml Konjugat-Lösung, die Verdünnung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt.
- Substrat-Lösung: 1 ABTS-Substrat-Tablette in 5 ml Substrat-Puffer (eine Flasche mit Puffergemisch, bestehend aus Natriumperborat und Citronensäure/Natriumphosphat-Puffer)

- Standard-Verdünnung: Bei einer Konzentration des Standards von $c = 0,1 \text{ mg/ml}$
Standard-Verdünnungsreihe für Standardkurve

a) 1000 ng/ml (1:100) : 20 μl Standard	+ 1980 μl Puffer
b) 200 ng/ml (1: 5) : 200 μl Standardverdünnung a)	+ 800 μl Puffer
c) 100 ng/ml (1: 2) : 500 μl Standardverdünnung b)	+ 500 μl Puffer
d) 50 ng/ml (1: 2) : 500 μl Standardverdünnung c)	+ 500 μl Puffer
e) 25 ng/ml (1: 2) : 500 μl Standardverdünnung d)	+ 500 μl Puffer
f) 12,5 ng/ml (1: 2) : 500 μl Standardverdünnung e)	+ 500 μl Puffer
g) 6,25 ng/ml (1: 2) : 500 μl Standardverdünnung f)	+ 500 μl Puffer

Als Verdünnungspuffer wurde das Blockierungsreagenz verwendet. Die Standard-Verdünnungen wurden kurz vor Gebrauch hergestellt. Zu erwähnen ist, dass alle Bestimmungen zur besseren Aussage doppelt durchgeführt wurden.

3.2.7.3 Testdurchführung

Alle Inkubationsschritte wurden bei $15\text{-}25^\circ\text{C}$ ohne Schütteln durchgeführt. 50 μl Wand-Antikörper-Lösung wurde pro Vertiefung der Mikrotiterplatte einpipettiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Platte ausgeleert und Flüssigkeitsreste wurden durch kräftiges Klopfen auf ein sauberes, trockenes Tuch entfernt. Anschließend wurde 200 μl Wasch-Lösung pro Vertiefung ca. 15 sec inkubiert und durch Klopfen ausgeleert. Nach 2x wiederholtem Waschvorgang wurde 200 μl Blockierungsreagenz pro Vertiefung einpipettiert und für 15 min inkubiert. Daraufhin wurde analog zum oben beschriebenen Waschschrift gewaschen. Für die Reaktion mit dem Standard bzw. den Proben wurden 50 μl Antikörper-Lösung pro Vertiefung einpipettiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurde erneut nach den oben beschriebenen Bedingungen gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 50 μl Konjugat-Verdünnung einpipettiert, woraufhin sich ein erneuter einstündiger Inkubationsschritt anschloss. Nach einem gleichen Waschvorgang wurden daraufhin 50 μl Substrat-Lösung in jede Vertiefung einpipettiert und für 20 min inkubiert.

3.2.7.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels eines Microplate-Readers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm. Die Standardkurve wurde auf Einfachlogarithmuspapier aufgetragen (Extinktion versus log Konzentration), um die Konzentrationen der Proben an der Standardkurve bestimmen zu können. So wurden über ein Computerprogramm die rechnerisch aus der Standardkurve ermittelten Konzentrationen direkt ausgedruckt.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Antikörpern, die bereits an fluoreszierende Farbstoffe (FITC, Fluoresceinisothiocyanat; oder PE, Phycoerythrin) gekoppelt waren, für mindestens 30 min lichtgeschützt bei ca. 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS mit 1% FCS wurde anschließend für 10 min mit 1400 U/min bei 4°C zentrifugiert. Biotin-gekoppelte Antikörper wurden nach der Zentrifugation wiederum mit FITC- oder PE-konjugiertem Streptavidin für mindestens 30 min lichtgeschützt bei ca. 4°C inkubiert und anschließend mit PBS/FCS gewaschen. Die Analyse wurde mit einem FACScan Durchflusszytometer und der CELLQUEST Software durchgeführt.

Die an PE gekoppelten verwendeten Antikörper waren Anti-DX5 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Anti-CD80 (B 7-1, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Anti-CD86 (B 7-2, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Biotin-gekoppelte Antikörper wurden mit PE-konjugiertem Streptavidin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) inkubiert. Die FITC-gekoppelten Antikörper waren Anti-CD4 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Anti-CD3e (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Anti-B220 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Anti-CD8a (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Anti-CD11c (Integrin α_x -Kette, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Anti-I-A/I-E 2G9 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Anti-H-2K^b AF6-88.5 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) waren Biotin-gekoppelte Antikörper. Alle Antikörper stammten von der Firma PharMingen [Hamburg]. Für die FACS-Messung wurden 10 μl des jeweiligen Antikörpers zu den Zellen gegeben.

3.2.9 Messung der SIINFEKL:H-2K^b- Komplexe mittels Konfigurations-spezifischem Antikörper 25.D1.16

Die unreifen DCs, deren Zahl nach der Isolation aus dem Knochenmark mindestens 6×10^7 betrug, wurden nach 6 Kultivierungstagen, wie in 3.2.4 beschrieben, in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe wurde mit Lipopolysaccharid (LPS) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml für 24 Stunden bei 37 °C, 95% H₂O und 5% CO₂ inkubiert, die andere ohne LPS.

Anschließend wurden die beiden Gruppen in die 4 folgenden Fraktionen unterteilt:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1) DCs ohne Antigen | 2) DCs mit SIINFEKL |
| 3) DCs mit OVA | 4) DCs mit OVA-DNP |

Ein auf H-2K^b-beschränktes Epitop (SIINFEKL) wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml für 4 h bei 37°C, 95% H₂O und 5% CO₂ mit den unreifen und reifen DCs inkubiert. OVA und OVA-DNP wurden mit einer Konzentration von 30 µg/ml (≈ 333 mM) für 18 Stunden unter identischen Bedingungen mit den beiden Zellen inkubiert. Die Kultivierungszeit wurde so abgestimmt, dass alle Proben gleichzeitig für die Farbmarkierung zur FACS-Analyse bereit waren. Anschließend wurden die jeweiligen vorbereiteten Proben mit 300 µl monoklonalen Antikörper (IgG-Subtyp: 25.D1.16) und mit 20 µl FITC markierten Anti-Maus IgG1, wie unter den in 3.2.8 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 ELISA-Nachweis von murinem Hybridom IgG

Alle Versuche wurden mit Zellkulturüberstand von IgG-Subklassen-Anti-DNP und IgE-Anti-DNP in einem deutlichen Überschuss an Antikörper im Vergleich zu Antigen durchgeführt. Nachdem die Hybridome in serumfreiem Medium die Antikörper produzierten, wurden die monoklonalen Antikörper durch ELISA-Messungen quantitativ nachgewiesen. Außerdem wurden die monoklonalen Antikörper zu weiteren Versuchen in einer größeren Menge gereinigt.

Folgende Konzentrationen der einzelnen monoklonalen Antikörper im Zellkulturüberstand von Zellhybridomen wurden durchschnittlich gemessen:

- IgG1: 13,4 µg/ml
- IgG2a: 8,6 µg/ml
- IgG3: 0,5 µg/ml

4.2 Charakterisierung der LPS-vermittelten Reifung von isolierten dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Wir entnahmen Humerus, Femur und Tibia aus 6-8 Wochen alten Mäusen, um Vorläuferzellen der DCs aus dem Knochenmark zu gewinnen.

Folgende Zelltypen in der Präparationsphase wurden mittels FACS-Analyse nach Zugabe der im folgenden angegebenen Antikörper ausgeschlossen: B-Zellen (Anti-B220), T-Zellen (Anti-CD3e), CD4/CD8 (Anti-CD4 bzw. Anti-CD8a), NK-Zellen (Anti-DX5).

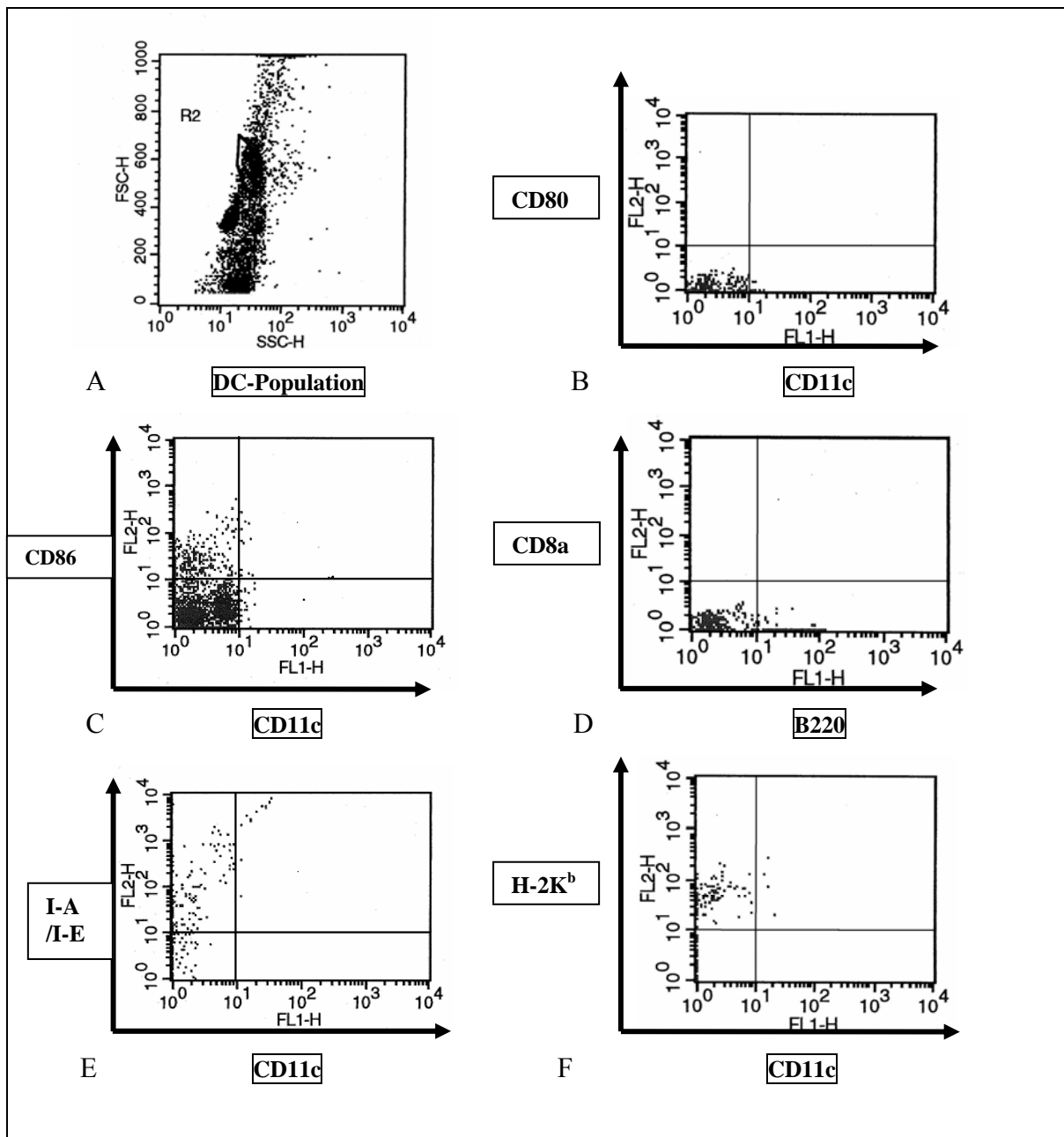


Abbildung 1 FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle der DCs nach Stimulierung mit LPS (0,1 mg/ml) zur Beurteilung der Reifung

A : Bestimmung der DC-Population

B : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

C : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

D : CD 8 (CD8a) + B-Zellen (B220)

E : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E) + Adhäsionsmoleküle (CD 11c)

F : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

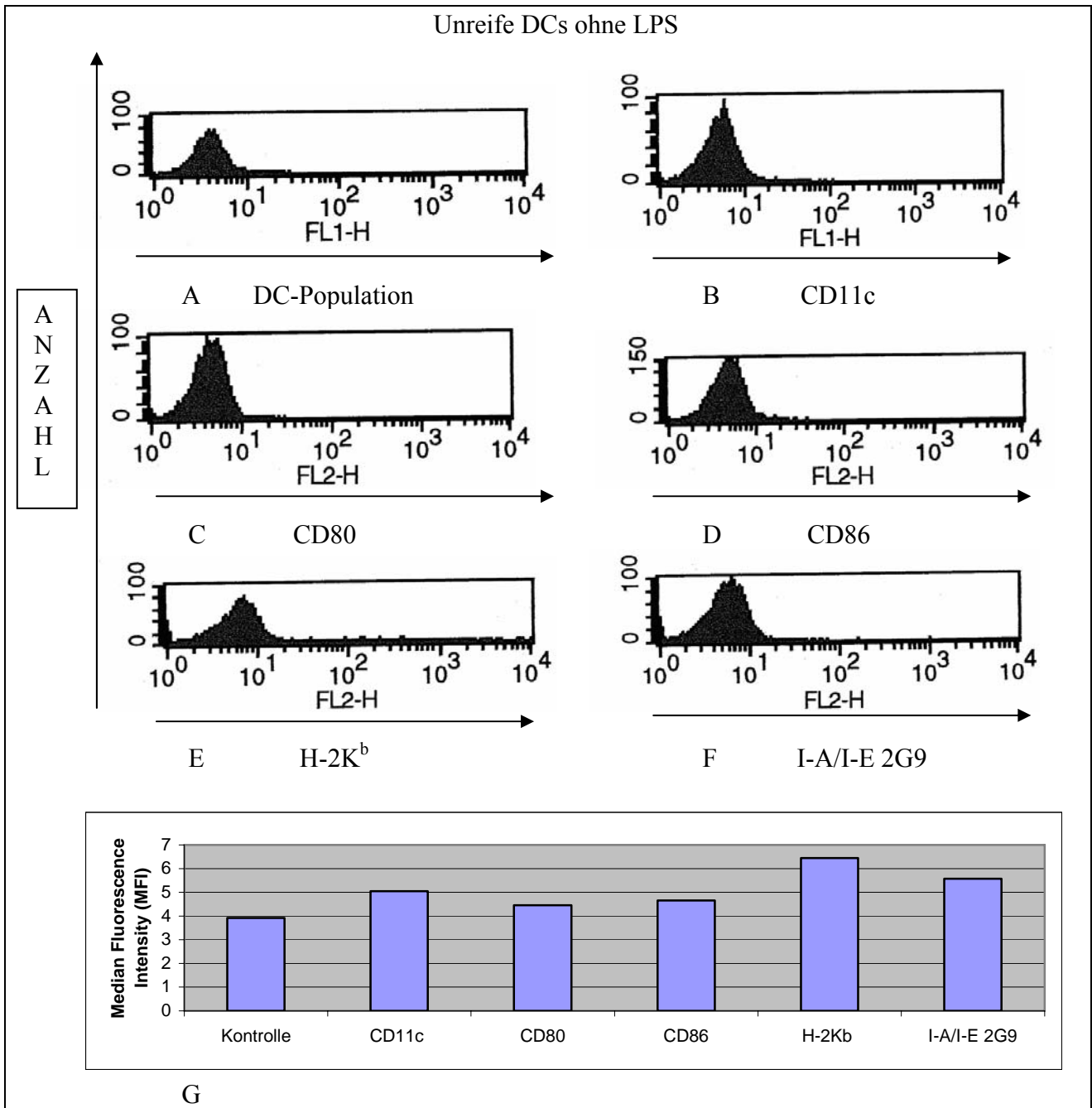


Abbildung 2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle der **nicht mit LPS stimulierten DCs** zur Beurteilung der Reifung und ihre grafische Darstellung anhand der Median Fluorescence Intensity (MFI)

- A : DC-Population (Kontrolle) B : Adhäsionsmoleküle (CD11c)
- C : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
- D : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
- E : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b) F : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
- G : Grafische Darstellung von 2A bis 2F anhand der Median Fluorescence Intensity

Die FACS-Analyse mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern zeigte, dass die DCs nach Stimulierung mit LPS eine verstärkte Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E; Abb. 1E) und MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b; Abb. 1F) aufwiesen. Ebenfalls eine verstärkte Expression fand sich bei den kostimulierenden Molekülen B 7.1 (CD80; Abb. 1B), B 7.2 (CD86; Abb. 1C) und dem Adhäsionsmolekül Integrin α_x (CD11c; Abb. 1B und 1C).

Im Versuch ohne Inkubation von LPS zeigte sich eine deutlich geringere Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle sowie der kostimulierenden Moleküle B 7.1 und B 7.2 (Abb. 2). Damit war festzustellen, dass die DCs nach der Inkubation mit LPS gereift waren.

4.3 Nachweis der SIINFEKL:H-2K^b- Präsentation in unreifen und reifen DCs

Dieser Versuch wurde aus folgenden Gründen mit Ovalbumin (OVA), Ovalbumin-Dinitrophenyl (OVA-DNP) und SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) durchgeführt. OVA sowie OVA-DNP wurden verwendet, da die immunogene Aktivität von OVA bei der H-2^b Maus ausreichend untersucht ist. Das SIINFEKL ist als ein MHC-Klasse-I bindendes Peptid identifiziert, das eine CTL-Antwort (Cytotoxische T-Lymphozyten) auslöst. [48] Zusätzlich wurde ein monoklonaler Antikörper, der selektiv an den H-2K^b-SIINFEKL-Komplex bindet, beschrieben (SIINFEKL-25.D1.16). Dieser erlaubt eine quantitative Messung von relevanten CTL-Epitopen auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen. [42]

Hier wurde untersucht, welche Unterschiede die unreifen und reifen DCs bei der Effektivität der Antigenprozessierung aufweisen und welche Antigene in die jeweiligen Zelltypen besser aufgenommen und mit H-2K^b (MHC-Klasse-I-Molekül) präsentiert werden können.

Abb. 3 und 4 zeigten, dass die reifen DCs ohne Antigen als Kontrolle eine höhere Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekül mit SIINFEKL (11,78%) aufwiesen als unreife DCs (1,90%). Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Präsentation der MHC-Klasse-I-Moleküle mit SIINFEKL zwischen unreifen DCs und reifen DCs (Abb. 3C und 3D). Die unreifen und reifen

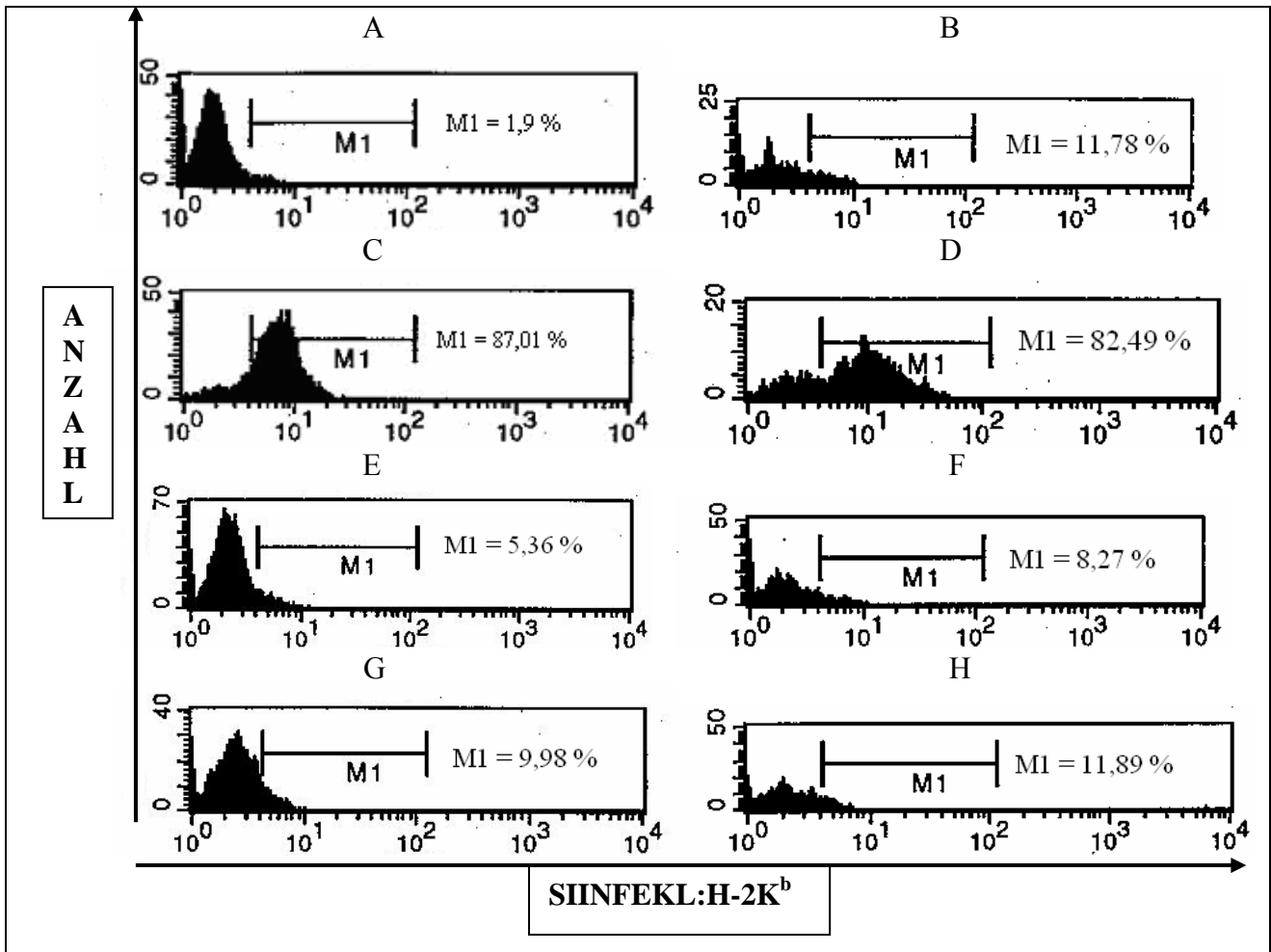


Abbildung 3 Die Grafik zeigt den **Nachweis von SIINFEKL:H-2K^b** gemessen mit Hilfe des **monoklonalen Antikörpers 25.D1.16** nach Inkubation mit unreifen DCs ohne Antigen (A), reifen DCs ohne Antigen (B), unreifen DCs mit SIINFEKL (C), reifen DCs mit SIINFEKL (D), unreifen DCs mit OVA (E), reifen DCs mit OVA (F), unreifen DCs mit OVA-DNP (G) und reifen DCs mit OVA-DNP (H).

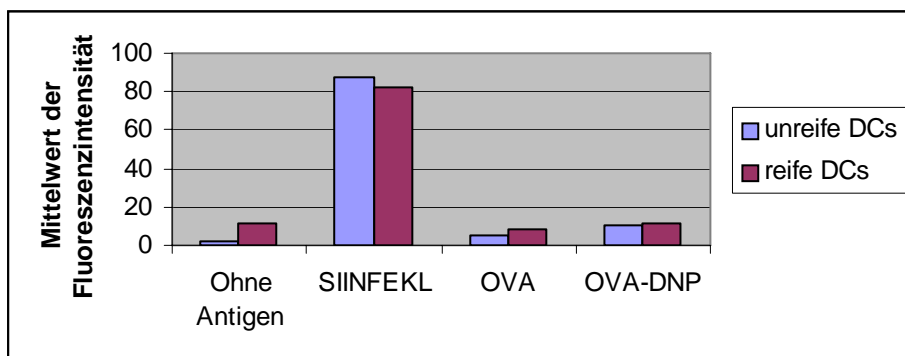


Abbildung 4 Graphische Darstellung der **Unterschiede der SIINFEKL:H-2K^b-Präsentation** nach Inkubation mit verschiedenen Antigenen bei unreifen und reifen DCs (aus der Abb. 3) anhand der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity).

DCs haben SIINFEKL (87,01% und 82,49%) sehr viel stärker an ihre MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und mit H-2K^b präsentiert als OVA (5,36% und 8,27%) und OVA-DNP (9,98% und 11,89%). Die unreifen und reifen DCs haben OVA-DNP geringfügig mehr präsentiert als OVA.

4.4 Antikörper-Isotyp-abhängige Aufnahme von OVA-DNP Immunkomplexen in murine DCs

Es wurde untersucht, welche Immunkomplexe (IC) der Anti-DNP Antikörper mit OVA-DNP zu einer gesteigerten Internalisierung führten.

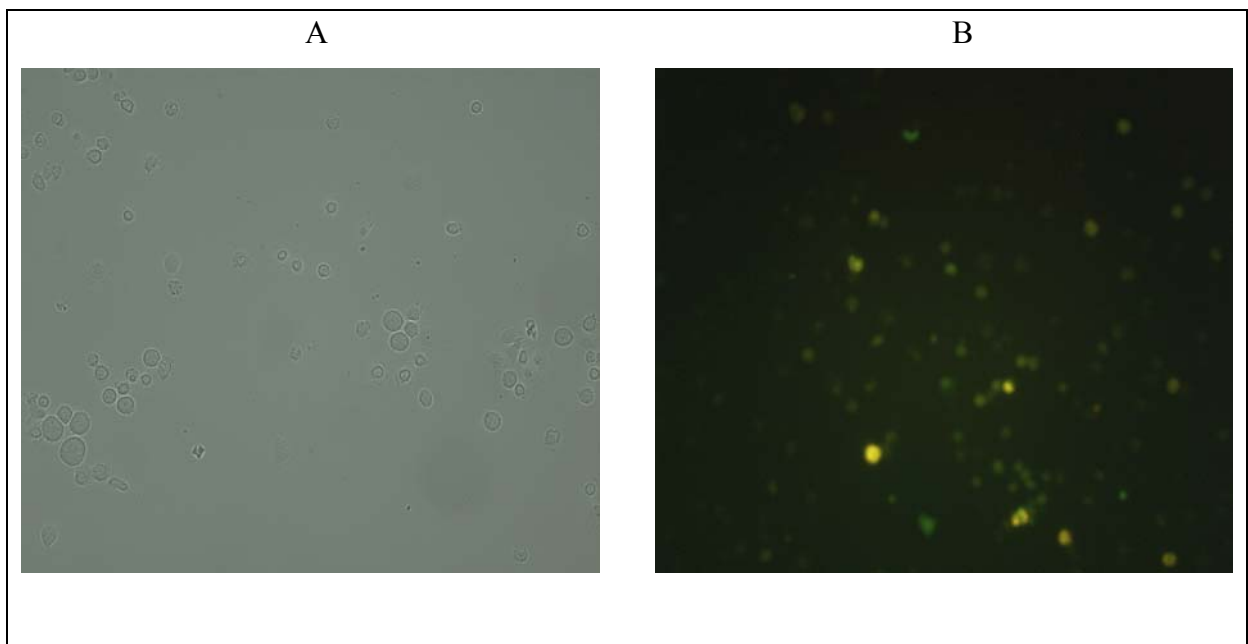


Abbildung 5 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der unreifen DCs mit OVA-DNP (A) und Darstellung der unreifen DCs mit an FITC gekoppeltem OVA-DNP mittels **Immunfluoreszenz** (B) in unterschiedlichen Feldern.

Dafür wurde OVA-DNP an FITC gekoppelt, damit die Fluoreszenz von FITC nach dem Internalisierungsvorgang mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen werden konnte. Zunächst wurde FITC-markiertes OVA-DNP (30 µg/ml) mit 1 ml Überstand der verschiedenen monoklonalen DNP-spezifischen Antikörper IgG1 und IgG2a sowie IgG3 und IgE inkubiert. Es wurde in einem deutlichen Überschuss an Antikörpern im Vergleich zu Antigen gearbeitet. Daraufhin wurden die unreifen kultivierten DCs mit den verschiedenen ICs, IgG1-Anti-DNP-,

IgG2a-Anti-DNP-, IgG3-Anti-DNP- oder IgE-Anti-DNP-OVA-DNP (an FITC gekoppelt) inkubiert. Anschließend wurden die vier verschiedenen Proben und eine Kontrollprobe (DCs mit nur OVA-DNP) mit PBS/FCS gewaschen und mikroskopisch fotografiert (Abb. 5 und 6). Danach wurde die Fluoreszenz von FITC bei den jeweiligen Proben mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen und analysiert (Abb. 7).

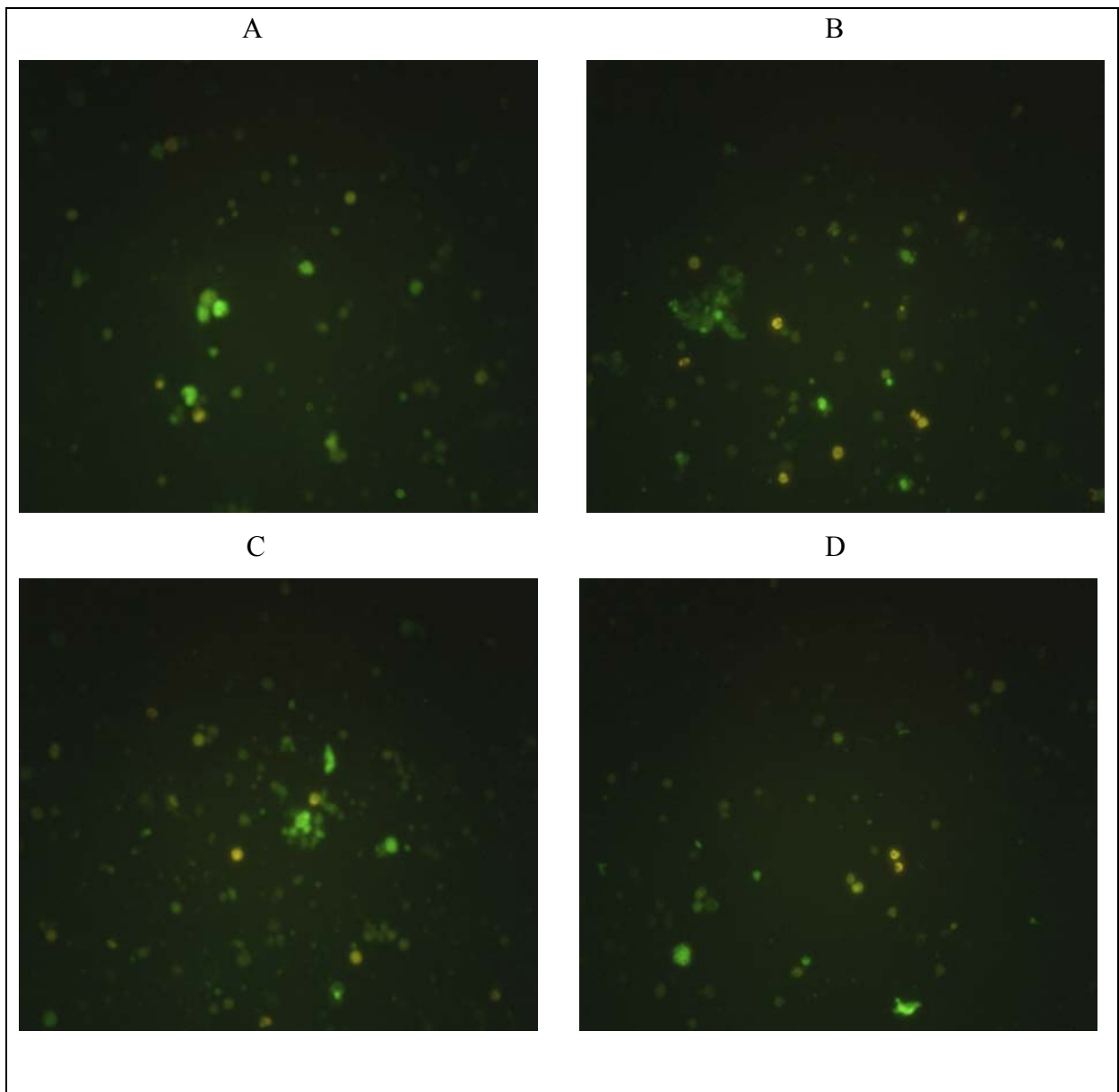


Abbildung 6 Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt **den Nachweis der intrazellulären Aufnahme von verschiedenen Immunkomplexen** - IgG1-Anti-DNP-OVA-DNP (A), IgG2a-Anti-DNP-OVA-DNP (B), IgG3-Anti-DNP-OVA-DNP (C) und IgE-Anti-DNP-OVA-DNP (D) - in unreifen DCs. OVA-DNP (ohne Antikörper) ist als Kontrolle in Abb. 5 dargestellt.

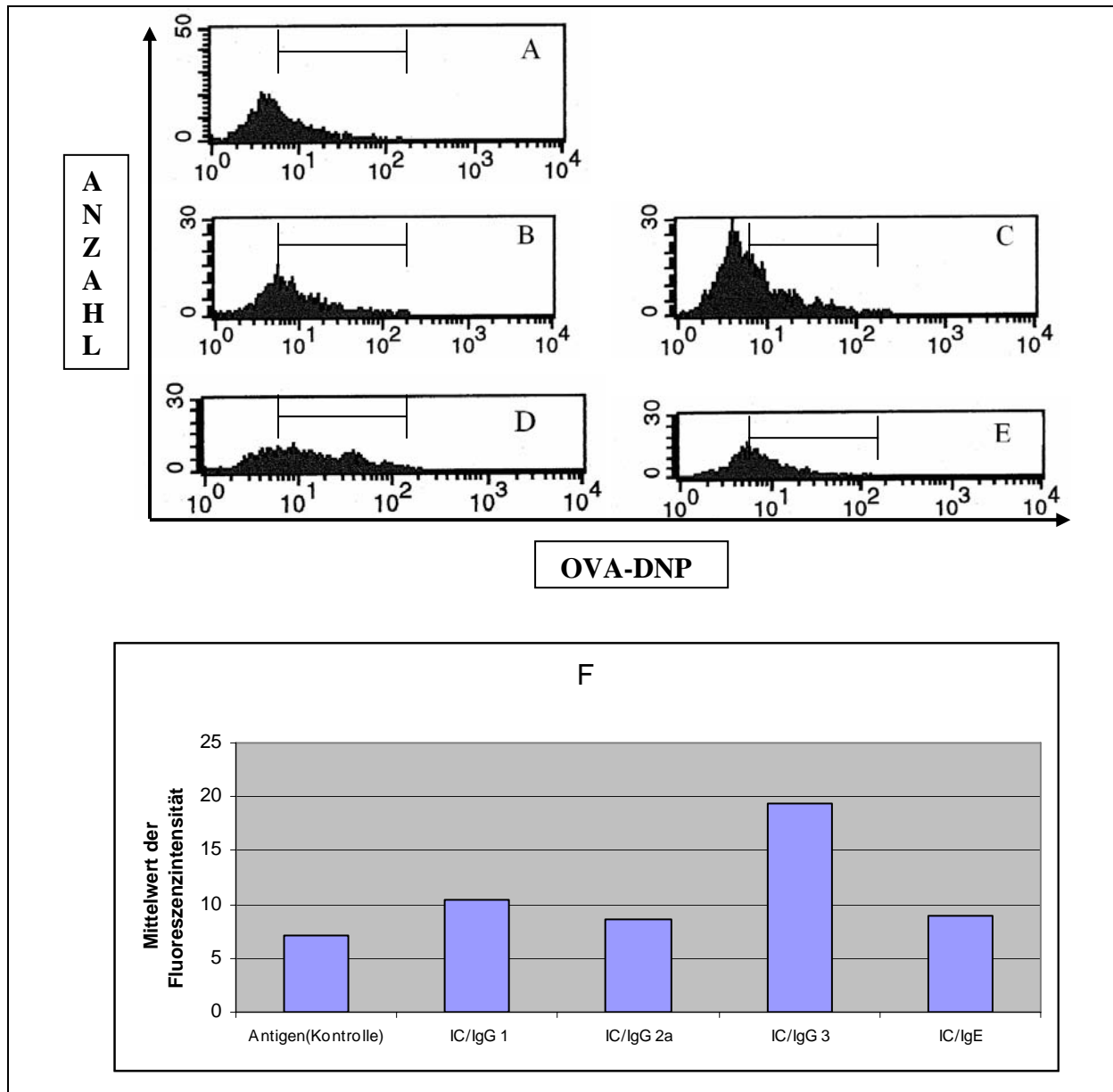


Abbildung 7 **Fluoreszenz von FITC nach Internalisierung der verschiedenen Immunkomplexe (ICs) in unreifen DCs sowie eine graphische Darstellung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) (F)**
 A : Fluoreszenz nach der Aufnahme des Antigens (OVA-DNP) allein (Kontrolle)
 B : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG1-Anti-DNP-OVA-DNP
 C : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG2a-Anti-DNP-OVA-DNP
 D : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG3-Anti-DNP-OVA-DNP
 E : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgE-Anti-DNP-OVA-DNP

Das Ergebnis zeigte eindeutig, dass unreife DCs der Maus OVA-DNP am besten über IgG3-IC mit OVA-DNP aufgenommen haben. Die drei anderen ICs wurden geringfügig besser von DCs aufgenommen als die Kontrollprobe (nur OVA-DNP) (Abb. 7).

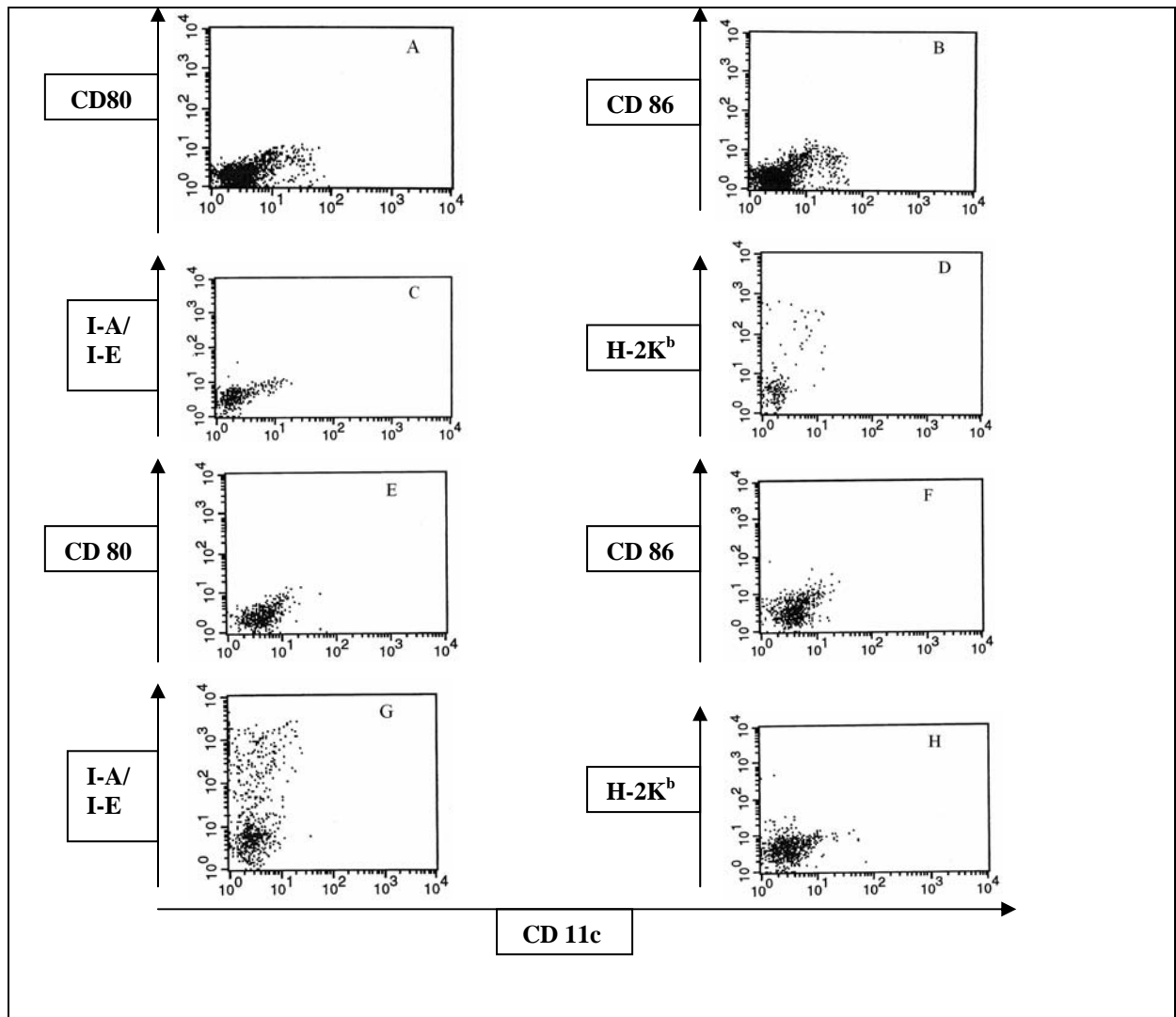


Abbildung 9 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei **unreifen DCs** (A bis D) und bei **den durch LPS gereiften DCs** (E bis H) **ohne Internalisierung von Antigen und ICs (Kontrolle)**

A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
 B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
 C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
 D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
 F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
 G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
 H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

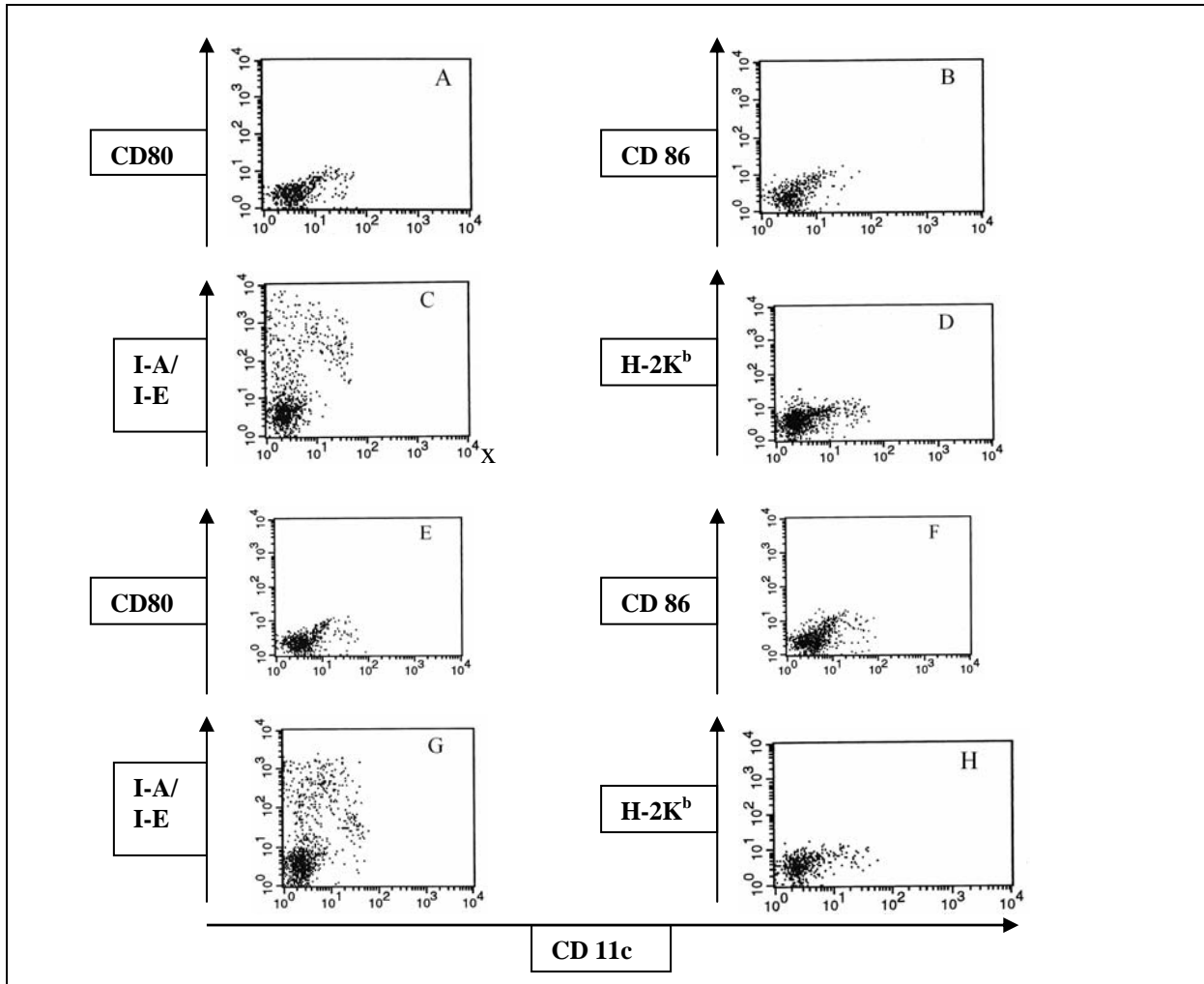


Abbildung 10 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von Antigen – OVA-DNP (A-D) und OVA (E-H)

- A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
- B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
- C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
- D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

- E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
- F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
- G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
- H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

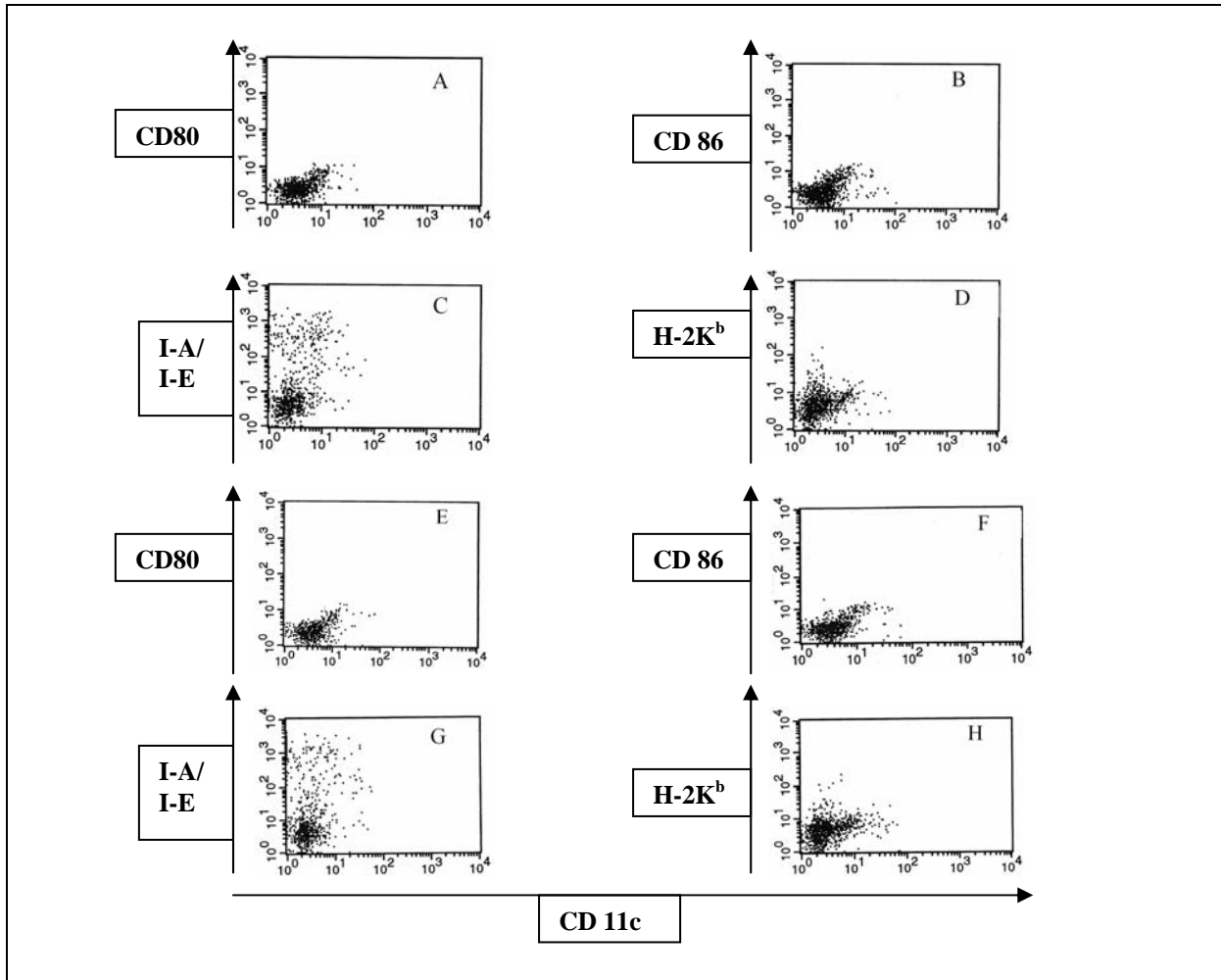


Abbildung 11.I FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von verschiedenen ICs

IgG1-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

- A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
- B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
- C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
- D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

IgG2a-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

- E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
- F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
- G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
- H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

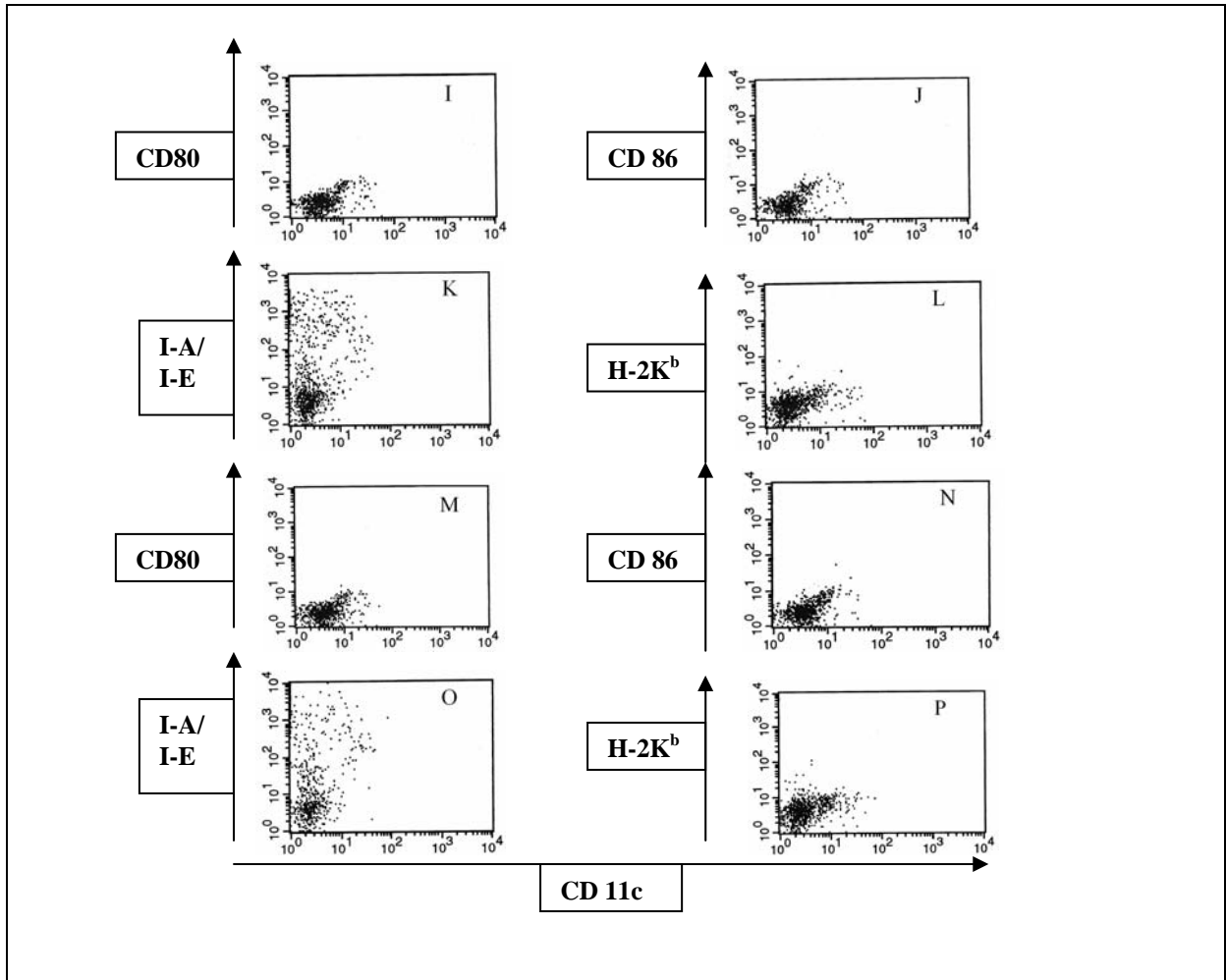


Abbildung 11.II

FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von verschiedenen ICs

IgG3-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

I : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

J : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

K : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

L : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

IgE-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

M : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

N : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

O : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

P : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

Dennoch zeigten die DCs nach Aufnahme von IC kein signifikantes Zeichen für Reifung (Abb. 9B, 10B, 10F, 11B, 11F, 11J und 11N). Die durch LPS gereiften DCs ohne Antigen und ohne ICs zeigten eine erhöhte Anzahl von kostimulierenden Molekülen für CD86 (Abb. 9F). Die MHC-Klasse-II-Moleküle zeigten auf den Oberflächen der DCs nach Internalisierung von verschiedenen ICs (Abb. 11C, 11G, 11K und 11O) auch keinen Unterschied im Vergleich zu den Proben, die OVA (Abb. 10G) oder OVA-DNP allein (Abb. 10C) aufgenommen haben.

Man konnte mit diesem Versuch feststellen, dass DCs nach Internalisierung von ICs viel stärker (Abb. 11D, 11H, 11L und 11P) als DCs nach Internalisierung von OVA allein (Abb. 10H) oder OVA-DNP allein (Abb. 10D) H-2K^b als MHC-I Molekül hoch-regulieren. Dieser Versuch konnte qualitativ nicht nachweisen, welche Kombination unter den IgG1-, IgG2a-, IgG3- oder IgE-OVA-DNP eine bessere Cross-Präsentation hervorruft. Deshalb sollte diese Frage weiter beantwortet werden.

4.6 Effekt von Immunkomplexen auf die Antigenpräsentation unreifer und reifer DCs

Reife DCs exprimieren mehr MHC-Moleküle und kostimulierende Moleküle auf ihre Oberfläche. Dadurch wird die T-Zell-stimulierende Kapazität vergrößert.

Untersucht wurde, welcher Immunkomplex eine bessere „Cross-Präsentation“ aufwies. Gleichzeitig wurde untersucht, welche Unterschiede bei der Cross-Präsentation auftraten nach Inkubation mit verschiedenen Antigenen allein oder nach Inkubation mit verschiedenen Immunkomplexen sowie bei reifen und unreifen DCs. Für diesen Versuch benutzte man eine spezielle Zelle (B3Z-Zelle), deren Funktionsweise schon in 3.2.5 beschrieben wurde, zur Messung der Cross-Präsentation. Die Probenvorbereitung wurde mit Änderungen in einigen Schritten durchgeführt. Zu diesem Untersuchungszweck wurden die BMDCs in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe enthielt reife DCs nach Inkubation mit LPS 100 µg/ml (Abb. 12B),

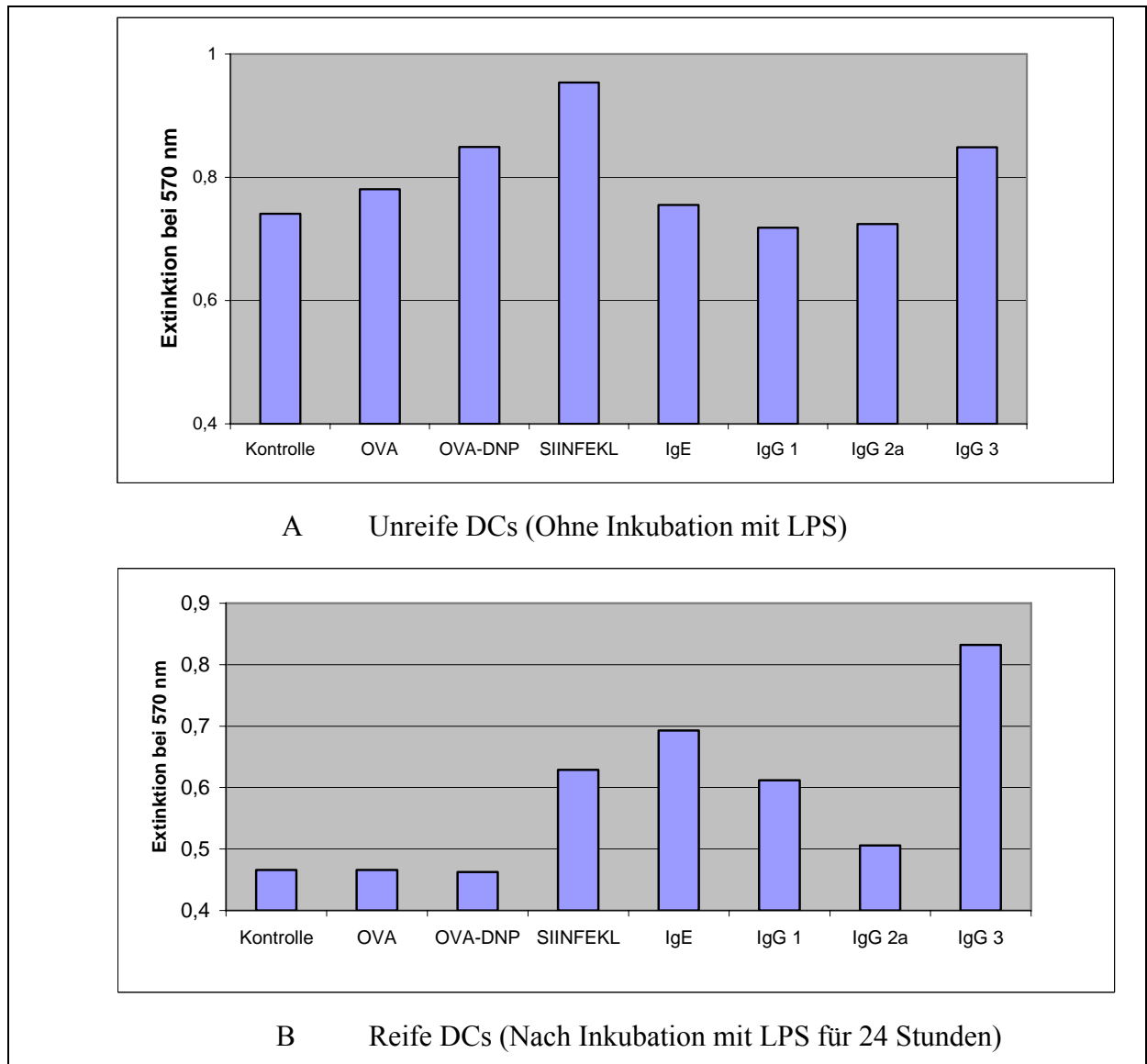


Abbildung 12 Vergleich der „Cross-Präsentation“ mittels β -Galactosidase Produktion aus B3Z-Zellen. Dargestellt ist die Umsetzung des spezifischen Substrates mittels Photometer.

eine andere Gruppe unreife DCs (Abb. 12A). Es wurden auch reife und unreife DCs mit Immunkomplexen inkubiert, wobei IgG1-Anti-DNP und IgG2a-Anti-DNP sowie IgG3-Anti-DNP und IgE-Anti-DNP mit OVA-DNP (30 μ g/ml) vor der Inkubation mit DCs inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgt in einem deutlichen Überschuss an Antikörper im Vergleich zu Antigen.

Wie Abb. 12A zeigt, waren die unreifen DCs nach der Inkubation mit SIINFEKL (ein auf H-2K^b- beschränktes Epitop) stärker zur Präsentation von SIINFEKL in der Lage. Unter den

unreifen DCs nach der Inkubation mit den verschiedenen ICs zeigten die DCs nach der Inkubation mit IgG3-Anti-DNP mit OVA-DNP die effektivste Cross-Präsentation, wobei sich jedoch nur minimale Unterschiede zwischen den ICs zeigten. Eine effektivere Cross-Präsentation nach der Inkubation mit IgG3-Anti-DNP mit OVA-DNP wurde erwartet, da IgG3-Anti-DNP mit OVA-DNP am besten von unreifen DCs aufgenommen wurde, wie man mit an FITC gekoppeltem OVA-DNP in 4.4 und Abb. 7 nachweisen konnte.

Die reifen DCs präsentierten SIINFEKL auf MHC-Klasse-I schwächer als die unreifen DCs nach Aufnahme von Antigenen allein oder nach Aufnahme von Immunkomplexen. Eine Ausnahme stellten die reifen DCs nach Inkubation mit IgG3-Anti-DNP mit OVA-DNP dar (Abb. 12B). Diese präsentierten SIINFEKL sogar besser auf MHC-Klasse-I als unreife DCs.

4.7 Dosiskurve der Cross-Präsentation der unreifen DCs

Bei diesem Versuch wurde gezeigt, dass die „Cross-Präsentation“ von der Konzentration der Antigene bzw. des Immunkomplexes abhängig ist. Je höher die Konzentration von OVA, desto stärker zeigte sich die Extinktion. Die höchste Extinktion nach der Inkubation von OVA-DNP mit IgG3 zeigte sich bei einer Konzentration von 5 µg/ml (Abb. 13).

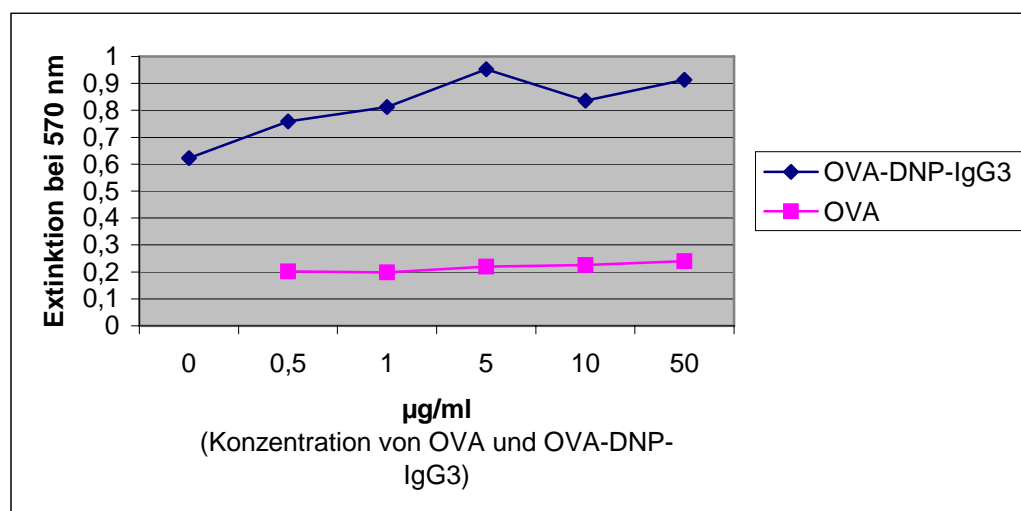


Abbildung 13 Extinktionsverhalten der DCs nach Aufnahme von OVA und OVA-DNP-IgG3 in unterschiedlichen Konzentrationen

Ein auf H-2K^b beschränktes Epitop (SIINFEKL) wurde in einer Konzentration von 0, 100 ng/ml und 10 µg/ml für 4 h mit unreifen DCs inkubiert. Anschließend wurde SIINFEKL:H-2K^b-Präsentation anhand der FACS-Analyse untersucht. Die stärkste Präsentation ergab sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml. Aufgrund dieses Ergebnisses haben wir alle Versuche, die mit SIINFEKL inkubiert wurden, in der Konzentration von 10 µg/ml durchgeführt (Abb. 14).

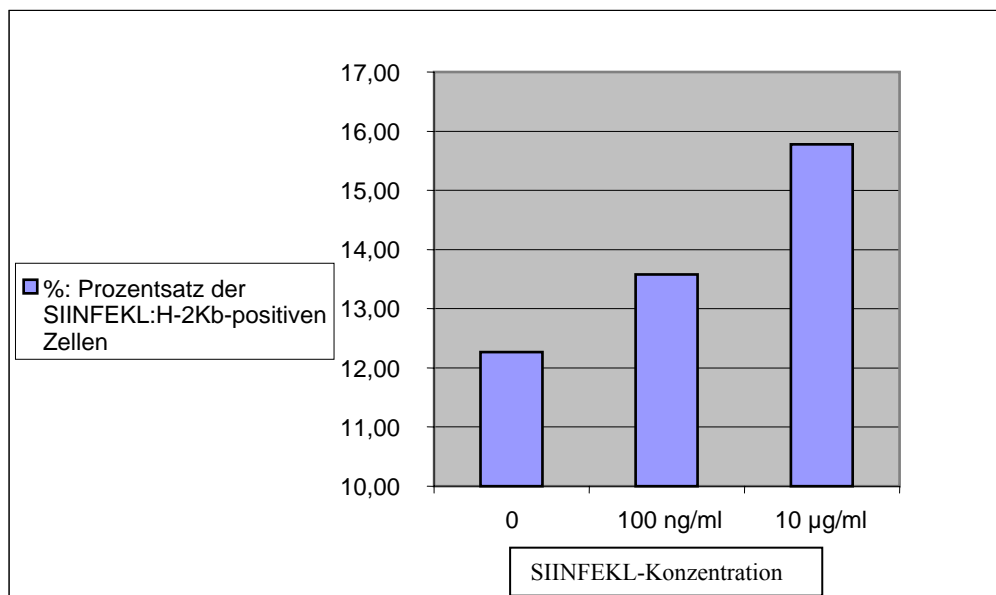


Abbildung 14 SIINFEKL:H-2K^b-Präsentation bei unreifen DCs nach Inkubation mit SIINFEKL **in unterschiedlichen Konzentrationen**

4.8 Gelelektrophorese von IgG3-Anti-DNP

Der monoklonale anti-DNP-Antikörper der IgG Subklasse IgG3 wurde mit Hilfe der Protein G Sepharose HP [MabTrap Kit] aufgereinigt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen zum Nachweis der aufgereinigten Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis wurde fotografiert (Abb. 15). Hier waren 2 Banden sichtbar, wobei die obere auf eine schwere Kette und die untere auf eine leichte Kette hinwies. Das Molekulargewicht der schweren Kette betrug 50 kDa und das Molekulargewicht der leichten Kette 25 kDa.

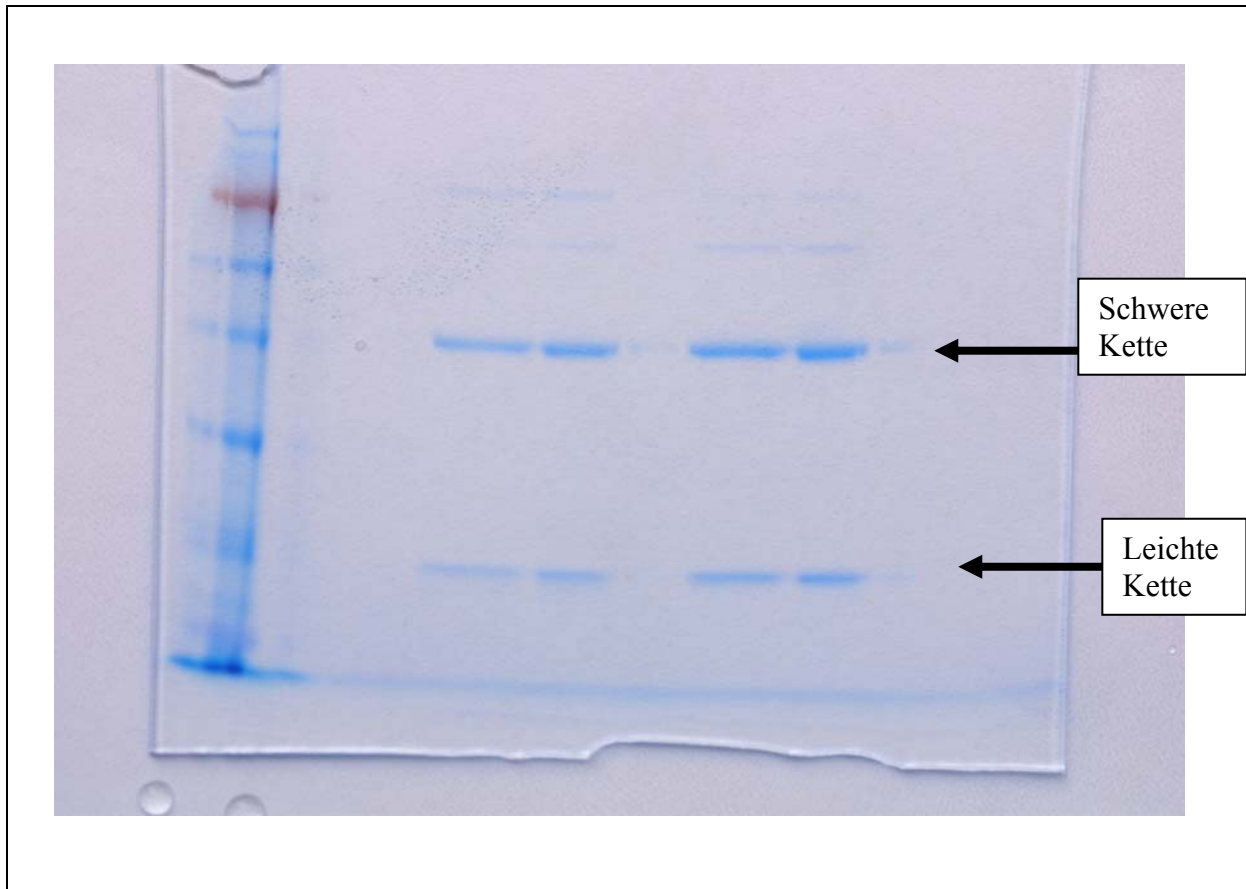


Abbildung 15 Darstellung der Gelelektrophorese von **gereinigtem monoklonalen anti-OVA-DNP IgG3** mit der schweren und leichten Kette unter reduzierenden Bedingungen

4.9 Dendritische Zelllinie

Für die Gewinnung der BMDCs waren 6 Kultivierungstage nötig. Dazu war die Menge der gewonnenen BMDCs manchmal nicht ausreichend. Freundlicherweise bekamen wir Unterstützung von Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli, University of Milano-Bicocca, Milano. Die Zelllinie wurde nach Anweisung von Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli vorbereitet. Die FACS-Analyse bestätigte, dass die DCs die ähnlichen Oberflächenmoleküle wie BMDCs beziehungsweise mehr MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle als BMDCs aufwiesen. Die Untersuchung mit 25.D1.16 (IgG-Subtyp) und Anti-Maus IgG1, wie in 4.3 beschrieben, zeigte, dass die DC-Zelllinie nach Aufnahme von OVA, OVA-DNP und SIINFEKL nicht cross-präsentierte. Deshalb wurden alle Untersuchungen mit BMDCs durchgeführt.

5 Diskussion

Bei dieser Arbeit wurden BMDCs durch ihre Oberflächenmoleküle identifiziert und verschiedene monoklonale Antikörper sowohl qualitativ als auch quantitativ gemessen. Auf dieser Basis kamen wir zu der Erkenntnis, dass LPS die Reifung der BMDCs hervorruft, nicht aber die untersuchten Immunkomplexe. Die Annahme, dass die „Cross-Präsentation“ durch Antikörper-vermittelte Aufnahme von Immunkomplexen in die BMDCs verstärkt wird, konnte durch unsere Messungen mit ELISA und FACS bestätigt werden. Hierbei wurde auch nachgewiesen, dass der Immunkomplex OVA-DNP-IgG3 besser als andere Immunkomplexe in die BMDCs aufgenommen wird und auch eine stärkere Cross-Präsentation bei BMDCs induziert. Diese durch den Immunkomplex OVA-DNP-IgG3 verstärkte Cross-Präsentation in BMDCs war abhängig von der Konzentration des IgG3 monoklonalen Antikörpers (Abb. 13).

M. Bevan vermutete bereits in der Mitte der siebziger Jahre, dass zytotoxische T-Lymphozyten gegen extrazelluläre Antigene wahrscheinlich durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aktiviert werden. [7] Diesen Prozess nannte er „Cross-Priming“. Nach heutigen Erkenntnissen müssen die APCs zunächst die Antigene internalisieren und anschließend diese Antigene mit MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche den CD8-T-Zellen präsentieren. Die Cross-Präsentation durch APCs kann *in vivo* sowohl zu „Cross-Priming“, d.h. Aktivierung der CD-8-T-Zellen, als auch zu „Cross-Toleranz“, also Nicht-Aktivierung der CD-8-T-Zellen führen. [19] Dies ist abhängig von der Aktivierung kostimulierender Moleküle. *In vitro* weisen dendritische Zellen eine stärkere Cross-Präsentation als andere APCs auf, zu denen sowohl B-Zellen und als auch Makrophagen gehören. [61] Dieser Vorgang konnte ebenso *in vivo* nachgewiesen werden. [30]

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die BMDCs eine unterschiedlich starke Cross-Präsentation bei der Aufnahme verschiedener Antigen-Antikörper-Komplexe und verschiedener Antigene aufweisen. So zeigen die BMDCs eine stärkere, wenn auch nicht

signifikant stärkere, Cross-Präsentation nach der Internalisierung von OVA-DNP mit IgG3 als mit anderen verwendeten Antikörpern (IgG1, IgG2a und IgE) und Antigen allein (OVA, OVA-DNP und SIINFEKL). Damit bestätigten unsere Untersuchungen die gängige Annahme, dass die Antikörper-vermittelte Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes via Fc γ -Rezeptor in DCs sich effektiver gestaltet als Internalisierung von Antigenen durch Endozytose. [2] Zusätzlich wiesen wir durch quantitative Messung der Cross-Präsentation mithilfe von ELISA eine Konzentrationsabhängigkeit der Antigenaufnahme nach (Abb. 13).

Regnault et al. haben eine Maturation der DCs nach Internalisierung von ICs durch Nachweis einer Veränderung der Oberflächenmoleküle berichtet. [44] Eine solche Maturation ließ sich in unseren Untersuchungen nicht feststellen. Die Fähigkeit zur „Cross-Präsentation“ der extrazellulären Antigene nach Internalisierung via Fc γ -Rezeptor ist auf DCs beschränkt. Die Untersuchung von Regnault et al. zeigte, dass DCs nach Aufnahme von einem Immunkomplex (OVA-IC) 10^2 - 10^3 fach besser SIINFEKL: H-2K^b den B3Z-Zellen an ihrer Oberfläche präsentieren als nach ausschließlicher Aufnahme von Antigenen. [44] Zusätzlich wurde von Amigorena und seinen Mitarbeiter veröffentlicht, dass die Cross-Präsentation von der Konzentration der Antigene selbst bzw. der Konzentration der Antigene (OVA) in ICs sowie von der Reifung der BMDCs abhängig ist. [44, 54]

Immunkomplexe (ICs) haben eine große Bedeutung durch ihre Fähigkeit, spezifisch von DCs aufgenommen zu werden und die Antigenpräsentation zu verstärken sowie Tumor-spezifische T-Killerzellen zu aktivieren. Dies findet (prä-)klinisch bereits Anwendung in der Therapie mit rekombinant hergestellten Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Antigene. [34]

DCs sind Schlüsselzellen bei der Aufnahme von Antigenen sowie bei der Präsentation dieser an T-Zellen. Naive CD4 – und CD8 – Zellen können von DCs direkt aktiviert werden [5, 13, 33], da DCs die Fähigkeit besitzen, in Verbindung mit kostimulatorischen Molekülen wie B7 sowie CD40 und MHC-Klasse-I/II-Molekülen Antigene effektiv aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. [5, 31, 39, 57] Zusätzlich können DCs extrazelluläre Antigene (z.B. ICs) durch das MHC-Klasse-I-Molekül den naiven CD8–T-Zellen präsentieren. [1, 37, 44, 54] Zur effektiven Stimulierung der T-Zellen müssen DCs gereift

sein. Immature DCs machen diesen Prozess durch Reaktion auf inflammatorische Zytokine sowie bakterielle Produkte durch. Im Laufe des Reifungsprozesses exprimieren DCs verstärkt kostimulierende Moleküle. [33, 34, 39, 59] Bei der Internalisierung der ICs sind die Rezeptoren der DCs von besonderer Bedeutung. Drei unterschiedliche Klasse von murinen Fc-Rezeptoren sind auf dendritischen Zellen identifiziert: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), und Fc γ RIII (CD16). [21] Dabei zeigen Fc γ RII- und Fc γ RIII-Rezeptoren eine niedrige Affinität zu IgG1, IgG2a, und IgG2b. Fc γ RI hingegen weist eine hohe Affinität zu monomerem IgG2a auf und neueren Untersuchungen zufolge bindet Fc γ RI an IgG3 mit einer moderaten Affinität. [16]

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass Immunkomplexe aus OVA-DNP und verschiedenen Immunglobulin G Subklassen zur Internalisierung und zumindest teilweise auch zur Prozessierung führen, jedoch nicht, über welchen Rezeptor dieses Phänomen stattfindet. Hierzu publizierten Wernersson et al., dass FcR $\gamma^{-/-}$ (γ -Kette-Knock-out)-Mäuse keine funktionelle Fc γ RI oder Fc γ RIII exprimieren [60] und dass die Bindung von IgG:Ag an einen oder beiden Rezeptoren für die Fähigkeit des IgGs, primäre Antikörperantwort auf lösliche Antigene zu verstärken, sehr wichtig ist. [66] Angenommen, dass DCs der FcR $\gamma^{-/-}$ -Mäuse lediglich normal funktionierende Fc γ RII aufweisen, so können diese jedoch keine signifikante IgG-vermittelte Verstärkung der primären Antikörperantwort induzieren. Diese Interpretation wurde durch die starke Antwort auf IgG/Ag in Fc γ RII $^{-/-}$ -Mäuse unterstützt. Da Fc γ RIII $^{-/-}$ -Mäuse auf IgG/Ag mit einer primären Antikörperantwort reagieren, kann man daraus den Rückschluss ziehen, dass Fc γ RI für die Antwort auf IgG/Ag ausreicht. Dennoch kann man nicht ausschließen dass auch Fc γ RIII gemeinsam mit Fc γ RI in diesem Prozess eine Rolle spielt. *In vitro* werden ICs effektiv via Fc γ R-vermittelter Endozytose durch Makrophagen bzw. dendritische Zellen aufgenommen und den T-Zellen präsentiert. [50] Dieser Mechanismus führt zu einer Antikörper-vermittelten Verstärkung der Antikörperantwort. Die Induktion der primären Immunantwort ist natürlich entscheidend für die sekundäre Immunantwort, bei der IgG-Antikörper die wichtigste Rolle spielen. Die oben genannte Arbeitsgruppe demonstrierte zusätzlich, dass Fc γ RII bei der Antwort auf IgG/Ag einen negativ regulatorischen Einfluß besitzt. Die Bindung von ICs an Fc γ -Rezeptoren kann sowohl zu einem aktivierenden als auch zu einem inhibierenden Signal veranlassen. Aktivierende Fc γ -Rezeptoren I und III sind mit einer γ -Kette assoziiert, deren

zytoplasmatische Region eine ITAM-Sequenz (Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren: immunoreceptor tyrosin-based activation motif) enthält. Diese Sequenz ist am Transport der Peptide zu Lysosomen sowie an der Aktivierung der Zelle beteiligt. Syk (Proteintyrosinkinase) und andere spezifische zytoplasmatische Partner, wie z.B. PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Phosphat Kinase), sind für diese beiden Funktionen notwendig. Zusätzlich ist Syk für die Phagozytose von an IgG gebundenen Partikeln notwendig. [2] Die Bindung der Fc γ -Rezeptoren I und III an ICs führt zu einer Src- und Syk-Kinase-vermittelten Aktivierungsantwort. Im Gegensatz dazu enthält der inhibierende Fc γ Rezeptor IIB in seinem zytoplasmatischen Schwanz eine ITIM-Sequenz (immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif). Diese ITIM-Sequenz inhibiert das ITAM-vermittelte Aktivierungssignal durch Rekrutierung der Inositolphosphatase SHIP. [8, 40] Während die Expression von Fc γ RIII und Fc γ RIIB auf DCs bei Mäusen und Menschen beschrieben ist [43], ist die Rolle dieses Signalweges in der Biologie der DCs nicht klar. Vor allem ist die Fähigkeit der ICs, die Maturation von immaturren DCs durch Fc γ R-Aktivierung zu induzieren, variabel. Der Versuch von Dhodapkar et al., die IC-vermittelte Maturation bei humanen DCs zu beobachten schlug fehl [11], während Regnault et al. sowie neulich Schuurhuis et al. die Maturation der Mäuse-DCs als Reaktion auf ICs berichtet haben.[37, 44] Alexis M. Kalergis and Jeffrey V. Ravetch stellten die Hypothese auf, dass die selektive Bindung der aktivierenden Fc-Rezeptoren an ICs eine effektive Antitumor-Immunität induziert. [28] Diese Selektivität könnte durch Blockierung des inhibitorischen Fc-Rezeptors erreicht werden. Eine Veränderung der Fc-Region der IgG-Moleküle in IC könnte ebenfalls aktivierende Signale hervorrufen. [55]

Wir konnten in unserem experimentellen System nicht nur die Aufnahme von Immunkomplexen in BMDC nachweisen, sondern über 2 unterschiedliche Techniken auch die Bildung von SIINFEKL-H-2K^b Komplexen auf der Zelloberfläche als Maß der Cross-Präsentation. Zum einen mittels SIINFEKL-H-2K^b spezifischem Hybridom, das proportional zur Bildung dieses Komplexes β -Galactosidase bildet, zum anderen mittels Konformations-spezifischem Antikörper. Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von S. Amigorena et al., der untersuchte, ob eine Aufnahme der Immunkomplexe über die assoziierte γ -Kette des Fc γ -Rezeptor die Reifung der DCs und „Cross-Präsentation“ hervorruft. Dies wurde mit Wildtyp-DCs und Fc-Rezeptor- γ -Kette-Knock-out DCs (γ -Kette^{-/-}) untersucht. Sie inkubierten die

beiden DCs mit LPS und OVA-IC. Nach der Aufnahme von LPS wiesen die beiden DCs eine Reifung durch Zunahme der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (I-A/I-E), CD86 (B7.2) und CD40 auf. Dagegen haben die γ -Kette-Knock-out DCs nach Inkubation mit OVA-IC keine Reifung und keine „Cross-Präsentation“ gezeigt, wohingegen die Wildtyp-DCs sowohl Reifung als auch „Cross-Präsentation“ aufwiesen. [44] Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Fc-Rezeptor- γ -Kette für die „Cross-Präsentation“ und Reifung unentbehrlich ist.

Frühere Studien zeigten, dass die „Cross-Präsentation“ sowohl abhängig als auch unabhängig vom Grad der Säuerung in den Endosomen sein kann. Die Präsentation von OVA aus einem Immunkomplex durch eine Maus-DC ist von der endosomalen Säuerung abhängig [49], obwohl die Prozessierung von löslichem OVA durch einen Maus-Makrophagen davon unabhängig ist. [43] Rodriguez et al. haben gefunden, dass der Transport von Immunkomplexen vom endosomalen Kompartiment in das Zytosol für Moleküle, die kleiner als 40 KDa sind, selektiv ist. Zusätzlich ist die Dissoziation von den Immunkomplexen, die von endosomaler Säuerung abhängig sind, für den Transport der Antigene ins Zytosol nötig. [43] Eine enzymatische Verarbeitung der Antigene wird ebenso benötigt, sowohl um die Antigene zu dissoziieren als auch um direkt Antigene in kleine Fragmente für den Transport ins Zytosol zu spalten.

Die Ig-abhängige Cross-Präsentation ist jedoch nur ein Weg der Induktion dieses Phänomens. Fonteneau et al. berichteten, dass Antigene aus apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen über den normalen Weg prozessiert werden – d.h. der Internalisierung der Zellkomponente folgt die Präprozessierung in das Endosom via Cathepsin D und anschließend die Einschleusung ins Zytosol für Prozessierung durch das Proteasom und letztendlich die TAP-abhängige Einschleusung in das Endoplasmatischen Retikulum. [14]

Es wurde mehrfach erwähnt, wie Pathogene internalisiert und prozessiert werden, um den CD8-T-Zellen mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert zu werden. Kürzlich wurde von Guermonprez et al. nachgewiesen, wie die durch das Proteasom zerkleinerten Peptide in das Endoplasmatischen Retikulum (ER) gelangen. In Makrophagen wurde gezeigt, dass das Phagosom während oder kurz nach der Antigenaufnahme mit dem ER fusioniert. [18]

Ähnliches wurde in dendritischen Zellen beobachtet, einige ER-spezifische Proteine (wie Sec61/Sec62 sowie Calnexin) waren kurz nach der Antigenaufnahme in den Phagosomen zu identifizieren. Bei der quantitativen Messung des Anteils von Phagosomen, die ER-spezifische Proteine enthalten, ist die Konzentration von Calnexin im frühen Phagosom hoch. Während Phagosome zu Phagolysosomen reifen, nimmt die Anzahl dieser Proteine in den Phagosomen ab. Daraus kann man den Rückschluss ziehen, dass die meisten Phagosome schon während oder kurz nach der Antigenaufnahme mit dem ER fusionieren. Diese Hypothese wurde mithilfe des Nachweises der Enzymaktivität der Glukose-6-Phosphatase und der Calretikulin-Färbung in den Phagosomen bestätigt. [18]

Im frühen Phagosom befinden sich TAP, Tapasin, Calretikulin, Erp57 und die schwere Kette von MHC-Klasse-I. Während die Anzahl von Tapasin und Erp57 deutlich geringer wurde, blieb die Anzahl der schweren Ketten von MHC-Klasse-I und Calretikulin unverändert. Die „Cross-Präsentation“ des SIINFEKL:H-2K^b-Komplexes erreichte innerhalb von 3 Stunden ein Plateau. Durch die Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern sowie mit einem funktionellen Assay für die T-Zell-Aktivierung war festzustellen, dass fusionierte ER-Phagosom-Kompartimente neue spezialisierte Organellen für die Aufnahme der MHC-Klasse-I-Moleküle während der „Cross-Präsentation“ darstellen. Zusätzlich funktionieren die Phagosome wie autonome Organellen für die „Cross-Präsentation“, d.h. diese sind sowohl Quelle der Antigene als auch ein Ort, an dem Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. [18] Abschließend haben Guermonprez et al. bestätigt, dass TAP sich an der Translokation der Peptide durch die phagosomalen Membranen beteiligt sowie dass die Phagosome der DCs während der ersten Stunden nach Phagozytose zur TAP-abhängigen Translokation der Peptide in der Lage sind. Via TAP importierte Peptide können an MHC-Klasse-I-Moleküle im Lumen der Phagosome binden. Wegen der Konkurrenz mit intrazellulären Antigenen ist die Kapazität für die „Cross-Präsentation“ limitiert. Deshalb konzentrieren sich DCs wahrscheinlich auf die durch Phagozytose aufgenommenen Antigene, die für die Initiation der Immunantwort relevant sind. [18] In der vorliegenden Arbeit konnte nicht untersucht werden, wie groß der Anteil dieser OVA-beladenen MHC-I-Moleküle war, hierzu wären Vergleichsexperimente mit OVA-spezifischen CD4 Zellen von großem Interesse.

Es wurde beschrieben, dass die durch FcγRs internalisierten Antigene in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. 1) Epitope, die durch FcγRIIb2- und FcγRIII-exprimierende Zellen internalisiert und präsentiert werden und 2) Epitope, die nur durch FcγRIII-exprimierende Zellen internalisiert und präsentiert werden. [3]

Schnell et al. haben folgende Feststellungen über die Rolle der CD4-T-Zellen berichtet: 1) Transfizierte DCs, die MHC-Klasse-I- und -II-Epitope präsentieren, sind bei der Immunität gegen Tumoren effektiver als lediglich mit MHC-Klasse-I-Peptid beladene DCs. 2) MHC-Klasse-II-Knock-out-DCs induzierten keine Tumormunität. 3) Die Induktion der Tumormunität wurde bei der Abwesenheit der CD4-T-Zellen aufgehoben. Bei der direkten Aktivierung der MHC-Klasse-II-Knock-out-DCs via CD40-Rezeptoren konnte eine moderate Erhöhung der OVA-spezifischen CTL-Aktivität beobachtet werden. Dennoch war diese CTL-Aktivität *in vivo* nicht ausreichend für die Unterdrückung der Tumoren. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass der volle Effekt der CD40-Aktivierung von aktiven Interaktionen zwischen CD4-T-Zellen und DCs abhängig ist und/oder dass CD4-T-Zellen möglicherweise andere wichtige Effekte, die durch DCs vermittelt werden, ausüben. [52]

Für eine zytotoxische Antwort sind sowohl die T-Helfer-Zellen als auch die Präsentation von MHC-Klasse-I-beschränkten sowie von MHC-Klasse-II-beschränkten Antigenen durch dieselbe DC nötig. [17] T-Helfer-Zellen modifizieren aktiv DCs, die wiederum effektiv die Entwicklung von CD8-Vorläuferzellen zu CTLs stimulieren. Dieser Teil des Prozesses wird „Conditioning“ [45] oder „Licensing“ [32] von DCs genannt. Durch den Effekt von T-Helfer-Zellen wird die Expression der MHC-Klasse-I-assoziierten Peptide auf der Oberfläche der DCs gesteigert. [36] Einige Signale von T-Helfer-Zellen, die für das „Licensing“ der DCs nötig sind, stammen von TCR der T-Helfer-Zellen und durchlaufen die mit Antigen verbundenen MHC-Klasse-II-Moleküle, die konzentriert in cholesterolreichen Domänen der DCs vorkommen. Diese Signale werden wahrscheinlich entweder durch MHC-Klasse-II-Moleküle allein oder in Konjunktion mit Signalen durch andere Moleküle weitergesendet, die sich konzentriert in Lipid-Domänen befinden. [64]

Machy et al. schlussfolgerten aus ihren Versuchen, dass es von großer Bedeutung für die Immunantwort sei, um welche MHC-Klasse-II-Moleküle:Antigen-Peptid-Komplexe es sich

handelt. Ein Antigen wird durch Endozytose in Vesikel aufgenommen und dort mit relevanten MHC-Klasse-II-Molekülen assoziiert. Dieser Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex wird auf der Zelloberfläche exprimiert, vor allem in cholesterolreichen Domänen. Dort assoziieren sie wahrscheinlich mit anderen für die Signalkette notwendigen Molekülen. Der Kontakt mit T-Helfer-Zellen und DCs führt zu „Cross-linking“ der TCRs sowie zu einer verstärkten Expression der Liganden insbesondere von CD154 auf der T-Helfer-Zelle. Gleichzeitig werden DCs durch MHC-Klasse-II-Moleküle, CD40-Antigen sowie zusätzliche Moleküle stimuliert. Diese Signale öffnen intrazelluläre Kompartimente der DCs und lassen dadurch Antigene in das Zytosol frei. Anschließend folgt der klassische Proteasom- und TAP-abhängige MHC-Klasse-I-Weg für die „Cross-Präsentation“. [36]

Maurer et al. zeigten, dass Bestandteile bakterieller DNA (unmethylierte CpG-Dinucleotid-Motive-DNA) sogar stärker „Cross-präsentiert“ werden als ICs. [38] Dieser Prozess findet statt, indem Krankheitserreger von DCs makropinozytisch aufgenommen, intrazellulär abgebaut und anschließend den T-Zellen präsentiert werden. Enthält die bakterielle DNA unmethylierte CpG-Dinucleotid-Motive, werden die DCs schnell aktiviert. Dies geschieht vermutlich nachdem ein intrazellulärer Mustererkennungsrezeptor namens TLR-9 (Toll-like-Rezeptor) die DNA erkannt hat. Die DNA stellt ein pathogenassoziiertes molekulares Muster (PAMPs) dar, das von TLR-9-Rezeptoren erkannt wird. Der Kontakt mit bakterieller DNA aktiviert Signalwege über NF κ B und eine mitogenaktivierte Proteinkinase und führt so zu einer Produktion von Zytokinen und Interferonen. Maurer et al. zeigten, dass durch die Konjugation von OVA an CpG-DNA das Aufnahmeverhalten von OVA deutlich effektiver wurde. [38] Ein CpG-DNA-Ovalbumin-Konjugat löste *in vivo* in der 10-fach niedrigeren Konzentration der Antigenosis als eine Mischung von CpG-DNA und OVA eine peptidspezifische CTL-Antwort aus. CpG-DNA-OVA-Konjugate wurden durch die effektivere DNA-Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen, während OVA in der Mischung von CpG-DNA und OVA wahrscheinlich durch eine ineffiziente Pinozytose aufgenommen wurde. Das „Cross-linking“ von OVA sowohl mit stimulierenden als auch mit nicht-stimulierenden ODN (Oligonukleotiden) rief durch eine verstärkte Aufnahme von OVA eine effiziente Prozessierung sowie die Präsentation des bekannten OVA-CTL Epitopes SIINFEKL hervor. Aber nur stimulierende CpG-ODN kreuz-verbunden mit OVA vermittelten das Maturationssignal, das für die primäre CTL-Antwort zur „Cross-

Präsentation“ nötig ist. Diese Studie beschrieb zwei Rollen von CpG-ODN verbunden mit OVA: 1) Die Verstärkung der Antigenaufnahme, die wiederum eine effiziente „Cross-Präsentation“ der Antigene hervorruft sowie 2) Die Aktivierung der unreifen SIINFEKL-präsentierenden DCs zur maturaen professionellen APCs. [38] Eine interessante Weiterführung der vorliegenden Arbeit könnte die Kombination von Immunkomplexen und CpG-ODN zur Induktion von CTLs sein. Leadbetter et al. beschreibt einen wichtigen Mechanismus zur Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen, wie sie bei Autoimmunerkrankungen vorkommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zur effektiven Aktivierung der Rheumafaktorproduzierenden B-Zellen durch IgG2a-Chromatin Immunkomplexe eine synergistische Beteiligung von Antigenrezeptoren und TLR erforderlich ist. Die Besonderheit dieser dualen Beteiligung sollte die Entwicklung von spezifischen Therapien gegen autoreaktive B-Zellen erleichtern. [35] Unsere Ergebnisse zeigen, dass die für die Immunantwort wichtige Ausprägung der Cross-Präsentation abhängig ist von der Kopplung der Antigene an Immunglobuline, wobei hier auch der Immunglobulin-Subklassentyp eine Rolle spielt. IgG3 weist in unseren Versuchen im Vergleich zu anderen Immunglobulin-Subklassen die beste Induktionsfähigkeit der Cross-Präsentation in der Maus auf.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zur Zielsetzung, den möglichen Effekt der Kopplung von Antigenen an Immunglobuline verschiedener Subklassen auf Antigenaufnahme und Prozessierung in Dendritischen Zellen zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Einschleusung von Bestandteilen extrazellulärer Antigene in den eigentlich für intrazytoplasmatische Antigene vorgesehenen MHC-I Präsentationsweg, die sogenannte „Cross-Präsentation“.

Hierfür wurden murine „bone marrow derived dendritic cells“ (BMDC) und das gut beschriebene Modellantigen Ovalbumin (OVA) in Kopplung mit DNP gewählt. Der Vorteil dieses Systems besteht in der genauen Kenntnis des dominanten MHC-I Peptides aus Ovalbumin für das MHC-I Molekül H-2K^b der C57BL/6 Maus, nämlich dem Octapeptid SIINFEKL.

Wir etablierten einen Fluoreszenznachweis von FITC-gekoppeltem Ovalbumin zur Beurteilung der Aufnahme von Ovalbumin in DCs und zwei unterschiedliche Techniken zur Quantifizierung der gebildeten H-2K^b-SIINFEKL Komplexe. Dies war das spezifische T-Zell-Hybridom B3Z, das nach Erkennung von H-2K^b-SIINFEKL Komplexen auf DCs die Produktion von β -Galactosidase induziert sowie der Konformations-spezifische Antikörper 25.D1.16, der H-2K^b-SIINFEKL-Moleküle direkt erkennen kann und somit deren Quantifikation ermöglicht.

Spezifische, monoklonale anti-DNP Antikörper der Subklassen IgG1, IgG2a, IgG3 und IgE wurden entweder aus Hybridomen aufgereinigt oder kommerziell bezogen.

Unsere Ergebnisse zeigten eine verstärkte zelluläre Aufnahme von Immunglobulin-gekoppeltem OVA-DNP (im Vergleich zum ungekoppelten Antigen), diese Verstärkung der Aufnahme war jedoch unabhängig vom Immunglobulin-Subklassentyp. Bei der Untersuchung der Cross-Präsentation zeigte sich eine verstärkte Tendenz zur Bildung von H-2K^b-SIINFEKL Molekülen bei der Kopplung von OVA-DNP an IgG3 im Vergleich zu IgG1, IgG2a und IgE, aber auch im Vergleich zum ungekoppelten Antigen.

Diese verstärkte Induktion der Cross-Präsentation war interessanterweise unabhängig von der Reifung der Dendritischen Zellen, was durch FACS-Messung verschiedener

Oberflächenmarker (CD11c, CD80, CD86, I-A/I-E) untersucht wurde. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann IgG3 als Immunglobulinsubklasse mit der besten Induktionsfähigkeit der Cross-Präsentation in der Maus eingestuft werden. Weiterführende Ergebnisse werden zeigen, ob beim Menschen ähnliche Unterschiede der Antikörpersubtypen in der Effektivität zur Cross-Präsentation vorliegen.

7 Literaturverzeichnis

1. Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86–89.
2. Amigorena, S., and Bonnerot, C. 1999. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and II molecules. *Immunology* 11:385-390.
3. Amigorena, S., Lankar, D., Briken, V., Laurent, G., Viguier, M., and Bonnerot, C. 1998. Type II and III receptors for different Immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J Exp. Med.* 187:505-515.
4. Amigorena, S., Salamero, J., Davoust, J., Fridman, W. H., and Bonnerot, C. 1992. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 358:337-341.
5. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
6. Banchereau, J., and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
7. Bevan, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283-1288.

8. Bolland, S., Pearse, R. N., Kurosaki, T., and Ravetch, J. V. 1998. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* 8:509–516.
9. Bonnerot, C., Amigorena, S., Choquet, D., Pavlovich, R., Choukroun, V., and Fridman, W. H. 1992. Role of associated gamma-chain in tyrosine kinase activation via murine Fc gamma RIII. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ) J.* 11:2747-2757.
10. Brossart, P., and Bevan, M. J. 1997. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90:1594-1599.
11. Dhodapkar, K. M., Krasovsky, J., Williamson, B., and Dhodapkar, M. V. 2002. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:125-133.
12. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
13. Fong, L., and Engleman, E. G. 2000. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18:245–273.
14. Fonteneau, J. F., Kavanagh, D. G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T. L., Bhardwaj, N., and M. Larsson. 2003. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102:4448-4455.
15. Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., and Desjardins, M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.

16. Gavin, A. L., Barnes, N., Dijstelbloem, H. M., and Hogarth, P. M. 1998. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 160:20-23.
17. Guerder, S., and Matzinger, P. 1992. A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J. Exp. Med.* 176:553-564.
18. Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, M., and Amigorena, S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397-402.
19. Heath, W. R., and Carbone, F. R. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47-64.
20. Huang, A. Y. C., Golumbeck, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, A., Pardoll, D. M., and Levitsky, H. I. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264:961-965.
21. Hulett, M. D., and Hogarth, P. M. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* 57:1-127.
22. Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J., and Steinman, R. M. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 180:1849-1860.
23. Janeway, C. A. Allgemeine Eigenschaften bewaffneter T-Effektorzellen. In „Immunologie“, Travels, P., Walport, M., Schlomchik, M. Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart ; Heidelberg, 2002, 5. Auflage, 342-352.

24. Janeway, C. A. Die Bildung bewaffneter T-Effektorzellen. In „Immunologie“, Travels, P., Walport, M., Schlomchik, M. Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart ; Heidelberg, 2002, 5. Auflage, 319-342.
25. Janeway, C. A. Die Erzeugung von T-Zell-Rezeptor-Liganden. In „Immunologie“, Travels, P., Walport, M., Schlomchik, M. Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart ; Heidelberg, 2002, 5. Auflage, 168-179.
26. Janeway, C. A. Die gezielte Beeinflussung der Immunantwort. In „Immunologie“, Travels, P., Walport, M., Schlomchik, M. Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart ; Heidelberg, 2002, 5. Auflage, 593-638.
27. Jondal, M., Schirmbeck, R., and Reimann, J. 1996. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5:295-302.
28. Kalergis, A. M., and Ravetch, J. V. 2002. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells *J. Exp. Med.* 195:1653-1659.
29. Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6020-6024.
30. Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. 2001. Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* 166:1439–1442.
31. Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* 13:291–298.
32. Lanzavecchia, A. 1998. Immunology. License to kill. *Nature* 393:413-414.

33. Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263–266.
34. La Temple, D. C., Abrams, J. T., Zhang, S. Y., and Galili, U. 1999. Increased immunogenicity of tumor vaccines complexed with anti-Gal: studies in knockout mice for α 1,3 galactosyltransferase. *Cancer Res.* 59:3417–3423.
35. Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., and Marshak-Rothstein, A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
36. Machy, P., Serre, K., Baillet, M., and Leserman, L. 2002. Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4⁺ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains. *J. Immunol.* 168: 1172-1180.
37. Machy, P., Serre, K., and Leserman, L. 2000. Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc γ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30:848–857.
38. Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O’Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G. B., Vabulas, R. M., and Wagner, H. 2002. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32:2356-2364.
39. Mellman, I., and Steinman, R. M. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255–258.
40. Pearse, R. N., Kawabe, T., Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T., and Ravetch, J. V. 1999. SHIP recruitment attenuates Fc γ RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity* 10:753–760.

41. Pierre, P., and Mellman, I. 1998. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93:1135-1145.
42. Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R., and Germain, R. N. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6:715-726.
43. Ramirez, M. C., and Sigal, L. J. 2002. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J. Immunol.* 169:6733-6742.
44. Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. 1999. Fc γ Receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalisation. *J. Exp. Med.* 189:371-380.
45. Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
46. Roake, J. A., Rao, A. S., Morris, P. J., Larsen, C. P., Hankins, D. F., and Austyn, J. M. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181:2237-2247.
47. Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell. Biol.* 1:362-368.
48. Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H. G. 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:2891-2894.

49. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down regulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400.
50. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. 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 α . *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.
51. Sanderson, S., and Shastri, N. 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int. Immunol.* 6:369-376.
52. Schnell, S., Young, J. W., Houghton, A. N., and Sadelain, M. 2000. Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4⁺ T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J. Immunol.* 164:1243-1250.
53. Schuler, G., and Steinman, R. M. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161:526-546.
54. Schuurhuis, D. H., Ioan-Facsinay, A., Nagelkerken, B., Van Schip, J. J., Sedlik, C., Melief, C. J. M., Verbeek, J. S., and Ossendorp, F. 2002. Antigen-antibody immune complex empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8⁺ CTL responses in vivo. *J. Immunol.* 168:2240-2246.
55. Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604.

56. Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R. and Rock, K. L. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigens. *Nature* 398:77-80.
57. Steinman, R. M. 2000. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 100:491-494.
58. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. immunol.* 9:271-296.
59. Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. 2002. Inaugural article: avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:351-358.
60. Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., and Ravetch, J. V. 1994. FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76:519-529.
61. Thery, C., and Amigorena, S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13:45-57.
62. Townsend, A. and Bodmer, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7:601-624.
63. Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., and Mellman, I. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527.
64. Vidalain, P. A., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Roubourdin-Combe, C., Gerlier, D., and Manie, S. 2000. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* 19:3304-3313.

65. Watts, C. 1997. Capture and Processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15:821-850.
66. Wernersson, S., Karlsson, M. C. I., Dahlström, J., Mattsson, R., Verbeek, J. S., and Heyman, B. 1999. IgG-Mediated Enhancement of Antibody Responses Is Low in Fc Receptor γ Chain-Deficient Mice and Increased in Fc γ RII-Deficient Mice. *J. Immunol.* 163:618-622.
67. Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185:317-328.

8 Anhang

Abbildung 1 FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle der **DCs nach Stimulierung mit LPS (0,1 mg/ml)** zur Beurteilung der Reifung

A : Bestimmung der DC-Population

B : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

C : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

D : CD 8 (CD8a) + B-Zellen (B220)

E : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E) + Adhäsionsmoleküle (CD 11c)

F : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b) + Adhäsionsmoleküle (CD11c)

Abbildung 2 FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle der **nicht mit LPS stimulierten DCs** zur Beurteilung der Reifung und ihre grafische Darstellung anhand der Median Fluorescence Intensity (MFI)

A : DC-Population (Kontrolle) B : Adhäsionsmoleküle (CD11c)

C : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

D : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

E : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b) F : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

G : Grafische Darstellung von 2A bis 2F anhand der Median Fluorescence Intensity

Abbildung 3 Die Grafik zeigt den **Nachweis von SIINFEKL:H-2K^b gemessen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 25.D1.16** nach Inkubation mit unreifen DCs ohne Antigen (A), reifen DCs ohne Antigen (B), unreifen DCs mit SIINFEKL (C), reifen DCs mit SIINFEKL (D), unreifen DCs mit OVA (E), reifen DCs mit OVA (F), unreifen DCs mit OVA-DNP (G) und reifen DCs mit OVA-DNP (H).

Abbildung 4 Graphische Darstellung der **Unterschiede der SIINFEKL:H-2K^b-Präsentation** nach Inkubation mit verschiedenen Antigenen bei unreifen und reifen DCs (aus der Abb. 3) anhand der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity).

Abbildung 5 **Phasenkontrastmikroskopische Darstellung** der unreifen DCs mit OVA-DNP (A) und Darstellung der unreifen DCs mit an FITC gekoppelten OVA-DNP mittels **Immunfluoreszenz** (B) in unterschiedlichen Feldern.

Abbildung 6 Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt **den Nachweis der intrazellulären Aufnahme von verschiedenen Immunkomplexen** - IgG1-Anti-DNP-OVA-DNP (A), IgG2a-Anti-DNP-OVA-DNP (B), IgG3-Anti-DNP-OVA-DNP (C) und IgE-Anti-DNP-OVA-DNP (D) - in unreifen DCs. OVA-DNP (ohne Antikörper) ist als Kontrolle in Abb. 5 dargestellt.

Abbildung 7 **Fluoreszenz von FITC nach Internalisierung der verschiedenen Immunkomplexe (ICs) in unreifen DCs sowie eine graphische Darstellung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) (F)**
A : Fluoreszenz nach der Aufnahme des Antigens (OVA-DNP) allein (Kontrolle)
B : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG1-Anti-DNP-OVA-DNP
C : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG2a-Anti-DNP-OVA-DNP
D : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgG3-Anti-DNP-OVA-DNP
E : Fluoreszenz nach der Aufnahme des IC- IgE-Anti-DNP-OVA-DNP

Abbildung 8 **Qualitative Messung** der verschiedenen anti-OVA-DNP monoklonalen Antikörper mittels **Streifentest**
A : Antikörper IgG1 B : Antikörper IgG2a
C : Antikörper IgG3 D : Antikörper IgE

Abbildung 9 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei **unreifen DCs** (A bis D) und bei **den durch LPS gereiften DCs** (E bis H) **ohne Internalisierung von Antigen und ICs (Kontrolle)**

A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

Abbildung 10 FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von Antigen – **OVA-DNP (A-D) und OVA (E-H)**

A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

Abbildung 11.I FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von verschiedenen ICs

IgG1-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

A : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)
B : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)
C : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)
D : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

IgG2a-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

E : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

F : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

G : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

H : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

Abbildung 11.II FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle bei unreifen DCs nach Internalisierung von verschiedenen ICs

IgG3-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

I : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

J : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

K : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

L : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

IgE-Anti-DNP+OVA-DNP als Immunkomplex

M : kostimulierende Moleküle B 7.1 (CD80)

N : kostimulierende Moleküle B 7.2 (CD86)

O : MHC-Klasse-II-Moleküle (I-A/I-E)

P : MHC-Klasse-I-Moleküle (H-2K^b)

Abbildung 12 Vergleich der „**Cross-Präsentation**“ mittels **β-Galactosidase Produktion aus B3Z-Zellen**. Dargestellt ist die Umsetzung des spezifischen Substrates mittels Photometer.

Abbildung 13 Extinktionsverhalten der DCs nach Aufnahme von OVA und OVA-DNP-IgG3 **in unterschiedlichen Konzentrationen**

Abbildung 14 SIINFEKL:H-2K^b-Präsentation bei unreifen DCs nach Inkubation mit SIINFEKL **in unterschiedlichen Konzentrationen**

Abbildung 15 Darstellung der Gelelektrophorese von **gereinigtem monoklonalen anti-OVA-DNP IgG3** mit der schweren und leichten Kette unter reduzierenden Bedingungen

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring möchte ich für die Ermöglichung einer wissenschaftlichen Arbeit an seiner Klinik herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Ollert möchte ich mich für die Überlassung des Themas und seinem steten Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. M. Mempel für seine ausgezeichnete Betreuung während des praktischen und theoretischen Teils der Arbeit sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene. Seine Unterstützung hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Heuser für ihre praktische Hilfe während der gesamten Labortätigkeit und beim Laborteam von Dr. Hochrein für die Einarbeitung in die Zellgewinnung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Verena für alles, was sich im Einzelnen nicht aufzählen lässt.

10 Lebenslauf

Nachname: JEON
Vorname: Seong Hwan
Geburtsdatum: 8. Nov. 1973
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: Verheiratet mit Verena Jeon geb. Heidbrink, Ärztin
Geburtsort: Pusan, Südkorea

Schule:

1980-1986 Grundschule, Pusan
1986-1989 Mittelschule, Pusan
1989-1992 Gymnasium, Abitur, Pusan
1994-1995 Deutsch-Sprachkurs, Philipps-Universität, Marburg
1995-1996 Universitätsvorbereitungskurs (Studienkolleg),
Philipps-Universität, Marburg (entspricht der 13. Klasse
in Deutschland)

Studium:

Wintersemester 96/97-
Sommersemester 2001 Zahnmedizinstudium in Philipps-Universität, Marburg
21. Jan. 1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung für Zahnmedizin,
Philipps-Universität, Marburg
07. Apr. 1999 Zahnärztliche Vorprüfung, Philipps-Universität, Marburg
19. Nov. 2001 Zahnärztliches Examen, Philipps-Universität, Marburg

Berufserfahrung:

Jan. 2003 - Jun. 2003 Zahnarzt in Kvinesdal, Norwegen
Nov. 2003 - Feb. 2004 Assistenz Zahnarzt in der Praxis von
Dr. Ittershagen, Duisburg
Seit 01. Mär. 2004 Weiterbildungsassistentenarzt zum Oralchirurg,
Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie in Jung-Stilling-
Krankenhaus, Siegen
Prof. Dr. med. Dr. med. dent. B. Hell