

Micromet AG
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Untersuchungen zur Eignung M-DC8-positiver dendritischer
Zellen für Vakzinierungsansätze beim Menschen**

Ines Mende

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra
2. Hon.-Prof. Dr. P. A. Baeuerle,

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 20.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.04.2003 angenommen.

Die der nachfolgenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden bei der Micromet AG in München und am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Vakzinierungsstrategien in der Tumorthherapie	1
1.2	Dendritische Zellen.....	5
1.2.1	Übersicht.....	5
1.2.2	Antigenpräsentierende Eigenschaften	7
1.2.3	Interaktion mit T-Zellen	12
1.3	M-DC8⁺ Zellen	14
1.4	CD16: Ein Fcγ-Rezeptor als Zielstruktur.....	16
1.4.1	Übersicht.....	16
1.4.2	CD16-basierte Ansätze in der Tumorthapie	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	Chemikalien und Lösungen	21
2.2	Protein-Techniken	23
2.2.1	Kopplung von Peptidantigen mit Antikörpern	23
2.2.2	Kopplung von Proteinantigen mit Antikörpern.....	24
2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	26
2.2.4	Nachweis von IgG-Antikörpern im Immunblotverfahren.....	27
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Antikörpern im ELISA	28
2.2.6	Bestimmung von Cytokin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen durch ELISA	29
2.2.7	Bestimmung der Kopplungseffizienz von fluoreszenzmarkierten Antigenen mit Antikörpern (F/P-Ratio)	30
2.2.8	Biotinylierung und Fluoresceinmarkierung von Antikörpern	30
2.2.9	Herstellen einer Anti-Maus IgG-Affinitätssäule zur Reinigung des D-DC8.3-Antikörpers	31
2.2.10	Reinigung von IgG-Antikörpern	31

2.2.11	Konzentrationsbestimmung von Antikörpern durch photometrische Messung ...	32
2.3	Zellkulturtechniken	32
2.3.1	Medien und Puffer für die Zellkultur	32
2.3.2	Verwendete T-Zell-Klone und Zell-Linien	34
2.3.3	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Blut	35
2.3.4	Lyse von Erythrozyten.....	35
2.3.5	Isolation von M-DC8 ⁺ -Zellen aus PBMCs mit Hilfe von magnetischen Partikeln.....	36
2.3.6	Differenzierung von M-DC8 ⁺ -Zellen zu immaturren dendritischen Zellen	36
2.3.7	Maturierung von immaturren dendritischen Zellen	37
2.3.8	Kultivierung und Restimulation von CD4 ⁺ T-Zellklonen	37
2.3.9	Kultivierung und Restimulation von CD8 ⁺ T-Zellklonen	38
2.3.10	Kryokonservierung von Zellen.....	38
2.4	Durchflußzytometrie	39
2.4.1	Verwendete Antikörper	39
2.4.2	Darstellung von Oberflächenmarkern	41
2.5	Zelluläre Assays	43
2.5.1	Aktivierung von T-Zellen durch M-DC8 ⁺ -Zellen bei Zugabe von Antikörper-Antigen-Konjugaten	43
2.5.2	Analyse des Aufnahmeweges der Konjugate	44
2.5.3	Zytotoxizitätstest zum Nachweis der Spezifität des CD8 ⁺ T-Zellklons	45
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	Charakterisierung der von den monoklonalen Antikörpern M-DC8 und D-DC8.3 erkannten Zellpopulationen.....	47
3.1.1	Expression der M-DC8 und D-DC8.3-Antigene	47
3.1.1.1	Spendervariabilität der Antigenexpression.....	47
3.1.1.2	Veränderung der Antigenexpression unter Kulturbedingungen.....	48
3.1.1.3	Expression von zellinienspezifischen Oberflächenmolekülen	49

3.1.1.4	Einordnung der M-DC8 ⁺ -Zellen und D-DC8.3 ⁺ -Zellen unter den monozytären Zellen	50
3.1.2	Expression des Fcγ-Rezeptors CD16.....	52
3.1.3	Expression von Oberflächenmolekülen auf M-DC8 ⁺ -Zellen	52
3.1.3.1	Expression von MHC-Molekülen.....	52
3.1.3.2	Expression von kostimulatorischen Moleküle.....	53
3.1.3.3	Veränderung der M-DC8 ⁺ -Zellen durch in-vitro-Kultivierung.....	54
3.1.4	Internalisierung des CD16- und des D-DC8.3-Antigens durch M-DC8 ⁺ -Zellen nach Antikörperbindung.....	55
3.2	Studien zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenem Antigen für die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen	56
3.2.1	Herstellung von Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten.....	56
3.2.1.1	Chemische Kopplung	56
3.2.1.2	Analyse der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate	59
3.2.2	Spezifische Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch M-DC8 ⁺ -Zellen.....	62
3.2.2.1	Effizienz unterschiedlicher Antikörper-Peptidantigen-Konjugate	64
3.2.2.2	Die Bedeutung einer stabilen Antikörper-Peptidantigen-Konjugation	65
3.2.2.3	Effekt von Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten auf T-Zellen in Abwesenheit von M-DC8 ⁺ -Zellen	67
3.2.2.4	Stimulation von T-Zellen durch M-DC8 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Antikörper-Tetanustoxoid-Peptid-Konjugat.....	68
3.2.2.5	Untersuchungen zum Mechanismus der Internalisierung	69
3.2.3	Spezifische Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch immature dendritische Zellen.....	71
3.2.3.1	Aktivierungseffizienz unterschiedlicher Antikörper-Tetanustoxoid-Peptid-Konjugate	72
3.2.3.2	Die Bedeutung der kovalenten Bindung zwischen Antikörper und Tetanustoxoid-Peptid.....	73
3.3	Untersuchungen zur Kreuzpräsentation von exogen aufgenommenem Antigen im MHC-Klasse I-Kontext durch M-DC8⁺-Zellen.....	75
3.3.1	Etablierung eines Testsystems zur Untersuchung der Kreuzpräsentation.....	76

3.3.2	Spezifität des CD8 ⁺ T-Zellklons.....	77
3.3.3	Herstellung von Konjugaten aus Antikörper und Her2/neu-Peptid	79
3.3.4	Aktivierung von Her2/neu-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch M-DC8 ⁺ - Zellen, die mit Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugat inkubiert wurden.....	81
3.3.4.1	T-Zellaktivierung in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration.....	81
3.3.4.2	T-Zellaktivierung bei zusätzlicher Kostimulation durch anti-NKG2D.....	82
3.3.5	Herstellung von Antikörper-Protein-Konjugaten	86
3.3.6	Aktivierung von Her2/neu-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch M-DC8 ⁺ - Zellen, die mit Antikörper-Protein-Konjugat inkubiert wurden.....	91
4	DISKUSSION.....	93
4.1	Synthesestrategien für Antikörper-Antigen-Konjugate	93
4.2	Verwendung von CD25 und CD69 als T-Zellaktivierungsmarker	94
4.3	D-DC8.3-Antigen und Fc̄-Rezeptor III als Zielstrukturen auf M-DC8 ⁺ - Zellen.....	95
4.4	Möglichkeiten für das Targeting von nativen M-DC8 ⁺ -Zellen und immaturen M-DC8 ⁺ dendritischen Zellen.....	98
4.5	Fähigkeiten der M-DC8 ⁺ -Zellen zur Antigenpräsentation.....	99
4.5.1	Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen im MHC-Klasse II-Kontext.....	99
4.5.2	Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen im MHC-Klasse I-Kontext	101
4.6	Anwendungspotential von M-DC8 ⁺ -Zellen für Vakzinierungsansätze	106
4.7	Ausblick	108
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	110
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	112
7	LITERATURVERZEICHNIS	114

8 DANKSAGUNG

9 LEBENSLAUF

1 Einleitung

1.1 Vakzinierungsstrategien in der Tumorthherapie

Tumorerkrankungen stellen in den Industrienationen die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen dar. Trotz Früherkennungsdiagnostik und verbesserten chirurgischen Methoden zur Entfernung von Neoplasien blieb die Zahl der Krebstoten in den letzten Jahren nahezu unverändert hoch. Bei jährlich etwa 350.000 Neuerkrankungen und 210.000 Sterbefällen pro Jahr in Deutschland (Quelle: statistisches Bundesamt) gewinnt die Suche nach alternativen Therapien zur Verbesserung der Behandlung von Krebspatienten zunehmend an Bedeutung. Seitdem Forscher in den 50er Jahren anhand von Untersuchungen bei Mäusen herausgefunden haben, dass auch Selbstantigene unter bestimmten Voraussetzungen eine Immunantwort induzieren können, scheint es möglich, durch gezielte Aktivierung des körpereigenen Immunsystems die Überlebensrate bei Krebserkrankungen zu verbessern.

Generell können zwei unterschiedliche Strategien das Immunsystem für die Bekämpfung von Tumorerkrankungen genutzt werden. So existiert einerseits die Möglichkeit, ähnlich einer passiven Immunisierung, durch Antikörper-basierte Therapie direkt Effektorzellen zu rekrutieren, um Tumorzellen zu eliminieren. Zu dieser Art von Immuntherapie gehört beispielsweise der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen tumorspezifische Antigene, wie der gegen CD20 gerichtete monoklonale Antikörper Rituximab (Maloney et al., 1997 und 1999) oder der anti-Her2/neu-Antikörper Trastuzumab (Pegram et al., 1998; Baselga, 2001), die in klinischen Studien erfolgreich Tumorstadium inhibieren konnten. Der Wirkmechanismus von monoklonalen Antikörpern beruht im wesentlichen auf der sogenannten Antikörper-vermittelten zelluläre Zytotoxizität (ADCC), die über die Bindung des konstanten Teils des Antikörpers an die Fc-Rezeptoren von natürlichen Killerzellen diese Effektorzellpopulation aktiviert, um letztendlich eine Lyse der Tumorzellen zu bewirken. Weiterhin kann die Opsonierung der Tumorzellen mit den Antikörpern die Aktivierung des Komplementsystems hervorrufen oder je nach Zielstruktur des Antikörpers eine direkte Inhibition der Tumorzellproliferation durch Blockierung von Wachstumsfaktorrezeptoren ausgelöst werden (Maloney et al., 2002; Baselga et al., 2001). Neben monoklonalen Antikörpern ist es auch möglich, mittels bispezifischer Moleküle die gewünschte Effektorpopulation zu rekrutieren. So gelang es mittels eines bispezifischen anti-CD19/anti-CD3-Einzelkettenantikörpers, B-Lymphomzellen mit zytotoxischen T-Zellen effizient zu

eliminieren (Dreier et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit, die tumorspezifische Zytotoxizität bei Antikörper-basierten Therapien zu erhöhen, besteht in der Kopplung von Antikörpern mit Toxinen. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür stellt die Fusion der variablen Domäne eines anti-CD22-Antikörpers mit dem Pseudomonasexotoxin zur Therapie der Haarzell-Leukämie dar (Kreitman et al., 2001).

Die andere Strategie zielt darauf ab, eine langfristige Immunantwort zu induzieren, indem analog zur aktiven Immunisierung bei Infektionskrankheiten tumorassoziierte Antigene oder Lysate von Tumorzellen zusammen mit immunstimulierenden Substanzen verabreicht werden. Durch ein immer genaueres Verständnis des Zusammenspiels der Immunzellen und der molekularen Grundlagen der Antigenpräsentation konnten ständig verbesserte Vakzinierungsverfahren entwickelt werden (Berzofsky et al., 2001). So wurden anfangs abgetötete Tumorzellen zusammen mit Adjuvantien gegeben, wobei die Aufnahme und Präsentation der Tumorantigene durch antigenpräsentierende Zellen zufällig erfolgte. Seitdem jedoch immer mehr Daten darauf hinweisen, dass der Aktivierungsstatus und die Art der antigenpräsentierenden Zelle einen großen Einfluß auf die Immunantwort hat, insbesondere hinsichtlich der Frage, ob eine Aktivierung des Immunsystems oder eine Toleranzinduktion stattfindet, konzentrieren sich die heute verfolgten Strategien darauf, das Antigen direkt mit der gewünschten antigenpräsentierenden Zellpopulation in Kontakt zu bringen (Berzofsky et al., 2001; Biragyn und Kwak, 2000). Unter den professionell antigenpräsentierenden Zellen gelten die dendritischen Zellen (DC) als die geeignetste Zellpopulation, da sie als einzige die Fähigkeit besitzen, konstitutiv naive T-Zellen zu aktivieren. Auf die besonderen Eigenschaften der dendritischen Zellen wird im folgenden noch gesondert eingegangen.

Die meisten Tumorkvakzinierungsansätze unter Verwendung von dendritischen Zellen basieren darauf, die dendritischen Zellen oder ihre Vorläuferzellpopulation aus dem Blut der Patienten zu isolieren, während einer Kultivierung mit dem Antigen in Kontakt zu bringen, sie gegebenenfalls zu differenzieren und maturieren, um die Zellen anschließend dem Patienten zu reinjizieren (Nestle et al., 2001; Steinman und Dhodapkar, 2001). Dabei kamen unterschiedliche Protokolle für die verschiedensten Indikationen, beispielsweise Melanome, Prostatakrebs, Brustkrebs etc., zur Anwendung. Von wenigen Ausnahmen abgesehen basieren die Daten nur auf in vitro Studien oder klinische Studien der Phase I/II, wodurch ein direkter Vergleich der verschiedenen Methoden nur schwer möglich ist. So wurde beispielsweise neben dem Beladen der dendritischen Zellen mit Tumorlysat oder Peptiden auch die Fusion von Tumorzellen mit den antigenpräsentierenden Zellen untersucht (Li et al., 2001; Kugler et al., 2000). Weitere Untersuchungen basieren auf der Insertion von Genen für tumorassoziierte Antigene in die DCs mittels viraler oder nicht viraler Vektoren (Reeves et al., 1996; Irvine et

al., 2000). Ein Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass die Isolierung der dendritischen Zellen sehr aufwendig ist und nur in speziell ausgerüsteten Kliniken stattfinden kann. Außerdem ist die Überlebensspanne der reinjizierten dendritischen Zellen begrenzt und bei Einsatz von maturaerten Zellen besteht das Problem, dass diese Zellen nicht mehr von sich aus zu den sekundären Lymphorganen wandern (Barratt-Boyes et al., 2000). Eine Übersicht über die unterschiedlichen Vakzinierungsstrategien unter Verwendung von dendritischen Zellen (nach Biragyn und Kwak, 2000) ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

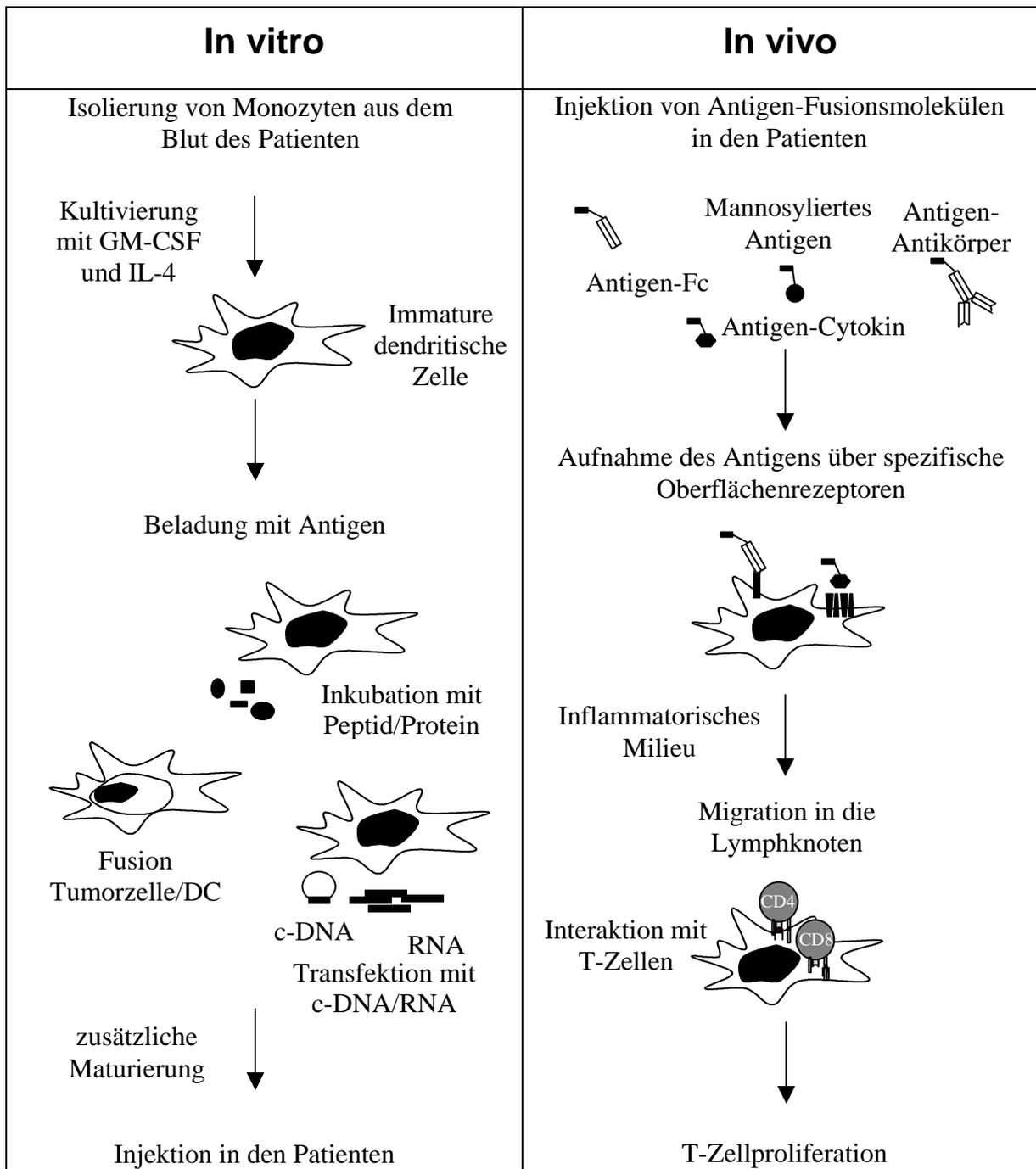


Abb. 1: Schematische Darstellung der Vakzinierungsstrategien unter Verwendung von dendritischen Zellen

Ein Ansatz, das Problem der Isolierung von dendritischen Zellen zu umgehen, besteht in der Identifizierung von DC-spezifischen Markern und der Generierung von Antikörper-Antigenfusionsmolekülen oder -konjugaten, die eine gezielte Aufnahme des Antigens in vivo ermöglichen. Im murinen System wurde der Erfolg einer derartigen Strategie unter Verwendung eines CD11c-Antikörpers gezeigt (Wang et al., 2000), während im humanen System erst vor kurzem DC-spezifische Marker identifiziert wurden, deren Verwendung für das Antigen-Targeting noch zu untersuchen bleibt. Die Verwendung von Markern, die nicht ausschließlich für dendritische Zellen spezifisch sind, zeigt jedoch auch im humanen System bei in-vitro-Experimenten eine deutliche Verbesserung der Immunantwort. Insbesondere die gezielte Aufnahme von Antigenen über Fc-Rezeptoren, beispielsweise in Form von Antigen-IgG-Immunkomplexen erhöht die Effizienz der Antigenaufnahme und kann sowohl eine CD4⁺ als auch eine CD8⁺ T-Zellantwort stimulieren (Regnault et al., 1999). Auch mannosylierte Antigene werden effizienter als das entsprechende nicht-mannosylierte Antigen aufgenommen (Tan et al., 1997; Apostolopoulos et al., 2000). Selbst die genetische Fusion von inflammatorischen Chemokinen mit einem Tumorantigen bewirkt die Aufnahme des Antigens über die entsprechenden Chemokinrezeptoren und induziert eine verlängerte Überlebensrate in tumorerkrankten Mäusen (Biragyn et al., 1999).

Allgemein ist bei Tumorstimmungsansätzen neben der Art der Antigenaufnahme auch das für die Vakzinierung verwendete Antigen zu berücksichtigen. Mittlerweile sind zwar viele Antigene bekannt, die auf Tumoren verstärkt exprimiert werden. Aber die wenigsten Antigene sind wirklich tumorspezifisch, sondern sie werden auch im Normalgewebe exprimiert. Bei Verwendung eines nicht spezifischen Antigens zur Tumorstimmung kann dies zu schweren Autoimmunerkrankungen führen, wobei die Folgen um so gravierender sind, je weiter verbreitet das Antigen auf Normalgewebe exprimiert wird und je potenter die von dem Vakzin induzierte Immunantwort ist (Ludewig et al., 2000). Ein zusätzliches Problem bei der Immunisierung gegen Tumorantigene stellt die Heterogenität der Tumorzellen sowie ein potentieller Verlust des Tumorantigens dar. Um eine vollständige Eliminierung der Tumorzellen bewirken zu können, ist es notwendig, die Vakzinierung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Tumorerkrankung vorzunehmen, wenn die Tumorzellheterogenität noch vergleichsweise begrenzt ist. Zusätzlich sollten immer mehrere Tumorantigene für die Immunisierung verwendet werden, da ein gleichzeitiger Verlust von mehreren tumorspezifischen Antigenen weniger wahrscheinlich ist (Gouttefangeas und Rammensee, 2000). Trotz allem gibt es Tumor-Evasionsmechanismen, wie den Verlust von MHC-Klasse I oder eine Verringerung der Antigenprozessierung in den Tumorzellen, denen nicht durch eine Verbesserung der DC-basierten Vakzinierung entgegengewirkt werden kann, da diese nur die antigenpräsentierende Zelle beeinflusst.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Übersicht

Dendritische Zellen (DC) stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die ihren Namen ihrer typischen Morphologie mit den langen Dendriten-ähnlichen Ausläufern verdanken. Sowohl im humanen als auch im murinen System existieren unterschiedliche Subtypen, die von myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen abstammen sollen. Da die vorliegende Arbeit auf Untersuchungen des humanen System basiert, beschränkt sich die Darstellung im wesentlichen auf die Vorstellung der humanen dendritischen Zellpopulationen. Die Charakterisierung der humanen dendritischen Zellen basiert aufgrund der geringen Zahl an murenen dendritischen Zellen im Blut hauptsächlich auf in-vitro-Untersuchungen der DC-Entwicklung nach Kultivierung von DC-Vorläuferzellen oder unreifen dendritischen Zellen. Im humanen System unterscheidet man Langerhanszellen mit der charakteristischen Expression von CD1a und Langerin, die CD11c positiven interstitiellen dendritischen Zellen sowie die plasmazytoiden dendritischen Zellen mit einer den Plasmazellen ähnlichen Morphologie (Libscomb und Masten, 2002; Shortman und Liu, 2002). Während die interstitiellen DCs myeloiden Ursprungs sind, wird von den plasmazytoiden DCs vermutet, dass sie auf lymphoide Vorläuferzellen zurückgehen, da die plasmazytoiden Vorläuferzellen keine Expression von myeloiden Antigenen aufweisen, im Gegensatz dazu aber den Prä-TCR-Komplex exprimieren. Plasmazytoide DCs lassen sich aus CD11c⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD14⁻, CD123⁺ Vorläuferzellen in Gegenwart von IL-3 erhalten (Grouard et al., 1997), während interstitielle DCs durch Kultivierung von Monozyten in GM-CSF und IL-4 oder TNF- α -haltigen Medium generiert werden können (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Caux et al., 1999). Im Unterschied dazu benötigen Langerhanszellen neben GM-CSF und IL-4 bzw. TNF- α noch zusätzlich TGF- β zur Differenzierung aus CD11c⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD14⁻ Vorläuferzellen (Ito et al., 1999). Im peripheren Blut werden nur zwei Subpopulationen von humanen dendritischen Zellen aufgrund ihrer CD11c-Expression unterschieden (Robinson et al., 1999; O'Doherty et al., 1994). Dabei entspricht die CD11c⁺ DC1-Population allen aus Monozyten erhaltenen DC-Subpopulationen, während die CD11c⁻ Fraktion der DC2-Zellen mit den plasmazytoiden dendritischen Zellen vergleichbar sind (Shortman und Liu, 2002). Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Entwicklung der humanen DC-Subpopulationen (modifiziert nach Libscomb und Masten, 2002).

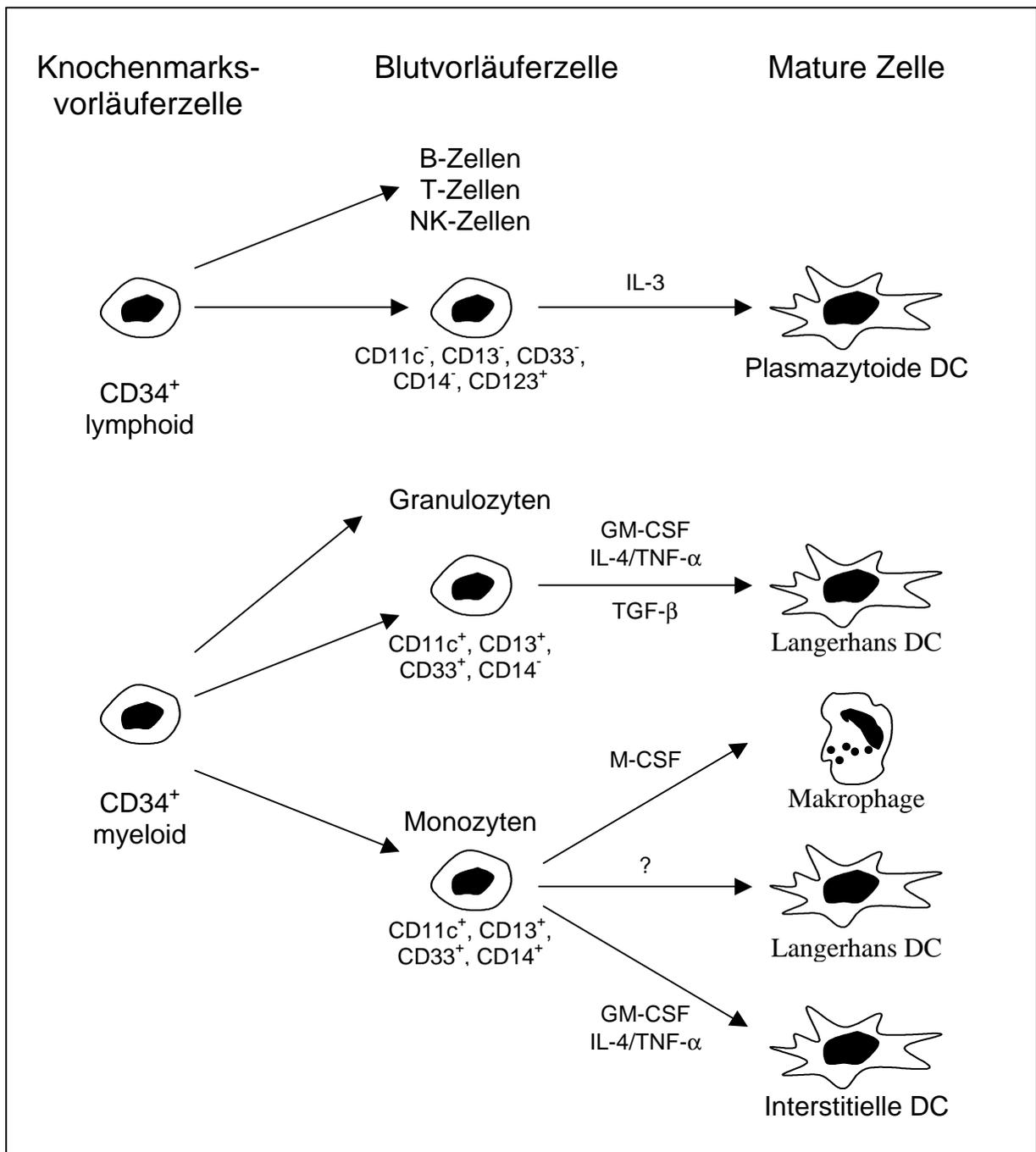


Abb. 2: Entwicklung der unterschiedlichen Subpopulationen humaner dendritischer Zellen aus den Vorläuferzellen im Knochenmark

Die Entwicklung von immaturren dendritischen Zellen, die auf die Antigenaufnahme spezialisiert sind, zu maturaen dendritischen Zellen, die eine effiziente Aktivierung von T-Zellen induzieren, erfordert ein Reifungssignal. Dieses kann über fünf verschiedene Familien von Oberflächenrezeptoren vermittelt werden. So sind an der Reifung von immaturren dendritischen Zellen sowohl Toll-Like Rezeptoren (TLR), Cytokinrezeptoren, die Familie der TNF-Rezeptoren, Apoptoserezeptoren und Fc-Rezeptoren beteiligt (Guermonez et al., 2002). Das Maturierungssignal bewirkt neben einer Blockierung der Antigenaufnahme die

Migration der dendritischen Zellen aus den peripheren Geweben zu den Lymphknoten, wo ein Kontakt mit T-Zellen ermöglicht wird. Gleichzeitig wird die Kapazität zur T-Zellstimulation erhöht, indem die Expression sowohl von MHC-Peptid-Komplexen als auch von kostimulatorischen Molekülen gesteigert wird.

Die Unterschiede in der Funktion der einzelnen Subpopulationen sind noch weitgehend unklar, da je nach Kultivierungsbedingungen und Aktivierungsstatus unterschiedliche Resultate erzielt wurden. So sind alle drei DC-Typen in der Lage im maturierten Zustand CD4 und CD8 positive naive T-Zellen zu aktivieren (Kohrgruber et al., 1999). Für die interstitiellen DCs wurde gezeigt, dass sie mit B-Zellen interagieren und diese zur Differenzierung anregen (Caux et al., 1997). Die plasmazytoiden DCs produzieren bei viraler Stimulation große Mengen an IFN- α , was auf eine Bedeutung bei viralen Infektionen hinweist (Cella et al., 1999). Weiterhin wurde ein unterschiedliches Cytokinexpressionsprofil nach Aktivierung der dendritischen Zellen gefunden, das auf eine Th1-polarisierende Wirkung bei den DC1-Zellen und auf einen Th2-polarisierenden Effekt bei DC2-Zellen hindeutet (Rissoan et al, 1999). Dagegen konnten Cella et al. (2000) auch bei plasmazytoiden DCs nach Aktivierung durch Influenza Virus und CD40L die Polarisierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen beobachten.

1.2.2 Antigenpräsentierende Eigenschaften

Bei den dendritischen Zellen handelt es sich um professionelle antigenpräsentierende Zellen. Fälschlicherweise wurde anfangs angenommen, dass dendritische Zellen nicht in der Lage seien, Antigen über Phagozytose aufzunehmen, da die ersten Studien auf Untersuchungen von isolierten maturaen dendritischen Zellen basierten, deren Fähigkeit zur Antigenaufnahme bereits reduziert war (Steinman und Swanson, 1995). Erst 1995 gelang es Sallusto et al. zu zeigen, dass humane dendritische Zellen, die aus PBMCs nach Kultivierung in GM-CSF und IL-4 generiert wurden, die Fähigkeit besitzen, sehr effizient Antigen über Makropinozytose und Mannoserezeptoren aufzunehmen. Mittlerweile sind die Wege zur Antigenaufnahme und Antigenprozessierung bei dendritischen Zellen genauer charakterisiert. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die Antigenprozessierungswege bei dendritischen Zellen.

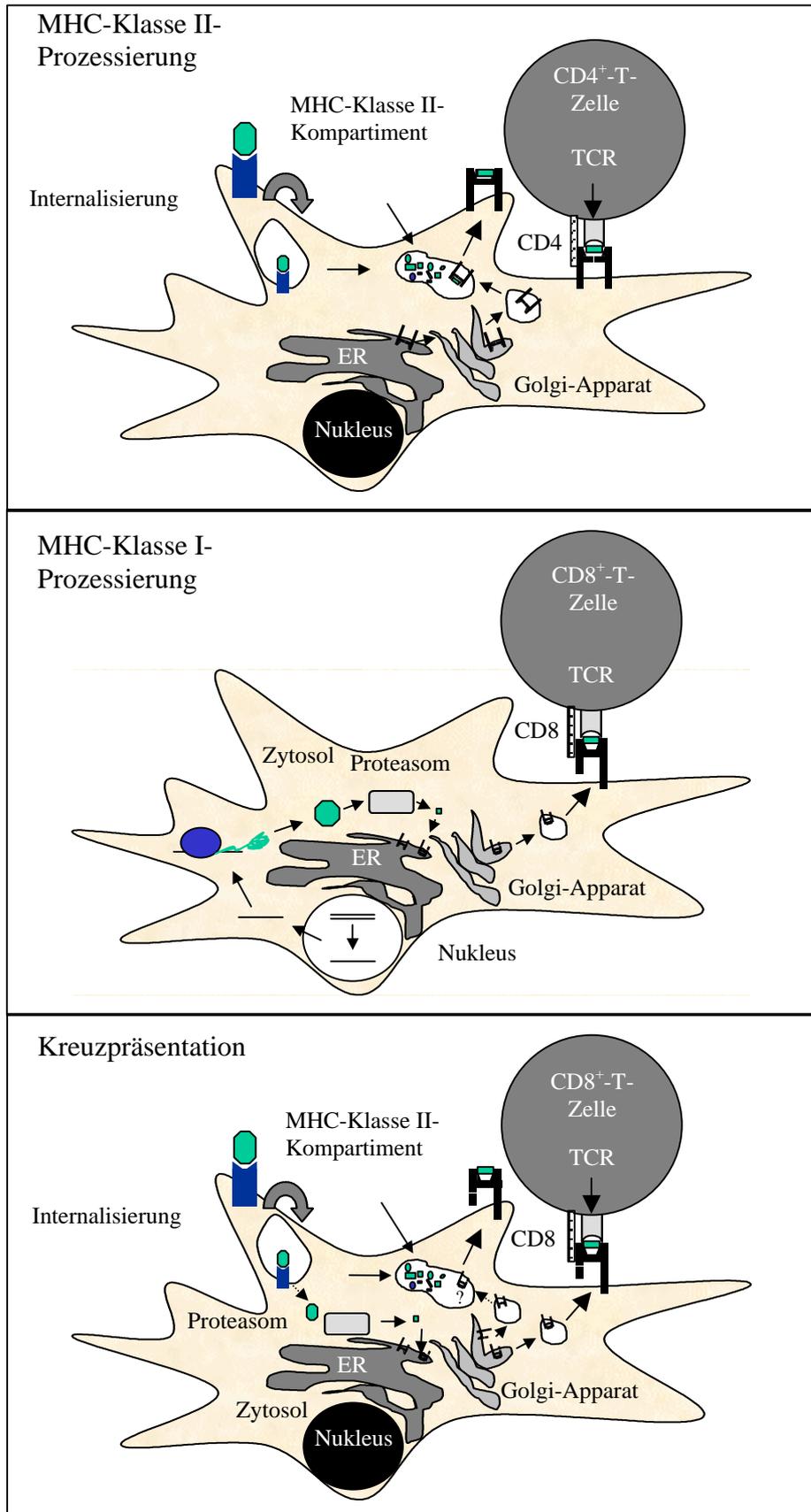


Abb. 3: Antigenprozessierungswege bei dendritischen Zellen
MHC-Klasse I-/MHC-Klasse II-Prozessierung und Kreuzpräsentation

Im immaturren Zustand nehmen dendritische Zellen sehr effizient Antigen auf. Dazu besitzen sie eine Reihe von endozytischen Rezeptoren, die nach Bindung eines geeigneten Liganden über ihre jeweilige zytoplasmatische Domäne eine Signalkaskade initiieren, die zur Bildung von Clathrin-bedeckten endozytischen Vesikeln führt. Die Aufnahme des Makromoleküls erfolgt über eine spezielle Region der Plasmamembran (coated pits) mit anschließendem Transport des Makromoleküls in den Clathrin-bedeckten Vesikeln. Zu den endozytischen Rezeptoren zählen neben den Fc-Rezeptoren, die den konstanten Teil von Immunglobulinen erkennen, Komplementrezeptoren, Scavenger Rezeptoren (Aufnahme von bakteriellen Lipoproteinen) und Hitzeschockproteinrezeptoren. Zusätzlich existiert die Familie der C-Typ-Lektin-Rezeptoren, die ihre Liganden, meist Monosaccharide wie Mannose, Ca^{2+} -abhängig erkennen. Dazu gehören unter anderem der Mannoserezeptor, DEC-205 und DC-SIGN. Neben der rezeptorvermittelten Aufnahme über Endozytose können Antigene von dendritischen Zellen auch über Phagozytose und Makropinozytose aufgenommen werden. Diese Prozesse sind aktinabhängig und führen zu der Bildung von intrazellulären Vakuolen. Makropinozytose ist ein in immaturren dendritischen Zellen konstitutiver Prozeß, bei dem große Mengen an umgebender Flüssigkeit aufgenommen werden (Sallusto et al., 1995). Die Phagozytose führt zur Aufnahme von Pathogenen oder apoptotischen und nekrotischen Zellen unter Beteiligung von endozytischen Rezeptoren.

Bei Erhalt eines Reifungssignales wird die Antigenaufnahme weitestgehend gestoppt. Ursache hierfür ist einerseits eine Herunterregulierung der Expression von endozytischen Rezeptoren, andererseits wird insbesondere auch die unspezifische Aufnahme durch Makropinozytose und Phagozytose inhibiert (Sallusto et al, 1995; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Die Regulierung von Makropinozytose und Phagozytose erfolgt durch GTPasen wie Cdc42 und Rac 1 (West et al, 2000; Garrett et al, 2000).

Die von immaturren dendritischen Zellen aufgenommenen Antigene werden in endosomal-lysosomalen MHC-Klasse II-Kompartimenten prozessiert. Der reguläre MHC-Klasse II-Prozessierungsweg von exogenen Antigenen in professionellen antigenpräsentierenden Zellen umfasst die Synthese von MHC-Klasse II-Molekülen im Endoplasmatischen Retikulum mit anschließendem Transport als Nonamer (bestehend aus drei MHC Klasse II $\alpha\beta$ -Dimeren und einem Trimer der sogenannten invarianten Kette) über den Golgi-Apparat zu den primären Lysosomen. Die invariante Kette verhindert das Beladen der MHC-Moleküle mit zytosolischen oder lysosomalen Peptiden. Die Lysosomen fusionieren mit den Endosomen unter Bildung des MHC-Klasse II-Kompartiments. Im MHC-Klasse II-Kompartiment erfolgt die Prozessierung der Antigene durch lysosomale Proteasen und die Beladung der MHC-Moleküle mit den entstehenden Peptiden. Die Bildung der MHC-Klasse II-Peptidkomplexe

erfolgt durch Spaltung der invarianten Kette unter Zurückbleiben eines kurzen Peptides CLIP, das erst unter Mithilfe von HLA-DM und HLA-DO gegen Peptidsequenzen aus der Antigenprozessierung ausgetauscht wird (Übersichten in Guernonprez et al., 2002; Klein und Sato, 2000). Die Bildung von MHC-Klasse II-Peptid-Komplexen in immaturren dendritischen Zellen ist jedoch sehr ineffizient. Studien im murinen System zeigen, dass immature dendritische Zellen das Antigen zwar zu MHC-Klasse II-Kompartimenten transportieren, dort aber keine Beladung von MHC-Klasse II-Molekülen mit prozessiertem Peptidantigen stattfindet, bevor die Zelle ein Maturierungssignal erhält (Inaba et al, 2000). Bei beginnender Maturierung werden die entstehenden MHC-Klasse II-Peptid-Komplexe in MHC-Klasse II-positive nicht-lysosomale Vesikel transportiert, wo sie zusammen mit CD86 Molekülen akkumulieren, bevor sie später zur Zelloberfläche gelangen (Turley et al, 2000). Im humanen System existieren Hinweise, dass die immaturren DCs in der Lage sind, MHC-Klasse II-Peptid-Komplexe sowohl durch Beladung rezirkulierender als auch neu synthetisierter MHC-Klasse II-Moleküle mit Peptid zu bilden, diese aber in kürzester Zeit nach Erreichen der Zelloberfläche wieder internalisiert werden und rezirkulieren (Cella et al., 1997). Bei Maturierung der dendritischen Zellen steigt die halbmaximale Lebensdauer der MHC-Klasse II-Moleküle auf der Zelle von 10 h auf über 100 h an. Zusätzlich wird die Synthese von MHC-Klasse II-Molekülen bei Erhalt eines Maturierungssignales gesteigert (Cella et al., 1997). Dendritische Zellen, die kurz zuvor ein Maturierungssignal erhalten haben, befinden sich in einem Zwischenzustand, in dem sowohl noch Antigenaufnahme und Prozessierung stattfinden, als auch die MHC-Klasse II-Syntheserate erhöht ist und stabile MHC-Klasse II-Peptid-Komplexe gebildet werden (Watts und Amigorena, 2000).

Neben der Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen auf MHC-Klasse II-Molekülen sind dendritische Zellen auch zur sogenannten Kreuzpräsentation befähigt, d.h. sie sind in der Lage, exogen aufgenommenes Antigen im MHC-Klasse I-Kontext zu präsentieren und dadurch eine Aktivierung von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen zu induzieren. Auch für andere professionelle APCs wie B-Zellen (Ke und Kapp, 1996) und Makrophagen (Norbury et al., 1995) existieren *in vitro* Daten, die auf die Befähigung zur Kreuzpräsentation hinweisen allerdings wurden für diese Zellpopulationen auch gegenteilige Beobachtungen publiziert (Albert et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Ob dendritische Zellen auch *in vivo* für die Kreuzpräsentation verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, da bisher noch keine kreuzpräsentierende APC aus lymphoiden Geweben isoliert werden konnten (Heath und Carbone, 2001).

Bei dem konventionellen Weg der MHC-Klasse I-Präsentation werden zytosolische Proteine durch das Proteasom zu kurzen Peptiden prozessiert, die anschließend zum

endoplasmatischen Retikulum transportiert werden. Dort werden sie auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen. Die schweren Ketten des MHC-Klasse I-Moleküls werden nach ihrer Synthese an Calnexin und β_2 -Mikroglobulin gebunden. Dieser Komplex assoziiert mit TAP (transporter associated with antigen processing), was zur Beladung mit Peptid führt. Nach der Bindung von Peptid werden die MHC-Klasse I-Moleküle freigesetzt und zur Plasmamembran transportiert (Rock, 1996).

Der molekulare Mechanismus der Kreuzpräsentation ist dagegen weniger genau charakterisiert. Es existieren sowohl Hinweise auf einen TAP-abhängigen wie auch für einen TAP-unabhängigen Weg. Für den TAP-unabhängigen Weg wurde eine Prozessierung des exogen aufgenommenen Antigens in endosomal-lysosomalen Kompartimenten mit einer Beladung von rezirkulierenden oder neu synthetisierten MHC-Klasse I-Molekülen postuliert. Experimente bestätigen eine Kollokalisierung von MHC-Klasse I-Molekülen mit MHC-Klasse II-Molekülen in MHC-Klasse II-Kompartimenten nach einer Aufnahme durch Endozytose (Chiu et al., 1999; Gromme et al., 1999). Zusätzlich wurde von Gromme und Kollegen (1999) gezeigt, dass ein Beladen von MHC-Klasse I-Molekülen mit Peptid unter Milieubedingungen möglich ist, wie sie in MHC-Klasse II-Kompartimenten vorliegen und eine spezifische T-Zellstimulation durch Anhebung des pH-Wertes inhibiert wird. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass in dendritischen Zellen die MHC-Klasse I-Moleküle analog zu den MHC-Klasse II-Molekülen erst nach Induzierung der Reifung zur Plasmamembran transportiert werden (MacAry et al., 2001).

Für einen Transport von exogen aufgenommenem Antigen in das Zytosol sprechen mehrere Untersuchungen unter Verwendung von unterschiedlichen Antigenen und antigenpräsentierenden Zellen (Heath und Carbone, 2001). In murinen Makrophagen konnte das Auftauchen von Proteinen im Zytosol nach Aufnahme über Makropinozytose nachgewiesen werden (Norbury et al., 1997). Ovalbumin, welches über Makropinozytose aufgenommen wird, wird ebenfalls in den normalen MHC-Klasse I-Prozessierungsweg eingeschleust, da eine Blockierung von TAP oder die Inhibierung des Transports von MHC-Klasse I-Molekülen aus dem ER zur Plasmamembran durch Brefeldin A die Kreuzpräsentation verhindert (Norbury et al., 1997). Auch nach einer rezeptorvermittelten Endozytose insbesondere unter Beteiligung von Fc-Rezeptoren werden Antigene auf MHC-Klasse I-Molekülen unter Verwendung eines zytosolabhängigen Prozessierungsweges präsentiert, wie Untersuchungen mit Immunglobulin-komplexiertem Ovalbumin (Regnault et al., 1999) oder mit gp-96-komplexierten Peptiden (Singh-Jasuja et al., 2000) zeigen.

1.2.3 Interaktion mit T-Zellen

Nach Erhalt eines Maturierungssignals wandern die dendritischen Zellen zu den T-Zellbereichen der sekundären lymphoiden Organe aus, wo sie mit den T-Zellen in Kontakt kommen. Die Maturierung bewirkt eine erhöhte Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen, zu denen Mitglieder der B7-Familie (z.B. CD80, CD86) und der TNF-Rezeptorfamilie (CD40, OX40L und 41-BBL) gehören sowie von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, DC-SIGN). Insbesondere das Vorhandensein der kostimulatorischen Moleküle ermöglicht es den dendritischen Zellen eine starke T-Zellantwort zu induzieren. Dabei reicht eine im Verhältnis sehr geringe Anzahl dendritischer Zellen aus, um eine Vielzahl von T-Zellen zu stimulieren, was sich insbesondere bei der sogenannten MLR („mixed leukocyte reaction“) zeigt, bei der die Proliferation von T-Zellen nach Zugabe von APCs eines anderen Donors mit unterschiedlichen MHC-Allelen gemessen wird. Während im Normalfall ungefähr gleiche Anzahlen an Stimulator und Responderzellen eingesetzt werden, sind DCs in der Lage die 100 bis 3000-fache Anzahl an T-Zellen zu aktivieren (Banchereau und Steinman, 1998). Die Interaktion von dendritischen Zellen mit den T-Zellen wird über Adhäsionsmoleküle eingeleitet, wonach sich eine sogenannte immunologische Synapse ausbildet, in deren Zentrum sich der MHC-TCR-Komplex befindet. Zusätzlich werden auch Signalmoleküle wie Lck, Fyn und ZAP 70 an der Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle konzentriert (Lee et al., 2002; Wülfing et al., 2002).

Für eine optimale T-Zellstimulation ist neben dem Aktivierungsstatus der dendritischen Zelle auch die Dauer der Interaktion zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle entscheidend. Dabei reicht für die Aktivierung einer Effektorzelle eine Stunde aus, während ein längerer Kontakt zum Zelltod führt. Naive T-Zellen benötigen für ca. 20 h einen ununterbrochenen Kontakt zu den dendritischen Zellen, damit eine Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen erfolgen kann (Iezzi et al., 1998). Ferner kann die Art der induzierten Immunantwort von der Länge des Kontaktes zwischen APC und T-Zelle beeinflusst werden. So ist für die T-Zellpolarisierung von naiven T-Zellen zu Th1-Effektorzellen in Gegenwart von IL-12 eine kurze Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) ausreichend. Die Polarisierung zu Th2-Effektorzellen erfordert eine verlängerte TCR-Stimulation, wobei IL-4 nur während der Dauer der TCR-MHC-Interaktion einen Effekt zeigt (Iezzi et al., 1999). Auf Seiten der dendritischen Zelle (DC) kann die Zeitdauer nach Erhalt des Maturierungssignals die Fähigkeit der dendritischen Zelle beeinflussen, eine Polarisierung von T-Zellen zum Th1- oder Th2-Phänotyp zu induzieren. In-vitro Experimente mit humanen aus Monozyten generierten dendritischen Zellen weisen daraufhin, dass DCs zu einem späteren Zeitpunkt nach Erhalt des Maturierungsstimulus bevorzugt eine Th2-Polarisierung bewirken, da die Cytokinproduktion

von IL-6, IL-12 und TNF- α nach längerer Kultivierung mit einem Maturierungsfaktors wie LPS bei den dendritischen Zellen abnimmt (Langenkamp et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird eine Th1-Polarisierung zu einem frühen Zeitpunkt nach Beginn der Maturierung erreicht, wenn eine hohe Cytokinproduktion vorliegt. Auch eine Vielzahl an spezifischen MHC-Peptid-Komplexen erleichtert die Polarisierung zu einer Th1-Zelle.

Dendritische Zellen sind aber nicht nur für die Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen verantwortlich, sondern können bei Fehlen von kostimulatorischen Molekülen auch eine Toleranzinduktion oder die Deletion von T-Zellen bewirken. Eine verbreitete Theorie zur Toleranzinduktion durch dendritische Zellen ist, dass in Abwesenheit einer Infektion immature dendritische Zellen Antigen von toten Zellen aufnehmen und anschließend in die Lymphknoten wandern, wo sie aufgrund der geringen Anzahl kostimulatorischer Moleküle T-Zellanergie, Apoptose von T-Zellen oder die Bildung von T-Regulatorzellen induzieren (Mahnke et al., 2002). Erst bei Vorliegen einer Infektion erfolgt eine Maturierung der dendritischen Zellen, die mit einer verstärkten Abwanderung der aktivierten DCs in die Lymphknoten einhergeht. Dort aktivieren die DCs naive und ruhende T-Zellen unter Generierung von Effektor-T-Zellen. Als auslösendes Signal für die DC-Maturierung wurde einerseits die Erkennung von wiederkehrenden Motiven von Pathogenen durch spezielle Rezeptoren postuliert (Janeway et al., 1992), andererseits werden Gefahrensignale durch die Freisetzung von intrazellulären Komponenten bei nekrotischen Zellen für die Maturierung verantwortlich gemacht (Matzinger, 1994). Die Fähigkeit von immaturren dendritischen Zellen eine Toleranzinduktion zu bewirken, basiert unter anderem auf der Induktion von IL-10-produzierenden, nicht-proliferierenden Regulator-T-Zellen (Jonuleit et al., 2000). Auch eine bereits existierende Effektor-T-Zellpopulation kann von immaturren dendritischen Zellen inhibiert werden (Dhodapkar et al., 2001).

Es ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob für die Toleranzinduktion eine andere Subpopulation von dendritischen Zellen verantwortlich ist als für die Aktivierung von T-Zellen oder ob alle Subpopulationen abhängig von ihrem Aktivierungsstatus und des umgebenden Milieus entweder als T-Zellstimulatoren oder als toleranzinduzierende Zellen fungieren können. Im murinen System gibt es Hinweise, dass die lymphoide DEC 205⁺ CD8 α ⁺ DC-Subpopulation, die mit den plasmazytoiden DCs des humanen System vergleichbar ist, Apoptose in CD4⁺ T-Zellen induziert (Suss und Shortman, 1996). Auch in der murinen Leber wurden DEC 205⁺ dendritische Zellen mit tolerogenen Eigenschaften entdeckt (Lu et al., 2001).

In jedem Fall ist die Interaktion von dendritischen Zellen mit den T-Zellen kein einseitiger Prozess, sondern die Aktivität der dendritischen Zellen kann ebenfalls von den T-Zellen reguliert werden. Dabei ist insbesondere die Relevanz der CD40L-CD40 Interaktion für die Maturierung der dendritischen Zellen (Caux et al., 1994) und die Fähigkeit der dendritischen Zellen zytotoxische T-Zellen nach Aufnahme von exogenem Antigen zu aktivieren, zu erwähnen (Bennett et al., 1997; Albert et al., 2001). Zusätzlich führt die Interaktion von T-Zellen, die einen hochaffinen T-Zellrezeptor tragen, mit MHC-Komplexen auf den dendritischen Zellen zur Verringerung der Antigen-MHC-Komplexe auf der Oberfläche der APCs (Kedl et al., 2002)

1.3 M-DC8⁺ Zellen

Die M-DC8⁺-Zellen stellen eine im humanen Blut vorkommende Zellpopulation von professionellen antigenpräsentierenden Zellen dar. Die Benennung der Zellen erfolgte nach dem zur Isolierung der Zellen verwendeten monoklonalen murinen Antikörper M-DC8, der eine Anreicherung über eine immunomagnetische Methode zu hoher Reinheit ermöglicht. Die M-DC8⁺ Zellen repräsentieren ca. 1% der humanen PBMCs und weisen mehrere typische Eigenschaften von dendritischen Zellen auf. So sind diese Zellen für die zellinienspezifischen Oberflächenmoleküle CD3 (T-Zellen), CD19 (B-Zellen) sowie CD56 (NK-Zellen) negativ und sind wesentlich potenter bei der allogenen und autologen MLR („mixed lymphocyte reaction“) als Monozyten (Schäkel et al., 1998). Ein weiteres charakteristisches Merkmal dieser Zellen ist die hohe Expression des niedrig affinen Fc γ -Rezeptors III (CD16). Die Einordnung als Subpopulation von dendritischen Zellen ist jedoch umstritten, da Ziegler-Heitbrock und Kollegen (2000) die M-DC8⁺-Zellen als Subpopulation der CD14⁺/CD16⁺⁺-Zellen identifiziert haben, die als eine den Makrophagen vergleichbare Zellpopulation beschrieben sind (Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Im Gegensatz dazu konnten Schäkel und Kollegen (1998, 2002) keine CD14-Expression bei den M-DC8⁺ Zellen beobachten.

Das von dem M-DC8 Antikörper erkannte Antigen wurde erst kürzlich als 6-SulfoLacNAc, eine neue Modifikation des PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1), identifiziert (Schäkel et al., 2002). 6-Sulfo-LacNAc ist im Gegensatz zu einer weiteren PSGL-1-Modifikation CLA („cutaneous lymphocyte antigen“), welche auf den M-DC8⁺ Zellen nicht vorkommt, nicht in der Lage an P-Selectin oder E-Selectin zu binden. Daher fehlt den M-DC8⁺ Zellen die Eigenschaft der übrigen Blut-DC-Populationen, die CLA exprimieren, über P-oder E-Selectin Kontakt mit dem Endothel aufzunehmen. Die genaue Funktion von 6-SulfoLacNAc ist bisher noch nicht bekannt.

M-DC8⁺ Zellen gelten als proinflammatorische dendritische Zellen oder Monozyten, da sie Rezeptoren für die Chemotaxine C5a und C3a besitzen, die eine Rekrutierung von Zellen in inflammatorische Gewebsareale bewirken (Schäkel et al, 2002). Neben dem Vorkommen im Blut wurden M-DC8⁺ Zellen hauptsächlich in den T-Zell-Arealen von inflammatorischem Mucosa-assoziiertem lymphoidem Gewebe wie Tonsillen, Lymphknoten und Milz nachgewiesen, während in nicht infizierten Lymphknoten oder der Milz kaum M-DC8⁺ Zellen beobachtet werden konnten (de Baey et al., zur Publikation eingereicht). Patienten mit bakterieller Sepsis weisen eine erhöhte Anzahl an M-DC8⁺ Zellen im Blut auf. Die Einordnung der M-DC8⁺ Zellen als proinflammatorische Zellen wird durch das Cytokinprofil dieser Zellen unterstützt. Als Antwort auf bakterielle Stimuli produzieren M-DC8⁺ Zellen große Mengen an TNF- α , dagegen kaum IL-10 im Gegensatz zu den klassischen Monozyten (de Baey et al, zur Veröffentlichung eingereicht; Schäkel et al., 2002). Als Reaktion auf virale Stimuli wurde nur eine geringe Cytokinproduktion beobachtet. Werden M-DC8⁺ Zellen in Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert, was bei Monozyten eine Differenzierung zu dendritischen Zellen induziert, bleibt das charakteristische Cytokinprofil erhalten. Der Vergleich von M-DC8⁺ DCs mit M-DC8⁻ DCs zeigt für die M-DC8⁺ Zellen bei LPS-Stimulation eine erhöhte Produktion des proinflammatorischen Cytokins IL-12, dagegen kaum IFN- α -Sekretion bei Infizierung mit Influenzaviren (de Baey et al, 2001).

Als professionelle antigenpräsentierende Zellen weisen die M-DC8⁺ Zellen eine hohe Expression von MHC-Molekülen auf, die nach Kultivierung und Maturierung mit LPS oder CD40L zunimmt. Zusätzlich erhöht sich unter diesen Bedingungen die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (de Baey et al, 2001). Neben einer Überlegenheit der M-DC8⁺ Zellen gegenüber Monozyten bei der allogenen oder autologen MLR zeigen die M-DC8⁺ Zellen eine erhöhte Fähigkeit zur T-Zellstimulation nach Zugabe von Antigenen wie Tetanustoxoid oder KLH (Schäkel et al, 1998). Ein Vergleich mit der im Blut vorkommenden myeloiden DC-Population DC1 weist auf eine vergleichbare Fähigkeit zur allogenen T-Zellstimulation hin. Die Immunantwort nach Gabe eines bestimmten Antigens unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob es sich bei den APCs um DC1 oder M-DC8⁺ Zellen handelt. Wird ein „Recall“-Antigen wie Tetanustoxoid verwendet, mit dem die Donoren mit hoher Wahrscheinlichkeit schon in Kontakt gekommen sind, induzieren die DC1-Zellen die potentere T-Zellstimulation. Bei Verwendung eines Neo-Antigens wie KLH, mit dem die T-Zellen des Donors bisher noch nicht in Berührung gekommen sind, bewirken die M-DC8⁺ Zellen die effizientere Immunantwort (Schäkel et al., 2002).

Insgesamt belegen die bisher bekannten Daten für die M-DC8⁺ Zellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation, welche den Monozyten überlegen und mit anderen bekannten

dendritischen Zellpopulationen vergleichbar ist. Das eindeutige proinflammatorische Profil dieser Zellen verringert die Gefahr der Induktion einer Th2-Immunantwort, wenn eine Th1-Immunantwort erwünscht ist. Obwohl die M-DC8⁺ Zellen nur 1% der PBMCs repräsentieren ist ihr Anteil deutlich höher als der von anderen im Blut vorkommenden dendritischen Zellen, die für ein spezifisches Antigen-Targeting in Frage kommen.

1.4 CD16: Ein Fc γ -Rezeptor als Zielstruktur

1.4.1 Übersicht

Rezeptoren für die konstanten Ketten von Immunglobulinen, sog. Fc-Rezeptoren, sind auf allen hämatopoetischen Zellen vorhanden, wobei nicht alle Zellen die gleichen Rezeptoren exprimieren. Durch die Bindung der Immunglobuline an Fc-Rezeptoren können verschiedene Funktionen ausgelöst werden, wie z.B. die Phagozytose oder Endozytose von Immunglobulin-Komplexen (Young et al., 1984; Anderson et al., 1990), die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren oder Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (Titus et al., 1987). Fc-Rezeptoren existieren für alle Immunglobulinsubtypen; alleine für IgG gibt es drei unterschiedliche Klassen: den hochaffinen Fc γ -Rezeptor I (CD64) mit einer Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-8} und 10^{-10} M sowie den Fc γ -Rezeptor II (CD32) und den Fc γ -Rezeptor III (CD16) mit Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-5} und 10^{-7} M. Bei den Fc-Rezeptoren handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne unter den einzelnen Fc-Rezeptoren vergleichsweise konserviert ist, während die zytoplasmatischen Domänen differieren (Ravetch und Kinet, 1991).

Neben der Subpopulation der CD14⁺/CD16⁺⁺ Monozyten und den M-DC8⁺ Zellen findet sich der Fc γ -Rezeptor IIIA auf Makrophagen, natürlichen Killerzellen und einer Subpopulation von T-Zellen (Barclay et al., 1997; Janeway, 1999). Zusätzlich wird auf neutrophilen Granulozyten eine an Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundene Form von CD16 (Fc γ -Rezeptors IIIB) exprimiert. Der Fc γ -Rezeptor IIIA-Komplex besteht aus einer α -Kette mit zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die je nach Zelltyp entweder mit einem Homodimer oder Heterodimer aus der allgemeinen γ -Kette der Fc-Rezeptoren bzw. der ζ -Kette des T-Zellrezeptors assoziieren. Bei Monozyten und Macrophagen liegt eine spezifische Assoziation der α -Kette mit einem Homodimer der γ -Kette vor (Masuda und Roos, 1993; Gerber und Mosser, 2001). Die Assoziation mit dem Dimer ist für die Signaltransduktion nach Ligand-Bindung erforderlich, da nur die γ -Kette und die ζ -Kette

sogenannte ITAM-Sequenzen (Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierende Motive) besitzen. Diese werden bei Ligandbindung phosphoryliert, wodurch Adaptermoleküle rekrutiert werden, die über weitere Phosphorylierungen in der Folge eine Signaltransduktionskette initiieren (Ravetch und Bolland, 2001). Der CD16-Komplex auf Monozyten und Makrophagen ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Ketten wird die Extrazellulärdomäne zelltypspezifisch glycosyliert. Die unterschiedliche Struktur der CD16-

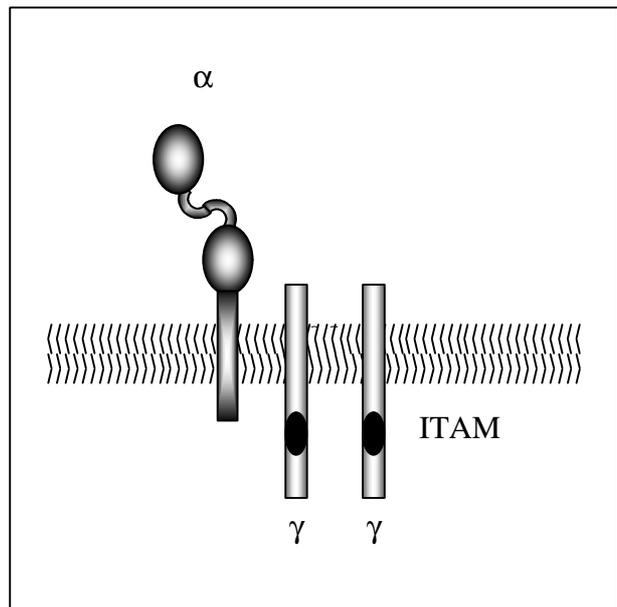


Abb. 4: Schematische Darstellung des Fc γ -Rezeptor-III A-Komplexes auf Monozyten und Makrophagen

Komplexe auf den verschiedenen Zelltypen bewirkt eine unterschiedliche Affinität für den Liganden IgG (Galon et al., 1997; Edberg und Kimberley, 1997). So wird der Fc γ -Rezeptor-III A schon bei geringen Konzentrationen von humanem IgG vollständig blockiert, während CD16 auf Monozyten bei normalen Serum-IgG-Konzentrationen noch freie Bindungsstellen besitzt (Edberg und Kimberly, 1997). Der Fc γ -Rezeptor IIIB-Komplex unterscheidet sich von Fc γ -Rezeptor-III A im wesentlichen durch das Fehlen der Transmembrandomäne. Stattdessen ist der Fc γ -Rezeptor-IIIB über GPI an der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten gebunden. Zusätzlich existiert eine lösliche Form von Fc γ -Rezeptor-IIIB. Im Gegensatz zu Fc γ -Rezeptor-III A besitzt Fc γ -Rezeptor-IIIB auch keine eigene Signaltransduktionskomponente, sondern übt seine Funktion in Kooperation mit anderen Rezeptoren wie z.B. CD32 unter Verwendung von deren Signaltransduktionsapparat aus (Daeron, 1997).

Aktivierende Fc-Rezeptoren mit ITAM-Sequenzen wie CD16 oder CD64 kommen auf Zellen immer zusammen mit inhibierenden Fc-Rezeptoren vor, so dass die Effekte der Bindung von Immunkomplexen an Fc-Rezeptoren auf das Immunsystem einer genauen Regulation unterliegen. Die Auswirkung eines Fehlens inhibierender Rezeptoren wurde insbesondere im murinen System untersucht. So konnten Kalergis und Ravetch (2002) zeigen, dass in Fc γ -Rezeptor-IIIB negativen Mäusen die Interaktion von Antigen-Immunkomplexen mit dem Fc γ -Rezeptor-III A auf dendritischen Zellen zur Aktivierung und Reifung der DCs führt, während die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation gegenüber Wildtypmäusen nicht verändert ist. Als Folge der DC-Aktivierung werden antigenspezifische T-Zellen induziert, die u.a. Tumorzellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, selektiv

eliminieren können (Kalergis und Ravetch, 2002). Eine Aktivierung von Effektor-Zellen über das Kreuzvernetzen von Fc-Rezeptoren kann ebenfalls durch Verwendung von Antikörpern, die an einen aktivierenden Fc-Rezeptor binden, erreicht werden. Aus diesem Grund werden zur Zeit auch tumorspezifische Antikörper, die an aktivierende Fc-Rezeptoren binden, in der Tumorthherapie intensiv untersucht (van Spriël et al., 2000; Deo et al., 1997).

1.4.2 CD16-basierte Ansätze in der Tumorthherapie

In der Tumorthherapie wurden Fc-Rezeptoren zuerst nur als Ziel für Rekrutierung von direkt zytotoxischen Effektorzellen verwendet. Insbesondere die natürlichen Killerzellen, die hauptsächlich für die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität verantwortlich sind, tragen zum therapeutischen Effekt von tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern wie z.B. Rituximab bei. Bispezifische Antikörper, die eine Spezifität für ein Tumorantigen mit einer Spezifität für einen aktivierenden Fc-Rezeptor kombinieren, sollten die Rekrutierung und Aktivierung der gewünschten Effektorzellpopulation verbessern und wurden bereits in klinischen Studien an Patienten getestet. Die CD16-Spezifität wurde im Zusammenhang mit mehreren Tumorspezifitäten untersucht, wobei bisher mit zwei verschiedenen bispezifischen Molekülen klinische Studien durchgeführt wurden. Die Gruppe um Pfreundschuh (Hartmann et al. 1997; Renner et al., 1997; Renner et al., 2001) beobachtete bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom, die mit einem murinen anti-CD30/anti-CD16 bispezifischen Antikörper behandelt wurden, einen Rückgang des Tumors in 19% der Fälle und ein Ansprechen auf die Behandlung bei insgesamt 29% der Patienten für eine Dauer von 1-15 Monaten. Weiner et al. (1995) beobachteten mit einem murinen anti-Her2/anti-CD16 bispezifischen Antikörper mehrere Fälle von geringfügigen therapeutischen Effekten sowie das Verschwinden einer Lebermetastase bei einem Patienten und die Auflösung von Pleuraergüssen und malignem Ascites bei zwei weiteren Patienten. In beiden klinischen Studien bildeten sich anti-Maus-Antikörper, die eine erneute Behandlung der Patienten verhinderten. Dieses Problem sollte sich jedoch durch Generierung von humanisierten bispezifischen Antikörpern verringern lassen, so dass anti-CD16-basierte Therapieansätze für die Behandlung von Tumorerkrankungen prinzipiell erfolgreich sein könnten.

Auch andere Fc γ -Rezeptoren wurden im Rahmen neuer Ansätze für die Tumorthherapie in klinischen Studien untersucht. Dabei konnte als Nebeneffekt in einer Pilotstudie mit dem anti-Her2/anti-Fc γ -Rezeptor I bispezifischen Antikörper MDX-210 eine Erhöhung der Konzentration von tumorzellspezifischen Antikörpern festgestellt werden (Kaufman et al., 1996). Eine weitere klinische Untersuchung sowie in-vitro-Experimente konnten zeigen, dass

Monozyten nach Aktivierung durch IFN- γ und Gabe von MDX-210 Tumorzellen phagozytieren können. Der gleiche Effekt wurde auch mit den analogen bispezifischen Antikörpern anti-CD16/anti-Her2 und anti-CD32/anti-Her2 erzielt (Wallace et al., 2001a). Auch im murinen System existieren Hinweise auf einen Vakzinierungseffekt. So wurde bei der Verwendung eines anti-Fc γ -Rezeptor I-Id bispezifischen Antikörpers gegen B-Lymphomazellen die Induktion einer langfristigen Resistenz gegen Tumorzellwachstum beobachtet (Honeychurch et al., 2000). Da der Fc γ -Rezeptor-I nur auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sowie nach Induktion durch GM-CSF auf neutrophilen Granulozyten vorkommt, ist dieser Vakzinierungseffekt höchstwahrscheinlich ebenfalls auf die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) nach Phagozytose der Tumorzellen zurückzuführen (Wallace et al., 2001a).

Die Beteiligung von Fc-Rezeptoren bei der Antigenaufnahme konnte mittlerweile durch viele in-vitro- und in-vivo-Experimente nachgewiesen werden (Manca et al., 1991; Amigorena et al., 1998; Heijnen et al., 1996; Amigorena und Bonnerot; 1999). Dabei zeigt sich nicht nur eine Verbesserung der MHC-Klasse II-Präsentation eines Modellantigens bei Verwendung von Fusionsmolekülen aus Antigen und Fc-Teil eines Antikörpers (Gosselin et al., 1992), sondern es konnte auch die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort beobachtet werden (Regnault et al., 1999; Rodriguez et al., 1999, Machy et al., 2000). Die nähere Untersuchung der Fc-rezeptor-vermittelten Kreuzpräsentation deutet auf eine Beteiligung des Fc γ -Rezeptors I oder III hin, während unter den gleichen Bedingungen der Fc γ -Rezeptor II nicht in der Lage war, eine CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren (Regnault et al., 1999). Ob CD16 die Fähigkeit besitzt, exogen aufgenommenes Antigen in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg einzuschleusen, ist noch ungeklärt. Die Tatsache, dass sich bisherige Untersuchungen zur Verwendung von anti-Fc-Rezeptor-spezifischen Antikörpern für die gerichtete Antigenaufnahme mehrheitlich auf CD64 konzentrierten, ist darauf zurückzuführen, dass die bisher identifizierten Blut-DC-Populationen DC1 und DC2 sowie ein Großteil der Monozyten und Makrophagen nur CD64, aber keine CD16-Expression aufweisen (Fanger et al., 1996) und die Population der M-DC8⁺ dendritischen Zellen erst seit kurzem bekannt ist und nur verhältnismäßig wenige Daten über deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation vorliegen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher untersuchten Tumorstimmungsansätze deuten darauf hin, dass antigenpräsentierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer langfristigen tumorspezifischen Immunantwort spielen. Aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeit, naive T-

Zellen effizient zu aktivieren und exogen aufgenommenes Antigen im MHC-Klasse I-Kontext zu präsentieren, gelten die dendritischen Zellen als die kompetentesten antigenpräsentierenden Zellen. Erst kürzlich wurde mit der Isolierung der M-DC8⁺ Zellen eine neue dendritische Zellpopulation im humanen Blut identifiziert, über deren Fähigkeiten zur Antigenpräsentation noch wenig bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war es, erstens die Eignung der M-DC8⁺ Zellen für die Tumorstimmung zu untersuchen und zweitens geeignete Zielstrukturen für eine mögliche gerichtete Antigenaufnahme zu charakterisieren.

Für die Bearbeitung der ersten Teilaufgabe war die Expressionsanalyse von Oberflächenmolekülen auf den M-DC8⁺ Zellen, von denen bekannt ist, dass sie für die Antigenpräsentation besonders relevant sind, in verschiedenen Differenzierungsstadien erforderlich. Ferner musste eine Untersuchung der Präsentation von Modellantigenen auf MHC-Klasse I und MHC-Klasse II vorgenommen werden.

Die Bearbeitung der zweiten Teilaufgabe konzentrierte sich auf die Untersuchung von zwei möglichen Zielstrukturen für die gerichtete Antigenaufnahme durch M-DC8⁺ Zellen. Die Analyse der gerichteten Antigenaufnahme über die beiden genannten Zielstrukturen beinhaltete die Kopplung eines modellhaften Antigens an einen die Zielstruktur erkennenden Antikörper. Als Modellsystem für die Induktion einer Immunantwort wurde die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen untersucht. Aufgrund der hohen Expression von CD16, die für M-DC8⁺ Zellen charakteristisch ist, stellte der Fc γ -Rezeptor III eine vielversprechende Zielstruktur dar. Weitere Gründe für die Wahl des CD16-Moleküls als Zielstruktur waren die effiziente Internalisierung von Antigenen durch Fc-Rezeptor-vermittelte Endozytose und Hinweise auf eine Beteiligung von Fc-Rezeptoren bei der Kreuzpräsentation von exogen aufgenommenen Antigenen. Als alternative Zielstruktur diente ein noch nicht näher charakterisiertes Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper D-DC8.3 auf einer Subpopulation der M-DC8⁺ Zellen erkannt wird. Dieser Antikörper musste zunächst noch auf seine Spezifität für antigenpräsentierende Zellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Folgende Chemikalien wurden von der Firma **Sigma, Deisenhofen** bezogen:

β-Mercaptoethanol; Biotinamidocaproat-NHS; Borsäure; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat/Nitro Blue Terrazolium (BCIP/NBT); Dimethylformamid (DMF); Dimethylsulfoxid (DMSO); Ethylendiamintetraacetat (EDTA); di-Natrium-4-Nitrophenol-Phosphat (pNPP-ELISA-Substrat); Lipopolysaccharide (LPS); N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED); Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20); Trypanblau; Saponin; Zitronensäure

Folgende Chemikalien wurden durch die Firma **Merck, Darmstadt** bezogen:

Ammoniumchlorid; Ammoniumperoxodisulfat (APS); Kaliumchlorid; Kaliumhydrogencarbonat; Kaliumhydrogenphosphat; Natriumchlorid; Natriumazid; Tris; Triton X-100

Die Firma **Fluka, Buchs** lieferte folgende Chemikalien:

Fluoresceincarboxamidocaproat-NHS; Propidiumiodid; Ethanol, absolut; Natriumlaurylsulfat (SDS); Natriumcitrat Dihydrat; Salzsäure, 37%

Die Firma **Roth, Karlsruhe** lieferte Borsäure; Kaliumdihydrogenphosphat; di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat; Natriumhydroxid; Natronlauge 1M; Salzsäure 1M

Von der Firma **Pierce/Perbio Science, Bonn** wurden folgende Chemikalien geliefert:

N-Succinimidyl-S-Acetylthioacetat (SATA); Sulfo-Succinimidyl 4-(N-Maleimidomethyl) Cyclohexan-1-Carboxylat (Sulfo-SMCC); Hydroxylamin Hydrochlorid

Die Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5 : 1 lieferte **Biozym, Hess. Oldendorf**.

Häufig verwendete Puffer und Lösungen:

PBS:	150 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Boratpuffer:	0,15 M NaCl 0,05 M Borsäure 0,01 M EDTA pH 7,2
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris; pH 6,8 SDS (0,4% w/v)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8,8 SDS (0,4 % w/v)
FACS-Puffer:	PBS 1% FCS 0,01% Na-Azid

Peptide und Proteine

Peptide	Aminosäuresequenz
TT-Peptid	5,6-Carboxyfluorescein-GGG- <u>QYIKANSFIGITE</u> -GGG-C
NS3-Peptid	5,6-Carboxyfluorescein-KGG- <u>GYKVLVLNPSVAAT</u> -GGG-C
Her2/neu-Peptid	5,6-Carboxyfluorescein- <u>KKIFGSLAFL</u> PES-C
Her2/neu Nonamer	KIFGSLAFL

Die Synthese der zur Konjugation verwendeten Peptidantigene einschließlich der Kopplung mit dem zur Detektion der Peptide verwendeten Carboxyfluorescein erfolgte in einer Auftragsarbeit durch die Firma Jerini. Das für die Kontrolle der Spezifität der zytotoxischen Her2/neu-spezifischen T-Zellen verwendete Nonamer-Peptid wurde von der Firma Chiron Technologies synthetisiert.

Proteine	Bezugsquelle
Tetanustoxoid	Connaught Laboratories, Willowdale, Ontario, Kanada
NS3	Mikrogen GmbH, München
Her2/neu ECD	Dr. T. Raum, Institut für Immunologie, LMU, München
EGFR ECD	Dr. T. Raum, Institut für Immunologie, LMU, München
β_2 -Microglobulin	ICN Biomedicals, Eschwege
Bovines Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen

2.2 Protein-Techniken

2.2.1 Kopplung von Peptidantigenen mit Antikörpern

Zur Herstellung stabiler Antikörper-Antigen-Konjugate wurde der heterobifunktionelle Crosslinker Sulfo-SMCC eingesetzt, um die Bildung unerwünschter Nebenprodukte gegenüber einer Verwendung von homobifunktionellen Crosslinkern zu reduzieren. Dazu wurden zuerst die freien Aminogruppen von Lysinresten des Antikörpers mit der NHS-Estergruppe des Crosslinkers umgesetzt. Dessen Maleimidgruppe konnte in der Folge mit der SH-Gruppe des Peptides unter Bildung einer stabilen Thioetherbrücke reagieren.

Die Konjugation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Je 100 μ g Antikörper (1 mg/ml) in Boratpuffer (0,15 M NaCl; 0,05 M Borsäure; 0,01 M EDTA; pH 7,2) wurden mit einem zehnfachen molaren Überschuss an Crosslinker (10 μ l pro 100 μ g Antikörper einer Stammlösung von 7,3 mg/ml (1,67 μ mol/ml) in DMSO) aktiviert. Nach einer einstündigen Inkubationsdauer unter leichtem Schütteln auf dem Rotationsmischgerät (ca. 400 rpm) wurde der überschüssige Crosslinker durch zweimaliges Auffüllen auf 500 μ l mit Boratpuffer und anschließende Zentrifugation (je 5 min, 12.000 g) in

einer Millipore Ultrafree Filtrationseinheit (Ausschlußgröße von 10 kDa; Restvolumen ca. 20 µl) teilweise abgetrennt. Anschließend wurde der Antikörper mit Boratpuffer auf ein Volumen von 50 µl (pro 100 µg eingesetztem Antikörper) eingestellt und mit 50 µl (= 100 µg) Carboxyfluorescein-Peptidantigen (2 mg/ml in Boratpuffer/20 % DMSO). Die Carboxyfluorescein-Peptide (Synthese durch die Firma Jerini) wurden als 10 mg/ml Stammlösung in DMSO bei 4°C (kurzfristig) oder -20°C (langfristig) aufbewahrt, um ein Ausfallen des hydrophoben Peptides während der Lagerung zu vermeiden. Die Konjugation erfolgte unter ständigen Schütteln (ca. 400 rpm) für eine Stunde. Die Kopplung sowie die anschließende Gelfiltration wurden unter Lichtausschluß durchgeführt, um die Fluoresceingruppe vor dem Ausbleichen zu schützen. Nach der Kopplung wurde das Konjugat von nicht gebundenen Peptid über eine Gelfiltration (P60-Gel, Biorad) in Boratpuffer/10 % DMSO abgetrennt. Das Säulenvolumen wurde dabei jeweils an das aufzutragende Volumen angepasst. Zur Qualitätskontrolle der Trennung von Konjugat und unkonjugiertem Peptid wurde ein Fluoreszenzprofil der Gelfiltration erstellt, indem im Fluorimeter (Wallac, Anregungswellenlänge: 485 nm; Wellenlänge des gemessenen emittierten Lichtes: 535 nm) von allen 50 µl Fraktionen der Fluoresceingehalt bestimmt wurde. Bei einer durchschnittlichen Trennung konnten anhand der Fluoreszenzwerte zwei getrennte Fluoresceinpeaks identifiziert werden, wobei die zuerst eluierten fluoreszenzpositiven Fraktionen dem Konjugat entsprachen. Die Konjugat-Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS/0,05% Na-Azid dialysiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Anzahl der pro Antikörper gekoppelten Peptidmoleküle wurde näherungsweise über die Bestimmung des Fluorescein-/Protein-Verhältnisses (siehe 2.2.7) ermittelt.

2.2.2 Kopplung von Proteinantigenen mit Antikörpern

Für die Kopplung der extrazellulären Domänen von Her2/neu und EGFR (Dr. T. Raum, Institut für Immunologie) an die Antikörper anti-CD16 (3G8, Pharmingen) oder die Isotypkontrolle Iso-IgG (Maus-IgG₁-Antikörper, Pharmingen) wurde der „Controlled Protein-Protein Cross-Linking Kit“ der Firma Pierce verwendet. Im wesentlichen wurde die Konjugation nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Molekulargewicht der Extrazellulärdomänen von Her2/neu und EGFR wurde auf der Basis der publizierten m-RNA-Sequenzen für Her2/neu (Yamamoto et al.,1986) und EGFR (Ullrich et al.,1984) errechnet. Für die Kopplung wurden die Antikörper (Molekulargewicht 150 kDa) und die Proteinantigene (kalkuliertes Molekulargewicht 70 kDa) in gleichen Konzentrationen (280 nm Absorptionsbestimmung) eingesetzt, so daß sich ein molares Verhältnis von ca. einem Antikörper pro zwei Proteinantigene ergab. Die für die Kopplung erforderlichen Arbeitsschritte sind im folgenden aufgelistet:

Aktivierung des Her2/neu-Proteins bzw. EGFR-Proteins mit SATA:

- Äquilibrierung einer 10 ml „D-Salt Dextran Plastic Desalting Column“ mit 30 ml PBS-EDTA (10 ml „Aktivierungspuffer“ aus dem Kit (10x) + 90 ml PBS)
- 500 μ l (= 500 μ g) Her2/neu oder EGFR ECD in PBS werden mit 3 μ l SATA (ca. 10 molarer Überschuß, 4 mg/ml in DMF) unter Vortexen vermischt, 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur bei 200 rpm auf dem Rotationsmischgerät
- Freisetzung der geschützten SH-Gruppen durch zweistündige Inkubation (RT, 200 rpm) mit 50 μ l Hydroxylamin-Lösung (5 mg Hydroxylamin-HCl in 100 μ l Aktivierungspuffer (10x)).
- Entfernung des überschüssigen Crosslinkers SATA durch Gelfiltration unter Verwendung der vorher äquilibrierten „Dextran Desalting Column“, Elution mit PBS-EDTA, wobei 1 ml Fraktionen aufgefangen werden. Von den einzelnen Fraktionen wird die Absorption bei 280 nm bestimmt, die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt vereinigt und nochmals die Absorption der gesammelten Fraktionen bestimmt.

Maleimid-Aktivierung des anti-CD16 bzw. Iso-IgG Antikörpers mit Sulfo-SMCC:

- Äquilibrierung einer 10 ml „D-Salt Dextran Plastic Desalting Column“ mit 30 ml PBS
- 500 μ l (= 500 μ g) Antikörper in PBS werden mit 11 μ l Sulfo-SMCC (1mg/ml in PBS) versetzt und für 30 min bei 200 rpm (RT) inkubiert
- Freisetzung der geschützten SH-Gruppen durch zweistündige Inkubation (RT, 200 rpm) mit 50 μ l Hydroxylamin-Lösung (5 mg Hydroxylamin-HCl in 100 μ l Aktivierungspuffer (10x)).
- Entfernung des überschüssigen Crosslinkers durch Gelfiltration analog zur Aktivierung von Her2/neu oder EGFR unter Verwendung von PBS als Lauf- und Elutionspuffer. Von den einzelnen Fraktionen wird die Absorption bei 280 nm bestimmt, die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt werden vereinigt und die Absorption der gesammelten Fraktionen bestimmt.

Kopplung:

- Maleimidantikörper und Sulphydrylprotein werden anhand der Konzentrationsbestimmung bei 280 nm in einem Volumenverhältnis so vermischt, daß jeweils gleiche Proteinmassenkonzentrationen vorliegen
- Einstündige Inkubation der Antikörper-Proteinantigen-Mischung bei RT und 200 rpm
- Zusatz von 0,05% Na-Azid und Lagerung im Kühlschrank

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Testung der Reinheit von Konjugaten oder anderen Proteinen wurden die Proteinproben auf 4-12 % Nu-PAGE Bis-Tris-Gelen (Novex) analysiert. Dazu wurden die Proben mit Nu-PAGE Sample Buffer (4x) versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert, kurz abgekühlt und zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker kamen Mark12™ Wide Range Protein Standard und Multi Mark™ Multi-Colored Standard (beides Fa. Novex) zur Anwendung. Die Auftrennung erfolgte mit 1x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer als Laufpuffer bei 200 V für 50 min. Bei den fluoreszierenden Konjugaten erfolgte die Auftrennung im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden und eine darauffolgende mikroskopische Kontrolle auf fluoreszierende Banden zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Blau gefärbt. Dazu wurde das Gel mit einem Gemisch aus 20 ml deion. Wasser, 25 ml Methanol, 5 ml Essigsäure pro Gel für 10 min auf dem Schüttler fixiert, nach dem Abgießen der Fixierlösung erfolgte die Färbung des Gels mit 27,5 ml deion. Wasser, 10 ml Methanol und 10 ml Stainer A (Novex). Nach 10 min Inkubation auf dem Schüttler wurden 2,5 ml Stainer B (Novex) zugegeben und das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in der Färbelösung belassen. Am nächsten Tag erfolgte die Entfärbung mit Leitungswasser bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit anschließender fotografischer Dokumentation.

Alternativ kamen auch selbst hergestellte SDS-Polyacrylamidelen unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystem mit Sammel- und Trenngel nach Laemmli et al. (1970) zur Anwendung.

	Trenngel (8 % v/v)	Trenngel (12% v/v)	Sammelgel (4% v/v)
Acrylamid-Lösung (30 % w/v) (mit 0,8% Bisacrylamid)	4,6 ml	6,85 ml	1,2 ml
Trenngelpuffer	4,25 ml	4,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,25 ml
H ₂ O	8,0 ml	5,75 ml	5,3 ml
APS (10% w/v)	150 µl	150 µl	200 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	15 µl

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Versetzen der Proben mit 4x Probenpuffer (Fa. Roth) und Erhitzen der Proben des Größenstandards (Rainbowmarker, Molekulargewichtsspanne 14,3 kDa bis 220 KDa, Amersham Pharmacia) für 3 min bei 95°C. Die Auftrennung der Proben wurde bei 120 V und 20 mA unter Verwendung eines Tris/Glycin/SDS-Laufpuffers (0,3% w/v Tris, 1,44% w/v Glycin, 0,1% w/v SDS) in einer Gelelektrophoreseapparatur (Fa. Hoeftle) durchgeführt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über Coomassie Blaufärbung mit 50 ml Färbelösung (Roti Blue, Fa. Biorad) über Nacht. Nach mehrmaligen Waschen mit 25 % v/v wässriger Methanollösung wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt.

2.2.4 Nachweis von IgG-Antikörpern im Immunblotverfahren

Der Nachweis von Antikörpern oder anderen Proteinen im Immunoblotverfahren erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinproben durch Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S83, Fa. Schleicher und Schüll) und anschließender Detektion der Proteine über Enzymgekoppelte Antikörper, die anhand durch das Enzym katalysierten Farbreaktion nachgewiesen werden können. Diese Methode wurde insbesondere zur Überprüfung der Aufreinigung des D-DC8.3-Antikörpers vor dem Einsatz zu Konjugationszwecken benutzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Antikörpers in 4-12 % Nu-PAGE Bis-Tris-Gelen erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran in einer Blotkammer (Schleicher & Schüll) in einem sog. Semi-Dry-Verfahren. Der Aufbau besteht aus drei Lagen Blotpapier, Membran, Gel und drei Lagen Blotpapier, wobei alles vorher mit Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,01% SDS)

äquilibriert wurde. Bei einer Stromstärke von 200 mA ist der Transfer innerhalb einer Stunde abgeschlossen.

Zum Nachweis der Proteinbanden wurden zuerst unbesetzte Membranbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit PBS, 0,2% BSA, 0,03% Tween 20 abgesättigt. Nach mehrmaligen Waschen mit PBS, 0,03% Tween 20 erfolgte eine Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase gekoppelten Ziege anti-Maus IgG Antikörper (1:10.000 Verdünnung in PBS, 0,2% BSA, 0,03% Tween 20) für eine Stunde. Nach wiederholten Waschschritten mit PBS, 0,03% Tween 20 und PBS wurde der Antikörper über eine von der alkalischen Phosphatase katalysierten Farbreaktion nachgewiesen. Als Substratlösung wurden 5 ml BCIP/NBT-Lösung (Fa. Sigma) eingesetzt und die Membran ca. 20 min nach Hinzufügen der Substratlösung kurz mit H₂O gewaschen und getrocknet.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Antikörpern im ELISA

Um die Effekte der verschiedenen Antikörper-Antigen-Konjugate miteinander vergleichen zu können, muß neben der Anzahl Peptide pro Antikörper auch die genaue Konzentration der Konjugate bekannt sein. Diese wurde für alle in einem Experiment miteinander zu vergleichenden Konjugate in dem gleichen ELISA ermittelt. Als Standard wurde der unmarkierte Maus IgG₁-Antikörper verwendet, der ebenfalls für die Konjugation der Isotypkontrolle benutzt wurde. Dazu wurde eine Maxisorpplatte (Fa. Nunc) über Nacht mit je 50 µl pro Vertiefung 10 µg/ml Ziege Anti-Maus IgG (F(ab')₂ spezifisch, F(ab')₂ Fragmente) inkubiert. Anschließend wurde die Platte zweimal mit je 200 µl PBS/ 0,05% Tween pro well gewaschen und überschüssige Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl PBS/ 10% FCS pro Vertiefung abgesättigt. Nach zwei weiteren Waschritten wurden die Proben verdünnt in PBS/ 10% FCS in die Platte gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von Standard und Proben 1:2 mit PBS/ 10% PBS durchgeführt, wobei die höchste Konzentration in der Platte für den Standard 1,024 µg/ml und für die Konjugate die Verdünnungsstufe 1:25 betrug. Der Detektionsantikörper Anti-Maus IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurde 1:10.000 verdünnt in PBS/ 10% FCS eingesetzt, wobei je 50 µl pro Vertiefung zugegeben wurden. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei RT und viermaligen Waschen mit PBS-T, konnte der ELISA mit je 100 µl p-Nitrophenolphosphat-Substratlösung (Fa. Sigma) pro well entwickelt werden und durch Messen der Absorption bei 405 nm (Referenz 450 nm) die Konzentration der Proben im ELISA-Reader bestimmt werden.

2.2.6 Bestimmung von Cytokin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen durch ELISA

Für die Bestimmung der Cytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen kamen der Opteia Human IFN- γ ELISA Kit und der Opteia Human TNF- α ELISA Set (Pharmingen) zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Bei Verwendung des TNF- α Sets war das Beschichten einer Maxisorpplatte mit 100 μ l/ Vertiefung des Maus anti-Human TNF- α -Antikörpers (1:250 verdünnt in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5) über Nacht bei 4°C erforderlich. Die Platte wurde zweimal mit je 200 μ l PBS/ 0,05% Tween pro Vertiefung gewaschen und überschüssige Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 μ l PBS/ 10% FCS pro Vertiefung abgesättigt. Nach zweimal Waschen mit PBS/ 0,05% Tween wurden die Überstände 1:2 verdünnt in PBS/ 10 % FCS aufgetragen (je 100 μ l). Dazu wurde eine Stammlösung von 32 ng/ml für den TNF- α Standard erstellt und anschließend eine Verdünnungsreihe jeweils 1:2 mit PBS/ 10% PBS durchgeführt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal mit PBS/ 0,05% Tween gewaschen und der Detektionsantikörper biotinylierter Maus anti-Human TNF- α 1:500 verdünnt und das Enzymreagenz Avidin-Merrettichperoxidase Konjugat 1:250 verdünnt in PBS/ 10% FCS je 100 μ l/Vertiefung zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei RT und siebenmaligen Waschen kann der ELISA mit je 100 μ l Substratlösung (TMB-Substrat) pro Vertiefung entwickelt werden. Nach ca. 20 min wird die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 2N H₂SO₄ abgestoppt und durch Messen der Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) die Konzentration der Proben im ELISA-Reader bestimmt.

Für die IFN- γ -Bestimmung wurden auf die vorgecoateten Platten jeweils 50 μ l Diluent gegeben und anschließend 50 μ l Überstand bzw. Standard hinzugegeben. Für den Standard wurden Vorverdünnungen von 600 pg/ml, 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18,8 pg/ml, 9,4 pg/ml und 4,7 pg/ml in Diluent erstellt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C und viermaligen Waschen wurden der Detektionsantikörper biotinylierter anti-Human IFN- γ 1:500 verdünnt und das Enzymreagenz Avidin-Merrettichperoxidase Konjugat 1:250 verdünnt in Diluent je 100 μ l/ Vertiefung zugegeben. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Entwicklung analog zum TNF- α ELISA unter Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien.

2.2.7 Bestimmung der Kopplungseffizienz von fluoreszenzmarkierten Antigenen mit Antikörpern (F/P-Ratio)

Zur Quantifizierung der Konjugationseffizienz wurde die Methode des F/P-Ratio nach Methods in Molecular Biology: Immunocytochemical Methods and Protocols (Vol 34, edited by L.C. Javois, 1994, Humana Press Inc., Totowa, NJ) angewendet. Dazu wurde die Absorption der Konjugate bei 280 nm und 493 nm im Photometer bestimmt und anschließend die Anzahl fluoreszierender Gruppen pro Antikörper nach folgenden Formeln errechnet:

Fluorescein-gekoppelte IgG-Konzentration (FL IgG conc.)

$$\text{FL IgG conc. [mg/ml]} = \frac{A_{280\text{nm}} - 0,35 \times A_{493\text{nm}}}{1,4}$$

Molekulares Verhältnis von Fluoreszenz-markiertem Peptid zu Antikörpermolekülen (F/P-Ratio)

$$\text{F/P-Ratio} = \frac{A_{280\text{nm}}}{73.000} \times \frac{150.000}{\text{FL IgG conc.}}$$

Mit	A_n	= Absorption bei einer Wellenlänge von n nm
	280nm	= Wellenlänge der maximalen Absorption von Protein
	493nm	= Wellenlänge der maximalen Absorption des Fluoresceins
	1,4	= optische Dichte von 1 mg/ml IgG
	73.000	= molarer Extinktionskoeffizient der Fluoresceingruppe
	150.000	= Molekulargewicht eines IgG Antikörpers [Da]

2.2.8 Biotinylierung und Fluoresceinmarkierung von Antikörpern

Zur Charakterisierung der D-DC8.3⁺-Zellen im Durchflußzytometer war die Markierung des aufgereinigten D-DC8.3-Antikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Biotin erforderlich. Dazu wurde der Antikörper gegen Boratpuffer (0,05 M Borat, 0,1 M NaCl, pH 8,3) dialysiert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Markierung des Antikörpers erfolgte durch Zugabe von jeweils 80 µg Biotinamidocaproat-NHS (Mr 454,5) oder Fluoresceincarboxamidocaproat-NHS (Mr 586,55) pro 1 mg Antikörper. Nach einstündiger

Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmischer wurde der fertige markierte Antikörper zur weiteren Aufbewahrung gegen PBS/ 0,05 % Na-Azid dialysiert.

2.2.9 Herstellen einer Anti-Maus IgG-Affinitätssäule zur Reinigung des D-DC8.3-Antikörpers

Für die Aufreinigung des D-DC8.3 wurde eine Affinitätssäule benutzt, um möglichst vollständig andere Proteine insbesondere bovines IgG abtrennen zu können, da dieser Antikörper auch für Konjugationszwecke eingesetzt werden sollte. Die zur Herstellung der Säule benötigten Arbeitsschritte sind im folgenden aufgelistet:

- Quellen von 0,7 g CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia Biotech) in 1 mM HCl und viermaliges Waschen mit je 50 ml 1 mM HCl
- 5 mg Esel anti-Maus IgG (geringe Kreuzreaktivität mit Antikörpern von Rind, Huhn, Ziege, Meerschweinchen, Hamster, Pferd, Mensch, Kaninchen und Schaf, 1,3 mg/ml, Jackson Immuno Research) werden mit 5 ml 2 x Bindungspuffer (0,2M NaHCO₃, 1M NaCl, pH 8,3) vermischt
- Antikörper wird zur aktivierten Sepharose gegeben, zweistündige Inkubation auf dem Schüttler
- Sepharose und Ligand werden auf die Säule (Biorad) gegeben, nicht gebundener Antikörper wird durch Waschen mit 10 ml 1x Bindungspuffer (0,1M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) entfernt
- Zur Blockierung übriger reaktiver Gruppen wird das Säulenmaterial zweimal mit 0,1M Tris pH 8,0 gewaschen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt
- 3 Zyklen alternierenden pH-Wertes (je 10 ml Acetatpuffer (0,1M Na-Acetat, 0,5 M NaCl) pH 4,0; dann 10 ml Trispuffer (0,1M Tris, 0,5 M NaCl) pH 8,0)
- Aufbewahrung der Säule in 20 mM Tris pH 7,5, 0,02% Na-Azid bei 4°C

2.2.10 Reinigung von IgG-Antikörpern

Die Aufreinigung des D-DC8.3 Antikörpers aus Hybridomüberständen erfolgte über eine Affinitätschromatographie unter Verwendung der unter 2.2.9 hergestellten anti-Maus IgG-

RPMI komplett:	RPMI1640 2 mM Glutamin 1% Na-Pyruvat 1% nicht essentielle Aminosäuren 1% Kanamycin oder 1% Penicillin /Streptamicin 5 x 10 ⁻⁵ M β-Mercaptoethanol
RPMI/10 % FCS	RPMI komplett 10% FCS
RPMI/5% HS/IL-2	RPMI komplett 5% HS 200 U/ml IL-2 bzw. 1000 U/ml IL-2
DC-Medium:	RPMI komplett 10% FCS 50 ng/ml GM-CSF 1000 U/ml IL-4
Einfriermedium:	50% Kompletmedium 40% FCS 10% DMSO
Puffer für die Zellkultur:	
MACS-Puffer:	PBS 10% FCS 1 mM EDTA (pH 8,0)

Erythrozytenlysepuffer: 0,15 M NH₄Cl
 5,0 mM KHCO₃
 0,1 mM EDTA

RPMI-1640, L-Glutamin, Kanamycin (100x), Na-Pyruvat (100x), nicht-essentielle Aminosäuren (100x), Hepes, FCS wurden von Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein bezogen.

Hochreines Phytohaemagglutinin (PHA) wurde von ABBOT, Murex, Wiesbaden geliefert.

Definiertes FCS von Hyclone Laboratories, Logan, UT wurde über Perbio Sciences Deutschland, Bonn bezogen.

Humanserum Typ AB wurde von der Firma PAN Biotech, Aidenbach bezogen.

PBS für die Zellkultur, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin wurden von der Firma Biochrom geliefert.

GM-CSF (Leucomax) wurde von der Firma Sandoz, Basel bezogen.

Humanes rekombinantes IL-4 und humanes IL-2 wurden über ein Myelom-basiertes Expressionssystem (Traunecker et al., 1991) produziert und freundlicherweise von Dr. Annegret de Baey zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Verwendete T-Zell-Klone und Zell-Linien

T-Zellklone	Spezifität	Bezugsquelle
NS3-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellklon	NS3 1248-1261 DRBI*1101	Prof. G. Pape, Institut für Immunologie, München
Tetanustoxoid-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellklon	TT 830-843 DRBI*1104	Dr. A. Lanzavecchia, Bellinzona, Schweiz
Her2/neu-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellklon	Her2/neu 369-377 A*0201	Dr. H. Bernhard, Klinikum rechts der Isar, München

Zell-Linien/Hybridome	Besonderheiten	Bezugsquelle
T2	TAP-Defizienz HLA-A*0201 ⁺	ATCC CRL-1992 Dr. H. Bernhard, Klinikum rechts der Isar, München
EBV-transformierte B-Zellen AlexB, nvB-EBV	HLA-A*0201 ⁺	Dr. H. Bernhard, Klinikum rechts der Isar, München

2.3.3 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Blut

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden gesunden Blutspendern bis zu 500 ml Blut mit Heparin versetzten Spritzen abgenommen und jeweils 25 ml Blut auf 15 ml Ficoll-Hypaque unter Verwendung von Leukoseptörhrchen gegeben, um eine sofortige Vermischung des Blutes mit der Ficoll-Lösung zu verhindern. Nach einer Zentrifugation bei 2200 rpm für 20 min ohne Bremse stellt sich ein Dichtegradient ein, wodurch sich die Lymphozyten an der Grenzschicht Ficoll/Serum konzentrieren, während Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren. Diese Lymphozytenschicht wird abgenommen und die Zellen werden vor der weiteren Verwendung noch insgesamt dreimal mit Waschmedium RPMI-Hepes/1%FCS gewaschen, um restliche Ficoll-Lösung zu entfernen (hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit) und tote Zellen abzutrennen (niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeit). Daher betrug die Zentrifugationsgeschwindigkeit beim ersten Waschschrift 15000 rpm (15 min), beim zweiten Waschschrift 1200rpm (10 min) und beim dritten Waschschrift 1000 rpm (10 min). Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Vermischung von 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung unter dem Mikroskop.

2.3.4 Lyse von Erythrozyten

Die Lyse von Erythrozyten wurde nach der Isolierung der peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut (PBMCs) bei Bedarf durchgeführt, da eine hohe Zahl an Erythrozyten bei den nachfolgenden Verfahren zur Anreicherung von einzelnen Lymphozytensubpopulationen stören kann. Für die Lyse wurde restliches Serum durch zweimaliges Waschen der PBMCs mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten mit Erythrozytenlysepuffer (0,15 M NH₄Cl; 5,0 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zeitdauer der Lyse darf dabei nicht wesentlich überschritten

werden, um eine Schädigung der Lymphozytenzellmembran durch das Ammoniumchlorid zu vermeiden. Die Lyse wird durch ein- bis zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS/2% FCS oder RPMI/Hepes/1%FCS beendet und die Zellen für die weitere Verwendung in dem gewünschten Medium aufgenommen.

2.3.5 Isolation von M-DC8⁺-Zellen aus PBMCs mit Hilfe von magnetischen Partikeln

Die Isolierung der M-DC8⁺-Zellen erfolgte durch Positivselektion unter Verwendung von Ratte-anti-Maus IgM Microbeads (Miltenyi) nach Protokoll des Herstellers. Dazu wurden die PBMCs in einer Konzentration von $2,5 \times 10^8$ Zellen /ml in Waschmedium aufgenommen, mit 100 μ l M-DC8-Überstand pro 1 ml Medium für 30 min auf Eis angefärbt und der nicht gebundene M-DC8-Antikörper durch einen einmaligen Waschschrift mit kaltem Waschmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 4°C mit Ratte-anti-Maus IgM Microbeads (100 μ l/1ml Puffer bei gleicher Zellkonzentration) in MACS-Puffer (PBS/10%FCS/1mM EDTA) inkubiert und die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4°C). Zur Positivselektion der M-DC8⁺-Zellen wurden die Zellen in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen, über sterile Filterspritzen filtriert und auf die mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte, am Magneten befestigte LS-Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 3 ml MACS-Puffer wurden die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer eluiert und vor der weiteren Verwendung zweimal mit Waschmedium zur Entfernung des EDTA gewaschen. Im Bedarfsfall erfolgte eine weitere Anreicherung über eine MS-Säule. Dazu wurden die Zellen direkt nach der Elution von der LS-Säule in einem kleineren Volumen von 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die äquilibrierte MS-Säule gegeben. Nach dreimaligen Waschen mit je 0,7 ml MACS-Puffer erfolgte die Elution mit 1,5 ml MACS-Puffer.

Die Isolierung von CD14⁺-Zellen zu Vergleichszwecken erfolgte analog mit anti-human-CD14- Microbeads (Miltenyi).

2.3.6 Differenzierung von M-DC8⁺-Zellen zu immaturren dendritischen Zellen

Für die Generierung immaturer dendritischer Zellen aus M-DC8⁺-Zellen oder CD14⁺-Monozyten wurden die Zellen nach der Isolierung für vier oder fünf Tage in DC-Medium (RPMI/10% FCS plus GM-CSF und IL-4) in einer Konzentration von 300.000 Zellen pro ml bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Da das M-DC8-Antigen und das D-DC8.3-Antigen bei der Differenzierung der M-DC8⁺-Zellen zu dendritischen Zellen leicht herunterreguliert werden, wurde vor dem Einsatz dieser Zellen auf die Expression dieser Antigene im FACS getestet.

Die Experimente mit den M-DC8⁺-DCs wurden in Medium ohne GM-CSF und IL-4 (wie unter Kapitel 2.5.1 beschrieben) durchgeführt.

2.3.7 Maturierung von immaturren dendritischen Zellen

Die Maturierung der immaturren M-DC8⁺ dendritischen Zellen kann durch verschiedene Stimuli erfolgen. Neben der Maturierung über die Zugabe von bakteriellen Lipopolysacchariden, die hauptsächlich bei den eigenen Experimenten angewendet wurde, können auch bakterielle Oligonucleotide CpG oder die Kreuzvernetzung von CD40 mittels anti-CD40-Antikörpern eine Maturierung der Zellen bewirken. Für die Maturierung durch Lipopolysaccharide wurden die M-DC8⁺-Zellen nach fünf Tagen Kultivierung in RPMI/10% FCS plus GM-CSF und IL-4 nach Zugabe von 1 µg/ml LPS für weitere 40 h in dem gleichen Medium kultiviert.

2.3.8 Kultivierung und Restimulation von CD4⁺ T-Zellklonen

Die Kultivierung der Tetanustoxoid-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erfolgte in RPMI/ 5 % humanem Serum mit 1000 U/ml IL-2, während für die NS3-spezifischen CD4⁺ T-Zellen RPMI/ 5 % humanes Serum mit 200 U/ml IL-2 als Kulturmedium verwendet wurde. Da humane T-Zellen in regelmäßigen Abständen einen zusätzlichen Stimulus als Überlebenssignal benötigen, wurden die Klonzellen ca. alle vier Wochen mit dem Superantigen Phytohaemagglutinin (PHA) restimuliert und expandiert. Dazu wurden allogene PBMCs bei 5000 rad bestrahlt, um eine spätere Proliferation dieser sogenannten Feeder-Zellen zu verhindern. Nach zweimaligen Waschen zur Abtrennung toter Zellen wurden die PBMCs in Kulturmedium mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und mit PHA einer Konzentration von 2 µg/ml versetzt. Je 1 ml dieser Mischung wurden zu 500.000 Klonzellen gegeben, die zuvor in einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium in 24 Lochplatten ausplattiert wurden. Nach ca. 5 Tagen Kultivierung der T-Zellen bei 37°C und 5% CO₂ erreichten die T-Zellen die maximale Dichte pro Vertiefung und konnten je 1:1 mit Medium ausverdünnt werden.

2.3.9 Kultivierung und Restimulation von CD8⁺ T-Zellklonen

Insbesondere CD28-negative CD8⁺ T-Zellen benötigen zur in vitro Expansion neben der Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors ein zusätzliches Aktivierungssignal, um eine Proliferation beginnen zu können. Daher wurden neben allogenen PBMCs auch noch autologe EBV-transformierte B-Zell-Linien als sog. Feederzellen eingesetzt, um die T-Zellproliferation zu unterstützen (zum Buschenfelde et al., 2001). Die PBMCs wurden jeweils kurz vorher aus dem Blut von freiwilligen Spendern isoliert. Eine Proliferation der Feederzellen wurde analog zur Expansion der CD4⁺ T-Zellen durch eine Bestrahlung mit γ -Röntgenstrahlen verhindert. Für die PBMCs ist eine Dosis von 50 Gy ausreichend, während die EBV-Zellen eine höhere Dosis von 100 Gy benötigen. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit Waschmedium gewaschen. Je 25 Mio PBMCs und 5 Mio EBV-Zellen wurden als Feederzellen zu 100.000 Klonzellen in 25 ml RPMI / 10% HS / 200U/ml IL-2 gegeben. Die Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen nach Zugabe von 30 ng/ml OKT3-Antikörper aufrechtstehend im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag sowie dann alle 2 Tage wurde IL-2 zugegeben (200 U/ml humaner IL-2-Überstand). Am Tag 6 nach Restimulation oder wenn erforderlich erfolgte ein Mediumwechsel. Zwei Wochen nach der Restimulation wurden die Zellen in Zellkulturplatten überführt und bis zum Einsatz in den Experimenten bei dreimaligen Mediumwechsel pro Woche RPMI / 10% HS / 200U/ml IL-2 kultiviert.

Bei einer Verwendung als Effektorzellen für Zytotoxizitätsuntersuchungen müssen die T-Zellen bis zu einem Zeitpunkt von zwei bis vier Wochen nach Restimulation in den Experimenten eingesetzt werden, da die Zytotoxizität mit Dauer der Kultivierung abnimmt und ca. 8 Wochen nach Restimulation verschwindet. Für die Untersuchung der T-Zellaktivierung nach Ligation des T-Zellrezeptors wurden T-Zellen in ihrem ruhenden Zustand verwendet (mehr als 6 Wochen nach Restimulation).

2.3.10 Kryokonservierung von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zelllinien erfolgt durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Dazu werden die Zellen, die sich in einem möglichst vitalen Zustand befinden sollten, schonend zentrifugiert und in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen an Einfriermedium aufgenommen (ca. 2×10^6 Zellen /ml). Das Einfriermedium besteht aus 50% Kulturmedium, 40% FCS und 10 % DMSO, welches zum Schutz der Zellen vor Eiskristallen dient. Nach der Aufnahme in Einfriermedium werden die Zellen erst für 24 h bei -80°C

gelagert, um ein langsames und damit schonenderes Einfrieren zu ermöglichen, bevor die Zellen zur Erreichen der endgültigen Lagerungstemperatur von -196°C in Behältern mit flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden.

DMSO besitzt jedoch ebenfalls eine zelltoxische Wirkung, so daß es nach dem Auftauen der Zellen umgehend entfernt werden muß. Die Zellen werden daher bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend zweimal mit warmen Medium RPMI/Hepes/1%FCS gewaschen. Das Ausverdünnen des DMSO im ersten Waschschrift sollte durch tropfenweise Zugabe des Waschmediums erfolgen, da rasche Konzentrationsänderungen die Zellen verstärkt schädigen. Anschließend werden die Zellen in einer geeigneten Konzentration in Kulturmedium aufgenommen.

2.4 Durchflußzytometrie

2.4.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Maus-anti-Human CD1a-FITC	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD3, unkonjugiert OKT3	Restimulation	Medac
Maus-anti-Human CD3-APC Klon UCHT1	FACS	Caltag
Maus-anti-Human CD3-FITC Klon UCHT1	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD11c-FITC	FACS	DAKO
Maus-anti-Human-CD14 FITC	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD16 (Klon 3G8), unkonjugiert	FACS, Konjugation	Pharmingen
Maus-anti-Human CD16-PC5	FACS	Immunotech

Antikörper	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Maus-anti-Human CD19-PE	FACS	Immunotech
Maus-anti-Human CD25-PE	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD33-PE	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD40-FITC	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD56-PE	FACS	Caltag
Maus-anti-Human CD80-PE	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human CD86-FITC	FACS	Pharmingen
Maus-anti-Human D-DC8.3-Antikörper (IgG ₁), unkonjugiert, biotiniliert	FACS, Konjugation	Hybridom von Prof. Rieber, Dresden
Maus-anti-Human HLA-DR-FITC	FACS	Immunotech
Maus-anti-Human HLA-ABC-FITC	FACS	Immunotech
Maus-anti-Human M-DC8-Überstand (IgM-Antikörper)	Isolierung von M-DC8 ⁺ -Zellen, FACS	Hybridom von Prof. Rieber, Dresden
Maus-anti-Human NKG2D, unkonjugiert	Kostimulation	Hybridom von Dr. R. Lutterbüse, Micromet AG
Maus-IgG ₁ -Antikörper (Isotypkontrolle), unkonjugiert	FACS, Konjugation, ELISA	Southern Biotechnology Associates (SBA)
Maus-IgG ₁ -FITC	FACS	Immunotech
Maus-IgG ₁ -PE	FACS	Immunotech

Antikörper	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Ziege-Anti-Maus IgG-Antikörper (F(ab') ₂ spezifisch, F(ab') ₂ Fragmente)	ELISA	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG –FITC	FACS	SBA
Ziege-anti-Maus IgG-PE	FACS	SBA
Ziege-F(ab') ₂ anti-Maus IgM-FITC	FACS	SBA
Ziege-F(ab') ₂ anti-Maus IgM-PE	FACS	SBA

Als Sekundärkonjugat zur Detektion biotinylierter Antikörper wurde Streptavidin-PE (Fa. Immunotech) verwendet. Die PE-konjugierten Peptid-MHC-Tetramere wurden freundlicherweise von Dr. D. Busch, Klinikum rechts der Isar, München zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Darstellung von Oberflächenmarkern

Die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen anhand von Größe, Granularität und der unterschiedlichen Expression verschiedener Oberflächenmoleküle lässt sich mit der Methode der Durchflußzytometrie untersuchen. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern markiert, die einerseits für bestimmte Oberflächenmoleküle spezifisch sind und andererseits einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Tatsache, dass die derart markierten Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren, der in der Lage ist, die Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen. Je nach Fluoreszenzfarbstoff wird dabei Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, das von einem Detektor aufgefangen und registriert wird. Stellt man diese Information für mehrere tausend Zellen in einem Diagramm dar, gibt die Wellenlänge des aufgefangenen Lichtes den Hinweis, wieviele Zellen einer Zellpopulation einen betreffenden Fluoreszenzfarbstoff tragen und somit ein bestimmtes Oberflächenmolekül exprimieren, während die Stärke des Signals ein Maß für die Anzahl der Oberflächenmoleküle pro Zelle ist. Die Darstellung des Anteils des durchgehenden Lichtes im Vergleich zu dem Anteil des gestreuten Lichtes der Anregungswellenlänge ermöglicht es Zellpopulationen nach ihrer Größe und Granularität zu unterscheiden und damit auch lebende Zellen von toten Zellen abzugrenzen. Eine weitere Möglichkeit tote Zellen abzugrenzen, ist es die Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid zu färben, der in die DNA interkaliert,

allerdings intakte Zellmembranen nicht passieren kann, so dass spezifisch nur tote Zellen angefärbt werden.

Je nach Art der verwendeten Zellen wurden bis zu 200.000 Zellen mit jeweils 20µl einer geeigneten Verdünnung der Antikörper in PBS/0,01% Na-Azid auf Eis gefärbt, um eine Internalisierung der erkannten Oberflächenantigene zu verhindern. Nach einer durchschnittlichen Inkubationsdauer von 30 min wurde der nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/0,01% Na-Azid entfernt und die Zellen bei Verwendung von nicht-direktmarkierten Antikörpern für eine halbe Stunde mit den Sekundärantikörpern inkubiert, bevor nach zwei weiteren Waschschritten die Zellen in PBS/0,01% Na-Azid aufgenommen werden konnten. Die Zugabe von Propidiumiodid erfolgte erst kurz vor der Messung in einer Konzentration von 10 µg/ml. Alle Messungen wurden mit einem FACS-Calibur bzw. FACScan-Gerät der Firma Becton-Dickinson durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Cellquest Version 3.1 f nach „Current protocols in immunology“, Editor J.E. Coligan, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1992.

2.4.3 Nachweis der Internalisierung von Antikörpern

Die Internalisierung von Antikörpern lässt sich anhand des Anteils von gebundenen Antikörper bei einer zur Aufnahme des Antikörpers permissiven Temperatur von 37°C im Vergleich zu einer nicht permissiven Temperatur von 4 °C untersuchen. Dazu wird nach Bindung des Antikörpers bei 4°C die Temperatur für eine gewisse Zeit erhöht, um die Internalisierung zu ermöglichen. Der Nachweis des auf der Oberfläche verbliebenden Antikörpers wird durch Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nach Fixierung der Zellen mit 2% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) erreicht. Der internalisierte Antikörper kann mittels einer zusätzlichen intrazelluläre Färbung nach Permeabilisierung der Zelloberfläche durch 0,5% Saponin detektiert werden.

Die genaue Versuchsdurchführung wird im folgenden dargestellt:

- Inkubation von je 200.000 M-DC8⁺ Zellen pro Ansatz mit 10 µg/ml Primärantikörper (anti-CD16, D-DC8.3) für 30 min bei 4°C, jeweils eine Kontrolle ohne Primärantikörper
- Dreimaliges Waschen mit kaltem RPMI/Hepes/ 1%FCS
- Kontrolle (Maximalfärbung) und Kontrolle ohne Primärantikörper verbleiben auf Eis, übrige Ansätze werden für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert

- Waschen mit PBS, Fixierung der Zellen mit je 0,5 ml 2% PFA-Lösung für 20 min bei RT, zweimal Waschen mit PBS/1% FCS
- Permeabilisierung der Zellmembran für intrazelluläre Färbung mit 1 ml 0,5% Saponin in PBS/1%FCS für 20 min bei RT, andere Ansätze verbleiben ebenfalls bei RT
- Inkubation mit 10µg/ml fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers oder Sekundärkonjugat (Ziege-anti-Maus-IgG-FITC bei anti-CD16 bzw. Streptavidin-PE bei D-DC8.3) für 30 min bei RT
- Waschen mit PBS, Resuspendierung der Zellen in adäquaten Volumen von PBS
- Analyse im Durchflußzytometer

2.5 Zelluläre Assays

2.5.1 Aktivierung von T-Zellen durch M-DC8⁺-Zellen bei Zugabe von Antikörper-Antigen-Konjugaten

Für die Untersuchung der T-Zellaktivierung nach Zugabe von Antikörper-Antigen-Konjugaten wurden M-DC8⁺-Zellen von Donoren mit passenden HLA-Typ nach 2.4.4 isoliert. Bei Verwendung von immaturren M-DC8⁺ dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen erfolgte die Differenzierung der frisch isolierten M-DC8⁺ Zellen nach Kapitel 2.3.6.

Zur Analyse der MHC-Klasse II-Präsentation wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen oder M-DC8⁺-DCs sowie 10.000 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI/10% FCS pro Vertiefung einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Nach Zugabe von je 10 µl Antikörper-Antigen-Konjugat einer entsprechenden Konzentration wurden die Zellen für 14 h im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Um die Kinetik der Konjugataufnahme durch die M-DC8⁺ Zellen zu analysieren, wurden die M-DC8⁺ Zellen mit jeweils 0,5 µg/ml Konjugat für die angegebene Zeitdauer bei 37°C vorinkubiert, bevor nicht gebundenes Konjugat durch zweimaliges Waschen mit RPMI/10% FCS entfernt wurde. Erst dann wurden die antigenspezifischen T-Zellen hinzugegeben und M-DC8⁺ Zellen und T-Zellen für 14 h miteinander kultiviert. Bei den Experimenten zur Kreuzpräsentation wurden die M-DC8⁺ Zellen ebenfalls mit den Konjugaten vorinkubiert, das nicht aufgenommene Konjugat aber erst nach Über-Nacht-Kultivierung durch zweimaliges Waschen mit

RPMI/10% anschließend die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen hinzugefügt. FCS entfernt und

Die Analyse der T-Zellaktivierung erfolgte über eine durchflußzytometrische Analyse auf CD25-Expression bei den CD4⁺ T-Zellen nach 14 Kultivierung und auf CD69-Expression bei den CD8⁺ T-Zellen nach 24 h Kultivierung. Der optimale Zeitpunkt für die Messung der T-Zellaktivierung wurde über Literaturrecherche und in Vorversuchen ermittelt. Zur Unterscheidung der T-Zellen von den M-DC8⁺-Zellen wurde neben der Färbung auf CD25-Expression bzw. CD69-Expression eine zusätzliche Färbung mit anti-CD11c-FITC und anti-CD3-APC vorgenommen. Dazu wurden die Zellen nach der Kultivierung zentrifugiert, der Kulturüberstand entfernt und jeweils 10 µl anti-CD3-APC (1:20 vorverdünnt in FACS-Puffer), anti-CD11c-FITC (1:10 vorverdünnt) und anti-CD25-PE bzw. anti-CD69-PE (je 1:5 vorverdünnt) hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubationsdauer auf Eis wurde nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit je 180 µl kaltem FACS-Puffer entfernt und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen wurde. Vor der Analyse auf einem FACS Calibur (Becton Dickinson) wurde Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben, um eine bessere Abtrennung von toten Zellen zu ermöglichen.

2.5.2 Analyse des Aufnahmeweges der Konjugate

Zur Analyse, welche Rolle die bekannten Mechanismen der Antigenaufnahme, wie z.B. rezeptorvermittelte Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose, bei der Aufnahme der unterschiedlichen Konjugate spielen, wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen für 20 min mit 20% humanen Serum bzw. mit humanem IgG entsprechend 20% der IgG -Konzentration in humanem Serum in einem Gesamtvolumen von 100 µl RPMI-Hepes/1 % FCS auf Eis inkubiert. Um den Anteil der gesamten rezeptorvermittelten Aufnahme inklusive Fc-Rezeptoren zu ermitteln, wurde stattdessen nur Waschmedium zugegeben und die Zellen ebenfalls 20 min auf Eis inkubiert. Bei Testung auf rezeptorvermittelte Aufnahme plus Phagozytose wurden die Zellen für 20 min in Waschmedium bei 37°C vorinkubiert. Zur Gewinnung des autologen humanen Serum wurde 1 ml Blut ohne Heparin 20 min stehengelassen und anschließend bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Die obere Phase mit dem Serum wurde abgenommen, mit Waschmedium versetzt und bei 56 °C, 30 min hitzeinaktiviert. Nach der 20 minütigen Inkubation der M-DC8⁺-Zellen wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 3 min), der Überstand wurde entfernt (Restvolumen ca. 20 µl) und mit dem gleichen Volumen an an Konjugat, Peptid bzw. Waschmedium versetzt. Nach 1 h Inkubation auf Eis bzw. 37°C wurden die Zellen dreimal mit Kompletmedium (RPMI/10%

FCS) gewaschen und 80 µl Medium sowie 100 µl TT- spezifische T-Zellen einer Konzentration von 100.000 Zellen /ml hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen ü.N. im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag die Aktivierung der TT- spezifischen T-Zellen im FACS wie unter 2.6.1 angegeben untersucht.

2.5.3 Zytotoxizitätstest zum Nachweis der Spezifität des CD8⁺ T-Zellklons

Die Spezifität des CD8⁺ T-Zellklons wurde über die Fähigkeit zur spezifischen Lyse von Her2/neu-Peptid gepulsten T2-Zellen ermittelt. Bei den T2-Zellen (ATCC CRL,1992) handelt es sich um ein humanes HLA-A*0201 positives T-/B-Zellhybrid, das aufgrund einer Defizienz im MHC-Klasse I-Prozessierungsweg nur von aussen aufgenommene Peptide über MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren kann (Salter und Cresswell, 1986; Anderson et al.,1991). Als Maß für die Lyse der T2-Zellen wurde die Freisetzung eines radioaktiven Chromisotop während einer bestimmten Zeitdauer in Abhängigkeit der Anzahl an Effektorzellen bestimmt.

Die genaue Versuchsdurchführung ist im folgenden angegeben:

- Je 2×10^6 T2-Zellen in ca. 100 µl FCS werden mit 100 bis 200 µl mit RPMI verdünnten Natriumchromat (7,4 MBq am Kalibrationstag) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert
- Zweimaliges Waschen mit RPMI-Medium (RPMI/5% FCS/ 2mM Glutamin), Aufteilen der T2-Zellen auf zwei 10 ml Rundbodenröhrchen und Aufnahme in jeweils 1,5 ml RPMI-Medium
- ca. 1×10^6 T2-Zellen werden mit 10 µg/ml Her2/neu-Peptid und 3 µg/ml β₂-Microglobulin für 1,5 h bei 37°C inkubiert, während die andere Hälfte der Zellen als Kontrolle dient (Inkubation unter gleichen Bedingungen ohne Peptid und β₂-Microglobulin), erneutes zweimaliges Waschen, Ermittlung der Zellzahl und Einstellen einer Konzentration von 10.000 Zellen /ml
- Die Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen werden in je 100 µl RPMI-Medium in verschiedenen Konzentrationen (höchste Konzentration $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml) in die Vertiefungen einer Spitzboden-Mikrotiterplatte verteilt, so daß sich bei Zugabe von je 1000 T2 –Zellen (100 µl) pro Vertiefung Verhältnisse von Effektorzellen zu Zielzellen von 45: 1 bis 1: 6 ergeben; zur Bestimmung der Maximallyse werden die Zielzellen mit PBS/0,5% Triton inkubiert, als Spontanlyse dienen Zielzellen ohne Effektorzellen
- Inkubation der Ansätze für 4 h bei 37 °C und 6% CO₂

- Jeweils 100 µl Überstand pro Vertiefung werden abgenommen und in einem Szintillationscounter (1480 Wizard 3'', Software Version 3.4 von Wallac, Freiburg) auf Radioaktivität untersucht. Die Anzahl der Zerfälle pro Minute (cpm) ist ein Maß für die Freisetzung des von den T2-Zellen aufgenommenen ^{51}Cr in den Überstand.
- Die spezifische Lyse der Her2/neu-Peptid gepulsten T2-Zellen durch den CD8^+ T-Zellklon lässt sich durch Vergleich der absoluten Zerfälle pro Minute im Beisein von Effektorzellen mit der spontanen Lyse und Maximallyse nach folgender Formel aus den Mittelwerten von Triplikaten errechnen:

Relative spezifische Lyse

$$= \frac{(\text{gemessene } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung [cpm]}) - (\text{spontane } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung [cpm]})}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung [cpm]}) - (\text{spontane } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung [cpm]})}$$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der von den monoklonalen Antikörpern M-DC8 und D-DC8.3 erkannten Zellpopulationen

3.1.1 Expression der M-DC8 und D-DC8.3-Antigene

3.1.1.1 **Spendervariabilität der Antigenexpression**

Zur Untersuchung der Häufigkeit des M-DC8-Antigens sowie des D-DC8.3-Antigens auf humanen Leukozyten wurden aus dem Blut von mehreren gesunden Spendern die mononukleären Zellen (PBMCs) isoliert und eine durchflußzytometrische Analyse mit den monoklonalen Antikörpern M-DC8 und D-DC8.3 vorgenommen. Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte über PE- bzw. FITC- gekoppelte anti-Maus-IgM und anti-Maus-IgG Sekundärantikörper. Für eine Analyse von isolierten M-DC8⁺-Zellen wurden PBMCs mit M-DC8-Hybridom-Überstand inkubiert und die M-DC8⁺-Zellen mit Hilfe von magnetischen anti-Maus-IgM-Beads (Fa. Miltenyi) über Säulen angereichert. Anschließend wurde die M-DC8- und die D-DC8.3-Antigenexpression im Durchflußzytometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigte sich, dass der Anteil der D-DC8.3⁺-Zellen an PBMCs gegenüber den M-DC8⁺-Zellen leicht verringert ist und die von den beiden monoklonalen Antikörpern erkannten Zellpopulationen etwa zur Hälfte überlappen. So exprimieren im Durchschnitt 46 % der isolierten M-DC8⁺-Zellen auch das D-DC8.3-Antigen.

	Färbung auf PBMCs	Färbung auf frisch isolierten M-DC8 ⁺ Zellen
M-DC8 ⁺ -Zellen [%]	1,5 (± 0,5)	96 (± 2,2)
D-DC8.3 ⁺ -Zellen [%]	1,1 (± 0,5)	-
M-DC8 ⁺ /D-DC8.3 ⁺ -Zellen [%]	0,4 (± 0,3)	46 (± 12,4)

Tab. 1: M-DC8- und D-DC8.3-Antigenexpression auf PBMCs und isolierten M-DC8⁺-Zellen

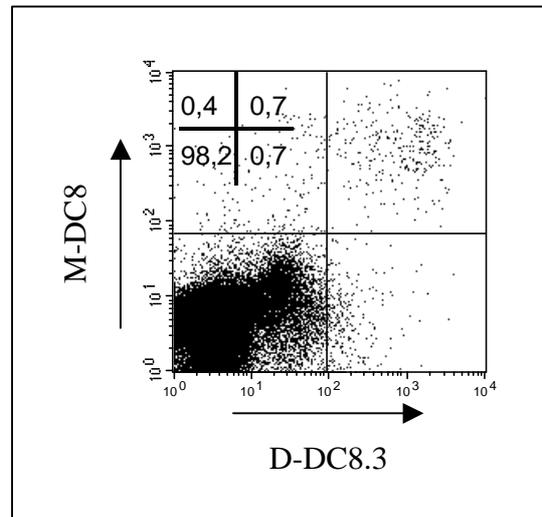
Angegeben sind die Prozentzahlen von M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen an PBMCs oder an isolierten M-DC8⁺-Zellen. Die Werte für die jeweilige Standardabweichung (Angabe in Klammern) beziehen sich auf eine Analyse von 8 Spendern (PBMCs) bzw. 6 Spendern (isolierte M-DC8⁺-Zellen).

In Abbildung 5 ist eine durchflußzytometrische Analyse auf M-DC8 und D-DC8.3-Antigenexpression auf mononukleären Blutzellen exemplarisch für einen Donor dargestellt. Die Mehrzahl der Zellen befindet sich im unteren linken Quadranten, d.h. 98,2% der Zellen exprimieren weder das M-DC8, noch das D-DC8.3-Antigen auf ihrer Oberfläche. Für diesen Donor liegt der Anteil der einfach positiven M-DC8⁺-Zellen bei 0,4%, der einfach positiven

D-DC8.3⁺-Zellen bei 0,7% und der M-DC8⁺/ D-DC8.3⁺-doppeltpositiven Zellen bei ebenfalls 0,7%.

Abb. 5: M-DC8- und D-DC8.3-Antigenexpression auf PBMCs

Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse von PBMCs nach Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern M-DC8 und D-DC8.3 und Detektion der Antikörperbindung über die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgM-PE und Ziege anti-Maus IgG-FITC. Die Zahlenwerte geben die Prozentzahlen der sich in den jeweiligen Quadranten befindlichen Zellen an.



3.1.1.2 Veränderung der Antigenexpression unter Kulturbedingungen

Die wichtigste Quelle humaner dendritischer Zellen für die Therapie sind gereinigte Monozyten aus dem peripheren Blut, die in-vitro mit Hilfe der Cytokine GM-CSF und IL-4 zu immaturren DCs differenziert und ggf. anschließend durch Zugabe von CD40L oder LPS maturiert werden (Syme und Glück, 2001; Zou und Tam, 2002). Auch M-DC8⁺-Zellen lassen sich unter diesen Bedingungen kultivieren sowie differenzieren und maturieren.

Unter diesen Kultivierungsbedingungen reduziert sich allerdings sowohl die M-DC8-, als auch die D-DC8.3-Antigenexpression, so dass eine zielgerichtete Antigenaufnahme mit Hilfe von M-DC8- und D-DC8.3-Antikörpern bei immaturren M-DC8⁺-DCs erschwert und bei maturierten M-DC8⁺-DCs nicht mehr möglich ist (Abbildung 6).

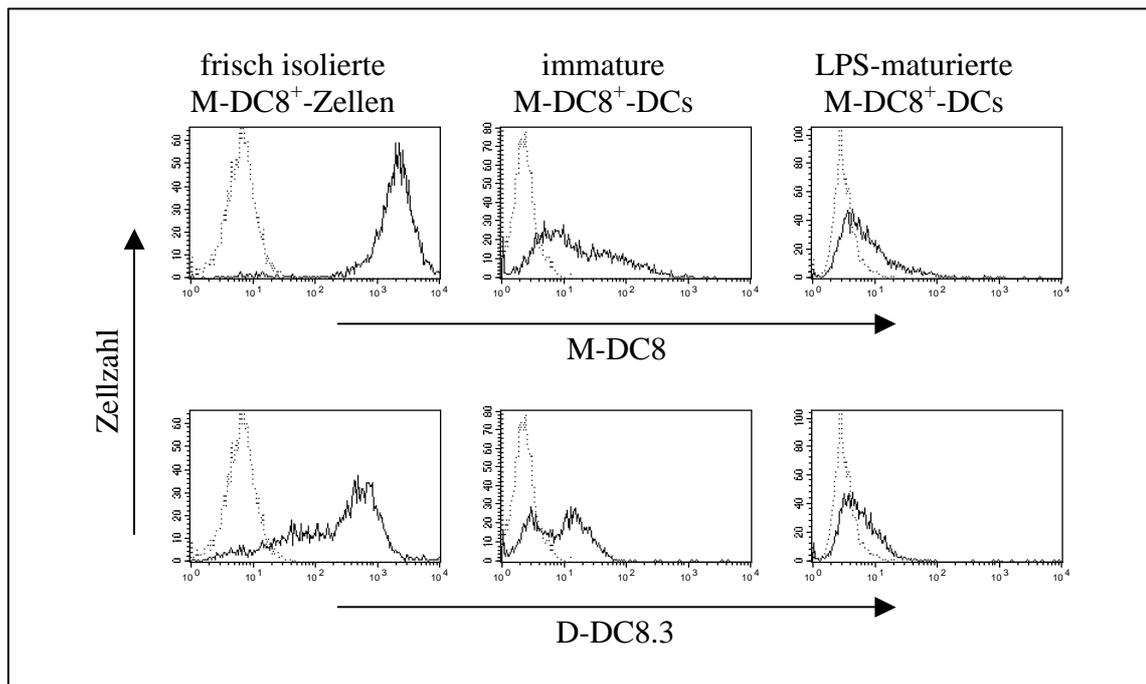


Abb. 6: Veränderung der M-DC8- und D-DC8.3-Antigenexpression durch Kultivierung

Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse von M-DC8⁺-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien nach Inkubation mit M-DC8 und D-DC8.3 und anschließender Detektion der Primärantikörper über Maus-IgM- und Maus-IgG-spezifische Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen (gestrichelte Linie). Die Differenzierung zu immaturren dendritischen Zellen erfolgte durch fünftägige Kultivierung in RPMI/10% FCS mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4. Für die Maturierung wurden die immaturren DCs noch zusätzlich 40 h mit 1 µg/ml LPS kultiviert.

3.1.1.3 Expression von zellinien-spezifischen Oberflächenmolekülen

Zur genaueren Charakterisierung der M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen wurden PBMCs neben Inkubation mit M-DC8 und D-DC8.3 zusätzlich mit Antikörpern gegen zellinien-spezifische Oberflächenmoleküle gefärbt und anschließend im Durchflußzytometer analysiert (Abbildung 7). Als Marker dienten CD3 für T-Zellen, CD19 für B-Zellen, CD14 für Monozyten und CD56 für NK-Zellen. Es zeigte sich, dass die D-DC8.3-Zellen genau wie die M-DC8⁺-Zellen mit Ausnahme einer schwachen Expression von CD14 keine zellinien-spezifischen Oberflächenmoleküle aufweisen. Es handelt sich also bei beiden untersuchten Zellpopulationen weder um T-Zellen, noch um B-Zellen oder NK-Zellen, obwohl die Zellen den für natürliche Killerzellen typischen Fcγ-Rezeptor III (CD16) exprimieren.

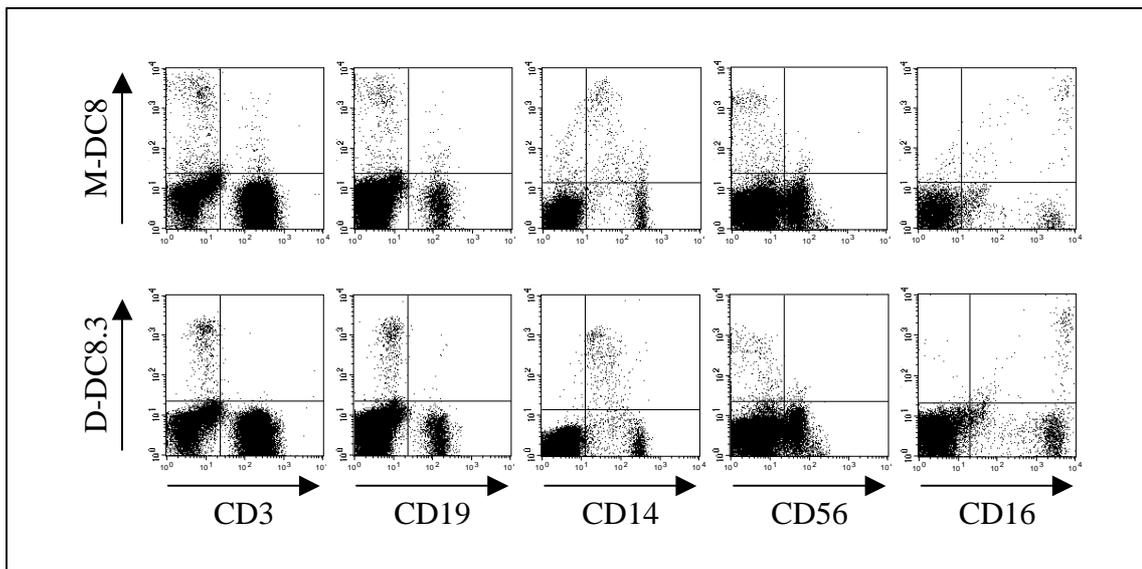


Abb. 7: Einordnung der M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen anhand von zellinienspezifischen Oberflächenmarkern

PBMCs wurden mit M-DC8-Hybridom-Überstand bzw. Biotin-gekoppeltem D-DC8.3-Antikörper inkubiert und die Bindung durch Färbung mit anti-Maus IgM-FITC/-PE für M-DC8 und Streptavidin-FITC/-PE für D-DC8.3 nachgewiesen. Gleichzeitig wurde eine Färbung mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen zellinienspezifische Oberflächenmoleküle durchgeführt. Verwendet wurden die Antikörper anti-CD3-FITC (T-Zellen), anti-CD19-FITC (B-Zellen), anti-CD14-FITC (Monozyten), anti-CD56-PE (NK-Zellen) und anti-CD16-PC5 (NK-Zellen). Der Ausschluß toter Zellen erfolgte über eine Färbung mit Propidiumiodid (10µg/ml).

3.1.1.4 Einordnung der M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen unter den monozytären Zellen

Sowohl die M-DC8⁺-Zellen als auch die D-DC8.3⁺-Zellen exprimieren den Monozytenmarker CD14, im Gegensatz zu den klassischen Monozyten weisen sie allerdings auch eine Expression des Fc-Rezeptors CD16 auf. Um die M-DC8⁺-Zellen und die D-DC8.3⁺-Zellen noch genauer in das Gefüge der Monozyten-Subpopulationen einzuordnen, wurde eine Dreifachfärbung mit anti-CD14-FITC, anti-CD16-PC5 und entweder M-DC8 (nachgewiesen durch anti-Maus-IgM-PE) oder D-DC8.3-Biotin (nachgewiesen durch Streptavidin-PE) durchgeführt. Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus der Untersuchung von vier verschiedenen Spendern.

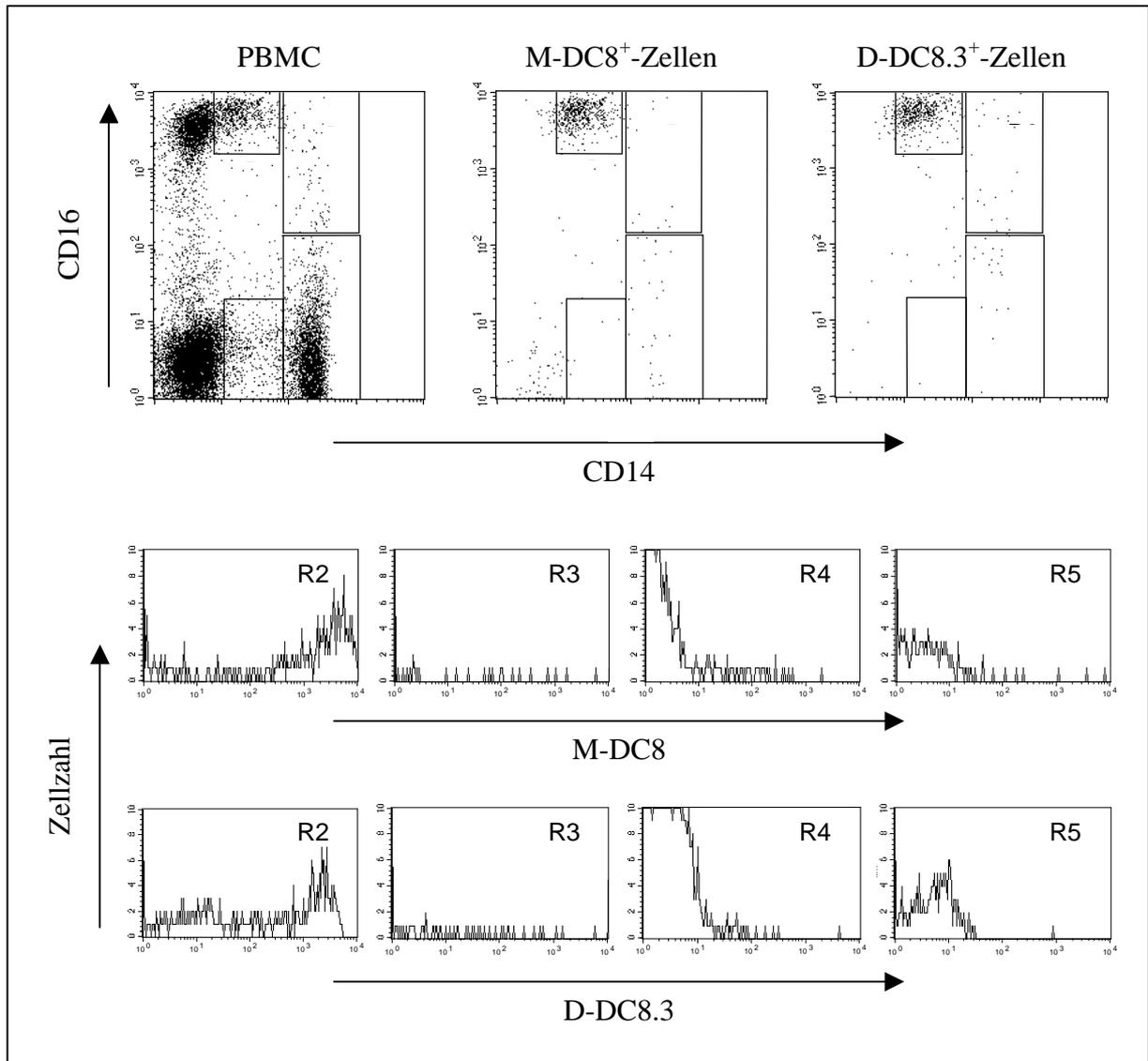


Abb. 8: Einordnung der M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen anhand der CD14 und CD16-Expression

PBMCs wurden mit anti-CD14-FITC, anti-CD16-PC5 und M-DC8 in Kombination mit anti-Maus-IgM-PE oder D-DC8.3-Biotin plus Streptavidin-PE gefärbt. Dargestellt ist die CD14/CD16-Expression von PBMCs im Vergleich zu M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen (A) sowie die M-DC8- und D-DC8.3-Antigenexpression in den einzelnen Subpopulationen von Monozyten (B). Unterschieden wurden die Subpopulationen CD14⁺/CD16⁺⁺ (R2); CD14⁺⁺/CD16⁺⁺ (R3); CD14⁺⁺/CD16⁻ (R4) und CD14⁺/CD16⁻.

Die Darstellung der CD14/CD16-Doppelfärbungen von M-DC8⁺-Zellen und D-DC8.3⁺-Zellen verglichen mit unseparierten PBMCs zeigt, dass sich sowohl die M-DC8⁺-Zellen als auch die D-DC8.3⁺-Zellen im wesentlichen in der Region R2 (mittlere Expression von CD14, hohe Expression von CD16) befinden. Dies wird durch die Analyse der M-DC8 und D-DC8.3-Antigenexpression in den einzelnen untersuchten Subpopulationen bestätigt: Nur bei den CD14⁺/CD16⁺⁺-Zellen exprimiert ein großer Anteil der Zellen das M-DC8- und das D-DC8.3-Antigen.

3.1.2 Expression des Fc γ -Rezeptors CD16

Die Untersuchung der M-DC8⁺-Zellen hat gezeigt, dass diese Zellpopulation bei den CD14⁺/CD16⁺⁺ Monozyten einzuordnen ist. Betrachtet man die CD16-Expression bei unseparierten PBMCs, so weisen nahezu alle M-DC8⁺-Zellen eine hohe CD16-Expression auf (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Nimmt man eine Anreicherung der M-DC8⁺-Zellen über magnetische Positivselektion vor, so erhält man bei einer durchschnittlichen Reinheit von 95 % mindestens 90 % CD16-positive Zellen, die alle eine ähnlich hohe Expressionsrate besitzen, wie anhand der CD16-Expression bei PBMCs erwartet wurde. Kultiviert man die M-DC8⁺-Zellen für einige Tage unter Zugabe von GM-CSF und IL-4, so differenzieren die Zellen zu immaturren dendritischen Zellen. Diese lassen sich unter anderem durch Zugabe von LPS maturieren. Vergleicht man die CD16-Expression von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen mit immaturren und maturierten M-DC8⁺-DCs, so beobachtet man eine Reduzierung der CD16-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Abbildung 9).

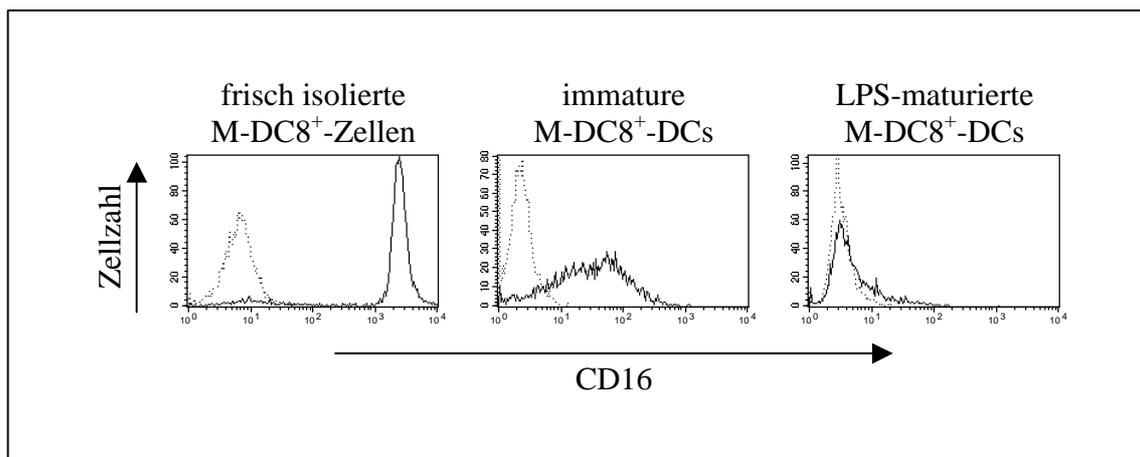


Abb. 9: CD16-Expression bei M-DC8⁺-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse der CD16-Expression von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen im Vergleich zu immaturren und maturierten M-DC8⁺-DCs unter Verwendung eines PE-markierten anti-CD16-Antikörpers. Als Referenz dienten ungefärbte Zellen (gestrichelte Linie). Zur Generierung der immaturren M-DC8⁺-DCs wurden die M-DC8⁺-Zellen für fünf Tage in RPMI/10% FCS + 50 ng/ml GM-CSF + 1000 U/ml IL-4 kultiviert. Die Maturierung erfolgte durch Kultivierung für weitere 40h in Gegenwart von 1 µg/ml LPS.

3.1.3 Expression von Oberflächenmolekülen auf M-DC8⁺-Zellen

3.1.3.1 Expression von MHC-Molekülen

Neben der Expression von möglichen Zielstrukturen für die Antigenaufnahme ist für einen erfolgreichen Vakzinierungsansatz die Expression von weiteren Oberflächenmolekülen entscheidend. Dazu gehören insbesondere Strukturen, die bei der Antigenpräsentation und der

T-Zellstimulierung eine Rolle spielen. Die M-DC8⁺-Zellen gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen, da sie neben MHC-Klasse I-Molekülen auch MHC-Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen (Abbildung 10). CD1-Moleküle sind an der Antigenpräsentation von Nicht-Peptidantigenen beteiligt und aktivieren NKT-Zellen. Für Vakzinierungsansätze mit Peptidantigenen haben sie daher keine Bedeutung. Die Färbung auf CD1a-Expression diente der weiteren Einordnung der M-DC8⁺-Zellen unter den dendritischen Zellen. Während CD1a als ein Marker für Langerhanszellen gilt, lassen sich die frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen (CD1a negativ) eher zu den interstitiellen dendritischen Zellen zählen (Abbildung 10).

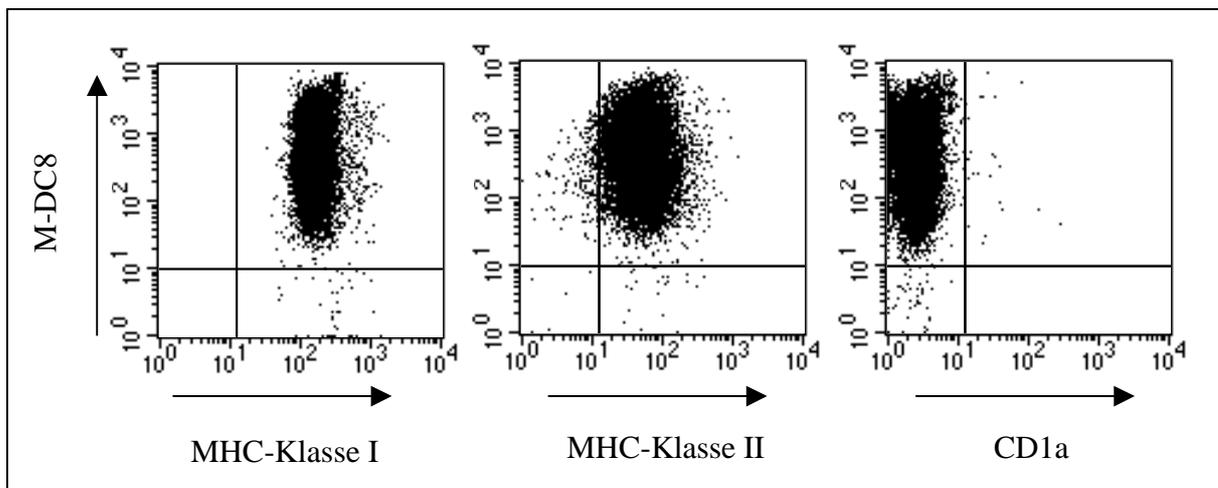


Abb. 10: Expression von MHC-Molekülen

Dargestellt ist eine FACS-Analyse von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen auf MHC-Klasse I-, MHC-Klasse II- und CD1a-Expression bei gleichzeitiger Gegenfärbung auf M-DC8-Antigenexpression. Dazu wurden die Zellen mit M-DC8-Hybridom-Überstand inkubiert und anschließend eine Färbung mit anti-Maus IgM-PE sowie den FITC-markierten Antikörpern gegen MHC-Klasse I (anti-HLA A,B,C), MHC-Klasse II (anti-HLA-DR), bzw. CD1a vorgenommen. Der Ausschluß toter Zellen erfolgte über eine elektronische Auswahl der lebenden Zellen nach Größe und Granularität in der FCS/SSC-Darstellung sowie über eine zusätzliche Propidiumiodidfärbung.

3.1.3.2 Expression von kostimulatorischen Moleküle

Kostimulatorische Signale können bei der Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle und naiver T-Zelle für das Schicksal der T-Zelle sowie für die Effizienz der induzierten Immunantwort entscheidend sein. Um das Potential von M-DC8⁺-Zellen zu analysieren, T-Zellen ein kostimulatorisches Signal zur Verfügung zu stellen, wurden frisch aus dem Blut isolierte M-DC8⁺-Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD40, CD80 und CD86 gefärbt und anschließend im Durchflußzytometer untersucht. Es zeigte sich, dass M-DC8⁺-Zellen CD40 und CD86 exprimieren und daher bereits in ihrem Ursprungszustand in der Lage sein sollten, T-Zellen durch Interaktion mit CD40L oder CD28 ein kostimulatorisches Signal zur Verfügung zu stellen (Abbildung 11).

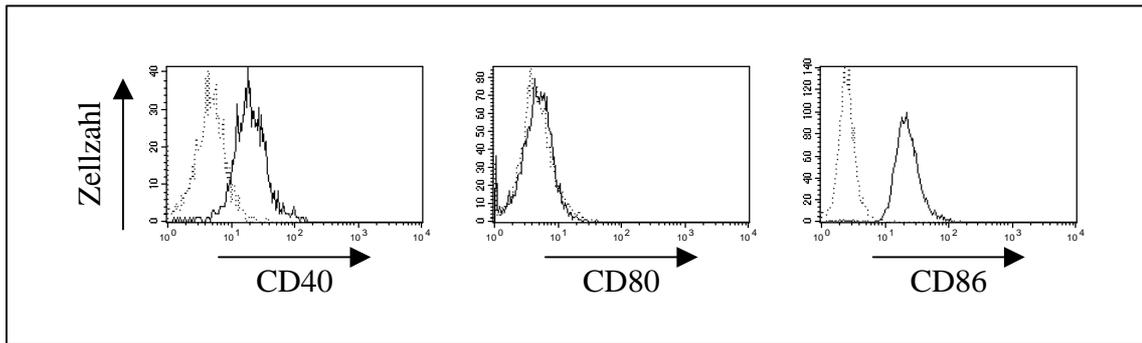


Abb. 11: Expression von kostimulatorischen Molekülen

Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse auf CD40-, CD80- und CD86-Expression nach Färbung von isolierten M-DC8⁺-Zellen mit anti-CD40-FITC-, anti-CD80-PE- oder anti-CD86-FITC-Antikörper. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (gestrichelte Linie). Der Ausschluß toter Zellen erfolgte über Propidiumiodidfärbung.

3.1.3.3 Veränderung der M-DC8⁺-Zellen durch in-vitro-Kultivierung

Um die Veränderung der M-DC8⁺-Zellen im Verlauf der Differenzierung zu dendritischen Zellen und der Maturierung zu analysieren, wurden von jeweils mindestens drei verschiedenen Donoren M-DC8⁺-Zellen isoliert und jeweils ein Teil der Zellen für eine direkte Charakterisierung verwendet, während die übrigen Zellen zur Differenzierung in immature DCs für vier bis fünf Tage in RPMI/10% FCS supplementiert mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 kultiviert wurden. Die Maturierung der Zellen erfolgte durch Kultivierung für weitere 40 Stunden unter Zugabe von 1 µg/ml LPS. Anschließend wurde eine durchflußzytometrische Analyse auf verschiedene Oberflächenmarker vorgenommen, die im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der M-DC8⁺-Zellen für die Vakzinierung bedeutsam erschienen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Expression der für die Antigenpräsentierung und die T-Zellstimulierung entscheidenden MHC- und kostimulatorischen Moleküle erst bei Maturierung der Zellen gegenüber den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen deutlich erhöht ist, während sich zwischen M-DC8⁺-Zellen und immaturren M-DC8⁺-DCs nur geringfügige Unterschiede beobachten lassen. Dagegen nahm die Expression des als Zielstruktur verwendeten D-DC8.3-Antigens sowie des Fcγ-Rezeptor III (CD16) im Laufe der Kultivierung ab, wobei immature dendritische Zellen nach 4 Tagen Kultivierung im Durchschnitt eine deutliche höhere D-DC8.3 und CD16-Expression aufwiesen als nach fünf Tagen Kultivierung. Die myeloischen Differenzierungsmarker CD11c und CD33 wurden bei den Experimenten zur besseren Unterscheidung der M-DC8⁺-Zellen von den T-Zellen verwendet, da sich ihre Expression als unabhängig von der Kultivierung der M-DC8⁺-Zellen erwies.

	M-DC8 Antigen	Zielstrukturen		MHC-Moleküle		Kostimulation			Maturierung	Monozyten	
		D-DC8.3 Antigen	CD16	HLA- ABC	HLA- DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD11c	CD33
Frisch isoliert	+++	++	+++	++	++	+	-	+	-	++	+
Immature DCs	+	+	+	++	++	+	-	+	-	++	+
Maturierte DCs	-	-	-	+++	++	+++	+	++	+	++	+

Tab. 2: Veränderung der M-DC8⁺-Zellen bei Differenzierung und Maturierung

Analysiert wurde die Expression von Oberflächenmolekülen von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen, immaturen und LPS-maturierten M-DC8⁺-DCs im Vergleich. Die Daten basieren auf einer Analyse von jeweils mindestens drei verschiedenen Donoren. Die Expressionsstärke eines Oberflächenmoleküls wurde anhand der erreichten mittleren Fluoreszenzintensität in die Kategorien keine Expression (-), schwache (+), mittlere (++) und hohe Expression (+++) eingeordnet.

3.1.4 Internalisierung des CD16- und des D-DC8.3-Antigens durch M-DC8⁺-Zellen nach Antikörperbindung

Eine Internalisierung von Rezeptoren nach Antikörperbindung ist bei niedrigen Temperaturen nicht möglich. Diese Tatsache erlaubt den experimentellen Nachweis einer Internalisierung von Antikörpern. Um die Internalisierung des CD16- und des D-DC8.3-Antigens durch M-DC8⁺-Zellen zu untersuchen, wurden die M-DC8⁺-Zellen deshalb mit anti-CD16- bzw. biotinyliertem D-DC8.3-Antikörper bei 4°C inkubiert, um die Bindung des jeweiligen Antikörpers auf der Zelloberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C kultiviert, während die übrigen Zellen bei 4°C belassen wurden. Der Nachweis von anti-CD16- und D-DC8.3-Antikörper auf der Zelloberfläche von M-DC8⁺-Zellen erfolgte über die Inkubation mit einem FITC-markierten anti-Maus IgG-Antikörper (anti-CD16) bzw. Streptavidin-PE (D-DC8.3) mit anschließender durchflußzytometrischer Analyse. Die Reduktion der Fluoreszenzintensität bei einer Inkubationstemperatur von 37°C im Vergleich zu 4°C ist ein Maß für die Abnahme der Antigenexpression auf der Oberfläche der M-DC8⁺-Zellen und damit ein Maß für die Internalisierung. Es zeigte sich, dass der anti-CD16-Antikörper auch ohne zusätzliche Kreuzvernetzung effizient internalisiert wird, während der Antikörper D-DC8.3 weitestgehend an der Oberfläche der M-DC8⁺-Zellen verbleibt (Abbildung 12).

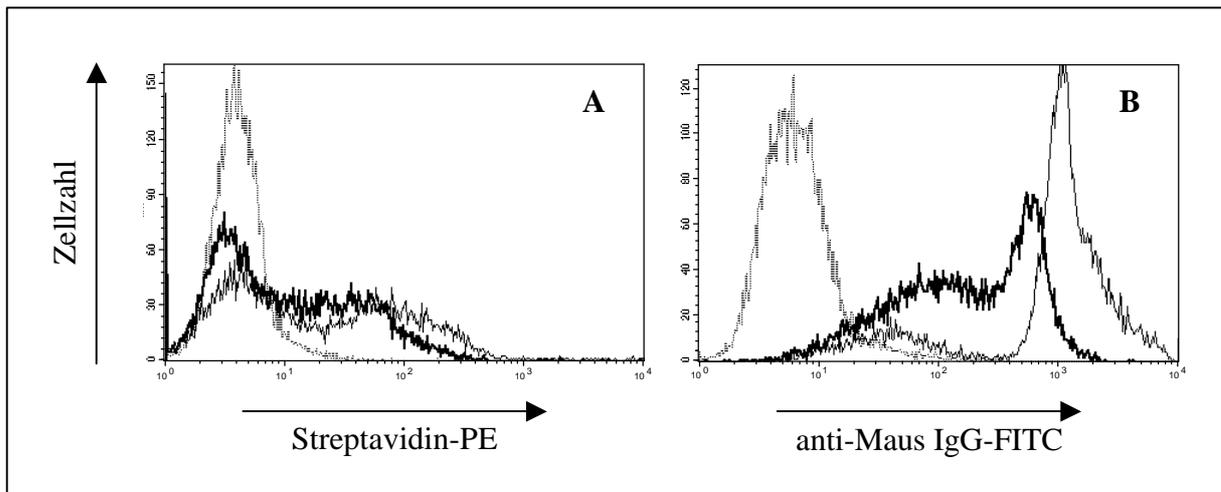


Abb. 12: Internalisierung von D-DC8.3- und anti-CD16-Antikörper durch M-DC8⁺-Zellen

FACS-Analyse der Antikörperbindung von D-DC8.3 (A) und anti-CD16 (B) auf der Zelloberfläche von M-DC8⁺-Zellen. Untersucht wurde die Inkubation bei 4°C (durchgezogene Linie), bei 37°C (durchgezogene Linie, fettgedruckt) und die Inkubation ohne Primärantikörper (gestrichelte Linie). Der Nachweis von D-DC8.3 und anti-CD16 erfolgte durch Inkubation mit Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern mit anschließender durchflußzytometrischer Analyse.

3.2 Studien zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenem Antigen für die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Für die Analyse der gezielten Aufnahme von Antigen durch M-DC8⁺-Zellen mittels Antikörper-Antigen-Konjugaten wurde ein geeignetes Nachweissystem benötigt. Da das Ziel von nahezu allen Vakzinierungsstrategien die Induktion einer T-Zellantwort ist, wurde die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellklonen durch M-DC8⁺-Zellen analysiert, die mit verschiedenen Antikörper-Antigen-Konjugaten inkubiert worden waren. Die Wahl eines geeigneten Modell-Antigens war dementsprechend durch die Spezifität der verfügbaren T-Zellklone eingeschränkt.

3.2.1 Herstellung von Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten

3.2.1.1 Chemische Kopplung

Die Charakterisierung der M-DC8⁺-Zellen legte zwei mögliche Zielstrukturen für die gerichtete Aufnahme von Antigen mittels Antikörper-Antigen-Konjugaten nahe. Antikörper gegen CD16 (Fcγ-Rezeptor III) werden effizient internalisiert und bieten damit möglicherweise den Vorteil einer leichteren Aufnahme eines mit ihnen gekoppelten Antigens.

Der monoklonale Antikörper D-DC8.3 (Prof. Dr. Rieber, Dresden) besitzt dagegen eine höhere Spezifität für antigenpräsentierende Zellen, wie die Phänotypanalyse an gereinigten M-DC8⁺-Zellen und unseparierten PBMCs ergab. Aus diesem Grund wurde sowohl ein anti-CD16 Antikörper (Klon 3G8, Pharmingen), als auch der D-DC8.3-Antikörper für die Herstellung von Antikörper-Antigen-Konjugaten verwendet. Zusätzlich wurden als interne Negativkontrollen Konjugate mit einem nicht an M-DC8⁺-Zellen bindenden Antikörper gleichen Isotyps (Iso-IgG) hergestellt.

Die Auswahl des Antigens für die Kopplung ergab sich aus der geplanten Nachweismethode. Für die Messung der T-Zellaktivierung standen sowohl ein NS3-spezifischer als auch ein Tetanustoxoid (TT)-spezifischer CD4⁺ T-Zellklon zur Verfügung, die jeweils eine bestimmte Peptidsequenz in Verbindung mit dem MHC-Molekül HLA-DR11 erkennen. Das Antigen musste daher mindestens die entsprechende Peptidsequenz sowie einige Aminosäuren zusätzlich beinhalten, um eine korrekte Prozessierung durch die Proteasen der endosomal-lysosomalen Kompartimenten zu ermöglichen. Zur späteren Quantifizierung des Peptidantigens wurde Carboxyfluorescein an den N-Terminus gekoppelt, während die Kopplung mit dem Antikörper über die freie Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes am C-Terminus des Peptidantigens erfolgte. Die Gesamtsequenz der Peptidantigene lautet daher 5,6-Carboxyfluorescein-KGG-GYKVLVLNPSVAAT-GGG-C für das NS3-Peptidantigen und 5,6-Carboxyfluorescein-GGG-QYIKANSFIGITE-GGG-C für das TT-Peptidantigen. Die unterstrichenen Aminosäuren symbolisieren die von den T-Zellen erkannten Peptidsequenzen. Die Synthese der Peptide wurde von der Firma Jerini in Berlin durchgeführt.

Für die Herstellung der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate kam eine chemische Kopplungsmethode unter Verwendung des heterobifunktionellen Crosslinkers Sulfo-SMCC (Sulfo-succinimidyl4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) zum Einsatz. Die Chemie der Kopplung ist in Abbildung 13 illustriert.

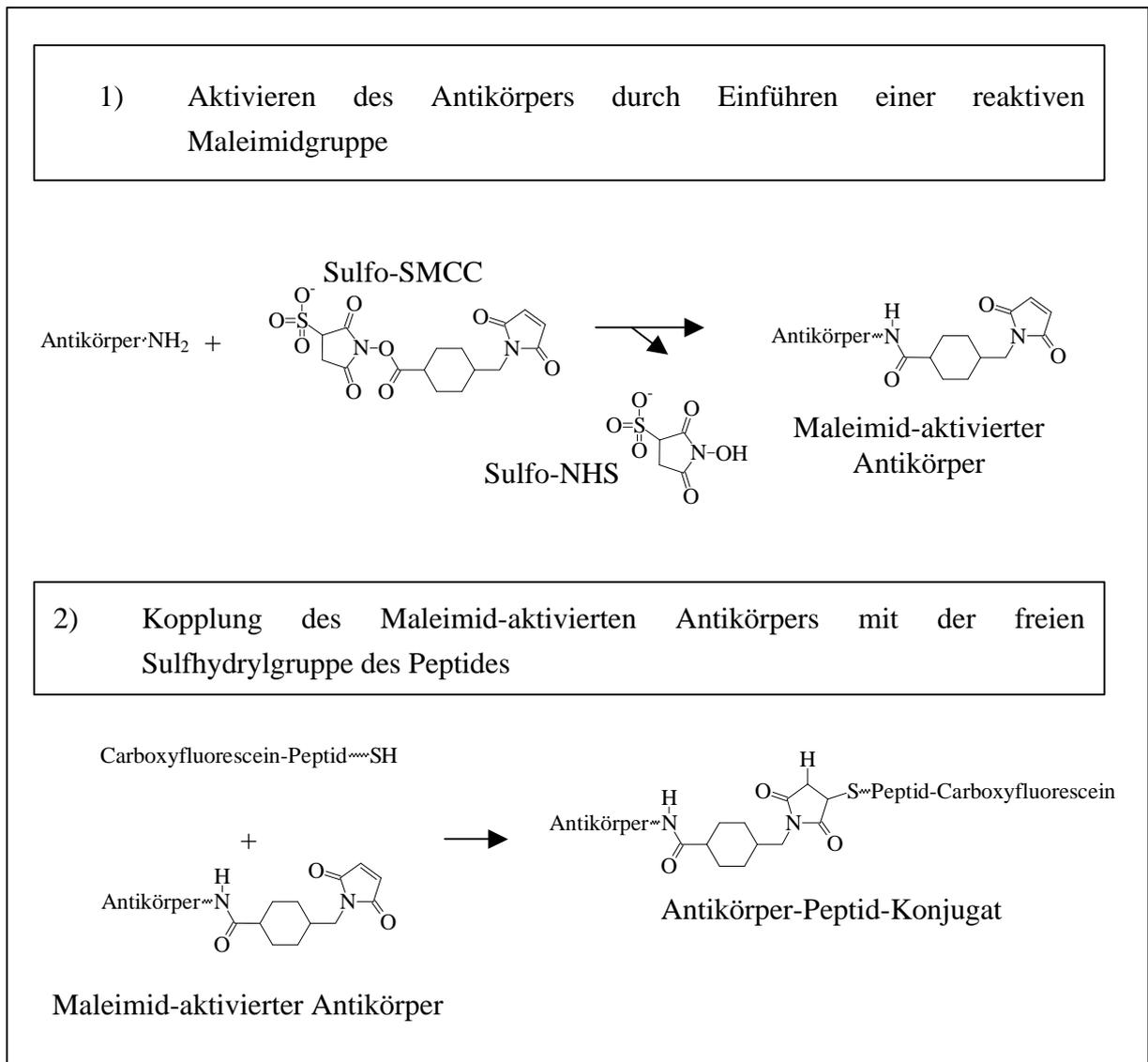


Abb. 13: Chemische Grundlage der Antikörper-Peptidantigen-Kopplung

Der Antikörper reagiert über die freien Aminogruppen seiner Lysinreste mit der NHS-Estergruppe des in 25-fachem molarem Überschuß eingesetzten heterobifunktionellen Crosslinkers Sulfo-SMCC, wodurch der Antikörper reaktive Maleimidgruppen erhält. Nach teilweiser Entfernung des überschüssigen Crosslinkers und Zugabe eines ca. 65-fachen molaren Überschusses an Peptidantigen können diese Maleimidgruppen mit der freien Sulfhydrylgruppe des Peptidantigens unter Bildung einer Thioetherbrücke reagieren. Das erhaltene Konjugat aus Peptidantigen und Antikörper wird durch Gelfiltration von nicht freiem Peptidantigen getrennt.

Nach erfolgter Kopplung von Peptidantigen und Antikörper wurde nicht gebundenes Peptidantigen über eine Gelfiltration (P60-Gel, Fa. Biorad) abgetrennt, ein Elutionsprofil anhand der Bestimmung des Fluoresceingehaltes in den einzelnen Fraktionen erstellt und die entsprechenden fluoreszierenden Konjugat-Fraktionen vereinigt.

3.2.1.2 Analyse der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate

Die Konjugationseffizienz läßt sich näherungsweise anhand einer photometrischen Messung bestimmen, indem man die Absorption der Konjugatlösung bei den Wellenlängen 280 nm (maximale Proteinabsorption) und 493 nm (Fluoresceinabsorption) ermittelt. Werden die erhaltenen Messwerte zueinander in Relation gesetzt, erhält man das Fluorochrom-/Protein-Verhältnis, welches mit dem molaren Verhältnis an Peptidantigen pro Antikörper übereinstimmt, sofern man eine ideale Abtrennung von freiem Peptidantigen durch Gelfiltration sowie eine perfekte Peptidsynthese (genau ein Carboxyfluorescein pro Peptidantigen) voraussetzt.

Auf der Grundlage der erhaltenen Werte für das F/P-Verhältnis wurde im Mittel eine Kopplungseffizienz von ein bis zwei Peptiden pro Antikörper erzielt. Um die biologische Aktivität unterschiedlicher Antikörper-Peptidantigen-Konjugate miteinander vergleichen zu können, wurde für die entsprechenden Experimente das F/P-Verhältnis mit nicht konjugiertem Antikörper auf ein Peptid pro Antikörper eingestellt. Mit diesem Verfahren lassen sich Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung, d.h. wieviele Antikörper mit einem, zwei oder mehr Peptidantigenen gekoppelt sind bzw. kein Peptidantigen tragen, jedoch nicht ausgleichen. Die Konzentrationsbestimmung der Konjugate erfolgte im ELISA unter Verwendung des unkonjugierten Isotyp-IgG-Antikörpers als Referenz.

Zur Überprüfung der Konjugate auf Unversehrtheit des Antikörpers nach erfolgter Konjugation wurde eine analytische Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Blaufärbung vorgenommen. In Abbildung 14 ist das Ergebnis einer Auftrennung von Konjugatproben exemplarisch für die Antikörper-TT-Peptid-Konjugate dargestellt. Die Größe der Proteine läßt sich anhand des mitgeführten Molekulargewichtsmarkers erkennen. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes des TT-Peptides lassen sich die Antikörper-TT-Peptidkonjugate von den unkonjugierten Antikörpern nicht unterscheiden. Um zu bestätigen, dass tatsächlich stabile Antikörper-TT-Peptidkonjugate entstanden sind, wurde das Gel vor der Anfärbung mit Coomassie-Blau unter dem Fluoreszenzmikroskop auf fluoreszierende Banden untersucht.

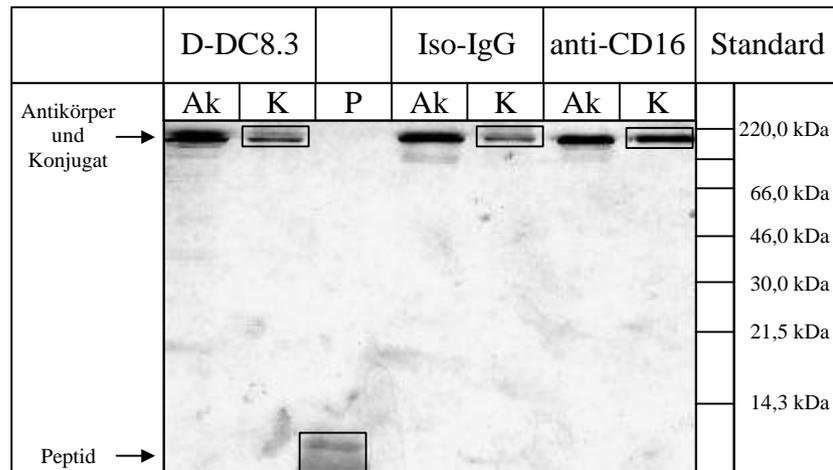


Abb. 14: Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Antikörper-TT-Peptid-Konjugatproben.

Die Auftrennung von je 1,5 µg unkonjugiertem Antikörper und TT-Peptid sowie je 15 µl (zwischen 0,5 und 1 µg) Konjugat, erfolgte in einem Polyacrylamidgel (12%) mit Detektion der Proteine über Coomassie - Blaufärbung. Ak: Antikörper; P: TT-Peptid; K: Antikörper-TT-Peptid-Konjugat; eingerahmte Banden: fluoreszierende Banden (Detektion von Fluorescein im Fluoreszenzmikroskop vor der Coomassieblaufärbung)

Die Funktionalität der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate wurde durch Analyse ihrer Bindungsaktivität an mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut nachgewiesen. Dazu wurden isolierte PBMCs mit je 5 µg/ml Konjugat inkubiert und gebundenes Antikörper-Peptidantigen-Konjugat durch einen anti-Maus-IgG-PE-konjugierten Sekundärantikörper im Durchflußzytometer nachgewiesen. Der Vorteil gegenüber einem jeweils parallel durchgeführten Nachweis der Konjugate mit Hilfe der Carboxyfluoresceingruppe bestand in der direkten Vergleichsmöglichkeit der Bindungseffizienzen von Konjugat und unkonjugiertem Antikörper. Zusätzlich liess sich auf diese Weise eine höhere Sensitivität im Vergleich zum direkten Nachweis der Konjugate erreichen. Das Ergebnis einer für alle hergestellten Antikörper-Peptidantigen-Konjugate repräsentativen Analyse ist in Abbildung 15 exemplarisch für die Antikörper-TT-Peptid-Konjugate dargestellt. Die Analyse zeigt, dass nicht nur das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat und das D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat noch in der Lage waren, ihre jeweiligen Zellpopulationen mit einer vergleichbaren Effizienz wie die unkonjugierten Antikörper zu erkennen, sondern auch, dass das Fluorescein-gekoppelte TT-Peptid durch den jeweiligen Antikörper auf der Zelloberfläche angereichert wurde. Dies zeigt, dass zumindest eine der notwendigen Voraussetzungen für einen Vakzinierungserfolg unter Verwendung von Antikörper-Antigen-Konjugaten, nämlich der Transport des Antigens zur dendritischen Zelle, von den Antikörper-TT-Peptid-Konjugaten erfüllt wird.

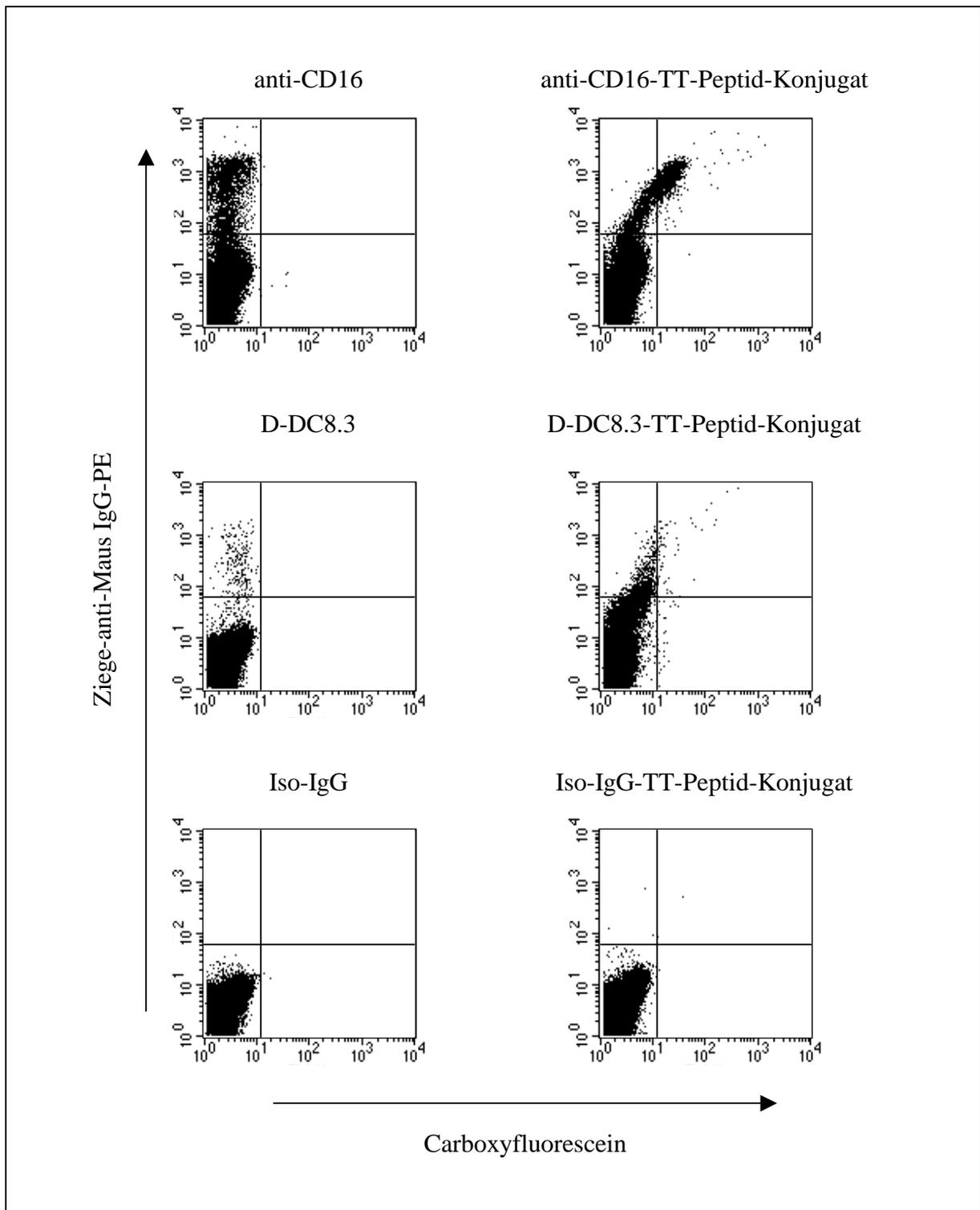


Abb. 15: Nachweis der Bindungsaktivität verschiedener Antikörper-TT-Peptidkonjugate auf PBMCs.

Je 200.000 Zellen wurden mit $5\mu\text{g/ml}$ Antikörper oder Konjugat inkubiert und die Bindung durch Inkubation mit einem Ziege-Anti-Maus-PE-konjugierten Sekundäntikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen zur Abgrenzung toter Zellen mit $10\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI), einem Farbstoff, der in die DNA von toten Zellen interkaliert, gefärbt. Dargestellt ist die Antikörper- bzw. Konjugatbindung auf lebenden Zellen. Iso-IgG = Kontrollantikörper irrelevanter Spezifität.

3.2.2 Spezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch M-DC8⁺-Zellen

Bei der Untersuchung der Effizienz von anti-CD16- und D-DC8.3-Peptidantigen-Konjugaten hinsichtlich der Induktion einer T-Zellantwort durch M-DC8⁺-Zellen wurde die Expression von CD25 als Marker für die Aktivierung von T-Zellen verwendet. Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2 Rezeptors, deren Expression infolge einer T-Zellaktivierung ansteigt, wodurch der hochaffine IL-2-Rezeptor an der Oberfläche der T-Zellen erscheint (Biselli et al., 1992). Damit es zu einer spezifischen T-Zellaktivierung durch die M-DC8⁺-Zellen kommen kann, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein (schematisch in Abbildung 16 dargestellt). Die erste Voraussetzung ist die Bindung der Konjugate an die M-DC8⁺-Zellen. Neben der spezifischen Bindung des anti-CD16-Peptidantigen-Konjugats an CD16 und des D-DC8.3-Peptidantigen-Konjugats an das D-DC8.3-Antigen, existiert auch die Möglichkeit einer unspezifischen Aufnahme z.B. durch Phagozytose oder über Fc-Rezeptoren nach Bindung des Fc-Teils der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate oder Phagozytose. Weitere Voraussetzungen sind die Internalisierung des Antikörper-Peptidantigen-Konjugats, die anschließende Prozessierung im MHC-Klasse II-Kompartiment und das Beladen von MHC-Klasse II-Molekülen mit dem Peptidantigen. Nur für das nicht gekoppelte Peptidantigen besteht die Möglichkeit auch ohne vorherige Prozessierung an MHC-Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche von M-DC8⁺-Zellen zu binden. Der auf diese Weise generierte MHC-Klasse II-Peptid-Komplex kann nun von dem spezifischen T-Zellklon erkannt werden, wodurch es zu einer Aktivierung der T-Zellen mit einer verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern (CD25, CD69), zur Cytokinausschüttung (z.B. IL-2) sowie später zu einer Proliferation der T-Zellen kommt.

Da neben aktivierten T-Zellen auch aktivierte Monozyten, Makrophagen und B-Zellen CD25 exprimieren, war es notwendig bei der durchflußzytometrischen Analyse der T-Zellaktivierung die T-Zellen von anderen Zellen und insbesondere den M-DC8⁺-Zellen zu unterscheiden. Dazu wurde das Gemisch aus T-Zellen und M-DC8⁺-Zellen nach einer ca. 14-stündigen Inkubation mit den Konjugaten mit einem PE-konjugierten anti-CD25-Antikörper, mit einem APC-konjugiertem anti-CD3-Antikörper (Anfärbung der T-Zellen) und einem FITC-konjugiertem anti-CD11c-Antikörper (Anfärbung der M-DC8⁺-Zellen) gefärbt. Die Abtrennung von toten Zellen erfolgte durch elektronische Auswahl der lebenden Zellen nach Größe und Granularität in der FSC-/SSC-Darstellung sowie durch zusätzliche Propidiumiodidfärbung. Von den lebenden Zellen wurden nur die CD3⁺/CD11c⁻ Zellen für die Darstellung der CD25-Expression ausgewählt und der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen nach Konjugatzugabe gegenüber der Negativkontrolle PBS angegeben. Abbildung 17

zeigt exemplarisch eine FACS-Analyse auf CD25-Expression bei aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen im Vergleich.

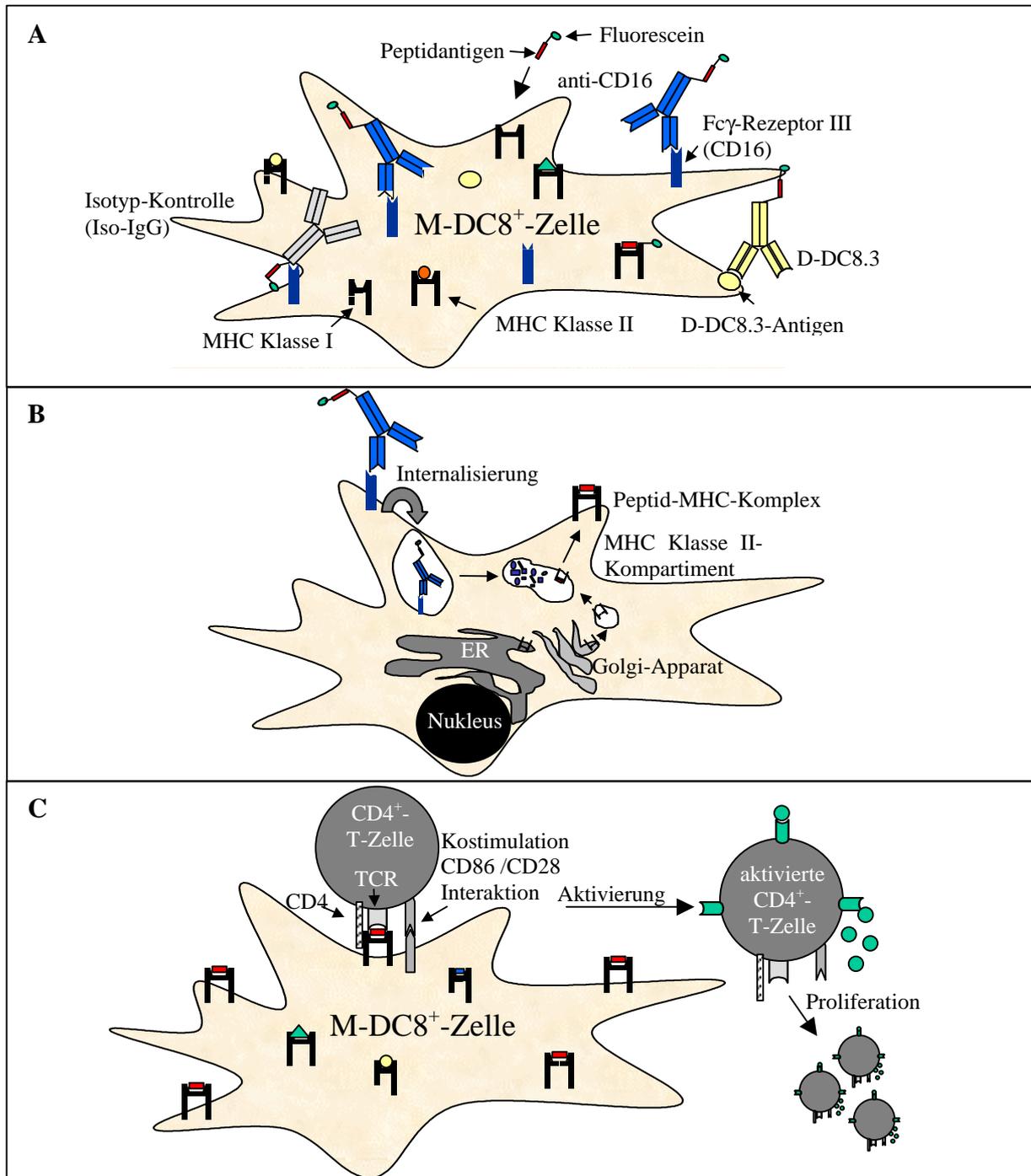


Abb. 16: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Konjugate

Die Antikörper-Peptidantigen-Konjugate können je nach Spezifität des Antikörpers an ihr Antigen, sowie zusätzlich über den Fc-Teil des Antikörpers an Fc-Rezeptoren auf M-DC8⁺-Zellen binden. Nur das ungekoppelte Peptidantigen kann ohne vorherige Prozessierung in die Antigenbindungsstelle des MHC-Moleküls gelangen. (A). Nach Internalisierung des Konjugates kommt es zur Prozessierung mit anschließender Beladung von MHC-Klasse II-Molekülen mit dem Peptidantigen (B). Der Peptidantigen-MHC-Komplex wird von CD4⁺-T-Zellen mit dem passenden T-Zellrezeptor (TCR) erkannt, wodurch die T-Zelle aktiviert wird und zu proliferieren beginnt (C). Im Fall einer naiven T-Zelle ist neben der MHC-TCR-Interaktion ein zweites kostimulatorisches Signal für die Aktivierung erforderlich.

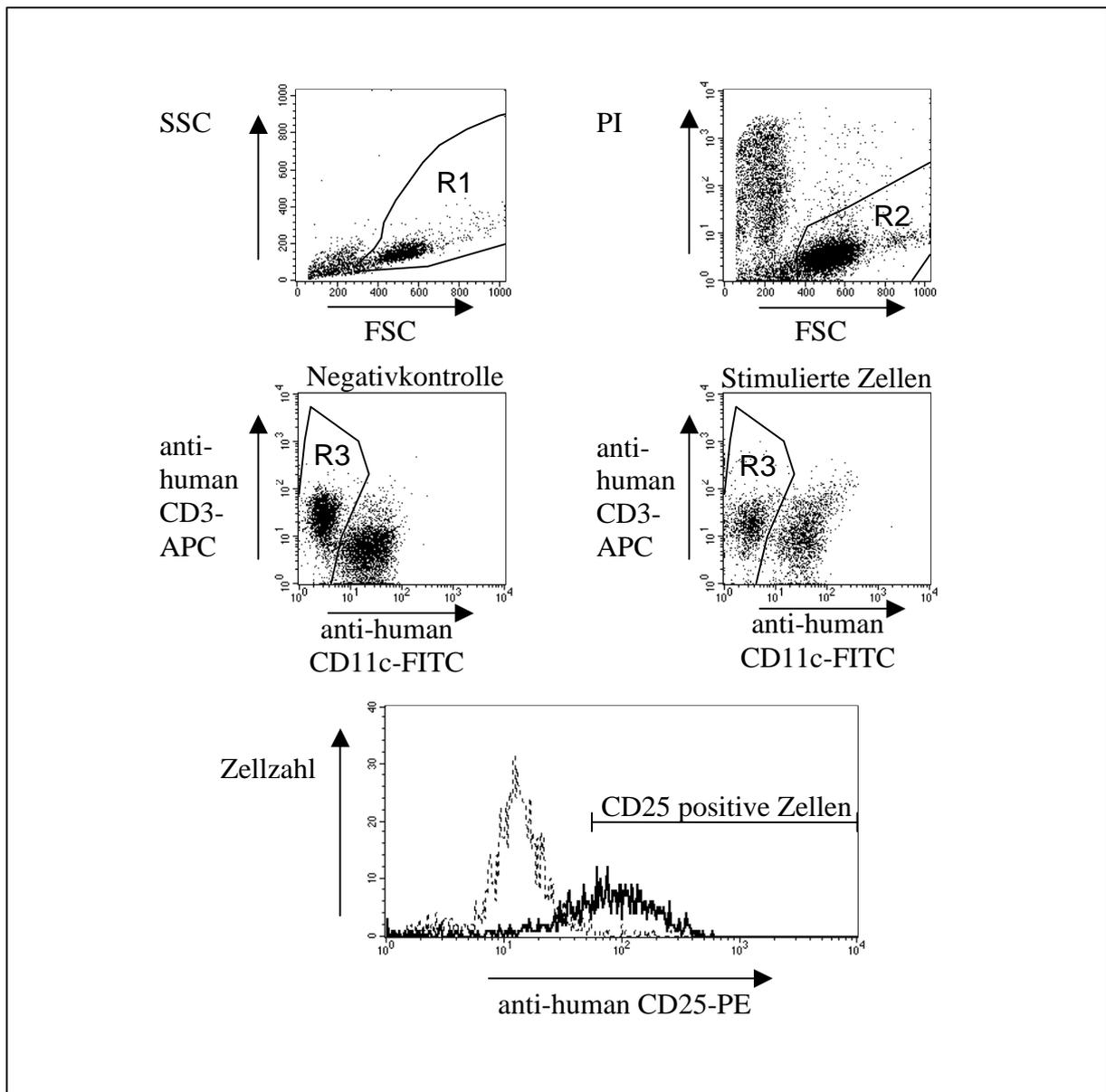


Abb. 17: Durchflußzytometrische Analyse der CD25-Expression von aktivierten T-Zellen

Nach einer ca. 14-stündigen Inkubationszeit mit den Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten werden die Zellen mit Antikörpern gegen CD11c (FITC), CD3 (APC) und CD25 (PE) sowie mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Bei der Analyse im FACS werden alle lebenden Zellen über eine kombinierte elektronische Auswahl in der FSC/SSC-Darstellung (R1) und der FSC/PI-Darstellung (R2) markiert und ihre Expression von CD3 und CD11c zur Unterscheidung von T-Zellen (R3) und M-DC8+-Zellen dargestellt. Das Histogramm zeigt die CD25-Expression aller lebenden T-Zellen (R1+R2+R3) von stimulierten T-Zellen (durchgezogene Linie) und unstimulierten T-Zellen (gestrichelte Linie) im Vergleich.

3.2.2.1 Effizienz unterschiedlicher Antikörper-Peptidantigen-Konjugate

Unterschiede in der Effizienz von anti-CD16, D-DC8.3 oder des Isotypkontrollantikörpers Iso-IgG eine gezielte Antigenaufnahme durch M-DC8⁺-Zellen zu erreichen, lassen sich am besten beobachten, wenn man die Konzentration ermittelt, die benötigt wird, um eine bestimmte T-Zellantwort zu induzieren. Dazu wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen und 10.000 antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Konjugat

für 14 h inkubiert und anschließend der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen ermittelt. Abbildung 18 zeigt die Titration von anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat, D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat und Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat. Das Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt drei Experimente unter Verwendung sowohl von Antikörper-TT-Peptid-Konjugaten, als auch Antikörper-NS3-Peptid-Konjugaten. Dabei ist zu beobachten, dass die zur halbmaximalen Aktivierung der T-Zellen benötigte Konzentration des anti-CD16-TT-Peptid-Konjugates nur 3 ng/ml beträgt, während sie bei dem D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat 300 ng/ml und bei dem Iso-IgG-TT-Konjugat 1 µg/ml beträgt.

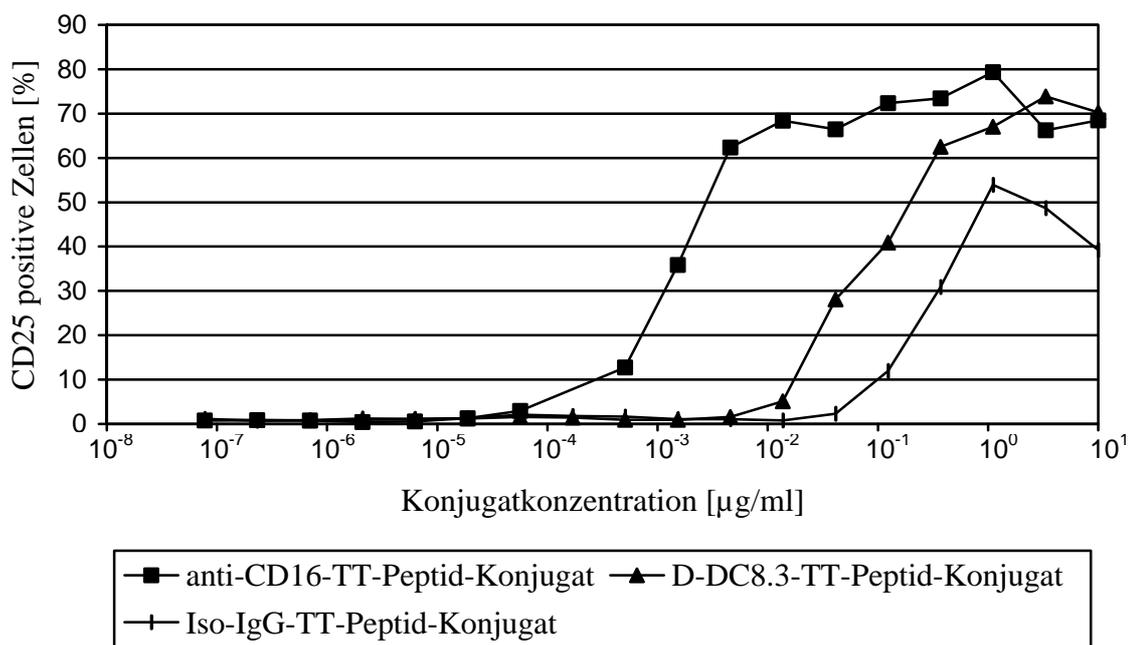


Abb. 18: Titration der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Konjugate mit jeweils einem Peptidantigen pro Antikörper (F/P = 1). Es wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen und 10.000 CD4⁺ T-Zellen für 14h mit Antikörper-TT-Peptid-Konjugat inkubiert und anschließend eine FACS-Analyse auf CD25-Expression vorgenommen. Das Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt drei Experimente basierend auf Antikörper-TT-Peptid-Konjugaten und Antikörper-NS3-Peptid-Konjugaten.

3.2.2.2 Die Bedeutung einer stabilen Antikörper-Peptidantigen-Konjugation

Bei der Herstellung der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate wurde das Antigen über eine kovalente Bindung an den Antikörper gekoppelt. Inwieweit eine solche kovalente Bindung zwischen Antikörper und Antigen für eine gerichtete Aufnahme des Antigens durch die M-DC8⁺-Zellen erforderlich ist, wurde im folgenden untersucht. Dazu wurde die T-Zellstimulation nach Konjugatzugabe im Vergleich zu einer Mischung aus ungekoppeltem Antikörper und Peptidantigen analysiert, die die beiden Komponenten in der dem Konjugat äquivalenten molaren Menge enthielt. Da die Messung der Konjugatkonzentration auf einem ELISA-Verfahren mit einem Referenzimmunoglobulin beruht, wurden bei diesem Experiment

gleiche Mengen an unkonjugiertem Antikörper und Konjugat eingesetzt; die Menge an Peptidantigen ist entsprechend seiner geringeren molaren Masse um ein Vielfaches geringer. So entsprechen 10 µg/ml anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat einer Mischung aus 10 µg/ml anti-CD16 (MW:150.000 Da) und 0,161 µg/ml TT-Peptid (MW: 2415,52 Da). Die Analyse der T-Zellstimulation erfolgte wie beim Vergleich der unterschiedlichen Antikörper-TT-Peptid-Konjugate durch Messung des Prozentsatzes CD25-positiver T-Zellen an der Gesamtheit der lebenden T-Zellen nach 14-stündiger Inkubation. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von dem verwendeten Antikörper die Mischung aus TT-Peptid und unkonjugiertem Antikörper nur eine dem TT-Peptid vergleichbare T-Zellaktivierung induzierte, die deutlich unter der des entsprechenden Konjugats lag (Abbildung 19 und Abbildung 20).

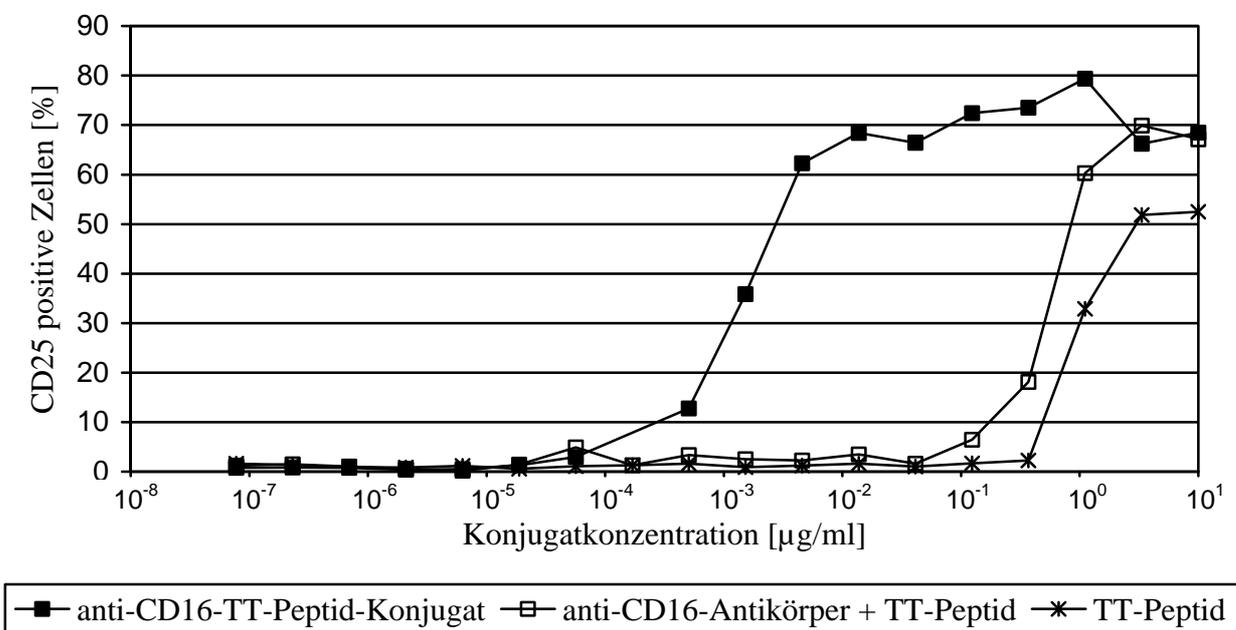


Abb. 19: Bedeutung der stabilen Bindung zwischen TT-Peptid und anti-CD16-Antikörper

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration nach 14h Inkubation von 10.000 CD4⁺ T-Zellen mit 25.000 M-DC8⁺-Zellen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat mit F/P = 1 sowie auf eine Mischung aus anti-CD16 (Antikörperkonzentration identisch zur Konjugatkonzentration) und äquimolaren Mengen an TT-Peptid (0,161 µg/ml TT-Peptid bei 10 µg/ml anti-CD16-Antikörper oder anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat). Das TT-Peptid allein wurde ebenfalls in äquimolaren Mengen eingesetzt.

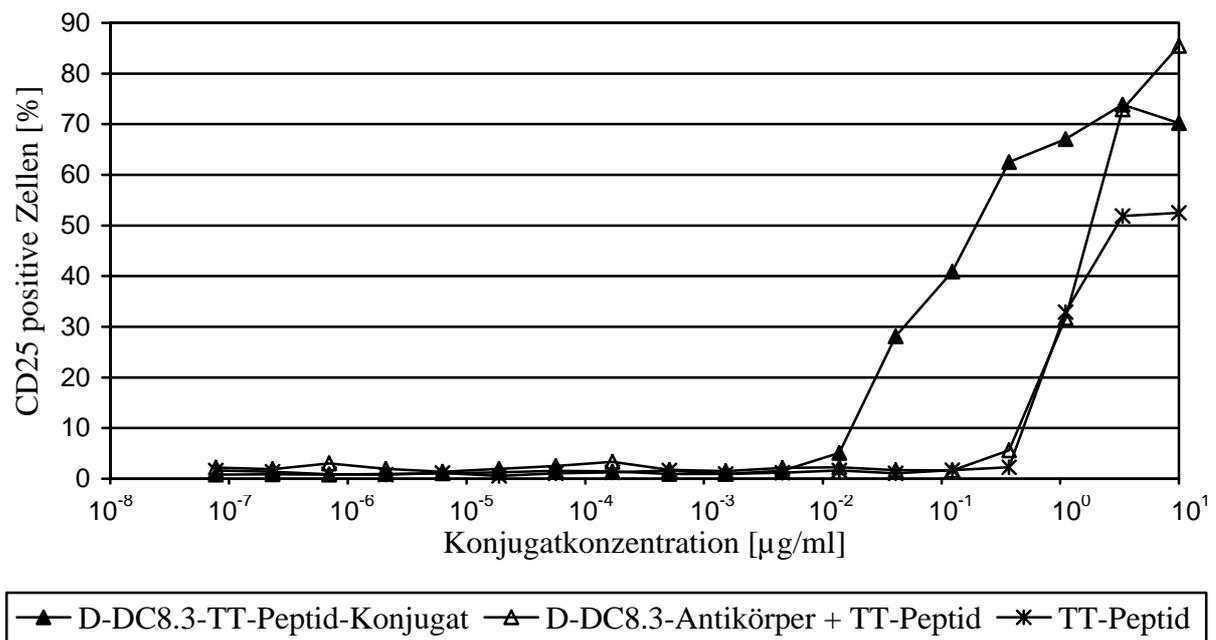


Abb. 20: Bedeutung der stabilen Bindung zwischen TT-Peptid und D-DC8.3-Antikörper

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration nach 14h Inkubation von 10.000 CD4⁺ T-Zellen mit 25.000 M-DC8⁺-Zellen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen analog zu den anti-CD16-TT-Peptid-Daten auf das D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat mit F/P = 1 sowie auf eine Mischung aus anti-CD16 (Antikörperkonzentration = Konjugatkonzentration) und äquimolaren Mengen an TT-Peptid. Das TT-Peptid allein wurde ebenfalls in äquimolaren Mengen eingesetzt.

3.2.2.3 Effekt von Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten auf T-Zellen in Abwesenheit von M-DC8⁺-Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob der Effekt der Antikörper-TT-Peptid- und Antikörper-NS3-Peptid-Konjugate auf die T-Zellstimulation auf eine Aufnahme der Konjugate durch die M-DC8⁺-Zellen zurückzuführen ist, wurde die jeweils höchste eingesetzte Konzentration an Konjugat auch auf T-Zellen in Abwesenheit von M-DC8⁺-Zellen getestet. Dabei bestätigte sich, dass die M-DC8⁺-Zellen für eine effiziente Stimulation der T-Zellen benötigt werden, da keine T-Zellstimulation nach Gabe der Konjugate zu den T-Zellen allein beobachtet werden konnte (Abbildung 21). Nur das freie TT-Peptid ist in der Lage, eine T-Zellstimulation auch in Abwesenheit der M-DC8⁺-Zellen zu bewirken. Das in Abbildung 21 dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei Experimente unter Verwendung der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate. Bei Verwendung der Antikörper-NS3-TT-Peptidkonjugate konnte ebenfalls keine T-Zellaktivierung beobachtet werden. Im Gegensatz zum unkonjugierten TT-Peptid induzierte das unkonjugierte NS3-Peptid jedoch keine T-Zellaktivierung (Daten nicht gezeigt).

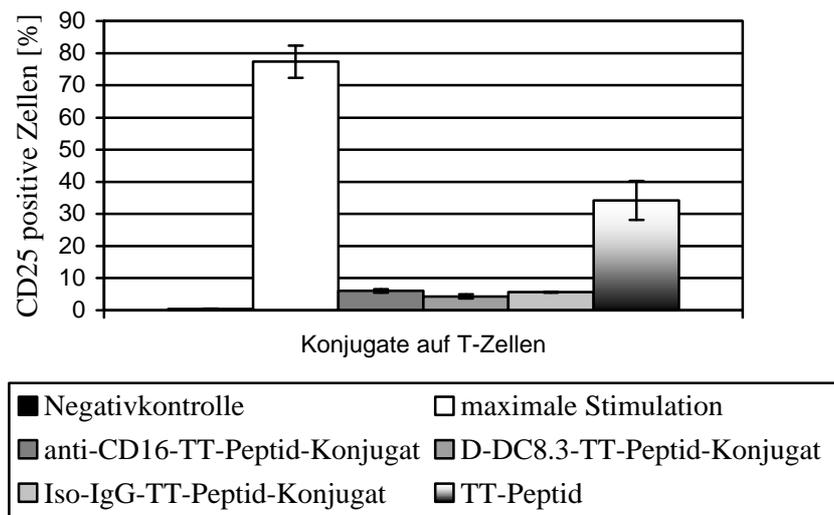


Abb. 21: Effekt der Konjugatzugabe in Abwesenheit von M-DC8⁺-Zellen

Darstellung des durchflußzytometrisch bestimmten Prozentsatzes CD25-positiver T-Zellen nach einer 14-stündigen Inkubation von 20.000 CD4⁺ T-Zellen mit je 10 µg/ml des jeweiligen Antikörper-TT-Peptid-Konjugats, beziehungsweise der Äquivalentkonzentration von 0,161 µg/ml des TT-Peptids. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet, für die maximale Stimulation wurden 5 µg/ml TT-Peptid eingesetzt. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei Experimente.

3.2.2.4 Stimulation von T-Zellen durch M-DC8⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Antikörper-Tetanustoxoid-Peptid-Konjugat

Neben der eingesetzten Konzentration spielt die Zeitdauer eine Rolle, die benötigt wird, um eine Aufnahme des Antigens bei einer gegebenen Konjugatkonzentration durch die M-DC8⁺-Zellen zu erreichen. Um die benötigte Inkubationszeit mit Konjugat für eine effiziente T-Zellstimulation zu untersuchen, wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen mit 0,5 µg/ml der verschiedenen Antikörper-TT-Konjugate sowie der molaren Äquivalentkonzentration des TT-Peptids für 0, 10, 20, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der M-DC8⁺-Zellen zur Entfernung des nicht an Zellen gebundenen Konjugates wurden je 10.000 spezifische CD4⁺ T-Zellen hinzugegeben und nach weiteren 14 h die CD25-Expression der T-Zellen im Durchflußzytometer analysiert. Dabei zeigte sich, dass die anti-CD16- und D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugate einen ähnlichen Zeitverlauf aufweisen, während die durch das Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat induzierte T-Zellaktivierung deutlich geringer ausfällt (Abbildung 22). Diese Beobachtung ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei dem angewendeten Versuchsprotokoll, die benötigte Zeit für die Bindung der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate an die M-DC8⁺-Zelle entscheidend ist, während die Fähigkeit zur Internalisierung des Konjugates, bei der sich anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat und D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat unterscheiden, nur eine untergeordnete Rolle spielt, da bereits internalisierte Fcγ-Rezeptoren innerhalb von 60 min noch nicht wieder für die Bindung weiterer anti-CD16-Moleküle zur Verfügung stehen. Da der Isotypkontrollantikörper Iso-IgG

im Gegensatz zu anti-CD16 und D-DC8.3 kein Epitop auf den M-DC8⁺-Zellen spezifisch erkennt, war die schwache T-Zellaktivierung durch das Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat zu erwarten. Dies gilt ebenso für das nicht gekoppelte TT-Peptid.

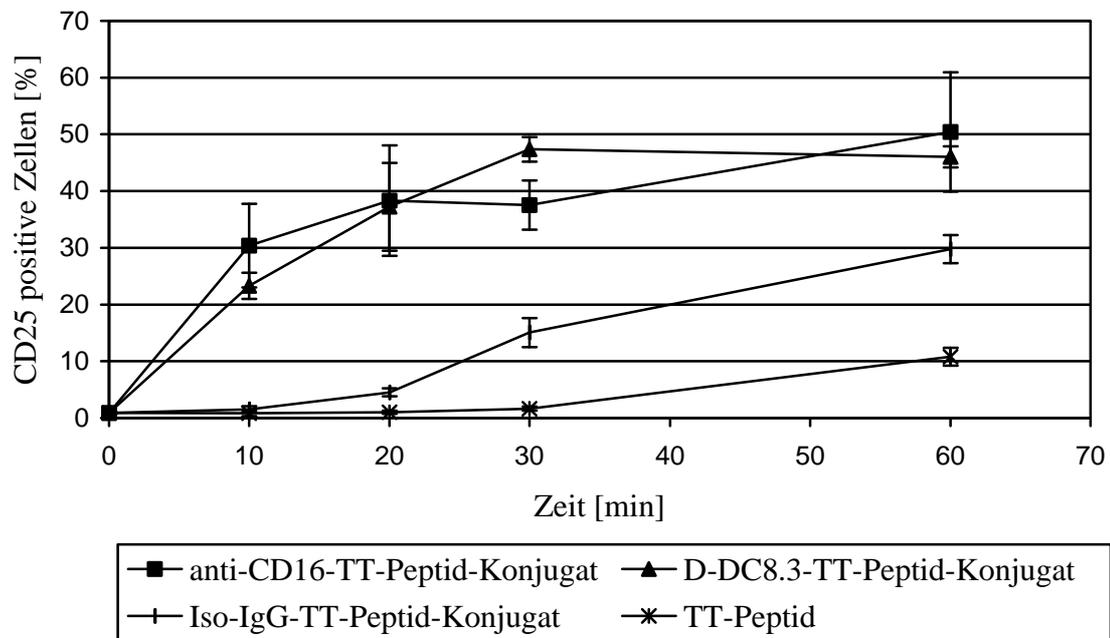


Abb. 22: T-Zellaktivierung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Antikörper-TT-Peptid-Konjugaten

Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden für 0, 10, 20, 30 oder 60 min mit je 0,5 µg/ml des jeweiligen Antikörper-TT-Peptid-Konjugats oder 0,008 µg/ml TT-Peptid (gleiche Molarität wie die Antikörper-TT-Peptid-Konjugate) inkubiert. Nach zwei Waschschrritten erfolgte die Zugabe von 10.000 TT-Peptid-spezifischen T-Zellen, deren CD25-Expression nach 14-stündiger Inkubation im FACS analysiert wurde. Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der M-DC8⁺-Zellen mit Konjugat oder TT-Peptid.

Weiterhin war zu beobachten, dass der größte Anteil der T-Zellstimulation bei Verwendung von anti-CD16- und D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat auf die Bindung von anti-CD16 und D-DC8.3 in den ersten 20 min zurückzuführen ist, da bei der Verlängerung der Inkubationsdauer auf 60 min die erreichte T-Zellaktivierung nur noch geringfügig ansteigt. Bei Verwendung des Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugates steigt die erreichbare T-Zellaktivierung dagegen gleichmäßig mit der Inkubationsdauer an.

3.2.2.5 Untersuchungen zum Mechanismus der Internalisierung

Für die Aufnahme von exogenen Antigenen durch dendritische Zellen kommen prinzipiell mehrere Möglichkeiten in Frage. So können dendritische Zellen entweder über rezeptorvermittelte Endozytose unter Verwendung von Fc-Rezeptoren, Scavenger Rezeptoren oder Rezeptoren aus der C-Typ Lectin Familie (z.B. Mannose-Rezeptor) exogenes Antigen

aufnehmen, andere Möglichkeiten sind Makropinozytose oder Phagozytose (Guermontprez et al., 2002). Da die Aufnahme von Antigen durch Macropinozytose bei 0°C gegenüber 37°C fast vollständig blockiert ist (Sallusto et al., 1995), während eine spezifische Bindung von Liganden an Rezeptoren bzw. die Bindung von Antikörpern an ihr Antigen auch bei 0°C noch möglich ist, sollte es möglich sein, durch einen Vergleich der Antigenaufnahme bei verschiedenen Temperaturen den Anteil der rezeptor-vermittelten Antigenaufnahme zu ermitteln. Um den Aufnahmeweg der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate und des TT-Peptides genauer zu charakterisieren, wurden daher jeweils 25.000 M-DC8⁺-Zellen mit 0,5 µg/ml des jeweiligen Konjugats oder einer äquimolaren Menge des TT-Peptids für eine Stunde entweder bei 37°C oder auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen, folgte eine 14-stündige Inkubation bei 37°C in Anwesenheit von je 10.000 Tetanustoxoid-spezifischen T-Zellen. Die Analyse der T-Zellaktivierung erfolgte analog zu den vorherigen Experimenten durch eine Bestimmung des prozentualen Anteils der CD25-positiven T-Zellen. Eine genauere Unterscheidung, welche Rolle Fc-Rezeptoren bei einer rezeptor-vermittelten Endozytose spielen, lässt sich vornehmen, indem man die Fc-Rezeptoren blockiert. Dazu wurden die M-DC8⁺-Zellen für 20 min mit 20% humanem Serum oder 2,7 mg/ml IgG (20% der Serum-IgG-Konzentration) (Janeway; 1999) auf Eis präinkubiert, bevor die Zugabe der Konjugate bzw. des TT-Peptids erfolgte.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Aufnahme der anti-CD16- und D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugate im wesentlichen rezeptor-vermittelt verläuft, während das Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat und das TT-Peptid nicht rezeptor-vermittelt, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit über Makropinozytose aufgenommen werden. Die Bedeutung der Fc-Rezeptoren für die rezeptor-vermittelte Aufnahme des anti-CD16- und des D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugates konnte nicht eindeutig geklärt werden, da der für die Konjugation verwendete CD16-spezifische monoklonale Antikörper 3G8 laut Literatur die IgG-Bindungsstelle des Fc γ -Rezeptors als Epitop erkennen sollte (Tamm und Schmidt, 1996; Edberg und Kimberley, 1997), sich aber die induzierte T-Zellaktivierung durch das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat mit oder ohne Blockierung der Fc-Rezeptoren nicht signifikant unterscheidet. Für das D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat ließ sich ebenfalls nur eine marginale im Schwankungsbereich liegende Reduzierung der T-Zellaktivierung nach Blockierung der Fc-Rezeptoren beobachten. Eine nicht ausreichende Blockierung der Fc-Rezeptoren kann daher trotz Verwendung zweier unterschiedlicher Blockade-Methoden nicht ausgeschlossen werden.

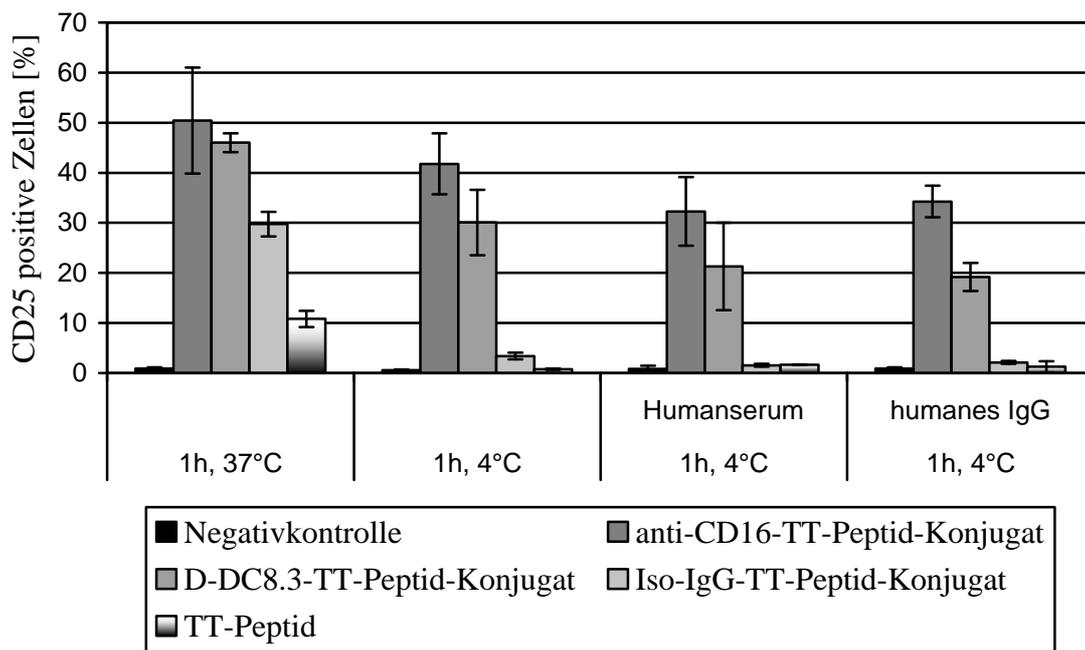


Abb. 23: Charakterisierung der Aufnahmewege für verschiedene Antikörper-TT-Peptid-Konjugate und das TT-Peptid

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsbedingungen. Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden mit je 0,5 µg/ml Konjugat bzw. 0,008 µg/ml TT-Peptid für 1 h bei 37°C oder auf Eis inkubiert. Zur Blockierung der Fc-Rezeptoren wurde vor der Konjugatzugabe eine 20-minütige Vorinkubation mit 20% humanem Serum oder 2,7mg/ml IgG durchgeführt. Nach zwei Waschstufen erfolgte die Zugabe von 10.000 TT-Peptid-spezifischen T-Zellen, deren CD25-Expression nach 14-stündiger Inkubation bestimmt wurde.

3.2.3 Spezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch immature dendritische Zellen

Bei immaturren dendritischen Zellen handelt es sich um einen Zelltyp antigenpräsentierender Zellen, der auf die Antigenaufnahme und Antigenprozessierung spezialisiert ist. In-vitro lassen sich immature DCs aus Monozyten durch Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 generieren. Auch M-DC8⁺-Zellen differenzieren unter diesen Kultivierungsbedingungen zu immaturren dendritischen Zellen. Inwieweit eine Verwendung von immaturren dendritischen M-DC8⁺-Zellen eine Verbesserung der Antigenaufnahme mittels Antikörper-TT-Peptid-Konjugaten gegenüber den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen ermöglicht, wurde im folgenden untersucht.

3.2.3.1 Aktivierungseffizienz unterschiedlicher Antikörper-Tetanustoxoid-Peptid-Konjugate

Analog zu den Experimenten mit den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen wurde zuerst die für eine T-Zellaktivierung benötigte Konjugatkonzentration ermittelt. Dazu wurden M-DC8⁺-Zellen aus dem Blut geeigneter Spender für vier Tage in RPMI/ 10% FCS supplementiert mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 kultiviert. Jeweils 25.000 dieser M-DC8⁺-DCs und 10.000 TT-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Konjugat für 14 h inkubiert und anschließend der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Abbildung 24 zeigt die T-Zellaktivierung bei Verwendung des anti-CD16-, D-DC8.3- oder Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugats in Abhängigkeit von der jeweiligen Konjugatkonzentration. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei Experimente.

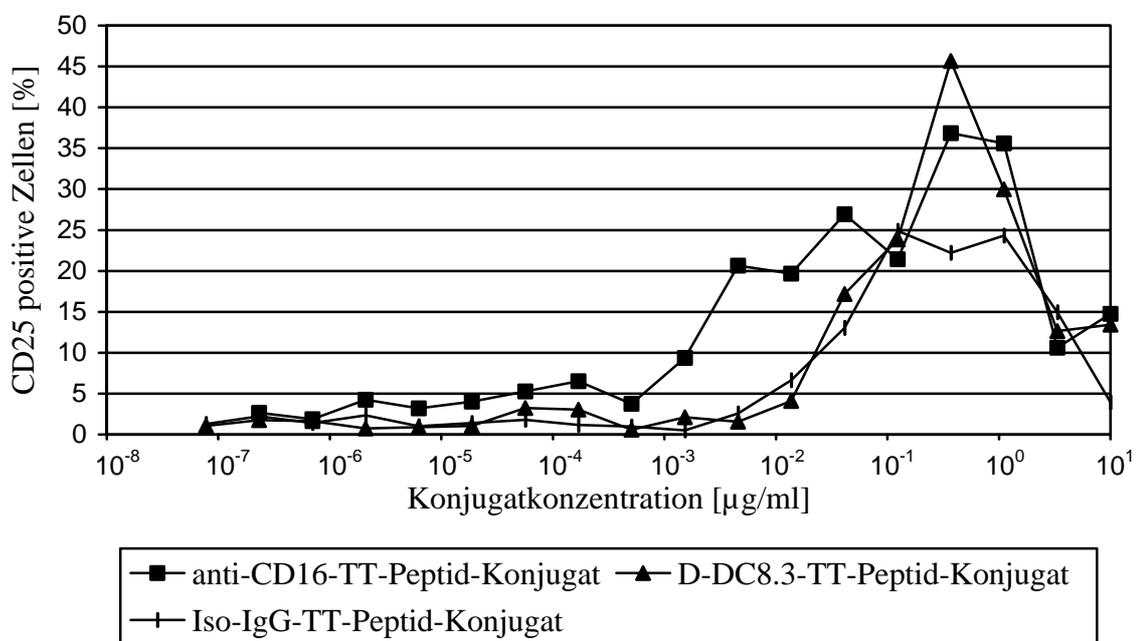


Abb. 24: Titration der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Konjugate mit F/P = 1. Dazu wurden jeweils 25.000 M-DC8⁺-DCs und 10.000 CD4⁺ T-Zellen für 14h mit Antikörper-TT-Peptid-Konjugat inkubiert und anschließend eine durchflußzytometrische Messung der CD25-Expression bei T-Zellen durchgeführt. Die Generierung der immaturren M-DC8⁺-DCs erfolgte durch Kultivierung von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen in RPMI/10%FCS mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4.

Dabei zeigte sich, dass die maximal erreichbare T-Zellstimulation bei Verwendung der M-DC8⁺-DCs deutlich geringer ausfällt als mit den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen. So werden noch nicht einmal 50 % der T-Zellen aktiviert. Auch der Konzentrationsbereich, in dem eine T-Zellaktivierung nach Konjugatgabe erfolgen kann, ist eingeschränkt. So werden unabhängig vom verwendeten Antikörper nur maximal 15 % der T-Zellen aktiviert, wenn 5 oder 10 µg/ml Konjugat eingesetzt werden. Die T-Zellaktivierung erreicht ein Maximum bei ca. 0,5 µg/ml für das D-DC8.3- und das Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat. Bei Verwendung des anti-

CD16-TT-Peptid-Konjugates ist die maximal erreichbare T-Zellstimulation etwas schwerer zu bestimmen und liegt bei beiden durchgeführten Experimenten bei einer Konzentration von ca. 50 ng/ml. Bezieht man sich auf die in dem jeweiligen Experiment zur halbmaximalen T-Zellaktivierung benötigte Konzentration (ca. 20% aktivierte T-Zellen), so liegt diese für das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat leicht erhöht bei ca. 8 ng/ml (gegenüber 3 ng/ml bei den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen), während sie sich für das D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat und das Iso-IgG-TT-Peptid-Konjugat mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml gegenüber der Verwendung von frisch isolierten Zellen um einen Faktor von 3 bis 10 verbessert.

3.2.3.2 Die Bedeutung der kovalenten Bindung zwischen Antikörper und Tetanustoxoid-Peptid

Auch bei Verwendung der immaturren M-DC8⁺-DCs wurde der Einfluß der kovalenten Bindung zwischen Antikörper und TT-Peptid analysiert. Dazu wurden die M-DC8⁺-DCs entweder mit Antikörper-TT-Peptid-Konjugat oder einer Mischung aus Antikörper und TT-Peptid inkubiert, die die beiden Komponenten in der dem Konjugat äquivalenten molaren Menge enthielt. Als Kontrolle diente die entsprechenden Menge des unkonjugierten TT-Peptids. Die Menge an Peptidantigen ist aufgrund seiner geringeren molaren Masse um ein Vielfaches geringer. So entsprechen 10 µg/ml anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat einer Mischung aus 10 µg/ml anti-CD16-Antikörper (MW:150.000 Da) und 0,161 µg/ml TT-Peptid (MW: 2415,52 Da). Die Analyse der T-Zellaktivierung erfolgte wie beim Vergleich der unterschiedlichen Antikörper-TT-Peptid-Konjugate durch Bestimmung des Anteils CD25-positiver T-Zellen nach 14-stündiger Inkubation. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von dem verwendeten Antikörper die Mischung aus TT-Peptid und Antikörper eine geringere T-Zellaktivierung als das TT-Peptid induzierte (Abbildung 25 und Abbildung 26).

Vergleicht man das entsprechende Antikörper-TT-Peptid-Konjugat mit der Mischung aus Antikörper und TT-Peptid, so bewirkt das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat eine stärkere T-Zellaktivierung als die Mischung (Abbildung 25), während im Falle des D-DC8.3-Antikörpers der umgekehrte Effekt beobachtet wurde (Abbildung 26). Die Mischung aus Iso-IgG und TT-Peptid zeigte vergleichbar mit dem D-DC8.3 eine gegenüber dem Konjugat gesteigerte T-Zellaktivierung (Daten nicht gezeigt).

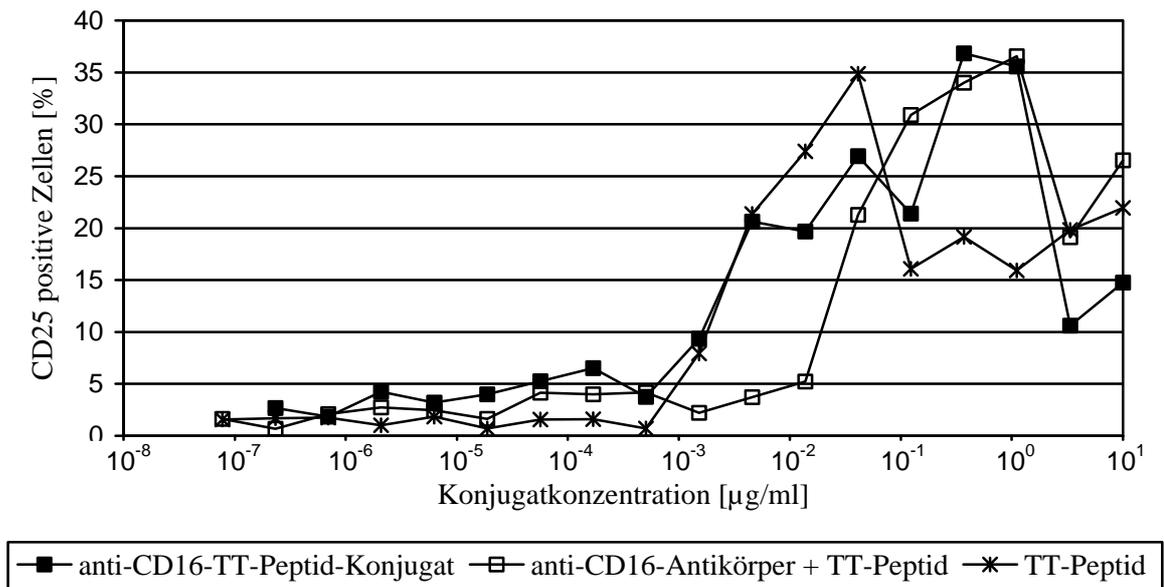


Abb. 25: Die Bedeutung der stabilen Bindung zwischen TT-Peptid und anti-CD16-Antikörper

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration nach 14h Inkubation von 10.000 CD4⁺ T-Zellen mit 25.000 M-DC8⁺-DCs. Die Generierung der immaturren M-DC8⁺-DCs erfolgte durch Kultivierung von frisch isolierten M-DC8⁺- Zellen in RPMI/10% FCS mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat mit F/P = 1 sowie auf eine Mischung aus anti-CD16-Antikörper und TT-Peptid in äquivalenter Konzentration. Das TT-Peptid allein wurde ebenfalls in gleicher molarer Menge eingesetzt.

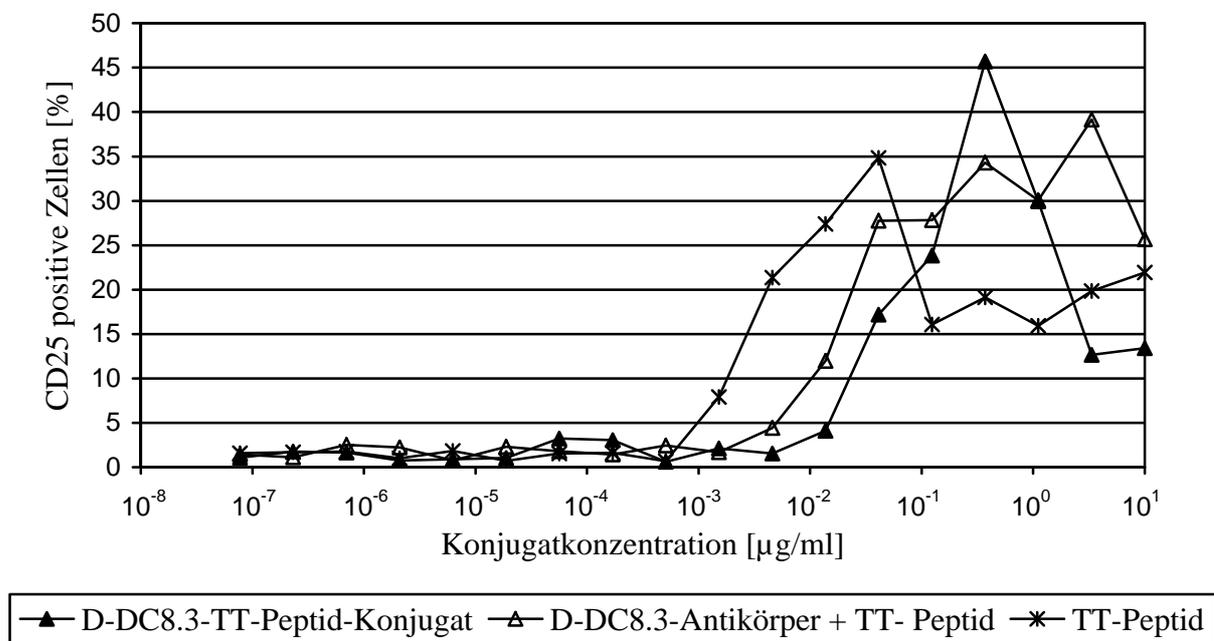


Abb. 26: Die Bedeutung der stabilen Bindung zwischen D-DC8.3-Antikörper und TT-Peptid

Dargestellt ist der Prozentsatz CD25-positiver T-Zellen nach 14h Inkubation von 10.000 CD4⁺ T-Zellen mit 25.000 M-DC8⁺-DCs in Abhängigkeit von der Konzentration des D-DC8.3-TT-Peptidkonjugats (F/P=1) im Vergleich zu einer Mischung aus D-DC8.3-Antikörper und TT-Peptid sowie TT-Peptid allein - jeweils in äquivalenter Konzentration. Die Generierung der immaturren M-DC8⁺-DCs erfolgte durch Kultivierung von frisch isolierten M-DC8⁺- Zellen in RPMI/10% FCS mit 50 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4.

3.3 Untersuchungen zur Kreuzpräsentation von exogen aufgenommenem Antigen im MHC-Klasse I-Kontext durch M-DC8⁺-Zellen

Exogen aufgenommenes Antigen wird in der Regel im MHC-Klasse II-Kontext von professionellen APCs präsentiert. Zusätzlich zu diesem regulären Prozessierungsweg besitzen dendritische Zellen die Fähigkeit, exogen aufgenommenes Antigen im MHC-Klasse I-Kontext zu präsentieren und damit eine zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren (sog. Kreuzpräsentation). Der Mechanismus, über den das Antigen aufgenommen und prozessiert werden muß, ist noch weitestgehend ungeklärt. Unter anderem gibt es Hinweise auf einen Transport des Antigens ins Zytosol zur weiteren Prozessierung durch das Proteasom und Beladung auf MHC-Klasse I-Moleküle unter Verwendung des regulären Prozessierungsweges für intrazelluläre Antigene. Andere Untersuchungen deuten daraufhin, dass der Abbau auch endosomal im MHC-Klasse II-Kompartiment erfolgen kann.

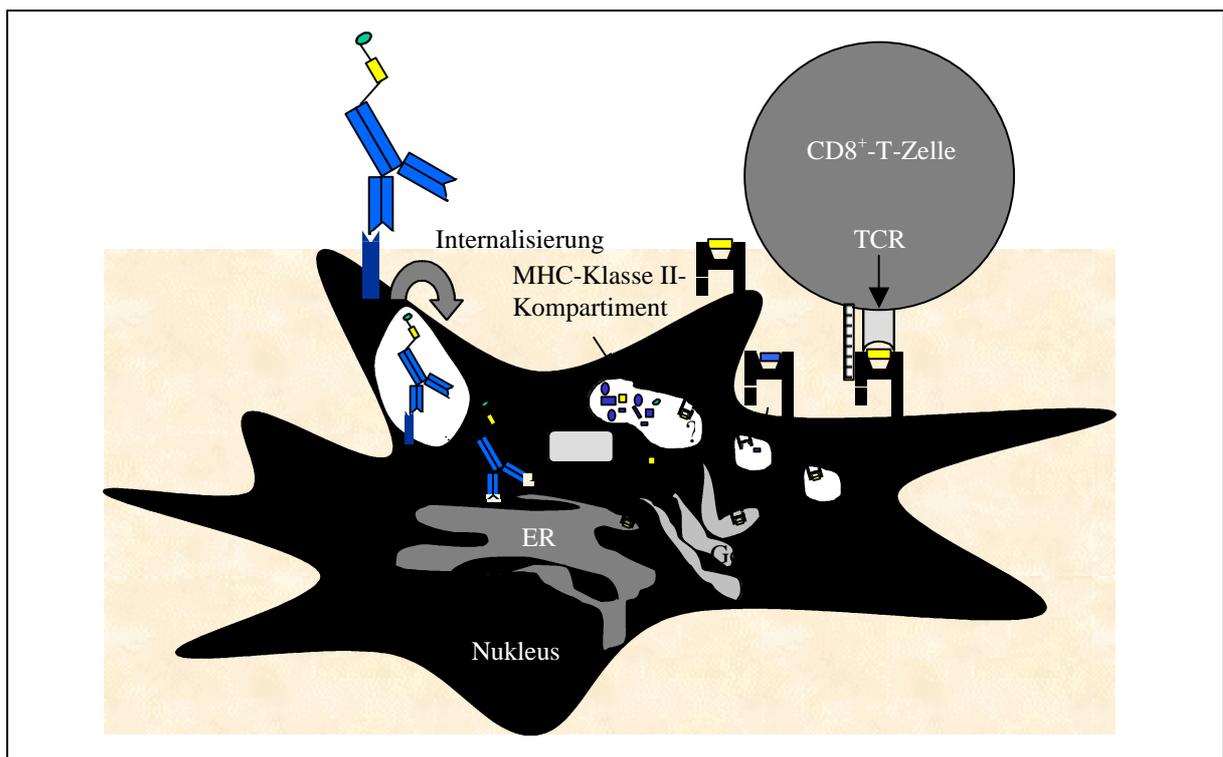


Abb. 27: Schematische Darstellung der Kreuzpräsentation

Exogen aufgenommene Antigene können von dendritischen Zellen über einen bisher ungeklärten Mechanismus auch im MHC-Klasse I-Kontext präsentiert werden, wodurch eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen erfolgen kann. Diskutiert wird einerseits die Möglichkeit, dass das Antigen nach der Aufnahme in das Zytosol gelangt und dann über den normalen MHC-Klasse I-Prozessierungsweg abgebaut und auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen wird. Ein anderer Weg wäre der Abbau des Antigens im MHC-Klasse II-Kompartiment mit anschließender Beladung rezirkulierender MHC-Klasse I-Moleküle.

Da insbesondere bei Tumorstimmungsansätzen eine Stimulation der zytotoxischen T-Zellen erwünscht ist, wurde die Fähigkeit von M-DC8⁺-Zellen zur Kreuzpräsentation bei Verwendung von anti-CD16- und D-DC8.3-Antigen-Konjugaten untersucht. Eine

schematische Darstellung der möglichen Kreuzpräsentation von Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten durch M-DC8⁺-Zellen ist in Abbildung 27 dargestellt.

3.3.1 Etablierung eines Testsystems zur Untersuchung der Kreuzpräsentation

Für die Analyse der Kreuzpräsentation bei M-DC8⁺-Zellen wurde analog zur MHC-Klasse II-Präsentation die Aktivierung eines Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons untersucht. Von der Verwendung von CD25 als Aktivierungsmarker wurde abgesehen, da die CD25-Expression nach Stimulation des T-Zellrezeptors mit Hilfe eines anti-CD3-Antikörpers im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen erst sehr spät und nur geringfügig ansteigt (Abbildung 28a). Mit CD69, einem C-Typ Lektin existiert ein weiterer Aktivierungsmarker, der an frühen Ereignissen der T-Zellaktivierung beteiligt ist und daher schon wenige Stunden nach T-Zellrezeptor-Ligation exprimiert wird. Eine Zeitkinetik der CD69-Expression des CD8⁺ T-Zellklons nach CD3-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen zeigt, dass das Maximum der CD69-Expression zwischen 18 h (Verwendung von aktivierten T-Zellen) und 24h (Verwendung von ruhenden T-Zellen) liegt (Abbildung 28b). Daher wurde die CD69-Expression als T-Zellaktivierungsmarker für die Analyse der Kreuzpräsentation bei M-DC8⁺-Zellen herangezogen.

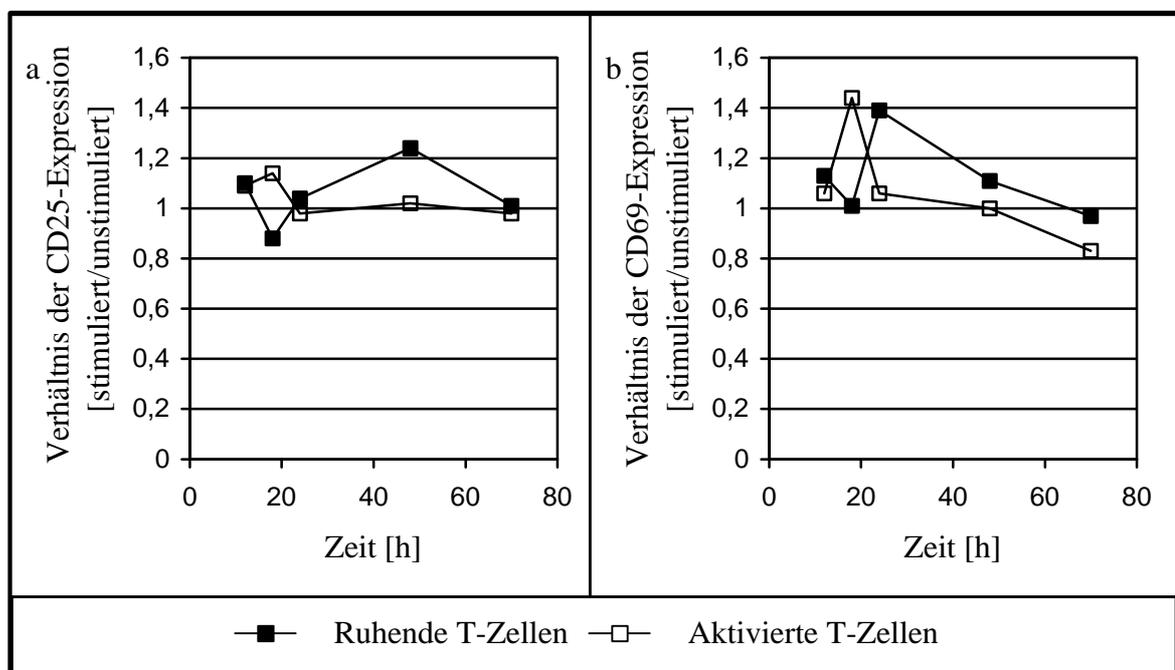


Abb. 28: Zeitkinetik der CD25- und CD69-Expression nach T-Zellrezeptoraktivierung

Dargestellt ist das Verhältnis der CD25-Expressionswerte (mittlere Fluoreszenzintensität, a) sowie der CD69-Expressionswerte (b) von stimulierten bzw. nicht stimulierten T-Zellen in Abhängigkeit der Zeit. Die Stimulation des T-Zellrezeptors erfolgte für die angegebene Zeitdauer durch Inkubation der CD8⁺ T-Zellen auf Zellkulturplatten, die mit 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper beschichtet worden waren. Die anschließende FACS-

Analyse der Aktivierungsmarker-Expression erfolgte mit anti-human CD25-PE und anti-human CD69-PE. Als Kontrolle wurden PBS-beschichtete Zellkulturplatten verwendet.

Abweichend von den CD4⁺-T-Zellexperimenten wurden die M-DC8⁺-Zellen mit den Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugaten für 12 h vorinkubiert, bevor nach Waschen der M-DC8⁺-Zellen ruhende, nicht mehr zytotoxische CD8⁺T-Zellen hinzugefügt wurden. Durch die Vorinkubation der M-DC8⁺-Zellen mit den Konjugaten sollte den M-DC8⁺-Zellen Zeit gegeben werden, das Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren, um anschließend bei Zugabe der T-Zellen eine möglichst gleichmäßige Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zu erzielen. Nach 24-stündiger Inkubation der M-DC8⁺-Zellen mit den T-Zellen wurden die T-Zellen auf CD69-Expression unter Verwendung eines PE-markierten CD69-Antikörpers analysiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit anti-CD11c-FITC (Markierung der M-DC8⁺-Zellen) und anti-CD3-APC (Markierung der T-Zellen) und Propidiumiodid (Ausschluß toter Zellen) angefärbt, um nur die CD69-Expression von lebenden T-Zellen darstellen zu können (analog zu Abb.17).

Die Produktion der Cytokine IFN- γ und TNF- α im Zellkultur-Überstand wurde aufgrund des hohen Hintergrunds durch die Cytokinproduktion der M-DC8⁺-Zellen nicht als Analysemethode verwendet. Die Verwendung des Chromium-Freisetzungstests zur Analyse einer spezifischen Lyse der M-DC8⁺-Zellen durch den Her2/neu-spezifischen T-Zellklon nach Aufnahme und Präsentation von Her2/neu wäre mit einem Verlust an Sensitivität verbunden gewesen, da M-DC8⁺-Zellen einerseits nur geringe Mengen an Chrom inkorporieren, andererseits nur eine geringe Lebensdauer in Kulturmedium ohne GM-CSF und IL-4 besitzen.

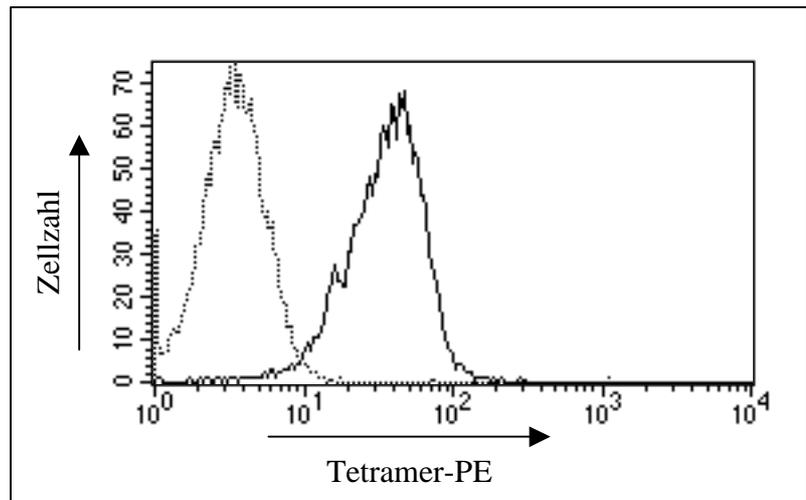
3.3.2 Spezifität des CD8⁺ T-Zellklons

Der verwendete CD8⁺ T-Zellklon erkennt ein Nonamer-Peptid aus der Extrazellulärdomäne des Her2/neu-Antigens im Kontext des MHC-Klasse I-Moleküls HLA-A*0201. Um sicherzustellen, dass die verwendeten T-Zellen auch die korrekte Spezifität besitzen, wurde von jeder Expansion der T-Zellen, die in den Experimenten eingesetzt wurden, eine Färbung mit PE-markierten MHC-Klasse I-Her2/neu-Tetrameren vorgenommen (Klenermann et al., 2002; Knabel et al., 2002). Abbildung 29 zeigt die spezifische Bindung des MHC-Her2/neu-Tetramers an die T-Zellen, während ein PE-markiertes MHC-MelanA-Tetramer nicht an die T-Zellen bindet.

Abb. 29: Histogrammdarstellung einer spezifischen Bindung von PE-markierten MHC-Klasse I-Her2/neu-Tetrameren an CD8⁺ T-Zellen mit einer Spezifität für Her2/neu.

Je 30.000 T-Zellen wurden mit MHC-Tetramer-PE (1:40) für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Fluoreszenz-Intensität im FACS untersucht.

Her2/neu-MHC-Tetramer (—);
MelanA-MHC-Tetramer (---)



Zusätzlich wurden die T-Zellen in regelmäßigen Abständen auf ihre Funktionalität überprüft, indem die Lyse von Peptid-gepulsten T2-Zellen untersucht wurde. Dazu wurden T2-Zellen für 2 h bei 37°C mit Cr⁵¹ beladen und anschließend mit 10 µg/ml Her2/neu-Nonamer und 3 µg/ml β₂-Mikroglobulin für 1,5 h gepulst. Die CD8⁺ T-Zellen wurden dann in unterschiedlicher Anzahl mit den Peptid-beladenen T2-Zellen für 4 h inkubiert und der Anteil der freigesetzten Radioaktivität in 100 µl Überstand im Szintillationsmeßgerät ermittelt. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Zielzellpopulationen wurde für jede Probe die spezifische Lyse berechnet. Dieser Wert ist ein prozentuales Verhältnis, das die absolute Zahl an Zerfällen pro Minute mit der maximalen Lyserate der Zielzellen (Lyse durch 0,5% Triton) und der spontanen Lyserate (Lyse in Abwesenheit der Effektorzellen) in Beziehung setzt. Die spezifische Lyse der Peptid-beladenen T2-Zellen in Abhängigkeit des Effektorzellen-/Zielzellen-Verhältnis ist in Abbildung 30 dargestellt.

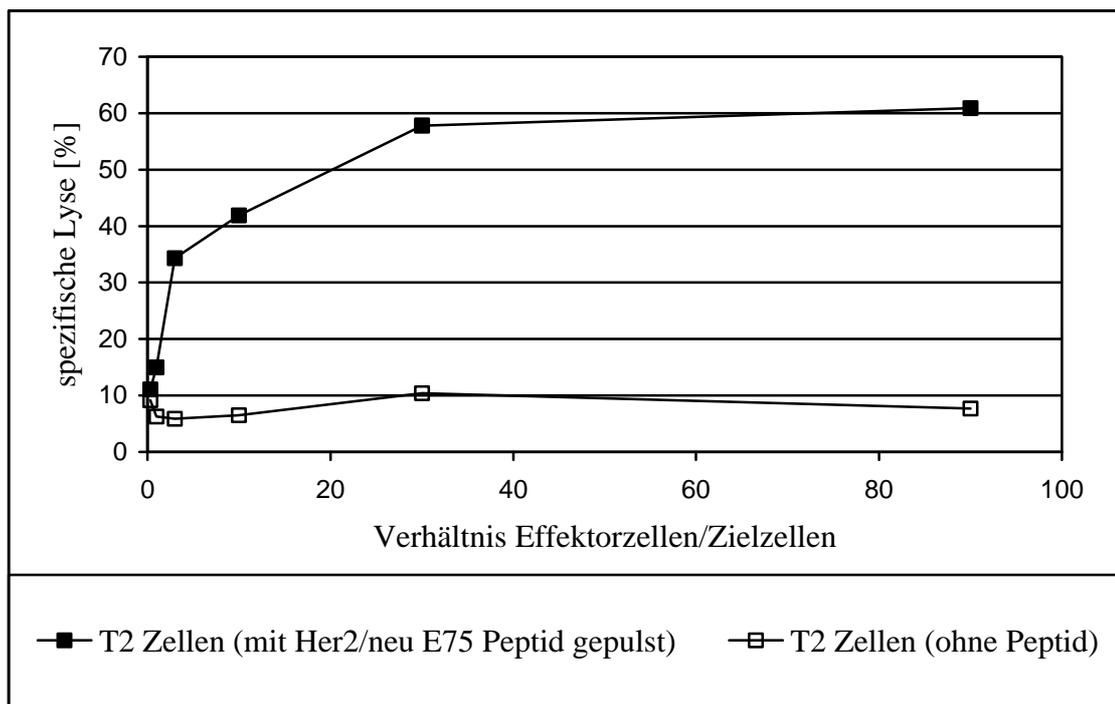


Abb.30: Zytotoxizität des Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon

Dargestellt ist die spezifische Lyse von Cr⁵¹- und Her2/neu-Nonamer beladenen T2-Zellen in Abhängigkeit des Effektorzellen-/Zielzellen-Verhältnisses. Als Kontrolle wurde die Lyse von T2-Zellen in Abwesenheit von Peptid untersucht.

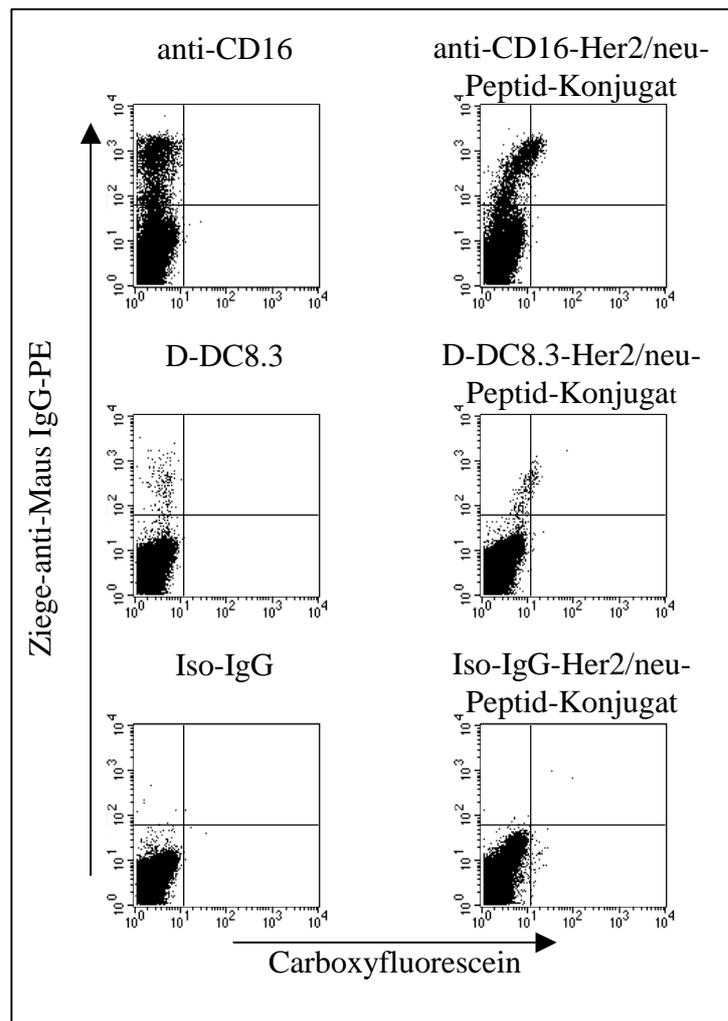
3.3.3 Herstellung von Konjugaten aus Antikörper und Her2/neu-Peptid

Die Verwendung eines Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons in dem Testsystem zur Analyse der Kreuzpräsentation erforderte die Generierung weiterer Antikörper-Peptidantigen-Konjugate mit dem Austausch der TT-Peptid-Aminosäuresequenz gegen das Her2/neu-Nonamer. Dazu wurde ein Her2/neu-Peptid synthetisiert, das zusätzlich zu dem Her2/neu-Nonamer und einigen flankierenden Aminosäuren ein Carboxyfluorescein am N-Terminus und ein Cystein am C-Terminus enthielt. Damit ergab sich folgende Peptid-Sequenz im Einbuchstabencode für Aminosäuren: Carboxyfluorescein-KKIFGSLAFLPES-C. Die von den T-Zellen erkannte Aminosäuresequenz ist durch Unterstreichen markiert. Bei den flankierenden Aminosäuren wurde die entsprechende Sequenz aus dem Her2/neu-Protein fortgeführt, um einen möglichst natürlichen Kontext für die Prozessierung zu schaffen. Die Kopplung des Her2/neu-Peptids an die drei Antikörper anti-CD16, D-DC8.3 und Iso-IgG erfolgte in Analogie zur Herstellung der Antikörper-TT-Peptid-Konjugate (siehe 3.2.1) unter Verwendung von Sulfo-SMCC als Kopplungsreagenz. Zur Quantifizierung der pro Antikörper gebundenen Her2/neu-Peptide wurde das Fluorochrom-/Protein-Verhältnis durch Absorptionmessung bei 280 und 493 nm ermittelt. Die Konjugatkonzentration wurde mit einem ELISA-Verfahren bestimmt, das einen Maus-IgG₁-Antikörper als Referenz verwendet.

Zur Überprüfung der Funktionalität der generierten Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate wurde die Bindung auf PBMCs im Durchflußzytometer nachgewiesen. Dazu wurden je 200.000 Zellen mit 5 µg/ml Antikörper oder Konjugat für 30 min inkubiert und anschließend die Antikörperbindung durch einen PE-markierten anti-Maus-Fcγ-spezifischen Sekundärantikörper detektiert. Die Bindungseffizienz der Konjugate entsprach dabei in etwa den jeweiligen unkonjugierten Antikörpern und das an die Antikörper gekoppelte Her2/neu-Peptid konnte über die Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins nachgewiesen werden (Abbildung 31).

Abb. 31: Bindungsfunktionalität der Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate.

Dargestellt ist die Bindung der anti-CD16-, D-DC8.3- und Iso-IgG Her2/neu-Peptid-Konjugate auf PBMCs im Vergleich zu den jeweiligen unkonjugierten Antikörpern. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation mit einem Fcγ-spezifischen PE-markierten Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Das Vorhandensein des Her2/neu-Peptides ist anhand der Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins nachweisbar. Sowohl die Konjugate als auch die Antikörper wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml für die Bindungsanalyse eingesetzt.



Zusätzlich wurden die Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate sowie die unkonjugierten Antikörper mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt, um einen proteolytischen Abbau der Konjugate ausschließen zu können und eventuelle Verunreinigungen mit nicht gekoppeltem Her2/neu-Peptid erkennen zu können. Dazu wurde das Gel zuerst im Fluoreszenzmikroskop untersucht und die Proteine anschließend durch Coomassie-Blau-Färbung detektiert (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Aktivierung von Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch M-DC8⁺-Zellen, die mit Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugat inkubiert wurden

3.3.4.1 T-Zellaktivierung in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration

Da bisher keine Anhaltspunkte vorlagen, ob M-DC8⁺-Zellen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen, wurde mit der CD69-Expressionsanalyse eine möglichst sensitive Methode zur Analyse der T-Zellaktivierung gewählt und um eine möglichst homogene T-Zellaktivierung zu erreichen, die M-DC8⁺-Zellen mit den Konjugaten vorinkubiert und erst anschließend die T-Zellen zugegeben. In Analogie zu den MHC-Klasse II-Untersuchungen wurde als erstes eine Titration der Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate vorgenommen, um die optimale Konzentration für die T-Zellaktivierung zu ermitteln. Dazu wurden je 25.000 M-DC8⁺-Zellen von einem HLA-A*0201 positiven Spender mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate für 12 h inkubiert, anschließend nach zwei Waschschritten je 10.000 T-Zellen hinzugefügt und nach weiteren 24h Kultivierung die T-Zellaktivierung durch durchflußzytometrische Bestimmung der CD69-Expression ermittelt. Es konnte jedoch kein signifikanter Anstieg der CD69-Expression infolge einer Konjugatzugabe beobachtet werden. Weder konnten Unterschiede zwischen der Aktivierungseffizienz von anti-CD16-Her2/neu-Konjugat, Iso-IgG-Her2/neu-Peptid-Konjugat oder D-DC8.3-Her2/neu-Peptid-Konjugat festgestellt werden, noch stieg die CD69-Expression infolge einer Konjugatkonzentrationserhöhung an (Abbildung 32).

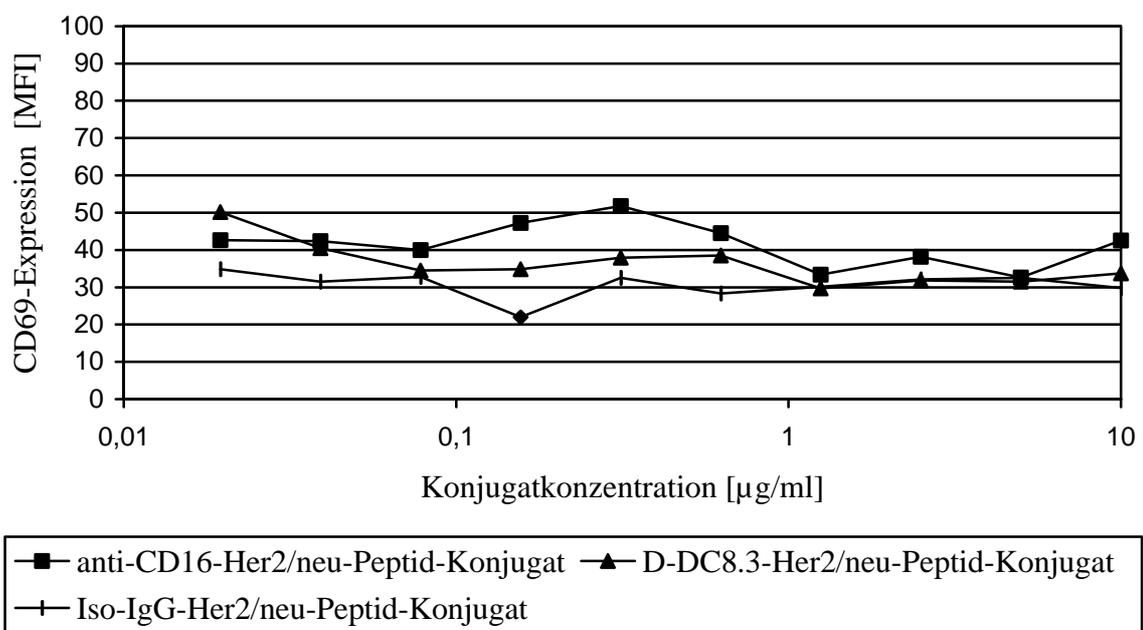


Abb. 32: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch Konjugat-gepulste M-DC8⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration

Dargestellt ist die CD69-Expression der T-Zellen als Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konjugatkonzentration. Dazu wurden je 25.000 M-DC8⁺-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugat (F/P = 1) für 12 h gepulst, anschließend nicht

aufgenommenes Konjugat durch zweimaliges Waschen entfernt und je 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen hinzugefügt. Die Bestimmung der CD69-Expression aller lebenden T-Zellen erfolgte nach 24 h Kultivierung mit den M-DC8⁺-Zellen durch eine durchflußzytometrische Analyse.

Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei Experimente bezogen auf das anti-CD16-Her2/neu-Peptid-Konjugat und das Iso-IgG-Her2/neu-Peptid-Konjugat. Auch der Vergleich von anti-CD16-Her2/neu-Peptid-Konjugat mit einer entsprechenden Mischung aus anti-CD16-Antikörper und Her2/neu-Peptid sowie mit Her2/neu-Peptid alleine oder mit der rekombinanten Extrazellulärdomäne des Her2/neu-Proteins (ebenfalls in äquivalenten molaren Mengen zum eingesetzt) zeigte keinen Vorteil des anti-CD16-Her2/neu-Peptid-Konjugats (Abb.33). Ein analoges Ergebnis wurde bei Verwendung des D-DC8.3-Her2/neu-Konjugats beobachtet.

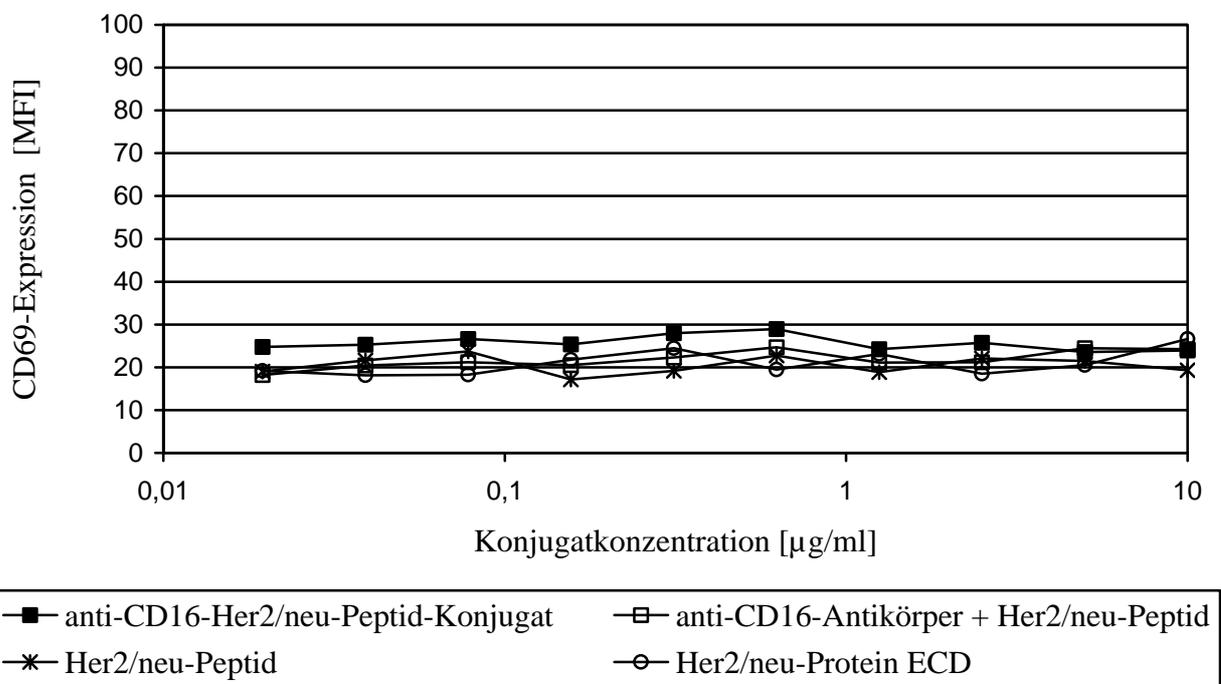


Abb. 33: T-Zellaktivierungspotential von anti-CD16-Her2/neu-Peptid-Konjugat im Vergleich zu Her2/neu-Protein, Her2/neu-Peptid sowie einer Mischung aus anti-CD16-Antikörper und Her2/neu-Peptid

Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität als Maß für die CD69-Expression in Abhängigkeit der Konjugatkonzentration. Anti-CD16-Antikörper, Her2/neu-Peptid und Her2/neu-Protein wurden in äquivalenten molaren Mengen wie das Konjugat (F/P=1) eingesetzt. Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden mit Konjugat, Peptid oder Protein für 12 h gepulst und nach zweimaligen Waschen 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺T-Zellen hinzugefügt. Nach 24h Kultivierung mit den M-DC8⁺-Zellen wurde die CD69-Expression mittels FACS-Analyse bestimmt.

3.3.4.2 T-Zellaktivierung bei zusätzlicher Kostimulation durch anti-NKG2D

Der verwendete Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellklon gehört zu den CD28⁻/CD8⁺ T-Zellen. Diese Zellpopulation lässt sich wesentlich schwieriger aktivieren als die CD28⁺ Population der zytotoxischen T-Zellen, da sie neben dem T-Zellrezeptorsignal noch ein zweites

kostimulatorisches Signal zur vollständigen Aktivierung benötigt. M-DC8⁺-Zellen exprimieren zwar CD40 und CD86 auf ihrer Oberfläche, aber nur über die CD40/CD40L-Interaktion wäre eine Kostimulation des Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons möglich. Um auszuschließen, dass das negative Resultat bei Verwendung der Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate auf eine mangelnde Kostimulation zurückzuführen ist, obwohl eine Prozessierung der Konjugate mit anschließender Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen stattgefunden hat, wurden die Experimente unter Verwendung von anti-NKG2D-Antikörpern wiederholt. Die Kostimulation von CD8⁺ T-Zellen durch anti-NKG2D ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.

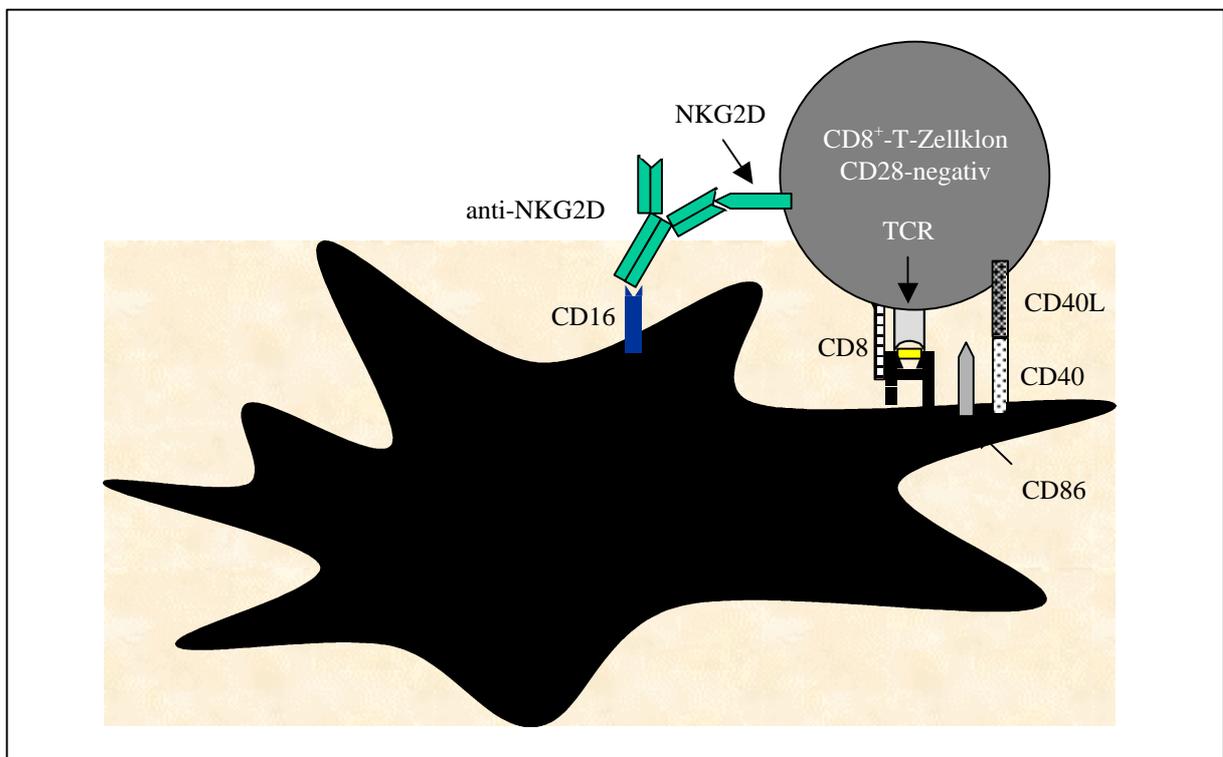


Abb. 34: Schematische Darstellung der Kostimulation von CD28⁻ zytotoxischen T-Zellen

Die CD28⁻ Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen benötigt zur Aktivierung neben der Ligation des T-Zellrezeptors (TCR) ein zweites, kostimulatorisches Signal. Die M-DC8⁺-Zellen können dieses Signal nur bedingt zur Verfügung stellen, da durch das Fehlen von CD28 eine Kostimulation über CD86 oder CD80 nicht erfolgen kann und somit nur die CD40/CD40L-Interaktion als Möglichkeit der Kostimulation verbleibt. Da die T-Zellen den aktivierenden Rezeptor NKG2D an ihrer Oberfläche besitzen, lassen sich die T-Zellen durch Zugabe von Antikörpern gegen NKG2D kostimulieren, sofern eine Kreuzvernetzung durch die Fc-Rezeptoren der M-DC8⁺-Zellen erfolgt.

Die optimale Konzentration an anti-NKG2D-Antikörper zur Kostimulation wurde in einem Vorversuch ermittelt. Dazu wurden M-DC8⁺-Zellen für 12 h mit Her2/neu-Protein in verschiedenen Konzentrationen gepulst und anschließend NKG2D-Antikörper (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml oder 0 µg/ml finale Konzentration) sowie jeweils 10.000 Her2/neu-spezifische T-Zellen hinzugefügt. Die Bestimmung der T-Zellaktivierung erfolgte nach 24 h Kultivierung durch eine FACS-Analyse auf CD69-Expression. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 100 µg/ml anti-NKG2D die CD69-Expression der T-Zellen deutlich gegenüber der Negativkontrolle ohne NKG2D-Antikörper gesteigert war (Abbildung 35). Daher wurde in den folgenden Experimenten diese Konzentration des anti-NKG2D-Antikörpers für die Kostimulation der T-Zellen verwendet.

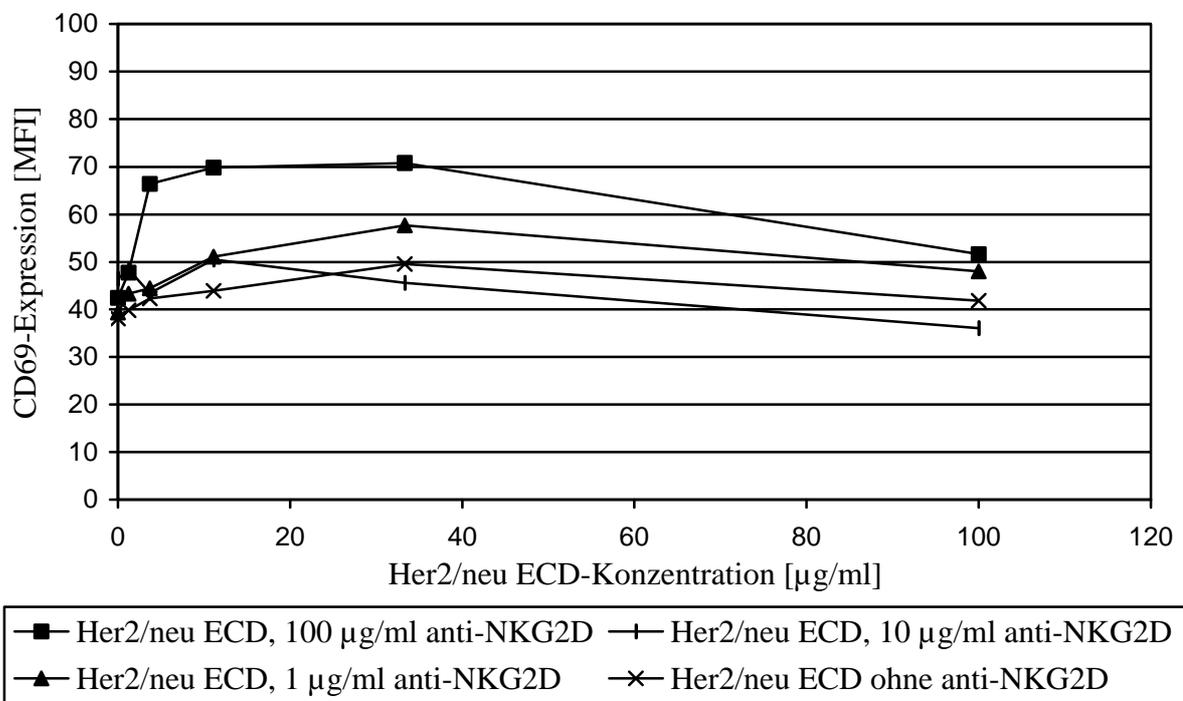


Abb. 35: Effekt von Antikörpern gegen NKG2D auf die T-Zellaktivierung

Dargestellt ist die CD69-Expression der T-Zellen als Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Her2/neu-Protein-Konzentration. Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden mit der Extrazellulärdomäne (ECD) des Her2/neu-Proteins für 12 h gepulst und nach zweimaligen Waschen 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen sowie unterschiedliche Konzentrationen eines anti-NKG2D-Antikörpers hinzugefügt. Nach weiteren 24h Kultivierung wurde die CD69-Expression der T-Zellen im FACS bestimmt.

Die Wiederholung der Kreuzpräsentations-Experimente mit zusätzlicher Kostimulation der T-Zellen durch Antikörper gegen NKG2D zeigte keine Veränderung der T-Zellaktivierung gegenüber den Experimenten ohne Kostimulation. Es konnten weder Unterschiede zwischen den einzelnen Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugaten (Abbildung 36), noch zwischen diesen und der ungerichteten Aufnahme von freiem Her2/neu-Peptid oder freiem Her2/neu-Protein beobachtet werden (Abbildung 37)

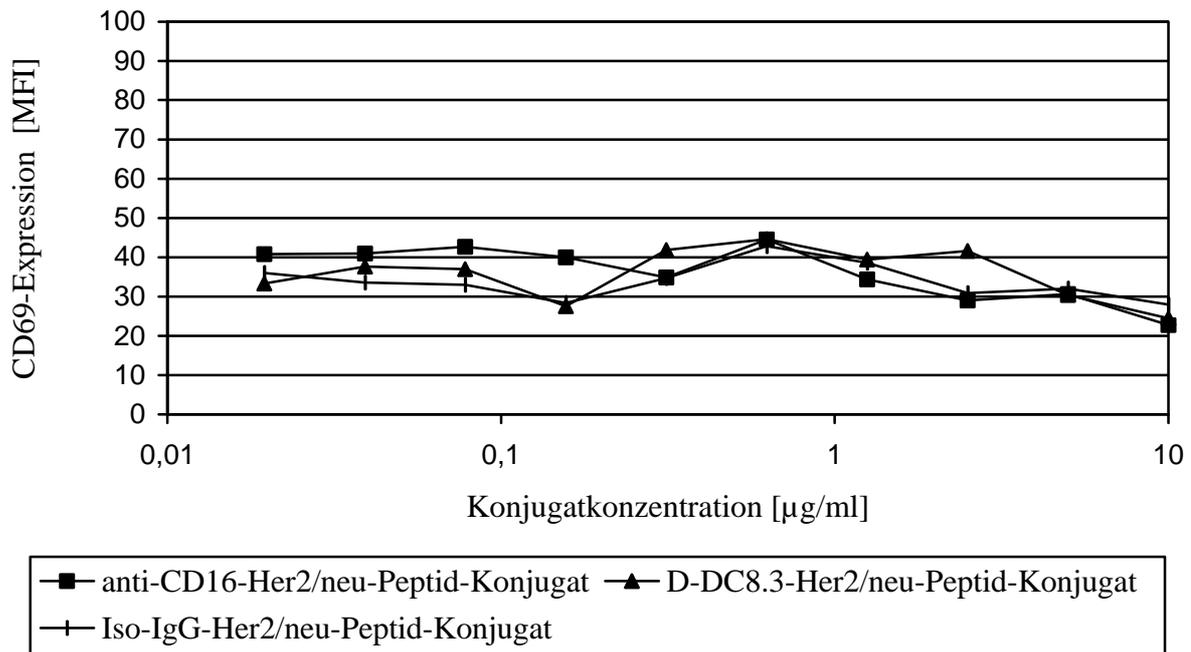


Abb. 36: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch Konjugat-gepulste M-DC8⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration bei zusätzlicher Kostimulation mit anti-NKG2D-Antikörper.

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität als Maß für die CD69-Expression der T-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konjugatkonzentration. Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugats (F/P = 1) für 12 h gepulst und anschließend nach zweimaligen Waschen 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen und 100 µg/ml anti-NKG2D-Antikörper hinzugefügt. Nach 24 h Kultivierung mit den M-DC8⁺-Zellen erfolgte die Bestimmung der T-Zellaktivierung.

Das Ergebnis der Titration der verschiedenen Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate bei Kostimulation mit anti-NKG2D-Antikörper basiert auf drei Experimenten bezogen auf das anti-CD16- und das Iso-IgG-Her2/neu-Peptid-Konjugat. Das Ergebnis einer vergleichenden Titrations-Analyse von anti-CD16-Her2/neu-Peptid-Konjugat sowie äquivalenten molaren Mengen an freiem Her2/neu-Peptid oder freiem Her2/neu-Protein wurde in zwei Experimenten erhalten. Dieses Ergebnis konnte auch bei Verwendung des D-DC8.3-Her2/neu-Peptid-Konjugats im Vergleich mit äquivalenten molaren Mengen an freiem Her2/neu-Peptid und Her2/neu-Protein bestätigt werden.

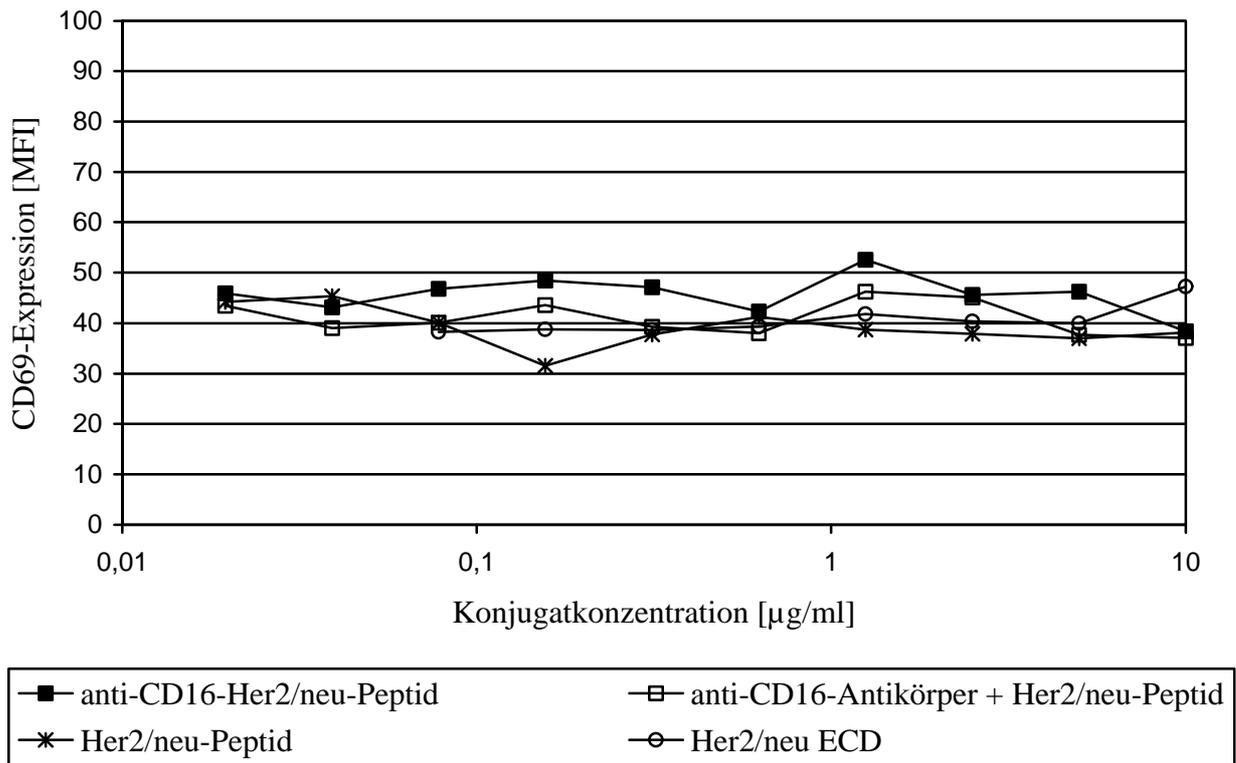


Abb.37: Vergleichende Analyse der gerichteten Antigenaufnahme gegenüber einer Aufnahme von freiem Antigen bei Kostimulation der T-Zellen durch einen anti-NKG2D-Antikörper

Die CD69-Expression der T-Zellen als Mittelwert der Fluoreszenzintensität ist in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration dargestellt. Sowohl anti-CD16-Antikörper, Her2/neu-Peptid und Her2/neu-Protein wurden in äquivalenten molaren Mengen wie das Konjugat (F/P=1) eingesetzt. Nach Pulsen von je 25.000 M-DC8⁺-Zellen für 12 h mit dem jeweiligen Antigen, wurden je 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen sowie 100 µg/ml anti-NKG2D-Antikörper hinzugefügt. Die Bestimmung der T-Zellaktivierung erfolgte nach weiteren 24h Kultivierung durch eine durchflußzytometrische Analyse der CD69-Expression.

3.3.5 Herstellung von Antikörper-Protein-Konjugaten

Die Komplexierung eines Peptidantigens durch MHC-Klasse I erfordert eine exaktere Prozessierung des Antigens als bei Peptid-MHC-Klasse II-Komplexen, da nur Peptide mit einer Länge zwischen 7 bis 15 Aminosäuren in die Bindungstasche eines MHC-Klasse I-Moleküls binden können, während die Länge der MHC-Klasse II bindenden Peptide aufgrund der offenen räumlichen Struktur der MHC-Klasse II-Bindungstasche stärker variieren kann (Klein und Sato, 2000). Da bei den Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugaten die im natürlichen Kontext das T-Zellepitop flankierenden Aminosäuren durch den Crosslinker und das Carboxyfluoresceinpeptid ersetzt wurden, ist nicht auszuschließen, dass eine fehlerhafte Prozessierung des Her2/neu-Peptides erfolgte und somit die Bildung von funktionellen Peptid-MHC-Klasse I-Komplexen verhindert wurde. Aus diesem Grund wurden der

Antikörper anti-CD16 und die Isotypkontrolle Iso-IgG mit den Extrazellulärdomänen des Her2/neu-Proteins sowie des homologen EGF-Rezeptors (EGFR) als Kontrolle gekoppelt. Unter diesen Bedingungen sollte der für die Prozessierung durch das Proteasom relevante Kontext (Toes et al., 2001) für das Her2/neu-Epitop gegenüber ungekoppelten Her2/neu-Protein im Großteil der Molekülpopulation erhalten bleiben.

Zur Herstellung der Antikörper-Protein-Konjugate wurde die schon bei der Herstellung der Antikörper-Peptid-Konjugate angewandte Methode in modifizierter Form angewandt. So wurden die Antikörper in Analogie zu den Antikörper-Peptid-Konjugaten durch Sulfo-SMCC mit Maleimidgruppen versehen, während in Her2/neu und EGFR unter Verwendung des heterobifunktionellen Kopplungsreagenz SATA (N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat) über die Aminogruppen der Lysinreste geschützte Sulfhydrylgruppen eingeführt wurden. Nach Entfernen der Schutzgruppe durch Inkubation mit Hydroxylamin-Hydrochlorid und Abtrennen der überschüssigen Kopplungsreagenzien durch Gelfiltration erfolgte die Kopplung von Antikörper und Protein durch Reaktion der Maleimidgruppe mit der Sulfhydrylgruppe unter Bildung einer stabilen Thioetherbrücke. Die chemischen Grundlagen der Kopplung sind in Abbildung 38 illustriert. Antikörper und Protein wurden in einem molaren Verhältnis von 1:2 für die Kopplung eingesetzt.

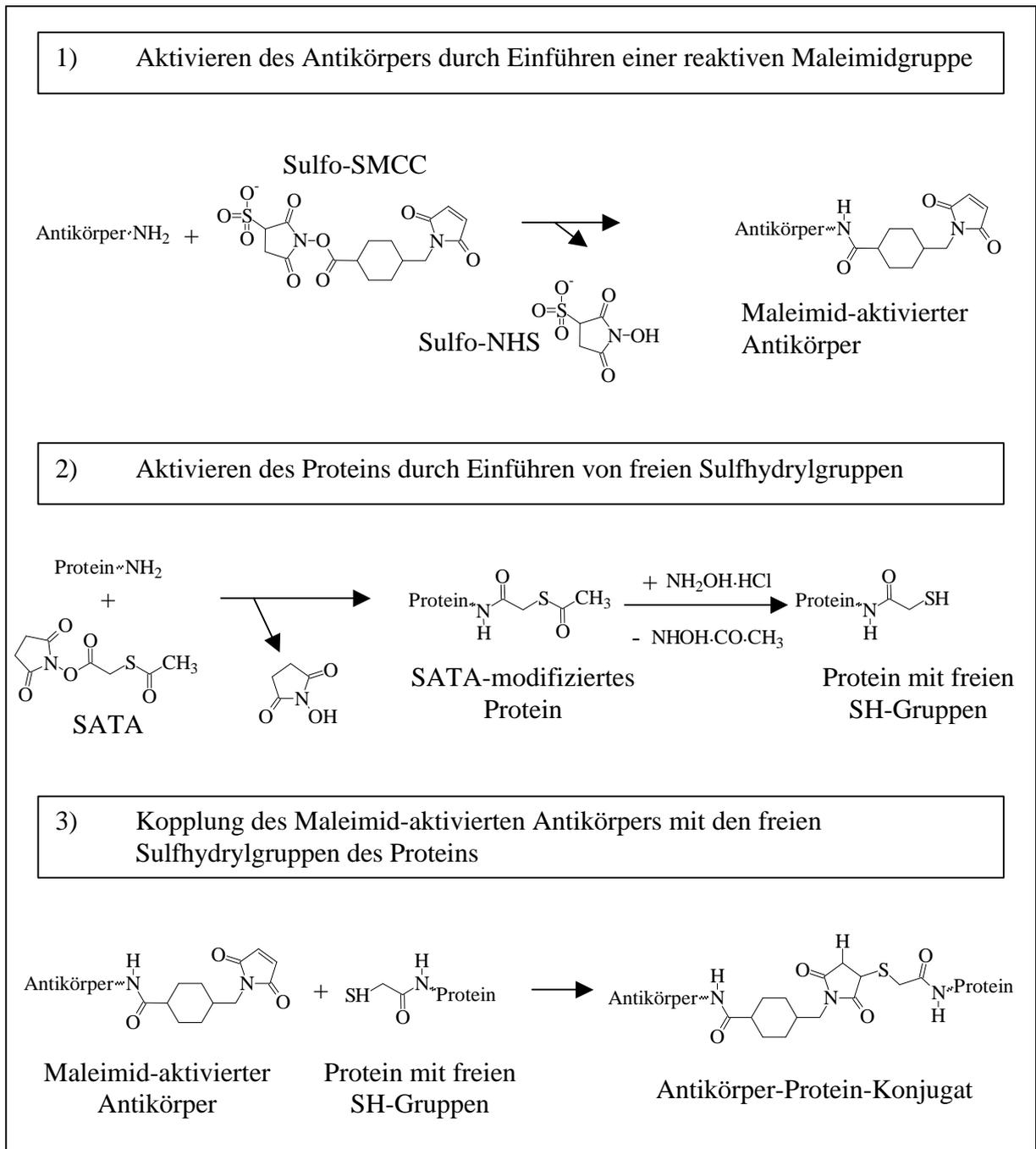


Abb. 38: Kopplungschemie der Antikörper-Protein-Konjugate

Sowohl Antikörper als auch Her2/neu bzw. EGFR mussten für die Kopplung mit reaktiven Gruppen versehen werden. Die Aktivierung des Antikörpers erfolgte durch Reaktion der NHS-Estergruppe des heterobifunktionellen Kopplungsreagens Sulfo-SMCC mit den Aminogruppen des Antikörpers, wodurch der Antikörper reaktive Maleimidgruppen erhält. Für die Modifizierung von rekombinantem Her2/neu und EGFR wurde SATA als Kopplungsreagens verwendet, das über die Reaktion eines NHS-Esters mit den Lysinen des Proteins geschützte Sulfhydrylgruppen in das Protein einführt. Nach dem Entfernen der Schutzgruppe über Hydroxylamin-Hydrochlorid kann die freie Sulfhydrylgruppe des rekombinanten Proteins mit den Maleimiden des Antikörpers reagieren, wodurch Antikörper und Her2/neu bzw. EGFR über eine kovalente Bindung verbunden werden.

Der Erfolg der Konjugation wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung der Konjugate im Vergleich zu Antikörper und rekombinantes Protein und anschließende Detektion der Proteine mittels Coomassie-Blaufärbung überprüft. Abbildung 39 zeigt exemplarisch die Auftrennung der Proben 8% SDS-Gel für die anti-CD16-Her2/neu-Konjugation.

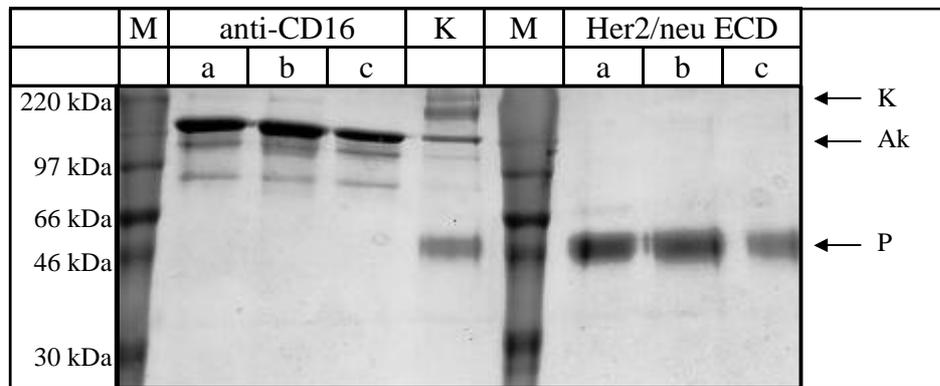


Abb. 39: Gelelektrophoretische Analyse der anti-CD16-Her2/neu –Konjugation

Auftrennung von je 10 µl Probe in einem 8% SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Detektion der Proteine mittels Coomassie-Blau-Färbung. Gezeigt ist die Auftrennung des anti-CD16-Her2/neu-Konjugates (K) im Vergleich zum Laufverhalten des anti-CD16-Antikörpers (Ak; a: vor Aktivierung, b: Maleimid-aktiviert, c: aktiviert nach Gelfiltration) und des Her2/neu (P; a: vor Aktivierung, b nach Aktivierung, c Aktivierung und Gelfiltration). Die Größenbestimmung der Proteine erfolgte anhand des mitgeführten Größenmarkers (M).

Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse deutete darauf hin, dass sich das anti-CD16-Her2/neu-Konjugat gebildet hatte; allerdings war da noch unkonjugierter Antikörper und ungekoppeltes Her2/neu-Protein in der Probe vorhanden. Zusätzlich waren größere Konjugate aus mehreren Her2/neu und mehreren Antikörpern entstanden. Da bei jedem Konjugationsansatz das Verhältnis zwischen den einzelnen Komponenten im Endprodukt variierte, war eine Abtrennung des Protein-Antikörper-Konjugats von den übrigen Komponenten erforderlich. Dazu wurden die Konjugationsprodukte durch Gelpermeationschromatographie in die einzelnen Komponenten nach der Größe aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen der Gelpermeationschromatographie wurden entsprechend ihrem Laufverhalten in einem SDS-Polyacrylamidgel charakterisiert. Das Ergebnis ist exemplarisch für das anti-CD16-Her2/neu-Konjugat in Abbildung 40 dargestellt. Die Fraktionen mit dem jeweils höchsten Anteil an Konjugat mit nur einem Her2/neu-Protein pro Antikörper wurden für die Experimente verwendet. Im Fall des anti-CD16-Her2/neu-Konjugates waren dies die Fraktionen 11-13. Als Referenz wurden ein Größenstandard sowie das nicht gereinigte Endprodukt der Konjugation, anti-CD16-Antikörper und rekombinantes Her2/neu mitgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der Antikörper-Protein-Konjugate erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm, da die bei den Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten angewendete ELISA-Methode unter Verwendung eines Referenzantikörpers als Standard keine sinnvollen Ergebnisse lieferte.

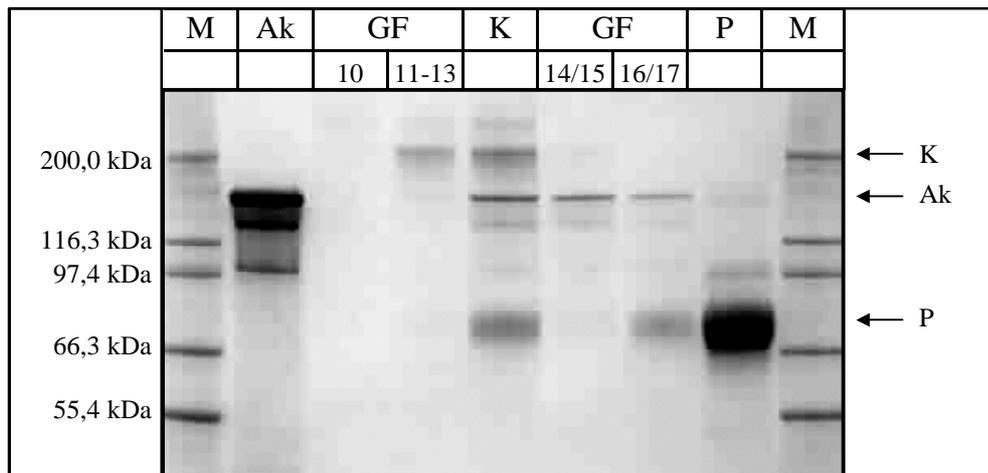


Abb. 40: Analyse der Gelpermeationschromatographie-Fractionen des anti-CD16-Her2/neu-Konjugats

Die Auftrennung von jeweils 10µl unverdünnter Proben von den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration (GF) sowie des nicht-gereinigten anti-CD16-Her2/neu-Konjugates (K) erfolgte in einem 4-12% Bis-Tris-Gel (Novex) unter nicht reduzierenden Bedingungen. Als Referenz wurden anti-CD16-Antikörper (Ak) und Her2/neu-Protein (P) sowie ein Größenstandard (M) mitgeführt.

Vor dem Einsatz in den Experimenten zur T-Zellaktivierung wurde die Bindungsaktivität der Konjugate auf Blutzellen analysiert. Dazu wurden PBMCs mit jeweils 5 µg/ml der Konjugate inkubiert, nicht gebundenes Konjugat durch zweimaliges Waschen entfernt und anschließend die gebundenen Konjugate durch Anfärbung mit einem FITC-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper sowie PE-markierten Antikörpern gegen Her2/neu und EGFR durchflußzytometrisch nachgewiesen. Mit dieser Methode wurde einerseits allgemein die Bindung des anti-CD16-Antikörpers an die NK-Zellfraktion der PBMCs nachgewiesen, während der Iso-IgG in den Iso-IgG-Her2/neu- und Iso-IgG-EGFR-Konjugaten keine Bindung an die NK-Zellen zeigte; andererseits liessen sich die anti-CD16-Konjugate durch die Verwendung des anti-EGFR-PE- und des anti-Her2/neu-PE-Antikörpers genauer charakterisieren (Abbildung 41). Als Kontrolle wurde die Bindung der Antikörper anti-CD16 und Iso-IgG sowie der rekombinanten Proteine Her2/neu und EGFR auf PBMCs untersucht, wobei erwartungsgemäß nur die Bindung des anti-CD16-Antikörpers mit Hilfe eines anti-Maus-IgG-FITC-Antikörpers auf den NK-Zellen detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

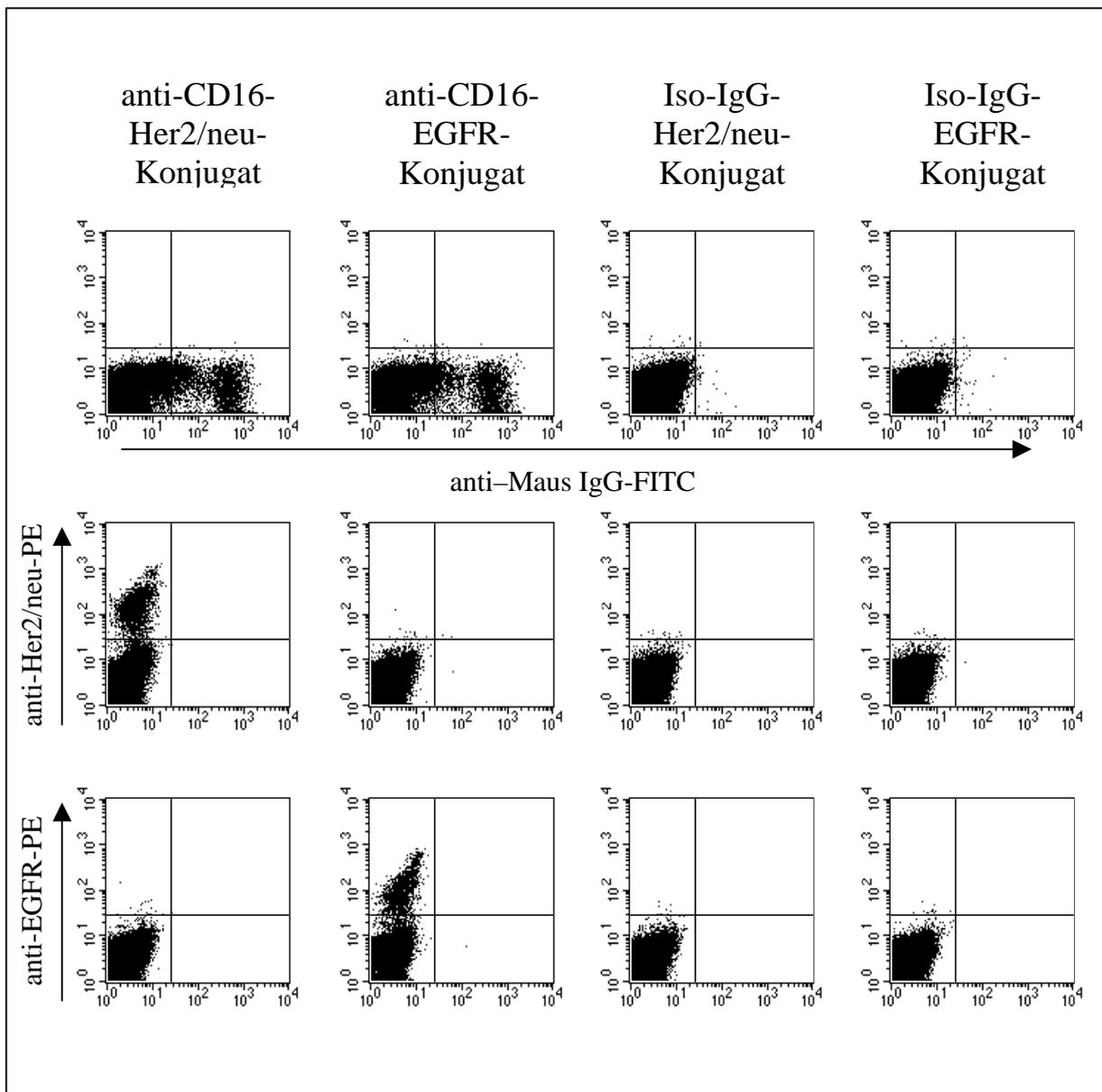


Abb.41: Bindungsaktivität der Antikörper-Protein-Konjugate

Jeweils 200.000 PBMCs wurden mit je 5µg/ml der Antikörper-Protein-Konjugate inkubiert. Der Nachweis der Konjugatbindung auf den Zellen erfolgte durch Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender durchflußzytometrischer Analyse. Zur Detektion des Antikörperanteils in den Konjugaten wurde ein FITC-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper und zur Detektion der rekombinanten Proteine ein PE-markierter anti-Her2/neu bzw. anti-EGFR Sekundärantikörper verwendet.

3.3.6 Aktivierung von Her2/neu-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch M-DC8⁺-Zellen, die mit Antikörper-Protein-Konjugat inkubiert wurden

Um die Frage, ob M-DC8⁺-Zellen nach einer gerichteten Antigenaufnahme von anti-CD16-Antigen-Konjugaten in der Lage sind, das gekoppelte Antigen im MHC-Klasse I-Kontext zu präsentieren und damit eine Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu bewirken,

endgültig beantworten zu können, wurden die Kreuzpräsentations-Experimente unter Verwendung von anti-CD16-Her2/neu-Protein-Konjugat und Iso-IgG-Her2/neu-Protein-Konjugat wiederholt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem bei den Antikörper Her2/neu-Peptid-Konjugaten angewendeten Protokoll. Als zusätzliche Kontrolle wurden anti-CD16- und Iso-IgG-EGFR-Konjugate eingesetzt, um den Effekt eines irrelevanten Antigens zu untersuchen. Das in Abbildung 42 dargestellte Ergebnis ist eine Bestätigung der Resultate aus den Experimenten, die mit Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugaten durchgeführt wurden. So ist zwar bei hohen Konzentrationen ein leichter Anstieg der CD69-Expression zu beobachten, allerdings ist diese Erhöhung bei allen Konjugaten gleichermaßen zu beobachten, so dass dies auf eine nicht spezifische Aktivierung der T-Zellen zurückzuführen sein muß.

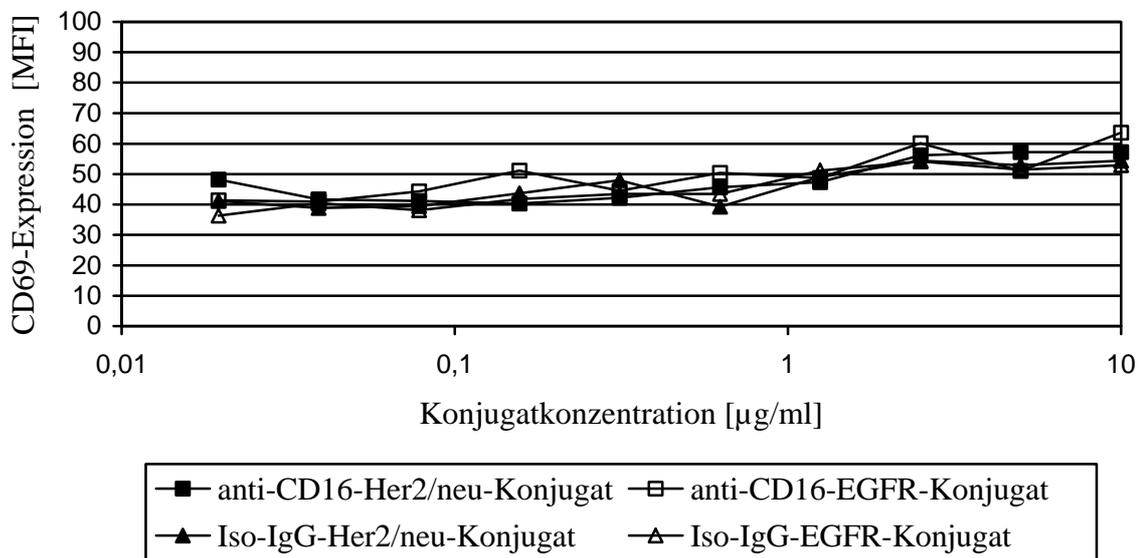


Abb. 42: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch Antikörper-Protein-Konjugat-gepulste M-DC8⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration

Dargestellt ist die CD69-Expression der T-Zellen als Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konjugatkonzentration. Je 25.000 M-DC8⁺-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Antikörper-Protein-Konjugat für 12 h gepulst, nicht aufgenommenes Konjugat durch zweimaliges Waschen entfernt und je 10.000 Her2/neu-spezifische CD8⁺ T-Zellen hinzugefügt. Die Analyse der T-Zellaktivierung erfolgte nach 24 h Kultivierung mit den M-DC8⁺-Zellen durch Bestimmung der CD69-Expression im FACS.

4 Diskussion

4.1 Synthesestrategien für Antikörper-Antigen-Konjugate

Für ein effizientes Targeting von dendritischen Zellen mittels Antikörper-Antigen-Konjugaten ist es erforderlich, das betreffende Antigen kovalent an den Antikörper zu koppeln, ohne die Bindung des Antikörpers an dessen Zielstruktur auf der antigenpräsentierenden Zelle zu beeinträchtigen. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten dieses Ziel zu erreichen – Generierung von Antikörper-Antigen-Fusionsmolekülen über rekombinante DNA-Techniken, oder die chemische Kopplung. Beide Techniken werden für Targetingexperimente von dendritischen Zellen verwendet. Die Herstellung von Fusionsproteinen mittels rekombinanter DNA-Techniken erlaubt das Einfügen eines T-Zellepitopes an einer definierten Stelle des Antikörpers (Lunde et al., 2002). Auch die Orientierung und die Anzahl der T-Zellepitope pro Antikörper kann auf diese Weise festgelegt werden. Bei der Verwendung der chemischen Kopplung als Methode ist das Endprodukt weniger genau definiert, da die meisten Kopplungsreagenzien mit den freien Aminogruppen der Lysine reagieren, so daß auf jedem Protein vielfältige Möglichkeiten für die Kopplung existieren. Dadurch entsteht bei chemisch gekoppelten Antigen-Antigen-Konjugaten immer ein Gemisch aus Konjugaten mit unterschiedlicher Anzahl an T-Zellepitopen pro Antikörper. Chemische Kopplungsmethoden haben jedoch den Vorteil, dass die einzelnen Elemente leichter den experimentellen Bedingungen angepasst werden können und bei Verwendung von internen Kontrollen, d.h. Verwendung von nicht bindenden Antikörpern oder irrelevanten Antigenen zur Konjugation, sollte auch mit Hilfe von chemisch gekoppelten Konjugaten eine Aussage über die Eignung verschiedener Antikörper-Antigen-Konjugate für das Targeting von M-DC8⁺-Zellen im Sinne eines „Proof of Principle“ getroffen werden können.

Die für die Herstellung der Antikörper-Proteinantigen-Konjugate eingesetzte Kopplungsstrategie unter Verwendung der Kopplungsreagenzien Sulfo-SMCC und SATA wurde bereits von Gosselin et al. (1992) erfolgreich für die Verbesserung der Antigenpräsentation bei Monozyten eingesetzt. Die Herstellung der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate beruhte auf der gleichen Kopplungschemie, wobei die Anzahl möglicher Nebenprodukte gegenüber den Antikörper-Protein-Konjugaten aufgrund nur einer einzigen Sulfhydrylgruppe am Peptidantigen deutlich reduziert war. Ein kritischer Punkt bei den Antikörper-Peptidantigenkonjugaten ist die Nähe des T-Zellepitopes zur Kopplungsgruppe, da die das T-Zellepitop umgebenden Aminosäuren für die korrekte

Prozessierung durch das Proteasom entscheidend sind (Toes et al., 2001) und die Länge der Peptide bei der MHC-Klasse I-Präsentation nur geringfügig variieren darf, während dieser Faktor bei der MHC-Klasse II-Präsentation eine untergeordnete Rolle spielt (Rothbard und Gefter, 1991; Appella et al., 1995; Lindner und Unanue, 1996). Dies bestätigt sich auch in den durchgeführten Experimenten, da die M-DC8⁺-Zellen bei Verwendung von NS3- oder TT-Peptid-Antikörper-Konjugaten das entsprechende T-Zellepitop im MHC-Klasse II-Kontext präsentieren und eine Aktivierung der jeweiligen spezifischen T-Zellen bewirken. Für die Untersuchung der MHC-Klasse I-Präsentation wurden die Experimente mit den Her2/neu-Peptid-Konjugaten mit Hilfe von Her2/neu-Protein-Konjugaten bestätigt, um die Nähe des T-Zellepitopes zur Kopplungsgruppe als Ursache für das negative Resultat auszuschließen.

4.2 Verwendung von CD25 und CD69 als T-Zellaktivierungsmarker

Zur Analyse des Targetingeffektes von anti-CD16- und D-DC8.3-Antigen-Konjugaten wurde die Aktivierung von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklonen untersucht. Als Marker wurde entweder die CD25-Expression oder die CD69-Expression verwendet, die bereits in vielfältigen Experimenten zur Analyse der T-Zellaktivierung eingesetzt wurden. Insbesondere für den verwendeten NS3-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon wurde gezeigt, daß die CD25-Expression und die CD69-Expression zu den frühesten Ereignissen nach T-Zellrezeptor-MHC-Peptid-Interaktion gehört (Diepolder et al., 2001). Später folgt die Expression von Cytokinen (IL-4 und IFN- α) und die Proliferation der T-Zellen, wobei die dafür benötigte Antigenkonzentration ca. 30-100 fach höher liegt als zur Expression von CD25 (Diepolder et al., 2001). Die CD4⁺ T-Zellklone bleiben bei einer suboptimalen Antigenkonzentration (CD25- und CD69-Expression, keine Cytokinproduktion oder Proliferation) jedoch sensitiv für eine höhere Antigenkonzentration (Diepolder et al., 2001; Valitutti et al., 1996), d.h. es wird keine dauerhafte T-Zellanergie induziert. Eine Messung der CD25-Expression oder der CD69-Expression kann daher Auskunft geben, ob eine spezifische TCR-MHC-Interaktion stattgefunden hat. Eine derartige Messung erlaubt jedoch keine Aussage, welche Konzentrationen in-vivo benötigt werden, um eine effiziente Immunantwort zu induzieren. Ob die Gefahr einer dauerhaften Induktion von T-Zellanergie unter in-vivo Bedingungen besteht und welchen Einfluß ein Targeting von M-DC8⁺-Zellen auf das Schicksal von T-Zellen ohne bisherigen Antigenkontakt hat, ist mit Hilfe von T-Zellklonen generell nicht zu beantworten.

Bei zytotoxischen T-Zellen kann ebenfalls die Aktivierung der T-Zellen über eine Bestimmung der CD25-Expression oder der CD69-Expression ermittelt werden. Über eine

Zeitkinetik wurde der optimale Zeitpunkt für die Analyse der CD25- und CD69-Expression nach anti-CD3-Stimulation bei den Her2/neu-spezifischen T-Zellen bestimmt. Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellklonen, die bereits 14 h nach einer spezifischen T-Zellrezeptor-MHC-Peptid-Interaktion eine hohe Expression von CD25 aufwiesen, trat die CD25-Expression bei dem verwendeten CD8⁺ T-Zellklon erst ca. 48 h nach T-Zellrezeptorstimulation auf. Für CD69 lag die maximale Expression bei einem Zeitpunkt von 24 h nach Aktivierung. Dies korreliert mit den Daten von Biselli et al. (1992), die für humane T-Lymphozyten ein Maximum der CD69-Expression nach 24 h und ein Maximum der CD25-Expression nach 48 bis 72 h im Anschluß an die Aktivierung mit Phytohaemagglutinin oder Concanavalin A beobachteten. Da die CD25-Expression in den eigenen Untersuchungen auch deutlich schwächer als die CD69-Expression war, wurde CD69 als T-Zellaktivierungsmarker für die Untersuchung der Kreuzpräsentation benutzt.

4.3 D-DC8.3-Antigen und Fc̄-Rezeptor III als Zielstrukturen auf M-DC8⁺-Zellen

Der monoklonale Antikörper D-DC8.3 erkennt ein bisher unbekanntes Antigen, das von ca. 50% der M-DC8⁺-Zellen exprimiert wird. Dieses Antigen ist auch auf Nicht-M-DC8⁺-Zellen vorhanden. Allerdings unterscheiden sich die von dem Antikörper D-DC8.3 erkannten Zellen von den M-DC8⁺-Zellen nur über die unterschiedliche Expression des D-DC8.3-Antigens und des M-DC8-Antigens, da beide Zellpopulationen den CD14⁺/CD16⁺⁺-Zellen zuzuordnen sind und eine vergleichbare Expression von MHC-Molekülen und zellinienspezifischen Markern aufweisen. Damit erkennt der D-DC8.3-Antikörper sehr spezifisch eine Zellpopulation von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Die spezifische Erkennung ist insofern bedeutend, da zu Beginn dieser Arbeit noch kein Oberflächenmolekül bekannt war, das spezifisch nur auf humanen dendritischen Zellen exprimiert wird. Mit Hilfe von Antikörpern gegen CD11c wurde im Maussystem bereits in-vivo gezeigt, daß ein spezifisches Targeting von dendritischen Zellen zu einer gegen das verwendete Modellantigen gerichteten Immunantwort führt (Wang et al., 2000). Im humanen System eignet sich CD11c nicht für ein spezifisches Targeting, da CD11c neben dendritischen Zellen auch auf Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten sowie auf Subpopulationen von B-Zellen und T-Zellen exprimiert wird. Mittlerweile sind jedoch auch für humane dendritische Zellen spezifische Marker wie B7-DC (Tseng et al., 2001), BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4 (Dzionek, et al., 2000) oder DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000) identifiziert. Mit Ausnahme von DC-SIGN und BDCA-2 ist bisher nicht bekannt, inwieweit sich diese neidentifizierten DC-spezifischen Oberflächenmoleküle für die Antigenaufnahme eignen. DC-SIGN ist ein C-Type-Lektin Rezeptor, der nach Bindung seines Liganden effizient internalisiert wird und als

DC-SIGN-Ligand-Komplex zu späten Endosomen und Lysosomen transportiert wird. Antikörper gegen DC-SIGN ermöglichen eine spezifische Antigenaufnahme mit Präsentation des Antigens im MHC-Klasse II-Kontext (Engering et al., 2002). Auch BDCA-2, ein weiterer C-Typ-Lektin Rezeptor, kann die Aufnahme von rezeptor-gebundenem Antigen ermöglichen (Dzionic et al., 2001).

Die benötigte Konzentration an D-DC8.3-NS3-Peptid-Konjugat und D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat für das Targeting von M-DC8⁺-Zellen beträgt etwa 50% der benötigten Konzentration von einem unspezifischen Isotyp-Antikörper-Peptidantigen-Konjugat, um die gleiche T-Zellaktivierung zu induzieren, während bei Verwendung des anti-CD16-Peptidantigen-Konjugates eine um Faktor 100 verringerte Konzentration benötigt wird. Das Resultat mit den D-DC8.3-Konjugaten ist auf den ersten Blick für einen spezifisch bindenden Antikörper enttäuschend, allerdings wird bei der verwendeten Methode die Effizienz des Antikörpers D-DC8.3 tendenziell unterschätzt, da die Experimente mit frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen als APCs durchgeführt wurden und das D-DC8.3-Antigen nur auf ca. 50 % der M-DC8⁺-Zellen exprimiert wird. Dagegen ist die Gesamtzahl an D-DC8.3⁺-Zellen bei einem durchschnittlichen Blutspender nur geringfügig gegenüber der Zahl an M-DC8⁺-Zellen vermindert und bei allen D-DC8.3⁺-Zellen handelt es sich um professionelle APCs. Betrachtet man die T-Zellaktivierung infolge einer Bindungskinetik der Antikörper-Peptidantigen-Konjugate bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml so zeigt sich, daß die von dem D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat induzierte T-Zellaktivierung mit dem anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat vergleichbar und deutlich gegenüber dem Isotypkontrollantikörper-TT-Peptid-Konjugat verbessert ist. Da unter in-vivo Bedingungen die lokalen Konzentrationen schwanken können und sich sowohl M-DC8⁺-Zellen als auch Antikörper in Bewegung befinden, könnte die Bindungsgeschwindigkeit an antigenpräsentierende Zellen und nicht die Antigenaufnahme entscheidend für die Effizienz einer in-vivo induzierten Immunantwort sein, so daß in diesem Fall die Verwendung eines D-DC8.3-Antigen-Konjugates trotz ineffizienter Internalisierung sinnvoll sein könnte.

Der Fcγ-rezeptor III zeichnet sich als Zielstruktur dadurch aus, daß er nach Kreuzvernetzen effizient internalisiert wird, wodurch eine rasche Antigenaufnahme mit Hilfe von anti-CD16-Antigen-Konjugaten erfolgen kann. Andere Fc-Rezeptoren, insbesondere der hochaffine Fc-Rezeptor I (CD64) wurden bereits in einem in-vitro und in einem in-vivo System als Zielstrukturen für Targetingexperimente verwendet. So beobachteten Gosselin et al. (1992) bei Verwendung von humanen Monozyten als antigenpräsentierenden Zellen eine um ca. 100-fach effizientere Antigenpräsentation für ein anti-CD64-TT-Konjugat oder anti-CD32-TT-Konjugat verglichen mit unkonjugiertem Antigen. Für das ebenfalls untersuchte anti-CD16-

TT-Konjugates zeigte sich in diesem System nur eine 5- bis 10-fache Verstärkung der Antigenpräsentation. Dies steht nicht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, bei denen unter Verwendung des gleichen anti-CD16-Antikörpers 3G8 das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat eine um den Faktor 200 effizientere T-Zellaktivierung im Vergleich zu einem Isotypantikörper-TT-Peptid-Konjugat bzw. um Faktor 1000 im Vergleich zu TT-Peptid erreicht wurde, da unter Monozyten nur ein geringer Prozentsatz (10-15%) der Zellen den Fc γ -Rezeptors III exprimieren, während nahezu 100% der M-DC8⁺-Zellen eine hohe CD16-Expression aufweisen.

Antikörper gegen CD16 konkurrieren unter in-vivo Bedingungen mit den im Blut vorhandenen IgG-Molekülen, sofern sie die IgG-Bindungsstelle des Fc γ -Rezeptors als Epitop erkennen. Bei der Analyse möglicher Aufnahmewege für die Konjugate wurde auch eine Blockierung der IgG-Bindungsstelle mit 20 % humanem Serum und gereinigtem humanem IgG vorgenommen, um die Auswirkungen einer Konkurrenz mit Serum-IgG für die Effizienz des anti-CD16-TT-Peptid-Konjugates und des D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugates abschätzen zu können. Es zeigte sich, daß die Blockierung der IgG-Bindungsstellen unter den untersuchten experimentellen Bedingungen keine signifikante Reduzierung der T-Zellaktivierung nach Gabe von anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat oder D-DC8.3-TT-Peptid-Konjugat bewirkt. Eine mögliche Ursache für die effiziente T-Zellaktivierung durch das anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat bei Zugabe von humanen Serum ist das unterschiedliche Ligand-Bindungsverhalten der verschiedenen zelltypspezifischen Glycoformen des Fc γ -Rezeptors III. So erkennt der anti-CD16 Antikörper 3G8 zwar ein Epitop, das sich in oder nahe der IgG-Bindungsstelle befindet, aber es werden je nach Zelltyp sehr unterschiedliche Konzentrationen an humanem IgG benötigt, um eine Bindung des 3G8 Antikörpers zu verhindern (Tamm und Schmidt, 1996). Bei Monozyten liegt bei den normalen Blut-IgG-Konzentrationen nur eine Blockade von ca. 60 % der 3G8-Bindungsstellen vor, während sie auf NK-Zellen schon bei viel geringeren IgG-Konzentrationen vollständig blockiert sind und bei neutrophilen Granulozyten dagegen nicht zu inhibieren sind (Edberg und Kimberly, 1997). Dagegen konnten Hsieh-Ma und Kollegen (1992) bei Verwendung des bispezifischen anti-CD16 (3G8)/anti-erbB2-Antikörpers 2B1 in 100% humanen Serum keinen Verlust der Aktivität feststellen. Auch die Gruppe um Mandelboim (1999) stellte bei Verwendung des anti-CD16-Antikörpers 3G8 in Kombination mit humanen IgG nur eine leichte Verminderung der Bindung des anti-CD16-Antikörpers an den Fc γ -rezeptor III auf Nk-Zellen fest. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Menge an anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat ausreicht, die von den M-DC8⁺-Zellen trotz teilweiser CD16-Blockierung gebunden werden kann, um genügend Antigen für eine effiziente T-Zellstimulation aufzunehmen.

4.4 Möglichkeiten für das Targeting von nativen M-DC8⁺-Zellen und immaturen M-DC8⁺ dendritischen Zellen

Die vergleichende Analyse der T-Zellaktivierung durch M-DC8⁺-Zellen und immaturen M-DC8⁺ dendritischen Zellen nach Inkubation mit anti-CD16-Antigen-Konjugaten oder D-DC8.3-Antigen-Konjugaten zeigt einen Vorteil für die frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen insbesondere bei Verwendung des anti-CD16-Antigen-Konjugates. Dies ist sicherlich unter anderem darauf zurückzuführen, daß die Expression des Fc γ -Rezeptors und des D-DC8.3-Antigens mit zunehmender Kultivierungsdauer abnimmt. Insbesondere für CD16 ist die Expressionsrate bei immaturen M-DC8⁺ dendritischen Zellen ca. 100-fach verringert. Über die verringerte Expression der Zielstrukturen lässt sich aber nur die Verschiebung der zur halbmaximalen T-Zellaktivierung benötigten anti-CD16-Konjugat-Konzentrationen zu höheren Werten erklären, während sich diese Konzentration bezogen auf das D-DC8.3-Konjugat trotz Abnahme der D-DC8.3-Antigenexpression ca. fünffach verringerte. Dies deutet daraufhin, daß insbesondere die unspezifische Aufnahme durch Phagozytose oder Makropinozytose bei immaturen dendritischen Zellen gegenüber M-DC8⁺-Zellen verstärkt ist, während die rezeptor-vermittelte Endozytose unverändert bleibt, wodurch es zur verstärkten nicht gerichteten Aufnahme von Antigen kommt. Die Beobachtung, daß bei hohen Konjugatkonzentrationen die M-DC8⁺-DCs im Gegensatz zu den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen jedoch nur eine geringe T-Zellaktivierung bewirkten, lässt auf einen anderen Effekt schließen. Immature dendritische Zellen sind sehr effektiv in der Antigenaufnahme und Prozessierung, präsentieren aber im Gegensatz zu maturierten dendritischen Zellen das prozessierte Antigen nur unzureichend. So beobachteten Labeur et al. (1999) bei einem Vergleich von immaturen und maturierten murinen DCs sowohl eine deutlich verminderte Effizienz der immaturen DCs auf die in-vitro T-Zellstimulation, als auch eine verringerte Induktion einer protektiven Immunantwort gegen das Tumorstadium nach Pulsen mit tumorassoziierten Antigenen. In einer humanen Studie wurde nach Injektion von mit Antigen gepulsten immaturen dendritischen Zellen sogar eine antigenspezifische Inhibition der Funktion einer bereits vorhandenen Effektor T-Zellpopulation gefunden (Dhodapkar et al., 2001). Zusätzlich wurde in dieser Studie auch ein vermindertes Priming von naiven CD4⁺ T-Zellen beobachtet.

Die immaturen M-DC8⁺-DCs unterscheiden sich von den aus klassischen Monozyten generierten immaturen dendritischen Zellen zwar durch eine höhere Expression von HLA- und CD86-Molekülen, bei der Stimulationseffizienz eines TT-spezifischen CD4⁺ T-Zellklons nach Pulsen mit Tetanustoxoid konnte jedoch kein Unterschied beobachtet werden (de Baey et al., 2001). Auch gegenüber den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen weisen die immaturen M-

DC8⁺-DCs eine höhere Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen auf (Schäkel et al., 1998, de Baey et al., 2001); in eigenen Untersuchungen konnten allerdings nur geringe Unterschiede bei den untersuchten Donoren festgestellt werden, was an leicht unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen sowie einem anderen Blutspenderpool liegen könnte. Die Expression von HLA-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen korreliert aber nicht unbedingt mit der Kapazität zur Antigenpräsentation, da bei einem direkten Vergleich von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen mit frisch isolierten Monozyten sich die M-DC8⁺-Zellen trotz ähnlicher Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen deutlich überlegen gegenüber Monozyten bei der autologen und allogenen MLR erwiesen (Schäkel et al., 1998). Die Beobachtung, daß immature dendritische M-DC8⁺-Zellen eine höhere Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen gegenüber den frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen aufweisen, widerspricht daher nicht dem Befund, daß die frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen eine effizientere T-Zellstimulation bei hohen Antigenkonzentrationen induzieren können als immature M-DC8⁺-DCs. Bei Verwendung von CD16 als Zielstruktur kommt es auch bei den frisch isolierten Zellen nach einer Kreuzvernetzung von CD16 zu einer verstärkten Expression von HLA-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen (de Baey et al., 2001).

4.5 Fähigkeiten der M-DC8⁺-Zellen zur Antigenpräsentation

4.5.1 Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen im MHC-Klasse II-Kontext

Um die Frage zu beantworten, inwieweit sich die Zellpopulation der M-DC8⁺-Zellen für einen Immunotargetingansatz mit Hilfe von anti-CD16-Antigen- oder D-DC8.3-Antigen-Konjugaten eignet, wurden Untersuchungen zur MHC-Klasse II-Präsentation und zur Kreuzpräsentation vorgenommen. Die Analyse der MHC-Klasse II-Präsentation durch M-DC8⁺-Zellen zeigte eine hohe Effizienz der anti-CD16-basierten gerichteten Antigenaufnahme, wobei ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml eine Aktivierung des Tetanustoxoid-spezifischen T-Zellklons beobachtet wurde und die benötigte Konzentration zur halbmaximalen Aktivierung ca. 3 ng/ml anti-CD16-TT-Peptid-Konjugat betrug. Dass die induzierte T-Zellaktivierung auf einen Targetingeffekt der M-DC8⁺-Zellen zurückzuführen ist und es sich um eine spezifische Aktivierung handelt, konnte in Kontrollexperimenten durch Inkubation der T-Zellen mit den einzelnen Antikörper-Antigen-Konjugaten bzw. durch Inkubation von M-DC8⁺-Zellen und T-Zellen mit den unkonjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die Prozessierung und die MHC-Klasse II-

Präsentation oder die Effizienz der gerichteten Antigenaufnahme abhängig von dem untersuchten Antigen ist, wurden sowohl ein NS3-Peptid als auch ein TT-Peptid zur Herstellung von Konjugaten verwendet. Das Resultat dieser Experimente bestätigt, dass M-DC8⁺-Zellen antigenunabhängig über eine anti-CD16-vermittelte Antigenaufnahme eine sehr effiziente spezifische T-Zellaktivierung induzieren. Die Verbesserung der T-Zellaktivierung durch die M-DC8⁺-Zellen bei Verwendung des anti-CD16-TT-Peptid-Konjugates im Vergleich zu dem Isotypkontrollantikörper-TT-Peptid-Konjugates liegt dabei in dem Bereich der von anderen Arbeitsgruppen für ein spezifisches Antigentargeting von humanen Zellen in einem in-vitro System beobachteten Ergebnisse. So wurde je nach verwendetem T-Zellklon für mannosylierte Antigene eine 100-fache bis maximal 10.000-fache Konzentrationsverringering gegenüber nicht mannosyliertem Peptidantigen zur Erreichung der gleichen T-Zellproliferation erhalten (Tan et al., 1997). Experimente zur gerichteten Antigenaufnahme durch den Fcγ-Rezeptors I auf einer monozytären Zelllinie mit anti-CD64-(Fab')₂-Antigen-Konjugaten zeigten eine ca. 100-fache Verbesserung der Antigenpräsentation gegenüber einem irrelevanten (Fab')₂-Antigen-Konjugat oder nicht gekoppeltem Antigen (Gosselin et al., 1992). Im Maussystem wurden beim Targeting von professionellen antigenpräsentierenden Zellen durch sog. „Troybodies“, anti-MHC-Klasse II-Antikörper mit einem in die CH1-Domäne des Antikörpers integrierten T-Zellepitop, eine ca. 1000-fache Verbesserung der spezifischen T-Zellaktivierung gegenüber unspezifischen Troybodies und eine 1000-10.000-fache Verbesserung gegenüber Peptid oder Protein erzielt (Lunde et al., 2002). Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Antikörper gegen CD16 ein geeignete Zielstruktur auf M-DC8⁺-Zellen darstellen, können aber keine Auskunft darüber geben, inwieweit sich M-DC8⁺-Zellen gegenüber anderen professionellen antigenpräsentierenden Zellen bei der MHC-Klasse II-Präsentation überlegen sind. Um diese Frage zu beantworten ist ein direkter Vergleich mit anderen Zellpopulationen erforderlich. Dies ist insofern schwierig, da zum Targeting von anderen Zellpopulationen im Normalfall auch andere Zielstrukturen verwendet werden müssen. Ein Vergleich mit den immaturren dendritischen M-DC8⁺-Zellen zeigte, daß die frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen in einem breiteren Konzentrationsbereich des jeweiligen eingesetzten Konjugats in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren und auch insgesamt einen höheren prozentualen Anteil an T-Zellen aktivieren. Auch im Vergleich zu Monozyten wurde die Fähigkeit der M-DC8⁺-Zellen zur Antigenpräsentation im MHC-Klasse II-Kontext bereits untersucht. So beobachteten Schäkel et al. (1998), daß nur 600 M-DC8⁺-Zellen im Vergleich zu 2.500 Monozyten benötigt werden um eine vergleichbare Tetanustoxoid-spezifische T-Zellproliferation zu induzieren. Insgesamt lassen die eigenen Ergebnisse im Kontext mit den von anderen Arbeitsgruppen bereits publizierten Daten darauf schließen, daß M-DC8⁺-Zellen sehr effizient bei der MHC-Klasse II-Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen sind, wobei insbesondere eine gerichtete

Aufnahme des Antigens über den Fc γ -Rezeptor III zu einer deutlichen Verbesserung der spezifischen Immunantwort führt.

4.5.2 Prozessierung und Präsentation von exogen aufgenommenen Antigen im MHC-Klasse I-Kontext

Neben einer effizienten Th1-Antwort ist insbesondere bei Tumorstabilisierungsstrategien die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort erwünscht. Dazu ist es bei exogen aufgenommenem Antigen nötig, daß die Zellen in der Lage sind eine sog. Kreuzpräsentation durchzuführen, um das Antigen im MHC-Klasse I-Kontext zu präsentieren. Die Ergebnisse der Experimente mit den M-DC8⁺-Zellen deuten daraufhin, dass diese Zellen weder über eine anti-CD16-vermittelte noch über eine D-DC8.3-vermittelte Antigenaufnahme das Her2/neu-T-Zellepitop in ausreichender Menge kreuzpräsentieren können, um einen Her2/neu-spezifischen T-Zellklon zu aktivieren. Da weder bei Verwendung der Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugate, noch bei den Antikörper-Her2/neu-Protein-Konjugaten eine spezifische CD69-Aktivierung beobachtet werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass eine MHC-Klasse I Präsentation mit einem inkorrekt prozessierten Her2/neu-Peptid, das nicht mehr durch den spezifischen T-Zellklon erkannt wird, stattgefunden hat. Bei den Her2/neu-Protein-Antikörper-Konjugaten liegt das T-Zellepitop in seinem natürlichen Aminosäurekontext vor, so dass die nach einer Analyse von Toes et al. (2001) für eine Prozessierung durch das Proteasom entscheidenden Spaltungsmotive vorliegen sollten. CD28-negative zytotoxische T-Zellklone lassen sich nach alleiniger T-Zellrezeptorligierung ohne zusätzliche kostimulatorische Signale nur schwer aktivieren (Azuma et al, 1993). Um die Sensitivität der Analysemethode zu verbessern, wurde eine zusätzliche Aktivierung mit anti-NKG2D-Antikörpern vorgenommen, da eine Kostimulation über NKG2D-Rezeptoren die Aktivierung von CTLs erleichtert (Groh et al, 2001; Roberts et al., 2001). Es konnte allerdings auch bei zusätzlicher Kostimulation keine spezifische Aktivierung der T-Zellen beobachtet werden.

Die Tatsache, dass M-DC8⁺-Zellen nicht in der Lage sind, eine Kreuzpräsentation nach gezielter Antigenaufnahme über CD16 oder das D-DC8.3-Antigen durchzuführen, schließt nicht aus, dass die M-DC8⁺-Zellen eventuell über die Beteiligung anderer Rezeptoren exogenes Antigen im MHC-Klasse I-Kontext präsentieren können. So existieren für nahezu alle professionellen antigenpräsentierenden Zellen (neben dendritischen Zellen auch Makrophagen, Monozyten und B-Zellen) in vitro Studien, die die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation belegen. Obwohl mehrere Hinweise für Kreuzpräsentation nach einer Fc γ -Rezeptor-vermittelten Aufnahme des Antigens bei dendritischen Zellen vorliegen, ist es

möglich, daß nur der Fc γ -Rezeptor I das Antigen in den korrekten Prozessierungsweg transportiert. Fast alle Studien verwenden Ovalbumin als Modellantigen, das besonders leicht aufgenommen und präsentiert werden kann.

Die einzige Studie, die im humanen System ein gezieltes Targeting von antigenpräsentierenden Zellen mit Hilfe von Antigen-Antikörperperforationsproteinen beschreibt, konnte erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen eine Kreuzpräsentation des Antigens durch die humane myeloide THP-1 Zelllinie detektieren. So benutzten Wallace et al. (2001b) ein anti-CD64-Antikörperkonstrukt, bei dem die schwere Kette des Antikörpers gegen das Modellantigen Prostata Spezifisches Antigen (PSA) ausgetauscht war. Eine Kreuzpräsentation von PSA, die sie über die spezifische Lyse der THP-1 Zellen nachgewiesen haben, wurde erst ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt. Die Verwendung von zwei für unterschiedliche Peptide spezifischen CTL-Linien zeigte eine zusätzliche Variabilität in der benötigten Antigenkonzentration für die Induktion einer spezifischen Lyse. Dies entspricht einer wenigstens um das ca. 2,3-fache höheren Molarität von Antigenepitopen als die höchste eingesetzte Konzentration (20 $\mu\text{g/ml}$) der hier verwendeten Antikörper-Her2/neu-Peptid-Konjugaten (150 kDa) bzw. einer um das ca. 6,8-fache höheren Molarität im Falle der Antikörper-Her2/neu-Protein-Konjugate (10 $\mu\text{g/ml}$ höchste Konzentration, 220 kDa). Zusätzlich werden für die Induktion einer spezifischen Lyse durch aktivierte zytotoxische T-Zellen bedeutend weniger MHC-Peptid-Komplexe an der Oberfläche einer Zielzelle benötigt, als für die Aktivierung von T-Zellen durch die APC erforderlich ist. Für die Induktion von zytotoxischen Effektorzellen mit Hilfe einer derartigen anti-CD64-basierte Targetingstrategie würden daher noch wesentlich höhere Proteinkonzentrationen benötigt, da eine zu geringe Anzahl von spezifischen MHC-Peptid-Komplexen statt einer Aktivierung von T-Zellen auch zur Toleranzinduktion führen kann. Der bei den eigenen Experimenten verwendete CD28-negative zytotoxische T-Zellklon lässt sich dagegen selbst bei einer anti-CD3-Stimulation nur sehr schwierig aktivieren und benötigt zur vollständigen Aktivierung noch zusätzliche kostimulatorische Signale. Diese kostimulatorischen Signale sollten durch die M-DC8⁺-Zellen generell durch die Möglichkeit der CD40/CD40L-Interaktion zur Verfügung gestellt werden. Ein Kreuzvernetzen des CD16-Moleküls, welches Voraussetzung für die effiziente Internalisierung des anti-CD16-Antikörpers ist, führt zur Reifung der M-DC8⁺-Zellen mit einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen (de Baey et al., 2001). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die in den eigenen Experimenten angewandten Methoden nicht sensitiv genug sind, um einen geringen Anteil an kreuzpräsentiertem Antigen, äquivalent zu den in der Studie von Wallace et al. (2001) nachgewiesenen MHC-Peptid-Komplexen, zu detektieren. Ob dieser geringe Anteil an kreuzpräsentierten Antigen ausreichen würde, eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort *in vivo* zu induzieren, bleibt dagegen mehr als fraglich.

Alle anderen Studien, die eine Beteiligung von Fc-Rezeptoren an der Kreuzpräsentation nachweisen, basieren auf Mausstudien unter Verwendung von Ovalbumin als Antigen. Das nur dieses Antigen verwendet wird, mag zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass mit dem für das Ovalbuminantigen spezifischen T-Zellhybridom ein geeignetes Analysesystem vorliegt, allerdings ist es verwunderlich, dass trotz der Bedeutung der MHC-Klasse I-Präsentation für eine Tumorstabilisierung bisher noch nie tumorelevante Antigene für eine Kreuzpräsentation getestet wurden. Für Ovalbumin konnte in sehr hohen Konzentrationen auch eine Kreuzpräsentation ohne zusätzliche Kopplung an Beads oder in Verbindung von Immunkomplexen erreicht werden (Rock et al., 1990). Besonders auffällig an den Ergebnissen mit Ovalbumin ist die Tatsache, dass Beads die Aktivierung eines MHC-Klasse I restringierten Ovalbumin-spezifischen T-Zellhybrids erleichtern, ohne dass eine Kopplung von Ovalbumin und Beads vorliegen muss (Reis e Sousa und Germain, 1995). Als Erklärung für diese Ergebnisse postulieren Reis e Sousa und Germain, dass eine „Überladung der phagozytischen Kompartimente“ es einer geringen Menge an Antigen ermöglicht, in das Zytosol zu gelangen. Es bleibt daher abzuwarten, ob die Effizienz der Kreuzpräsentation von Ovalbumin nicht teilweise auf eine intrinsische Eigenschaft des Ovalbumin zurückzuführen ist, so dass Ovalbumin im Gegensatz zu anderen Antigenen leichter in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg gelangt. Diese ersten Studien zur Kreuzpräsentation wurden entweder mit Milzzellen oder Makrophagen als APCs durchgeführt, wobei zu diesem Zeitpunkt dendritische Zellen noch nicht als APCs identifiziert waren, so dass eine Kontamination mit DCs nicht ausgeschlossen werden kann. Die Beteiligung von Fc γ -Rezeptoren an der Kreuzpräsentation von Ovalbumin wurde mit unterschiedlichen antigenpräsentierenden Zellpopulationen unter Verwendung von Ovalbumin-IgG-Immunkomplexen oder Ovalbumin-IgG-Liposomen nachgewiesen. Dabei konnte eine spezifische Kreuzpräsentation von Ovalbumin über Fc γ -Rezeptoren nur mit murinen dendritischen Zellen, aber nicht mit B-Zellen (Regnault et al., 1999; Machy et al., 2000) oder Makrophagen (Rodriguez et al., 1999) detektiert werden. Dabei lag die benötigte Konzentration an Ovalbumin-Immunkomplex zur Induktion einer T-Zellantwort zwischen 0,1 und 3 μ g/ml. Die Unterschiede zwischen der murinen Studie und der humanen Studie zur Fc γ -Rezeptor-vermittelten Kreuzpräsentation können, was die benötigten Antigenkonzentrationen betrifft, einerseits auf das unterschiedliche Antigen sowie Unterschiede im Nachweissystem zurückzuführen sein, was auf eine Besonderheit des Ovalbumins hindeutet. Andererseits ist es auch möglich, dass die von Wallace et al. (2001) verwendete humane monozytäre Zell-Linie wie die murinen B-Zellen oder Makrophagen nicht zur effizienten Kreuzpräsentation fähig ist. Leider existieren noch keine in-vitro Daten zur Kreuzpräsentation von Modellantigenen mit humanen dendritischen Zellen, so dass das negative Resultat für die M-DC8⁺-Zellen auf eine mangelnde Fähigkeit zur Kreuzpräsentation insgesamt oder auf eine Nichteignung des Fc γ -Rezeptors III zur Einschleusung des Antigens in das Zytosol zurückzuführen sein kann. Eine

Beteiligung des Fc γ -Rezeptors II an der Kreuzpräsentation konnte im murinen System unter Verwendung von γ -Ketten-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden, es ist jedoch noch nicht geklärt, ob der Fc γ -Rezeptor I oder der Fc γ -Rezeptors III für die Kreuzpräsentation verantwortlich ist (Regnault et al, 1999). Alle Studien im murinen System zeigen jedoch die notwendige Involvierung des Proteasoms und eine TAP-Abhängigkeit für die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Kreuzpräsentation, während im humanen System eine Kolokalisierung von Fluoreszenz-markiertem anti-CD64-Antikörper mit MHC-Klasse I-Molekülen in besonderen MHC-Klasse I-Kompartimenten, die nicht mit den frühen oder späten endosomalen /lysosomalen Kompartimenten identisch sind, bei einer humanen myeloiden Zell-Linie festgestellt wurde (Guyre et al., 2001). Statt auf eine Einschleusung des Antigens in das Zytosol deutet das Ergebnis von Guyre et al. (2001) eher auf den ebenfalls diskutierten Mechanismus der Beladung von Antigen auf rezirkulierende MHC-Klasse I-Moleküle hin.

Da sich die Eigenschaften der dendritischen Zellen zwischen humanem und murinem System sowie zwischen einzelnen Subpopulationen von dendritischen Zellen teilweise erheblich unterscheiden können, lassen sich die Daten aus dem murinen System nur begrenzt auf die Situation im humanen System übertragen. Mit Ausnahme der murinen Ovalbuminexperimente existieren jedoch kaum in-vitro-Daten für eine rezeptor-vermittelte Kreuzpräsentation und die Ergebnisse von Wallace et al. (2001) können nur bei sehr hohen Antigenkonzentrationen eine geringe Kreuzpräsentation nachweisen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die bisher postulierten Wege für die Kreuzpräsentation nur eine untergeordnete Rolle in-vivo spielen und die beobachteten in-vivo Effekte einer Induktion von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen nach Injektion von Tumorzellen eher auf die Übertragung von bereits prozessierten Peptiden auf dendritische Zellen nach Austausch von Teilen der Zellmembran zurückzuführen sind. Harshyne et al. (2001) konnten einen derartigen Antigenaustausch zwischen dendritischen Zellen über videomikroskopische Verfahren nachweisen.

Für Vakzinierungsansätze wird daher im Moment auch die Entwicklung von Vakzinen unter Verwendung von bakteriellen Toxinen getestet, die im größeren Umfang Proteine und andere Makromoleküle in das Zytosol transportieren können. Für diese Zwecke wurden u.a. die Adenylatcyclase, das Toxin von Bordella Pertussis, Ricin und Shiga Toxin sowie Anthrax untersucht. Dabei gelang es beispielsweise mittels Integration von T-Zellepitopen in eine rekombinante Adenylatcyclase mit inaktivierter katalytischer Toxin-Domäne (Fayolle et al, 1996) eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren. Ein generelles Problem bei der Verwendung von inaktivierten Toxinen ist die teilweise bereits vorhandene Immunogenität gegen das Trägermolekül. Desweiteren ist für die Anwendung die vollständige Inaktivierung

der für die Toxizität verantwortlichen katalytischen Domänen erforderlich. Dies ist nicht bei allen Toxinen möglich, da die katalytische Domäne teilweise gleichzeitig für die Translokation ins Zytosol verantwortlich ist. Dieses Problem lässt sich durch Verwendung von kurzen Peptidsequenzen umgehen. So reicht die Homeodomäne des Antennapedium Moleküls aus, um antigene Peptidsequenzen bis zu einer Länge von ca. 50 Aminosäuren in das Zytoplasma zu transportieren. Die Prozessierung des Fusionspeptides führt dann zur MHC-Klasse I-Präsentation und zur Aktivierung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen (Schutze-Redelmeier, 1996; Chikh et al., 2001). Für eine effiziente Vakzinierung ist jedoch die Anwendung von vollständigen Proteinen statt einzelner kurzer Peptide vorteilhafter, da die Präsentation von Peptiden von dem HLA-Typ des Patienten abhängig ist. Erst vor kurzem wurden synthetische Peptide als Trägermoleküle getestet, die die Aufnahme von vollständigen Proteinen in das Zytosol von Zellen ermöglichen. Unter Verwendung des Pep-1 Peptidträgermoleküls konnten Morris und Kollegen (2001) die Aufnahme von ganzen Antikörpern unter Erhalt der Bindungsspezifität erreichen.

Insgesamt steht die Entwicklung einer Vakzine mit einer gezielten Einschleusung von exogenem Antigen in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort noch am Anfang, da fast alle erhobenen Daten zur Kreuzpräsentation durch dendritische Zellen auf der Präsentation von Ovalbumin im murinen System basieren. Die Toxin-basierten Verfahren sind genau wie die meisten Verfahren, die synthetische Peptide als Trägermoleküle verwenden, in der Länge des einzuschleusenden Antigens limitiert. Zusätzlich fehlt sowohl den Toxinen als auch den Peptiden die Spezifität für die dendritischen Zellen. Inwieweit eine Kombination aus synthetischen Peptiden oder Toxinsequenzen mit Fusionsmolekülen aus Antikörper und Tumorantigen die gezielte Aufnahme durch dendritische Zellen erlaubt, bleibt noch zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass M-DC8⁺-Zellen nicht in der Lage sind, über CD16 oder das D-DC8.3-Antigen aufgenommene Proteine in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg einzuschleusen. Um herauszufinden, ob M-DC8⁺-Zellen generell die Fähigkeit fehlt, Antigen kreuzpräsentieren zu können, da andere humane Zellpopulationen diese Aufgabe übernehmen oder ob andere Rezeptoren als CD16 auf M-DC8⁺-Zellen an der Aufnahme von exogenen Antigenen für die Kreuzpräsentation beteiligt sind, sind weitere Untersuchungen mit M-DC8⁺-Zellen, aber auch mit anderen humanen dendritischen Zellen nötig. Bisher liegen leider keine Daten mit humanen Zellen vor, die ein gezieltes Targeting von tumorrelevanten Antigenen über Oberflächenrezeptoren in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg in annähernd physiologischen Konzentrationen zeigen. Möglicherweise gelingt es über die zusätzliche Kopplung eines Transportpeptides an ein Antikörper-Antigen-

Konjugat eine Aufnahme des Antigens in das Zytosol zu erzwingen, allerdings bleibt abzuwarten, ob die Identifikation einer Peptidsequenz gelingt, die das selektive Targeting der M-DC8⁺-Zellen über den Antikörper nicht behindert.

4.6 Anwendungspotential von M-DC8⁺-Zellen für Vakzinierungsansätze

Neben der Fähigkeit tumorspezifische Antigene zu prozessieren und im MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Kontext zu präsentieren, um sowohl eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen als auch von CD4⁺ T-Zellen bewirken zu können, besitzt der Aktivierungsstatus der antigenpräsentierenden Zelle eine grosse Bedeutung für den Erfolg einer Vakzinierung. So kann ein Mangel an kostimulatorischen Molekülen, wie schon in der Einleitung erwähnt, Anergie bei naiven T-Zellen induzieren und ein unterschiedliches Cytokinprofil die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu einem Th1- oder Th2-Zellen beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur einige grundlegende Untersuchungen zum Aktivierungsstatus der M-DC8⁺-Zellen vorgenommen. Mit der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 besitzen M-DC8⁺-Zellen prinzipiell die Voraussetzungen, naive T-Zellen zu aktivieren. Im Rahmen einer Kultivierung in GM-CSF und IL-4 sowie zusätzlicher Stimulation mit LPS wird die Expression von CD86 und CD40 noch gesteigert und zusätzlich CD80 exprimiert. In diesem Zustand werden die für die Antigenaufnahme benötigten Rezeptoren nicht oder nur sehr schwach exprimiert, so dass eine gezielte Aufnahme über CD16 oder das D-DC8.3-Antigen nicht mehr möglich ist. Auch die Antigenaufnahme über Makropinozytose und Phagozytose ist bei maturierten dendritischen Zellen kaum noch vorhanden, so dass eine Verbesserung der T-Zellaktivierung nur über eine Maturierung nach abgeschlossener Antigenaufnahme zu erreichen wäre. Auch frisch isolierte M-DC8⁺-Zellen lassen sich über ein Kreuzvernetzen des Fc γ -Rezeptors III maturieren, was zu einer verstärkten Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen führt (de Baey et al., 2001). Eine zielgerichtete Antigenaufnahme über CD16 unter gleichzeitiger Kreuzvernetzung des Rezeptors könnte auch die Maturierung der M-DC8⁺-Zellen bewirken. Das Kreuzvernetzen von CD16 sollte allerdings trotz schnellerer Internalisierung und damit effizienterer Antigenaufnahme vermieden werden, da sonst, wie bei Verwendung von bispezifischen anti-CD16/anti-Tumorantigen Antikörpern beobachtet wurde, auch andere Zellen wie NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen aktiviert werden, was zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann. Sollte eine zusätzliche Maturierung der M-DC8⁺-Zellen erforderlich sein, könnte dies über die Kopplung eines zusätzlichen Maturierungsstimulus wie z.B. CpG-Oligonukleotiden (Gursel et al., 2002) an den Antikörper-Antigen-Komplex erfolgen.

Die Untersuchungen von Schäkel et al. (2002), die für M-DC8⁺-Zellen gegenüber den humanen Blut-DC-Populationen DC1 und DC2 eine verbesserte Stimulation von autologen T-Zellen bei Verwendung des Neo-Antigens KLH nachweisen konnten, geben Hinweise auf eine Fähigkeit der M-DC8⁺-Zellen zum Priming von naiven T-Zellen. Zusammen mit den Untersuchungen von de Baey et al. (2001), die eine Polarisierung von naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut zum proinflammatorischen Th1-Typ nach Stimulation mit CD40L aktivierten M-DC8⁺-DCs zeigen konnten und der Beobachtung, dass M-DC8⁺-Zellen bevorzugt das proinflammatorische Cytokin TNF- α , aber kein IL-10 bei Erhalt eines bakteriellen Stimulus sekretieren, lässt sich ein proinflammatorisches Profil bei den M-DC8⁺-Zellen erkennen. Dies verringert die Gefahr über die gerichtete Antigenaufnahme das Gegenteil der gewünschten Immunreaktion, nämlich Immuntoleranz, auszulösen. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch M-DC8⁺-Zellen bei Fehlen eines bakteriellen Stimulus regulatorische T-Zellen induzieren können, wie es für immature humane dendritische Zellen von Jonuleit et al. (2000) gezeigt wurde. Zusätzlich verhindern hohe IL-10 Konzentrationen während der DC-Entwicklung die vollständige Maturierung von dendritischen Zellen, so dass die resultierenden dendritischen Zellen eine Toleranzinduktion bewirken (Steinbrink et al., 1997 und 1999).

Insgesamt konnte für die M-DC8⁺-Zellen ein limitiertes Potential für die Verwendung in Vakzinierungsansätzen festgestellt werden. Insbesondere für die Tumorstimmulierung ist die Präsentation im MHC Klasse I-Kontext zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen von Bedeutung. Den M-DC8⁺-Zellen fehlt jedoch die Fähigkeit mittels anti-CD16 oder D-DC8.3-Antigen-Konjugaten das exogen aufgenommene Antigen in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg einzuschleusen. Allerdings ist es auch für andere humane dendritische Zellpopulationen bisher noch nicht gelungen, eine effiziente Kreuzpräsentation von Tumorantigenen bei Gabe des Antigens in annähernd physiologischen Mengen nachzuweisen. Ob und welche endozytotischen Rezeptoren im humanen System für die Kreuzpräsentation von Tumorantigenen in-vivo bei M-DC8⁺-Zellen und anderen dendritischen Zellen eine Rolle spielen, bleibt noch zu untersuchen. Solange keine geeigneten Rezeptoren auf M-DC8⁺-Zellen für die gezielte Aufnahme von exogenem Antigen in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg identifiziert sind oder die Toxin- oder Peptid-basierten Verfahren mit dem spezifischen Targeting von M-DC8⁺-Zellen vereinbar sind, bleibt die Anwendbarkeit der M-DC8⁺-Zellen in Vakzinierungsansätzen auf die Induktion einer CD4⁺ T-Zellantwort beschränkt. In den Experimenten konnte für die M-DC8⁺-Zellen eine effiziente MHC-Klasse II-Präsentation, insbesondere nach Antigenaufnahme durch anti-CD16-Antigen-Konjugate, nachgewiesen werden. Daher sollte gegebenenfalls zum Targeting von M-DC8⁺-Zellen eine Vakzine basierend auf einem anti-CD16-Antikörper verwirklicht werden. Da CD16 noch auf anderen nicht antigenpräsentierenden Zellpopulationen wie den NK-Zellen vorkommt, wäre zur

Erhöhung der Spezifität für die Zellpopulation der M-DC8⁺-Zellen eine Kombination aus CD16-Spezifität und D-DC8.3 zu erwägen. Die Tendenz der M-DC8⁺-Zellen zur Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen und die Potenz von frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen eine effizientere Proliferation von autologen T-Zellen bei Gabe des Neo-Antigens KLH als Monozyten oder die dendritischen Zellen DC1 zu induzieren, lassen auf eine besondere Eignung der M-DC8⁺-Zellen für die Induktion einer potenten Th1 T-Zellantwort in-vivo durch Antigen Targeting hoffen. In jedem Fall sind jedoch weitere Untersuchungen mit dem Ziel andere Zielstrukturen auf den M-DC8⁺-Zellen zu identifizieren sinnvoll, um die effiziente Internalisierung eines anti-CD16-Antikörpers mit der Spezifität eines D-DC8.3-Antikörpers in einem Targetingkonstrukt kombinieren zu können und im Idealfall auch gleichzeitig eine Präsentation des Antigens im MHC-Klasse I-Kontext zu erreichen.

4.7 Ausblick

Die gezielte Aufnahme von tumorrelevanten Antigenen durch dendritische Zellen über Antikörper-Tumorantigen-Fusionsmoleküle stellt trotz bisher fehlender klinischer Untersuchungen eine attraktive Möglichkeit zur Verbesserung der Effizienz von Tumorstimmungen dar, da diese nicht die gleichen komplizierten Aufwendungen erfordern wie eine in-vitro Beladung von dendritischen Zellen mit Antigen und anschließender Reinfusion der dendritischen Zellen in den Patienten. Bevor diese Ansätze aber für den Einsatz in der Klinik in Frage kommen, sind noch einige Limitationen der bisherigen Ansätze zu überwinden. Ähnlich wie die mit den M-DC8⁺-Zellen erhaltenen eigenen Ergebnisse, die über ein CD16-vermitteltes Antigen-Targeting eine effiziente Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen zeigen, zielen bisherige Targetingansätze auf eine Verbesserung der MHC-Klasse II-Präsentation ab. Die dabei zu erreichende Verbesserung der Antigenpräsentation bei in-vitro Experimenten gegenüber nicht gerichtet aufgenommenem Antigen liegt dabei im Rahmen der mit den anti-CD16-Antigen-Konjugaten erhaltenen Ergebnisse. Im Gegensatz zu dem im murinen System vorhandenen DC-spezifischen Marker CD11c fehlten bis vor kurzem im humanen System DC-spezifische Antigene. Ein zukünftiges Ziel ist es, die neu identifizierten DC-spezifischen Oberflächenmoleküle wie BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 (Dzionek et al, 2000) näher auf ihre Eignung als Zielstruktur für das Antigen-Targeting hin zu untersuchen. Für die M-DC8⁺-Zellen existiert mit dem D-DC8.3-Antigen ein sehr spezifischer Marker für eine verhältnismäßig homogene antigenpräsentierende Zellpopulation. Leider erwies sich die geringe Internalisierung des D-DC8.3-Antigens als limitierender Faktor für dessen Verwendung für den Antigentransport. Möglicherweise lässt sich aber über eine Kombination von D-DC8.3 und anti-CD16 die spezifische Erkennung der M-DC8⁺-Zellen mit der effizienten Antigenaufnahme verbinden.

Die Frage, wie eine effiziente Kreuzpräsentation von exogenem Antigen erreicht werden kann, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden, so dass in diesem Bereich die *in vitro* Beladung von dendritischen Zellen mittels Pulsen mit Peptid, Transfektion mit DNA oder Fusion mit Tumorzellen zur Zeit die einzige Möglichkeit darstellt, eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort zusätzlich zur T-Helferzellantwort zu erzielen. Die in murinen Experimenten gezeigte Effizienz von Fc-Rezeptor-vermittelter Aufnahme von Ovalbumin in den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg, die entweder auf den Fc γ -Rezeptor I oder den Fc γ -Rezeptor III zurückzuführen ist, konnte im humanen System weder von Wallace et al. (2001) für das CD64-vermittelte Antigentargeting noch in den eigenen Untersuchungen mit den M-DC8⁺-Zellen unter Verwendung der CD16-vermittelten Antigenaufnahme bestätigt werden. Erfolgreiche Ergebnisse zur Einschleusung von exogen aufgenommenen Antigenen in das Zytosol wurden mit bakteriellen Toxinen oder synthetischen Peptiden erzielt. Diese werden jedoch unspezifisch von allen Zellpopulationen aufgenommen, so dass das Antigen nicht nur von dendritischen Zellen präsentiert wird und eine derartige Vakzinierungsstrategie daher eher der konventionellen Vakzinierung mit Antigen plus Adjuvans entspricht. Die Entwicklung einer Strategie zur Kombination von gezielter Antigenaufnahme durch dendritische Zellen und Translokation des Antigens in das Zytosol stellt zur Zeit die grösste Herausforderung bei der Tumorkvakzinierung mittels Antigentargeting dar.

5 Zusammenfassung

Antikörper-Antigen-Konjugate, die Oberflächenstrukturen auf dendritischen Zellen spezifisch erkennen, bieten im Prinzip die Möglichkeit, tumorrelevante Antigene gezielt zu antigenpräsentierenden Zellen zu transportieren, um eine Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen zu induzieren. Der Vorteil gegenüber anderen Tumorstimmungsstrategien, z.B. basierend auf mit Tumorantigenen gepulsten Dendritischen Zellen (DC) oder Tumor-DC-Fusionen, besteht in dem Verzicht auf die aufwendige Isolierung und in-vitro-Kultivierung von DCs aus dem Blut von Patienten vor der Therapie, die auf den Patienten abgestimmt nur in speziellen Kliniken durchgeführt werden kann.

M-DC8⁺-Zellen repräsentieren eine erst kürzlich identifizierte Subpopulation von im Blut vorkommenden professionellen antigenpräsentierenden Zellen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den myeloiden dendritischen Zellen (DC1) im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf ihre Eignung für die Tumorstimmung untersucht wurden. Charakteristisch für die M-DC8⁺-Zellen ist eine hohe Expression des Fcγ-Rezeptors III. Da Fc-Rezeptoren an der Antigenaufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose beteiligt sind und im murinen System experimentelle Hinweise auf eine Präsentation des über Fc-Rezeptoren aufgenommenen Antigens im MHC-Klasse I-Kontext vorlagen, wurde CD16 als Zielstruktur für das Antigen-Targeting von M-DC8⁺-Zellen gewählt.

Als zweite Zielstruktur wurde ein bislang unbekanntes Oberflächenmolekül untersucht, das auf ca. 50% der M-DC8⁺-Zellen von dem monoklonalen Antikörper D-DC8.3 erkannt wird. Die phänotypische Charakterisierung der D-DC8.3⁺-Zellen ergab, dass die D-DC8.3⁺-Zellen bis auf die unterschiedliche Bindung der monoklonalen Antikörper M-DC8 und D-DC8.3 mit den M-DC8⁺-Zellen identisch sind, so dass unter Verwendung des D-DC8.3-Antikörpers ein spezifisches Targeting von dendritischen Zellen möglich erscheint. Durch chemische Kopplung wurden Konjugate aus den Antikörpern anti-CD16 bzw. D-DC8.3 einerseits und einem wohletablierten Antigen, welches ein T-Zellepitop beinhaltet, andererseits hergestellt und diese mit frisch isolierten M-DC8⁺-Zellen auf ihre Wirkungsweise getestet. Zur Analyse der Antigenpräsentation wurde in einer durchflußzytometrischen Messung die Aktivierung von T-Zellklonen untersucht.

Die M-DC8⁺-Zellen zeigten bei einer CD16-vermittelten Antigenaufnahme eine gegenüber freiem Antigen oder einem Konjugat mit einem irrelevanten Antikörper deutlich verbesserte MHC-Klasse II-Präsentation. Für das anti-CD16-Antigen-Konjugat betrug die zur halbmaximalen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen benötigte Konjugatkonzentration nur 3 ng/ml und lag damit um mehr als den Faktor 100 niedriger als für das freie Antigen oder die Konjugat-Isotypkontrolle. Das D-DC8.3-Antigen-Konjugat erzielte eine im Vergleich zum

anti-CD16-Antigen-Konjugat schwächere T-Zellaktivierung, was vermutlich auf eine ineffiziente Internalisierung zurückzuführen ist, da die Kinetik für die Bindung auf M-DC8⁺-Zellen für D-DC8.3 und anti-CD16 (Klon 3G8) vergleichbar war.

Die Untersuchung der MHC-Klasse I-Präsentation zeigte weder über eine anti-CD16-vermittelte, noch über eine D-DC8.3-vermittelte Antigenaufnahme eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Eine fehlerhafte Prozessierung aufgrund der in den Antikörper-Peptidantigen-Konjugaten gegenüber dem natürlichen Antigen veränderten Aminosäureumgebung konnte durch Herstellen weiterer Konjugate mit vollständigem Proteinantigen sowie ein generelles Aktivierungsproblem der T-Zellen durch geeignete Kontrollexperimente als Ursache ausgeschlossen werden.

Damit lässt sich feststellen, dass M-DC8⁺-Zellen grundsätzlich in der Lage sind, nach CD16-vermittelter Antigenaufnahme eine potente Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels MHC-Klasse II zu induzieren, jedoch fehlt den Zellen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse I nach Aufnahme des Antigens über den Fc γ -Rezeptor III oder das D-DC8.3-Antigen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	internationale Nomenklatur für Oberflächenmarker (Cluster of Differentiation)
CDR	„Complementary Determining Region“
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zellen
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerretich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanin“
MACS	„Magnetic-Activated Cell Sorting“
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

NK	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	„Peripheral Blood Mononuclear Cells“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
rpm	„rounds per minutes“
RT	Raumtemperatur
scFv	„single-chain Fragment of variable domains“
SATA	N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TT	Tetanustoxoid
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
VL	variable Domäne der leichten Kette
VH	variable Domäne der schweren Kette

7 Literaturverzeichnis

- Albert, M. L., Jegathesan, M. und Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. Nat Immunol 2: 1010-7.
- Albert, M. L., Sauter, B. und Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 392: 86-9.
- Amigorena, S. (2002). Fc gamma receptors and cross-presentation in dendritic cells. J Exp Med 195: F1-3.
- Amigorena, S. und Bonnerot, C. (1999). Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. Semin Immunol 11: 385-90.
- Amigorena, S., Lankar, D., Briken, V., Gapin, L., Viguier, M. und Bonnerot, C. (1998). Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. J Exp Med 187: 505-15.
- Anderson, C. L., Shen, L., Eicher, D. M., Wewers, M. D. und Gill, J. K. (1990). Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. J Exp Med 171: 1333-45.
- Anderson, K., Cresswell, P., Gammon, M., Hermes, J., Williamson, A. und Zweerink, H. (1991). Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. J Exp Med 174: 489-92.
- Apostolopoulos, V., Barnes, N., Pietersz, G. A. und McKenzie, I. F. (2000). Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. Vaccine 18: 3174-84.
- Appella, E., Padlan, E. A. und Hunt, D. F. (1995). Analysis of the structure of naturally processed peptides bound by class I and class II major histocompatibility complex molecules. Exs 73: 105-19.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1993). Requirements for CD28-dependent T cell-mediated cytotoxicity. J Immunol 150: 2091-101.
- Azuma, M., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1993). CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. J Immunol 150: 1147-59.
- Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-52.
- Barclay A.N., Brown M.H., Law S.K.A., McKnight A.J., Tomlinson M.G. und P.A., v. d. M. (1997). The Leucocyte Antigen Factsbook, 2nd Edition. London/ San Diego, Academic Press.

Barratt-Boyes, S. M., Zimmer, M. I., Harshyne, L. A., Meyer, E. M., Watkins, S. C., Capuano, S., 3rd, Murphey-Corb, M., Falo, L. D., Jr. und Donnenberg, A. D. (2000). Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. J Immunol 164: 2487-95.

Baselga, J. (2001). Phase I and II clinical trials of trastuzumab. Ann Oncol 12 Suppl 1: S49-55.

Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A. und Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. Semin Oncol 28: 4-11.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. und Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. J Exp Med 186: 65-70.

Berzofsky, J. A., Ahlers, J. D. und Belyakov, I. M. (2001). Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. Nat Rev Immunol 1: 209-19.

Biragyn, A. und Kwak, L. W. (2000). Designer cancer vaccines are still in fashion. Nat Med 6: 966-8.

Biragyn, A., Tani, K., Grimm, M. C., Weeks, S. und Kwak, L. W. (1999). Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. Nat Biotechnol 17: 253-8.

Biselli, R., Matricardi, P. M., D'Amelio, R. und Fattorossi, A. (1992). Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. Scand J Immunol 35: 439-47.

Caux, C., Massacrier, C., Dubois, B., Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., Durand, I., Schmitt, D. und Saeland, S. (1999). Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. J Leukoc Biol 66: 781-91.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A. und Banchereau, J. (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. Blood 90: 1458-70.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. und Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med 180: 1263-72.

- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. und Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. Nature 388: 782-7.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. und Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. Nat Immunol 1: 305-10.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. und Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med 5: 919-23.
- Chikh, G. G., Kong, S., Bally, M. B., Meunier, J. C. und Schutze-Redelmeier, M. P. (2001). Efficient delivery of Antennapedia homeodomain fused to CTL epitope with liposomes into dendritic cells results in the activation of CD8+ T cells. J Immunol 167: 6462-70.
- Chiu, I., Davis, D. M. und Strominger, J. L. (1999). Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 13944-9.
- Coligan, J. E., Ed. (1992). Current protocols in Immunology. New York, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.
- Daeron, M. (1997). Fc receptor biology. Annu Rev Immunol 15: 203-34.
- de Baey, A., Mende, I., Riethmueller, G. und Baeuerle, P. A. (2001). Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. Eur J Immunol 31: 1646-55.
- Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R. und van de Winkel, J. G. (1997). Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. Immunol Today 18: 127-35.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. und Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med 193: 233-8.
- Diepolder, H. M., Gruener, N. H., Gerlach, J. T., Jung, M. C., Wierenga, E. A. und Pape, G. R. (2001). Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4(+) T-cell clones. J Virol 75: 7803-10.
- Dreier, T., Lorenczewski, G., Brandl, C., Hoffmann, P., Syring, U., Hanakam, F., Kufer, P., Riethmuller, G., Bargou, R. und Baeuerle, P. A. (2002). Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. Int J Cancer 100: 690-7.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W. und Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol 165: 6037-46.

- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y. und Schmitz, J. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. J Exp Med 194: 1823-34.
- Edberg, J. C. und Kimberly, R. P. (1997). Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIIa (CD16): differential ligand binding. J Immunol 159: 3849-57.
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V. und van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. J Immunol 168: 2118-26.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F. und Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J Immunol 157: 541-8.
- Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A. und Leclerc, C. (1996). In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis carrying viral CD8+ T cell epitopes. J Immunol 156: 4697-706.
- Galon, J., Robertson, M. W., Galinha, A., Mazieres, N., Spagnoli, R., Fridman, W. H. und Sautes, C. (1997). Affinity of the interaction between Fc gamma receptor type III (Fc gammaRIII) and monomeric human IgG subclasses. Role of Fc gammaRIII glycosylation. Eur J Immunol 27: 1928-32.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E. und Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. Cell 102: 325-34.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. und Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. Cell 100: 575-85.
- Gerber, J. S. und Mosser, D. M. (2001). Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc gamma receptors. Microbes Infect 3: 131-9.
- Gosselin, E. J., Wardwell, K., Gosselin, D. R., Alter, N., Fisher, J. L. und Guyre, P. M. (1992). Enhanced antigen presentation using human Fc gamma receptor (monocyte/macrophage)-specific immunogens. J Immunol 149: 3477-81.
- Gouttefangeas, C. und Rammensee, H. G. (2000). Problem solving for tumor immunotherapy. Nat Biotechnol 18: 491-2.

- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. und Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. Nat Immunol 2: 255-60.
- Gromme, M., Uytdehaag, F. G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J., Tulp, A., Verwoerd, D. und Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10326-31.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. und Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med 185: 1101-11.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. und Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 20: 621-67.
- Gursel, M., Verthelyi, D. und Klinman, D. M. (2002). CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. Eur J Immunol 32: 2617-22.
- Guyre, C. A., Barreda, M. E., Swink, S. L. und Fanger, M. W. (2001). Colocalization of Fc gamma RI-targeted antigen with class I MHC: implications for antigen processing. J Immunol 166: 2469-78.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. und Barratt-Boyes, S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. J Immunol 166: 3717-23.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichentopf, B., Kloft, M. und Pfreundschuh, M. (1997). Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. Blood 89: 2042-7.
- Heath, W. R. und Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 19: 47-64.
- Heijnen, I. A., van Vugt, M. J., Fanger, N. A., Graziano, R. F., de Wit, T. P., Hofhuis, F. M., Guyre, P. M., Capel, P. J., Verbeek, J. S. und van de Winkel, J. G. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. J Clin Invest 97: 331-8.
- Honeychurch, J., Tutt, A. L., Valerius, T., Heijnen, I. A., Van De Winkel, J. G. und Glennie, M. J. (2000). Therapeutic efficacy of Fc gamma RI/CD64-directed bispecific antibodies in B-cell lymphoma. Blood 96: 3544-52.
- Hsieh-Ma, S. T., Eaton, A. M., Shi, T. und Ring, D. B. (1992). In vitro cytotoxic targeting by human mononuclear cells and bispecific antibody 2B1, recognizing c-erbB-2 protooncogene product and Fc gamma receptor III. Cancer Res 52: 6832-9.

- Iezzi, G., Karjalainen, K. und Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. Immunity 8: 89-95.
- Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D. und Lanzavecchia, A. (1999). The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. Eur J Immunol 29: 4092-101.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I. und Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. J Exp Med 191: 927-36.
- Irvine, A. S., Trinder, P. K., Laughton, D. L., Ketteringham, H., McDermott, R. H., Reid, S. C., Haines, A. M., Amir, A., Husain, R., Doshi, R., Young, L. S. und Mountain, A. (2000). Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. Nat Biotechnol 18: 1273-8.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. und Ikehara, S. (1999). A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. J Immunol 163: 1409-19.
- Janeway, C. A. (1999). Immunobiology : the immune system in health and disease. London, Current Biology Publ. [u.a.].
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol Today 13: 11-6.
- Javois, L. C., Ed. (1994). Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192: 1213-22.
- Kalergis, A. M. und Ravetch, J. V. (2002). Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcgamma receptors on dendritic cells. J Exp Med 195: 1653-9.
- Kaufman, P. A., Guyre, P. M., Lewis, L. D., Valone, F. H., Memoli, V., Wells, W. A. A., Deo, Y. M., Ernstoff, M. S., Fischer, J., Mrozek-Orlowski, M., Phipps, K. und Fanger, M. W. (1996). Her-2/neu targeted immunotherapy: a pilot study of multi-dose MDX-210 in patients with breast or ovarian cancers that overexpress Her2/neu and a report of an increased incidence of Her2/neu overexpression in metastatic breast cancer. Tumor Targeting 2: 17-28.

- Ke, Y. und Kapp, J. A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. J Exp Med 184: 1179-84.
- Kedl, R. M., Schaefer, B. C., Kappler, J. W. und Murrack, P. (2002). T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. Nat Immunol 3: 27-32.
- Klein, J. und Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. N Engl J Med 343: 702-9.
- Klein, J. und Sato, A. (2000). The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med 343: 782-6.
- Klenerman, P., Cerundolo, V. und Dunbar, P. R. (2002). Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. Nat Rev Immunol 2: 263-72.
- Knabel, M., Franz, T. J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H. und Busch, D. H. (2002). Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. Nat Med 8: 631-7.
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G. und Maurer, D. (1999). Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. J Immunol 163: 3250-9.
- Kreitman, R. J., Wilson, W. H., Bergeron, K., Raggio, M., Stetler-Stevenson, M., FitzGerald, D. J. und Pastan, I. (2001). Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. N Engl J Med 345: 241-7.
- Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G. A. und Ringert, R. H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. Nat Med 6: 332-6.
- Labeur, M. S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T. und Grabbe, S. (1999). Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. J Immunol 162: 168-75.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol 1: 311-6.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M. und Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. Science 295: 1539-42.

- Li, J., Holmes, L. M., Franek, K. J., Burgin, K. E., Wagner, T. E. und Wei, Y. (2001). Purified hybrid cells from dendritic cell and tumor cell fusions are superior activators of antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother 50: 456-62.
- Lindner, R. und Unanue, E. R. (1996). Distinct antigen MHC class II complexes generated by separate processing pathways. Embo J 15: 6910-20.
- Lipscomb, M. F. und Masten, B. J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. Physiol Rev 82: 97-130.
- Lu, L., Bonham, C. A., Liang, X., Chen, Z., Li, W., Wang, L., Watkins, S. C., Nalesnik, M. A., Schlissel, M. S., Demestris, A. J., Fung, J. J. und Qian, S. (2001). Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses. J Immunol 166: 7042-52.
- Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (2000). Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. J Exp Med 191: 795-804.
- Lunde, E., Western, K. H., Rasmussen, I. B., Sandlie, I. und Bogen, B. (2002). Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific Troybodies. J Immunol 168: 2154-62.
- MacAry, P. A., Lindsay, M., Scott, M. A., Craig, J. I., Luzio, J. P. und Lehner, P. J. (2001). Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 3982-7.
- Machy, P., Serre, K. und Leserman, L. (2000). Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcgamma receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. Eur J Immunol 30: 848-57.
- Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H. und Jonuleit, H. (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. Immunol Cell Biol 80: 477-83.
- Maloney, D. G. (1999). Preclinical and phase I and II trials of rituximab. Semin Oncol 26: 74-8.
- Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. und Levy, R. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Blood 90: 2188-95.
- Maloney, D. G., Smith, B. und Rose, A. (2002). Rituximab: mechanism of action and resistance. Semin Oncol 29: 2-9.

- Manca, F., Fenoglio, D., Li Pira, G., Kunkl, A. und Celada, F. (1991). Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. J Exp Med 173: 37-48.
- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D. M., Jo, C. H., Boyson, J. E. und Strominger, J. L. (1999). Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 5640-4.
- Masuda, M. und Roos, D. (1993). Association of all three types of Fc gamma R (CD64, CD32, and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes. J Immunol 151: 7188-95.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol 12: 991-1045.
- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. und Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nat Biotechnol 19: 1173-6.
- Nestle, F. O., Banchereau, J. und Hart, D. (2001). Dendritic cells: On the move from bench to bedside. Nat Med 7: 761-5.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. und Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. Eur J Immunol 27: 280-8.
- Norbury, C. C., Hewlett, L. J., Prescott, A. R., Shastri, N. und Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. Immunity 3: 783-91.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. und Steinman, R. M. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunology 82: 487-93.
- Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S. A., Twaddell, T., Glaspy, J. A. und Slamon, D. J. (1998). Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. J Clin Oncol 16: 2659-71.
- Ravetch, J. V. und Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol 19: 275-90.
- Ravetch, J. V. und Kinet, J. P. (1991). Fc receptors. Annu Rev Immunol 9: 457-92.

- Reeves, M. E., Royal, R. E., Lam, J. S., Rosenberg, S. A. und Hwu, P. (1996). Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. Cancer Res 56: 5672-7.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. und Amigorena, S. (1999). Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. J Exp Med 189: 371-80.
- Reis e Sousa, C. und Germain, R. N. (1995). Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. J Exp Med 182: 841-51.
- Renner, C., Hartmann, F. und Pfreundschuh, M. (1997). Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. Cancer Immunol Immunother 45: 184-6.
- Renner, C., Stehle, I., Lee, F. T., Hall, C., Catimel, B., Nice, E. C., Mountain, A., Rigopoulos, A., Brechbiel, M. W., Pfreundschuh, M. und Scott, A. M. (2001). Targeting properties of an anti-CD16/anti-CD30 bispecific antibody in an in vivo system. Cancer Immunol Immunother 50: 102-8.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. und Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science 283: 1183-6.
- Roberts, A. I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C. und Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. J Immunol 167: 5527-30.
- Robinson, S. P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S. C. und Reid, C. D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. Eur J Immunol 29: 2769-78.
- Rock, K. L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. Immunol Today 17: 131-7.
- Rock, K. L., Gamble, S. und Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. Science 249: 918-21.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. und Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. Nat Cell Biol 1: 362-8.

- Rothbard, J. B. und Gefer, M. L. (1991). Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. Annu Rev Immunol 9: 527-65.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. und Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med 182: 389-400.
- Sallusto, F. und 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 alpha. J Exp Med 179: 1109-18.
- Salter, R. D. und Cresswell, P. (1986). Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. Embo J 5: 943-9.
- Schakel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M. und Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a Novel Carbohydrate Modification of PSGL-1, Defines an Inflammatory Type of Human Dendritic Cells. Immunity 17: 289.
- Schakel, K., Mayer, E., Federle, C., Schmitz, M., Riethmuller, G. und Rieber, E. P. (1998). A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. Eur J Immunol 28: 4084-93.
- Schakel, K., Poppe, C., Mayer, E., Federle, C., Riethmuller, G. und Rieber, E. P. (1999). M-DC8+ leukocytes--a novel human dendritic cell population. Pathobiology 67: 287-90.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. und Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature 393: 480-3.
- Schutze-Redelmeier, M. P., Gournier, H., Garcia-Pons, F., Moussa, M., Joliot, A. H., Volovitch, M., Prochiantz, A. und Lemonnier, F. A. (1996). Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by Drosophila antennapedia homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. J Immunol 157: 650-5.
- Shortman, K. und Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol 2: 151-61.
- Siedlar, M., Frankenberger, M., Ziegler-Heitbrock, L. H. und Belge, K. U. (2000). The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. Immunobiology 202: 11-7.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D. und Schild, H. (2000).

Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. J Exp Med 191: 1965-74.

Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. Blood 93: 1634-42.

Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. und Enk, A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol 159: 4772-80.

Steinman, R. M. und Dhodapkar, M. (2001). Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. Int J Cancer 94: 459-73.

Steinman, R. M. und Swanson, J. (1995). The endocytic activity of dendritic cells. J Exp Med 182: 283-8.

Suss, G. und Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. J Exp Med 183: 1789-96.

Syme, R. und Gluck, S. (2001). Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical applications. Transfus Apheresis Sci 24: 117-24.

Tamm, A. und Schmidt, R. E. (1996). The binding epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. J Immunol 157: 1576-81.

Tan, M. C., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C., Ottenhoff, T. H., Tulp, A., Neefjes, J. J. und Koning, F. (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. Eur J Immunol 27: 2426-35.

Titus, J. A., Perez, P., Kaubisch, A., Garrido, M. A. und Segal, D. M. (1987). Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. J Immunol 139: 3153-8.

Toes, R. E., Nussbaum, A. K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N. P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T. P., Muller, J., Schonfisch, B., Schmid, C., Fehling, H. J., Stevanovic, S., Rammensee, H. G. und Schild, H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. J Exp Med 194: 1-12.

Traunecker, A., Oliveri, F. und Karjalainen, K. (1991). Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. Trends Biotechnol 9: 109-13.

- Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M. und Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. J Exp Med 193: 839-46.
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M. und Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. Science 288: 522-7.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J. und et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309: 418-25.
- Valitutti, S., Muller, S., Dessing, M. und Lanzavecchia, A. (1996). Signal extinction and T cell repolarization in T helper cell-antigen-presenting cell conjugates. Eur J Immunol 26: 2012-6.
- van Sriel, A. B., van Ojik, H. H. und van De Winkel, J. G. (2000). Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. Immunol Today 21: 391-7.
- Wallace, P. K., Kaufman, P. A., Lewis, L. D., Keler, T., Givan, A. L., Fisher, J. L., Waugh, M. G., Wahner, A. E., Guyre, P. M., Fanger, M. W. und Ernstoff, M. S. (2001). Bispecific antibody-targeted phagocytosis of HER-2/neu expressing tumor cells by myeloid cells activated in vivo. J Immunol Methods 248: 167-82.
- Wallace, P. K., Tsang, K. Y., Goldstein, J., Correale, P., Jarry, T. M., Schlom, J., Guyre, P. M., Ernstoff, M. S. und Fanger, M. W. (2001). Exogenous antigen targeted to FcγRI on myeloid cells is presented in association with MHC class I. J Immunol Methods 248: 183-94.
- Wang, H., Griffiths, M. N., Burton, D. R. und Ghazal, P. (2000). Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 847-52.
- Watts, C. und Amigorena, S. (2000). Antigen traffic pathways in dendritic cells. Traffic 1: 312-7.
- Weiner, L. M., Clark, J. I., Davey, M., Li, W. S., Garcia de Palazzo, I., Ring, D. B. und Alpaugh, R. K. (1995). Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII. Cancer Res 55: 4586-93.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. und Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. Curr Biol 10: 839-48.

Wulfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M. D., Wu, L. C., Dustin, M. L. und Davis, M. M. (2002). Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. Nat Immunol 3: 42-7.

Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. und Toyoshima, K. (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 319: 230-4.

Young, J. D., Ko, S. S. und Cohn, Z. A. (1984). The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 5430-4.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B. und Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. Eur J Immunol 23: 2053-8.

Zou, G. M. und Tam, Y. K. (2002). Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. Eur Cytokine Netw 13: 186-99.

zum Buschenfelde, C. M., Metzger, J., Hermann, C., Nicklisch, N., Peschel, C. und Bernhard, H. (2001). The generation of both T killer and Th cell clones specific for the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells. J Immunol 167: 1712-9.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Patrick Baeuerle für die interessante Themengestaltung, die kompetenten und hilfreichen Anmerkungen sowie die wissenschaftliche Freiheit, die ich während meiner Promotion genießen durfte.

Herrn Prof. Dr. Arne Skerra möchte ich herzlich für die Vertretung meiner Promotion an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München sowie für sein Interesse an meiner Arbeit danken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Peter Kufer danke ich für die kompetente Betreuung meiner Arbeit, die stetige Unterstützung auch in schwierigen Phasen und seine kontinuierliche Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Annegret de Baey danke ich für die Betreuung während des ersten Jahres und die Weitergabe ihres fachlichen Wissens über dendritische Zellen.

Insbesondere Herrn Patrick Hoffmann möchte ich für die Hilfestellung bei den chemischen Kopplungen und für die zahlreichen Tips im Laboralltag danken. Herrn Dr. Andreas Wolf und Herrn Eugen Kopp danke ich für die teilweise sehr aufwendige Protein-Aufreinigung. Den Arbeitsgruppen von Frau Dr. Helga Bernhard und von Prof. Dr. Gerd Pape danke ich für die zur Verfügungstellung der T-Zellklone.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Micromet-Mitarbeitern sowie den Mitgliedern des Instituts für Immunologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders gilt mein Dank natürlich allen Blutspendern und den Ärzten für die Blutabnahmen, die meine Experimente erst ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die ständige moralische Unterstützung und Förderung bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Freund Holger danke ich für die telefonischen Aufmunterungsversuche, Ratschläge und seine fast grenzenlose Geduld. Seine Liebe und sein Verständnis, besonders für die hoffentlich bald beendete räumliche Trennung, stellen einen großen Rückhalt für mich dar.

9 Lebenslauf

Name: Ines Mende
Geburtsdatum: 23.05.1975
Geburtsort: Braunschweig

Schulbildung:

1981-1983 Grundschule Kücknitz, Lübeck
1983-1985 Grundschule am Stadtpark, Lübeck
1985-1994 Ernestinenschule zu Lübeck, städtisches Gymnasium, Lübeck
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung:

10/1994 - 09/1999 Beginn des Studiums der Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
1996 Vordiplom
06/1998-08/1998 Studienarbeit am Scripps Research Institute, Division of Oncovirology, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter K. Vogt mit dem Thema: „Oncogenic activity of *akt2* and *akt3*“
04/1999-09/1999 Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universität Essen in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Tarik Möröy mit dem Thema: „Koordination von Zellproliferation und Apoptose bei der T-Zell Lymphomagenese“
09/1999 Abschluß des Studiums der Biotechnologie und Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Biotechnologin“
Seit 01/2000 Beginn der Doktorarbeit in der Firma Micromet AG bei Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle mit dem Thema: „Untersuchungen zur Eignung der M-DC8⁺ dendritischen Zellen für Vakzinierungsansätze beim Menschen“

Publikationsliste

I. Mende, S. Malstrom, P. N. Tschlis, P. K. Vogt und M. Aoki (2001). Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. Oncogene 20: 4419-23.

A. de Baey, **I. Mende**, G. Riethmueller und P. A. Baeuerle (2001). Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. Eur J Immunol 31: 1646-55.

H. Karsunky, **I. Mende**, T. Schmidt und T. Möröy (2002). High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. Oncogene 21: 1571-9.

A. de Baey, **I. Mende**, G. Baretton, A. Greiner, H. M. Diepolder und P. A. Baeuerle. A Subset of Human Dendritic Cells in the T cell Area of Mucosa-associated Lymphoid Tissue with High Potential to Produce TNF- α . Zur Veröffentlichung eingereicht.

I. Mende, P. Hoffmann, A. de Baey, A. Wolf, E. Kopp, P. A. Baeuerle und P. Kufer. Highly efficient Antigen-targeting to M-DC8 (+) dendritic cells via CD16. Manuskript in Vorbereitung.