

**Synergistische Aktivierung von dendritischen Zellen durch  
Kombination von TLR Liganden und Untersuchung von Dextran-  
basierenden Nanopartikeln als Carrier in der Immuntherapie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Mathias Krummen  
aus Lingen

2006

Dekan: Prof. Dr. F. E. Hahn

Erster Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Galla

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. S. Grabbe

Tag der Disputation: 21.12.2006

Tag der Promotion: 21.12.2006

Für Constanze und meine Kinder

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von Adjuvantien für die antitumorale Immuntherapie mit dendritischen Zellen. Zu diesem Zweck wurden die synergistische Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) durch Kombinationen von Toll-*like* Rezeptor (TLR) Liganden und die Eignung von Dextranpartikeln als möglicher Träger in der Immuntherapie untersucht.

In einem ersten Schritt wurde die Wirkungsbandbreite der TLR Liganden LPS (Lipopolysaccharid), CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin), PGN (Peptidoglykan) und Poly (I:C) (Polyinosin:Polycytidyl-Säure) bei der Aktivierung von BM-DC (bone-marrow generierten DC) anhand verschiedener Parameter untersucht. Anschließend wurden die TLR Liganden in suboptimalen Konzentrationen in Dreierkombinationen miteinander kombiniert, um synergistische Effekte auf die Freisetzung von IL-12 nachzuweisen. Es zeigte sich, daß alle vier möglichen Kombinationen eine synergistisch verstärkte Freisetzung von IL-12 durch BM-DC induzieren. Es wurde die Kombination aus CpG, PGN und Poly (I:C) ausgewählt und in Titrationsexperimenten die Konzentrationen der TLR Liganden evaluiert, bei der die Freisetzung von IL-12 maximal ist. Nachfolgende Versuche zeigten, daß die synergistische Produktion von IL-12 nach Stimulation mit CpG und Poly (I:C) durch Zusatz von PGN dosisabhängig gesenkt wird, während gleichzeitig die Freisetzung von IL-10 überproportional stark ansteigt. Dies resultierte in einer verminderten T<sub>H</sub>1-polarisierenden Wirkung der so stimulierten BM-DC *in vitro*. *In vivo*-Versuche mit transferierten Zellen aus T-Zellrezeptor transgenen Mäusen zeigten eine starke Antigen-spezifische Proliferation nach Applikation synergistisch aktivierter BM-DC, die mit steigender PGN-Konzentration geringer wurde. Die Auslösephase einer Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ war bei Mäusen, die mit synergistisch aktivierten BM-DC sensibilisiert worden waren, ebenfalls umso schwächer je mehr PGN bei der Aktivierung der DC verwendet worden war. Ein Trend, der letztendlich auch bei der Freisetzung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen durch Lymphknotenzellen, die den Mäusen nach Beendigung der Hypersensibilitätsreaktion entnommen waren, bestätigt wurde.

Die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zeigen also einen starken synergistischen Effekt auf die Freisetzung von IL-12 durch DC und auf die T<sub>H</sub>1-Polarisierung von T-Zell Antworten durch eine Stimulation mit der Kombination aus CpG und Poly (I:C) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Zugabe des dritten TLR Liganden PGN resultierte in einer vermehrten Produktion von IL-10 und einer Verringerung des Effekts durch CpG und Poly (I:C), was eindeutig auf tolerogene Eigenschaften dieser Kombination hinweist. Außerdem zeigen die Daten, daß auch die Freisetzung von IL-10 synergistisch erhöht werden kann.

Die Erkenntnisse um eine synergistische Aktivierung von DC durch mehrere TLR Liganden sollen später bei Versuchen Anwendung finden, die sich mit der *in situ*-Aktivierung von DC mit Hilfe von partikulären Adjuvantien beschäftigen. Dafür wurden im zweiten Teil der Arbeit Dextran-basierende Nanopartikel hergestellt. Es konnte fluoreszenz-mikroskopisch gezeigt werden, daß diese Partikel effektiv von BM-DC aufgenommen werden. Der Einschluß von LPS führte zu einer Aktivierung von BM-DC, gezeigt durch erhöhte Expression von Oberflächenmarkern auf diesen Zellen, und nach Inkubation von BM-DC mit OVA-enthaltenden Partikel konnten diese die Antigen-spezifische Proliferation von TCR-transgenen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* induzieren. Die Sensibilisierung mit LPS- und OVA-enthaltenden Dextranpartikeln resultierte nach Auslösung einer Hypersensibilitätsreaktion des verzögerten Typs in einer starken und im Vergleich zur Sensibilisierung mit löslichen Komponenten wesentlich nachhaltigeren Immunantwort. Dextran-basierende Nanopartikel, in die LPS und OVA eingeschlossen ist, werden also von DC aufgenommen und prozessiert, was zur Aktivierung der Zellen und zur Präsentation des Antigens führt. *In vivo* induzieren diese Partikel eine starke, T<sub>H</sub>1-polarisierte Immunantwort.



<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Das Immunsystem.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Die TLR (<i>Toll-like receptor</i>) Familie .....</b>	<b>2</b>
2.1. Die Spezifität der TLRs.....	2
2.2. Die Signaltransduktion der TLRs.....	4
<b>3. Das adaptive Immunsystem .....</b>	<b>5</b>
3.1. T-Zellen .....	6
3.2. B-Zellen.....	8
3.3. Die Bildung von Effektor-B- und –T-Zellen.....	8
<b>4. Die dendritische Zelle .....</b>	<b>9</b>
<b>5. Tumorentstehung, -wachstum und –immuntherapie.....</b>	<b>12</b>
5.1. Tumorenstehung und –wachstum.....	13
5.2. Antitumorale Immuntherapie mit DC .....	14
5.3. Antitumorale Immuntherapie durch <i>in situ</i> Aktivierung von dendritischen Zellen .....	16
<b>6. Ziel dieser Dissertation.....</b>	<b>18</b>
<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Material.....</b>	<b>19</b>
1.1. Mäuse.....	19
1.2. Antikörper, Zytokine und TLR Liganden .....	19
1.2.1. Antikörper .....	19
1.2.2. Zytokine .....	20
1.2.3. TLR Liganden.....	20
1.3. Medienbestandteile, Enzyme, Chemikalien, Oligonukleotide, Kits und sonstige Materialien.....	21
1.3.1. Medienbestandteile .....	21
1.3.2. Kits.....	21
1.3.3. Primer.....	21
1.3.4. Chemikalien und Enzyme .....	22
1.3.5. Sonstige Materialien .....	23
1.4. Software zur Datenanalyse .....	23
1.5. Geräte.....	24
1.6. Medien und Puffer.....	24
<b>2. Methoden .....</b>	<b>27</b>

2.1. Zellkultur .....	27
2.1.1. Sterilisation .....	27
2.1.2. Kryokonservierung von Zellen .....	27
2.1.3. Präparation von murinen T-Zellen .....	28
2.1.4. Präparation von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark .....	31
2.2. Herstellung von Dextranpartikeln .....	33
2.3. Analyse .....	33
2.3.1. Durchflusszytometrie (FACS*, fluorescence activated cell sorting).....	33
2.3.2. MLR ( <u>m</u> ixed <u>l</u> eukocyte <u>r</u> eaction).....	34
2.3.3. Antigen-spezifische T-Zellproliferation <i>in vitro</i> .....	36
2.3.4. Aktivierung von T-Zellen mit <u>P</u> horbol-13- <u>M</u> yristat-12- <u>A</u> cetate und Ionomycin (PMA/Iono).....	36
2.3.5. Messung der T-Zellproliferation durch Einbau von <sup>3</sup> H-Thymidin .....	37
2.3.6. CFSE-Färbung .....	37
2.3.7. Zytokin-Bestimmung mit dem CBA.....	38
2.4. <i>in vivo</i> Untersuchungen .....	39
2.4.1. Proliferationsbestimmung mit Hilfe transgener T-Zellen.....	39
2.4.2. Auslösung einer Fußschwellung ( <i>Delayed Type Hypersensitivity</i> , DTH) .....	40
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	41
2.5.1. RNA-Isolierung mit TRIZOL <sup>®</sup> .....	41
2.5.2. Qualitäts- und Quantitätskontrolle von RNA.....	42
2.5.3. DNase-Verdau.....	43
2.5.4. cDNA Synthese (RevertAid <sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit) .....	44
2.5.5. $\beta$ -Aktin PCR.....	44
2.5.6. Real-Time PCR .....	45
2.6. Statistische Analyse.....	46
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Synergieeffekte durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer Toll-like Rezeptor Liganden.....</b>	<b>47</b>
1.1. Ermittlung der Arbeitskonzentrationen von LPS, PGN, Poly (I:C) und CpG	48
1.2. Synergistische Effekte durch Kombination von drei TLR-Liganden .....	53
1.3. Titration von CpG, PGN und Poly (I:C) gegeneinander .....	56
1.4. Einsatz der Dreierkombination <i>in vitro</i> .....	58
1.5. Einsatz der Dreierkombination <i>in vivo</i> .....	63
<b>2. Dextran-Partikel als Adjuvanz in der Immuntherapie.....</b>	<b>67</b>
2.1. Funktionalität der Dextran Partikel <i>in vitro</i> .....	68
2.2. Funktionalität der Dextran Partikel <i>in vivo</i> .....	70
<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>



<b>1. Synergistische Wirkungen kombinierter Toll-like Rezeptor Liganden</b>	<b>75</b>
1.1. Vorversuche.....	75
1.2. Ermittlung der idealen Arbeitskonzentrationen für eine synergistische Aktivierung von BM-DC.....	80
1.3. Funktionelle Analyse der synergistischen Effekte.....	82
1.3.1. <i>in vitro</i> .....	82
1.3.2. <i>in vivo</i> .....	84
<b>2. <i>In situ</i> Aktivierung von DC.....</b>	<b>85</b>
<b>3. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>90</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>93</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>106</b>
<b>Abbildungen.....</b>	<b>108</b>
<b>Tabellen.....</b>	<b>109</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>110</b>
1. Artikel.....	110
2. Poster.....	110
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>111</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>

# Einleitung

## 1. Das Immunsystem

Multizelluläre Organismen haben verschiedenste Verteidigungsmöglichkeiten zur Abwehr zerstörerischer Mikroorganismen und Neutralisation freigesetzter virulenter Faktoren entwickelt. Bei den Vertebraten wird diese Aufgabe von einem Immunsystem übernommen, das eine angeborene und eine erworbene Komponente besitzt.

Phylogenetisch betrachtet ist das angeborene Immunsystem der wesentlich ältere Teil und bildet die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Mikroorganismen. Neben dem Einsatz physikalischer Barrieren (Epithelien der Haut) und biochemischer „Kampfstoffe“ (z.B. das antibakteriell wirkende Lysozym der Tränenflüssigkeit) verwendet es hierfür im Wesentlichen drei Strategien der Immunerkennung, die alle auf einem beschränkten Satz in der Keimbahn festgelegter Rezeptoren beruhen. Dies ist zum Einen die Erkennung von körpereigenen Zellen, die z.B. in Folge des Stresses einer viralen Infektion ein verändertes Muster von Markern aufweisen, was die Beseitigung dieser Zellen durch das angeborene Immunsystem nach sich zieht. So kann eine Infektion über zellautonome Mechanismen die Apoptose der befallenen Zelle induzieren (1), was in dem Erscheinen von Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche resultiert. Dieses normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Phospholipid wird von PS-Rezeptoren auf Makrophagen und anderen Phagozyten erkannt und führt zur Phagozytose der apoptotischen Zellen (2). Ähnlich der Erkennung von „*altered self*“ beruht die Detektion von „*missing self*“ auf einer veränderten Expression von Oberflächenmarkern. Bei letzterem ist allerdings das Fehlen bestimmter Merkmale das entscheidende Kriterium für eine Zerstörung durch Zellen des Immunsystems. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das Wechselspiel von MHC (*major histocompatibility complex*) I-Molekülen mit den KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Alle Zellen des Körpers mit einem Zellkern exprimieren MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, mit denen vorwiegend intrazellulär generierte Peptide dem Immunsystem präsentiert werden. Auf diese Weise werden im Falle einer erfolgten Infektion der Zelle durch Viren oder intrazelluläre Bakterien auch Peptide der Eindringlinge patrouillierenden Immunzellen dargeboten. Eine gängige Strategie, eine hierdurch bedingte Immunerkennung zu unterbinden, ist die Blockade des MHC I-Transports zur Zellmembran. Diese MHC I-defizienten Zellen werden von NK Zellen erkannt, denn NK Zellen töten benachbarte Zellen stets ab, sofern diese nicht durch Bindung der KIR-Rezeptoren an endogene MHC I-Moleküle funktionell inaktiviert werden. (3).

Die direkte Erkennung von Mikroorganismen und anderen nicht körpereigenen Strukturen („*nonsel*f“), stellt die dritte Säule des angeborenen Immunsystems dar und beruht auf der Detektion von essentiellen und daher stark konservierten Produkten der mikrobiellen Physiologie. Diese invarianten Strukturen, PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) genannt, werden nicht vom Wirt produziert und sind typisch für bestimmte Klassen von Mikroorganismen. Es war eine der großen Leistungen von Charles A. Janeway Jr., die Existenz dieser Muster und ihrer entsprechenden Rezeptoren im Immunsystem, die PRRs (*pattern recognition receptors*) zu postulieren, als die immunologische Fachwelt noch von einem eher unspezifisch agierenden, angeborenen Immunsystem ausging (4). Die am besten charakterisierte Klasse von PRRs ist die Familie der TLRs (*Toll-like receptors*).

## 2. Die TLR (*Toll-like receptor*) Familie

Toll wurde das erste Mal als ein Typ I Transmembranrezeptor mit einer wichtigen Rolle bei der dorso-ventralen Entwicklung von *Drosophila*-Embryonen beschrieben (5). Die genauere Untersuchung des Signaltransduktionsweges von Toll brachte bemerkenswerte Homologien mit dem für das Immunsystem von Mammalia so wichtigen NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) *pathway* hervor, was letztendlich in der Entdeckung einer bedeutsamen Rolle von Toll für das Immunsystem von *Drosophila* mündete. So konnten bisher acht Mitglieder der Toll Familie in *Drosophila* identifiziert werden (6), von denen mindestens zwei in der Lage sind, verschiedene Pathogene zu unterscheiden (7;8).

Sozusagen nebenbei wurde auf diese Weise auch eine homologe Familie von Toll Rezeptoren, die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in Mammalia entdeckt (9), die im humanen System bisher 11 Mitglieder umfaßt (TLR1-11) (10). Alle Mitglieder dieser Familie liegen als Homo- oder Heterodimere (TLR1/2 und TLR2/6) vor, besitzen eine einzelne Transmembran-Domäne, eine aminoterminal Leucin-reiche, (LRR, *leucine-rich repeat*) extrazelluläre Domäne, welche der Ligandenbindung dient, sowie eine carboxyterminale, intrazelluläre Domäne, die für die Signaltransduktion zuständig ist. Diese bezeichnet man aufgrund der großen Homologie zu der zytoplasmatischen Domäne des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) als Toll/IL-1R (TIR) Domäne (11).

### 2.1. Die Spezifität der TLRs

Die extrazelluläre Domäne von TLRs besteht aus 19-25 Kopien der LRR, wobei jedes 24-29 Aminosäuren umfaßt. Die LRR bilden zusammen eine hufeisenförmige Formation, deren konkave Oberfläche vermutlich direkt der Erkennung der verschiedenen PAMPs dient. Eine

bemerkenswerte Eigenschaft der TLRs ist es, trotz großer Homologien der LRR keine Liganden untereinander zu teilen und gleichzeitig ein weites Spektrum strukturell unterschiedlicher Moleküle durch einen einzigen Rezeptor abzudecken (10).

TLR1/2 und TLR2/6: Diese Heterodimere sind auf die Erkennung und Unterscheidung von triacylierten bzw. diacylierten Lipopeptiden spezialisiert. Dieser scheinbar banale Unterschied markiert eine differenzierte Detektion von Gram-positiven Bakterien und Mycobakterien (12;13). Die Kollaboration mit nicht-TLR Rezeptoren wie Dectin-1 (*dendritic cell-associated c-type lectin-1*) ermöglicht dem TLR2 eine weitere Diversifizierung der Erkennung von PAMPs wie z.B. Zymosan, eine Zellwand-Komponente von Hefen (14).

TLR3: Während der Replikation der meisten Viren wird zu irgendeinem Zeitpunkt doppelsträngige RNA (dsRNA) hergestellt, eine Form dieser Nukleinsäure, die weitgehend untypisch für die Wirtszelle ist und es dem Immunsystem daher ermöglicht, über die Erkennung durch den TLR3 virale Infektionen zu detektieren (15).

TLR4: Dieser TLR wurde als erstes Mitglied der TLR-Familie entdeckt und ist für den schon lange bekannten, stimulierenden Effekt von Lipopolysacchariden (LPS) auf das Immunsystem verantwortlich. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (16).

TLR5: Der Ligand für TLR5 ist Flagellin, ein obligatorisches Protein des bakteriellen Flagellums, einer schwanzförmigen Fortbewegungsorganelle einiger Gram-negativer und – positiver Bakterien (17).

TLR7/TLR8: Synthetische Imidazoquinoline wie Imiquimod (R-837) und Resiquimod (R-848), die als antivirale Wirkstoffe Verwendung finden, waren lange die einzigen bekannten Liganden für diese TLRs. Erst 2004 konnte virale, einzelsträngige RNA (ssRNA) als natürlicher Ligand identifiziert werden (18).

TLR9: Der Anteil von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) im Genom von Vertebraten ist relativ gering im Vergleich zu dem von Bakterien (1:50-1:60 bzw. 1:16) und zudem sind Cytosin-Nukleotide bei Wirbeltieren meist methyliert. Dieser Umstand wird bei der Erkennung bakterieller doppelsträngiger DNA (dsDNA) durch den TLR9 ausgenutzt (11).

TLR10: Bislang konnten keine Hinweise auf einen Liganden für diesen TLR gefunden werden. Erschwert wird die Suche durch das Fehlen eines funktionellen Gens für TLR10 in der Maus sowie einer sehr eingeschränkten Expression im humanen System (19).

TLR11: Auch der Ligand für TLR11 konnte bisher nicht genauer bestimmt werden. Erwiesen ist aber die Erkennung bestimmter uropathogener Stämme von *Escherichia coli* durch diesen Rezeptor. Die Expression von TLR11 im humanen System bleibt allerdings zweifelhaft, da bisherige Genomanalysen die Existenz eines Stopcodons im mutmaßlichen ORF (*open*

*reading frame*) des entsprechenden Gens gezeigt haben. Andererseits haben neuere Untersuchungen einen häufigen Polymorphismus in der humanen TLR5-Sequenz enthüllt, bei dem die Expression des Rezeptors ebenfalls durch ein Stopcodon verhindert wird. Es besteht also die Möglichkeit, daß das Stopcodon im TLR11 wie im oben genannten Fall nur einen genetischen Polymorphismus repräsentiert (20).

## 2.2. Die Signaltransduktion der TLRs

Die Signaltransduktion über TLRs ist entweder MyD88-abhängig oder –unabhängig. MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) ist das universelle Adaptor-Protein in der Signalkaskade der TLRs. Bis auf einen TLR, den TLR3, sind alle TLRs für die optimale Signalweiterleitung auf dieses Protein angewiesen.

Nach der Ligandenbindung dimerisieren die TIR-Domänen der TLR-Homo- bzw. Heterodimere, und die resultierende Konformationsänderung ermöglicht die Bindung des MyD88 über dessen eigene TIR-Domäne. Eine zweite Domäne des Adapterproteins, die DD (*death domain*) bindet daraufhin die DD von IRAK (*IL-1R-associated kinase*) 4. Diese homophile DD Bindung resultiert in der Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4, woraufhin IRAK1 im N-Terminus autophosphoryliert wird. Das hyperphosphorylierte IRAK1 wird von TRAF (*tumor-necrosis factor-receptor-associated factor*) 6 gebunden, was die Loslösung des IRAK1-TRAF6 Dimers vom Rezeptor bewirkt. Das Dimer interagiert nun an der Plasmamembran mit einem Komplex bestehend aus TAK (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase*) 1, TAB (*TAK1-binding protein*) 1 und TAB2 oder TAB3. Diese Interaktion führt zur Phosphorylierung des Komplexes, der dann in das Zytoplasma migriert, wo es zur Aktivierung von IKK (*inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase*) kommt, das wiederum I $\kappa$ B phosphoryliert. Die Phosphorylierung des I $\kappa$ B hat eine Ubiquitinylierung desselben zur Folge, was in einer Degradierung des Inhibitors durch das Proteasom mündet, woraufhin Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie freigelassen werden. Diese translozieren in den Nukleus, wo sie eine Reihe Entzündungs-relevanter Gene aktivieren (10;21).

Die MyD88-unabhängige Signaltransduktion, nachgewiesen bisher nur für die Signalweiterleitung von TLR3 und TLR4, nutzt ein anderes, zentrales Adapter-Molekül als MyD88, TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ). Dieser Weg ist weniger gut beschrieben, führt aber letztendlich über Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) zur Bildung von Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), welches die Expression einer Serie von IFN-induzierbaren Genen initiiert. Neben IRF-3 werden auch bei diesem Signalweg Faktoren der NF- $\kappa$ B-Familie aktiviert (22).

Inzwischen einige weitere Adapter-Moleküle identifiziert worden, welche die Aufgabe haben, über eigene TIR-Domänen die Signaltransduktion über MyD88 sowie TRIF zu modulieren. Beispiele hierfür sind TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (23) sowie TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) (24). Somit wird gewährleistet, daß die Aktivierung verschiedener TLR auch zu der Induzierung unterschiedlicher Ereignisse innerhalb der Zelle führt.

Neben der intrinsischen Spezifität der TLRs und der für jeden TLR individuellen Signaltransduktion wird die Detektion von Pathogenen über diese Rezeptoren noch von der Lokalisation und dem Expressionsmuster bestimmt. So befinden sich die gegen extrazelluläre Pathogene gerichteten TLRs auf der Zelloberfläche, während TLR7, TLR8, TLR9 in endosomalen Kompartimenten und TLR3 intrazellulär vorliegen, um virale und andere intrazelluläre Erreger zu detektieren (18;25;26). Schließlich werden die TLR konstitutiv oder induzierbar von verschiedenen Zelltypen unterschiedlich exprimiert (27;28).

Entgegen der lange vorherrschenden Vorstellung eines eher unspezifisch agierenden angeborenen Immunsystems, dessen Beitrag bei der Pathogenabwehr im Vergleich zum adaptiven Immunsystem von untergeordneter Bedeutung schien, zeichnen die in den letzten Jahren gemachten Erkenntnisse ein wesentlich differenzierteres Bild. Demnach ist der angeborene Teil des Immunsystems nicht nur für die Bekämpfung eingedrungener Pathogene während der ersten Tage zuständig, sondern dirigiert auch die Reaktion des adaptiven Immunsystems.

### 3. Das adaptive Immunsystem

Das erworbene oder adaptive Immunsystem basiert auf Lymphozyten, die spezifisch Antigene erkennen und deren selektive Eliminierung induzieren können. Die Lymphozyten werden in zwei Hauptklassen unterteilt: die B- und T-Zellen. Jeder dieser Lymphozyten trägt Antigenrezeptoren (BCR, *B cell receptor* bzw. TCR, *T cell receptor*) nur einer einzigen Spezifität, die durch die sogenannte somatische Rekombination während der Differenzierung der Zelle aus einer pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzelle entsteht. Bei diesem Prozeß werden verschiedene Gensegmente (V(D)J-Gene), in einer randomisierten Umlagerung neu angeordnet, woraus sich ein praktisch unbegrenztes Repertoire möglicher Spezifitäten ergibt. Durch die große Anzahl von Lymphozyten mit unterschiedlichen Antigenrezeptoren ist es dem adaptiven Immunsystem so möglich, nahezu jedes beliebige

Antigen zu erkennen (29;30). Ein weiteres gemeinsames Merkmal von B- und T-Zellen ist die klonale Expansion der Zellen im Falle einer adäquaten Aktivierung, das heißt aus einer Ag-spezifischen Zelle entwickeln sich durch ungeschlechtliche Zellteilung (Mitose) eine Vielzahl von Nachkommen mit einem Rezeptor derselben Spezifität.

### 3.1. T-Zellen

Das Attribut, welches die Ag-Erkennung von T- und B-Zellen unterscheidet, ist die MHC (*major histocompatibility complex*)-Restriktion. MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen kodiert werden, die zusammen den Haupthistokompatibilitätskomplex bilden. MHC I-Moleküle werden in unterschiedlichem Umfang konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC II-Moleküle nur auf sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cell*) und im Thymus vorkommen. In beiden Fällen wird von den membrandistalen Domänen der MHC-Moleküle I + II ein Spalt gebildet, in dem die Bindung von Peptiden erfolgt, ohne welche die MHC-Moleküle instabil wären. Die Erkennung von Antigenen durch T-Zellen ist absolut abhängig von einer Präsentation der Peptide auf MHC I- bzw. MHC II-Molekülen (31).

Der Name der T-Zellen leitet sich vom Ort ihrer Differenzierung, dem Thymus ab. In diesem kleinen Organ unter dem Brustbein entwickeln sich aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle zwei Klassen von T-Zellen, die sich anhand der Expression der Glykoproteine CD4 und CD8 unterscheiden lassen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind MHC II-restringiert, d.h. deren TCRs erkennen Peptide nur im Komplex mit MHC II-Molekülen (32), während CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer MHC I-Restriktion unterliegen, also für eine Ag-Erkennung MHC I-Peptid-Komplexe benötigen (33).

Die somatische Rekombination stellt der adaptiven Immunantwort ein nahezu unerschöpfliches Repertoire an Ag-Rezeptoren bereit, wovon allerdings aufgrund der randomisierten Natur ein großer Teil autoreaktive Spezifitäten aufweist. Um die Gefahr von Autoimmunkrankheiten durch autoreaktive T-Zellen einzuschränken, werden die noch in der Differenzierungsphase befindlichen Vorläufer der T-Zellen, die Thymozyten einer strengen Kontrolle im Thymus unterworfen.

In einem ersten Selektionsschritt wird die MHC-Restriktion der Thymozyten geprüft. All jene TCRs, die durch die ihre Zufallsentstehung eine Form bekommen haben, die nicht mit den eigenen MHC-Molekülen zusammenpaßt, sind von vornherein nutzlos. Daher erhalten nur die Thymozyten, die erfolgreich an ein MHC-Molekül andocken, ein Überlebenssignal, während die übrigen Zellen durch Apoptose sterben (positive Selektion) (31;34).

Die Population von Thymozyten, welche die positive Selektion überstanden haben, umfaßt einerseits Zellen mit geringer Affinität sowie andererseits die mit hoher Affinität zu dem dargebotenen Komplexen aus MHC-Molekül und körpereigenem Peptid. Während der negativen Selektion werden letztere ebenfalls durch Apoptose entfernt, da diese potentiell autoreaktiv sind (31;34).

Das Ziel des Selektionsprozesses ist es, T-Zellen reifen zu lassen, die den eigenen MHC erkennen, so daß es mit einem Fremd-Peptid zu einer vollen Aktivierung kommen kann, jedoch nicht mit einem Selbst-Peptid aktivierbar sind. Am Ende des Selektionsprozesses verlassen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen als naive Zellen den Thymus und zirkulieren fortan durch die Blut- und Lymphgefäße des Körpers bis sie aktiviert werden oder sterben (35).

$CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterscheiden sich nicht nur in der MHC-Restriktion, sondern auch bei der weiteren Differenzierung zu Effektorzellen. So entwickeln sich die  $CD8^+$  T-Zellen zu cytotoxischen T-Zellen (CTL, *cytotoxic T lymphocyte*), während aus  $CD4^+$  T-Zellen T-Helferzellen entstehen. CTLs patrouillieren durch die Gewebe und kontrollieren dabei alle Zellen, an denen sie vorbeikommen. Erkennen sie eine Zelle, die den Peptid:MHC-Komplex auf der Oberfläche trägt, für den die CTL spezifisch ist, dann leiten sie in der entsprechenden Zelle Apoptose ein. Dies kann über zwei Mechanismen geschehen. Der erste besteht in der Sekretion von Perforin und Granzymen. Beide sind in Granula gespeichert und werden nach der Ag-Erkennung freigesetzt. Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle zu einer großen Pore, durch welche die Granzyme ins Zellinnere gelangen können. Dort induzieren sie über verschiedene Mechanismen die Apoptose der Zelle. Beim zweiten Mechanismus werden durch Interaktion der Oberflächenmoleküle Fas-Ligand auf der CTL und Fas auf der Zielzelle Caspasen aktiviert, eine Familie von Proteasen, die wiederum die Apoptose einleiten (36-38).

$CD4^+$  T-Zellen können entweder zu T-Helferzellen des Typs 1 ( $T_H1$ ) oder 2 ( $T_H2$ ) differenzieren, die sich in erster Linie in der Bildung verschiedener Zytokine unterscheiden (39). [Unter dem Oberbegriff Zytokine sind zahlreiche Peptide zusammengefaßt, die v.a. von Zellen des Immunsystems ausgeschüttet werden und proinflammatorische, immunregulatorische und die Zelldifferenzierung beeinflussende Eigenschaften besitzen (40).]  $T_H1$ -Zellen werden aufgrund der Sekretion von  $IFN-\gamma$  von den IL-4 und IL-5 produzierenden  $T_H2$ -Zellen unterschieden. Entsprechend der verschiedenen Zytokinmuster, sind auch die Aufgaben dieser Effektoren unterschiedlicher Art.  $T_H1$ -Zellen unterstützen die zellvermittelte Immunität durch Aktivierung von Makrophagen (41;42) und durch Unterstützung der Differenzierung von CTL, während  $T_H2$ -Zellen die humorale Immunantwort durch Aktivierung von B-Zellen beeinflussen (31;43).



Nachdem lange ignoriert, sind in den letzten Jahren auch wieder die regulatorischen CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Fokus der immunologischen Forschung gerückt. Die Aufgabe dieser natürlich auftretenden oder induzierbaren Zellen ist die Suppression autoreaktiver T-Zellen und die Kontrolle von Immunreaktionen (44).

### 3.2. B-Zellen

B-Zellen oder B-Lymphozyten entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark (*bone marrow*) und sind die Träger der humoralen, also der Antikörper (Ak)-vermittelten Immunität. Anders als T-Zellen im Thymus werden B-Zellen im Knochenmark nur einem negativen Selektionsschritt unterworfen. Nach der erfolgreichen Rekombination der V(D)J-Gene wird Immunglobulin M (IgM) auf der Oberfläche von unreifen B-Zellen exprimiert und bildet zusammen mit einem Heterodimer aus Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  den BCR. Kommt es zu einer Vernetzung des IgM durch körpereigene Strukturen im Knochenmark, erhalten die unreifen B-Zellen ein Apoptosesignal und sterben. Die Zellen, die diesen Selektionsprozeß überstehen, verlassen als naive B-Zellen das Knochenmark (45).

Eine Aktivierung von B-Zellen führt zur Differenzierung dieser Zellen zu Plasmazellen, den Effektoren der humoralen Immunantwort. Plasmazellen produzieren zunächst IgM-Ak und später vermehrt IgG-Ak. Durch den Wechsel der Immunglobulin-Klassen (Ig-switch) wird die humorale Immunantwort den Bedürfnissen der Pathogenabwehr angepaßt. Außerdem bilden einige dieser Zellen sogenannte sekundäre Follikel, die eine spezielle Mikroumgebung bereitstellen, in der durch den Prozeß der Hypermutation Plasmazellen entstehen, deren BCR eine stark erhöhte Affinität zum Antigen besitzt. Aus einigen dieser Zellen entwickeln sich Gedächtnis-B-Zellen, die im Falle einer zweiten Infektion mit dem selben Pathogen, eine schnellere und effektivere Immunantwort gewährleisten (45;46).

### 3.3. Die Bildung von Effektor-B- und -T-Zellen

Oberflächlich betrachtet ist die Erkennung eines Antigens über den spezifischen Rezeptor, den BCR oder TCR der wichtigste Schritt bei der Differenzierung von naiven B- und T-Zellen zu Effektorzellen des Immunsystems.

Naive B-Zellen lassen sich zwar auch ohne T-Zell-Hilfe aktivieren, doch ist die humorale Antwort auf eine Aktivierung durch diese TI (*thymus independent*)-Ag generell schwächer, die vorherrschende Ig-Klasse ist IgM, was auf einen fehlenden Ig-switch hindeutet und es wird kein immunologisches Gedächtnis gebildet. Für eine vollständige Aktivierung sind B-Zellen auf die Hilfe von T<sub>H</sub>2-Zellen angewiesen (46).

Ähnliches gilt für den zellulären Teil der adaptiven Immunantwort, die CTL. Obwohl ein starkes TCR-Signal genügt, um die Zellteilung bei CTL zu induzieren, sind zusätzliche Signale u.a. von  $T_H1$ -Zellen zur Optimierung der Effektorfunktionen nötig (47).

Die Differenzierung von  $CD4^+$  T-Zellen zu Effektorzellen des Typs 1 oder 2 ist also ein kritischer Punkt für das adaptive Immunsystem (48), denn es ist keineswegs unerheblich, ob das Immunsystem mit einer  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Antwort auf ein eingedrungenes Pathogen reagiert. Ein typisches Beispiel hierfür ist die Bekämpfung des Parasits *Leishmania major*, des Erregers der Leishmaniose. Dieses Protozoon vermehrt sich intrazellulär in den Phagosomen von Makrophagen und ist daher für Antikörper unerreichbar, eine  $T_H2$ -Antwort also ineffektiv. Nur durch eine Aktivierung von Makrophagen über  $T_H1$ -Zellen läßt sich dieser Erreger eliminieren (31;42).

Dieses Ereignis, das sogenannte *priming* der naiven  $CD4^+$  T-Zellen, also die Prägung und Ausrichtung der Helferzellen, wird von speziellen Zellen des angeborenen Immunsystems, den dendritischen Zellen, übernommen und von TLR in entschiedenem Maße beeinflußt.

#### 4. Die dendritische Zelle

Dendritische Zellen (DC, *dendritic cell*) stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, deren Name der typischen Morphologie mit den langen Dendriten-ähnlichen Ausläufern zu verdanken ist. Bis dato wurden in der Maus sechs Subtypen von DC identifiziert, die sich phänotypisch, funktionell und ihrer Lokalisierung unterscheiden lassen (49). Der Ursprung der DCs liegt im Knochenmark, wo sie unter der Kontrolle von löslichen Wachstumsfaktoren und direkten Zell-Zell-Kontakten mit den Stromazellen des Knochenmarks aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen. Sie differenzieren entweder entlang der myeloiden Linie, aus der auch Monozyten, Makrophagen, Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten (eosinophile, basophile und neutrophile) entstehen oder entlang der lymphoiden Linie, zu deren Produkten in erster Linie T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen gehören (50). Es ist lange darüber spekuliert worden, ob bestimmte Subtypen der myeloiden oder der lymphoiden Linie zuzuordnen sind. Inzwischen ist aber allgemein akzeptiert, daß sich sämtliche DC-Klassen sowohl aus lymphoiden Vorläuferzellen (CLPs, *common lymphoid precursors*) als auch myeloiden Stammzellen (CMPs, *common myeloid precursors*) generieren lassen (49;51).

DCs verlassen als Vorläuferzellen oder unreife DCs (imDC, *immature DC*) das Knochenmark und migrieren durch die Blutgefäße zu lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben, wo sie schließlich sesshaft werden (52). Außer in den lymphoiden Organen wie Thymus, Milz und

Lymphknoten (LN, *lymph node*) finden sich DC in den meisten peripheren Geweben, besonders an den Grenzschichten zur Umgebung (Haut und Mukosa), wo sie ca. 1-2 % der Zellzahlen ausmachen (52;53).

ImDC zeichnen sich durch eine ausgesprochen effiziente Endozytose aus, wofür sie mehrere Methoden anwenden: a) Makropinozytose (54); b) Rezeptor-vermittelte Endozytose über C-Typ Lektin-Rezeptoren (Mannose-Rezeptor, DEC-205) (55-57) oder Fc-Rezeptoren (Aufnahme von Immunkomplexen oder opsonierten Partikeln) (58); c) Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen Fragmenten, Viren oder Bakterien (59-62). Die aufgenommenen Partikel extrazellulären Ursprungs werden proteolytisch gespalten, aber nicht auf MHC II-Moleküle geladen (53). Intrazellulär generierte Peptide werden weiterhin wie bei allen anderen Zellen mit Nukleus auf MHC I-Molekülen präsentiert. Anders als die meisten anderen Zellen sind DC in der Lage, extrazellulär aufgenommene Ag auch auf MHC I-Molekülen zu präsentieren, ein Prozeß, der als *cross presentation* bezeichnet wird (63).

Unter *steady state*-Bedingungen, also in Abwesenheit eines inflammatorischen Impulses reifen einige imDCs spontan und wandern zu den regionalen LN, wo sie Antigene präsentieren (64). Diese zwar reifen, aber nicht aktivierten DC (semi-mDC, semi-*mature* DC) präsentieren nur körpereigene Antigene und spielen bei der Induktion der sogenannten peripheren Toleranz eine wichtige Rolle. Hierbei werden autoreaktive T-Zellen, die als Thymocyten der negativen Selektion im Thymus entgangen sind, weil einige Moleküle nur in bestimmten Geweben oder unter bestimmten Umständen exprimiert werden und daher nicht im Thymus vorkommen, durch unvollständig aktivierte DC toleriert (65;66).

TLR-Stimulierung von imDCs im Zuge einer Invasion durch pathogene Mikroorganismen dagegen führt zu einer vollständigen Aktivierung dieser Zellen und resultiert in pleiotropen Effekten (Mikroarray-Analysen haben z.B. für eine Aktivierung von DC über den TLR4-Liganden LipidA eine verstärkte Expression von 223 Genen gezeigt; 198 Gene dagegen zeigten eine verminderte Transkription (67)). Die vormals so aktive Endozytose wird eingestellt, um sicherzustellen, daß vorwiegend Antigene, die mit dem Pathogen in Verbindung stehen, den Immunzellen präsentiert werden. Die DC sekretieren Zytokine und Chemokine, die Zellen des angeborenen Immunsystems zum Infektionsherd führen und aktivieren, damit die Infektion in Schach gehalten werden kann (68-70). Außerdem wird das Muster der Expression von Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen geändert, um die Migration der reifenden Zellen zu den lymphatischen Geweben wie Milz und Lymphknoten zu ermöglichen (70-72). [Chemokine sind Proteine geringer Masse (8-10 kD), welche die Aktivierung und Migration von Leukozyten entlang eines chemotaktischen Gradienten regeln

(71).] Dies ist im Wesentlichen CCR7 (*CC motif receptor 7*), der Rezeptor für CCL19/ELC (*Eppstein Bar virus-induced molecule 1 ligand chemokine*) und CCL21/SLC (71;73) (*secondary lymphoid tissue chemokine*), die von Zellen der sekundären lymphoiden Organe produziert werden (74). Wichtiger für das *priming* naiver T-Zellen ist allerdings die verstärkte Expression von Adhäsions- und ko-stimulatorischen Molekülen auf den mDC wie CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7-1 und CD86/B7-2 und der MHC-Moleküle I und II (53;75;76).

Nach der Migration der mDC in die paracorticale Region der regionalen Lymphknoten präsentieren sie den T-Zellen die prozessierten Antigene. Naive T-Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich vom Blut in die lymphatischen Organe und wieder zurück. Die fortdauernde Passage der naiven T-Zellen vorbei an den dendritischen Zellen ist essentiell für die Initiierung der primären Immunantwort, denn nur so kann gewährleistet werden, daß aus dem Pool naiver T-Zellen diejenigen herausgesucht werden, deren TCRs spezifisch an die von der mDC präsentierten Peptid:MHC-Komplexe binden. Dieses „Abtasten“ setzt eine transiente, lockere Bindung der beiden Zelltypen über Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 ↔ LFA-1 oder LFA-3 ↔ CD2 voraus (77). Kommt es zu einer Erkennung des Peptid:MHC-Komplexes auf der mDC durch den TCR der naiven T-Zelle, wird die anfängliche Bindung verstärkt und es erfolgt eine Signalweiterleitung über den TCR assoziierten CD3-Komplex (78). Dieser als Signal 1 bezeichneter Vorgang versorgt das adaptive Immunsystem also mit Informationen über die molekulare Identität des Pathogens und bestimmt die Spezifität der Immunantwort, genügt allerdings nicht, um die Aktivierung und damit eine klonale Expansion der T-Zelle zu induzieren. Hierfür bedarf es eines zweiten Signals über ko-stimulatorische Moleküle. Die CD80/CD86 ↔ CD28-Interaktion stellt Informationen über die Pathogenität bereit, da die CD80/CD86-Expression auf der DC mit der Stärke des Aktivierungssignals korreliert. Fehlt Signal 2 wie es bei der Präsentation von körpereigenen Antigenen in Abwesenheit von inflammatorischen Signalen der Fall ist, resultiert das *signalling* über Signal 1 in Toleranzinduktion (79).

DCs in der Peripherie sind konstant einem lokalen Mikromilieu aus Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren ausgesetzt, die von umgebenden Zellen ausgeschieden werden. Die unter *steady-state*-Bedingungen freigesetzten Faktoren sind zwar schwierig zu bestimmen und ihr Einfluß auf die DC dementsprechend unbekannt, aber inzwischen wurden eine Reihe von Mediatoren identifiziert, die als Antwort auf eine Infektion von Zellen wie Mastzellen, Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt werden. Hierzu gehören IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*), Prostaglandine und Histamine (68;80). Zusammen

mit der direkten Stimulierung der DCs über PRRs wie die TLRs resultiert das Konzert dieser Faktoren in einer mDC mit einer ganz bestimmten Polarisierung, die entscheidenden Einfluß auf das von den DCs freigesetzte Cytokinprofil hat (80;81). Dieses von manchen Autoren als „Signal 3“ bezeichnete Zusammenspiel löslicher Faktoren bestimmt die Ausrichtung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und steuert die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantwort (82). Zu den T<sub>H</sub>2-polarisierenden Faktoren gehören MCP-1 (83) und OX40L (84). IL-10 und TGF-β sind Induktoren von regulatorischen T-Zellen (85), während Typ I Interferone und die Mitglieder der IL-12-Familie IL-23, IL-27 und IL-12 eine T<sub>H</sub>1-Antwort induzieren (86).

Zusammenfassend ergibt sich damit exemplarisch folgendes Bild für den Verlauf einer Infektion: Das Pathogen X dringt entweder aktiv oder durch einen Defekt der physikalischen Barriere in den Körper ein. Infolge der Zerstörung von Gewebe sowie der Erkennung des Pathogens durch PRR auf Epithelzellen und Leukozyten kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Aktivierte DC verlassen das Gewebe und migrieren zu den regionalen LN, wo sie naiven T-Zellen u.a. Antigene des Pathogens präsentieren und die T-Zellen aktivieren. Je nach Art der Infektion werden dabei präferentiell Th1- oder Th2-Zellen induziert, die dann wiederum die Aktivierung von CTL oder B-Zellen unterstützen. Effektorzellen verlassen den LN und migrieren entlang eines chemotaktischen Gradienten, dessen Zentrum der Infektionsherd ist, in das entzündete Gewebe ein, wo sie das eingedrungene Pathogen, das bis dahin von den Zellen des angeborenen Immunsystems in Schach gehalten worden ist, eliminieren.

Die bedeutende Rolle von DC bei dem Erhalt und der Generierung von Toleranz sowie der Induktion und Modellierung von Immunantworten macht diese Zellen zu einem natürlichen Schlüsselement in der Immuntherapie. So auch der Therapie von Tumoren.

## **5. Tumorentstehung, -wachstum und –immuntherapie**

In den westlichen Industrienationen haben sich Tumorerkrankungen inzwischen auf dem zweiten Platz der häufigsten Todesursachen nach den Herzkrankheiten etabliert. Es wird geschätzt, daß jeder dritte Amerikaner im Laufe seines Lebens an Krebs erkranken, und daß jeder fünfte dieser Krankheit erliegen wird (31).

## 5.1. Tumorenstehung und –wachstum

Normalerweise wird die Proliferation und die Lebenserwartung einer jeden Körperzelle strikt reguliert, wobei sogenannte Proto-Onkogene eine wichtige Rolle spielen, da deren Genprodukte in die Kontrolle dieser Prozesse involviert sind. Kommt es infolge der Wirkung chemischer Cancerogene, inflammatorischer Prozesse, der Einstrahlung energiereicher Strahlung wie Röntgen- oder Gammastrahlung oder dem Einbau viraler DNA zu Mutationen in Proto-Onkogenen, kann dies zum Verlust der Kontrolle führen, ein Tumor entsteht (31).

Die Art und Weise, wie und ob das Immunsystem mit diesen entarteten, körpereigenen Zellen umgeht, war lange Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen. Nach einer Hypothese bleibt das Tumorwachstum progressiv, weil der Tumor immunologisch betrachtet wie normales, wachsendes Gewebe aussieht und deshalb das Immunsystem nicht aktiviert wird. Eine Tumorabstoßung wäre demnach eine Autoimmunreaktion (87). Der andere Denkansatz (*cancer immunosurveillance hypothesis*, Burnet und Thomas (88;89)) geht davon aus, daß wesentlich mehr Tumore entstehen, als sich später makroskopisch manifestieren können, da viele in einem frühen Stadium vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Progressiv wachsende Tumore haben also Mechanismen entwickelt, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen (90).

Inzwischen mehren sich die Indizien für die Richtigkeit der Hypothese einer Immunüberwachung nach Burnet und Thomas, denn zahlreiche Untersuchungen und Beobachtungen zeigen, daß dem Immunsystem eine gewichtige Rolle bei der Bekämpfung von Neoplasien zukommt. So besteht bei immunsupprimierten Patienten ein stark erhöhtes Risiko, an bestimmten Tumoren zu erkranken (91), und das Auftreten von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) kann ein positiver Indikator für das Überleben des Patienten darstellen (92). Allerdings spielt hierbei die Qualität eine wesentlich wichtigere Rolle als die Quantität, da z.B. die Infiltration mit  $T_{reg}$  eine Verschlechterung der Situation zur Folge hat (93). Weitere Indizien stammen von Mäusen, bei denen bestimmte Zellpopulationen wie T-Zellen oder NK-Zellen oder Moleküle wie Perforin, IFN- $\gamma$  oder IL-12 „ausgeknockt“ worden sind. Diese Tiere zeigen zum einen ein verstärktes Auftreten von Tumoren und zum anderen sind die Tumore von immundefizienten Mäusen immunogener und werden häufig nach Injektion in Wildtyp (wt)-Tiere vom intakten Immunsystem dieser Mäuse zerstört (94;95). Die letzteren Experimente haben allerdings eine Erweiterung der These von Burnet und Thomas notwendig gemacht, da das Wechselspiel zwischen Immunsystem und Tumor nicht mit der Entstehungsphase der Neoplasie endet:

Tumore können umgebendes Gewebe durch exzessives Wachstum zerstören oder sie lösen Streßantworten aus, wenn Teile des Tumors aufgrund überlasteter „Nachschubwege verhungern“. So werden z.B. durch nekrotische Zellen Hitzeschockproteine (Hsp, heatshock protein) wie Hsp90 freigesetzt, die wiederum potente immunstimulatorische Fähigkeiten besitzen (96;97). Mit steigender Aggressivität des Wachstums, dessen Voraussetzung eine hohe Mutationsrate ist (der durchschnittliche maligne Tumor trägt mehr als 10 000 Mutationen (98)), steigt zudem die Anzahl veränderter Proteine, die eine Quelle für Tumorspezifische Antigene (TAA, *tumor associated antigen*) bilden können (99). Ein progressiv wachsender Tumor wird also zunehmend immunoger, was theoretisch eine antitumorale Immunantwort auslösen müßte. Praktisch geschieht dies auch, allerdings ist eine spontane Regression trotzdem ein seltenes Ereignis (90). Der Grund hierfür ist wieder in der hohen Mutationsrate von Tumoren zu suchen, die unter dem starken Selektions stehend verschiedene Strategien entwickeln, dem Immunsystem zu entgehen. Dazu gehört die Ausschaltung und/oder Veränderung der MHC I-Expression (100;101), der Verlust von TAA (102), die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen (103), die Induktion der Bildung von regulatorischen Zellen (104;105) und die Unterbrechung der Signalwege, die zu einer Apoptose führen würden (106). Dieser Prozeß wird als Immunoeditierung bezeichnet (95). Zudem entwickelt sich der Tumor zunächst ohne einen inflammatorischen Hintergrund, was zwangsläufig die Induktion peripherer Toleranz gegen die TAA zur Folge hat.

Das Immunsystem ist also ein zweiseitiges Schwert, denn auf der einen Seite verhindert es in vielen Fällen Tumorwachstum, aber auf der anderen Seite können Tumorvarianten selektiert werden, die der Überwachung durch das Immunsystem entgehen. Diesen Umständen entspringt das Konzept der antitumoralen Immuntherapie, die durch adäquate Aktivierung, das Immunsystem in die Lage versetzen soll, diese angepaßten Tumore erfolgreich zu bekämpfen.

## 5.2. Antitumorale Immuntherapie mit DC

Seit William Corey in den 1890ern mit geringem Erfolg Krebspatienten mit bakteriellen Extrakten behandelt hat, wird die Eignung der Immuntherapie zur Tumorbekämpfung untersucht (107). Zu den Strategien, die dabei zur Anwendung gekommen sind, gehören unspezifische Ansätze wie die Verabreichung von Zytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$  (108;109) oder spezifische wie die Gabe von genetisch modifizierten Tumoren oder die Vakzinierung mit Tumorpeptiden (110). Obwohl jeder dieser Ansätze die antitumorale Immunität im Tierversuch verstärkt hat, blieben sie die Nützlichkeit im klinischen Versuch schuldig.

Mit dem wachsenden Wissen um die zentrale Rolle der DC bei der Steuerung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Teils des Immunsystems sind diese Zellen immer stärker in den Vordergrund der Immuntherapie gerückt. Zudem hat die Entwicklung von Verfahren zur Generierung großer Mengen DC aus verschiedenen Vorläuferzellen die Verfügbarkeit dieser Zellen stark erhöht (111;112).

Bei der Immuntherapie mit DC werden die *ex vivo* generierten Zellen mit TAA beladen und dem Patienten injiziert. Für die Beladung der DC mit Antigen werden die verschiedensten Methoden angewendet: Fusion von DC mit Tumorzellen (113), Beladung mit synthetischen Tumor-assoziierten Peptiden (114), Transfektion der DC mit RNA aus dem Tumor (115), Virus-vermittelte Beladung (116) und Inkubation der DC mit Tumorlysat (117). Auch werden unterschiedliche Routen der Applikation diskutiert: intravenös (i.v.) (118), intradermal (119), intralymphatisch (120) und subkutan (s.c., *subcutaneously*) (118).

Ein weiterer wichtiger, wenn nicht gar der wichtigste Parameter in der Immuntherapie mit DC ist die Aktivierung der Zellen. Frühe Versuche, bei denen unreife und reife DC verwendet worden sind, haben gezeigt, daß nur reife Zellen eine effektive, antitumorale Immunantwort induzieren können (121;122). Dieser Befund ist nach dem heutigen Stand der Forschung nicht weiter überraschend, da unreife Zellen nur eine schwache Migration zu den lymphatischen Organen zeigen und zudem bei fehlender Aktivierung Toleranz induzieren (122).

Obwohl die Notwendigkeit einer Aktivierung von DC für die antitumorale Immuntherapie inzwischen unumstritten ist, bleibt der optimale Stimulus oder die optimale Kombination von Stimuli bislang noch unklar (123). Allerdings haben verschiedene Versuche gezeigt, daß für eine möglichst effektive antitumorale Immunantwort die Auslösung einer T<sub>H</sub>1-Antwort gegen den Tumor notwendig ist (124;125).

Wie bereits erwähnt spielt bei der Generierung einer T<sub>H</sub>1-Antwort die Freisetzung des Zytokins IL-12 durch DC eine wichtige Rolle. IL-12p70, die aktive Form dieses Zytokins ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Ketten IL-12p35 und IL-12p40, wobei letztere im murinen System auch als Homodimer vorliegen kann, dann aber eher immunsuppressive Eigenschaften besitzt (126). Verschiedenste Experimente haben die große Bedeutung des IL-12 für die Generierung von T<sub>H</sub>1 basierten Immunantworten belegt (127). Hierbei ist die Stimulierung der IFN- $\gamma$  Freisetzung durch IL-12 das entscheidene Ereignis. So locken DC in der frühen Phase einer Infektion NK-Zellen in die sekundären lymphoiden Organe, wo diese über IL-12 Stimulation eine frühe Quelle für IFN- $\gamma$  bereitstellen, die unabdingbar für die Generierung einer T<sub>H</sub>1-Antwort ist (128). Über positive Rückkopplung wird die IL-12-



Freisetzung durch DC verstärkt, welches synergistisch mit anderen, aktivierenden Stimuli die Bildung von  $T_{H1}$ -Zellen unterstützt (86;128;129).

Es bietet sich also bei der Suche nach einem geeigneten Stimulus an, die Produktion von IL-12 als ein bestimmendes Kriterium zu verwenden. Neben der absoluten Menge an IL-12 ist auch die Kinetik der Freisetzung von Bedeutung. Nach einem Konzept von Langenkamp (130) spielt sich die Sekretion des Zytokins in einem engen Zeitfenster von ca. 8 h ab, das sich 10-18 h nach Stimulierung öffnet. Danach werden die DC refraktär und die Freisetzung von IL-12 kann auch durch erneute Stimulierung nicht wieder induziert werden. Dieses *exhausting* beschreibt Langenkamp im folgenden Szenario: In der Peripherie werden im DC durch entsprechende Stimuli aktiviert und migrieren innerhalb weniger Stunden zu den drainierenden Lymphknoten. Dort setzen die nun reifen und aktivierten DC IL-12 frei und generieren eine  $T_{H1}$ -Antwort in der Ag-spezifischen T-Zellpopulation. Im Laufe der Immunantwort läßt der Influx IL-12-produzierender DC allerdings nach und der Anteil von *exhausted* DC steigt, womit sich das Gleichgewicht zugunsten einer Ausrichtung zu  $T_{H2}$  verschiebt (130).

Das *exhausting* der DC stellt insbesondere beim Einsatz von *ex vivo* generierten DC ein Hindernis dar, da diese Zellen erst längere Zeit *in vitro* aktiviert werden müssen und möglicherweise zum Zeitpunkt der Applikation nur noch geringe Mengen IL-12 freisetzen. Eine Lösung des Problems könnte die Beladung von DC mit Ag sowie die zeitgleiche Aktivierung der Zellen direkt *in situ* durch den Einsatz von Nanopartikeln sein.

### 5.3. Antitumorale Immuntherapie durch *in situ* Aktivierung von dendritischen Zellen

Unter Berücksichtigung der strengen Kontrolle der Migration, Reifung, Aktivierung und Zytokinproduktion von DC könnte sich die Manipulation von *ex vivo* generierten DC als eine zu große Herausforderung herausstellen. Außerdem ist diese Therapieform sehr kosten- und arbeitsintensiv und stellt hohe Anforderungen an Ausrüstung und Personal. Wünschenswert wäre daher eine Beladung von DC mit Ag und zeitgleiche Aktivierung dieser Zellen *in situ* durch Applikation von einfach und kostengünstig herstellbaren Produkten, die in einer Qualität von hoher Reproduzierbarkeit bereitgestellt werden können, um vergleichende Studien zu vereinfachen.

Versuche haben bereits zeigen können, daß *ex vivo* generierte DC, die aber erst *in situ* durch Vorbehandlung der Injektionsstelle aktiviert werden, *in vitro* aktivierten DC *in puncto* Migration und Induktion antitumoraler Antworten überlegen sind (131). Andere Ansätze nutzen die effiziente Phagozytoseaktivität von DC aus, indem mit Ag beladene Nanopartikel

auf Basis von z.B. Liposomen (132), Polystyrol (133), Polypropylensulfid (134), Latex (135) oder Poly-D,L-lactid-co-glycolid (136) injiziert werden, um Immunantworten zu induzieren. Diese werden in erster Linie von Makrophagen und DC aufgenommen und gleichermaßen stark phagozytiert (137;138). Eine konzeptionelle Weiterentwicklung ist die gezielte Beladung von DC mit Ag mittels gegen DC gerichteter Antikörper wie  $\alpha$ DEC205-Ak (139;140), was in Kombination mit Partikeln zu einer bevorzugten Aufnahme durch DC zuungunsten von Makrophagen resultiert (137). Eine gleichzeitige Aktivierung der DC wird durch parallele, systemische Gabe von Stimuli (140) oder konsequenter durch Einschluß von Stimuli in Partikel (132;141) erreicht.

Diese Untersuchungen konnten zeigen, daß die Verwendung von Nanopartikeln zahlreiche Vorteile gegenüber dem Einsatz Protein basierender Vakzine besitzt. So wird ein vorzeitiger, proteolytischer Abbau des Ag verhindert (142), durch Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose wird die Verfügbarkeit des Ag auf APC oder, gezielter noch, Subtypen von APC beschränkt (137;140;142), und zudem ist die Effizienz der Ag-Präsentation stark erhöht (140;142), wobei insbesondere die Präsentation über MHC I verstärkt wird (143-145). Als Folge dessen führt beispielsweise die Applikation von mit  $\alpha$ DEC205-Ak beladenen Partikeln zu einer stärkeren zellulären Immunität im Vergleich zu einer Protein-basierenden Vakzinierung (137).

## 6. Ziel dieser Dissertation

Die Immuntherapie mit dendritischen Zellen (DC) stellt eine erfolgversprechende Alternative oder Ergänzung zu herkömmlichen und anderen, innovativen Krebstherapien dar. Obwohl der adäquaten Aktivierung von DC in der Immuntherapie mit diesen Zellen eine entscheidende Bedeutung zukommt, ist die Methode, mit der dies erreicht werden soll, immer noch unklar. Forschungsergebnisse und klinische Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine Immuntherapie mit *ex vivo* generierten oder aus dem Blut isolierten DC technisch sehr aufwendig ist und zudem keine ausreichende klinische Wirksamkeit besitzt. Toll-like Rezeptor (TLR) Liganden spielen bei der Aktivierung, Kontrolle und Modellierung des Immunsystems über DC eine wichtige Rolle und könnten daher von großem Wert bei der weiteren Entwicklung dieser Therapieform sein.

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, im Mausmodell aus einer großen Auswahl von TLR-Liganden mit verschiedenen Spezifitäten, einen vielversprechenden Stimulus für die Aktivierung von DC in der antitumoralen Immuntherapie zu identifizieren. Erreicht werden sollte dies über die Stimulierung von Knochenmark-generierten DC (BM-DC, *bone marrow derived-DC*) mit den TLR-Liganden sowie Kombinationen aus diesen, wobei die Freisetzung von Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-10 (IL-10) die entscheidenden Kriterien für die anfänglichen Experimente darstellte. Die Stimuli, die in diesen Vorversuchen hervorragten, sollten durch Variation der Konzentrationen optimiert und anschließend in weitergehenden *in vitro* und *in vivo* Versuchen eingesetzt werden. Parallel zu diesen Arbeiten sollte ein System entwickelt werden, um DC *in situ* mit Antigen zu beladen und zeitgleich zu aktivieren. Erreicht werden sollte dies über auf Dextran basierende Partikel, in die sowohl ein Antigen (Ovalbumin) als auch ein DC Stimulus (LPS) eingeschlossen werden kann. Die Funktionalität sollte dann anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten im direkten Vergleich mit entsprechenden Kontrollgruppen gezeigt werden.

# Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1. Mäuse

Balb/c und C57/B6 wurden von Harlan Winkelmann, Deutschland, bezogen und in einem Alter von 8 – 12 Wochen für die Experimente eingesetzt. Weitere Mäuse dieser Linien sowie DO11.10 (H-2<sup>d</sup>) Mäuse, die einen transgenen TCR, spezifisch für MHC II und das Ovalbumin Peptid 323-339 (OVA), auf ca. 75 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen tragen, wurden an der Universität Münster in einem SPF-Tierstall (specified pathogen free) unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

### 1.2. Antikörper, Zytokine und TLR Liganden

#### 1.2.1. Antikörper

Primäre Antikörper	Klon	Ak Herkunft	Hersteller
CD8a	53-6.7	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11b/Mac-1	M1/70	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD16/32	2.4G2	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD24	M1/69	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25	PC61	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD45/B220	RA3-6B2	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
GR-1/Ly-6G	RB6-8C5	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
Biotin anti- $\gamma\delta$ -T-Zellen	GL3	Hamster	BD Biosciences, Heidelberg, D
NKT-Zellen	U5A2-13	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
F4/80	F4/80	Ratte	BMA Biomedicals AG, Augst, CH
BM8	T-2006	Ratte	BMA Biomedicals AG, Augst, CH
ERBMDM-1	T-2015	Ratte	BMA Biomedicals AG, Augst, CH

direkt markierte Antikörper	Klon	Ak Herkunft	Hersteller
CD54-FITC	3E2	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD80-FITC	16-10A1	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD40-PE	3/23	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25-PE	PC61	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD86-PE	GL1	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11c-APC	HL3	Hamster	BD Biosciences, Heidelberg, D
DO11.10 TCR-Biotin	KJ1-26	Maus	Caltag, Burlingame, CA, USA
Streptavidin-PE-Cy7	/	/	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD4-PerCp	L3T4	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, D

### 1.2.2. Zytokine

Zytokin	Hersteller
GM-CSF	Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF von Dr. Blankenstein, Berlin, D
IL-4	Zelllinie NIH 3T3-IL-4 von Dr. Schmitt, Wien, AU

### 1.2.3. TLR Liganden

TLR Ligand	Hersteller
PAM <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	EMC microcollectionsGmbH, Tübingen, D
PGN	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MALP-2	EMC microcollectionsGmbH, Tübingen, D
Poly (I:C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CpG	MWG Biotech, Ebersberg, D

### 1.3. Medienbestandteile, Enzyme, Chemikalien, Oligonukleotide, Kits und sonstige Materialien

#### 1.3.1. Medienbestandteile

Medienbestandteile	Hersteller
FCS	PAA, Cölbe, D
Gentamycin	PAA, Cölbe, D
Genitacin	PAA, Cölbe, D
HBSS	PAA, Cölbe, D
HEPES	PAA, Cölbe, D
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Cölbe, D
L-Glutamin x 100	PAA, Cölbe, D
Natriumpyruvat	PAA, Cölbe, D
NEAA	PAA, Cölbe, D
Pen/Strep x 100	PAA, Cölbe, D
RPMI 1640	PAA, Cölbe, D
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

#### 1.3.2. Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
CBA inflammation Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
Revert Aid cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq Man Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg, D
Taq Man Gene Expression Assays (Ccr7, Jag1, Hprt, Dll4)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

#### 1.3.3. Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
β-Aktin vorwärts	5' CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCC ACATCTGC 3'	MWG Biotech, Ebersberg, D
β-Aktin rückwärts	5' ATCTGGCACCACCTTCTACAA TGAGCTGCG 3'	MWG Biotech, Ebersberg, D
CpG 1826	5' tccatgacgttctctgacgtt 3' (PTO modifiziert)	MWG Biotech, Ebersberg, D

**1.3.4. Chemikalien und Enzyme**

Chemikalien und Enzyme	Hersteller
5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
TO-PRO-3 iodide	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
OVA Peptid	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Bochum, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Bochum, D
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
TRIZOL	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Glycerin (100%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MOPS (N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat (Na-Acetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase I	Promega, Mannheim, D
dNTPs	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dextran 500	Pharmacia Biotech, Uppsala, S

### 1.3.5. Sonstige Materialien

Materialien	Hersteller
3-Wege-Hahn (Kat. 888-101B)	PVB Medizintechnik GmbH & Co. KG, Kirchseeon, D
Kanülen, 25G	Terumo, Leuven, B
Kanülen, 30G	Terumo, Leuven, B
goat anti rat IgG Magnetpartikel	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
anti-CD49b (DX-5) Magnetpartikel	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Nylonwolle	G. Kisker-Produkte für Biotechnologie, Steinfurt, D
Spritze 10 ml	AMEFA, Kriftel, D
Spritze 5 ml	AMEFA, Kriftel, D
Zellsieb 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg, D
96 Loch Mikrotiterplatten Falcon 353077	BD Biosciences, Heidelberg, D
12 Loch Mikrotiterplatten Falcon 353043	BD Biosciences, Heidelberg, D
Zellkulturschalen Falcon 353003	BD Biosciences, Heidelberg, D
Sterilfilter Millipore Express plus 0,22 µm	Millipore, Badford, MA, USA
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell MicroScience, Dassel, D
Kryoröhrchen CyroTube Vials	Nunc, Roskilde, DK
Einfrierbehälter, Freezing Container	Nalgene, Rochester, NY
Thermo Fast 384 PCR Plate	Abgene, Epsom, GB
Adhesive PCR Seal	Abgene, Epsom, GB

### 1.4. Software zur Datenanalyse

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
WinMDI 2.8	Analyse von FACS-Daten	J. Trotter, Scripts Institute, La Jolla, CA, USA
BD CBA Analysis Software	Analyse von FACS-Daten	BD Biosciences, Heidelberg, D
SDS 2.1	Analyse von RT PCR Daten	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Analysis 3.2	Auswertung von Fluoreszenzbildern	Soft Imaging Solutions, Münster, D



### 1.5. Geräte

Laborgerät	Typenbezeichnung	Hersteller
AutoMACS	Cellsorter	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Brutschrank	NUNC Cellstar	Nunc, Wiesbaden, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD Biosciences, Heidelberg, D
Szintillationszähler	1450 Micro Beta Plus	Wallace, Turku, FIN
Zell-Harvester	Harvester 96	TOMTEC, Orange, CO, USA
Sterilbank	Hera safe	Kendro, Hanau, D
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau, D
Schüttler	Titramax 1000	Heidolph, Schwabach, D
Vortex	VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Mikroskop	DMLB	Leica, Bensheim, D
Scheren und Pinzetten		Willers, Münster, D
Wasserbad	GFL-1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
PCR Gerät	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, D
RT Gerät	7900HT Fat Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Zellzähler	CASY Cell Counter DT	Schärfe System GmbH, Reutlingen, D
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus, Hamburg, D

### 1.6. Medien und Puffer

Die verwendeten Medien und andere, thermolabile Lösungen wurden nach der Zusammenstellung sterilfiltriert, während die Puffer autoklaviert wurden. Das zur Herstellung der verschiedenen Puffer verwendete Wasser wurde in einer Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore) aus deionisiertem Wasser aufbereitet.

#### Fötales Kälberserum (FCS)

Das FCS wurde 30 min im Wasserbad bei 56 °C Hitze inaktiviert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### Komplett-Medium (CM)

- 500 ml RPMI 1640
- 50 ml FCS
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml NEAA (100 x)
- 5 ml HEPES (1 M)
- 5 ml Pen/Strep (10<sup>4</sup>/10<sup>4</sup> U/ml)

- 5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
- 5 ml 2-Mercaptoethanol (50 mM)

**T-Zell-Medium**

- 500 ml RPMI 1640
- 25 ml FCS
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml NEAA (100 x)
- 5 ml HEPES (1 M)
- 5 ml Pen/Strep ( $10^4/10^4$  U/ml)
- 5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
- 5 ml 2-Mercaptoethanol (50 mM)

**BM-DC-Medium**

- 500 ml RPMI 1640
- 25 ml FCS
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)
- 5 ml NEAA (100 x)
- 5 ml 2-Mercaptoethanol (50 mM)
- 25 ml GM-CSF (3000 U/ml)
- 25 ml IL-4 (1500 U/ml)

**Lysepuffer**

- 500 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 4,15 g NH<sub>4</sub>Cl
- 0,5 g KHCO<sub>3</sub>
- 1,85 g EDTA

**PBS (*phosphate buffered saline*)**

- 450 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 50 ml Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (10x)

**PBS 1% FCS**

- 500 ml PBS
- 5 ml FCS

**10x MOPS-Puffer** ((N-Morpholino)-Propansulfonsäure)

(lichtempfindlich; nicht autoklavieren, sondern sterilfiltrieren)

- 1 l H<sub>2</sub>O
- 41,86 g MOPS
- 6,8 g Na-Acetat
- 3,7 g EDTA

pH auf 6,8 einstellen

**Ladepuffer**

- 500 µl DEPC (oder RNasefreie Wasser)
- 500 µl Glycerin (100%)
- 10 mg Bromphenolblau

**Denaturierungspuffer**

- 633 µl deionisiertes Formamid
- 133 µl 10x MOPS
- 234 µl säurefreies Formaldehyd (37%)

## 2. Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Sterilisation

Für die Arbeit mit Zellkulturen ist es unabdingbar, daß die verwendeten Gefäße, Nährlösungen, Puffer und Arbeitsgeräte steril sind, also keine vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthalten. Die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden der Sterilisation waren die Sterilfiltration, das Autoklavieren (20 min bei 121 °C und 2,1 bar) sowie die Desinfektion mit 70% Ethanol. Glaswaren wurden für 2 h bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert.

#### 2.1.2. Kryokonservierung von Zellen

##### Einfrieren von Zellen

Die dauerhafte Lagerung von Zellen aus Primärkulturen sowie Zelllinien erfolgte durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$ . Diese Lagerung verhindert eine Kontamination sowie Variabilität durch Subkultivierung der verwendeten Zelllinien. Als Schutzsubstanz wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt. Es verhindert die Kristallbildung und die partielle Dehydratation des Cytoplasmas. Um eine Schädigung der Zellen durch zu schnelles Gefrieren zu vermeiden, erfolgte das Einfrieren zudem in speziellen Behältern, die ein langsames Abkühlen ( $-1\text{ °C/min}$ ) ermöglichen (146).

Vorbereitung:

- Einfrierbehältnis mit Isopropanol befüllen und bei  $4\text{ °C}$  kühlen

Durchführung:

- Zellen in  $500\text{ }\mu\text{l}$  gekühltem FCS resuspendieren
- $500\text{ }\mu\text{l}$  gekühltes FCS 20% DMSO hinzufügen
- Zellsuspension in Kryoröhrchen überführen
- Kryoröhrchen in Einfrierbehältnis plazieren und für 18 h bei  $-80\text{ °C}$  lagern
- in  $\text{N}_2$ -Behälter überführen

##### Auftauen von Zellen

Anders als das Einfrieren sollte das Auftauen der Zellen möglichst rasch erfolgen, um eine Devitrifikation, d.h. ein Kristallisieren des ursprünglich amorph erstarrten Gemisches zu verhindern. Der DMSO-Zusatz ist durch Mediumwechsel zu entfernen.

Durchführung:

- die gefrorene Kryokultur bei 37 °C solange im Wasserbad auftauen, bis gerade das letzte Eisklumpchen verschwindet
- Röhrchen außen mit 70% Ethanol desinfizieren und der Inhalt in ein 50 ml Röhrchen mit 30 ml vorgewärmtem Komplettmedium dekantieren
- 5 min bei 200 x g zentrifugieren
- Zellpellet in dem entsprechenden Medium aufnehmen und Zellen bei 37 °C im Brutschrank kultivieren

**2.1.3. Präparation von murinen T-Zellen**

Die Gewinnung von T-Zellen erfolgte durch gezielte Aufkonzentrierung dieser Zellen aus Zellsuspensionen von Milz und/oder Lymphknoten von Mäusen in mehreren Schritten.

Zunächst wurden die Erythrozyten durch osmotische Hämolyse in einem hypotonischen Puffer zerstört. Dies war für die Präparation von T-Zellen aus Lymphknoten aufgrund der fehlenden Erythrozyten in diesen Organen nicht notwendig. Anschließend erfolgte die weitere Aufreinigung über eine Nylonwollsäule. Dieser Schritt beruht auf der Adhärenz vieler Leukozytenarten (B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) sowie von Zelldebris an der Oberfläche der Nylonwolle. Da T-Zellen nicht an Nylonwolle adhäreren, konnten sie effizient aus einem heterogenen Leukozyten-Zellgemisch angereichert werden (147). Der Anteil von T-Zellen in der Zellsuspension betrug nach der Erylyse ca. 45-50% und wurde durch die Aufreinigung über die Nylonsäule auf über 60% angehoben (148). Dies war für einige Anwendungen durchaus ausreichend. War eine größere Reinheit an CD3<sup>+</sup> T-Zellen notwendig oder aber sollte nur die CD4<sup>+</sup> bzw. die CD8<sup>+</sup> Subpopulation eingesetzt werden, wurde ein weiterer Schritt nötig. Bei der negativen Anreicherung wurden die unerwünschten (CD4<sup>+</sup>-bzw. CD8<sup>+</sup>T-Zellen) und kontaminierenden Zellen (verbliebene B-Zellen und Makrophagen sowie Granulozyten,  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie NK- und NKT-Zellen) zunächst indirekt, d.h. über entsprechende Antikörper mit magnetischen Partikeln markiert und anschließend über eine Säule entfernt. Durch diese letzte Aufkonzentrierung ließen sich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Reinheit von > 99% bzw. > 96% erhalten (148).

Vorbereitung:

Je nach Anzahl der zu verarbeitenden Milzen waren verschiedene Nylonwollsäulen vorzubereiten. Pro Milz wurden ca. 0,5 g Nylonwolle in 5 ml Spritzen (1 Milz), 10 ml

Spritzen (2 Milzen) und 20 ml Spritzen (3 Milzen) gefüllt und anschließend autoklaviert. Um T-Zellen aus Milzzellsuspensionen aufzukonzentrieren, wurden die Säule über einen 3-Wege-Hahn mit T-Zell-Medium blasenfrei von unten geflutet und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina T-Zell-Medium äquilibriert.

#### Organentnahme:

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Asphyxie in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol abgespült und links, seitlich der Wirbelsäule aufgeschnitten. Nach der Öffnung des Peritoneums wurde die Milz entnommen und in ein Röhrchen mit PBS 1% FCS transferiert. Die Isolierung der inguinalen, poplitealen, axilaren und cervikalen Lymphknoten erfolgte nach einem ventralen Schnitt.

#### Bereitung der Zellsuspension:

Die aus der Maus entnommenen Organe wurden mit dem sterilen Stempel einer 5 ml Spritzen durch ein Zellsieb (Poren: Ø 100 µm) in einer Petrischale gepreßt bis makroskopisch nur noch Bindegewebe zu erkennen war. Weitere Schritte:

- Zellsuspension in 50 ml Röhrchen überführen
- Zellsieb und Petrischale mit PBS 1% FCS spülen
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 3 ml Lysepuffer pro Milz resuspendieren und 3 min bei RT inkubieren
- Zugabe von ca. 5 ml PBS 1% FCS pro Milz (Abbruch der Reaktion)
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellen in 2 ml PBS 1% FCS pro Milz aufnehmen
- Zellsuspension über ein Zellsieb (Poren: Ø 100 µm) filtrieren und auf die Säule geben
- Flüssigkeitsspiegel in der Säule bis kurz über die Nylonwolle absenken (im Idealfall ersetzt die Zellsuspension vollständig das Medium)
- das abgelassene Medium wieder auf die Säule geben
- Säule 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
- Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluieren und dabei solange frisches Medium auf die Säule geben bis 40 ml Eluat in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen worden sind
- Zellzahl bestimmen

Aufreinigung über ein MACS<sup>®</sup>: (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen, optional)

Das in dieser Arbeit eingesetzte System von der Firma Miltenyi verwendet monoklonale Antikörper, die mit sehr kleinen paramagnetischen Partikeln (ca. 50 nm) gekoppelt sind. Hierdurch ließen sich je nach eingesetztem Antikörper bestimmte Zellpopulationen paramagnetisch markieren und anschließend in dem Hochgradienten-Magnetfeld der MACS<sup>®</sup>-Säule zurückhalten, während die unmarkierten Zellen die Säule passierten. Nach einem Waschschrift wurden die markierten Zellen durch Entfernung des Magnetfeldes mit einem bestimmten Volumen Puffer eluiert (146).

Durchführung:

- Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$ /ml mit PBS 1% aufnehmen
- pro  $1 \times 10^8$  Zellen folgende Mengen Antikörper hinzufügen:
  - 11  $\mu$ l T-Zell Antikörpercocktail:
    - 1,8  $\mu$ l  $\alpha$ CD11b
    - 1,8  $\mu$ l  $\alpha$ CD16/32
    - 3,4  $\mu$ l  $\alpha$ CD45/B22
    - 8,4  $\mu$ l  $\alpha$ Gr-1/Ly-6G
    - 2,4  $\mu$ l  $\alpha$ yd-TCR
    - 1,2  $\mu$ l  $\alpha$ NKT-Zellen
  - 100  $\mu$ l  $\alpha$ CD24 Überstand
  - 500  $\mu$ l  $\alpha$ CD25 Überstand
  - 6  $\mu$ l DX5
  - 3  $\mu$ l  $\alpha$ CD8 Antikörper
- 10 min auf Eis schütteln
- 3 min bei 200x g zentrifugieren
- 1x mit PBS 1% waschen
- 3 min bei 200x g zentrifugieren
- Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$ /ml mit PBS 1% + 2 mM EDTA einstellen
- magnetische Beads hinzufügen:
  - 55  $\mu$ l goat anti rat MACS Beads
  - 5  $\mu$ l streptavidin MACS Beads
- 15 min auf Eis inkubieren
- 3 min bei 200x g zentrifugieren
- 2x mit PBS 1% + 2 mM EDTA waschen

- 3 min bei 200x g zentrifugieren
- Zellen im MACS mit dem Programm „DepleteS“ separieren:

#### **2.1.4. Präparation von murinen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark**

Die Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (*bone marrow derived dendritic cells* = BM-DC) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Inaba *et al.* (111) durchgeführt.

Zunächst wurde aus dem Knochenmark von Femur und Tibias eine Zellsuspension gewonnen, die durch Inkubation in einem hypotonischen Lysepuffer von Erythrozyten befreit wurde. Anschließend wurden die Knochenmarkszellen für 6 oder 8 Tage in BM-DC Medium inkubiert, daß mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 supplementiert worden war (Anmerkung: In einigen Fällen wurde kein zusätzliches IL-4 dem Medium hinzugefügt). Nach 8 Tagen Kultivierung wurden die nicht-adhärenenten sowie die leicht adhärenenten Zellen abgenommen und über einen Dichtegradienten gereinigt und konnten für Experimente eingesetzt werden.

#### Organentnahme:

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Asphyxie in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol abgespült und an den Hinterläufen der Tiere entfernte. Nun wurden Femur und Tibias weitgehend von Muskelfleisch befreit, vom Torso abgetrennt und in ein Röhrchen mit PBS 1% FCS überführt.

#### weitere Schritte:

- Tag 0: Knochen mit 70% Ethanol spülen und in eine Petrischale mit PBS 1% FCS legen
- (alle weiteren Schritte von Tag 0 auf Eis)
- Knochen mit einer Schere durchtrennen und in eine andere Petrischale überführen
- Knochenmark mit Hilfe einer 10-ml Spritze (Kanüle: 0,45 x 23) mit PBS 1% FCS ausspülen
- Suspension mit einer 10-ml Spritze aufziehen
- Homogenisierung der Suspension durch Ansetzten der Spritze (Kanüle: 0,9 x 40) an den Rand eines 50 ml Röhrchens
- 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren



- Überstand verwerfen und Zellen mit 2 ml Lysepuffer pro 2 Hinterläufe resuspendieren
- 5 min inkubieren
- Zugabe von ca. 4 ml PBS 1% FCS pro 2 Hinterläufe (Abbruch der Reaktion)
- 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellen in 10 ml BM-DC-Medium aufnehmen und über ein Zellsieb (Poren: Ø 100 µm) filtrieren
- Zellen zählen und in einer Zellzahl von  $10 \times 10^6$  Zellen in Zellkulturschalen (Ø 100 mm) mit 10 ml BM-DC-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultivieren
- Tag 3: 10 ml BM-DC-Medium hinzufügen
- Tag 6: 10 ml Medium durch frisches BM-DC-Medium ersetzen
- Tag 7 oder 8: nicht-adhärente und leicht adhärente Zellen durch kräftiges Spülen mit Medium abnehmen und in ein 50 ml Röhrchen überführen
- 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren
- (alle weiteren Schritten von Tag 8 auf Eis)
- Überstand verwerfen und Zellen über Dichtegradienten-Zentrifugation reinigen
- Zellen für Experimente einsetzen

### **Dichtegradienten-Zentrifugation**

Die isopyknische Zentrifugation mit Ficoll ( $\rho = 1,077$  g/ml) wurde in dieser Arbeit für die Abtrennung von toten Zellen aus Zellsuspensionen von BM-DC verwendet. Dabei macht man sich die höhere Dichte toter Zellen zu Nutze, wodurch diese im Laufe der Zentrifugation zum Boden des Zentrifugenröhrchens wandern, während sich die vitalen BM-DC in der Interphase zwischen Ficoll und Medium konzentrieren.

#### Durchführung:

- Zellen in 5 ml Ficoll-Lösung ( $\rho = 1,077$  g/ml) aufnehmen und in ein 15 ml Röhrchen transferieren
- Ficoll-Lösung vorsichtig mit 2 ml Kompletmedium überschichten
- 20 min bei 660x g und 4 °C ungebremst zentrifugieren
- Zellen in der Interphase vorsichtig abnehmen und in ein 15 ml Röhrchen überführen
- Röhrchen mit Kompletmedium auffüllen
- 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren
- Zellen in beliebigem Medium oder Puffer aufnehmen

## 2.2. Herstellung von Dextranpartikeln

Die Herstellung der Dextranpartikel erfolgt nach einer Methode von Schröder (149).

### Durchführung:

- 2 g einer 26% w/v Lösung von Dextran in 100 ml Becherglas vorlegen (für die Herstellung FITC-markierter Dextranpartikel wurde entsprechendes FITC-Dextran verwendet)
- 400 µl H<sub>2</sub>O mit oder ohne:
  - 6,25 mg/ml OVA-Peptid oder
  - 312 µg/ml LPS oder
  - 6,25 mg/ml OVA-Peptid + 312 µg/ml LPS
- auf Eis 30 ml Speiseöl unter Rühren hinzufügen
- auf Eis mit Ultraschallstab für 40 sek homogenisieren
- Suspension unter Rühren langsam in 200 ml einer 0,1%-igen Lösung von Tween 80 in Aceton gießen
- Partikel für mehrere Stunden präzipitieren lassen
- Partikel über Zellsieb von größeren Verunreinigungen reinigen
- 3x mit 0,1%-iger Lösung von Tween 80 in Aceton waschen
- 5 min bei 3000x g zentrifugieren
- Partikel mit 2 ml der 0,1%-igen Lösung von Tween 80 in Aceton aufnehmen und bei RT trocknen lassen

## 2.3. Analyse

### 2.3.1. Durchflusszytometrie (FACS\*, fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie ist ein ausgesprochen wichtiges Verfahren in der modernen Zellbiologie und erlaubt sowohl die qualitative Analyse einer heterogenen Zellsuspension als auch die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen.

Grundlage dieses Verfahrens ist die Bildung einer Einzelzellsuspension (durch hydrodynamische Fokussierung), die es ermöglicht die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl zu führen. Die Passage einer Zelle durch den Laserstrahl führt zur Streuung des Lichts sowie zur Aktivierung von Fluoreszenzerscheinungen (bei entsprechender Markierung der Zellen). Das in einem kleinen Winkel abgelenkte Licht wird als Vorwärtsstreuung (FSC, *forward scatter*) bezeichnet und ist abhängig von der Zellgröße, während das orthogonal gestreute

Licht entsprechend Seitwärtsstreuung (SSC, *side scatter*) genannt wird und proportional zur Granularität der Zelle ist (150).

Durch den Einsatz von fluoreszierenden, intrazellulären Farbstoffen (z.B. CFSE) oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern lassen sich markierte Zellen innerhalb einer Zellsuspension verfolgen und genauer untersuchen. Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag dabei auf der qualitativen Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen sowie der quantitativen Bestimmung von Aktivierungs-abhängigen Oberflächenmarkern.

#### Durchführung:

- ca.  $3 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen vorlegen
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 50 µl PBS 1% FCS sowie die Antikörper (Verdünnung: 1:300) hinzufügen
- 20 min bei RT unter Lichtausschluß inkubieren
- 1 ml PBS 1% FCS hinzufügen
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 250 µl PBS 1% FCS hinzufügen (optional: 1 µM TOPRO-3 hinzufügen, um tote Zellen anzufärben)
- Messung der Proben

\* Der allgemein gebräuchliche Ausdruck „FACS“ ist eigentlich eine eingetragene Handelsmarke der Firma Becton-Dickinson

#### **2.3.2. MLR (mixed leukocyte reaction)**

Die sogenannte primäre allogene MLR (*mixed leukocyte reaction*) wird häufig als funktionaler Test zur Bestimmung der Aktivität von dendritischen Zellen verwendet. Hierbei werden naive T-Zellen zusammen mit dendritischen Zellen aus einem allogenen Spendertier kultiviert und nach 5 Tagen die Proliferation der T-Zellen bestimmt.

Obwohl die Mechanismen dieses Verfahrens nicht genau bekannt sind, wird die Fähigkeit von dendritischen Zellen, die Proliferation von allogenen T-Zellen anzuregen, in entscheidendem Maße der Stärke der Expression von MHC II- sowie co-stimulatorischen Molekülen zugeordnet (151). Die allostimulatorische Kapazität von dendritischen Zellen korreliert also mit dem Reifegrad der Zelle.

Die allogene MLR wird in 96-Loch-Rundbodenplatten durchgeführt, um eine räumliche Nähe von dendritischen Zellen und T-Zellen zu gewährleisten. Es empfiehlt sich zudem, die beiden Zelltypen in verschiedenen Verhältnissen einzusetzen, um einen AICD (*activation induced cell death*) hervorgerufen durch ein ungünstiges Verhältnis von potenten stimulatorischen Zellen zu den T-Zellen zu erkennen. Bei der allogenen MLR im Rahmen dieser Arbeit wurden T-Zellen verwendet, die nur über Nyloensäule aufgereinigt worden waren (s. 2.1.4).

#### Durchführung:

- durch Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden die dendritischen Zellen so in den Löchern einer 96-Loch-Rundbodenplatte vorgelegt, daß sich nach späterer Zugabe der T-Zellen DC:T-Zell-Verhältnisse von 1:10, 1:20 sowie 1:40 ergaben; das Volumen betrug hierbei 100 µl Komplettmedium; es wurden jeweils Triplikate angesetzt
- $1 \times 10^5$  allogene T-Zellen wurden in 100 µl Komplettmedium in jedes Loch mit dendritischen Zellen gefüllt, sowie in mindestens 3 Löcher ohne weitere Zellen (Negativkontrolle)
- Inkubation für 4 Tage bei 37 °C im Brutschrank
- Zugabe von 1 µCi  $^3\text{H}$ -Thymidin zu jedem Loch
- Inkubation für 18 h bei 37 °C im Brutschrank
- Einfrieren der 96-Loch-Rundbodenplatte bei -20 °C

Neben der Ermittlung der allostimulatorischen Kapazität von dendritischen Zellen wurde die allogene MLR im Rahmen dieser Arbeit noch für die Bestimmung des Potentials dieser Zellen genutzt, eine T-Zellantwort in Richtung  $T_H1$  oder  $T_H2$  zu dirigieren.

#### Durchführung:

- $1 \times 10^5$   $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen wurden in 100 µl Komplettmedium in den Löchern einer 96-Loch-Rundbodenplatte vorgelegt
- $5 \times 10^4$  dendritische Zellen wurden in 100 µl Komplettmedium hinzugefügt
- Inkubation für 9-11 Tage bei 37 °C im Brutschrank
- Abnahme von Überständen für die spätere Bestimmung der Zytokine

### 2.3.3. Antigen-spezifische T-Zellproliferation *in vitro*

Die Verwendung von TCR-transgener T-Zellen ist eine Möglichkeit, die stimulatorische Kapazität von und die Ag-Präsentation durch DC zu untersuchen, da das Ag bekannt ist und gezielt eingesetzt werden kann.

TCR-transgene T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden mit syngen BM-DC aus Balb/c Mäusen sowie dem Ag OVA-Peptid kokultiviert.

#### Durchführung:

- $1 \times 10^4$  Balb/c BM-DC in 100  $\mu$ l Komplettmedium mit 0,1  $\mu$ g/ml OVA-Peptid in die Löcher einer 96-Loch Rundbodenplatte vorlegen
- $1 \times 10^5$  DO11.10 T-Zellen in 100  $\mu$ l Komplettmedium zu den BM-DC geben
- Inkubation für 2 Tage bei 37 °C im Brutschrank
- Zugabe von 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin zu jedem Loch
- Inkubation für 18 h bei 37 °C im Brutschrank
- Einfrieren der 96-Loch-Rundbodenplatte bei -20 °C

### 2.3.4. Aktivierung von T-Zellen mit Phorbol-13-Myristat-12-Acetat und Ionomycin (PMA/Iono)

Phorbolester wie Phorbol-13-Myristat-12-Acetat (PMA) aktivieren aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zu Diazylglyzerat die Proteinkinase C (PKC), ein wichtiges Enzym bei der Regulierung des zellulären Wachstums. Ionomycin, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor unterstützt durch Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivierung von PKC durch PMA. Durch Behandlung von T-Zellen mit PMA/Iono wird eine Aktivierung und Proliferation der Zellen erreicht.

#### Durchführung:

- $1 \times 10^5$  T-Zellen in 200  $\mu$ l Medium vorlegen
- 3 ng/ml PMA und 300 ng/ml Ionomycin hinzufügen
- 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubieren

### 2.3.5. Messung der T-Zellproliferation durch Einbau von $^3\text{H}$ -Thymidin

Die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Thymidin durch proliferierende T-Zellen wurde in dieser Arbeit mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Das Prinzip eines Szintillationszählers besteht in der Emission von Photonen in Folge der Wechselwirkung ionisierender Teilchen (in diesem Fall die  $\beta$ -Strahlen des  $^3\text{H}$ ) mit den Molekülen eines sogenannten Szintillators. Die Lumineszenz des Szintillators wird über einen Photomultiplier verstärkt und ist direkt proportional zu der  $\beta$ -Strahlung der Probe.

Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe eines Harvesters zunächst auf eine Filtermatte übertragen und gewaschen, damit das Ergebnis nicht durch im Kulturüberstand verbliebenes  $^3\text{H}$ -Thymidin verfälscht werden konnte. Anschließend wurde die Matte mit der Szintillationsflüssigkeit getränkt und die Lumineszenz der Proben im Szintillationszähler ermittelt.

#### Durchführung:

- 96-Loch-Platte mit den Zellen bei 40 °C im Inkubator auftauen
- Platte im Harvester absaugen
- Filtermatte in Papier einschlagen und 2 h bei 60 °C im Inkubator trocknen
- Filtermatte an 3 Seiten in Folie einschweißen, mit Szintillator tränken und vollständig verschließen
- Lumineszenz der Proben auf der Filtermatte im Szintillationszähler ermitteln

### 2.3.6. CFSE-Färbung

5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der in dieser Arbeit für die intrazelluläre Markierung von Lymphozyten eingesetzt wurde. CFSE besitzt die Eigenschaft, bei Zellteilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt zu werden, womit eine Bestimmung von proliferierenden Zellen durch Messung der Verdünnung der Fluoreszenzintensität möglich wird. Die Detektion erfolgt mit den entsprechenden Filtern (denselben wie für FITC-Markierungen) im Durchflusszytometer.

Die Lagerung von CFSE erfolgte in einer 5 mM Stocklösung. Dazu wurden 2,78 mg des Farbstoffs in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung einer Arbeitslösung wurde die Stocklösung 1:10000 mit PBS verdünnt (Endkonzentration 0,5  $\mu\text{M}$ ).

Durchführung:

- Zellen einmal mit PBS waschen
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in einer maximalen Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml mit der Arbeitslösung aufnehmen
- 5 min bei RT in Dunkelheit inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 10 ml PBS 1% FCS beenden
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen 2x mit PBS waschen
- Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufnehmen

**2.3.7. Zytokin-Bestimmung mit dem CBA**

Die Bestimmung von IL-12, IL-10 und IFN- $\gamma$  erfolgte mit dem *Mouse Inflammation Cytometric Bead Array Kit* sowie dem *Mouse Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit* von BD Biosciences.

Diese Verfahren beruhen auf dem Einsatz von Kügelchen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die mit Antikörpern gegen bestimmte Zytokine beladen sind (*capture beads*). Dadurch kommt es zu einer Bindung der zu bestimmenden Zytokine auf der Oberfläche der Kügelchen. Die quantitative Bestimmung der gebundenen Zytokine erfolgt anschließend durch weitere Antikörper, welche dieselben Zytokine binden, hierfür aber andere Epitope verwenden (*detection antibodies*). Die Detektion erfolgt im Durchflusszytometer (FACSCalibur) durch Auflösung der verschiedenen *capture beads* im FL3 Kanal und Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der PE (phycoerythrin)-gekoppelten *detection antibodies* im FL2 Kanal. Die so erhaltenen Rohdaten können durch Abgleichung mit entsprechenden Eichkurven von der BD CBA Analysis Software ausgewertet werden.

Der Vorteil dieses Systems gegenüber dem herkömmlichen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein geringerer Verbrauch von Probenvolumina und Arbeitszeit, da 6 (*Mouse Inflammation Cytometric Bead Array Kit*) bzw. 5 (*Mouse Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit*) verschiedenen Zytokine gleichzeitig gemessen werden können.

Durchführung:

- *master mix* (MM): capture beads vortexen und 2,5 µl von jedem *capture bead* (sowie 12,5 µl *PE-detection reagent* pro Probe zusammen pipettieren)
- 25 µl des MM in FACS-Röhrchen füllen
- 50 µl Probe hinzufügen
- 2 h bei RT in Dunkelheit inkubieren
- 500 µl *Wash Buffer* hinzufügen
- 5 min bei 200x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 150 µl *Wash Buffer* hinzufügen
- im Durchflusszytometer (FACSCalibur) messen
- Auswertung der Daten mittels BD CBA Analysis Software

## 2.4. *in vivo* Untersuchungen

### 2.4.1. Proliferationsbestimmung mit Hilfe transgener T-Zellen

Bei dieser Methode wurden zunächst TCR transgene T-Zellen aus DO11.10 Mäusen isoliert mit CFSE gefärbt und syngenen Balb/c Mäuse injiziert. Dann wurden die Mäuse mit syngenen, OVA-beladenen BM-DC immunisiert und nach 3 und 4 Tagen Lymphknoten und Milzen entfernt, um die T-Zellen zu analysieren. Mit Hilfe des KJ1-26 Ak, der spezifisch die transgenen T-Zellen erkennt, konnte anhand der CFSE-Verdünnung die Proliferation der Zellen verfolgt werden.

Durchführung:

- Tag -1:
  - Isolierung von T-Zellen aus DO11.10 Mäusen (s. 2.1.3.)
  - Färbung der T-Zellen (s. 2.2.4.)
  - $3-5 \times 10^6$  T-Zellen pro Maus i.v. in eine Schwanzvene injizieren
  - BM-DC einer Tag 7-Kultur ernten (s. 2.1.4.)
  - BM-DC für 24 h stimulieren und mit 10 µg/ml OVA beladen
- Tag 0:
  - BM-DC abnehmen und 3 mal mit PBS waschen
  - 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren
  - Zellen bis zur Injektion auf Eis lassen
  - $1 \times 10^6$  BM-DC pro Maus i.v. in eine Schwanzvene injizieren



- Tag 3 und 4:
  - Organentnahme (Milz und Lymphknoten) von jeweils 1-2 Mäusen zur Isolation von T-Zellen (s. 2.1.3.)
  - durchflusszytometrische Analyse der Zellen (s. 2.2.1.) unter Verwendung von  $\alpha$ CD4-PerCp, KJ1-26-Biotin, Streptavidin-PE-Cy7 und TOPRO-3

#### 2.4.2. **Auslösung einer Fußschwellung (Delayed Type Hyersensitivity, DTH)**

Die DTH oder Typ IV Hypersensitivität läßt sich in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase von 1-2 Wochen, der Sensibilisierung, werden nach Applikation eines Ag T-Zellen, vornehmlich CD4<sup>+</sup>, von APC aktiviert und expandieren. Durch erneute Exposition zum Ag wird die Effektorphase ausgelöst. Diese ist charakterisiert durch den massiven Influx von Makrophagen und anderen Zellen des zellulären Arms des Immunsystems, wodurch eine Schwellung hervorgerufen wird, die nach ca. 24 h sichtbar wird und nach 48-72 h ihren Höhepunkt erreicht (152).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde lokal eine DTH 13-15 Tage nach i.v. erfolgter Immunisierung von Balb/c Mäusen mit syngenen, OVA-beladenen BM-DC oder Dextranpartikeln ausgelöst, indem erneut OVA-beladene BM-DC s.c. in die Fußsohlen injiziert wurden.

#### Durchführung:

- Tag -1:
  - Isolierung von T-Zellen aus DO11.10 Mäusen (s. 2.1.3.)
  - $3-5 \times 10^6$  T-Zellen pro Maus i.v. in eine Schwanzvene injizieren
  - BM-DC einer Tag 7-Kultur ernten (s. 2.1.4.)
  - BM-DC für 24 h stimulieren und mit 10  $\mu$ g/ml OVA beladen
- Tag 0: (Sensibilisierung)
  - BM-DC abnehmen und 3 mal mit PBS waschen
  - 5 min bei 200x g und 4 °C zentrifugieren
  - Zellen bis zur Injektion auf Eis lassen
  - $1 \times 10^6$  BM-DC pro Maus i.v. in eine Schwanzvene injizieren
- Tag 13-15: (Auslösung)

- $1 \times 10^6$  OVA-beladene BM-DC (die Zellkulturen sind von Tag 7 auf Tag 8 mit  $10 \mu\text{g/ml}$  OVA supplementiert worden) s.c. in die Pfoten der Hinterläufe injizieren
- für die folgenden 7 Tage wurde täglich die Dicke der Pfoten mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt und gegen den Zustand vor Auslösung der Schwellung abgeglichen

## 2.5. Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1. RNA-Isolierung mit TRIZOL®

Anders als DNA ist RNA durch die zusätzliche 2'Hydroxylgruppe der Ribose besonders unter alkalischen Bedingungen sehr instabil. Zudem ist RNA sehr anfällig gegen RNase Kontaminationen, da dieses Enzym aufgrund seiner Häufigkeit und enormen Stabilität in einem biochemischen Labor allgegenwärtig ist. Zudem benötigen RNasen keine Cofaktoren wie bivalente Kationen. Ein schnelles und sauberes Arbeiten ist daher unabdingbar.

Intakte Gesamt RNA wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (153) mit TRIZOL gewonnen. TRIZOL, ein *ready-to-use* Reagenz bestehend aus einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin Isothiocyanat zerstört Zellen und löst Zellkomponenten auf. Gleichzeitig gewährleistet die chaotrope Wirkung des Guanidin Isothiocyanats durch Denaturierung von RNasen die Stabilität der RNA. Anschließend wurde durch die Gabe von Chloroform eine Phasentrennung in eine phenolische und eine wässrige Phase erreicht. Letztere enthielt die gesuchte RNA, die nach Abnahme der Phase mit Isopropanol ausgefällt wurde. Die RNA wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich mit RNase-freiem Wasser aufgenommen.

#### Durchführung:

- Zellen (ca.  $3-5 \times 10^6$  DC oder  $7-10 \times 10^6$  T-Zellen) in ein 1,5 ml Gefäß überführen und 2x mit PBS waschen, um Reste von Medium zu entfernen
- Pellet in dem Rest-PBS suspendieren und 1 ml Trizol hinzufügen; 3-5 mal hoch und runter pipettieren
- Zellen durch 3maliges hoch und runter saugen in einer 1ml-Spritze mit gelber Kanüle (30G) aufschließen
- 5-10 min bei RT inkubieren

- 200 µl Chloroform hinzufügen und 1,5 ml Gefäß mehrmals schwenken, bis eine milchige, rosarote Flüssigkeit entsteht
- 10 min bei 12000x g und 4 °C zentrifugieren
- den klaren Überstand abnehmen und in frisches 1,5 ml Gefäß überführen
- 500 µl Isopropanol hinzufügen und gründlich schwenken
- 20 min bei 12000x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und mit 500 µl 70%-igem EtOH waschen
- 10 min bei 12000x g und 4°C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und Pellet bei geöffnetem Deckel unter der Lamina trocknen lassen bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen ist
- Pellet in 10-20 µl RNA-Wasser lösen

### 2.5.2. Qualitäts- und Quantitätskontrolle von RNA

Die RNA-Konzentrationen und -Reinheit von RNA-Proben können durch UV-Spektroskopie bei 260 nm und 280 nm untersucht werden. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm sollte zwischen 1,7 und 2,0 betragen, ist jedoch vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängig.

#### Durchführung:

- 2 µl RNA mit 98 µl RNase freiem Wasser verdünnen und in eine Photometer Küvette überführen
- Extinktion im Biophotometer bestimmen

Eine weitergehende Kontrolle erhielt man durch Auftragung der RNA auf ein Agarosegel. Hierbei waren denaturierende Bedingungen nötig, um eine Veränderung des Laufverhaltens der RNA durch die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Um die Ausbildung von H-Brücken durch Aminogruppen zu unterdrücken, wurde Formaldehyd zugesetzt, das mit den Aminogruppen zu Schiff'schen Basen reagiert. Es war darauf zu achten, keine Tris Puffer, sondern MOPS Puffer zu verwenden, da Formaldehyd mit ersterem reagiert. Eine gute Qualität der RNA war durch die Abwesenheit von niedermolekularem „Schmier“, hervorgerufen durch RNA Degradationsprodukte und die Anwesenheit von zwei Banden (28S rRNA und 18S rRNA) in einem ungefähren Intensitätsverhältnis von 2:1 gekennzeichnet.

Durchführung:

- 1%-iges Agarosegel:
    - 1,2 g Agarose
    - 100 ml steriles dest H<sub>2</sub>O
    - 12 ml 10x MOPS-Puffer
    - mehrmals aufkochen
    - auf 50 °C abkühlen lassen und 6,5 ml Formaldehyd + 2 µl EtBr hinzufügen
  - Probenbereitung:
    - ca. 2 µg RNA in 5 dest H<sub>2</sub>O aufnehmen
    - 10 µl Denaturierungspuffer
    - 1,5 µl Ladepuffer
    - 5-7 min bei 65 °C denaturieren
- bei 75-80 mV laufen lassen

**2.5.3. DNase-Verdau**

Um nach der RNA Isolierung möglicherweise noch vorhandene chromosomale DNA zu entfernen, wurde ein DNase Verdau der RNA Präparationen durchgeführt.

Durchführung:

- ca. 5 µg RNA in 45 µl Wasser aufnehmen
- 5 µl DNAase Puffer hinzufügen
- 1 µl DNAse I hinzugeben
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- 10 min bei 65 °C inaktivieren
- 100 µl Isopropanol hinzufügen
- ü/N bei -20 °C ausfällen
- 30 min bei 12000x g und 4 °C zentrifugieren
- mit 500 µl 70%-igem EtOH waschen
- 10 min bei 12000x g und 4 °C zentrifugieren
- in 20 µl Wasser aufnehmen

#### 2.5.4. cDCN Synthese (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)

Für die quantitative mRNA Bestimmung mittels *real time* PCR mußte die RNA zunächst in komplementäre DNC (cDNA) umgeschrieben werden, da RNA nicht als Matrize für die Taq (*thermophilus aquaticus*) Polymerase verwendet werden kann. Dies geschah mit Hilfe von reversen Transkriptasen (RT), hier die aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) und *random* Hexamer Primer, Hexanukleotiden mit statistischer Basenzusammensetzung, die folglich an den verschiedensten Stellen eines mRNA Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Um eine Zerstörung der RNA durch die RNase H Aktivität der MMLV RT zu verhindern, wurde zusätzlich ein RNase Inhibitor zugefügt.

##### Durchführung:

- 1-2 µg RNA auf Eis mit RNase freiem Wasser auf 11 µl auffüllen
- 1 µl random Hexamer Primer hinzufügen
- 5 min bei 70 °C inkubieren
- 3-5 min auf Eis abkühlen lassen
- 4 µl Reaktionspuffer hinzufügen
- 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor hinzufügen
- 2 µl dNTPs hinzufügen
- 5 min bei 25 °C inkubieren
- 1 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase zugeben und mischen
- 60 min bei 42 °C inkubieren
- 10 min bei 70 °C inkubieren, um die Reaktion durch Denaturierung der RT abubrechen
- 10 min auf Eis stehen lassen und anschließend einfrieren

#### 2.5.5. β-Aktin PCR

Um die Qualität der cDNA zu prüfen, wurde eine β-Aktin PCR durchgeführt. Durch die Wahl der Primer war es zudem möglich, zu kontrollieren, ob eventuell noch genomische DNA die Probe verunreinigt, indem Exon-übergreifende Sequenzen verwendet wurden..

Durchführung:

- 1  $\mu$ l dNTPs
- 0,5  $\mu$ l Taq
- 1  $\mu$ l Primermix
- 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ l Puffer
- 1  $\mu$ l cDNA
- 39,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

## PCR Bedingungen:

- |       |       |        |
|-------|-------|--------|
| - 1x  | 94 °C | 4 min  |
| - 30x | 94 °C | 30 sek |
|       | 58 °C | 45 sek |
|       | 72 °C | 30 sek |
| - 1x  | 72 °C | 10 sek |

**2.5.6. Real-Time PCR**

Die quantitative *real time*-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung von DNA Mengen, die auf der herkömmlichen PCR (*polymerase chain reaction*) beruht. Bei dieser Art PCR werden DNA Segmente nicht einfach nur vervielfältigt, sondern können durch die Bestimmung von Fluoreszenz, die proportional zur Menge an PCR Produkten zunimmt, quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden TaqMan<sup>®</sup> Sonden eingesetzt. Diese beruhen auf dem FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) Effekt. Dabei befindet sich ein Donor-Fluorochrom in unmittelbarer, räumlicher Nähe eines korrespondierenden Akzeptor-Fluorochroms (Quencher), was zur Folge hat, daß bei Lichteinstrahlung keine Fluoreszenz emittiert wird. Bei den TaqMan<sup>®</sup> Sonden sind Reporter (FAM, 6-Carboxfluorescein) und Quencher (TAMRA, 6-Carboxy-tetramethylrhodamin) auf Hybridisierungs sonden zu finden, die durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstrangs abgebaut werden. Dadurch wird die räumlich Nähe aufgehoben und Fluoreszenz kann gemessen werden.

Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l in 384-Well Platten angesetzt und die cDNA Mengen in Zweifachansätzen bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte durch Auftragung der Zyklenzahl gegen die Fluoreszenz. Dann wurde manuell ein Schwellenwert in

die exponentielle Phase der Kurven gelegt und hieraus die Zyklusnummer (Ct) bestimmt, welcher die Basis für die Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta$  Ct-Methode darstellt. Als Referenz wurde die Expression des *house keeping*-Gens HPRT (Hypoxanthin-Guanine Phosphoribosyltransferase) bestimmt. Die Analyse erfolgte im Vergleich zu unstimulierten Proben.

#### Durchführung:

- in 384 PCR Platten wurden zusammen pipetiert:
  - 5  $\mu$ l TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix
  - 0,5  $\mu$ l Assays-on-Demand<sup>®</sup> Gene Expression Assay Mix
  - 4,5  $\mu$ l cDNA
- die Platten wurden mit einer Folie (PCR Seal) versiegelt
- PCR Bedingungen:
  - 1x 50 °C 2 min
  - 1x 95 °C 10 min
  - 40x 95 °C 15 sek
  - 60 °C 1 min

#### Datenanalyse: ( $\Delta\Delta$ Ct-Methode)

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{HPRT})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{unstimuliert}) - \Delta Ct (\text{stimuliert})$$

$$\text{x-fache Expressionsteigerung} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

### **2.6. Statistische Analyse**

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, sind zum Teil als Mittelwerte mit Standardabweichung von  $n$  Einzelwerten dargestellt. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels des parametrischen (students) t-test für unverbundene Stichproben (verwendete Software: SigamPlot 8.0). Dieser prüft, ob sich die Mittelwerte zweier Proben signifikant voneinander unterscheiden. Als signifikant galt  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Diese Arbeit läßt sich in zwei verschiedenen ausgerichtete Bereiche einteilen. Im ersten Teil soll ein geeigneter Stimulus oder eine Kombination verschiedener DC-Aktivierungs-Stimuli für einen potentiellen Einsatz in der Immuntherapie gefunden werden. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Einsetzbarkeit von Dextranpartikeln als Carriersubstanz für Antigen und DC-Aktivatoren für die Immuntherapie. Perspektivisch sollen beide Teilbereiche miteinander verbunden werden, indem der ermittelte, optimale Stimulus für die Beladung der Dextranpartikel eingesetzt wird.

### 1. Synergieeffekte durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer Toll-*like* Rezeptor Liganden

Es ist relativ lange bekannt, daß TLR Ligand stimulierte DC IL-12 freisetzen und dieser Effekt noch durch IFN- $\gamma$  und CD40L verstärkt wird. Aber erst kürzlich konnten verschieden Arbeitsgruppen synergistische Effekte durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer TLR Liganden zeigen (26;154-156). Hier greifen wir die Ergebnisse dieser Arbeiten auf und führen sie weiter aus, indem andere Kombinationen verwendet und weiterführende Versuche, zum Teil auch *in vivo*, durchgeführt werden.

Die Aktivierung von DC durch verschiedene TLR Liganden ist inzwischen relativ gut untersucht und Gegenstand zahlreicher Übersichtsartikel. Auch der therapeutische Einsatz von TLR Liganden in der antitumoralen Immuntherapie ist, zumindest im murinen System, oft beschrieben worden (157). Bei diesen Untersuchungen wurden die TLR Liganden allerdings immer nur als einziger Stimulus oder in Kombination mit bekannten endogenen Aktivatoren wie CD40L oder IFN- $\gamma$  eingesetzt. Erst kürzlich wurden Arbeiten veröffentlicht, die zeigen können, daß verschiedene TLR Liganden in Zweierkombinationen starke, synergistische Effekte auf die Aktivierung von DC zeigen (26;155;156). Vor allem LPS + R848 (26) und Poly (I:C) + R848 (155;156) sind genauer untersucht worden. In dieser Arbeit sollen diese Vorarbeiten aufgegriffen und weitergeführt werden.

Hierfür wird zunächst eine Auswahl an vier TLR Liganden getroffen. Es werden je zwei Liganden extrazellulärer TLR (TLR4: LPS und TLR2: PGN) sowie intrazellulärer TLR (TLR9: CpG und TLR3: Poly (I:C)) ausgewählt. In Vorarbeiten bei denen verschiedenste TLR Liganden (TLR1/2: PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, TLR2/6: MALP2, TLR2: PGN, TLR3: Poly (I:C), TLR4: LPS, TLR7: R848, TLR9: CpG) miteinander verglichen worden sind, konnte zudem gezeigt werden, daß LPS, PGN und CpG die effektivsten IL-12 Induktoren bei BM-DC sind (Daten nicht gezeigt). Poly (I:C) wird gewählt, weil es in schon veröffentlichten Arbeiten im



Zusammenspiel mit anderen TLR Liganden bereits starke synergistische Effekte erzielen konnte (26;155;156) und zudem als einziger TLR Ligand einen MyD88 unabhängigen Signalweg verwendet.

### 1.1. Ermittlung der Arbeitskonzentrationen von LPS, PGN, Poly (I:C) und CpG

Bevor die TLR Liganden LPS, PGN, Poly (I:C) und CpG miteinander kombiniert werden, sollten zunächst einmal Konzentrationen ermittelt werden, bei denen die Wirkung dieser Stimuli einsetzt. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarks generierte dendritische Zellen (BM-DC) für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (s. Tab. 1) der TLR Liganden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen nach Anfärbung der Aktivierungs-abhängigen Oberflächenmarker CD54, CD86, CD80 und CD25 im Durchflusszytometer (FACS) analysiert und in einer allogenen, gemischten Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) eingesetzt. Außerdem wurden die Konzentrationen von IL-12, IL-2, IL-6 und IL-10 in den Zell-kulturüberständen bestimmt.

Konzentration	TLR Ligand			
	LPS	CpG	PGN	Poly (I:C)
1	0 ng/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml
2	0,1 ng/ml	0,005 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml
3	1 ng/ml	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml
4	10 ng/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
5	100 ng/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
6	1000 ng/ml	25 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml

Tabelle 1: Konzentrationen der verschiedenen TLR Liganden, die bei der Bestimmung des Aktivierungsprofils genutzt wurden.

#### FACS-Analyse:

Die geringste verwendete Konzentration von LPS (0,1 ng/ml) zeigte keinen Effekt, während bei 1 ng/ml schon eine deutliche Expressionssteigerung der Oberflächenmarker im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zu erkennen war. Die Menge an Oberflächenmolekülen wurde durch 10 ng/ml LPS nochmals stark erhöht. Bei den Konzentrationen 100 ng/ml und 1000 ng/ml LPS war aber nur noch ein geringer, weiterer Anstieg der Expression zu beobachten. Eine Ausnahme bildete die Expression von CD25, die auch in diesem Bereich noch einen starken Anstieg verzeichnete (s. Abb. 1A).

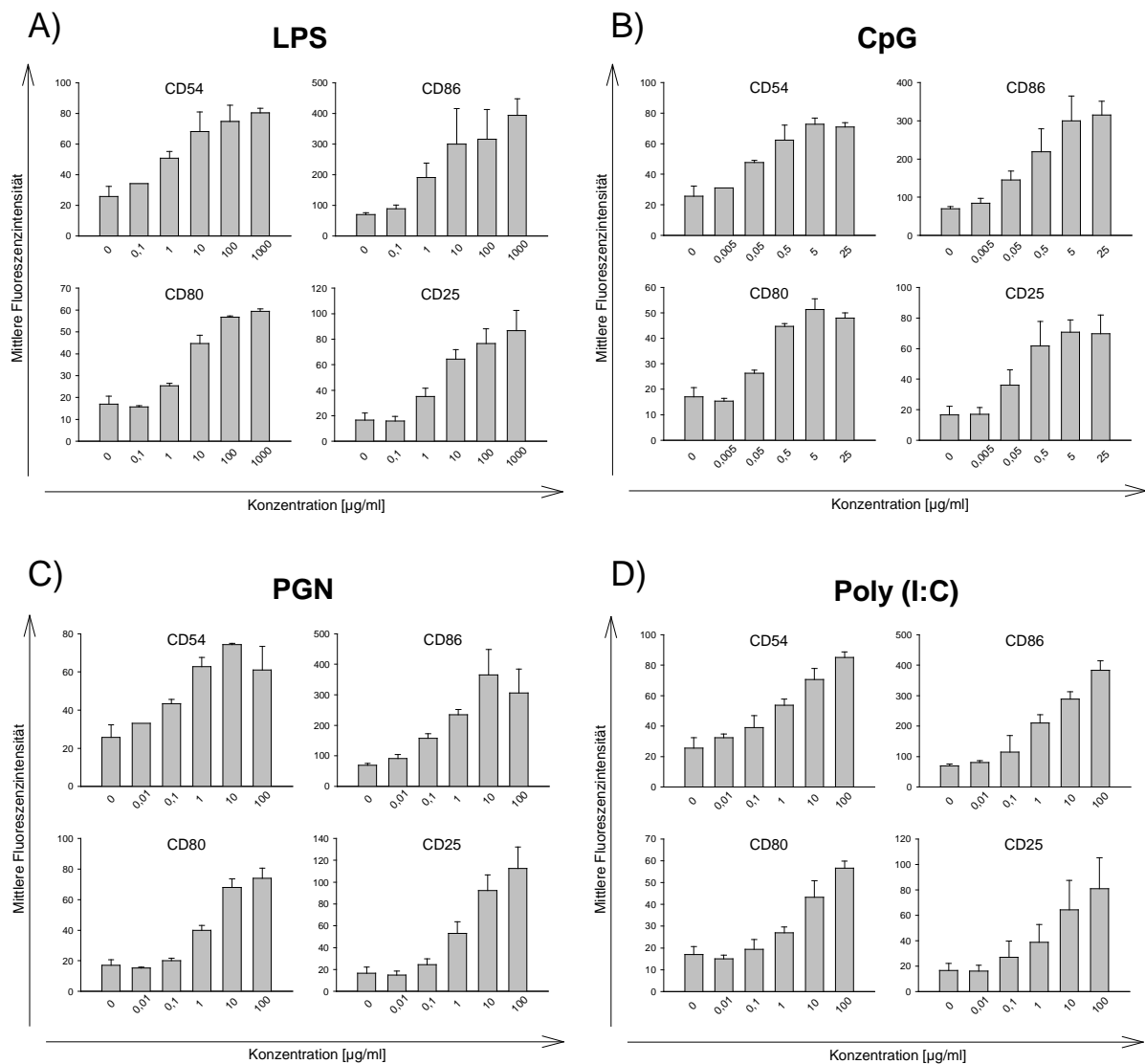


Abbildung 1: **Konzentrations-abhängige Expression von Oberflächenmarkern auf BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C).**

BM-DC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von A) LPS, B) CpG, C) PGN oder D) Poly (I:C) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Fluoreszenz-markierten Ak gegen CD54, CD86, CD80 und CD25 sowie mit TOPRO-3 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der TOPRO-3 negativen BM-DC aus 4 unabhängigen Experimenten.

Der Verlauf des Anstiegs der Expression der untersuchten Oberflächenmarker war bei der Stimulierung mit CpG ähnlich wie bei LPS. Auch hier zeigte die geringste Konzentration (0,005 µg/ml CpG) keinen Effekt, während die Expressionssteigerung zwischen 0 µg/ml ( $\approx$  0,005 µg/ml) und 0,05 µg/ml CpG sowie zwischen 0,05 µg/ml und 0,5 µg/ml CpG stark war. Die Unterschiede zwischen den drei höchsten Konzentrationen (0,5 µg/ml, 5 µg/ml und 25 µg/ml CpG) waren wieder gering (s. Abb. 1B).

PGN zeichnete dagegen, verglichen mit LPS und CpG, ein uneinheitliches Bild. Während die Expression von CD54 und CD86 schon bei 0,1 µg/ml deutlich stärker war als bei 0 µg/ml ( $\approx$  0,01 µg/ml) und danach kontinuierlich stärker wurde, um dann bei der höchsten

Konzentration wieder abzufallen, zeigten CD80 und CD25 erst bei 1 µg/ml einen starken Anstieg der Expression, der bis 10 µg/ml stark blieb und sich zwischen 10 µg/ml und 100 µg/ml abschwächte (s. Abb. 1C).

Poly (I:C) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml führte zu einer schwachen Steigerung der Expression gegenüber 0 µg/ml ( $\approx$  0,01 µg/ml Poly (I:C)). Diese Zunahme wurde bei steigender Konzentration stärker, ohne anders als bei LPS, CpG und PGN bei der höchsten verwendeten Konzentration nachzulassen (s. Abb. 1D).

#### Allogene MLR:

Die allogene stimulatorische Kapazität von BM-DC konnte durch Stimulierung der Zellen mit 0,1 ng/ml LPS im Vergleich zu unstimulierten Zellen (0 ng/ml LPS) nicht gesteigert werden. Eine stärkere T-Zell Proliferation wurde erst durch die Stimulation mit 1 ng/ml LPS erreicht. Zwischen den Aktivierungen mit 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml ließen sich keinerlei Unterschiede ausmachen (s. Abb. 2A).

Wie bei LPS zeigten sich auch bei CpG keine Unterschiede zwischen den beiden geringsten Konzentrationen, 0 µg/ml und 0,005 µg/ml CpG. Erst die nächst höhere Konzentration (0,05 µg/ml CpG) steigerte die T-Zell Proliferation deutlich und bei 0,5 µg/ml CpG wurde das Maximum erreicht. Alle höheren Konzentrationen wiesen eine etwas geringere allostimulatorische Kapazität auf (s. Abb. 2B).

Mit 0 µg/ml und 0,01 µg/ml PGN stimulierte BM-DC zeigten keine Unterschiede bei der Stimulierung von T-Zellen in der allogenen MLR auf. Bei 0,1 µg/ml PGN war die Proliferation etwas stärker, aber erst die drei höchsten Konzentrationen wiesen eine stark erhöhte Teilungsrate der T-Zellen auf, wobei der stärkste Effekt bei 10 µg/ml detektiert wurde. Bei einer Stimulierung der BM-DC mit 100 µg/ml fiel die T-Zellproliferation allerdings schon wieder etwas geringer aus (s. Abb. 2C).

Die von Poly (I:C) stimulierten BM-DC induzierte Proliferation von T-Zellen wies eine starke Korrelation zur Konzentration auf. Zwischen den geringsten Konzentrationen, 0 µg/ml, 0,01 µg/ml sowie 0,1 µg/ml Poly (I:C) lassen sich zwar keine Unterschiede ausmachen, aber von 1 µg/ml über 10 µg/ml bis 100 µg/ml Poly (I:C) steigt die allostimulatorische Kapazität der stimulierten Zellen stark und kontinuierlich an (s. Abb. 2D).

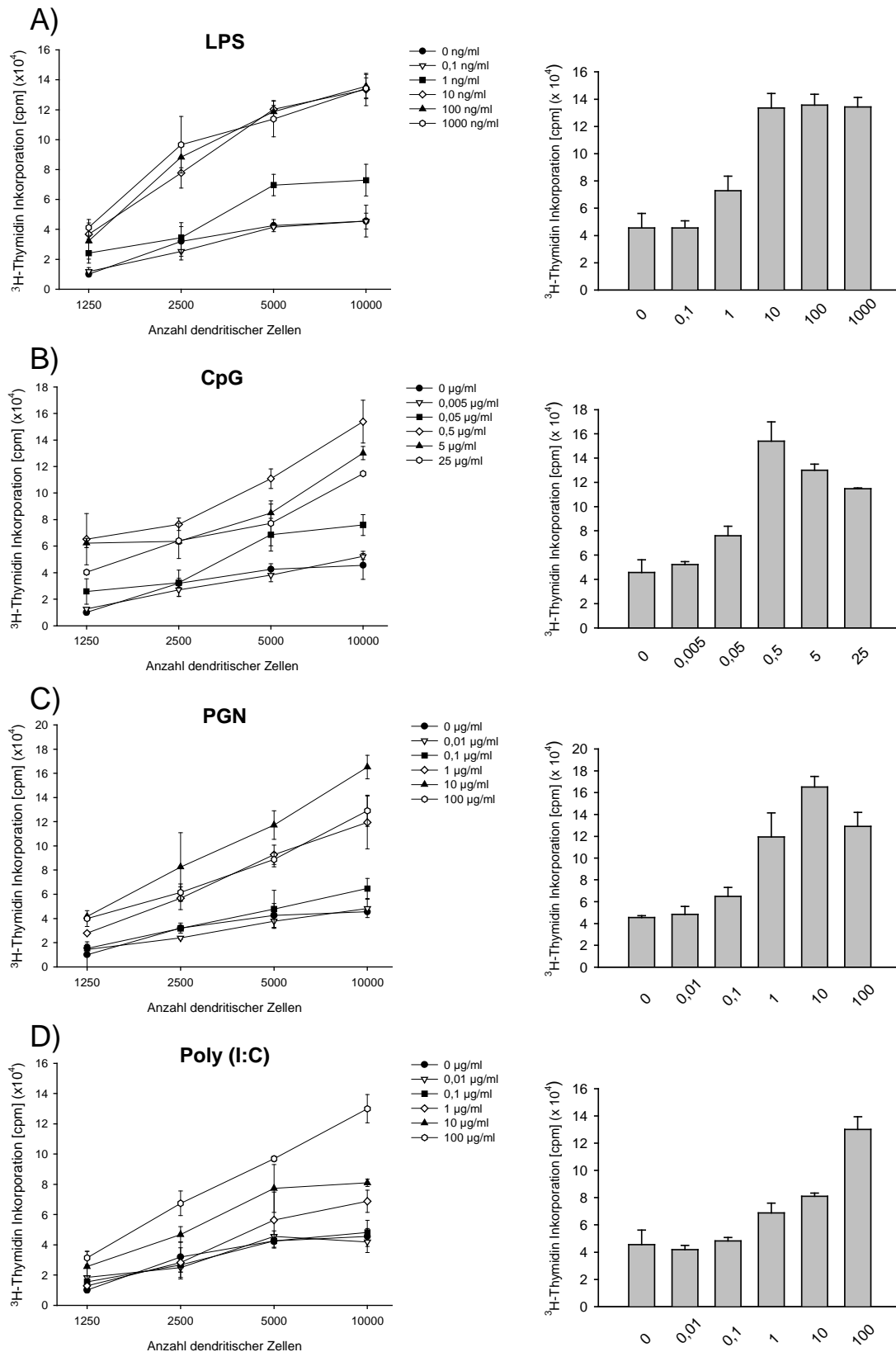


Abbildung 2: **Konzentrations-abhängige Erhöhung der allostimulatorischen Kapazität von BM-DC durch Stimulierung mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C).**

BM-DC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von A) LPS, B) CpG, C) PGN oder D) Poly (I:C) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und nach TOPRO-3 Ausschluß mit  $1 \times 10^5$  allogenen T-Zellen im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 ko-kultiviert. Nach 5 Tagen wurde der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Das Balkendiagramm rechts neben jedem Kurvendiagramm stellt die Proliferation der T-Zellen im DC:T-Zell Verhältnis 1:10 dar. Repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Versuchen zeigt.

### Zytokinproduktion:

IL-12: Erst durch die Stimulierung der BM-DC mit 10 ng/ml LPS konnte IL-12 im Überstand nachgewiesen werden. Durch Erhöhung der LPS Konzentration auf 100 ng/ml stieg die IL-12 Konzentration stark an. Eine weitere Erhöhung der LPS Konzentration auf 1000 ng/ml zeigte keinen zusätzlichen Effekt auf die Freisetzung des Zytokins. Die Ausschüttung von IL-12 durch CpG stimulierte BM-DC setzte bei 0,5 µg/ml ein und war durch Erhöhung der Konzentration nicht steigerbar. PGN stimulierte Zellen wiesen bei 1 µg/ml geringe Mengen von freigesetztem IL-12 auf. Stark erhöht wurde diese durch Stimulierung mit 10 µg/ml PGN. Eine weitere Erhöhung der Konzentration zog keine weitere Steigerung nach sich. Poly (I:C) induzierte erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration die Freisetzung von IL-12 durch BM-DC (s. Abb. 3A).

IL-2: Eine starke IL-2 Produktion konnte nur mit hohen Konzentrationen von PGN (>10 µg/ml) erreicht werden. Mit LPS und Poly (I:C) konnte keine Freisetzung des Zytokins erzielt werden und der Effekt von CpG war ebenfalls nur gering (s. Abb. 3B).

IL-6: Die Freisetzung von IL-6 nach Stimulation mit den TLR Liganden folgte einem ähnlichen Schema wie die von IL-12. Erst mit 10 ng/ml LPS wurde das Zytokin freigesetzt. Dieser Wert stieg bei Erhöhung der Konzentration weiter an, und erreichte ein Plateau. Die Ausschüttung von IL-6 durch CpG-Stimulation war bei den Konzentrationen 0,5 µg/ml CpG bis 25 µg/ml CpG gleich. Die IL-6 Freisetzung nach Stimulation mit Poly (I:C) war mit 10 µg/ml Poly (I:C) nur gering, stieg mit 100 µg/ml Poly (I:C) dann aber auf Werte an, die mit denen der anderen Gruppen vergleichbar waren (s. Abb. 3C).

IL-10: Die IL-10 Freisetzung durch LPS stieg bei Steigerung der Konzentration, blieb aber auf geringem Niveau. CpG induzierte keine Produktion von IL-10 durch BM-DC, während die Stimulierung mit 100 µg/ml Poly (I:C) geringe Mengen freisetzte. Die Aktivierung der BM-DC mit PGN resultierte ab einer Konzentration von 10 µg/ml PGN in einer starken Produktion von IL-10 durch die Zellen, die durch Erhöhung auf 100 µg/ml PGN nochmals kräftig angehoben wurde (s. Abb. 3D).

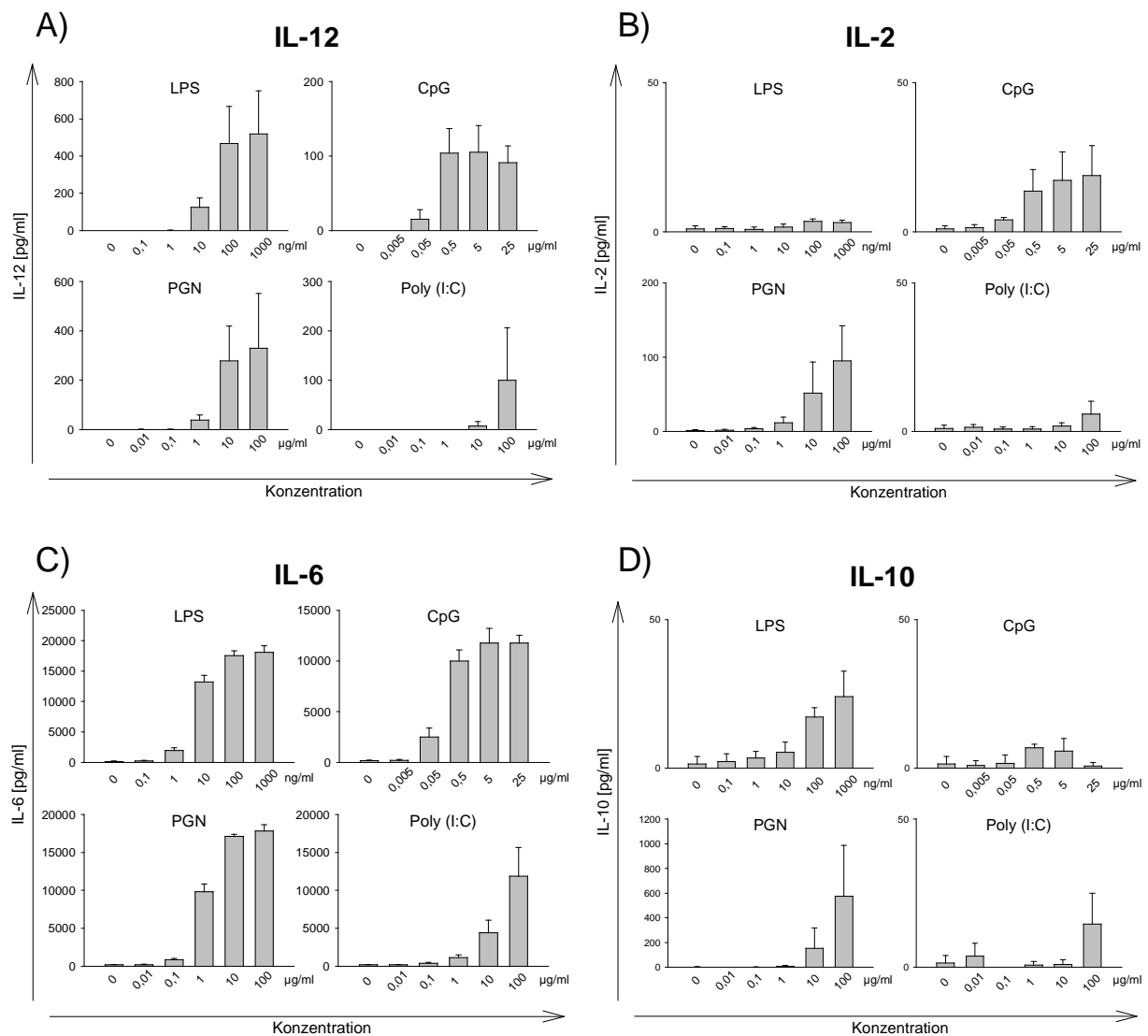


Abbildung 3: **Konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-12, IL-2, IL-6 und IL-10 durch BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C).**

BM-DC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von A) LPS, B) CpG, C) PGN oder D) Poly (I:C) stimuliert. Anschließend wurden Überstände entnommen und die Konzentration von IL-12, IL-2, IL-6 und IL-10 bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.

## 1.2. Synergistische Effekte durch Kombination von drei TLR-Liganden

In den vorangegangenen Versuchen (s. 1.1.1) konnte eine Konzentrations-abhängige Steigerung der Expression von Oberflächenmarkern, der allostimulatorischen Kapazität sowie der Freisetzung von IL-12 durch BM-DC gezeigt werden, die mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C) stimuliert worden waren. Diese Versuche sind durchgeführt worden, um die Konzentrationen der jeweiligen Stimuli zu ermitteln, bei denen eine Aktivierung mittelmäßig oder maximal ist. In den nächsten Versuchen sollten diese Erkenntnisse eingesetzt werden, um synergistische Effekte durch den Einsatz verschiedener Kombinationen der TLR Liganden zu erzielen. Dafür wurden in einem Vorversuch zunächst die möglichen Dreierkombinationen

aus LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob etwaige synergistische Effekte deutlicher durch die Verwendung von suboptimalen, also mittelstarken oder optimalen Konzentrationen (s. Tab. 2) der TLR Liganden zu erkennen sind. Hierfür wurden BM-DC an Tag 8 für 24 h stimuliert und die IL-12 Konzentration im Überstand analysiert. Es zeigte sich für alle vier möglichen Kombinationen ein synergistischer Effekt, der allerdings bei der Verwendung suboptimaler Konzentrationen deutlich stärker ausgebildet war (Daten nicht gezeigt).

Konzentration	TLR Ligand			
	LPS	CpG	PGN	Poly (I:C)
suboptimal	1 ng/ml	0,05 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
optimal	100 ng/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml

Tabelle 2: **Optimale und suboptimale Konzentrationen der TLR Liganden**

Gruppe	TLR Ligand			
	LPS [ng/ml]	CpG [µg/ml]	PGN [µg/ml]	Poly (I:C) [µg/ml]
None	0	0	0	0
LPS	100	0	0	0
CpG	0	5	0	0
PGN	0	0	10	0
Poly (I:C)	0	0	0	100
LPS + CpG	1	0,05	0	0
LPS + PGN	1	0	1	0
LPS + Poly (I:C)	1	0	0	10
CpG + PGN	0	0,05	1	0
CpG + Poly (I:C)	0	0,05	0	10
PGN + Poly (I:C)	0	0	1	10
LPS + CpG + PGN	1	0,05	1	0
LPS + CpG + Poly (I:C)	1	0,05	0	10
LPS + PGN + Poly (I:C)	1	0	1	10
CpG + PGN + Poly (I:C)	0	0,05	1	10

Tabelle 3: **Konzentrationen der TLR Liganden in den Gruppen, die für Versuch 1.2 eingesetzt wurden**

In den nächsten Versuchen wurden daher suboptimale Konzentrationen verwendet, um die Kombination zu erhalten, welche die für die in dieser Arbeit anvisierte Zielsetzung am geeignetsten erschien. Im Folgenden wurden Tag 8 BM-DC für 24 h mit den vier möglichen Dreierkombinationen stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen mit den sechs möglichen Zweierkombinationen versetzt, wobei die gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden wie für die Dreifachstimulationen. Als Kontrolle dienten vier weitere Gruppen von BM-DC, die mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C) stimuliert wurden. Bei den Kontrollgruppen wurden nicht die suboptimalen, sondern die optimalen Konzentrationen der Stimuli verwendet (s. Tab. 3). Die

Zellen wurden nach Anfärbung der Oberflächenmarker CD54, CD86, CD80 und CD25 mittels Durchflußzytometrie analysiert und in einer allogenen MLR eingesetzt. Außerdem wurde die IL-12 Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Die Expression von CD54 und CD86 zeigte keine Unterschiede zwischen den Einfach-, Zweifach- und Dreifachstimulationen und auch die Unterschiede bei der Expression von CD80 und CD25 waren weder signifikant noch erheblich (s. Abb. 4). Ähnlich indifferent zeigte sich die allogene MLR. Auch hier waren die Unterschiede weder signifikant noch besonders deutlich und nicht auf synergistische Effekte zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Anders verhielt es sich mit der Freisetzung von IL-12 durch die so stimulierten Zellen. Im Vergleich mit den Einzelstimulationen zeigen alle Mehrfachkombinationen einen synergistischen Effekt (s. Abb. 5).

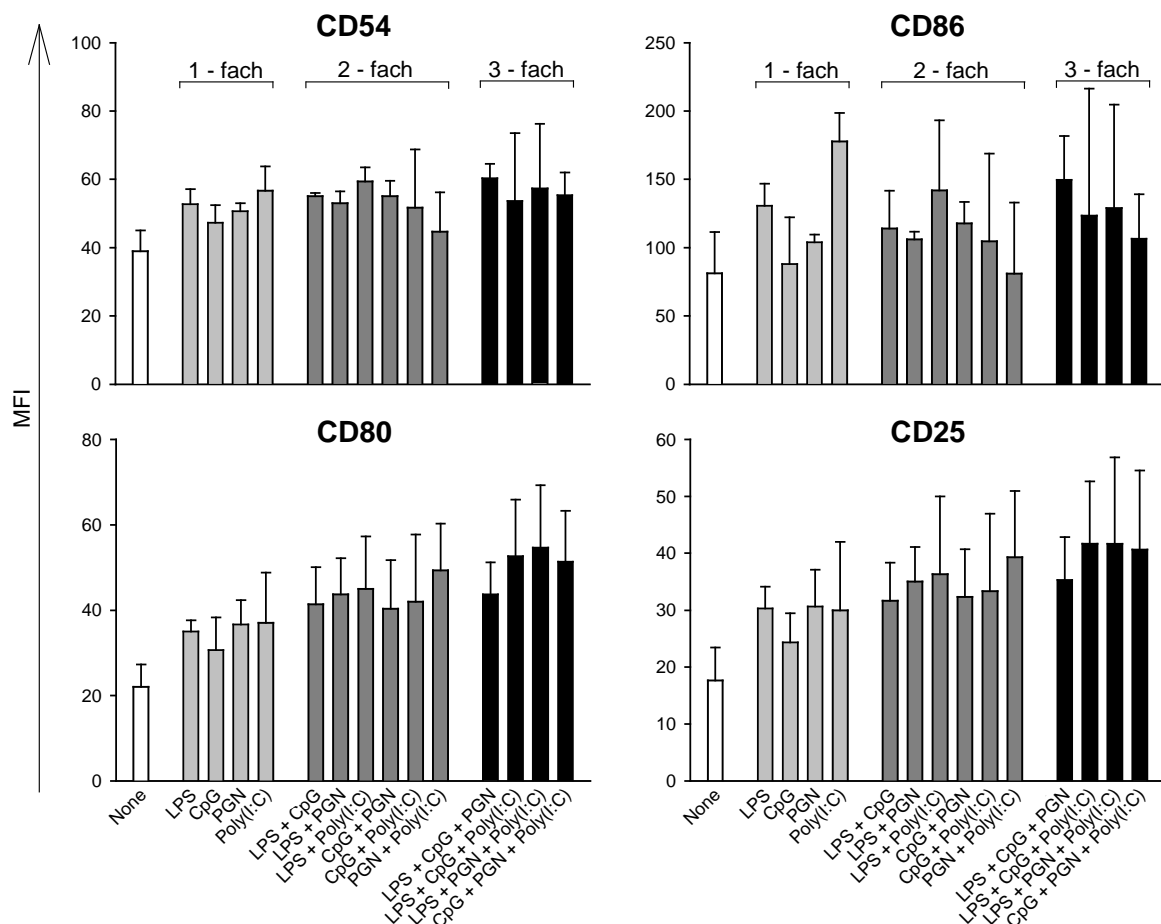


Abbildung 4: **Expression von Oberflächenmarkern auf BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in 1-fach, 2-fach oder 3-fach Kombination.**

BM-DC wurden für 24 h mit LPS, CpG, PGN und/oder Poly (I:C) einzeln sowie mit allen möglichen 2-fach und 3-fach Kombinationen stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen bei den 1-fach Stimulationen waren: 100 ng/ml LPS, 5 µg/ml CpG, 10 µg/ml PGN, 100 µg/ml Poly (I:C) und bei den 2-fach bzw. 3-fach Stimulationen: 10 ng/ml LPS, 0,05 µg/ml CpG, 1 µg/ml PGN, 10 µg/ml Poly (I:C). Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Fluoreszenz-markierten Ak gegen CD54, CD86, CD80 und CD25 sowie mit TOPRO-3 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der TOPRO-3 negativen BM-DC aus 5 unabhängigen Experimenten.



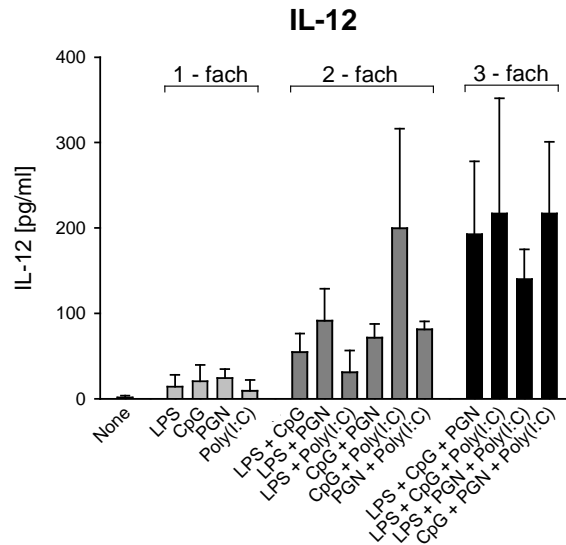


Abbildung 5: Freisetzung von IL-12 durch BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in 1-fach, 2-fach oder 3-fach Kombination.

BM-DC wurden für 24 h mit LPS, CpG, PGN und/oder Poly (I:C) einzeln sowie mit allen möglichen 2-fach und 3-fach Kombinationen stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen bei den 1-fach Stimulationen waren: 100 ng/ml LPS, 5 µg/ml CpG, 10 µg/ml PGN, 100 µg/ml Poly (I:C) und bei den 2-fach bzw. 3-fach Stimulationen: 10 ng/ml LPS, 0,05 µg/ml CpG, 1 µg/ml PGN, 10 µg/ml Poly (I:C). Anschließend wurden Überstände entnommen und die Konzentration von IL-12 bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten.

### 1.3. Titration von CpG, PGN und Poly (I:C) gegeneinander

Die Resultate der Versuche aus 1.1.2 sprachen für die Verwendung der Kombinationen LPS, CpG und Poly (I:C) oder PGN, CpG und Poly (I:C). Da PGN neben dem TLR 2 auch noch über Nod1 und Nod2 agiert (158), während LPS lediglich über TLR4 wirkt (159), wurde für die nachfolgenden Versuche die Kombination aus CpG, PGN und Poly (I:C) ausgewählt.

Wie die Versuche unter 1.1.1 gezeigt hatten, existieren bei einer Einzelstimulation für jeden TLR Ligand optimale Konzentrationen. Daher sollten in den folgenden Versuchen die optimalen Konzentrationen der einzusetzenden Liganden in der Dreifachkombination bestimmt werden. Hierfür wurden Tag 8 BM-DC für 24 h mit steigenden Konzentrationen von CpG (0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml), PGN (1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml) und Poly (I:C) (1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml) stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten Einzel- und Doppelstimulationen, wobei immer die höchsten Konzentrationen (5 µg/ml CpG, 100 µg/ml PGN und 100 µg/ml Poly (I:C)) verwendet wurden.

Sowohl die Freisetzung von IL-12 als auch von IL-10 erhöhte sich mit steigender Konzentration des zugesetzten Poly (I:C). Bei gleichbleibender PGN/Poly (I:C) Konzentration aber steigenden Mengen an CpG sank die Freisetzung von IL-12. Ausnahmen

bildeten lediglich die Meßpunkte für 100 µg/ml Poly (I:C) + 1 µg/ml PGN und 100 µg/ml Poly (I:C) + 10 µg/ml PGN, bei denen die freigesetzte Menge an IL-12 bei einer Konzentrationssteigerung des CpG von 0,05 µg/ml auf 0,5 µg/ml anstieg. Unter gleichen Bedingungen blieb die Freisetzung von IL-10 für 0,05 µg/ml und 0,5 µg/ml CpG nahezu gleich, während sie für 5 µg/ml geringer war. Mit steigender Menge zugesetztem PGN wurde zunehmend IL-10 von den Zellen produziert. Dieser für IL-10 so klare Trend, trifft auf die Freisetzung von IL-12 nicht zu. Von 1 µg/ml PGN zu 10 µg/ml stieg die IL-12 Produktion zunächst an, um bei 100 µg/ml wieder geringer zu werden. Eine Ausnahme bildete wieder der Meßpunkt für 100 µg/ml Poly (I:C) + 0,5 µg/ml CpG + 1 µg/ml PGN. Dieser wies im Vergleich zu dem entsprechendem Wert mit 10 µg/ml PGN eine größere Menge IL-12 auf (s. Abb. 6A und Abb. 7A).

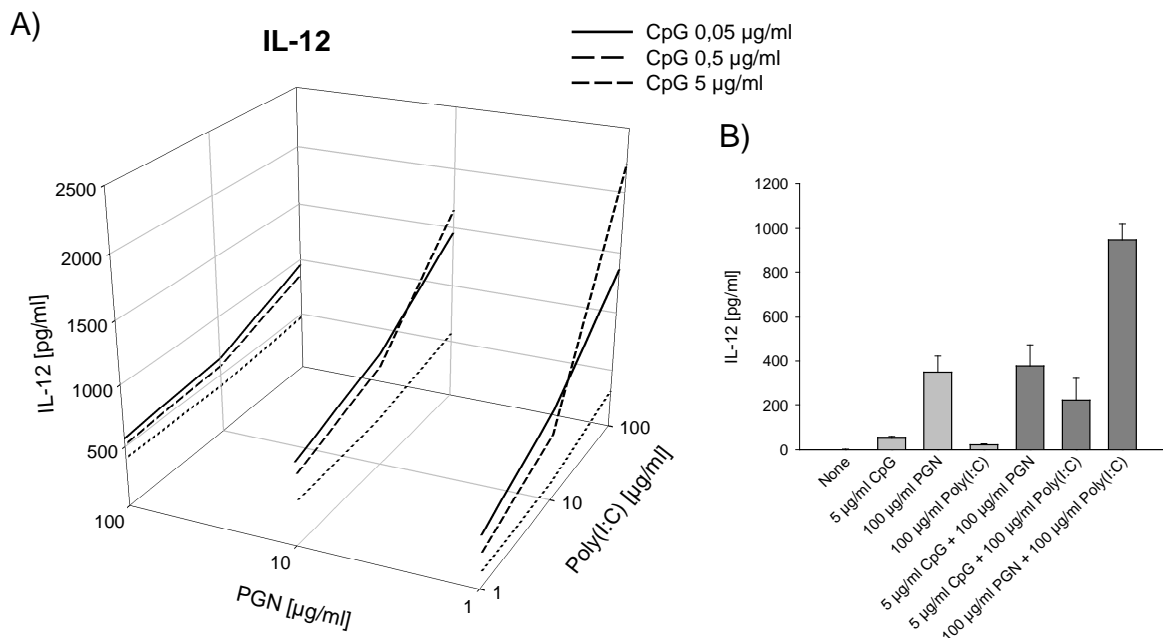


Abbildung 6: Freisetzung von IL-12 durch BM-DC nach Stimulierung mit CpG, PGN und Poly (I:C) in unterschiedlichen Konzentrationen.

A) BM-DC wurden mit allen möglichen 3-fach Kombinationen aus CpG, PGN und Poly (I:C) unter Verwendung von drei verschiedenen Konzentrationen pro TLR Ligand stimuliert. B) Zur Kontrolle wurden BM-DC mit den einzelnen TLR Liganden oder 2-fach Kombinationen hieraus stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentration von IL-12 in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

Ein Vergleich mit den Kontrollgruppen zeigte, daß wesentlich weniger IL-12 durch die Einzel- und Doppelstimulationen sekretiert wurde als durch die höchste Dreierkombination von CpG, PGN und Poly (I:C). So erreichte die IL-12 Produktion von durch 100 µg/ml PGN + 100 µg/ml Poly (I:C) stimulierte BM-DC nicht einmal 50 % des höchsten Wertes, der durch eine Dreifachstimulation erreicht werden konnte (s. Abb. 6B). Die von dieser Gruppe

induzierte Menge an IL-10 dagegen, war genauso hoch, wie die höchste durch eine Dreierkombination erzielte (s. Abb. 7B).

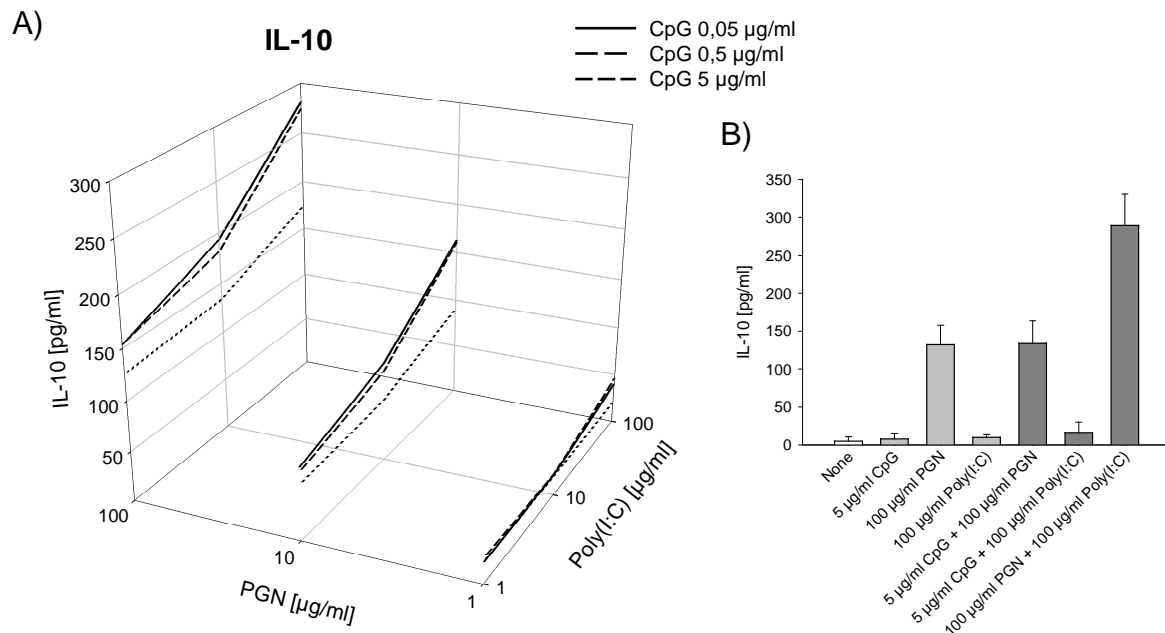


Abbildung 7: Freisetzung von IL-10 durch BM-DC nach Stimulierung mit CpG, PGN und Poly (I:C) in unterschiedlichen Konzentrationen.

A) BM-DC wurden mit allen möglichen 3-fach Kombinationen aus CpG, PGN und Poly (I:C) unter Verwendung von drei verschiedenen Konzentrationen pro TLR Ligand stimuliert. B) Zur Kontrolle wurden BM-DC mit den einzelnen TLR Liganden oder 2-fach Kombinationen hieraus stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentration von IL-10 in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 1.4. Einsatz der Dreierkombination *in vitro*

Das Ziel der bisherigen Versuche war die Bestimmung einer Kombination von TLR Liganden, die eine möglichst starke IL-12 Freisetzung durch BM-DC induzieren sollte. Die Produktion von IL-10 sollte dabei gleichzeitig gering bleiben. Von diesen Vorgaben ausgehend wurde in den weiteren Versuchen 0,5 µg/ml CpG + 100 µg/ml Poly (I:C) + 1 µg/ml PGN zur Aktivierung von BM-DC eingesetzt. Um aber die Richtigkeit der Vorgaben zu prüfen, wurde zusätzlich noch eine weitere Gruppe verwendet, die mit 0,5 µg/ml CpG + 100 µg/ml Poly (I:C) + 10 µg/ml PGN stimuliert wurde, denn diese Bedingungen induzieren bei etwas geringerer IL-12 Freisetzung die Produktion wesentlich größerer Mengen IL-10 (s. Abb. 6A und Abb. 7A). Als weitere Kontrollgruppen wurden eingesetzt: Einzelstimulationen unter Verwendung der unter 1.1.1 evaluierten optimalen Konzentrationen (5 µg/ml CpG, 10 µg/ml PGN und 100 µg/ml Poly (I:C) sowie Zweierkombinationen, bei denen aber die für die Dreifachstimulation verwendeten Konzentrationen eingesetzt wurden (s. Tab. 4).

Gruppe	TLR Ligand		
	CpG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	PGN [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Poly (I:C) [ $\mu\text{g/ml}$ ]
None	0	0	0
CpG	5	0	0
PGN	0	10	0
Poly (I:C)	100	0	0
CpG + PGN	0,5	1	0
CpG + Poly (I:C)	0,5	0	100
PGN + Poly (I:C)	0	1	100
CpG + Poly (I:C) + PGN 1	0,5	1	100
CpG + Poly (I:C) + PGN 10	0,5	10	100

Tabelle 4: Konzentrationen der TLR Liganden in den Dreierkombinationen für die *in vitro*-Versuche

Zunächst sollten die unter 1.1.3 ermittelten Ergebnisse bezüglich der Produktion von IL-12 und IL-10 durch die von TLR Ligand Kombinationen stimulierten BM-DC unter den oben festgesetzten Bedingungen verifiziert werden. Hierfür wurden Tag 8 BM-DC für 24 h stimuliert und anschließend in den Überständen die Konzentration von IL-12 und IL-10 bestimmt.

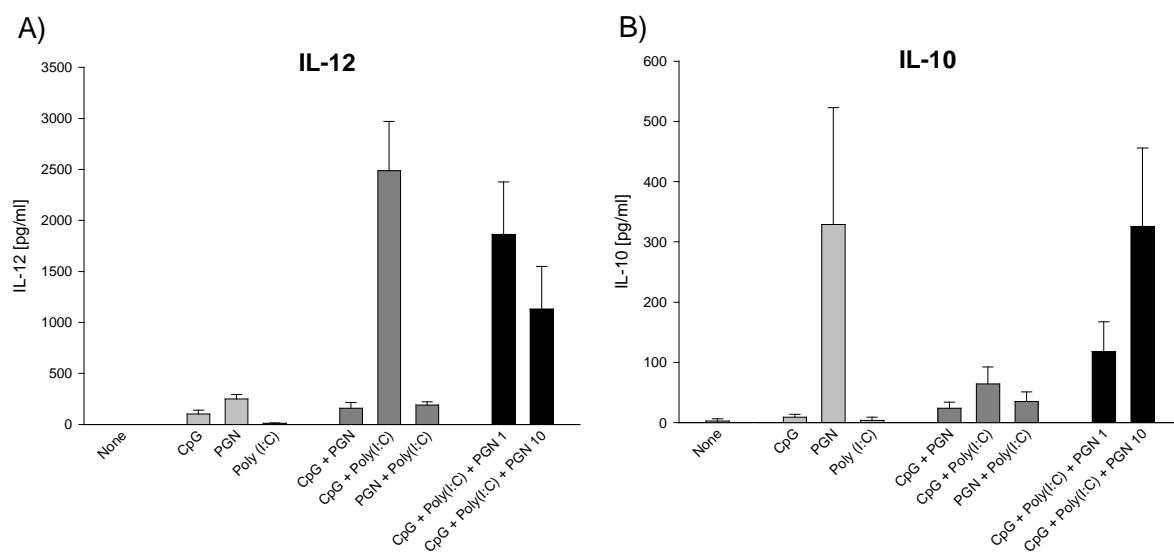


Abbildung 8: Freisetzung von IL-12 und IL-10 durch BM-DC nach Stimulation mit der 3-fach Kombination CpG + Poly (I:C) + PGN.

BM-DC wurden mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  CpG, 100  $\mu\text{g/ml}$  Poly (I:C) und entweder 1  $\mu\text{g/ml}$  oder 10  $\mu\text{g/ml}$  PGN stimuliert. Kontrollgruppen waren Einzelstimulationen mit 5  $\mu\text{g/ml}$  CpG, 10  $\mu\text{g/ml}$  PGN oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Poly (I:C) sowie 2-fach Kombinationen aus 0,5  $\mu\text{g/ml}$  CpG, 100  $\mu\text{g/ml}$  Poly (I:C) und 1  $\mu\text{g/ml}$  PGN. Nach 24 h wurden in den Überständen die Konzentrationen von A) IL-12 und B) IL-10 bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.

Anders als in vorhergegangenen Experimenten führten die Doppelstimulationen mit CpG + PGN sowie PGN + Poly (I:C) zu keinem synergistischen Effekt bei der Sekretion von IL-12.

Bestätigt wurde aber die starke IL-12 Freisetzung durch CpG + Poly (I:C) + PGN stimulierte BM-DC. Wie unter 1.1.3 ermittelt war diese bei Verwendung von 1 µg/ml PGN höher als bei 10 µg/ml. Auch die Menge an freigesetztem IL-10 bei diesen beiden Gruppen verhielt sich ähnlich: Sie war für die Gruppe mit 10 µg/ml PGN wesentlich höher als für die mit 1 µg/ml PGN und entspricht in etwa derjenigen, die auch bei der Einzelstimulation mit 10 µg/ml PGN zu beobachten war. Entgegen den Erwartungen an diesen Versuch induzierte die Doppelkombination aus CpG + Poly (I:C) die stärkste IL-12 Produktion, während gleichzeitig die Freisetzung von IL-10 unter derjenigen der beiden Dreifachstimulationen blieb (s. Abb. 8A und 8B).

Es wird postuliert, daß IL-12 eine T<sub>H</sub>1-Ausrichtung von T-Zellen begünstigt (128;129;160), während IL-10 eher für eine T<sub>H</sub>2-Polarisierung verantwortlich gemacht wird (161;162). Daher wurden naive T-Zellen in einer allogenen MLR mit BM-DC ko-kultiviert, die für 24 h stimuliert worden sind. Nach fünf Tagen der Ko-Kultivierung wurden Überstände für eine Bestimmung der freigesetzten Menge an IFN-γ entnommen.

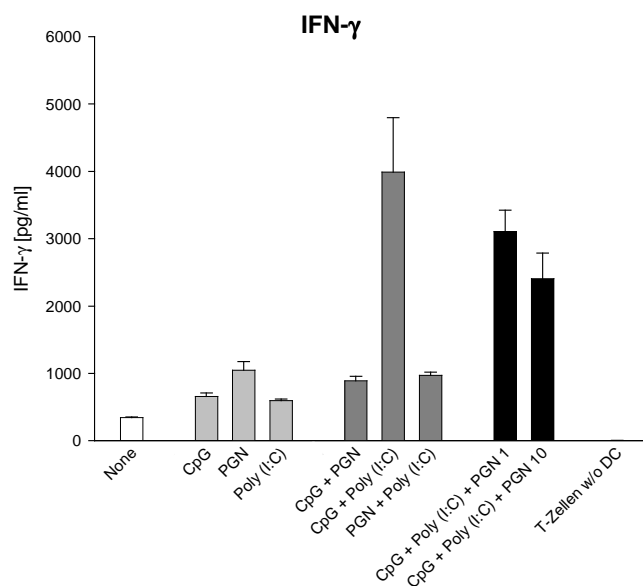


Abbildung 9: **TH1-polarisierende Wirkung von synergistisch stimulierten BM-DC.**

BM-DC, die für 24 h mit CpG, Poly (I:C) und/oder PGN in verschiedenen 1-fach, 2-fach und 3-fach Kombinationen stimuliert worden waren (s. Abb. 8), wurden mit  $1 \times 10^5$  allogenen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in einem Verhältnis von 1:20 für 5 Tage ko-kultiviert. Anschließend wurde die Konzentration von IFN-γ in den Überständen bestimmt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Das Muster der Produktion von IFN-γ durch die T-Zellen entsprach relativ genau dem der IL-12 Freisetzung durch die stimulierten BM-DC. Große Mengen an IFN-γ wurden von den T-Zellen freigesetzt, die mit CpG + Poly (I:C) und den beiden Dreierkombinationen stimulierten

BM-DC ko-kultiviert worden waren, wobei mit steigender Konzentration an PGN die Menge an IFN- $\gamma$  abnahm. Trotz starker IL-10 Freisetzung durch PGN stimulierte BM-DC, induzierten diese Zellen in der allogenen MLR eine IFN- $\gamma$  Produktion, welche über derjenigen von beispielsweise der CpG Gruppe lag, deren BM-DC nur sehr wenig IL-10 freisetzten (s. Abb. 9).

Kürzlich wurden die Notch Liganden Jagged1 und Jagged2 sowie Delta1, Delta3 und Delta4 als wichtige Faktoren für die Polarisierung der T<sub>H</sub>-Differenzierung identifiziert. Beide Familien können von APC exprimiert werden und induzieren verschiedene Ausrichtungen. Jagged begünstigt die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen, während Delta die Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützt (163). Um einen möglichen synergistischen Effekt auf die Bildung dieser Notch Liganden durch gleichzeitige Stimulation von BM-DC mit verschiedenen TLR Liganden zu untersuchen, wurden Tag 8 BM-DC für 12 h stimuliert. Anschließend wurde Gesamt-RNA für die Ermittlung der Expression von Jagged1 und Delta4 aus den Zellen gewonnen.

Für die Expression von Jagged1 konnten keine synergistischen Effekte festgestellt werden. Auch ließen sich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachten. Ausnahmen bildeten lediglich die CpG stimulierte sowie die PGN + Poly (I:C) stimulierte Gruppe. Bei CpG stimulierten BM-DC war die Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen etwas niedriger, während sie bei der PGN + Poly (I:C) Gruppe erhöht war (s. Abb. 10A).

Die Expression von Delta4 war bei allen Gruppen stark erhöht, denen PGN zugesetzt worden war, wobei dieser Notch Ligand von der CpG + PGN Gruppe schwächer und von der CpG + Poly (I:C) + PGN 10 Gruppe stärker exprimiert wurde als von den übrigen drei Gruppen. Da die Expression von Delta4 schon durch PGN alleine so stark erhöht wurde, läßt sich allenfalls bei der CpG + Poly (I:C) + PGN 10 Gruppe von einer Synergie sprechen. Einen eindeutig synergistischen Effekt zeigte dagegen die CpG + Poly (I:C) Gruppe. Hier ist die Expression ungefähr dreifach gegenüber dem Wert einer Addition der Einzelstimulationen erhöht (s. Abb. 10B).

Wichtig für die Migration reifender dendritischer Zellen ist die Expression des Oberflächenrezeptors CCR7 (71-74). Napolitani *et al.* konnten auch bei der Expression dieses *homing* Rezeptors synergistische Effekte durch Stimulierung mit einer Kombination verschiedener TLR Liganden (LPS, R848 und Poly (I:C)) beobachten (26).

Tag 8 BM-DC wurden wie oben für die Ermittlung der Expression von Jagged1 und Delta4 beschrieben stimuliert.

Obwohl eine Stimulierung der Zellen bei allen Gruppen zu einer Erhöhung der CCR7 Expression führt, ließen sich doch zwischen den verschiedenen stimulierten Gruppen keinerlei Unterschiede ausmachen (s. Abb. 10C).

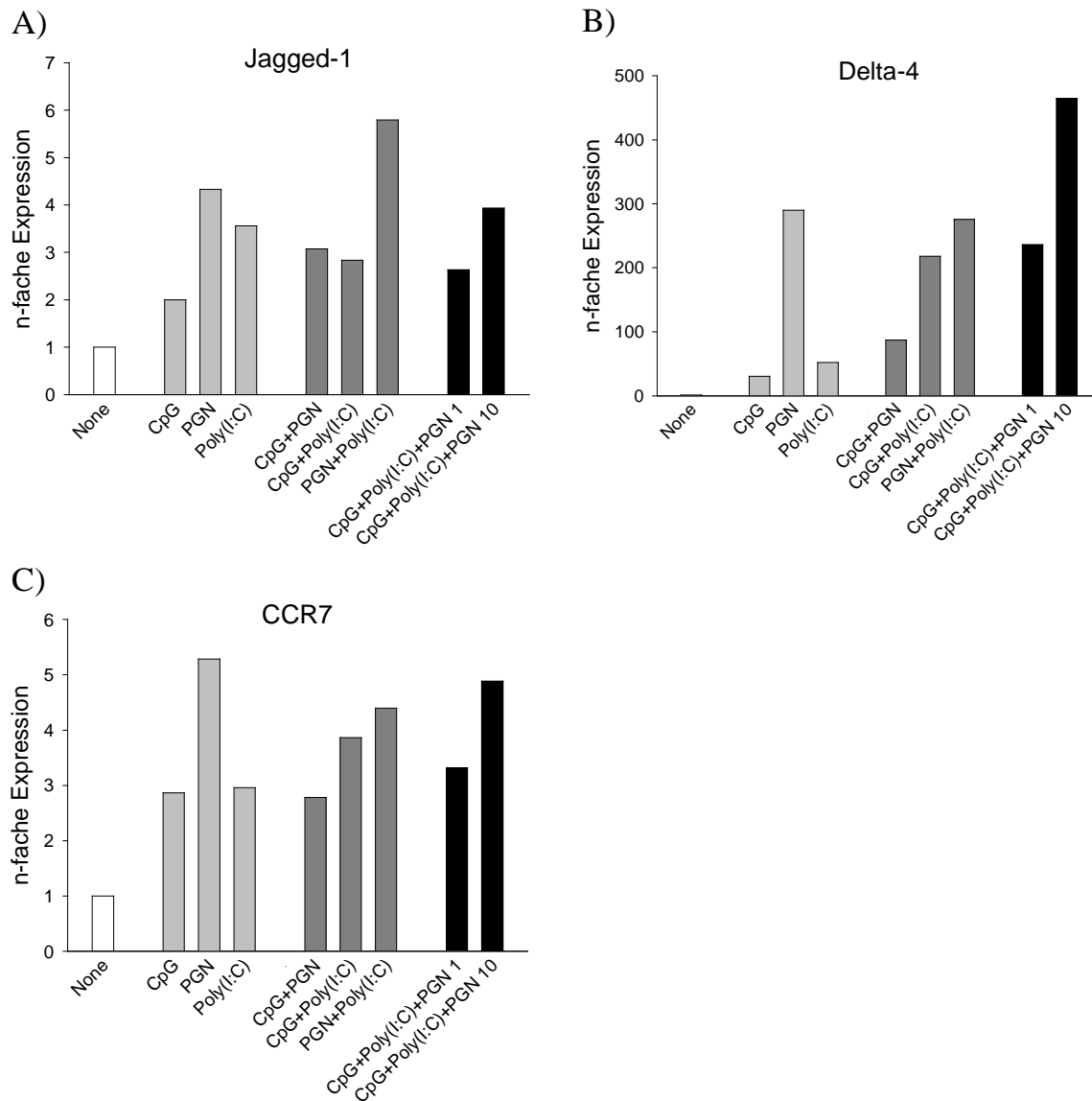


Abbildung 10: **Expression von Jagged-1, Delta-4 und CCR7 in synergistisch stimulierten BM-DC.**

BM-DC wurden mit verschiedenen 1-fach, 2-fach und 3-fach Kombinationen der TLR Liganden CpG, Poly (I:C) und PGN stimuliert (Einzelstimulation: 5  $\mu$ g/ml CpG, 100  $\mu$ g/ml Poly (I:C), 10  $\mu$ g/ml PGN; 2-fach/3-fach Kombination: 0,5  $\mu$ g/ml CpG, 100  $\mu$ g/ml Poly (I:C), 1  $\mu$ g/ml oder 10  $\mu$ g/ml PGN). Anschließend wurde die Expression von A) Jagged-1, B) Delta-4 und C) CCR7 relativ zur Expression von HPRT durch quantitative *real-time* PCR bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta$ ct-Methode. Dargestellt ist die n-fache Expressionsteigerung relativ zur Expression der unstimulierten Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten.

### 1.5. Einsatz der Dreierkombination *in vivo*

Für die folgenden *in vivo* Versuche wird die Anzahl der Gruppen aus praktischen Gründen weiter eingeschränkt (s. Tab. 5). Nachdem synergistische Effekte *in vitro* eindeutig herausgearbeitet worden waren, wurde in diesen Experimenten auf den Einsatz von Einzelstimulationen verzichtet und das Augenmerk auf mögliche Unterschiede bei der gleichzeitigen Verwendung von optimalen Konzentrationen an CpG und Poly (I:C) sowie unterschiedlichen Mengen an PGN gerichtet.

Gruppe	TLR Ligand		
	CpG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	PGN [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Poly (I:C) [ $\mu\text{g/ml}$ ]
CpG + Poly (I:C)	0,5	0	100
CpG + Poly (I:C) + PGN 1	0,5	1	100
CpG + Poly (I:C) + PGN 10	0,5	10	100

Tabelle 5: Konzentrationen der TLR Liganden in den Dreierkombinationen der *in vivo*-Versuche

Um eine Antigen-spezifische Proliferation von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden CFSE markierte Splenozyten und Lymphknotenzellen aus DO11.10 Mäusen i.v. in syngene BALB/c Mäuse injiziert. Anschließend wurden mit OVA Peptid beladene, stimulierte BALB/c BM-DC i.v. injiziert. Nach drei Tagen wurden einem Teil der Tiere Lymphknoten und Milzen entnommen und T-Zellen daraus isoliert. Diese wurden gegen CD4, KJ1-26 (klonotypischer Antikörper gegen den transgenen TCR von DO11.10 Mäusen) und TOPRO-3 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

In der mit unstimulierten BM-DC behandelten Gruppe ließ sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Proliferation von  $\text{KJ1-26}^+$  Zellen in den Lymphknoten oder der Milz ausmachen. Eine Verabreichung CpG/Poly behandelter BM-DC resultierte dagegen in einer starken Zunahme dieser Zellen auf 15% der  $\text{CD4}^+$  T-Zellpopulation in der Milz und 2% in den Lymphknoten. Bei den Gruppen, bei denen neben CpG und Poly(I:C) noch PGN zum Einsatz gekommen ist, ließ sich eine Antigen-spezifische Proliferation nur in der Milz beobachten. Sie fiel zudem wesentlich schwächer aus und nahm mit steigender Konzentration an PGN auf 3% bzw. 0,9% ab (s. Abb. 11).

Die Entnahme von Organen am vierten Tag nach der Immunisierung bestätigte die an Tag drei gemachten Beobachtungen im Wesentlichen. Zu diesem Zeitpunkt hatte allerdings auch bei der mit unbehandelten BM-DC stimulierten Gruppe eine starke Proliferation stattgefunden und die Unterschiede waren nicht mehr so deutlich wie noch am Tag zuvor (Daten nicht gezeigt).



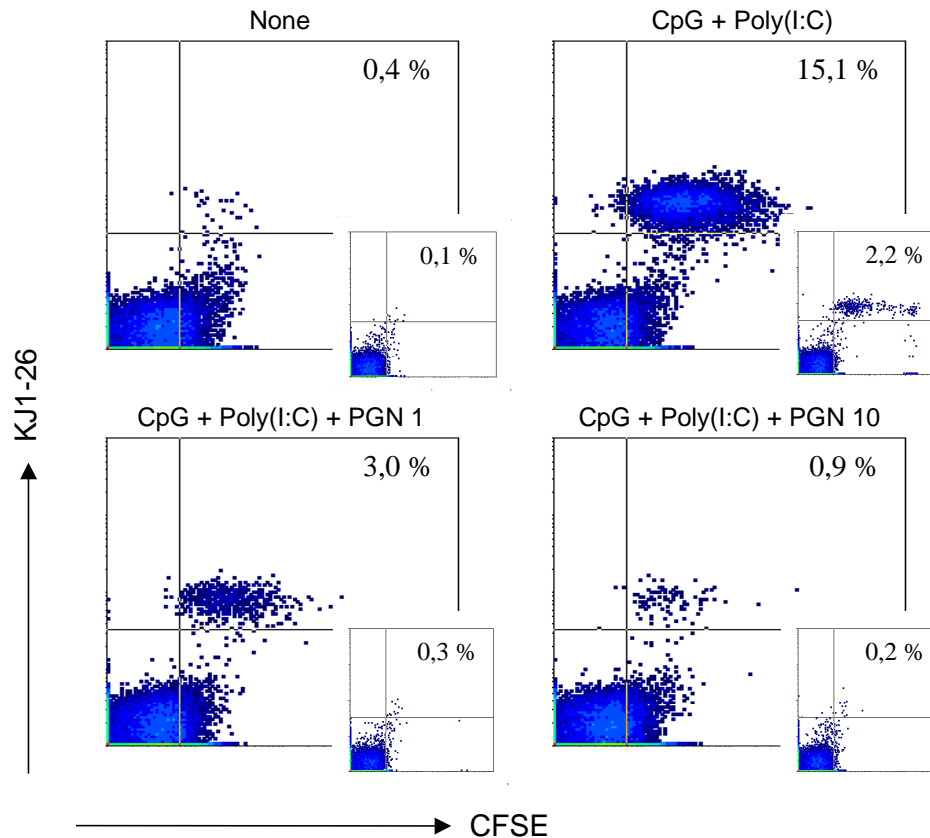


Abbildung 11: **Stimulatorische Kapazität von synergistisch aktivierten BM-DC *in vivo*.**

$5 \times 10^6$  CFSE markierte KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden in Balb/c Mäuse überführt. Einen Tag später wurden  $1 \times 10^6$  synergistisch aktivierte OVA-beladene BM-DC i.v. in diese Mäuse injiziert. Die Stimulation hatte mit 0,5 µg/ml CpG + 100 µg/ml Poly (I:C) mit oder ohne 1 µg/ml oder 10 µg/ml PGN erfolgt. 3 Tage nach Injektion der BM-DC wurden Lymphknoten und Milzen entnommen, um die Ag-spezifische Proliferation der KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. In den *density plots* dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> Zellen nach TOPRO-3 Ausschluß in Milzen (große Grafiken) und Lymphknoten (kleine Grafiken). Die Prozentzahlen geben den Anteil KJ1-26<sup>+</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup> Zellen an. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Vierzehn Tage nach der Immunisierung wurden den verbliebenen Tieren, dreien pro Gruppe, in die Fußsohlen der Hinterläufe mit OVA-beladene BM-DC s.c. injiziert und über sechs Tage die Schwellung der Pfoten dokumentiert. Am ersten Tag nach der Injektion der OVA-beladenen BM-DC ließen sich zwischen den Gruppen keine Unterschiede bei der Dicke der Hinterpfoten ausmachen. Die Schwellung der Pfoten verstärkte sich bei allen vier Gruppen bis zum zweiten Tag, wobei jetzt allerdings große Unterschiede im Ausmaß nachweisbar waren. So fiel die Schwellung bei der unbehandelten Gruppe mit 0,5 mm am Geringsten aus, während sie bei der CpG + Poly (I:C) Gruppe mit 0,9 mm am Stärksten war. Die CpG + Poly (I:C) + PGN 1 Gruppe zeigte nur eine etwas geringere Reaktion und die von der CpG + Poly (I:C) + PGN 10 Gruppe eine deutliche schwächere im Vergleich zur CpG + Poly (I:C) Gruppe. Die Schwellung der Pfoten nahm bei der CpG + Poly (I:C) nochmals leicht zu, um dann ab dem vierten Tag mit leichter Tendenz abzunehmen. Der Rückgang der Fußschwellung setzte bei den anderen drei Gruppen schon nach Tag 2 ein und verlief deutlich

schneller, wobei sich die beiden neben CpG und Poly (I:C) noch mit unterschiedlichen Mengen an PGN stimulierten Gruppen bis zum vierten Tag angenähert hatten und bis zum Ende des Versuchs im Gleichklang verliefen (s. Abb. 12A). Zum Höhepunkt der Immunreaktion zeigen alle Gruppen eine starke Fußschwellung. Unterschiede zwischen den Gruppen sind zwar vorhanden, aber vergleichsweise gering (s. Abb. 12B). Beendet wurde das Experiment bei Erreichen des Ausgangswertes durch die unstimulierte Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt dagegen waren die Unterschiede zwischen den Gruppen tlw. sehr deutlich. Während die beiden Gruppen, die neben CpG + Poly (I:C) noch PGN in unterschiedlichen Konzentrationen erhalten hatten, eine Restschwellung auf niedrigem Niveau zeigten, war die Fußschwellung bei der CpG + Poly (I:C) Gruppe nur wenig schwächer als zum Zeitpunkt des Höhepunkts der Immunreaktion (s. Abb. 12C).

Das Experiment wurde an Tag 7 beendet, um die drainierenden Lymphknoten (popliteal) zu entnehmen. Die hieraus erhaltenen Zellen wurden für zwei Tage *in vitro* stimuliert und die Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 im Überstand bestimmt. Die Lymphknotenzellen der Gruppe, die mit unstimulierten BM-DC behandelt worden waren, setzten nur sehr geringe Mengen von IFN- $\gamma$  frei, während im Vergleich dazu die IFN- $\gamma$  Konzentration in den Überständen aus den stimulierten Gruppen 20- bis 54-fach erhöht war. Die CpG + Poly (I:C) + PGN 10 Gruppe wies unter den drei stimulierten Gruppen die geringste Freisetzung von IFN- $\gamma$  auf. Bei der CpG + Poly (I:C) + PGN 1 Gruppe war die Konzentration an IFN- $\gamma$  verglichen mit der unstimulierten Gruppe ca. 42-fach erhöht und der höchste Wert (54-fache Erhöhung) wurde von der CpG + Poly (I:C) Gruppe erreicht (s. Abb. 13A). Die Konzentration an TNF- $\alpha$  in den Überständen war bei den synergistisch stimulierten Gruppen ähnlich stark erhöht und zeigte die gleichen Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abb. 13B). Auch die Freisetzung von IL-2 war abhängig von einer Stimulation durch TLR Liganden, allerdings war die Konzentration des Zytokins bei diesen drei Gruppen gleich (s. Abb. 13C).

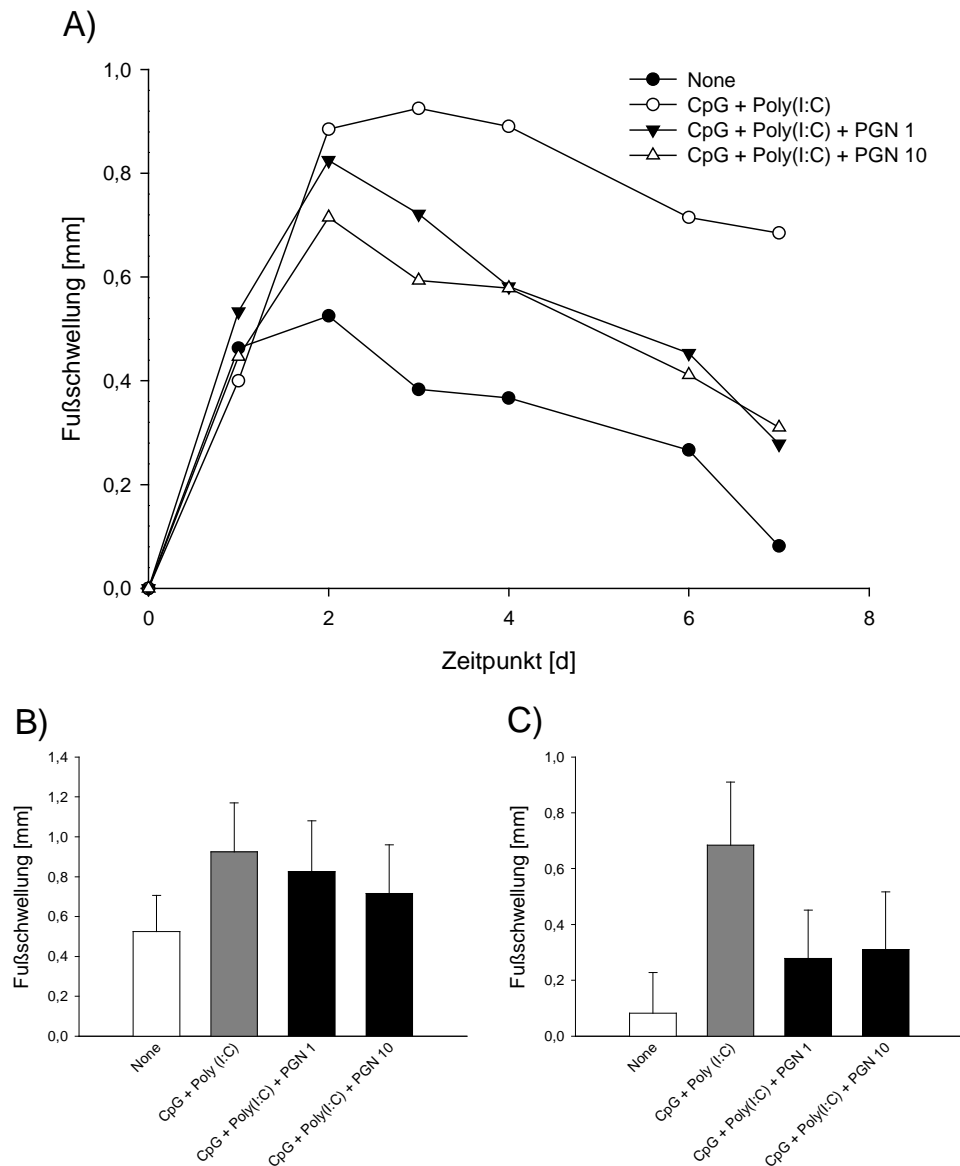


Abbildung 12: Auslösung einer Fußschwellung nach Sensibilisierung mit synergistisch stimulierten BM-DC.

$5 \times 10^6$  CFSE markierte KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden in Balb/c Mäuse überführt. Einen Tag später wurden  $1 \times 10^6$  synergistisch aktivierte OVA-beladene BM-DC i.v. in diese Mäuse injiziert. Die Stimulation hatte mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  CpG +  $100 \mu\text{g/ml}$  Poly (I:C) mit oder ohne  $1 \mu\text{g/ml}$  oder  $10 \mu\text{g/ml}$  PGN erfolgt. 13 Tage nach der so erfolgten Sensibilisierung wurden  $1 \times 10^6$  OVA-beladene BM-DC s.c. in die Fußsohlen der Hinterläufe injiziert. In den folgenden Tagen wurde die Schwellung durch Vergleich mit der Dicke der Fußsohlen vor dem Experiment bestimmt. Dargestellt werden A) die chronologische Entwicklung der Fußschwellungen und B) das Ausmaß der Schwellungen zum Höhepunkt der Immunreaktion sowie C) am Ende des Experiments. Es wurden 3 Mäuse pro Gruppe eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

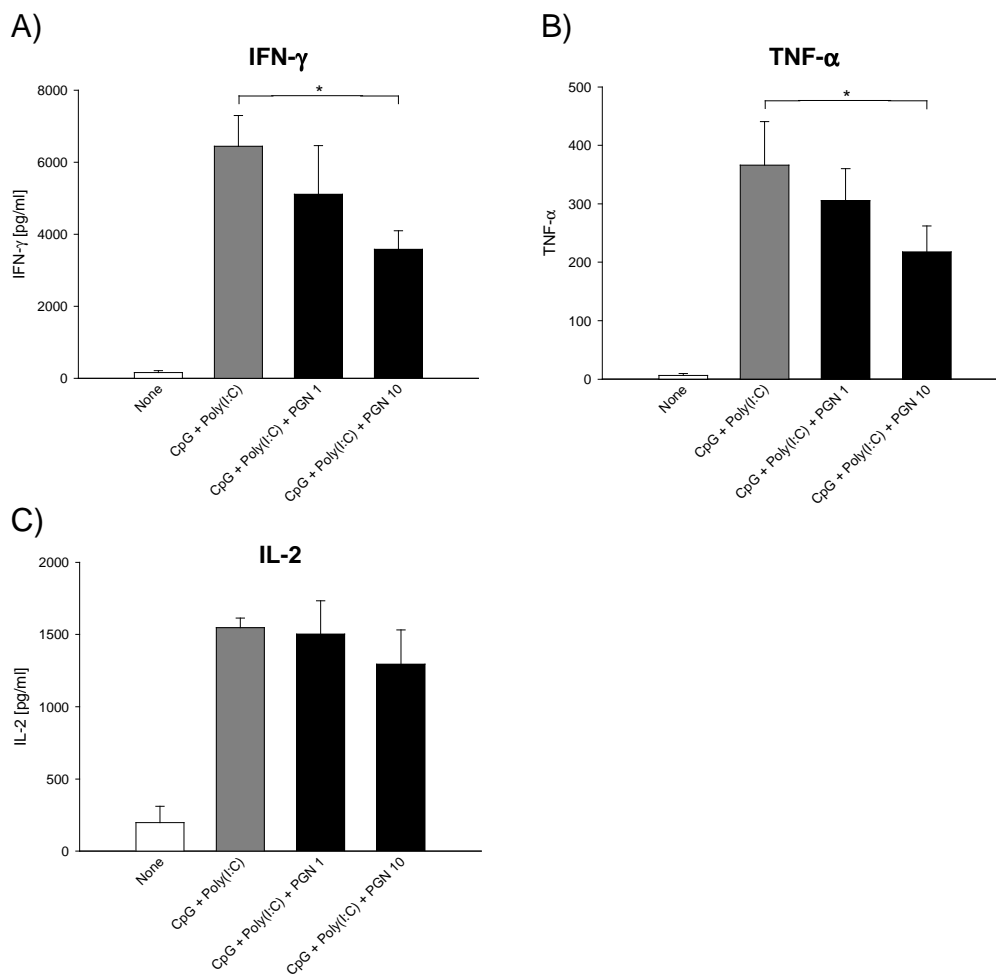


Abbildung 13: **T<sub>H</sub>1-polarisierende Wirkung synergistisch aktivierter BM-DC *in vivo*.**

7 Tage nach Auslösung der Fußschwellungen (s. Abb. 12) wurden die poplitealen Lymphknoten (3 Mäuse pro Gruppe) entnommen und  $1 \times 10^5$  Lymphknotenzellen mit PMA/Iono für 2 Tage *in vitro* stimuliert. Anschließend wurden die Konzentrationen von A) IFN- $\gamma$ , B) TNF- $\alpha$  und C) IL-2 in den Überständen bestimmt. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. \*,  $P < 0,05$ .

## 2. Dextran-Partikel als Adjuvanz in der Immuntherapie

Die in den folgenden Versuchen zur Anwendung kommenden Dextran-Partikel (CDS, *crystallized dextran spheres*) wurden nach einer modifizierten Methode von Schröder et al. hergestellt (149), die in getrockneter Form gewogen und gelagert werden können. Die verschiedenen Derivate mit OVA Peptid (323-339) (CDS (OVA)), LPS (CDS (LPS)) und einer Kombination aus beiden (CDS (OVA + LPS)) wurden auf die gleiche Weise produziert. Nach dem ursprünglichen Protokollen sind CDS, die aus gering konzentrierten Dextranlösungen hergestellt werden, in Wasser instabil. Die CDS wurden daher immer aus einer 26%-igen Lösung generiert. Um die Stabilität der CDS zu kontrollieren, wurden diese in PBS suspendiert und für zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt und kontinuierlich durch Durchflußzytometrie analysiert (Daten nicht gezeigt).

## 2.1. Funktionalität der Dextran Partikel *in vitro*

In einem ersten Versuch sollte die Aufnahme von CDS mikroskopisch untersucht und visuell dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden fluoreszierende CDS durch Einbau von FITC-Dextran (CDS (FITC)) hergestellt und diese 4h mit BM-DC inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Bilder zeigten eindeutig, daß fluoreszierende CDS von BM-DC aufgenommen wurden (s. Abb.14).

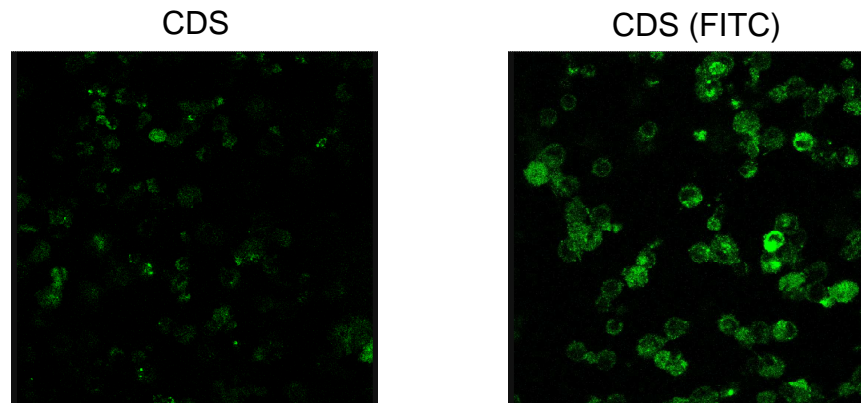


Abbildung 14: Aufnahme von Dextranpartikeln durch BM-DC.

BM-DC werden für 4 h mit unmarkierten (CDS) sowie CFSE-markierten Partikeln (CDS (FITC)) bei 37 °C inkubiert und anschließend fluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

Der nächste Versuch beschäftigte sich mit der Frage, ob die Aufnahme der CDS eine funktionale Relevanz haben kann. Hierzu wurden BM-DC mit unbeladenen (CDS), OVA-beladenen oder LPS-beladenen CDS behandelt sowie unbehandelt gelassen oder mit LPS stimuliert. Nach 24 h wurde durchflußzytometrisch untersucht, ob unterschiedliche Mengen an CD54, CD40, CD80 und CD86 exprimiert wurden. Es ließen sich keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker zwischen der unbehandelten Gruppe, der Gruppe, die mit unbeladenen CDS kultiviert worden war (s. Abb.15) und der Gruppe mit OVA-beladenen CDS (Daten nicht gezeigt) ausmachen. Die Stimulation der BM-DC mit LPS resultierte in einer deutlich verstärkten Expression der Marker, die sich aber auch bei der Gruppe beobachten ließ, die mit LPS-beladenen CDS behandelt worden war (s. Abb.15). Um auszuschließen, daß nicht aufgenommene, LPS-beladene CDS hydrolysiert wurden und freigewordenes LPS die Aktivierung der BM-DC hervorgerufen hat, wurden suspendierte CDS (LPS) ausgefällt und der verbleibende Überstand zu BM-DC gegeben. Es konnte keine Aktivierung dieser Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

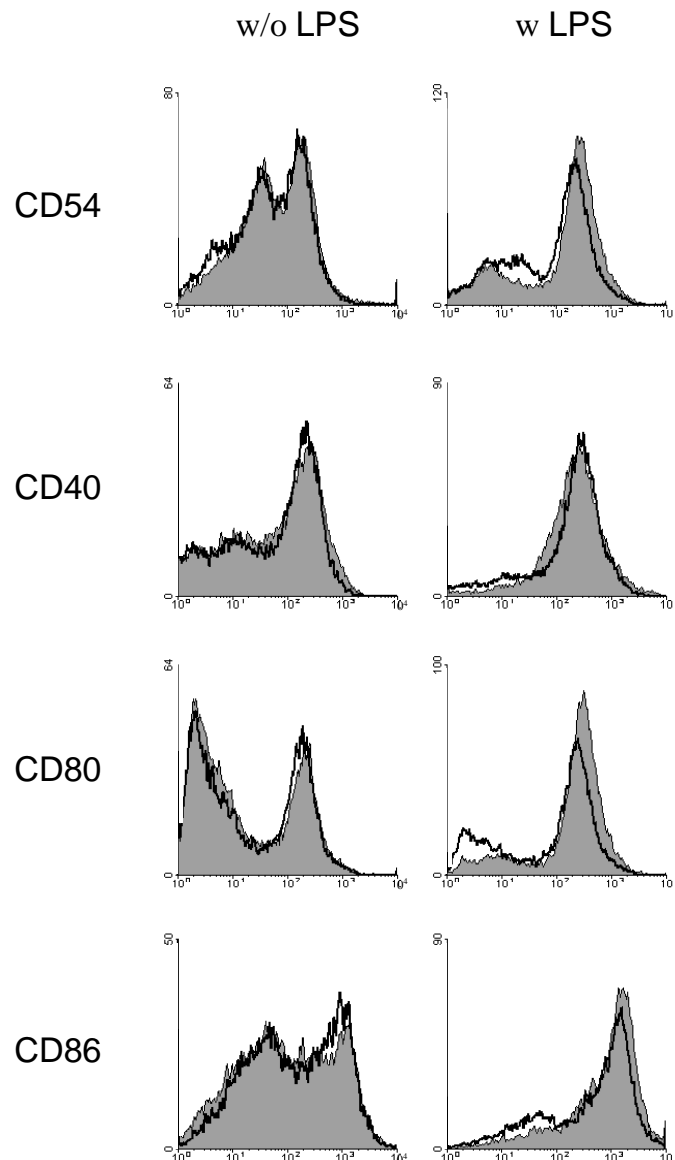


Abbildung 15: Die Expression von Oberflächenmarkern wird durch LPS-enthaltende Dextranpartikel erhöht.

BM-DC wurden für 48 h mit LPS, CDS oder LPS-enthaltenden CDS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gerntet mit Fluoreszenz-markierten Ak gegen CD54, CD40, CD80, CD86 und CD11c gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Die Histogramme zeigen unstimulierte bzw. LPS-stimulierte (gefüllte Graphen) und CDS- bzw. CDS (LPS)-stimulierte (offene Graphen) CD11c<sup>+</sup> Zellen. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

In den beiden vorhergegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, daß die CDS von BM-DC aufgenommen werden, und daß inkorporiertes LPS die Zellen stimuliert. Im nächsten Experiment sollte überprüft werden, ob in den CDS befindliche Antigene auch präsentiert werden. Hierzu wurden BM-DC in einem Verhältnis von 1 zu 10 mit CD4<sup>+</sup> DO11.10 T-Zellen ko-kultiviert und zusätzlich mit oder ohne OVA Peptid und LPS in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten und Erscheinungsformen (löslich oder in CDS inkorporiert) versetzt. OVA und OVA + LPS induzierten eine gleich starke T-Zell Proliferation, die

vergleichbar mit der von CDS (LPS) + OVA war. Die Proliferation von CDS (OVA) und CDS (LPS + OVA) war geringfügig schwächer, während die ausgelöst durch CDS (OVA) nur ca. 50% der maximal gemessenen Proliferation ausmachte. LPS sowie CDS alleine zeigten keinen Effekt (s. Abb.16).

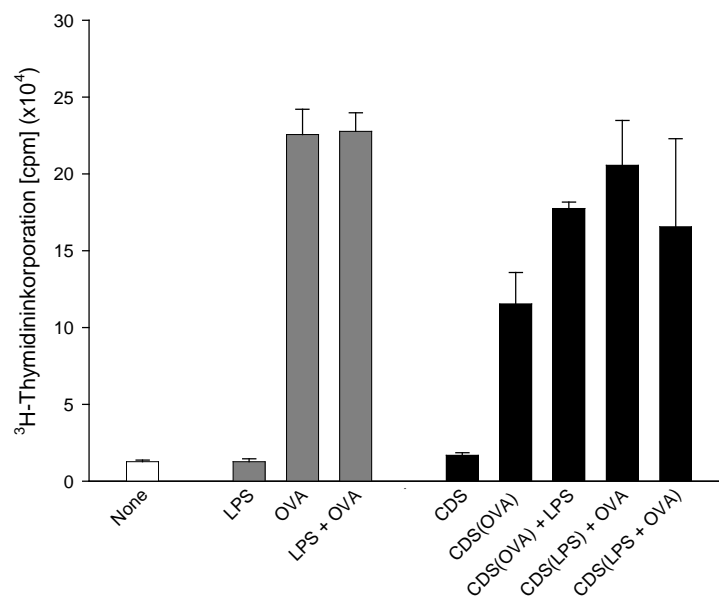


Abbildung 16: **OVA-spezifische T-Zellproliferation durch mit Dextranpartikel behandelte BM-DC.**

1x10<sup>5</sup> TCR-transgene DO11.10 T-Zellen wurden mit BM-DC in einem Verhältnis von 1:10 und 0,1 µg/ml OVA peptide (OVA), 100 ng/ml LPS oder 0,1 mg/ml der angegebenen CDS ko-kultiviert. Nach 3 Tagen wurde der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen.

## 2.2. Funktionalität der Dextran Partikel *in vivo*

Die bisherigen Versuch, *in vitro* durchgeführt haben lediglich gezeigt, daß CDS als Träger für Antigene sowie Stimuli eine ähnliche Wirkung haben wie diese Substanzen frei in Lösung. Ziel dieser Arbeit ist es aber, zu zeigen, daß eine gezielte Belieferung von APC, insbesondere DC, mit CDS *in vivo* eine überlegene Methode ist.

Zunächst sollte die Antigen-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* untersucht werden. Splenozyten und Lymphknotenzellen von DO11.10 Mäusen wurden mit CFSE markiert und i.v. in syngene Balb/c Mäuse injiziert. Anschließend wurde OVA-Peptid, OVA-Peptid + LPS, CDS (OVA) oder CDS (OVA + LPS) i.v. injiziert. Vier Tage später wurden die Milzen entnommen und T-Zellen daraus isoliert. Diese wurden gegen CD4, KJ1-26 und TOPRO-3 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

Die Applikation von OVA-Peptid alleine induzierte eine relativ schwache Proliferation der KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen, während die Gabe von zusätzlichem LPS die Vermehrungsrate dieser

Zellen um ca. 150% verstärkte. Von CDS transportiertes OVA-Peptid zeigte dagegen auch ohne zusätzliches Stimulans einen stärkeren Effekt als das lösliche Peptid (ca. 50% erhöht). War neben dem Antigen auch noch LPS in die Partikel eingeschlossen worden, wurde die Proliferation Antigen-spezifischer Zellen nochmals erhöht, und erreichte ca. 90% der von OVA + LPS induzierten T-Zell Proliferation (s. Abb.17).

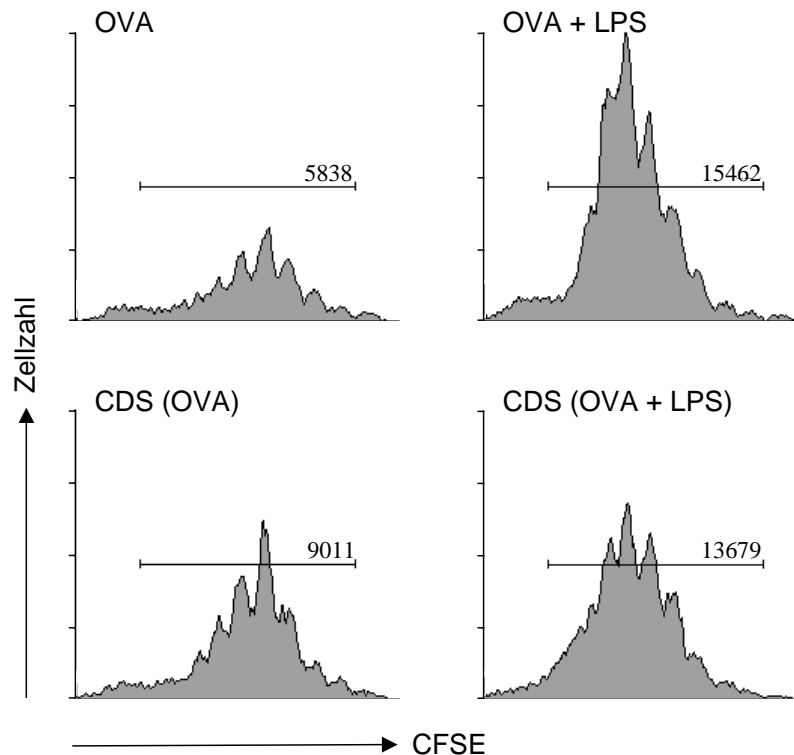


Abbildung 17: **Erhöhung der Ag-spezifischen T-Zellproliferation durch Dextranpartikel *in vivo*.**

$5 \times 10^6$  CFSE markierte KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden in Balb/c Mäuse überführt. Einen Tag später wurden lösliches OVA-Peptid (OVA), OVA und LPS (OVA + LPS), OVA-enthaltende Dextranpartikel (CDS (OVA)) oder OVA- und LPS-enthaltende Dextranpartikel (CDS (OVA + LPS)) i.v. injiziert. Nach 4 Tagen wurden die Milzen der Tiere entnommen und die Ag-spezifische T-Zellproliferation bestimmt. In den Histogrammen dargestellt ist die Abnahme der CFSE-Intensität der CD4<sup>+</sup>, KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen nach TOPRO-3 Ausschluß. Die Zahlen geben die absoluten Zahlen aktivierter Ag-spezifischer Zellen an. Repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen.

Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob die oben erwähnte Proliferation der T-Zellen auch eine funktionelle Relevanz für die Immunantwort hat. Wieder wurden Balb/c Mäusen, denen vorab DO11.10 T-Zellen gespritzt worden waren, mit Dextran Partikel (CDS (OVA), CDS (OVA + LPS) und/oder mit löslichen Reagenzien (OVA, OVA + LPS, LPS) immunisiert. Zwei Wochen später wurden mit OVA beladene BM-DC in die Fußsohlen der Tiere s.c. injiziert und an den folgenden Tagen die Fußschwellung verfolgt.

Mit OVA beladene CDS zeigten nur ein schwache Reaktion im Vergleich zu unbeladenen Partikeln. Die Reaktion nach Immunisierung mit löslichem OVA war zwar wesentlich stärker,



fiel aber schon am zweiten Tag auf ein Niveau etwas über das unbeladener CDS herunter. Ähnlich verhielt es sich mit OVA + LPS, mit dem Unterschied, daß die Reaktion an Tag 1 nochmals wesentlich deutlicher als bei löslichem OVA alleine war. Während die Immunisierung mit CDS (OVA) wie beschrieben eher eine schwache Reaktion zur Folge hatte, zeigten mit CDS (OVA) + LPS und CDS (OVA + LPS) behandelte Tiere am ersten Tag eine gleich starke Fußschwellung wie die OVA + LPS Gruppe. Anders als bei letztgenannter Gruppe fiel die Schwellung aber danach nicht sofort wieder auf ein schwaches Maß herunter, sondern verblieb während der Dauer des gesamten Experiments auf einem höheren Niveau (CDS (OVA) + LPS) oder stieg sogar bis Tag 2 noch leicht an, um danach wieder etwas abzusinken (CDS (OVA + LPS)) (s. Abb.18). Auf dem Höhepunkt der Immunreaktion waren zwischen den Gruppen, die mit löslichem OVA + LPS, mit CDS (OVA) + löslichem LPS oder CDS (OVA + LPS) keine Unterschiede erkennbar (s. Abb. 18B). Dagegen waren die Unterschiede gegen Ende des Experiments wesentlich deutlicher. Während sich die unbehandelte Kontrollgruppe sowie die CDS (OVA) Gruppe auf gleich niedrigem Niveau befanden, war die Immunreaktion bei der CDS (OVA) + LPS Gruppe etwas stärker und bei der CDS (OVA + LPS) Gruppe immer noch sehr ausgeprägt (s. Abb. 18C).

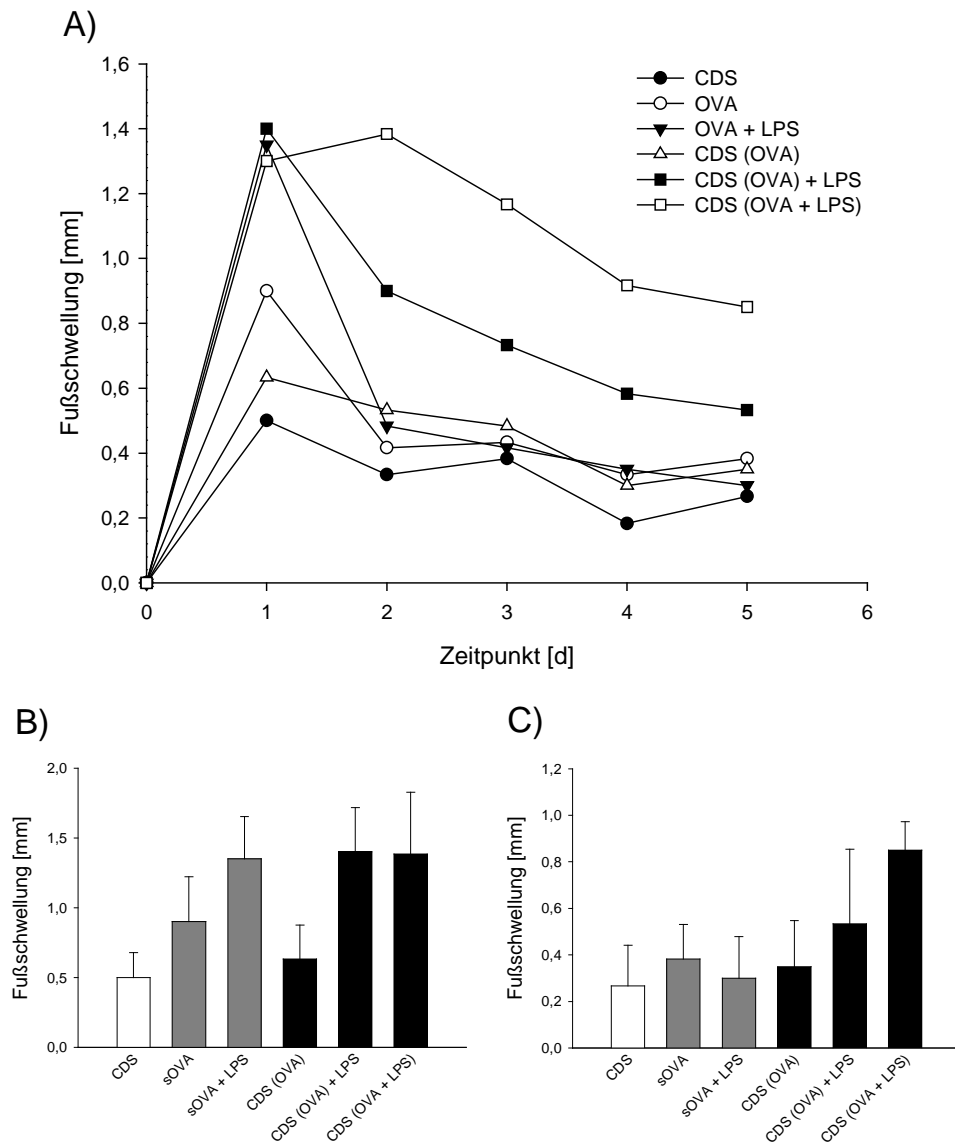


Abbildung 18: **Auslösung einer Fußschwellung nach Sensibilisierung mit Dextranpartikeln.**

$5 \times 10^6$  CFSE markierte KJ1-26<sup>+</sup> T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden in Balb/c Mäuse überführt. Einen Tag später wurden lösliches OVA-Peptid (OVA), OVA und LPS (OVA + LPS), OVA-enthaltende Dextranpartikel (CDS (OVA)) oder OVA- und LPS-enthaltende Dextranpartikel (CDS (OVA + LPS)) i.v. injiziert. Nach 14 Tagen wurden  $1 \times 10^6$  OVA-beladene BM-DC s.c. in die Fußsohlen der Hinterläufe injiziert. In den folgenden Tagen wurde die Schwellung durch Vergleich mit der Dicke der Fußsohlen vor dem Experiment bestimmt. Dargestellt werden A) die chronologische Entwicklung der Fußschwellungen und B) das Ausmaß der Schwellungen zum Höhepunkt der Immunreaktion sowie C) am Ende des Experiments. Es wurden 3 Mäuse pro Gruppe eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

## Diskussion

Dendritische Zellen (DC) sind bei der Kontrolle des Immunsystems von besonderer Bedeutung. Sie sind maßgeblich an der Induktion und Erhaltung von Toleranz sowie der Aktivierung und Steuerung des Immunsystems beteiligt. Als Schlüsselfiguren dieses streng regulierten Systems sind sie in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt und werden als Zielzellen für eine ganze Reihe verschiedener Anwendungen, so auch der Tumorthherapie, diskutiert.

Die Hauptquelle für DC in klinischen Studien zur antitumoralen Immuntherapie mit diesen Zellen sind Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und einem Cocktail aus IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und PGE2 stimuliert werden. Diese als „Gold-Standard“ bezeichneten DC werden allerdings wegen der geringen oder nicht vorhandenen Produktion von IL-12 zunehmend kritisiert. Zu dem kommen Bedenken, daß die voll ausgereiften Zellen *exhausted* sein könnten und nach Applikation nicht mehr fähig sind, eine robuste Immunantwort zu induzieren (164). Die Bestandteile des oben genannten Cocktails sind außerdem Mediatoren, die vom Immunsystem selber generiert werden können. Wie Reis de Sousa *et al.* zeigen konnten, sind inflammatorische Mediatoren zwar durchaus in der Lage, DC zu aktivieren und eine adaptive Immunantwort zu verstärken, die Initiierung einer geeigneten T-Zell Antwort aber ist abhängig von der direkten Erkennung von PAMPs durch die DC (165), so daß die Eignung des Cocktails zumindest zweifelhaft ist.

Langenkamp *et al.* haben unterschiedliche Kinetiken für verschiedene Zytokine nachweisen können. So werden TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MIP-1 $\beta$  schon 2 bis 8 Stunden nach Aktivierung der DC freigesetzt, während die Produktion von IL-12 erst in einem engen Zeitfenster 12 bis 18 Stunden später erfolgt. Aufgrund dieser Daten wird postuliert, daß die Freisetzung der frühen Zytokine die Bekämpfung der Infektion direkt *in situ* unterstützt. IL-12 wird demnach erst nach erfolgter Migration in den sekundären lymphoiden Organen sekretiert und beeinflusst dort die T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2 Balance. Da IL-12 von DC nur transient produziert wird, ist seine Verfügbarkeit von einem kontinuierlichen Strom kürzlich aktivierter DC aus dem entzündlichen Gewebe abhängig (130). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, daß aktivierte DC innerhalb von 12 bis 18 Stunden in die drainierenden Lymphknoten einwandern (131;166). Nair *et al.* konnten zudem zeigen, daß *in situ* aktivierte DC eine stärkere CTL- und antitumorale Antwort induzieren als vorab, *ex vivo* ausgereifte Zellen (131) (s. auch (157)).

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Ermittlung eines Stimulus, der eine starke und dauerhafte Ausschüttung von IL-12 durch DC induziert. In parallelen Experimenten sollte dann gezeigt werden, daß die Aktivierung von DC *in situ* über Dextran Partikel eine Möglichkeit darstellen könnte, die bekannten Nachteile *ex vivo* ausgereifter Zellen zu umgehen.

## 1. Synergistische Wirkungen kombinierter Toll-*like* Rezeptor Liganden

### 1.1. Vorversuche

Die Freisetzung von IL-12 durch DC wird gemeinhin als entscheidend für die Etablierung einer zellvermittelten Immunantwort betrachtet. Gleichzeitig wird eine T<sub>H</sub>1 Antwort für die antitumorale Immunität benötigt. Es lag daher auf der Hand, bei der Suche nach einem für die antitumorale Immuntherapie mit DC geeigneten Stimulus die Freisetzung von IL-12 als Kriterium zu verwenden.

Zu den stärksten Induktoren der IL-12 Produktion durch DC gehören TLR Liganden, und wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, weisen Kombinationen von gewissen TLR Liganden zudem noch synergistische Effekte (26;155;156) auf. So konnten Napolitani *et al.* zeigen, daß die gleichzeitige Stimulierung von DC durch LPS und R848 bzw. Poly (I:C) und R848 nicht nur die IL-12 Freisetzung um ein Vielfaches erhöht, auch die Transkription der Notch-Liganden Delta-4 und Jagged-1, T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 relevanten Modulatoren, wurde synergistisch zugunsten einer T<sub>H</sub>1-Antwort beeinflusst. Übereinstimmend damit induzierten LPS + R848 stimulierte DC eine stärkere T<sub>H</sub>1-Ausrichtung in naiven T-Zellen als DC, die nur mit LPS oder R848 aktiviert worden waren. Die T<sub>H</sub>1-polarisierende Fähigkeit verlor zudem, anders als bei den Einzelstimulationen, auch nach 48 h noch nicht an Wirkung (26). In einer weiteren Arbeit von Warger *et al.* wird beschrieben, daß Poly (I:C) + R848 stimulierte DC *in vitro* in der Lage sind, die Inhibition der Proliferation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch voraktivierte, regulatorische T-Zellen vollständig aufzuheben. Durch Poly (I:C) oder R848 aktivierte DC waren dazu nicht fähig. Außerdem wird gezeigt, daß die doppelt stimulierten DC eine stärkere Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induzieren (155).

In der Arbeit von Napolitani *et al.* wurden die TLR Liganden in den weiterführenden Versuchen sowohl bei der Einzel- als auch der Doppelstimulation in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Das waren Konzentrationen, bei denen die Einzelstimulationen nicht die maximal mögliche Effektivität gezeigt hatten, so daß nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, daß die beobachteten Wirkungen nicht auch durch maximal effiziente

Einzelstimulationen hätten erreicht werden können. Im Gegensatz dazu haben Warger *et al.* sowohl bei Einzel- als auch bei Doppelstimulationen Konzentrationen verwendet, die in Vorversuchen mit Einzelstimulationen maximale Effekte gezeigt hatten. Dabei ist allerdings nicht gewährleistet, daß die Konzentrationen, die sich in den Einzelstimulationen als ideal herausgestellt hatten, auch die idealen für die Doppelstimulation sind.

Diese Arbeit nimmt die Ergebnisse der oben genannten Publikationen auf und versucht sie, u.a. dadurch zu erweitern, daß ein bisher nicht auf synergistische Effekte untersuchter TLR Ligand, PGN, einbezogen wurde. Außerdem wurde untersucht, ob durch die gleichzeitige Verwendung eines dritten TLR Liganden eine zusätzliche Wirkung erzielt werden kann.

Um die oben genannte Problematik der Konzentrationen für Einzel-, Doppel- und Dreifachstimulationen zu umgehen, wurde zunächst die konzentrationsabhängige Aktivierung durch LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in Einzelstimulationen ermittelt. Eine Titration der vier Komponenten in allen möglichen Kombinationen über mehrere Konzentrationen hinweg wäre zwar die naheliegende Methode gewesen, war aber aufgrund des dafür nötigen, immensen experimentellen Aufwands nicht möglich. Bei vier verschiedenen TLR Liganden ergeben sich ebenso viele, verschiedene Dreierkombinationen. Würde man nun drei verschiedene Konzentrationen der einzelnen TLR Liganden verwenden, käme man auf 144 mögliche Kombinationen. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander zu gewährleisten, müssten sämtliche Kombinationsmöglichkeiten parallel bearbeitet werden, was in Anbetracht der gegebenen Möglichkeiten keine Option darstellte.

In den ersten Experimenten wurde versucht, ein konzentrationsabhängiges Aktivierungsprofil von LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) zu erstellen. Die Ergebnisse zeigen wie erwartet eine dosisabhängige Steigerung der aktivierungsrelevanten Oberflächenmarker CD54, CD86, CD80 und CD25 (s. Abb. 1A-D). Bemerkenswert bei diesen Daten ist die starke Expression von CD25 durch PGN stimulierte BM-DC, die einen um ca. 25 % erhöhten Maximalwert im Vergleich zu den anderen Stimulantien erreicht (s. Abb. 1C). CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, und obgleich CD25 für die T-Zell Aktivierung ohne Bedeutung ist (167), so ist gezeigt worden, daß murine DC auf IL-2 durch Erhöhung der IL-12-abhängigen IFN- $\gamma$  Produktion reagieren (168). Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, daß humane Monozyten, die in Gegenwart von IL-2 ausdifferenziert worden sind, verstärkt IL-12 bei Stimulierung durch LPS freisetzen (169). Bemerkenswert wird die starke Expression von CD25 durch PGN stimulierte BM-DC auch deshalb, weil PGN in hohen Konzentrationen der einzige hier untersuchte Stimulus ist, der die Freisetzung geringer Mengen IL-2 durch BM-DC induziert

hat (s. Abb. 3B). Eine gezielte weitergehende Untersuchung dieser Beobachtung wurde hier aber nicht durchgeführt, da es den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte.

Neben der Expression der Oberflächenmarker erfolgte auch die Zunahme der allostimulatorischen Kapazität der BM-DC durch Stimulierung der Zellen dosisabhängig (s. Abb. 2A - D), wobei allerdings die höchsten eingesetzten Konzentrationen für CpG (5 µg/ml und 25 µg/ml) und PGN (100 µg/ml) eine rückläufige Tendenz aufwiesen (s. Abb. 2B + C). Der Grund für die angesprochene Beobachtung bei steigenden CpG Konzentrationen ist dabei ungeklärt. Die rückläufige allostimulatorische Kapazität bei PGN stimulierten BM-DC ist dagegen vermutlich auf eine geringere Vitalität der Zellen zurückzuführen, da die mit 100 µg/ml PGN aktivierten Kulturen einen höheren Anteil toter Zellen aufwiesen, als bei geringeren Konzentrationen des Stimulus (Daten nicht gezeigt).

Alle hier untersuchten TLR Liganden induzierten ab einer gewissen Konzentration auch die Freisetzung von IL-12 durch BM-DC (s. Abb. 3A). Allerdings wurde dies im Falle von Poly (I:C) erst bei der höchsten, eingesetzten Konzentration (100 µg/ml) erreicht. Wie auch die Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Versuchen zeigen, wurde anders als bei LPS, CpG und PGN mit der höchsten Konzentration an Poly (I:C) noch keine Sättigungsphase erreicht. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Poly (I:C) und der Tatsache, daß mit 100 µg/ml die in der Literatur angegebene Arbeitskonzentration bereits um den Faktor 10 überschritten worden ist (170), wurde auf den Einsatz höhere Konzentrationen von Poly (I:C) verzichtet.

Die starke IL-12 Freisetzung durch PGN stimulierte BM-DC war relativ überraschend, da PGN im besonderen (171) und TLR2 Liganden im allgemeinen (159;172) als schwache IL-12 Induktoren mit T<sub>H</sub>2 polarisierenden Effekten angesehen werden. Unsere Ergebnisse zeigen aber nicht nur eine robuste IL-12 Induktion durch PGN, sondern auch eine T<sub>H</sub>1 polarisierende Wirkung, wenn die PGN stimulierten BM-DC mit naiven, allogenen T-Zellen kokultiviert wurden. (Daten nicht gezeigt). Weitergehende Nachforschungen ergaben, daß diese konträren Ergebnisse das Resultat verschiedener Kultivierungsbedingungen sind. Die vorliegende Arbeit stützt sich auf Experimente mit BM-DC, die mit Hilfe von GM-CSF und IL-4 aus Knochenmarkszellen differenziert wurden (GM/IL-4 DC). Andere Arbeitsgruppen verwenden lediglich GM-CSF (GM DC). Ein direkter Vergleich von GM DC und GM/IL-4 DC zeigte eine schwächere IL-12 Produktion durch GM DC nach Stimulierung mit LPS. Dies ist bereits beschrieben (173-175) und war nicht weiter überraschend. Allerdings war die Diskrepanz bei der IL-12 Freisetzung zwischen GM/IL-4 DC und GM DC nach Stimulierung mit PGN wesentlich ausgeprägter im Vergleich zu einer Stimulierung mit LPS (Daten nicht gezeigt).

Über die genauen Ursachen läßt sich zu diesem Zeitpunkt nur spekulieren, aber Menges *et al.* beschreiben, daß IL-4 die Bildung bestimmter Subpopulationen aus Knochenmarkszellen verstärkt (176). Es wäre vorstellbar, daß dies direkt (diese Subpopulation produziert als Antwort auf PGN sehr viel IL-12) oder indirekt (ein verändertes Zytokinmuster resultiert in einer veränderten Antwort aller Zellen auf PGN (177)) einen Einfluß haben könnte.

Neben IL-12 wurde noch die Freisetzung der Zytokine IL-2, IL-6 und IL-10 untersucht, um zu analysieren, ob die Produktion verschiedener Zytokine unterschiedlichen Mustern folgt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß IL-2 von verschiedenen DC-Subtypen nach Stimulation mit TLR Liganden sekretiert wird (178). Während der Differenzierung vorhandenes IL-4 hat sich bei humanen Monozyten-generierten DC allerdings als inhibierender Faktor herausgestellt (179). Trotzdem konnten in den Überständen von BM-DC, die mit hohen Konzentrationen von 10 µg/ml und 100 µg/ml PGN behandelten worden waren, deutliche Mengen IL-2 nachgewiesen werden. Die Freisetzung durch CpG-Stimulaton war sehr schwach und LPS bzw. Poly (I:C) haben keine IL-2 Sekretion induziert (s. Abb. 3B).

IL-10 wird als ein vornehmlich regulatorisch wirkendes Zytokin beschrieben und gilt als Gegenspieler des IL-12 (130). In größeren Mengen wurde IL-10 nur von BM-DC sekretiert, die mit 10 µg/ml und 100 µg/ml PGN stimuliert worden waren, was mit Angaben in der Literatur übereinstimmt (171)(s. Abb. 3D).

Die Konzentration von IL-6 in den Überständen aktivierter BM-DC ist bestimmt worden, weil in Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, daß DC-generiertes IL-6 den inhibitorischen Einfluß von T<sub>reg</sub> aufheben kann (180). Anders als die anderen untersuchten Zytokine scheint die IL-6 Freisetzung keiner strikten Regulierung zu unterliegen, da alle untersuchten TLR Liganden ab einer gewissen Konzentration mit fast identischer Effizienz die Sekretion des Zytokin anregen (s. Abb. 3C).

Die Daten aus den ersten Versuchen zeigen, ab welchen Konzentrationen von LPS, CpG und PGN keine weitere Aktivierungssteigerung mehr erzielt werden kann, und bei welchen Konzentrationen von LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) suboptimale Effekte erreicht werden. Als suboptimal wird hierbei die Konzentration definiert, ab der erste Wirkungen beobachtet werden konnten.

Wie die Untersuchungen von Napolitani *et al.* gezeigt haben, sind synergistische Effekte am Deutlichsten mit Konzentrationen zu erreichen, bei denen in der Einzelstimulation erst sehr geringe Wirkungen zu beobachten sind (26). Da eigene Versuche dies bestätigen konnten (Daten nicht gezeigt), wurde zur Ermittlung möglicher Synergien durch die verschiedenen

Zweier- und Dreierkombinationen von LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) mit Konzentrationen in einem für Einzelstimulationen suboptimalen Bereich gearbeitet. Um aber zeigen zu können, daß durch Synergie erzielte Effekte stärker sind als die durch Einzelstimulationen maximal erreichbaren, wurden die Einzelstimulationen mit Konzentrationen im optimalen Bereich durchgeführt.

Wie in der Literatur beschrieben (26;155) konnten keine synergistischen Effekte auf die Expression von Oberflächenmarkern (s. Abb. 4) oder die allostimulatorische Kapazität (Daten nicht gezeigt) ausgemacht werden (Warger *et al.* berichten zwar von einer derart synergistischen Wirkung, allerdings zeigen die in ihrer Publikation dargestellten Daten teilweise nicht einmal additive Wirkungen.). Die Freisetzung von IL-12 durch aktivierte BM-DC aber war bei allen Mehrfachstimulationen synergistisch erhöht (s. Abb. 5). Der Unterschied in der Wirkung von Einzel- und Doppelstimulationen zwischen der Expression von Oberflächenmarkern und der Ausschüttung von IL-12 war nicht überraschend. Die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen und die Produktion von einigen Zytokinen werden getrennt voneinander reguliert (166). Dies ist immunologisch betrachtet auch sinnvoll, da z.B. IL-12 und IL-23 potentiell gefährliche Effektorzellen generieren können und daher einer strengeren Kontrolle unterliegen müssen, damit die Stärke der Immunantwort der pathogenen Herausforderung angemessen ist.

Diese ersten Experimente mit Mehrfachstimulationen sollten lediglich dazu dienen, mögliche Kandidaten für weitere Versuche zu selektieren. Die Kombinationen LPS/CpG/Poly (I:C) sowie CpG/PGN/Poly (I:C) zeigten sich hier als besonders potente IL-12 Induktoren, wobei die Doppelstimulation aus CpG/Poly (I:C) aber vergleichbar stark war.

LPS entfaltet seine Wirkung lediglich über TLR4 (159), für PGN aber konnte gezeigt werden, daß es neben TLR2 auch noch über die cytosolischen Rezeptoren Nod1 und Nod2 agiert (181;182). Dies geschieht über die Degradationsprodukte  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) bzw. Muramyldipeptid (MDP). Nod1 und Nod2 gehören zur Familie der NACHT (*domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1*)-LRR (*leucine rich repeat*) receptors (NLR), die ähnlich wie TLR bestimmte mikrobielle Komponenten erkennen. Obgleich die Rolle und Effekte von Nod1 und Nod2 noch nicht gänzlich geklärt und teilweise umstritten sind (183), scheint die Signalweiterleitung über diese Rezeptoren einen negativen Einfluß auf die IL-12 Freisetzung durch PGN stimulierte DC auszuüben (184). Andererseits zeigen Nod1 und Nod2 Agonisten mit anderen TLR Liganden als TLR2 Liganden wie PGN synergistische Effekte bezüglich der TNF- $\alpha$ -Freisetzung (185), der IL-12 Produktion und T<sub>H</sub>1 polarisierende Wirkung durch entsprechend stimulierte DC



(154;185;186). Aus diesen Gründen wurde mit PGN statt LPS als dritter Komponente weitergearbeitet.

Die Vorversuche waren damit abgeschlossen und die vorläufigen Ergebnisse waren wie folgt: Es konnte eine Dreifachkombination ermittelt werden, die zumindest gegenüber den entsprechenden Einzelstimulationen synergistische Effekte bezüglich der Freisetzung von IL-12 aufwies. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Effekte durch Stimulation mit einzelnen TLR Liganden ab bestimmten Konzentrationen ein Plateau erreichten. Die Ermittlung der maximal effektiven Konzentrationen in Einzelstimulationen sollte in den weiteren Versuchen dazu dienen, zu ermitteln, ob die Effekte, die durch Synergie erreicht werden sollten, nicht auch durch starke Einzelstimulationen zu erhalten gewesen wären.

## 1.2. Ermittlung der idealen Arbeitskonzentrationen für eine synergistische Aktivierung von BM-DC

Um die optimalen Konzentrationen von CpG, PGN und Poly (I:C) in einer Dreifachstimulation zu ermitteln, wurden BM-DC mit steigenden Konzentrationen der TLR Liganden stimuliert. Optimal bedeutet in diesem Fall, daß bei möglichst hoher IL-12 Freisetzung die Ausschüttung von IL-10 gering sein sollte. IL-10 wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, weil es in der Kooperation von DC mit T-Zellen von großer Bedeutung ist. Es wird beschrieben, daß IL-10 die DC vermittelte Proliferation von T-Zellen hemmt (187), die  $T_H1/T_H2$  Balance zugunsten einer  $T_H2$  Antwort verschiebt (162;188;189), die Toleranzinduktion durch Bildung von  $T_{reg}$  fördert (190-192) und die Reifung und Aktivierung von DC inhibiert (192).

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind etwas überraschend. Während Napolitani *et al.* bei Titrationsexperimenten mit LPS + R848 bzw. Poly (I:C) + R848 das Erreichen einer Plateauphase für die IL-12 Produktion beobachteten (26), zeigen unsere Daten einen wechselhafteren Verlauf. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar andere TLR Liganden eingesetzt, doch zeigen die Ergebnisse der Einzelstimulationen, daß die eingesetzten Konzentrationen in beiden Fällen vergleichbar sind. Eine mögliche Erklärung könnte die Freisetzung von IL-10 sein. So haben in eigenen Experimenten LPS, Poly (I:C) und R848 die Sekretion nur sehr geringe Mengen dieses Zytokins durch BM-DC induziert (s. Abb. 3D und Daten nicht gezeigt), wohingegen PGN stimulierte BM-DC deutlich erhöhte Mengen an IL-10 produzierten (s. Abb. 3D und 7B). IL-10 aber wirkt inhibierend auf die Freisetzung von IL-12 und wird zudem noch zu einem früheren Zeitpunkt produziert als IL-12 (130;162;193). Es ist also davon auszugehen, daß durch PGN induziertes IL-10 einen negativen Einfluß auf die IL-

IL-12 Produktion in diesen Versuchen ausübte. Andererseits zeigten auch hier wieder PGN stimulierte BM-DC neben der besagten Freisetzung von IL-10 (s. Abb. 7B) eine robuste Produktion von IL-12 (s. Abb. 6B).

Nach Auswertung der Titrationsexperimente wurden zwei Konzentrationen für die Dreifachstimulation ausgewählt, 0,5 µg/ml CpG + 100 µg/ml Poly (I:C) + 1 µg/ml PGN (CpG + Poly (I:C) + PGN 1) und 0,5 µg/ml CpG + 100 µg/ml Poly (I:C) + 10 µg/ml PGN (CpG + Poly (I:C) + PGN 10). Zusätzlich zu der Gruppe, welche die stärkste IL-12 Produktion bei gleichzeitig geringer IL-10 Freisetzung zeigte, wurde also noch eine Gruppe untersucht, die vergleichbare Werte für IL-12, aber wesentlich höhere für IL-10 aufwies.

Der nächste Versuch sollte eigentlich nur noch einmal der Bestätigung der beim Titrationsexperiment erzielten Ergebnisse dienen, brachte aber statt dessen neue Erkenntnisse und zeigte zudem die Relevanz der in den Kontrollgruppen verwendeten Konzentrationen. Wie bereits zuvor, wurden für die Einzelstimulationen die Konzentrationen verwendet, die sich als maximal effektiv erwiesen hatten. Die Doppelstimulationen wurden dagegen mit den Konzentrationen durchgeführt, die auch bei den Dreifachstimulationen am Effektivsten waren. Es wurde, wie erwartet, bestätigt, daß die beiden ausgewählten Konzentrationen für die Dreifachstimulation ähnlich stark die Produktion von IL-12 und sehr unterschiedlich die von IL-10 durch BM-DC induzieren. Entgegen den Erwartungen aber zeigte sich die Gruppe mit CpG + Poly (I:C) als stärkster Induktor der IL-12 Freisetzung bei gleichzeitig geringerer IL-10 Produktion als bei den Dreifachstimulationen beobachtet. Außerdem konnte keine synergistische IL-12 Induktion bei der Doppelstimulation PGN + Poly (I:C) mehr beobachtet werden (s. Abb. 8A + B). Im Fall von PGN + Poly (I:C) ist offensichtlich die Verringerung der PGN Konzentration im Vergleich zum Experiment davor (s. Abb. 6B) der Grund und vermutlich nur Ausdruck ungenügender Aktivierung. Bei der Gruppe CpG + Poly (I:C) dagegen scheint eher eine zu starke Aktivierung vorgelegen zu haben, wenn CpG in höherer Konzentration, d.h. > 0,5 µg/ml eingesetzt wurde. Hinweise darauf lieferten bereits die ersten Experimente, die für die Expression von Oberflächenmarkern und die Ausschüttung von IL-12 bei diesen Konzentrationen einen Sättigungsbereich zeigten (s. Abb. 1B + 3). Die allostimulatorische Kapazität war bei Konzentrationen von CpG > 0,5 µg/ml sogar schon rückläufig gewesen (s. Abb. 2B). Die Ergebnisse des Titrationsexperimentes wiesen in dieselbe Richtung, denn während die Kurven für 0,05 µg/ml CpG und 0,5 µg/ml CpG sehr ähnliche Verläufe zeigen, sind die für 5 µg/ml CpG in deutlich niedrigeren Bereichen von IL-12 und IL-10 zu finden (s. Abb. 6 + 7). Während aber die Stimulierung von BM-DC mit beispielsweise LPS oder PGN in hohen Konzentrationen zu deutlich verringerter Viabilität

der Zellen führte (Daten nicht gezeigt), sind soweit uns bekannt, keine solchen Auswirkungen für die Stimulation mit CpG beschrieben. Ein möglicher Mechanismus für unsere Beobachtung bleibt also zu klären.

Obleich eine Verallgemeinerung aufgrund der dünnen Datenlage und der verschiedenen im Umlauf befindlichen CpG Sequenzen schwierig ist, so deuten die hier erhaltenen Daten darauf hin, daß CpG möglicherweise häufig in Konzentrationen verwendet wird, die sich außerhalb des idealen Bereichs befinden. In vielen Publikationen wird CpG in Konzentrationen von 1 µg/ml bis 12 µg/ml zur Stimulierung von DC eingesetzt (26;154;157;194-196). Diese Vermutung wird unterstützt durch eine Publikation, in der bei der Stimulation von murinen Milz-DC ab ca. 0,5 µg/ml CpG eine Sättigung bei der Freisetzung von IL-12 gezeigt wird (197).

### 1.3. Funktionelle Analyse der synergistischen Effekte

#### 1.3.1. *in vitro*

Das nächste Experiment zeigte die T<sub>H</sub>1 polarisierende Wirkung der untersuchten TLR Liganden und deren Kombinationen anhand der IFN-γ Produktion von allogenen, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Ko-Kultur mit stimulierten BM-DC. Die Verhältnisse der IFN-γ Ausschüttung in den Überstand der Ko-Kulturen zwischen den verschiedenen Gruppen glichen erstaunlicherweise ziemlich genau denen der IL-12 Freisetzung in die korrespondierenden BM-DC Kulturen (s. Abb. 9).

Wie bereits erwähnt erfolgt die Freisetzung von IL-12 durch aktivierte DC in einem engen Fenster und ist spätestens 20 h nach Stimulation der Zellen als abgeschlossen zu betrachten (130), was auch durch eigene Daten bestätigt wird (Daten nicht gezeigt). IL-12 ist zwar ein wichtiger Faktor bei der Ausrichtung einer T<sub>H</sub>1 Antwort, aber nicht unbedingt eine absolut nötige Voraussetzung (86;198). Andere Faktoren wie die Ag-Dichte auf den DC und das Verhältnis von DC zu T-Zellen (130), IFN-α (199), IFN-γ (200) IL-27 (201) und die Abwesenheit von IL-10 (202) scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Zudem wirkt IL-12 autokrin aktivierend auf DC, indem z.B. die Expression von CD40 erhöht wird (203).

Auch wenn die aktivierten BM-DC zum Zeitpunkt der Kokultivierung mit den T-Zellen vermutlich nur noch geringe Mengen oder gar kein IL-12 mehr freisetzen, so zeigen die Daten doch, daß die initiale Produktion des Zytokins als ein Maß für die T<sub>H</sub>1-polarisierende Fähigkeit von BM-DC herangezogen werden kann.

Die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Effekte konnten durch Bestimmung der Expression der Notch-Liganden Jagged-1 und Delta-4 nur teilweise geklärt werden. Notch ist ein hochkonservierter

Rezeptor, der von sich entwickelnden sowie reifen Lymphozyten exprimiert wird, und dem eine Rolle bei der peripheren Reifung zugesprochen wird. Obwohl die Liganden Jagged-1 und Delta-4 über den selben Rezeptor agieren, lösen sie doch unterschiedliche Antworten bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus. Während Jagged-1 für die Bildung von T<sub>H</sub>2 Zellen verantwortlich gemacht wird, stellt Delta-4 ein T<sub>H</sub>1 Differenzierungssignal dar (163).

Die Expressionmuster dieser beiden Notch-Liganden deckten sich nicht mit den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Versuch. Zwar zeigten die Gruppen, die eine starke T<sub>H</sub>1-polarisierende Wirkung gezeigt hatten, auch eine starke Expression von Delta-4, doch war diese nicht direkt proportional. Die Expression von Delta-4 durch CpG + Poly (I:C) + PGN 10 stimulierten BM-DC war beispielsweise mehr als doppelt so hoch wie die der CpG + Poly (I:C) aktivierten Zellen, obwohl letztere sich im vorangegangenen Versuch als effektivere T<sub>H</sub>1-Induktoren erwiesen hatten. Außerdem war die Delta-4 Expression auch bei Zellen erhöht, die nicht die Ausschüttung größerer Mengen IFN- $\gamma$  in Kokultur mit T-Zellen induziert hatten. So korrelierte die starke Delta-4 Expression der PGN-stimulierten BM-DC nicht im gleichen Maße mit der von diesen Zellen induzierten IFN- $\gamma$  Freisetzung durch allogene CD4<sup>+</sup> T-Zellen (s. Abb. 10B und Abb. 9). Auch unter Berücksichtigung der Daten für die Jagged-1 Expression durch die differentiell stimulierten Zellen, ergab sich kein direkter Zusammenhang zwischen den Expressionmustern der Notch-Liganden und der beobachteten T<sub>H</sub>1-polarisierenden Wirkung (s. Abb. 10A und Abb. 9), so daß zu vermuten bleibt, daß Notch-Liganden zwar eine Rolle bei der T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2-Ausrichtung gespielt haben könnten, aber nicht die entscheidende.

Eine direkte Korrelation der Expressionsdaten von Delta-4 mit den *in vitro* beobachteten T<sub>H</sub>1-polarisierenden Effekten der stimulierten BM-DC konnte zwar nicht hergestellt werden, doch zeigte die Stimulation mit CpG + Poly (I:C) auch hier starke synergistische Effekte und bestätigt damit publizierte Daten, die bei anderen Kombinationen ebenfalls synergistische Wirkungen zeigen (26). Die Gruppe PGN + Poly (I:C) sowie die beiden dreifach-stimulierten Gruppen zeigten zwar eine ähnlich hohe und teilweise noch stärkere Expression, diese waren aber nicht als synergistisch zu werten, da die Expression von Delta-4 durch PGN im Vergleich zu CpG und Poly (I:C) übermäßig stark erhöht worden war (s. Abb. 10B). Allenfalls der Gruppe CpG + Poly (I:C) + PGN 10 könnte von diesen dreien ein geringer synergistischer Effekt zugeordnet werden.

Da CCR7 für die Migration von DC von essentieller Bedeutung ist (204), wurde die Expression des Rezeptors im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Wie erwartet führt

eine Aktivierung der Zellen durch TLR Liganden zu einer gesteigerten Expression von CCR7. Allerdings konnten keinerlei synergistische Effekte festgestellt werden. Bemerkenswert war aber auch bei diesem Versuch die starke Wirkung auf den untersuchten Parameter durch Stimulation mit PGN (s. Abb. 10C).

### 1.3.2. *in vivo*

Um den experimentellen Aufwand in Grenzen zu halten, wurden die *in vivo*-Versuche nur noch mit vier Gruppen durchgeführt. Da die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche *in puncto* IL-12/IL-10-Produktion und T<sub>H</sub>1-polarisierender Wirkung eher für die Gruppe CpG + Poly (I:C) als für eine Triplestimulation aus CpG, PGN und Poly (I:C) sprachen, wäre die naheliegende Gruppenszusammenstellung CpG + Poly (I:C) mit Kontrollgruppen aus Einzelstimulationen gewesen. Allerdings wurden während der experimentellen Phase dieser Dissertation von Warger *et al.* umfangreiche Studien veröffentlicht, die bereits eindeutig zeigen, daß synergistisch aktivierte BM-DC nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* um ein Vielfaches effektiver in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Zwar sind diese Versuche mit Poly (I:C) + R848 durchgeführt worden, doch überschneiden und ergänzen sich die Ergebnisse von Napolitani *et al.*, Warger *et al.* sowie die bisher im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Daten so weit, daß eine synergistische *in vivo*-Effektivität der CpG + Poly (I:C) aktivierten BM-DC im Vergleich zu den Einzelstimulationen daraus abgeleitet wurde. Aus diesem Grund wurden die *in vivo*-Versuche mit unstimulierten, CpG + Poly (I:C)-, CpG + Poly (I:C) + PGN 1- sowie CpG + Poly (I:C) + PGN 10-stimulierten BM-DC durchgeführt. Es sollte untersucht werden, wie sich die Zugabe von PGN bei *in vivo*-Versuchen auswirkt, und ob unsere Annahmen bezüglich des Einflusses einer hohen IL-12 bei geringer IL-10 Produktion bestätigen lassen.

Die mit CpG + Poly (I:C) stimulierten BM-DC immunisierten Tiere zeigten eine stärkere Ag-spezifische Proliferation der vorab injizierten OVA-transgenen T-Zellen als die Gruppen CpG + Poly (I:C) + PGN 1 und CpG + Poly (I:C) + PGN 10 an Tag 3 (s. Abb. 11) und Tag 4 (Daten nicht gezeigt) nach Injektion der BM-DC. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren allerdings nicht bei allen Versuchen so stark wie hier dargestellt und waren an Tag 4 geringer als an Tag 3 (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Fußschwellung waren aber in allen untersuchten Fällen ähnlich deutlich (s. Abb. 12). Die Fußschwellung war hierbei aber trotz des Einsatzes OVA-beladener BM-DC in der Auslösephase nicht in erster Linie auf eine Wirkung der TCR-transgenen T-Zellen zurückzuführen. Es ist vielmehr von einer Immunantwort gegen ein breiteres Spektrum von Ag auszugehen, da sowohl bei der Immunisierung als auch bei der Injektion in die Fußsohlen

der Mäuse BM-DC verwendet wurden, die in FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren. Eine Reaktion gegen Bestandteile des Mediums ist also als wahrscheinlich anzunehmen, was aber nichts an der Aussagekraft des Experiments ändert.

Die Fußschwellungen, die hier untersucht worden sind, gehören zu den DTH (*delayed-type hypersensitivity*) Reaktionen. DTH sind zelluläre Immunantworten, die sowohl  $T_H1$ - als auch  $T_H2$ -vermittelt sein (205-207) können, wobei  $T_H1$ -vermittelte DTH Reaktionen zu einem späteren Zeitpunkt den Höhepunkt der Reaktion erreichen (2-3 Tage) und langsamer abklingen (<5 Tage) (208). Die Schwellungen in der Gruppe, die unstimulierte BM-DC erhalten hatte, verstärkten sich von Tag 1 auf Tag 2 nur noch sehr wenig, während bei den mit synergistisch stimulierten BM-DC behandelten Gruppen zu diesem Zeitpunkt noch eine kräftige Verstärkung der Reaktion beobachtet wurde. Demnach handelte es sich bei letztgenannten DTH Reaktionen vermutlich um  $T_H1$ -vermittelte Immunantworten, wobei starke quantitative Unterschiede zwischen den synergistisch stimulierten Gruppen auftraten. Die CpG + Poly (I:C) Gruppe zeigte eine stärker und wesentlich länger andauernde Reaktion als die Gruppen, die zusätzlich noch PGN erhalten hatte. Die Immunantwort der CpG + Poly (I:C) + PGN 1 Gruppe war in dieser Hinsicht nur bis Tag 3 etwas intensiver als die der Gruppe mit 10 µg/ml PGN (s. Abb. 12A-C). Die bereits *in vitro* beschriebene Reihenfolge bei der Stärke der  $T_H1$ -polarisierenden Wirkungen durch die synergistisch stimulierten BM-DC, wird also auch durch diesen Versuch bekräftigt.

Für eine weitere Bestätigung wurden nach Beendigung der Fußschwellung die Zellen aus den poplitealen Lymphknoten stimuliert und die Konzentrationen  $T_H1$ -charakteristischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 (209) in den Zellkulturüberständen bestimmt. Obwohl die Freisetzung von IL-2 indifferent war, unterstützt dieser Versuch eindeutig die bisherigen Schlußfolgerungen (s. Abb. 13A-C).

## 2. *In situ* Aktivierung von DC

Die Immuntherapie von Tumoren mit *ex vivo* generierten DC ist eine sehr kostspielige und aufwendige Methode, die bisher noch nicht die erhofften Erfolge zeigen konnte. Trotz intensiver Forschung oder gerade deswegen bleiben zahllose Fragen unbeantwortet. Welche Vorläuferzellen sollen verwendet werden? Wie lange und mit welchen Zytokinen sollen die Zellen ausdifferenziert werden? Wie sollten die Zellen stimuliert werden? Welche Applikationsmethode soll verwendet werden? Weiterhin muß man die Frage stellen, ob die Verwendung von artifiziellen DC überhaupt sinnvoll sein kann, wenn die Komplexität des Immunsystems berücksichtigt wird. Kann es unmittelbar erfolgversprechend sein, eine Zelle, die so wichtig für die Feinjustierung des Immunsystems ist, künstlich herzustellen und so

auszurichten, daß Sie die Zerstörung von Zellen induziert, die der Überwachung bislang so effektiv ausgewichen sind? Eine Alternative zu der Verwendung von *ex vivo* generierten DC könnte die Verbesserung herkömmlicher *in situ* Immunisierungsstrategien liefern.

Bei herkömmlichen Vakzinierungen wird das Ag zusammen mit einem Adjuvans appliziert. Ein Adjuvans ist die Komponente des Vakzins, die helfen soll, die Immunantwort gegen das Ag zu erhöhen. Genau diese Fähigkeit, die Verstärkung der Immunantwort, ist das größte Problem bei der Entwicklung von Adjuvantien für humane Anwendungen. Das Beispiel von Freund's complete adjuvant (FCA), eines der stärksten, bekannten Adjuvantien, verdeutlicht sowohl die Voraussetzungen als auch die Probleme dieser Komponenten. FCA ist eine Emulsion von Wasser und Mineralöl, die abgetötete Mycobakterien enthält. Diese Emulsion zeigt den Charakter eines Depots und sorgt für eine langandauernde Freisetzung des Antigens, während die Mycobakterien eine starke immunstimulatorische Wirkung ausüben. Die Konsequenz ist zwar eine starke Immunantwort gegen das Ag, aber auch die Auslösung schwerer Nebenwirkungen, so daß abgeschwächte Varianten verwendet werden müssen, wie z.B. incomplete Freund's adjuvant (IFA). IFA enthält keine Mycobakterien mehr und dementsprechend ist die Toxizität geringer. Allerdings verringert sich auch die Ag-spezifische Immunität. Am weitesten verbreitet sind heutzutage Adjuvantien, die auf Aluminium-Salzen basieren, relativ schwachen Adjuvantien, die selten zelluläre Antworten hervorrufen, allerdings gut toleriert werden (210).

Obwohl ähnlich vom Konzept sind die Ansprüche an Tumorkvakzine in einigen Punkten höher als die an mehr konventionelle Vakzine. Der bedeutenste Punkt ist hierbei der Umstand, daß sich Tumorkvakzine gegen körpereigene Ag richten, und eine adequate Immunantwort die Ausschaltung der immunologischen Toleranz gegen diese voraussetzt. Das bedeutet aber, daß potente Adjuvantien verwendet werden müssen, um eine genügend starke Aktivierung des Immunsystems zu gewährleisten. Hierbei werden allerdings wieder toxikologische Fragestellungen relevant. Dieses Problem kann man dadurch umgehen, indem ein nicht-toxischer Träger mit einem potenten Stimulans gezielt zu den APC geführt wird. Dies hat eine hohe lokale Konzentration desselben zur Folge, was in einer starken Aktivierung der Zelle resultiert, ohne daß hohe systemische Konzentrationen des Stimulans erforderlich sind.

Durch die Kopplung von Ag und Stimulanz wird zudem erreicht, daß erstens nur die APC aktiviert werden, die das relevante Ag präsentieren können, und zweitens alle APC, welche das Ag tragen, aktiviert werden. Dadurch wird das Auftreten von Nebenwirkungen aufgrund einer unnötigen, systemweiten Aktivierung von Zellen des Immunsystems und die Präsentation des Ag durch unzureichend aktivierte APC verhindert.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung Protein-basierender Vakzine ist die fehlende Generierung von CTL Antworten (143), die für die antitumorale Immuntherapie von entscheidender Bedeutung sind (124). Lösliche Ag werden von APC normalerweise über Makropinozytose aufgenommen, in Lysosomen degradiert und als Peptide auf MHC II-Molekülen präsentiert, was die präferentielle Ausbildung einer  $T_H2$ -Antwort zur Folge hat (211). Für die Aktivierung von CTL ist aber essentiell, daß die Ag auch auf MHC I-Molekülen präsentiert werden. Dies ist nur möglich, wenn die Ag nach der Aufnahme durch die Zelle ins Zytosol gelangen. Untersuchungen haben gezeigt, daß phagozytotisch aufgenommene, partikuläre Ag effektiv auf MHC I-Molekülen präsentiert werden (133;143-145;212) und *in vivo* starke CTL-Antworten induzieren (137;213;214). So wird in einer *in vivo*-Studie berichtet, daß partikuläres Ag 500-mal effektiver  $CD4^+$  T-Zellen und 50 000-mal effektiver  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert wird (215). Als Ursachen hierfür werden der *phagosome-to-cytosol* Weg (145) oder ein Quellen der Endosomen nach Auflösung der Partikelkomponenten und einer damit einhergehenden Veränderung des osmotischen Druckes diskutiert (143;216). Eine vielversprechende Möglichkeit, exogene Ag auf diese Weise in DC einzuschleusen, ist die Verwendung von Partikeln als Vehikel, in die oder auf denen die Ag transportiert werden. Zahlreiche verschiedene biodegradierbare und nicht-biodegradierbare Partikel auf Basis von z.B. Liposomen (132;137;217) und Polymilchsäure (138) bzw. Polystyrol (218) und Latex (135) werden zu diesem Zweck bereits intensiv untersucht.

Als erste Annäherung an eine partikelvermittelte, gezielte und gleichzeitige Applikation von immunstimulierenden TLR Liganden und dem relevanten Ag wurden in dieser Arbeit Dextranpartikel (CDS, *crystallized dextran spheres*) verwendet. Diese wurden nach einer Methode von Schröder hergestellt, wodurch während des Herstellungsprozesses in Lösung befindliche Moleküle eingeschlossen werden (149). Dextran basierende Partikel wurden aufgrund der relativ leichten Herstellbarkeit und aufgrund der Tatsache, dass Dextran als Medikament bereits zugelassen ist und somit eine Überführung der Ergebnisse in die klinische Erprobung leicht möglich wäre, gewählt.

In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, daß CDS effektiv von BM-DC aufgenommen werden (s. Abb. 14). Zudem stimulierten mit LPS beladene CDS (CDS (LPS)) die Zellen ebenso effektiv wie lösliches LPS, während CDS ohne Stimulans keine Expressionssteigerung von Oberflächemarkern induzierten (s. Abb. 15). Hierbei sind sowohl die Stimulation durch CDS (LPS) als auch die nicht erfolgte Stimulation durch CDS von Bedeutung. Zwar wird in einigen Publikationen postuliert, daß Ag-beladene Partikel alleine *in vitro* und *in vivo* Immunität erzeugen (216;218), aber andere Arbeiten zeigen deutlich, daß



eine zusätzliche, stimulatorische Komponente benötigt wird, um Toleranzinduktion zu vermeiden (139;141). In den zuerst genannten Fällen haben möglicherweise die Partikel selber einen aktivierenden Effekt auf die DC gehabt. Partikel mit stimulierenden Eigenschaften entstehen auch bei der Herstellung von Liposomen mit Membranlipiden aus Mycobakterien (217) oder Archae (Archaeosomen) (219;220) oder durch Zusammenstellung aus Viruspartikeln (*virus-like particles*, VLP) (221). Vorteilhafter sollte aber die Verwendung von Trägern sein, die keine intrinsische, aktivierende Wirkung besitzen, um bei gleichbleibendem Träger die Wahl der Stimuli möglichst flexibel gestalten zu können, und die Immunantwort sehr gerichtet und differenziert zu manipulieren. Außerdem müssen Partikel mit Komponenten aus Pathogenen sehr intensiv auf mögliche infektiöse und inflammatorische Antworten untersucht werden (221).

Im nächsten Experiment wurde gezeigt, daß BM-DC, die mit OVA-beladenen Dextranpartikeln (CDS (OVA)) inkubiert worden waren, eine Ag-spezifische T-Zellproliferation induzieren können (s. Abb. 16). Nachdem also gezeigt werden konnte, daß die Dextranpartikel *in vitro* ähnlich wirksam wie lösliche Produkte sind, sollte *in vivo* untersucht werden, ob eine Immunisierung mit Partikeln Vorteile zeigt. Die Immunisierung mit löslichem Ag alleine resultierte in einer nur schwachen Proliferation der transgenen T-Zellen, während die gleichzeitige Gabe von Ag und LPS eine sehr starke Reaktion aufwies. Im Vergleich zu löslichem OVA war der Effekt von CDS (OVA) stark erhöht, was vermutlich auf eine effizientere Aufnahme und Ag-Präsentation durch DC zurückzuführen ist. Die Wirkung von mit OVA und LPS beladenen Partikeln war vergleichbar mit der Wirkung der löslichen Substanzen (s. Abb. 17). Also zeigte auch dieser Versuch keine Vorteile von partikulären gegenüber löslichen Vakzinen, was aber in keinem Widerspruch zu bisher publizierten Daten steht, da mit der Proliferation der transgenen DO11.10 T-Zellen nur der Einfluß auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht worden ist. Entscheidende Vorteile sollten aber partikuläre Vakzine bei der Stimulierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben. Um diese zu untersuchen, wurde eine DTH Antwort nach Sensibilisierung mit verschiedenen löslichen und partikulären Ag ausgelöst. Die Ergebnisse zeigten am ersten Tag nach Auslösung der Fußschwellung keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit löslichem OVA bzw. LPS + OVA behandelt worden waren, und den Gruppen, die partikuläres OVA bzw. OVA + LPS erhalten hatten. Danach aber gingen die Schwellung aller Gruppen außer derjenigen, die mit OVA + LPS enthaltenden Partikeln immunisiert worden war, und derjenigen, die OVA Partikel und lösliches LPS erhalten hatte, auf das Niveau der unbehandelten Kontrollgruppe zurück (s. Abb. 18). Die Ergebnisse dieses Versuchs bestätigen gleich mehrere Erwartungen:

1. Lösliche Vakzine induzieren vordringlich  $T_H2$ -Antworten, da die Reaktion ausgelöst durch lösliches OVA + LPS nur von kurzer Dauer war. Wie bereits beschrieben, deutet dies auf eine  $T_H2$  basierende DTH Antwort (208). 2. Eine effektive Immunantwort benötigt die Bereitstellung von Ag und DC Stimulus, denn die Immunreaktionen waren ohne LPS-Zugabe unabhängig von der Art der Ag-Bereitstellung nur schwach. 3. Partikuläre Vakzine induzieren eine  $T_H1$ -Antwort, was durch die langanhaltende Fußschwellung gezeigt wurde (208). 4. Partikuläre Vakzine sind in der Lage, Ag in die MHC I-abhängige Präsentation einzubringen, da Ag-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen zum einen Teil einer  $T_H1$ -Antwort sind und ihnen zum anderen eine wichtigere Rolle bei DTH Antworten spielen (222).

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hat bereits veröffentlichte Daten bestätigen können, die zeigen, daß bestimmte Kombinationen von TLR Liganden synergistische Effekte auf die Aktivierung von DC haben. Im Unterschied zu den genannten Veröffentlichungen wurde ein systematischerer Ansatz gewählt, der deutlich gemacht hat, daß die beobachteten Synergien nicht das Ergebnis geschickt gewählter Konzentrationen waren, sondern auch Bestand haben, wenn die Einzelstimulationen mit optimalen Mengen durchgeführt wurden. Außerdem wurden erstmals die synergistischen Effekte der Kombination CpG + Poly (I:C) *in vivo* untersucht.

Zwar ermöglichte der Zusatz eines dritten TLR Liganden in Form von PGN keine weitere Verbesserung *in puncto* T<sub>H</sub>1-Polarisierung, doch brachten auch diese Versuche interessante Erkenntnisse. So zeigten sie, daß die Freisetzung von IL-10 durch Synergie erhöht werden kann, was zwar nicht für die Fragestellung dieser Dissertation von Belang war, aber durchaus von Interesse sein könnte, wenn z.B. wie in der Transplantationsmedizin die Unterdrückung von Immunantworten das Ziel einer Therapie ist.

Obwohl oder gerade weil PGN eine starke IL-10 Freisetzung durch DC induziert, könnte dieser TLR Ligand für die antitumorale Immuntherapie interessant sein, wenn es gelingen würde, die Komponenten zu identifizieren, die für die IL-12 Freisetzung verantwortlich sind, denn trotz Inhibition durch IL-10 wurden immer noch große Mengen IL-12 produziert. Wenn es möglich wäre, die IL-10 stimulierende Wirkung bei Beibehaltung des IL-12 aktivierenden Effektes zu beseitigen, hätte man möglicherweise ein sehr effektives IL-12 Stimulans. Interessant in diesem Zusammenhang könnte auch die im Vergleich zu den anderen untersuchten TLR Liganden starke IL-2 Freisetzung nach Stimulation von DC mit PGN sein. Diese war zwar bei den Konzentrationen, mit denen die Dreifachstimulationen durchgeführt worden waren, sehr gering und deshalb ohne Bedeutung in den funktionellen Analysen, was aber auf die Kultivierungsbedingungen der DC zurückzuführen ist. Bei einer direkten Stimulation von DC *in vivo* wäre die IL-2 induzierende Wirkung von PGN möglicherweise wieder relevant.

Die Aktivierung von DC durch Kombinationen verschiedener TLR Liganden spiegelt die *in vivo*-Situation nach Invasion eines Pathogens vermutlich besser wider als die bisher üblichen Stimulationen mit nur einem TLR Liganden. Ein besonders interessanter Versuch von Napolitani *et al.* zeigt, daß sich nach Stimulation von DC mit Poly (I:C) ein Fenster von 4 Stunden öffnet, in dem eine nachfolgende Stimulation mit R848 besonders effektiv ist. Es wird argumentiert, das von Virus-infizierten Zellen freigesetzte ds RNA die DC voraktivieren

würde, so daß eine nachfolgende Stimulierung durch Viruspartikel in endosomalen Kompartimenten umso effektiver ausfällt. Dieser Mechanismus würde sicherstellen, daß nur die DC maximal T<sub>H</sub>1-polarisierende Effekte ausüben würden, die auch das Pathogen aufgenommen haben und somit präsentieren können (26). Ein solch starke Aktivierung wäre aber möglicherweise nötig, um die Toleranz gegen Tumorzellen wirkungsvoll zu brechen. Bisher wurden keine Studien veröffentlicht, in denen die Wirkung von synergistisch aktivierten DC in einem Tumormodel untersucht wurde. Genau dies wird eines unserer weiteren Ziele sein.

Hierfür werden wir aber von der bisherigen Linie abweichen, Immunisierungen und Therapien mit *ex vivo* generierten DC durchzuführen. Vielmehr werden wir uns auf die Arbeit mit Nanopartikeln konzentrieren. Erste Erfahrungen auf diesem Gebiet wurden in dieser Dissertation bereits vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, daß Dextran-basierende Partikel effektiv von DC aufgenommen und prozessiert wurden. Eingeschlossenes LPS führte zur Aktivierung von DC, und Ag wurden auf MHC I- und MHC II-Molekülen präsentiert. *In vivo* haben diese Partikel starke und langanhaltende Immunantworten mit deutlicher T<sub>H</sub>1-Polarisierung induziert. Die Partikel haben also genau die Eigenschaften gezeigt, die für ihren Einsatz in der antitumoralen Immuntherapie nötig wären. In weiteren Experimenten soll nun versucht werden, Dextranpartikel mit Kombinationen aus CpG und Poly (I:C) zu beladen. Parallel werden Nanopartikel aus anderen Materialien getestet werden. Zum einen Träger aus Kalziumphosphat und zum anderen magnetische Kügelchen wie sie von der Firma Miltenyi hergestellt werden. Diese Materialien würden den Vorteil bieten, daß sie leichter reproduziert werden können und zudem eine genaue Einstellung der Partikelgröße erlauben, was sowohl wichtig für die Effizienz als auch die Spezifität der Aufnahme ist, da Untersuchungen gezeigt haben, daß Partikel im Größenbereich von Viren effizient und bevorzugt von DC aufgenommen werden, während größere, im Bakterienbereich liegende eher von Makrophagen phagozytiert werden (218).

Schließlich soll versucht werden, DC gezielt mit den Partikeln zu beladen, indem gegen spezifische Oberflächenrezeptoren gerichtete Strukturen auf der Oberfläche der Partikel verankert werden. Letztendlich soll somit auch untersucht werden, ob man durch die gezielte Aktivierung bestimmter Subpopulationen von DC, die Therapie noch weiter optimieren kann. Neben TLR Liganden könnten Nanopartikel noch Substanzen tragen, die es DC ermöglichen, andere Lymphozyten als herkömmliche  $\alpha\beta$  T-Zellen zu aktivieren. NK (natürliche Killer) Zellen, NKT (natürliche Killer-T-) Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen sind hierbei mögliche Ziele. Die Aktivierung von NKT Zellen über auf DC präsentiertes  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer)

führt zu einer Expansion dieser Zellen und nachweislich anti-tumoralen Effekten (132). Ähnliches gilt für die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen (223). Dabei ist es so, daß alle drei Zellpopulationen die Aktivierung von DC induzieren bzw. verstärken und das *priming* des Immunsystems unterstützen. Diese gegenseitige Rückkopplung ist eine Möglichkeit, die Antworten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems gegen Tumore zu verstärken (224).

## Literatur

- 1 Green, D. R. and Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- 2 Savill, J. and Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788.
- 3 Lodoen, M. B. and Lanier, L. L. 2005. Viral modulation of NK cell immunity. *Nat.Rev.Microbiol.* 3:59-69.
- 4 Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 54 Pt 1:1-13.
- 5 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- 6 Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:10520-10525.
- 7 Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:14614-14619.
- 8 Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.
- 9 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- 10 Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 4:499-511.
- 11 Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680.
- 12 Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169:10-14.
- 13 Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlratt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13:933-940.
- 14 Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., and Underhill, D. M. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by *dectin-1* and Toll-like receptor 2. *J.Exp.Med.* 197:1107-1117.
- 15 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- 16 Kawai, T. and Akira, S. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.*
- 17 Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
- 18 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.

- 19 Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G., and Bates, E. E. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174:2942-2950.
- 20 Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
- 21 Nakanishi, C. and Toi, M. 2005. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat.Rev.Cancer* 5:297-309.
- 22 Takeda, K. and Akira, S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin.Immunol.* 16:3-9.
- 23 Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp.Med.* 198:1043-1055.
- 24 Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat.Immunol* 2:835-841.
- 25 Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J Immunol* 32:1958-1968.
- 26 Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat.Immunol.*
- 27 Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp.Med.* 194:863-869.
- 28 Bernasconi, N. L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101:4500-4504.
- 29 Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
- 30 Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., and Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517-1523.
- 31 Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., and Kuby, J. 2003. *Immunology*, 5. edition edn. W. H. Freeman and Company, New York.
- 32 Rosenthal, A. S. and Shevach, E. M. 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp.Med.* 138:1194-1212.
- 33 Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-702.
- 34 von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., and Klein, L. 2003. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev.* 191:62-78.
- 35 Ueno, T., Hara, K., Willis, M. S., Malin, M. A., Hopken, U. E., Gray, D. H., Matsushima, K., Lipp, M., Springer, T. A., Boyd, R. L., Yoshie, O., and Takahama, Y. 2002. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 16:205-218.
- 36 Maher, J. and Davies, E. T. 2004. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br.J Cancer* 91:817-821.

- 37 Trapani, J. A. and Sutton, V. R. 2003. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr.Opin.Immunol* 15:533-543.
- 38 Lieberman, J. and Fan, Z. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr.Opin.Immunol* 15:553-559.
- 39 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- 40 Zytokin. <http://de.wikipedia.org/wiki/Zytokine> . 6-6-2005.
- 41 Schluger, N. W. and Rom, W. N. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Am.J Respir.Crit Care Med.* 157:679-691.
- 42 Anderson, C. F., Mendez, S., and Sacks, D. L. 2005. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 174:2934-2941.
- 43 Mitchison, N. A. 2004. T-cell-B-cell cooperation. *Nat.Rev.Immunol* 4:308-312.
- 44 Asseman, C. and von Herrath, M. 2002. About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun.Rev.* 1:190-197.
- 45 Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat.Immunol* 1:379-385.
- 46 McHeyzer-Williams, M. G. 2003. B cells as effectors. *Curr.Opin.Immunol* 15:354-361.
- 47 Redmond, W. L. and Sherman, L. A. 2005. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity.* 22:275-284.
- 48 Santana, M. A. and Rosenstein, Y. 2003. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195:392-401.
- 49 Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat.Rev.Immunol.* 3:582-591.
- 50 Shortman, K. and Liu, Y. J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol.* 2:151-161.
- 51 Shortman, K. and Liu, Y. J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2:151-161.
- 52 Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
- 53 Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- 54 Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400.
- 55 Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 27:2417-2425.
- 56 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., Neeffjes, J. J., and Koning, F. 1997. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 27:2426-2435.



- 57 Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155.
- 58 Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157:541-548.
- 59 Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89.
- 60 Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp.Med.* 188:1359-1368.
- 61 Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp.Med.* 178:479-488.
- 62 Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R. 1997. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur.J Immunol* 27:1893-1900.
- 63 Steinman, R. M. 2001. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 68:106-166.
- 64 Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp.Med.* 191:435-444.
- 65 Gad, M., Claesson, M. H., and Pedersen, A. E. 2003. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS* 111:766-775.
- 66 Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 199:9-26.
- 67 Weighardt, H., Jusek, G., Mages, J., Lang, R., Hoebe, K., Beutler, B., and Holzmann, B. 2004. Identification of a. *Eur.J Immunol* 34:558-564.
- 68 Mazzoni, A. and Segal, D. M. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J.Leukoc.Biol.*
- 69 Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J.Exp.Med.* 184:741-746.
- 70 Tang, H. L. and Cyster, J. G. 1999. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284:819-822.
- 71 Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp.Med.* 188:373-386.
- 72 Cyster, J. G. 1999. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 189:447-450.
- 73 Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 28:2760-2769.

- 74 Bardi, G., Lipp, M., Baggiolini, M., and Loetscher, P. 2001. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur.J Immunol* 31:3291-3297.
- 75 Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., and Banchereau, J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp.Med.* 180:1841-1847.
- 76 Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J., and Steinman, R. M. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp.Med.* 180:1849-1860.
- 77 Davis, M. M., Krogsgaard, M., Huppa, J. B., Sumen, C., Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Wu, L. C., and Ehrlich, L. 2003. Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu.Rev.Biochem.* 72:717-742.
- 78 Kalamasz, D., Long, S. A., Taniguchi, R., Buckner, J. H., Berenson, R. J., and Bonyhadi, M. 2004. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies. *J Immunother.* 27:405-418.
- 79 Steinman, R. M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. 2003. Dendritic Cell Function in Vivo during the Steady State: A Role in Peripheral Tolerance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 987:15-25.
- 80 Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat.Rev.Immunol* 3:984-993.
- 81 Mazzoni, A. and Segal, D. M. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc.Biol.* 75:721-730.
- 82 Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20:561-567.
- 83 Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B. J. 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404:407-411.
- 84 Ohshima, Y., Yang, L. P., Uchiyama, T., Tanaka, Y., Baum, P., Sergerie, M., Hermann, P., and Delespesse, G. 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92:3338-3345.
- 85 Zeller, J. C., Panoskaltsis-Mortari, A., Murphy, W. J., Ruscetti, F. W., Narula, S., Roncarolo, M. G., and Blazar, B. R. 1999. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 163:3684-3691.
- 86 Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3:133-146.
- 87 Restifo, N. P., Antony, P. A., Finkelstein, S. E., Leitner, W. W., Surman, D. P., Theoret, M. R., and Touloukian, C. E. 2002. Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin.Cancer Biol.* 12:81-86.
- 88 Burnet, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog.Exp.Tumor Res.* 13:1-27.
- 89 Thomas, L. 1982. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol.Med.* 55:329-333.
- 90 Ahmad, M., Rees, R. C., and Ali, S. A. 2004. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother.* 53:844-854.
- 91 Penn, I. 2000. Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23:101-113.

- 92 Clemente, C. G., Mihm, M. C., Jr., Bufalino, R., Zurrada, S., Collini, P., and Cascinelli, N. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303-1310.
- 93 Yu, P. and Fu, Y. X. 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 86:231-245.
- 94 Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
- 95 Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21:137-148.
- 96 Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12:1539-1546.
- 97 Basu, S. and Srivastava, P. K. 2003. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int.Immunol.* 15:1053-1061.
- 98 Stoler, D. L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M. S., Rodriguez-Bigas, M. A., Petrelli, N. J., and Anderson, G. R. 1999. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15121-15126.
- 99 Khong, H. T. and Restifo, N. P. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat.Immunol* 3:999-1005.
- 100 Algarra, I., Collado, A., and Garrido, F. 1997. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int.J Clin Lab Res.* 27:95-102.
- 101 Johnsen, A. K., France, J., Nagy, N., Askew, D., Abdul-Karim, F. W., Gerson, S. L., Sy, M. S., and Harding, C. V. 2001. Systemic deficits in transporter for antigen presentation (TAP)-1 or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence. *Int.J Cancer* 91:366-372.
- 102 de Vries, T. J., Fourkour, A., Wobbles, T., Verkroost, G., Ruiter, D. J., and van Muijen, G. N. 1997. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.* 57:3223-3229.
- 103 Taylor, M. W. and Feng, G. S. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5:2516-2522.
- 104 Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349-1356.
- 105 Gabilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D. P. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150-4166.
- 106 Davidson, W. F., Giese, T., and Fredrickson, T. N. 1998. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp.Med.* 187:1825-1838.
- 107 Faith, A. and Hawrylowicz, C. M. 2005. Targeting the dendritic cell: the key to immunotherapy in cancer? *Clin Exp.Immunol* 139:395-397.
- 108 Kimura, H. and Yamaguchi, Y. 1995. Adjuvant immunotherapy with interleukin 2 and lymphokine-activated killer cells after noncurative resection of primary lung cancer. *Lung Cancer* 13:31-44.
- 109 Chyczewska, E. and Mroz, R. M. 1997. Cytokines in lung cancer. *Rocz.Akad.Med.Bialymst.* 42 Suppl 1:8-22.
- 110 Pardoll, D. M. 1998. Cancer vaccines. *Nat.Med.* 4:525-531.

- 111 Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp.Med.* 176:1693-1702.
- 112 Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp.Med.* 180:83-93.
- 113 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., and Ringert, R. H. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6:332-336.
- 114 Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L., and Brugger, W. 2000. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108.
- 115 Grunebach, F., Muller, M. R., and Brossart, P. 2005. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother.* 54:517-525.
- 116 Brossart, P., Goldrath, A. W., Butz, E. A., Martin, S., and Bevan, M. J. 1997. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol* 158:3270-3276.
- 117 Herr, W., Ranieri, E., Olson, W., Zarour, H., Gesualdo, L., and Storkus, W. J. 2000. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood* 96:1857-1864.
- 118 Eggert, A. A., Schreurs, M. W., Boerman, O. C., Oyen, W. J., de Boer, A. J., Punt, C. J., Figdor, C. G., and Adema, G. J. 1999. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res.* 59:3340-3345.
- 119 Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., and Engleman, E. G. 2001. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166:4254-4259.
- 120 Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., and Engleman, E. G. 2001. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J.Immunol.* 166:4254-4259.
- 121 Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. 2001. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93:243-251.
- 122 de Vries, I. J., Krooshoop, D. J., Scharenborg, N. M., Lesterhuis, W. J., Diepstra, J. H., van Muijen, G. N., Strijk, S. P., Ruers, T. J., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Adema, G. J., Punt, C. J., and Figdor, C. G. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63:12-17.
- 123 Kalady, M. F., Onaitis, M. W., Emani, S., Abdel-Wahab, Z., Tyler, D. S., and Pruitt, S. K. 2004. Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity. *J.Surg.Res.* 116:24-31.
- 124 Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T., and Nishimura, T. 2004. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 95:697-703.
- 125 Chamoto, K., Kosaka, A., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Sato, T., Takeshima, T., Iwakabe, K., Togashi, Y., Koda, T., and Nishimura, T. 2003. Critical role of the Th1/Tc1 circuit for the generation of tumor-specific CTL during tumor eradication in vivo by Th1-cell therapy. *Cancer Sci.* 94:924-928.
- 126 Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S., and Gately, M. K. 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur.J Immunol* 25:200-206.

- 127 Trinchieri, G. 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv.Immunol* 70:83-243.
- 128 MartIn-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat.Immunol.* 5:1260-1265.
- 129 Stober, D., Schirmbeck, R., and Reimann, J. 2001. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J.Immunol.* 167:957-965.
- 130 Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1:311-316.
- 131 Nair, S., McLaughlin, C., Weizer, A., Su, Z., Boczkowski, D., Dannull, J., Vieweg, J., and Gilboa, E. 2003. Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation. *J.Immunol.* 171:6275-6282.
- 132 Suzuki, Y., Wakita, D., Chamoto, K., Narita, Y., Tsuji, T., Takeshima, T., Gyobu, H., Kawarada, Y., Kondo, S., Akira, S., Katoh, H., Ikeda, H., and Nishimura, T. 2004. Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res.* 64:8754-8760.
- 133 Wang, X., Uto, T., Sato, K., Ide, K., Akagi, T., Okamoto, M., Kaneko, T., Akashi, M., and Baba, M. 2005. Potent activation of antigen-specific T cells by antigen-loaded nanospheres. *Immunol Lett.* 98:123-130.
- 134 Reddy, S. T., Rehor, A., Schmoekel, H. G., Hubbell, J. A., and Swartz, M. A. 2006. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J Control Release* 112:26-34.
- 135 Reece, J. C., Vardaxis, N. J., Marshall, J. A., Crowe, S. M., and Cameron, P. U. 2001. Uptake of HIV and latex particles by fresh and cultured dendritic cells and monocytes. *Immunol Cell Biol.* 79:255-263.
- 136 Waeckerle-Men, Y., Allmen, E. U., Gander, B., Scandella, E., Schlosser, E., Schmidtke, G., Merkle, H. P., and Groettrup, M. 2006. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine* 24:1847-1857.
- 137 Kwon, Y. J., James, E., Shastri, N., and Frechet, J. M. 2005. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:18264-18268.
- 138 Lutsiak, M. E., Robinson, D. R., Coester, C., Kwon, G. S., and Samuel, J. 2002. Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharm.Res.* 19:1480-1487.
- 139 Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J.Exp.Med.* 196:1627-1638.
- 140 Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M., and Steinman, R. M. 2004. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J.Exp.Med.* 199:815-824.
- 141 van Broekhoven, C. L., Parish, C. R., Demangel, C., Britton, W. J., and Altin, J. G. 2004. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 64:4357-4365.
- 142 Elamanchili, P., Diwan, M., Cao, M., and Samuel, J. 2004. Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine* 22:2406-2412.

- 143 Murthy, N., Xu, M., Schuck, S., Kunisawa, J., Shastri, N., and Frechet, J. M. 2003. A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: acid-degradable protein-loaded microgels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:4995-5000.
- 144 Nixon, D. F., Hioe, C., Chen, P. D., Bian, Z., Kuebler, P., Li, M. L., Qiu, H., Li, X. M., Singh, M., Richardson, J., McGee, P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C. Y., and O'Hagan, D. 1996. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity. *Vaccine* 14:1523-1530.
- 145 Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. L. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-246.
- 146 Lindl, T. 2000. *Zell- und Gewebekultur*, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage edn. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- 147 Corrigan, A., O'Kennedy, R., and Smyth, H. 1979. Lymphocyte membrane alterations caused by nylon wool column separation. *J Immunol Methods* 31:177-182.
- 148 Gunzer, M., Weishaupt, C., Planelles, L., and Grabbe, S. 2001. Two-step negative enrichment of CD4+ and CD8+ T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail. *J Immunol Methods* 258:55-63.
- 149 Schroder, U. and Stahl, A. 1984. Crystallized dextran nanospheres with entrapped antigen and their use as adjuvants. *J Immunol Methods* 70:127-132.
- 150 Martz, E. Introduction to Flow Cytometry. 2000. University of Massachusetts, Amherst MA US.
- 151 Bedford, P., Garner, K., and Knight, S. C. 1999. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int.Immunol.* 11:1739-1744.
- 152 Black, C. A. 1999. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol.Online.J.* 5:7.
- 153 Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162:156-159.
- 154 Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T., and Takada, H. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect.Immun.* 73:7967-7976.
- 155 Warger, T., Osterloh, P., Rechtsteiner, G., Fassbender, M., Heib, V., Schmid, B., Schmitt, E., Schild, H., and Radsak, M. P. 2006. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood.*
- 156 Roelofs, M. F., Joosten, L. A., Abdollahi-Roodsaz, S., van Lieshout, A. W., Sprong, T., van den Hoogen, F. H., van den Berg, W. B., and Radstake, T. R. 2005. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 52:2313-2322.
- 157 Pilon-Thomas, S., Li, W., Briggs, J. J., Djeu, J., Mule, J. J., and Riker, A. I. 2006. Immunostimulatory effects of CpG-ODN upon dendritic cell-based immunotherapy in a murine melanoma model. *J.Immunother.* 29:381-387.
- 158 Dziarski, R. and Gupta, D. 2005. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect.Immun.* 73:5212-5216.
- 159 Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B. 2003. Cutting Edge: different toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J.Immunol.* 171:4984-4989.

- 160 Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 19:641-644.
- 161 Schwarz, A., Grabbe, S., Riemann, H., Aragane, Y., Simon, M., Manon, S., Andrade, S., Luger, T. A., Zlotnik, A., and Schwarz, T. 1994. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* 103:211-216.
- 162 Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J.Immunol.* 166:4312-4318.
- 163 Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R. A. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526.
- 164 Nestle, F. O., Farkas, A., and Conrad, C. 2005. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr.Opin.Immunol* 17:163-169.
- 165 Sporri, R. and Reis e Sousa 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat.Immunol.* 6:163-170.
- 166 Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294:870-875.
- 167 Kronin, V., Vremec, D., and Shortman, K. 1998. Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int.Immunol.* 10:237-240.
- 168 Fukao, T. and Koyasu, S. 2000. Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 30:1453-1457.
- 169 Sanarico, N., Ciaramella, A., Sacchi, A., Bernasconi, D., Bossu, P., Mariani, F., Colizzi, V., and Vendetti, S. 2006. Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. *J.Leukoc.Biol.*
- 170 Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J., and Beutler, B. 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat.Immunol.* 4:1223-1229.
- 171 Qi, H., Denning, T. L., and Soong, L. 2003. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect.Immun.* 71:3337-3342.
- 172 Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H., and Raz, E. 2004. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J.Immunol.* 172:2739-2743.
- 173 Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G., and Austyn, J. M. 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur.J.Immunol.* 30:1813-1822.
- 174 Ebner, S., Ratzinger, G., Krosbacher, B., Schmuth, M., Weiss, A., Reider, D., Kroczeck, R. A., Herold, M., Heufler, C., Fritsch, P., and Romani, N. 2001. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol* 166:633-641.
- 175 Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E., and Shortman, K. 2000. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp.Med.* 192:823-833.

- 176 Menges, M., Baumeister, T., Rossner, S., Stoitzner, P., Romani, N., Gessner, A., and Lutz, M. B. 2005. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc.Biol.* 77:535-543.
- 177 Jackson, S. H., Yu, C. R., Mahdi, R. M., Ebong, S., and Egwuagu, C. E. 2004. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J.Immunol.* 172:2307-2315.
- 178 Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J.Immunol.* 170:5075-5081.
- 179 Feau, S., Facchinetti, V., Granucci, F., Citterio, S., Jarrossay, D., Seresini, S., Protti, M. P., Lanzavecchia, A., and Ricciardi-Castagnoli, P. 2005. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 105:697-702.
- 180 Pasare, C. and Medzhitov, R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-1036.
- 181 Girardin, S. E. and Philpott, D. J. 2004. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur.J Immunol* 34:1777-1782.
- 182 Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C., and Boneca, I. G. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5:1000-1006.
- 183 Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat.Rev.Immunol* 6:9-20.
- 184 Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., and Strober, W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat.Immunol* 5:800-808.
- 185 Traub, S., Kubasch, N., Morath, S., Kresse, M., Hartung, T., Schmidt, R. R., and Hermann, C. 2004. Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *J.Biol.Chem.* 279:8694-8700.
- 186 Traub, S., von Aulock, S., Hartung, T., and Hermann, C. 2006. MDP and other muropeptides--direct and synergistic effects on the immune system. *J.Endotoxin.Res.* 12:69-85.
- 187 Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Barthelemy, C., Liu, Y. J., and Banchereau, J. 1994. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int.Immunol.* 6:1177-1185.
- 188 De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur.J.Immunol.* 27:1229-1235.
- 189 Liu, L., Rich, B. E., Inobe, J., Chen, W., and Weiner, H. L. 1998. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int.Immunol.* 10:1017-1026.
- 190 Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.
- 191 Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., and Akdis, C. A. 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 117:433-442.
- 192 Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J.Immunol.* 159:4772-4780.
- 193 Jiang, H. R., Muckersie, E., Robertson, M., Xu, H., Liversidge, J., and Forrester, J. V. 2002. Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture. *J.Leukoc.Biol.* 72:978-985.



- 194 Rizzitelli, A., Vremec, D., Villadangos, J. A., Mavaddat, N., Wright, M. D., and Shortman, K. 2005. Switching from a restricted to an effective CD4 T cell response by activating CD8+ murine dendritic cells with a Toll-like receptor 9 ligand. *Eur.J Immunol* 35:3209-3220.
- 195 Manickasingham, S. P., Edwards, A. D., Schulz, O., and Reis e Sousa 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur.J.Immunol.* 33:101-107.
- 196 Kuwajima, S., Sato, T., Ishida, K., Tada, H., Tezuka, H., and Ohteki, T. 2006. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat.Immunol.* 7:740-746.
- 197 Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J.Immunol.* 170:3059-3064.
- 198 MacDonald, A. S. and Pearce, E. J. 2002. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. *J.Immunol.* 168:3127-3130.
- 199 Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R., and Biron, C. A. 1999. Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J.Exp.Med.* 189:1315-1328.
- 200 Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., and Glimcher, L. H. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338-342.
- 201 Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S., and de Sauvage, F. J. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407:916-920.
- 202 Jankovic, D., Kullberg, M. C., Hieny, S., Caspar, P., Collazo, C. M., and Sher, A. 2002. In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. *Immunity.* 16:429-439.
- 203 Bianchi, R., Grohmann, U., Vacca, C., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. 1999. Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J.Immunol.* 163:2517-2521.
- 204 Adema, G. J., de Vries, I. J., Punt, C. J., and Figdor, C. G. 2005. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr.Opin.Immunol* 17:170-174.
- 205 Kitagaki, H., Ono, N., Hayakawa, K., Kitazawa, T., Watanabe, K., and Shiohara, T. 1997. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J.Immunol.* 159:2484-2491.
- 206 Kondo, H., Ichikawa, Y., and Imokawa, G. 1998. Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur.J.Immunol.* 28:769-779.
- 207 Probst, P., Kuntzlin, D., and Fleischer, B. 1995. TH2-type infiltrating T cells in nickel-induced contact dermatitis. *Cell Immunol.* 165:134-140.
- 208 Muller, K. M., Jaunin, F., Masouye, I., Saurat, J. H., and Hauser, C. 1993. Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation. *J.Immunol.* 150:5576-5584.
- 209 Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7:145-173.
- 210 Petrovsky, N. and Aguilar, J. C. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol.Cell Biol.* 82:488-496.

- 211 Galea-Lauri, J., Wells, J. W., Darling, D., Harrison, P., and Farzaneh, F. 2004. Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol.Immunother.* 53:963-977.
- 212 Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., and Rock, K. L. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:4942-4946.
- 213 Serre, K., Giraudo, L., Siret, C., Leserman, L., and Machy, P. 2006. CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo. *Eur.J.Immunol.* 36:1386-1397.
- 214 Ignatius, R., Mahnke, K., Rivera, M., Hong, K., Isdell, F., Steinman, R. M., Pope, M., and Stamatatos, L. 2000. Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood* 96:3505-3513.
- 215 Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R., and Heath, W. R. 2001. Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J.Immunol.* 166:6099-6103.
- 216 Standley, S. M., Kwon, Y. J., Murthy, N., Kunisawa, J., Shastri, N., Guillaudeu, S. J., Lau, L., and Frechet, J. M. 2004. Acid-degradable particles for protein-based vaccines: enhanced survival rate for tumor-challenged mice using ovalbumin model. *Bioconjug.Chem.* 15:1281-1288.
- 217 Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Gurnani, K., Sad, S., and Krishnan, L. 2004. Activation of dendritic cells by liposomes prepared from phosphatidylinositol mannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin and adjuvant activity in vivo. *Infect.Immun.* 72:5235-5246.
- 218 Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F., and Plebanski, M. 2004. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173:3148-3154.
- 219 Sprott, G. D., Sad, S., Fleming, L. P., Dicaire, C. J., Patel, G. B., and Krishnan, L. 2003. Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea.* 1:151-164.
- 220 Gurnani, K., Kennedy, J., Sad, S., Sprott, G. D., and Krishnan, L. 2004. Phosphatidylserine receptor-mediated recognition of archaeosome adjuvant promotes endocytosis and MHC class I cross-presentation of the entrapped antigen by phagosome-to-cytosol transport and classical processing. *J.Immunol.* 173:566-578.
- 221 Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J. C., Xiang, S. D., Mottram, P., and Plebanski, M. 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol.Cell Biol.* 82:506-516.
- 222 Bouloc, A., Cavani, A., and Katz, S. I. 1998. Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* 111:44-49.
- 223 Wilhelm, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Reimer, P., Weissinger, F., Ruediger, T., and Tony, H. P. 2003. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102:200-206.
- 224 Munz, C., Steinman, R. M., and Fujii, S. 2005. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp.Med.* 202:203-207.

## Abbkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
BM-DC	Knochenmarks ( <i>bone marrow</i> )-generierte DC
CCR	C-Chemokin Rezeptor
CD	Differenzierungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDS	Dextranpartikel ( <i>crystallized dextran sphere</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein Diazetat Succinimidyl Ester
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	dendritische Zelle
ds	doppelsträngig ( <i>double-stranded</i> )
DTH	Hypersensibilitätsreaktion, verzögerter Typ ( <i>delayed type hypersensitivity</i> )
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Durchflußzytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FAM	6-Carboxfluorescein
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten Monozytenkolonie stimulierender Faktor ( <i>granulocyte monocyte-colony stimulating factor</i> )
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
imDC	unreife dendritische Zelle ( <i>immature dendritic cell</i> )
LN	Lymphknoten ( <i>lymph node</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholung ( <i>leucin-rich repeat</i> )
mDC	reife dendritische Zelle ( <i>mature dendritic cell</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )

MIP-1 $\beta$	Makrophagen inflammatorisches Protein-1 $\beta$
MLR	gemische Leukozytenreaktion ( <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NF- $\kappa$ B	nuklearer Faktor $\kappa$ B
NK Zelle	natürliche Killerzelle
NKT Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
Nod	Nukleotid-bindende Oligomerisierungs Domäne ( <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> )
OVA	Ovalbumin Peptid
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplexe
PGE2	Prostaglandin E2
PGN	Peptidoglykan
Poly (I:C)	Polyinosin:Polycytidyl-Säure
PRR	Mustererkennungszereptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
SPF	speziell Pathogen-frei
ss	einzelsträngig ( <i>single-stranded</i> )
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TCR	T-Zell Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
T <sub>H</sub>	T-Helfer
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
w	mit ( <i>with</i> )
w/o	ohne ( <i>without</i> )
wt	wildtyp

## Abbildungen

Abbildung 1: Konzentrations-abhängige Expression von Oberflächenmarkern auf BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C). .....	49
Abbildung 2: Konzentrations-abhängige Erhöhung der allostimulatorischen Kapazität von BM-DC durch Stimulierung mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C).....	51
Abbildung 3: Konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-12, IL-2, IL-6 und IL-10 durch BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN oder Poly (I:C). .....	53
Abbildung 4: Expression von Oberflächenmarkern auf BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in 1-fach, 2-fach oder 3-fach Kombination. ....	55
Abbildung 5: Freisetzung von IL-12 durch BM-DC nach Stimulation mit LPS, CpG, PGN und Poly (I:C) in 1-fach, 2-fach oder 3-fach Kombination.....	56
Abbildung 6: Freisetzung von IL-12 durch BM-DC nach Stimulierung mit CpG, PGN und Poly (I:C) in unterschiedlichen Konzentrationen.....	57
Abbildung 7: Freisetzung von IL-10 durch BM-DC nach Stimulierung mit CpG, PGN und Poly (I:C) in unterschiedlichen Konzentrationen.....	58
Abbildung 8: Freisetzung von IL-12 und IL-10 durch BM-DC nach Stimulation mit der 3-fach Kombination CpG + Poly (I:C) + PGN.....	59
Abbildung 9: TH1-polarisierende Wirkung von synergistisch stimulierten BM-DC.....	60
Abbildung 10: Abb. 10: Expression von Jagged-1, Delta-4 und CCR7 in synergistisch stimulierten BM-DC. ....	62
Abbildung 11: Stimulatorische Kapazität von synergistisch aktivierten BM-DC <i>in vivo</i> . ....	64
Abbildung 12: Auslösung einer Fußschwellung nach Sensibilisierung mit synergistisch stimulierten BM-DC. ....	66
Abbildung 13: TH1-polarisierende Wirkung synergistisch aktivierter BM-DC <i>in vivo</i> .....	67
Abbildung 14: Aufnahme von Dextranpartikeln durch BM-DC. ....	68
Abbildung 15: Die Expression von Oberflächenmarkern wird durch LPS-enthaltende Dextranpartikel erhöht. ....	69
Abbildung 16: OVA-spezifische T-Zellproliferation durch mit Dextranpartikel behandelte BM-DC.....	70
Abbildung 17: Erhöhung der Ag-spezifischen T-Zellproliferation durch Dextranpartikel <i>in vivo</i> . ....	71
Abbildung 18: Auslösung einer Fußschwellung nach Sensibilisierung mit Dextranpartikeln.	73

## Tabellen

Tabelle 1: Konzentrationen der verschiedenen TLR Liganden, die bei der Bestimmung des Aktivierungsprofils genutzt wurden.....	48
Tabelle 2: Optimale und suboptimale Konzentrationen der TLR Liganden.....	54
Tabelle 3: Konzentrationen der TLR Liganden in den Gruppen, die für Versuch 1.2 eingesetzt wurden.....	54
Tabelle 4: Konzentrationen der TLR Liganden in den Dreierkombinationen für die <i>in vitro</i> -Versuche.....	59
Tabelle 5: Konzentrationen der TLR Liganden in den Dreierkombinationen der <i>in vivo</i> -Versuche.....	63

## Publikationen

Während des Promotionszeitraumes sind folgende Veröffentlichungen und Poster erschienen, die unter meiner Beteiligung entstanden sind:

### 1. Artikel

Krummen MB, Varga G, Steinert M, Stuetz A, Luger TA, Grabbe S. **Effect of pimecrolimus vs. corticosteroids on murine bone marrow-derived dendritic cell differentiation, maturation and function.** *Exp Dermatol.* 2006 Jan;15(1):43-50.

Loser K, Scherer A, Krummen MB, Varga G, Higuchi T, Schwarz T, Sharpe AH, Grabbe S, Bluestone JA, Beissert S. **An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice.** *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5298-305.

Varga G, Balkow S, Wild MK, Stadtbauer A, Krummen MB, Rothoefl T, Higuchi T, Beissert S, Wethmar K, Scharffetter-Kochanek K, Vestweber D, Grabbe S. **Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DC is inhibitory for full T cell activation.** *Blood* (für die Veröffentlichung akzeptiert)

Balkow S, Loser K, Apelt J, Higuchi T, Rothoefl T, Krummen MB, Weishaupt C, Beissert S, Grabbe S.  **$\alpha$ CD40 plus IL-12 and IL-18 is a powerful cocktail for DC activation and efficiently stimulates antitumoral immunity.** (in Vorbereitung)

### 2. Poster

Krummen MB, Weishaupt C, Steinert M, Grabbe S. **In cultures of bone-marrow derived cells IL-4 promotes the development of T<sub>H</sub>1 inducing dendritic cells.** 8<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells, Brugge, 2004

Krummen MB, Balkow S, Loser K, Apelt J, Steinert M, Grabbe S. **Synergistic effects of different Toll-like receptors on bone marrow derived dendritic cells.** 9<sup>th</sup> International Conference Dendritic Cells, Edinburgh, 2006

## Lebenslauf

Name: Mathias Bernhard Wilhelm Krummen  
Geburtsdatum: 14. Juli 1975  
Geburtsort: Thuine  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Rudolf Heinrich Krummen und Martha Maria Krummen-Dreising, geb. Merscher

### Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Baccum  
1986-1992 integrierte Gesamtschule Fürstenau  
1992-1995 Gymnasium Gerdeanum  
15/06/1995 Erlangung der allg. Hochschulreife

### Zivildienst:

10/1995-10/1996 St. Christophoruswerk Lingen

### Ausbildung:

WS 1996/97 Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Bielefeld  
09/07/2001 Abschluß mit Diplom

### Promotionsstudium:

03/2002 Beginn der Dissertation im Institut für Biochemie unter der Betreuung von Prof. Dr. H.-J. Galla

### Berufstätigkeit:

SS 2001 Studentische Hilfskraft in der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld  
10/2001-02/2002 Aushilfskraft bei Schanze Lufttechnik, Lingen  
seit 03/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Zellbiologie der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. S. Grabbe

Münster, den 02.11.06



## Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. H.-J. Galla dafür bedanken, daß er es auf sich genommen hat, die Betreuung eines externen Doktoranden zu übernehmen. Seine Hilfe war bei der Umschiffung bürokratischer Hürden unersetzlich und ohne sie wäre diese Dissertation vermutlich schon auf den ersten Metern zum Scheitern verurteilt gewesen.

Prof. Dr. S. Grabbe oder einfach nur Stephan ist derjenige, der den operativen Rahmen für meine Promotionsarbeit bereitgestellt hat. Seine Begeisterung für die immunologische Forschung und die faszinierenden, dendritischen Zellen war und ist immer wieder aufs Neue motivierend. Dank schulde ich auch Frau Dr. Sandra Balkow. Sandra hat es geschafft, meinem zunächst ungezielten Forschungsdrang klare Richtungen vorzugeben und in geregelte Bahnen zu lenken. Stephan und Sandra hatten einen entscheidenden Einfluß auf meine Arbeit.

A special „domo arigato“ goes out to our former colleague from Japan, Dr. Tetsuya Higuchi for his help with the dextran based particles.

Ein dickes Danke auch an alle anderen ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der kombinierten Arbeitsgruppen Grabbe/Beissert: Dem Urge“stein“ der Gruppe, Meike Steinert, Andrea Stadtbäumer, Maik Voskort, Dr. Jenny Appelt, Dr. Matthias Gunzer, Dr. Georg Varga, PD Dr. Stefan Beissert, Joachim Windau, Dr. Carsten Weishaupt, Dr. Yasmin Basoglu, Dr. Tobias Rothoef, Dr. Helge Riemann, Birgit Geng, Dr. Kerstin Klimmek und Dr. Karin Loser. Hervorheben möchte ich aus dieser Gruppe Meike Steinert, die immer mal wieder T-Zellen und Maus PCRs für mich gemacht hat, und Dr. Karin Loser, deren Hilfe v.a. bei molekularbiologischen Fragestellungen sehr wichtig war, und die auch immer wieder viel Zeit für mich erübrigt hat.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen die anderen Mitglieder der Zellbiologie sowie das Tierstallteam.

Last but not least möchte ich mich natürlich noch bedanken bei meiner holden Gattin Constanze, meinem Sohn Collian, seinem noch ungeborenen Geschwisterchen sowie all meinen weiteren Kindern, die da noch kommen werden. Letztendlich sind sie die treibenden Kräfte.

