

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Effekte von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die
Ausreifung, Antigenaufnahme und Antigenpräsentation von
humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Corinna Jenderek

aus Essen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Max Schnurr

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Ludger Klein
Prof. Dr. Petra E. Petrides

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Max Schnurr

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in das Thema und Ziele der Arbeit	1
1.2 Charakterisierung dendritischer Zellen	3
1.2.1 Differenzierung und Immunphänotypisierung dendritischer Zellen.....	3
1.2.2 Physiologie dendritischer Zellen	8
1.2.3 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf MHC-I und MHC-II-Molekülen.....	11
1.3 Dendritische Zellen als Tumorstoffe.....	14
1.4 Biologische Funktionen von Prostaglandinen	18
1.5 EP-Rezeptoren	21
2 Material und Methoden	24
2.1 Geräte und Reagenzien.....	24
2.1.1 Geräte und Software	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	25
2.1.5 Reagenziensätze	25
2.1.6 Material für die Zellisolation und -kultur	25
2.1.7 Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzien	26
2.1.8 Antikörper	26
2.1.9 Peptide und Proteine	27
2.1.10 Zelllinien	27
2.2 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	28
2.2.1 Isolierung von Monozyten.....	28
2.2.2 Kultur dendritischer Zellen	29
2.2.3 Kryopräservierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen..	29
2.3 Reifungseffekte von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf dendritische Zellen.....	29
2.3.1 Inkubation mit Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten	29
2.3.2 Analyse der Zell-Reifung durch Oberflächenmarkerexpression	30

2.4	Studien zur Antigenaufnahme von dendritischen Zellen	30
2.4.1	Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen und Zelllysate	30
2.4.1.1	Kultur der SK-Mel 37 Tumorzellen und CHO _{NY-ESO-1} -Zelllinie ..	30
2.4.1.2	Zellmarkierung mit CFSE.....	30
2.4.1.3	Induktion von Apoptose bei SK-Mel 37 Tumorzellen und Annexin-PI-Färbung.....	30
2.4.1.4	Generierung eines Zelllysats aus CHO _{NY-ESO-1} -Zellen.....	31
2.4.1.5	Antigenbeladung dendritischer Zellen mit apoptotischen Zellen oder Zelllysate	31
2.4.2	Antigenaufnahme von FITC-Dextran Partikeln	32
2.5	Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen.....	32
2.5.1	HLA-A ₂ -Typisierung der Blutspender.....	32
2.5.2	Vorbereitung der dendritischen Zellen.....	33
2.5.3	Antigenbeladung der dendritischen Zellen mit NY-ESO-1 Peptid, NY-ESO-1/Immunkomplex und NY-ESO-1/ISCOMATRIX® Formulierungen	33
2.5.4	Interferon- γ Elispot-Assay	34
2.5.5	Interferon- γ Nachweis mittels ELISA	34
2.6	Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen.....	34
2.6.1	HLA-DP ₄ -Typisierung der Blutspender	34
2.6.2	Vorbereitung der dendritischen Zellen.....	35
2.6.3	Antigenbeladung der DC mit NY-ESO-1 Formulierungen	35
2.6.4	Kokultur der antigenbeladenen dendritischen Zellen mit NY-ESO-1-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	36
2.6.5	Intrazelluläre Zytokinfärbung	36
2.7	Durchflusszytometrie	36
2.7.1	Technische Beschreibung	36
2.7.2	Immunphänotypisierung dendritischer Zellen.....	37
2.8	Statistik	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Monozyten-Isolierung und Kultur der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen.....	39
3.2	Einfluss von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Ausreifung der dendritischen Zellen	39
3.3	Einfluss von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Antigenaufnahme von dendritischen Zellen.....	42
3.3.1	Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen und CHO _{NY-ESO-1} -Lysate.....	42

3.3.2	Aufnahme von FITC-Dextran-Partikeln	46
3.4	Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen (Kreuzpräsentation)	47
3.4.1	Präsentation von MHC-I-restringiertem Peptid	47
3.4.2	MHC-I-Präsentation von NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/Immunkomplex und NY-ESO-1/ISCOMATRIX®	48
3.5	Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen	51
3.5.1	Titration der Anzahl dendritischer Zellen zur Antigenpräsentation	51
3.5.2	Präsentation von MHC-II-restringiertem Peptid	52
3.5.3	MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein und CHO _{NY-ESO-1} -Zelllysat durch frisch generierte dendritische Zellen	54
3.5.4	MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein durch kryopräservierte dendritische Zellen	57
4	Diskussion	59
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	59
4.2	Methodendiskussion	60
4.2.1	Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen	60
4.2.2	Aktivierung dendritischer Zellen mit Prostaglandin E ₂	61
4.2.3	Antigenaufnahme dendritischer Zellen	61
4.2.4	Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen	62
4.3	Ergebnisinterpretation im Abgleich mit der Literatur	63
4.3.1	Aktivierung dendritischer Zellen	63
4.3.2	Antigenaufnahme dendritischer Zellen	64
4.3.3	Auswahl der Antigene und der Antigenformulierungen	64
4.3.4	Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen durch dendritische Zellen	67
4.3.5	Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen durch dendritische Zellen	68
4.3.6	Verwendung von Prostaglandin E ₂ in DC-basierten Tumorvakzinierungsstudien	70
4.3.7	Mögliche Rolle von Prostaglandin E ₂ auf die Tumorimmunantwort	72
4.4	Klinische Relevanz und Ausblick	73
5	Zusammenfassung	74
	Literaturverzeichnis	VIII
	Danksagung	XXVIII
	Veröffentlichungen	XXIX
	Lebenslauf	XXXI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierungswege dendritischer Zellen	6
Abb. 2: Charakteristika unreifer und reifer dendritischer Zellen.....	9
Abb. 3: Zelluläre Mechanismen der Kreuzpräsentation.....	13
Abb. 4: Strukturformel von Prostaglandin E ₂	18
Abb. 5: Synthese von Prostaglandin E ₂	19
Abb. 6: Signaltransduktionswege der EP-Rezeptoren.....	21
Abb. 7: Effekte von Prostaglandin E ₂ auf die Ausreifung der DC	40
Abb. 8: Einfluss einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubation von MoDC mit PGE ₂ bzw. CD40L Trimer auf die Expression von Reifemarkern.....	41
Abb. 9: Vergleich der Effekte von Prostaglandin E ₂ und spezifischer EP-Rezeptoragonisten auf die Ausreifung von MoDC	42
Abb. 10: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hyperthermiebehandlung zur Apoptoseinduktion von SK-Mel 37-Melanomzellen.....	43
Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion mittels Annexin V / PI-Färbung.....	43
Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose von apoptotischen SK-Mel 37-Tumorzellen durch DC	44
Abb. 13: Einfluss von PGE ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Phagozytose von CHO _{NY-ESO-1} -Zelllysat durch MoDC	45
Abb. 14: Einfluss von PGE ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Makropinozytose von FITC-Dextran-Partikeln (40 kDa) durch MoDC.....	46
Abb. 15: Einfluss von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die MHC-I Präsentation von NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ -Peptid durch MoDC	47
Abb. 16: MHC-I Präsentation von NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC.....	48
Abb. 17: Einfluss von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC	49
Abb. 18: Einfluss einer PGE ₂ -haltigen Zytokinkombination auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC	50
Abb. 19: Antigenpräsentation von CHO _{NY-ESO-1} -Lysat auf MHC-II-Molekülen: Optimierung des DC : T-Zell-Verhältnis	51
Abb. 20: Titration von NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₇₀ Peptid	52
Abb. 21: MHC-II-restringierte Peptidpräsentation nach Inkubation mit Prostaglandin E ₂ bzw. mit spezifischen EP-Rezeptoragonisten.....	53
Abb. 22: MHC-II-Präsentation von rekombinantem NY-ESO-1 Protein durch MoDC ..	54

Abb. 23: MHC-II-Präsentation von rekombinantem NY-ESO-1 Protein durch frisch generierte DC nach Inkubation mit Prostaglandin E ₂ bzw. spezifischen EP-Rezeptoragonisten	55
Abb. 24: MHC-II Präsentation von CHO _{NY-ESO-1} -Lysat	56
Abb. 25: Einfluss von Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die MHC-II-Präsentation von CHO _{NY-ESO-1} -Lysat	57
Abb. 26: MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein durch kryopräservierte DC nach Inkubation mit Prostaglandin E ₂ und EP-Rezeptoragonisten	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Unterteilung verschiedener dendritischer Zelltypen	5
Tab. 2: Effekte von Prostaglandin E ₂ auf dendritische Zellen.....	21
Tab. 3: Phänotypen von Mäusen mit fehlenden Prostanoidrezeptoren.....	22
Tab. 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	26

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Ak	Antikörper
Ag	Antigen
BFA	Brefeldin A, Sekretionshemmer aus <i>Penicillium brefeldianum</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> = internationale Nomenklatur zellulärer Oberflächenmarker
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CEA	Carcinoembryonisches Antigen
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> , Zelllinie
CLP	Gemeinsame lymphatische Vorläuferpopulation
CMP	Gemeinsame myeloide Vorläuferpopulation
CTA	<i>Cancer-testis antigen</i>
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
COX	Cyclooxygenase
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immuno spot technique</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	<i>FMS-like Tyrosin Kinase 3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMX	ISCOMATRIX® adjuvant
kDa	Kilodalton
LC	Langerhanszelle

LICR	<i>Ludwig Institute for Cancer Research</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMB	Minimacs Puffer
MMR	Makrophagen Mannose-Rezeptor
MNC	Mononukleäre Zellen
MPC	<i>Magnetic particle concentrator</i>
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle
NHS	<i>Normal human serum</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche T-Killer-Zellen
NY-ESO-1/IMX	NY-ESO-1 Protein formuliert mit ISCOMATRIX [®] adjuvant
PBDC	<i>Peripheral blood dendritic cells</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propium Iodid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PG	Prostaglandin
PS	Phospholipid Phosphatidylserin
RCLB	<i>Red cell lysis buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TxA ₂	Thromboxan A ₂

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema und Ziele der Arbeit

Während der letzten Dekade hat das schnell zunehmende Verständnis über das Immunsystem und die wachsende Kenntnis der Mechanismen, mit denen maligne Tumoren der Immunüberwachung entgehen, zu vielversprechenden neuen Strategien auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren geführt (Armstrong/Eaton/Ewing 2001). Maligne Tumore leiten sich von körpereigenen Zellen ab, die eine maligne Transformation durchlaufen. Die entstandenen Tumorzellen exprimieren mutierte Gene, die wiederum die Translation abnormer Proteine zur Folge haben. Diese Proteine, als tumorassoziierte Antigene bezeichnet, können vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden (Boon et al. 1994). Antikörper und T-Zellen, die Tumorantigene erkennen, wurden von Tumorpatienten isoliert; eine Immunantwort gegen Tumore tritt somit spontan auf. Diese spontane Immunantwort ist jedoch nicht in der Lage den Tumor zu eliminieren. Verschiedene Möglichkeiten diese Immunantwort zu stimulieren und zu optimieren werden aktuell in der Immuntherapie eruiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zellgestützten Immuntherapie, bei der Patienten dendritische Zellen (DC) verabreicht werden, die eine Antitumoraktivität im Körper hervorrufen (DC-Vakzine; Armstrong 2001).

DC bilden eine heterogene Familie von Leukozyten. Als unreife DC agieren sie als Phagozyten in einem dichten Netzwerk im peripheren Gewebe. DC verfügen über die Fähigkeit, die phagozytierten Antigene in Peptide zu zerlegen, zu immunogenen MHC-Peptid-Komplexen zu prozessieren und auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren (Sallusto et al. 1994). Um eine effektive Präsentation zu gewährleisten, müssen die DC durch Entzündungsmediatoren („*danger signals*“) zur Ausreifung angeregt werden. Das Stadium der Ausreifung verwandelt die DC in effiziente antigenpräsentierende Zellen und T-Zell-Aktivatoren (Steinman 1991; Bell 1999). Dies erlaubt ihnen, naive T-Lymphozyten zu aktivieren und eine adaptive Immunantwort zu initiieren (Banchereau et al. 2000).

Nach heutigen Erkenntnissen spielen DC eine zentrale Rolle sowohl in der Initiation, als auch in der Modulation von antigenspezifischen Immunantworten (Banchereau et al. 1998). Sie sind zudem wichtig für die Induktion einer Antitumorimmunantwort, da sie neben B- und T-Zellen auch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. natürliche Killer-Zellen (NK) und natürliche Killer-T-Zellen (NKT) aktivieren (Nestle et al. 2005).

DC verfügen über die Fähigkeit, exogene Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Durch diesen Prozess, der Kreuzpräsentation genannt wird (Heath et al. 2001; siehe Abschnitt 1.2.3), wird die Aktivierung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) induziert (Young und Steinman 1990). CTL spielen bei der Abwehr von Tumoren eine Rolle als Effektorzellen, da sie über ihren T-Zell-Rezeptor die Zielzellen mit Expression eines spezifischen Antigens erkennen und lysieren können. Diese Fähigkeit zur CTL-Stimulation macht DC für die Entwicklung von Tumor-Vakzinen interessant (Fonteneau et al. 2003). Durch DC-Vakzine werden dem Immunsystem Antigene von Tumorzellen in einem immunogenen Kontext präsentiert, wodurch Tumor-spezifische CTL generiert werden können (Timmerman und Levy 1999).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass mit DC effektive Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene induziert werden können (Mayordomo et al. 1995). Daraus erwuchs die Hoffnung, dass auch bei Patienten eine Immuntherapie mit DC erfolgreich sein könnte. In kleinen DC-Vakzinierungsstudien konnten spezifische Antitumor-Immunantworten und in Einzelfällen auch ein klinisches Ansprechen erreicht werden (Timmerman und Levy 1999; Nestle et al. 1998; Thurner et al. 1999; Fong et al. 2000). Mittlerweile sind über 100 klinische DC-Vakzinierungsstudien mit mehreren verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt worden (Ridgway 2003).

Obwohl es also prinzipiell möglich ist, mit einer DC-Vakzinierung Antitumor-Immunantworten zu induzieren, ist das klinische Ansprechen bisher unbefriedigend. In einer kürzlich publizierten Phase-III-Studie mit Peptid-beladenen DC bei Patienten mit metastasiertem Melanom konnte gegenüber einer Standardchemotherapie kein therapeutischer Nutzen nachgewiesen werden (Schadendorf et al. 2006). Für die Entwicklung von effektiveren Vakzinen gilt es noch einige Herausforderungen zu überwinden: Die Identifikation geeigneter DC-Typen und deren *ex vivo* Manipulation; die optimierte Antigenpräparation und -beladung und eine optimale Methode zur Verabreichung der Vakzine (Figdor et al. 2004).

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MoDC) sind die am häufigsten verwendeten DC-Typen in präklinischen und klinischen Studien. Zur *in vitro* Ausreifung der MoDC für klinische DC-basierte Vakzinierungsstudien wird *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) und IL-4 in Kombination mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ verwendet. Dies wird von einigen Autoren als „Goldstandard“ bezeichnet (Jonuleit et al. 1997).

PGE₂ wurde beim Vergleich verschiedener Prostanoiden als potentestes Prostaglandin für eine vollständige Ausreifung der MoDC identifiziert (Steinbrink et al. 2000). Nach

Kontakt mit einem Gefahrensignal induziert PGE₂ migratorische Fähigkeiten der MoDC, die es ihnen ermöglichen vom Infektionsort in Richtung der Lymphknoten zu migrieren (Scandella et al. 2002; Luft et al. 2002). Auf der anderen Seite inhibiert PGE₂ die Produktion von IL-12p70, das eine Th1-Antwort induziert (Kalinski et al. 2001). Somit hat PGE₂ sowohl fördernde, als auch hemmende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung. Die beschriebenen Effekte von PGE₂ auf MoDC in Bezug auf Reifung, Migration und Zytokinproduktion sind gut untersucht, aber über die Effekte von PGE₂ auf die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation ist bislang wenig bekannt. Dies ist umso überraschender, da dies eine essentielle Funktion für die Induktion einer antigenspezifischen T-Zellantwort durch DC darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen von PGE₂ auf humane MoDC in Hinsicht auf ihre Fähigkeit exogenes Tumorantigen auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen zu präsentieren untersucht. Diese Untersuchungen sind von zentraler Bedeutung, da PGE₂, wie oben bereits erwähnt, derzeit von vielen Gruppen als „Goldstandard“ bei der Aktivierung von MoDC verwendet wird.

Hierzu wurden folgende Effekte von PGE₂ auf die Funktion von MoDC untersucht:

- (1) **Ausreifung:** Die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf MoDC
- (2) **Antigenaufnahme:** Die Fähigkeit, extrazelluläre Substanzen durch Phagozytose bzw. Makropinozytose zu internalisieren
- (3) **Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen:** Fähigkeit der MoDC, Tumorantigen auf MHC-II-Molekülen zu präsentieren und Tumorantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren
- (4) **Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen:** Fähigkeit der MoDC, aufgenommenes Tumorantigen auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren und Tumorantigen-spezifische CTL zu aktivieren

Neben PGE₂ wurde die Wirkung von synthetischen spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf MoDC untersucht, um die Rezeptor-Subtypen zu identifizieren, über die PGE₂ seine Effekte vermittelt.

1.2 Charakterisierung dendritischer Zellen

1.2.1 Differenzierung und Immunphänotypisierung dendritischer Zellen

Im Jahre 1868 wurde ein dendritischer Zelltyp zum ersten Mal von Langerhans in der Epidermis der Haut beschrieben (Langerhans 1868). Später wurde dieser Zelltyp als Langerhanszelle bezeichnet. Die Zellen gerieten für längere Zeit in Vergessenheit, bis

1973 Steinman und Cohn einen neuen Zelltyp, den sie während einer Observation von adhärennten Zellen aus der Mäusemilz entdeckt hatten, beschrieben (Steinman und Cohn 1973). Diese Zellen wurden aufgrund ihrer distinktiven Morphologie mit langen Zytoplasmaausläufern dendritische Zellen (dendros = griechisch: Der Baum) genannt (Steinman et al. 1973). In der Folgezeit wurden DC in den peripheren lymphatischen Organen bei Mäusen nachgewiesen (Steinman et al. 1974). Später wurden ähnliche Zellen auch im nicht-lymphatischen Gewebe muriner und menschlicher Herkunft (Hart und Fabre 1981; Daar et al. 1983) identifiziert.

Die gemeinsamen Eigenschaften der aus verschiedenen Geweben isolierten DC waren die Expression von MHC-II-Molekülen und die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung (Steinman et al. 1978). Damals war bekannt, dass neben B-Zellen zusätzliche Zellen notwendig waren, um eine primäre Antikörperantwort in einer Kultur zu erhalten. Aber erst als die DC identifiziert waren, wurde ihre Funktion als potente antigenpräsentierende Zelle ersichtlich (Banchereau et al. 1998). Diese These wurde durch frühe Hinweise gefestigt, dass DC eine wichtige Rolle in der zellulären Abstoßungsreaktion gegen Herz- und Nierentransplantate spielen (Hart und Fabre 1981; McKenzie et al. 1984).

Inzwischen ist bekannt, dass DC heterogene Populationen bilden, die sich über unterschiedliche Differenzierungswege aus verschiedenen Vorläuferzellen entwickeln (Shortman et al. 2002). Obwohl alle DC in der Lage sind Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und T-Zellen zu präsentieren, unterscheiden sich die verschiedenen DC-Subtypen in Bezug auf Lokalisation, Migrationsweg, immunologischer Funktion und Abhängigkeit von inflammatorischen Stimuli für ihre Generierung (Shortman und Naik 2007).

Der Forschungsweg der Ontogenie der DC befindet sich weiterhin im Fluss. Im Maussystem wird momentan die folgende Einteilung favorisiert (siehe Tab. 1): Pre-DC (direkte DC Vorläuferzellen), konventionelle DC (cDC), migratorische DC, im lymphatischen Gewebe ansässige DC und inflammatorische DC. Die pre-DC besitzen noch keine charakteristische DC-Form oder -Funktion, aber sie sind die letzte Vorstufe in der Entwicklung zur DC. Zu dieser Gruppe gehören Monozyten und plasmazytoide DC (pDC). Die cDC sind DC mit vollständiger Form und Funktion. Die migratorischen DC stellen die klassischen DC dar, die im peripheren Gewebe Antigen aufnehmen (siehe Abschnitt 1.2.2) und in lymphatisches Gewebe einwandern. Hierzu gehören auch die Langerhanszellen (Romani et al. 2003). Im Gegensatz zu migratorischen DC ist der Aufenthalt und die Funktion der im lymphatischen Gewebe ansässigen DC auf ein lymphatisches Organ beschränkt. Beispiele hierfür sind DC im Thymus (Ardavin et al. 1997) und in der Milz (Vremec et al. 2000). Die inflammatorischen DC entstehen als

Reaktion auf mikrobielle oder inflammatorische Stimuli und sind im entzündeten Gewebe zu finden.

Pre-DC	cDC
<ul style="list-style-type: none"> - Besitzen noch keine DC-Form und DC-Funktion - Letzte Vorstufe vor DC - Beispiele: pDC, Monozyten 	<ul style="list-style-type: none"> - Vollständige DC mit Form und Funktion - Beispiele: Im lymphatischen Gewebe ansässige DC, Migratorische DC
Migratorische DC	Im lymphatischen Gewebe ansässige DC
<ul style="list-style-type: none"> - Nehmen Antigen im peripheren Gewebe auf - Beispiel: Langerhans-Zellen, dermale DC 	<ul style="list-style-type: none"> - Funktion auf ein lymphatisches Organ beschränkt - Beispiel: DC im Thymus und in der Milz
Inflammatorische DC	
<ul style="list-style-type: none"> - Entstehen als Reaktion auf inflammatorische Stimuli - Nur im entzündeten Gewebe zu finden 	

Tab. 1: Unterteilung verschiedener dendritischer Zelltypen

Modifiziert nach Shortman und Naik 2007.

DC haben ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen Zellen entwickeln sich zunächst die myeloiden (Akashi et al. 2000) und lymphatischen (Kondo et al. 1997) Vorläuferpopulationen (siehe Abb. 1). Nachdem man zunächst annahm, dass sich die verschiedenen DC-Typen entweder aus den myeloiden (CMP) oder aus den lymphatischen (CLP) Vorläuferpopulationen entwickeln, stellte sich heraus, dass DC-Subtypen aus beiden Vorläuferpopulationen generiert werden können (Manz et al. 2001). *In vivo* sind die meisten DC im Knochenmark, Milz und Lymphknoten wahrscheinlich myeloider und im Thymus lymphatischer Herkunft (Shortman und Naik 2007). Die CLP und CMP können in FLT3⁺ (*FMS-like Tyrosin Kinase 3*) und FLT3⁻ Subgruppen unterteilt werden. DC entwickeln sich nahezu ausschließlich aus FLT3⁺ Zellen (Karsunky et al. 2003; D’Amico und Wu 2003). Aus der myeloiden Vorläuferpopulation entwickeln sich Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen, aus denen sich wiederum Makrophagen/DC-Vorläuferzellen und Granulozyten differenzieren können (Fogg et al. 2006). Die Identifizierung der gemeinsamen Makrophagen/DC Vorläuferzelle belegt die enge Entwicklungsbeziehung zwischen Makrophagen und cDC. Die Makrophagen/DC Vorläuferzelle ist auf zwei Wegen in der Lage DC zu bilden: durch die direkte Produktion von im lymphatischen Gewebe ansässigen DC und durch die Generierung von inflammatorischen DC über einen Monozyten-abhängigen Weg (siehe Abb. 1).

Die Ansicht, dass sich die Hämatopoese durch eine Sequenz von streng geordneten, irreversiblen Schritten vollzieht, wurde durch das Konzept eines graduellen

mehrstufigen Prozesses mit erst spät auftretenden irreversiblen Differenzierungsschritten ersetzt (Shortman und Naik 2007). Die DC weisen eine außergewöhnliche Flexibilität in ihrer Entwicklung auf. In Mausstudien konnte gezeigt werden, dass aus Vorläuferzellen, aus denen normalerweise nur T- und B-Zellen entstehen, sich auch DC differenzieren können (Kawamoto et al. 2006; Katsura et al. 2002).

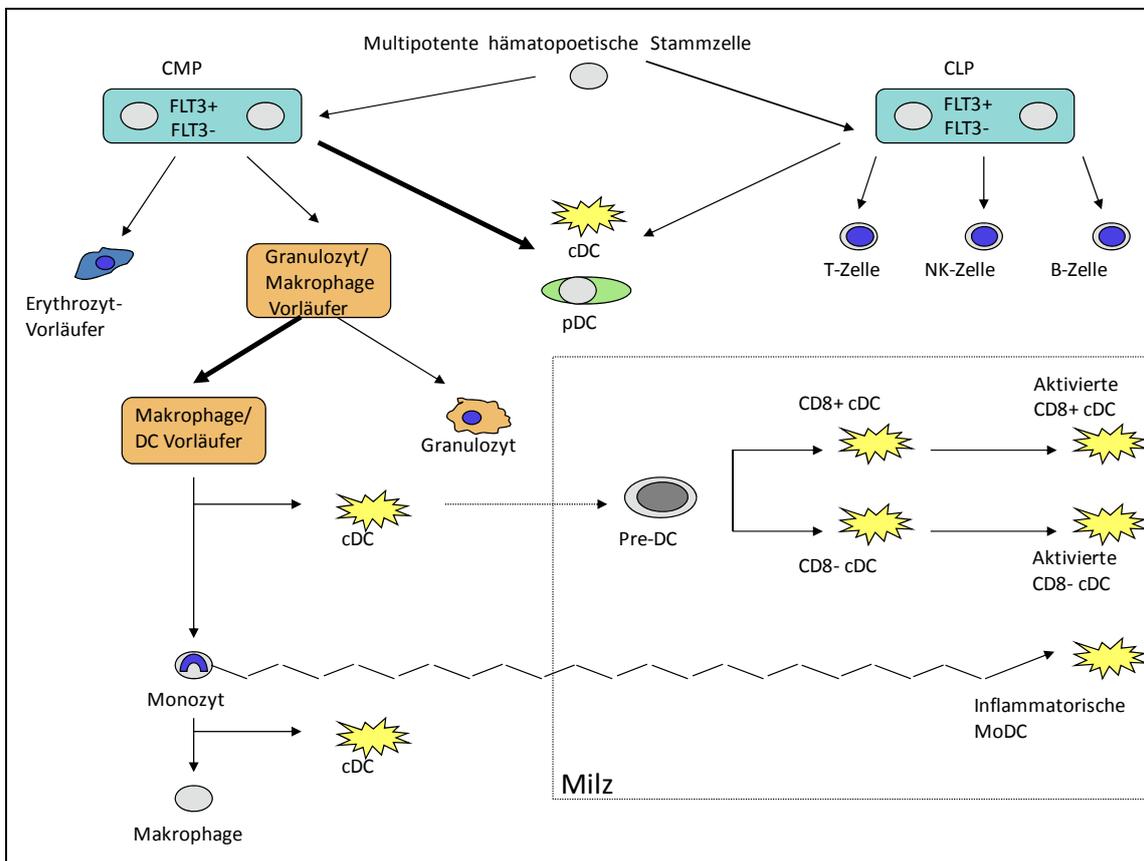


Abb. 1: Differenzierungswege dendritischer Zellen

CMP = gemeinsame myeloide Vorläuferpopulation, CLP = gemeinsame lymphatische Vorläuferpopulation, cDC = konventionelle dendritische Zelle, pre-DC = direkte DC Vorläuferzellen, pDC = plasmazytoide DC. Modifiziert nach Shortman und Naik 2007.

Plasmazytoide Zellen (pDC) werden von denselben Vorläuferzellen gebildet aus denen auch cDC entstehen (D'Amico und Wu 2003). Ihre Produktion ist ebenso abhängig von FLT3L (Brawand et al. 2002) und ihre Entwicklung hängt von vielen ähnlichen Transkriptionsfaktoren wie die der cDC ab; dennoch zweigt der Entwicklungsweg der pDC an einer Stelle, die noch nicht genau identifiziert wurde, von dem Differenzierungsweg der cDC ab. pDC gehören zu den pre-DC, sie werden durch inflammatorische Stimuli und IL-3 zu aktivierten DC umgewandelt. Sie sind in der Lage große Mengen Typ I Interferon (IFN) zu bilden (Liu 2005) und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Erkrankungen (Cella et al. 1999).

Den Thymus-ständigen DC werden tolerogene Eigenschaften zugeschrieben. Sie sind in der Lage, autoreaktive T-Zellen zu deletieren und verhindern somit unkontrollierte Immunreaktionen gegen gesundes Gewebe (Ardavín 1997).

Zwei funktionell verschiedene Typen von Monozyten können durch Expression von Chemokinrezeptoren und Oberflächenmolekülen unterschieden werden: CD14⁺CD16⁻ Monozyten, die CCR2 exprimieren, und CD14^{low}CD16⁺ Monozyten, die kein CCR2 aufweisen (Geissmann et al. 2003). Aus den CCR2⁺ Monozyten können unter inflammatorischen Bedingungen DC entstehen (Gordon und Taylor 2005). Dies kann *in vitro* nachempfunden werden, indem aus Monozyten durch Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 MoDC gewonnen werden (Sallusto et al. 1994). *In vivo* werden diese MoDC nur im entzündeten Lymphgewebe gefunden, sie stellen eher ein transientes Produkt eines inflammatorischen Vorgangs, als einen Dauerzustand der DC, dar (Granelli-Piperno et al. 2005). In einem *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass sich CD14⁻CD16⁺ Monozyten nach transendothelialer Migration zu DC differenzieren können, während sich Monozyten, die in die subendotheliale Matrix einwandern, zu Makrophagen entwickeln (Randolph et al. 1998). Aus CD14⁻CD16⁺ Monozyten können *in vivo* unter nicht-inflammatorischen Bedingungen interstitielle DC entstehen (Yrliid et al. 2006).

Langerhanszellen (LC) können *in vivo* aus Monozyten entstehen (Ginhoux et al. 2006). *In vitro* können LC aus CCR2⁺ CD14⁺ Monozyten gebildet werden (Schaerli et al. 2005), zudem können sie durch Zugabe von GM-CSF und *Transforming growth factor* (TGF-β) aus myeloiden Vorläuferzellen generiert werden (Geissmann et al. 1998).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten humane DC für die klinische Anwendung zu gewinnen. DC können über direkte Isolation von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Auf diesem Weg können zwei Populationen isoliert werden: CD1c⁺ myeloide DC und IL-3R (CD123⁺) pDC (Kohrgruber et al. 1999; Dzionek et al. 2000). Die Zellausbeute ist aufgrund der geringen Frequenz der dendritischen Vorläuferzellen von 0,1-0,5 % aller mononukleären Zellen im peripheren Blut sehr gering. Mit verschiedenen Zytokinen, wie z. B. *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) und Flt-3 Ligand (Marakovsky et al. 2000; Pulendran et al. 2000), ist es möglich, DC-Vorläuferzellen *in vivo* zu expandieren.

Wesentlich effizienter lassen sich DC durch die *in vitro* Kultur von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen oder aus Monozyten generieren. Nach Mobilisierung mit G-CSF können die CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut isoliert werden. *In vitro* können sie durch Kultur in Gegenwart von GM-CSF und TNF-α um den Faktor 10 bis 30 expandiert werden und zeigen nach zwölf-tägiger Kultur

typische Eigenschaften von myeloiden DC (Caux et al. 1996). Monozyten-abgeleitete DC (MoDC) werden gewonnen, indem aus peripherem Blut isolierte Monozyten für fünf bis sieben Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden (Sallusto et al. 1994). Das meiste Wissen, das über die Funktion humaner DC erlangt wurde, ist durch die Arbeit mit MoDC entstanden, da schnell und einfach eine hohe Ausbeute von DC erreicht werden kann. Da in klinischen Studien überwiegend MoDC eingesetzt werden, sind diese Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

DC lassen sich von anderen Leukozytenpopulationen durch das Fehlen von Lineage-spezifischen Oberflächenmarkern wie CD3 (T-Lymphozyten), CD14 (Monozyten/Makrophagen), CD16 (NK-Zellen) und CD19 (B-Lymphozyten) abgrenzen. Die immunphänotypische Charakterisierung der DC erfolgt über ihre Oberflächenexpression von Antigenaufnahme-Rezeptoren (MMR, DEC 205), antigen-präsentierenden Molekülen (CD1a,b,c; MHC-I und MHC-II), Adhäsionsmolekülen (CD11b,c; CD54, CD58) und T-Zell-stimulierenden Molekülen (CD40, CD80, CD86). Reife DC exprimieren eine hohe Dichte an MHC-I, MHC-II und kostimulatorischen Molekülen. Weiterhin gelten CD83 und DC-LAMP als spezifische dendritische Zellmarker, die nur bei aktivierten, reifen DC nachweisbar sind. Daher werden sie auch Reifemarker genannt (De SaintVis et al. 1998; Zhou et al. 1996).

1.2.2 Physiologie dendritischer Zellen

DC bilden im lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe ein dichtes Netzwerk. Sie befinden sich in großer Anzahl an potentiellen Eintrittspforten von Pathogenen, wie z. B. an epithelialen Oberflächen. DC interagieren mit den Effektorzellen des angeborenen (NK- und NKT-Zellen) und adaptiven (T- und B-Lymphozyten) Immunsystems. Als hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen spielen sie eine zentrale Rolle bei der Regulation von spezifischen Immunantworten und der Induktion eines immunologischen Gedächtnisses. DC sind einzigartig in ihrer Fähigkeit, naive T-Zellen *de novo* zu antigenspezifischen Effektorzellen zu aktivieren.

Ausreifung

Der Kontakt mit sogenannten Gefahrensignalen veranlasst die unreife DC zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen und zu einer Funktionsänderung von Antigenaufnahme zur Antigenpräsentation. Diese Reifung der DC ist eng mit deren Migration aus dem peripheren Gewebe zu den drainierenden Lymphknoten verknüpft (Larsen et al. 1990). Die Reifung wird durch eine Reihe verschiedener Stimuli ausgelöst: (a) Pathogen-zugehörige Moleküle, wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS; Rescigno et al. 1999), bakterielle DNA (Hartmann et al. 1999) und einzel- und

doppelsträngige RNA (Cella et al. 1999); (b) proinflammatorische Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β und Prostaglandine und (c) T-Zell vermittelte Signale. T-Lymphozyten tragen über membranständige CD40 Ligand-abhängige und -unabhängige Wege zu der endgültigen Ausreifung der DC in den Lymphknoten bei (Caux et al. 1994; Bell et al. 1999).

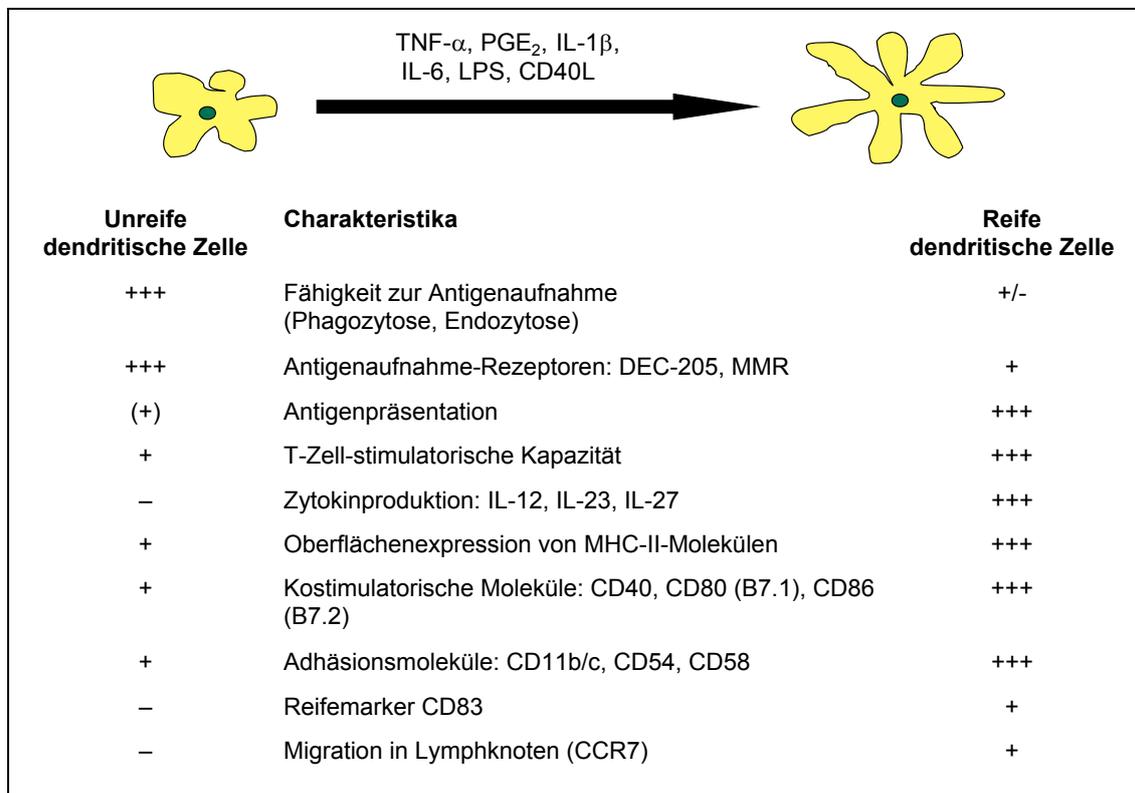


Abb. 2: Charakteristika unreifer und reifer dendritischer Zellen

Der Reifungsprozess ist mit einer Reihe von Veränderungen verbunden: (a) Verlust der Antigenaufnahme-fähigkeit; (b) Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen: CD40, CD80, CD86; (c) Veränderung der Zellmorphologie mit Bildung von Zellausläufern, so dass das charakteristische Bild der dendritischen Zelle entsteht; (d) Veränderung der lysosomalen Kompartimente: Geringere Expression von CD68 und Hochregulierung von DC-Lysosom-assoziierten Membranproteinen (DC-LAMP) und (e) Expression von Chemorezeptoren, die eine Migration vom peripheren Gewebe in die drainierenden Lymphknoten über das Lymphsystem ermöglichen. Morphologische Veränderungen der DC-Reifung sind ein Verlust von adhäsiven Strukturen, eine Zytoskelettorganisation und die Aneignung einer hohen Zellmotilität (Winzler et al. 1997).

Antigenaufnahme

Im peripheren Gewebe befinden sich DC in einem unreifen Funktionszustand, der sie zu einer effizienten Antigenaufnahme befähigt. Sie können über verschiedene Wege

Antigen aufnehmen. Mit Hilfe von sogenannten „scavenger“ Rezeptoren, wie CD36 und $\alpha\beta 5$ Integrinen, phagozytieren DC partikuläre Antigene wie apoptotische und nekrotische Zell-Fragmente (Albert et al. 1998; Rubartelli et al. 1997). Auch Viren und Bakterien in einer Größe von 0,5 μm bis 6 μm können über Phagozytose aufgenommen werden (Inaba et al. 1993). Phagozytose ist eine Form der Endozytose, bei der extrazelluläre feste Partikel durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden. Extrazelluläre Flüssigkeit und gelöste Stoffe werden von DC in größeren Vesikeln (0,5-3 μm) durch Makropinozytose aufgenommen. Die Makropinozytose ist ein Zytoskelett-abhängiger Aufnahme-mechanismus, der nur in einigen Zelltypen, wie Makrophagen, DC und stimulierten epithelialen Zellen, vorkommt (Racoosin und Swanson 1992). Sie unterscheidet sich von der Mikropinozytose, die in fast allen Zellen beobachtet wird. Bei der Mikropinozytose wird extrazelluläre Flüssigkeit über *clathrin coated pits* in kleineren Vesikeln mit einer Größe von 0,1 μm aufgenommen (Watts und Marsh 1992). Die Makropinozytose ermöglicht den DC kontinuierlich sehr große Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit, geschätzte 1500 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ (dies entspricht nahezu dem kompletten Zellvolumen) aufzunehmen und in MHC-II-Kompartimente zu transportieren (Sallusto et al. 1995). DC können Antigene auch über rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen. Unreife DC exprimieren Fc-Rezeptoren ($\text{Fc}\gamma$: CD32, CD64; $\text{Fc}\epsilon$), an die Immunkomplexe gebunden werden (Fanger et al. 1996), C-Typ Lectin-Rezeptoren, wie z. B. DEC-205 (Jiang et al. 1995), und den Makrophagen Mannose Rezeptor (MMR; Sallusto et al. 1995). Der MMR vermittelt die Phagozytose von Mannosehaltigen Partikeln und die Endozytose von mannosilierten Glykoproteinen (Ezekowitz et al. 1990). Für eine effiziente Antigenpräsentation reichen picomolare Konzentrationen von Antigen, die durch Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme aufgenommen werden, aus. Dies ist deutlich weniger als die micromolaren Mengen, die von anderen antigenpräsentierenden Zellen, wie z. B. Makrophagen, benötigt werden (Sallusto et al. 1995).

Zellmigration

Eine funktionelle Konsequenz der DC-Ausreifung ist die Hochregulierung des Chemokinrezeptors CCR7 (Saeki et al. 1999), der die Migration der DC in Richtung der Chemokine CCL21 (6CKine) und CCL19 (MIP-3) ermöglicht (Kellermann et al. 1999; Robbiani et al. 2000). Diese Chemokine bewirken eine Migration der DC über das afferente Lymphsystem in die T-Zell-reichen Zonen sekundärer lymphatischer Organe. Während der Migration reifen die DC zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen heran. Sie sind nun in der Lage durch Antigenpräsentation über MHC-Moleküle,

kostimulatorische Rezeptoren und Zytokine proliferative Antworten in ruhenden T-Zellen zu induzieren (Young und Steinman 1990).

1.2.3 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf MHC-I und MHC-II-Molekülen

In den Lymphknoten interagieren die DC mit den Effektorzellen des Immunsystems. Die reifen DC präsentieren CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aufgenommene Antigene auf MHC-I- bzw. auf MHC-II-Molekülen. Exogene Antigene werden von den unreifen DC über Phagozytose oder Mikropinozytose aufgenommen und über den endozytotischen Weg prozessiert (Watts 2001). In den Endosomen und Lysosomen wird das Antigen von endozytotischen Proteasen durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken entfaltet und in Peptide zerlegt (Villadangos et al. 1999). Neu synthetisierte MHC-II $\alpha\beta$ Dimere sammeln sich im Endoplasmatischen Retikulum mit dem Chaperon *invariant chain* (Ii), das das MHC-II-assoziierte Ii Peptid (CLIP) in die Peptidbindungsstelle des Dimers inseriert, um es zu stabilisieren und um zu verhindern, dass ein anderes Polypeptid an die Stelle anbindet. Der MHC-II $\alpha\beta$ Ii Komplex wird zu dem Endosom und danach zu den lysosomalen Kompartimenten transportiert. Auf dem Weg werden die phagozytierten und in Peptide aufgebrochenen Proteine aufgenommen und daraufhin an der Zelloberfläche den CD4⁺ T-Zellen präsentiert (Banchereau et al. 2000).

Endogene Antigene, wie intrazelluläre Proteine, aber auch Bestandteile von Viren oder Parasiten, werden in einem Phagosomen-Endoplasmatischen Retikulum Kompartiment prozessiert. Im Zytosol werden sie durch das Proteasom in Peptide gespalten, die im ER an MHC-I-Moleküle gebunden werden und für die Präsentation an CD8⁺ T-Zellen an die Zelloberfläche transportiert werden. CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen exprimieren klonale Rezeptoren, die Peptidfragmente von Antigenen, assoziiert mit MHC-I- (CD8) und MHC-II-Molekülen (CD4), erkennen. DC sind spezialisiert, naive T-Zellen zu aktivieren und somit eine adaptive Immunantwort zu initiieren (Bell et al. 1999).

Kreuzpräsentation

Wie bereits beschrieben, verfügen DC über die Fähigkeit, exogene Antigene auf MHC-I-Molekülen an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Hierin unterscheiden sie sich von allen anderen Zellen, die lediglich endogene Antigene auf MHC-I-Molekülen präsentieren. Dieses Phänomen wurde als erstes in einem Mausmodell beschrieben und wird Kreuzpräsentation genannt (Bevan 1976). Die Kreuzpräsentation hat physiologische Bedeutung für die Initiierung der Immunantwort gegen Tumorantigene, Viren und intrazelluläre Proteine (Larsson et al. 2001).

Über die MHC-I-Präsentation von Antigenen bewirken DC eine Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen zu antigenspezifischen CTL (Young und Steinmann 1990). Die CTL spielen bei der zellulären Abwehr von Tumoren eine besondere Rolle, da sie über ihren T-Zell-Rezeptor die Zielzellen mit Expression eines spezifischen Antigens erkennen und lysieren können. Die Fähigkeit CD8⁺ T-Zell-Antworten zu stimulieren, ist ein wichtiger Faktor in der Strategie, DC für eine Anti-Tumor-Vakzine bei Tumorpatienten zu nutzen. Jedoch verfügen nicht alle DC-Typen über die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von exogenem Antigen. Bislang ist dies nur für humane MoDC und CD1c⁺ PBDC gesichert (Schnurr et al. 2005), wohingegen pDC (Schnurr et al. 2005; Fonteneau et al. 2003), Langerhanszellen (Nagata et al. 2002), B-Zellen und Monozyten unabhängig von ihrem Reifestadium wahrscheinlich nicht dazu in der Lage sind. Daraus ergibt sich, dass DC-Typen nicht gleichermaßen zur Tumorstimmung mit Protein als Antigen geeignet sind.

Die molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation sind Gegenstand intensiver Forschung. Folgende Modelle werden derzeit favorisiert: Nach der Phagozytose gelangt das aufgenommene Antigen zunächst in das Phagosom. Dieses fusioniert mit Teilen des Endoplasmatischen Retikulums und erlangt hierdurch wichtige funktionelle Einheiten, wie TAP (*transporter associated with antigen processing*), Tapasin, MHC-I-Moleküle und das Sec61 Translokon, für die MHC-I-Peptid-Komplexbildung (Guermontez et al. 2003). Von diesem spezialisierten, unabhängigen ER-Phagosomen-Kompartiment werden zwei verschiedene Wege, die zur MHC-I-Präsentation führen, diskutiert (Houde et al. 2003; Guermontez et al. 2003; Ackerman et al. 2003). Bei dem ersten Weg, dem Phagosom-Zytosol-Weg (Norbury et al. 1997; Kovacsovics-Bankowski und Rock 1996; Rodriguez et al. 1999), wird das Antigen über Retranslokation, möglicherweise durch Sec61 (Ackerman et al. 2006; Rock et al. 2003) von dem Phagosom ins Zytosol transportiert, wo es von dem Proteasom in Peptidfragmente gespalten wird (Rock et al. 1996). Die so entstandenen Peptide werden dann von dem Peptidtransporter TAP in das Lumen des ER, bzw. Phagosomen-ER Kompartiment transportiert (Huang et al. 1996), durch den komplexen Beladungsapparat, der Tapasin, Calreticulin und Erp57 beinhaltet, an MHC-I-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert (Cresswell et al. 1999). Bei dem zweiten, dem vakuolären Weg, werden Peptide im Phagosom durch Proteasen, hauptsächlich Cathepsin S, generiert, im Phagosom direkt an MHC-I-Moleküle gebunden und daraufhin an die Zelloberfläche transportiert (Shen et al. 2004; siehe Abb. 3).

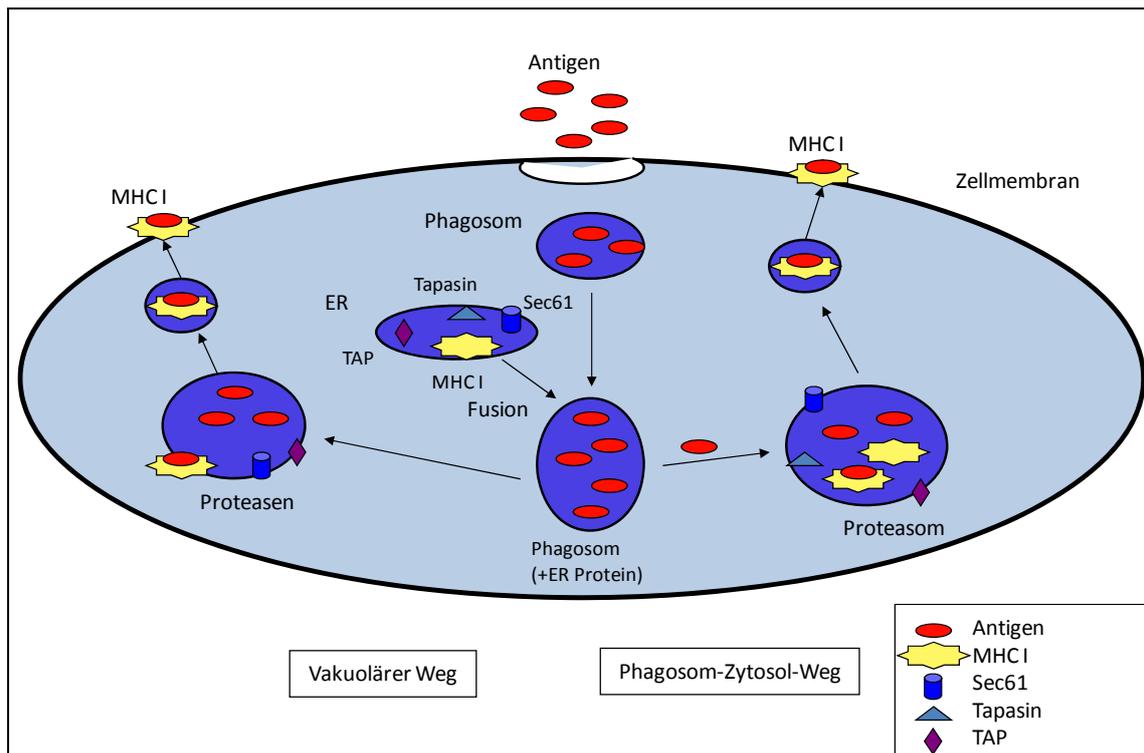


Abb. 3: Zelluläre Mechanismen der Kreuzpräsentation

Die Abbildung stellt zwei aktuell diskutierte Wege der Kreuzpräsentation dar; den Vakuolären Weg und den Phagosom-Zytosol-Weg. Modifiziert nach Rock 2003 und Villadangos et al. 2007.

Der ER-basierte Retranslokationsmechanismus ist in vielen Zellen vorhanden, jedoch besitzen nur DC die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation und sind in der Lage Peptide aus exogenem Protein auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass DC über einen besonderen Mechanismus der Antigenverarbeitung verfügen, der nicht in anderen Zellen gefunden wird (Villadangos et al. 2007). Savina und Mitarbeiter haben einen solchen möglichen Mechanismus beschrieben (Savina et al. 2006): Der Prozess der Degradierung von phagozytiertem Antigen wird in DC im Vergleich zu anderen Zellen abgeschwächt (Delamarre et al. 2005). Dies geschieht zum Teil durch eine Limitierung der Ansäuerung im Phagosom, die durch die NADPH-Oxidase NOX2 erreicht wird. NOX2 produziert ROS (*reactive oxygen species*), das von der V-ATPase gebildete Protonen bindet und somit eine Alkalisierung der Phagosomen erreicht (Trombetta et al. 2003). Diese Alkalisierung des Milieus reduziert die Aktivität lysosomaler Proteasen und mindert somit die Proteolyse (Delamarre et al. 2005). Die Alkalisierung des Phagosoms durch NOX2 scheint mit einer effektiven Antigenprozessierung und Kreuzpräsentation assoziiert zu sein (Savina et al. 2006).

Th1- und Th2-Immunantwort

Bei der Induktion spezifischer T-Zell-Antworten ist die Unterscheidung in Th1- und Th2-gerichtete Immunantworten von Bedeutung. IL-12p70 wird durch reife DC produziert und bewirkt eine Differenzierung von T-Helfer-Zellen in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen (Cella et al. 1996). Th1-gerichtete Immunantworten führen zu einer zellulären zytotoxischen Immunantwort und dienen der Elimination von Zellen, die virale oder mutierte Peptidfragmente von Antigenen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (Macatonia et al. 1995). Bei einer Th2-gerichteten Immunantwort werden IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produziert. Hierbei kommt es primär zur Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen. Th2-Immunantworten schützen vor Infektionen mit Würmern, Protozoen und bestimmten Bakterien und sind in atopische und allergische Reaktionen involviert (Paul et al. 1994). Bei der Vakzinierung gegen Tumore wird die Induktion einer überwiegend Th1-gerichteten Immunantwort mit der Expansion Tumor-spezifischer CTL angestrebt (Timmerman und Levy 1999, Schuler-Thurner et al. 2002).

1.3 Dendritische Zellen als Tumorstoffe

Die Inzidenz einiger Tumorarten beim Menschen ist bei immundefizienten Patienten, z. B. nach Organtransplantation und Einnahme von Immunsuppressiva, erhöht (Euvrard et al. 2003). Aber auch bei Patienten mit einem intakten Immunsystem besteht das Problem, dass der Tumor keine starke Abwehrreaktion auslöst (Davis et al. 2003). Dies kann durch die geringe Anzahl von Tumorantigenen oder HLA-Molekülen, schlechter Erreichbarkeit durch die Effektorzellen oder durch das sehr schnelle Wachstum der Tumorzellen bedingt sein. Des Weiteren kann die Sekretion von Zytokinen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen des Tumors für die geringe Abwehrreaktion verantwortlich sein, da sie die Funktion der Effektorzellen beeinträchtigt (Hellstrand et al. 1994; Qin et al. 1997). Zudem exprimieren Tumorzellen Oberflächenmoleküle wie den Fas-Liganden, der Apoptose bei T-Zellen induziert (Hahne et al. 1996). Diese Fähigkeiten des Tumors werden unter dem Begriff tumorinduzierte Immunevasion subsumiert.

Studien an Mäusen haben gezeigt, dass es dem Immunsystem prinzipiell möglich ist Tumore zu erkennen und abzuwehren (Foley 1953). Im Blut von Tumorkranken wurden Antikörper und T-Zellen, die Tumorantigene erkennen, isoliert. Diese Beobachtungen unterstützen die wissenschaftliche Begründung für eine Immuntherapie von Malignomen.

Vakzinierungsstrategien

Es gibt verschiedene Strategien das Immunsystem hinsichtlich der Abwehr von Tumoren zu beeinflussen. Dazu zählt die unspezifische Aktivierung des Immunsystems mit mikrobiellen Komponenten oder Zytokinen. Ende des 19. Jahrhunderts begann William Coley Patienten mit Osteosarkomen, Abdominaltumoren und verschiedenen weiteren Tumoren mit einem bakteriellen Extrakt aus Streptokokken und Serratus Spezies (*Coley's mixed toxins*) zu behandeln (Coley 1893; Starnes 1992). Obwohl die Behandlung unspezifisch war, zeigten einige Patienten eine Regression ihrer Tumoren, teilweise hielt diese sogar mehrere Jahrzehnte lang an. Die Wirkungsweise des Toxins bleibt ungeklärt. Es gilt zu erwähnen, dass Nachahmungsversuche von verschiedenen Gruppen erfolglos blieben, und diese Strategie letztlich wieder verlassen wurde.

Nachdem die zellulären Komponenten und Mediatoren der spezifischen Immunantwort identifiziert wurden, konnten erstmals tumorspezifische Strategien, wie die Tumorkvakzinierung gegen definierte Antigene von Tumoren, entwickelt werden. Eine attraktive Strategie ist die Vakzinierung mit DC, von der man sich verspricht, dass sie therapeutische T-Zell-Immunität, in Form von tumorspezifischen T-Effektorzellen, und protektive T-Zell-Immunität, in Form von tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen, induziert (Pardoll 1998; Gilboa 1999; Finn 2003).

In der letzten Dekade wurden *in vitro* generierte DC als zelluläre Adjuvantien in verschiedenen Tumorkvakzinierungsstudien verwendet (Antonia et al. 2004). Zur Tumorkvakzinierung werden autologe DC entweder aus CD34⁺ Vorläuferzellen oder aus Monozyten gewonnen. Die verwendeten Monozyten stammen aus dem peripheren Blut und werden mit Hilfe von GM-CSF und IL-4 (Sallusto et al. 1994) oder IL-13 (Piemonti et al. 1995; Alters et al. 1999) zur DC-Differenzierung angeregt. Die DC werden *in vitro* mit Tumorantigenen beladen und dem Patienten zurück injiziert. *In vivo* müssen die DC zu den Lymphknoten migrieren und naive T-Zellen in Richtung eines Th1-Phänotyp aktivieren, um eine effiziente zytotoxische Antwort gegen den Tumor zu induzieren. DC-Reifungssubstanzen, wie TNF- α , LPS und CD40L, wurden verwendet um den DC diese funktionellen Attribute zu verleihen (Whiteside und Odoux 2004).

Verschiedene Varianten der Beladung von DC mit Tumorantigenen wurden getestet: Präformierte Peptide, Proteine, Tumorzelllysate, Tumor-RNA und ganze apoptotische bzw. nekrotische Tumorzellen (Schuler et al. 2003). Durch die Beladung mit apoptotischen bzw. nekrotischen Tumorzellen und Lysaten verspricht man sich die Präsentation multipler definierter und undefinierter Tumorantigene auf MHC-I- sowie MHC-II-Molekülen (Fonteneau et al. 2003; Thumann et al. 2003; Albert et al. 1998).

Dies hätte den Vorteil, dass ein breites Repertoire an tumorreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen rekrutiert werden könnte (Wang 2001).

Tumorantigene

Als erstes humanes Tumorantigen wurde das Carcinoembryonische Antigen (CEA) im kolorektalen Karzinom entdeckt (Gold et al. 1965), gefolgt von α -Fetoprotein im hepatozellulären Karzinom (Abeley 1971). Es handelt sich hierbei um Differenzierungsantigene, die von Tumorzellen überexprimiert werden, aber auch im gesunden Gewebe vorkommen können.

1989 wurde das erste MAGE-Gen beschrieben. Dies gehört zur Gruppe der *cancer testis antigene* (CTA), die nach dem embryonalen Stadium nur noch in Tumorzellen und Keimzellen exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten gegen dieses humane Tumorantigen T-Zell-Antworten generieren können (Knuth et al. 1989). Die Entdeckung von CTA war ein besonderer Meilenstein in der Tumormunologie, da dies der erste Schritt in Richtung einer gezielten antigenspezifischen Tumortherapie war. Seit der Entdeckung dieser ersten Tumorantigene sind viele weitere hinzugekommen. Mehrere Arbeiten bieten eine Übersicht über die bis heute bekannten humanen Tumorantigene (Rosenberg 1999; Renkvist et al. 2001).

NY-ESO-1

NY-ESO-1, ein aus 180 Aminosäuren bestehendes Protein, ist eines der am besten charakterisierten CTA in Bezug auf seine Immunogenität (Jäger et al. 1998). Es wurde das erste Mal durch SEREX-Technologie (*Serological analysis of recombinant cDNA expression*), ein Verfahren bei dem das Serum von Tumorpatienten auf Antikörper gescreent wird, bei einem Patienten mit Ösophaguskarzinom entdeckt (Chen et al. 1997). Bei der SEREX-Technologie wird eine *cDNA-library* aus frischem Tumorgewebe konstruiert, in λ -Phagenvektoren verpackt und in *Escherichia coli* exprimiert. Rekombinantes Protein wird daraufhin auf Nitrozellulosemembranen transferiert und als Antigen durch seine Reaktivität mit IgG-Antikörpern, die im Patientenserum vorhanden sind, identifiziert. Positive Kolonien werden kloniert und die Nukleotidsequenz der eingefügten cDNA bestimmt (Sahin et al. 1997). Über 1500 weitere potenzielle Tumorantigene wurden bisher auf diesem Weg beschrieben (Davis et al. 2003).

Seitdem konnte gezeigt werden, dass viele Tumore NY-ESO-1 exprimieren: Melanome, Neuroblastome, Mammakarzinome, Blasenkarzinome, epitheliale Ovarialkarzinome, Prostatakarzinome, Lungenkarzinome, multiple Myelome, Ösophaguskarzinome, Sarkome und hepatozelluläre Karzinome. In anderen Geweben ist die mRNA von NY-ESO-1 nur gering exprimiert, mit der höchsten mRNA-Expressionsrate

in Keimzellen des Hodens und Ovars (Jungbluth et al. 2001). Über die biologische Funktion von NY-ESO-1 ist bislang wenig bekannt.

Das NY-ESO-1 Gen befindet sich auf dem Chromosom Xq28 (Chen et al. 1997), auf dem bisher mehrere CTA-Gene gefunden wurden (Ross et al. 2005). Verschiedene NY-ESO-1 CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Epitope wurden mittlerweile beschrieben (zusammengefasst in Nicholaou et al. 2006).

Die Immunogenität und die auf Tumorgewebe beschränkte Expression hat NY-ESO-1 zu einem wichtigen Kandidaten für die Entwicklung einer Tumorstabilisierung gemacht. Die ersten klinischen Tumor-Vakzinierungsstudien mit NY-ESO-1 Epitopen wurden mit HLA-A₂-restringierten Peptiden durchgeführt, die spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten in einigen Patienten induzieren konnten (Jäger et al. 2000). In mehreren weiteren klinischen Vakzinierungsstudien mit NY-ESO-1 Peptid wurden spontane humorale und zelluläre Immunantworten gegenüber NY-ESO-1, sowie Metastasenregression und Tumorstabilisierung in einem Teil der Patienten mit fortgeschrittenem NY-ESO-1 exprimierenden Tumoren nachgewiesen (Stockert et al. 1998; Valmori et al. 2000; Gnjatic et al. 2003).

Für eine DC-basierte Tumorstabilisierung kann, neben spezifischen NY-ESO-1 Peptiden, rekombinantes NY-ESO-1 Protein für die Beladung der DC verwendet werden. Vollständiges Protein hat den Vorteil, dass es über alle bekannte und möglicherweise unbekanntes Epitope verfügt. Somit können, im Gegensatz zur Vakzinierung mit Peptid, CD4⁺ und CD8⁺-T-Zell-Antworten gegen eine Vielzahl von Epitopen induziert werden (Murphy et al. 2005). Um eine bessere immunstimulatorische Wirkung zu erzielen, kann rekombinantes NY-ESO-1 Protein mit Antikörpern gegen NY-ESO-1 zu einem Antigen-Antikörper Immunkomplex (NY-ESO-1/IC) kombiniert werden. Klinische Tumorstabilisierungsstudien mit dem Antigen NY-ESO-1, kombiniert mit verschiedenen Adjuvantien, werden momentan bei unterschiedlichen Tumorentitäten durchgeführt (zusammengefasst in Nicholaou et al. 2006).

ISCOMATRIX® adjuvant

Adjuvantien sind Substanzen mit immunstimulatorischer Wirkung, durch deren gleichzeitige Gabe oder Koppelung mit dem relevanten Antigen, die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort verstärkt werden soll. Es werden zum Beispiel Vakzine erprobt, die mikrobielle Vektoren (Bakterien, Viren oder Hefe) oder Nukleinsäuresequenzen benutzen, um humanes Antigen zu transportieren. Die drei Hauptkriterien, die ein Adjuvant für humane Vakzine erfüllen muss, sind Sicherheit, Immunogenität und klinische Wirksamkeit.

Der immunstimulatorische Komplex (ISCOM) wurde erstmals 1984 von Morein und Mitarbeitern als Antigen-Transport-System mit einer starken immunstimulatorischen Aktivität beschrieben (Morein et al. 1984). ISCOM bildet kugelförmige, käfigähnliche Strukturen, typischerweise 40 nm im Durchmesser, die aus Cholesterol, Phospholipid und Saponin bestehen. Für die klinische Anwendung wurde ISCOMATRIX[®] adjuvant (IMX; CSL Limited, Australien) entwickelt, um die Antigenbeladung reproduzierbar, skalierbar und widerstandsfähiger zu machen (Sanders et al. 2005). IMX verfügt über dieselbe käfigähnliche Struktur wie ISCOM, jedoch ohne das Antigen mit einzuschließen. IMX-Vakzine können durch Zugabe des jeweiligen Antigens zum präformierten IMX gebildet werden. Verschiedene IMX-basierte Vakzine wurden in Tiermodellen und in klinischen Studien getestet (Kersten et al. 2003).

Eine klinische Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie mit ISCOMATRIX[®] adjuvant formuliertem NY-ESO-1 Protein zeigte, dass die Vakzine gut vertragen wurde und dass sowohl eine Antikörperantwort, als auch eine für eine Vielzahl von NY-ESO-1 Epitopen spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort induziert werden konnte (Marakovsky et al. 2004).

1.4 Biologische Funktionen von Prostaglandinen

Prostaglandine werden aus Arachidonsäure gebildet und bestehen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Sie können von allen Zellen außer von Erythrozyten synthetisiert werden. Sie werden hauptsächlich bei Bedarf gebildet und nach der Bildung sofort aus der Zelle freigesetzt. Da ihre Halbwertszeit nur wenige Minuten beträgt wird angenommen, dass die Prostanoiden nur lokal, d. h. unmittelbar an ihrem Produktionsort wirken (Narumiya et al. 2001).

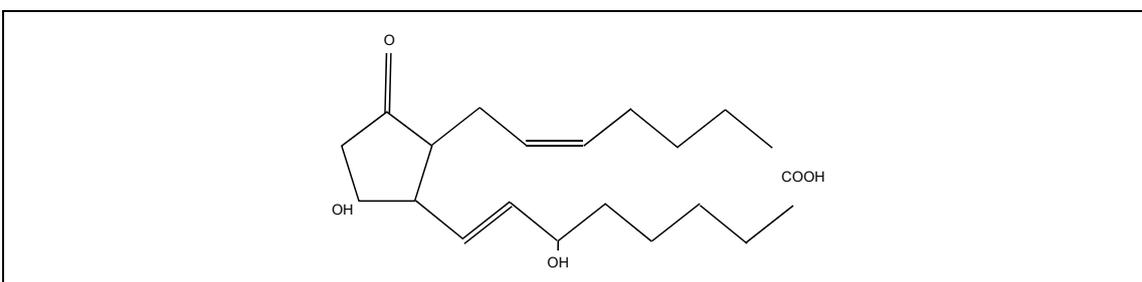


Abb. 4: Strukturformel von Prostaglandin E₂

Wenn Gewebe diversen physiologischen oder pathologischen Stimuli physikalischen, chemischen oder hormonellen Ursprungs ausgesetzt ist, wird Arachidonsäure durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Membranphospholipiden freigesetzt. Durch Cyclooxygenase (COX) wird die Arachidonsäure zu Prostanoiden, Prostaglandinen (PGs) und Thromboxanen (TXs), umgewandelt. Die COX-Reaktion resultiert in der

Bildung eines instabilen Endoperoxid-Zwischenproduktes, dem Prostaglandin H_2 , das wiederum durch zellspezifische Isomerasen und Synthasen zu PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 und Thromboxan (Tx) A_2 metabolisiert wird (siehe Abb. 5).

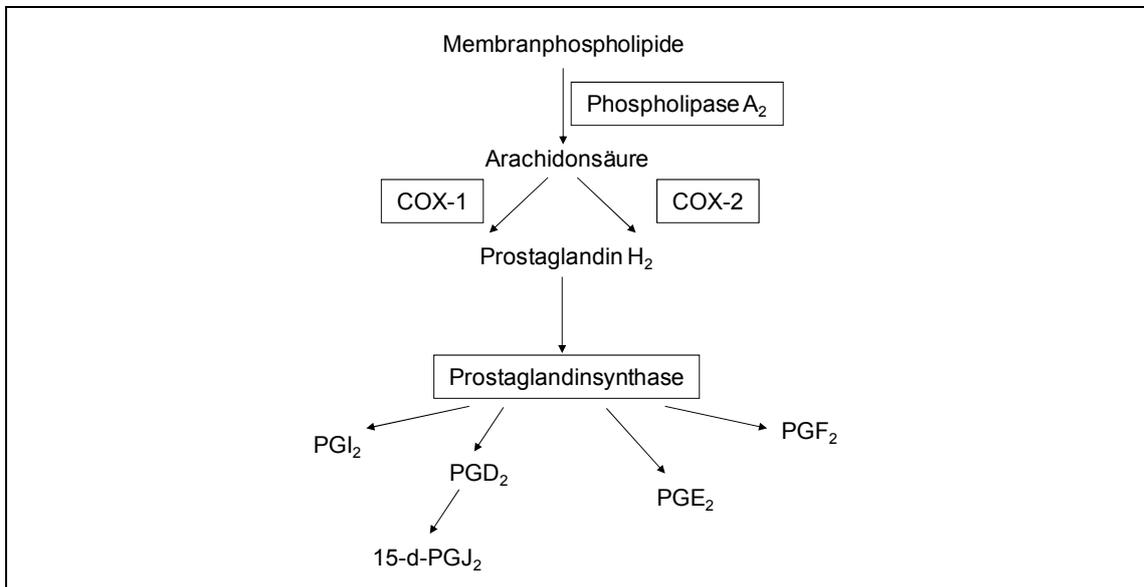


Abb. 5: Synthese von Prostaglandin E_2

Modifiziert nach Harris et al. 2002.

Es existieren zwei COX-Isoformen, COX-1 und COX-2. Die COX-1-abhängige Produktion von Prostaglandin E_2 (PGE_2) dient physiologischen Haushaltsfunktionen, wie z. B. der Generierung von proaggregatorischem TxA_2 durch Thrombozyten und zytoprotektiven Funktionen in der gastrischen Mukosa. Die Konzentration der COX-1 Isoform bleibt relativ stabil. Im Gegensatz dazu ist COX-2 in Ruhebedingungen so gut wie nicht nachweisbar. In Makrophagen, Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen wird es bei Entzündungen durch verschiedene Zytokine, Endotoxine und Wachstumsfaktoren induziert. Daher wird angenommen, dass die COX-2-abhängige Prostaglandin-Produktion eine Rolle bei Entzündungen und der Zellproliferation spielt (Smith et al. 2001).

Prostanoide vermitteln eine Vielzahl von unterschiedlichen Aktionen in verschiedenen Geweben und Zellen. Sie wirken bei der Relaxation und Kontraktion von verschiedenen Typen der glatten Muskulatur mit. Sie modulieren neuronale Aktivitäten durch Inhibierung oder Stimulation der Neurotransmitterfreisetzung, sensibilisieren sensorische Schmerzfasern gegenüber toxischen Reizen (Zurier und Quagliatta 1971) oder induzieren zentrale Aktionen wie z. B. Schlaf. Prostaglandine regulieren die Sekretion und Motilität im Gastrointestinaltrakt (Ramwell 1968), die glomeruläre Filtration (Kokko 1981), die Ovulation, Uteruskontraktion (Challis und Gibb 1996) und Embryoimplantation und -entwicklung. Sie wirken bei der Apoptose, Zelldifferenzierung

und Onkogenese mit. Prostaglandine regulieren die Aktivität von Thrombozyten und sind in die vaskuläre Homöostase und Hämostase involviert (Narumiya et al. 1999). Zudem spielen sie eine Rolle in der Inflammation und der Modulation von immunologischen Prozessen, wie bei der rheumatoiden Arthritis (Zurier und Quagliatta 1971) und der Induktion von Fieber (Miller 2006).

Effekte von Prostaglandin E₂ auf dendritische Zellen

Prostaglandin E₂ (PGE₂) hat verschiedene Effekte auf DC in Bezug auf Reifung, Zytokinproduktion und Migration. PGE₂ induziert die Expression von CD83, eine Hochregulierung von CD40 und CD44, von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, von Adhäsions- (CD54, CD58) und von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) bei DC. Nach Inkubation mit PGE₂ zeigen DC einen reifen Phänotyp mit multiplen Zytoplasmaausläufern (Rieser et al. 1997). Beim Vergleich verschiedener Prostaglandine wurde PGE₂ als potentestes Prostaglandin für eine Ausreifung von DC identifiziert (Steinbrink et al. 2000). PGE₂ wird in Kombination mit TNF- α , IL-1 β und IL-6 als Reifestimulus für DC in Tumorstudien verwendet (Thurner et al. 1999), diese Kombination wird von einigen Autoren auch als „Goldstandard“ zur Ausreifung von DC bezeichnet (Jonuleit et al. 1997; siehe auch Abschnitt 1.1).

Die Fähigkeit der DC von dem Ort der Antigenaufnahme im peripheren Gewebe zu den T-Zell-Regionen der abführenden Lymphwege zu migrieren, ist entscheidend für die Interaktion mit den T-Lymphozyten. Durch die Stimulation mit PGE₂ wird die Expression des CCL19/CCL21 Chemokinrezeptors CCR7 auf der Zelloberfläche von reifen MoDC erhöht. Die Zellen erlangen die Fähigkeit, in Richtung des proinflammatorischen Chemokins CXCL12 und der vom lymphatischen Endothel produzierten Chemokine CCL19 und CCL21, und somit in die Lymphknoten zu migrieren. PGE₂ induziert diese Migrationsfähigkeit der DC über EP2/EP4-Rezeptoren, die einen cAMP-Anstieg im Zytosol vermitteln (Luft et al. 2002; Scandella et al. 2002).

Neben der Reifung und Migration beeinflusst PGE₂ auch das Zytokinprofil aktivierter DC. DC, die in Gegenwart von PGE₂ ausreifen, sind in ihrer Fähigkeit bioreaktives IL-12p70 zu produzieren eingeschränkt (Kalinski et al. 1998; Van der Pouw Kraan et al. 1995). Da IL-12p70 die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Zellen induziert und entscheidend für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-Zellen ist, werden möglicherweise Tumorimmunantworten abgeschwächt (Brombacher et al. 2003; Trinchieri et al. 2003). Des Weiteren hemmt PGE₂ die IL-27-Produktion der DC (Schnurr et al. 2005). IL-27, das zur IL-12 Familie gehört, induziert die Proliferation und IFN- γ -Produktion von naiven CD4⁺ T-Zellen (Pflanz et al. 2002). Fördernd wirkt PGE₂ auf die IL-10- (Stolina et al. 2000) und IL-23-Produktion (Schnurr et al. 2005). IL-10

inhibiert die Zytokinproduktion von Th1-Zellen (Luscher et al. 1994) und verfügt über immunoregulatorische und immunostimulatorische Aktivitäten (Howard et al. 1992). IL-23 aktiviert selektiv Gedächtnis T-Zellen zur IFN- γ - und IL-17-Produktion (Oppmann et al. 2000; Aggarwal et al. 2003) und ist in der Lage tumorspezifische CTL zu induzieren (Lo et al. 2003; Wang et al. 2003).

Reifung	CD80 \uparrow , CD83 \uparrow , CD40 \uparrow , CD44 \uparrow , MHC-I \uparrow , MHC-II \uparrow , CD54 \uparrow , CD58 \uparrow , CD80 \uparrow , CD86 \uparrow
Migration	CCR7 \uparrow , CXCR4 \uparrow
Zytokinproduktion	IL-12p70 \downarrow , IL-27 \downarrow , IL-23 \uparrow , IL-10 \uparrow

Tab. 2: Effekte von Prostaglandin E₂ auf dendritische Zellen

1.5 EP-Rezeptoren

Prostanoide wirken über Membranrezeptoren auf der Oberfläche von ihren Zielzellen. Prostaglandin E₂ wirkt über die EP-Rezeptoren E₁ (Funk et al. 1993), E₂ (Regan et al. 1994), E₃ (Adam et al. 1994) und E₄ (Coleman et al. 1994). Daneben existieren vier weitere Typen und Subtypen von Membran Prostanoid-Rezeptoren: Zwei Subtypen der PGD Rezeptoren: DP1 und DP2 (Boie et al. 1994); der PGF Rezeptor FP (Abramovitz et al. 1994) und der PGI Rezeptor IP (Boie et al. 1994).

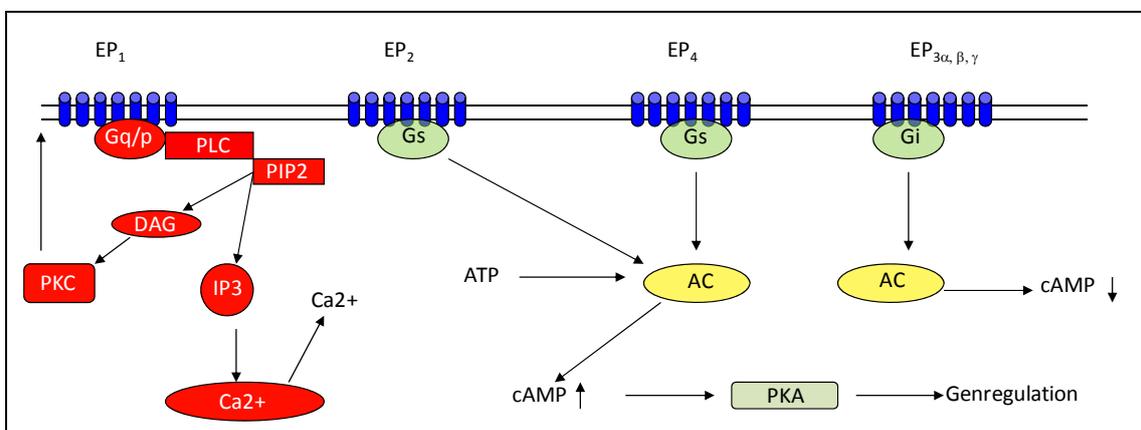


Abb. 6: Signaltransduktionswege der EP-Rezeptoren

Abkürzungen: AC (Adenylatzyklase), DAG (Diacylglycerol), IP₃ (Inositol-triphosphat), PIP₂ (Phosphatidylinositoldiphosphat), PKA (Proteinkinase A), PKC (Proteinkinase C), PLC (Phospholipase C). Modifiziert nach Harris et al. 2002.

Alle Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rhodopsin-Typ Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Jeder Rezeptor wird durch ein unterschiedliches Gen kodiert (Narumiya et al. 1999). EP₁ ist an G_{q/p} gekoppelt und das Binden des Liganden resultiert in einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. EP₂ und EP₄ sind an das G_s

Protein gekoppelt und induzieren einen Anstieg von cAMP (Regan et al. 1994). Die drei Isoformen des EP3-Rezeptors sind überwiegend an G_i gebunden und ihre Aktivierung führt zu einer Verminderung des cAMP-Spiegels (Narumiya et al. 1999; siehe Abb. 6).

EP3- und EP4-Rezeptoren befinden sich in fast allen Geweben des Körpers. Im Gegensatz dazu wird der EP1-Rezeptor nur in wenigen Organen, wie in der Niere, Lunge und Magen gefunden, der EP2-Rezeptor ist am wenigsten verbreitet.

Gen	Phänotyp	Referenz(en)
EP1	Verminderung von Karzinogen induzierten kolorektalen Neoplasien	Watanabe et al. 1999
EP2	Beeinträchtigte Ovulation und Fertilisation Salzsensitive Hypertension Beeinträchtigte Vasopressorische Antwort Verlust der Bronchodilatation nach PGE_2 i.v.	Kennedy et al. 1999 Tilley et al. 1999 Audoly et al. 1999 Zhang et al. 2000 Sheller et al. 2000
EP3	Verminderte febrile Antwort nach Pyrogenen Verminderte dudodenale Bikarbonatsekretion und muköse Integrität Verstärkte Vasodepressorische Antwort nach i.v. Infusion von PGE_2	Ushikubo et al. 1998 Takeuchi et al. 1999 Audoly et al. 1999
EP4	Offener Ductus arteriosus Verminderte vasodepressorische Antwort nach i.v. Infusion von PGE_2	Nguyen et al. 1997 Audoly et al. 1999

Tab. 3: Phänotypen von Mäusen mit fehlenden Prostanoidrezeptoren
Modifiziert nach Narumiya et al. 2001.

Um die biologische Funktion der EP-Rezeptoren zu analysieren, wurden Knock-out Mäuse mit fehlenden EP-Rezeptoren generiert (siehe Tab. 3). Die cDNA des klonierten EP1-Rezeptors codiert ein 402-Aminosäuren Polypeptid (Funk et al. 1993). Der EP1-Rezeptor, ein 42 kDa Protein, wurde zunächst als Konstriktor von glatten Muskelzellen beschrieben, zudem wird eine Involvierung des EP1-Rezeptors in die Kolonkarzinogenese diskutiert. Die humane EP2-Rezeptor cDNA codiert ein 358-Aminosäuren Polypeptid. Funktionelle Studien weisen darauf hin, dass der EP2-Rezeptor, ein 53 kDa Protein, eine wichtige Rolle bei der Implantation des Embryos im Uterus spielt (Hizaki et al. 1999; Kennedy et al. 1999) und relaxierend auf die Bronchiolen wirkt (Pavord et al. 1991). Der EP3-Rezeptor, der einzige EP-Rezeptor, der die Adenylatzyklase inhibiert, ist einzigartig in der Familie der Prostanoidrezeptoren, da durch verschiedene Spleißvarianten unterschiedliche zytosolische C-Termini entstehen (Breyer et al. 1994). Die verschiedenen Isoformen können über G_i -Proteine zu einer Reduktion von cAMP oder über G_s -Proteine zu einer Erhöhung von cAMP führen. Der EP3-Rezeptor ist in die Pyrogen-induzierte Fieberantwort und in die Immunabwehr der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes involviert (Ushikubi et al. 1998). Die humane EP4-Rezeptor cDNA codiert ein

488-Aminosäuren Polypeptid. Der EP4-Rezeptor vermittelt wichtige vasodilatatorische Effekte im venösen und arteriellen Gefäßbett (Coleman et al. 1994), ist in die Inhibition von Immunantworten und in die Regulation der Mukussekretion im Gastrointestinaltrakt involviert (Coleman et al. 1990).

Rolle der EP-Rezeptoren in der Immunmodulation und in der Funktion von DC

EP2- und EP4-Rezeptoren sind in die Immunmodulation durch PGE₂ involviert, wohingegen die EP1- und EP3-Rezeptoren hierfür keine wesentliche Rolle zu spielen scheinen (Gualde und Harizi 2004). Der EP2-Rezeptor vermittelt die Inhibition der Differenzierung und Funktion von DC sowie die Tumor-assoziierte Immunsuppression (Yang et al. 2003). Zudem reguliert der EP2-Rezeptor die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu IgE-sezernierenden Plasmazellen (Fedyk und Phipps 1996), moduliert die T-Zell-Entwicklung (Rocca et al. 1999), die Zytokinfreisetzung von Makrophagen (Nataraj et al. 2001) und die postoperative Immunantwort (Strong et al. 2001). Der EP4-Rezeptor fördert die Migration und Reifung von Langerhanszellen (Narumiya 2003).

Des Weiteren vermitteln EP2- und EP4-Rezeptoren die IL-10-Produktion (Harizi et al. 2003), die Migration von MoDC (Luft et al. 2002; Scandella et al. 2002) und spielen eine zentrale Rolle bei der Inhibition der TNF- α -Produktion in humanen Monozyten (Meja et al. 1997) und DC (Vassiliou et al. 2003). Sie vermitteln die IL-8-Produktion von humanen epithelialen Zellen (Yu und Chadee 1998). Im Mausmodell spielen sie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung inhibitorischer Effekte von PGE₂ auf die Zellproliferation und Zytokinfreisetzung im Immunsystem (Nataraj et al. 2001).

EP-Rezeptoragonisten

Klonierte Prostanoidrezeptoren ermöglichen eine homogene Expression in Reporterzellen, wodurch die systematische Analyse der Liganden-bindenden Charakteristika der einzelnen Prostanoidrezeptoren möglich wurde. Es wurden spezifische Liganden identifiziert, die als Agonisten an die verschiedenen EP-Rezeptoren binden und die Wirkung von PGE₂ selektiv an den Rezeptoren imitieren (Breyer et al. 1994). Der Agonist mit der höchsten Affinität zum EP1-Rezeptor ist 17-phenyl-PGE₂ (Lawrence et al. 1992), gefolgt von Sulprostone. Sulprostone ist auch der Agonist mit der höchsten Affinität am EP3-Rezeptor (Kiryama et al. 1997). Am EP2-Rezeptor wirken 11-deoxy-Prostaglandin E₁ und 6,16-dimethyl-PGE₂ (Coleman et al. 1994). 11-deoxy-Prostaglandin E₁ ist zudem der EP-Rezeptoragonist mit der höchsten Affinität zum EP4-Rezeptor (Kiryama et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir Sulprostone als EP1/EP3-Rezeptoragonist und 11-deoxy-Prostaglandin E₁ als EP2/EP4-Rezeptoragonist.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Geräte und Software

FACS Calibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FlowJo Software, Version 4.4	Tree star, San Carlos, CA, USA
Kubota 8800 Zentrifuge	Kubota Corporation, Tokio, Japan
Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss, Jena
MiniMacs	Miltenyi Biotech, Sunnyvale, CA, USA
Vortex VF2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen, Mt Waverley, VIC, Australien
AID EliSpot Reader	Autoimmun Diagnostika GmbH, Straßberg
SPSS für MAC OS X, Version 11.0.4	SPSS Inc. Chicago, IL, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen (8-, 24-, 48-, 96-Loch)	BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Röhrchen	BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
Gefrier Röhrchen	Costar, Corning, NY, USA
25 cm ² und 75 cm ² Zellkulturflaschen	BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Röhrchen	Costar, Vitaris AG, Baar, Schweiz

2.1.3 Chemikalien

Annexin V	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
FACSFlow	BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
FACSSafe	BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoreszein-Isothiozyanat Dextran Partikel	Sigma, St. Louis, MO, USA
10 % Normal Human Serum/PBS	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
Tris (2-carboxyethyl)-Phosphine Hydrochlorid (TCEP)	Pierce Endogen, IL, USA
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Trypsin	Gibco, Carlsbad, CA, USA
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

DC-Kulturmedium

10 % Hitze-inaktiviertes FCS
 RPMI 1640
 60 mg/L Penicillin G
 12,6 mg/L Streptomycin
 2 mM L-Glutamin
 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
 20 ng/ml GM-CSF
 10 ng/ml IL-4
 20 mM HEPES

PBS

24 g Na₂HPO₄
 160 g NaCl
 4 g KH₂PO₄
 4 g KCl
 pH: 7,4

Kulturmedium

RPMI-1640
 10 % Hitze-inaktiviertes FCS
 1 % Glutamin
 1 % Penicillin/Streptomycin

Erythrozyten Lyse Puffer

4,14 g NH₄Cl
 0,5 g KHCO₃
 0,018 g EDTA
 pH 7,35

Minimacs Puffer

90 % PBS
 5 ml 0,5M EDTA
 10 % BSA

Kryomedium

RPMI-1640
 10 % DMSO
 20 % FCS
 1 % Glutamin
 1 % Penicillin/Streptomycin

Buffy diluent

10 % PBS
 1 % 0,5M EDTA

2.1.5 Reagenssätze

ELISA Kit Mouse IFN- γ BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Zellisolation mittels der MACS-Methode

MACS CD14 ⁺ Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA, USA
MACS Cell Separation Columns	Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA, USA
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA, USA

2.1.6 Material für die Zellisolation und -kultur

Ficoll-Paque TM -Lösung	Amersham Bioscience, Schweden
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Trace, Noble Park, VIC, Australien

RPMI 1640-Medium	LICR Parkville, Melbourne, VIC, Australien
Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes Serum	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1 % Penicillin	CSL, Parkville, VIC, Australien

2.1.7 Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

PGE ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IL-2	Cetus Co. Emeryville, CA, USA
GM-CSF	Schering-Plough, Sydney, NSW, Australien
IL-4	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Sulprostone	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
11-deoxy-Prostaglandin E ₁	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
CD40L Trimer	Immunex, Seattle, WA, USA
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.8 Antikörper

Anti-IFN- γ monoklonaler Antikörper	CSL Limited, Parkville, VIC, Australien
HLA-A ₂ (Klon BB7.2)	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Die folgenden fluorchrom-konjugierten monoklonalen Antikörper wurden von Pharmingen, San Diego, CA, USA erworben:

Negativ-kontrollen (Isotypen)	Fluoresceinisothiocyanat-konjugierter monoklonaler Antikörper: Anti-human IgG-FITC	Phycoerythrin-konjugierter monoklonaler Antikörper: Anti-human IgG-PE	Cy-Cychrom: Anti-mouse IgG1-CyCh	Allophycocyanin-konjugierter monoklonaler Antikörper: Anti-mouse IgG1-APC
Dendritische Zellmarker	FITC-AK: HLA-A,B,C (MHC I)	PE-AK: CD83	Cy-Cychrom-AK: CD86	APC-AK: HLA-DR (MHC II), CD45
Lineage-marker	FITC-AK: CD56 (NK-Zellen)	PE-AK: CD20 (B-Zellen)	Cy-Cychrom-AK: CD3 (T-Zellen)	APC-AK: CD14 (Monozyten)
T-Zell-Aktivierungsmarker	FITC-AK: IFN- γ	PE-AK: CD4	Cy-Cychrom-AK: CD8	

Tab. 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

2.1.9 Peptide und Proteine

NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ Peptid (SLLMWITQC)	Auspep, Parkville, VIC, Australien
NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₇₀ Peptid (SLLMWITQCFLPVF)	Mimotopes, Clayton, VIC, Australien
NY-ESO-1 Protein	Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australien, siehe 2.6.3.

2.1.10 Zelllinien

NY-ESO-1-spezifische CD4⁺ T-Zell-Linie

Eine CD4⁺ T-Zelllinie spezifisch für das NY-ESO-1 Epitop NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ (HLA-DR4-Restriktion) wurde aus dem peripheren Blut eines mit dem NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid vakzinierten Melanompatienten durch wiederholte *in vitro* Peptidrestimulation gewonnen und von Dr. Qiyuan Chen (LICR) zur Verfügung gestellt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden in Medium mit 10 IU/ml IL-2 (Cetus Co. Emeryville, CA) kultiviert und wöchentlich mit Peptid restimuliert. Der Anteil an NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀-spezifischen T-Zellen lag bei ≥90 %.

NY-ESO-1-spezifische CD8⁺ T-Zell-Linie

Eine CD8⁺ T-Zelllinie spezifisch für das NY-ESO-1 Epitop NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (HLA-A2-Restriktion) wurde aus dem peripheren Blut eines mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid vakzinierten Melanompatienten durch wiederholte Peptidstimulation gewonnen und von Dr. Qiyuan Chen (LICR) zur Verfügung gestellt. Der Anteil an NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen betrug zwischen 10 % und 60 %.

NY-ESO-1-transfizierte CHO-Zellen

Chinese hamster ovary (CHO)-Zellen wurden am LICR in Melbourne, Australien von Dr. Tsin Yee Tai mit NY-ESO-1 transfiziert. Das NY-ESO-1-Konstrukt wurde mit der Führungssequenz His-tag versehen, als Minigen hergestellt und in einen pcDNA 3.1(-) Vektor eingesetzt. Dieser wurde durch Elektroporation in die CHO-Zellen transfiziert. Stabile Klone wurden durch limitierte Verdünnung und Selektion mit dem Antibiotikum G418 generiert.

SK-Mel 37 Melanomzellen

Die HLA-A2-exprimierende humane Melanomzelllinie SK-Mel 37 wurde am Sloan-Kettering Institut in New York, USA, generiert.

2.2 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

2.2.1 Isolierung von Monozyten

Mononukleäre Zellen wurden aus *buffy coats* von gesunden Spendern (Red Cross Blood Bank, Melbourne, VIC, Australien) isoliert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Blut aus den *buffy coats* entnommen und in 50 ml Röhren mit jeweils 25 ml *buffy diluent* versetzt.

Die mononukleäre Zellfraktion wurde durch Dichtezentrifugation (2300 rpm, 18°C, 25 min) über Ficoll-Paque™-Lösung (spezifische Dichte 1,077 g/ml) gewonnen. In drei Waschschrritten (1800 rpm, 4°C, 5 min) mit *buffy diluent* wurden die Zellen von Thrombozyten und Plasma gereinigt und durch darauf folgende fünfminütige Inkubation mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer von Erythrozyten befreit. Nach einem weiteren Waschschrtritt wurde die Zellviabilität und Zellzahl mithilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt und die Zellen in *buffy diluent* resuspendiert.

Isolierung von Monozyten mit CD14⁺ MicroBeads (MACS)

Für den gesamten Prozess der Monozyten-Isolierung wurde die Temperatur der Zellsuspension und Lösungen bei 4°C gehalten um den Anteil der vitalen Zellen zu maximieren. Die mononukleären Zellen wurden in frischem entgastem Minimacs Puffer mit anti-CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Minimacs Puffer gewaschen und in einer Dichte von 10⁸ Zellen/500 µl in Minimacs Puffer resuspendiert.

Die magnetische MACS-Säule wurde zunächst unter sterilen Bedingungen mit Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 180 µm gefiltert und auf die MACS-Säule gegeben. Nach dreimaliger Spülung der MACS-Säule mit Minimacs-Puffer wurden die CD14⁻ Zellen, die aus der magnetischen Säule heraus gespült wurden, verworfen. Die CD14⁺ Zellen, die in der MACS-Säule retiniert wurden, wurden nach Entfernung aus dem Magneten mit Minimacs-Puffer aus der Säule heraus gespült, gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert. Ein Aliquot der selektionierten CD14⁺ Zellen wurde für die Qualitätskontrolle aufbewahrt.

Qualitätskontrolle der isolierten Zellen

Jeweils 2 x 10⁴ - 5 x 10⁴ der gewonnenen CD14⁺ Zellen wurden in 50 µl 10 % NHS/PBS in FACS-Röhren überführt und für fünf min bei 21°C mit jeweils 2 µl

der nachfolgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörper bzw. den entsprechenden Isotypen (siehe Abschnitt 2.1.8), inkubiert: CD56-FITC (für NK-Zellen), CD20-PE (für B-Zellen), CD3-CyChr (für T-Zellen) und CD14-APC (für Monozyten). Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl PBS resuspendiert, bevor sie der FACS-Analyse zugeführt wurden.

2.2.2 Kultur dendritischer Zellen

MoDC wurden generiert, indem CD14⁺ Zellen in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 20 mM HEPES, 60 mg/L Penicillin G, 12,6 mg/L Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % nicht-essentieller Aminosäuren, 20 ng/ml rekombinantes humanes GM-CSF und 10 ng/ml rekombinantes humanes IL-4 in 24-Loch Zellkulturschalen in je 1 ml Kulturmedium ausgetragen und für sechs Tage bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.3 Kryopräservierung der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

MoDC wurden nach fünftägiger Kultur mit GM-CSF und IL-4 in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml eingefroren. Das Einfriermedium und die Gefriereröhrchen wurden auf Eis vorgekühlt. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 10 % DMSO und 10 % FCS resuspendiert und für 12 h bei -80°C eingefroren. Danach wurden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3 Reifungseffekte von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf dendritische Zellen

2.3.1 Inkubation mit Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten

MoDC wurden nach sechstägiger Kultur geerntet und gezählt. In einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml wurden sie in 24-Loch Zellkulturschalen in je 1 ml Kulturmedium ausgesät. Zu den Zellen wurde PGE₂ in Konzentrationen von 10 µM, 3 µM, 1 µM, 0.3 µM und 0.1 µM; Sulprostone oder 11-deoxy-Prostaglandin E₁ in Konzentrationen von je 2 µM und 1 µM hinzugefügt. Als positive Ausreifungskontrolle wurde zu einigen Zellen 1 µg/ml CD40L Trimer hinzugefügt. Nach 24 bzw. 48 h wurden die stimulierten Zellen der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

2.3.2 Analyse der Zell-Reifung durch Oberflächenmarkerexpression

In der Durchflusszytometrie wurde die Expression von MHC-I (HLA-ABC), MHC-II (HLA-DR), CD83 und CD86 auf MoDC anhand der Fluoreszenzintensität quantitativ gemessen (siehe 2.7.2) und mit Hilfe der Software *FlowJo* ausgewertet.

2.4 Studien zur Antigenaufnahme von dendritischen Zellen

2.4.1 Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen und Zellysat

2.4.1.1 Kultur der SK-Mel 37 Tumorzellen und CHO_{NY-ESO-1}-Zelllinie

Die Zellen der SK-Mel 37- und CHO-Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälber-Serum, sowie 1 % L-Glutamin, 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Alle 48 h erfolgte eine komplette Erneuerung des Kulturmediums. Bei lichtmikroskopischer Konfluenz wurden die adhärennten Zellkulturen mit 0,5 % Trypsin und 0,02 % EDTA von dem Kulturflaschenboden abgelöst, in einem Waschschrift von der Enzymlösung befreit und im Verhältnis 1:4 (SK-Mel 37 Tumorzellen) bzw. 1:10 (CHO_{NY-ESO-1}-Zellen) im Kulturmedium neu ausgetragen.

2.4.1.2 Zellmarkierung mit CFSE

Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) ist ein Fluorchrom, das intrazellulär an Protein bindet. Konfluente SK-Mel 37 Tumorzellen bzw. CHO_{NY-ESO-1}-Zellen wurden zur Entfernung von Zelldebris mit PBS gespült und für 5 min mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium und mehrfacher Zentrifugation (1800 rpm, 4°C, 5 min) wurden die Zellen von der Trypsinlösung gereinigt, in einer Zählkammer gezählt und in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in 2 ml RPMI 1640 resuspendiert. Die zehnminütige Inkubation der Zellen mit 1 µM CFSE bei 37°C wurde durch 2 ml FCS gestoppt. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem RPMI 1640 gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert.

2.4.1.3 Induktion von Apoptose bei SK-Mel 37 Tumorzellen und Annexin-PI-Färbung

Die mit CFSE markierten SK-Mel 37 Tumorzellen wurden in 15 ml Röhrchen in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium in ein Wasserbad überführt. Zur Apoptoseinduktion durch Hyperthermie wurden die Zellen für 60 min bzw. 120 min bei

43°C bzw. 45°C im Wasserbad belassen, bevor sie für weitere 24 h auf einem Rüttler bei 37°C kultiviert wurden.

Die Analyse der Tumorzellapoptose erfolgte durchflusszytometrisch mit der Annexin-PI-Färbung. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu dem Phospholipid Phosphatidylserin aufweist. In apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin von der inneren Plasmamembran auf die äußere transloziert („Flip-Flop-Modell“). Annexin V kann somit an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche apoptotischer Tumorzellen binden. Da Phosphatidylserin sich auch auf der Zellmembran von nekrotischen Zellen findet, wurden die Tumorzellen zusätzlich mit Propidium Iodid (PI) gefärbt, welches sich an Zellkerne von nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen anlagert.

Nach 24-stündiger Inkubation auf dem Rüttler wurden die Tumorzellen mehrfach mit kaltem PBS gewaschen, in 30 μl Annexin-Bindungspuffer (Hepes/NaOH, NaCl, CaCl_2) resuspendiert und für 15 min mit 1,5 μl Annexinlösung inkubiert. Mit weiteren 70 μl Annexin-Bindungspuffer wurden die Tumorzellen in kleine FACS-Röhrchen transferiert. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde 1,5 μl PI hinzugegeben. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der FlowJo Software.

2.4.1.4 Generierung eines Zelllysats aus CHO_{NY-ESO-1}-Zellen

Nach Markierung der CHO_{NY-ESO-1}-Zellen mit CFSE wurden diese in einer Zelldichte von 8×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die CHO_{NY-ESO-1}-Zellen durch drei Gefrier-Tau-Zyklen lysiert. Die Zellen wurden hierfür bei -80°C für einige Stunden eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Durch Trypanblaufärbung konnte die Zellyse lichtmikroskopisch bestätigt werden. Das Zelllysate wurde für die spätere Antigenbeladung von MoDC bei -20°C aufbewahrt.

2.4.1.5 Antigenbeladung dendritischer Zellen mit apoptotischen Zellen oder Zelllysate

Unreife MoDC wurden nach sechs Tagen geerntet, gezählt und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 96-Loch Zellkulturschalen in je 200 μl Kulturmedium ausgetragen. Zu den Zellen wurde PGE_2 (3 μM bzw. 1 μM) oder die EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E_1 (1 μM) bzw. Sulprostone (1 μM) hinzugefügt und für 24 h inkubiert. Danach wurden die mit CFSE markierten SK-Mel 37-Zellen bzw. das CHO_{NY-ESO-1}-Lysate zu den MoDC in einem Verhältnis von 1:1 (DC : SK-Mel 37-Zellen) und 1:2 (DC : CHO_{NY-ESO-1}-Lysate) hinzugefügt und für 4 h bei 37°C kultiviert. Um eine unspezifische Bindung an der Zelloberfläche von DC zu bestimmen, wurde für jede Versuchsbedingung eine Kontrolle bei 0°C durchgeführt. Der Anteil der unspezifischen

Bindungen bei 0°C wurde von der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) bei 37°C subtrahiert.

Nach der Antigenbeladung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit anti-CD45 Ak, einem Oberflächenmarker für Monozyten, für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Markierung wurden die Zellfraktionen dreimal mit PBS gewaschen und der Analyse im Durchflusszytometer zugeführt.

2.4.2 Antigenaufnahme von FITC-Dextran Partikeln

Verwendet wurden mit dem Fluorchrom FITC beladene Dextranmoleküle, die über ein durchschnittliches Molekulargewicht von 40 kDa verfügen. Diese werden aufgrund ihrer Größe durch Makropinozytose von MoDC aufgenommen. Die Aufnahme kann im Durchflusszytometer quantifiziert werden. Zuerst wurde die Konzentration der FITC-Dextran Partikel und die Zeitdauer der Antigenaufnahme optimiert. FITC-Dextran Partikel in einer Endkonzentration von 50 µg/ml erwiesen sich als am besten geeignet für die Antigenaufnahme durch MoDC und wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Die unreifen MoDC wurden nach sechs Tagen geerntet, gezählt und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 96-Loch Zellkulturschalen in je 200 µl Kulturmedium ausgetragen. Zu den Zellen wurde PGE₂ (3 µM bzw. 1 µM) oder die EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ (1 µM) bzw. Sulprostone (1 µM) hinzugefügt und für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 37°C für 30 min mit 50 µg/ml FITC-Dextran Partikeln inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und der Analyse im Durchflusszytometer zugeführt. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde analog zu den Versuchen zur Aufnahme apoptotischer Zellen (siehe 2.4.1.5) der MFI bei 0°C von dem MFI bei 37°C subtrahiert.

2.5 Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen

2.5.1 HLA-A₂-Typisierung der Blutspender

Leukozyten aus *buffy coats* wurden hinsichtlich ihres HLA-A₂ Haplotyps für die Kreuzpräsentationsversuche durchflusszytometrisch charakterisiert. Aus den unfraktionierten Leukozyten wurden unter sterilen Bedingungen 100 µl entnommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer transferiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit *buffy diluent* gewaschen und zentrifugiert. Die Zellfraktion wurde daraufhin in 100 µl 10 % NHS/PBS resuspendiert. 10 µl der Zelllösung wurden jeweils zu 50 µl des Überstandes von Hybridomzellen des Klons BB7.2 (American Type Culture Collection) bzw. zu

50 µl 10%NHS/PBS (Negativkontrolle) hinzugefügt und für fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in einer 1:50 Lösung aus Anti-humanem IgG-FITC und 10 % NHS/PBS für fünf min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert.

2.5.2 Vorbereitung der dendritischen Zellen

Für Versuche zur Kreuzpräsentation wurden nur frisch generierte MoDC verwendet, da aus Vorversuchen ersichtlich wurde, dass kryokonservierte MoDC in ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation stark beeinträchtigt waren. Die Vorbereitung der DC und Inkubation mit PGE₂ wurde analog zu den Versuchen in Abschnitt 2.6.2 durchgeführt.

2.5.3 Antigenbeladung der dendritischen Zellen mit NY-ESO-1 Peptid, NY-ESO-1/Immunkomplex und NY-ESO-1/ISCOMATRIX[®] Formulierungen

Peptidbeladung der DC

Das NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid (SLLMWITQC) wurde, bevor es für die Versuche eingesetzt wurde, für 60 min mit 500 µM Tris (2-carboxyethyl)-Phosphine Hydrochlorid (TCEP) behandelt, um eine Dimerisation des terminalen Cysteins zu verhindern. Die weitere Peptidbeladung der DC erfolgte wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben.

Antigenbeladung der DC mit NY-ESO-1/Immunkomplex

Der Immunkomplex (NY-ESO-1/IC) wurde gebildet, indem rekombinantes NY-ESO-1 Protein mit dem Antikörper anti-NY-ESO-1 mAk (Klon ES121) in einem Verhältnis von 1:1 in Serum-freien RPMI 1640 bei 37°C für 30 min inkubiert wurde.

Antigenbeladung der DC mit NY-ESO-1/ISCOMATRIX[®]

ISCOMATRIX[®] adjuvant (IMX) wurde freundlicherweise von CSL Limited, Melbourne, VIC, Australien bereitgestellt (Herstellung siehe Marakovsky et al. 2004). Die Formulierung aus NY-ESO-1 Protein und IMX wurde gebildet, indem rekombinantes NY-ESO-1 Protein (0,4 mg/ml) mit IMX (0,4 mg/ml ISCOPREP) in einem Verhältnis von 1:1 in 0,5 M Phosphat-Puffer, der 0,75 M NaCl, 0,25 M Glycin und 0,2 M Harnstoff (pH 6,5) enthielt, zusammen gegeben wurde.

NY-ESO-1/IC wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml und NY-ESO-1/ISCOMATRIX[®] (NY-ESO-1/IMX) in einer Konzentration von 1 µg/ml zu den MoDC hinzugefügt. Die Beladung der MoDC mit NY-ESO-1/IMX erfolgte nach der Inkubation mit PGE₂ und den EP-Rezeptoragonisten für 4 h bei 37°C.

2.5.4 Interferon- γ Elispot-Assay

Die Elispot-Platten wurden mit 5 μ l/ml anti-IFN- γ monoklonalen Antikörpern (mAk) für 12 h bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden sie mehrfach gewaschen und für 2 h mit PBS/10 % FCS geblockt. Die antigenbeladenen MoDC wurden mit den CD8⁺ T-Zellen für 16 bis 18 h in den Elispot-Platten kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen entfernt, die Platten mit Wasser gewaschen und mit anti-IFN- γ mAk für 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Platten mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und 1 μ g/ml Streptavidin-Alkalin Phosphat wurde hinzugefügt. Die Farbentwicklung wurde durch Waschen mit Wasser nach 6 bis 8 min gestoppt. Die IFN- γ -Produktion der CD8⁺ T-Zellen wurde mit dem AID EliSpot Reader System ausgewertet.

2.5.5 Interferon- γ Nachweis mittels ELISA

Die antigenbeladenen MoDC wurden nach 2 h mit CD40L aktiviert und nach weiteren 12h mit den HLA-A₂-restringierten NY-ESO-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 16 bis 18 h kokultiviert. Die IFN- γ -Produktion der CD8⁺ T-Zellen wurde im zellfreien Überstand der Zellkulturen mit einem kommerziellen IFN- γ ELISA-Kit (BD Biosciences) gemäß der Anleitung des Herstellers quantifiziert und die absolute Zytokinmenge über Eichkurven (Zytokinstandards des Herstellers) ermittelt.

2.6 Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen

2.6.1 HLA-DP₄-Typisierung der Blutspender

Aufgrund Mangels eines spezifischen Antikörpers gegen HLA-DP₄ erfolgte die Phänotypisierung der Spender indirekt über die Fähigkeit von DC HLA-DP₄-restringiertes NY-ESO-1 Peptid an CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren. Nach fünftägiger Kultur wurden MoDC unbekanntem HLA-Haplotyps geerntet. Je 5 x 10⁵ DC wurden in zwei Röhrchen transferiert und mit 5 ml PBS gewaschen. Die erste Probe wurde in 200 μ l Kulturmedium resuspendiert und die zweite Probe wurde für 45 min mit Serum-freiem RPMI 1640 und 20 μ g/ml NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid (SLLMWITQCFLPVF) bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Peptid bindet spezifisch an HLA-DP₄-Moleküle. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 5 ml Serum-freiem RPMI 1640 gewaschen und danach in Kulturmedium resuspendiert. DC von Spendern, die in der Lage waren, die NY-ESO-1-spezifische CD4⁺ T-Zell-Linie zu aktivieren, wurden für die Antigenpräsentationsversuche verwendet.

2.6.2 Vorbereitung der dendritischen Zellen

MoDC von HLA-DP₄⁺ Spendern wurden nach sechstägiger Kultur in GM-CSF und IL-4 geerntet und gezählt. In einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml wurden sie in 96-Loch Zellkulturschalen in je 200 µl Kulturmedium ausgesät. Ein Teil der DC wurde für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese kryopräservierten MoDC wurden für die Versuche durch Resuspendierung in 10 ml Kulturmedium, das auf 37°C vorgewärmt war, aufgetaut. Die Zellen wurden mehrfach mit Kulturmedium gewaschen und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 96-Loch Zellkulturschalen in Medium, in dem sie zuvor sechs Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, ausgesät. Vor der Inkubation mit PGE₂ und den EP-Rezeptoragonisten wurden die MoDC für einige Stunden bei 37°C kultiviert.

Inkubation der MoDC mit Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten

PGE₂ wurde in Konzentrationen von 10 µM, 3 µM, 1 µM, 0,3 µM und 0,1 µM, Sulprostone und 11-deoxy-Prostaglandin E₁ in Konzentrationen von jeweils 2 µM und 1 µM zu den DC-Kulturen hinzugefügt. Bei einigen Versuchen wurden PGE₂ und die EP-Rezeptoragonisten 24 h vor der Inkubation mit NY-ESO-1 Protein (1 µg/ml), bei der simultanen Inkubation gleichzeitig mit dem NY-ESO-1 Protein zu den DC hinzugefügt. Zur Ausreifung der DC wurde CD40L Trimer (1 µg/ml) 60 min später hinzu pipettiert.

2.6.3 Antigenbeladung der DC mit NY-ESO-1 Formulierungen

Peptidbeladung der DC

Je 5×10^5 DC wurden in zwei Röhrchen transferiert und mit 5 ml PBS gewaschen. Die erste Probe wurde in 200 µl Kulturmedium resuspendiert (Negativkontrolle) und die zweite wurde mit Serum-freiem RPMI 1640 und 20 µg/ml NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid (SLLMWITQCFLPVF) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert (Positivkontrolle). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 5 ml Serum-freiem RPMI 1640 gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert.

Proteinbeladung der DC

Rekombinantes NY-ESO-1 Protein wurde am *Ludwig Institute for Cancer Research* in E.coli Bakterium hergestellt und unter *current good manufacturing practice* (cGMP) Bedingungen (Murphy et al. 2005) aufgereinigt. Die Endotoxinlevel des NY-ESO-1 Proteins betragen zwischen 3 und 31 EU/0.1 mg Protein. Es wurden verschiedene Konzentrationen von NY-ESO-1 Protein, die ausgehend von 10 µg/ml titriert wurden, für die Antigenbeladung von DC verwendet.

2.6.4 Kokultur der antigenbeladenen dendritischen Zellen mit NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Die NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (siehe 2.1.10) wurden mit Kulturmedium gewaschen und in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium resuspendiert. Brefeldin A wurde zu den T-Zellen hinzugefügt, so dass die Endkonzentration in der DC/T-Zell-Kokultur $10 \mu\text{g/ml}$ betrug. Jeweils 1×10^4 T-Zellen wurden pro Versuchsbedingung mit 5×10^4 antigenbeladenen MoDC für 4 h bei 37°C kokultiviert. Brefeldin A hemmt die Freisetzung von IFN- γ aus dem Endoplasmatischen Retikulum der aktivierten Zellen und macht es somit einer durchflusszytometrischen Analyse nach dem intrazellulären Färbeprotokoll von Zytokinen zugänglich.

2.6.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Kokultur aus DC und CD4⁺ T-Zellen wurde nach vierstündiger Inkubation bei 37°C durch mehrfaches Waschen beendet. Die Zellen wurden für 20 min bei 4°C mit Antikörpern gegen CD4 in einer 1:50 Verdünnung in PBS markiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur mit $100 \mu\text{l}$ 1 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit $50 \mu\text{l}$ IFN- γ -Ak (anti-IFN- γ -FITC) in einer 1:50 Verdünnung in PBS, in Anwesenheit von 0,25 % Saponin, einem milden Detergens, dass die Zellmembran permeabilisiert, für weitere 20 min bei 4°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS und einer Resuspendierung in $50 \mu\text{l}$ PBS in einem FACS-Röhrchen wurde die IFN- γ -Produktion in den CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.7 Durchflusszytometrie

2.7.1 Technische Beschreibung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung von suspendierten Einzelzellen nach morphologischen Eigenschaften in Hinblick auf Zellgröße und Granularität sowie nach der spezifischen Bindung von Fluorochrom-markierten Antikörpern (Ak) gegen definierte Oberflächenantigene. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson) durchgeführt. Folgendes Prinzip findet Anwendung: Die Zellsuspension wird angesaugt und die Zellen durchlaufen einzeln einen Messpunkt, an dem sie von einem fokussierten Argon-Ionen-Laser (488 nm) im 90° Winkel bestrahlt werden. In Abhängigkeit von Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) streuen die Zellen den Laserstrahl. Zusätzlich werden von dem Laserstrahl die Fluorochrome der zellgebundenen Antikörper zur Emission definierter

Fluoreszenzstrahlung angeregt, die über einen Bandpassfilter in drei Farben aufgetrennt wird. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert Licht im grünen (Bandpassfilter 530 nm), R-Phycoerythrin (PE) im gelben (Bandpassfilter 585 nm) und PE-Cychrom im orangen Wellenlängenbereich (Bandpassfilter 650 nm). Für APC im roten Wellenlängenbereich (Bandpassfilter 670 nm) findet ein zweiter Laser (633 nm) Anwendung. Somit kann unter Verwendung von Antikörperkombinationen, an die unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind, die Koexpression mehrerer Antigene auf den zu untersuchenden Zellen bestimmt werden.

Die untersuchten Zellen wurden anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Eigenschaften in einem Punkthistogramm zur Darstellung gebracht. Aufgrund der charakteristischen morphologischen Auftrennung der Zellen konnte die zu analysierende Zielpopulation durch die Festlegung eines Zielbereiches eingegrenzt und nicht vitale Zellen ausgeschlossen werden („*life gate*“). Für jede Messung wurden mindestens 5.000 Ereignisse in dem entsprechenden Zielbereich aufgezeichnet und anschließend mit der FlowJo Software quantitativ ausgewertet.

2.7.2 Immunphänotypisierung dendritischer Zellen

DC wurden nach sechstägiger Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 in An- bzw. Abwesenheit einer 24- oder 48-stündigen Inkubation mit PGE₂ bzw. spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf die Expression charakteristischer Oberflächenmarker untersucht. Für jede Färbung wurden 10⁵ Zellen in 60 µl PBS suspendiert und für 20 min bei 4°C mit 2 µl Fluorochrom-konjugierten spezifischen Antikörpern bzw. den entsprechenden Isotypen inkubiert (siehe Abschnitt 2.1.8). Anschließend wurden die Zellen mehrere Male mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl PBS resuspendiert, bevor sie der Analyse zugeführt wurden.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt wird. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS (Version 11.0.4) durchgeführt. Die Voraussetzungen für die Durchführung eines Student t-Test für Gruppenvergleiche sind erfüllt, da die Daten intervallskaliert sind und es sich um unabhängige Stichproben handelt. Die dritte Voraussetzung, die Normalverteilung der Daten, wurde jeweils mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests überprüft, die Voraussetzung wurde als erfüllt angesehen, wenn $p > 0,05$.

Statistische Signifikanz beim zweiseitigen Student t-Test wurde für $p < 0,05$ angenommen. Zunächst wurden für alle t-Tests die Stichproben mit Hilfe des Levene's

Test auf die Voraussetzung der Varianzgleichheit überprüft. Wenn der hiermit ermittelte F-Wert ein Signifikanzniveau von $p < 0,1$ aufwies, wurden die Varianzen als ungleich angenommen. In Folge dessen wurden die Ergebnisse des t-Tests mit Hilfe einer Korrektur für ungleiche Varianzen berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Monozyten-Isolierung und Kultur der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Voraussetzung der Versuche war es, die Isolierung von Monozyten aus dem peripheren Blut in ausreichender Zahl und Reinheit für die DC-Kultur zu gewährleisten. Über eine Ficoll-Dichte-Zentrifugation ließen sich mononukleäre Zellen in reproduzierbarer Zahl von $8 - 12 \times 10^8$ Zellen pro *buffy coat*, gewonnen aus 500 ml Blut von gesunden Spendern generieren. Nach der Isolierung der Monozyten mithilfe des MACS Isolation Kits ergab die durchflusszytometrische Qualitätskontrolle eine Reinheit der CD14⁺-Zellen von durchschnittlich über 96 %.

Die isolierten Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 1 ml Kulturmedium in 24-Loch Kulturschalen überführt und für 5-6 Tage unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 bei 37°C inkubiert. Die Ausbeute an DC, mit dem Phänotyp CD14⁻, HLA-DR⁺ und CD11c⁺, nach sechstägiger Kultur betrug 15-50 % der ursprünglich eingesetzten CD14⁺ Monozyten.

3.2 Einfluss von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Ausreifung der dendritischen Zellen

Mehrere Autoren haben beschrieben, dass PGE₂ in Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α, IL-1β und IL-6, aktivierende Effekte auf MoDC u. a. in Bezug auf ihre Ausreifung hat (Jonuleit et al. 1997; siehe Abschnitt 1.4). Ziel der Untersuchungen war es, die Aktivierungseffekte von PGE₂ auf MoDC ohne die Zugabe weiterer Stimuli zu untersuchen. Hierzu wurden DC nach fünftägiger Kultur mit GM-CSF und IL-4 für weitere 24 bzw. 48 h mit PGE₂ inkubiert. Der Reife- bzw. Aktivierungsstatus wurde anhand der Oberflächenmarkerexpression von MHC-I (HLA-ABC), MHC-II (HLA-DR), CD86 und CD83 analysiert. Zunächst wurden DC mit PGE₂ für 48 h in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, um festzustellen, ob der Reifungseffekt dosisabhängig ist. CD40L Trimer wurde als Positivkontrolle gewählt, da es eine vollständige Ausreifung der MoDC induziert (siehe Abb. 7).

Die unstimulierten MoDC wiesen in geringem Ausmaß eine Expression von HLA-ABC, HLA-DR und CD86 auf und zeigten keine CD83-Expression. Die Expressionsstärke der untersuchten Oberflächenmarker stieg dosisabhängig mit der Konzentration von PGE₂ (siehe Abb. 7). Ab einer PGE₂-Konzentration von 0,3 μM erwies sich die Hochregulierung von CD86 als signifikant ($p=0,012$) und ab einer PGE₂-Konzentration

von 1 μM wurden alle Oberflächenmarker signifikant hochreguliert (HLA-ABC: $p=0,017$, HLA-DR: $p=0,02$, CD83: $p=0,004$ und CD86: $p=0,035$). Die PGE_2 Konzentration von 10 μM erwies sich als toxisch (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurde eine PGE_2 Konzentration von 1 μM verwendet.

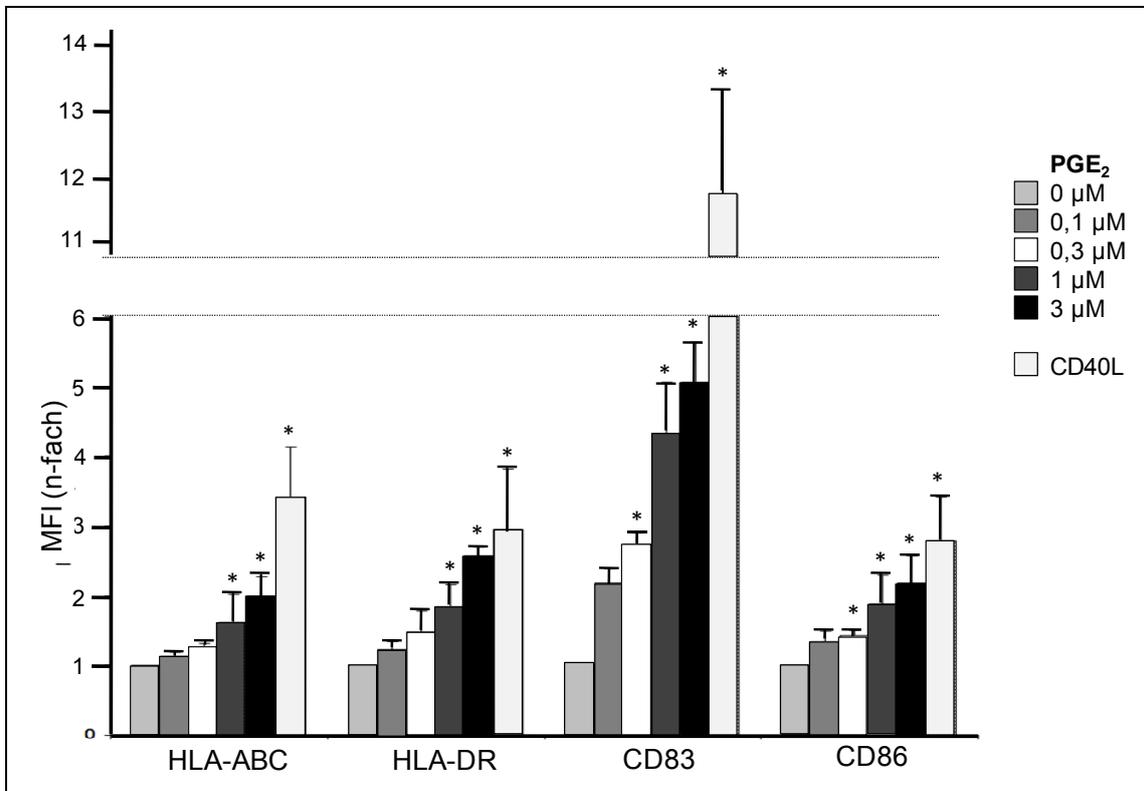


Abb. 7: Effekte von Prostaglandin E_2 auf die Ausreifung der DC

Der Effekt verschiedener PGE_2 -Konzentrationen nach 48-stündiger Inkubation auf die Expression von Reifemarkern auf DC wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als n-fache Expressionszunahme im Vergleich zu unstimulierten DC dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (+SEM) von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

Als nächster Schritt wurde die Inkubationsdauer der MoDC mit PGE_2 1 μM untersucht und eine 24-stündige mit einer 48-stündigen Inkubation verglichen (siehe Abb. 8).

Im Vergleich der Inkubationszeiten von 24 und 48 h zeigte sich, dass die MoDC schon nach 24-stündiger Inkubation mit PGE_2 eine signifikante Hochregulierung von HLA-DR, CD83 und CD86 ($p=0,014$, $p=0,005$ und $p=0,036$) aufwies (siehe Abb. 8). Nach 48-stündiger Inkubation mit PGE_2 waren alle gemessenen Oberflächenmarker signifikant hochreguliert (HLA-ABC: $p=0,01$, HLA-DR: $p=0,034$, CD83 $p=0,002$ und CD86: $p=0,004$). Die Ausreifung mit CD40L Trimer wurde als Positivkontrolle verwendet. Für die weiteren Versuche wurden die DC für 48 h mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert um eine vollständige Ausreifung der DC zu erzielen.

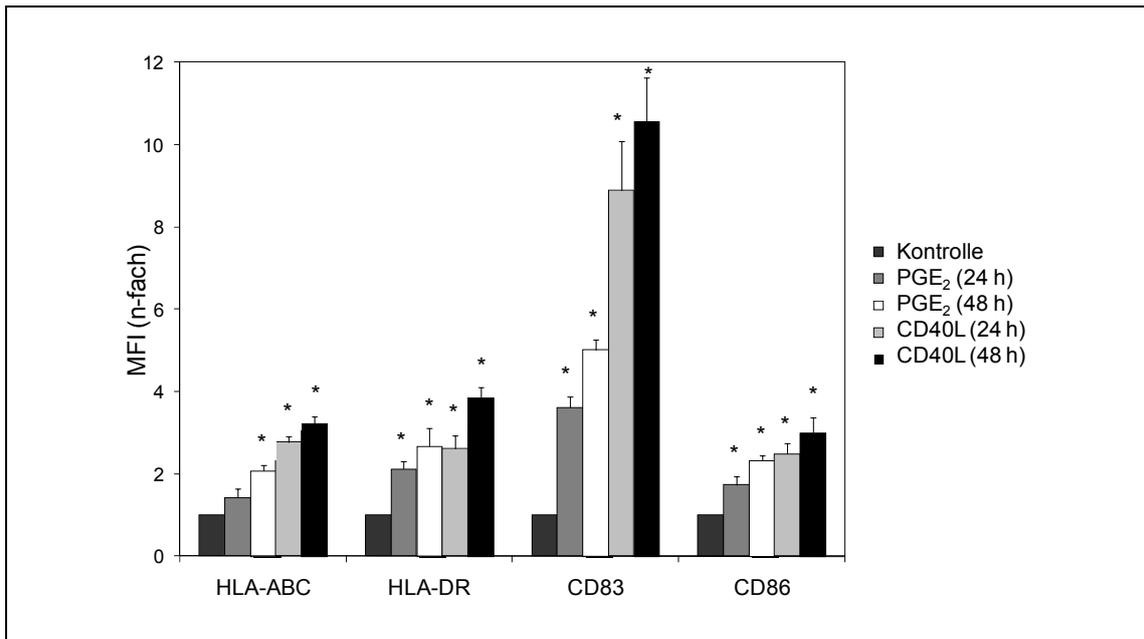


Abb. 8: Einfluss einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubation von MoDC mit PGE₂ bzw. CD40L Trimer auf die Expression von Reifemarkern

Der Effekt verschiedener PGE₂-Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation auf die Expression von Reifemarkern auf der Zelloberfläche von DC wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als n-fache Expressionszunahme im Vergleich zu unstimulierten DC dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit dem korrespondierenden SEM aus drei unabhängigen Experimenten (* p < 0,05).

Um zu untersuchen über welche EP-Rezeptoren PGE₂ MoDC aktiviert, wurden MoDC mit zwei spezifischen EP-Rezeptoragonisten, 11-deoxy-Prostaglandin E₁, das EP2- und EP4-Rezeptoren aktiviert bzw. Sulprostone, das EP1- und EP3-Rezeptoren aktiviert, für 48 h inkubiert (siehe Abb. 9).

Nach 48-stündiger Inkubation mit PGE₂ ist, wie in den vorangegangenen Versuchen, eine signifikante Hochregulierung der untersuchten Oberflächenmarker auf den DC erkennbar. Der EP2/EP4-Rezeptoragonist 11-deoxy-Prostaglandin E₁ bewirkte ebenfalls eine signifikante Ausreifung der DC (HLA-ABC: p=0,027, HLA-DR: p=0,029, CD83 p=0,05, CD86 p=0,01). Der EP1/EP3-Rezeptoragonist Sulprostone induzierte hingegen keine signifikante Hochregulierung der Oberflächenmarker. Zwischen der Ausreifung durch PGE₂ und 11-deoxy-Prostaglandin E₁ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

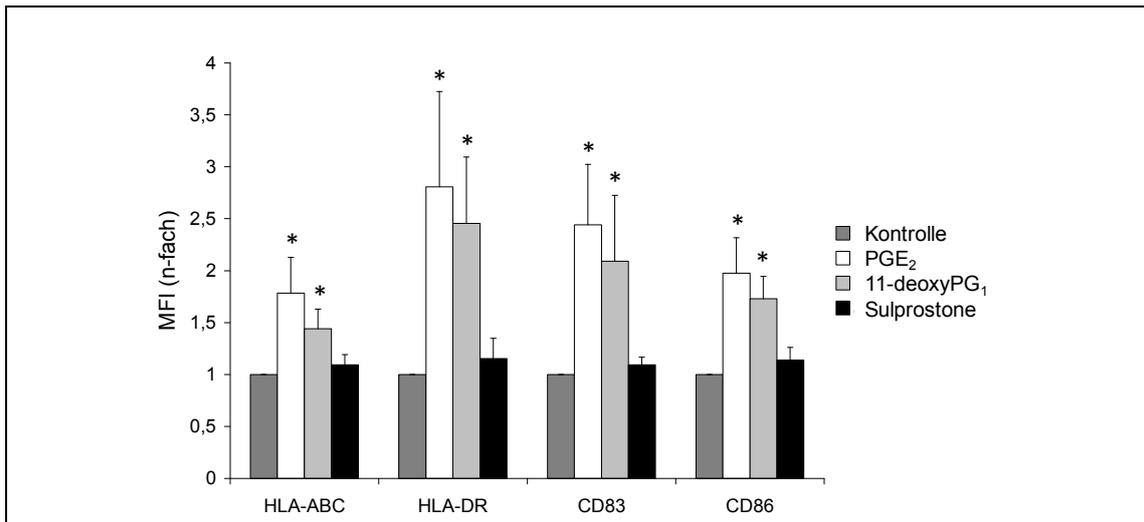


Abb. 9: Vergleich der Effekte von Prostaglandin E₂ und spezifischer EP-Rezeptoragonisten auf die Ausreifung von MoDC

MoDC wurden für 48 h mit PGE₂ (1 µM), 11-deoxy-Prostaglandin E₁ (1 µM) oder Sulprostone (1 µM) inkubiert und die Expression der Oberflächenmarker HLA-ABC (MHC-I), HLA-DR (MHC-II), CD83 und CD86 durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die relative Expressionszunahme im Vergleich zu unreifen MoDC (n-fache Expression). Die Mittelwerte mit den korrespondierenden SEM aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt (*p < 0,05).

3.3 Einfluss von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Antigenaufnahme von dendritischen Zellen.

3.3.1 Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen und CHO_{NY-ESO-1}-Lysat

Apoptoseinduktion bei SK-Mel 37-Melanomzellen

Die Hyperthermiebehandlung erwies sich im Vergleich zur γ -Bestrahlung und Serumdeprivation als effektivste Methode zur Apoptoseinduktion bei SK-Mel 37-Zellen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die optimale Temperatur und Dauer der Hyperthermiebehandlung ermittelt. Die SK-Mel 37-Zellen wurden nach der Hyperthermiebehandlung mit Annexin V und PI gefärbt um apoptotische bzw. nekrotische Zellen abgrenzen zu können. Bei der Kontrollbedingung bei 37°C waren etwa 80 % der Zellen vital. Nach Hyperthermiebehandlung bei 43°C für eine bzw. für zwei Stunden wurden ca. 40 % bzw. 50 % der SK-Mel 37-Zellen apoptotisch (siehe Abb. 10). Bei einer Hyperthermiebehandlung von 45°C für eine bzw. für zwei Stunden stieg der Anteil nekrotischer Zellen auf ca. 55 % bzw. 70 % und die Rate an apoptotischen Zellen ging auf etwa 30 % bzw. 15 % zurück. Die höchste Apoptoserate der SK-Mel 37-Zellen konnte nach zweistündiger Hyperthermiebehandlung bei 43°C erzielt werden, so dass diese Methode für die weiteren Versuche verwendet wurde.

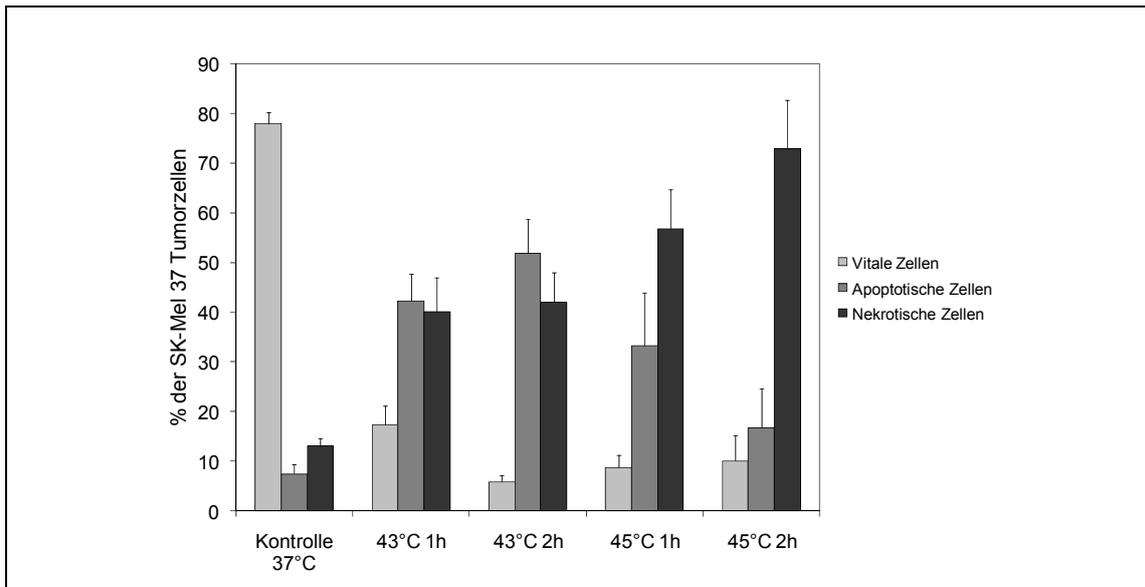


Abb. 10: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hyperthermiebehandlung zur Apoptoseinduktion von SK-Mel 37-Melanomzellen

SK-Mel 37-Zellen wurden für 1 h bzw. 2 h bei 43°C bzw. 45°C inkubiert und durchflusszytometrisch mittels Annexin V / PI-Färbung analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an vitalen (Annexin V - / PI -), apoptotischen (Annexin V + / PI -) und nekrotischen (Annexin V + / PI +) Zellen nach Hyperthermiebehandlung. Die Daten entsprechen Mittelwerten +SEM von vier unabhängigen Experimenten.

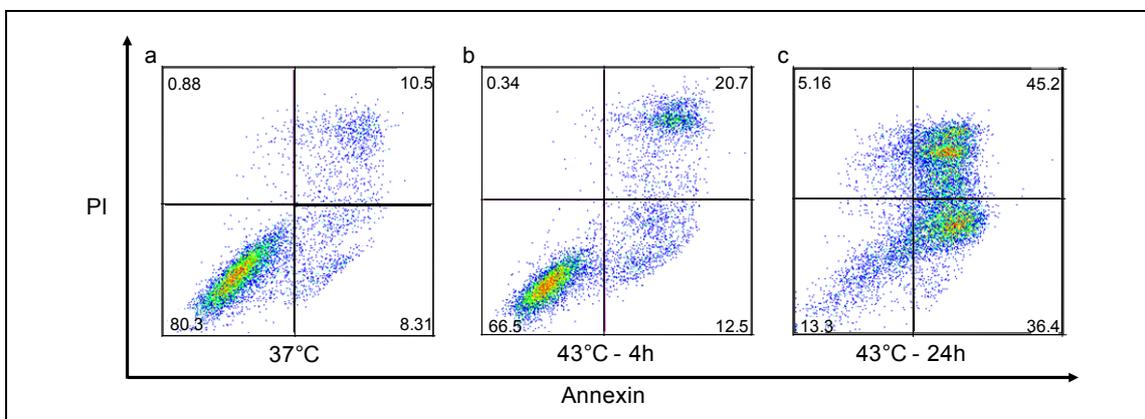


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion mittels Annexin V / PI-Färbung

In den linken unteren Quadranten befinden sich Annexin V und PI negative Zellen, die vitalen Tumorzellen entsprechen. In dem rechten oberen Quadranten befinden sich Annexin V und PI positive Zellen, dies sind die nekrotischen Zellen. Die apoptotischen, PI negativen und Annexin V positiven, Zellen befinden sich in den rechten unteren Quadranten. Die Angaben in den Quadranten entsprechen dem prozentualen Anteil aller SK-Mel 37-Zellen. **a.** Kontrolle: Inkubation von SK-Mel 37-Zellen bei 37°C. **b.** SK-Mel 37-Zellen nach 2 h Hyperthermiebehandlung bei 43°C und weiterer vierstündiger Inkubation auf dem Rüttler. **c.** SK-Mel 37-Zellen nach 2 h Hyperthermiebehandlung bei 43°C und weiteren 24 h auf dem Rüttler. Gezeigt ist eine repräsentative Grafik von drei unabhängigen Experimenten.

Nach der zweistündigen Hyperthermiebehandlung bei 43°C benötigen die SK-Mel 37-Zellen Zeit um den Vorgang der Apoptose zu durchlaufen. In den beschriebenen Versuchen erwiesen sich 24 h als optimal (siehe Abb. 11).

Phagozytose

Apoptotische und nekrotische Zellfragmente in einer Größe von 0,5 µM bis 6 µM werden von DC durch Phagozytose aufgenommen. Im Folgenden wurde der Einfluss von PGE₂ und den spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf die Aufnahme von apoptotischen SK-Mel 37-Tumorzellen und CHO-Lysat untersucht (siehe Abb. 12).

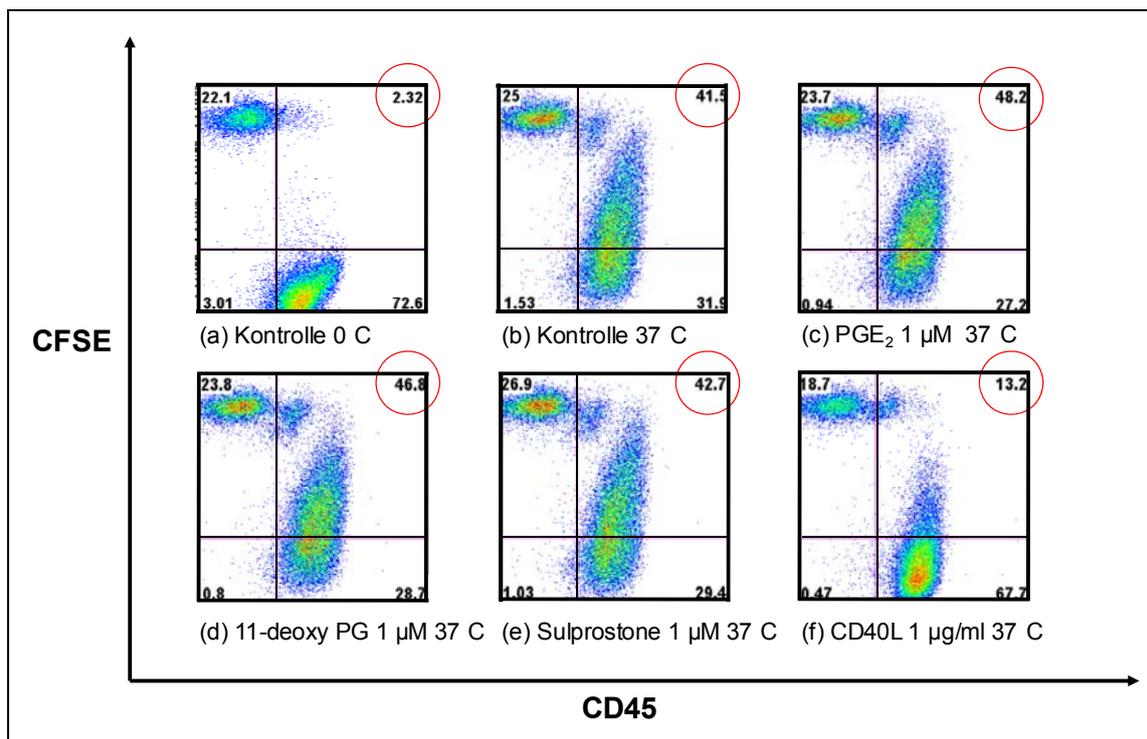


Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose von apoptotischen SK-Mel 37-Tumorzellen durch DC

MoDC wurden mit dem Fluorochrom-markierten anti-CD45 Ak und SK-Mel 37-Zellen mit CFSE markiert und im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die bei 0°C inkubiert wurden (a), als Positivkontrolle Zellen die bei 37°C inkubiert wurden (b). Gezeigt ist der Einfluss von PGE₂ (c), 11-deoxy-Prostaglandin E₁ (d), Sulprostone (e) und CD40L Trimer (f) auf die Phagozytosefähigkeit der DC. In dem rechten unteren Quadranten befinden sich CD45 (+) und CFSE (-) Zellen, die MoDC, die keine SK-Mel 37-Zellen phagozytiert haben. In dem linken oberen Quadranten befinden sich CD45 (-) und CFSE (+) Zellen, die den SK-Mel 37-Tumorzellen entsprechen. In dem rechten oberen Quadranten befinden sich CD45 (+) und CFSE (+) Zellen, welche MoDC, die SK-Mel 37-Zellen phagozytiert haben, entsprechen. Ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die „Kontrolle 0°C“ zeigt die Inkubation von MoDC und SK-Mel 37-Zellen bei 0°C für die gleiche Zeitdauer, wie die Kokultur beider Zelltypen bei 37°C (siehe Abb. 12a).

Diese Negativkontrolle wurde für alle Versuchsbedingungen durchgeführt. Da bei 0°C keine Phagozytose mehr möglich ist, wurden auf diese Weise mögliche unspezifische Bindungen ausgeschlossen. In der Kokultur bei 37°C im Kulturmedium ohne Zugabe von PGE₂ bzw. EP-Rezeptoragonisten nahmen 41,5 % aller MoDC Tumorzellen auf (siehe Abb. 12 b). Die Inkubation von DC mit CD40L Trimer, welches eine vollständige Ausreifung der MoDC bewirkt und die Phagozytosefähigkeit der MoDC effektiv hemmt, reduziert die Phagozytose auf 13,2 % (siehe Abb. 12 f). Weder durch die Inkubation mit PGE₂, noch mit den EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ bzw. Sulprostone wird die Aufnahme von apoptotischen SK-Mel 37-Tumorzellen inhibiert (siehe: Abb. 12c: 48,2 %; 12d: 46,8 %; 12e: 42,7 %).

Analog zu den Versuchen mit apoptotischen SK-Mel 37-Tumorzellen wurde der Einfluss von PGE₂ und den spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf die Aufnahme von CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate durch die MoDC untersucht (siehe Abb. 13).

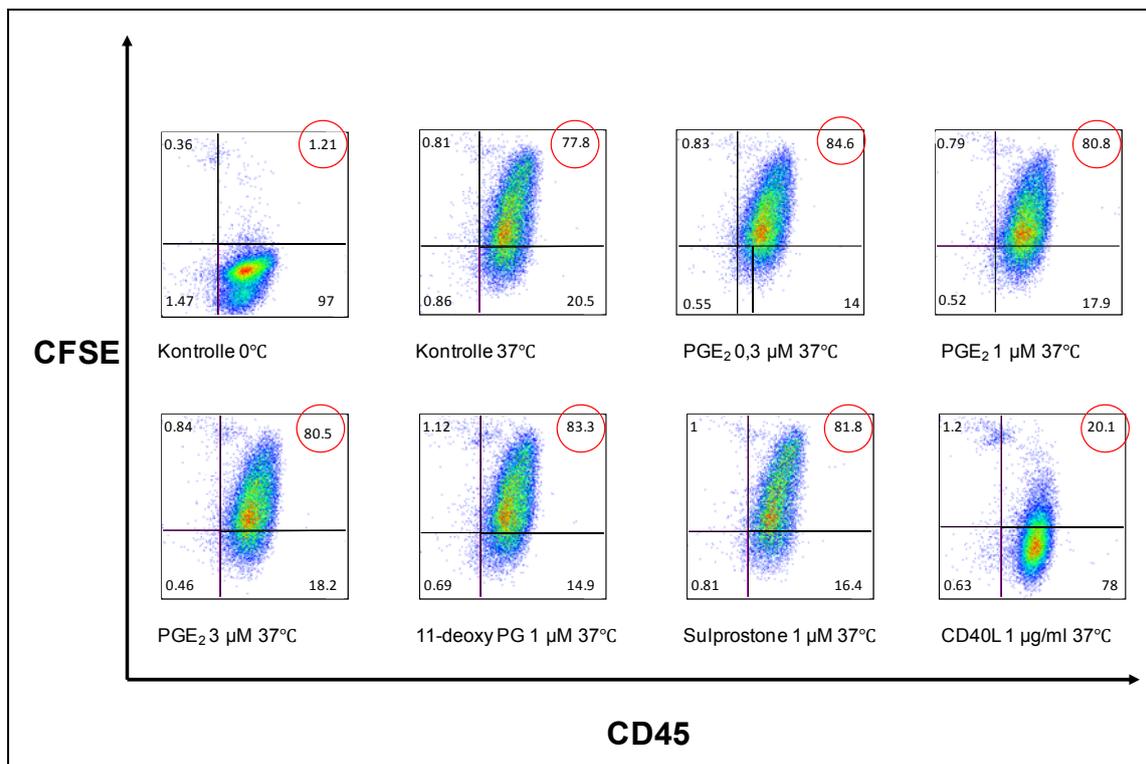


Abb. 13: Einfluss von PGE₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Phagozytose von CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate durch MoDC

MoDC wurden mit dem Fluorochrom-markiertem anti-CD45 Ak und CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate mit CFSE markiert und im Verhältnis 1:2 kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die bei 0°C inkubiert wurden, als Positivkontrolle Zellen die bei 37°C inkubiert wurden. Gezeigt ist der Einfluss von PGE₂ in Konzentrationen von 0,3 µM, 1 µM und 3 µM, 11-deoxy-Prostaglandin E₁, Sulprostone und CD40L Trimer auf die Phagozytosefähigkeit der DC. Die Darstellung in den Quadranten ist analog zu Abb. 12. Gezeigt ist eine repräsentative Grafik von drei Experimenten.

Die unstimulierten MoDC nahmen 77,8 % des CHO_{NY-ESO-1}-Lysats auf. Die Phagozytose von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat durch MoDC wurde durch die Inkubation mit PGE₂ und den spezifischen EP-Rezeptoragonisten nicht beeinflusst. Entsprechend den vorangegangenen Versuchen wurde CD40L als potenter Reifestimulus verwendet. CD40L inhibierte die Aufnahme von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat durch MoDC signifikant (siehe Abb. 13).

3.3.2 Aufnahme von FITC-Dextran-Partikeln

FITC-Dextran-Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 40 kDa werden von MoDC durch Makropinozytose, einem Zytoskelett-abhängigen Mechanismus, aufgenommen. Für eine optimale Antigenaufnahme durch MoDC wurde zunächst die Dauer der Inkubation und die Konzentration der FITC-Dextran-Partikel ermittelt. Als optimal erwiesen sich eine Endkonzentration von 50 µg/ml und eine Inkubationsdauer von 30 min (Daten nicht gezeigt). Analog zu den vorangegangenen Experimenten zur Antigenaufnahme wurde der MFI zur Messung der Makropinozytose bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.1).

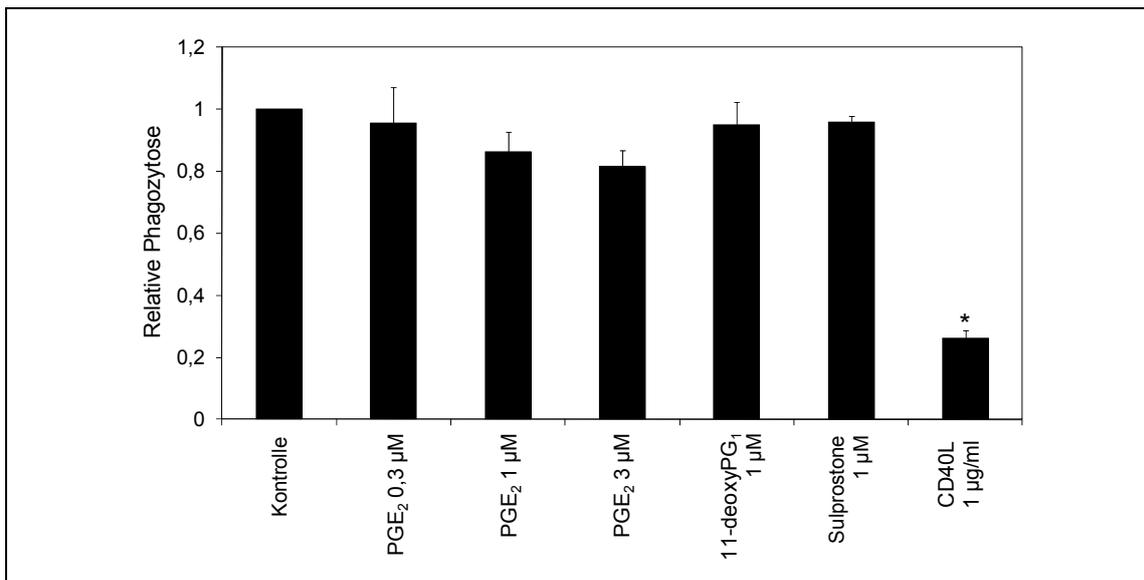


Abb. 14: Einfluss von PGE₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Makropinozytose von FITC-Dextran-Partikeln (40 kDa) durch MoDC

MoDC wurden mit den angegebenen Stimuli aktiviert, mit FITC-Dextran-Partikeln für 30 min inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die relative Veränderung der Aufnahme der FITC-Dextran-Partikel im Vergleich zu nicht stimulierten MoDC. Die Daten entsprechen den Mittelwerten +SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Aufnahme von FITC-Dextran-Partikeln 40 kDa durch die MoDC wurde durch die Inkubation mit PGE₂ und den spezifischen EP-Rezeptoragonisten nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 14).

3.4 Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen (Kreuzpräsentation)

3.4.1 Präsentation von MHC-I-restringiertem Peptid

Zunächst wurde die Antigenpräsentationsfähigkeit der MoDC auf MHC-I-Molekülen mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid, das HLA-A₂-restringiert ist, untersucht. Als nächster Schritt wurde geprüft, ob die Inkubation mit PGE₂ bzw. mit den spezifischen EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ und Sulprostone einen Einfluss auf die MHC-I-restringierte Peptidpräsentation hat. MoDC wurden nach Prä- oder simultaner Inkubation mit PGE₂ bzw. mit den EP-Rezeptoragonisten mit 10 µg/ml NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid beladen. Anschließend wurden die MoDC mit den CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und es wurde der Anteil der IFN-γ⁺ CD8⁺ T-Zellen gemessen (siehe Abb. 15).

Die Peptidpräsentationsfähigkeit der MoDC wurde weder durch Prä- noch durch Simultaninkubation mit PGE₂ bzw. mit den EP-Rezeptoragonisten negativ beeinflusst.

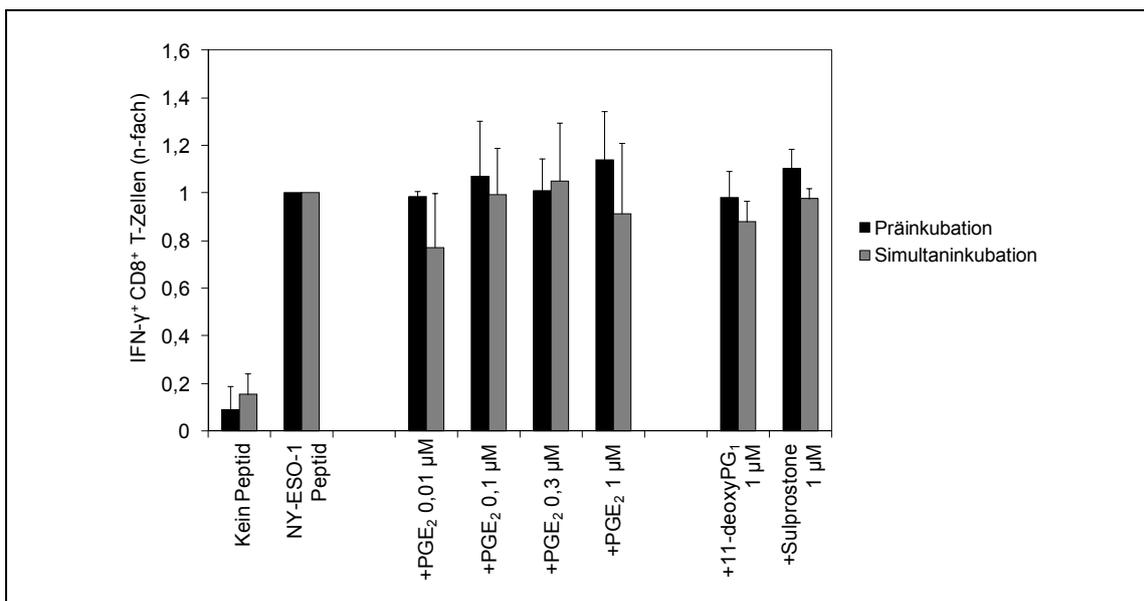


Abb. 15: Einfluss von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die MHC-I Präsentation von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-Peptid durch MoDC

MoDC wurden entweder 24 h vor (Präinkubation) oder gleichzeitig (Simultane Inkubation) zu der Beladung mit NY-ESO-1 Peptid mit PGE₂ bzw. EP-Rezeptoragonisten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kokultur mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Quantifizierung der T-Zellaktivierung erfolgte durchflusszytometrisch durch Analyse der intrazellulären IFN-γ-Expression. Gezeigt sind relative Veränderungen der T-Zellaktivierung bezogen auf nichtaktivierte MoDC (normiert auf 1,0). Die Daten entsprechen Mittelwerten (+SEM) aus fünf unabhängigen Experimenten.

3.4.2 MHC-I-Präsentation von NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/Immunkomplex und NY-ESO-1/ISCOMATRIX®

Zunächst wurden verschiedene NY-ESO-1 Antigenformulierungen in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht, um eine möglichst effektive Kreuzpräsentation zu gewährleisten. Die Kreuzpräsentation von MoDC mit Protein alleine ist ineffizient. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Effizienz der Kreuzpräsentation zu steigern, z. B. indem NY-ESO-1 mit Hilfe von Antigen-Antikörper Immunkomplexen (IC) auf die Fc γ -Rezeptoren gerichtet wird. Eine Alternative ist die Formulierung mit ISCOMATRIX® Adjuvant (IMX). Die optimale Inkubationsdauer der DC mit NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX wurde in Vorversuchen ermittelt und betrug jeweils vier Stunden.

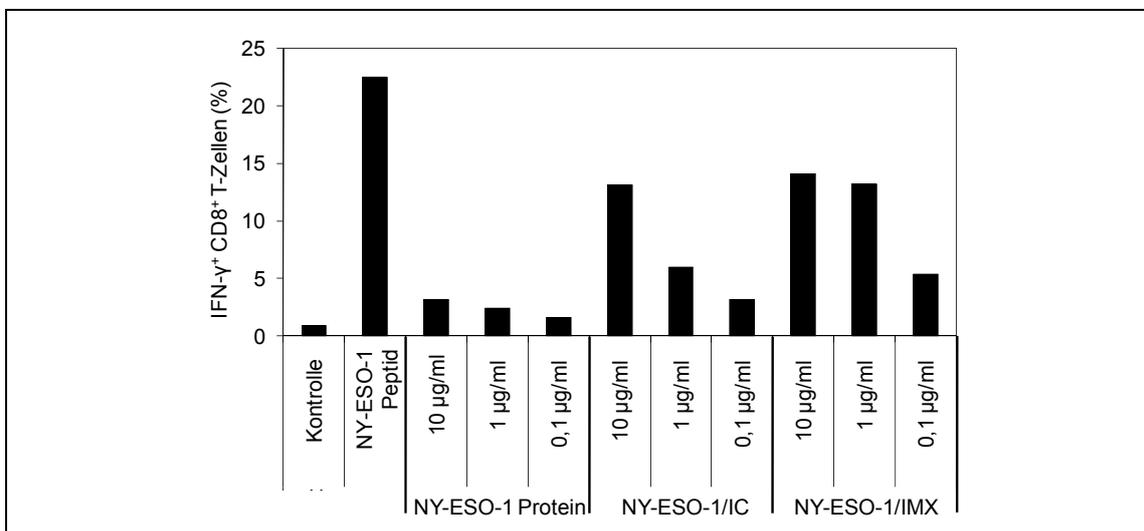


Abb. 16: MHC-I Präsentation von NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC

MoDC wurden mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid, rekombinatem NY-ESO-1 Protein, NY-ESO-1/IC (mAk ES121) oder NY-ESO/IMX inkubiert und mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die T-Zellaktivierung wurde durch die intrazelluläre IFN- γ -Expression durchflusszytometrisch quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Die Beladung mit rekombinatem NY-ESO-1 Protein induzierte keine zufriedenstellende MHC-I-Präsentation durch die MoDC. Die Effizienz der Kreuzpräsentation konnte durch Formulierung des NY-ESO-1 Proteins als NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX deutlich gesteigert werden (siehe Abb. 16). Bei allen verwendeten Antigenformulierungen zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der IFN- γ ⁺-Antwort. 10 µg/ml von NY-ESO-1/IC und 1 µg/ml von NY-ESO-1/IMX zeigten eine ausreichende Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen. Diese Konzentrationen wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Einfluss von PGE₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX

Um den Einfluss von PGE₂ und den EP-Rezeptoragonisten auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1 Proteinformulierungen zu untersuchen, wurden MoDC mit verschiedenen Konzentrationen von PGE₂ bzw. spezifischen EP-Rezeptoragonisten inkubiert und mit NY-ESO-1/IC bzw. NY-ESO-1/IMX beladen (siehe Abb. 17).

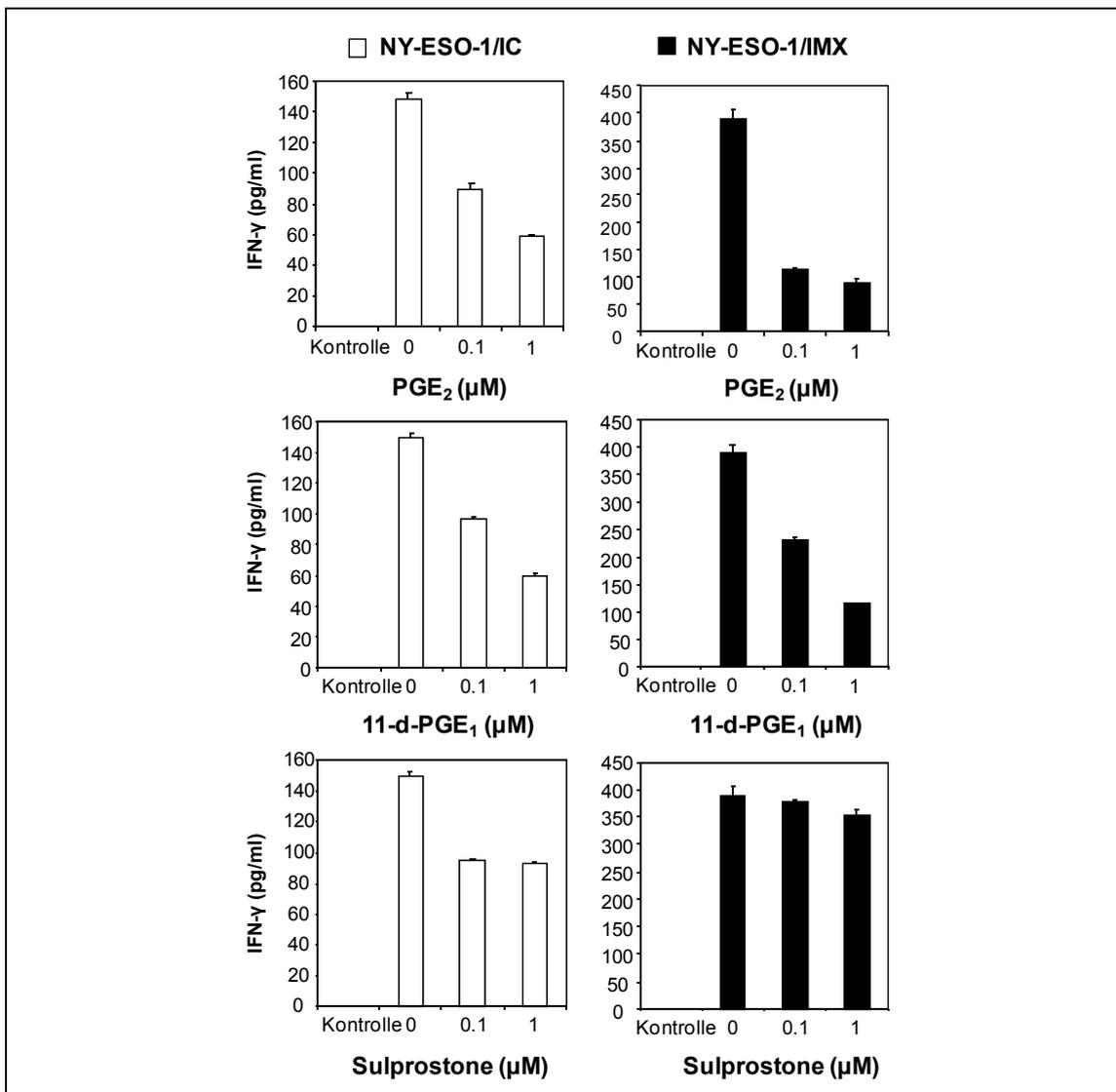


Abb. 17: Einfluss von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC

MoDC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von PGE₂ bzw. spezifischen EP-Rezeptoragonisten inkubiert, mit 10 μg/ml NY-ESO-1/IC bzw. 1 μg/ml NY-ESO-1/IMX beladen und 2 h später mit CD40L aktiviert. Nach weiteren 12 h erfolgte eine Kokultur der MoDC mit HLA-A₂-restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Quantifizierung der T-Zellaktivierung erfolgte durch das im Kulturüberstand gemessene IFN-γ mittels ELISA.

Die Kreuzpräsentation sowohl von NY-ESO-1/IC, als auch von NY-ESO-1/IMX durch MoDC wird signifikant durch die Inkubation mit PGE₂ gehemmt. Die Hemmung der Kreuzpräsentationsfähigkeit erfolgt dosisabhängig. Auch der spezifische EP2/EP4-Rezeptoragonist 11-deoxy-Prostaglandin E₁ hemmt die Präsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch die MoDC signifikant, wenn auch in einem etwas geringeren Ausmaß. Durch den spezifischen EP1/EP3-Rezeptoragonist Sulprostone hingegen wurde die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IMX durch MoDC nicht signifikant beeinflusst. Bei der Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC kann eine Hemmung durch Sulprostone beobachtet werden, die jedoch nicht dosisabhängig ist.

Einfluss einer PGE₂-haltigen Zytokinkombination auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/Immunkomplex und NY-ESO-1/ISCOMATRIX

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, verwenden viele Arbeitsgruppen PGE₂ in Kombination mit TNF- α , IL-1 β und IL-6 als Reifestimulus für DC in klinischen DC-basierten Tumorstudien. Daher untersuchten wir als nächstes den Einfluss von der Kombination aus PGE₂, TNF- α , IL-1 β und IL-6 auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit von MoDC (siehe Abb. 18).

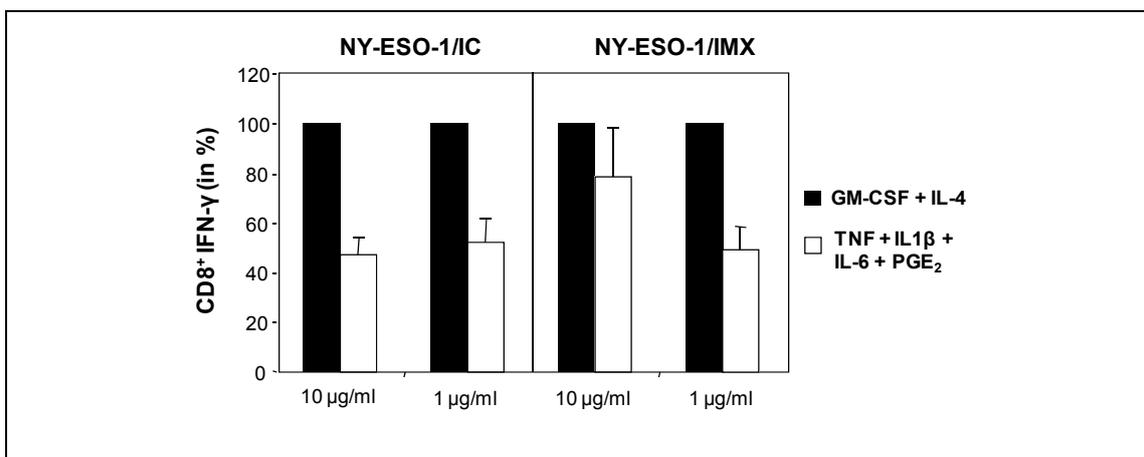


Abb. 18: Einfluss einer PGE₂-haltigen Zytokinkombination auf die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch MoDC

MoDC wurden mit NY-ESO-1/IC (10 µg/ml) bzw. NY-ESO-1/IMX (1 µg/ml) beladen und 2 h später ohne Zusatz von Reifungsstimuli (GM-CSF + IL-4) bzw. mit einer Kombination aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ kultiviert. Nach weiteren 12 h erfolgte eine Kokultur der MoDC mit HLA-A₂-restringierten NY-ESO-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels Intrazellulärfärbung (ICS) für IFN- γ durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der Abweichungen zwischen verschiedenen Spendern wurde die T-Zellaktivierung in Abwesenheit des Zytokincocktails auf 100 % normiert. Gezeigt sind Mittelwerte (+SEM) aus drei Versuchen.

Auch die Inkubation mit einer PGE₂-haltigen Zytokinkombination, die neben PGE₂ auch TNF- α , IL-1 β und IL-6 enthält, hemmt sowohl die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC

(10 µg/ml und 1 µg/ml), als auch die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IMX (1 µg/ml) durch MoDC signifikant.

Wurden MoDC mit CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate bzw. apoptotischen Zellen inkubiert, konnte keine signifikante Kreuzpräsentation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von PGE₂ auf die Kreuzpräsentation von Zelllysate bzw. apoptotischen Tumorzellen durch MoDC konnte daher nicht analysiert werden.

3.5 Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen

3.5.1 Titration der Anzahl dendritischer Zellen zur Antigenpräsentation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kreuzpräsentation von MoDC durch PGE₂ gehemmt wird, wurde die Auswirkung von PGE₂ auf die MHC-II-Präsentation untersucht. Zunächst wurde das optimale Verhältnis zwischen DC und NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für die Versuche zur MHC-II-Präsentation ermittelt. Ziel war es, die Zellzahl möglichst niedrig zu wählen, um eine mögliche Inhibition der Antigenpräsentation durch PGE₂ detektieren zu können. Pro Versuch wurden 1 x 10⁴ T-Zellen eingesetzt. Als Antigen wurde CHO_{NY-ESO-1}-Lysate verwendet. Die Menge des verwendeten Zelllysates entsprach einer Anzahl von 4 x 10³ CHO-Zellen pro Versuchsansatz.

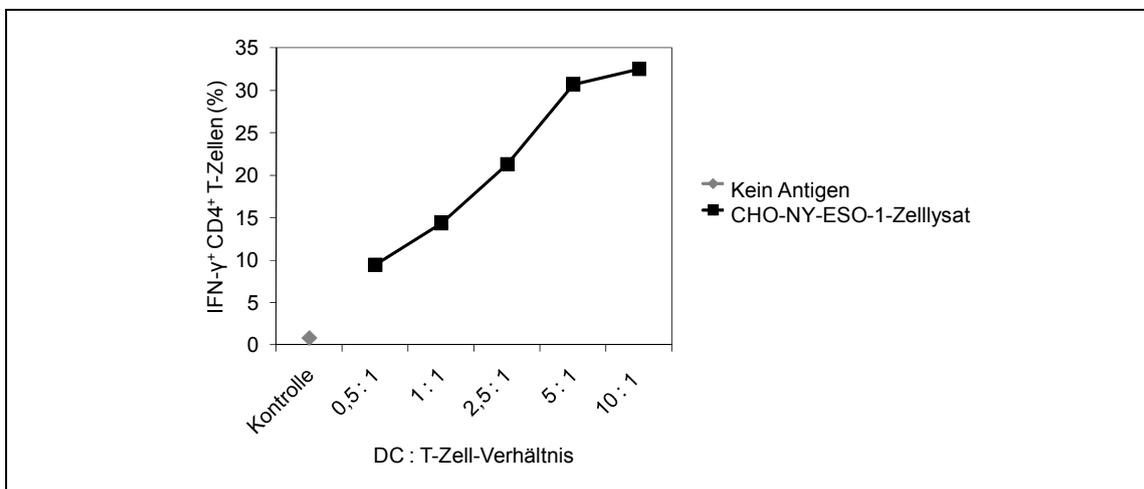


Abb. 19: Antigenpräsentation von CHO_{NY-ESO-1}-Lysate auf MHC-II-Molekülen: Optimierung des DC : T-Zell-Verhältnis

MoDC von HLA-DP₄⁺ Spendern wurden mit CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate inkubiert und mit einer HLA-DP₄-restringierten, NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zelllinie kokultiviert. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch den intrazellulären Nachweis von IFN-γ quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Eine Anzahl von 5×10^4 DC, dies entsprach einem Verhältnis von 5:1 DC zu $CD4^+$ T-Zellen, erwies sich als optimal um bei den Versuchen zur Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen eine nahezu maximale IFN- γ -Antwort der $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren (siehe Abb. 19).

3.5.2 Präsentation von MHC-II-restringiertem Peptid

Parallel zu den Experimenten der MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein wurden MoDC mit allen verwendeten Konzentrationen von PGE_2 , 11-deoxy-Prostaglandin E_1 und Sulprostone inkubiert und mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid beladen, um zu prüfen, ob die Präsentation von exogenem Peptid erhalten bleibt. Zunächst wurde die optimale Peptidkonzentration für die weiteren Versuche ermittelt.

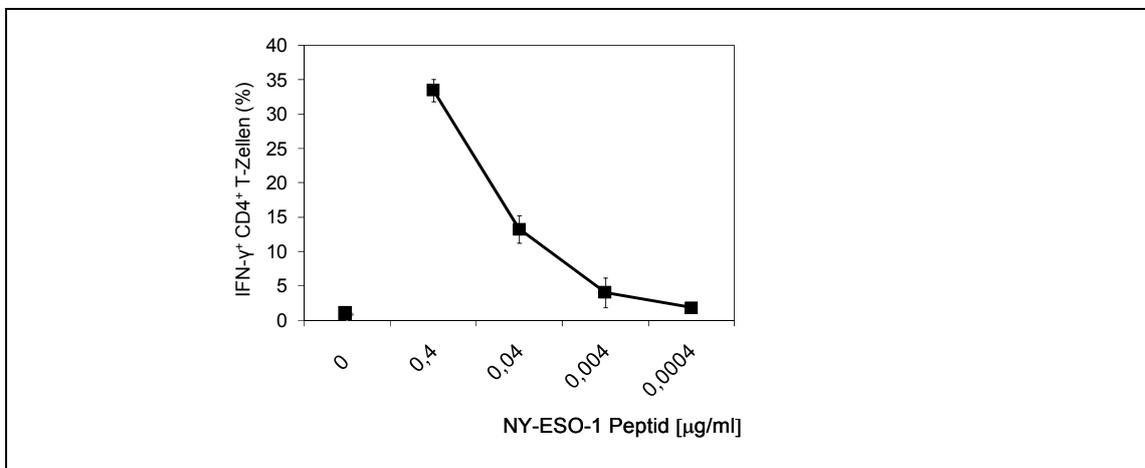


Abb. 20: Titration von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid

MoDC wurden mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid beladen und mit NY-ESO-1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen kokultiviert. Die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch den intrazellulären Nachweis von IFN- γ bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (+SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Bei einer Beladung mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Peptid waren die MoDC in der Lage eine IFN- γ -Antwort der $CD4^+$ T-Zellen von 33,5 % zu induzieren (siehe Abb. 20). Schon bei einer Peptidkonzentration von 0,04 μg fiel die IFN- γ -Antwort der $CD4^+$ T-Zellen auf einen Mittelwert von 13,3 % ab. Für die weiteren Versuche wurde eine Peptidkonzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, um eine optimale IFN- γ -Antwort der $CD4^+$ T-Zellen zu gewährleisten.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die Peptidpräsentationsfähigkeit bei kryopräservierten und frisch generierten MoDC nach Inkubation mit PGE_2 bzw. den EP-Rezeptoragonisten beeinflusst wurde. PGE_2 und die spezifischen EP-Rezeptoragonisten wurden entweder 24 h vor der Peptidinkubation (Präinkubation) oder zur selben Zeit (simultane Inkubation) zu den MoDC hinzugefügt (siehe Abb. 21).

Weder durch die Prä-, noch durch die Simultaninkubation mit PGE₂ bzw. mit den EP-Rezeptoragonisten wurde die Peptidpräsentationsfähigkeit der frisch generierten oder der kryopräservierten MoDC signifikant gehemmt. Es zeigte sich, dass die frisch generierten MoDC über eine bessere Peptidpräsentationsfähigkeit verfügen als die kryopräservierten MoDC.

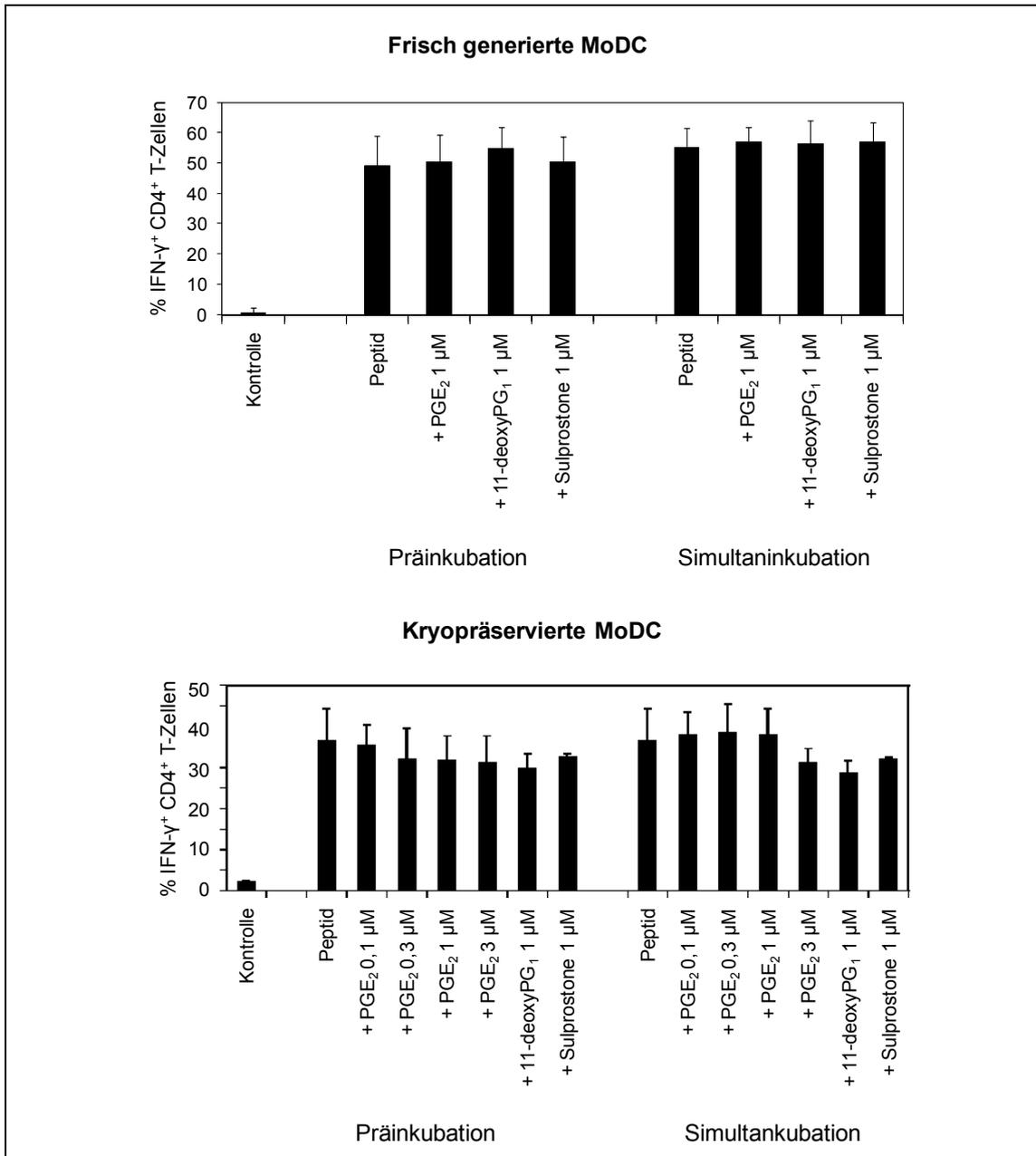


Abb. 21: MHC-II-restringierte Peptidpräsentation nach Inkubation mit Prostaglandin E₂ bzw. mit spezifischen EP-Rezeptoragonisten

MoDC von HLA-DP₄⁺ Spendern wurden mit den angegebenen Stimuli aktiviert, mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid beladen und mit NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch den intrazellulären Nachweis von IFN- γ bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (+SEM) von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

3.5.3 MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein und CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate durch frisch generierte dendritische Zellen

Präsentation von NY-ESO-1 Protein

Zunächst wurde durch Titration die optimale NY-ESO-1 Proteinkonzentration für die weiteren Experimente ermittelt. Diese Konzentration sollte hoch genug sein, um eine ausreichende MHC-II-Präsentation der MoDC zu induzieren, aber gleichzeitig niedrig genug, um eine eventuelle Inhibition durch PGE₂ bzw. durch die EP-Rezeptoragonisten erkennen zu können.

MoDC wurden in Kulturmedium (GM-CSF + IL-4) oder nach Präinkubation mit 1 µM PGE₂ mit NY-ESO-1 Protein beladen. Danach wurden die MoDC mit antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert und der Anteil der IFN-γ-produzierenden CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen (siehe Abb. 22).

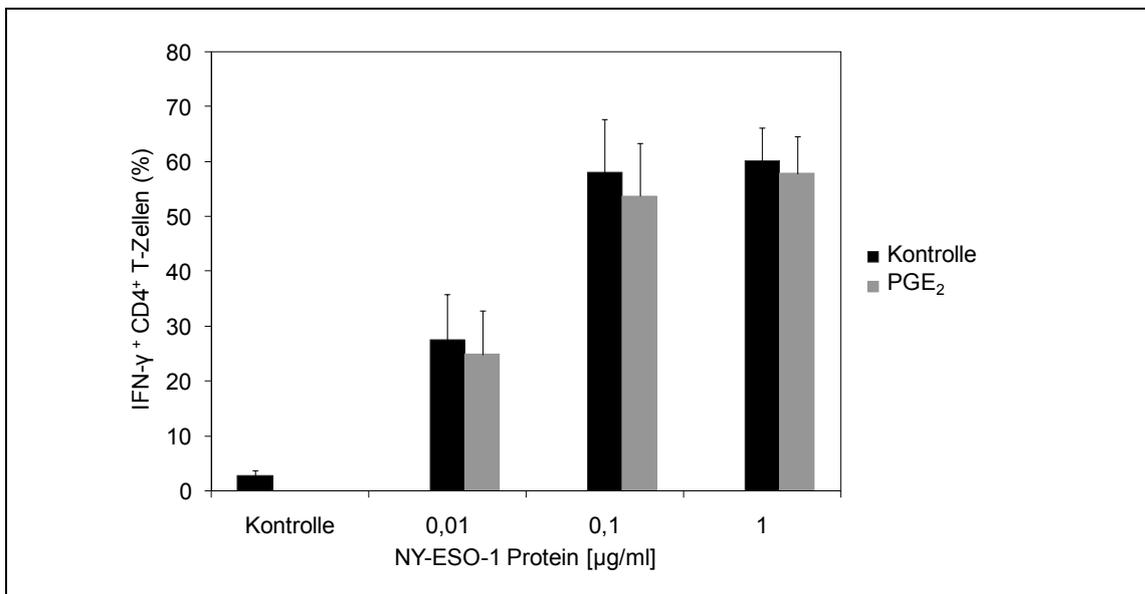


Abb. 22: MHC-II-Präsentation von rekombinantem NY-ESO-1 Protein durch MoDC

Gezeigt sind die Mittelwerte (+SEM) von vier unabhängigen Versuchen.

Für die weiteren Experimente wurde eine Proteinkonzentration von 0,1 µg/ml gewählt, da bei dieser Konzentration, ähnlich wie bei 1 µg/ml, eine gute IFN-γ-Antwort der CD4⁺ T-Zellen induziert werden konnte (siehe Abb. 22).

Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurden die MoDC mit NY-ESO-1 Protein beladen. Sie wurden entweder 24 h vor (Präinkubation) oder gleichzeitig (Simultaninkubation) zur Proteinbeladung mit PGE₂ oder mit den EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ bzw. Sulprostone inkubiert. Nach der Kokultur mit

spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen gemessen (siehe Abb. 23).

Es zeigt sich, dass PGE₂ und die spezifischen EP-Rezeptoren keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit der frisch generierten MoDC zur MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein haben (siehe Abb. 23).

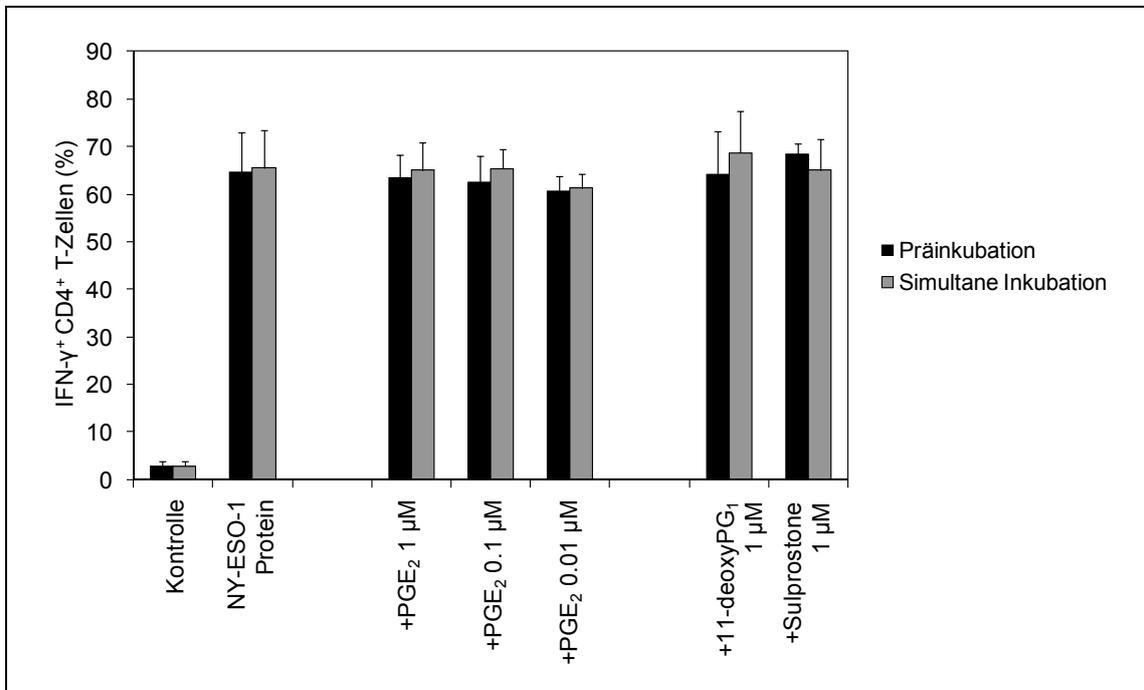


Abb. 23: MHC-II-Präsentation von rekombinantem NY-ESO-1 Protein durch frisch generierte DC nach Inkubation mit Prostaglandin E₂ bzw. spezifischen EP-Rezeptoragonisten

Gezeigt sind die Mittelwerte (+SEM) aus vier unabhängigen Experimenten.

Präsentation von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat

Zunächst wurde durch Titration die optimale Konzentration von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat für die weiteren Versuche zur MHC-II-Präsentation ermittelt. Als Kontrolle diente CHO-Lysat von Zellen, die nicht mit NY-ESO-1 Protein transfiziert wurden. Des Weiteren wurde untersucht, ob CHO_{NY-ESO-1}-Lysat, als Immunkomplex mit einem Antikörper gegen NY-ESO-1 (ES 121AB) gebunden, zu einer optimierten IFN- γ -Antwort führen würde (siehe Abb. 24). MoDC wurden mit CHO_{NY-ESO-1}-Lysat beladen. Nach der Kokultur mit spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde der Anteil der IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

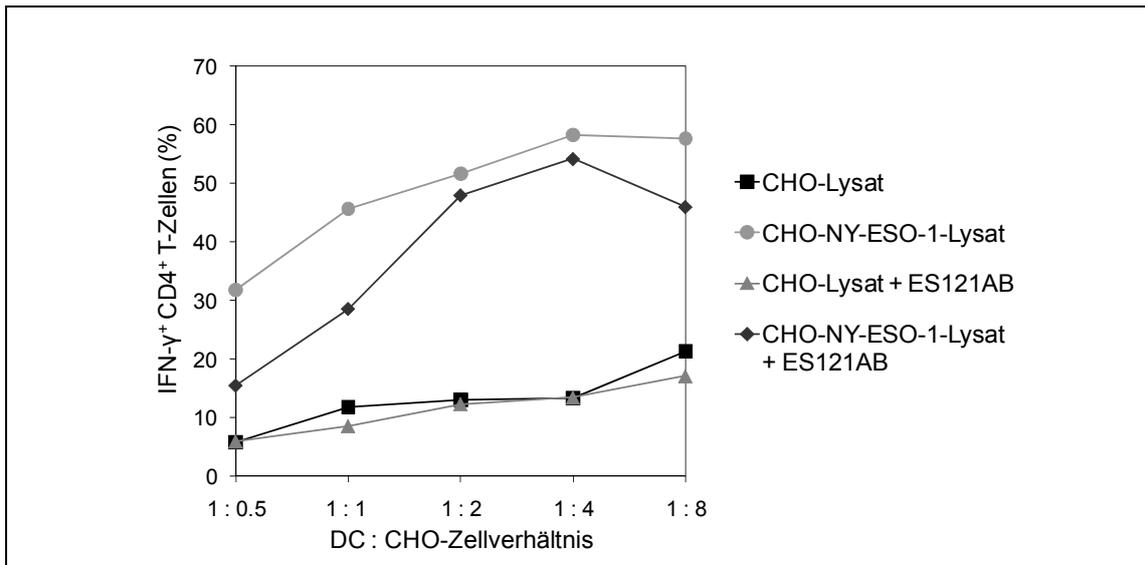


Abb. 24: MHC-II Präsentation von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat

MoDC wurden mit Zelllysate der CHO_{NY-ESO-1}-Zelllinie in An- bzw. Abwesenheit des mAk ES121 inkubiert und mit NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Quantifizierung der CD4⁺ T-Zellaktivierung erfolgte durch den intrazellulären Nachweis von IFN- γ mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Für die weiteren Versuche zur MHC-II-Präsentation entschieden wir uns für ein Verhältnis von DC zu CHO-Zelllysate von 1:2, dies entsprach 4×10^3 CHO-Zellen im CHO_{NY-ESO-1}-Lysate pro Versuchsbedingung. Diese Konzentration war die niedrigste, die noch eine nahezu maximale IFN- γ -Antwort der CD4⁺ T-Zellen induzierte. Die Kombination des CHO_{NY-ESO-1}-Lysates mit dem Antikörper ES 121AB als Immunkomplex ergab keine verstärkte IFN- γ -Antwort der CD4⁺ T-Zellen.

Frisch generierte MoDC wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen PGE₂ bzw. mit den EP-Rezeptoragonisten inkubiert, danach wurden sie mit 4×10^3 CHO-Zellen im CHO_{NY-ESO-1}-Lysate beladen. Nach der Kokultur mit den antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde der Anteil IFN- γ ⁺-produzierender CD4⁺ T-Zellen gemessen. CHO-Lysate ohne Transfizierung mit NY-ESO-1 stellte die Negativkontrolle dar.

PGE₂ bzw. die spezifischen EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ und Sulprostone hemmen nicht die Fähigkeit frischer MoDC zur MHC-II-Präsentation von CHO_{NY-ESO-1}-Lysate (siehe Abb. 25).

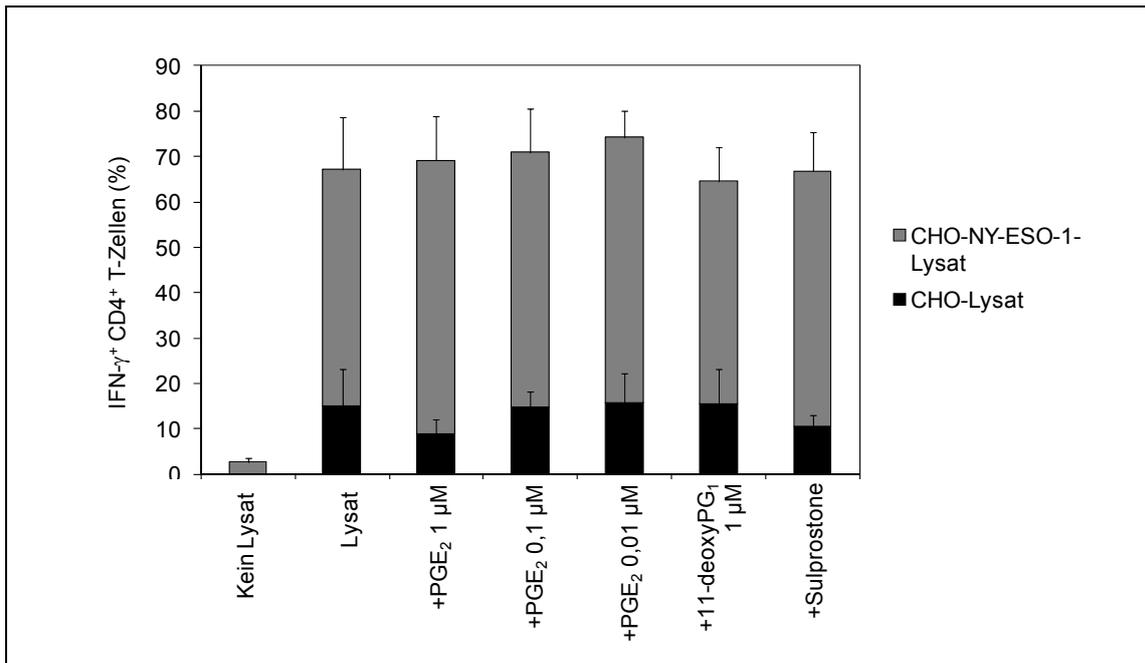


Abb. 25: Einfluss von Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten auf die MHC-II-Präsentation von CHO_{NY-ESO-1}-Lysat

MoDC wurden mit den angegebenen Stimuli aktiviert, mit CHO-Lysat bzw. CHO_{NY-ESO-1}-Lysat inkubiert und mit NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Quantifizierung der CD4⁺ T-Zellaktivierung erfolgte durch den intrazellulären Nachweis von IFN-γ mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den korrespondierenden SEM von fünf unabhängigen Experimenten.

3.5.4 MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein durch kryopräservierte dendritische Zellen

Die kryopräservierten DC wurden zügig in frischem Medium aufgetaut und vor Versuchsbeginn einige Stunden im Kulturmedium inkubiert, um eine möglichst hohe Vitalität der Zellen zu erhalten und die Möglichkeit zur Regeneration zu gewähren. Die kryopräservierten MoDC wurden analog zu den Versuchsbedingungen beschrieben in Abschnitt 3.5.3 entweder 24 h vor (Präinkubation) oder parallel (Simultaninkubation) zur Beladung mit 0,1 µg/ml NY-ESO-1 Protein mit verschiedenen Konzentrationen an PGE₂ oder EP-Rezeptoragonisten inkubiert.

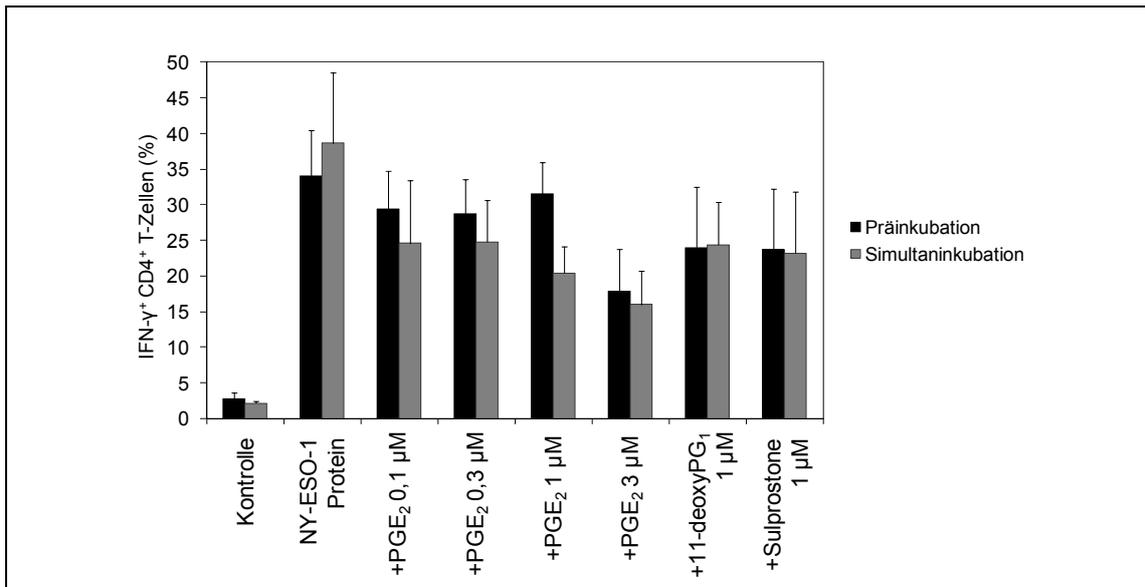


Abb. 26: MHC-II-Präsentation von NY-ESO-1 Protein durch kryopräservierte DC nach Inkubation mit Prostaglandin E₂ und EP-Rezeptoragonisten

MoDC wurden mit den angegebenen Stimuli aktiviert, mit 0,1 μg/ml NY-ESO-1 Protein inkubiert und mit einer NY-ESO-1-spezifischen CD4 T-Zelllinie kokultiviert. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch den intrazellulären Nachweis von IFN-γ quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte (+SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Bei den kryopräservierten MoDC zeigte sich ein Trend zur Hemmung der MHC-II-Präsentationsfähigkeit durch PGE₂ (siehe Abb. 26). Diese Inhibierung stellte sich jedoch weder für die Prä- noch für die simultane Inkubation mit den verschiedenen PGE₂-Konzentrationen als statistisch signifikant heraus.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Prostaglandin E_2 wird zur Aktivierung von MoDC in Kombination mit Zytokinen als Reifestimulus in klinischen DC-basierten Tumorstudien verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von PGE_2 und spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf die Antigenpräsentationsfähigkeit von MoDC untersucht. Hierzu wurde der Einfluss von PGE_2 auf die einzelnen funktionellen Aspekte, wie Zell-Reifung, Antigenaufnahme, MHC-I- und MHC-II-Antigenpräsentationsfähigkeit analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass PGE_2 einen inhibierenden Einfluss auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC hat, der über EP2-/EP4-Rezeptoren vermittelt wird. Die Fähigkeit zur Präsentation auf MHC-II-Molekülen wird hingegen nicht beeinflusst.

Zuerst wurde die Wirkung von PGE_2 , dem EP1/EP3-Rezeptoragonist Sulprostone und dem EP2/4-Rezeptoragonist 11-deoxy-Prostaglandin E_1 auf die Ausreifung von MoDC untersucht. Die MoDC regulierten nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Inkubation sowohl mit PGE_2 , als auch mit dem EP2/4-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E_1 die Oberflächen- und Aktivierungsmarker HLA-ABC, HLA-DR, CD83 und CD86 signifikant hoch. Der EP1/3-Rezeptoragonist Sulprostone war diesbezüglich wirkungslos.

Als nächstes wurde der Einfluss von PGE_2 auf die Antigenaufnahmefähigkeit der MoDC untersucht. Es wurde die Phagozytosefähigkeit anhand von Zelllysat bzw. apoptotischen Tumorzellen sowie die Makropinozytosefähigkeit anhand von Dextran Partikeln analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass weder PGE_2 noch die spezifischen EP-Rezeptoragonisten einen signifikanten Einfluss auf die verschiedenen Formen der Antigenaufnahme haben.

Die Auswirkung von PGE_2 auf die Peptid- bzw. Kreuzpräsentationsfähigkeit auf MHC-I-Molekülen der MoDC wurde mit dem HLA-A₂-restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid, einer Formulierung aus NY-ESO-1 Protein mit ISCOMATRIX[®] adjuvant (NY-ESO-1/IMX) und einem Immunkomplex, bestehend aus NY-ESO-1 Protein und dem Antikörper anti-NY-ESO-1 mAk (Klon ES 121AB; NY-ESO-1/IC) anhand der Aktivierung von CTL untersucht. Die Peptidpräsentation blieb durch PGE_2 unbeeinflusst. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Inkubation mit PGE_2 dosisabhängig die Kreuzpräsentationsfähigkeit von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX durch die MoDC signifikant inhibiert. Ähnlich wie bei der MoDC-Ausreifung ist dieser Effekt, zumindest partiell, über EP2/4-Rezeptoren vermittelt. Des Weiteren konnte

gezeigt werden, dass die Inkubation mit einer von vielen Arbeitsgruppen verwendeten Zytokinkombination, bestehend aus PGE₂, TNF- α , IL-1 β und IL-6 ebenfalls die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC und NY-ESO-1/IMX hemmt.

Die MHC-II-Präsentationsfähigkeit der MoDC wurde für NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid, rekombinantes NY-ESO-1 Protein, sowie Zelllysate als Antigenquellen untersucht. PGE₂ bzw. EP-Rezeptoragonisten wurden zu den MoDC entweder 24 h vor (Präinkubation) oder zur gleichen Zeit (Simultaninkubation) wie das Antigen hinzugefügt. Es konnte keine Inhibition der Aktivierung von tumorantigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. PGE₂ hat keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen durch MoDC.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Isolierung und Kultur Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

DC können direkt aus Blut und Geweben isoliert oder aus einer Vielzahl von verschiedenen Vorläuferzellen und Subtypen generiert werden (siehe Abschnitt 1.2.1). Aus mehreren Gründen wurde für die vorliegende Arbeit die Gewinnung von DC aus einer Kultur von Monozyten gewählt. Zum einen können MoDC relativ einfach aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes innerhalb von 5-7 Tagen in großer Zahl generiert werden. Zum anderen sind sie eine sehr gut charakterisierte Population von DC. Ein weiteres Argument für die Verwendung von MoDC ist ihr häufiger Einsatz in klinischen DC-Studien. Die ersten dieser Studien (Nestle et al. 1998; Thurner et al. 1999; Murphy et al. 1999) zeigten bei Patienten mit Malignomen ein immunologisches und teilweise auch klinisches Ansprechen auf eine Vakzinierung mit MoDC (zusammengefasst in Steinman und Dhodapkar 2001).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren zur Generierung und Kultur von MoDC ist gut etabliert und entspricht im Wesentlichen den bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Kulturprotokollen (Romani et al. 1994; Bender et al. 1996; Thurner et al. 1999). Für die Isolation der CD14⁺ Zellen wurde das magnetische Verfahren mit dem MACS CD14 *Isolation Kit* benutzt, da hierdurch eine Reinheit der CD14⁺ Zellen von über 96 %, im Gegensatz zu ca. 60-80 % beim Adhärenzverfahren, erzielt werden kann (Miltenyi et al. 1990).

Ein Kritikpunkt im Zusammenhang mit der Auswahl von MoDC ist, dass nicht abschließend geklärt ist, ob die *in vitro* durch GM-CSF und IL-4 aus Monozyten generierten MoDC funktionell DC *in vivo* entsprechen. *In vivo* wurde die Differenzierung von DC unter inflammatorischen Bedingungen aus CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ Monozyten beschrieben (Shortman und Naik 2007). MoDC-Äquivalente werden nicht in

nicht-entzündeten humanen Lymphknoten gefunden (Granelli-Piperno et al. 2005). Dies unterstützt die Aussage, dass sie eher ein transientes Produkt eines inflammatorischen Vorgangs darstellen. Ein anderes Modell postuliert, dass sich Monozyten *in vivo* nach transendothelialer Migration zu DC differenzieren, während sich Monozyten, die in die subendotheliale Matrix einwandern, zu Makrophagen entwickeln (Randolph et al. 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MoDC zeigten die von anderen Autoren beschriebenen charakteristischen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften. Die MoDC wiesen die typische sternförmige Zellmorphologie mit multiplen Zytoplasmaausläufern auf, exprimierten Adhäsionsmoleküle (CD11c, CD54, CD58), kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) und antigenpräsentierende Moleküle (MHC-I und MHC-II). Sie zeigten eine hohe endozytotische Aktivität und die Kapazität allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Daten nicht gezeigt). Somit sind die Daten auf MoDC anderer Arbeitsgruppen übertragbar.

4.2.2 Aktivierung dendritischer Zellen mit Prostaglandin E₂

In dieser Arbeit wurden die MoDC mit PGE₂ oder alternativ mit den spezifischen EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E1 (EP2/EP4) bzw. Sulprostone (EP1/EP3) aktiviert. Die jeweiligen Konzentrationen entsprachen denen aus der Fachliteratur (Scandella et al. 2002; Luft et al. 2002). Die Ausreifung der MoDC wurde anhand der Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde die quantitative Expression der MHC-I- und MHC-II-Moleküle, des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Reifemarkers CD83 analysiert. Als positive Kontrolle der vollständigen Aktivierung wurde als Stimulus CD40L verwendet, welches eine potente Ausreifung der DC induziert (Brossart et al. 1998).

4.2.3 Antigenaufnahme dendritischer Zellen

Da apoptotische Tumorzellen mit vielen bekannten und unbekanntem Tumorantigenen eine interessante Antigenquelle für Tumorstimmungen darstellen und DC apoptotische Zellen bzw. deren Bestandteile phagozytieren, wurden unter anderem apoptotische SK-Mel 37-Melanomzellen für die Versuche zur Antigenaufnahme verwendet. Verschiedene Möglichkeiten der Apoptoseinduktion von Tumorzellen wurden *in vitro* beschrieben: Virusinfektion (Influenza, EBV, HIV-1), Röntgenbestrahlung (Russo et al. 1999), γ -Bestrahlung (Shaif-Muthana et al. 2000), UV-Bestrahlung (Albert et al. 1998), Serum-Deprivation (Berard et al. 2000) und Hyperthermie (Guermontez et al. 2002). In Vorversuchen wurden die Wirkungen von

verschiedenen Dosierungen einer γ -Bestrahlung und Hyperthermiebehandlung auf die Apoptoseinduktion ermittelt. Die Hyperthermiebehandlung bei 43°C für zwei Stunden erwies sich dabei als die effektivste Methode zur Apoptoseinduktion bei den verwendeten SK-Mel 37-Zellen.

Die Phagozytose apoptotischer SK-Mel 37-Zellen und von CHO_{NY-ESO-1}-Zelllysate durch MoDC wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die SK-Mel 37-Zellen mit CFSE markiert (Lyons und Parish 1994). Die MoDC wurden mit Antikörpern gegen den Panleukozytenmarker CD45 gefärbt, der nicht von den Tumorzellen exprimiert wird. Die Zellen, die positiv für CFSE und CD45 waren, entsprachen somit den DC, die Tumorzellen phagozytiert hatten. Die Bestimmung doppelt positiver Zellen ist eine etablierte Methode, um die Phagozytosefähigkeit von DC zu ermitteln (Shaif-Muthana et al. 2000; Russo et al. 1999; Albert et al. 1998).

Zur Untersuchung der Makropinozytosefähigkeit der MoDC wurden FITC-Dextran-Partikel verwendet (Sallusto et al. 1995). Die Makropinozytoserate der DC wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt.

4.2.4 Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen

Chow und Mitarbeiter haben mit *real time microscopy* gezeigt, dass MoDC bereits nach 30 Minuten in der Lage sind, Antigen aufzunehmen und an MHC-II-Moleküle gebunden an der Zelloberfläche zu präsentieren (Chow et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die MoDC für 4 h mit NY-ESO-1 Protein, CHO_{NY-ESO-1}-Lysat bzw. NY-ESO-1/IMX inkubiert. Dieser Zeitraum stellte sich als optimal dar, in dem MoDC Antigene vollständig aufnehmen, prozessieren, an MHC-II-Moleküle binden und sie daraufhin an der Zelloberfläche den spezifischen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen präsentieren.

Nach Antigenerkennung vermittelt durch Interaktion des MHC-II/Peptid-Komplexes mit den spezifischen T-Zellrezeptoren werden spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktiviert und produzieren IFN- γ . Der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach MHC-II-Präsentation wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der intrazellulären Zytokinfärbung (ICS) gemessen. Mithilfe der Durchflusszytometrie können IFN- γ -produzierende T-Zellen quantitativ bestimmt werden und durch Verwendung von Antikörperkombinationen den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen direkt zugeordnet werden (Welsh 2001). Die intrazelluläre Zytokinmessung ist eine etablierte Methode (Romero et al. 2004).

Die IFN- γ -Produktion der aktivierten CD8⁺ T-Zellen wurde bei den Versuchen zur Kreuzpräsentation zudem mit der ELISPOT-Färbetechnik und ELISA quantitativ

ausgewertet (Larsson et al. 1999). Bei der Zytokinmessung mittels ELISA wird die Zytokinproduktion quantitativ im zellfreien Überstand gemessen. ELISPOT und intrazelluläre Zytokin Färbung (ICS) folgen einem ähnlichen Prinzip, beide Methoden messen die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen nach Antigenpräsentation anhand der Zytokinproduktion von einzelnen Zellen. Jedoch bestehen einige entscheidende Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden. Durch die ICS wird intrazelluläres Zytokin gemessen, wohingegen bei der ELISPOT-Färbetechnik Zytokin gemessen wird, das von der Zelle freigesetzt wurde. Beim ICS werden die T-Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt fixiert und das intrazelluläre Zytokin gemessen. Beim ELISPOT wird das Zytokin während der gesamten Inkubationszeit kontinuierlich am Kulturschalenboden gebunden und am Ende der Inkubation anhand der charakteristischen *spots* gemessen. Im Gegensatz zum ICS können die Zellen nach Auswertung durch einen ELISPOT für weitere Versuche verwendet werden. ELISPOT ist aufgrund der höheren Sensibilität besser geeignet, wenn antigenspezifische T-Zellen in einer geringen Frequenz vorkommen.

4.3 Ergebnisinterpretation im Abgleich mit der Literatur

4.3.1 Aktivierung dendritischer Zellen

Die Aktivierung der antigenpräsentierenden DC ist für die Induktion einer produktiven Immunantwort erforderlich (Banchereau et al. 2000). Eine Vielzahl von Stimuli, wie der TLR4-Ligand LPS, das Zytokin TNF- α , das Oberflächenmolekül CD40L und weitere sind für die Ausreifung von DC bekannt. Mehrere Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass PGE₂ die Reifung von MoDC synergistisch mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6 unterstützt (Kalinski et al. 1998; Rieser et al. 1997). Für klinische Studien wurden bisher TNF- α (Kugler et al. 2000), die Kombination aus TNF- α und PGE₂ (Hörtl et al. 1999) und die Kombination aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ (Jonuleit et al. 1997) verwendet, um eine Reifung der MoDC zu induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ auch ohne weitere proinflammatorische Zytokine über eine Aktivierungspotenz verfügt, so dass nach 48-stündiger Inkubation die untersuchten Aktivierungsmarker signifikant hochreguliert wurden. Im Vergleich zu CD40L, war der Effekt jedoch nur mäßig stark ausgeprägt. Durch den EP2/4-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ zeigte sich eine qualitativ und quantitativ ähnliche Reifung der MoDC wie für PGE₂. Da PGE₂ seine Wirkungen auf zellulärer Ebene über spezifische EP1-4 Rezeptoren vermittelt (Coleman et al. 1990), kann daraus geschlossen werden, dass PGE₂ seine stimulatorische Reifungswirkung über EP2/EP4-Rezeptoren vermittelt. Diese Resultate stimmen mit Ergebnissen

anderer Gruppen überein, die gezeigt haben, dass PGE₂ die von ihnen untersuchten Funktionen, wie IL-12- und IL-10-Produktion und Migration der DC über einen EP2/EP4-abhängigen Mechanismus beeinflusst (Harizi et al. 2003; Legler et al. 2006; Luft et al. 2002; Scandella et al. 2002).

4.3.2 Antigenaufnahme dendritischer Zellen

DC nehmen über verschiedene Mechanismen, wie Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose, Makro- und Mikropinozytose Antigen in endosomale Kompartimente auf. Die Fähigkeit der DC Antigen effizient aufzunehmen ist entscheidend für die Aktivierung spezifischer CD4⁺ T-Zellen und CTL (Lanzavecchia 1990). Die Antigenaufnahme-fähigkeit von DC kann durch verschiedene Faktoren gehemmt werden. Es ist bekannt, dass Stimuli, wie TNF- α , LPS, IL-1 β , CD40L sowie EDTA, die über den Mannose Rezeptor vermittelte Endozytose der DC hemmen (Sallusto et al. 1995). Die Makropinozytose der DC wird unter anderem durch Cytochalasin D (Racoosin und Swanson 1989) und Amilorid (Hewlett et al. 1994) gehemmt. Rieser und Mitarbeiter zeigten, dass PGE₂ in Kombination mit TNF- α die Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose von DC hemmt (Rieser et al. 1997).

In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass durch Inkubation der MoDC mit PGE₂ alleine bzw. mit den spezifischen EP-Rezeptoragonisten weder die Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen bzw. Zelllysate noch die Makropinozytose von FITC-Dextran 40 kDa Partikeln beeinflusst wurde.

4.3.3 Auswahl der Antigene und der Antigenformulierungen

Ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung einer DC-basierten Tumorstoffimpfung ist die Wahl des Antigens. DC können mit unterschiedlichen undefinierten oder definierten Tumorantigenen durch verschiedene Methoden beladen werden. Das ideale Tumorantigen sollte ein großes Repertoire an antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit einer hohen Affinität zum jeweiligen Tumorantigen, das von den Tumor- oder umliegenden Stromazellen präsentiert wird, induzieren. Die am häufigsten verwendeten Antigenpräparationen sind Peptide, Tumorzelllysate, apoptotische Zellen, Proteine und transfizierte RNA bzw. DNA (Figdor et al. 2004).

Peptid-basierte Vakzine arbeiten mit Antigensequenzen, die vorher als die minimalen CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zell-Epitope identifiziert wurden. T-Zell-Antworten auf solche Peptid-basierten Vakzine sind auf die ausgewählten Peptide beschränkt und auf die Patienten limitiert, die den jeweils zum Patienten passenden HLA-Genotyp besitzen.

In den beschriebenen Versuchen zur Antigenpräsentation wurde das NY-ESO-1 Protein als Antigen verwendet. Dieses *cancer-testis antigen* wurde von einer Gruppe am LICR entdeckt und ist ein vielversprechendes Antigen (Chen et al. 1997), das auf vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 1.3). Die Immunogenität und die auf Tumorgewebe beschränkte Expression hat NY-ESO-1 zu einem wichtigen Kandidaten für die Entwicklung einer Tumorstoffimpfung gemacht. NY-ESO-1 wurde als rekombinantes Protein in mehreren, auch klinischen, Studien verwendet (Nagata et al. 2002; Davis et al. 2004). Der große Vorteil bei der Nutzung von Protein-Antigen für eine Vakzine ist die Möglichkeit multiple MHC-I- und MHC-II-restringierte T-Zell-Antworten zu generieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Versuchen zur MHC-II-Präsentation neben rekombinantem NY-ESO-1 Protein auch Zelllysate von NY-ESO-1-transfizierten CHO-Zellen als Antigenquelle verwendet. Die Verwendung von Tumorzelllysate ist im Hinblick auf die Induktion einer Antitumor-Immunität attraktiv, weil im Lysat das gesamte antigene Spektrum der Tumorzellen enthalten ist (Fiels et al. 1998; Nestle et al. 1998). Die Tumorzelllysate haben allerdings sowohl *in vivo* als auch *in vitro* den Nachteil, dass durch den Mangel an definierten Antigen-Epitopen eine exakte quantitative Bestimmung der antigenspezifischen T-Zellen erschwert ist (Timmermann und Levy 1999). Damit die Induktion antigenspezifischer T-Zellen durch Tumorzelllysate-beladene DC trotzdem beurteilt werden kann, können Indikatoren für die T-Zell-Aktivierung, wie die Induktion einer Tumorzelllysate-induzierten T-Zell-Proliferation, die Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern und das Zytokin-Profil in den Kokulturen mit Tumorzellen oder DC, untersucht werden. Im Vergleich zur Beladung von DC mit einem einzelnen Peptidantigen führt die Lysatebeladung zu einer deutlich niedrigeren T-Zell-Proliferationsrate (Peiper et al. 1997). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass es, aufgrund der großen Zahl von antigenen Epitopen im Tumorzelllysate und der dadurch bedingten geringeren Präsentationsdichte der einzelnen Epitope auf den DC, zu einem geringeren Proliferationsstimulus für die jeweiligen T-Zell-Klone kommt (Constant et al. 1997). Andererseits können Tumorzelllysate immunsuppressive Moleküle, wie z.B. TGF- β oder Galectin-1 enthalten, was sich auf die Antigenpräsentation negativ auswirken kann.

Wie bereits beschrieben, bietet eine Protein-basierte Vakzine die Möglichkeit eine Immunantwort gegen ein weitaus größeres Spektrum an MHC-I-Epitopen zu induzieren als eine Peptid-basierte Vakzine, jedoch ist die Kreuzpräsentation von löslichem Protein im Gegensatz zu präformiertem Peptid sehr ineffizient. Die Effizienz der Kreuzpräsentation kann gesteigert werden, indem das Antigen in einem Antigen-Antikörper Immunkomplex gebunden auf die Fc- γ Rezeptoren gerichtet wird

(Rodriguez et al. 1999; Regnault et al. 1999; Dhodapkar et al. 2002; Nagata et al. 2002). Eine alternative Möglichkeit besteht in der Formulierung des Antigens mit Adjuvanzen, wie dem ISCOMATRIX[®] adjuvant.

Für die Untersuchungen zur Kreuzpräsentation in der vorliegenden Arbeit wurde zum einen NY-ESO-1/IC, ein Immunkomplex bestehend aus rekombinantem NY-ESO-1 Protein und dem Antikörper anti-NY-ESO-1 mAk (Klon ES121), und zum anderen NY-ESO-1/ISCOMATRIX[®], die Formulierung aus dem rekombinanten NY-ESO-1 Protein und ISCOMATRIX[®] adjuvant, verwendet. 1984 beschrieben Morein und Mitarbeiter erstmals den immunstimulatorischen Komplex (ISCOM) als Methode der Antigenformulierung. Durch eine Vielzahl an Tier- und Humanstudien konnte die Sicherheit, Immunogenität und Wirksamkeit von ISCOM-basierten Vakzinen nachgewiesen werden (Sjölander et al. 2001; Frazer et al. 2004; Davis et al. 2004). Die Schlüsselqualifikation der ISCOM-basierten Vakzine ist die Induktion einer potenten humoralen (Polakos et al. 2001), sowie zellulären Immunantwort mit Aktivierung von Tumor- und Virus-spezifischen CTL (Rimmelzwaan et al. 2000; Ennis et al. 1999; Sjölander et al. 2001).

Der exakte Mechanismus, mit dem ISCOM-basierte Vakzine CTL induzieren, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Fähigkeit CTL zu induzieren impliziert jedoch bereits, dass Antigene, die in der ISCOM-basierten Vakzine formuliert sind, Zugang zu intrazellulären Prozessierungswegen erhalten, die für die Generierung von Peptidfragmenten und deren anschließende Beladung auf die MHC-I-Moleküle verantwortlich sind (Guan et al. 2002; Le et al. 2001). Schnurr und Mitarbeiter konnten zeigen, dass NY-ESO-1/IMX im Zytosol unabhängig vom Proteasom über die zytosolische Protease Tripeptidyl Peptidase II prozessiert wird (Schnurr et al. 2009).

ISCOMATRIX[®] adjuvant-basierte Vakzine haben eine Reihe von günstigen Eigenschaften für die Verwendung in der Tumormimmuntherapie. Dazu gehören (a) die Abwesenheit von potentiellen Sicherheitsrisiken, die mit lebenden viralen oder bakteriellen Vektorsystemen und DNA assoziiert sind; (b) die Möglichkeit zur wiederholten Nutzung aufgrund fehlender Induktion von neutralisierenden Antikörperantworten; (c) die Induktion von effektiven CD8⁺ T-Zell-Antworten und Antikörpern (Lenarczyk et al. 2004) und (d) die Ausnutzung des vollständigen Repertoires an MHC-I- und MHC-II-Epitopen, durch die Verwendung von Protein als Antigen (Marakovsky et al. 2004).

Schnurr und Mitarbeiter haben überdies gezeigt, dass die Formulierung eines Antigens mit IMX die Kreuzpräsentation erheblich verbessert und im Gegensatz zu Immunkomplexen, einen alternativen Prozessierungsweg in DC ansteuert (Schnurr et

al. 2005). Weiterhin bietet die Formulierung mit IMX den erheblichen Vorteil, dass die Antigenpräsentationszeit der MoDC verlängert wird. Dies ist bei der Vakzinierung von Tumorpatienten relevant, da die injizierten MoDC ein bis zwei Tage benötigen, um zu den Lymphknoten zu migrieren, wo sie T-Zellen die aufgenommenen Antigene präsentieren (De Vries et al. 2003; Morse et al. 1999).

Rekombinantes NY-ESO-1 Protein mit IMX formuliert ergibt eine potente Antitumor-Vakzine, die von DC *in vitro* gut aufgenommen wird und sowohl eine effektive humorale, als auch CD8⁺ CTL-Antwort in Tumormodellen bei Mäusen induziert (Marakovsky et al. 2004). Eine klinische Phase I Studie, die eine Vakzine mit NY-ESO-1 Protein formuliert mit IMX verwendete, zeigte bei Patienten mit NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren eine gute Verträglichkeit der Vakzine. Die Vakzine war in der Lage, in der Mehrzahl der Tumorpatienten humorale und zelluläre Immunantworten gegen multiple NY-ESO-1-Epitope hervorzurufen (Davis et al. 2004). Bei 100 % der Vakzine-Empfänger wurden Antikörper-Antworten registriert und in 69 % bzw. 38 % der Fälle CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten.

4.3.4 Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen durch dendritische Zellen

DC sind in der Lage eine Vielzahl endozytierte Antigene auf MHC-II-Molekülen zu präsentieren (Überblick in Villadangos 2001; Wilson und Villadangos 2005). Der Ablauf und die Mechanismen der MHC-II-Präsentation von DC wurden in den letzten Dekaden intensiv untersucht (siehe Abschnitt 1.2.3).

Es wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die die MHC-II-Präsentation regulieren. In dem MHC-II-Präsentationsweg kontrollieren lysosomale Proteasen der Kathepsin (Cat) Familie die Prozessierung von Antigen (Villadangos et al. 2000). Um prozessierte Peptide an die MHC-II-Moleküle zu binden, muss die Bindungsstelle des MHC-II $\alpha\beta$ Dimers von MHC-II-assoziiertem li Peptid (CLIP) durch die Proteasen befreit werden (Wolf und Ploegh 1995; Lotteau et al. 1990). Die Konversion von lip10 zu CLIP wird durch Cathepsin (Cat) S vermittelt (Shi et al. 1999; Nagawa et al. 1999). Dieser Schritt ist besonders entscheidend, da hierdurch die MHC-II-Moleküle von einem Retentionssignal, das von li kodiert ist, befreit werden. Dieses Retentionssignal verhindert, dass die MHC-II-lip10 Komplexe vom Endosom zur Zelloberfläche migrieren (Driessen et al. 1999). Die Protease Cat S kann durch Cystatin C inhibiert werden (Pierre und Mellman 1998). Cat B ist für den Abbau und die Degradation von Peptiden, Proteinen und Toxinen, die über Endo- oder Phagozytose in die Zelle eindringen, verantwortlich (Authier et al. 1996). IL-10 inhibiert die MHC-II-Präsentation der DC, indem es die Degradation der Antigene durch Cat B mindert und die Aktivität

von Cat S hemmt (Fiebiger et al. 2001). Des Weiteren ist bekannt, dass die MHC-II-Präsentationsfähigkeit der DC durch Anhebung des lysosomalen pH inhibiert werden kann (Trombetta et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchungen zur MHC-II-Präsentation frisch isolierte und kryopräservierte MoDC verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die MHC-II-Präsentationsfähigkeit der MoDC weder durch die Inkubation mit PGE₂ noch mit den spezifischen EP-Rezeptoragonisten 11-deoxy-Prostaglandin E₁ und Sulprostone signifikant gehemmt wurde. Dies traf sowohl für die Präinkubation als auch für die Simultaninkubation der MoDC mit PGE₂ zu.

Diese Ergebnisse sind konform mit der bisherigen Literatur. Eine Studie von Braun und Mitarbeitern stellte den Gebrauch von PGE₂ für die Ausreifung von DC in Vakzinierungsversuchen in Frage. Sie zeigten in ihrer Arbeit, dass durch die Ausreifung der DC mit PGE₂ in Kombination mit anderen Reifungsstimuli Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) stark hochreguliert wird (Braun et al. 2005). IDO ist ein intrazelluläres Enzym, das in DC und Makrophagen nachweisbar ist und Tryptophan abbaut. Wenn es von DC exprimiert wird, unterdrückt es die T-Zell-Proliferation, verkürzt das Überleben der T-Zellen und kann eine Toleranzentwicklung fördern (Mellor et al. 2004; Grohmann et al. 2003). Krause und Mitarbeiter konnten hingegen zeigen, dass unter klinisch relevanten Bedingungen die Verwendung von PGE₂ zur Ausreifung der DC zwar aktiv die Expression von IDO induziert, PGE₂ jedoch nicht elementar für die Induktion von IDO ist und dass durch IDO nicht die Fähigkeit der DC zur Stimulation der CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigt wird (Krause et al. 2007). Auch Rubio und Mitarbeiter zeigten, dass nach Ausreifung der DC mit PGE₂ die MHC-II-Präsentation von exogenem Protein durch die MoDC nicht gehemmt, sondern sogar eher verbessert wird (Rubio et al. 2005).

4.3.5 Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen durch dendritische Zellen

Die Kreuzpräsentation ermöglicht den DC exogenes Antigen auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Hierdurch stimulieren sie eine CD8⁺ T-Zell-Antwort und bewirken eine Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen zu antigenspezifischen CTL (Young und Steinman 1990), die in der Lage sind Tumorzellen zu eliminieren. Diese Fähigkeit ist ein wichtiger Faktor in der Strategie DC für eine Anti-Tumor-Vakzine bei Patienten zu benutzen. Es hat sich gezeigt, dass MoDC neben CD1c⁺ PBDC am besten in der Lage sind, formuliertes Protein auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren (Schnurr et al. 2005).

Antigene, die auf MHC I Molekülen präsentiert werden, werden über Endozytose aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass NY-ESO-1 formuliert als

Immunkomplex oder mit ISCOMATRIX effizient von MoDC aufgenommen wird (Schnurr et al. 2005; Nagata et al. 2002). Da die meisten CD8⁺ T Zell-Epitope im Zytosol generiert werden, wo die Degradierung der Antigene durch das Proteasom und weitere Proteasen stattfindet (Shastri et al. 2002), ist die Translokation der Antigene vom Endozytotischen Kompartiment ins Zytosol essentiell. Die Peptide, die durch die zytosolischen Proteasen generiert werden, werden dann über TAP in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an MHC-I-Moleküle gebunden an die Zelloberfläche transportiert werden. Schnurr und Mitarbeiter konnten zeigen, dass NY-ESO-1 formuliert als Immunkomplex über einen Proteasomen-abhängigen Weg prozessiert wird. NY-ESO-1/IMX hingegen, wird über einen Proteasomen unabhängigen Weg prozessiert und benötigt die zytosolische Protease Tripeptidyl Peptidase II (TPPII) zur Antigen Degradierung (Schnurr et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präsentation von MHC-I-restringiertem Peptid durch die MoDC zur Kontrolle der Versuchsbedingungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die MHC-I Präsentationsfähigkeit von NY-ESO-1 Peptid durch die MoDC nicht beeinflusst. Die MHC-I-Präsentation sowohl von NY-ESO-1/IC, als auch von NY-ESO-1/IMX hingegen wurde durch Inkubation mit PGE₂ signifikant inhibiert. Hierbei konnte eine dosisabhängige Wirkung gezeigt werden. Auch der EP2/4 Rezeptoragonist 11-deoxy Prostaglandin E1 bewirkte eine Inhibierung der Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC, wohingegen der EP1/3-Rezeptoragonist Sulprostone keine signifikante Wirkung diesbezüglich auf die MoDC aufwies. Wie schon in den Versuchen zur Ausreifung der MoDC ersichtlich, kann daraus geschlossen werden, dass PGE₂ auch die inhibierenden Effekte auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC zumindest teilweise durch den EP2/4 Rezeptor ausübt.

In den Experimenten zur Antigenaufnahme wurde gezeigt, dass PGE₂ den Schritt der Antigenaufnahme über Endozytose nicht negativ beeinflusst. Im Gegensatz zur Kreuzpräsentation wurde die MHC-II Präsentation von Protein und von Zelllysat durch PGE₂ nicht gehemmt. Da die Antigenaufnahme, die MHC-II-Präsentation von Protein und Lysat und die MHC I Präsentation von Peptid nicht durch PGE₂ beeinflusst wurden, beruht die Hemmung der Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC auf inhibitorischen Effekten von PGE₂, die direkt auf die spezifischen Mechanismen der Kreuzpräsentationswege der MoDC wirken. Da PGE₂ gleichermaßen sowohl die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC, als auch die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IMX hemmt, ist eine selektive Hemmung der spezifischen Mechanismen, wie die Inhibierung des Proteasoms, der Retranslokation vom Phagosomen-ER Kompartiment ins Zytosol, der Spaltung durch zytosolische Peptidasen und von TPPII,

eher unwahrscheinlich. In der Literatur finden sich keine Untersuchungen zum Einfluss von PGE₂ auf die genannten Schritte. Kovacsovics-Bankowski und Rock zeigten, dass die Kreuzpräsentation durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden kann (Kovacsovics-Bankowski und Rock 1995). Lactacystin, ein Proteasom Inhibitor hemmt die Kreuzpräsentation von NY ESO-1/IC, wohingegen die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IC unbeeinflusst bleibt. Umgekehrt inhibiert AAF CMK, ein Inhibitor von TPPI und TPPII, die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IMX ohne die Präsentation von NY-ESO-1/IC zu hemmen (Schnurr et al. 2005; Schnurr et al. 2009).

Somit bleiben mehrere mögliche Angriffspunkte von PGE₂ auf die verschiedenen Schritte der Kreuzpräsentation. Nach der Aufnahme des Antigens in das Phagosom über Phagozytose fusioniert das Phagosom mit dem ER. Dieser Schritt wird unter anderem durch das Rab5 Protein reguliert (Duclos et al. 2000). Es findet sich in der Literatur keine Untersuchungen im Bezug auf den Einfluss von PGE₂ auf diesen Schritt. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die spezifische Hemmung von TAP, der die Peptide vom Zytosol ins ER transportiert (York und Rock 1996). Schnurr und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ICP-47, ein virales Protein, das mit TAP interferiert, die Kreuzpräsentation sowohl von NY-ESO-1/IC, als auch von NY-ESO-1/IMX hemmt (Schnurr et al. 2009). Zu dem spezifischen Einfluss von PGE₂ auf TAP gibt es noch keine Untersuchungen in der Literatur. Das Beladen der MHC-I-Moleküle und die abschließende Präsentation auf der Zelloberfläche mit einem vermehrten *turn over* der MHC-I/Peptidkomplexe sind weitere, noch nicht untersuchte, mögliche Angriffspunkte für die Hemmung der Kreuzpräsentation durch PGE₂.

Für nachfolgende Studien bleiben die genauen Mechanismen der Inhibition der Kreuzpräsentation durch PGE₂ zu klären.

4.3.6 Verwendung von Prostaglandin E₂ in DC-basierten Tumorstudien

PGE₂ wird von vielen Gruppen in Kombination mit TNF- α , IL-1 β und IL-6 als Reifestimulus für DC in klinischen DC-basierten Tumorstudien verwendet (Turner et al. 1999; Jonuleit et al. 1997). Dieser Zytokin-Cocktail wurde auch als „Goldstandard“ der DC-Reifung bezeichnet. Von Steinbrink und Mitarbeiter haben beim Vergleich verschiedener Prostaglandine PGE₂ als potentestes Prostaglandin für eine vollständige Ausreifung der DC identifiziert (Steinbrink et al. 2000).

Die Polarisierung von T-Zellen in Richtung einer Th1- oder Th2-Antwort ist entscheidend für den Verlauf der Immunantwort (Mosmann und Sad 1996). Die DC erfüllen eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Th1- und Th2-Antworten (Liu et

al. 2001; siehe Abschnitt 1.2.2), die durch die verschiedenen Kulturbedingungen und Aktivierungssignale bestimmt zu werden scheinen (Tanaka et al. 2000). Die Auswirkungen von PGE₂ auf die Polarisierung der T-Zell-Antwort durch die DC wird kontrovers diskutiert. Kalinski und Mitarbeiter sowie Luft und Mitarbeiter zeigten, dass PGE₂ zu einer Verlagerung der CD4⁺ T-Zell-Antwort in Richtung einer Th2-gerichteten Immunantwort führt (Kalinski et al. 2001; Luft et al. 2002) und die Produktion von IL-10 induziert. IL-10 übt suppressive Effekte auf die zellvermittelte Immunantwort und auf die Th1-Antwort aus (Kalinski et al. 1997). Die Aktivierung von DC mit PGE₂ fördert nur die Freisetzung der IL-12p40 Untereinheit, während das für eine Th1-Polarisation benötigte bioaktive IL-12p70 nicht nachweisbar ist (Kalinski et al. 2001). PGE₂ inhibiert die Produktion von IFN- γ und IL-2 durch die Th1-Zellen (Hilkens et al. 1996). Im Gegensatz hierzu beschreiben Rubio und Mitarbeiter, dass mithilfe von PGE₂ gereifte MoDC eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen induzieren, die IFN- γ produzieren (Rubio et al. 2005).

Über die Effekte von PGE₂ auf die CD8⁺ T-Zellen ist weniger bekannt. Es wurde gezeigt, dass PGE₂ die CD8⁺ T-Zell-Proliferation hemmen kann und die IFN- γ -Produktion der CD8⁺ Zellen verringert (Hendricks et al. 2000; Ganapathy et al. 2000).

Luft und Scandella haben sich mit den Effekten von PGE₂ auf die Migration der DC beschäftigt. PGE₂ verfügt über die Fähigkeit, die migratorischen Eigenschaften der DC nach Kontakt mit einem Gefahrensignal zu steigern, so dass die Migration zu den Lymphknoten für die Antigenpräsentation an die T-Zellen initiiert wird (Scandella et al. 2002). Luft und Mitarbeiter haben gezeigt, dass MoDC, die in der Gegenwart von PGE₂, TNF- α und IL-1 β gereift sind, den Rezeptor CCR7 hochregulieren und effizient in Richtung der Lymphknoten-weisenden Chemokine CCL19 oder CCL21 wandern (Luft et al. 2002). PGE₂ stellte sich hier als entscheidender migrationsfördernder Faktor heraus.

Harizi und Mitarbeiter konnten demonstrieren, dass PGE₂ die MHC-II-Expression von DC inhibiert und ihre Fähigkeit zur T-Zell-Proliferation mindert (Harizi et al. 2001). Dieser inhibitorische Effekt von PGE₂ wird über eine Erhöhung von IL-10 vermittelt, die wiederum in einer niedrigen Konzentration von IL-12p70 und einer geminderten stimulatorischen Funktion der DC resultiert (Harizi et al. 2002).

PGE₂ verfügt, insbesondere in Kombination mit anderen Reifungsstimuli, über die wünschenswerten ausreifenden Effekte auf die MoDC und induziert ihre migratorischen Fähigkeiten, die es ihnen ermöglichen in die Lymphknoten zu gelangen, um dort auf die T-Zellen zu treffen. Des Weiteren inhibiert PGE₂ nicht die

Antigenaufnahme, wie in den Versuchen gezeigt wurde. Jedoch sind die inhibitorischen Effekte auf die Kreuzpräsentation limitierend für die Benutzung von PGE₂ zur Ausreifung von MoDC für eine Protein-basierte DC-Vakzinierung, da eine reduzierte Kreuzpräsentation einer Induktion der gewünschten CTL-Antwort entgegen steht. Zur Ausreifung von MoDC stehen viele andere Faktoren und Zytokine, wie TNF- α , CD40L und IL-6, zur Verfügung. Eine potentielle Alternative für die Induktion der Migrationsfähigkeit der DC ist das Adeninnukleotid ATP (Schnurr et al. 2003). Ein hemmender Einfluss von ATP auf die Kreuzpräsentation wurde nicht beobachtet (Schnurr, persönliche Mitteilung).

4.3.7 Mögliche Rolle von Prostaglandin E₂ auf die Tumorimmunantwort

Viele Tumore sind in der Lage eine Immuntoleranz zu fördern und eine effektive antitumorale Immunantwort zu verhindern (Ruiz et al. 1992). Hierfür sind verschiedene Mechanismen verantwortlich: Eine natürliche Selektion von Tumorzellvarianten, die Runterregulierung von HLA Klasse I Antigenen, der Verlust von Oberflächenantigenen, das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen und die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen und Chemokinen. Tumorzellen produzieren eine Vielfalt von Zytokinen und Chemokinen, die einen negativen Effekt auf die Reifung und Funktion von Immunzellen haben. Neben PGE₂ handelt es sich hierbei hauptsächlich um IL-10, TGF- β und VEGF. Die mangelnde Aktivierung des Immunsystems bei Tumorpatienten wird der Sekretion dieser immunsuppressiven Zytokine zugeschrieben. Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass die Expression von COX-2 und die Produktion von PGE₂ in diversen Tumoren erhöht sind (Kargman et al. 1995; Hwang et al. 1998; Ristimaki et al. 1997; Tucker et al. 1999; Shiota et al. 1999). PGE₂ fördert das Tumorzellüberleben indem es die Tumorzellapoptose durch Bcl-2-Expression inhibiert und eine Tumorzellprogression, durch Veränderung der Zellmorphologie und erhöhte Zellmotilität, fördert (Sheng et al. 1998). PGE₂ inhibiert die Produktion von IL-12p70 und erhöht die IL-10 Produktion der Makrophagen (Harizi et al. 2002). IL-10 besitzt die Fähigkeit die Aktivierung von Immunzellen auf verschiedenen Wegen zu hemmen, wie z. B. durch die Inhibierung der Differenzierung, Ausreifung und Funktion von DC und die Steigerung der Apoptose (Corinti et al. 2001; Ludewig et al. 1995). IL-10 hemmt die Antigenpräsentation, die IL-12p70 Produktion und die Induktion von Th1-Antworten *in vivo* (De Smedt et al. 1997). Des Weiteren schützt IL-10 die Tumorzellen vor CTL durch die Runterregulierung von HLA Klasse I und II und ICAM-1 (Yue et al. 1997). Zudem inhibiert PGE₂ die Funktion und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (He und Stuart 1999).

4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

In klinischen Phase I und Phase II Studien wurde die generelle Sicherheit und Durchführbarkeit einer Vakzinierung mit DC für die Immuntherapie von Malignomen nachgewiesen. Einige klinische Studien mit Tumorstoffen auf der Basis von MoDC zeigten ermutigende, wenn auch bei weitem noch nicht zufriedenstellende Ergebnisse (Nestle et al. 1998; Thurner et al. 1999; Pecher et al. 2002; Slingluff et al. 2003; Yamanaka et al. 2003).

Für eine effektive Tumorstoffe mit einer erfolgreichen Anti-Tumor-Antwort sind folgende Faktoren zu optimieren: DC-Typ, *ex vivo* Stimulierung und Manipulation der DC, Wahl des Antigens und Adjuvans, Injektionsort und Zeit und Dosierung der Vakzine. Die Wahl des Antigens beeinflusst die Spezifität der Immunantwort, wohingegen die Wahl des Adjuvans die Qualität und Stärke der Anti-Tumor-Antwort bestimmt (Nestle et al. 2005). Das *cancer-testis antigen* NY-ESO-1, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist ein vielversprechendes Tumorstoffe für eine Vakzin-basierte Immuntherapie von Malignomen (Marakovsky et al. 2004).

MoDC sind die am häufigsten verwendeten DC für klinische Vakzinierungsstudien. Sie werden durch die, auch häufig als „Goldstandard“ bezeichnete, Kombination aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ aktiviert (Figdor et al. 2004). Es ist bekannt, dass PGE₂ einen negativen Einfluss auf Th1-gerichtete Immunantworten hat. Der geringe Anteil an klinischen Antworten in momentanen Studien unterstützt die Bedenken (Nestle et al. 2005), dass neben weiteren Faktoren die Stimulierung der DC noch nicht optimal ist. In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine mögliche Ursache für die geringe Anti-Tumor Antwort gezeigt werden. PGE₂ besitzt eine inhibierende Wirkung auf die Kreuzpräsentation von Protein-Antigen und hemmt somit die Induktion einer tumorspezifischen CTL-Antwort, die für eine effektive Tumorbekämpfung notwendig ist. Ferner hemmt PGE₂ die Synthese von bioaktivem IL-12p70, das für eine Th1-gerichtete Immunantwort erforderlich ist. Die Benutzung von PGE₂ als Reifestimulus für MoDC in klinischen Studien muss somit nochmals kritisch überdacht werden. Insbesondere sollten alternative Wege der Aktivierung und der Migrationsinduktion untersucht werden. Eine Alternative für PGE₂ wäre z. B. das Adeninnukleotid ATP, das ebenfalls eine CCR7-gerichtete Migration der DC fördert, aber nach unseren Erkenntnissen nicht negativ die Kreuzpräsentation beeinflusst.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der Arbeit stehen die Auswirkungen des Prostanoids Prostaglandin E₂ (PGE₂) auf die Fähigkeit von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC) zur Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen. Die Kreuzpräsentation von exogenem Antigen auf MHC-I-Molekülen ist eine entscheidende Fähigkeit der dendritischen Zellen (DC), die es ihnen ermöglicht zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. PGE₂ wird in Aktivierungsprotokollen als „Goldstandard“ in Kombination mit Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, als Reifestimulus für DC in klinischen DC-basierten Tumorstudien verwendet. Bisher wurde über den Effekt von PGE₂ auf die Antigenpräsentation von Tumorantigenen in Proteinform nicht berichtet.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von PGE₂ und spezifischen EP-Rezeptoragonisten auf verschiedene Funktionen von MoDC, die für die Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen relevant sind, untersucht. Zuerst wurde die Auswirkung von PGE₂ und den EP-Rezeptoragonisten auf die Ausreifung der MoDC untersucht. Hierbei wurde ersichtlich, dass MoDC nach Inkubation mit PGE₂, vermittelt über EP2/4-Rezeptoren, die Aktivierungsmarker HLA-A, HLA-B und HLA-C3, HLA-DR, CD83 und CD86 hochregulieren.

Als nächstes wurde der Einfluss von PGE₂ auf die Antigenaufnahme der MoDC untersucht. Hierbei wurde die Phagozytosefähigkeit anhand von Zelllysaten und apoptotischen Tumorzellen und die Makropinozytosefähigkeit anhand von Dextran-Partikeln analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass weder PGE₂ noch spezifische EP-Rezeptoragonisten die Antigenaufnahme signifikant beeinflussten.

Durch Präsentation von Antigenen auf MHC-II-Molekülen sind DC in der Lage, tumorspezifische CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Die MHC-II-Präsentationsfähigkeit der MoDC unter dem Einfluss von PGE₂ wurde mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ Peptid, NY-ESO-1 Protein sowie mit NY-ESO-1-transfiziertem CHO-Zelllysat als Antigenquellen untersucht. PGE₂ wurde zu den MoDC entweder 24 h vor (Präinkubation) oder zur gleichen Zeit wie das Antigen (Simultaninkubation) hinzugefügt. Die Versuche ergaben, dass die MHC-II-Antigenpräsentation der MoDC durch PGE₂ nicht signifikant beeinflusst wird.

Die Auswirkung von PGE₂ auf die Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC wurde mit einer Formulierung aus NY-ESO-1 Protein und dem ISCOMATRIX[®] adjuvant (NY-ESO-1/IMX) und einem Immunkomplex bestehend aus NY-ESO-1 Protein und dem Antikörper anti-NY-ESO-1 mAk (Klon ES121; NY-ESO-1/IC) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Kreuzpräsentation von NY-ESO-1/IMX als

auch von NY-ESO-1/IC durch PGE₂ dosisabhängig signifikant gehemmt wurde. Dieser Effekt wird, ähnlich wie die Zell-Reifung, über die EP2/4-Rezeptoren vermittelt.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse den Schluss, dass PGE₂ über einen EP2/4-Rezeptor-vermittelten Mechanismus die Kreuzpräsentationsfähigkeit der MoDC inhibiert, ohne jedoch die Antigenaufnahme oder die MHC-II-Präsentation signifikant zu beeinflussen. Eine klinische Relevanz der Ergebnisse besteht bei der Verwendung von DC für therapeutische Tumorstimmungen zur Induktion einer gegen Malignome gerichteten Immunantwort. Die Benutzung von PGE₂ als Reifestimulus für MoDC, die mit Protein-Antigenen gepulst werden, birgt das Risiko, die Induktion von tumorantigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen negativ zu beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Sliplets DM, Grygorczyk R. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;**269**:2632-2636.
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *PNAS* 2003;**100**:12889-12894.
- Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 2006;**25**:607-617.
- Adam M, Boie Y, Rushmore TH, Müller G, Bastien L, McKee KT, Metters KM, Abramovitz M. Cloning and expression of the human EP3 prostanoid receptor. *FEBS Lett.* 1994;**338**:170-174.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2003;**278**:1910-1914.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;**404**:193-197.
- Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha β 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1998;**188**:1359-1368.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* 1998;**392**:86-89.
- Alters SE, Gadea JR, Holm B, Lebkowski J, Philip R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J. Immunother.* 1999;**22**:229-236.
- Antonia S, Mule JJ, Weber JS. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr. Opin. Immunol.* 2004;**16**:130-136.
- Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* 1997;**18**:350-361.
- Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *BMJ* 2001;**323**:1289-1293.
- Audoly LP, Tilley SL, Goulet J, Key M, Nguyen M, Stock JL, Mc Neish JD, Koller BH, Coffman TM. Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE₂. *Am. J. Physiol.* 1999;**277**:924-930.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* 1996;**389**:55-60.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;**392**:245-252.

- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;**18**:767-811.
- Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 1999;**72**:255-324.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* 1996;**196**:121-135.
- Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Mahyar Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau B, Palucka AK. Cross-Priming of naive CD8 T Cells against Melanoma Antigens using Dendritic cells loaded with killed allogeneic Melanoma Cells. *J. Exp. Med.* 2000;**192**:1535-1543.
- Bevan MJ. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 1976;**117**:2233-2238.
- Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipets DM, Metters KM, Abramovitz M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;**269**:12173-12178.
- Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;**270**:18910-18916.
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;**12**:337-365.
- Brawand P, Fitzpatrick DR, Greenfield BW, Brasel K, Maliszewski CR, De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bonemarrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 2002;**169**:6711-6719.
- Breyer RM, Emeson RB, Breyer MD, Abromson RM, Davis LS, Ferrenbach SM. Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit PGE2 receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;**298**:6163-6169.
- Brombacher F, Kastelein RA, Novel GA. IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003;**24**:207-212.
- Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 Ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;**92**:4238-4247.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF and TNF- α . *J. Exp. Med.* 1996;**184**:695-706.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 1994;**180**:1263-1272.

- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 1996;**184**:747-752.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 1999;**5**:919-923.
- Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by doublestranded RNA. *J. Exp. Med.* 1999;**189**:821-829.
- Challis J, Gibb W. Control of parturition. *Prenat. Neonat. Med.* 1996;**1**:283-291.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *PNAS* 1997;**94**:1914-1918.
- Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, Tai TY, Zhu HC, Mifsud NA, Dimopoulos N, Masterman KA, Hopkins W, Goldie H, Maraskovsky E, Green S, Miloradovic L, McCluskey J, Old LJ, Davis ID, Cebon J, Chen W. Immunodominant CD4 responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *PNAS* 2004;**101**:9363-9368.
- Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997;**79**:237-240.
- Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 2002;**418**:988-994.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. VIII. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 1994;**46**:205-229.
- Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RL. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 1994;**47**:151-168.
- Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumpley P. Prostanoids and their receptors. *Comprehensive Medicinal Chemistry* 1990;**3**:643.
- Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 1893;**105**:487-511.
- Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;**15**:297-322.
- Corinti S, Albanesi C, Ia Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* 2001;**166**:4312-4318.
- Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 1999;**172**:21-28.

Daar AS, Fuggle SV, Hart DN, Dalchau R, Abdulaziz Z, Fabre, Ting A, Morris PJ. Demonstration and phenotypic characterization of HLR-DR positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues. *Trans. Proc.* 1983;**1**:311-329.

D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.* 2003;**198**:293-303.

Davis ID, Jefford M, Parente P, Cebon J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J. Leukocyte Biology* 2003;**73**:3-29.

Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in humans. *PNAS* 2004;**101**:10697-10702.

Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005;**307**:1630-1634.

De Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein DC-LAMP induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;**9**:325-336.

De Smedt T, Van Mechelsen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of IL10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* 1997;**27**:1229-35.

De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymphnodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Research.* 2003;**63**:12-17.

Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T-cells by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002;**195**:125-133.

Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in denritic cells. *J. Cell. Biol.* 1999;**174**:775-790.

Duclos S, Diez R, Garin J, papadopoulou B, Descoteaux A, Stenmark H, Desjardins M. Rab 5 regulates the kiss and run fusion between phafosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Sci.* 2000;**19**:3531-3541.

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2000;**165**:6037-6046.

Ennis FA, Cruz J, Jameson J, Klein M, Burt D, Thipphawong J. Augmentation of human influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMS). *Virology* 1999;**259**:256-261.

- Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2003;**348**:1681-1691.
- Ezekowitz RA, Sastry K, BaiUy P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos1cells. *J. Exp. Med.* 1990;**172**:1785-94.
- Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc c receptor mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 1996;**157**:541-548.
- Fedyk ER, Phipps RP. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *PNAS* 1996;**93**:10978-10983.
- Fiebiger E, Meraner P, Weber E, Fei Fang I, Stingl G, Ploegh H, Maurer D. Cytokines Regulate Proteolysis in Major Histocompatibility Complex Class II-dependent Antigen Presentation by Dendritic Cells, *J. Exp. Med.* 2001;**193**:881-892.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* 2004;**10**:475-480.
- Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;**3**:630-641.
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006;**311**:83-87
- Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 1953;**13**:835-837.
- Fong L, Engleman, EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;**18**:245-273.
- Fonteneau JF, Kavanagh D, Lirvall M, Sanders C, Cover T, Bhardwaj N, Larsson M. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003;**101**:3520-3526.
- Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;**101**:3520-3526.
- Frazer IH, Quinn M, NicklIn JL, Tan J, Perrin LC, Ng P, O'Connor VM, White O, Wendt N, Martin J, Crowley JM, Edwards SJ, McKenzie AW, Mitchell SV, Maher DW, Pearse MJ, Bassler RL. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 2004;**23**:172-181.
- Funk CD, Furci L, Fitzgerald R, Grygorczyk C, Rochette MA, Bayne MA, Bramovits A, Adam M, Metters KM. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP subtype. *J.Biol.Chem.* 1993;**268**:26767-26772.
- Ganapathy V, Gurlo T, Jarstadmarken HO, von Graefenstein H. Regulation of TCR-induced IFN- γ release from islet-reactive non-obese diabetic CD8 T cells by prostaglandin E(2) receptor signaling. *Int.Immunol.* 2000;**12**:851-860.

Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 1998;**187**:961-966.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;**19**:71-82.

Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 1999;**11**:263-270.

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nature Immunol.* 2006;**7**:265-273.

Gnjatic S, Atanackovic D, Jäger E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ. Survey of naturally occurring CD4 T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *PNAS* 2003;**100**:8862-8867.

Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 1965;**121**:439-462.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 2005;**5**:953-964.

Graneli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, Trumpfheller C, Piguët V, Moran TM, Steinman RM. Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin/ CD209 is Abundant on Macrophages in the Normal Human Lymph Node and Is Not Required for Dendritic Cell Stimulation of the Mixed Leukocyte Reaction. *J. Immunol.* 2005;**175**:4265-4273.

Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO *Trends Immunol.* 2003;**24**:242-248.

Gualde N, Harizi H. Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity. *Immunology and Cell Biology* 2004;**82**:353-360.

Guan XJ, Wu YZ, Jia ZC, Shi TD, Tang Y. Construction and characterization of an experimental ISCOMS-based hepatitis B polypeptide vaccine. *World J. Gastroenterol.* 2002;**8**:294-297.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Amigorena S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;**20**:620-667.

Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003;**425**:397-402.

Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini JC, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand - implications for tumor immune escape. *Science* 1996;**274**:1363-1366.

- Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE2 that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.* 2001;**209**:19-28.
- Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell function. *J. Immunol.* 2002;**168**:2255-2263.
- Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J. Leukoc. Biol.* 2003;**73**:756-763.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* 2002;**23**:144-150.
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *PNAS* 1999;**96**:9305-9310.
- Hart DN, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* 1981;**154**:347-361.
- Hart DN, Fabre JW. Localization of MHC antigens in long surviving rat renal allografts: probable implication of passenger leukocytes in graft adaptation. *Transplant Proc.* 1981;**13**:95-99.
- Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;**19**:47-64.
- He X, Stuart JM. Prostaglandin E2 selectively inhibits human CD4+ T cells secreting low amounts of both IL-2 and IL-4. *J. Immunol.* 1999;**163**:6173-6179.
- Hellstrand K, Asea A, Dahlgren C, Hermodsson S. Histaminergic regulation of NK cells. Role of monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J. Immunol.* 1994;**153**:4940-47.
- Hendricks A, Leibold W, Kaever V, Schuberth HJ. Prostaglandin E2 is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T-cell proliferative response. *Immunobiology* 2000;**201**:493-505.
- Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell. Biol.* 1994;**124**:689-703
- Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory-cell-derived products. *Eur. Respir. J. Suppl.* 1996;**22**:90-94.
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *PNAS* 1999;**96**:10501-10506.
- Hörtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, Radmayr C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J. Urol.* 1999;**161**:777-782.

Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. Phagosomes are competent organelles for antigen crosspresentation. *Nature* 2003;**425**:402-406.

Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J. Clin. Immunol.* 1992;**12**:239-247.

Huang AY, Bruce AT, Pardoll DM, Levitsky HI. In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 1996;**4**:349-355.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;**90**:455-460.

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 1993;**178**:479-488.

Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 1998;**187**:265-270.

Jäger E, Gnjatich S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *PNAS* 2000;**97**:12198-12203.

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

Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serumfree conditions. *Eur. J. Immunol.* 1997;**27**:3135-3142.

Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Old LJ. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer.* 2001;**92**:856-860.

Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 1997;**159**:28-35.

Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM; Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 1998;**161**:2804-2809.

Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001;**97**:3466-3469.

- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini J, Jothy S. Expression of prostaglandin G7H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* 1995;**55**:2556-2559.
- Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2003;**198**:305-13.
- Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;**2**:127-132.
- Kawamoto, H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol.* 2006;**27**:169-175.
- Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, Liu YJ, McEvoy LM. The CC Chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 1999;**162**:3859-3864.
- Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM. Salt-sensitivity hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat. Med.* 1999;**5**:217-220.
- Kersten G, Drane D, Pearse M, Jiskoot W, Coulter A. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 2003;**21**:915-920.
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.* 1997;**122**:217-224.
- Knuth A, Wölfel T, Klehmann, E, Boon, T, Meyer zum Buschenfelde KH. Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *PNAS* 1989;**86**:2804-2808.
- Kohrgruber N, Halanek N, Groger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, Stingl G, Maurer D. Survival, maturation, and function of CD11c⁻ and CD11c peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 1999;**163**:3250-3259.
- Kokko J. Effect of prostaglandins on renal epithelial electrolyte transport. *Kidney Int.* 1981;**19**:791-796.
- Kondo M, Weissman IL., Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;**91**:661-672.
- Kovacovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;**267**:243-246.
- Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.* 2000;**6**:332-336.
- Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1868;**44**:325-337.

Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1990;**8**:773-793.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* 1990;**172**:1483-1493.

Larsson M, Jin X, Ramratnam B, Ogg GS, Engelmayer J, Demoitie MA, McMichael AJ, Cox WI, Steinman RM, Nixon D, Bhardwaj N. A recombinant vaccinia virus based ELISPOT assay detects high frequencies of Pol-specific CD8 T cells in HIV-1-positive individuals. *Aids* 1999;**13**:767-777.

Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001;**22**:141-148.

Lawrence RA, Jones RL. Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* 1992;**105**:817-824.

Le TT, Drane D, Malliaros J, Cox JC, Rothel L, Pearse M, Woodberry T, Gardner J, Suhrbier A. Cytotoxic T cell polyepitope vaccines delivered by ISCOMs. *Vaccine* 2001;**19**:4669-4675.

Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Groettrup M. Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J. Immunol.* 2006;**176**:966-973.

Lenarczyk A, Le TTT, Drane D, Malliaros J, Pearse M, Hamilton R, Cox J, Luft T, Gardner J, Suhrbier A. ISCOM based Vaccines for Cancer immunotherapy. *Vaccine* 2004;**22**:963-974.

Liu E, Tu W, Law HK, Lau YL. Increased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br. J. Haematol.* 2001;**113**:240.

Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;**23**:275-306.

Lo CH, Lee SC, Wu PY, Pan WY, Su J, Cheng CW, Roffler SR, Chiang BL, Lee CN, Wu CW, Tao MH. Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. *J. Immunol.* 2003;**171**:600-607.

Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL, Quaranta V, Peterson PA. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 1990;**348**:600-605.

Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 1995;**25**:1943-1950.

Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002;**100**:1362-1372.

Luscher U, Folgueira L, Juretic A, Zuber M, Luscher NJ, Heberer M, Spagnoli GC. The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int. J. Cancer*. 1994;**57**:612-619.

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 1994;**171**:131-137.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol*. 1995;**154**:5071-5079.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001;**97**:3333-3341.

Marakovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000;**96**:878-884.

Marakovsky E, Sjolander S, Drane DP, Schnurr M, Le TT, Mateo L, Luft T, Masterman KA, Tai TY, Chen Q, Green S, Sjolander A, Pearse MJ, Lemonnier FA, Chen W, Cebon J, Suhrbier A. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8⁺ T-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1⁺ tumors. *Clin. Cancer Res*. 2004;**10**:2879-2890.

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med*. 1995;**1**:1297-302.

McKenzie JL, Beard ME, Hart DN. Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival. *Transplant Proc*. 1984;**16**:948-51.

Meja KK, Barnes PJ, Giembycz MA. Characterization of the prostanoid receptors on human blood monocytes at which prostaglandin E2 inhibits lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor- α generation. *Br. J. Pharmacol*. 1997;**122**:149-157.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism *Nat. Rev. Immunol*. 2004;**4**:762-774.

Miller SB. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. *Semin. Arthritis Rheum*. 2006;**36**:37-49.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;**11**:231.

Morein B, Sundquist B, Hoglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 1984;**308**:457-460.

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

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 1996;**17**:138.

- Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Jarisch J, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 1999;**38**:73-78.
- Murphy R, Green S, Ritter G, Cohen L, Ryan D, Woods W, Rubira M, Cebon J, Davis ID, Sjolander A, Kypridis A, Kalnins H, Mc Namara M, Moloney MB, Ackland J, Cartwright G, Rood J, Dumsday G, Healey K, Maher D, Marakovsky E, Chen YT, Hoffman EW, Old LJ, Scott AM. Recombinant NY-ESO-1 cancer antigen: production and purification under cGMP conditions. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2005;**35**:119-134.
- Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatic S, Valmori D, Ritter G, Garrett W, Old LJ, Mellman I. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *PNAS* 2002;**99**:10629-10634.
- Nagawa TY, Brisette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 1999;**2**:207-217.
- Nataraj Ch, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen M, Mannon R, Koller BH, Coffman TM. Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse. *J. Clin. Invest.* 2001;**108**:1229-1235.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 1999;**79**:1193-1226.
- Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* 2001;**108**:25-30.
- Narumiya S. Prostanoids in immunity: Roles revealed by mice deficient in their receptors. *Life Science* 2003;**74**:391-395.
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumorlysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 1998;**4**:328-332.
- Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr. Opin. in Immunol.* 2005;**17**:163-169.
- Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN, Koller BH. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodeling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 1997;**390**:78-81.
- Nicholaou T, Ebert L, Davis ID, Robson N, Klein O, Maraskovsky E, Chen W, Cebon J. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. *Immunol. Cell Biol.* 2006;**84**:303-317.
- Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1997;**27**:280-288.

- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore Kw, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;**13**:715-725.
- Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat. Med.* 1998;**4**:525-531.
- Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;**76**:241-251.
- Pavord ID, Wisniewski A, Mathur R, Wahedna I, Knox AJ, Tattersfield AE. Effect of inhaled prostaglandin E2 on bronchial reactivity to sodium metabisulphite and methacholine in patients with asthma. *Thorax* 1991;**46**:633-637.
- Pecher G, Haring A, Kaiser L, Thiel E. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002;**51**:669-673.
- Peiper M, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Generation of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells capable of lysing human pancreatic cancer cells. *Surgery* 1997;**122**:235-241.
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 2002;**16**:779-790.
- Piemonti L, Bernasconi S, Luini W, Trobonjaca Z, Minty A, Allavena P, Mantovani A. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur. Cytokine Netw.* 1995;**6**:245-252.
- Pierre P, Mellman I. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 1998;**93**:1135-1145.
- Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghton M, Paliard X. Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J. Immunol.* 2001;**166**:3589-98.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* 2000;**165**:566-572.
- Qin Z, Noffz G, Mohaupt M, Blankenstein T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J. Immunol.* 1997;**159**:770-776.
- Racoosin EL, Swanson JA. M-CSF-induced macropinocytosis-increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Sci.* 1992;**102**:867-880.
- Ramwell P, Shaw J. Prostaglandin inhibition of gastric secretion. *J. Physiol.* 1968;**195**:34-36.

- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998;**282**:480-483.
- Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, Gil DW. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of pharmacologically defined EPsubtype. *Mol. Pharmacol.* 1994;**46**:213-220.
- Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Theyry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 1999;**189**:371-380.
- Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2001;**50**:3-15.
- Rescigno, M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria induced DC maturation. *Immunol. Today* 1999;**20**:200-203.
- Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest.* 2003;**21**:873-886.
- Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 1997;**186**:1603.
- Rimmelzwaan GF, Nieuwkoop N, Brandenburg A, Sutter G, Beyer WE, Maher D, Bates J, Osterhaus AD. A randomized, double blind study in young healthy adults comparing cell mediated and humoral immune responses induced by influenza ISCOM vaccines and conventional vaccines. *Vaccine* 2000;**19**:1180-1187.
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* 1997;**57**:1276-1280.
- Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3β, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 2000;**103**:757-68.
- Rocca B, Spain LM, Pure E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA. Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *J. Clin. Invest.* 1999;**103**:1469-1477.
- Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 1996;**17**:131-137.
- Rock KL. The ins and outs of crosspresentation. *Nat. Immunol.* 2003;**4**:941-943.
- Rock KL, Shen L. Cross-presentation: Underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological reviews* 2005;**207**:166-183.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1999;**1**:362-368.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994;**180**:83-93.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods.* 1996;**196**:137-151.

Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 2003;**111**:725-740.

Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004;**53**:249-255.

Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999;**10**:281-287.

Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005;**434**:325-337.

Rubartelli, A, Poggi A, Zocchi MR. 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.* 1997;**27**:1893-1900.

Rubio MT, Means TK, Chakraverty R, Shaffer J, Yasuhiro F, Chittenden M, Luster AD, Sykes M. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells in the presence of prostaglandin E₂ optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE₂ in Chemokine and cytokine expression by MoDCs. *Inter. Immun.* 2005;**17**:1561-1572.

Ruiz P, Woodson C, Rey L. Modification of rat skin allograft rejection by inhibition of thromboxane synthesis. *Transplantation* 1992;**54**:385-358.

Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, Bordignon C, Traversari C. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *PNAS* 2000;**97**:2185-2190.

Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. Immunol.* 1999;**162**:2472-2475.

Sahin U, Türeci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 1997;**9**:709-716.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 1994;**179**:1109-1118.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC Class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995;**182**:389-400.

- Sanders MT, Brown LE, Deliyannis G, Pearse MJ. ISCOM™-based vaccines: The second decade. *Immunol. and Cell Biol.* 2005;**83**:119-128.
- Savina A, Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Dumenil AM, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2006;**126**:205-218.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002;**100**:1354-1361.
- Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E, Schuler G. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Annals of Oncology* 2006;**17**:563-570.
- Schnurr M, Toy T, Stoitzner P, Cameron P, Shin A, Beecroft T, Davis ID, Cebon J, Marakovsky E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* 2003;**102**:613-620.
- Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis I, Villadangos J, Shortman K, Marakovsky E, Cebon J. Tumor antigen processing and presentation depends critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005;**105**:2465-2472.
- Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Marakovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005;**105**:1582-1589.
- Schnurr M, Orban M, Robson NC, Shin A, Braley H, Airey D, Cebon J, Marakovsky E, Endres S. ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *J. of Immunol.* 2009;**182**:1253-1259.
- Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002;**195**:1279-1288.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 2003;**15**:138-147.
- Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res.* 2000;**60**:6441-6447.
- Shastri N, Schwab S, Serwold T. Producing nature's gene-chips: The generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;**20**:463-493.
- Sheller JR, Mitchell D, Meyrick B, Oates J, Breyer R. EP2 receptor mediates bronchodilation by PGE2 in mice. *J. Appl. Physiol.* 2000;**88**:2214-2218.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;**58**:362-366.

Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999;**10**:197-206.

Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashimata K, Kishimoto Y, Kawasaki H. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 1999;**46**:407-412.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;**2**:151-161.

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;**7**:19-30.

Slingluff CL, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* 2003;**21**:4016-4026.

Sjölander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck JP, Suhrbier A, Tennent J, Pearse M. Immune responses to ISCOM(®) formulations in animal and primate models. *Vaccine* 2001;**19**:2661-2665.

Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J. Clin. Invest.* 2001;**107**:1491-1495.

Starnes CO. Coley's toxins in perspective. *Nature* 1992;**357**:11-12.

Steinbrink K, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch. Dermatol. Res.* 2000;**292**:437-445.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973;**137**:1142-1162.

Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties *in vivo*. *J. Exp. Med.* 1974;**139**:1431-45.

Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *PNAS USA* 1978;**75**:5132-5136.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991;**9**:271-296.

Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int. J. Cancer.* 2001;**94**:459-473.

Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 1998;**187**:1349-1354.

Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol.* 2000;**164**:361-370.

Strong VE, Winter J, Yan Z, Smyth GP, Mestre JR, Maddali S, Schaefer PA, Yurt RW, Stapleton PP, Daly JM. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are down-regulated in human mononuclear cells after injury. *Surgery* 2001;**130**:249-255.

Takeuchi K, Ukawa H, Kato S, Furukawa O, Araki H, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP3. *Gastroenterol.* 1999;**117**:1128-1135.

Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J. Exp. Med.* 2000;**192**:405.

Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the E prostaglandin E2 receptor. *J. Clin. Invest.* 1999;**103**:1539-1545.

Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* 1999;**50**:507-529.

Thumann P, Moc I, Humrich J, et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J. Immunol. Methods.* 2003;**277**:1-16.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Diekmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 1999;**190**:1669-1678.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003;**19**:641-644.

Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 2003;**299**:1400-1403.

Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahety TJ. Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;**59**:987-990.

Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998;**395**:281-284.

Valmori D, Dutoit V, Lienard D, Rimoldi D, Pittet MJ, Champagne P, Ellefsen K, Sahin U, Speiser D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P. Naturally occurring HLA-A2 restricted CD8+ T cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* 2000;**60**:4499-4506.

- Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdens J, Arden LA. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human IL-12 production. *J. Exp. Med.* 1995;**181**:775-779.
- Vassiliou E, Jing H, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* 2003;**223**:120-132.
- Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Duménil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 1999;**172**:109-120.
- Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 2000;**12**:233-239.
- Villadangos JA. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol. Immunol.* 2001;**38**:329-346.
- Villadangos JA, Heath WR, Carbone FR. Outside looking in: the inner workings of the crosspresentation pathway within dendritic cells. *TRENDS in Immunol.* 2007;**28**:45-47.
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 2000;**164**:2978-2986.
- Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4 T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2001;**22**:269-276.
- Wang YQ, Ugai S, Shimozato O, Yu L, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Tagawa M. Induction of systemic immunity by expression of interleukin-23 in murine colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 2003;**105**:820-824.
- Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Ohta T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Ushikubi F, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Role of prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999;**59**:5093-5096.
- Watts C, Marsh M. Endocytosis: what goes in and how? *J. Cell Sci.* 1992;**103**:1-8.
- Watts C. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr. Opin. in Immunol.* 2001;**13**:26-31.
- Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J. Exp. Med.* 2001;**193**:19-22.
- Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004;**53**:240-248.
- Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of Antigen Presentation and Cross-Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications. *Adv. in Immu.* 2005;**86**:241-305.
- Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 1997;**185**:317-328.
- Wolf PR, Ploegh L. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: Biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Ann. Rev. of Cell and Developm. Biol.* 1995;**11**:267-306.

- Yamanaka R, Abe T, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Kobayashi T, Narita M, Takahashi M, Tanaka R. Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. *Br. J. Cancer* 2003;**89**:1172-1179.
- Yang L, Noboru Y, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, Shyr Y, Boothby M, Joyce S, Carbone DP, Breyer RM. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *J. Clin. Invest.* 2003;**111**:727-735.
- York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;**14**:369-396.
- Young JW, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4⁺ helper T cells. *J. Exp. Med.* 1990;**171**:1315-32.
- Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells *in vivo* under steady-state conditions. *J. Immunol.* 2006;**176**:4155-4162.
- Yu Y, Chadee K. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* 1998;**161**:3746-3752.
- Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int. J. Cancer* 1997;**71**:630-637.
- Zhang Y, Guan Y, Schneider A, Brandon S, Breyer RM, Breyer MD. Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E2 receptors. *Hypertension* 2000;**35**:1129-1134.
- Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *PNAS* 1996;**93**:2588-2592.
- Zurier R, Quagliatta F. Effect of prostaglandin E1 on adjuvant arthritis. *Nature* 1971;**234**:304-305.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Stefan Endres, meinem Doktorvater, möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas danken. Für seine Unterstützung und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe gilt ihm mein besonderer Dank.

Herrn PD Dr. Maximilian Schnurr, dem Betreuer meiner Doktorarbeit, möchte ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für die kontinuierliche sehr gute Betreuung meiner Arbeit und für die hervorragende Möglichkeit zur Durchführung einer experimentellen Arbeit am *Ludwig Institute for Cancer Research* in Melbourne danken.

Am *Ludwig Institute for Cancer Research* möchte ich mich bei Herrn Professor Jonathan Cebon und Professor Eugene Marakovsky für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung bedanken.

Ferner gilt mein Dank Amanda Shin und Tracey Toy für die praktische Einführung in relevante Methoden, für die sehr gute Zusammenarbeit und für die ständige tatkräftige Unterstützung.

Für die Bereitstellung der T-Zelllinien möchte ich mich bei Dr. Qiyuan Chen bedanken. Dr. Tsin Yee Tai danke ich für die Bereitstellung der transfizierten CHO_{NY-ESO-1}-Zelllinie.

Bei der Boehringer Ingelheim Stiftung möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit bedanken, die es mir ermöglicht hat, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente am *Ludwig Institute for Cancer Research* durchzuführen.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, **Jenderek C**, Green S, Miloradovic L, Grane D, Davis ID, Villadangos J, Shortman K, Marakovsky E, Cebon J.
Tumor antigen processing and presentation depends critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery
Blood 2005;**105**:2465-2472.

Vorträge und Poster bei folgenden Kongressen

Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, **Jenderek C**, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis I.D., Marakovsky E, Cebon J.
Targeting of the tumor antigen NY-ESO-1 to two distinct processing pathways induces effective presentation on MHC class I and II by human dendritic cells
8th International Symposium on Dendritic cells in Brügge, Belgien, 2004

Jenderek C, Jückstock J, Schindlbeck C, Rack B, Fuchs R, Noeding S, Krabisch P, Ebner F, Lichtenegger W, Beckmann MW, Friese K, Sommer H, Janni W.
Minimal Residual Disease Detection in peripheral blood of primary breast cancer patients – translational research in the SUCCESS-Study.
31st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio 2008

Jenderek C, Kainer F, Friese K, Drinovac V, Scholz C
High-Fidelity Simulation in der Geburtshilfe – Integration eines interaktiven dynamischen Modells in die geburtshilfliche Aus- und Weiterbildung
82. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde in Augsburg, 2008

Zombirt E, Rack B, Jückstock J, **Jenderek C**, Hepp P, Zill B, Rengel A, Sommer H, Janni W, Schindlbeck C, Tulusan AH, Friese K
Her2/neu-Status disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und in der rezidivfreien Nachsorge
Deutsche Gesellschaft für Senologie – 28. Jahrestagung in Stuttgart, 2008

Friese K, Janni W, **Jenderek C**, Jückstock J, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H.
Vergleich zirkulierender Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut und disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM) von Mammakarzinompatientinnen Deutsche Gesellschaft für Senologie – 28. Jahrestagung in Stuttgart, 2008

Jenderek C, Jückstock J, Schindlbeck C, Rack B, Fuchs R, Noeding S, Krabisch P, Ebner F, Villena C, Schlag R, Zahm DM, Lichtenegger W, Beckmann MW, Friese K, Sommer H, Janni W.
Nachweis von Minimal Residual Disease (MRD) im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen – Translationale Forschung im Rahmen der SuCCCESS-Studie
Deutsche Gesellschaft für Senologie – 28. Jahrestagung in Stuttgart, 2008

Jenderek C, Schiessl B, Kästner R, Hiedl S, Kainer F

Schwangerschaftsverlauf, Geburtsmodus und Outcome bei pränatal diagnostizierter extremer fetaler Hyperextension der Halswirbelsäule – Fallbericht von sechs Patientinnen

24. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Perinatale Medizin (DGPM) und 35. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) in Berlin 2009

Jenderek C, Weissenbacher T, Drinovac V, Friese K, Kainer F, Scholz C
Integration eines interaktiven, dynamischen Modells in die geburtshilfliche Studentenausbildung

57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Hamburg, 2009

Schindlbeck C, Rack B, Jückstock J, **Jenderek C**, Andergassen U, Guenther-Biller M, Sommer H, Janni W, Friese K.

Comparison of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Peripheral Blood and Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow (DTC-BM) of Breast Cancer patients

7th International Symposium on Minimal Residual Cancer in Athen, Griechenland 2009

Kästner R, Gingelmaier A, Sovric M, Kainer F, **Jenderek C**, Weizsäcker K.

HIV-positive women in Germany can also deliver vaginally – Experiences from 50 vaginally intended deliveries from 2001 to 2008

5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention in Kapstadt, Südafrika, 2009

Lebenslauf

Geboren am 8. September 1981 in Essen

Schule und Studium

09/1991 - 06/2000	Goethe-Gymnasium , Essen. Abitur mit der Note 1,5
08/1997 - 07/1998	Kents Hill School , Kents Hill, Maine, USA Auslandsjahr an einer College Preparatory School
10/2000 - 03/2001	Universität Regensburg Studium der Betriebswirtschaftslehre
03/2001 - 11/2007	Ludwig-Maximilians-Universität München Studium der Humanmedizin
03/2003	Ärztliche Vorprüfung mit der Note 2,66
11/2007	2. Ärztliche Prüfung mit der Note 1,5
11/2007	Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr (04/2006 - 03/2007)

Innere Medizin	Harvard Medical School , Boston, USA Core Clerkship - Massachusetts General Hospital Sub-Internship - Mount Auburn Hospital, Cambridge
Chirurgie	Clinica Santa Chiara , Locarno, Schweiz Allgemeinchirurgie, Viszeralchirurgie und Traumatologie Klinikum der Universität München : Chirurgische Klinik und Poliklinik - Innenstadt Allgemeinchirurgische Ambulanz und Notaufnahme, sowie Abteilung für Plastische und Handchirurgie
Gynäkologie	Klinikum der Universität München, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt

Famulaturen und praktische Erfahrungen

Gynäkologie	Praxis Dr. med. Villinger und Geisenhofer Klinik , München (04/2002)
Chirurgie	Complejo Hospitalario Universitario de Albacete , Spanien (08/2004)
Kardiologie	Deutsches Herzzentrum , München (09/2004 - 10/2004)

Innere Medizin	New York Presbyterian Hospital , New York City, USA (04/2005)
Endokrinologie	Universitätsklinikum Essen , Klinik für Endokrinologie (09/2005)

Praktische Erfahrungen

08/2003 - 04/2004	Ludwig Institute for Cancer Research , Melbourne, Australien Forschungsaufenthalt
10/2005	IPOKRATES-Students Seminar, Krankenhaus Harlaching , München „Symptoms, Signs and Interpretation in Neurology“, Prof. Huned Patwa, MD, Dept. of Neurology, Yale University School of Medicine
03/2005 - 04/2005	Weill Medical College, Cornell University , New York City, USA; US - Europe Medical Educational Exchange Projekt der LMU; Case Report über den Krankheitsverlauf und die Versorgung durch das amerikanische Gesundheitssystem eines COPD Patienten

Stipendien

1997 - 1998	Stipendium von ASSIST (American Secondary Schools for International Students), Schuljahr an der Kents Hill School, USA
2003 - 2004	MD Stipendium der Boehringer Ingelheim Stiftung , Forschungsaufenthalt am <i>Ludwig Institute for Cancer Research</i> in Melbourne, Australien
2006	Stipendium der München-Harvard Alliance for Medical Education , PJ Tertial in der Inneren Medizin an der Harvard Medical School

Beruf

seit 01/2008	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians- Universität München; Direktor: Prof. Dr. K. Friese
--------------	---