

Endogene und tumorassoziierte
MHC Klasse II-Liganden
in humanen dendritischen Zellen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Till Alexander Röhn

Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.2004

Dekan:	Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter:	PD Dr. H. Kropshofer

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum Oktober 2000 bis Dezember 2003 am Basel Institut für Immunologie sowie am Roche Center for Medical Genomics, Hoffmann-La Roche, Basel, im Labor von Herrn PD Dr. Harald Kropshofer und Frau Dr. Anne Vogt.

Sie wurde unter der externen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht, sind als Manuskripte eingereicht oder in einer Patentapplikation enthalten:

Kropshofer, H., Spindeldreher, S., **Röhn, T. A.**, Platania, N., Grygar, C., Daniel, N., Wölpl, A., Langen H., Horejsi V., Vogt, A.B. (2002) Tetraspan micodomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nature Immunology 3 (1): 61-68*

Röhn, T. A., Schadendorf, D., Yuansheng, S., Nguyen, D., Röder, D., Langen, H., Vogt, A. B., Kropshofer, H. Melanoma cell necrosis facilitates transfer of specific sets of antigen onto MHC class II molecules of dendritic cells (*eingereicht*).

Röhn, T. A., Wolters, D., Müller, B., Langen, H., Vogt., A.B., Kropshofer, H. Self-peptide CLIP up-regulated on mature dendritic cells antagonizes T_H1 polarisation (*eingereicht*).

Patentanmeldung:

Vogt, A. B., **Röhn, T.A.**, Kropshofer, H. Novel MHC II Associated Peptides.
European Patent Application No. 02022224.6; *Filing Date October 2, 2002.*

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Dendritische Zellen	3
1.2.1 Die Reifung dendritischer Zellen	4
1.2.2 MHC Klasse II-Antigenpräsentation in dendritischen Zellen	6
1.2.3 Die immunologische Synapse zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen.....	10
1.2.4 T-Zell-Priming und Polarisierung	11
1.2.5 Die Bedeutung der Präsentation von MHC II-Selbstpeptiden auf DCs für die periphere Toleranz und die Regulation der T-Zell- Aktivität.	12
1.3 Die Immunität gegenüber Krebs	13
1.3.1 Immuntherapien gegen Tumore	17
1.3.2 Die Bedeutung von CD4 ⁺ -T-Zellen in der Anti-Tumor- Immunität.....	18
1.4 Zielsetzungen der Promotionsarbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Antikörper	23
2.1.3 Peptide	29
2.1.4 Protein-Antigene.....	29
2.1.5 Zelllinien.....	30
2.1.6 Kulturmedien.....	31
2.2 Zellbiologische Methoden	32
2.2.1 Allgemeine Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl	32
2.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien	32
2.2.1.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen.....	33

2.2.2 Kultivierung von Hybridomzelllinien zur Produktion von Antikörpern.....	33
2.2.3 Isolierung und Kultivierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut.....	34
2.2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) aus humanem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	34
2.2.3.2 Isolierung von Monocyten und Differenzierung zu dendritischen Zellen	35
2.2.3.3 Isolierung und Kultivierung von CD4 ⁺ -T-Zellen	35
2.2.3.4 Isolierung und Kultivierung naiver CD4 ⁺ -T-Zellen	36
2.2.4 Stimulierung und Pulsen von dendritischen Zellen mit Antigenen.....	36
2.2.4.1 Stimulation dendritischer Zellen mit nekrotischen oder apoptotischen Tumorzellen	36
2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS).....	37
2.2.6 Stimulierung von T-Zellen durch antigenbeladene dendritische Zellen.....	37
2.2.6.1 Priming und Polarisierung naiver CD4 ⁺ -T-Zellen.....	37
2.2.6.2 Generierung antigenspezifischer CD4 ⁺ -T-Zell-Linien	38
2.2.6.3 Messung der Cytokinproduktion	38
2.2.6.3.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Sandwich-ELISA).....	38
2.2.6.3.2 Intrazelluläre Durchflußzytometrie	39
2.2.7 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie.....	39
2.3 Biochemische Methoden	40
2.3.1 Allgemeine biochemische Methoden.....	40
2.3.1.1 Detergenz-Lyse	40
2.3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
2.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.3.1.4 Coomassie Färbung	42
2.3.1.5 Western Blot Analyse.....	42
2.3.2 Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation	43
2.3.3 Isolierung MHC II-assoziiertes Peptide.....	44
2.3.4 Peptidbindungsassays	44
2.3.4.1 In vivo Peptidbindungsassay	44
2.3.4.2 Peptid-MHC-Bindungsassay	45
2.3.4.3 HLA-DM-Aktivitätsassay	45
2.3.5 Isolierung monoklonaler Antikörper	45
2.3.5.1 Affinitätschromatographische Reinigung mittels Protein A	45
2.3.5.2 Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose.....	46

2.4 Massenspektrometrische Methoden	47
2.4.1 MALDI-MS.....	47
2.4.2 MALDI-PSD-MS.....	47
2.4.3 Peptidsequenzierung mittels LC-MS/MS	48
2.4.3.1 Herstellung und Vorbereitung der Trennsäulen	49
2.4.3.2 Chromatographische Trennung und MS/MS-Analyse von MHC II- Peptidgemischen	49
2.4.3.3 Datenbanksuche und Selektion	50
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	51
2.5.1 Primer und Sonden	51
2.5.2 DNA Microarray-Analyse	52
2.5.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellpellets	52
2.5.2.2 cDNA-Synthese.....	52
2.5.2.3 In vitro Transkriptions-Markierung.....	53
2.5.2.4 Genchip-Hybridisierung.....	53
2.5.3 Single Target Expression Profiling (STEP-Analyse)	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Präsentation endogener Selbstpeptide auf MHC II-Molekülen dendritischer Zellen	55
3.1.1 Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs.....	55
3.1.2 Sequenzierung von Selbstpeptiden unreifer und reifer DCs.....	57
3.1.3 Regulation der HLA-DM-Aktivität während der Reifung von DCs	60
3.1.4 Antigenrezeptivität und Stabilität von Peptid-MHC II- Komplexen während der Reifung von DCs.....	63
3.1.5 Kopräsentation von CLIP und Antigenpeptiden auf der Zelloberfläche reifer DCs.....	66
3.1.6 CLIP ist Bestandteil immunologischer Synapsen	68
3.1.7 CLIP und ein exogenes Antigen kolokalisieren in Tetraspan- Mikrodomänen reifer DCs.....	69
3.1.8 Das CLIP/MHC II-Verhältnis auf der Oberfläche von DCs hat Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung.....	72

3.1.9 CLIP ist dominantes Selbstpeptid in medullären sowie corticalen Thymusepithelzellen von Mäusen	75
3.2 Identifizierung von MHC Klasse II-restringierten tumorassoziierten Antigenepitopen.....	77
3.2.1 Identifizierung eines MHC II-restringierten Hämagglutinin- Epitops aus dem virosomalen Grippe-Impfstoff Inflexal.....	77
3.2.2 Transfer von Antigenen von Melanomzellen auf MHC II- Moleküle dendritischer Zellen	80
3.2.2.1 DC-Aktivierungspotential nekrotischer und apoptotischer Zellen	81
3.2.2.2 Vergleich von UKRV-Mel-15a und Ma-Mel-18a bezüglich einiger die Maturierung von DCs beeinflussender Parameter	82
3.2.2.3 Aus nekrotischen Melanomzellen freigesetzte Antigene kompetieren mit Peptiden um die Bindung an HLA-DR.....	85
3.2.2.4 Epitope aus HLA-A2 von Melanomzellen können auf HLA-DR1- Moleküle dendritischer Zellen übertragen werden.	86
3.2.2.5 Veränderungen im HLA-DR-Peptidrepertoire von DCs durch nekrotische Tumorzellen.....	89
3.2.2.6 Überstände nekrotischer Melanomzellen induzieren die Expression von Neo-Antigenpeptiden auf DCs.....	90
3.2.2.7 Hsp70/Hsc73-Proteine aus nekrotischen Melanomzellen binden an MHC II-Peptide.	91
3.2.3 Identifizierung eines durch nekrotische Tumorzellen induzierten Neo-Peptids auf DCs mittels MALDI-PSD-MS	93
3.2.4 Identifizierung neuer MHC II-assoziierter Tumorantigen- Kandidaten durch komparative Peptidsequenzierung Melanomzell-gepulster und ungepulster DCs	95
3.2.4.1 Sequenzierung des HLA-DR-assozierten Peptidrepertoires von DCs (DRB1*0101/DRB1*04011) in Anwesenheit und Abwesenheit nekrotischer Ma-Mel-18a-Zellen.	96
3.2.4.2 HLA-DR-Bindungseigenschaften der identifizierten Antigenpeptide	98
3.2.4.3 Aktivierung von CD4 ⁺ -T-Zellen durch das identifizierte Epitop Melanotransferrin (668-684).....	100
3.2.4.4 Expression von Melanotransferrin in Melanomzelllinien und Melanom- Biopsien.	101
3.2.4.5 Präsentation von Melanotransferrin(668-684) und weiterer potentieller Tumorantigene auf der Melanomzelllinie UKRV-Mel-17.....	103
3.2.4.6 UKRV-Mel-17-Melanomzellen bewirken keine Stimulation der Melanotransferrin(668-684)-spezifischen T-Zelllinie.....	105
3.2.4.7 Expression von Melanotransferrin in Lungen- und Colon-Karzinomen	107

4. Diskussion.....	109
4.1 Das Selbstpeptid CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs.....	109
4.2 Massenspektrometrische Identifizierung von MHC Klasse II-restringierten Epitopen exogener Antigene.....	118
4.2.1 Übertragung von Antigenen von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle dendritischer Zellen.....	119
4.2.2 Identifizierung tumorspezifischer Neo-Antigene durch Analyse des MHC II-Repertoires dendritischer Zellen.....	122
4.2.3 Melanotransferrin(668-684): ein potentielles neues Antigen für die Tumorimmuntherapie.....	124
5. Zusammenfassung	127
6. Referenzen.....	129
7. Abkürzungsverzeichnis	145
8. Danksagungen.....	148
9. Publikationen	150
10. Wissenschaftliche Präsentationen	151
11. Verzeichnis der akademischen Lehrer	152
12. Tabellarischer Lebenslauf	153

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (Latein: immunis = frei, unberührt) ist die Gesamtheit aller Organe, Zellen und Proteine, die dem Organismus zur Abwehr von Mikroorganismen und Fremdstoffen sowie zur kontinuierlichen Eliminierung anomaler Körperzellen dienen. Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit, körpereigene von körperfremden oder veränderten Strukturen unterscheiden zu können, damit sich die Immunreaktionen nicht gegen Bestandteile des gesunden Organismus richten. Das Immunsystem der Vertebraten hat sich im Laufe der Evolution zu einer ausgesprochen komplexen Komposition von Abwehrmechanismen entwickelt, die sich in zwei Hauptsysteme gliedern:

A. Die angeborene Immunität :

Die angeborene Immunität ist für die frühe Erkennung von Krankheitserregern verantwortlich, welche die natürlichen Barrieren des Organismus, wie die Epithelien von Haut und Schleimhaut, durchbrochen haben. Sie ist in der Lage, Fremdkörper und Pathogene bereits beim ersten Aufeinandertreffen unschädlich zu machen und bedient sich dabei humoraler sowie zellulärer Faktoren.

Zu den humoralen Faktoren gehören bakterizid wirkende Substanzen, wie z.B. Verdauungsenzyme (Lysozym) oder die mehr als 20 verschiedenen Proteine des Komplementsystems, die zur Auflösung körperfremder Zellen führen können. Auch die überwiegend bei viralen Infektionen wirksamen Interferone sind Bestandteile der angeborenen, humoralen Abwehr.

Zu den zellulären Faktoren der angeborenen Abwehr gehören Granulocyten, Makrophagen, Monocyten, Mastzellen und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Zellen der angeborenen Immunität haben Rezeptoren, sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), mit denen sie konservierte Struktur motive auf pathogenen Mikroorganismen erkennen können, welche nicht auf Eukaryonten vorkommen (Janeway, 1989; Ezekowitz et al., 1990; Gordon 1995; Medzhitov and Janeway, 2000; Aderem and Ulevitch, 2000). Nach Erkennung eines Pathogens können diese Zellen, speziell Makrophagen und neutrophile Granulocyten, den Mikroorganismus phagozytieren und das Immunsystem in einen generellen Alarmzustand versetzen, indem sie inflammatorische Mediatoren freisetzen, die eine Entzündungsreaktion auslösen (Aderem and Underhill, 1999). Im Zuge der durch die Entzündungsreaktion ausgelösten Immunantwort kommt es dann auch zur Aktivierung der Bestandteile der adaptiven Immunität.

B. Die spezifische oder adaptive Immunität:

Die spezifische Abwehr entwickelt sich im Unterschied zur angeborenen Abwehr erst während der Auseinandersetzung mit dem Pathogen, weshalb man sie auch als erworbene Immunität bezeichnet. Besonderes Kennzeichen der adaptiven Immunität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Organismus gegen das erneute Eindringen des gleichen Krankheitserregers schützt.

Im Gegensatz zu den Zellen der angeborenen Immunität, die Mikroorganismen über eine limitierte Zahl von keimbahnkodierten Rezeptoren erkennen, beruht die Pathogenerkennung bei den Zellen der adaptiven Immunität auf einer Vielzahl von Antigenrezeptoren einzigartiger Spezifität. Diese Antigenrezeptoren (B-Zell-Rezeptoren bzw. Antikörper und T-Zell-Rezeptoren) gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und entstehen durch somatische Rekombination von keimbahnkodierten Genfragmenten (Tonegawa, 1983; Tonegawa, 1988; Tonegawa, 1988 b; Davis and Bjorkman, 1988), die im Falle der Antikörper eine Vielfalt von 10^{11} Antigenpezifitäten hervorbringen können (Tonegawa, 1983).

Das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität ist die klonale Selektion der Lymphocyten (Burnet, 1959). Es besagt zum einen, dass potentiell autoreaktive Lymphocyten durch klonale Deletion vernichtet werden. Zum anderen werden nur diejenigen Zellen, die einen für das vorhandene Antigen spezifischen Rezeptor tragen, selektiv zur Teilung aktiviert und vermehren sich klonal. Die Zusammensetzung der Zellen der adaptiven Immunität verändert sich also in Abhängigkeit von den vorhandenen Selbst- und Fremdanitigenen, denen der Organismus ausgesetzt ist, sie adaptiert sich.

Die spezifische Immunität verfügt über humorale und zelluläre Abwehrmechanismen:

Für die zelluläre Immunantwort sind T-Zellen verantwortlich. Diese erkennen Antigene als Peptide gebunden an sogenannte *Major Histocompatibility Complexes* (MHC-Moleküle) (Zinkernagel und Doherty, 1974) und entwickeln sich nach Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigenepitop auf den entsprechenden MHC-Molekülen (MHC-Restriktion) antigenpräsentierender Zellen (APCs) zu T-Effektorzellen. Man unterscheidet aufgrund ihrer Oberflächenmarker und Funktion zwei Arten von T-Zellen: $CD8^+$ -T-Zellen werden zu cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs), die virusinfizierte Zellen oder oncogen-transformierte Zellen direkt abtöten können (O'Rourke and Mescher, 1992; Squier and Cohen, 1994; Kägi et al., 1994). Sie erkennen Antigenepitope im Kontext von MHC Klasse I-Molekülen. $CD4^+$ -T-Zellen erkennen Antigenpeptide im Kontext von MHC Klasse II-Molekülen und entwickeln sich zu T-Helferzellen vom Typ T_H1 oder T_H2 (Abbas et al., 1996). T_H1 -Zellen sind im wesentlichen für die Aktivierung der Makrophagen verantwortlich und für die Auslösung inflammatorischer Prozesse, während T_H2 -Zellen B-Lymphocyten aktivieren und entzündungshemmend wirken.

Die humoralen Abwehrmechanismen werden durch B-Zellen vermittelt. Diese nehmen Antigene über membranständige Antikörper (B-Zell-Rezeptoren) auf und können sie auf MHC II-Molekülen den T-Zellen präsentieren (Parker, 1993). Nach Aktivierung durch T-

Helfer-Zellen können sie zu Plasmazellen differenzieren und große Mengen an neutralisierenden oder opsonierenden Antikörpern freisetzen.

Das Auslösen einer adaptiven Immunantwort beginnt, wenn in einem infizierten Gewebe ein Pathogen von einer sogenannten dendritischen Zelle (DC) aufgenommen wird. Dendritische Zellen sind das zentrale Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität. Sie setzen Cytokine frei, die beide Arten der Immunabwehr beeinflussen können und nehmen damit eine zentrale regulatorische Funktion ein, indem sie darüber entscheiden, ob und wie der Organismus auf einen Krankheitserreger reagiert.

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die einzigartig in ihrer Fähigkeit sind, naive T-Zellen zu stimulieren und primäre Immunreaktionen auszulösen. Neben der Initiierung der adaptiven Immunantwort werden ihnen aber auch eine Reihe weiterer Funktionen zugeschrieben. So sind sie an der Induktion von Toleranz in zentralen und peripheren Lymphorganen beteiligt (Stockinger, 1999; Mellman und Steinman 2001; Steinman and Nussenzweig 2002; Steinman et al., 2003) und stellen offenbar das Überleben der naiven T-Lymphocyten in der Peripherie sicher (Brocker, 1997; Viret et al., 1999; Muranski et al., 2000). Zudem regulieren sie maßgeblich die Qualität der T-Zell-Antwort, indem sie die naiven T-Zellen dazu bringen, unterschiedliche Effektorfunktionen anzunehmen und die Differenzierung und Expansion regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) bewirken (Pulendran et al., 2001; Moser, 2003). Auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems haben DCs Einfluss, indem sie Cytokine wie IL-12 oder Typ I und II Interferone freisetzen (Siegal et al., 1999; Cella et al., 1999) sowie NK- und NKT-Zellen aktivieren (Gerosa et al., 2002). Es ist bisher weitgehend unverstanden, wie DCs diese vielfältigen und zum Teil recht konträren Funktionen wahrnehmen können. Eine mögliche Erklärung ist, dass unterschiedliche DC-Subtypen, die sich aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln, die verschiedenen Aufgaben erfüllen (Modell der spezialisierten Linien). Dieser Ansicht widerspricht das Konzept der funktionellen Plastizität von DCs, welches davon ausgeht, dass die unterschiedlichen Funktionen je nach Entwicklungs- und Aktivierungsstatus sowie in Abhängigkeit vom umgebenden lokalen Milieu von ein und derselben DC-Linie wahrgenommen werden können (Kalinski et al., 1999; Liu et al., 2000; Shortman and Liu, 2002).

Humane DCs stellen eine ausgesprochen heterogene Leukocytenpopulation dar. Man unterscheidet derzeit drei verschiedene Vorläuferzellen, die im Blut zirkulieren:

- a) $CD14^+$, $CD11c^+$, $CD1a^+$, CLA^- (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*). Sie entstehen aus $CD34^+$ myeloiden Vorläuferzellen und lassen sich unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 aus Monocyten in interstitielle DCs differenzieren. Sie werden auch als „DC1“ bezeichnet.

- b) $CD14^-$, $CD11c^+$, $CD1a^+$, CLA^+ . Diese Zellen entstehen ebenfalls aus myeloiden $CD34^+$ -Vorläuferzellen. Sie entwickeln sich unter dem Einfluss von GM-CSF, IL-4 und TGF- β zu Langerhans DCs, die sich durch Expression des Antigens Langerin (CD207) auszeichnen.
- c) $CD14^-$, $CD11c^-$, $IL3Ra^+$ Plasmacytoide Monocyten. Diese Zellen entstehen aus $CD34^+$ -Zellen lymphoiden Ursprungs, denen die myeloiden Antigene CD11c, CD13 und CD33 fehlen, die dafür aber die lymphoiden Marker CD2, CD5 und CD7 exprimieren (Grouard et al., 1997; Kohrgruber et al., 1999; Spits et al., 2000). Sie differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-3 zu plasmacytoiden DCs. Diese werden auch als „DC2“ bezeichnet und produzieren Typ I Interferone.

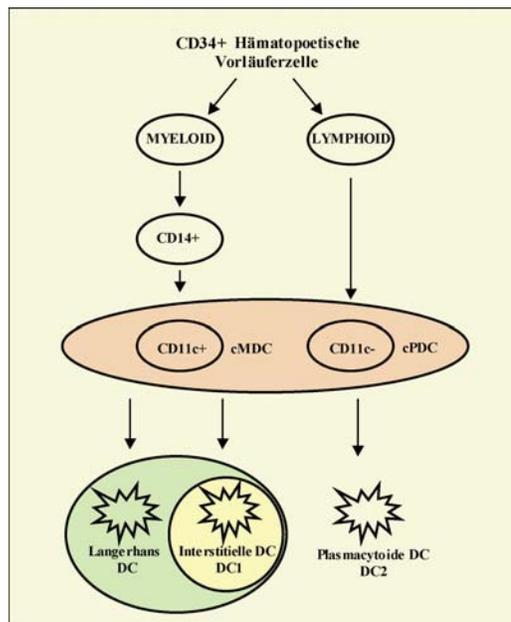


Abb. 1-1: Subtypen humaner dendritischer Zellen

Man unterscheidet 3 Subtypen humaner DCs. Langerhans DCs und interstitielle DCs gehen aus myeloiden Vorläufern hervor, plasmacytoide DCs hingegen aus lymphoiden (aus: Banchereau et al., 2001).

1.2.1 Die Reifung dendritischer Zellen

Vorläuferzellen von DCs im Blut entwickeln sich fortlaufend zu unreifen dendritischen Zellen, die sich in peripheren Geweben niederlassen. Dort warten sie auf den Kontakt mit Pathogenen. Unreife DCs zeichnen sich durch eine niedrige Expression an Oberflächen-MHC-Molekülen und costimulatorischen Molekülen aus, nehmen aber sehr effizient Antigene auf (Banchereau, 2000). Die Antigenaufnahme erfolgt teilweise über Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993) und Makropinocytose (Sallusto et al., 1995), teilweise aber auch rezeptorvermittelt. Die rezeptorvermittelte Endocytose verläuft beispielsweise über den Mannose Rezeptor (Engering et al., 1997), DEC-205 (Jiang et al., 1995), über die Fc γ -Rezeptoren (Fanger et al., 1996), den Fc ϵ -Rezeptor (Jurgens et al., 1995) CD36, $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ Integrine (Albert et al., 1998) oder Hitzeschock-Protein Rezeptoren wie CD91 (Binder et al., 2000; Becker et al., 2002).

Nach Kontakt mit dem Pathogen oder einer Substanz, welche „Gefahr“ anzeigt und damit ein Aktivierungssignal liefert („Danger“-Hypothese) (Matzinger, 2001), machen DCs eine Reihe von phänotypischen und funktionellen Veränderungen durch, welche sie von einer antigenaufnehmenden zu einer antigenpräsentierenden Zelle werden lassen und die man unter dem Begriff DC-Maturierung zusammenfasst (Banchereau et al., 2000). Die Maturierung kann durch zahlreiche Agenzien induziert werden. Diese können mikrobielle Produkte sein, wie LPS, bakterielle DNA oder dsRNA (Rescigno et al., 1999; Hacker et al., 1998; Cella et al., 1999 b), pro-inflammatorische Signale wie TNF- α , Prostaglandine, IL-1 β und IL-6 (Banchereau et al., 2000; Kaisho and Akira, 2001), T-Zell-Signale, wie CD40L (Armitage et al., 1992), OX40 (Chen et al., 1999) und TRANCE (Bachmann et al., 1999; Josien et al., 2000) oder nekrotischer Zelltod (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000). In vivo unterscheidet man dabei drei Haupt-Rezeptorfamilien, durch die die Reifung vermittelt wird: Die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) (Barton and Medzhitov, 2002; Gordon, 2002), die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptoren (Romani et al., 1996; Bender et al., 1996) und die Fc-Rezeptoren, an die Antikörper-dekorierte Pathogene binden können (de la Salle et al., 1997).

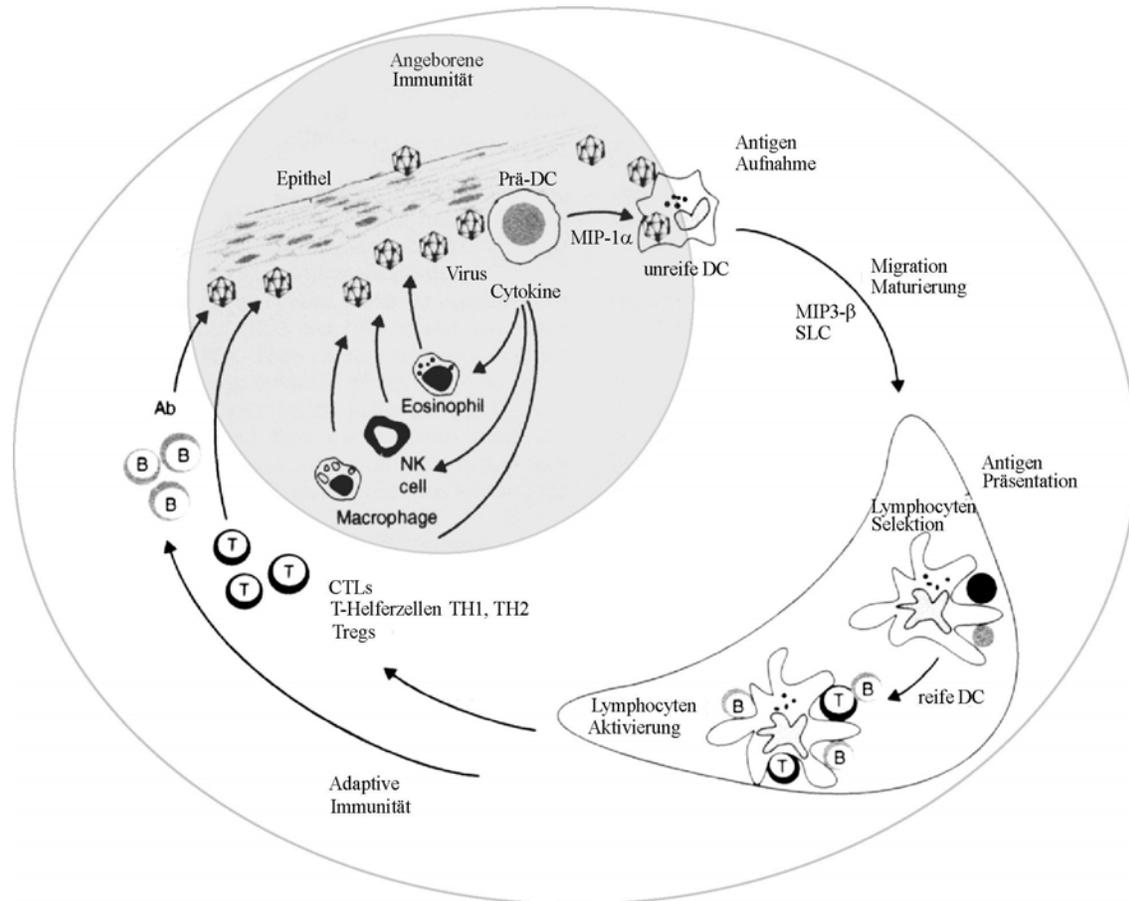


Abb. 1-2: Dendritische Zellen: Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität

DC-Vorläufer gelangen als unreife DCs in periphere Gewebe, wo sie Cytokine zur Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems ausschütten können. Nach Antigenaufnahme und Maturierung gelangen sie, angezogen von MIP-3 β und SLC in die peripheren Lymphknoten, wo sie T- und B-Zellen aktivieren und damit auch die adaptive Immunantwort in Gang setzen. (aus: Palucka and Banchereau, 2002).

Während der Maturierung vermindern DCs die Zahl ihrer Antigenrezeptoren. Sie erhöhen die Zahl an MHC I- und MHC II-Molekülen und steigern die Expression costimulatorischer und T-Zell-interagierender Moleküle wie CD80, CD86, CD40, CD58 (LFA-3) und CD54 (ICAM-1) und beginnen mit der Synthese von CD83. Auch setzt die Produktion bestimmter Chemokine (z.B. IL-8, MIP3- β , SLC) und Cytokine (z.B. TNF- α , IL-12, IL-10, IL-18) ein (Banchereau et al., 2000), die dem Anlocken naiver T-Zellen und der Regulation der T-Zell-Polarisierung dienen. Auch Wachstum und Differenzierung von B-Zellen werden direkt durch DCs beeinflusst (Dubois et al., 1998).

Zusätzlich bewirkt die Reifung auch, dass die DCs von den peripheren Regionen, in denen sie das Antigen aufgenommen haben, in die T-Zell-Regionen der angrenzenden Lymphknoten wandern. Dies geschieht im wesentlichen durch Herunterregulation der Rezeptoren für MIP-1 α und anderer Chemokine (MIP-3 α , RANTES), die unreife DCs im peripheren Gewebe halten. Gleichzeitig wird der Chemokinrezeptor CCR7 heraufreguliert, dessen Ligand das in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten produzierte MIP-3 β sowie das *secondary lymphoid-tissue chemokine* SLC ist (Yoshida et al., 1998; Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1999; Saeki et al., 1999). Im Lymphknoten angekommen, werden die DCs dann selbst zu Produzenten von MIP-3 β und SLC sowie anderen Chemokinen, um Lymphocyten chemotaktisch anzulocken (Adema et al., 1997; Tang and Cyster, 1999). Die in der Peripherie aufgenommenen Antigene werden dann naiven T-Zellen präsentiert und die adaptive Immunantwort kommt in Gang.

1.2.2 MHC Klasse II-Antigenpräsentation in dendritischen Zellen

MHC II-Moleküle sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Kette, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) als Typ 1 Transmembran-Glycoproteine synthetisiert werden. Unter dem Einfluss der Chaperone Calnexin und Invariante Kette (Ii) werden die MHC II- $\alpha\beta$ -Dimere im ER zusammengesetzt. Dabei bilden je 3 Ketten des Typ-2 Transmembran-Glycoproteins Ii, welches nicht im MHC-Lokus kodiert ist aber strikt mit der α - und β -Kette koexprimiert wird, mit je 3 α - und 3 β - Ketten einen nonameren ($\alpha\beta$)₃Ii₃-Komplex (Cresswell, 1994). Ein Teil der Polypeptidkette von Ii liegt in der durch α - und β -Kette gebildeten Peptidbindungsgrube und verhindert damit vorzeitiges Binden von Peptiden im ER (Roche and Cresswell 1990). Eine weitere Funktion von Ii ist es, mit Hilfe von zwei Di-Leucin-Sortiersignalen den nonameren Komplex vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in endocytotische MHC-II-Beladungskompartimente (MIIC-Kompartimente) zu leiten (Bakke and Dobberstein 1990). Dort findet der Abbau der Invarianten Kette durch Proteasen, im wesentlichen Cathepsin S, über mehrere Zwischenstufen statt. Finales Prozessierungsprodukt des Ii-Abbaus ist ein kurzes Stück, das sogenannte CLIP-Peptid (*Class II-associated invariant chain peptide*), das in der Bindungsgrube zurückbleibt (Riberdy et al., 1992). CLIP bindet in die Bindungsgrube aller MHC II-Varianten, hat aber zum Teil recht verschiedene Bindungsaffinitäten für die unterschiedlichen Haplotypen (Sette et al. 1995). CLIP wurde in

der bisherigen Literatur als nichts weiteres als ein Beladungsintermediat angesehen, welches ausgetauscht werden muss, damit Antigenpeptide auf MHC II-Moleküle geladen werden können (Romagnoli and Germain, 1994). Dies geschieht bei einigen MHC-Typen unter den endosomal-lysosomal pH-Bedingungen spontan, vermittelt durch die allosterische Interaktion des CLIP-N-Terminus mit einer Effektorstelle außerhalb der MHC II-Bindungsgrube (Kropshofer et al., 1995). Effizienter wird der Austausch von CLIP gegen Antigenpeptide aber durch das nicht-klassische MHC II-Molekül HLA-DM katalysiert (Sloan et al., 1995; Denzin and Cresswell, 1995; Sherman et al., 1995).

Ebenso wie MHC II-Moleküle besteht auch HLA-DM aus einer α - und einer β -Kette, die im MHC-Genlocus kodiert sind. Sie bilden allerdings keine Peptidbindungsgrube und HLA-DM ist daher nicht in der Lage, Peptide zu binden (Kropshofer et al., 1997; Mosyak et al., 1998). Im Gegensatz zu den klassischen MHC Molekülen, weist HLA-DM einen nur sehr limitierten Polymorphismus auf. Die Sortierung von HLA-DM in die MHC II-Beladungskompartimente geschieht über ein sogenanntes Tyrosin-Sortierungsmotiv am C-Terminus der β -Kette.

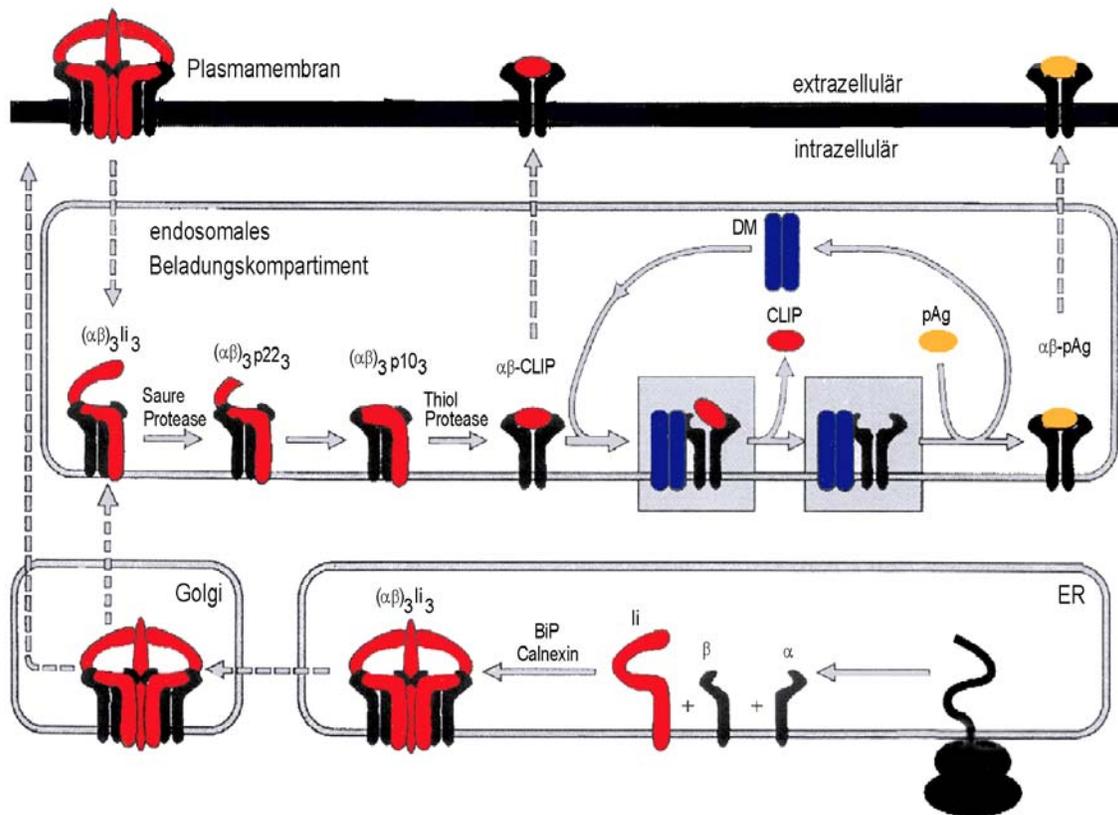


Abb. 1-3: Zusammenbau, Transport und Beladung von MHC Klasse II-Molekülen

Der Zusammenbau des nonameren Komplexes $(\alpha\beta)_3Ii_3$ erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Von dort wird er über den Golgi-Komplex in die endosomal/lysosomalen Beladungskompartimente transportiert. Hier findet der Abbau von Ii schrittweise vom C-Terminus her statt über die Zwischenstufen Iip22 und Iip10 bis schließlich nur noch CLIP in der Bindungsgrube verbleibt. HLA-DM katalysiert den Austausch von CLIP und die Beladung mit Antigenpeptiden für die Präsentation an der Zelloberfläche (modifiziert aus: Busch and Mellins, 1996).

HLA-DM hat mehrere Funktionen: Zum einen agiert es als MHC II-Chaperon, indem es leere MHC II $\alpha\beta$ -Dimere stabilisiert und deren Aggregation verhindert (Kropshofer et al., 1997 b). Die Interaktion von DM mit MHC II-Molekülen scheint eine offene Übergangskonformation der Peptidbindungsgrube zu stabilisieren und dabei die Assoziation und Dissoziation von Peptiden zu begünstigen. Die Expression von leeren, peptidrezeptiven MHC II-Molekülen auf der Oberfläche von unreifen DCs (Santambrogio et al., 1999; Santambrogio et al., 1999b) könnte daher durch die Expression von HLA-DM auch auf der Zelloberfläche von unreifen DCs ermöglicht werden (Arndt et al., 2000). Eine weitere Aufgabe von HLA-DM besteht in seiner *Editing*-Funktion (Kropshofer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997). HLA-DM agiert wie ein Enzym, da ein Molekül DM die Peptidbeladung zahlreicher MHC II-Moleküle katalysieren kann. Es sorgt aber nicht nur für den Austausch des Beladungsintermediats CLIP, sondern aller Peptide mit niedriger kinetischer Stabilität, d.h. hoher intrinsischer Dissoziationsrate. Erst wenn ein Peptid mit hoher kinetischer Stabilität in der Bindungsgrube gebunden hat, ist die Dissoziationsgeschwindigkeit von HLA-DM höher als die des Peptids und das Peptid bleibt stabil gebunden (Kropshofer et al., 1996). HLA-DM nimmt also eine Qualitätskontrolle vor und selektiert auf die Bindung stabiler Peptid-MHC II-Komplexe. Die Stabilität eines MHC II-Peptid-Komplexes wird im wesentlichen von der Interaktion der Ankeraminosäuren des Peptids mit den Bindungstaschen der Peptidbindungsgrube bestimmt, hängt aber auch von der Länge des Peptids ab (Kropshofer et al., 1996; Weber et al., 1996).

Ein weiteres, nicht-klassisches MHC Klasse II-Molekül, HLA-DO, wird in B-Zellen exprimiert und ist eng mit HLA-DM assoziiert. HLA-DO beeinflusst die Aktivität von HLA-DM: Es konnte sowohl ein aktivitätssteigernder (Kropshofer et al., 1998) als auch ein aktivitätsvermindernder (Denzin et al., 1997; Van Ham et al., 1997; Alfonso et al., 1999; Brocke et al., 2002) Einfluss auf HLA-DM gezeigt werden. In dendritischen Zellen ist die Expression von HLA-DO im Gegensatz zu B-Zellen und thymalen Epithelzellen äußerst gering bis abwesend (Alfonso and Karlsson, 2000; Chen et al., 2002).

Unreife dendritische Zellen exprimieren nur geringe Mengen an MHC II auf der Zelloberfläche. Der Großteil ihrer MHC II-Moleküle befindet sich in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten. Nach Induktion der DC-Reifung gelangen die MHC II-Moleküle an die Zelloberfläche, und es setzt gleichzeitig die Neusynthese ein (Cella et al., 1997).

Über die Mechanismen, welche die Expression und Beladung von MHC II-Molekülen in DCs kontrollieren, herrscht derzeit noch Uneinigkeit. Zumindest scheint es Unterschiede in der Kontrolle der MHC II-Expression in murinen und humanen DCs zu geben:

Nach Auffassung eines Modells werden in murinen, unreifen DCs die neusynthetisierten MHC II-Moleküle in lysosomalen Kompartimenten zurückgehalten und gelangen nicht an die Zelloberfläche (Pierre et al., 1997). Grund dafür ist, dass Ii nur unvollständig, d.h. bis zum Iip10 Fragment abgebaut wird und daher das lysosomale Retentionssignal in der cytosolischen Domäne von Ii erhalten bleibt. Dieser unvollständige Abbau von Ii in unreifen, murinen DCs ist auf die Inhibition der für die terminalen Abbauschritte notwendigen Protease

Cathepsin S durch Cystatin C zurückzuführen (Pierre and Mellman, 1998). Die Folge dieser unvollständigen Ii-Prozessierung ist, dass unreife Maus-DCs nicht in der Lage sind, Peptid-MHC-Komplexe zu bilden (Inaba et al., 2000; Turley et al., 2000). Zudem sind unreife DCs nur in sehr begrenztem Maß dazu in der Lage, aufgenommene Antigene zu prozessieren. Diese werden zwar zu Lysosomen dirigiert, dort aber nicht proteolytisch gespalten (Inaba et al., 2000). Unreife DCs sind nach diesem Modell nicht in der Lage, Selbst- oder Fremdpeptid-MHCs zu präsentieren. Erst nach Initiierung der DC-Reifung lässt die Cystatin C-Aktivität nach und Peptid-MHC-Komplexe können gebildet werden und an die Zelloberfläche gelangen. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass erst nach DC-Maturierung durch Aktivierung der V-ATPase in Lysosomen eine Azidifizierung und damit ein für den proteolytischen Abbau von Antigenproteinen günstiger pH-Wert erreicht werden kann (Trombetta et al., 2003).

Im deutlichen Gegensatz dazu steht ein anderes Modell, welches davon ausgeht, dass die Regulation der MHC II Expression in DCs unabhängig vom Ii-Abbau erfolgt (Villadangos et al., 2001) und vielmehr durch die unterschiedliche endocytotische Aktivität unreifer und reifer DCs kontrolliert wird. Nach diesem Modell werden MHC II Peptid-Komplexe auch von unreifen DCs gebildet und an die Zelloberfläche transportiert, allerdings von dort sehr schnell wieder re-endocytiert. Nach Reifung der DCs nimmt die Endocytosegeschwindigkeit ab und damit die Halbwertszeit der Peptid-MHC II-Komplexe auf der Zelloberfläche zu. Zusätzlich beginnt die MHC II-Neusynthese, sodass die Zahl der MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche ansteigt. Dieses Modell wird durch Untersuchungen an humanen DCs unterstützt, wonach Peptid-MHC II-Komplexe auch in unreifen DCs die Zelloberfläche erreichen, ihre Halbwertszeit auf der Zelloberfläche während der Reifung aber von ca. 10 h auf über 100 h ansteigt (Cella et al., 1997).

Obwohl die Antigenpräsentation auf MHC II-Molekülen dendritischer Zellen ein für die Initiierung und Regulation der adaptiven Immunantwort sehr entscheidender Schritt ist, sind die Mechanismen der Kontrolle der Peptid-MHC II-Generierung und Präsentation bisher nicht vollständig verstanden. Die sich aus den beiden dargelegten Modellen ergebenden Fragen sind daher: Sind auch unreife DCs in der Lage, Selbstpeptid-MHC II-Komplexe zu präsentieren? Welcher Natur sind diese Peptid-MHC II-Komplexe und wie unterscheiden sie sich von denen reifer DCs? Wie wird die Generierung und Präsentation von Peptid-MHC II-Komplexen in unreifen und reifen DCs kontrolliert?

1.2.3 Die immunologische Synapse zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen

Die hochgradig organisierte molekulare Struktur, die sich an der Kontaktfläche zwischen T-Zelle und APC ausbildet, wird als immunologische Synapse (Norcross, 1984) bzw. *Supramolecular Activation Cluster* (SMAC) bezeichnet (Monks et al., 1998). Sie bildet sich bereits in den ersten Minuten des T-Zell-APC-Kontaktes. Die Anordnung der Moleküle in der immunologischen Synapse gliedert sich in einen zentralen (cSMAC) und einen peripheren (pSMAC) Bereich (Monks et al., 1998). Im cSMAC kommt es zur Anreicherung von TCR-CD3-Komplexen, MHC-Peptid-Komplexen, CD4, CD28-CD80/CD86-Interaktionen, CD2-CD58-Komplexen und von Signalmolekülen wie Lck, Fyn und ZAP-70. Um diesen Bereich herum bildet sich ein Ring aus ICAM-1, welches mit LFA-1 interagiert und den pSMAC darstellt (Grakoui et al., 1999; Bromley et al., 2001; Bromley et al., 2001 b). Der pSMAC ist für die Verankerung von T-Zelle und APC verantwortlich, während im cSMAC die Antigenpräsentation und Signalweiterleitung stattfindet. Der initiale Kontakt zwischen beiden Zellen wird offenbar durch die Interaktion von ICAM-3 mit seinem Liganden sowie durch die Wechselwirkung von ICAM-1 mit LFA-1 hergestellt, die erst während der Maturierung der Synapse in den peripheren Bereich wandern (Montoya et al., 2002; Grakoui et al., 1999). Die Ausbildung der Synapse in der beschriebenen Weise wurde ursprünglich für die Interaktion von T-Zellen mit B-Zellen oder künstlichen Lipidschichten beschrieben. Jüngste Studien haben gezeigt, dass es auch während der Interaktion von reifen dendritischen Zellen mit naiven T-Zellen, also während des sogenannten T-Zell-Primings, zur Ausbildung stabiler immunologischer Synapsen kommt, welche die gleiche molekulare Struktur aufweisen, wie die bei der Interaktion von T-Zellen und B-Zellen (Benvenuti et al., 2004). Unklar ist, ob sich die hochgradig organisierte Struktur stabiler Synapsen zwischen naiven T-Zellen und DCs nur in einer antigenabhängigen Weise und nur zwischen reifen DCs und T-Zellen bilden kann, wie kürzlich beschrieben wurde (Benvenuti et al., 2004), oder, wie eine frühere Studie zeigte, sich offenbar auch in Abwesenheit eines Antigens ausbilden kann und auf der Interaktion von MHC-Selbstpeptiden mit TCRs oder sogar nur auf der Interaktion von Adhäsionsmolekülen basiert (Revy et al., 2001). Auch die Wechselwirkungen zwischen naiven T-Zellen und DCs in Synapsen, die sich ohne Fremdartigen ausbilden, führen aber offenbar zur Signaltransduktion in T-Zellen (Kondo et al., 2001; Revy et al., 2001).

1.2.4 T-Zell-Priming und Polarisierung

Die Aktivierung naiver $CD4^+$ -T-Zellen ist ein entscheidender Schritt in der Auslösung der adaptiven Immunität, da über sie die Art der Immunantwort im wesentlichen kontrolliert wird. Die Stimulierung und klonale Vermehrung einer naiven T-Zelle nach dem ersten Kontakt mit Antigen auf der Oberfläche einer APC bezeichnet man als *Priming*. DCs sind einzigartig in ihrer Effizienz, naive T-Zellen zu primen. Neben Peptid-MHC-Komplexen und T-Zell-Rezeptoren (TCRs) interagieren eine Vielzahl weiterer Moleküle miteinander, um den Kontakt zwischen T-Zellen und DCs herzustellen. Die ersten Wechselwirkungen werden durch Adhäsionsmoleküle hergestellt. Dies sind auf Seiten der naiven T-Zelle die Integrine LFA-1, CD2 (LFA-2) und ICAM-3 (CD50), auf Seiten der DC deren Liganden ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), LFA-3 (CD58) und DC-SIGN (Hauss et al., 1995; Ganpule et al., 1997; Bachereau and Steinman, 1998; Bell et al., 1998). Auch die Interaktion der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 mit ihrem Liganden CD28 sind wichtig für die Wechselwirkung von DCs und T-Zellen (Caux et al., 1994; Inaba et al., 1994; Gonzalo et al., 2001).

Nach dem *Priming* beginnen $CD4^+$ -T-Zellen mit der Proliferation und der funktionellen Differenzierung. Die $CD4^+$ -T-Zellen können dabei mindestens 3 unterschiedliche Phänotypen annehmen, den T_H1 , den T_H2 und den unpolarisierten T_H0 Phänotyp. T_H1 -Zellen sind im wesentlichen für die Auslösung der zellulären Immunantwort verantwortlich: sie aktivieren Makrophagen, aktivieren DCs dazu, $CD8^+$ -T-Zellen effizient zu primen und sezernieren eine Reihe pro-inflammatorischer Cytokine wie $IFN-\gamma$, GM-CSF sowie $TNF-\alpha$. T_H2 -Zellen hingegen sind für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich, sezernieren B-Zell-stimulierende Cytokine wie IL-4, IL-5 und anti-inflammatorische wie IL-10 und $TGF-\beta$. Ihnen wird auch eine protektive Wirkung bei Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (Hunter and Reiner, 2000; Lenschow et al., 1996). Eine Reihe unterschiedlicher Parameter in der Interaktion von DCs mit naiven T-Zellen hat Einfluss auf die Balance zwischen T_H1 - und T_H2 -Zell-Polarisierung. Am ausschlaggebendsten ist das Cytokinmilieu: IL-12 fördert stark die T_H1 -Polarisierung, IL-4 hingegen bewirkt T_H2 -Polarisierung (Trinchieri and Scott, 1995; Seder and Paul, 1994). Aber auch die Antigenendosis (Hosken et al., 1995; Langenkamp et al., 2000), die Länge und Intensität der Antigenstimulation (Constant et al., 1995; Iezzi et al., 1999), die Art der costimulatorischen Moleküle (Kuchroo et al., 1995) sowie der Maturierungsstatus der DCs (Langenkamp et al., 2000) nehmen maßgeblich Einfluss auf das Ergebnis der T-Zell-Polarisierung.

Dendritische Zellen sind offenbar auch in der Lage, regulatorische T-Zellen zu induzieren (Jonuleit et al., 2001; Yamazaki et al., 2003), welche die T-Zell-Aktivierung inhibieren (Mason and Powrie, 1998; Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000). Von welchen Umständen die Induktion dieser Zellen abhängt ist aber noch weitgehend unbekannt.

1.2.5 Die Bedeutung der Präsentation von MHC II-Selbstpeptiden auf DCs für die periphere Toleranz und die Regulation der T-Zell-Aktivität.

Neben exogenen Fremdanthigenen nehmen DCs auch exogene Selbstproteine z.B. aus Geweben auf und präsentieren endogene Selbstpeptide auf ihren MHC II-Molekülen. Die Präsentation von Selbstpeptiden durch reife DCs kann daher potentiell in der Auslösung einer Autoimmunreaktion resultieren. Zwar werden während der Reifungsphase der T-Lymphocyten in den medullären Epithelzellen des Thymus diejenigen T-Zell-Klone deletiert, deren TCR eine hohe Affinität für MHC-Selbstpeptide besitzt (von Boehmer and Kisielow, 1990), die zentrale Toleranzinduktion ist aber unvollständig. Offenbar sind eine Vielzahl von T-Zellen mit niedriger Affinität für Selbstantigene in der Lage, der negativen Selektion im Thymus zu entgehen (Bouneaud et al., 2000). Zudem mag es Selbstproteine geben, gegen die Toleranz erforderlich ist, die aber nicht im Thymus präsentiert werden, sondern nur in spezialisierten Geweben vorkommen (Lo et al., 1989; Anderson et al., 2002) oder in späteren Phasen des Lebens auftreten, wenn das Lymphocyten-Repertoire bereits gebildet ist (Matzinger, 1994). Periphere Toleranzmechanismen müssen daher also die zentrale, thymale Toleranz komplementieren (Rocha and von Boehmer, 1991; Jones et al., 1990; Powrie and Maloy, 2003). Den dendritischen Zellen wird bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine zentrale Position zugeschrieben (Steinman, 2003; Steinman and Nussenzweig, 2002). Für die Mechanismen, über die DCs in der Peripherie für Toleranz gegenüber „Selbst“ sorgen, werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Die Präsentation von Selbstpeptiden durch unreife DCs könnte unter *Steady State*-Bedingungen Toleranz induzieren, da unreifen DCs costimulatorische Moleküle fehlen. Die Präsentation von Peptid-MHC-Komplexen ohne costimulatorisches Signal führt bei erkennenden T-Zellen zu Anergie (Greenfield et al., 1998). Auch gibt es Hinweise darauf, dass selbstreaktive T-Zellen in der Peripherie deletiert werden könnten (Hawiger et al., 2001). Ein anderer Mechanismus könnte die indirekte Tolerisierung selbstreaktiver T-Zellen über regulatorische T-Zellen sein, die große Mengen an IL-10 und TGF- β produzieren (Roncarolo et al., 2001). Unreife DCs sind in der Lage, T_{regs} zu induzieren (Jonuleit et al., 2001; Menges et al., 2002). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass ebenso reife DCs regulatorische CD4⁺CD25⁺-T-Zellen stimulieren können (Yamazaki et al., 2003). Bei Autoimmunreaktionen zeigten reife DCs zudem effizientere protektive Effekte als unreife DCs, indem sie T_H2-Antworten auslösten (Lenschow et al., 1996; Feili-Hariri et al., 1999; Salomon et al., 2000). Das anti-inflammatorische Cytokinmilieu der T_H2-Antworten trägt offenbar zur Verhinderung autoreaktiver Prozesse bei und sorgt damit in der Peripherie ebenfalls für Selbsttoleranz.

Selbstpeptid-MHC II-Komplexe haben also sowohl eine Funktion als Liganden für die positive und negative Selektion von Thymocyten als auch, wie eben beschrieben, für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Zudem scheinen sie für das Überleben naiver T-Lymphocyten essentiell zu sein (Brocker, 1997; Viret et al., 1999). Neueste Studien deuten zudem darauf hin, dass Selbstpeptide eine bedeutende Rolle für die Antigenerkennung und

Regulation der T-Zell-Aktivität gegenüber Fremdanitigenen spielen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass endogene Selbstpeptid-MHC II-Komplexe als „akzessorische Liganden“ die Bildung der immunologischen Synapse unterstützen und zur T-Zell-Signaltransduktion beitragen (Wülfing et al., 2002). Zudem könnten sie dem TCR das Auffinden seines passenden MHC-Peptid-Liganden erleichtern, indem sie schwache Wechselwirkungen mit dem TCR eingehen und ihn so zum Fremdpeptid-MHC II leiten (Wu et al., 2002). Welchen Einfluss MHC II-Selbstpeptide nun genau auf die Regulation der T-Zell-Aktivierung haben, ist allerdings noch umstritten. So zeigt z.B. eine Studie, dass Selbstpeptide die T-Zell-Reaktion gegenüber Fremdpeptiden dämpfen, indem sie zum einen die Aktivierbarkeitsschwelle anheben und zum anderen regulatorische T-Zellen aktivieren (Bandhoola et al., 2002). Eine andere Studie hingegen zeigt, dass die Gegenwart von Selbstpeptiden die Sensitivität des T-Zell-Rezeptors gegenüber Fremdpeptiden sogar steigert (Stefanova et al., 2002).

1.3 Die Immunität gegenüber Krebs

Mit ca. 25 % aller Todesfälle ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in westlichen Industrienationen. Die Inzidenz mancher Tumore steigt stark an, so z.B. die des malignen Melanoms mit über 4 % pro Jahr (Agarwala, 2002). Trotz intensiver Bemühungen ist eine wirksame Therapie gegen Krebs bis heute nicht entwickelt worden. Die Standardbehandlungsmethoden - chirurgische Entfernung des Tumors mit anschließender Bestrahlungs- oder Chemotherapie - haben sich innerhalb der letzten Jahrzehnte zwar verbessert, sie sind aber von schweren Nebenwirkungen begleitet und zeigen bei einigen Tumorarten nur sehr begrenzte Wirkung. Eine wesentliche Hoffnung zur Bekämpfung von Krebs liegt daher in der Idee, eine Immunreaktion zu induzieren, welche in der Lage ist, zwischen „Selbst“ und anomalem „Selbst“ zu unterscheiden, eine Idee, die erstmals 1890 von Paul Ehrlich und William Coley geäußert wurde (Ehrlich, Pergamon, London, 1956; Coley, 1896).

Das Immunsystem ist darauf spezialisiert, fremde Eindringlinge zu eliminieren, ohne dabei körpereigenes Gewebe zu zerstören. Es verfügt daher über zahlreiche Schutzmechanismen, um Autoimmunreaktionen zu unterbinden. Tumorzellen gehen aus körpereigenem Gewebe hervor und besitzen einen Phänotyp, der dem normaler Körperzellen unter Umständen sehr ähnelt und vom Immunsystem folglich als „Selbst“ erkannt werden kann. Da in Studien mit immundeprimierten Mäusen keine Erhöhung der Tumorzinzidenz beobachtet werden konnte (Stutman, 1975), war ein Vorhandensein natürlicher, tumorspezifischer Abwehrmechanismen häufig in Zweifel gezogen worden. Dass Tumore durchaus immunogen sind, konnte aber an syngenen Mäusen gezeigt werden, die nach vorheriger Immunisierung mit Krebszellen das Wachstum implantierter Tumore gleichen Ursprungs verhinderten und zudem eine Anreicherung tumorspezifischer CTLs aufwiesen (Prehn and Main, 1957; Klein et al., 1960).

Auch humane tumorinfiltrierende Lymphocyten (TILs) zeigen tumorspezifische Lyse-Aktivität (Itoh, 1987; Topalian et al., 1989, Lee et al., 1999). In immundeprimierten Patienten konnte außerdem ein erhöhtes Auftreten einiger Tumorarten auch nicht-viralen Ursprungs gezeigt werden (Gatti and Good, 1971; Sheil, 1986). Die Fähigkeit des Immunsystems, Krebszellen aufzuspüren und zu zerstören, wird als Immunüberwachung (*immune surveillance*) (Burnet, 1967) bezeichnet, und in der Tat scheinen Wachstum und metastatische Verbreitung von Tumoren stark von ihrer Fähigkeit abzuhängen, der Immunüberwachung und den Abwehrmechanismen des Organismus zu entgehen. Das Aufspüren von Tumorzellen durch das Immunsystem setzt aber die Expression immunogener Determinanten auf den Tumorzellen voraus.

Der Prozess der malignen Transformation ist ein vielstufiges Geschehen, bei dem es durch Mutationen in Tumorsuppressor-Genen, Transkriptionsregulatoren, Proto-Oncogenen und ähnlichen Genen zur Dysregulation der Zell-Proliferation und zur veränderten Expression zahlreicher zellulärer Proteine kommt (Fearson and Vogelstein, 1990). Das Proteom einer Tumorzelle unterscheidet sich also von dem seiner nicht-neoplastischen Vorläuferzelle. Die tumorassoziierten Proteine, welche immunogene Determinanten hervorbringen, die vom Immunsystem erkannt werden können, bezeichnet man als Tumorantigene. Mehrere unterschiedliche Klassen von Tumorantigenen sind definiert worden (Stevanovic, 2002):

1.) Cancer-testis Antigene:

Es handelt sich hierbei um Proteine, die von Spermatozoen, nicht aber von normalen somatischen Zellen exprimiert werden. Aus noch nicht verstandenen Gründen tritt ihre Expression in manchen Tumorzellen wieder auf. Da Spermatozoen keine klassischen MHC-Moleküle exprimieren und daher nicht die entsprechenden MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentieren können, sind die Cancer-testis Antigene quasi tumorspezifisch. Bekannte Vertreter dieser Gruppe von Tumorantigenen sind z.B. Proteine der MAGE- (van der Bruggen et al., 1991), GAGE- (Van den Eynde et al., 1995) und BAGE- (Boel et al., 1995) Familie sowie NY-ESO (Chen et al., 1997).

2.) Mutierte oder einzigartige Tumorantigene:

Aufgrund der genomischen Instabilität kommt es in Tumorzellen häufig zu Mutationen. Diese können z.B. neue tumorspezifische MHC-Liganden hervorbringen (Wölfel et al., 1995; Wang et al., 1999; Pieper et al., 1999), neue Fusionsproteine generieren (Wang et al., 1999 b) oder zu alternativen Transkriptionen (Gaugler et al., 1996) oder gar zur Transkription von Pseudogenen (Moreau-Aubry et al., 2000) und Intronsequenzen (Guilloux et al., 1996; Lupetti et al., 1998) führen, welche dann neue MHC-Epitope liefern, die von T-Zellen erkannt werden können. Prominente Beispiele dieser Gruppe von Tumorantigenen sind CDK4, β -Catenin, CDC27 und TPI.

3.) Virale Tumorantigene:

Virale Proteine, die unter Umständen am Orogeneseprozess beteiligt sind, stellen Tumorantigene dar, z.B. HPV16 E7 (Ressing et al., 1995).

4.) Gewebsspezifische Differenzierungsantigene:

Dies sind Proteine, die nur in den Tumorzellen sowie dem entsprechenden Normalgewebe exprimiert werden, aus denen der Tumor hervorgegangen ist. Prominenteste Beispiele dafür sind die melanocytenspezifischen Antigene (Houghton et al., 1982). In Melanompatienten kommt es häufig zur Erkennung dieser Differenzierungsantigene durch Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen. Bekannte Beispiele sind Tyrosinase (Topalian et al., 1996; Brichard et al., 1996), Gp100 (Kawakami et al., 1998; Li et al., 1998) sowie TRP-1 und TRP-2 (Wang et al., 1996; Wang et al., 1998).

5.) Überexprimierte Proteine:

Häufig kommt es im Zuge der Carcinogenese zur Überexpression bestimmter Proteine, die dem Tumor einen Überlebensvorteil verleihen oder seiner raschen Expansion dienlich sind. Die starke Überexpression dieser Proteine kann sie für eine tumorspezifische Immunreaktion relevant machen. Ein Beispiel für diese Gruppe von Tumorantigenen ist der Tyrosinkinase-Rezeptor erbB-2 (Her2/neu) (Fisk et al., 1995).

Obwohl die meisten Tumore Antigene exprimieren, die, wie die Analyse tumorinfiltrierender Lymphocyten zeigte, auch bis zu einem gewissen Maß vom Immunsystem erkannt werden (Muul et al., 1987; Itoh, 1987; Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 1994), so kommt es doch in den meisten Fällen zu keiner oder zu einer nur sehr unvollständigen Antitumor-Immunantwort. Der vermutliche Grund dafür liegt in der Fähigkeit vieler Tumore, die Immunfunktionen auf unterschiedliche Weise zu unterdrücken und damit immunologische Toleranz zu induzieren. Verschiedene Mechanismen sind beschrieben worden:

Bei vielen Tumorantigenen handelt es sich um normale zelluläre Proteine, die auf Tumorzellen überexprimiert werden. Diese Proteine sind daher unter Umständen nur schwach immunogen und nicht in der Lage, eine vollständige Immunreaktion auszulösen. Die genetische Instabilität vieler Krebszellen sorgt zudem dafür, dass sich Tumore fortlaufend verändern und damit Tumorantigene, gegen die eine Immunreaktion primär ausgelöst wurde, wieder verloren gehen (Boon et al., 1994). Teilweise kommt es sogar zum Verlust von MHC-Molekülen, sodass die Antigenepitope den T-Zellen nicht mehr präsentiert werden können (Ferrone and Marincola, 1995), oder zum Verlust von costimulatorischen Molekülen, wodurch potentiell reaktive T-Zellen anergisiert werden können (Harding et al., 1992). Manche Tumore sind außerdem in der Lage, immunsuppressive Cytokine wie VEGF, TGF- β oder IL-10 freizusetzen (Gabrilovich et al., 1996; Tada et al., 1991; Elgert et al., 1998; Salazar-Onfray, 1999) oder die DC-Maturierungsfähigkeit zu beeinträchtigen (Ishida et al.,

1998; Shurin et al., 2002). Auch die Beteiligung regulatorischer T-Zellen an der Induktion der Toleranz gegen Tumore konnte gezeigt werden (Sutmuller et al, 2001; Van Elsas et al., 2001).

Während der Auseinandersetzung mit dem Immunsystems kann es zu Veränderungen des Tumors kommen, der sich entsprechend adaptiert, um der Immunüberwachung zu entgehen. Man bezeichnet diesen Prozess auch als „Immuneditierung“ (Dunn et al., 2002). Es ist davon auszugehen, dass die Immunüberwachung in der Lage ist, viele der transformierten Zellen, die im Organismus entstehen, zu eliminieren. Diejenigen Tumorzellen aber, die trotzdem weiter proliferieren und metastasieren und schließlich klinisch relevant werden, sind entsprechend dem gezeigten Modell (s. Abb.1-4) durch die Abwehrmechanismen des Organismus selektiert worden und haben Mechanismen entwickelt, sich zu verbreiten, ohne ein für sie letales Maß an Immunität zu erzeugen. Die grundlegende Strategie einer immuntherapeutischen Intervention gegen Krebs sollte es daher sein, die Immunogenizität von Tumoren zu erhöhen, um eine vollständige Eliminierung aller Tumorzellen zu erreichen.

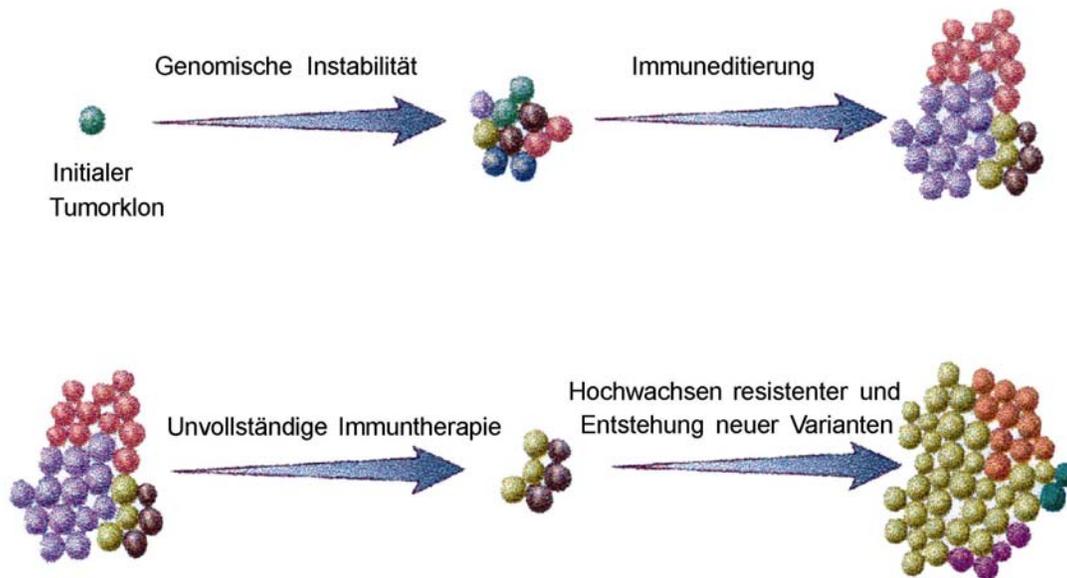


Abb. 1-4: Modell der Entstehung immunresistenter Tumore

Die genetische Instabilität von Tumorzellen sorgt für ein gehäuftes Auftreten von Mutationen, die zu unterschiedlichen Zellvarianten führen. Die *Immune surveillance* sorgt für die Elimination einiger dieser transformierten Zellen. Bestimmte Krebszellvarianten können der Immunüberwachung aber entgehen und Wachsen zu Tumoren aus. Immuntherapien, beispielsweise Vakzinierungen gegen nur ein einzelnes Tumorantigen, können eine transienten Regression des Tumors bewirken. Der Verlust des Tumorantigens macht einige Krebszellen unanfällig für die Therapie und sorgt für ein erneutes Hochwachsen des Tumors (modifiziert aus: Khong and Restifo, 2002).

1.3.1 Immuntherapien gegen Tumore

Eine Vielzahl von therapeutischen Strategien ist bisher angewendet worden, um wirkungsvolle Immunreaktionen gegen Tumorzellen auszulösen. Der Fokus vieler dieser Therapien liegt darauf, die Toleranz vorhandener, tumorspezifischer T-Zellen zu durchbrechen und sie zu aktivieren.

Eine Möglichkeit, dieses zu erreichen, ist der Einsatz von Cytokinen. Speziell IL-2 und IL-12 spielen für die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen eine wesentliche Rolle und sind bereits vielfach, zum Teil allerdings mit sehr limitiertem Erfolg eingesetzt worden. Teilweise werden die Cytokine systemisch verabreicht, teilweise TILs ex vivo stimuliert und dann reinjiziert (Bronte et al., 1995; McLaughlin et al., 1996; Brunda et al., 1993; Rao et al., 1996). Auch der Einsatz von GM-CSF zeigte verstärkende Effekte auf antigenspezifische T-Zell-Reaktionen (Disis et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit ist die Bereitstellung costimulatorischer Signale bzw. die Blockierung inhibitorischer Signale. Dazu werden Tumorzellen mit costimulatorischen Molekülen transfiziert (Townsend and Allison, 1993; Townsend et al., 1994; Allison et al., 1995) oder es werden anti-CD28-anti-Tumorantigen bispezifische Antikörper (Renner et al., 1994) oder entsprechende Fusionsproteine generiert (Marshall and Marks, 2001). Auch die Verabreichung anti-CTLA-4 spezifischer Antikörper konnte die T-Zell-Antwort gegenüber Tumoren steigern (Leach et al., 1996; Kwon et al., 1997).

Die Identifizierung des ersten tumorspezifischen T-Zell-Epitops aus dem Cancer-testis-Tumorantigen MAGE zu Beginn der 90iger Jahre (van der Bruggen et al., 1991) machte den Weg frei für die Entwicklung von Krebsvakzinen. Diese beruhen auf dem Einsatz von Antigenpeptiden, die entweder alleine (Jäger et al., 1996) oder in Kombination mit Cytokinen (Jäger et al., 1996 b; Jäger et al., 2000) verabreicht werden und spezifische T-Zellen aktivieren. Besonderes Augenmerk ist auf den Einsatz von DCs in Vakzinierungsansätzen gelegt worden, da sie als professionelle antigenpräsentierende Zellen speziell für die Aktivierung von T-Zellen geeignet sind. Sie lassen sich mit tumorspezifischen Peptiden oder Proteinen oder gar Tumorzell-Lysaten beladen oder mit Tumorantigen-spezifischer DNA transfizieren und können dann als Vakzine eingesetzt werden. In vielen dieser Studien konnten Tumorregressionen beobachtet werden (Nestle et al., 1998; Rosenberg et al., 1998; Thurner et al., 1999), vielfach waren diese aber nur transienter Natur und führten nicht zur vollständigen Elimination des Tumors (Lee et al., 1999; Panelli et al., 2000; Panelli et al., 2000 b).

Ein möglicher Grund für die bisher sehr limitierten Erfolge der Anti-Tumor-Vakzinierung ist neben dem Auftreten resistenter Varianten (s. Abb. 4-1) die ineffiziente Aktivierung des T-Zell-Systems. Bisherige Vakzinierungsstrategien haben sich auf die Aktivierung von CTLs fokussiert, für die es bereits eine Vielzahl von T-Zell-Epitopen gibt, da CTLs in der Lage sind, MHC I-exprimierende Tumore, die entsprechendes Tumorantigen tragen, direkt zu lysieren. Eine vollständige Immunantwort umfasst allerdings sowohl die Aktivierung von

CD8⁺-T-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen. Bisher sind tumorspezifische CD4⁺-T-Zell-Epitope erst in sehr wenigen klinischen Vakzinierungsversuchen eingesetzt worden (Slingluff et al., 2001; Brossart et al., 2000) und es sind nur wenige tumorspezifische MHC II-Peptide bekannt. Die gleichzeitige Stimulation von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen wird für die Induktion einer langanhaltenden Anti-Tumor-Immunantwort als essentiell angesehen (Topalian, 1994; Wang, 2001; Stevanovic, 2002), da CD4⁺-T-Zellen eine sehr zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen.

1.3.2 Die Bedeutung von CD4⁺-T-Zellen in der Anti-Tumor-Immunität

Die zentrale, regulatorische Bedeutung von CD4⁺-T-Zellen in nahezu allen antigenspezifischen Immunreaktionen ist unbestritten. Umso erstaunlicher ist es, dass ihnen im Bereich der Tumorkvakzinierung bisher eine so geringe Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Ein Grund ist, dass Tumorzellen im allgemeinen MHC I-Moleküle exprimieren, nicht aber MHC II. Daher schien die Induktion von CTLs, die in der Lage sind, Tumorzellen direkt nach Erkennung eines Peptid-MHC I-Komplexes zu eliminieren, ausreichend. Die essentielle Bedeutung von CD4⁺-T-Zellen für die Eliminierung auch MHC II-negativer Tumore konnte jedoch in den letzten Jahren durch verschiedene Studien gezeigt werden (Greenberg, 1991; Ossendorp et al., 1998; Hung et al., 1998; Toes et al., 1999; Mumberg et al., 1999). Sie sind an der Regulation vielfältiger Effektorwege beteiligt, die alle letztendlich in der Beseitigung des Tumors resultieren können (s. Abb. 1-5):

T_H1-Effektorzellen sind wesentlich für das effiziente *Priming* und die Induktion antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen (Bennett et al., 1997; Hung et al., 1998; Toes et al., 1999). Dieser Prozess ist nicht vollständig verstanden, verläuft aber offenbar über CD40/CD40L-Interaktionen zwischen DCs und CD4⁺-T-Zellen, welche die DCs letztendlich für die effiziente CD8⁺-T-Zell-Aktivierung „lizenzieren“. CD4⁺- und CD8⁺- T-Zelle müssen ihr Epitop offenbar auf derselben DC erkennen, und idealerweise stammen beide Epitope aus demselben Antigen (Schoenberger et al., 1998; Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Ossendorp et al., 1998). Auch für die Erhaltung und Proliferation der CD8⁺-T-Zellen scheinen Helfer-T-Zellen nötig zu sein (Greenberg, 1991; Zajac et al., 1998). Aber auch in Abwesenheit von CD8⁺-T-Zellen konnten CD4⁺-T-Zell-vermittelte Tumor-Regressionen beobachtet werden (Greenberg, 1991). Diese beruhen zum Teil auf direkten Effekten der T-Zellen auf den Tumor, bedingt durch die Freisetzung von Cytokinen wie IFN- γ , TNF- α und die Expression von FasL (Mumberg et al., 1999; Qin and Blankenstein, 2000). Zum Teil kommt es auch zur Aktivierung anderer Effektorzellen wie Makrophagen und Eosinophilen, welche den Tumor zerstören (Hung et al., 1998; Greenberg, 1991). Die Rolle von T_H2-Zellen in der Anti-Tumor-Immunität liegt im wesentlichen in der Aktivierung von B-Zellen, welche tumorspezifische Antikörper produzieren können, die den Tumor direkt oder indirekt schädigen (Old, 1996; Glennie and Johnson, 2000).

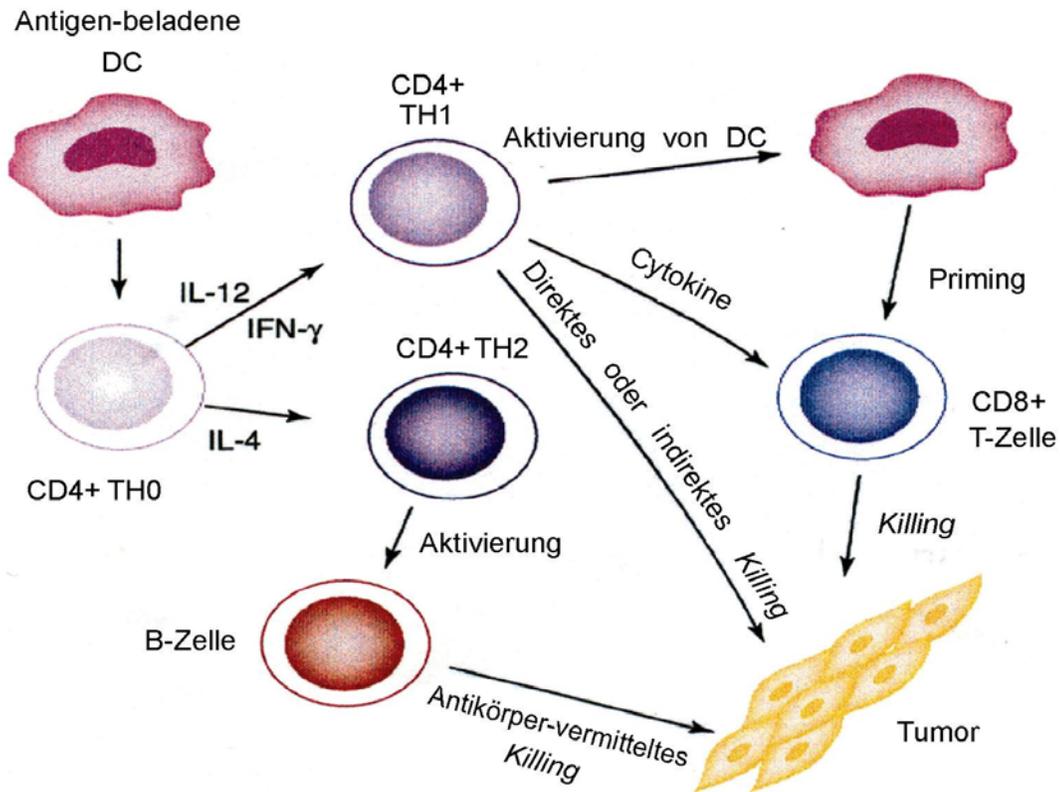


Abb. 1-5: CD4⁺-T-Zellen als Regulatoren der Anti-Tumor Immunität.

CD4⁺-T-Zellen sind an der Auslösung und Regulation zahlreicher Effektorwege beteiligt, die eine Anti-Tumor-Aktivität entfalten können. Sie helfen bei *Priming* und Proliferation von CD8⁺-Zellen, inhibieren das Tumorstadium über direkte und indirekte Mechanismen und aktivieren B-Zellen. Die koordinierte Aktion dieser Effektoren führt dann zur Elimination des Tumors (modifiziert aus: Wang, 2001).

Bisher gibt es kaum tumorspezifische MHC-II-Epitope. Ein Grund dafür liegt in technischen Problemen, die ihre Identifizierung schwierig machen. MHC I-Epitope werden im wesentlichen über zwei Strategien identifiziert (Stevanovic, 2002): Zum einen werden tumorreaktive T-Zellen isoliert und mit ihrer Hilfe das Antigen, welches sie erkennen, ermittelt. Dazu werden cDNA-Expressionsbibliotheken aus den jeweiligen Tumoren generiert und in Zellen mit entsprechendem MHC I-Haplotyp exprimiert, bis die T-Zell-Reaktivität auf ein einzelnes Antigen eingegrenzt wurde. Das Epitop wird dann durch Expression verschiedener kürzerer Fragmente ermittelt (van der Bruggen et al., 1991; Traversari et al., 1992). Alternativ kann das T-Zell-Epitop nach Elution der MHC I Peptide ermittelt werden, indem man die Fraktion der eluierten Peptide, die von den T-Zellen erkannt wird, massenspektrometrisch untersucht (Cox et al., 1994). Andererseits lassen sich MHC I-Epitope auch über das Verfahren der „Reversen Immunologie“ bestimmen (Celis et al., 1994). Dabei werden ausgehend von einem identifizierten Tumorantigen mit Hilfe inzwischen sehr zuverlässiger Epitop-Prediction-Algorithmen die T-Zell-Epitope vorhergesagt und dann in T-Zell-Assays verifiziert (Stevanovic and Rammensee, 1994; Brossart et al., 2000; Schirle et al., 2000; Nussbaum et al., 2001; Schirle et al., 2001).

Für die Identifizierung tumorspezifischer MHC II-Epitope lassen sich diese Methoden nur in sehr begrenztem Umfang anwenden. So ist z.B. die Expression von cDNA-Expressionsbibliotheken in MHC II-positiven APCs oft schwierig, zumal die Proteine zur Präsentation auf MHC II-Molekülen in die endosomal-lysosomalen Beladungskompartimente geleitet werden müssen. Auch die direkte Isolation von MHC II-Peptiden aus Tumorzellen scheidet in den meisten Fällen aus, weil Tumore im allgemeinen MHC II-negativ sind oder MHC II in nur sehr geringen Mengen exprimieren, sodass große Zellmengen benötigt würden. Auch die Identifizierung von Epitopen über „Reverse Immunologie“ funktioniert nicht, da die MHC II-Peptidmotive deutlich degenerierter sind als die MHC-I-Motive und sich zudem die proteolytischen Vorgänge während der MHC II-Antigenprozessierung bisher nicht vorhersagen lassen.

Zahlreiche Versuche sind in jüngster Zeit unternommen worden, um tumorassoziierte MHC II-Epitope zu identifizieren. Meistens wurden dabei CD4⁺-T-Zellepitope ausgehend von bekannten Tumorantigenen identifiziert (Zeng et al., 2000; Jäger et al., 2000 b). Auch die Elution von Peptiden aus MHC II-positiven Tumorzellen führte zur Identifizierung zweier neuer Epitope (Li et al., 1998). Eine relativ erfolgreiche und systematische Strategie war die Fusionierung aus Tumorzellen generierter cDNAs an das Invariante Kette-Gen. Über diese Vorgehensweise konnten drei mutierte MHC II-restringierte Tumorantigene identifiziert werden (Wang et al., 1999; Wang et al., 1999 b; Pieper et al., 1999). Alle diese Methoden sind allerdings sehr arbeitsintensiv, umständlich und langsam, weshalb bis heute ein großer Mangel an tumorspezifischen und für Vakzinierungsversuche einsetzbaren Helferpeptiden besteht.

Die Entwicklung einer Strategie zur systematischen Identifizierung neuer tumorspezifischer CD4⁺-T-Zellepitope sowie von Protokollen für ihren effizienten Einsatz in DC-basierten Vakzinierungen sind daher von fundamentalem Interesse und würden die Bemühungen, effektive Tumorstoffe zu generieren, erheblich unterstützen.

1.4 Zielsetzungen der Promotionsarbeit

Dendritische Zellen sind Initiatoren und Modulatoren der adaptiven Immunantwort. Ihre Interaktion mit CD4⁺-T-Helferzellen entscheidet über Toleranz und Immunität sowie auch über die Art der Immunität. Wie dendritische Zellen in der Lage sind, diese unterschiedlichen Funktionen wahrzunehmen, ist daher von großem Interesse. Welche Rolle die von DCs präsentierten MHC Klasse II-assoziierten Peptid-Liganden in diesem Kontext spielen, ist erst wenig verstanden. Insbesondere die Bedeutung von Selbstpeptid-MHC II-Komplexen für die Interaktion von T-Zellen mit DCs wird zunehmend deutlich, ist aber kaum untersucht worden. Für diese Promotionsarbeit ergaben sich diesbezüglich folgende Fragestellungen:

- Wie wird der Peptid-Editor HLA-DM während der Reifung dendritischer Zellen reguliert, welchen Einfluss hat dies auf die Beladbarkeit von MHC II-Molekülen und die Stabilität von MHC II-Peptidkomplexen? Welchen Einfluss hat es auf das Selbstpeptid-Repertoire von DCs?
- Werden MHC II-Selbstpeptide auch von unreifen DCs präsentiert? Gibt es Unterschiede zwischen unreifen und reifen DCs in der Art der präsentierten Peptide? Wie kommen mögliche Unterschiede zustande und haben sie Einfluss auf die Interaktion von DCs mit T-Zellen?

Einer der derzeitigen Ansätze in der Krebstherapie basiert auf der Vakzinierung mit DCs, die tumorspezifische Antigene tragen. Erste Erfolge dieser Therapieversuche sind sichtbar, allerdings noch sehr limitiert. Der Einsatz tumorspezifischer CD4⁺-T-Zell-Epitope im Kontext von DCs könnte die Therapie unterstützen, bisher sind aber kaum T-Helfer-Epitope aus Tumorantigenen verfügbar. Es sollten daher folgende Fragen adressiert werden:

- Welche Bedingungen erlauben einen effizienten Antigen-Transfer von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle von DCs?
- Ist es möglich, MHC II-Epitope aus Tumorzellen durch direkte massenspektrometrische Untersuchung der MHC II-Peptide von DCs zu identifizieren?
- Ist es auf diese Weise möglich, neue tumorassoziierte MHC II-Epitope zu identifizieren?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Bezugsquellen für alle eingesetzten Chemikalien sind an entsprechender Stelle im Text angegeben. Standardchemikalien, die nicht gesondert spezifiziert sind, wurden von den Firmen Merck, Fluka oder Sigma erworben.

2.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Färbung von *Western Blots* verwendet:

Erstantikörper:

Antigen	Name des Antikörpers	Isotyp (Maus)	Konzentration	Verdünnung	Bezugsquelle
HLA-DR α	1B5	IgG1	1 mg/ml	1:1000	J. Neefjes, NCL, Amsterdam
HLA-DR α	1B5-bio	IgG1	1 mg/ml	1:2000	J. Neefjes, NCL, Amsterdam
HLA-DR α	DA6.147	IgG1	1 mg/ml	1:1000	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
HLA-DM β	DM.K8	IgG1	1 mg/ml	1:1000	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
HLA-DM β -bio	DM.K8-bio	IgG1	1 mg/ml	1:2000	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
HLA-DO β	DOB.L1	IgG2b	1 mg/ml	1:1000	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
HLA-DO β -bio	DOB.L1	IgG2b	1 mg/ml	1:2000	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
Ii	SD3	IgG1	Sup ^a	1:6	C.A. Müller, Univers. Tübingen
HLA-B, C	HC-10	IgG2a	Sup	1:10	H.L. Ploegh, Havard Medical School, Boston
HLA-A	HC-A2	IgG1	Sup	1:10	H.L. Ploegh, Havard Medical School, Boston
CD 9 [NR] ^b	MEM192	IgM	Asc ^c	1:2000	V.Horejsi, Universität Prag
CD 63 [NR]	CBL 553	IgG1	0,1 mg/ml	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
CD 81 [NR]	MEM38	IgG1	Asc	1:1000	V.Horejsi, Universität Prag

CD 82 [NR]	C33	IgG2a	Asc	1:1000	O.Yoshie, Osaka, Japan
HSC 70	1B5	Ratte IgG2a	0,2 mg/ml	1:2000	Stressgen Biotech, Collegeville, PA
PARP	C2-10	IgG1	0,5 mg/ml	1:1000	R&D-Systems, Abingten, GB
IL-10	JES3-9D7	IgG1 Ratte	1 mg/ml	1:1000	BD Pharmingen, San Diego, CA
VEGF	G143-850	IgG2a	1 mg/ml	1:1000	BD Pharmingen, San Diego, CA
Melanotransferrin (p97)	L235	IgG1	0,44 mg/ml	1:1000	ATCC, Manassas, VA

^a Sup: Hybridom-Überstand (Konzentration ca. 1-5 µg/ml)

^b NR: Antikörper erkennt das Antigen nur in nicht-reduziertem Zustand

^c Asc: Ascites

Für durchflußzytometrische Analysen (FACS-Analysen) und die konfokale Immun-Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Antikörper verwendet:

Erstantikörper:

Antigen	Name des Antikörpers	Isotyp (Maus)	Konzentration	Verdünnung	Bezugsquelle ^a
MHC class I	W6/32	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	ATCC
HLA-DR	L243	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	ATCC
HLA-DR	TÜ36	IgG2b	0,5 mg/ml	1:100	BD
HLA-DQ	TÜ169	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	BD
DR-CLIP	Cer.CLIP	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD3	OKT3	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	ATCC
CD4	RPA-T4	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD14	M5E2	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD19	HIB19	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD25	M-A251	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD45RO	UCHL1	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD45RA	HI100	IgG2b	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD54	HA58	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD54	LB-2	IgG2b	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD63	H5C6	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD69	FN50	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD71	M-A712	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	BD
CDw78	FN1	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD80	L307.4	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD

CD83	HB15e	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
CD86	FUN-1	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
HLA-A2	HB82		Sup ^b	1:1	
Melanotransferrin	L235	IgG1	0,44 mg/ml	1:100	ATCC
Kontroll-IgG1	MOPC-21	IgG1	0,5 mg/ml	1:100	BD
Kontroll-IgG2a	G155-178	IgG2a	0,5 mg/ml	1:100	BD

^a BD: BD Pharmingen, San Diego, CA; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA

^b Sup: Hybridom-Überstand (Konzentration ca. 1-5 µg/ml)

Als zusätzlicher Antikörper wurde der humane monoklonale Antikörper (mAk) UL-5A1 eingesetzt (Wölpl et al., 1998), der spezifisch ist für die Erkennung des immundominanten Epitops des HLA-A2 Moleküls A2 (103-117), gebunden an ein MHC II-Molekül mit dem Haplotyp HLA-DR1 (DRB1*0101). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Wölpl, Deutsches Rotes Kreuz, Ulm.

Der anti-Maus-MHC II-Antikörper Y3P wurde von Dr. Saizawa (Nihon Medical College, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt (Janeway C Jr, 1984).

Der CLIP-spezifische polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde durch Immunisierung mit KLH-gekoppeltem CLIP-Peptid erzeugt. Die IgG-Fraktion des Serums wurde über Protein A aufgereinigt.

Folgende direktmarkierte Antikörper wurden für durchflußytometrische Färbungen eingesetzt. Die Antikörper waren an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiozyanat (FITC) (Emissionswellenlänge bei Anregung durch Argon-Laser_{488nm}: ca. 525nm) oder alternativ an das fluoreszierende, photosynthetische Rotalgenhilfspigment Phycoerythrin-R (PE) (Emissionswellenlänge bei Anregung durch Argon-Laser_{488nm}: ca. 575nm) gekoppelt.

Antigen	Name des Klons	Isotyp (Maus)	Verdünnung
<u>FITC-markiert:</u>			
Kontroll-IgG1	MOPC-21	IgG1	1:20
Kontroll-IgG1	MOPC-21	IgG1	1:20
Kontroll-IgG2a	G155-178	IgG2a	1:20
MHC class I	G46-2.6	IgG1	1:20
HLA-DR	L243(G46-6)	IgG2a	1:20
DR-CLIP	Cer.CLIP	IgG1	1:20

CD1a	HI149	IgG1	1:20
CD3	UCHT1	IgG1	1:20
CD4	RPA-T4	IgG1	1:20
CD8	HIT8a	IgG1	1:20
CD14	M5E2	IgG2a	1:20
CD19	HIB19	IgG1	1:20
CD45RO	UCHL1	IgG2a	1:20
CD45RA	HI100	IgG2b	1:20
CD86	FUN-1	IgG1	1:20
α/β -TCR	T10B9.1A-31	IgM	1:20

PE-markiert:

Kontroll-IgG1	MOPC-21	IgG1	1:20
Kontroll-IgG2a	G155-178	IgG2a	1:20
Kontroll-IgG2b	27-35	IgG2b	1:20
HLA-A,B,C	G46-2.6	IgG1	1:20
HLA-DR	L243(G46-6)	IgG2a	1:20
HLA-DR	TÜ36	IgG2b	1:20
CD3	UCHT1	IgG1	1:20
CD4	PRA-T4	IgG1	1:10
CD8	HIT8a	IgG1	1:20
CDw78	FN1	IgG1	1:20
CD80	L307.4	IgG1	1:20
CD82	50F11	IgG1	1:20
CD83	HB15e	IgG1	1:20
CD86	2331(Fun-1)	IgG1	1:20

Die direktmarkierten Antikörper wurden ausnahmslos von der Firma BD Pharmingen erworben.

Für die intrazelluläre Färbung der Cytokine IL-4 und IFN- γ wurden bereits vorgefertigte Antikörpermischungen verwendet, die für intrazelluläre Anwendungen optimiert wurden: IL-4-PE/IFN- γ -FITC (Fastimmune®, BD Pharmingen) und entsprechende Isotyp-Kontrollen IgG2a-FITC/IgG1-PE (Fastimmune®, BD Pharmingen).

Zweitreagenzien:

Die im folgenden aufgelisteten Zweitreagenzien wurden für die Erstantikörper-Detektion im *Western Blot* (WB), für FACS-Analysen (FACS) und die konfokale Immun-Fluoreszenzmikroskopie (IF) eingesetzt.

WB:

Alle Zweitreagenzien, die für *Western Blot*-Färbungen eingesetzt wurden, sind an das Enzym Meerrettichperoxidase (POX) konjugiert. Die Isotyp-spezifischen Antikörperkonjugate wurden von der Firma Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL) bezogen, sämtliche nicht Isotyp-spezifischen Konjugaten von der Firma Dianova (Hamburg, Deutschland).

GaM-POX:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für alle Maus-IgG-Isotypen
GaM- γ 1-POX:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG1-Isotyp
GaM- γ 2a-POX:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG2a-Isotyp
GaM- γ 2b-POX:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG2b-Isotyp
GaM- μ -POX:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgM-Antikörper
GaRat-POX:	Ziege anti-Ratte Antikörper, spezifisch für alle Ratte-IgG-Isotypen
SA-POX:	Streptavidin, zur Färbung biotinylierter Erstantikörper

FACS:

Die Zweitreagenzien, die zur Fluoreszenzmarkierung in der Durchflußzytometrie eingesetzt wurden, waren entweder gekoppelt an Fluorescein Isothiozyanat (FITC) oder an Phycoerythrin-R (PE). Die Antikörperkonjugate wurden von der Firma Dianova erworben.

GaM-FITC:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für alle Maus-IgG-Isotypen
GaM-PE:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für alle Maus-IgG-Isotypen
SA-PE:	Streptavidin, zur Färbung biotinylierter Erstantikörper
GaHu-PE	Ziege anti-Mensch Antikörper, spezifisch für alle Mensch-IgG-Isotypen

IF:

Als Zweitreagenzien für die Immun-Fluoreszenzmikroskopie wurden ausschließlich isotypspezifische Antikörper verwendet, die an die Fluorophore Alexa 488 oder Alexa 568 gekoppelt waren (Alexa 488: bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm beträgt die Emissionswellenlänge 523 nm; Alexa 568: bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm

beträgt die Emissionswellenlänge 603 nm) Die Alexa-gekoppelten Zweitantikörper wurden ausnahmslos von der Firma Molecular Probes (Eugene, OR) erworben.

GaM- γ 1-Alexa 568:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG1-Isotyp
GaM- γ 1-Alexa 488:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG1-Isotyp
GaM- γ 2a-Alexa 488:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG2a-Isotyp
GaM- γ 2a-Alexa 568:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG2a-Isotyp
GaM- γ 2b-Alexa 568:	Ziege anti-Maus Antikörper, spezifisch für den Maus-IgG2b-Isotyp
GaHu-Alexa 488:	Ziege anti-Mensch Antikörper, spezifisch für alle Mensch-IgG-Isotypen

Für die Detektion von Cytokinen in Zellkulturüberständen mittels enzymgekoppeltem Immunsorptionsstest (Sandwich-ELISA) wurden folgende Antikörperpaare eingesetzt:

<u>Cytokin</u>	<u>Fangantikörper</u>	<u>Detektionsantikörper</u>
IL-2	Maus anti-Mensch anti-IL-2 mAk ^a , Klon: 5344-111	Maus-anti-Mensch Bio-anti-IL-2 mAk ^b , Klon: B33-2
IL-12	Ratte anti-Mensch anti-IL-12 p70, mAk, Klon: 20C2	Ratte anti-Mensch Bio-anti-IL-12 p70 mAk, Klon : C8.6
IL-4	Maus anti-Mensch anti-IL-4 mAk Klon: 8D4-8	Maus anti-Mensch Bio-anti-IL-4 mAk, Klon: MP4-25D2
IFN- γ	Maus anti-Mensch anti-IFN- γ mAk, Klon: NIB42	Maus anti-Mensch Bio-anti-IFN- γ mAk, Klon: 4S.B3

^a mAk: monoklonaler Antikörper

^b Bio-mAk: biotinylierter monoklonaler Antikörper

Die im ELISA eingesetzten Antikörperpaare zur Cytokindetektion wurden ausnahmslos von der Firma BD Pharmingen erworben.

2.1.3 Peptide

Die Synthese der eingesetzten Peptide erfolgte mittels klassischer Festphasensynthese nach Merrifield unter Einsatz von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten Aminosäuren nach der Fmoc/tBu-Strategie. Einige Peptide wurden während der Synthese durch Kupplung von Biotinyl-Aminohexansäure an den N-Terminus biotinyliert. Die Synthese der Peptide erfolgte durch R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg), D. Avilla (Basel Institut für Immunologie, Basel, Schweiz) bzw. Medprobe (Oslo, Norwegen). Alle Peptide wurden über *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographie* (RP-HPLC) gereinigt und massenspektrometrisch überprüft.

Folgende Peptide wurden eingesetzt:

CLIP(81-105)	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMG
A2(103-117)	VGSDWRFLRGYHQYA
M4	ACPKYRFLRGLKLAT
MTF(668-684)	GQDLLFKDATVRAVPVG
Vimentin(202-217)	TLQSFQRQVDNASLAR
NY-ESO(115-132)	PLPVPGVLLKEFTVSGNI
CDC-27(768-782)	MNFSWAMDLDKFGAN
HA(307-319)	PKYVKQNTLKLAT
Bio-HA(307-319)	Bio-C6-PKYVKQNTLKLAT
TT(829-843)	MQYIKANSKFIGITE
Bio-TT(829-843)	Bio-C6-MQYIKANSKFIGITE
Annexin(208-223)	DVPKWISIMTERSVPH
TPI(23-37)	GELIGILNAAKVPAD
GAD(114-128)	VMNILLQYVVKSFDR
COL(260-274)	GIAGFKGEQGPKGEHFG
MBP(87-99)	VHFFKNIVTPRTP

2.1.4 Protein-Antigene

Folgende Proteine wurden für das Pulsen dendritischer Zellen mit exogenen Antigenen zum Zwecke der T-Zell-Stimulation oder Identifizierung immundominanter Epitope verwendet: Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wurde von der Firma Toxin Technologies (Sarasota, FL) erworben.

Die Proteine HLA-A2 und HLA-Cw6 wurden rekombinant in Insektenzellen exprimiert (M. – H. Smith et al., 1998). Die Insektenzell-Lysate enthielten eine Konzentration von 0,7 mg/ml HLA-A2 bzw. 0,35 mg/ml HLA-Cw6 in Phosphatpuffer (PBS) mit Harnstoff (6 M). Die

Lysate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Smith (University of Arizona, Tuscon, AZ).

Hämagglutinin wurde in Form von Virosomen verabreicht. Dazu wurde der Grippeimpfstoff Inflexal Berna V (Berna, Bern, Schweiz) verwendet. Der Impfstoff besteht aus Lecithin-Phospholipid-Liposomen, auf deren Oberfläche Hämagglutinine von drei verschiedenen Influenza-Virusstämmen (1. Influenza A, New Caledonia 20/99; 2. Influenza A, Panama 2007/99; 3. Influenza B Yamanashi 166/98) in einer Konzentration von je 15 µg/ml aufgebracht wurden.

2.1.5 Zelllinien

Melanomzelllinien:

- UKRV-Mel-15a: humanes malignes Melanom, adhärend; von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, DKFZ, Heidelberg, (Eichmüller et al., 2002).
- UKRV-Mel-17: humanes malignes Melanom, adhärend; von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, DKFZ, Heidelberg, (Eichmüller et al., 2002).
- Ma-Mel-18a: humanes malignes Melanom, adhärend; von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, DKFZ, Heidelberg, (Eichmüller et al., 2002).
- SK-Mel-28: humanes malignes Melanom, adhärend; Zelllinie erworben von ATCC (Manassas, VA) (ATCC Katalog Nummer HTB-72), (Carey et al., 1976).
- Mel-JuSo: humanes malignes Melanom, adhärend; von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, DKFZ, Heidelberg, (Johnson et al., 1981).
- MZ-2: humanes malignes Melanom, adhärend; zur Verfügung gestellt von Dr. S. Carrel (Lausanne, Schweiz).
- B16: Maus-Melanom aus C57BL/6, adhärend; von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, (Stackpole, 1981).

Andere Zelllinien:

- STO: Mausembryo-Fibroblast, adhärend; Zelllinie erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer CRL-1503), (Martin and Evans, 1975).
- Cos-7: Nieren-Fibroblast aus Affen, adhärend; Zelllinie erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer CRL-1651), (Gluzman, 1981)
- T2: humanes T-Zell/B-Zell-Hybrid, Suspensionskultur; Zelllinie erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer CRL-1992), (Salter et al., 1985).
- CD40L: Murine B-Zelllinie, transfiziert mit CD40L, Suspensionskultur; erhalten vom Basel Institut für Immunologie (Cella et al., 1996).

EBV-transformierte B-Zelllinien:

Es wurden die folgenden homozygoten B-Lymphoblastoiden-Zelllinien (B-LCLs) verwendet (die Klasse II Haplotypen sind nach der WHO Nomenclatur von 1990 zitiert, in eckigen Klammern sind die jeweiligen HLA-Gene aufgeführt):

B-LCL WT-100: DR1Dw1 [DRA1*0101, DRB1*0101]

B-LCL Jutthom: DR1Dw1 [DRA1*0101, DRB1*0101]

B-LCL Cox: DR17Dw3: [DRA1*0101, DRB1*03011]

Hybridomzelllinien:

L243: produziert anti-HLA-DR α -Antikörper (IgG2a), erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer HB-55), (Gorga et al., 1987).

L235: produziert anti-Melanotransferrin-Antikörper (IgG1), erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer HB-8446), (Houghton et al., 1982).

DM.K8: produziert anti-HLA-DM β -Antikörper (IgG1), (Kropshofer et al., 1996)

W6/32: produziert Antikörper gegen HLA-A,B,C (IgG2a), erworben von ATCC (ATCC Katalog Nummer HB-95), (Brodsky and Parham, 1982)

2.1.6 Kulturmedien

Die Melanomzelllinien, EBV-transformierten B-Zelllinien sowie alle nicht weiter spezifizierten Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium (incl. 2 mM L-Glutamin) der Firma Gibco BRL kultiviert. Dem Medium wurden 1,5 g/l NaHCO₃ sowie HEPES (25 mM) und Pyruvat (1 mM) zugesetzt. Das Medium wurde mit 10 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt (**Zellkulturmedium**).

Die Hybridomzelllinien wurden in dem gleichen Medium kultiviert, welchem zusätzlich Kanamycin (100 UG/ml), 1 % Glutamax I (L-Alanyl-Glutamin), Amphotericin B (2,5 UG/ml) sowie 2,25 g/L Glucose hinzugefügt wurden (**Hybridommedium**).

Die Kultivierung der embryonalen Fibroblastenzelllinie STO erfolgte in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM), welches auf eine Endkonzentration von 4 mM Glutamin, 1,5 g/L NaHCO₃ und 4,5 g/L Glucose eingestellt wurde.

Dendritische Zellen wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert, welchem 1 % Kanamycin, 1 % Glutamin 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 % Pyruvat sowie die Cytokine *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF; 50 ng/ml) und Interleukin 4 (IL-4; 3 ng/ml) zugesetzt wurden (**DC-Medium**).

Die Kultivierung von T-Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium, welchem 1 % Kanamycin, 1 % Glutamin 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 1 % Pyruvat zugesetzt wurde. Zur

Expansion der T-Zellen wurde diesem Medium Interleukin 2 (IL-2; 1250 U/ml) zugesetzt (**T-Zell-Medium**).

Vor Benutzung wurde den Medien 10 % fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt, welches zuvor für 30 min bei 56°C zur Inaktivierung der Komplementproteasen erhitzt wurde.

Zur Generierung von T-Zelllinien wurde dem Medium 1 % autologes humanes Serum anstelle von FCS zugesetzt. Dieses ließ sich durch Erhitzen auf 56°C für 30 min und anschließendes Zentrifugieren bei 1325 x g für 15 min aus Plasma gewinnen (**autologes DC-Medium**).

Alle Medien sowie Medienzusätze und PBS wurden von der Firma Gibco BRL (Gaithersburg, MD) bezogen, mit Ausnahme von GM-CSF (Leukomax; Novartis, Basel Switzerland), IL-4 (R&D, Minneapolis MN) und IL-2 (BD Pharmingen).

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zahl der Zellen in einer Zellkultur wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mittels Kapillarkraft in die vorbereitete Zählkammer (0,1 mm Tiefe) eingezogen und anschließend die Zahl der Zellen in einem der äußeren Quadrate der Zählkammer bestehend aus 16 Kleinquadraten bestimmt. Die Zahl der Zellen in 16 Kleinquadraten multipliziert mit $1 \cdot 10^4$ entspricht der Zellzahl/ml.

2.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in beschichteten Falcon®-Zellkulturflaschen (75 cm² oder 150 cm²; Falcon BD) in einem Begasungs-Brutschrank (Brouwer, Luzern, Schweiz) bei 37°C unter CO₂-Atmosphäre (5 % v/v).

Das Splitten der in Suspensionskultur wachsenden Zellen erfolgte bei einer Dichte von ca. $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 durch einfaches Austauschen des entsprechenden Volumens an Zellsuspension gegen frisches Medium.

Adhärente Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-100 % vermehrt und dann in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 gesplittet. Dazu wurden die adhärennten Zellen zunächst in der Zellkulturflasche mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/0,5 mM EDTA (Gibco BRL) bedeckt. Der Ablöseprozess konnte mikroskopisch verfolgt werden und die abgelösten Zellen

in Kompletmedium (zur Inaktivierung des Trypsins) aufgenommen und entsprechen verdünnt wieder ausgesät werden.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 5 min) und anschließend in eiskaltem, sterilfiltriertem Einfriermedium (50 % FCS, 40 % RPMI-1640, 10 % DMSO (Fluka, Neu-Ulm)) so resuspendiert, dass eine Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml resultierte. Je 1 ml dieser Suspension wurde in Kryoröhrchen (Nunc, Dänemark) pipettiert. Die Röhrchen wurden in einer Styroporschachtel bei -70°C langsam eingefroren und nach 1-2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Rekultivierung der Zellen erfolgte durch rasches Auftauen in einem 37°C -Wasserbad. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sodann in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit eiskaltem Kompletmedium überführt, die Zellen abzentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand abgegossen. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmten Kompletmedium aufgenommen und in einen Zellinkubator überführt.

2.2.2 Kultivierung von Hybridomzelllinien zur Produktion von Antikörpern.

Die Kultivierung von Hybridomzelllinien zur Produktion von Antikörpern erfolgte in sogenannten miniPERM® Minifermentern (Vivascience, Satorius, Göttingen). Die Minifermenter bestehen aus zwei Modulen, die durch eine Membran mit einem Ausschlussvolumen von 12,5 kDa getrennt sind. Zellen aus 200 ml dichter Hybridomzell-Suspension wurden abzentrifugiert (300 x g, 5 min, Heraeus Varifuge 3.2RS), in 40 ml 37°C -warmem Hybridommedium aufgenommen und in das Produktionsmodul des miniPERM-Systems überführt. In das Versorgungsmodul wurden anschließend 400 ml warmes Hybridommedium eingefüllt, Druckausgleich hergestellt und das miniPERM-System auf eine Rollvorrichtung bei 3-4 Umdrehungen/min in einen Zellinkubator überführt. In Abhängigkeit von der Dichte der Hybridomzellen im Produktionsmodul wurde alle 2-4 Tage das Medium in der Versorgungskammer ausgetauscht. Nach ca. 3-4-wöchiger Kultivierung wurden die Hybridomzellen inklusive antikörperhaltigem Überstand aus dem Produktionsmodul des Minifermenters geerntet. Die Hybridomzellen wurden dazu für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und der Überstand anschließend ein weiteres Mal für 10 min bei 1300 x g zentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.2RS). Sodann wurde der Überstand durch einen Sterilfilter (0,45 μm) filtriert und für die Antikörper-Isolierung eingesetzt (s. 2.3.5 Isolierung monoklonaler Antikörper).

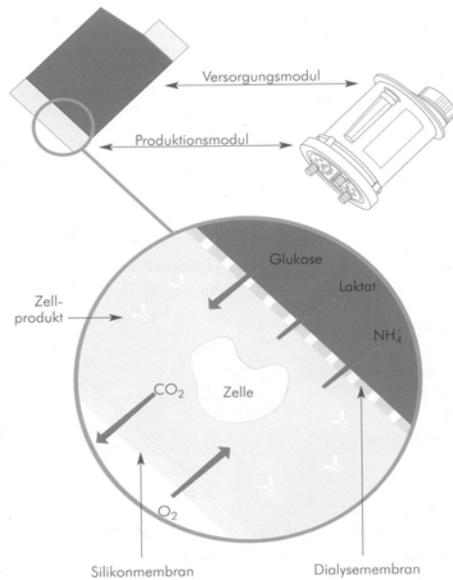


Abbildung 2.1: Aufbau eines miniPerm® Minifermenters zur Produktion von Antikörpern

Die Membran mit einer Durchlässigkeit bis maximal 12,5 kDa erlaubt den Austausch von Metaboliten, hält aber den Antikörper im Produktionsmodul zurück, aus dem er später zusammen mit den Hybridomzellen geerntet werden kann.

2.2.3 Isolierung und Kultivierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut

2.2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) aus humanem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Der *Buffy coat* (Leukocytenmanschette) ist ein Lymphocytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Die in dieser Arbeit verwendeten *Buffy coats* wurden vom Kantonsspital Basel oder vom Deutschen Roten Kreuz in Mannheim bereitgestellt. Aus dem Lymphocytenkonzentrat wurden mononukleäre Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque) über *Lymphocyte Separation Medium* (LSM®, ICN, Aurora, OH) isoliert. Dazu wurde das Lymphocytenkonzentrat mit RPMI-1640 + 25 mM HEPES + Heparin (5 IE/µl Liquemin®, Roche, Basel, Schweiz) 3:1 verdünnt und anschließend über das LSM geschichtet. Dann wurde für 30 min bei 825 x g (Heraeus Varifuge 3.2RS) und 18°C zentrifugiert. Die Lymphocyten und Monocyten (PBMCs) sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/ Thrombocyten) und Ficoll-Hypaque an. Das Zellsediment bilden Erythrocyten und Granulocyten, die eine höhere Dichte besitzen. Die PBMCs konnten nach der Dichtegradientenzentrifugation aus der Interphase geerntet werden. Die verunreinigenden Erythrocyten liessen sich durch Inkubation mit Erythrocyten-Lyse-Puffer (135 mM NH₄Cl, 17 mM Tris, pH 7,2) für 3-4 min bei 37°C entfernen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und waren für die Isolierung von Subpopulationen bereit.

2.2.3.2 Isolierung von Monocyten und Differenzierung zu dendritischen Zellen

Die Isolierung von Monocyten aus gereinigten PBMCs erfolgte über positive Selektion von CD14⁺-Zellen mittels Anti-CD14-beschichteter, magnetischer *Beads* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Dazu wurden die PBMCs in EDTA-Puffer (PBS + 10 % FCS + 1 mM EDTA (Fuka)) aufgenommen und für 15 min bei 4°C mit Anti-CD14-*Beads* inkubiert. Anschliessend liessen sich die CD14-positiven von den CD14-negativen Zellen über *Magnetic Cell Sorting* (MACS) separieren. Nach 4-maligem Waschen mit EDTA-Puffer wurden die CD14⁺-Monocyten von der magnetischen Säule (LS, Miltenyi Biotech) eluiert. Nach einem weiteren Waschschrift in RPMI/HEPES wurden die Zellen schließlich in DC-Medium in einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 6-Loch-Platten (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY) ausgesät.

Die Differenzierung der dendritischen Zellen aus Monocyten erfolgte, wie beschrieben (Vincent et al., 1992; Sallusto und Lanzavecchia, 1994) durch Zusatz der Cytokine GM-CSF (50 ng/ml) und IL-4 (3 ng/ml) in einem Zeitraum von 5 Tagen. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde routinemäßig überprüft und betrug > 97 %.

2.2.3.3 Isolierung und Kultivierung von CD4⁺-T-Zellen

Die Isolierung von CD4⁺-T-Zellen aus gereinigten PBMCs erfolgte über Depletion mit Hilfe eines CD4⁺-T-Zell-Isolations-Kits (Miltenyi-Biotech). Dieses Kit enthält einen Hapten-Antikörper-Cocktail, bestehend aus Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD8, CD11b, CD16, CD36, und CD56. Alle Zellen außer den CD4⁺-T-Zellen können so markiert und über MACS depletiert werden, sodass nur CD4⁺-T-Zellen übrig bleiben.

Die PBMCs wurden in EDTA-Puffer aufgenommen und mit dem Antikörper-Cocktail für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit EDTA-Puffer gewaschen und dann mit magnetischen *Beads*, die mit Anti-Hapten Antikörpern beschichtet sind, für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurde die Zellsuspension zur Separierung markierter und unmarkierten Zellen auf eine magnetische Säule gegeben (LS, Miltenyi Biotech). Die Säule wurde 4 Mal gewaschen und der Durchlauf, der die CD4⁺-T-Zellen enthielt, gesammelt. Die auf diesem Wege isolierten CD4⁺-T-Zellen stellten eine Mischpopulation aus CD45RO⁺- und CD45RA⁺-Zellen dar, d.h. eine Mischung aus aktivierten und naiven T-Zellen. Die Zellen wurden in einer Dichte von $4-6 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer 24-Loch-Platte in T-Zell-Medium ohne Cytokine ausgesät. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde routinemäßig überprüft und betrug 92-98%.

2.2.3.4 Isolierung und Kultivierung naiver CD4⁺-T-Zellen

Naive CD4⁺-T-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie CD45RA-positiv aber CD45RO-negativ sind (Bell, 1992). Zur Isolation rein naiver T-Zellen wurden daher aus der Mischpopulation von CD45RA- und CD45RO-positiven Zellen durch Depletion der CD45RO⁺-Zellen die CD45RA⁺-Zellen gewonnen. Die CD4⁺-T-Zellen wurden dazu in EDTA Puffer für 15 min bei 4°C mit magnetischen *Beads* inkubiert, die mit dem CD45RO-Antikörper beschichtet waren (Miltenyi Biotech). Nach 2-maligem Waschen wurden die Zellen sodann auf eine magnetische Depletionssäule gegeben (LD, Miltenyi Biotech) und 4 Mal mit EDTA-Puffer gewaschen. Der Durchlauf enthielt nur CD45RA⁺-Zellen und damit naive CD4⁺-T-Zellen. Die naiven T-Zellen wurden in einer Dichte von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Reinheit der naiven T-Zellen wurde routinemäßig mittels FACS-Analyse überprüft und war > 93 %.

2.2.4 Stimulierung und Pulsen von dendritischen Zellen mit Antigenen

Nach einem Zeitraum von 5 Tagen in DC-Medium sind die Monocyten vollständig zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Diese zeigen den Phänotyp unreifer DC, wie durch FACS-Analyse routinemäßig überprüft wurde. Die Maturierung dendritischer Zellen kann am Tag 5 nach Isolierung der Monocyten durch zahlreiche inflammatorische Stimuli ausgelöst werden. Die hier verwendeten Aktivierungsstimuli waren: LPS (1 µg/ml) von *Salmonella abortus equi* (Sigma, St.Louis, MO), TNF-α (10 ng/ml) (R&D), TNF-α + PGE2 (1 µM) (Miniprostin® E₂, Pharmacia & Upjohn), Poly I:C (50 µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA) Peptidoglycan (10 µg/ml) (Sigma), oder CD40L. Die Aktivierung mittels CD40L wurde durch Kokultur mit bestrahlten (17,5 mSv) CD40L-Zellen ausgelöst.

Das Pulsen der DCs mit exogenem Antigen in Form von Protein, Peptid oder Virosomen erfolgte an Tag 5 nach Isolierung der Monocyten entweder ohne oder gleichzeitig mit Gabe des inflammatorischen Stimulus. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden die Zellen geerntet und mit verschiedenen analytischen Methoden charakterisiert.

2.2.4.1 Stimulation dendritischer Zellen mit nekrotischen oder apoptotischen Tumorzellen

Die Präparation nekrotischer Tumorzellen erfolgte durch 4-maliges Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff mit anschließendem jeweiligem Auftauen bei Raumtemperatur. Die Effizienz der Nekrotisierung wurde lichtmikroskopisch überprüft und erreichte zwischen 80-

90 %. Die nekrotisierten Zellen wurden in einem Verhältnis von 3:1 bzw. 1:1 (nekrotische Zellen : DCs) mit oder ohne zusätzlichen inflammatorischen Stimulus für einen Zeitraum von 24 h zu den DCs gegeben.

Zur Generierung apoptotischer Zellen wurden die Tumorzellen für 24 h mit Cisplatin (6 µg/ml) (Sigma) behandelt. Die Effizienz der Apoptose-Induktion wurde durchflußzytometrisch über Annexin V-Färbung bzw. mittels *Western Blot* über PARP-Spaltung überprüft. Apoptotische Zellen wurden wie nekrotische Zellen im Verhältnis 1:1 bzw. 3:1 (apoptotische Zellen : DCs) zu den DCs zugesetzt.

2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS)

Vor der durchflußzytometrischen Färbung wurden die Zellen zunächst in FACS-Puffer (2 % FCS + 0,02 % NaN₃ in PBS) gewaschen und anschließend bei 4°C für 30 min mit 5 µg/ml des jeweiligen Erstantikörpers in FACS-Puffer inkubiert. Nach 2-maligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen für 15 min mit den entsprechenden FITC/PE-konjugierten Zweitreagenzien (Verdünnung 1:200) bei 4°C auf Eis zusammengebracht. Nach zwei finalen Waschschrritten wurden die Zellen dann auf einem FACScalibur® Durchflußzytometer unter Verwendung der CELLquest® Software (Beckton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte über eine nichtgefärbte Probe (Autofluoreszenz), die Bestimmung der unspezifischen Färbung der Zellen über einen irrelevanten Antikörper gleichen Isotypes (Isotyp-Kontrolle).

2.2.6 Stimulierung von T-Zellen durch antigenbeladene dendritische Zellen

2.2.6.1 Priming und Polarisierung naiver CD4⁺-T-Zellen

Isolierte, naive T-Zellen wurden am vierten Tag nach ihrer Isolierung in einem Verhältnis von 10:1 mit dendritischen Zellen in 96-Loch *flat bottom* Zellkulturplatten (Costar, Corning Incorporation) kokultiviert. Die DCs waren zuvor für 24 h mit dem entsprechenden Antigen und LPS (1 µg/ml) inkubiert worden. Für die Stimulation mit SEB-gepulsten DCs wurden 5*10⁴ T-Zellen pro Ansatz eingesetzt für alle anderen Antigene je 1*10⁵ T-Zellen. Nach 5-tägiger Kokultur wurden die proliferierenden T-Zellen in eine 24-Loch Platte umgesetzt (Costar) und durch Zusatz von IL-2 (1250 U/ml; BD Pharmingen) expandiert. Die Analyse des Polarisierungsmusters der aktivierten T-Zellen erfolgte in Abhängigkeit von der Proliferationsgeschwindigkeit 3-9 Tage später durch intrazelluläre Durchflußzytometrie.

2.2.6.2 Generierung antigenspezifischer CD4⁺-T-Zell-Linien

Die Generierung antigenspezifischer CD4⁺-T-Zelllinien erfolgte durch wiederholte Restimulation der T-Zellen mit antigenbeladenen, autologen DCs in autologem DC-Medium (mit Serum des Spenders, von dem die DCs und T-Zellen isoliert wurden, statt FCS). Dazu wurden zu Beginn $1 \cdot 10^6$ T-Zellen mit $2 \cdot 10^5$ autologen DCs, die zuvor für 24 h mit 20 μM Peptidantigen und LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aktiviert wurden in einer 24-Loch-Zellkulturplatte kokultiviert. Nach 5 Tagen wurde IL-2 (1250 U/ml; BD Pharmingen) zugesetzt. Alle 10-14 Tage wurden die Zellen mit antigenbeladenen, autologen DCs restimuliert und in T-Zell-Medium kultiviert. Nach 3 Restimulationen und dann nach jeder weiteren Restimulation wurde die Antigenpezifität der proliferierenden T-Zellen auf sezerniertes IL-4 bzw. IFN- γ mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) überprüft (s. 2.2.6.3.1.)

Zur Generierung antigenspezifischer T-Zell-Klone wurden T-Zellen der spezifischen T-Zell-Linien subkloniert. Dazu wurden die T-Zellen in PBS + EDTA (5 mM) gewaschen und dann Verdünnungen von 10^2 , 10^1 und 10^0 Zellen/ml angesetzt. Anschließend wurden 100 μl der jeweiligen Zellsuspension pro Loch einer 96-U-Loch-Platte in T-Zellmedium ausgesät. Zu den Ansätzen wurden jeweils 5000 DCs sowie 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-L (Sigma) zugesetzt. Nach 5 Tagen wurde das PHA-L-haltige Medium durch PHA-L-freies Medium ausgetauscht. Die Restimulation der proliferierenden Klone erfolgte ebenfalls alle 10-14 Tage durch autologe, antigengepulste DCs.

2.2.6.3 Messung der Cytokinproduktion

2.2.6.3.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Sandwich-ELISA)

Zur Messung der von den T-Zellen freigesetzten Cytokine mittels ELISA wurden $1 \cdot 10^5$ T-Zellen mit je $1 \cdot 10^4$ DCs pro Loch in eine 96-U-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand aufbewahrt.

Die Detektion der im Überstand enthaltenen Cytokine erfolgte in einer ELISA-Platte (Wallac Oy, Turku, Finnland). Dazu wurde die Platte für 24 h bei 4°C mit dem entsprechenden Fangantikörper in Carbonatpuffer (0,5 M, pH 9,6) beschichtet und anschließend mit 0,2 % Gelatine in PBS blockiert. Je 20 μl Überstand wurden dann zu 80 μl PBS/Tween (0,05 %)/BSA (1 %) in die ELISA-Platte pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit PBS/Tween (0,05 %) wurde dann für 1 h bei RT mit dem entsprechenden biotinylierten Detektionsantikörper inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschrritten wurde die Platte für 1 h mit 100 $\mu\text{l}/\text{Loch}$ Streptavidin-Eu (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Wallac Oy) in Assay-Puffer (Wallac Oy) inkubiert. Anschließend wurde 4 weitere Male gewaschen und die saure

Verstärkerlösung (Wallac Oy) zugesetzt, die das Europium (Eu) vom Streptavidin ablöst und chelatiert. Schließlich wurde die Fluoreszenz des Eu-Chelatkomplexes durch Anregung bei 340 nm und Emissionsmessung bei 615 nm zeitaufgelöst (400 μ s) auf einem Wallac Victor2® *Multilabel Counter* (Wallac Oy) gemessen. Über eine Standardkurve aus rekombinanten Cytokin mit bekannter Konzentration konnte die Konzentration des freigesetzten Cytokins im Überstand ermittelt werden.

2.2.6.3.2 Intrazelluläre Durchflußzytometrie

Zur Stimulierung der Cytokinproduktion wurden die T-Zellen 5 h vor der Analyse mit Ionomycin (1 μ g/ml) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA (0,06 μ g/ml)) versetzt und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 3 h wurde den Zellen Brefeldin (10 μ g/ml) zugesetzt, um die Sekretion der synthetisierten Cytokine zu inhibieren.

Vor der intrazellulären Färbung der produzierten Cytokine wurden die Zellen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Saponin (Cytofix/Cytoperm; BD Pharmingen) für 20 min bei 4°C permeabilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit 0,1 % Saponin (Perm/Wash; BD Pharmingen) wurden die Zellen durch Inkubation mit humanen IgG (0,5 mg/ml) für 15 min bei 4°C blockiert und nach 2 Waschschritten durch Inkubation mit einem Gemisch aus IL-4-PE und IFN- γ -FITC bzw. IgG2a-FITC und IgG1-PE (Fastimmune®, BD Pharmingen) für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie (s. 2.2.5).

2.2.7 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Antigengepulste, reife dendritische Zellen wurden mit CD4⁺-T-Zellen in einem Verhältnis von 1:4 in *Chamber Slides* (BD Pharmingen), die zuvor mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet worden waren, in FCS-freiem RPMI-Medium gemischt. Die Zellen wurden für 1 min bei 50 x g zentrifugiert und dann 30 min bei 37°C inkubiert, um die Interaktion von DCs mit T-Zellen zuzulassen. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und dann mit 2 % FCS, 2 % BSA und 0,2 % Gelatine in PBS für 30 min bei 4°C blockiert. Die Zellen wurden für 40 min mit dem jeweiligen Erstantikörper-Gemisch zweier unterschiedlicher Isotypen in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 2 % FCS in PBS und einem in PBS wurden die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min (2 min bei 4°C, 18 min bei RT in einer feuchten Kammer) fixiert. Die Zellen wurden mit 2 % FCS in PBS gewaschen und dann mit 2 % FCS, 2 % BSA, 0,2 % Gelatine und 50 mM Glycin in PBS erneut für 10 min blockiert. Anschließend wurden die Zellen für 40 min mit den entsprechenden Zweitantikörpern inkubiert, zweimal mit PBS + 2 % FCS und einmal mit PBS gewaschen und dann in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA) eingebettet.

Die Darstellung der gefärbten Zellen erfolgte auf einem Leica DMIBRE Mikroskop und die Aufnahme mit Hilfe des Leica TCS NT Confocal Microscope System (Leica Microsystems, Wetzlar) unter Verwendung der 25 x und 40 x Plan Fluotar und 63 x Plan Apochromat Objektive (Leica) und der TCS NT Software, Version 1.6.587. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte bei 488 nm und 569 nm und die Öffnung des *Pinholes* wurde für alle Aufnahmen auf 1 Airy Einheit gesetzt. Zur Generierung der Bilder wurden 160 nm Schnitte entlang der Z-Achse aufgenommen und die 3-D-Rekonstitution erfolgte mit Hilfe der Imaris (IRIX) 3.1.3 Software (Bitplane, Zürich, Schweiz).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Allgemeine biochemische Methoden

2.3.1.1 Detergenz-Lyse

Zur Lyse wurden die Zellpellets in 10-fachem Volumen hypotonem Puffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7,5) inklusive Protease-Inhibitoren (2,5 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM PMSF, 5 µg/ml Pepstatin, 5 µg/ml Chymostatin) und 0,02 % NaN₃ sowie 1 % Triton-X-100 (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgenommen (**Lysepuffer**). Alternativ wurden die Detergenzien Zwittergent 3-12 (1 %) (Calbiochem) oder Octylglucopyranosid (1 %) (Sigma) verwendet. Die Lyse erfolgte bei 4°C für 1 h unter Rotieren oder Schütteln. Anschließend wurden alle nicht-solubilierten Bestandteile wie z.B. Zellkerne und bestimmte Bestandteile des Cytoskeletts für 10 min bei 20000 x g und 4°C abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5417R, Eppendorf, Hamburg).

Die Lyse von Gewebeproben erfolgte durch gleichmäßiges Homogenisieren der in Lysepuffer aufgenommenen Probe in einem Gewebe-Homogenisator (Wheaton, Millville, NJ) auf Eis und anschließendes Inkubieren für 1 h bei 4°C unter Rotieren oder auf einem Schüttler.

2.3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Vorschrift von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde die zu bestimmende, proteinhaltige Lösung auf ein Volumen von 20 µl gebracht und zu 980 µl Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie G-250, 50 ml Ethanol, 100 ml konzentrierte H₃PO₄ pro Liter ddH₂O) pipettiert, das in einer Einmal-Halbmikroküvette (Greiner, Lemgo) vorgelegt wurde. Nach 3-maligem Invertieren und 10

minütiger Wartezeit wurde die Absorption bei 595 nm an einem Spektrophotometer (Smartspec 3000®, BioRad) bestimmt. Die Eichung wurde mit wasserfreiem BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 µg/ml vorgenommen.

Die Bradfordlösung muss nach der Herstellung filtriert werden und kann dann in einer Braunglasflasche aufbewahrt werden.

2.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach dem Prinzip von U.K. Lämmli durchgeführt (Lämmli, 1970), d.h. unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Tris-HCl, Tris-Glycin-Puffersystem. Zum Aufbau der Gele wurden Gelplatten (CTI, Idstein Taunus) verwendet, die eine Abmessung von 10 x 8 cm für die Minigele und 17 x 8 cm für die Standardgele hatten, bei einer *Spacer*-Dicke von 1 mm. Die Komponenten des Sammel- und Trenngels wurden dabei entsprechend der Reihenfolge und den Angaben von Tabelle 2.1 zusammenpipettiert. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, welches vor dem Auffüllen des Sammelgels durch gründliches Waschen mit aqua bidest. wieder entfernt wurde. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (CTI, Idstein Taunus) eingespannt und anschließend Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) in das obere und untere Pufferreservoir gefüllt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

(Angaben in ml)	Sammelgel		Trenngel	
	3,60%	10%	11,50%	13,50%
1 M Tris, pH 8,8	-	5,00	5,00	5,00
1 M Tris, pH 6,8	0,68	-	-	-
aqua bidest.	3,54	3,35	2,75	1,83
30 % (w/v) Acrylamid/	0,72	4,40	5,00	5,92
0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Mix) (Biorad)				
10 % SDS	0,06	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,05	0,025	0,025	0,025
10 % APS	0,05	0,10	0,10	0,10

Die Proben wurden 1:4 (v/v) mit 5 x Lämmli-Probenpuffer (150 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6 % SDS, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin) versetzt, anschließend 5 min bei 95°C gekocht und dann auf Eis abgekühlt. Für reduzierende Gele wurde den Proben vor dem Kochen noch 1,4-Dithiothreitol (1,4-DTT; 0,3 M) zugesetzt. Nach dem Abkühlen wurden

die Proben in die Probentaschen pipettiert, als Molekulargewichtsstandard wurde der *Kaleidoscope Prestained Standard* (BioRad, Hercules, CA) verwendet, der einen Molekulargewichtsbereich von 8 kDa bis 218 kDa abdeckt.

Die Elektrophorese fand unter Konstanthaltung des Stroms ($I_{\text{konst}} = 19$ mA pro kleinem Gel und $I_{\text{konst}} = 38$ mA pro großem Gel) bei einer maximalen Spannung von 160 V für ca. 1,5 h statt.

2.3.1.4 Coomassie Färbung

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele für 30 min unter sanftem Schütteln in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Serva Blue R, 50 % (v/v) Methanol, 8 % (v/v) Eisessig, filtriert) überführt. Zum Entfärben wurden die Gele bis zum Verschwinden des blauen Hintergrunds in eine Lösung aus 7 % (v/v) Eisessig und 10 % (v/v) Methanol gelegt, dann in aqua bidest. gewässert, getrocknet und in Folie eingeschweißt.

2.3.1.5 Western Blot Analyse

Das Blotten der Gele erfolgte nach dem *Semi-Dry*-Verfahren auf Immobilon P Transfer Membranen (PVDF, 0,45 μm ; Millipore) in einer *Semi-Dry*-Blotkammer (CTI, Idstein Taunus). Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung kurz in Methanol getaucht, dann für 2 min in aqua bidest. gewaschen und schließlich in Puffer II (25 mM Tris/HCl, pH 10,2, 20% Methanol) gegeben. Das Methanol wurde allen Puffern erst kurz vor der Verwendung zugesetzt. Der Blot wurde im Sandwich-Verfahren aufgebaut, beginnend von der Anode mit 8 x 3 MM Whatmanfilterpapieren getränkt in Puffer I (300 mM Tris/HCl, pH 10,2, 20 % (v/v) Methanol), gefolgt von 2 x 3 MM Whatmanfilterpapieren getränkt in Puffer II. Auf diese Filterpapiere wurde die PVDF-Membran gelegt und direkt darüber das ebenfalls in Puffer II inkubierte Gel. Abschließend wurden 6 Whatmanfilterpapiere getränkt in Puffer III (25 mM Tris/HCl, pH 9,4, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 20 % Methanol) auf den Blot gelegt und abschließend die Kathode aufgesetzt. Der Blot sollte absolut luftblasenfrei sein und die PVDF-Membran nach dem Benetzen mit Methanol nicht mehr trocken werden. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA für ein Gel, 160 mA für 2 Gele, bei einer maximalen Spannung von 150 V für 1 h.

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen zunächst für >1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in eine Blockierlösung (1 % Blockierreagenz (Roche Diagnostics) in PBS mit 0,05 % Tween-20 (PBS/Tween)) gelegt. Das Ansetzen der Blockierlösung erfolgte durch Aufkochen des Blockierreagenz in PBS/Tween. Nach dem Blockieren konnte die Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln vorgenommen werden. Anschließend

wurde die Membran 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitreagenz (Verdünnung 1:100000) für 45 min bei RT inkubiert.

Die Detektion des gefärbten Proteins erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dazu wurde die Membran 3 weitere Male mit PBS/Tween gewaschen und anschließend für ca. 1 min mit einer SuperSignal® West Dura Extended-Lösung (Pierce, Lausanne, Schweiz) benetzt. Die Lösung setzte sich aus gleichen Teilen Luminol/Enhancer und Peroxid-Puffer zusammen. Das Chemolumineszenz-Signal konnte entweder durch Auflegen eines Films (Biomax ML, Kodak, Rochester, NY) und anschließende Entwicklung in einer Entwicklungseinheit (Kodak) sichtbar gemacht werden, oder durch Detektion mit Hilfe des Lumi-Imagers F1® und der Analyse-Software LumiAnalyst® (Roche Diagnostics). Der Lumi-Imager erlaubte auch die quantitative Auswertung der Bandenintensität, wenn auf demselben Blot eine Standardkurve mit verschiedenen bekannten Menge des zu untersuchenden Proteins vorhanden war.

2.3.2 Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitationen wurden mit immobilisierten Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper wurden dazu kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose-*Beads* (CL-4B, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Die Sepharose-*Beads* wurden vor ihrer Verwendung durch zweimaliges Waschen in dem entsprechenden Lysepuffer äquilibriert. Dann wurden sie in einem Verhältnis von etwa 1:12 bis 1:20 zu den Zell-Lysaten gegeben und anschließend in Abhängigkeit von der Konzentration des zu präzipitierenden Proteins und der Affinität des Antikörpers mindestens 1 h bis zu 24 h bei 4°C unter langsamem Rotieren oder Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *Beads* bei 2600 x g für 1 min und 4°C abzentrifugiert und anschließend 3-4 Mal in Lysepuffer oder 0,1 % Zwittergent 3-12 in PBS gewaschen. Nach Aufnehmen in Lämmli-Probenpuffer und 5-minütigem Kochen bei 95°C wurden die Proteine denaturiert und die Präzipitate konnten mittels SDS-Page oder Western-Blot analysiert werden.

Für Co-Immunpräzipitationen (CoIPs) wurde ähnlich verfahren wie für Immunpräzipitationen, allerdings wurden hier, speziell für die Analyse schwacher Protein-Protein-Interaktionen oder die Untersuchung von Proteinkomplexen, schwächere Detergenzien verwendet, wie z.B. 1 % Octylglucopyranosid oder 1 % CHAPS anstelle von Triton-X-100. Die Präzipitate wurden bei den CoIPs mit dem gleichen Detergenz gewaschen, in dem die Zellen lysiert wurden.

2.3.3 Isolierung MHC II-assoziiierter Peptide

Die Zellpellets wurden in 1 % Triton-X-100-haltigem Lysepuffer lysiert und anschließend die MHC II-Moleküle durch Sepharose-*Beads*-gekoppelte anti-MHC II-Antikörper (L243 für HLA-DR, Y3P für I-A) präzipitiert (s. 2.3.2 Immunpräzipitation). Nach dreimaligem Waschen der *Beads* in 0,1 % Zwittergent wurden sie in Ultrafree®-MC Zentrifugations-Filtreinheiten mit einer Maximaldurchlässigkeit von 30 kDa (Millipore, Bedford, MA) überführt und 8 weitere Male mit ddH₂O (Merck, Darmstadt) gewaschen (Zentrifugation bei 20000 g für ca. 40-60 s). Die Elution der Peptide aus den an den *Beads* immobilisierten MHC II-Molekülen erfolgte unter Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure und anschließende Inkubation für 35 min bei 37°C. Die nach Zentrifugation (2 min, 20000 x g) in ein Eppendorf-Gefäß freigesetzten Peptide wurden umgehend lyophilisiert und dann bei 4°C für eine anschließende Analyse aufbewahrt.

2.3.4 Peptidbindungsassays

2.3.4.1 In vivo Peptidbindungsassay

Zu dendritischen Zellen in einer 6-Loch-Platte wurde ein Gemisch der biotinylierten Peptide Bio-HA (307-319) und Bio-TT (829-843) gegeben. Diese Peptide wurden gewählt, da HA (307-319) stark promiscue Bindungseigenschaften für eine Vielzahl der häufig vorkommenden HLA-DR-Haplotypen (HLA-DR1, -DR2, -DR4, -DR5) zeigt und TT(829-843) sehr gut an HLA-DR3 bindet. Den DCs wurde zusammen mit den Peptiden, oder je nach Experiment zeitlich versetzt, ein inflammatorischer Stimulus zugesetzt. Für Kompetitionsassays wurden zusätzlich zu den biotinylierten Reporterpeptiden auch unmarkierte Peptide, Proteinantigene oder lebende, apoptotische oder nekrotische Tumorzellen zu den DCs gegeben. Die Bindung der Bio-Peptide an die HLA-DR-Moleküle der DCs ließ sich nach verschiedenen Zeitspannen mittels *Sandwich*-ELISA detektieren. Dazu wurden die DCs geerntet und gewaschen und anschließend in Lysepuffer lysiert. Dann wurden je 20 µl Lysat zu 80 µl PBS/Tween/BSA auf eine ELISA-Platte pipettiert, die für 24 h mit dem Anti-HLA-DR Antikörper L243 (3 µg/ml) beschichtet worden war (s. Cytokin-ELISA 2.2.6.3.1). Mit Streptavidin-Europium konnten die gebundenen, biotinylierten Peptide quantifiziert werden.

2.3.4.2 Peptid-MHC-Bindungsassay

Die Bindungsaffinitäten von Peptiden an verschiedene HLA-DR-Typen wurden durch Peptid-MHC-Bindungsassays ermittelt. Dazu wurde das entsprechende DR-Isolat (20 nM) mit biotinyliertem HA (307-319) (200 nM) als Reporterpeptid und dem zu untersuchenden Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen in Bindungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM NaCl, pH 4,8, 0,1 % Zwittergent 3-12) gemischt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion des an HLA-DR gebundenen, biotinylierten Reporterpeptids erfolgte mittels *Sandwich*-ELISA durch Bindung des HLA-DR-Isolats an eine mit Anti-HLA-DR-Antikörper beschichtete ELISA-Platte (s. In vivo Peptidbindungsassays 2.3.4.1).

2.3.4.3 HLA-DM-Aktivitätsassay

Unreife und LPS-maturierte DCs wurden in Lysepuffer + NaVO₄ (1 mM), NaF (10 mM), NaP₂O₅ (10 mM) lysiert. Anschließend wurde HLA-DM aus beiden Zellen mit immobilisiertem HLA-DM-Antikörper (DM.K8) immunpräzipitiert. Die *Beads* wurden mit Detergenz-solubilisierten HLA-DR1 (20 nM) und Bio-HA (50 nM) für 25 min bei 37°C mit 50 µl Bindungspuffer (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM NaCl pH 4,5, 0,1 % Zwittergent 3-12) inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl des Bindungsansatzes für 3 h bei 4°C an die mit Anti-DR-Antikörper beschichtete ELISA-Platte gebunden. Die Quantifizierung der gebildeten HLA-DR1-Bio-HA-Komplexe erfolgte mittels *Sandwich*-ELISA (s. 2.3.4.1 und 2.3.4.2: Peptidbindungsassays).

2.3.5 Isolierung monoklonaler Antikörper

2.3.5.1 Affinitätschromatographische Reinigung mittels Protein A

Der aus Minifermentern gewonnene, klare antikörperhaltige Hybridomzellüberstand (s. 2.2.2: Kultivierung von Hybridomzellen) (ca. 40 ml) wurde zunächst durch langsames, portionsweises Zugeben von Glycin und NaCl unter Rühren bei RT auf eine Konzentration von 1,5 M Glycin, 3 M NaCl und 0,02 % NaN₃ gebracht (pH 8,9). Die Protein A Säule wurde folgendermaßen vorbereitet: Zunächst wurde die Protein A Sepharose Cl-4B (Kapazität: 20 mg/ml; Amersham Pharmacia, Freiburg) 2 x in PBS gewaschen und anschließend ca. 3 ml der Sepharose in eine P-10-Polypropylensäule (Amersham Pharmacia) gefüllt. Vor ihrer Verwendung mußte die Säule mit Hochsalzpuffer (3 M NaCl, 1,5 M Glycin, pH 8,9) äquilibriert werden. Der antikörperhaltige Überstand wurde 3 Mal langsam (40 ml/h) über die

Säule gegeben, um eine möglichst vollständige Bindung des Antikörpers an die Protein A Sepharose zu erreichen. Dann wurde die Säule mit ca. 200 ml Hochsalzpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 50 ml Citratpuffer (100 mM Natriumcitrat, pH 8) um Glycin zu entfernen, welches im späteren Kupplungsschritt stört. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 100 ml/h bei pH 3 mit Citratpuffer (100 mM, pH 3) in drei Elutionsschritten à 30 ml. Die Eluate wurden sofort bei RT mit 1 M NaOH auf pH 6,5-7 eingestellt. Die Säule wurde durch weiteres Waschen mit Elutionspuffer und Hochsalzpuffer regeneriert.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Antikörpereluat in einer Amicon-Kammer (Millipore) (*Cutoff* 20 kDa) aufkonzentriert und entweder auf PBS oder für die spätere Kupplung an CNBr-aktivierte Sepharose auf Kupplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8) umgepuffert. Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Antikörper erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.3.5.2 Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose

Die CNBr-aktivierte Sepharose CI-4B (Amersham Pharmacia) wurde für 30 min bei 4°C in 1 mM HCl gequollen (1 g Sepharose quellen zu einem Volumen von 3 ml). Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (300 x g, 3 min) und mit Kupplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8) gewaschen. Dann konnte der gereinigte Antikörper in einer Konzentration von etwa 1 mg/ml in Kupplungspuffer auf die Sepharose gegeben und für 24 h bei 4°C oder 3 h bei RT unter langsamer Kopf-über-Kopf Rotation immobilisiert werden. Es wurde dann überprüft, ob der Überstand proteinfrei war, die Immobilisierung also erfolgreich verlaufen war. Nach Abnehmen des proteinfreien Überstandes ließen sich die noch reaktiven Bindungsstellen durch Zugabe von 100 mM Tris, pH 8, für 1 h unter Rotieren abgesättigen. Schließlich wurde die Sepharose zweimal in PBS gewaschen und dann nach Zusatz von 0,02 % NaN₃ bei 4°C bis zur Anwendung für die Immunpräzipitation gelagert.

2.4 Massenspektrometrische Methoden

2.4.1 MALDI-MS

Die Analyse der aus den MHC II-Molekülen eluierten Peptide erfolgte mittels *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry* (MALDI-MS). Die Probenvorbereitung geschah nach der Methode des „getrockneten Tröpfchens“. Dazu wurden die lyophilisierten Peptide (s. 2.3.3 Isolierung MHC II-assoziiertes Peptide) in 0,35 µl TFA (0,1 % in ddH₂O) (Merck) aufgenommen und auf ein Probenblech (*Anchorchip Plate*, Bruker, Bremen) pipettiert. Sofort danach wurden 0,25 µl α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (5 mg/ml in 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA) (Merck) dazu pipettiert und die Mischung bei RT zum Auskristallisieren stehengelassen. Aufgrund der hydrophoben Beschichtung der Probenpositionen auf der *Anchorchip*-Platte zieht sich die Mischung während des Kristallisationsprozesses auf ein kleines Volumen zusammen, wodurch eine Konzentrierung der Probe bewirkt wird.

Die Messung erfolgte an einem Reflex III® TOF oder einem Ultraflex® TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker). Die Kalibrierung der Geräte wurde mit Hilfe der theoretischen Massen der tryptischen Peptide aus humanem Albumin vorgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im Reflectron-Modus durch Summation der Einzelspektren von 200-600 Laserschüssen. Die Datenaufnahme wurde mithilfe der Software FLEXcontrol 1.1 Alpha® (Bruker) durchgeführt. Darstellung und Auswertung der Spektren erfolgten unter Verwendung der Software Fragment21 (Dr. Peter Berndt, Roche, Basel, Schweiz).

2.4.2 MALDI-PSD-MS

Die Sequenzierung einiger MHC-Peptide konnte mittels MALDI-PSD (MALDI-*Post Source Decay*) erreicht werden. Beim MALDI-PSD können die metastabilen Fragmentierungen, die nach dem MALDI-Ionisierungsprozess der Moleküle in der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs entstehen, detektiert werden. Die Aufnahme der MALDI-PSD-Spektren erfolgte am Ultraflex® TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker). Die zu sequenzierenden Peptide wurden dazu im LIFT-Modus (PSD-Analyse) aufgrund ihrer spezifischen Masse zunächst isoliert und die Masse des Mutterions aufgenommen. Anschließend wurden die Fragmentierungsspektren durch Aufsummation der Einzelspektren im LIFT-Modus aufgezeichnet. Die Annotierung der Fragmentpeaks und Auswertung der Spektren erfolgte automatisch mit Hilfe der Software Xmas 5.1.2 und Biotools 2.1 (Bruker). Die Sequenzidentifizierung erfolgte über die *Swiss.Fasta. All organisms* Proteindatenbank unter Verwendung des Mascot-Algorithmus.

Teilweise musste die MHC II-Peptidmischung vor der MALDI-PSD-Analyse durch einen einfachen HPLC-Gradienten vorfraktioniert werden. Dazu wurde die Probe auf einem Ultimate® Nano-LC System (LC Packings, Dionex, Olten, Schweiz) bei einer Flussrate von 200 nl/min aufgetrennt und die Fraktionen im Zeitintervall von 1 min auf ein Probenblech

aufpipettiert. Als Gradient wurde ein eindimensionaler Acetonitril-Gradient mit folgendem Profil verwendet: 1 min 5 % ACN, 40 min von 5 auf 50 % ACN, 2 min von 50 auf 90 % ACN, 2 min 90 % ACN, 1 min von 90 auf 5 % ACN, 15 min 5 % ACN.

2.4.3 Peptidsequenzierung mittels LC-MS/MS

Die Sequenzierung der MHC II-Peptidgemische erfolgte standardmäßig nach dem MudPit-Verfahren (*Multidimensional Protein Identification Technology*) (Washburn et al., 2001). Diese Technologie basiert auf der zweidimensionalen, flüssigchromatographischen Auftrennung komplexer Peptid- oder Proteingemische mit nachfolgender massenspektrometrischer Sequenzierung. Die beim MudPit verwendeten Trennsäulen sind sogenannte gekoppelte Säulen, in denen Ionenaustauscher-Material (SCX) und Reverse Phase-Material (RP) direkt hintereinander in eine sogenannte *Fused-Silica*-Kapillare gepackt werden.



Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer MudPit-Trennkapillare

Die Säulenmaterialien werden direkt hintereinander in eine *Fused-Silica*-Kapillare gepackt (gekoppelte Säule). Im hinteren Teil der Säule befindet sich das Ionenaustauscher-Material (SCX), davor das Reverse Phase Material (C18-ACE). Die Säule dient gleichzeitig auch als Elektrosprayquelle.

Die Chromatographie erfolgt in mehreren Stufen steigender Salzkonzentration gefolgt jeweils von einem kontinuierlichen Gradienten mit steigender Hydrophobizität. Die Kapillare dient gleichzeitig als Elektrosprayquelle und wird direkt vor das *Orifice* des Massenspektrometers montiert.

Als Pumpe für die Durchführung der Nano-HPLC diente die Ultimate® Mikropumpe (LC-Packings, Dionex), als Massenspektrometer wurde das Finnigan LCQ Dekka XP Plus Ion Trap MS (Finnigan, Bremen) verwendet.

2.4.3.1 Herstellung und Vorbereitung der Trennsäulen

Zur Herstellung der Trennsäulen wurden *Fused-Silica*-Mikrokapillaren (100 μm i.d. x 375 μm ; LC Packings, Dionex, Olten, Schweiz) mit Hilfe eines *Laserpullers* (P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA) zu Kapillarsäulen ausgezogen. Anschließend ließen sich die Säulen mit den Trennmaterialien füllen. Die Trennmaterialien wurden zunächst in Methanol gewaschen und resuspendiert und dann ca. 5 cm C18-RP-Material (C18-ACE 3 μm [ProntoSIL 120-3-C18 ACE-EPS, Leonberg]) in einer Druckkammer bei 100 bar mit Helium eingespült. Anschließend wurden ca. 3 cm SCX-Material (5 μm Partishere SCX, Whatman, Clifton, NJ) auf gleiche Weise eingespült und die Säule trockengeblasen. Vor ihrer Verwendung mußten die Säulen gespült und äquilibriert und die Flussrate auf ca. 200 nl/min eingestellt werden. Anschließend wurde 1 pmol tryptisch verdautes, humanes Serum Albumin auf die Säule geladen und eluiert, um unspezifische Bindungsstellen des Säulenmaterials abzusättigen.

2.4.3.2 Chromatographische Trennung und MS/MS-Analyse von MHC II-Peptidgemischen

Die lyophilisierten Peptide wurden in 10 μl Beladungspuffer (5 % (v/v) Acetonitril (ACN), 0,5 % (v/v) Essigsäure (HAc), 0,012 % (v/v) Heptafluorbuttersäure (HFBA), 1 % (v/v) Ameisensäure) aufgenommen und mit Hilfe einer Druckkammer auf die vorbereitete Trennkapillare geladen. Die Trennkapillare wurde komplett trocken geblasen und dann vor das *Orifice* des *Ion Trap*-Massenspektrometers montiert.

Die Elution der Peptide erfolgte mit einer Flussrate von ca. 200 nl/min bei gleichzeitiger Massenanalyse und Fragmentierung in der Ion-Trap.

Folgende Puffer wurden für die Herstellung der Elutionsgradienten verwendet:

Puffer A: 5 % (v/v) ACN, 0,5 % (v/v) HAc, 0,012 % (v/v) HFBA

Puffer B: 80 % (v/v) ACN, 0,5 % (v/v) HAc, 0,012 % (v/v) HFBA

Puffer C: 250 mM Ammoniumacetat in Puffer A

Puffer D: 1,5 M Ammoniumacetat in Puffer A

Die Elution der Peptide erfolgte durch 10 Gradienten mit jeweils unterschiedlicher Konzentration an Ammoniumacetat. Der erste Gradient mit 116 min Länge enthielt keinen Salz-Elutionsschritt (Abb 3-3 A), die Gradienten 2-6 mit jeweils 146 min Länge enthielten je einen fünfminütigen Salz-Elutionsschritt mit steigenden Konzentrationen an Puffer C (20-90%) (Abb 3-3 B). Der 7. Gradient von 140 min Länge enthielt einen 20 minütigen Salz-Elutionsschritt mit 100 % Puffer C (Abb 3-3 C), der darauffolgende Gradient den gleichen

Salz-Elutionsschritt mit Puffer D (Abb 3-3 D). Die letzten beiden Gradienten waren eine Wiederholung der Gradienten 7-8, allerdings mit nur 110 min Länge. Sie dienen der vollständigen Elution des Materials von der Säule.

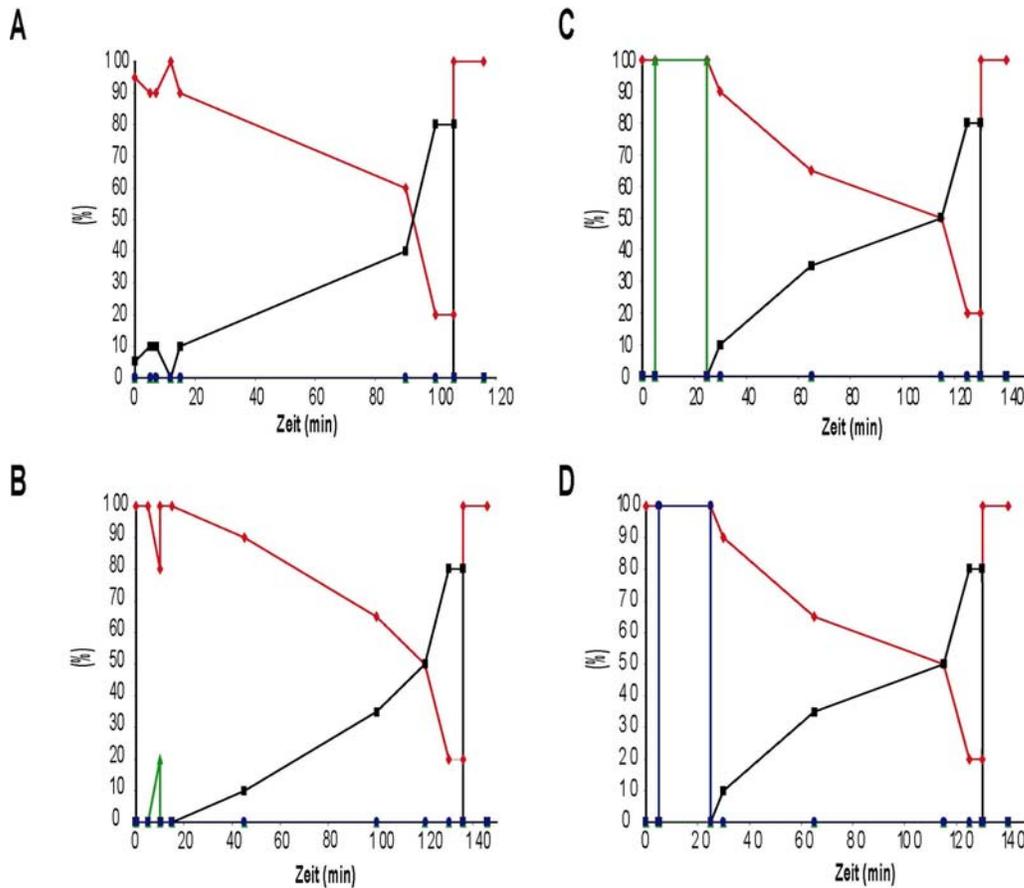


Abb. 2-3: MudPit Gradienten.

A) zeigt den ersten Gradienten, B) die Gradienten 2-6 mit steigendem Anteil an Puffer C (dargestellt ist der Elutionsschritt mit 20 % C.) C) zeigt den Elutionsschritt 7, D) Elutionsgradient 8. Die rote Linie entspricht dem Verlauf von Puffer A, die schwarze Puffer B, die grüne Puffer C und die blaue Puffer D.

2.4.3.3 Datenbanksuche und Selektion

Zur Interpretation der in der Ion-Trap gemessenen MS/MS-Fragmentspektren wurde der SEQUEST Algorithmus verwendet. SEQUEST nimmt eine vollautomatisierte Analyse der Spektren vor, indem es sie mit theoretischen, virtuell erzeugten Fragmentspektren aller in der verwendeten Datenbank vorkommenden Peptide mit identischer Masse des Mutterions (m/z) vergleicht. Für die Generation von MS/MS-Spektren wurde die Auswahl der Mutterionen im MS-Modus auf einen Molekulargewichtsbereich von m/z 400-2000 beschränkt. Aus dem Vergleich des virtuellen Spektrums mit dem gemessenen Spektrum wird eine sogenannte *Cross-Correlation* errechnet. Das Peptid mit der höchsten *Cross-Correlation* zum gemessenen Fragmentspektrum wird von SEQUEST als bester Treffer angezeigt. Der

Unterschied zum nächstbesten Peptid wird über die *Delta Cross Correlation* offenbart und ist ein weiterer wichtiger Parameter für die Zuverlässigkeit des Treffers.

Für die Auswahl der Fragmentspektren und anschließende Datenbanksuche wurden folgende Filter benutzt: Es wurden nur solche Spektren gesucht, die einen *Total Ion Current (TIC)* von mehr als $5 \cdot 10^5$ sowie eine Mindestzahl von 35 Fragmentionen aufwiesen. Als Datenbank wurde die *Swiss. Fasta. All organisms* gewählt und eine Fragmentionentoleranz von 1,2 Da sowie eine Massentoleranz für das Mutterion von 1,5 Da zugelassen.

Die Auswahl der im SEQUEST *Summary* angegebenen Treffer erfolgte im wesentlichen über die Parameter *Cross-Correlation* und *Delta Cross-Correlation*. Es wurden nur solche Peptide in die engere Wahl genommen, die eine *Cross-Correlation* $>2,5$ sowie eine *Delta Cross Correlation* von $>0,1$ aufwiesen. Alle MS/MS-Spektren dieser Peptide wurden zusätzlich einer manuellen Evaluation unterzogen und nur solche Peptide ausgewählt, die zusätzlich zu den SEQUEST Auswahlkriterien aufgrund der Eigenschaften ihrer Fragmentspektren in höchstem Maße plausibel erschienen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Primer und Sonden

Primerpaar spezifisch für das lange Melanotransferrin-Transkript (Sequenz aus Exon 9).

5'-CAGTGCGTGTCAGCCAAGTC

3'-TTCCCCGCCGTGTAAATGT

Taqman®-Sonde spezifisch für das lange Melanotransferrin-Transkript

P'-AGCGTCGACCTGCTCAGCCTGG

Primerpaar spezifisch für das kurze Melanotransferrin-Transkript (Sequenz aus Exon 7).

5'-TGGCTGATGGAAGCACCTAAA

3'-TACCCCCGCTTCCCAACT

Taqman®-Sonde spezifisch für das kurze Melanotransferrin-Transkript

P'-TTTTCGGCGGCTGCAAAACCTTT

2.5.2 DNA Microarray-Analyse

2.5.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellpellets

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde zunächst 1 ml RNazol zu ca. 50 mg Zellpellet zugegeben und homogenisiert. Anschließend wurden 10 % Chloroform zugesetzt, homogenisiert und für 5 min auf Eis gekühlt. Nach Abzentrifugation bei 12000 x g für 15 min wurde der Überstand mit 2 Volumen Isopropanol versetzt und für 15 min auf Eis gekühlt. Nach abermaligem Abzentrifugieren bei 12000 x g für 10 min wurde das Pellet in 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde sodann in Rnase-freiem Wasser durch 10 minütiges Erwärmen auf 55-60°C gelöst und anschließend die Konzentration durch OD₂₆₀-Messung bestimmt.

2.5.2.2 cDNA-Synthese

20 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl T7-(T)₂₄ Primer (100 pmol/µl) in einem Gesamtvolumen von 9 µl gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 4 µl 5 x Erststrang-Synthese-Puffer (Gibco BLR), 2 µl DTT (0,1 M) und 2 µl dNTP-Gemisch (10 mM) (Gibco BLR) zugesetzt.

Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C erwärmt und anschließend 4 µl Reverse Transkriptase *Superscript II* (SSII RT, 200 U/µl) (Gibco BLR) zugesetzt und für 1 h bei 42°C inkubiert.

Sodann wurden zur Synthese des zweiten Stranges auf Eis 91 µl DEPC-H₂O, 30 µl 5 x Zweitstrang-Synthese-Puffer (Gibco BLR), 3 µl dNTP, 1 µl E. coli DNA Ligase (10 U/µl, Gibco BLR), 4 µl E. coli DNA-Polymerase I (10 U/µl, Gibco BLR) und 1 µl Rnase H (2 U/ml, Gibco BLR) zugesetzt und bei 16°C für >2 h inkubiert. Dann wurden 2 µl T4 DNA Polymerase zugegeben (10 U/µl, Gibco BLR) und 5 min bei 16°C inkubiert. Abschließend wurde die Lösung mit 1 µl RNase A (25 µg/ml, Gibco BLR) für 30 min bei 37°C inkubiert und dann mit 2,5 µl Proteinase K (0,6 U/ml, Gibco BLR) ebenfalls für 30 min bei 37°C.

Die Reinigung der synthetisierten cDNA erfolgte durch Zugabe von 150 µl DEPC-H₂O und 300 µl einer vorgefertigten Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol-Lösung (25:24:1, Gibco BLR) und anschließende Überführung der Mischung in ein sogenanntes Phase-Lock Gefäß (Eppendorf). Anschließend wurde für 2 min bei 12000 x g abzentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden dann 50 % (v/v) Ammoniumacetat (7,5 M) ca. 100 µg/ml Glycogen und 2,5 Volumen eiskalter Ethanol (100 %) zugesetzt. Nach Zentrifugation bei RT und 16000 x g für 20 min wurde das Pellet 2 Mal in 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 10 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Qualität der cDNA ließ sich auf einem 1 % Agarose-Gel überprüfen.

2.5.2.3 In vitro Transkriptions-Markierung

Die cDNA wurde mit 14,5 µl Bio-NTP-Gemisch (je 75 mM aller Nucleotide + 10 mM Bio-11-CTP + 10 mM Bio-16-UTP, (Ambion, Austin, Tx)) sowie je 2 µl 10 x T7 Transkriptionspuffer und 10 x T7 Enzym-Mix (Ambio) gemischt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die transkribierte RNA mittels RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden) gereinigt und auf einem Formaldehyd-Gel die Qualität überprüft.

Zur Fragmentierung wurden 10-20 µg RNA in 1 x Fragmentationspuffer aufgenommen (Endkonzentration von 0,5-1 µg/µl) und bei 95°C für 35 min inkubiert.

2.5.2.4 Genchip-Hybridisierung

Für die Genexpressionsanalyse wurde der Genchip U95A (Affimetrix, Santa Clara, CA) verwendet. Jeder Chip wurde zunächst mit 220 µl Vorbehandlungslösung (25 µl acetyliertes BSA (20 µg/µl), 50 µl Hering Sperma DNA (10 µg/µl) 2 x MES-Hybridisationspuffer, 425 µl DEPC-H₂O) für 15 min bei 40°C unter Rotieren auf einem Rondell (60 Umdrehungen/min) gespült.

20 µl fragmentierte cRNA wurde mit 2,5 µl biotinyliertem Oligo 948, 2,5 µl Hering-Sperma DNA (10 µg/ml), 6,25 µl acetyliertem BSA, 125 µl 2 x MES-Hybridisationspuffer und 97,5 µl DEPC-H₂O für 5 min bei 95°C erhitzt, auf den Genchip geladen und dann bei 45°C und 60 Umdrehungen/min über Nacht inkubiert. Der Chip wurde mit 6 x SSPE für 5 min gewaschen, mit MES-Waschpuffer gespült und anschließend mit diesem Puffer für 30 min bei 45°C unter Rotation gewaschen. Dann wurden 125 µl 2 x Färbepuffer mit 110 µl DEPC-H₂O, 12,5 µl acetyliertem BSA (50 µg/µl) und 2,5 µl Strptavidin (1 mg/ml) gemischt und für 15 min bei 40°C bei 60 Umdrehungen/min auf den Chip gegeben. Anschließend wurde der Chip für 5 min mit 6 x SSPE gewaschen. Zur Verstärkung des Signals wurde der Chip dann mit einem biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörper (2 µg/ml in 2 x Färbepuffer + acetyliertem BSA) für 30 min bei 40°C unter Rotieren versetzt und wiederum für 5 min in 6 x SSPE gewaschen. Das Färben erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Phycoerythrin in gleichem Puffer für 15 min bei 40°C und 60 Umdrehungen/min. Schließlich wurde der Chip ein letztes Mal für 5 min in 6 x SSPE gewaschen und dann komplett und luftblasenfrei mit 6 x SSPE aufgefüllt.

Die Messung des Genchips erfolgte im *Cofocal Laser Scanner* (Hewlett Packard) mit Hilfe der Software GeneChip v3.1 (Affymetrix). Der Expressionslevel jedes Gens wurde als mittlere Fluoreszenzintensität in Relation zur Hybridisierungsintensität ungepaarter Oligonukleotide berechnet. Zur Angabe des mRNA-Levels der einzelnen Gene wurden Mittelwerte aus drei unabhängigen Genchip-Hybridisierungen pro Ansatz ermittelt.

2.5.3 Single Target Expression Profiling (STEP-Analyse)

Um die Expression bestimmter Proteine auf mRNA-Ebene in einer Reihe unterschiedlicher Krebs- und Normalgewebe untersuchen zu können, wurde die STEP-Analyse durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Roche-interne Methode, die auf der Applied Biosystems Taqman® Technologie basiert und in der Arbeitsgruppe von Jürgen Hammer in Nutley, NJ durchgeführt wurde. Die Expressionsdaten wurden über quantitative Echtzeit PCR (*polymerase chain reaction*) generiert.

Die Echtzeit PCR erfolgte gleichzeitig für das zu untersuchende Gen und das Referenzgen GAPDH (Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Dazu wurden die jeweiligen *Primer* für GAPDH und das zu untersuchende Gen (900 nM) mit der Fluorophor-Quencher markierten genspezifischen Taqman®-Sonde (200 nM) in einer 384-Loch optischen Platte mit je 200 pg der gewebsspezifischen cDNA und dem Taqman® Universal PCR Master Mix (Gesamtvolumen pro Loch 25 µl) gemischt und 40 Zyklen mit folgenden Konditionen gefahren: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 62°C für 1 min. Die während der PCR freigesetzten, fluoreszenzmarkierten Nukleotide wurden auf einem ABI Prism® PE7900 Sequenz Detektionssystem (Perkin-Elmer, Lincoln, CA) quantifiziert. Die Expressionsintensitäten des zu untersuchenden Gens wurden relativ zu der des Referenzgens normalisiert und als relative Expression angegeben:

$$E = 2^{(\Delta Ct)}$$

Dabei ist ΔCt die Differenz der Zyklenzahl zwischen Referenzgen und zu untersuchendem Gen, nach der die Amplifikation einen festgelegten Schwellenwert durchschreitet. Die Expression des Referenzgens GAPDH wurde dabei in jedem Gewebe wiederum durch Vergleich mit der Expression acht weiterer *housekeeping* Gene normalisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Präsentation endogener Selbstpeptide auf MHC II-Molekülen dendritischer Zellen

3.1.1 Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs

Trotz der immer deutlicher werdenden Bedeutung von MHC-II-Selbstpeptiden für die T-Zell-Physiologie und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (s. Einleitung), hat man die von dendritischen Zellen präsentierten Selbstpeptide bisher nicht untersuchen können, so dass ihre Identität bis heute weitgehend unbekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst überprüft werden, ob sich die unterschiedlichen Funktionen unreifer, toleranzinduzierender DCs und reifer, immunitätsinduzierender DCs auch in unterschiedlichen Selbstpeptid-Repertoires manifestieren würden. Dazu sollten mittels massenspektrometrischer Verfahren die MHC II-restringierten Selbstpeptid-Repertoires unreifer und reifer DCs verglichen und die präsentierten Peptide mittels LC-MS/MS sequenziert werden.

HLA-DR-Moleküle wurden von ca. $5 \cdot 10^6$ unreifen und reifen (Aktivierung mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) für 24 h) humanen DCs isoliert, die MHC II-Peptide eluiert und mittels MALDI-MS analysiert (Abb. 3-1 A). Die gemessenen Peptide wurden im Masse/Ladungs-Bereich (m/z) = 1400-2800 abgebildet, da dies dem für MHC II-Peptide typischen Massenfenster entspricht. Dies führte im allgemeinen zu einer Auflösung von mehreren hundert unterschiedlichen Peptidsignalen. Der Vergleich der Peptidmassen in den Spektren unreifer und reifer DCs zeigte, dass diese in eine Massebereich bis $m/z = 2200$ nahezu identisch waren. Ein dramatischer Unterschied zeigte sich allerdings für den Bereich $m/z > 2200$. Hier wiesen nur die Peptidprofile reifer DCs sehr dominante Signale auf, die aufgrund ihrer Massenidentität eindeutig als Längenvarianten des Selbstpeptids CLIP identifiziert werden konnten. Diese Peptidspezies konnten manchmal auch als sehr kleine Signale im Peptidprofil unreifer DCs identifiziert werden, erfuhren aber im Vergleich zu den anderen Selbstpeptiden während der Maturierung der DCs eine starke relative Anreicherung. Gleichzeitig konnte für einige andere Selbstpeptide (Abbildung 3-1 A, mit einem Kreuz markiert) hingegen eine relative Abnahme während der Maturierung beobachtet werden.

Da die MALDI-Analyse keine absolute Quantifizierung der gemessenen Peptide zulässt, wurde die Zahl der MHC II-Moleküle, die mit CLIP beladen sind, mittels quantitativem *Western blot* bestimmt. MHC II-CLIP-Komplexe wurden dazu von unreifen und reifen DCs mit Hilfe des mAbs Cer.CLIP präzipitiert und mit dem HLA-DR-spezifischen Antikörper 1B5 gefärbt. Die Gesamtmenge an HLA-DR in den entsprechenden Lysaten wurde mit der Menge

an HLA-DR-CLIP-Komplexen verglichen (Abb. 3-1 B). Es zeigte sich, dass reife DCs eine 12-20-fach höhere Menge an HLA-DR-CLIP-Komplexen aufwiesen als unreife DCs, während die Menge an Gesamt-HLA-DR nur um einen Faktor von 3-5 zunahm. Unreife DCs haben demnach zwischen 0,5-1,5 % ihrer HLA-DR-Moleküle mit dem Selbstpeptid CLIP besetzt, während es in reifen DCs etwa 4-8 % sind. Geht man von einer Gesamtzahl von etwa $8 \cdot 10^6$ HLA-DR-Molekülen in reifen DCs aus (Vogt et al., 2002), so ergibt sich für die HLA-DR-CLIP-Komplexe eine Anzahl von $3-6 \cdot 10^5$ Molekülen. Da die meisten MHC Klasse II-Moleküle reifer DCs auf der Zelloberfläche liegen (Cella et al., 1997), sollte dieser Anstieg an MHC-CLIP-Komplexen auch auf der Zelloberfläche reifer DCs messbar sein. Dazu wurde eine FACS-Analyse von unreifen und LPS-aktivierten DCs durchgeführt (Abb. 3-1 C). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte eine starke Zunahme der CD83 und CD86 Oberflächenexpression gemessen werden.

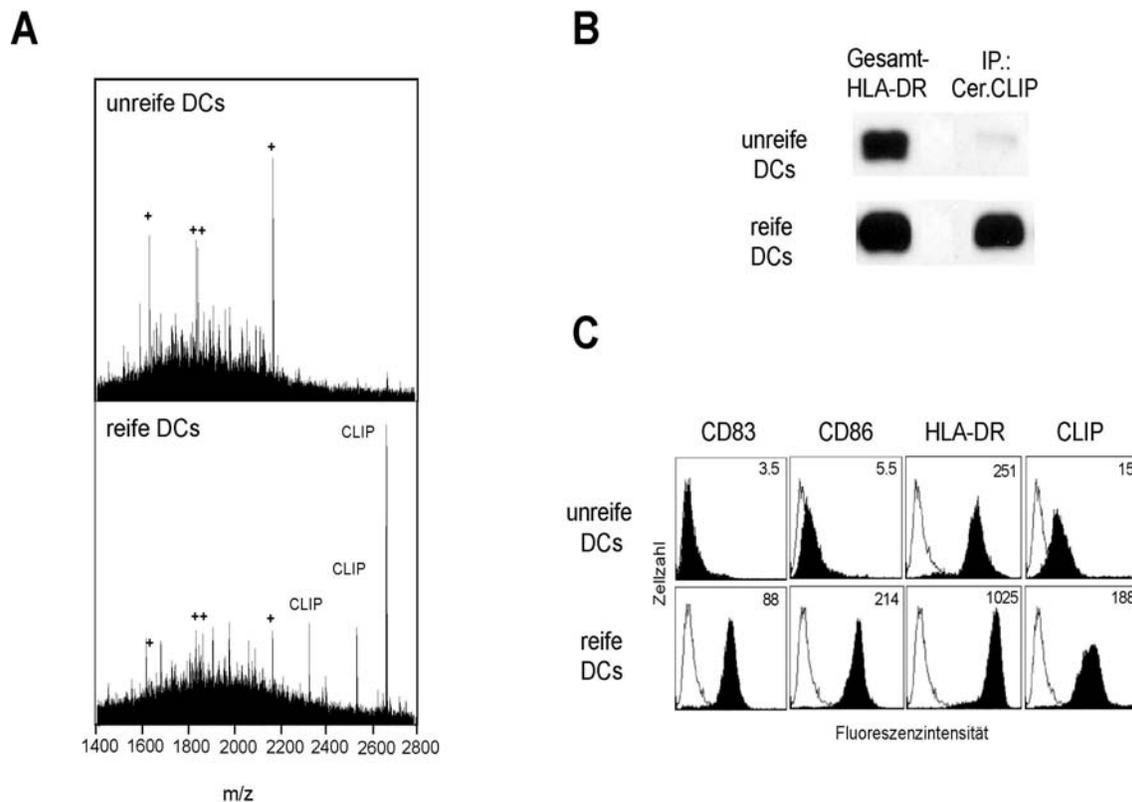


Abb. 3-1: Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs.

(A) HLA-DR-Moleküle unreifer und LPS-aktivierter DCs wurden in 1 % Triton-X-100 mit Hilfe des an Sepharose-*Beads* gekoppelten mAks L243 präzipitiert und die Peptide in 0,1 % TFA eluiert. Die CLIP-Varianten (81-102, m/z = 2333,4; 81-103, m/z = 2543,4 und 81-104 m/z = 2674,5) wurden aufgrund ihrer Massen identifiziert (Chicz et al., 1992). Die mit einem Kreuz markierten Peptide haben Massen von m/z = 1629,4; 1833,5; 1842,6 und 2172,7. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der Peptidprofile unreifer und reifer DCs von mehr als zwanzig analysierten mit ähnlichen Resultaten.

(B) Unreife und reife DCs wurden in 1 % Triton-X-100 lysiert und im *Western blot* mit Hilfe des mAks 1B5 auf HLA-DR gefärbt (Gesamt-HLA-DR). MHC-CLIP-Komplexe wurden parallel mit Hilfe des an Sepharose gekoppelten mAks Cer.CLIP präzipitiert (IP: Cer.CLIP) und ebenfalls auf HLA-DR gefärbt (HLA-DR-CLIP).

(C) Durchflußzytometrische Analyse von unreifen und reifen DCs. Weiße Histogramme entsprechen den Färbungen mit Isotyp-Kontroll-Antikörpern, schwarze Histogramme den spezifischen Färbungen mit mAks gegen die angegebenen Antigene. Ein repräsentatives Beispiel von mehr als zehn Messungen ist gezeigt.

Die Gesamtmenge an Oberflächen-HLA-DR nahm um etwa den Faktor 4 zu, während die Menge an MHC-CLIP Komplexen auf der Zelloberfläche gleichzeitig etwa um den Faktor 12 anstieg. Der überproportionale Anstieg an MHC II-CLIP Komplexen führte zu einer Zunahme des CLIP/HLA-DR-Verhältnisses auf der Oberfläche reifer DCs und damit zu einem relativen Anstieg der CLIP-Peptide am Gesamtpeptid-Repertoire reifer DCs, wie aus der MALDI-Analyse bereits deutlich wurde.

Wie diese Ergebnisse demonstrieren, sind also bereits unreife humane DCs in der Lage, ein breites Spektrum an MHC II-restringierten Selbstpeptiden zu präsentieren, welches während der Maturierung weitgehend unverändert bleibt. Weshalb reife DCs einen wesentlichen Anteil ihrer MHC II-Moleküle mit einem für die Antigenpräsentation scheinbar „unnützen“ Peptidliganden blockieren, sollte daher im weiteren näher untersucht werden.

3.1.2 Sequenzierung von Selbstpeptiden unreifer und reifer DCs

Die Analyse der Selbstpeptide mittels MALDI-MS deutete, abgesehen von den Unterschieden in der Präsentation von CLIP, auf eine recht hohe Übereinstimmung in der Art der präsentierten Selbstpeptide unreifer und reifer DCs hin. Um dieses weiter zu verifizieren sowie die Identität und Herkunft weiterer, von DCs präsentierter Selbstpeptide zu ermitteln, sollte eine Sequenzierung mittels LC-MS/MS unternommen werden. Dazu wurden die HLA-DR-assoziierten Peptide eines Spenders mit dem Haplotyp DRB1*0101/1201 isoliert und einer LC-MS/MS Messung zugeführt (s. Methoden). Die Peptidspektren wurden mit Hilfe des SEQUEST Algorithmus über der *Swiss.fasta. All organisms* Datenbank ausgewertet. Als Filter wurde eingeführt, dass nur solche Peptide berücksichtigt wurden, die von SEQUEST mit einem signifikanten *Score* (in den Parametern *cross-correlation* und *delta cross-correlation*, s. Material und Methoden, Abschnitt 2.4.3.3) versehen wurden und mindestens eine Längenvariante aufwies (Tabelle 3.1 A-C). Insgesamt konnten so 215 Peptidsequenzen aus 55 Proteinen identifiziert werden. Einige dieser Peptide waren bereits aus der Literatur bekannt, bei den meisten allerdings handelte es sich um neue Epitope. Interessanterweise kamen 33 % der identifizierten Peptide aus cytosolischen und nukleären Proteinen. Die meisten der identifizierten Selbstpeptide konnten in unreifen und reifen DCs identifiziert werden, einige wenige Epitope allerdings in entweder dem einen oder dem anderen DC-Maturierungsstatus. So z.B. waren Epitope aus den Proteinen Aminopeptidase N, dem Mannose Rezeptor, TNF- α und CLIP vorwiegend in reifen DCs vorhanden. Epitope aus der Leukocyten Elastase, dem Inter-Alpha Trypsin Inhibitor, dem Lymphocyten-spezifischen Protein und der Nicotin Nucleotid Pyrophosphorylase traten nur in unreifen DCs auf. Die Dominanz von CLIP-Epitopen in reifen DCs verifizierte noch einmal die in Abbildung 3-1 gemachten Beobachtungen, auch wenn die mehrfach geladenen, langen CLIP-Varianten sich aufgrund technischer Limitationen in der massenspektrometrischen Messung nicht detektieren ließen. Es zeigte sich aber auch für die kurzen CLIP-Varianten eine deutliche Dominanz in reifen DCs.

Tabelle 3.1: HLA-DR (DRB1*0101/1201)-assoziierte Selbstpeptide unreifer und reifer DCs.

HLA-DR-assoziierte Selbstpeptide wurden von HLA-DR-Molekülen unreifer (I) und reifer (M) DCs eluiert. Die Peptide sind nach der intrazellulären Lokalisation ihrer Ursprungproteine sortiert. **A)** Membranproteine, sekretorische Proteine und Proteine aus intrazellulären Kompartimenten, **B)** cytoplasmatische, cytoskelettale und nucleäre Proteine, **C)** bovine Proteine, vermutlich aus dem Kälberserum.

A) Membranproteine, sekretorische Proteine und Proteine aus intrazellulären Kompartimenten

Protein	Peptidsequenz	Epitop	Zell- typ
Invariante Kette	KMRMATPLLMQALPMG	90-105	I,M
	MRMATPLLMQALPMG	91-105	,M
	RMATPLLMQALPMG	92-105	,M
	RMATPLLMQALPMGALP	92-108	,M
	VSKMRMATPLLMQALPM	88-104	,M
Invariante Kette	PSSGLGVTKQDLGPVPM	200-216	I,
	TTAYFLYQQQGRDLK	50-64	I,M
Aminopeptidase N	DAFNLASAHKVPVT	663-676	I,M
	INDAFNLASAHKVPVT	661-676	I,M
	NDAFNLASAHKVPVT	662-676	,M
	NDVYRVMADVALLASSHP	437-453	,M
	DVFKQGLASYLHT	493-505	,M
	EPTEYLVVHLKGLVKD	156-172	,M
Annexin II	LNPDLIRKQDATSTIIS	848-864	,M
	RDALNIETAIKTKGVD	36-51	I,
	RDALNIETAIKTKGVDE	36-52	I,M
	ERDALNIETAIKTKG	35-49	I,
Annexin V	RDALNIETAIKTKG	36-49	I,M
	LTGKFEKLIVALKMPS	72-87	I,M
	TGKFEKLIVALKM	73-85	I,
	TGKFEKLIVALKMPS	73-87	I,M
	ETLYYAMKGAGTDDH	252-266	I,
Beta Hexosaminidase	AETLYYAMKGAGTDDH	251-266	I,
	LAETLYYAMKGAGTDDH	250-266	,M
	EPVAVLKANRVWG	155-167	I,
Catalase	VKEPVAVLKANRVWGAL	153-169	I,M
	IPVGKLVLRNRPVNYFA	310-326	I,M
	IPVGKLVLRNRPVNYF	310-325	I,
	IPVGKLVLRNRPVNY	310-324	I,M
Cathepsin B	MVWDFWSLRPESLHQ	180-194	I,M
	DFWSLRPESLHQ	183-194	I,M
	KSGVYQHVTGEMMGHA	263-279	I,M
KDEL Rezeptor	KSGVYQHVTGEMMGH	263-278	I,M
	SGVYQHVTGEMMGHA	264-279	,M
	DWGDNGFFKILRGQDH	303-318	,M
HLA-A	GDNGFFKILRGQDH	305-318	,M
	VPVGGLSFLVNHDF	100-113	I,M
HLA-DR- α	VPVGGLSFLVNHDFSPL	110-116	,M
	DGKDYIALKEDLRS	118-131	I,M
Integrale Membran-	YDGKDYIALKEDLRS	117-131	,M
	GRFASFEEAQQALAN	74-87	I,
Integraler Membran-	VPPEVTVLTNSPVLELR	110-125	I,M
	IENIDHLGFFIYR	209-221	I,M
Integraler Membran-	DRIENIDHLGFFIYR	207-221	,M

protein 2B	RIENIDHLGFFIYR	208-221	I,M
Integrin Alpha M	GHVLLLRSPVLR	607-619	I,M
	TFKEFQNNPNRSLVK	201-216	I,M
	FKEFQNNPNRSLVKP	202-217	I,M
	GSTDVLVIGAPHY	470-482	I,
	GSTDVLVIGAPHYYEQ	470-485	I,
	GQSVVQLQGSRVVVG	35-49	I,M
	TPLSAFGNLRPVLAEDA	740-756	I,M
	TPLSAFGNLRPVLAEDAQ	740-757	I,M
	AQGHVLLLRSPVLR	605-619	I,M
	VGAQGHVLLLRSPVLRV	603-620	,M
Integrin Alpha X	GSTDVLVIGAPHYYEQ	471-486	I,
	GSTDVLVIGAPHY	471-483	I,
	LASVHQLQGFTYTAT	216-230	I,
	DTSVYSQLPGQEAFFMR	1075-1090	,M
	NVVHRLFHASYGAR	234-247	I,M
	IQNVVHRLFHASYGAR	232-247	I,M
Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor	IQNVVHRLFHASYG	232-245	I,M
	AIQNVVHRLFHASYGAR	231-247	,M
	GLPGPPDVPDHAAYHFF	671-687	I,
	GPPDVPDHAAYHFF	674-687	I,
Integrin beta 2	NSNQFQTEVVKQLISGN	213-229	I,
	KTYEKLTEIIPK	328-339	,M
Lymphocyten-spezif. Protein	EDSSNVVHLIKNAYNK	347-362	,M
	LCLKPSEAPLDEDEGF	65-81	I,
	SLKPSEAPLDEDEGF	66-81	I,
Cholesteryl-Ester-hydrolase	KPSEAPLDEDEGF	69-81	I,
	RIKMFFALGPVASVA	193-207	I,M
	KRIKMFFALGPVASVA	192-207	,M
Lysosomales, protektives Protein	KRIKMFFALGPVASVAF	192-208	,M
	YFAYYHGLGNRLWS	220-234	I,M
	FAYYHGLGNRLWSSL	221-236	I,M
Makrophagen Mannose Rezeptor	FAYYHGLGNRLWSS	221-236	I,M
	NSQYLKLLSSQKYQIL	378-393	I,M
Polyposis Locus Protein 1	EQQTITWRLITASGSYH	695-710	,M
	GYPAYISIKAIESPKNK	61-76	I,M
Pro-activator Polypeptid	YPAYISIKAIESPKNK	61-76	I,M
	TNSTFVQALVEHVKEE	214-229	I,M
	STFVQALVEHVKEE	216-229	I,M
Pro-activator Polypeptid	LPVILDIKGMESRPG	114-129	I,M

Kleines ind. Cytokin A13	KKISLQRLKSYVIT	41-54	I,M
	KKISLQRLKSYVITT	41-55	,M
	SKKISLQRLKSYVITT	40-55	,M
Tartrat resistente Säure-Phosphatase	TVTYIEASGKSLFK	301-314	I,M
	TVTYIEASGKSLFKT	301-315	,M
	TVTYIEASGKSLFKTR	301-316	,M
TGF-β Rezeptor	GKQYWLITAFHAKG	318-331	I,M
	LGKQYWLITAFHAKGN	317-332	I,
Transferrin Rezeptor CD71	KEIKILNIFGVIK	382-394	I,M
	VLKEIKILNIFGVIK	380-394	,M
	NVLKEIKILNIFGVIK	379-394	,M
TGF-β-induziertes Protein	FTSTIKLLNENSYPVR	140-155	I,M
	TSTIKLLNENSYPVR	141-155	I,M
	TIKLLNENSYPVR	143-155	I,M
	VSNVNIELLNALRYH	160-174	I,M
	SNVNIELLNALRYH	161-174	I,M
TNF-α	NVNIELLNALRYH	162-174	I,M
	SNVNIELLNALRYHMVG	161-177	I,M
	VNIELLNALRYHMVG	163-177	I,M
	NVNIELLNALRYHMV	162-176	I,
	NVNIELLNALRYHMVG	162-177	I,M
	NVNIELLNALRYHM	162-175	I,M
	IELLNALRYH	165-174	I,M
	IEDTFETLRAAVAASG	249-264	I,
	APTNEAFEKIPSETLNR	541-557	I,M
	Vacuoläre ATP Synthase D	YLGGVFQLEKGDRLSAE	195-211
LGGVFQLEKGDRLSAE		196-211	,M
Alpha-2 Makroglobulin *	DEMNIETIRNTLYK	174-187	,M
	LNKLAFLNQFHFG	301-313	I,M
	LNKLAFLNQFHFGVF	301-315	I,M
Apolipoprotein IV A *	NEKDMYSFLEDMLKA	662-677	I,M
	EKDMYSFLEDMLKA	663-677	I,
	KDMYSFLEDMLKA	664-677	I,
	KPQYMLVLPVSLHTE	28-42	I,M
	GKPQYMLVLPVSLH	27-40	I,M
Koagulationsfaktor XIII *	GKPQYMLVLPVSLHTE	27-42	I,M
	ELGGHLDQQVEEF	291-303	I,
Apo-	SLAELGGHLDQQVEEF	288-303	I,
	ENADSLQASLRPHADEL	170-186	I,
Koagulationsfaktor XIII *	MDFEVENAVLGKDFK	520-534	I,M
	VDMDFEVENAVLGKDFK	518-534	I,M

B) cytoplasmatische, cytoskelettale und nucleäre Proteine

Protein	Peptidsequenz	Epitop	Zell-typ
Actin, cytoplasmatisch	DYLMKILTERGYS	187-199	I,M
	TDYLMKILTERGYS	186-199	I,M
	DYLMKILTERGY	187-198	,M
	YLMKILTERGYSFT	188-201	I,M
	DYLMKILTERGYSFT	187-201	I,M
	DLTDYLMKILTERGY	184-198	,M
	TDYLMKILTERGYSFT	186-201	I,M
	TDYLMKILTERGY	186-198	I,M
	DYLMKILTERGYSF	187-200	,M

	WISKQEYDESGPSIV	356-370	I,
Calmodulin	DFPEFLTMMARKMKD	64-78	I,M
	IDFPEFLTMMARKMK	63-77	,M
Collagen alpha 1	FPEDFSILTTVKAKKG	95-110	I,M
	GYEKTVIEINTPKIDQ KTVIEINTPKIDQ	1762-1777 1765-1777	,M ,M
Elongationsfaktor 1 alpha	AVGVKAVDKKAAGAKVVT	434-452	I,M
	IEKFEKEAAEMGKG TIEKFEKEAAEMGKG	39-52 38-52	I,M I,M
Gelsolin	TGDAYVILKTVQLRNGN	91-107	I,M
	GDAYVILKTVQLRNGN	92-107	I,M
	TGDAYVILKTVQLRNG	91-106	I,M
	TGDAYVILKTVQLR	91-104	,M
	GDAYVILKTVQLRN	92-105	I,M
	GDAYVILKTVQLRNG	92-106	I,M
	GDAYVILKTVQLRNGN	92-107	I,M
	GDAYVILKTVQLR	92-104	I,M
	DAYVILKTVQLRNG	93-106	,M
	DAYVILKTVQLRN	93-105	I,M
DAYVILKTVQLR	93-104	I,M	
HSP 70 - verwandtes Protein	IPKIQKLLQDFENGK	346-360	I,M
	IPKIQKLLQDFENGKE	346-361	,M
Histon 2A	IILELAGNAARDNK	62-74	I,M
	EILELAGNAARDNK	61-74	I,
	AEILELAGNAARDNKK	60-75	I,M
	TAEILELAGNAARDNK	59-74	I,M
	LTAEILELAGNAARDNK	58-74	I,M
	LTAEILELAGNAARDNKK	58-75	I,M
TAEILELAGNAARDNKK	59-75	I,M	
Homogenisat 1,2 Dioxigenase	DPSIFTVLTAKSVRPG	294-309	I,M
	ADPSIFTVLTAKSVRPG	293-309	I,M
Leukocytin-Elastase-Inhibitor	YILKLANRLYGEK	84-96	I,M
	SYILKLANRLYGEK	83-96	I,
	SYILKLANRLYG	83-94	I,M
	ASYILKLANRLYGEK	82-96	I,
	GASYILKLANRLYGEK	81-96	,M
	GASYILKLANRLYG	81-94	,M
GEKTYNFLPEFLVSTQ	94-109	I,	
Leukocytin-Elastase	IAPNFVMSAAHCVAN	60-74	I,
	IAPNFVMSAAHCVANVN	60-76	I,
Nicotin Nucleotid Pyrophosphorylase	VEKYGLLVGGAASHR	147-161	I,
	LVEKYGLLVGGAASHR	146-161	I,
Phosphoglyceratkinase	SPERPFLAILGGAKVADK	202-219	I,M
	NPAAGSVILLENLRFH	109-124	,M
Poly (RC)-bindendes Protein	INEIRQMSGAIK	310-322	I,M
	INEIRQMSGAIKIA	310-324	I,
	NINEIRQMSGAIK	309-322	,M
Rab GDP Dissoziations-Inhibitor	IPKFLMANGQLVK	77-89	I,
	LIPKFLMANGQLVKML	76-91	I,M
	LIPKFLMANGQLVK	76-89	,M
Transitionale ER ATPase	EDNSVVSLSQPKMDE	34-48	I,M
	INEDNSVVSLSQPKMDE	32-48	,M
Ubiquitin	IFVKTLTGKTITL	3-16	I,M
	IFVKTLTGKTITL	3-15	I,M

C) bovine Proteine, aus Kälberserum

Protein	Peptidsequenz	Epitop	Zell-typ
Alpha-2-HS-Glycoprotein	KHTLNQIDSVKVVPR	57-71	I,M

	VVDPTKCNLLAEKQYG	213-228	,M		VHASLDKFLANVSTVLT	121-139	,M
Cathepsin S	TGKLVLSAQNLVDCS	42-57	I,	Hämoglobin beta, fötale Kette	GDLSSADAILGNPKVK	45-60	I,M
	TGKLVLSAQNLVDC	42-56	I,		FGDLSSADAILGNPKVK	44-60	,M
	TGKLVLSAQNLVDC	42-55	I,M		SFGDLSSADAILGNPKVK	43-60	,M
	LKTGKLVLSAQNLVDC	40-55	,M		KGAFASLSELHCDK	81-94	I,
Koagulations- faktor V	INGMIYNLPGLRMYEQ	1795-1810	I,M	DDLKGAFASLSELHCDK	78-94	I,	
	GMIYNLPGLRMYEQ	1797-1810	,M	GAFASLSELHCDK	82-94	I,	
	IQVRFKNLASRPYS	1643-1656	I,	Lumican	DVKSFCILGPLSYSK	294-309	I,
Komplement C4	IADITLLSGFHALR	661-674	I,M	VSAALKGLKSLEYLDL	180-195	,M	
	AIADITLLSGFHALR	660-674	I,M	Pigmentaler Epithelfaktor	DAPDFSKITGKPIK	337-350	I,M
	AIADITLLSGFHALRA	660-675	I,M		APDFSKITGKPIKLTQ	338-353	I,M
Hämoglobin alpha-1 .	ASLDKFLANVSTVLTSK	123-139	I,M				
	SLDKFLANVSTVLTSKY	124-140	I,M				
	SLDKFLANVSTVLTSK	124-139	I,M				

* Peptide aus Plasmaproteinen, die wahrscheinlich aus FCS aufgenommen wurden, allerdings sind die bovinen Sequenzen dieser Proteine unbekannt und die Epitope auch in den entsprechenden humanen Proteinen vorhanden. Es lässt sich daher nicht sagen, ob diese Peptide humanen oder bovinen Ursprungs sind.

3.1.3 Regulation der HLA-DM-Aktivität während der Reifung von DCs

Die Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche von DCs im Zuge der Maturierung warf die Frage nach der Regulation des Peptideditors HLA-DM auf. HLA-DM ist ein für den Austausch von CLIP und die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen essentielles Protein (Denzin and Cresswell 1995, Kropshofer et al., 1997), und die Anreicherung von CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs ist vergleichbar mit der Situation in DM-defizienten Zellen (Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992; Fung-Leung et al., 1996; Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996) oder Zellen, die eine starke HLA-DO-Expression aufweisen (Chen et al., 2002; Glazier et al., 2002).

Daher wurde die Expression von HLA-DR und HLA-DM in unreifen und reifen DCs verglichen: Während die Expression von HLA-DR im Verlauf einer 48-stündigen LPS-induzierten Reifung um etwa den Faktor 3-5 zunahm, war im gleichen Zeitraum eine Abnahme der HLA-DM Proteinmenge auf etwa ein Drittel bis ein Viertel festzustellen (Abb. 3-2 A). Mit Hilfe von HLA-DR und HLA-DM-Isolaten bekannter Konzentration konnte das molekulare HLA-DR:HLA-DM-Verhältnis mittels quantitativer *Western blot*-Analyse ermittelt werden. Es beträgt in unreifen DCs etwa 4:1, nach 48 h Maturierung mehr als 40:1. Die Proteinmengen an HLA-DR und HLA-DM werden während der Reifung von DCs also gegenläufig reguliert, was zu einer im Schnitt 10-15-fach erhöhten Menge an HLA-DR-Molekülen pro Molekül HLA-DM führt. Das Ansteigen des HLA-DR:HLA-DM-Verhältnisses ist offenbar ein generelles Phänomen der DC-Reifung, da es mit allen getesteten Maturierungsstimuli erreicht wurde (Abb. 3-2 B). Bei allen Maturierungsstimuli stieg jeweils auch der Anteil der MHC II-CLIP-Fraktion auf der Zelloberfläche (Daten nicht gezeigt).

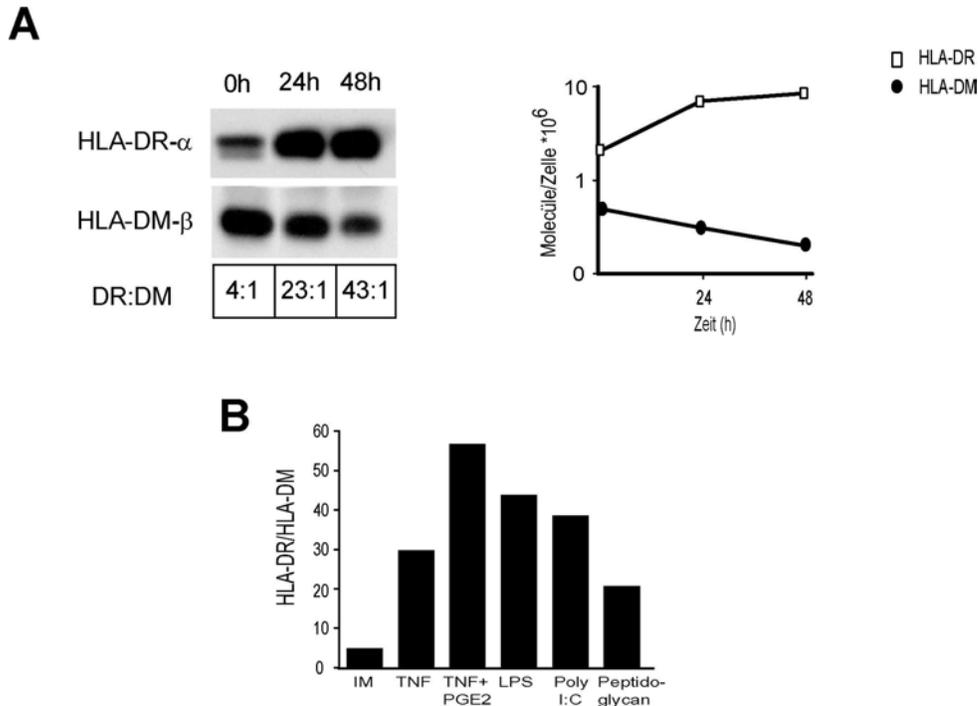


Abb. 3-2: Veränderung des HLA-DR:HLA-DM-Verhältnisses während der Reifung von DCs

(A) DCs wurden im unreifen Zustand sowie nach Reifung mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 24 h und 48 h in 1 % Triton-X-100 lysiert und die Lysate im *Western blot* auf HLA-DR- α und HLA-DM- β gefärbt. Die Proteinbanden wurden über HLA-DR- und HLA-DM-Isolate bekannter Konzentration quantifiziert und das DR:DM-Verhältnis für alle Zeitpunkte bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus mehr als 5 mit nahezu identischen Resultaten.

(B) DCs wurden mit verschiedenen Maturierungsstimuli für 48 h aktiviert und dann das Verhältnis von HLA-DR zu HLA-DM bestimmt (s. oben). Eins von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt.

Da der Anstieg von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche sehr rasch erfolgte, war fraglich, ob dies allein durch die kontinuierliche Abnahme der HLA-DM-Menge pro Molekül MHC II zu erklären sei, oder ob vielleicht auch die Funktionalität von HLA-DM in reifen DCs beeinträchtigt sei. Um dies zu überprüfen, wurden gleiche Mengen an HLA-DM aus unreifen und reifen (LPS 24 h) DCs isoliert und die katalytische Aktivität des Moleküls anhand seiner Fähigkeit, CLIP gegen ein biotinyliertes Reporterpeptid auszutauschen, überprüft (Abb. 3-3 A). Es zeigte sich, dass HLA-DM aus unreifen DCs eine erwartungsgemäß starke katalytische Aktivität aufwies. Die Aktivität der gleichen Menge HLA-DM aus reifen DCs hingegen lag nur unwesentlich über der basalen, unkatalysierten Austauschrate (gepunktete Linie). Durch Subtraktion der für das Kontrollprotein gemessenen Aktivität von der durch HLA-DM-katalysierten in unreifen und reifen DCs und Normierung auf die im Ansatz bestimmte Menge an HLA-DM konnte die spezifische Aktivität (Abb. 3-3 B) ermittelt werden. Diese lag bei unreifen DCs etwa 4 Mal über der von reifen DCs. Berechnete man nun das Verhältnis von HLA-DR zu katalytisch aktivem HLA-DM in reifen und unreifen DCs, so ergab sich bereits nach 24 h ein Anstieg des HLA-DR:HLA-DM Verhältnisses von 4:1 auf über 80:1.

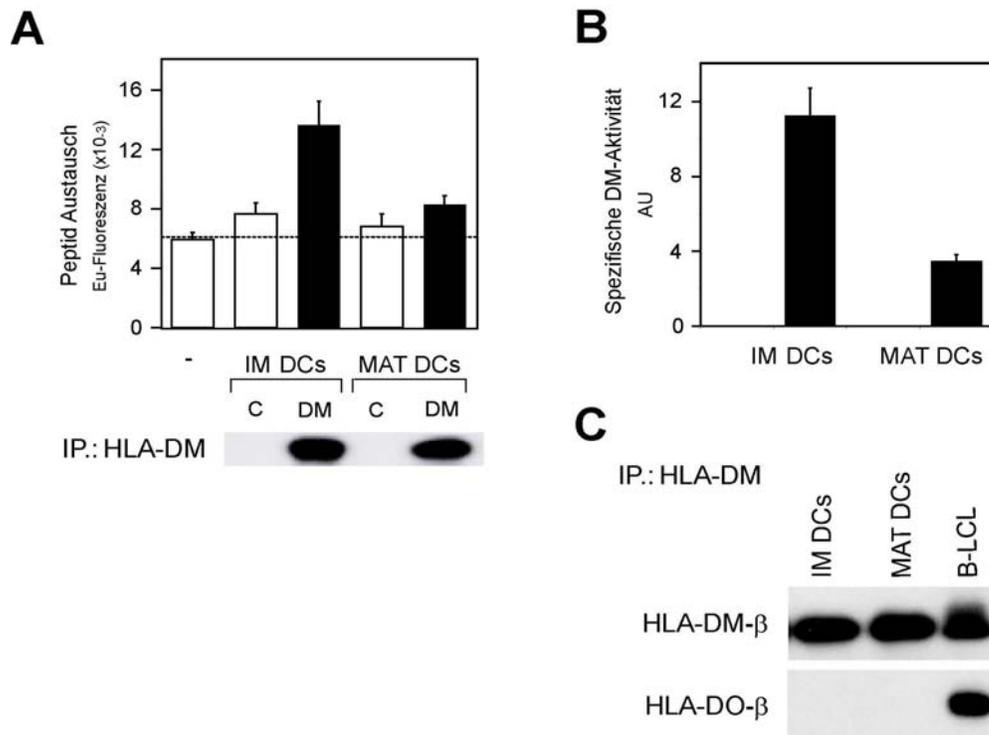


Abb. 3-3: Verminderung der HLA-DM-Aktivität während der Reifung dendritischer Zellen

(A) HLA-DM wurde aus unreifen und reifen (LPS (1 µg/ml), 24h) DCs in 1 % Triton-X-100 mittels mAk DM.K8 isoliert. Gleiche Mengen HLA-DM wurden mit DR1:CLIP (20 nM) und Bio-HA (307-319; 50 nM) bei pH 4,5 für 20 min bei 37°C inkubiert und die Menge an ausgetauschten CLIPs über ELISA quantifiziert. Die Menge an HLA-DM wurde mittels quantitativem *Western blot* bestimmt. Als Kontrollprotein „C“ wurde CD 63 eingesetzt

(B) Die basale, unkatalysierte Austauschrate des Kontrollproteins wurde von der durch HLA-DM katalysierten abgezogen und die katalytische Aktivität auf die im *Western blot* quantifizierte Menge an HLA-DM normiert.

(C) Unreife und reife DCs, sowie die B-Zelllinie Jutthom wurden in 1 % Octylglycosid lysiert und HLA-DM präzipitiert. Gleiche Mengen an HLA-DM wurden im *Western blot* aufgetragen und auf assoziiertes HLA-DO überprüft.

HLA-DO ist ein Molekül, welches in B-Zellen mit HLA-DM assoziiert ist und dessen Aktivität modulieren kann (Denzin et al., 1997; Kropshofer et al., 1998). Die Überprüfung von aus DCs isoliertem HLA-DM auf kopräzipitiertes HLA-DO ergab aber, dass HLA-DO in DCs im Gegensatz zu B-Zellen kaum exprimiert wird und daher auch nicht mit HLA-DM assoziiert ist (Abb. 3.3 C). Ein möglicher Einfluß von HLA-DO auf die HLA-DM-Aktivität in reifen DCs ist damit auszuschließen und die Frage, wie die Aktivität von DM in reifen DCs reduziert wird, bleibt vorerst offen.

3.1.4 Antigenrezeptivität und Stabilität von Peptid-MHC II-Komplexen während der Reifung von DCs.

Es ist gezeigt worden, dass endosomal/lysosomales HLA-DM und auch HLA-DM auf der Zelloberfläche eine bedeutende Rolle bei der Beladung von MHC II-Molekülen mit exogenen Peptidantigenen spielt (Arndt et al., 2000). Es war daher anzunehmen, dass die Verminderung der HLA-DM-Aktivität während der Reifung von DCs nicht nur zur Akkumulation von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche führen, sondern auch die Beladbarkeit der MHC II-Moleküle mit exogenem Peptid beeinträchtigen würde. Die Verwendung von Peptidantigenen macht die Untersuchung der MHC II-Beladbarkeit unabhängig von Veränderungen der proteolytischen Kapazität der DCs möglich. Dendritische Zellen wurden daher zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Initiierung der Reifung für einen Zeitraum von jeweils 2 h mit den biotinylierten Reporterpeptiden pHA und pTT beladen. Anschließend wurde die Menge des auf HLA-DR geladenen Peptides mittels ELISA quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Bildung von HLA-DR-Peptidkomplexen während der ersten 4-5 h nach Beginn der Reifung sehr effizient erfolgte, dann aber kontinuierlich abnahm und nach 24 h fast auf Hintergrundwerte abgesunken war (Abb. 3-4 A). Da DCs während der Reifung ihre Fähigkeit zur Endocytose kontinuierlich verlieren (Garrett et al., 2000) und sich zudem das Recycling ihrer MHC II-Moleküle verlangsamt (Cella et al., 1997), sollte überprüft werden, ob diese Effekte allein auch für die Verminderung der Peptidbeladbarkeit von MHC II-Molekülen während der Reifung verantwortlich seien. Dazu wurden DCs mit dem Endocytose-Inhibitor Wortmannin (Li et al., 1995) vorinkubiert. Wie Abbildung 3-4 B zeigt, wurde die Beladbarkeit von MHC II-Molekülen durch Wortmannin in der Tat deutlich vermindert, sie war aber in unreifen, Endocytose-inhibierten DCs immer noch deutlich höher als in reifen DCs. Diese zusätzliche Verminderung der MHC II-Beladbarkeit, unabhängig von möglichen Endocytose-Effekten könnte daher mit der Abnahme der HLA-DM-Aktivität zusammenhängen.

Da HLA-DM als Peptid-Editor den Austausch von Peptiden in Abhängigkeit von ihrer kinetischen Stabilität katalysiert (Kropshofer et al., 1996), war zudem die Frage nach der Stabilität von Peptid-MHC II-Komplexen während der DC-Reifung von Interesse. DCs wurden daher in Anwesenheit oder Abwesenheit eines Reifungsstimulus mit biotinylierten Reporterpeptiden inkubiert und anschließend nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Menge der Peptid-HLA-DR-Komplexe quantifiziert. Es zeigte sich, dass nur reifende DCs stabile HLA-DR-Peptid-Komplexe bildeten, während DCs, die keinen inflammatorischen Stimulus erhielten, das primär (2 h Wert) gleich gut aufgeladene Peptid kontinuierlich wieder verloren.

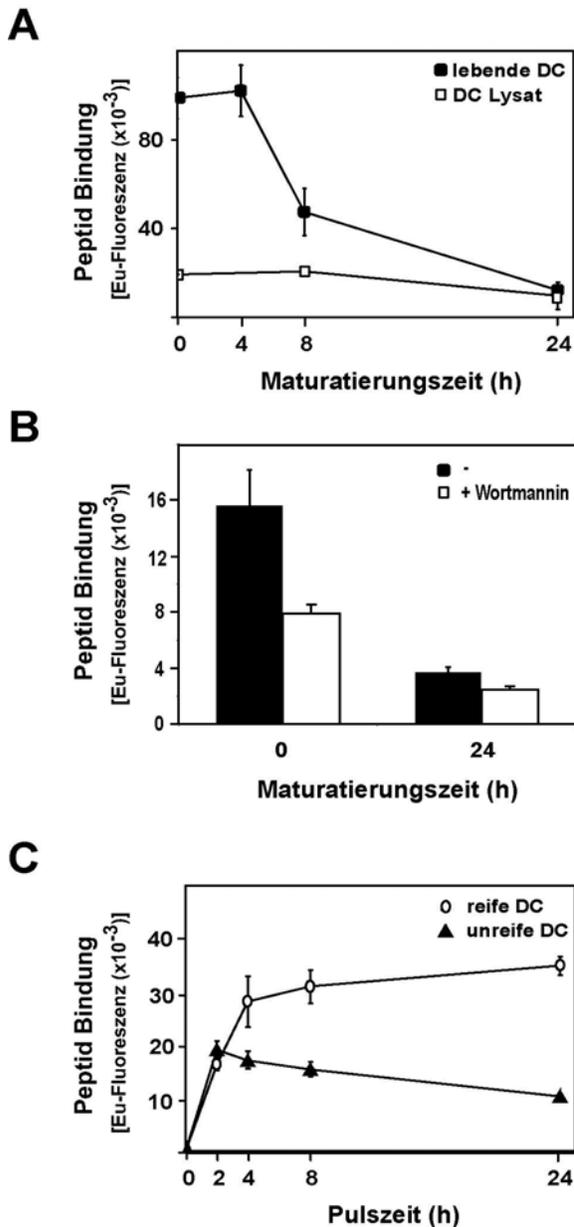


Abb. 3-4: HLA-DR-Antigenrezeptivität und Stabilität von HLA-DR-Peptid-Komplexen in reifenden DCs.

(A) DCs wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach TNF- α -Maturierung mit einer Mischung aus je 10 μ M Bio-HA (307-319) und Bio-TT (829-843) für jeweils 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 % Tx-100 lysiert und die Menge des an HLA-DR gebundenen Peptids mittels ELISA quantifiziert. Standardabweichungen aus drei Messungen sind gezeigt.

(B) DCs wurden wie oben behandelt und der Peptidmix nach jeweiliger 30-minütiger Vorinkubation mit Wortmannin (1 μ M) oder ohne Wortmannin für 30 min bei 37°C zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugegeben. Die Quantifizierung gebundenen Peptids erfolgte wie in (A). Standardabweichungen aus drei Messwerten sind gezeigt.

(C) Bindung von Bio-HA und Bio-TT in Abhängigkeit von der Pulszeit. Die Peptide wurden für 2, 4, 8 oder 24 h zugegeben und die Bindung wie in (A) und (B) quantifiziert. Die Standardabweichungen von drei Experimenten sind gezeigt.

Zur Überprüfung, ob die beschriebenen Unterschiede in der Peptidrezeptivität auch direkte Auswirkungen auf die Fähigkeit dendritischer Zellen haben würden, CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren, wurden DR4-positive DCs mit dem Peptid Annexin(208-223) gepulst und die Aktivierung einer DR4-restringierten Annexin(208-223)-spezifischen T-Zelllinie mittels IFN- γ -ELISA bestimmt. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit den in Abbildung 3-4 A gezeigten Ergebnissen, dass Peptidbeladung zu Beginn der Maturierung und bei 37°C zu deutlicher T-Zell-Aktivierung führte, während eine späte Beladung mit Peptid sowie eine Beladung bei Raumtemperatur nur zu einer schwachen CD4⁺-T-Zellaktivierung führte (Abb. 3-5 A). Diese Beobachtungen stehen in deutlichem Gegensatz zu den Befunden, die mit einer Melan-A(27-35)-spezifischen CD8⁺-T-Zelllinie gemacht wurden. Hier führte die Peptidbeladung in einer

späten Phase der Maturierung und bei Raumtemperatur zur effizientesten T-Zell-Aktivierung und spiegelt die Ergebnisse des Peptidbindungsassays wieder (Abb. 3-5 B): Es konnten mehr MHC-I-Melan-A-Komplexe detektiert werden, wenn das Peptid kurz vor der Messung zugegeben wurde, als wenn es 24 h zuvor appliziert wurde, was wiederum im Gegensatz zu der Situation bei der MHC II-Beladung stand (Abb. 3-5 B linke Seite).

Zur effizienten CD4⁺-T-Zell-Aktivierung ist also Antigenaufnahme in einer frühen Phase der DC-Maturierung notwendig, zur Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen hingegen MHC-I-Beladung möglichst kurz vor dem T-Zell-Kontakt. Die in Abbildung 3-5 gezeigten Experimente wurden im Labor von Prof. Dr. Schadendorf, DKFZ, Heidelberg durchgeführt.

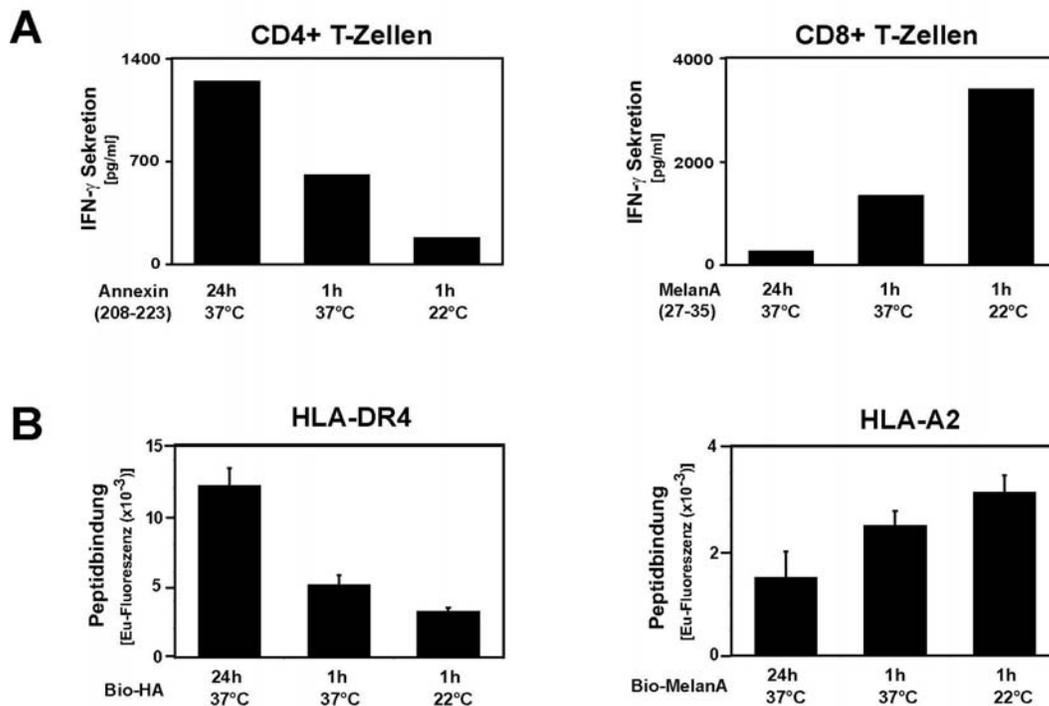


Abb. 3-5: T-Zell-Aktivierungspotential reifender DCs

A) DR4⁺-DCs wurden mit dem Peptid Annexin(208-223) bei 22°C oder 37°C für 1 h oder 24 h beladen. Dann wurden sie mit einer T-Zelllinie kokultiviert, die pAnnexin(208-223) im Kontext von DR4 spezifisch erkennt. Die T-Zell-Aktivierung wurde mittels IFN- γ -ELISA quantifiziert. Ebenso wurde die IFN- γ -Sekretion von CD8⁺-CTLs bestimmt, die spezifisch für das Peptid MelanA(27-35) im Kontext von HLA-A2 waren.

B) Bindung von biotinyliertem HA(307-319) an HLA-DR4 bzw. biotinyliertem MelanA(27-35) an HLA-A2 Moleküle von DCs bei 22°C oder 37°C für 1 h oder 24 h. Die Ergebnisse von einem aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

3.1.5 Kopräsentation von CLIP und Antigenpeptiden auf der Zelloberfläche reifer DCs

Im weiteren sollte untersucht werden, ob die Akkumulation von CLIP auf der Oberfläche von DCs auch dann aufträte, wenn die Zellen exogenes Antigen prozessierten und somit zahlreiche potentielle Antigenpeptide für den Austausch von CLIP vorliegen würden.

Dazu wurden DCs mit Lysat gepulst, welches das rekombinant exprimierte Protein HLA-A2 enthielt (Smith et al., 1998). Es wurden für dieses Experiment DCs gewählt, die selbst HLA-A2 negativ, aber positiv für HLA-DR1 waren, da das immundominante Epitop aus HLA-A2 mit HLA-DR1-Molekülen einen Komplex bildet (HLA-DR1:A2(103-117)), der spezifisch mit dem monoklonalen Antikörper UL-5A1 nachgewiesen werden kann. Es war somit möglich, gleichzeitig die Oberflächenexpression eines MHC II-Antigen-Komplexes und der MHC II-CLIP-Komplexe durchflußzytometrisch zu analysieren. Die Messung wurde 4 h und 24 h nach Antigenpuls in Gegenwart und Abwesenheit von LPS (1 µg/ml) durchgeführt (Abb. 3-6 A). Es ließen sich folgende Beobachtungen machen:

Zunächst zeigte sich auch für die Beladung mit dem Proteinantigen HLA-A2 der in Abbildung 3-4 C für Peptidantigene gemachte Befund, dass MHC II-Peptid-Komplexe mit etwa gleicher Effizienz in unreifen und reifenden DCs gebildet werden, dass aber in unreifen DCs nach 24 h ein Großteil des primär auf MHC II aufgeladenen Antigens wieder verloren geht, während es in reifen DCs stabil bleibt und zunimmt. Es zeigte sich weiterhin, dass, obwohl das immundominante Epitop A2 (103-117) in reifen DCs nach 24 h stark auf der Zelloberfläche exprimiert wurde, die Menge an MHC II-CLIP-Komplexen nahezu unverändert blieb. In der frühen Phase der Maturierung (4 h), in der ja auch noch relativ viel aktives HLA-DM vorliegt und die MHC II-Beladbarkeit hoch ist (s. Abb. 3-2 und Abb. 3-4), zeigte sich zunächst eine Abnahme von CLIP in den Zellen, die mit Antigen gepulst wurden gegenüber ungepulsten, was auf einen Austausch von CLIP zu diesem Zeitpunkt hindeutete. Nach 24 h war aber bereits soviel CLIP auf die Zelloberfläche gelangt, welches offenbar von neugebildeten MHC II-Molekülen stammt, in denen der Austausch von CLIP nicht mehr effizient erfolgte, dass nahezu kein Unterschied zwischen ungepulsten und gepulsten Zellen erkennbar war. Das gleiche Bild zeigte sich auch für die Analyse des MHC II-Peptidrepertoires A2-gepulster und ungepulster DCs (Abb 3-6 B). Nach Antigenpuls konnten im MALDI-Spektrum drei dominante neue Peaks beobachtet werden, die aufgrund ihrer genauen Massenidentität als das immundominante A2-Epitop(103-117) sowie dessen Längenvarianten A2(102-117) und A2(105-117) identifiziert werden konnten. Dies korrelierte mit der deutlichen Zunahme von DR1-A2(103-117)-Komplexen, die per FACS-Analyse gefunden wurden. Während die Signale einiger zuvor sehr dominanter Selbstpeptide (Abb. 3-6 B, gekennzeichnet mit Kreuzen) nach Antigenpuls deutlich abnahmen, blieb die Intensität der CLIP-Signale unverändert stark. Es kam sogar eine weitere CLIP-Längenvariante als neues dominantes Signal hinzu. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch für unterschiedliche Konzentrationen des virosomalen Antigens Inflexal (Abb. 3-6 C, siehe auch Abbildung 3-13) sowie andere Protein- und Peptidantigene (Daten nicht gezeigt). In allen Fällen blieb die Menge an Oberflächen-MHC II-CLIP-Komplexen nach Antigenpuls unverändert.

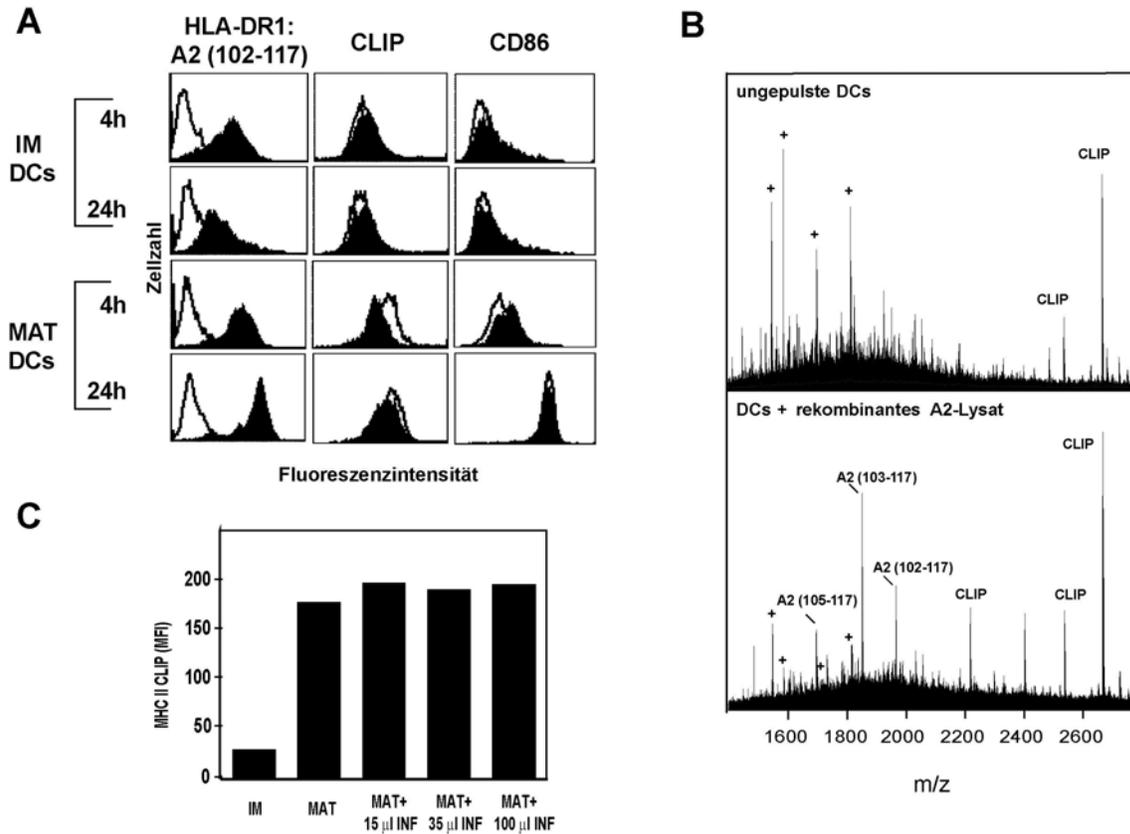


Abb. 3-6: Kopräsentation von CLIP und Antigenpeptiden auf der Oberfläche reifer DCs.

(A) Durchflußzytometrische Analyse von HLA-DRB1*0101-positiven DCs, die mit 5 µg/ml rekombinantes A2-Protein gepulst wurden (schwarze Histogramme) oder ungepulst blieben (weiße Histogramme). Die Zellen wurden in Gegenwart von LPS (1 µg/ml) (MAT DCs) oder ohne LPS gepulst (IM DCs) und nach 4 h und 24 h analysiert. HLA-DR1:A2-Peptid-Komplexe wurden mit dem monoklonalen Antikörper UL-5A1 detektiert, welcher das immundominante Epitop HLA-A2(103-117) und seine Längenvarianten im Kontext von HLA-DR1 erkennt. Isotyp-Kontrollen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

(B) Peptide wurden von HLA-DR-Molekülen reifer DCs (LPS, 24 h) isoliert und mittels MALDI-MS analysiert. CLIP-Varianten 82-101 ($m/z = 2220,22$), 81-103 ($m/z = 2543,4$), 81-104 ($m/z = 2674,54$) sowie HLA-A2-Epitope 103-117 ($m/z = 1854,9$), 102-117 ($m/z = 1969,9$) und 105-117 ($m/z = 1698,9$) sind gekennzeichnet. Die mit Kreuzen markierten Selbstpeptide haben die Massen $m/z = 1549,9$; $m/z = 1588,0$; $m/z = 1703,1$; $m/z = 1818,1$.

(C) DCs wurden in Gegenwart von LPS mit unterschiedlichen Konzentrationen Hämagglutinin-haltiger Virosomen (s.2.1.3) gepulst und die Oberflächenexpression von MHC II-CLIP-Komplexen durchflußzytometrisch bestimmt. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenz (MFI).

Es lässt sich also feststellen, dass MHC II-CLIP-Komplexe unabhängig von der Art der von DCs präsentierten, exogenen Antigene eine dominante Fraktion von MHC II-Peptid-Komplexen darstellen, die mit dem jeweiligen Antigen kopräsentiert werden. Die Tatsache, dass DCs selbst während der Präsentation eines exogenen Antigens eine solch große Fraktion von MHC II-Molekülen mit CLIP belegen und diese nicht für die Beladung mit Antigenpeptiden benutzen, legte die Vermutung nahe, dass CLIP bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielen könnte.

3.1.6 CLIP ist Bestandteil immunologischer Synapsen

Der starke Anstieg von MHC II-CLIP-Komplexen nach Aktivierung von DCs ist vergleichbar mit dem Anstieg costimulatorischer Moleküle auf DCs, die für *Priming* und Aktivierung von T-Zellen benötigt werden. Um zu überprüfen, ob CLIP bei der Interaktion von DCs mit T-Zellen eine Rolle spielen könnte, wurde seine Beteiligung an der Ausbildung immunologischer Synapsen zwischen $CD4^+$ -T-Zellen und reifen DCs untersucht. Dazu wurden DCs, wie in 3.1.5 beschrieben, für 24 h mit rekombinatem HLA-A2-Protein in Gegenwart von LPS stimuliert. Dann wurde die Interaktion mit autologen T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, indem die T-Zellen mit anti-CD3 Antikörpern gefärbt wurden, die DCs entweder mit anti-CD54 oder anti-MHC II-CLIP (Cer.CLIP) Antikörpern (Abb. 3-7). Die Verteilung der Proteine in der Synapse wurde nur in solchen Zellen bewertet, die im differentiellen Interferenzkontrast-Bild einen eindeutigen und engen Zell-Zell-Kontakt aufwiesen. Immunologische Synapsen sind durch die Verteilung bestimmter Proteine in den sogenannten *central molecular activation cluster* (cSMAC) und den *peripheral molecular activation cluster* (pSMAC) definiert (Monks et al., 1998).

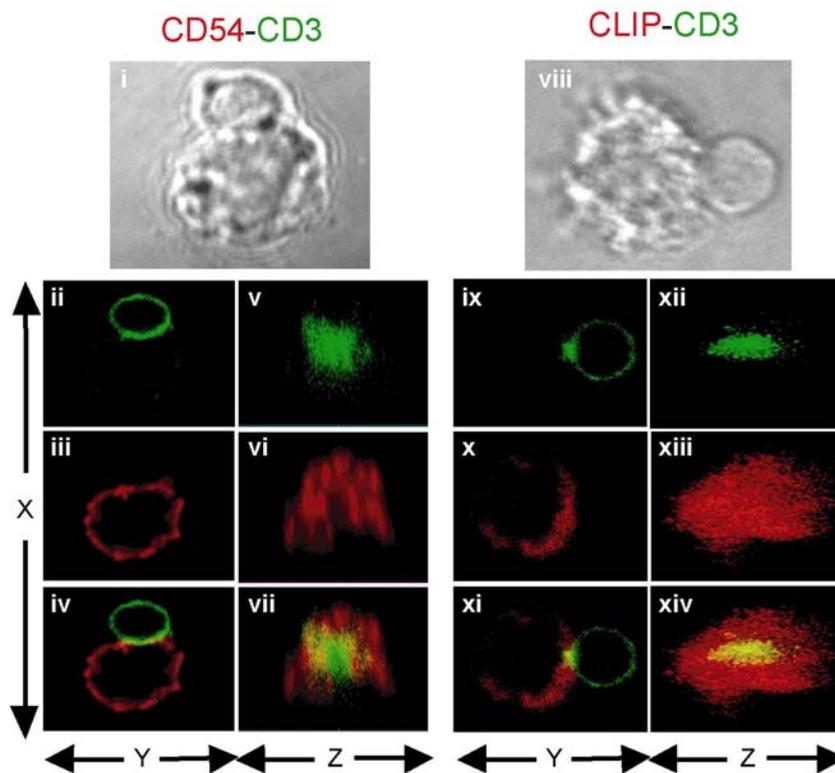


Abb. 3-7: CLIP ist Bestandteil immunologischer Synapsen und kolokalisiert mit CD3.

DCs wurden für 24 h mit 5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinatem HLA-A2-Protein und LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) gepulst. Dann wurden sie für 30-40 min mit $CD4^+$ -T-Zellen kokultiviert und anschließend Zell-Zell-Kontakte über konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die schwarz/weiß Bilder sind DIC-Aufnahmen (*difference interference contrast*). Immunfluoreszenzbilder derselben Zell-Zell-Kontakte sind in ii-vii mit CD3 (grün) und CD54 (rot) gezeigt sowie in ix-xiv mit CD3 (grün) und Cer.CLIP (rot). Die Bilder ii-iv und ix-xi sind optische Schnitte entlang der x-y-Achse. Die Bilder v-vii und xii-xiv sind Schnitte derselben Zell-Zell-Kontakte entlang der x-z-Achse.

Der T-Zell-Rezeptorkomplex reichert sich im Zentrum (cSMAC) der Synapse an, während CD54 eine eher ringartige Verteilung um das Zentrum herum aufweist und im pSMAC liegt (Bromley et al., 2001). Die oben beschriebene Interaktion von CD4⁺-T-Zellen mit HLA-A2-gepulsten DCs führte zur Ausbildung von Synapsen, in denen sich, in Übereinstimmung mit der Literatur, CD3 im zentralen Bereich des T-Zell-DC-Kontakts akkumulierte, während CD54 eine ringartige Verteilung mit niedriger Konzentration im Zentrum aufwies (Abb. 3-7 i-vii). Die MHC II-CLIP-Komplexe zeigten eine homogene Verteilung über den gesamten Bereich der Kontaktzone (Abb. 3-7 viii-xiv). Zwar wiesen sie nicht, wie auf *lipid bilayers* für nicht-agonistische Peptide gezeigt (Wülfing et al., 2002), eine Koaggregation mit CD3 im Zentrum der Synapse auf, zeigten aber Kofärbung mit CD3 und waren nicht aus der MHC-TCR-Kontaktzone ausgeschlossen. Das Vorhandensein von MHC II-CLIP in der immunologischen Synapse sowie seine Kofärbung mit CD3 unterstützt die Hypothese, dass CLIP auf der Zelloberfläche eine Funktion bei der DC-T-Zell-Interaktion zukommt.

3.1.7 CLIP und ein exogenes Antigen kolokalisieren in Tetraspan-Mikrodomänen reifer DCs

MHC II-Moleküle sind nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen verteilt, sondern in Mikrodomänen organisiert. *Membrane rafts* sind eine Form solcher Mikrodomänen, in denen MHC II-Moleküle angereichert sind und für die eine Bedeutung in der Antigenpräsentation gezeigt wurde (Anderson et al., 2000). Tetraspan-Mikrodomänen stellen eine von *membrane rafts* verschiedene Form von Mikrodomänen dar. Sie sind charakterisiert durch die CDw78-Determinante humaner MHC II-Moleküle, die mit unterschiedlichen Proteinen der Tetraspan-Superfamilie (z.B. CD9, CD63, CD81, CD82) assoziiert sind (Kropshofer et al., 2002). Die systematische Analyse der Proteinzusammensetzung von CDw78-Mikrodomänen in verschiedenen humanen antigenpräsentierenden Zellen und Organen des Immunsystems zeigte, dass HLA-DR-Moleküle in unterschiedlichem Ausmaß in diesen Domänen organisiert sind. Zudem zeigten Tetraspan-Mikrodomänen in all diesen Geweben eine teilweise unterschiedliche Zusammensetzung und enthielten neben verschiedenen Tetraspan-Molekülen auch HLA-DM (Tabelle 3-2).

CDw78-Mikrodomänen zeichnen sich dadurch aus, dass sich die MHC II-Moleküle in ihnen in Abhängigkeit vom MHC II-assoziierten Peptid anreichern. Sie weisen daher nur eine Selektion des gesamten MHC II-assoziierten Peptidrepertoires einer antigenpräsentierenden Zelle auf (Kropshofer et al., 2002). Ferner scheinen sie für die Aktivierung von T-Zellen von Bedeutung zu sein und konnten als Bestandteile immunologischer Synapsen nachgewiesen werden (Vogt et al., 2002; Mittelbrunn et al., 2002).

Es sollte daher überprüft werden, ob CDw78-Domänen reifer DCs in ihrem selektierten Peptidrepertoire auch CLIP enthalten würden. Dazu wurden CDw78-Mikrodomänen und Gesamt-HLA-DR von reifen HLA-A2⁻, DR1⁺-DCs isoliert, die, wie in Abschnitt 3.1.5

Tabelle 3-2: Proteingehalt in CDw78-Mikrodomänen

	HLA-DR Gehalt in CDw78 (% von HLA-DR) ^a	Proteine in CDw78-Mikrodomänen ^b					
		HLA-DR	HLA-DM	CD9	CD63	CD82	CD81
B-LCL WT-100	5-6	++	+	+	+	++	+
B-LCL Jutthom	6-10	++	+	-	-	++	-
unreife DCs	2-4	+	++	++	++	-	-
reife DCs	9-12	+++	++	+++	++	+	-
Milz	4-5	+	+	+	+++	++	-
Tonsille	15-17	++	+	++	++	+++	++
Lymphknoten	8-12	+++	+++	++	+++	+++	+++
Thymus	15-17	++	-	++	+	+	+

^a Zellen bzw. Gewebe wurden in 1 % Octylglucopyranosid lysiert, CDw78-Mikrodomänen mit Hilfe des mAbs FN1 isoliert und der Gehalt an CDw78-assoziiertem HLA-DR relativ zu Gesamt-HLA-DR mittels quantitativem *Western blot* bestimmt.

^b CDw78-Präzipitate wurden auf das relative Vorhandensein der angegebenen Moleküle gefärbt. Für jedes Protein wurde das intensivste Signal = 100 % gesetzt und die anderen Signale relativ dazu in folgende Kategorien eingeteilt: +++ 100-60 %; ++ 59,9-20 %; + 19,9-1%, - < 1%.

beschrieben, zuvor mit rekombinantem HLA-A2-Protein gepulst wurden. Die Peptide wurden eluiert und mittels MALDI-MS analysiert. Wie Abbildung 3-8 A (unten) zeigt (s. auch Abbildung 3-6 B) führte die Aufnahme von rekombinantem A2-Protein zur dominanten Präsentation des A2-Epitops (103-117) sowie zweier Längenvarianten im Gesamt-DR-Peptidrepertoire reifer DCs. Für die HLA-A2-positive B-Zelllinie Jutthom konnte bereits gezeigt werden, dass das immundominante Epitop A2(103-117), welches das im Kontext von HLA-DR häufigste Selbstpeptid in dieser Zelllinie ist, in CDw78-Domänen lokalisiert ist (Kropshofer et al., 2002). Abbildung 3-8 A (oben) zeigt, dass auch die Aufnahme exogenen A2-Proteins seitens DCs zur Präsentation dieses Epitops in CDw78-Mikrodomänen führte. Dort wird es mit drei Längenvarianten eines weiteren dominanten Peptids präsentiert, dem Selbstpeptid CLIP.

MHC-Komplexe mit Peptiden aus dem hier verwendeten exogenen Antigen A2 werden also in spezielle Tetraspan-Mikrodomänen von DCs befördert, die für die T-Zell-Aktivierung von Bedeutung zu sein scheinen (Kropshofer et al., 2002).

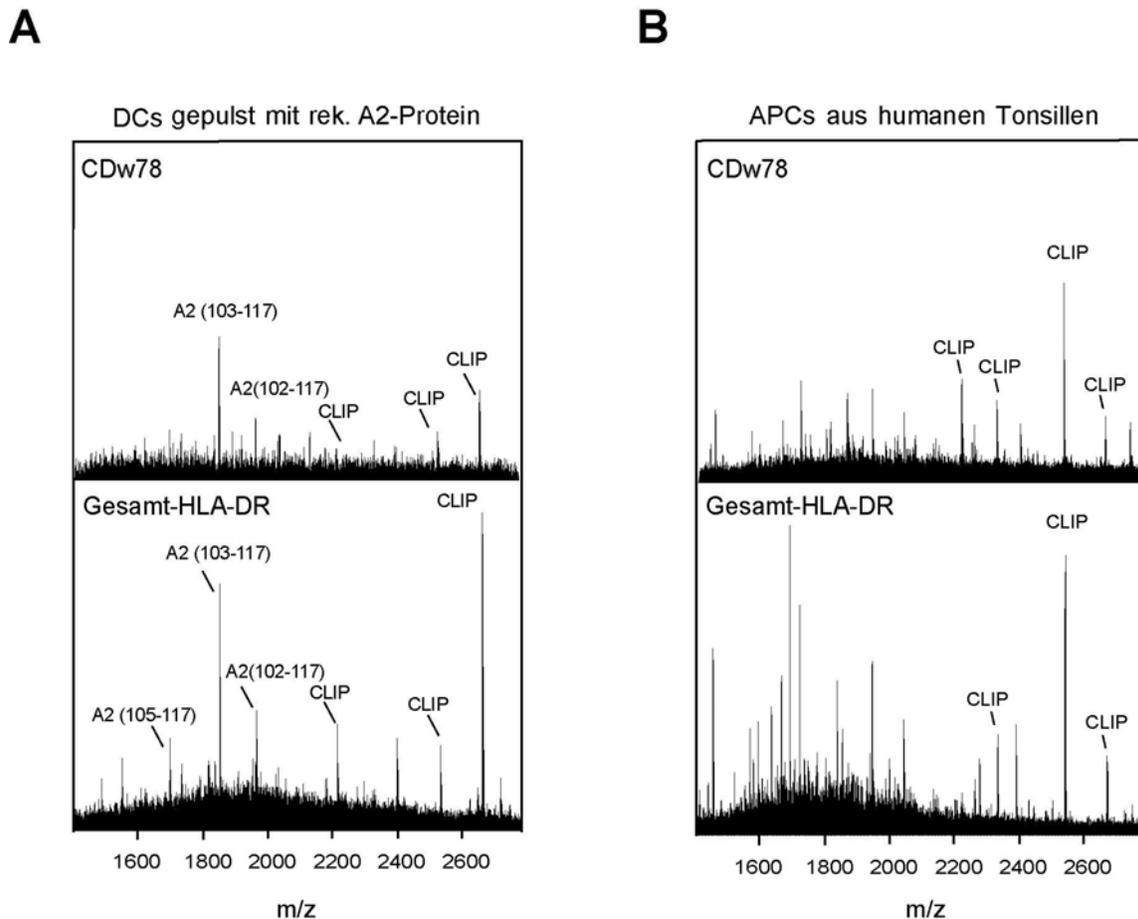


Abb. 3-8: CLIP ist dominantes Selbstpeptid in CDw78-Mikrodomänen von DCs und APCs aus humanen Tonsillen

(A) DCs wurden, wie in Abbildung 3-7 beschrieben, mit rekombinantem A2-Protein gepulst. MHC II-Moleküle wurden dann in 1 % Octylglucopyranosid mit den mAbs FN1 (CDw78-Mikrodomänen) oder L243 (Gesamt-HLA-DR) isoliert und die eluierten Peptide mittels MALDI-MS analysiert. CLIP-Varianten 82-101 ($m/z = 2220,22$), 81-103 ($m/z = 2543,4$), 81-104 ($m/z = 2674,54$) sowie HLA-A2-Epitope 103-117 ($m/z = 1854,9$), 102-117 ($m/z = 1969,93$) und 105-117 ($m/z = 1698,9$) sind gekennzeichnet

(B) Humane Tonsillen wurden in 1 % Octylglucopyranosid homogenisiert und MHC II-assoziierte Peptide wie in A isoliert.

Auch in diesen Domänen mit ihrem sehr begrenzten und offenbar für die Antigenpräsentation selektierten Peptidrepertoire ist CLIP das dominanteste Selbstpeptid.

Zur Überprüfung, ob diese mit *in vitro* kultivierten DCs gemachten Beobachtungen auch *in vivo* zuträfen, wurden Gesamt-HLA-DR und CDw78- Domänen auch aus humanen Tonsillen isoliert (Abb. 3-8 B). Auch hier zeigte das Gesamt-DR-Peptidrepertoire sehr dominante CLIP-Signale. Außerdem zeigte CLIP auch in den CDw78-Domänen mit ihrer im Vergleich zu Gesamt-HLA-DR deutlich begrenzteren Vielfalt an Peptiden eine relative Anreicherung gegenüber anderen Selbstpeptiden (Abb. 3-8 B oben).

Die Anreicherung von CLIP und Antigenpeptiden in Tetraspan-Domänen reifer DCs und die Dominanz von CLIP in diesen Domänen, auch in tonsillären APCs, bestärkte ein weiteres Mal die Vermutung, dass CLIP eine funktionelle Bedeutung in der T-Zell-Aktivierung spielen könnte.

3.1.8 Das CLIP/MHC II-Verhältnis auf der Oberfläche von DCs hat Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung

Die Polarisation von T-Helferzellen zum T_H1 - oder T_H2 -Phänotyp hängt stark vom Cytokinmilieu ab, ist aber ein sehr dynamischer Prozess, der in unterschiedlichen Stadien der DC-Reifung zu unterschiedlichen Resultaten führen kann (Langenkamp et al., 2000). Zudem ist gezeigt worden, dass die T-Zell-Polarisierung auch von der Antigenendosose und damit der Antigenendichte auf der APC sowie der Dauer und Stärke der MHC II-TCR-Interaktion abhängt (s. Einleitung). Der Anteil an MHC II-CLIP-Komplexen am Gesamt-MHC II könnte insofern Einfluß auf die Antigenendichte und damit die T-Zell-Polarisierung nehmen.

Um diese Frage zu klären, wurde zunächst versucht, den Anteil an MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche von DCs durch exogene Zugabe von CLIP zu erhöhen.

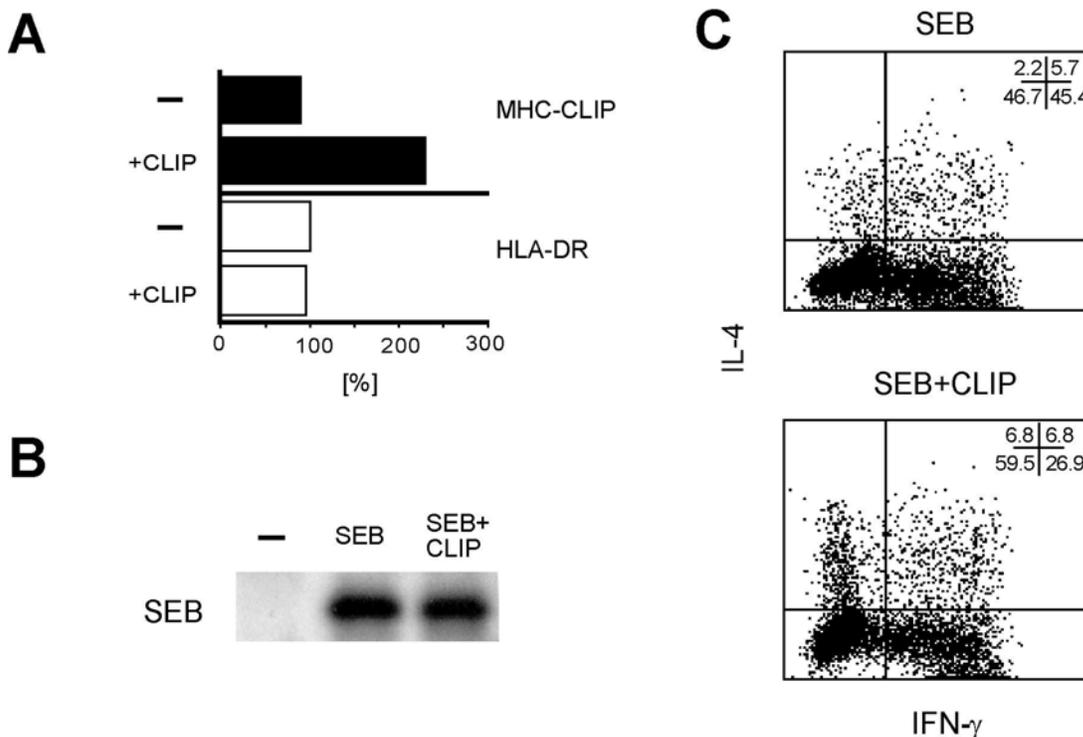


Abb. 3-9: Die Erhöhung des CLIP/MHC II-Verhältnisses auf DCs verschiebt die T-Zell-Polarisierung in Richtung T_H0 sowie T_H2 .

(A) DCs wurden mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) aktiviert und mit oder ohne CLIP (20 μM) für 24 h stimuliert. Die Oberflächenexpression von CLIP wurde mit dem mAk Cer.CLIP, die von Gesamt-HLA-DR mit dem mAk L243 durchflußzytometrisch bestimmt. Die Expressionen beider Moleküle ohne Zugabe von exogenem CLIP wurden = 100 % gesetzt.

(B) DCs wurden mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SEB oder 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SEB + 20 μM CLIP für 24 h in Gegenwart von LPS gepulst, in 1 % Triton-X-100 lysiert und dann die Menge gebundenen SEBs im *Western blot* durch Färbung mit anti-SEB Kaninchen Serum (SIGMA) quantifiziert

(C) Naive $CD4^+$ -T-Zellen wurden mit DCs kokultiviert, die zuvor für 24 h mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SEB oder 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SEB + 20 μM CLIP in Gegenwart von LPS stimuliert wurden. Die T-Zellen wurden nach Tag 5 durch Zugabe von IL-2 expandiert und der Anteil IL-4- und IFN- γ -produzierender Zellen zwischen Tag 10-14 nach Stimulation mit PMA (0,1 μM) und Ionomycin (1 $\mu\text{g/ml}$) sowie Zugabe von Brefeldin (10 $\mu\text{g/ml}$) durch intrazelluläre FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

Es zeigte sich, dass durch Zugabe von 20 μM CLIP die Menge an MHC II-CLIP-Komplexen um das 2,5- bis 3-fache anstieg, während die HLA-DR-Expression unbeeinflusst blieb (Abb. 3-9 A). Als Antigen für die T-Zell-Polarisierung wurde zunächst das Superantigen SEB (Staphylokokkus Enterotoxin B) verwendet. Durch gleichzeitiges Pulsen von DCs mit SEB und CLIP in Gegenwart von LPS verminderte sich der Anteil an gebundenem SEB nicht (Abb. 3-9 B), es zeigte sich aber ein deutlicher Effekt auf die T-Zell-Polarisierung, der offenbar ausschließlich auf der Veränderung des CLIP/MHC II-Verhältnisses auf der Zelloberfläche der DCs beruhte. Während die Zahl der IFN- γ -sezernierenden T_{H1} -Zellen sich etwa halbierte, stieg die Zahl der IL-4-produzierenden T_{H2} -Zellen um etwa das dreifache an. Auch die Zahl der unpolarisierten Zellen (T_{H0}) nahm deutlich zu (Abb. 3-9 C).

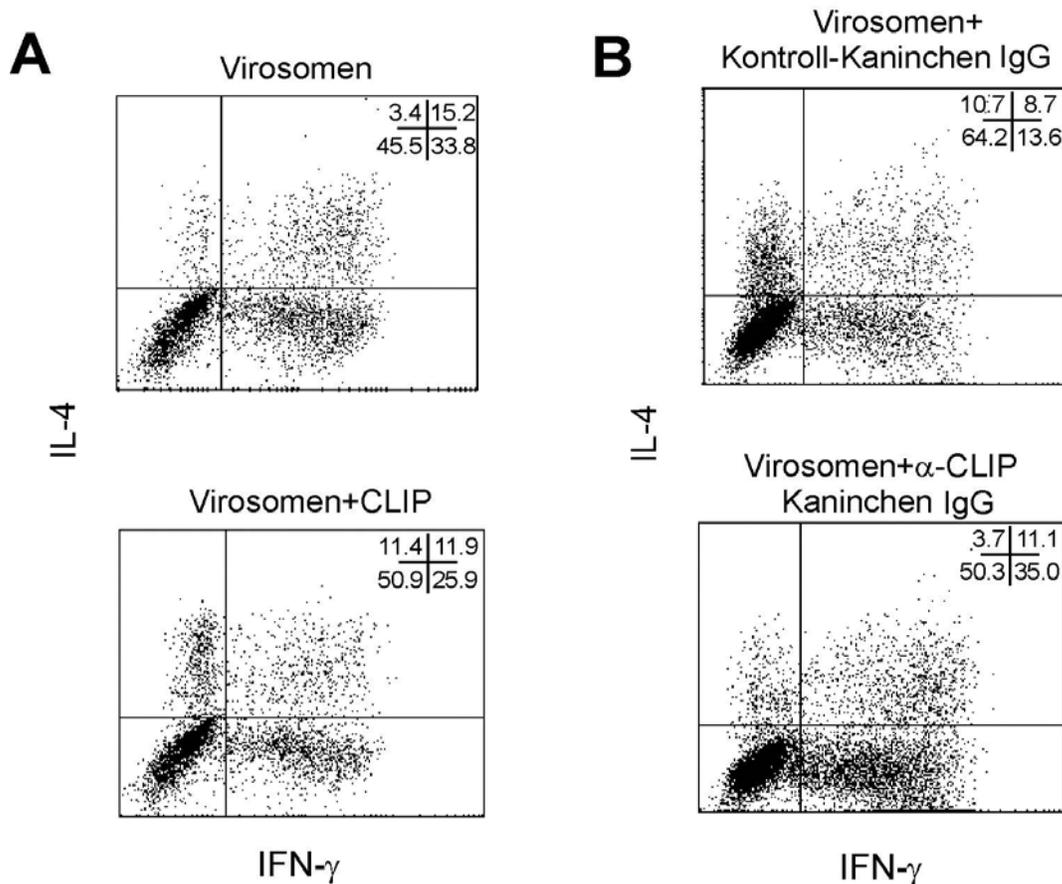


Abb. 3-10: Blockieren des endogenen CLIPs auf der Zelloberfläche von DCs verschiebt die T-Zell-Polarisation in Richtung T_{H1} .

(A) DCs wurden vor Kokultivierung mit naiven $CD4^+$ -T-Zellen mit 50 $\mu\text{l/ml}$ Virosomen oder 50 $\mu\text{l/ml}$ Virosomen + 20 μM CLIP in Gegenwart von LPS für 24 h gepulst. Analyse der T-Zellen erfolgte wie in Abb.3-9 beschrieben. Gezeigt ist eins aus zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

(B) DCs eines anderen Spenders als in (A) wurden mit 20 $\mu\text{l/ml}$ Virosomen behandelt. Zur Kokultur von T-Zellen und DCs wurden entweder 100 $\mu\text{g/ml}$ eines irrelevanten Kaninchen IgGs oder die gleiche Menge eines CLIP-spezifischen Kaninchen IgGs zugesetzt und die Analyse der T-Zellen wie in Abb. 3-9 durchgeführt. Eins aus zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten ist gezeigt.

Sehr ähnliche Ergebnisse konnten beobachtet werden, wenn als Antigen statt SEB Hämagglutinin-haltige Virosomen (50 $\mu\text{l/ml}$) verwendet wurden. Auch bei diesem Antigen führte die Erhöhung der CLIP-Menge auf der Zelloberfläche zu einer Verschiebung der T-Zell-Polarisierung in Richtung T_{H2} (Abb. 3-10 A).

Es sollte ferner überprüft werden, ob sich der durch exogenes CLIP hervorgerufene Effekt auf die T-Zell-Polarisierung auch umkehren ließe, indem man endogenes CLIP auf der Zelloberfläche mit einem Antikörper blockiert. Dazu wurden DCs eines anderen Spenders als in Abbildung 3-10 A mit einer geringeren Konzentration an Virosomen (20 $\mu\text{l/ml}$) gepulst und zur DC-T-Zell-Kokultur ein irrelevantes Kaninchen IgG zugesetzt (Abb. 3-10 B). Für die T-Zell-Polarisierung unter diesen Bedingungen ergab sich eine fast gleichmäßige Verteilung von T_{H1} - und T_{H2} -Zellen. Wenn statt des irrelevanten Kaninchen IgGs aber ein Anti-CLIP-spezifisches Kaninchen-IgG zugesetzt wurde (zur Bindungsspezifität des Antikörpers siehe Abb. 3-11), ergab sich eine deutliche Verschiebung der T-Zell-Polarisation in Richtung T_{H1} . Durch Blockade endogener MHC II-CLIP-Komplexe im DC-T-Zell-Assay ließ sich der durch exogenes CLIP erzielte Effekt umkehren, sodass man schlussfolgern kann, dass der Anteil an MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs ein für die T-Zell-Polarisierung maßgeblicher Parameter ist und dem T_{H1} -Zell-*Priming* entgegenwirkt.

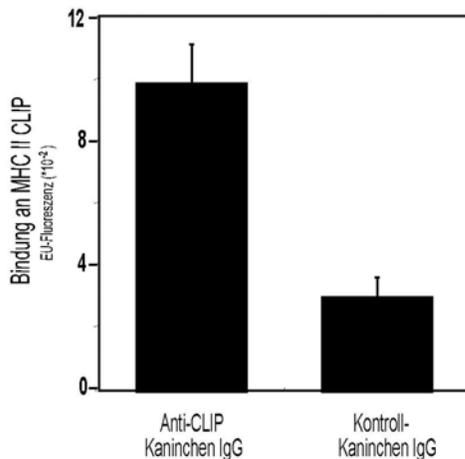


Abb. 3-11: Bindung des anti-CLIP Kaninchen-IgGs an HLA-DR-CLIP-Komplexe aus T2-Zellen.

HLA-DR-Moleküle wurden aus T2-Zellen isoliert, deren MHC II-Molekülen im wesentlichen mit dem Selbstpeptid CLIP besetzt sind (Riberdy et al., 1992). Die HLA-DR-Isolate wurden an eine ELISA-Platte gecoatet und die Erkennung durch anti-CLIP-Kaninchen IgG (5 $\mu\text{g/ml}$) sowie unterschiedliche Kontroll-IgGs (jeweil 5 $\mu\text{g/ml}$) überprüft. Im Vergleich zu den Kontrollseren zeigte das anti-CLIP-IgG eine deutliche Erkennung von HLA-DR-CLIP-Komplexen.

Die Ergebnisse der T-Zell-Polarisierungssassays für unterschiedliche Antigene sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst und zeigen die deutlichen Verschiebungen im T_{H1}/T_{H2} sowie T_{H1}/T_{H0} -Verhältnis durch Modulation der MHC II-CLIP-Fraktion auf der Zelloberfläche von reifen DCs.

Tabelle 3-3: Einfluss der MHC II-CLIP-Menge auf die T-Zell-Polarisierung.

Antigen	SEB		M4		Virosomen		Virosomen	
	-	+CLIP	-	+CLIP	-	+CLIP	-	+ α CLIP-IgG
$\frac{[\%]T_{H1}}{[\%]T_{H2}}$ ^a	20.64	3.96	10.05	1.79	9.94	2.27	1.27	9.46
$\frac{[\%]T_{H1}}{[\%]T_{H0}}$ ^a	0.97	0.45	0.26	0.13	0.74	0.51	0.21	0.70

^a Der prozentuale Anteil an Zellen mit T_{H1}-, T_{H2}- oder T_{H0}-Phänotyp wurde wie in Abbildung 3-9 und 3-10 für die Antigene SEB, die A2(103-117)-Variante M4 (s. 2.1.2. Peptide) und Hämagglutinin-haltige Virosomen bestimmt. Die Verhältnisse von T_{H1}:T_{H2} und T_{H1}:T_{H0} wurden mit und ohne CLIP bzw. mit und ohne CLIP-Kaninchen IgG berechnet. Die Werte wurden aus jeweils einem repräsentativen Experiment aus mindestens 3 mit ähnlichen Resultaten ausgewählt.

3.1.9 CLIP ist dominantes Selbstpeptid in medullären sowie corticalen Thymusepithelzellen von Mäusen

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden konnte, ist CLIP ein in der Peripherie dominant exprimiertes Selbstpeptid, welches die T-Zell-Polarisierung beeinflussen kann. Es sollte abschließend daher überprüft werden, ob CLIP auch ein für die T-Zell-Selektion im Thymus relevantes Peptid ist. Bis dato ist die Art in vivo vorkommender, natürlich prozessierter Peptidliganden, die an der positiven und negativen Selektion von T-Zellen im Thymus beteiligt sind, wenig untersucht.

Die Isolation der für positive und negative Selektion verantwortlichen medullären sowie corticalen Thymusepithelzellen ist bisher nur in Mäusen etabliert. Die Untersuchung dieser Zelltypen in bezug auf ihr MHC II-Peptidrepertoire wurde daher in Zellen einer BL6-Maus durchgeführt. Die Isolation der thymalen Epithelzellen wurden von J. Derbinski im Labor von B. Kyewski (DKFZ, Heidelberg) vorgenommen. Es konnten Peptidspektren für ex vivo präparierte corticale (cTECs) und medulläre (mTECs) Thymusepithelzellen sowie für thymale DCs (mDCs) erhalten werden.

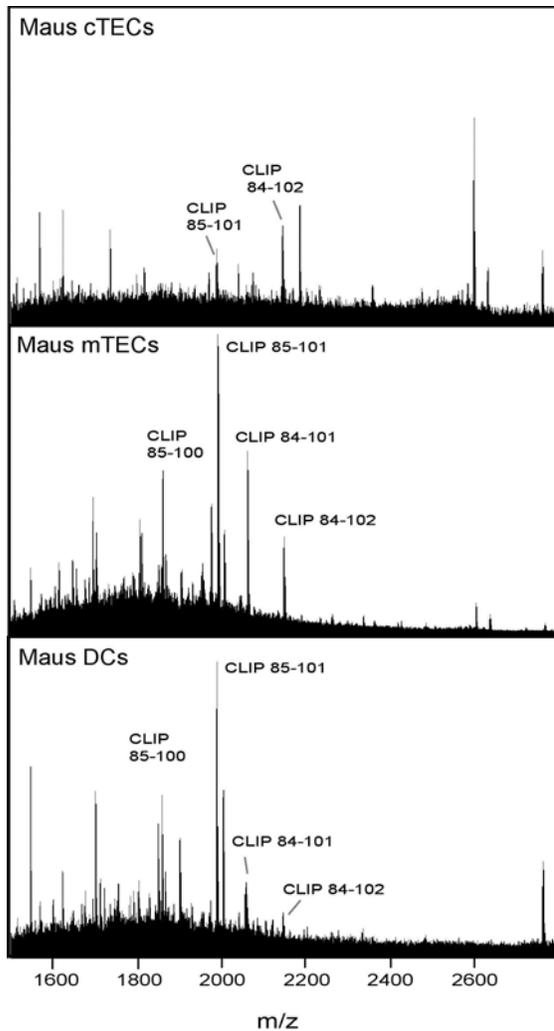


Abb. 3-12: Peptidspektren von thymalen epithelialen Zellen der Maus.

Corticale (cTECs) und medulläre (mTECs) Thymusepithelzellen sowie thymale DCs (mDCs) wurden aus Gesamthymi des Mausstamms BL/6 durchflußzytometrisch isoliert und eingefroren. MHC II-Moleküle wurden anschließend durch Präzipitation in 1 % Zwittergent-3-12 mit Hilfe des mAks Y3P isoliert, Peptide eluiert und mittels MALDI-MS analysiert.

Die annotierten Peptide sind Varianten von Maus-CLIP, die aufgrund ihrer Masse-Identität sowie durch LC-MS/MS Sequenzierung bestimmt wurden.

CLIP 85-100 ($m/z = 1856,0$); CLIP 85-101 ($m/z = 1987,1$); CLIP 84-101 ($m/z = 2058,1$); CLIP 84-102 ($m/z = 2145,1$).

Die Zellen der mTECs und mDCs wiesen eine starke MHC II-Expression auf und zeigten eine hohe Vielfalt an unterschiedlichen MHC II-assoziierten Peptidspezies (Abb. 3-12).

In cTECs schien die Peptidvielfalt deutlich eingeschränkter zu sein. Sowohl in cTECs als auch in mTECs und mDCs konnten CLIP-Längenvarianten identifiziert werden, in cTECs waren zwei der insgesamt nur sehr wenigen Peptidsignale auf CLIP zurückzuführen in mTECs und mDCs gingen die dominantesten Signale ebenfalls auf CLIP-Spezies zurück. Aus diesen Resultaten leitet sich die Hypothese ab, dass in der Maus ein beachtlicher Teil der T-Zellen, welche die Peripherie erreichen, auf einem CLIP-Hintergrund positiv sowie negativ selektiert werden.

3.2 Identifizierung von MHC Klasse II-restringierten tumorassoziierten Antigenepitopen

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass mit den hier beschriebenen Methoden die Sequenzierung von MHC II-restringierten Selbstpeptiden aus einer Zellzahl von nur ca. $5 \cdot 10^6$ DCs möglich ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass bekannte Epitope aus exogen aufgenommenen Proteinantigenen im HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoire von DCs massenspektrometrisch identifiziert werden konnten (Abb. 3-6 B). Es sollten daher im folgenden Bedingungen gefunden werden, unter denen der Transfer von Tumorantigenen von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle von DCs optimal erfolgt. Zudem sollte versucht werden, durch direkte Sequenzierung der auf MHC II-Moleküle von DCs aufgeladenen Peptide neue tumorassoziierte T-Helfer-Zell-Epitope zu identifizieren. Eine solche direkte Methode der Tumorantigen-Identifizierung über Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen würde die Suche nach neuen Helfer-Epitopen für die Tumorstimmung vereinfachen und vielleicht die Entwicklung effizienterer Tumorthérapien ermöglichen.

3.2.1 Identifizierung eines MHC II-restringierten Hämagglutinin-Epitops aus dem virosomalen Grippe-Impfstoff Inflexal

Der Puls mit dem Proteinantigen HLA-A2 führte, wie in Abbildung 3-6 gezeigt, zur Beladung von HLA-DR-Molekülen mit A2-Epitopen. Diese konnten als neue Signale im MALDI-Peptidprofil detektiert und aufgrund der exakten Masse-Identität als A2(103-117) sowie zwei seiner Längenvarianten identifiziert werden.

Es sollte daher als nächstes versucht werden, mittels MALDI-MS neue, unbekannte Epitope von exogen aufgenommenen Proteinantigenen auf MHC II-Molekülen von DCs zu identifizieren. Es wurde dazu der Grippe-Impfstoff Inflexal® (Berna) verwendet, der Hämagglutinine von drei verschiedenen Virusstämmen enthält (s. Material und Methoden 2.1.3). Es ist gezeigt worden, dass DCs Antigene aus Liposomen, speziell mannosylierten Liposomen und Virosomen, besonders effizient aufnehmen können (Copland et al., 2003). Der Grund dafür liegt in der rezeptorvermittelten Aufnahme dieser Antigene, die effizienter verläuft als die bloße Aufnahme durch Makropinocytose.

DCs wurden mit $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) und 33 $\mu\text{l/ml}$ Inflexal® gepulst und nach 24 h die HLA-DR-assoziierten Peptide isoliert. Das Peptidrepertoire gepulster DCs wies im Vergleich zu ungepulsten DCs drei sehr dominante neue Peptidspezies auf, mit den Massen: #1, $m/z = 1969,2$; #2, $m/z = 2097,3$; #3, $m/z = 2196,4$ (Abb. 3-13). Interessanterweise hatten die Peptidsignale zueinander Aminosäureabstand (#3-#2 = 99,1 (Valin); #2-#1 = 128,1 (Lysin oder Glutamin)), weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei den Signalen wahrscheinlich um zwei Längenvarianten eines einzigen Epitops handeln würde.

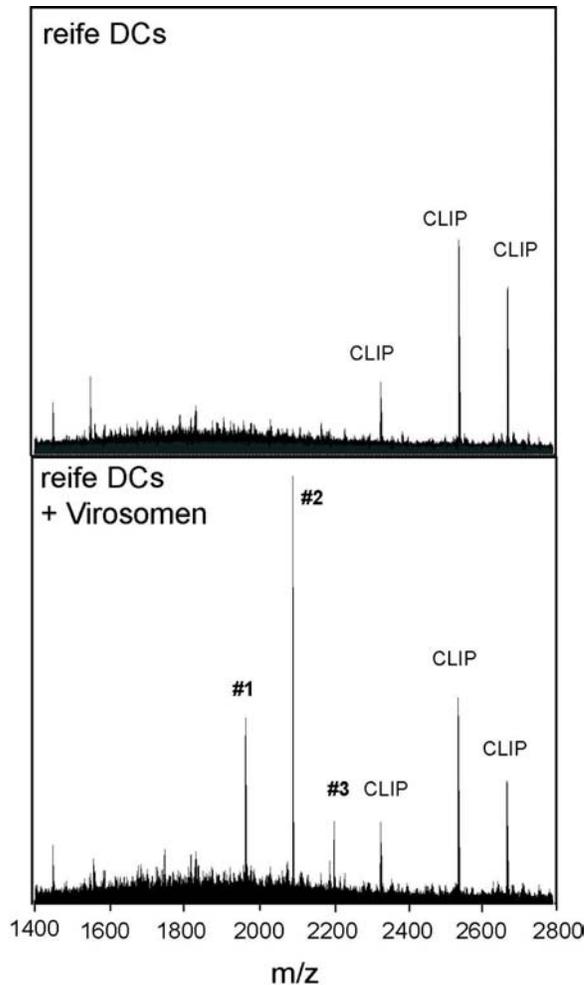


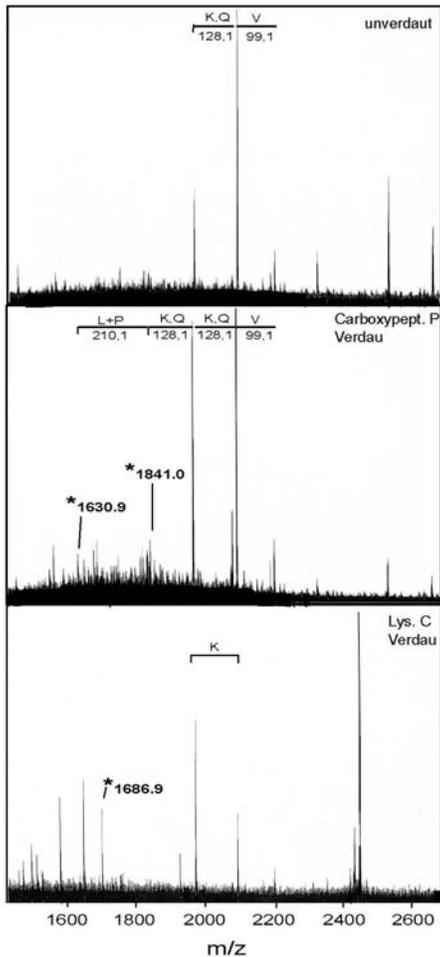
Abb. 3-13: Beladung dendritischer Zellen mit virosomalem Influenza-Hämagglutinin

DCs wurden mit $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) und 33 $\mu\text{l/ml}$ Hämagglutinin-Virosomen für 24 h stimuliert, HLA-DR Moleküle durch Präzipitation mit immobilisiertem mAk L243 präzipitiert und Peptide mit 0,1 % TFA eluiert. Die annotierten Peptide haben die Massen #1, $m/z = 1969,2$; #2, $m/z = 2097,3$; #3, $m/z = 2196,4$.

Bei den CLIP-Varianten handelt es sich um die bereits in Abb. 3-1 beschriebenen Längensvarianten 81-102, $m/z = 2333,4$; 81-103, $m/z = 2543,4$ und 81-104, $m/z = 2674,5$.

Aufgrund der Dominanz des Epitops wurde versucht, seine Identität durch enzymatischen Verdau aufzuklären. Dazu wurde das HLA-DR-Peptid-Lyophilisat aufgeteilt und zunächst mit Carboxypeptidase P verdaut (Abb. 3-14, zweites Spektrum). Carboxypeptidase P verdaut sukzessiv den C-Terminus von Peptiden. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des Peaks mit der Masse $m/z = 1969,2$ gegenüber dem Peak bei 2097,3, was die Vermutung bestärkte, dass dieser Peak in der Tat aus dem anderen hervorging, es sich also um Peptidsignale aus ein und demselben Epitop handelte. Zusätzlich entstanden eine Reihe weiterer Peaks mit kleineren Massen. Zwei dominanterer dieser Peaks wiesen wiederum Aminosäureabstände zu den Ursprungspeaks auf und könnten somit aus ihnen hervorgegangen sein (Abb. 3-14, markiert mit einem Stern). Da die eingesetzten Virosomen Hämagglutinine aus bekannten Influenzastämmen enthielten, waren die Hämagglutininsequenzen, aus denen die Epitope entstanden sein könnten, bekannt. Aufgrund der im MALDI bestimmten, exakten Masse des Epitops sowie der aus dem Carboxypeptidase P Verdau bestimmten Aminosäuren ergab sich das Kandidatenepitop HA(253-272) aus dem Virusstamm B Yamanashi 166/98. Die Sequenz sowie das in Frage kommende Epitop sind in Abbildung 3-14 B gezeigt. Zur Verifizierung wurde ein Verdau des Peptidgemisches mit der Endoproteinase Lys C durchgeführt. Lys C schneidet Peptide auf der C-terminalen Seite von Lysinen.

A



B

Influenza Hämagglutinin (HA) Stamm B/Yamanashi/166/98

10	20	30	40	50
DRICTGITSS	NSPHVVKTAT	QGEVNVTVGI	PLTTPTKSH	FANLKGKTR
60	70	80	90	100
GKLCPTCLNC	TDLVALGRP	MCVGVTPSAK	ASILHEVRPV	TSGCFPIHMD
110	120	130	140	150
RTKIRQLPNL	LRGYEKIRLS	TQNVINAEGA	PGGPYRLGTS	GSCP NATSRS
160	170	180	190	200
GFFATMAWAV	PKDNNKTATN	PLTVEVPHIC	TKEEDQITWV	GFHSDNKTQM
210	220	230	240	250
KNLYGDSNFQ	KFTSSANGVT	THYVSQIGGF	PDQTEDGGLP	QSGRIVV DYM
260	270	280	290	300
<u>VQKPGKTGTI</u>	<u>VYQRGILLPQ</u>	<u>KV</u> WCASGRSK	VIRGSLPLIG	EADCLHEKYG
310	320	330	340	346
GLNKSPPYYT	GEHAKAIGNC	PIWVKTP LKL	ANGTKYRPPA	KLLKER

C

Mögliche Fragmente nach Lys C-Verdau:

TGTIVYQRGILLPQK $m/z = 1686,99$

PGK $m/z = 301,19$

Identifiziertes Epitop: KPGKTGTIVYQRGILLPQKV

Abb. 3-14: Identifizierung eines MHC II-restringierten Hämagglutinin-Epitops durch enzymatischen Verdau.

(A) Das HLA-DR-Peptid-Eluat Influenza-Hämagglutinin-gepulster DCs wurde aufgeteilt und per MADLI-MS unverdaut (oberstes Spektrum), nach Verdau mit Carboxypeptidase P (20 min bei 37°C in Citratpuffer, pH 4,5; mittleres Spektrum) oder nach Lys C-Verdau (in Tris-Puffer (25 mM, pH 8) bei 37°C; unteres Spektrum) analysiert. Die aus den enzymatischen Verdaus hervorgegangenen Peptidpeaks mit Aminosäureabstand zu den Ursprungspeaks sind mit Sternen markiert.

(B) Sequenz des Hämagglutinins aus Stamm B Yamanashi 166/98, dessen Epitope 253-272 (2196,4) (rot markiert) sowie 253-271 (2097,3) und 253-270 bzw. 254-271 (jeweils 1969,2) zu den dominanten Signalen im MALDI-MS-Spektrum gepulster DCs führten.

(C) Lys C-Verdau sollte für das Kandidatenepitop zu den angegebenen neuen Massepeaks führen. Der Peak bei 1686,9 konnte detektiert werden und ist im untersten Spektrum mit einem Stern markiert.

Für das in Frage kommende Epitop sollte sich nach Lys C-Verdau ein neues Peptid mit der Masse $m/z = 1686,99$ ergeben (Abb. 3-14 C). In der Tat konnte im MALDI-MS nach Lys C-Verdau ein Peptid mit der Masse 1686,96 identifiziert werden (Abb. 3-14 A, unterstes Spektrum). Zudem zeigte sich eine deutliche Zunahme des Peaks bei $m/z = 1969,2$ gegenüber dem bei 2097,3, was auf ein N-terminales Lysin hindeutete, welches im Kandidatenpeptid ebenfalls vorhanden war. Die weiteren nach Lys C-Verdau entstandenen dominanten Peptide können nicht aus dem identifizierten Hämagglutinin Ursprungsepitop HA(253-272) stammen

und sind offenbar die Produkte anderer, in der komplexen HLA-DR-Mischung vorhandener Peptide (Abb. 3-14, unterstes Spektrum).

Dieses Beispiel zeigt, dass nach Pulsen dendritischer Zellen mit Antigenen, auf MHC Klasse II-Moleküle aufgeladene Epitope massenspektrometrisch detektiert und, wenn sie ausreichende Dominanz aufweisen, auch direkt identifiziert werden können. Die für dieses Epitop gezeigte Identifizierung über enzymatischen Verdau konnte auch über LC-MS/MS-Messung verifiziert werden (G. Buurman, persönliche Mitteilung).

3.2.2 Transfer von Antigenen von Melanomzellen auf MHC II-Moleküle dendritischer Zellen

Die im vorangegangenen Abschnitt am Beispiel des virosomalen Impfstoffs Inflexal gezeigte Möglichkeit der direkten Identifizierung neuer T-Helferzell-Epitope durch Sequenzierung der von DCs prozessierten und auf MHC II-Molekülen präsentierten Antigenpeptide sollte nun auch auf die Identifizierung neuer tumorassoziierter Helfer-Epitope übertragen werden. Für die Identifizierung tumorassoziierter Epitope sollten Gesamt-Tumorzellen als Antigene eingesetzt werden. Gesamtzell-Lysate haben im Gegensatz zu vorher ausgesuchten Tumorantigenen den Vorteil, dass sie theoretisch eine Vielzahl an möglichen, neuen tumorassozierten und tumorspezifischen Antigenen liefern können. Dazu war es aber notwendig, zunächst die optimalen Bedingungen für die Übertragung der Antigene von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle dendritischer Zellen zu ermitteln.

Bezüglich des optimalen Zeitpunkts der Antigengabe konnte bereits durch die in Abschnitt 3.1.4 dargestellten Ergebnisse gezeigt werden, dass nur eine sehr frühe Phase während der Maturierung von DCs für die effiziente Beladung von MHC II-Molekülen in Frage kommt. Stabile MHC II-Peptid-Komplexe konnten zudem nur generiert werden, wenn gleichzeitig mit der Antigengabe auch die Reifung der DCs induziert wurde.

Welche Form der Tumorzell-Präparation für den Transfer von Antigenen auf MHC II-Moleküle am geeignetsten ist, sollte im folgenden analysiert werden. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen insbesondere auf dem Vergleich apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen als Antigenquelle.

3.2.2.1 DC-Aktivierungspotential nekrotischer und apoptotischer Zellen

Der Einsatz nekrotischer und apoptotischer Tumorzellen für Vakzinierungs-Strategien mittels dendritischer Zellen ist bereits vielfach diskutiert worden. Die meisten Studien konzentrierten sich dabei auf den Einfluss dieser Zellen auf die DC-Maturierung mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Maturierungspotentials nekrotischer vs. apoptotischer Zellen (Sauter et al., 2000; Basu et al., 2000; Kotera et al., 2001, Salio et al., 2000). Vorherrschende Meinung ist, dass nekrotische Zellen, bedingt durch die Freisetzung von Hitzeschock-Proteinen (Hsps), ein Gefahren-Signal liefern, welches die Maturierung von DCs induziert (Matzinger, 1998). Um der Frage nachzugehen, ob nekrotische Tumorzellen stets eine vollständige Reifung von DCs bewirkten, wurden verschiedene Melanomzelllinien nekrotisiert und ihr DC-Aktivierungspotential untersucht. Nekrose wurde dabei durch standardisiertes, viermaliges rasches Einfrieren und Auftauen der Zellen ausgelöst. Wie mittels durchflußzytometrischer Analyse der DC-Aktivierungsmarker CD86, MHC I und MHC II gezeigt werden konnte, war die Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a sowie auch die Melanomzelllinie MZ-2 (Daten nicht gezeigt) nach Nekrotisierung nicht in der Lage, eine vollständige und anhaltende DC-Maturierung auszulösen (Abb. 3-15 A). Es zeigte sich im Vergleich zur deutlichen Aktivierung durch TNF- α (10 ng/ml) nur eine leichte, transiente Steigerung der Aktivierungsmarker-Expression, die aber nach 10-12 h wieder abklang und vergleichbare Werte wie nach der Stimulation mit apoptotischen Zellen erreichte (zur Aufbereitung apoptotischer und nekrotischer Zellen s. 2.2.4.1). Gleiches Verhalten zeigten auch die Aktivierungsmarker CD80 und CD83 (Daten nicht gezeigt) und konnten auch für höhere Konzentrationen an nekrotischen UKRV-Mel15a-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu induzierten nekrotische Ma-Mel-18-Melanomzellen eine vollständige DC-Maturierung (Abb. 3-15 B). Beide Zelllinien wurden auf eine mögliche Kontamination durch Mycoplasmen untersucht, die für den Unterschied im Aktivierungspotential verantwortlich sein könnten (Salio et al., 2000), waren aber negativ (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Aktivierung von DCs durch nekrotische Melanomzellen kein allgemeingültiges Phänomen ist und daher zur Sicherstellung der vollständigen Maturierung und Generierung stabiler MHC II-Antigen-Komplexe zusätzlich ein inflammatorischer Stimulus, beispielsweise in Form von TNF- α , bereitgestellt werden muss.

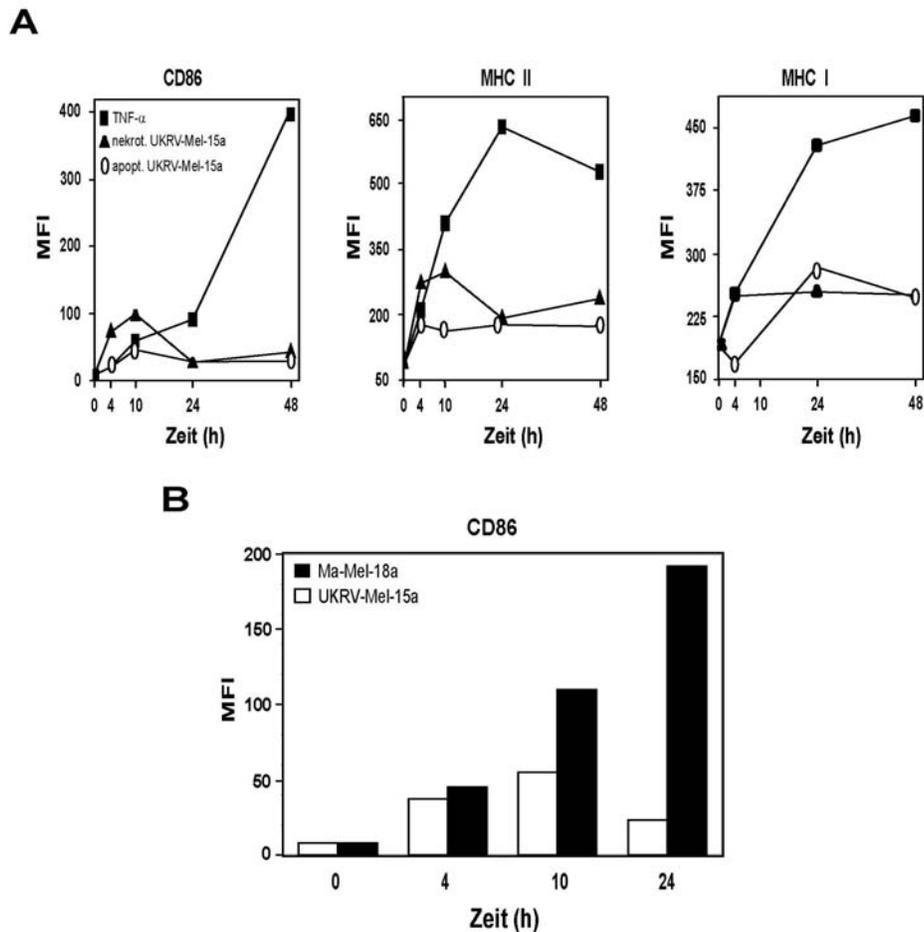


Abb. 3-15: Tumorzell-Nekrose führt nicht notwendigerweise zur Maturierung von DCs

(A) DCs wurden mit TNF- α (10 ng/ml) stimuliert oder jeweils im Verhältnis von 1:1 mit apoptotischen (induziert durch 24-stündige Behandlung mit Cisplatin (6 μ g/ml) (SIGMA)) oder nekrotischen UKRV-Mel-15a Zellen kokultiviert. DCs wurden durchflußzytometrisch auf die Expression der Aktivierungsmarker CD86, HLA-DR (MHC-II) und HLA-A, -B, -C untersucht. Dargestellt sind die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen *Geomeans*. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel einer Vielzahl von Experimenten mit ähnlichen Resultaten. (B) Durchflußzytometrische Analyse der CD86-Expression nach Behandlung von DCs mit nekrotischen UKRV-Mel-15a oder Ma-Mel-18a-Zellen (jeweils im Verhältnis von 1:1 mit DCs kokultiviert).

3.2.2.2 Vergleich von UKRV-Mel-15a und Ma-Mel-18a bezüglich einiger die Maturierung von DCs beeinflussender Parameter

Als endogener Auslöser für die Aktivierung von DCs durch nekrotische Zellen wird die Freisetzung von Hitzeschock-Proteinen angesehen (Sauter et al, 2000; Basu et al., 2000). Wie in Abbildung 3-21 gezeigt wird, führte auch die Nekrotisierung von UKRV-Mel-15a-Zellen zur deutlichen Freisetzung von Proteinen der Hsp-70-Familie. Da die Nekrotisierung von UKRV-Mel-15a-Zellen trotzdem im Gegensatz zur Nekrotisierung von Ma-Mel-18a-Zellen nur zu einer sehr unvollständigen DC-Reifung führte, musste davon ausgegangen werden,

dass entweder UKRV-Mel-15a-Zellen bestimmte andere Faktoren freisetzen, die der Maturierung entgegenwirken, oder Ma-Mel-18a über zusätzliche maturierungsaktivierende Faktoren verfügte, die in UKRV-Mel-15a-Zellen fehlten. Solche die DC-Maturierung inhibierende Faktoren, deren Freisetzung von Tumorzellen auch bereits beschrieben wurde (Gabrilovich et al., 1996; Salazar-Onfray, 1999) sind beispielsweise IL-10 und VEGF. Der Vergleich der Expression dieser Proteine in beiden Zelllinien sowie der sich bezüglich des Maturierungspotential ähnlich wie UKRV-Mel-15a verhaltenden Melanomzelllinien MZ-2 mittels *Western blot* zeigte, dass IL-10 in der Tat in beiden Zelllinien mit schwachem DC-Aktivierungspotential stärker exprimiert wird als in der mit hohem Aktivierungspotential (Abb. 3-16 A). Für VEGF zeigte sich in MZ-2 eine starke Expression, in Mel-18a-Zellen allerdings auch eine schwache Expression, während es in Mel-15a Zellen abwesend war. Zur Klärung der Frage, ob wirklich diese Proteine für das geringe Aktivierungspotential von Mel-15a und MZ-2 verantwortlich wären, wurden DCs mit diesen nekrotischen Melanomzellen unter Zusatz von Anti-IL10 bzw. Anti-VEGF kokultiviert. Der Zusatz der Antikörper führte nicht dazu, dass sich das Aktivierungspotential der jeweiligen Zelllinie auf DCs erhöhte (Daten nicht gezeigt). Zudem war davon auszugehen, dass die Freisetzung dieser Proteine dann auch die TNF- α -induzierte DC-Maturierung abschwächen sollten. Tatsächlich führte aber eine Koinkubation von DCs mit TNF- α und nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen zu einer stärkeren DC-Aktivierung als Inkubation mit TNF- α alleine. Daher kam als Grund für das verminderte Aktivierungspotential von MZ-2 und Mel-15a die Freisetzung von IL-10 bzw. VEGF eher nicht in Frage.

Um eine etwas breitere Übersicht über die möglichen Unterschiede zwischen UKRV-Mel-15a und Ma-Mel-18a bezüglich ihres Aktivierungspotentials zu erhalten, wurde eine mRNA-Microarray-Analyse der beiden Zelllinien durchgeführt. Es wurde dabei speziell auf Unterschiede in der Expression von Hsps und anderer möglicher, die Maturierung von DCs beeinflussender Proteine geachtet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Western blot*-Analyse war die mRNA-Expression von VEGF in Ma-Mel-18a-Zellen höher als in UKRV-Mel-15a (Abb. 3-16 B). Auch die Expression von TGF- β , einem weiteren Protein, welches die DC-Maturierung negativ beeinflusst, war in Ma-Mel-18-Zellen höher. Diese Parameter scheinen also offenbar nicht der Grund für das unterschiedliche Aktivierungspotential zu sein. Auch die Analyse der mRNA-Expression von Hsps lieferte keinen Hinweis auf mögliche Ursachen für das unterschiedlichen Aktivierungspotentials, da sie entweder gar keine veränderte Expression aufwies, oder zum Teil in der einen oder anderen Zelllinie überexprimiert wurden (Abb. 3-16 B).

Ein interessanter weiterer Unterschied dieser beiden Zelllinien war neben ihrem DC-Aktivierungspotential auch ihre IFN- α -Sensitivität. Während sich Ma-Mel-18a-Zellen als ausgesprochen IFN- α -resistent erwiesen, führte IFN- α -Behandlung von UKRV-Mel-15a-Zellen zur Induktion bestimmter, IFN- α -induzierbarer Gene. IFN- α ist ein in der Melanomtherapie erfolgreich eingesetztes Cytokin. Neben seinem direkten Einfluss auf die Proliferationsrate von Melanomen scheint es auch die Antitumor-Antwort des Immunsystems zu unterstützen (Belardelli et al, 2002). Es war daher denkbar, dass IFN- α fördernd auf die DC-Aktivierung einwirken würde. Ein interessanter Unterschied ergab sich in diesem Kontext

aus dem Vergleich der beiden Melanomzelllinien: Das Interferon-induzierbare Protein 1-8U, dem bereits eine Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation in Melanomen zugesprochen wird (Brem et al., 2003) ist in der DC-aktivierenden, IFN- α -resistenten Melanomzelllinie Ma-Mel-18 hoch exprimiert (Abb 3-16 B). Dieses Protein war in der IFN- α -sensitiven Zelllinie UKRV-Mel-15a wenig exprimiert, gehörte aber zu den am stärksten induzierbaren Genen (Abb. 3-16 C). Als Kontrolle für die erfolgreiche Aktivierung der Zellen mit IFN- α ist die Expressionssteigerung der Gene für Interferon-induzierbares 56 kDa-Protein und Interferon-induzierbares 15/17 kDa-Protein sowie MHC I angegeben. Gleichzeitig stieg auch die Expression einiger Hsps nach IFN- α -Gabe an.

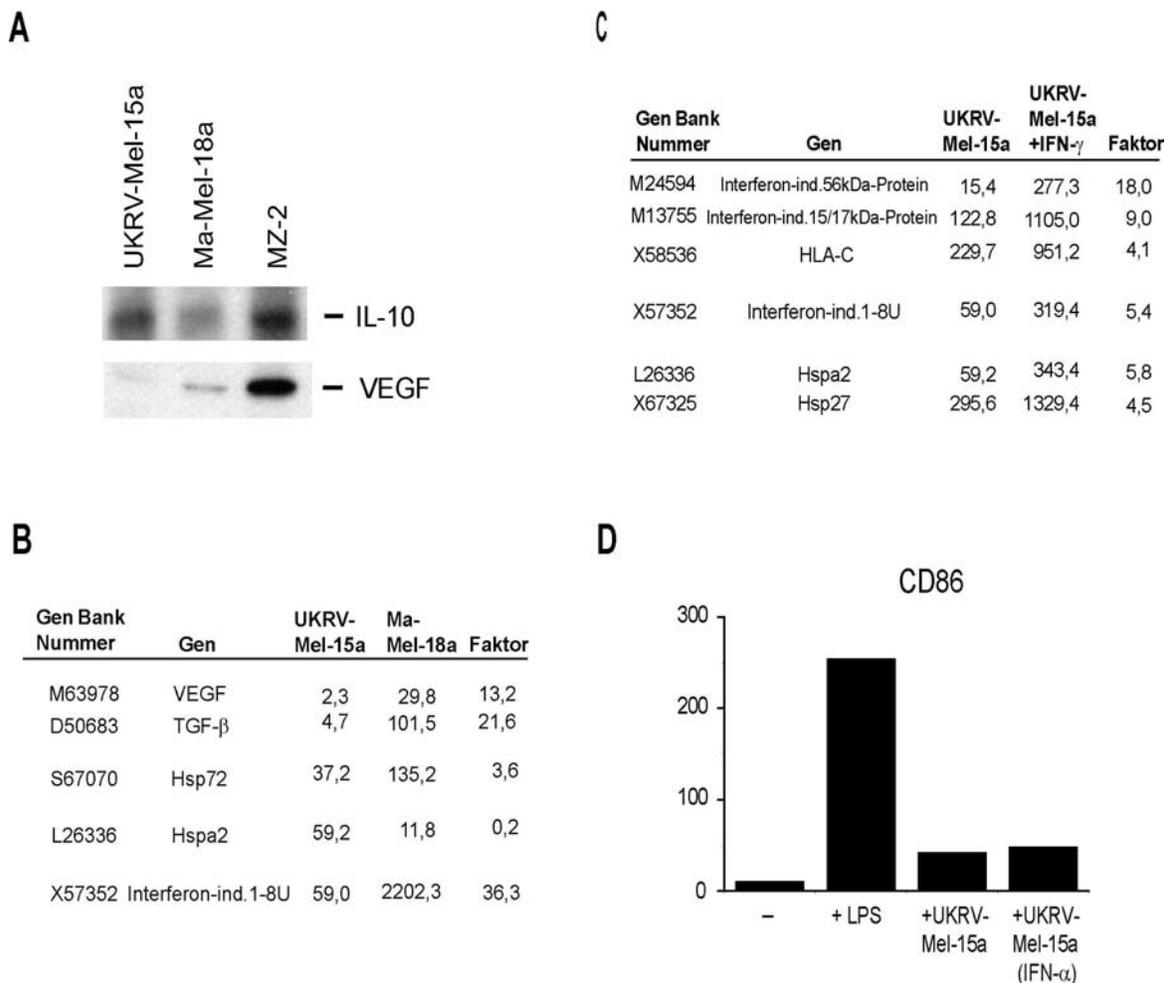


Abb. 3-16: Analyse möglicher, die Maturierung von DCs beeinflussender Faktoren

(A) Melanomzelllinien wurden in 1 % Triton-X-100 lysiert und anschließend die Expression der Proteine IL-10 oder VEGF mittels *Western-blot*-Analyse bestimmt.

(B) Microarray-Analyse der mRNA-Expression möglicher, die Maturierung von DCs beeinflussender Proteine. Die Intensitäten der jeweiligen Gene sind für beide Zelllinien angegeben sowie der Faktor, um den die Expressionsintensitäten in Ma-Mel-18a über den der UKRV-Mel-15a liegen.

(C) Microarray-Analyse der mRNA-Expression vor und nach 48-stündiger Inkubation der Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a mit 100 U/ml IFN- α .

(D) Durchflußzytometrische Analyse der CD86-Expression von DCs ohne Stimulation, nach Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) oder nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen, die zuvor für 48 h mit 100 U/ml IFN- α vorbehandelt wurden.

Es sollte überprüft werden, ob die Vorbehandlung von UKRV-Mel-15a-Zellen mit IFN- α deren DC-Aktivierungspotential anheben würde. Dazu wurden DCs für 24 h mit nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen kokultiviert, die zuvor entweder für 48 h mit IFN- α stimuliert worden waren, oder unbehandelt blieben. Dann wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Es zeigte sich, dass nach IFN- α -Vorbehandlung das DC-Aktivierungspotential von UKRV-Mel-15a nur sehr unwesentlich zunahm (Abb. 3-16 D), gleiches zeigte sich für andere Aktivierungsmarker (Daten nicht gezeigt). Ein Zusammenhang zwischen der DC-Aktivierung und IFN- α -Behandlung von Melanomzellen scheint zumindest für den hier untersuchten Fall nicht zu bestehen.

Auch nach Transfektion der Zellen mit Semliki Forest Viren, die das Gen für 1-8U trugen, konnte das Aktivierungspotential nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Gründe, weshalb die nekrotischen Melanomzelllinien UKRV-Mel-15a und Ma-Mel-18a so unterschiedliche Fähigkeiten aufweisen, die DC-Maturierung zu induzieren, bleiben vorerst offen und müssen durch breitere Analysen systematisch angegangen werden.

3.2.2.3 Aus nekrotischen Melanomzellen freigesetzte Antigene kompetieren mit Peptiden um die Bindung an HLA-DR

Es sollte als nächstes untersucht werden, inwieweit verschiedene Präparationen der MHC II-negativen Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a in Gegenwart von TNF- α , Antigen auf HLA-DR-Moleküle von DCs übertragen würden. Um dies zu untersuchen wurde ein sogenannter Kompetitionsassay durchgeführt: DCs wurden mit den Reporterpeptiden Bio-HA(307-319) und Bio-TT(829-843) sowie TNF- α in Gegenwart oder Abwesenheit von gleichen Mengen an lebenden, apoptotischen oder nekrotischen Melanomzellen für 24 h inkubiert. Eine Abnahme in der Bindung der Reporterpeptide an HLA-DR war dabei ein Indiz für das Vorliegen kompetierender, aus den Melanomzellen freigesetzter Antigene. Als Positivkontrolle diente das Antigenpeptid Annexin(208-223). Wie Abbildung 3-17 A zeigt, führte die Ko-Inkubation mit lebenden und apoptotischen Melanomzellen nur zur schwachen Konkurrenz mit den Reporterpeptiden, Kokultur mit nekrotischen Tumorzellen hingegen zu deutlicher Konkurrenz. Dies konnte auch mit anderen nekrotischen Zelllinien gezeigt werden (Abb. 3-17 B). Um auszuschließen, dass eventuell aus nekrotischen Zellen freigesetzte Proteasen mit den Reporterpeptiden interferieren und auf diese Weise eine Peptidkonkurrenz zustande käme, wurde die Inkubation mit nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen in Gegenwart von Protease-Inhibitoren durchgeführt. Abbildung 3-17 C zeigt, dass die Protease-Inhibitoren keinerlei Einfluß auf die Resultate des Kompetitionsassays zeigten, sodass man schlussfolgern kann, dass die Tumorzell-Nekrose mehr Antigene für die Bindung an MHC II freisetzt als Tumorzell-Apoptose. Zusammenfassend mit den Ergebnissen aus Abb. 3-4 lässt sich schließen, dass die Kokultur von DCs mit präferentiell nekrotischen Zellen in einer sehr frühen Phase der Maturierung und in Gegenwart eines Maturierungsstimulus den effizientesten Transfer von Antigenen auf MHC II-Moleküle von DCs erlaubt.

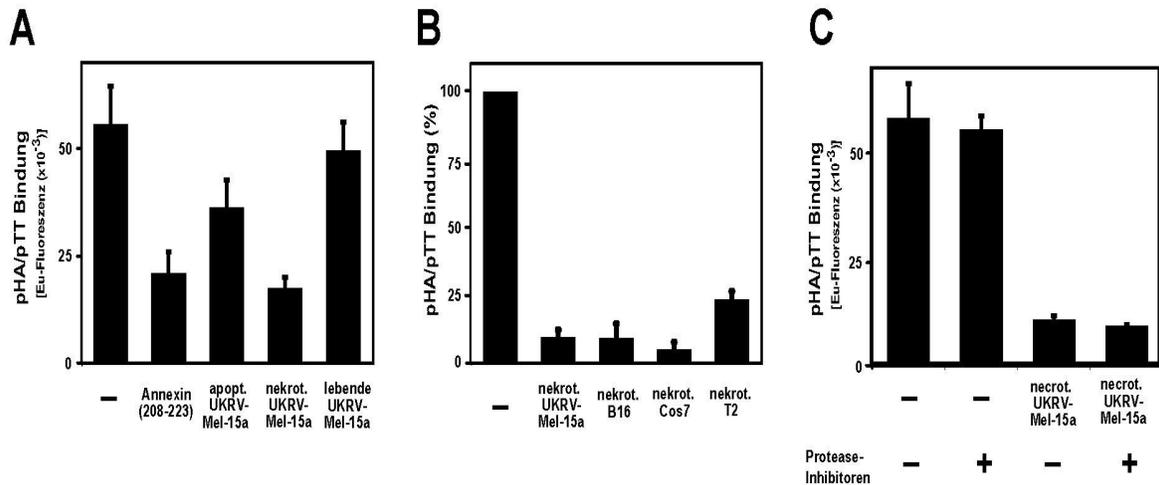


Abb. 3-17: Konkurrenz der von nekrotischen Zellen freigesetzten Antigene mit der Peptidbindung an HLA-DR

(A) DCs wurden mit je 5 μ M Bio-HA(307-319) und Bio-TT(829-843) im Beisein von apoptotischen, nekrotischen oder lebenden UKRV-Mel-15a-Zellen (DCs:UKRV-Mel-15a = 1:1) oder 40 μ M Annexin(208-223) für 24 h unter gleichzeitiger Gabe von $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert. Anschließend wurden die HLA-DR-Moleküle isoliert und die Menge gebundener Reporterpeptide über ELISA quantifiziert.

(B) Verschiedene nekrotische Zelllinien wurden mit pHA/pTT und DCs im Verhältnis von 3:1 kultiviert und gebundene Peptide wie oben quantifiziert.

(C) DCs wurden mit nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen wie in B) kultiviert, jedoch in Anwesenheit oder Abwesenheit eines Gemisches aus fünf Protease-Inhibitoren.

3.2.2.4 Epitope aus HLA-A2 von Melanomzellen können auf HLA-DR1-Moleküle dendritischer Zellen übertragen werden.

Um den Transfer eines spezifischen Antigens aus Tumorzell-Präparationen auf MHC II-Moleküle von DCs direkt zu untersuchen und die Menge entstehender MHC II-Antigen-Komplexe, die auf diese Weise entstehen, zu quantifizieren, wurde folgendes System entwickelt: Wie bereits zuvor beschrieben (Abschnitt 3.1.5), bildet das Epitop A2(103-117) des HLA-A2-Proteins mit DR1-Molekülen DR1:A2(103-117)-Komplexe, die sich spezifisch mit dem mAk UL-5A1 identifizieren lassen. HLA-A2 sollte daher als Modell-Tumorantigen dienen und die Bildung von DR1:A2(103-117)-Komplexen auf DR1-positiven, HLA-A2 negativen DCs nach Inkubation mit unterschiedlichen Präparationen der HLA-A2-positiven, MHC II-negativen Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a quantifiziert werden. Apoptotische und nekrotische UKRV-Mel-15a Zellen wurden dazu mit DCs für 24 h mit $\text{TNF-}\alpha$ kokultiviert und dann die Neo-Expression der DR1:A2(103-117)-Komplexe auf den DCs mittels FACS-Analyse quantifiziert. Parallel dazu wurden UKRV-Mel-15a-Zellen vor der Induktion von Apoptose oder Nekrose für 48 h mit $\text{IFN-}\gamma$ (250 U/ml) vorbehandelt, so dass die Expression von HLA-A2 auf den Melanomzellen gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wie

Abbildung 3-18 A zeigt, führte die Kokultur mit nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen zu einer deutlichen Neo-Expression von DR1:A2(103-117)-Komplexen auf der Zelloberfläche von DCs. Diese konnte noch gesteigert werden, wenn die Melanomzellen zuvor mit IFN- γ behandelt wurden. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung apoptotischer Zellen als Antigenquelle kaum zur Neo-Expression des MHC II-Antigen-Komplexes und nach IFN- γ -Vorbehandlung nur zu einer kleinen Zahl dieser Komplexe. Die Verwendung der HLA-A2 negativen murinen Zelllinie B16, die als Negativkontrolle eingesetzt wurde, führte erwartungsgemäß auch nach IFN- γ -Vorbehandlung nicht zur Expression von DR1:A2(103-117)-Komplexen auf DCs (Abb. 3-18 B). Tabelle 3-4 zeigt die Quantifizierung der MHC II-Antigen-Komplexe, die nach Aufnahme des Antigens aus den Tumorzellen auf den DCs präsentiert wurden. Als Kalibrierungsstandard diente dabei die HLA-A2⁺, HLA-DR1⁺-B-Zelllinie Jutthom, die ca. $5 \cdot 10^5$ endogene DR1:A2(103-117)-Komplexe exprimiert (Kropshofer et al., 2002).

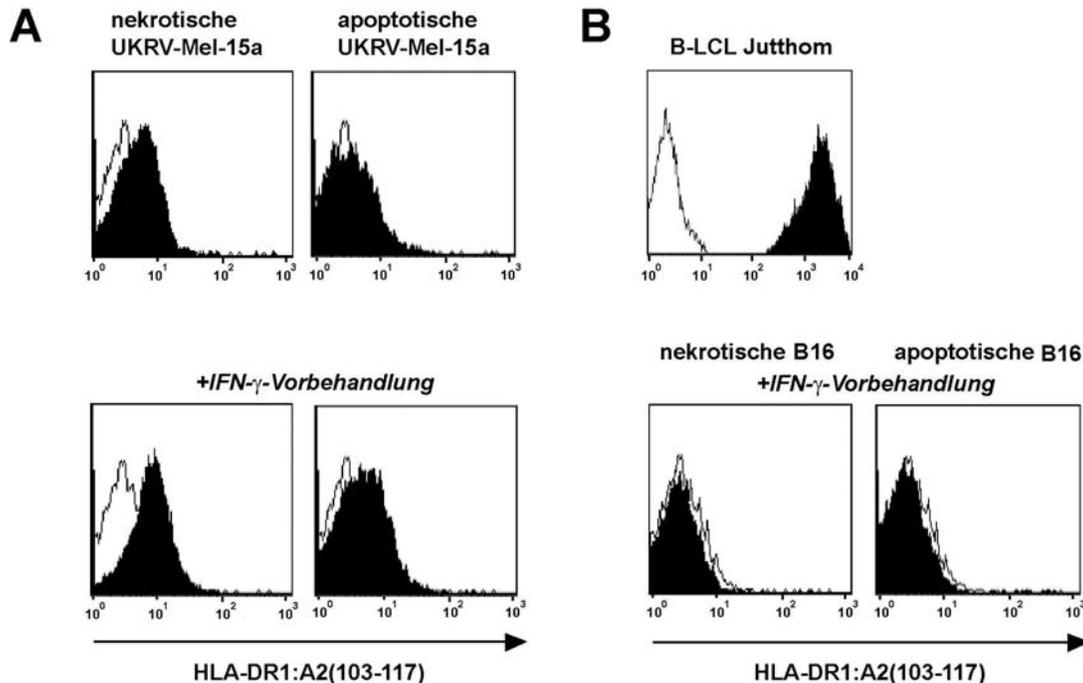


Abb. 3-18: DCs präsentieren HLA-DR1-Epitope aus HLA-A2, das aus nekrotischen Melanomzellen stammt.

(A) FACS-Analyse von DCs, die mit TNF- α (10 ng/ml) und nekrotischen oder apoptotischen UKRV-Mel-15a Zellen (Verhältnis DCs : Melanomzellen = 1:3) kokultiviert wurden. Die Melanomzellen waren zuvor für 48 h mit IFN- γ (250 U/ml) vorbehandelt worden (untere Histogramme) oder blieben unbehandelt (obere Histogramme). Weiße Histogramme zeigen Isotyp-Kontrollantikörper, schwarze Histogramme die Färbung mit dem mAk UL-5A1, spezifisch für DR1:A2(103-117).

(B) FACS-Analyse von DCs, die mit IFN- γ vorbehandelten nekrotischen oder apoptotischen Zellen der HLA-A2 negativen murinen Melanomzelllinie B16 kokultiviert wurden (untere Histogramme).

Die HLA-A2⁺, HLA-DR1⁺ B-LCL Jutthom, die hohe Mengen an endogenem DR1:A2(103-117)-Komplexen exprimiert (ca. 50 % am Gesamt-HLA-DR) wurde als Kalibrierungsstandard verwendet (oberes Histogramm).

Mit Hilfe dieses Kalibrationsstandards und der mit dem mAk UL-5A1 durchflusszytometrisch bestimmten mittleren Fluoreszenz-Indizes (MFI), ließ sich auf diese Weise die Zahl der nach Kokultur mit verschiedenen UKRV-Mel-15a Präparationen auf DR1-Moleküle von DCs aufgeladenen A2(103-117)-Epitope ungefähr bestimmen. Sie lag für nekrotische UKRV-Mel-15a-Zellen bei ca. 500 und nach IFN- γ -Vorbehandlung bei fast 2000. Für apoptotische UKRV-Mel-15a-Zellen hingegen bei weniger als 100 und nach IFN- γ -Vorbehandlung bei etwa 600. Die Steigerung der DR1:A2(103-117)-Präsentation nach IFN- γ -induzierter Erhöhung der HLA-A2-Expression in Melanomzellen zeigt, dass das Angebot an Antigen die Antigenpräsentation limitiert und nicht die Prozessierungskapazität der DCs.

Mit diesem Experiment konnte der Transfer eines Epitops eines in Tumorzellen exprimierten Proteins auf MHC II-Moleküle von DCs direkt visualisiert werden. Die Verwendung des Antikörpers UL-5A1 erlaubte dabei den direkten quantitativen Vergleich der Transfer-Effizienz für den Einsatz apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen als Antigenquelle. Für das untersuchte Epitop A2(103-117) sind nekrotische Tumorzellen ein effizienterer „Antigenlieferant“ als apoptotische, was die Ergebnisse aus Abbildung 3-17 bestätigt, in denen sich nekrotische Zellen als effektivere Konkurrenten der Reporterpeptide erwiesen. Es sollte daher im folgenden überprüft werden, ob sich die für das A2(103-117)-Peptid erzielten Ergebnisse auch auf andere Antigene übertragen lassen.

Tabelle 3-4: Anzahl gebildeter DR1:A2(103-117)-Komplexe nach Kokultur von DCs mit UKRV-Mel-15a-Zellen

reife DCs ^a	MFI ^b	n ^c
-	2,96	0
+ nekrotische UKRV-Mel-15a	4,48	546
+ nekrotische UKRV-Mel-15a (+IFN- γ)	8,08	1840
+ apoptotische UKRV-Mel-15a	3,20	86
+ apoptotische UKRV-Mel-15a (+IFN- γ)	4,76	611
+ nekrotische Kontrolle (+ IFN - γ)	2,82	0
+ apoptotische Kontrolle (+ IFN- γ)	2,62	0
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
B-LCL Jutthom	2389,89	500 000

^a DCs wurden mit TNF- α und verschiedenen Präparationen von UKRV-Mel-15a-Zellen kokultiviert.

^b Der mittlere Fluoreszenz-Index (MFI) wurde mit dem mAk UL-5A1 durchflusszytometrisch bestimmt.

^c Die Zahl (n) der DR1:A2(103-117)-Komplexe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n(x)=(MFI(x)-2,96)500000/(2389,9- 2,96)$$

Die Zahl der DR1:A2(103-117)-Komplexe in Jutthom-Zellen beträgt ca. 500000 (Kropshofer et al. 2002).

3.2.2.5 Veränderungen im HLA-DR-Peptidrepertoire von DCs durch nekrotische Tumorzellen

Es war somit als nächstes die Frage zu klären, ob die in Abbildung 3-17 und 3-18 gezeigte Übertragung von Antigenen auf HLA-DR-Moleküle von DCs durch nekrotische Zellen auch Veränderungen im HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoire hervorrufen würde. Dazu wurden DCs mit TNF- α sowie lebenden, apoptotischen oder nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen kokultiviert, und die HLA-DR-assoziierten Peptide isoliert.

Wie die MALDI-MS-Analyse zeigt (Abb. 3-19) führte die Präsenz lebender und apoptotischer Zellen nur zu leichten Veränderungen im Peptidrepertoire. Kokultur mit nekrotischen Zellen hingegen induzierte zwei dominante neue Peptidsignale (1: $m/z = 1681,1$; 2: $m/z = 1792,8$), von denen das eine in keinem anderen Peptidrepertoire auftauchte ($m/z = 1681,1$). Die Masse dieser Peptide entspricht der typischen Länge von MHC II-Peptiden.

Auch die Analyse der Peptidrepertoires deutete also darauf hin, dass der Einsatz nekrotischer Zellen für den effizienten Peptidtransfer am geeignetsten ist. Zudem scheinen die auf DCs übertragenen Peptide für den nekrotischen Zelltod spezifisch zu sein.

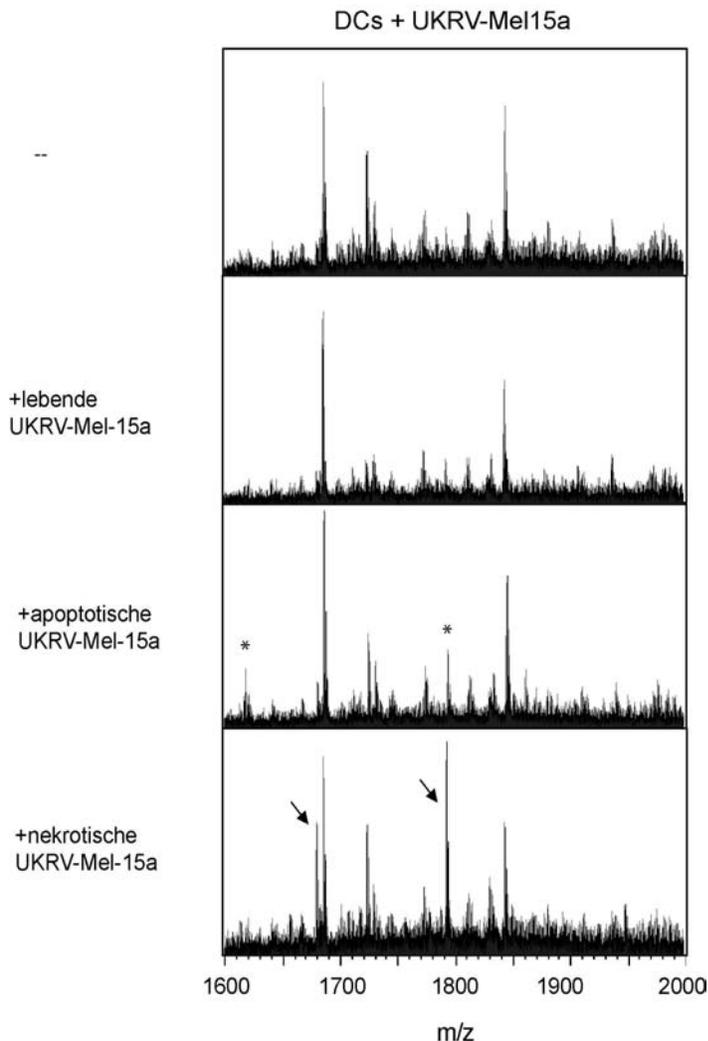


Abb. 3-19: Veränderungen im HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoire nach Kokultur mit Tumorzellen.

DCs wurden im Verhältnis von 1:3 mit unterschiedlichen Präparationen an UKRV-Mel-15a-Zellen in Gegenwart von TNF- α (10 ng/ml) für 24 h kultiviert und HLA-DR-assoziierte Peptide eluiert. Veränderungen des Peptidrepertoires im Bereich $m/z = 1600-2000$ sind dargestellt. Sterne markieren neue Signale nach Inkubation mit apoptotischen Zellen, Pfeile zeigen Veränderungen nach Inkubation mit nekrotischen Zellen.

3.2.2.6 Überstände nekrotischer Melanomzellen induzieren die Expression von Neo-Antigenpeptiden auf DCs

Apoptose und Nekrose sind fundamental verschiedene Arten des Zelltodes. Während bei der Apoptose der Zellinhalt in Form von kleinen apoptotischen Vesikeln kontrolliert freigesetzt wird, kommt es bei der Nekrose zum unkontrollierten Zerreißen der Zellmembran und zur Freisetzung des Zellinhaltes in den Zellkulturüberstand. Folglich sollte die Art und Menge der nach Nekrose und Apoptose freigesetzten Moleküle, die dann von DCs aufgenommen werden können, unterschiedlich sein. Es wurden daher statt ganzer Zellen Überstände von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen auf DCs gegeben und im HLA-DR-Peptidrepertoire nach neuen Antigenepitopen gesucht (Abb. 3-20). Wie schon zuvor nach Verwendung ganzer Zellen beobachtet, führte auch der Einsatz von Zellüberständen zu neuen Antigenepitopen im Peptidrepertoire. Während die DC-Peptidrepertoires nach Inkubation mit apoptotischen und lebenden Zellen sich sehr glichen, führte die Inkubation mit nekrotischen Überständen wieder zu dominanten neuen Peptidspezies (markiert mit Pfeilen), die in keinem anderen Peptidspektrum detektierbar waren.

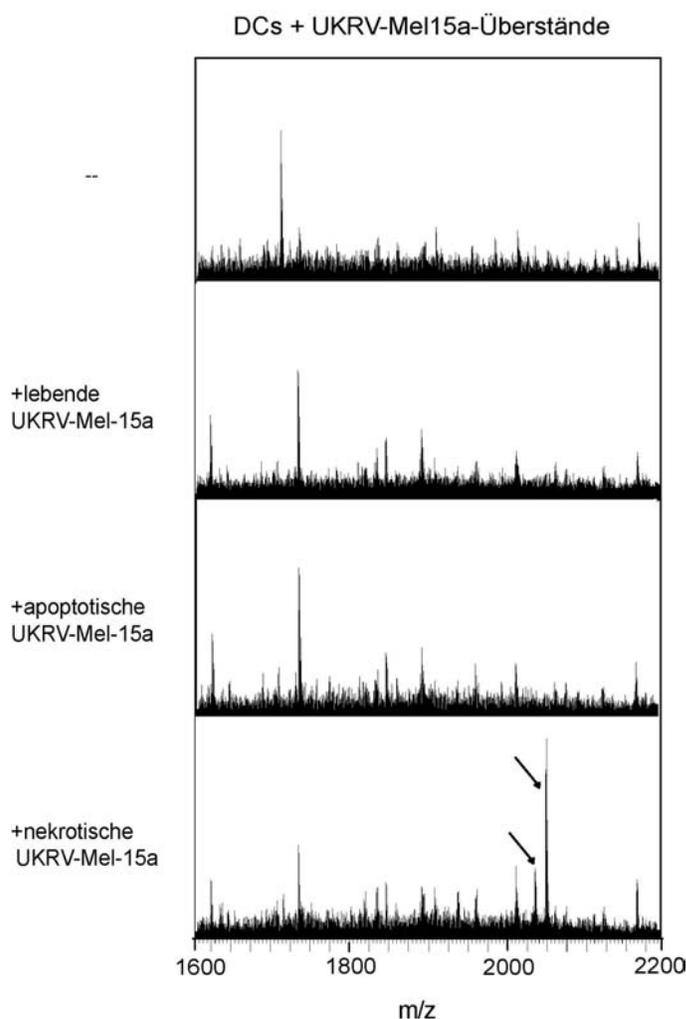


Abb. 3-20: Veränderungen im HLA-DR-Peptidrepertoire von DCs nach Inkubation mit Überständen von Melanomzellen.

DCs wurden im Verhältnis von 1:6 mit Überständen von nekrotischen, apoptotischen oder lebenden UKRV-Mel-15a-Zellen und TNF- α (10 ng/ml) für 24 h kultiviert und dann die HLA-DR-assoziierten Peptide eluiert. Die mit Pfeilen markierten neuen Peptidpeaks haben Massen von $m/z = 2039,8$ und $m/z = 2054,8$.

Die Ergebnisse dieser Analyse bestätigten also, dass Zellnekrose Antigene in den Zellüberstand freisetzt, die für diese Art des Zelltodes spezifisch sind, da sie durch Apoptose nicht generiert werden. Apoptose und Nekrose unterscheiden sich damit also nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ in ihrer Fähigkeit, Antigene auf MHC II-Moleküle von DCs zu übertragen. Die Gründe für diese Unterschiede sollten im folgenden näher beleuchtet werden.

3.2.2.7 Hsp70/Hsc73-Proteine aus nekrotischen Melanomzellen binden an MHC II-Peptide.

Im Gegensatz zum apoptotischen Zelltod geht Zellnekrose mit der Freisetzung von Hitzeschock-Proteinen einher (Basu et al., 2000). Es ist gezeigt worden, dass Hsps wie z.B. Hsp70, Hsp90, gp96 und Calnexin mit MHC I-restringierten Tumorantigen-Peptiden assoziiert sind (Ishii et al., 1999). Hsps können als Chaperone für diese Peptide dienen und sind an deren Übertragung auf MHC I-Moleküle beteiligt (Castellino et al., 2000; Binder et al., 2001). Hsp-Peptid-Komplexe werden effizient von DCs aufgenommen (Binder et al., 2000; Becker et al., 2002), können CD8⁺-T-Zell-Antworten auslösen und werden bei Tumor-Vakzinierungen eingesetzt (Blachere et al., 1997; Tamura et al., 1997; Belli et al., 2002). Die Rolle von Hsps ist im wesentlichen im Kontext der *Cross-Presentation* und Antigenpräsentation auf MHC I-Molekülen untersucht worden. Es gibt jedoch auch einige wenige Beispiele, die ihre Beteiligung am MHC II-Beladungsweg vermuten (Panjwani et al., 1999; Hoeger et al., 1994). Eine mögliche Erklärung für die in Abbildungen 3-17 bis 3-20 gezeigte Überlegenheit nekrotischer Zellen, in ihrer Fähigkeit Antigene auf MHC II-Moleküle von DCs zu übertragen, könnte daher in der Freisetzung von Hsps liegen, welche mit MHC II-Peptiden Hsp-Peptid-Komplexe bilden, die von DCs effizient aufgenommen und präsentiert werden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden unterschiedliche MHC II-Peptide an *Sepharose-Beads* gekoppelt und mit Überständen der nekrotischen Lymphoblast-Zelllinie COX inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* gewaschen und im Immunblot auf möglicherweise gebundenes Hsp70/Hsc73 gefärbt (Abb. 3-21 A). Es zeigte sich, dass einige MHC II-Epitope, wie z.B. das in Abbildung 3-18 untersuchte A2(103-117) aber auch das Tetanus Toxoid-Epitop (829-843) und etwas weniger auch das Autoantigen GAD(114-128) an Hsp70/Hsc73 binden können. *Beads* mit den Peptiden COL(261-273), MBP(87-99) oder TPI(23-37) sowie Tris-Kontroll-*Beads* waren hingegen nicht in der Lage Hsp70/Hsc73 zu präzipitieren. Es hängt also offenbar von der Peptidsequenz ab, welche MHC II-Peptide mit Hsps Komplexe eingehen können. Das A2(103-117)-Epitop, für das die Übertragung auf HLA-DR1 von DCs quantifiziert wurde (Abb. 3-18), ist ein guter Hsp70-Ligand. Um dieses Ergebnis auch auf die zuvor eingesetzten UKRV-Mel-15a-Zellen zu übertragen, wurden daher lebende, apoptotische und nekrotische Melanomzellen generiert. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten Hsps nur im Überstand nekrotischer Zellen detektiert werden (Abb. 3-21 B, Lysatkontrolle).

Folglich konnte auch nur aus dem Überstand nekrotischer Zellen Hsp70/Hsc73 mit A2(103-117)-*Beads* präzipitiert werden, nicht aber aus dem Überstand apoptotischer Zellen. Für das Tetanus Toxoid-Epitop ergaben sich ähnliche Resultate.

Eine mögliche Erklärung für die quantitativen und qualitativen Unterschiede in der Fähigkeit apoptotischer und nekrotischer Zellen, Antigene in den MHC-II-Beladungsweg von DCs zu überführen, könnte also die Freisetzung von Hsps aus nekrotischen Zellen sein. Diese könnten als Chaperone für MHC II-Peptide fungieren und sie, nach Aufnahme über Hsp-Rezeptoren wie CD91 oder TLRs auf der DC-Oberfläche, auf MHC II-Moleküle übertragen.

Die hier gezeigten Experimente legen oben genannte Vermutung nahe, liefern aber noch keinen endgültigen Beweis und müssen daher durch zukünftige Studien untermauert werden.

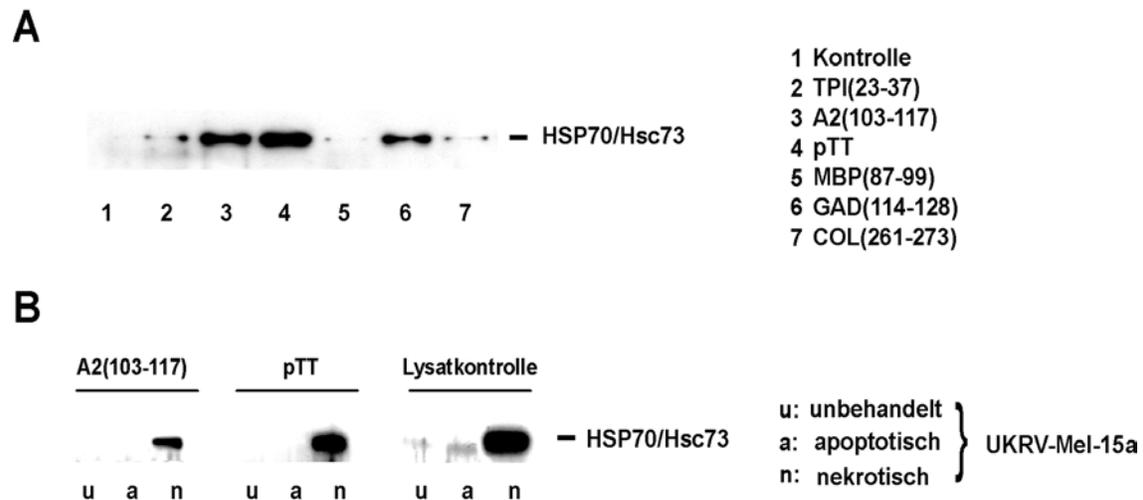


Abb. 3-21: Hitzeschock-Proteine der Hsp 70-Familie binden an bestimmte MHC II-Peptide

(A) Überstände von $6 \cdot 10^5$ nekrotischen B-LCL COX-Zellen wurden mit Triton-X-100 (1% v/v) und Protease-Inhibitoren versetzt und anschließend für 3 h mit den angegebenen, an Sepharose-*Beads* immobilisierten Peptiden inkubiert. Als Kontrolle wurden *Beads* verwendet, die an Tris statt Peptid konjugiert waren. Die Präzipitate wurden anschließend im *Western Blot* mit dem Hsp70/Hsc73-spezifischen Antikörper 1B5 analysiert. (B) Überstände von je $6 \cdot 10^4$ lebenden, apoptotischen oder nekrotischen UKRV-Mel15a-Zellen wurden wie in (A) behandelt und mit immobilisiertem A2(103-117) oder pTT inkubiert. Assoziiertes Hsp 70/Hsc 73 wurde im *Western Blot* detektiert. Als Kontrolle diente der Überstand ohne Inkubation mit Peptid-*Beads* (Lysatkontrolle).

3.2.3 Identifizierung eines durch nekrotische Tumorzellen induzierten Neo-Peptids auf DCs mittels MALDI-PSD-MS

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Kokultur mit nekrotischen Melanomzellen für die Induktion dominanter, neuer Antigenpeptide im HLA-DR-Peptidrepertoire von DCs geeignet ist. Es sollte daher im folgenden versucht werden, diese MHC II-assoziierten Tumorpeptide direkt zu sequenzieren, ähnlich wie es für das Hämagglutinin-Epitop in Abbildung 3-14 gezeigt wurde.

DR4⁺-DCs wurden also wiederum mit nekrotischen UKRV-Mel15a-Zellen und TNF- α für 24 h inkubiert und anschließend eine MALDI-Analyse der HLA-DR-assoziierten Peptide durchgeführt. In dem in Abbildung 3-22 gezeigten Beispiel führte die Inkubation mit nekrotischen Melanomzellen zur Induktion eines neuen dominanten Peptidsignals mit der Masse $m/z = 1820,91$ (Abb.3-22 A). Das Fragmentationsmuster dieses Peptids wurde durch PSD-Messung aufgezeichnet, das entstehende Fragmentspektrum mit Hilfe der Programme Xmas und Biotools (Bruker) interpretiert und das Peptid mittels Mascot-Suchalgorithmus identifiziert. Aufgrund der Komplexität der eluierten MHC II-Peptide war die Massenselektion für die PSD-Analyse schwierig, weshalb die Probe zusätzlich über Nano-HPLC vorfraktioniert und dann die Fraktion, welche die zuvor exakt bestimmte Masse von 1820,91 enthielt, für die PSD-Analyse benutzt wurde (s. Material und Methoden 2.4.2). Abbildung 3-22 B zeigt das Fragmentspektrum mit den annotierten Ionen der b- und y-Serie, das eine eindeutige Identifizierung des Epitops Vimentin(202-217) mit der Sequenz TLQSFRQDVNDNASLAR zuließ. Zur Verifizierung wurde die Probe auch mittels LC-MS/MS-Messung per *Iontrap*-MS gemessen. Auch hier wurde das Fragmentspektrum für das Peptid mit der Masse 1820,9 über den SEQUEST Algorithmus demselben Vimentinepitop zugeordnet. Das mit der *Iontrap*-MS erhaltene Fragmentspektrum ist in Abbildung 3-22 C dargestellt. Die hervorgehobenen Aminosäuren des identifizierten Epitops sind die vermutlichen Ankeramino-säuren für die Bindung an HLA-DR. Das Bindungsmotiv ist ein für den Haplotyp HLA-DR4 (DRB1*0401) typisches Motiv (P1-Anker: W, Y, F, I, L, V; P4-Anker: D, E; P6-Anker: T, S, A; P9-Anker: A, S, G). Dies macht in Anbetracht der Tatsache, dass für dieses Experiment HLA-DR4⁺ DCs verwendet wurden, Sinn. Die HLA-DR-Bindungseigenschaften des Peptides konnten auch experimentell bestätigt werden (s. Abb. 3-25).

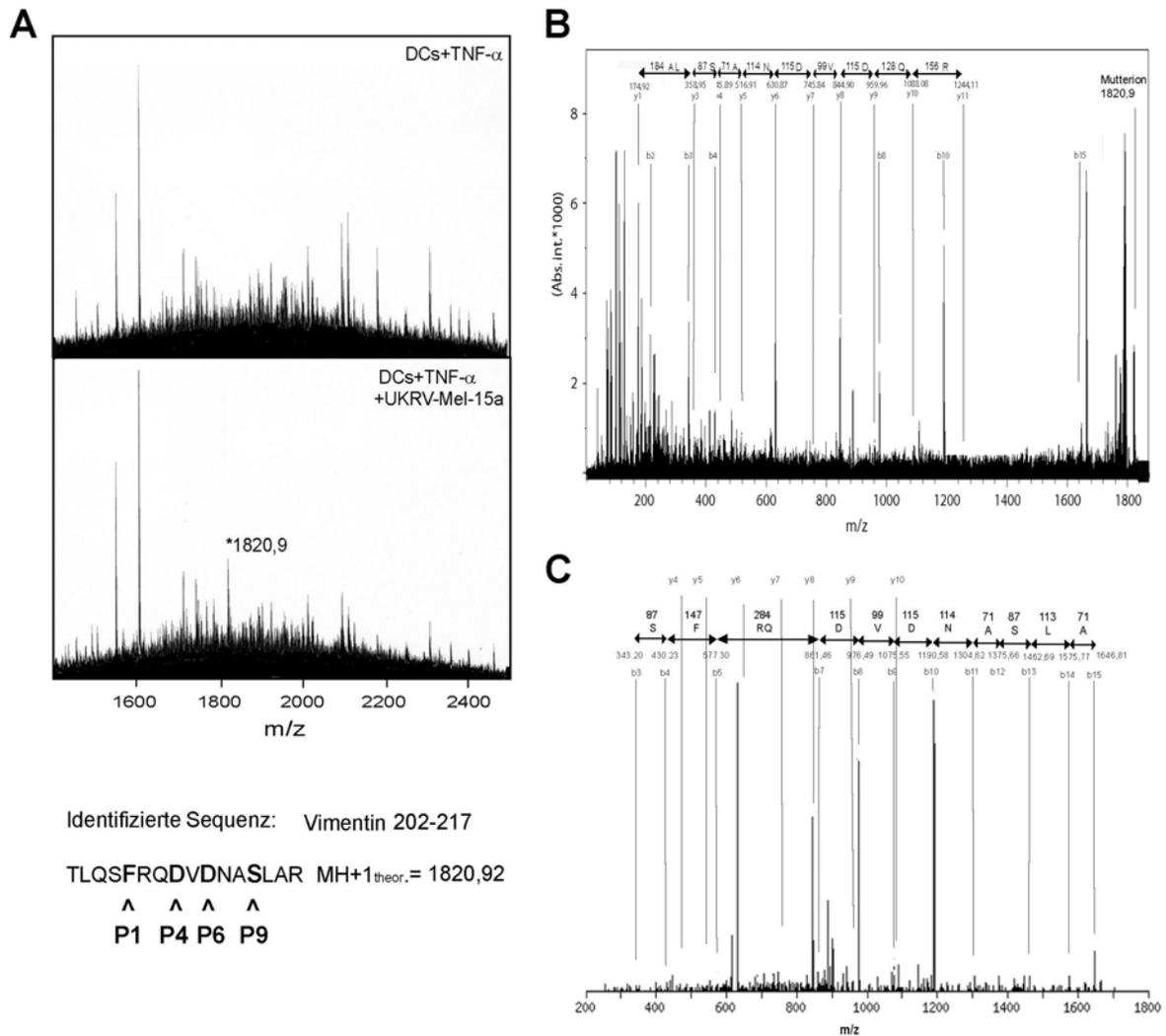


Abb. 3-22: Identifizierung eines durch nekrotische Tumorzellen induzierten Neo-Antigens auf HLA-DR-Molekülen reifer DCs

(A) DCs wurden mit TNF- α (10 ng/ml) und nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen (DCs:UKRV-Mel-15a = 1:3) für 24 h inkubiert, anschließend HLA-DR-assoziierte Peptide isoliert und mittels MALDI-MS analysiert. Der annotierte Peak, der nur in Gegenwart von UKRV-Mel-15a-Zellen auftauchte, hat eine Masse von $m/z = 1820,91$.

(B) MALDI-PSD-MS-Analyse des Peptids mit der selektierten Mutterionen-Masse $m/z = 1820,91$. Gekennzeichnet sind die Ionen der b- und y-Serien sowie die aus der y-Serie ablesbare Sequenz. Immoniumionen, sowie Nebenfragmentierungen, die aber vom Mascot Suchalgorithmus auch zur Identifizierung der Sequenz verwendet wurden, sind nicht annotiert.

(C) *Ion-Trap*-MS-MS-Spektrum für das Peptid mit $m/z = 1820,9$. Die Ionen der b- und y-Serien sind annotiert und die Aminosäuren der b-Serie dargestellt. Die Identifizierung des Peptids erfolgte über den SEQUEST-Suchalgorithmus.

Die Aminosäure-Sequenz des identifizierten Peptids mit den hervorgehobenen potentiellen Ankeramino-säuren für die Bindung an MHC II. P1, P4, P6, P9 = 4 Ankeramino-säuren für die Interaktion mit den Bindungstaschen (P = *pockets*) in der HLA-DR-Peptidbindungsgrube.

3.2.4 Identifizierung neuer MHC II-assoziierter Tumorantigen-Kandidaten durch komparative Peptidsequenzierung Melanomzell-gepulster und ungepulster DCs

Zwar konnte in den vorangehenden Experimenten gezeigt werden, dass nekrotische Tumorzellen neue HLA-DR-Peptidsignale im MALDI induzieren und diese auch identifiziert werden konnten, es war aber anzunehmen, dass durch die Verwendung nekrotischer Tumorzellen als Antigenquelle eine Reihe von neuen Peptiden auf HLA-DR-Moleküle von DCs gelangen würden. Aufgrund der hohen Komplexität der HLA-DR-Peptidmischung und der hieraus resultierenden Signalsuppression können im MALDI aber nur die dominantesten Peptide detektiert werden. Um neue tumorassoziierte MHC II-Epitope durch direkte massenspektrometrische Analyse identifizieren zu können, war es folglich notwendig, eine MS-Methode mit höherem Auflösungsvermögen anzuwenden. Die Peptide Melanomzell-gepulster DCs sollten daher mittels LC-MS/MS nach dem *Mudpit*-Verfahren (s. 2.4.3) sequenziert werden, so wie es für die Identifizierung der Selbstpeptide unreifer und reifer DCs in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde. Durch die Subtraktion der HLA-DR-assozierten Peptide ungepulster DCs von denen der DCs, die mit nekrotischen Melanomzellen kokultiviert wurden, sollte daher die Identifikation von Tumorantigen-Kandidaten möglich sein (Abb. 3-23).

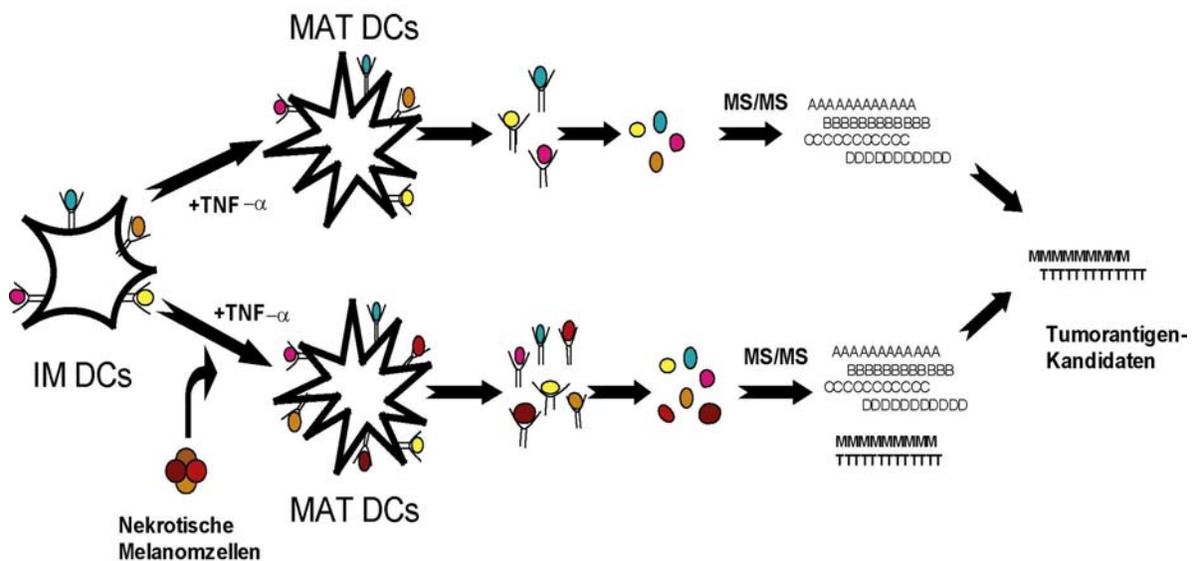


Abb. 3-23: Vorgehensweise zur Identifizierung tumorassoziierter MHC II-Peptide

3.2.4.1 Sequenzierung des HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoires von DCs (DRB1*0101/DRB1*04011) in Anwesenheit und Abwesenheit nekrotischer Ma-Mel-18a-Zellen.

Die Ergebnisse einer solchen komparativen Analyse des Peptidrepertoires sind im folgenden dargestellt: Es wurden $4 \cdot 10^6$ DCs mit dem zuvor bestimmten Haplotyp DRB1*0101/04011; HLA-A1, -A2, -B27 und -B62 mit $1,2 \cdot 10^7$ nekrotischen Ma-Mel-18a Melanomzellen und TNF- α (10 ng/ml) für 24 h kokultiviert. Als Kontrolle diente die gleiche Menge DCs, die nur mit TNF- α kultiviert wurde. HLA-DR-assoziierte Peptide wurden, wie zuvor beschrieben, isoliert und der 2D-LC-MS/MS-Analyse zugeführt (s. 2.4.3). Aus der ungepulsten Kontrolle konnten aus 87 verschiedenen Proteinen 169 Peptidsequenzen erhalten werden von denen 22 nach Zugabe der nekrotischen Zellen nicht mehr detektierbar waren (Tabelle 3-5). In der Ma-Mel-18a gepulsten Probe konnten 173 Peptide aus 81 Proteinen identifiziert werden. Von 70 dieser 81 Proteine waren auch Epitope in der Kontrolle vorhanden.

Tabelle 3.5: Veränderungen im Peptidrepertoire von DCs nach Puls mit nekrotischen Ma-Mel-18a-Zellen

	Peptide	Proteine ^a	Einzigartige Peptide ^b	Einzigartige Proteine ^b
DCs	169	87	22	17
DCs + nekrotische Ma-Mel-18a	173	81	15	11

^a Anzahl der Proteine aus denen die Peptidsequenzen identifiziert wurden

^b Anzahl der Peptide bzw. Proteine die entweder nur in Abwesenheit oder nur in Anwesenheit von nekrotischen Ma-Mel-18a-Zellen gefunden wurden.

Die Epitope von 11 Proteinen waren allerdings nicht in der Kontrolle detektierbar und sind insofern mögliche Kandidaten für durch Melanomzellen auf HLA-DR-Molekülen von DCs übertragene Neo-Antigene. Tabelle 3-6 zeigt diese durch Puls mit nekrotischen Melanomzellen induzierten Neo-Epitope: Von den 11 Proteinen waren 6 ubiquitäre Proteine, die auch in dendritischen Zellen exprimiert wurden und für die laut derzeitiger Literatur keinerlei Zusammenhang mit malignen Transformationen oder Tumorzellprogression besteht. Die Proteine TRAIL und TRAIL-R2 sind ebenfalls ubiquitär exprimierte Proteine, die auch von DCs exprimiert werden. Eine Überexpression in Tumorzellen ist für diese Proteine aber beschrieben worden (Zhang et al., 1999; Zhao et al., 1999), sodass sie nach Aufnahme des nekrotischen Tumormaterials von DCs zu neuen Epitopen führen könnten, die zuvor nicht oder nur in sehr geringem Maße von DCs präsentiert wurden und daher im Peptidrepertoire der ungepulsten Kontrollzellen nicht detektierbar waren. Für das Protein TRAIL-R2 konnte mittels FACS-Analyse eine schwache Expression in DCs und eine ca. viermal stärkere Expression in der verwendeten Melanomzelllinie Ma-Mel-18a gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.6: Neo-Antigene auf DCs (DRB1*0101/DRB1*04011) nach Puls mit nekrotischen Ma-Mel-18a Tumorzellen

Protein	Peptidsequenz ^a	Epitop
Melanotransferrin (Melanoma-associated antigen p97) ^b	GQDL <u>L</u> FKD <u>A</u> T <u>V</u> R <u>A</u> VPVG	668-684
HLA-A1 ^c	DGKDY <u>I</u> AL <u>N</u> ED <u>L</u> R <u>S</u> WT	143-158
TRAIL-Rezeptor-2 ^d	DNE <u>I</u> KV <u>A</u> K <u>A</u> E <u>A</u> A <u>G</u> HR	365-379
TRAIL Protein (Apo-2 Ligand) ^d	NDRI <u>F</u> V <u>S</u> V <u>T</u> NE <u>H</u> L <u>I</u> D	253-267
Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1 ^d	TDL <u>Y</u> KL <u>L</u> K <u>T</u> Q <u>H</u> L <u>S</u> NDH	110-125
Inhibitor of NF-κB-Kinase Beta ^e	PNGC <u>F</u> K <u>A</u> L <u>D</u> D <u>I</u> L <u>N</u> LKLV	296-312
Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase ^e	YDNS <u>L</u> K <u>I</u> I <u>S</u> N <u>A</u> S <u>C</u> TTN	139-154
Spannungsabhängiges Anion- selektives Kanalprotein 2 (VDAC-2) ^e	IAAK <u>Y</u> Q <u>L</u> D <u>P</u> T <u>A</u> S <u>I</u> SAK	247-262
Semaphorin 4d (CD100) ^e	SHGK <u>Y</u> M <u>Q</u> <u>S</u> T <u>T</u> V <u>E</u> Q <u>S</u> HT	338-352
Protein Tyrosin Phosphatase Zeta ^e	TNGL <u>Y</u> G <u>K</u> <u>Y</u> S <u>D</u> Q <u>L</u> I <u>V</u> D	393-407
Vakuoläre ATP Synthase S1 ^e	KGS <u>L</u> L <u>V</u> <u>A</u> R <u>T</u> Q <u>P</u> <u>S</u> PWQ	380-394

^a Peptidsequenzen der in der ersten Spalte angegebenen Proteine, die nur in Ma-Mel-18a-gepulsten DCs detektiert werden konnten. Identifizierte Längenvarianten der Epitope sind nicht aufgeführt. Unterstrichen sind die potentiellen Ankeraminoaciden für die Bindung an HLA-DRB1*0101 oder HLA-DRB1*04011.

^b Protein, für das eine melanomspezifische Expression beschrieben wurde. Keine Expression in DCs.

^c Epitop, das nur aus den verwendeten DCs stammen kann, in Abwesenheit von Ma-Mel-18a aber nicht exprimiert wurde.

^d Proteine, die ubiquitär, also auch in DCs exprimiert werden, für die aber Überexpression in Tumorzellen beschrieben wurde oder deren Expression im Kontext maligner Transformationen gesehen wird.

^e Proteine, die ubiquitär exprimiert werden und für die keinerlei Zusammenhang zu Melanomen besteht.

Für TRAIL sowie das an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligte Protein Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1 konnte keine Überexpression in Ma-Mel-18a-Zellen im Vergleich zu DCs beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), sie waren daher für eine weitere Untersuchung uninteressant.

Das einzige Protein, dessen Name bereits auf eine melanomspezifische Expression hindeutete und welches nicht ubiquitär und auch nicht von DCs exprimiert wird (s. Abb. 3-27), war Melanotransferrin (*melanoma-associated antigen p97*). Von diesem Protein konnte das Epitop Melanotransferrin(668-684) sowie die Längenvariante Melanotransferrin(668-683) im Peptidrepertoire Ma-Mel-18a gepulster DCs detektiert werden (MS/MS-Spektrum siehe Abb. 3.24). Wie die anderen in Tabelle 3-5 dargestellten Peptide, enthielt das Melanotransferrin-Epitop ein HLA-DR4 bzw. HLA-DR1 Bindungsmotiv mit L-672, D-675, T-677 und A-680 bzw. F-673, A-676, V-678 und V-681. Bisher sind weder MHC I noch MHC II Epitope von Melanotransferrin identifiziert worden. Das hier sequenzierte MHC II-Epitop war daher ein interessanter Kandidat für ein neues Tumorantigenpeptid, weshalb sich die weiteren Untersuchungen auf dieses Epitop konzentrierten.

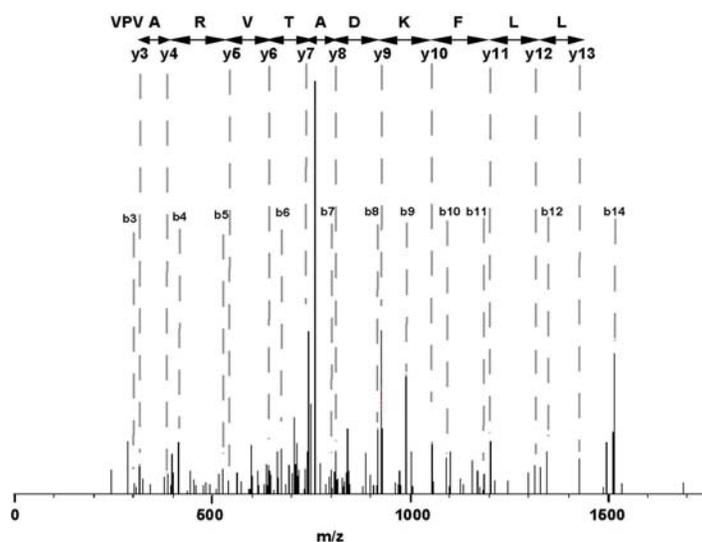


Abb. 3.24: LC-MS/MS-Spektrum von Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃

Ion-Trap-MS-MS-Spektrum für das Peptid mit der Masse $m/z = 1730,2$. Die Ionen der b- und y-Serien sind annotiert und die Aminosäuren der y-Serie dargestellt. Die Identifizierung des Peptids erfolgte über den SEQUEST-Suchalgorithmus.

3.2.4.2 HLA-DR-Bindungseigenschaften der identifizierten Antigenpeptide

Zur Verifizierung der mittels Massenspektrometrie identifizierten DC-Neo-Antigene, sollte zunächst die Fähigkeit dieser Peptide untersucht werden, an unterschiedliche HLA-DR-Typen zu binden. Im folgenden sind Peptidbindungsassays für die identifizierten Epitope Vimentin(202-217) sowie Melanotransferrin(668-684) im Vergleich zu bereits bekannten HLA-DR-restringierten Tumorantigenen gezeigt (Abb. 3-25). Beide Peptide wiesen theoretisch ein gutes HLA-DR4-Bindungsmotiv auf und wurden jeweils im Kontext von DR4-positiven DCs identifiziert, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass sie hohe Bindungsaffinitäten für HLA-DR4 zeigen würden.

Die entsprechenden Peptide wurden daher synthetisiert und mit dem jeweiligen HLA-DR-Isolat (20 nM) und biotinyliertem HA(307-319) (200 nM) als Reporterpeptid in Bindungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM NaCl, pH 4,8, 0,1 % Zwittergent 3-12) gemischt und für 24 h bei 37°C inkubiert.

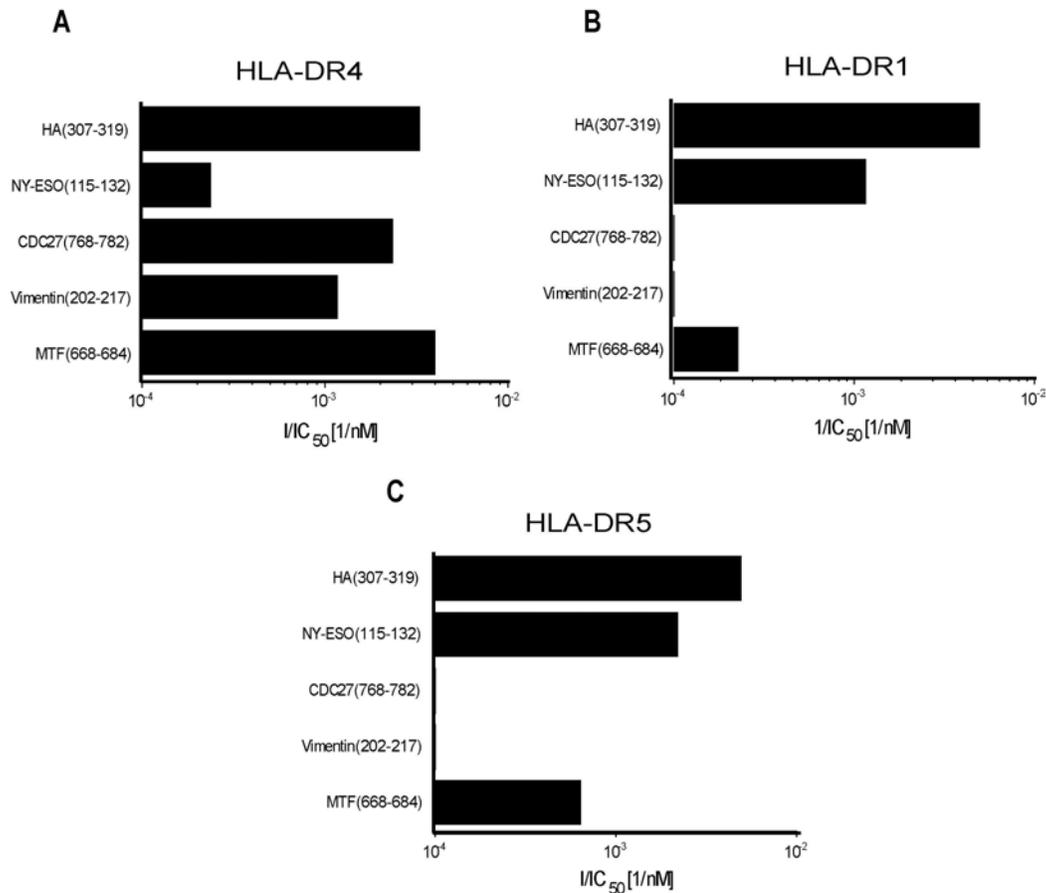


Abb. 3-25: Bindungsaffinitäten von Antigenpeptiden an unterschiedliche HLA-DR-Typen

Die HLA-DR-Bindungsaffinitäten wurden durch einen Kompetitionsassay gemessen. Dazu wurde die Peptidkonzentration der jeweiligen Antigenpeptide bestimmt, die notwendig war, um die Bindung des biotinylierten Reporterpeptids HA(307-319) um 50 % zu reduzieren (IC₅₀). Angegeben ist der reziproke IC₅₀-Wert, der direkt mit der Bindungsaffinität korreliert, für HLA-DR4 (A), HLA-DR1 (B) und HLA-DR5 (C). HA = Hämagglutinin, MTF = Melanotransferrin, NY-ESO = New York-Esophagus-1.

Die Detektion des an HLA-DR gebundenen biotinylierten Reporterpeptids erfolgte mittels *Sandwich*-ELISA (s. 2.3.4.1). Als Vergleichspeptide wurden die Tumorantigene NY-ESO(115-132) (Zarour et al., 2002) und CDC27(768-782) (Wang et al., 1999) eingesetzt.

Es zeigte sich, dass Vimentin(202-217) eine hohe Bindungsaffinität für HLA-DR4 aufwies (Abb. 3-25 A), allerdings kaum mit HLA-DR1 (Abb. 3-25 B) und HLA-DR5 (Abb. 3-25 C) assoziierte. In diesem Verhalten ähnelte es sehr dem mutierten HLA-DR4-restringierten Tumorantigen CDC27, welches ebenso wie Vimentin(202-217) an Ankerposition P4 und P6 ein Aspartat (D) aufweist, was für die Bindung an HLA-DR1 und HLA-DR5 ungeeignet ist.

Melanotransferrin (668-684) zeigte promiskuitivere Bindungseigenschaften: Wie erwartet wies es eine sehr hohe Affinität für HLA-DR4 auf. Für HLA-DR1 und HLA-DR5 waren allerdings auch mittlere Bindungsaffinitäten feststellbar. Die Tatsache, dass das Melanotransferrin-Epitop zwei um eine Aminosäure versetzte HLA-DR-Bindungsmotive aufweist (L-672, D-675, T-677 und A-680 bzw. F-673, A-676, V-678 und V-681) scheint also seine Fähigkeit zu verbessern, an verschiedene HLA-DR-Typen zu binden. Es könnte daher als Peptidvakzin im Kontext von verschiedenen HLA-DR-Allelen einsetzbar sein.

3.2.4.3 Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen durch das identifizierte Epitop Melanotransferrin (668-684)

Die Überprüfung der HLA-DR-Bindungseigenschaften ist eine wichtige Methode zur Verifizierung der identifizierten Peptide und zur Evaluierung ihrer möglichen Einsetzbarkeit als Peptidvakzin. Wichtiger aber noch ist es, die Immunogenizität der identifizierten Peptide zu evaluieren, d.h. ihre Fähigkeit, eine T-Zell-Aktivierung auszulösen.

Für das als neues tumorassoziiertes Helfer-Epitop aussichtsreichste Peptid, Melanotransferrin (668-684), wurde daher das T-Zell-Aktivierungspotential untersucht. Da die Bindungsaffinität des Peptids für HLA-DR4 besonders hoch war, wurden T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Spenders isoliert und mit autologen DCs, die mit Melanotransferrin(668-684) gepulst wurden, stimuliert. Die reaktiven T-Zellen wurden durch 14-tägige Restimulationen in Kultur gehalten (s.2.2.6.2). Nach sechsmaliger Restimulation der T-Zellen wurde die Spezifität der generierten T-Zelllinie bestimmt. Dazu wurden die T-Zellen für 16 h mit DCs kokultiviert, die zuvor für 24 h mit Melanotransferrin(668-684) oder einem Kontrollpeptid beladen wurden und anschließend die in den Überstand sezernierten Cytokine IFN- γ bzw. IL-4 mittels ELISA gemessen (Abb. 3-26 A). Es zeigte sich, dass Melanotransferrin(668-684) eine deutliche Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen auslöste: sie sezernierten IFN- γ (Abb. 3-26 A) und IL-2 (Daten nicht gezeigt). IL-4 wurde nur in sehr geringem Umfang freigesetzt. Subklonierung der reaktiven T-Zelllinie resultierte aber auch in Klonen, die nach Stimulation IL-4 freisetzen (Daten nicht gezeigt). Durch Kontrollpeptid oder ungepulste DCs hingegen liessen sich die T-Zellen nicht stimulieren. Peptid-Titrationen zeigten, dass die Aktivierung der T-Zellen schon durch Konzentrationen von 100 nM ausgelöst werden konnte und starke Dosisabhängigkeit bei der IFN- γ -Freisetzung vorhanden war (Abb.3-26 B).

Sowohl die in Abbildung 3-25 gezeigten HLA-DR-Bindungseigenschaften als auch die in Abbildung 3-26 gezeigte Immunogenizität verifizieren das aus Melanom-gepulsten DCs isolierte Peptid Melanotransferrin(668-684) und unterstreichen seine Relevanz als potentiell immunogenes Antigen für die Vakzinierung gegen Melanotransferrin-exprimierende Tumore.

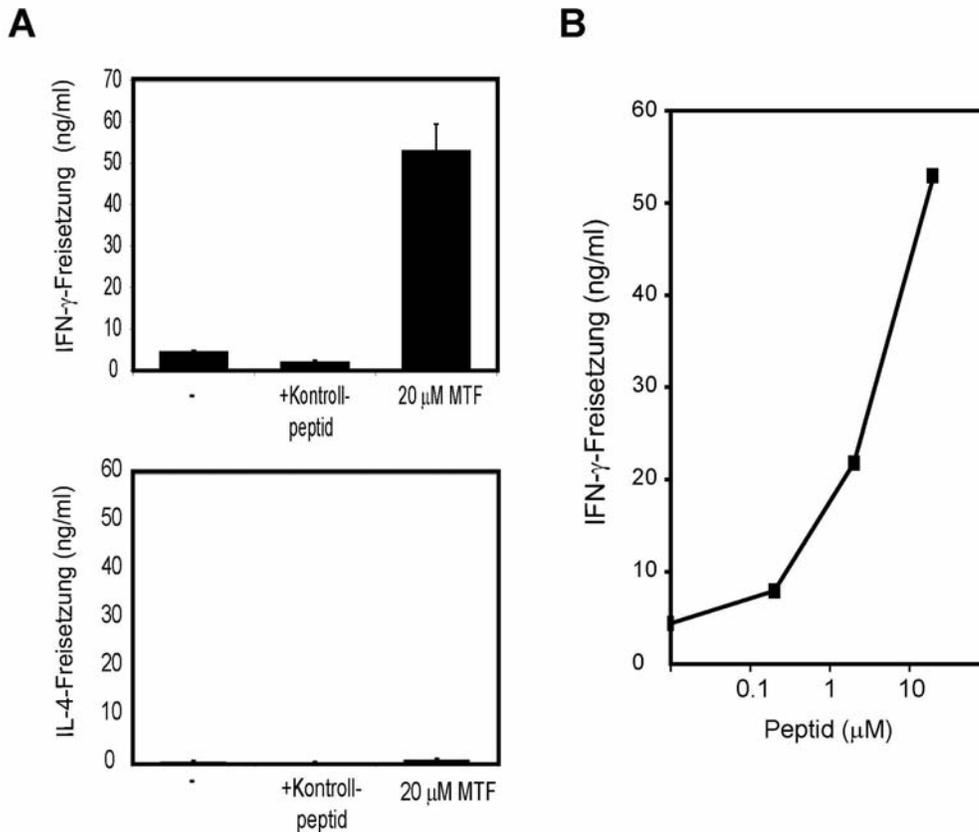


Abb. 3-26: CD4⁺-T-Zell-Aktivierung durch Melanotransferrin(668-684)

(A) CD4⁺-T-Zellen eines HLA-DRB1*0401-positiven Donors durchliefen sechs In-Vitro-Restimulationsrunden mit autologen Melanotransferrin(668-684)-gepulsten DCs. Die Spezifität der T-Zellen wurde getestet, indem autologe DCs mit LPS (1 μ g/ml) alleine (-) oder LPS plus 20 μ M des Kontrollpeptids CLIP(81-105) oder 20 μ M Melanotransferrin (MTF) gepulst und dann im Verhältnis von DCs:T-Zellen = 1:10 für 16 h mit CD4⁺-T-Zellen kokultiviert wurden. Gezeigt ist die Freisetzung von IFN- γ (oberes Diagramm) oder IL-4 (unteres Diagramm). (B) IFN- γ -Freisetzung in Abhängigkeit von der Konzentration an Melanotransferrin(668-684). Gezeigt ist eins von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten.

3.2.4.4 Expression von Melanotransferrin in Melanomzelllinien und Melanom-Biopsien.

Es ist bereits beschrieben worden, dass Melanotransferrin in einer Vielzahl von Melanomen stark exprimiert wird (Brown et al., 1981; Tilgen et al., 1983). Daher wurde die Melanotransferrin-Expressionsrate in eingesetzten Melanomzelllinien sowie DCs überprüft. Melanotransferrin ist ein Zellmembranprotein, welches über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran fixiert ist. Es war daher möglich die Expressionsrate durchflußzytometrisch zu bestimmen. Zur Detektion von Melanotransferrin stand bereits ein Antikörper zur Verfügung, der mAk L235.

Die für die Beladung dendritischer Zellen eingesetzte Melanomzelllinie Ma-Mel-18a zeigte eine starke Expression von Melanotransferrin, die nahezu 60 % der Expressionsrate der

Melanomzelllinie SK-Mel-28a erreichte, in der Melanotransferrin erstmalig beschrieben wurde (Hellstrom et al., 1982) und welche die bis dato höchste beschriebene Expressionsrate aufweist (Abb. 3-27 A). Dendritische Zellen selbst wiesen keine Expression von Melanotransferrin auf. Dies beweist, dass das identifizierte Melanotransferrin-Epitop auf HLA-DR-Molekülen ungepulster DCs nicht präsentiert werden kann, sondern von den nekrotischen Ma-Mel-18a-Melanomzellen auf HLA-DR-Moleküle übertragen wurde. Die anderen untersuchten Melanomzelllinien wiesen teilweise sehr unterschiedliche Expressionsintensitäten an Melanotransferrin auf, waren aber alle positiv.

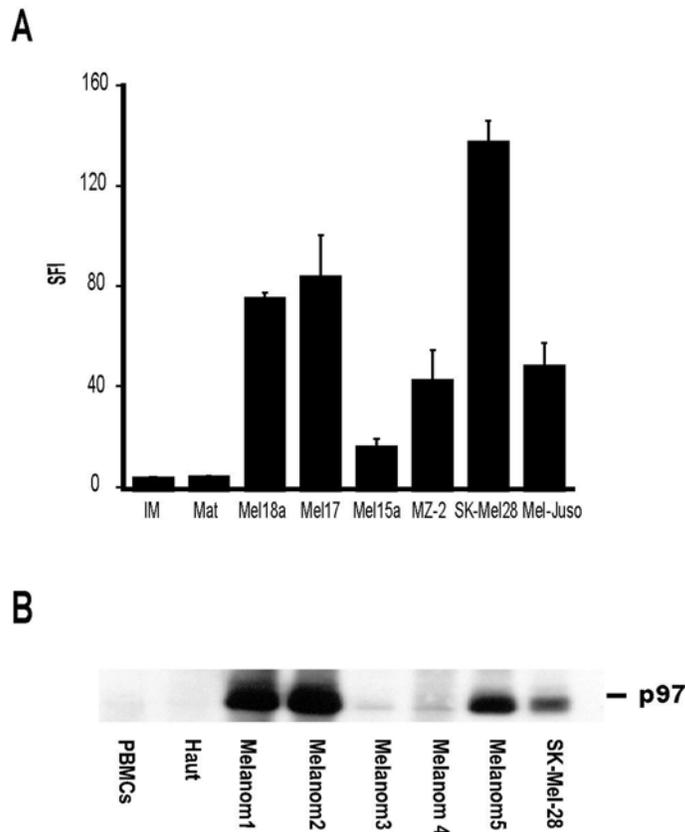


Abb. 3-27: Expression von Melanotransferrin (p97) in verschiedenen Melanomzelllinien und Melanombiopsien.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Melanotransferrin mit Hilfe des mAks L235. Angegeben sind die SFIs-Mittelwerte (MFI des spezifischen Antikörpers geteilt durch MFI der Isotyp-Kontrolle) für alle Zelllinien aus drei unabhängigen Messungen.

(B) *Western blot*-Analyse der Expression von Melanotransferrin in Gewebebiopsien. Die Gewebe wurden in 1 % Triton-X-100 lysiert und die Expression mit Hilfe des mAks L235 überprüft. Gewebeproben wurden gewogen und jeweils gleiche Massen eingesetzt.

Interessanterweise konnte nach Kokultur der in Abschnitt 3.2.4.1 verwendeten DCs (HLA-DRB1*0101/04011) mit nekrotischen Zellen der Melanomzelle UKRV-Mel-15a, die Melanotransferrin in deutlich geringerem Maße exprimiert als Ma-Mel-18a, kein Melanotransferrin-Epitop auf DCs detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt noch einmal die in Abschnitt 3.2.2.4 gemachte Beobachtung, dass die Expressionsrate des Tumorantigens in der Melanomzelllinie der für die Präsentation auf DCs limitierende Parameter ist.

Es sollte auch die Expression von Melanotransferrin in ex-vivo Tumorgewebe untersucht werden. Dazu wurden Melanom-Biopsien von fünf verschiedenen Patienten auf Expression an Melanotransferrin untersucht. Drei der fünf Proben wiesen eine starke Expression auf, zwei waren negativ, wie auch eine als Kontrolle eingesetzte gesunde Hautprobe und PBMCs (Abb.

3-27 B). Auch wenn aufgrund der kleinen Probenmenge keine allgemeingültige Aussage gemacht werden kann, so scheint Melanotransferrin doch eine hohe Prävalenz in Melanomen zu haben und das identifizierte Epitop für den Einsatz in Vakzinen gegen Melanome daher von besonderem Interesse zu sein.

3.2.4.5 Präsentation von Melanotransferrin(668-684) und weiterer potentieller Tumorantigene auf der Melanomzelllinie UKRV-Mel-17.

Die Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 weist eine ähnlich starke Melanotransferrin-Expression auf wie Ma-Mel-18a (Abb. 3-27 A). Im Unterschied zur MHC II-negativen Melanomzelllinie Ma-Mel-18a exprimiert UKRV-Mel-17 aber MHC II und ist HLA-DR4 positiv (DRB1*0401/DRB1*03011). Es ist gezeigt worden, dass MHC II-positive Melanomzellen Epitope von Tumorantigenen auf ihren MHC II Molekülen präsentieren können (Li et al., 1998). Es war daher von Interesse herauszufinden, ob die Melanotransferrin-positive Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 auf ihren HLA-DR-Molekülen Epitope von Melanotransferrin präsentieren würde, zumal das identifizierte Epitop Melanotransferrin(668-684) ja eine ausgesprochen gute HLA-DR4 Bindungsaffinität aufwies. Es wurden dazu ca. 100 µl UKRV-Mel17-Zellpellet in 1 % Triton-X-100 lysiert und die HLA-DR-Moleküle mit mAk L243 isoliert. Die eluierten Peptide wurden dann einer 2D-LC-MS/MS-Messung zugeführt. Insgesamt konnten auf diese Weise 335 Peptidsequenzen aus insgesamt 151 Proteinen bestimmt werden. Interessanterweise war unter diesen Sequenzen exakt das gleiche Melanotransferrin-Epitop(668-684), welches zuvor aus den Ma-Mel-18a gepulsten DCs isoliert werden konnte. Ko-Expression von MHC II und Melanotransferrin in UKRV-Mel-17-Zellen führte also in der Tat zur Präsentation eines Melanotransferrin-Epitops. Tabelle 3-6 zeigt eine Auswahl an HLA-DR-restringierten Epitopen aus einigen der insgesamt 151 verschiedenen Proteine, für die eine spezifische Expression im Kontext von Tumoren beschrieben ist und deren sequenzierte Epitope daher als mögliche MHC II-restringierte Tumorantigene in Frage kommen.

Zwei weitere Proteine MART-1 und GAGE-1 sind bereits als melanomassoziierte Tumorantigene beschrieben worden und es gibt für sie bereits zahlreiche MHC I-Epitope (Renkvist et al., 2001), sowie für MART-1 auch bereits ein HLA-DRB1*0401-Epitop. Die hier identifizierten Peptidsequenzen sind aber bisher nicht beschrieben worden. Die Expression dieser Proteine in der für die Analyse der HLA-DR-assoziierten Peptide eingesetzten Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 konnte mittels *Western blot*-Analyse verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die in Tabelle 3-7 aufgelisteten Epitope mit Ausnahme von Melanotransferrin(668-684) können bisher nur als Kandidaten für mögliche neue HLA-DR-assoziierte Tumorantigen-Peptide angesehen werden, da die Überprüfung ihrer HLA-DR-Bindungseigenschaften sowie ihrer möglichen Immunogenizität noch aussteht.

Die Analyse der HLA-DR-Peptide zeigte, dass Melanomzellen, die MHC II konstitutiv exprimieren, in der Lage sind, tumorspezifische Antigenpeptide zu präsentieren und damit möglicherweise direkt Einfluss auf die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zu nehmen. Ob die Antigenpräsentation aber tatsächlich auch zur Aktivierung von T-Zellen führt, sollte im folgenden überprüft werden.

Tabelle 3-7: HLA-DR (DRB1*0401/DRB1*03011)-assoziierte Peptide der Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 mit möglicher Relevanz als tumorassoziierte CD4⁺-T-Zell-Epitope.

Protein	Peptidsequenz ^a	Epitop
Melanotransferrin (Melanoma-associated antigen p97) ^b	GQDL <u>L</u> FK <u>D</u> AT <u>V</u> R <u>A</u> VPVG	668-684
Melanom-assoziiertes Chondroitinsulfat-Proteoglycan NG2 (HSN tumor-specific antigen) ^c	GPWPQGAT <u>L</u> RL <u>D</u> PT <u>V</u> LD <u>A</u> GEL GPWPQGAT <u>L</u> RL <u>D</u> PT <u>V</u> LD <u>A</u> GE GAT <u>L</u> RL <u>D</u> PT <u>V</u> LD <u>A</u> GEL GPWPQGAT <u>L</u> RL <u>D</u> PT <u>V</u> LD <u>A</u> GELA	2053-2073 2053-2072 2058-2073 2053-2074
Melanom-Antigen erkannt von T- Zellen-1 (MART-1) (Melan-A) ^c	APPAY <u>E</u> K <u>L</u> SA <u>E</u> Q <u>S</u> PPPY APPAY <u>E</u> K <u>L</u> SA <u>E</u> Q <u>S</u> PPP	100-116 100-115
GAGE-1 bzw. GAGE-8 ^c	KTPEEE <u>M</u> RS <u>H</u> Y <u>V</u> AQ <u>T</u> GIL	105-122
NY-REN-45 Antigen ^c	ENGN <u>L</u> GP <u>I</u> QA <u>E</u> V <u>K</u> GATG	686-702
AF-4 Protein (Proto-oncogene AF4) ^c	THR <u>L</u> DA <u>S</u> EN <u>R</u> L <u>G</u> KPKYPLI	77-95
Tenascin (Glioma-associated- extracellular matrix antigen) ^c	SPKEV <u>I</u> FS <u>D</u> I <u>T</u> EN <u>S</u> AT SPKEV <u>I</u> FS <u>D</u> I <u>T</u> EN <u>S</u> ATVS	1711-1726 1711-1728
Matrix Metalloproteinase-14 (MMP-14) (MT-MMP 1) (Membrane-type-1 matrix metalloproteinase) ^c	GDKH <u>W</u> VF <u>D</u> E <u>A</u> S <u>L</u> E <u>P</u> G	384-398
Syntenin 1 (Syndecan bindendes Protein) (Melanoma differentiation associated protein-9) ^c	NPANPAI <u>L</u> SE <u>A</u> SA <u>P</u> I <u>P</u> HDGN ITS <u>I</u> V <u>K</u> D <u>S</u> SA <u>A</u> R <u>N</u> GLL ITS <u>I</u> V <u>K</u> D <u>S</u> SA <u>A</u> R <u>N</u> GL ITS <u>I</u> V <u>K</u> D <u>S</u> SA <u>A</u> R <u>N</u> ITS <u>I</u> V <u>K</u> D <u>S</u> SA <u>A</u> R <u>N</u> GLLT	25-44 218-234 218-233 218-231 218-235

Melanocyten stimulierender Hormon Rezeptor (MSH-R) (Melanotropin receptor) ^d	VILL <u>L</u> LEA <u>G</u> AL <u>V</u> RAAVLQQ	97-115
Mögliches Transmembran Protein NMB (Transmembrane glycoprotein HGFIN) ^d	VPIAQ <u>V</u> KD <u>V</u> Y <u>V</u> VDQIPVFVTMFQKN SSDET <u>F</u> LK <u>D</u> L <u>P</u> IM <u>F</u> DVLIHD SDET <u>F</u> LK <u>D</u> L <u>P</u> IM <u>F</u> DVLIHD	221-246 250-269 251-269

^a Peptidsequenzen von 11 aus insgesamt 151 Proteinen, deren (Über-)Expression im Kontext von Tumoren (speziell Melanomen) bereits beschrieben wurde, oder deren Expression auf Melanocyten und Melanomzellen beschränkt ist. Unterstrichen sind die potentiellen Ankeramino-säuren für die Bindung an HLA-DRB1*0401 oder HLA-DRB1*03011.

^b Melanotransferrin-Epitop, welches auch nach Puls HLA-DR4-positiver DCs mit Ma-Mel-18a-Zellen identifiziert werden konnten.

^c Proteine, deren Expression im Kontext verschiedener Tumoren (speziell Melanomen) bereits publiziert ist. Die identifizierten Epitope kommen daher als neue potentielle HLA-DR-assoziierte Tumorantigene in Frage.

^d Proteine, die spezifisch in Melanocyten exprimiert werden. Die identifizierten Peptide könnten daher möglicherweise als gewebspezifische Tumorantigene eingesetzt werden.

3.2.4.6 UKRV-Mel-17-Melanomzellen bewirken keine Stimulation der Melanotransferrin(668-684)-spezifischen T-Zelllinie

Während die meisten Tumore MHC I-Moleküle exprimieren, sind nur wenige dazu in der Lage, MHC II konstitutiv zu exprimieren. Speziell in Melanomzellen findet man aber relativ häufig MHC II-Expression. Dies führt, wie am Beispiel von Melanotransferrin in der Melanomzelllinie UKRV-Mel17 gezeigt, dazu, dass Epitope aus tumorspezifischen Proteinen auch als Antigene auf MHC II-Molekülen präsentiert werden können. Einige Studien konnten zeigen, dass Antigenpräsentation auf MHC II-Molekülen von Tumorzellen CD4⁺-T-Zellen aktivieren kann (Qi, 2000), während andere eher Anergisierung der T-Zellen beobachten (Becker et al., 1993). Insgesamt ist die MHC II-Expression auf Melanomen ein Indikator für einen schlechten Krankheitsverlauf und aggressivere Melanome (Lopez-Nevot et al., 1988). Grundvoraussetzung für CD4⁺-T-Zell-Aktivierung ist das Vorhandensein costimulatorischer Moleküle.

Die Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 wurde durchflusszytometrisch auf Expression von HLA-DR, CLIP sowie der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 überprüft (Abb. 3-28 A). Es zeigte sich, dass die Zelllinie zwar, wie erwähnt, stark HLA-DR-positiv war, sie wies aber keinerlei Expression an CD80 oder CD86 auf. Es war daher von Interesse zu überprüfen, ob diese Melanomzelllinie, die Melanotransferrin(668-684) präsentierte (Tabelle 3-7), auch in der Lage wäre, die Melanotransferrin-spezifische T-Zelllinie (s. Abschnitt 3.2.4.2) zu aktivieren. Die T-Zelllinie wurde dazu mit ungepulsten, reifen HLA-DR4⁺-DCs, DCs, die zuvor für 24 h mit Melanotransferrin(668-684) gepulst wurden sowie UKRV-Mel-17-Zellen und der MHC

II-negativen Zelllinie UKRV-Mel-15a für 16 h inkubiert und anschließend die Freisetzung von IFN- γ gemessen. Wie in Abbildung 3-26 darstellt, zeigte sich eine starke spezifische Aktivierung der T-Zelllinie durch Melanotransferrin(668-684)-gepulste DCs. UKRV-Mel-17-Zellen, die endogenes Melanotransferrin(668-684) präsentieren, konnten hingegen keine Aktivierung auslösen.

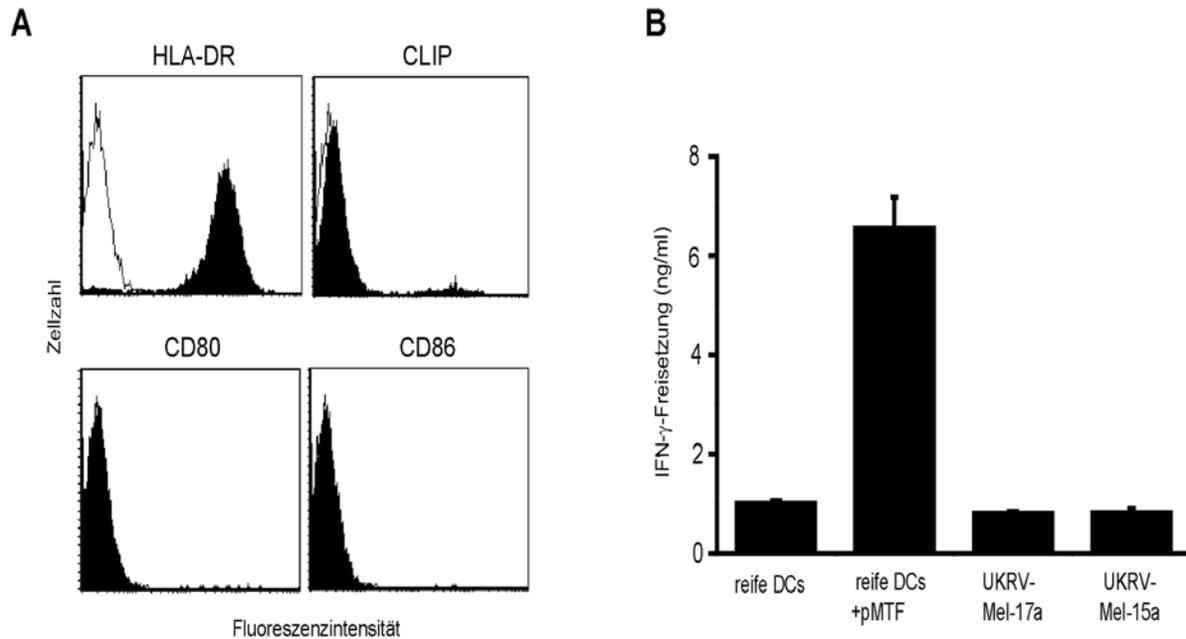


Abb. 3-28: T-Zell-Aktivierungspotential der Melanotransferrin(668-684)-präsentierenden Melanomzelllinie UKRV-Mel-17.

(A) Durchflußzytometrische Analyse von UKRV-Mel-17-Zellen. Weiße Histogramme entsprechen den Färbungen mit Isotyp-Kontroll-Antikörpern, schwarze Histogramme den spezifischen Färbungen mit den mAbs gegen die angegebenen Antigene.

(B) Je 20000 Zellen der Melanotransferrin (668-684)-spezifischen CD4⁺-T-Zelllinie wurden mit je 10000 Melanotransferrin(668-684) (pMTF, 20 μ M)-gepulsten reifen DCs, ungepulsten reifen DCs oder UKRV-Mel-17 bzw. UKRV-Mel-15a-Zellen für 16 h inkubiert. Die Freisetzung von IFN- γ wurde mittels ELISA quantifiziert. SD (n=3).

Es sollte daher eine systematische Untersuchung der Melanotransferrin-Expression in verschiedenen Normal- sowie Tumorgeweben erfolgen. Dazu wurde eine sogenannte STEP-Analyse durchgeführt (*single target expression profiling*, s. 2.5.3). Die mRNA-Expression von Melanotransferrin wurde dabei in 189 Normalgewebeprobe und 119 Krebsgewebeprobe untersucht. Abbildung 3-29 zeigt die Expression der langen, GPI-verankerten Melanotransferrin-Variante, aus der auch das Epitop Melanotransferrin(668-684) identifiziert wurde, in einer Auswahl von unterschiedlichen Geweben. Die durchschnittliche Expression in allen untersuchten Normalgeweben ist durch die gestrichelte Linie angegeben. Interessanterweise zeigte sich, dass Melanotransferrin in allen untersuchten Normalgeweben nahezu abwesend war, dass aber neben Melanomen auch in 4 von 9 untersuchten Lungenkrebs-Geweben Melanotransferrin stark exprimiert wurde. Auch in den Colonkrebs-Geweben sowie Colonkrebs-Metastasen zeigte sich eine im Vergleich zum Colon-Normalgewebe erhöhte Expressionsrate des Proteins. Melanotransferrin scheint also nicht nur ein für Melanome spezifischer Marker zu sein, sondern auch in bestimmten anderen Tumoren vorzukommen und stark überexprimiert zu werden. Melanotransferrin ist somit als Antigen für die Tumorummuntherapie ein ausgesprochen vielversprechendes Zielprotein und das identifizierte T-Helfer-Epitop daher in Peptidvakzinen nicht nur im Kontext von Melanomen, sondern auch in der Behandlung von Lungen- und Colon-Karzinomen von Interesse.

4. Diskussion

4.1 Das Selbstpeptid CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs

Zahlreiche Studien der jüngsten Zeit über dendritische Zellen beschäftigten sich mit der Frage, wie eine einzelne Zellspezies in der Lage sein kann, solch unterschiedliche Funktionen wie die Auslösung und Regulation der Immunität sowie die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wahrzunehmen. Viele dieser Studien, speziell in den letzten beiden Jahren, haben sich auf die Bedeutung der Präsentation von Selbstpeptiden fokussiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wird immer deutlicher, dass die Erkennung von MHC II-Selbstpeptid-Komplexen durch T-Zell-Rezeptoren für alle Stadien der T-Zell-Entwicklung sowie für die T-Zell-Aktivierung von fundamentaler Bedeutung zu sein scheint. Bedingt durch die positive und negative Selektion im Thymus erreichen nur diejenigen T-Zellen die Peripherie, die eine geringe Affinität für MHC-Selbstpeptid-Komplexe haben (Goldrath and Bevan, 1999). Man nimmt an, dass die fortlaufende Interaktion von T-Zellen mit Selbstpeptiden in der Peripherie nicht nur das Überleben naiver T-Zellen und die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bewirkt (Brocker, 1997; Viret et al., 1999; Steinman et al., 2003), sondern auch die T-Zell-Reaktivität gegenüber Fremdanigenen moduliert (Wulfiging et al., 1999; Stefanova et al., 2002; Bhandoola et al., 2002). All diese Prozesse werden durch die Interaktion von CD4⁺-T-Zellen mit MHC II-Selbstpeptid-Komplexen auf dendritischen Zellen vermittelt. Über die Identität der von DCs präsentierten Selbstpeptide hatte man bisher jedoch kaum Kenntnis.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, welche die Selbstpeptid-Repertoires unreifer und reifer humaner DCs untersucht und Selbstpeptid-Sequenzen identifiziert hat. Die Ergebnisse dieser Analysen (Abb. 3-1 A, Tabelle 3-1) ließen folgende Schlussfolgerungen zu: Die Selbstpeptide stammen aus nahezu allen intrazellulären Kompartimenten, d.h. nicht nur von Zellmembran- oder endosomalen Proteinen, sondern auch aus cytosolischen und nukleären Proteinen. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits bei murinen Makrophagen und B-Zellen gemacht werden (Dongre et al., 2001). All diese Proteine erreichen also offenbar die endosomalen MHC II-Beladungskompartimente und DCs sind damit in der Lage, ein breites Spektrum an Selbstpeptiden zu präsentieren. Einige der identifizierten Peptidsequenzen stammten aus extrazellulären Proteinen, die offenbar von DCs aufgenommen und sowohl von unreifen als auch reifen DCs präsentiert wurden (Tabelle 3-1). Interessanterweise ließ sich feststellen, dass sich die Peptidrepertoires unreifer und reifer DCs bis auf einige kleine Unterschiede in der Dominanz mancher Peptide im wesentlichen glichen. Auch unreife DCs sind also in der Lage, MHC II-Peptid-Komplexe zu generieren und zu präsentieren. Dies ist im Zusammenhang mit den in der Einleitung (s. 2.1.2) dargelegten, unterschiedlichen Auffassungen bezüglich der Fähigkeit unreifer DCs, MHC II-Peptidkomplexe zu bilden von

besonderem Interesse. Laut einem dieser Modelle verfügen unreife DCs von Mäusen, aufgrund der inhibierten Cathepsin S-Aktivität nicht über peptidrezeptive MHC II-Moleküle und können daher weder MHC II-Selbstpeptide noch Fremdantigene präsentieren (Inaba et al., 2000). Die hier für humane unreife DCs gezeigten Daten widersprechen dieser Auffassung, da sie zum einen zeigen, dass unreife DCs ein breites Spektrum an Selbstpeptiden präsentieren können, welches dem reifer DCs weitgehend entspricht, und zum anderen demonstrieren, dass auch exogen verabreichte Peptid- und Proteinantigene in unreifen DCs zur Bildung von MHC II-Peptid-Komplexen führen können (Abb. 3-4 und Abb. 3-6). Diese Differenzen könnten ihre Ursache in speziesbedingten Unterschieden in der Antigenpräsentation humaner und muriner DCs haben, man könnte allerdings auch argumentieren, dass humane unreife DCs, die durch Inkubation mit IL-4 und GM-CSF aus Monocyten differenziert werden, in ihrem Entwicklungsstatus eher sogenannten semi-maturierten Maus-DCs entsprechen.

Die Bildung von MHC II-Peptid-Komplexen der hier untersuchten humanen DCs erfolgte initial in unreifen und reifenden DCs mit gleicher Effizienz. Der Unterschied bestand allerdings darin, dass sie in unreifen DCs nicht stabil blieben und, offenbar bedingt durch einen kontinuierlichen Peptidaustausch, wieder verloren gingen. In DCs hingegen, die gleichzeitig mit der Antigenaufnahme einen inflammatorischen Stimulus erhielten, blieben die MHC II-Peptid-Komplexe stabil und reicherten sich im Verlauf der Maturierung auf der Zelloberfläche an (Abb. 3-4 und Abb. 3-6). Der Grund für dieses Verhalten könnte neben den bereits publizierten unterschiedlichen Halbwertszeiten von MHC II-Peptid-Komplexen auf humanen unreifen und reifen DCs (Cella et al., 1997) auch in der hier gezeigten gegenläufigen Regulation von HLA-DR und HLA-DM während der Reifung von DCs liegen (Abb. 3-2 und 3-3).

Es ist publiziert worden, dass die Expression von HLA-DM und klassischen MHC II-Molekülen in B-Zellen stets koreguliert ist (Alfonso and Karlsson, 2000). Die hier gezeigten Daten demonstrieren, dass dies in humanen dendritischen Zellen auf Proteinebene zumindest nicht der Fall ist (Abb. 3-2): Im Verlauf einer 48-stündigen Maturierung konnte eine bis zu vierfache Verminderung der HLA-DM-Menge beobachtet werden, während die Anzahl an HLA-DR-Molekülen um bis zum fünffachen zunahm. Dies hatte eine Verschiebung des HLA-DR:HLA-DM-Verhältnisses von ca. 4:1 in unreifen DCs bis zu über 40:1 in reifen DCs zur Folge (Abb. 3-2). Es ist beschrieben worden, dass es in DCs im Verlauf der Maturierung auch zu einer räumlichen Trennung von HLA-DM und MHC II-Molekülen kommt (Pierre et al., 1997). Dies könnte eine Konsequenz der hier beschriebenen gegenläufigen Regulation beider Proteine sein: Während MHC II-Moleküle zunehmen und an die Zelloberfläche gelangen, werden HLA-DM-Moleküle in lysosomalen Kompartimenten abgebaut.

Zusätzlich zu den dramatischen Verschiebungen im Proteinlevel beider Moleküle konnte auch eine Abnahme der katalytischen Aktivität von DM in reifen DCs beobachtet werden (Abb. 3-3). Die nach 24-stündiger LPS-induzierter Maturierung gemessene katalytische Austausch-Aktivität von HLA-DM war um etwa das 4-6-fache verringert. Wie es in reifen DCs zur Verminderung der katalytischen Aktivität von HLA-DM kommt, ist zum momentanen

Zeitpunkt noch ungeklärt, könnte aber mit der fehlenden Assoziation von HLA-DM mit dem Co-Chaperon HLA-DO (Kropshofer et al., 1998) zusammenhängen (Abb. 3-3 C). Im Gegensatz zu B-Zellen und thymalen Epithelzellen wird HLA-DO in dendritischen Zellen nicht exprimiert (Chen et al., 2002). Damit fehlt nach dem Export der peptidbeladenen MHC Klasse II-Moleküle ein HLA-DM-stabilisierender Bindungspartner, wodurch HLA-DM beschleunigt abgebaut wird.

Somit führte also die Verminderung der HLA-DM-Proteinmenge und der katalytischen HLA-DM-Aktivität während der DC-Reifung zu einer Verschiebung des HLA-DR:HLA-DM-Verhältnisses von 4:1 in unreifen DCs zu 80:1 bis 120:1 nach 24-stündiger Maturierung. B-Zellen mit wenig CLIP auf der Zelloberfläche haben ein HLA-DR:HLA-DM-Verhältnis von etwa 20:1. Auf der Zelloberfläche von B-Zellen heterozygoter H2-M^{+/-} Mäuse jedoch konnte eine deutliche Erhöhung von MHC-CLIP-Komplexen nachgewiesen werden (Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996), was darauf hindeutet, dass bereits eine zweifache Verminderung der DM-Menge deutlichen Einfluss auf die CLIP-Präsentation unter *Steady-state*-Bedingungen hat. Eine wesentliche funktionelle Konsequenz der massiven Reduzierung von katalytisch aktivem HLA-DM ist also offenbar die Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs. Diese konnte mittels qualitativer massenspektrometrischer Analyse, quantitativer Western blot- und FACS-Analyse gezeigt werden und war zugleich der dramatischste Unterschied zwischen den Selbstpeptid-Repertoires unreifer und reifer DCs (Abb. 3-1). Die Zunahme von CLIP auf der Zelloberfläche konnte für alle untersuchten Maturierungsstimuli gezeigt werden und ging jeweils mit der Zunahme des DR:DM-Verhältnisses einher (Abb. 3-2). Auch für die meisten HLA-DR-Haplotypen mit Ausnahme einiger weniger, wie HLA-DRB1*0401, konnte die CLIP-Zunahme beobachtet werden. Insgesamt nahm die Menge an MHC II-CLIP-Komplexen während der DC-Reifung auf das etwa 20-fache zu und die Häufigkeit der mit CLIP besetzten MHC II-Moleküle erreichte damit nahezu 10 % aller HLA-DR-Moleküle. Unter der Annahme, dass reife DCs etwa 8×10^6 HLA-DR-Moleküle besitzen (Vogt et al., 2002) entspricht dies der beachtlichen Zahl von etwa 8×10^5 CLIP-HLA-DR-Molekülen auf der Oberfläche einer reifen DC.

Interessanterweise konnte die Zunahme an MHC II-CLIP-Komplexen auch beobachtet werden, wenn die dendritischen Zellen großen Mengen der unterschiedlichsten exogenen Antigene ausgesetzt waren, was die Möglichkeit ausschließt, dass dieses Phänomen eventuell nur auf Antigen-Mangel beruht. Wenn DCs mit unterschiedlichen Mengen der Proteinantigene HLA-A2 und virosomalem Hämagglutinin gepulst wurden, führte dies zur starken Präsentation der immundominanten Epitope dieser Proteine (Abb. 3-6, 3-13). Dies hatte jedoch keinerlei Verminderung in der Oberflächenpräsentation von CLIP nach 24 h DC-Maturierung zur Folge, wie durch FACS-Analyse demonstriert werden konnte. Offenbar wurden die exogenen Antigene jedoch auf Kosten anderer Selbstpeptide aufgeladen. Darauf deutet die relative Abnahme einiger Selbstpeptidsignale nach Präsentation des immundominanten HLA-A2-Epitops A2(103-117) und seiner Längenvarianten hin (Abb. 3-6 B). Wie lässt sich diese Beobachtung erklären?

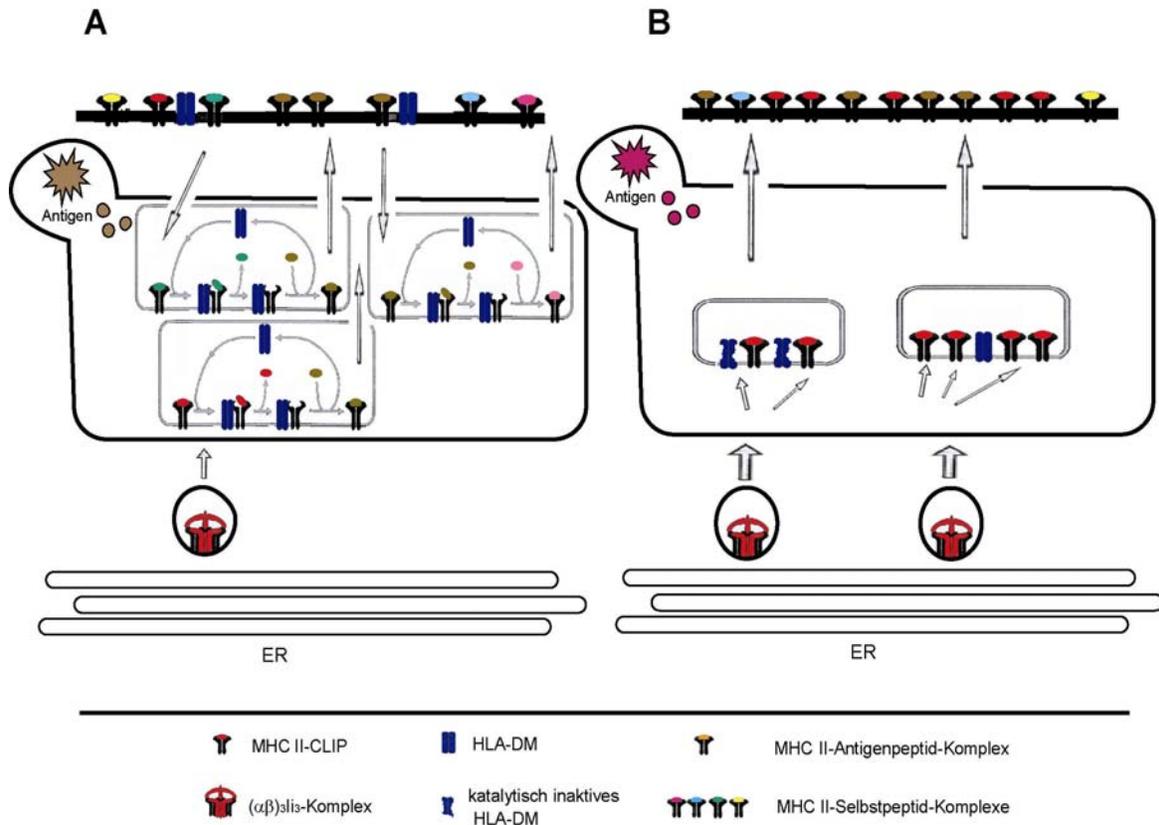


Abb. 4-1: Modell für die Akkumulation von CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs

A) Zu Beginn der Maturierung wird das aufgenommene Antigen vermittelt durch die Peptid-*Editing*-Funktion von HLA-DM auf MHC II-Moleküle aufgeladen. Es kommt dabei zum Austausch von CLIP und anderen Selbstpeptiden gegen Peptide des exogenen Antigens, die dann auf die Zelloberfläche gelangen. In unreifen DCs kommt es allerdings durch fortlaufendes MHC II-Recycling und die hohe HLA-DM-Aktivität auch wieder zum Austausch des Antigenpeptids gegen andere Selbstpeptide, sodass die MHC II-Antigenpeptid-Komplexe nach und nach wieder verloren gehen. Nur wenn gleichzeitig mit der Antigenaufnahme die Maturierung induziert wird, können sich die MHC II-Antigenpeptide-Komplexe auf der Zelloberfläche anreichern.

B) Im Verlauf der Maturierung kommt es zur deutlichen Verringerung an funktionellen HLA-DM, sodass auf neusynthetisierten MHC II-Molekülen CLIP nicht mehr effizient ausgetauscht werden kann und sich an der Zelloberfläche anreichert, da zudem das MHC II-Recycling deutlich vermindert ist. Antigene, die zu diesem Zeitpunkt von DCs aufgenommen werden, können aufgrund des HLA-DM-Mangels nicht mehr auf MHC II-Moleküle aufgeladen werden, sodass die Fähigkeit dendritischer Zellen, in späten Phasen der Maturierung MHC II-Peptid-Komplexe zu bilden, deutlich vermindert ist.

Eine wesentliche Aufgabe von HLA-DM besteht in seiner *Editing*-Funktion (Kropshofer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997), d.h. es tauscht nicht nur CLIP, sondern potentiell alle kinetisch instabilen gegen kinetisch stabile Peptide aus. In Gegenwart von HLA-DM und großer Mengen exogener Antigene sollten also Selbstpeptide, die mit dem entsprechenden HLA-DR-Typ instabilere Komplexe eingehen als die prozessierten Peptide des exogenen Antigens, ausgetauscht werden können. Folglich sollte es dann aber auch zum Austausch von CLIP kommen. In der Tat konnte in Anwesenheit exogenen Antigens in der frühen Phase der DC-Maturierung (4 h), wenn also noch große Mengen an funktionell aktivem HLA-DM vorlagen, ein Austausch von CLIP beobachtet werden (Abb. 3-6 A). Nach 24 h war dieser

aber wieder nivelliert und es konnte kein Unterschied in der MHC II-CLIP-Oberflächenexpression zwischen Antigen-ungepulsten und -gepulsten DCs beobachtet werden. Dies lässt sich am schlüssigsten folgendermaßen verstehen: In der frühen Phase der DC-Maturierung kommt es zur effizienten Beladung von MHC II-Molekülen mit Antigenpeptiden, indem Selbstpeptide inklusive CLIP ausgetauscht werden. Die Abnahme der Menge an funktionellem HLA-DM während der DC-Reifung führt dann aber offenbar dazu, dass ab einem gewissen Zeitpunkt auf neusynthetisierten MHC II-Molekülen CLIP nicht mehr effektiv ausgetauscht werden kann und diese daher als MHC II-CLIP-Komplexe die Zelloberfläche erreichen, wo sie sich anreichern. Dies erklärt die Beobachtung, dass CLIP neben den aus den exogenen Antigenen präsentierten Epitopen das einzige dominant ko-exprimierte Selbstpeptid ist (Abb. 3-6 und 3-13). Die sich hieraus ergebende Frage war: Weshalb steigern dendritische Zellen während der Maturierung die MHC II-Synthese, wenn es durch die gleichzeitige Verminderung der HLA-DM-Aktivität ab einem gewissen Zeitpunkt nur noch zur Anreicherung von MHC II-Molekülen kommt, die mit dem Beladungsintermediat CLIP besetzt sind? Die Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen ist eher als ein gewollter Prozess zu sehen. Es war daher anzunehmen, dass MHC II-CLIP-Komplexe auf der Zelloberfläche reifer DCs eine Rolle in der Antigenpräsentation spielen würden. Aufgrund dieser Überlegung fokussierten sich die weiteren Experimente auf die Analyse einer möglichen Funktion von CLIP in der Interaktion von DCs mit T-Zellen.

Erste Hinweise für eine Beteiligung von CLIP an der T-Zell-Stimulierung ergaben sich aus der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der immunologischen Synapse zwischen DCs, die mit dem rekombinanten HLA-A2-Protein gepulst wurden und autologen T-Zellen. Hier zeigten MHC-CLIP-Komplexe eine relativ gleichmäßige Verteilung innerhalb der gesamten Zell-Zell-Kontaktfläche und Kolo-kalisation mit CD3, waren aber nicht im Bereich des cSMAC angereichert (Abb. 3-7) wie bereits für agonistische wie auch nicht-agonistische MHC II-Peptid-Komplexe beschrieben worden ist (Wülfing et al., 2002). CLIP kann als nicht-agonistisches Peptid angesehen werden, da es mit dem Antigenpeptid A2(103-117) quasi keine Sequenzübereinstimmung aufweist. Nicht-agonistische Peptide können zur T-Zell-Erkennung beitragen (Wülfing et al., 2002) und die Bildung der Synapse erleichtern, indem sie den TCR über schwache initiale Wechselwirkungen zu dem für ihn spezifischen Peptid-MHC-Komplex leiten (Wu et al., 2002). CLIP könnte als endogenes Selbstpeptid die Funktion eines solchen „Null“-Peptids übernehmen und zur Synapsenbildung beitragen.

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Funktion von CLIP konnte durch die Analyse von CDw78-Mikrodomänen gewonnen werden, welchen eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung zukommt und die ebenfalls Bestandteil immunologischer Synapsen sind (Kropshofer et al., 2002; Vogt et al., 2002; Mittelbrunn et al., 2002). Zusammen mit dem agonistischen A2(103-117)-Peptid war CLIP in diesen Mikrodomänen ein dominant exprimiertes endogenes Selbstpeptid (Abb. 3-8). Gleiches konnte für das Peptidrepertoire von CDw78-Mikrodomänen aus humanen Tonsillen beobachtet werden, was die In vivo-Relevanz der MHC II-CLIP-Komplexe unterstreicht. Man nimmt an, dass die Organisation von MHC-Peptid-Komplexen in Membran-Mikrodomänen wesentlich für die Regulation der Antigenpräsentation auf der

Zelloberfläche ist (Anderson et al., 2000; Kropshofer et al., 2002). Die Antigendichte wiederum ist ein Parameter, der maßgeblich Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung hat (Hosken et al., 1995; Constant and Bottomly, 1997). Es war daher zu untersuchen, ob die Akkumulation des nicht-agonistischen Selbstpeptids CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs sowie seine Anreicherung in Mikrodomänen zusammen mit exogenen agonistischen Liganden Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung nehmen würde.

Die Modulation des MHC II-CLIP/Gesamt-HLA-DR-Verhältnisses auf DCs durch Zugabe exogenen CLIPs bzw. die Blockierung endogenen CLIPs mithilfe eines anti-CLIP-Antikörpers führte in der Tat zur Verschiebung der T_H1 - T_H2 -Balance. Eine Erhöhung des Oberflächen CLIPs um den Faktor 2 bewirkte eine etwa fünffache Verminderung des T_H1 : T_H2 -Verhältnisses und etwa eine Halbierung des T_H1 : T_H0 -Verhältnisses. Blockierung mit dem Anti-CLIP-Antikörper resultierte in einem gegenteiligen Effekt (Abb. 3-9, 3-10, Tabelle 3-3). Dieses Phänomen konnte für unterschiedliche Antigene beobachtet werden. MHC II-CLIP-Komplexe auf der Zelloberfläche von DCs scheinen also der T_H1 -Polarisierung entgegenzuwirken und die T_H2 - bzw. T_H0 -Polarisierung zu fördern. Wie lässt sich dies mechanistisch erklären?

Es ist gezeigt worden, dass Ii-Knockout-Mäuse eine deutlich verminderte Fähigkeit zur positiven Selektion von $CD4^+$ -T-Zellen besitzen (Bikoff et al., 1993; Viville et al., 1993; Elliot et al., 1994). Interessanterweise ließ sich diese Fähigkeit aber durch Expression geringer Mengen an Ii, die nicht ausreichten, um eine normale MHC II-Expression wiederherzustellen, zurückgewinnen (Naujokas et al., 1995). Aufgrund dieser Studie war anzunehmen, dass die Invariante Kette wichtig für die Generierung von Liganden sei, welche die positive Selektion bewirkten und man nahm an, dass es sich bei diesen Liganden um CLIP handeln würde. Die hier gezeigte Analyse des MHC II-Peptidrepertoires ex vivo gewonnener corticaler Thymusepithelzellen von Mäusen demonstriert, dass CLIP in der Tat eines der wesentlichen Selbstpeptide ist, die im Thymuscortex präsentiert werden (Abb. 3-12). Aus Untersuchungen an H2-M-Knockout-Mäusen, in denen das MHC II-Selbstpeptid-Repertoire nahezu zu 100 % aus CLIP besteht, weiß man, dass die positive Selektion auf CLIP zu einem breiten Repertoire an $CD4^+$ -T-Zellen mit unterschiedlicher TCR-Spezifität führt. Es ist also davon auszugehen, dass eine Vielzahl der T-Zellen, welche die Peripherie erreichen auf einem CLIP-Hintergrund positiv selektiert wurden. Da CLIP, wie hier gezeigt, aber auch von den an der negativen Selektion beteiligten, medullären Thymusepithelzellen dominant präsentiert wird (Abb. 3-12), ist ferner davon auszugehen, dass die in der Peripherie vorkommenden T-Zellen nur eine geringe Affinität für MHC II-CLIP aufweisen. CLIP könnte in der Peripherie daher wie ein endogenes „Null“-Peptid wirken und die Antigendichte der agonistischen Peptide verdünnen. Dies hätte einen ähnlichen Effekt wie eine niedrige Antigenkonzentration, nämlich eine APC-T-Zell Interaktion von niedriger Avidität, welche die T-Zell-Polarisation in Richtung T_H2 verschiebt (Hosken et al., 1995; Langenkamp et al., 2000).

Es ist ferner gezeigt worden, dass *Altered Peptide Ligands*, welche Analoga immunogener Peptide mit ein oder mehreren veränderten Aminosäuren sind, zu qualitativ unterschiedlichen T-Zell-Aktivierungssignalen führen können. So können sie veränderte T-Zell-Polarisierungen

herbeiführen oder andersartige T-Zell-Phosphorylierungsmuster induzieren. Sie spielen zudem eine Rolle in der positiven Selektion im Thymus (Hogquist et al., 1994, Sebzda et al., 1994). Man kann endogene Selbstpeptide als eine Art von APLs ansehen (Constant and Bottomly, 1997; Nicholson and Kuchroo, 1997; Vidal and Allen, 1996). Die positive und negative Selektion von T-Zellen im Thymus über CLIP könnte also dazu führen, dass T-Zell-Rezeptoren CLIP in der Peripherie zwar erkennen, dies aber wie ein suboptimaler Ligand bzw. APL wirkt und damit ein T-Zell-Aktivierungsmuster für die T_H2-Polarisation induziert.

Wie eine Studie kürzlich demonstrierte, hat der Maturierungsstatus dendritischer Zellen über die Kinetik der Cytokinsekretion einen maßgeblichen Einfluss auf die T-Zell-Polarisierung (Langenkamp et al., 2000). In den ersten 10-15 h der Maturierung kommt es durch die erhebliche Freisetzung von IL-12 zur T_H1-Polarisierung, während die spätere Phase der Maturierung, nachdem die IL-12-Produktion zum Erliegen kam, T_H2-Polarisierung fördert. Die hier gezeigte Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche infolge der Verminderung von HLA-DM steht im kinetischen Einklang mit dieser Beobachtung, da die Verringerung von DM und die Akkumulation von CLIP im Zeitraum 15-48 h ihren Höhepunkt erreichten.

Anhand der hier gezeigten Daten ist nicht auszuschließen, dass auch andere Selbstpeptide, die während der DC-Maturierung hochreguliert werden (Tabelle 3-1), ähnliche Effekte auf die T-Zell-Polarisierung haben wie CLIP. Die Akkumulation von CLIP scheint aber die wichtigste und generell auftretende Veränderung im MHC II-restringierten Selbstpeptid-Repertoire während der Reifung von DCs zu sein. Zudem spielt CLIP unter den von reifen DCs präsentierten Selbstpeptiden aus einer Reihe von Gründen eine besondere Rolle:

- a) CLIP ist ein Prozessierungsprodukt der Ii und damit eng mit der MHC II-Expression assoziiert. Es ist daher in allen APCs in Thymus und Peripherie vorhanden.
- b) CLIP erreicht auf der Zelloberfläche von DCs eine erstaunlich hohe Kopienzahl von nahezu 10 % aller HLA-DR-Moleküle.
- c) Da die CLIP-Sequenz in der Bindungsgrube aller neusynthetisierten MHC II-Moleküle liegt, weist sie sehr promiske Bindungseigenschaften für die unterschiedlichen MHC II-Varianten auf, was für die meisten anderen Selbstpeptide nicht gilt.
- d) Die Evolution hat mit der Entwicklung von HLA-DM und HLA-DO zwei Moleküle hervorgebracht, über die sich die Menge an MHC II-CLIP-Komplexen strikt regulieren lässt.
- e) MHC II-CLIP-Komplexe weisen offenbar eine andere Struktur auf als andere MHC-Peptid-Komplexe, wie die Strukturanalyse von CLIP-I-A^b und CLIP-I-A^{g7} verdeutlichte (Arneson et al., 2000; Zhu et al., 2003).
- f) Im Gegensatz zu vielen anderen Selbstpeptiden scheint CLIP in Tetraspan-Mikrodomänen reifer DCs vorzukommen.

Zahlreiche Publikationen untermauern die hier gezeigten Daten, dass dendritische Zellen die T-Zell-Polarisation über die Oberflächenexpression von MHC II-CLIP-Komplexen modulieren können. So konnte eine Studie kürzlich zeigen, dass es in Ii-Knockout-Mäusen präferentiell zur Induktion von T_H1 -Immunantworten kommt (Topilski et al., 2002). Es besteht daher die Möglichkeit, dass diesen Mäusen, bei denen CLIP-Peptide abwesend sind, die Möglichkeit fehlt, T_H2 -Antworten durch Erhöhung der Anzahl ihrer MHC II-CLIP-Komplexe zu induzieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von Wildtyp-Mäusen mit Antigen in Gegenwart von CLIP zu einer Verschiebung des Cytokinmusters und zu einem Antikörper-Isotypenwechsel führte, der einer Verschiebung von T_H1 zu T_H2 entsprach. Die Erklärung für diese Beobachtung war, dass die Zugabe von CLIP die MHC II-Oberflächenexpression vermindern und damit die Antigendichte verringern würde (Chaturvedi et al., 2000).

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass einige MHC II-Varianten, die mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen assoziiert sind, MHC II-CLIP-Komplexe von besonders niedriger Stabilität bilden. Dies ist im Kontext der Autoimmunerkrankungen rheumatoide Arthritis (Patil et al., 2001), juvenile Dermatomyositis (Reed et al., 1997), Autoimmun-Hepatitis (Strettell et al., 1997), der Basedowschen Krankheit (Hu et al., 1992) sowie für Typ I Diabetes von Mäusen (Hausmann et al., 1999) beschrieben worden. Es legt die Interpretation nahe, dass die Unfähigkeit, stabile MHC II-CLIP-Komplexe zu generieren und damit sicherlich auch die Unfähigkeit, diese auf der Oberfläche reifer DCs zu akkumulieren, empfänglich für das Auftreten von Autoimmunreaktionen macht. Umgekehrt würde dies bedeuten, dass die Akkumulation von MHC II-CLIP-Komplexen in gewisser Hinsicht vor Autoimmunreaktionen schützt. In Anbetracht der hier präsentierten Daten könnte dies folgendermaßen erklärt werden:

Viele Autoimmunerkrankungen sind mit dem Auftreten autopathogener T_H1 -Zellen assoziiert. Autoreaktive T_H1 -Zellen sezernieren pro-inflammatorische Cytokine und können die Auslösung von Autoimmunreaktionen induzieren (Nicholson and Kuchroo, 1996; Kuchroo et al., 1993). Autoreaktive T_H2 -Zellen hingegen, die anti-inflammatorische Cytokine sezernieren, sind dazu offenbar nicht in der Lage (Katz et al., 1995) und können sogar vor der Induktion von Autoimmunreaktionen schützen (Nicholson et al., 1995). Wenn CLIP auf der Oberfläche reifer DCs die T_H1 -Polarisierung antagonisiert, könnte ein HLA-DR-Allel, welches nur instabile MHC II-CLIP-Komplexe bilden kann, damit der T_H1 -Polarisierung weniger entgegenwirken und folglich das Risiko zum *Priming* autoreaktiver T_H1 -Zellen erhöhen. MHC II-Allele hingegen, die eine hohe Affinität für CLIP haben, können MHC II-CLIP-Komplexe auf der Zelloberfläche reifer DCs anreichern, damit autoantigene MHC II-Peptid-Komplexe verdünnen und somit die Avidität der APC- T_H -Zell-Interaktion vermindern. Dies würde das Risiko einer Autoimmunreaktion verringern.

Zusammenfassend lässt sich aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten folgende Schlussfolgerung ziehen: Sowohl die gegenläufige Regulation von HLA-DR und HLA-DM als auch die Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen auf der Zelloberfläche reifer DCs, scheinen Schutzmechanismen zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen zu sein. Die

Verminderung der HLA-DM-Aktivität während der Reifung von DCs führt dazu, dass sich MHC II-Moleküle in späteren Phasen der Maturierung, wenn sich die DCs bereits auf dem Weg in die Lymphknoten befinden, kaum mehr beladen lassen. Dies geht Hand in Hand mit der Verminderung der Endocytosekapazität (Garrett et al., 2000) und der Verlangsamung des MHC II-Recyclings (Cella et al., 1997), und dient offenbar dazu, die Aufnahme von Selbstantigenen zu diesem Zeitpunkt zu verhindern, was die Auslösung von Autoimmunreaktionen induzieren könnte. Die Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen, die offenbar auch aus der Verminderung der HLA-DM-Aktivität resultiert, wirkt der Bildung möglicher autopathogener T_H1 -Zellen entgegen, indem es die Polarisierung zu T_H2 oder T_H0 -Zellen fördert.

Diese Arbeit trägt damit zu der momentanen Diskussion über die mögliche Funktion von Selbstpeptiden in der T-Zell-Aktivierung bei. CLIP ist das erste Beispiel für einen endogenen Peptidliganden, der die T-Zell-Antwort gegenüber Fremdanigenen modulieren kann. In Erweiterung früherer Befunde scheint CLIP mehr zu sein als lediglich ein MHC II-Beladungsintermediat, sondern vielmehr ein Hilfsmittel, welches dendritischen Zellen dazu dient, ihre schwierige Aufgabe zu erfüllen, die Balance zwischen Immunität und Toleranz zu erhalten.

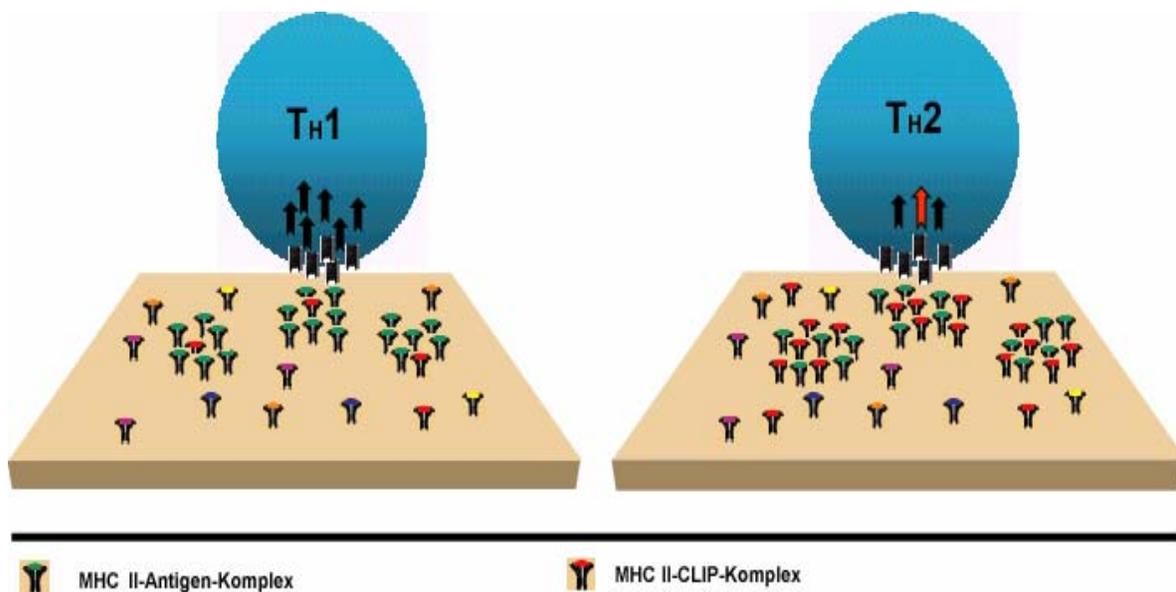


Abb. 4-2: Modell für Modulation der T-Zell-Polarisierung durch MHC II-CLIP-Komplexe

Wenn nur wenige MHC II-CLIP-Komplexe auf der Zelloberfläche sind, können MHC II-Antigenpeptid-Komplexe, beispielsweise durch Akkumulation in Mikrodomänen eine hohe Antigendichte erreichen, welche antigenspezifische T_H1 -Zellen hervorbringt. Die Anwesenheit hoher Mengen an MHC II-CLIP-Komplexen, welche nicht-agonistische oder „Null“-Liganden sind, bewirkt eine Verdünnung dieser Komplexe, so dass es zu APC-T-Zell-Interaktionen geringerer Avidität kommt, welche antigenspezifische T_H2 -Zellen hervorbringen. Vielleicht bewirkt die Interaktion von TCRs mit dem Liganden CLIP, ähnlich wie für ALPs beschrieben, ein unterschiedliches T-Zell-Aktivierungsmuster, welches die T_H2 -Polarisierung erklären könnte.

4.2 Massenspektrometrische Identifizierung von MHC Klasse II-restringierten Epitopen exogener Antigene

Aufgrund der bisher sehr limitierten Erfolge von Peptidvakzinen in der Tumorummuntherapie und der Erkenntnis, dass $CD4^+$ -T-Zellen eine fundamentale Bedeutung in der Antitumor-Immunantwort haben, wurden die Bemühungen zur Identifizierung neuer MHC Klasse II-restringierter Tumorantigene erheblich verstärkt. Nach wie vor ist aber die Zahl der zur Verfügung stehenden tumorspezifischen T-Helferepitope ausgesprochen begrenzt, was unter anderem mit technischen Problemen bei ihrer Identifizierung zusammenhängt (s. Einleitung 1.3.2). Die meisten bisher identifizierten MHC II-restringierten Tumorantigene wurden mittels tumorreaktiver $CD4^+$ -T-Zellen aus tumorinfiltrierenden Lymphocyten gewonnen. Bei den meisten handelt es sich um Epitope aus mutierten Proteinen oder Fusionsproteinen, die nur limitierte klinische Anwendbarkeit haben (Wang and Rosenberg, 1999). Es besteht daher ein erheblicher Bedarf nach neuen Methoden, die eine effiziente Identifizierung tumorrelevanter MHC II-Epitope möglich machen.

Diese Arbeit fokussierte sich auf die Entwicklung einer T-Zell-unabhängigen Methode zur Identifizierung neuer tumorspezifischer MHC II Klasse-Antigene mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse der von dendritischen Zellen präsentierten MHC II-Peptidrepertoires.

Wie anhand der Identifizierung der Hämagglutinin-Epitope HA(253-271), HA(253-272) und HA(254-270) gezeigt werden konnte, ist es mit den hier beschriebenen Methoden der Analyse der HLA-DR-restringierten Peptidrepertoires möglich, Epitope aus Antigenen, die von dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert wurden, zu identifizieren (Abb. 3-13 und 3-14). Die Aufnahme von Hämagglutinin aus dem virosomalen Grippeimpfstoff Inflexal®, führte zum Auftreten außerordentlich dominanter neuer Peptidsignale, die eine Identifizierung über enzymatische Methoden zuließ. Die ausgesprochene Dominanz der nach Aufnahme von Hämagglutinin-Virosomen präsentierten Neo-Epitope im DC-Peptidrepertoire konnte für andere Antigene nicht in vergleichbarem Maße beobachtet werden. Sie hängt wahrscheinlich mit der Darreichungsform des Antigens zusammen, da gezeigt worden ist, dass Antigene aus Liposomen und insbesondere aus mannosylierten Liposomen und Virosomen besonders effizient von DCs aufgenommen werden (Copland et al., 2003). Die für diese Epitope beschriebene Identifizierung über enzymatische Modifikation stellt daher auch eher eine Ausnahme dar und ist sicher nicht die Methode der Wahl. Das Beispiel zeigt aber, dass es möglich ist, MHC II-Epitope aus rekombinanten Proteinen, die von dendritischen Zellen prozessiert und präsentiert wurden, direkt massenspektrometrisch zu identifizieren. Dies würde die für MHC II-Epitope bestehende Problematik unzureichender Epitop-Vorhersagemöglichkeiten umgehen. Es könnten somit beispielsweise Tumorantigene, die sich nur in geringen Mengen exprimieren oder aufreinigen lassen, in Virosomen oder mannosylierte Liposomen verpackt werden und neue MHC II-Epitope nach Aufnahme und Prozessierung durch DCs identifiziert werden.

4.2.1 Übertragung von Antigenen von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle dendritischer Zellen

Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie zur Identifizierung neuer Tumorantigene zielte auf den Einsatz ganzer Tumorzellen als Antigenquelle ab, da dies die Möglichkeit eröffnet, neue tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene zu liefern, deren Relevanz im Kontext von Tumoren noch gar nicht bekannt ist.

Für den Einsatz ganzer Tumorzellen als Antigenquelle bedarf es geeigneter Methoden hinsichtlich Zellpräparation sowie Zeitpunkt und Art der Antigengabe, um einen effizienten Transfer von Antigenen von den Tumorzellen auf dendritische Zellen zu erreichen. Uneinigkeit besteht über die Frage, ob nekrotische oder apoptotische Tumorzellen in immuntherapeutischen Anwendungen geeignetere Quellen für die Auslösung einer Anti-Tumor-Immunantwort sind. Die meisten Studien beschäftigten sich bisher mit dem DC-Maturierungspotential nekrotischer und apoptotischer Zellen und zeigten höchst konträre Daten. So gibt es Hinweise, dass nur nekrotische, nicht aber apoptotische Zellen (Sauter et al., 2000; Basu et al., 2000) auch apoptotische Zellen (Rovere et al., 1998; Feng et al., 2001) oder weder apoptotische noch nekrotische Zellen die DC-Maturierung auslösen können (Salio et al., 2000). Die hier gezeigten Ergebnisse tragen zu dieser Diskussion insofern bei als sie Beispiele für nekrotische Melanomzellen zeigen, welche die DC-Maturierung induzieren können und solche, die dazu nicht in der Lage sind (Abb. 3-15). Die Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a konnte nach Nekrose nur eine transiente Aktivierung dendritischer Zellen auslösen, nach Apoptose keine Aktivierung. Die Melanomzelllinie Ma-Mel-18a hingegen führte zu vollständiger Aktivierung nach Zellnekrose. Dieses Beispiel zeigt, dass offenbar nicht nur die Art des Zelltodes darüber entscheidet, ob DCs aktiviert werden, sondern dass es auch vom Zelltyp abhängt.

Als wichtiger Faktor für die Auslösung der DC-Maturierung wird die Freisetzung von Hsps diskutiert (Basu et al., 2000; Binder et al., 2000). Zwar wurden auch von der Melanomzelllinie UKRV-Mel-15a Hitzeschock-Proteine der Hsp70-Familie freigesetzt (Abb. 3-21), dies reichte aber nicht für die Auslösung der DC-Maturierung aus. Es war daher davon auszugehen, dass andere Faktoren für den Unterschied im DC-Maturierungspotential zwischen Ma-Mel-18a und UKRV-Mel-15a-Zellen verantwortlich sein würden. Die Analyse der Expression von Faktoren, für die ein inhibierender Einfluss auf die DC-Maturierung bereits publiziert wurde, wie etwa IL-10, VEGF oder TGF- β (Gabrilovich et al., 1996; Shurin et al., 2002; Bonham et al., 1996) mittels *Western blot* und Microarray-Analyse konnte keinen eindeutigen Zusammenhang erkennen lassen. Zudem führte auch die Ko-Inkubation von DCs mit TNF- α oder LPS und nekrotischen UKRV-Mel-15a Zellen nicht zu einer Verminderung der TNF- α - bzw. LPS-induzierten DC-Maturierung wie für die Freisetzung inhibitorischer Faktoren aus den nekrotischen Tumorzellen zu erwarten gewesen wäre (Daten nicht gezeigt). Auch die Untersuchung des IFN- α -induzierbaren Proteins 1-8U, welchem antiproliferative Eigenschaften in Melanomzellen zugesprochen werden (Brem et al., 2003), als möglichem die

DC-Maturierung förderndem Faktor, ergab keinen Zusammenhang mit den beobachteten Unterschieden beider Melanomzelllinien in ihrem DC-Aktivierungspotential (Abb. 3-16 D). Die Frage nach den Gründen für die beobachteten Unterschiede im DC-Aktivierungspotential muss daher zunächst offen bleiben. Es lässt sich aus diesen Ergebnissen aber schließen, dass für die Generierung einer effizienten Antitumor-Immunantwort das Pulsen dendritischer Zellen mit nekrotischen Tumorzellen nicht unbedingt ausreicht, da unter Umständen keine vollständige DC-Maturierung induziert werden kann, sondern dass in jedem Fall zusätzlich inflammatorische Stimuli, beispielsweise in Form von $\text{TNF-}\alpha$, zugesetzt werden müssen. Dies ist in besonderem Maße für die Aktivierung von CD4^+ -T-Zellen von Bedeutung, da in Abb. 3-4 gezeigt werden konnte, dass die Generierung stabiler MHC II-Peptidkomplexe nur in DCs erfolgte, die gleichzeitig mit der Antigenaufnahme zur Maturierung induziert wurden.

Zum Zwecke der massenspektrometrischen Identifizierung neuer Tumorantigene war es zudem wichtig, Bedingungen zu finden, die zu signifikanten Veränderungen im MHC II-restringierten Peptidrepertoire führen würden. Der Vergleich nekrotischer mit apoptotischen oder lebenden Zellpräparationen führte mittels dreier unabhängiger Methoden zu dem Ergebnis, dass nekrotische Tumorzellen für einen sehr effizienten Antigentransfer sorgen: Dies konnte mittels Peptid-Kompetitionsassays gezeigt werden (Abb.3-17), in denen die von nekrotischen Tumorzellen freigesetzten Peptidantigene am effizientesten mit immundominanten Reporterpeptiden um die Bindung an HLA-DR-Moleküle kompetierten. Ein Ergebnis, welches sich nicht nur für UKRV-Mel-15a-Zellen, sondern auch für andere nekrotische Tumorzellen ergab. Zudem konnte dies durch die Analyse der HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoires nach Pulsen dendritischer Zellen mit nekrotischen, apoptotischen oder lebenden Zellen verifiziert werden (Abb. 3-19). Die dominantesten Veränderungen im Peptidrepertoire, die für die Expression von Neo-Antigenepitopen sprachen, konnten nach Kokultur der DCs mit nekrotischen UKRV-Mel-15a-Zellen induziert werden. Schließlich konnte die Überlegenheit nekrotischer Zellpräparationen für die Übertragung von Antigenen auf MHC-II-Moleküle dendritischer Zellen auch für das Modell-Tumorantigen HLA-A2 gezeigt werden (Abb. 3-18). UKRV-Mel-15a-Zellen, welche das HLA-A2-Protein exprimierten, übertrugen das aus dem HLA-A2-Protein stammende Epitop A2(103-117) am effizientesten auf DR1^+ , HLA-A2^- DCs, wenn sie als nekrotische Zellen zugesetzt wurden, nicht aber wenn sie apoptotisch waren. Ein besonders effizienter Transfer zeigte sich, wenn die Expression von HLA-A2 in den Melanomzellen durch Vorbehandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ um das ca. fünffache (Daten nicht gezeigt) gesteigert wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass im wesentlichen die Menge des angebotenen Antigens der limitierende Faktor für die effiziente Präsentation auf DCs ist und weniger die Antigenprozessierungs-Kapazität der DCs.

Worin könnte der Grund für die Überlegenheit nekrotischer Zellen als Antigenquelle für die Beladung von MHC II-Molekülen in DCs liegen?

Für den Vergleich von Apoptose und Nekrose als Antigenquelle wurden gleiche Mengen an Zellen verwendet. Die durch viermaliges Auftauen und Einfrieren der Zellen induzierte Nekrose entsprach mit 80-90 % lysierter Zellen (lichtmikroskopisch bestimmt) der Effizienz der durch Cisplatin ausgelösten Apoptosefrequenz (ebenfalls 80-90 %), sodass davon auszugehen war, dass die Ursachen für die beobachteten Unterschiede in der Quantität und Qualität der auf DCs übertragenen Antigene in der Art und Menge der freigesetzten Moleküle zu suchen ist. Offenbar werden die von nekrotischen Zellen freigesetzten Antigene effizienter von DCs aufgenommen oder finden leichter Zugang zu den MHC II-Beladungskompartimenten als die während der Apoptose freigesetzten. Es ist gezeigt worden, dass auch apoptotische Zellen von DCs effizient aufgenommen werden und aus apoptotischen Zellen aufgenommene Antigene CTLs präsentieren werden können (Albert et al., 1998; Albert et al., 1998b). Es wird aber diskutiert, dass die von apoptotischen Zellen aufgenommenen Antigene eher zur Induktion von Toleranz führen, da sie nicht die Reifung von DCs induzieren. Ein Mechanismus der die Auslösung von Autoimmunreaktionen verhindert, da im Organismus wahrscheinlich permanent apoptotische Zellen von DCs aufgenommen werden. Wahrscheinlich reichen für die Aufrechterhaltung von Toleranz sehr kleine Antigenmengen aus. Die hier gezeigte geringere Fähigkeit apoptotischer Zellen, die Präsentation von Neo-Antigenen auf MHC II-Molekülen von DCs zu induzieren, würde zu diesem Konzept passen, da dadurch hohe Antigenkonzentrationen und damit eventuell die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zu verhindern wäre.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod ist die Freisetzung der Hitzeschock-Proteine Hsp70, Hsp90, gp96 und Calreticulin infolge von Zellnekrose (Basu et al., 2000). Es ist gezeigt worden, dass Hsp70- und gp96-Moleküle von Tumorzellen Peptide aus MHC I-restringierten Tumorantigenen tragen und effizient von DCs und Makrophagen aufgenommen werden können (Becker et al., 2002; Srivastava et al., 1998). Aus diesem Grund werden Hsp-Peptid-Komplexe bzw. Hsp-Peptid-Fusionsproteine derzeit als Vakzine in klinischen Studien eingesetzt (Srivastava et al., 1997; Belli et al., 2002). Es ist denkbar, dass Hsps auch den Transfer von Proteinen oder Peptiden von nekrotischen Tumorzellen auf MHC II-Moleküle von DCs erleichtern. Für diese Hypothese sprechen zwei Aspekte der hier gezeigten Daten: Die effiziente Induktion von Neo-Antigenen im HLA-DR-Peptidrepertoire von DCs konnte auch erreicht werden, wenn statt ganzer Zellen nur Überstände nekrotischer, nicht aber Überstände von apoptotischen oder lebenden Zellen eingesetzt wurden. Offenbar befinden sich im Überstand nekrotischer Zellen Antigene die gut auf MHC II-Moleküle übertragbar sind, die sich im Überstand apoptotischer oder lebender Zellen nicht befinden. Die Präsenz von Hsps in den Überständen nekrotischer Zellen ist ein wesentlicher Unterschied zu den Überständen apoptotischer oder lebender Zellen (Abb. 3-21 B). Zudem konnte gezeigt werden, dass bestimmte HLA-DR-assoziierte Peptide Komplexe mit Hitzeschock-Proteinen der Hsp70-Familie eingehen können (Abb. 3-21). Dies konnte für die MHC II-Epitope GAD(114-128), COL(261-273) sowie A2(103-117) nachgewiesen

werden, für welches der effizientere Transfer aus nekrotischen Melanomzellen auf MHC II-Moleküle von DCs quantifiziert werden konnte (Tabelle 3-4). Vielleicht schützt die Assoziation bestimmter Peptide wie A2(103-117) mit Hsps diese vor Verdauung durch intrazelluläre und extrazelluläre Proteasen. Dies würde erklären, warum A2(103-117) in HLA-A2-, DR1-positiven B-Zellen und DCs als sehr dominantes Selbstpeptid bekannt ist (Chicz et al., 1993; Kropshofer et al., 2002). Auch der Befund, dass apoptotische Zellen nach Stress-induzierter Hsp-Induktion effizientere Anti-Tumor-Immunität auslösten als ohne Hsp-Induktion, spricht für die Bedeutung von Hsps bei der Übertragung von Antigenen auf DCs (Feng et al., 2001).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse also, dass speziell durch die Verwendung nekrotischer Tumorzellen ein effizienter Transfer von tumorspezifischen Antigenen auf MHC II-Moleküle von dendritischen Zellen möglich ist.

4.2.2 Identifizierung tumorspezifischer Neo-Antigene durch Analyse des MHC II-Repertoires dendritischer Zellen

Der Antigen-Transfer von Tumorzellen kann zu Veränderungen im HLA-DR-assoziierten Peptidrepertoire führen, die eine massenspektrometrische Identifizierung der Neo-Antigene möglich machen. Welche Peptide unter der Vielzahl der von nekrotischen Tumorzellen freigesetzten Antigene als dominante Neo-Epitope im MHC II-Peptidrepertoire von DCs massenspektrometrisch sichtbar werden, hängt von mehreren Faktoren ab:

- (i) Wie für das Modell-Tumorantigen HLA-A2 in Abbildung 3-18 gezeigt, ist es die Expressionsrate eines Proteins in der Tumorzelle, die darüber entscheidet, ob und in welcher Menge es zur Präsentation von Epitopen dieses Proteins auf MHC II-Molekülen von DCs kommt.
- (ii) Die Art der Freisetzung des Proteins aus den nekrotischen Tumorzellen und damit seine intrazelluläre Lokalisation in der Tumorzelle ist ein weiterer Parameter, der darüber entscheidet, wie effizient das Antigen aus den Tumorzellen von DCs aufgenommen werden kann.
- (iii) Möglicherweise ist die Fähigkeit mit Hsp-Molekülen zu assoziieren, ein wichtiger Parameter, der dafür sorgt, dass bestimmte Epitope besonders effizient auf DCs übertragen werden und damit eine hohe Kopienzahl erreichen, die sich in signifikanten Veränderungen des Peptidrepertoires manifestiert (s. oben).

(iv) Der HLA-DR-Haplotyp der verwendeten DCs entscheidet darüber, welche Epitope stabile MHC II-Peptid-Komplexe bilden und damit eine so hohe Kopienzahl erreichen, dass sie massenspektrometrisch erfasst werden können.

(v) Auch die Flugeigenschaften und der Ladungszustand des Peptids entscheiden - je nach verwendeter massenspektrometrischer Methode - darüber, ob ein auf DCs aufgeladenes Neo-Epitop detektiert werden kann.

Prinzipiell ist die Identifizierung der nach Pulsen mit nekrotischen Tumorzellen präsentierten Neo-Antigene, wie in dieser Arbeit gezeigt, über MALDI-PSD (Abb. 3-22) oder LC-MS/MS möglich (Tabelle 3-5). Die Schwierigkeit der direkten Identifizierung über MALDI-PSD liegt in der Komplexität der aus HLA-DR-Molekülen eluierten Peptidmischung. Es ist anzunehmen, dass die aufgrund der Signaldichte auftretende Signalsuppression dazu führt, dass nur ein Bruchteil der auf MHC II-Molekülen von DCs präsentierten Neo-Antigene auch tatsächlich gesehen werden kann. Nur die dominantesten Veränderungen des Peptidrepertoires, die aufgrund oben genannter Punkte entstehen, können so identifiziert werden. Die Peptidsequenzierung gepulster und ungepulster DCs mittels LC-MS/MS hat den Vorteil eines deutlich erhöhten Auflösungsvermögens, bedingt durch die zweidimensionale Auftrennung des Peptidgemisches vor der MS-Analyse und lässt damit die Identifizierung einer größeren Zahl von Neo-Antigenen zu (Tabelle 3-5).

Der Einsatz von Tumorzell-Lysat-gepulsten DCs in der Immuntherapie hat den Vorteil, dass Tumorzellen eine Vielzahl bekannter und unbekannter Antigene enthalten, gegen die T-Zell-Antworten hervorgerufen werden können (Fields et al., 1998; Brossart and Bevan, 1997). Dieser Ansatz birgt aber auch die Gefahr, dass Autoimmunreaktionen gegen Antigene ausgelöst werden können, die auch von gesunden Zellen exprimiert werden (Ludewig et al., 2000). Es ist insofern nicht davon auszugehen, dass es sich bei allen nach Pulsen mit nekrotischen Tumorzellen identifizierten Neo-Antigenen um tumorspezifische Antigene handelt. Eine mögliche tumorspezifische Expression muss in jedem Fall extra verifiziert werden.

Ein Beispiel für eine mittels MALDI-PSD identifizierte Neo-Epitop, ist das Peptid Vimentin(202-217) (Abb. 3-22). Vimentin ist bekanntermaßen ein Markerprotein für eine Reihe gutartiger und bösartiger Tumore. So wird es beispielsweise zusammen mit MART-1, Tyrosinase und S100 für das Auffinden von Melanomzellen in Gewebeproben von Melanompatienten verwendet. Wenig invasive Melanome zeigen höhere Vimentin-Expression als hochgradig invasive (Gutgemann et al., 2001). Eine erhöhte Vimentin-Expression wurde auch im Kontext anderer Krebsarten wie Prostata-Karzinomen und Nieren-Karzinomen beschrieben (Lang et al., 2002, Strassar et al., 2001). Aufgrund der ubiquitären Expression von Vimentin im gesamten Organismus, ist das identifizierte Epitop für einen möglichen Einsatz in der Tumormimmuntherapie aber zunächst nicht von primärem Interesse.

Dies galt auch für 9 der 11 mittels LC-MS/MS identifizierten Neo-Epitope (Tabelle 3-5). Für 2 Proteine, TRAIL-R2 und Melanotransferrin ist eine melanomspezifische Expression

beschrieben worden (Zhang et al., 1999; Zhao et al., 1999; Brown et al., 1981): 1. TRAIL-R2 zeigte in DCs eine nur schwache Expression, in der als Antigenquelle eingesetzten Melanomzelle Ma-Mel-18a hingegen eine ca. fünffach höhere (Daten nicht gezeigt). 2. Melanotransferrin wird von dendritischen Zellen nicht exprimiert, von Ma-Mel-18a-Zellen jedoch sehr stark (Abb. 3-27).

Melanotransferrin ist somit ein gutes Beispiel für die Übertragung eines tumorspezifischen Antigens von nekrotischen Tumorzellen auf MHC II-Moleküle dendritischer Zellen und unterstreicht die Anwendbarkeit der hier vorgestellten Methode für die Identifizierung neuer tumorspezifischer MHC II-Peptide.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt in der Tatsache, dass DCs eine Filterfunktion haben: Es werden nur solche Epitope gefunden, die von DCs prozessiert und präsentiert werden können, d.h. real existierende Epitope. Folglich erspart man sich die zeitaufwendige Identifizierung des tatsächlich präsentierten Epitops mittels überlappender Peptide, wie es für die Identifizierung von Tumorantigenen mittels tumorreaktiver T-Zellen notwendig ist. Die Methode erlaubt zwar nicht die Identifizierung mutierter Tumorantigene, da die Peptide nicht de novo sequenziert, sondern gegen eine Datenbank abgeglichen werden, mutierte Tumorantigene sind aber für die klinische Anwendbarkeit in Vakzinen weniger bedeutsam, da sie nur vereinzelt auftreten und daher nicht auf breiter Basis einsetzbar sind. Die Methode ist eher selektiv für Proteine, die in Tumorzellen stark überexprimiert werden und daher nach Aufnahme von DCs zu Neo-Epitopen führen oder für Proteine die abnormerweise nur in Tumorzellen, nicht aber in DCs präsentiert werden.

Eine wesentliche Limitation liegt im Auflösungsvermögen und in der Sensitivität der Massenspektrometrie, so dass bisher nur sehr dominante Neo-Antigene identifiziert werden können und in niedriger Kopienzahl vorliegende tumorassoziierte Epitope unentdeckt bleiben. Eine weitere Verbesserung der Auflösung und Sensitivität wird aber die Wahrscheinlichkeit erhöhen, weitere tumorassoziierte MHC II-Epitope zu entdecken, die für die Tumorstimmung benötigt werden.

4.2.3 Melanotransferrin(668-684): ein potentielles neues Antigen für die Tumorimmuntherapie

Das hier identifizierte, aus Melanomzellen auf MHC II-Moleküle von DCs übertragene Epitop Melanotransferrin(668-684) kann als aussichtsreicher Kandidat für den Einsatz in der Tumorimmuntherapie angesehen werden. Dies hat folgende Gründe:

(i) Es konnte gezeigt werden, dass Melanotransferrin(668-684) sehr gute Bindungseigenschaften für HLA-DR4 besitzt und zudem auch gut an die beiden anderen getesteten HLA-DR-Typen (HLA-DR1 und HLA-DR5) binden kann (Abb. 3-25). Die

Bindungseigenschaften des Epitops sind also relativ promisk, was für eine breite Anwendbarkeit in Vakzinierungsversuchen von großer Bedeutung ist.

(ii) Das identifizierte Epitop erwies sich als immunogen, d.h. es konnte mittels peptidbeladener dendritischer Zellen eine Melanotransferrin(668-684)-spezifische CD4⁺-T-Zell-Linie generiert werden (Abb. 3-26).

(iii) Wie die Analyse von Melanom-Biopsien und die Ergebnisse der STEP-Analyse demonstrierten, wird Melanotransferrin nicht nur in den meisten Melanomen stark exprimiert, sondern auch in anderen Krebsarten, wie Lungen- und Colonkrebs, während es in Normalgeweben nahezu nicht vorkommt (Abb. 3-27; 3-29). Melanotransferrin qualifiziert sich damit als sogenanntes *Shared Tumor Antigen*.

Melanotransferrin ist ein 738-AS-Protein, welches eine etwa 40 %-ige Sequenzidentität mit den anderen Mitgliedern der Transferrin-Familie aufweist. Melanotransferrin existiert in zwei *Splicing*-Varianten: Einer kurzen 302-AS-N-terminalen Variante, die sezerniert wird, und einer langen 738-AS-Form, aus der auch das identifizierte Epitop stammt und die über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (Sekyere et al., 2002). Die Funktion von Melanotransferrin, welches im Gegensatz zu Transferrin nur eine funktionelle Eisenbindungsstelle aufweist, ist noch nicht geklärt. Ursprüngliche Berichte, es könnte für den Eisenmetabolismus neoplastischer Zellen essentiell sein, sind umstritten (Richardson, 2000; Kwok and Richardson, 2001). Jüngste Studien schlagen eine Rolle im Zusammenhang mit der Zellmigration und –metastasierung vor (Sala et al., 2002; Demeule et al., 2003). Auch eine mögliche Funktion als Metallopeptidase ist diskutiert worden (Garratt and Jothi, 1992). Seine tumorspezifische Expression deutet darauf hin, dass es Tumorzellen einen Überlebens- oder Proliferationsvorteil verschafft und somit für die Immuntherapie ein äußerst interessantes Zielprotein ist.

Interessanterweise konnte das Epitop Melanotransferrin(668-684) nicht nur als Neo-Epitop auf dendritischen Zellen nach Kokultur mit nekrotischen Ma-Mel-18a-Zellen identifiziert werden, sondern auch als endogener MHC II-Ligand in der DR4⁺-Melanomzelllinie UKRV-Mel-17, die stark positiv für Melanotransferrin war (Tabelle 3-6). Dies ist ein wichtiges Ergebnis zur Validierung des über die dendritischen Zellen identifizierten Epitops. Die Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 weist zwar eine deutliche HLA-DR-Expression auf, ist aber absolut negativ für die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Abb. 3-28). Es ist gezeigt worden, dass die Expression von MHC II-Molekülen in Abwesenheit costimulatorischer Moleküle - speziell in Melanomzellen - relativ häufig vorkommt und offenbar ein Mechanismus ist, der Immunüberwachung zu entgehen (Becker et al., 1993; Tran et al., 1998; Fischer et al., 1999; Byrne and Halliday, 2003). Man nimmt an, dass MHC II-positive Tumoren in der Lage sind, Tumorantigene auf ihren MHC II-Molekülen zu präsentieren, um damit potentiell reaktive T-Zellen zu anergisieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese (Abb. 3-28) kam es trotz der Präsentation des Melanotransferrin(668-684)-Epitops seitens der UKRV-Mel-17 Zelle nicht zur Stimulation der MTF-spezifischen CD4⁺-T-Zell-Linie, während sie von peptidgepulsten DCs stark stimuliert wurde. Man könnte

argumentieren, dass das Epitop von der Melanomzelllinie vielleicht nicht in ausreichender Menge präsentiert wurde, um die T-Zell-Linie zu stimulieren. Da das Epitop aber massenspektrometrisch detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass es eine eher hohe Kopienzahl hat. Außerdem ließ sich die T-Zelllinie auch bereits von einer relativ geringen Peptidkonzentration durch DCs stimulieren (Abb. 3-26). Es ist also möglich, dass ein Mechanismus der T-Zell-Anergisierung oder –Tolerisierung vorliegt, was allerdings noch experimentell bewiesen werden muss.

Neben Melanotransferrin konnten im Peptidrepertoire der Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 eine Reihe weiterer tumorassoziierter Epitope identifiziert werden, die als mögliche neue Tumorantigene in Frage kommen. Die Überprüfung ihrer HLA-DR-Bindungseigenschaften und Immunogenizität steht allerdings noch aus. Bis auf MART-1 ist für keines dieser Proteine bislang ein MHC II-Epitop bekannt. Die Vielzahl der durch die direkte Sequenzierung des MHC II-Selbstpeptid-Repertoires der Melanomzelllinie UKRV-Mel-17 identifizierten tumorrelevanten Epitope, lässt diese Strategie der Identifizierung neuer Tumorantigene ebenfalls sehr aussichtsreich erscheinen. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Tumore, abgesehen von einigen Melanomen, aber MHC II-negativ sind, stellt diese Strategie keine Alternative zur Identifizierung von Tumorantigenen nach Präsentation auf dendritischen Zellen dar.

Die hier am Beispiel der Identifizierung von Melanotransferrin(668-684) gezeigte Vorgehensweise zur Identifizierung neuer MHC II-restringierter Tumorantigene stellt also eine zukunftssträchtige und vor allem im Vergleich zu bisherigen Verfahren schnelle Methode dar. Ihre systematische Anwendung - vor allem auch auf andere Tumorarten - wird in Zukunft hoffentlich zur Identifizierung einer Vielzahl neuer MHC II-Tumorantigene führen und damit vielleicht dazu beitragen, die Chancen einer erfolgreichen Tumorstimmung zu erhöhen.

5. Zusammenfassung

Die Interaktion von T-Zell-Rezeptoren mit MHC II-Selbstpeptid-Komplexen auf dendritischen Zellen scheint nicht nur für verschiedene Phasen der T-Zell-Entwicklung, sondern auch für die Regulation der T-Zell-Reaktivität gegenüber Fremantigenen von fundamentaler Bedeutung zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die HLA-DR-restringierten Selbstpeptide unreifer und reifer humaner dendritischer Zellen untersucht und mittels Nanoelektrospray LC-MS/MS über 200 Peptidsequenzen identifiziert. Es zeigte sich, dass die von unreifen und reifen DCs präsentierten Selbstpeptide weitgehend identisch waren und dass die Peptide aus Proteinen nicht nur endosomal/lysosomaler Kompartimente, sondern auch aus cytosolischen und nukleären Proteinen stammten.

Wesentlicher Unterschied in den Peptidrepertoires war die starke, selektive Anreicherung von MHC II-CLIP-Komplexen in reifen DC. Der Grund für die Akkumulation von CLIP auf der Zelloberfläche reifer DCs liegt vermutlich in der während der DC-Maturierung erfolgenden deutlichen Reduzierung der Menge und katalytischen Aktivität von HLA-DM, welches für die CLIP-Freisetzung verantwortlich ist.

CLIP wird zusammen mit exogenen Antigenpeptiden in Tetraspan-Mikrodomänen angereichert, für die eine Funktion in der T-Zell-Aktivierung beschrieben wurde, und ist Bestandteil immunologischer Synapsen. MHC II-CLIP-Komplexe auf der Zelloberfläche von DCs beeinflussen die Polarisierung naiver T-Zellen: Eine Erhöhung des Anteils CLIP-beladener MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche wirkt der T_H1 -Polarisierung entgegen und fördert die Entstehung des T_H2 und T_H0 Phänotyps. Offenbar handelt es sich bei CLIP um einen endogenen Peptidliganden, der die Art der T-Zell-Antwort gegenüber exogenen Antigenen modulieren kann.

Die Induktion und Aufrechterhaltung von Antitumor-Immunität erfordert die Aktivierung von $CD4^+$ -Helferzellen. Dazu werden in der Regel MHC II-restringierte, tumorspezifische Antigenepitope benötigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, welche die direkte, d.h. T-Zell-unabhängige, massenspektrometrische Identifizierung von Antigenen erlaubt, die von Tumorzellen auf MHC II-Moleküle von DCs übertragen wurden. Es zeigte sich, dass Antigene besonders gut auf MHC II-Moleküle von DCs übertragen wurden und zu deutlichen Veränderungen im HLA-DR-Peptidrepertoire führten, wenn nekrotische Tumorzellen zusammen mit einem zusätzlichen inflammatorischen Stimulus in einer frühen Phase der DC-Maturierung als Antigenquelle eingesetzt wurden. Der effiziente Transfer von Antigenen aus

nekrotischen Tumorzellen auf DCs, könnte durch freigesetzte Hitzeschock-Proteine vermittelt werden, die bestimmte MHC II-Epitope binden.

Mit Hilfe dieser Methode gelang die Identifizierung eines neuen, tumorspezifischen T-Helferzell-Epitops. Durch differentielle Nanoelektrospray LC-MS/MS-Analyse ungepulster versus mit nekrotischen Tumorzellen gepulster DCs konnte das erste MHC-II-Epitop des melanomspezifischen Proteins Melanotransferrin, Melanotransferrin(668-684), identifiziert werden. Das Epitop erwies sich als guter Ligand für unterschiedliche HLA-DR-Moleküle und konnte eine spezifische CD4⁺-T-Zell-Antwort induzieren. Zudem konnte es als endogener MHC II-Ligand auf einer MHC II-positiven, Melanotransferrin-exprimierenden Melanomzelllinie nachgewiesen werden.

Neben seiner melanomspezifischen Expression konnte für Melanotransferrin auch eine spezifische Überexpression in Lungen- und Colon-Karzinomen gezeigt werden, so dass das identifizierte Epitop als aussichtsreicher Kandidat für den Einsatz in Vakzinierungen angesehen werden kann.

6. Referenzen

- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." *Nature* **383**(6603): 787-93.
- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon and C. G. Figdor (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." *Nature* **387**(6634): 713-7.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* **406**(6797): 782-7.
- Agarwala, S. S. (2002). "Intermediate- and high-risk melanoma." *Curr Treat Options Oncol* **3**(3): 205-17.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998 b). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Alfonso, C., M. Liljedahl, O. Winqvist, C. D. Surh, P. A. Peterson, W. P. Fung-Leung and L. Karlsson (1999). "The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation." *Immunol Rev* **172**: 255-66.
- Alfonso, C. and L. Karlsson (2000). "Nonclassical MHC class II molecules." *Annu Rev Immunol* **18**: 113-42.
- Allison, J. P., A. A. Hurwitz and D. R. Leach (1995). "Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses." *Curr Opin Immunol* **7**(5): 682-6.
- Anderson, H. A., E. M. Hiltbold and P. A. Roche (2000). "Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation." *Nat Immunol* **1**(2): 156-62.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-401.
- Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski and et al. (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." *Nature* **357**(6373): 80-2.
- Arndt, S. O., A. B. Vogt, S. Markovic-Plese, R. Martin, G. Moldenhauer, A. Wolpl, Y. Sun, D. Schadendorf, G. J. Hammerling and H. Kropshofer (2000). "Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells." *Embo J* **19**(6): 1241-51.
- Arneson, L. S., M. Peterson and A. J. Sant (2000). "The MHC class II molecule I-Ag7 exists in alternate conformations that are peptide dependent." *J Immunol* **165**(4): 2059-67.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, R. Josien, R. M. Steinman, A. Oxenius and Y. Choi (1999). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation." *J Exp Med* **189**(7): 1025-31.
- Bakke, O. and B. Dobberstein (1990). "MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments." *Cell* **63**(4): 707-16.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka and G. Schuler (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* **106**(3): 271-4.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov (2002). "Toll-like receptors and their ligands." *Curr Top Microbiol Immunol* **270**: 81-92.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson and P. K. Srivastava (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-46.

- Becker, J. C., T. Brabletz, C. Czerny, C. Termeer and E. B. Brocker (1993). "Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma." *Int Immunol* **5**(12): 1501-8.
- Becker, T., F. U. Hartl and F. Wieland (2002). "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." *J Cell Biol* **158**(7): 1277-85.
- Belardelli, F., M. Ferrantini, E. Proietti and J. M. Kirkwood (2002). "Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 119-34.
- Bell, E. B. (1992). "Function of CD4 T cell subsets in vivo: expression of CD45R isoforms." *Semin Immunol* **4**(1): 43-50.
- Bell, E. D., A. P. May and D. L. Simmons (1998). "The leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)-binding site on ICAM-3 comprises residues on both faces of the first immunoglobulin domain." *J Immunol* **161**(3): 1363-70.
- Belli, F., A. Testori, L. Rivoltini, M. Maio, G. Andreola, M. R. Sertoli, G. Gallino, A. Piris, A. Cattelan, I. Lazzari, M. Carrabba, G. Scita, C. Santantonio, L. Pilla, G. Tragni, C. Lombardo, F. Arienti, A. Marchiano, P. Queirolo, F. Bertolini, A. Cova, E. Lamaj, L. Ascani, R. Camerini, M. Corsi, N. Cascinelli, J. J. Lewis, P. Srivastava and G. Parmiani (2002). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings." *J Clin Oncol* **20**(20): 4169-80.
- Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman and N. Bhardwaj (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." *J Immunol Methods* **196**(2): 121-35.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* **393**(6684): 478-80.
- Benvenuti, F., C. Lagaudriere-Gesbert, I. Grandjean, C. Jancic, C. Hivroz, A. Trautmann, O. Lantz and S. Amigorena (2004). "Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes." *J Immunol* **172**(1): 292-301.
- Bhandoola, A., X. Tai, M. Eckhaus, H. Auchincloss, K. Mason, S. A. Rubin, K. M. Carbone, Z. Grossman, A. S. Rosenberg and A. Singer (2002). "Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature CD4(+) T cells: evidence from a lymphopenic T cell model." *Immunity* **17**(4): 425-36.
- Bikoff, E. K., L. Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain and E. J. Robertson (1993). "Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression." *J Exp Med* **177**(6): 1699-712.
- Binder, R. J., D. K. Han and P. K. Srivastava (2000). "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." *Nat Immunol* **1**(2): 151-5.
- Binder, R. J., N. E. Blachere and P. K. Srivastava (2001). "Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules." *J Biol Chem* **276**(20): 17163-71.
- Blachere, N. E., Z. Li, R. Y. Chandawarkar, R. Suto, N. S. Jaikaria, S. Basu, H. Udono and P. K. Srivastava (1997). "Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity." *J Exp Med* **186**(8): 1315-22.
- Boel, P., C. Wildmann, M. L. Sensi, R. Bresseur, J. C. Renauld, P. Coulie, T. Boon and P. van der Bruggen (1995). "BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes." *Immunity* **2**(2): 167-75.
- Bonham, C. A., L. Lu, R. A. Banas, P. Fontes, A. S. Rao, T. E. Starzl, A. Zeevi and A. W. Thomson (1996). "TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells." *Transpl Immunol* **4**(3): 186-91.
- Boon, T., J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen and A. Van Pel (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* **12**: 337-65.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." *Immunity* **13**(6): 829-40.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brem, R., K. Oraszlan-Szovik, S. Foser, B. Bohrmann and U. Certa (2003). "Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon-alpha-responsive and non-responsive cell lines." *Cell Mol Life Sci* **60**(6): 1235-48.

- Brichard, V. G., J. Herman, A. Van Pel, C. Wildmann, B. Gaugler, T. Wolfel, T. Boon and B. Lethe (1996). "A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes." Eur J Immunol **26**(1): 224-30.
- Brocke, P., N. Garbi, F. Momburg and G. J. Hammerling (2002). "HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences." Curr Opin Immunol **14**(1): 22-9.
- Brocke, T. (1997). "Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." J Exp Med **186**(8): 1223-32.
- Brodsky, F. M. and P. Parham (1982). "Monomorphic anti-HLA-A,B,C monoclonal antibodies detecting molecular subunits and combinatorial determinants." J Immunol **128**(1): 129-35.
- Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (2001). "The immunological synapse." Annu Rev Immunol **19**: 375-96.
- Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss and M. L. Dustin (2001 b). "The immunological synapse and CD28-CD80 interactions." Nat Immunol **2**(12): 1159-66.
- Bronte, V., K. Tsung, J. B. Rao, P. W. Chen, M. Wang, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo (1995). "IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases." J Immunol **154**(10): 5282-92.
- Brossart, P. and M. J. Bevan (1997). "Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines." Blood **90**(4): 1594-9.
- Brossart, P., S. Wirths, G. Stuhler, V. L. Reichardt, L. Kanz and W. Brugger (2000). "Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells." Blood **96**(9): 3102-8.
- Brown, J. P., R. G. Woodbury, C. E. Hart, I. Hellstrom and K. E. Hellstrom (1981). "Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 539-43.
- Brunda, M. J., L. Luistro, R. R. Warriar, R. B. Wright, B. R. Hubbard, M. Murphy, S. F. Wolf and M. K. Gately (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." J Exp Med **178**(4): 1223-30.
- Burnet, F. M. (1959). "The clonal selection theory of acquired immunity." London: Cambridge University Press.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." Lancet **1**(7501): 1171-4.
- Busch, R. and E. D. Mellins (1996). "Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity." Curr Opin Immunol **8**(1): 51-8.
- Byrne, S. N. and G. M. Halliday (2003). "High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4+ T cell infiltration, enables murine skin tumours to progress." Cancer Immunol Immunother **52**(6): 396-402.
- Carey, T. E., T. Takahashi, L. A. Resnick, H. F. Oettgen and L. J. Old (1976). "Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(9): 3278-82.
- Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton and R. N. Germain (2000). "Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways." J Exp Med **191**(11): 1957-64.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L. L. Lanier and J. Banchereau (1994). "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells." J Exp Med **180**(5): 1841-7.
- Celis, E., V. Tsai, C. Crimi, R. DeMars, P. A. Wentworth, R. W. Chesnut, H. M. Grey, A. Sette and H. M. Serra (1994). "Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2105-9.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Aleardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen and A. Lanzavecchia (1999 b). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA." J Exp Med **189**(5): 821-9.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "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 **184**(2): 747-52.

- Chaturvedi, P., R. Hengeveld, M. A. Zechel, E. Lee-Chan and B. Singh (2000). "The functional role of class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in its ability to variably modulate immune responses." Int Immunol **12**(6): 757-65.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A. O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh and L. J. Old (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1914-8.
- Chen, A. I., A. J. McAdam, J. E. Buhlmann, S. Scott, M. L. Lupper, Jr., E. A. Greenfield, P. R. Baum, W. C. Fanslow, D. M. Calderhead, G. J. Freeman and A. H. Sharpe (1999). "Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions." Immunity **11**(6): 689-98.
- Chen, X., O. Laur, T. Kambayashi, S. Li, R. A. Bray, D. A. Weber, L. Karlsson and P. E. Jensen (2002). "Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development." J Exp Med **195**(8): 1053-62.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, W. S. Lane, J. C. Gorga, L. J. Stern, D. A. Vignali and J. L. Strominger (1992). "Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size." Nature **358**(6389): 764-8.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane and J. L. Strominger (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." J Exp Med **178**(1): 27-47.
- Coley, W. B. (1893). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases." Am. J. Med. Sci. **105**: 487-511.
- Constant, S., C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini and K. Bottomly (1995). "Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells." J Exp Med **182**(5): 1591-6.
- Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." Annu Rev Immunol **15**: 297-322.
- Copland, M. J., M. A. Baird, T. Rades, J. L. McKenzie, B. Becker, F. Reck, P. C. Tyler and N. M. Davies (2003). "Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells." Vaccine **21**(9-10): 883-90.
- Cox, A. L., J. Skipper, Y. Chen, R. A. Henderson, T. L. Darrow, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt and C. L. Slingluff, Jr. (1994). "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines." Science **264**(5159): 716-9.
- Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." Annu Rev Immunol **12**: 259-93.
- Das, P. K., R. M. van den Wijngaard, A. Wankowicz-Kalinska and I. C. Le Poole (2001). "A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo." Trends Immunol **22**(3): 130-6.
- Davis, M. M. and P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.
- de la Salle, H., J. Galon, H. Bausinger, D. Spehner, A. Bohbot, J. Cohen, J. P. Cazenave, W. H. Fridman, C. Sautes and D. Hanau (1997). "Soluble CD16/Fc gamma RIII induces maturation of dendritic cells and production of several cytokines including IL-12." Adv Exp Med Biol **417**: 345-52.
- Demeule, M., Y. Bertrand, J. Michaud-Levesque, J. Jodoin, Y. Rolland, R. Gabathuler and R. Beliveau (2003). "Regulation of plasminogen activation: a role for melanotransferrin (p97) in cell migration." Blood **102**(5): 1723-31.
- Denzin, L. K. and P. Cresswell (1995). "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading." Cell **82**(1): 155-65.
- Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman and P. Cresswell (1997). "Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing." Science **278**(5335): 106-9.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
- Disis, M. L., H. Bernhard, F. M. Shiota, S. L. Hand, J. R. Gralow, E. S. Huseby, S. Gillis and M. A. Cheever (1996). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines." Blood **88**(1): 202-10.
- Dongre, A. R., S. Kovats, P. deRoos, A. L. McCormack, T. Nakagawa, V. Paharkova-Vatchkova, J. Eng, H. Caldwell, J. R. Yates, 3rd and A. Y. Rudensky (2001). "In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses." Eur J Immunol **31**(5): 1485-94.
- Dubois, B., C. Massacrier, B. Vanbervliet, J. Fayette, F. Briere, J. Banchereau and C. Caux (1998). "Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes." J Immunol **161**(5): 2223-31.

- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.
- Ehrlich, P. (Pergamon, London, England, 1956). "On immunity with special reference to cell life: Cronian lecture." *The collected papers of Paul Ehrlich II: Immunology and Cancer Research*: 148-192.
- Eichmuller, S., D. Usener, A. Jochim and D. Schadendorf (2002). "mRNA expression of tumor-associated antigens in melanoma tissues and cell lines." *Exp Dermatol* **11**(4): 292-301.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva and D. W. Mullins (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." *J Leukoc Biol* **64**(3): 275-90.
- Elliott, E. A., J. R. Drake, S. Amigorena, J. Elsemore, P. Webster, I. Mellman and R. A. Flavell (1994). "The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules." *J Exp Med* **179**(2): 681-94.
- Engering, A. J., M. Cella, D. M. Fluitsma, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia and J. Pieters (1997). "Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells." *Adv Exp Med Biol* **417**: 183-7.
- Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly and A. Warner (1990). "Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells." *J Exp Med* **172**(6): 1785-94.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J Immunol* **157**(2): 541-8.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Feili-Hariri, M., X. Dong, S. M. Alber, S. C. Watkins, R. D. Salter and P. A. Morel (1999). "Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells." *Diabetes* **48**(12): 2300-8.
- Feng, H., Y. Zeng, L. Whitesell and E. Katsanis (2001). "Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity." *Blood* **97**(11): 3505-12.
- Ferrone, S. and F. M. Marincola (1995). "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance." *Immunol Today* **16**(10): 487-94.
- Fields, R. C., K. Shimizu and J. J. Mule (1998). "Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9482-7.
- Fischer, W. H., P. thor Straten, P. Terheyden and J. C. Becker (1999). "Function and dysfunction of CD4(+) T cells in the immune response to melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **48**(7): 363-70.
- Fisk, B., T. L. Blevins, J. T. Wharton and C. G. Ioannides (1995). "Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines." *J Exp Med* **181**(6): 2109-17.
- Fung-Leung, W. P., C. D. Surh, M. Liljedahl, J. Pang, D. Leturcq, P. A. Peterson, S. R. Webb and L. Karlsson (1996). "Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice." *Science* **271**(5253): 1278-81.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D. P. Carbone (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." *Nat Med* **2**(10): 1096-103.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* **5**(11): 1249-55.
- Ganpule, G., R. Knorr, J. M. Miller, C. P. Carron and M. L. Dustin (1997). "Low affinity of cell surface lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) generates selectivity for cell-cell interactions." *J Immunol* **159**(6): 2685-92.
- Garratt, R. C. and H. Jhoti (1992). "A molecular model for the tumour-associated antigen, p97, suggests a Zn-binding function." *FEBS Lett* **305**(1): 55-61.
- Garrett, W. S., L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan and I. Mellman (2000). "Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42." *Cell* **102**(3): 325-34.
- Gatti, R. A. and R. A. Good (1971). "Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review." *Cancer* **28**(1): 89-98.
- Gaugler, B., N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J. P. Szikora, C. W. Van der Spek, J. J. Patard, T. Boon, P. Schrier and B. J. Van den Eynde (1996). "A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma." *Immunogenetics* **44**(5): 323-30.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra and G. Trinchieri (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." *J Exp Med* **195**(3): 327-33.

- Glazier, K. S., S. B. Hake, H. M. Tobin, A. Chadburn, E. J. Schattner and L. K. Denzin (2002). "Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO." *J Exp Med* **195**(8): 1063-9.
- Glennie, M. J. and P. W. Johnson (2000). "Clinical trials of antibody therapy." *Immunol Today* **21**(8): 403-10.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* **23**(1): 175-82.
- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." *Nature* **402**(6759): 255-62.
- Gonzalo, J. A., T. Delaney, J. Corcoran, A. Goodearl, J. C. Gutierrez-Ramos and A. J. Coyle (2001). "Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation." *J Immunol* **166**(1): 1-5.
- Gordon, S. (1995). "The macrophage." *Bioessays* **17**(11): 977-86.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." *Cell* **111**(7): 927-30.
- Gorga, J. C., V. Horejsi, D. R. Johnson, R. Raghupathy and J. L. Strominger (1987). "Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line." *J Biol Chem* **262**(33): 16087-94.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* **285**(5425): 221-7.
- Greenberg, P. D. (1991). "Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells." *Adv Immunol* **49**: 281-355.
- Greenfield, E. A., K. A. Nguyen and V. K. Kuchroo (1998). "CD28/B7 costimulation: a review." *Crit Rev Immunol* **18**(5): 389-418.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**(6): 1101-11.
- Guilloux, Y., S. Lucas, V. G. Brichard, A. Van Pel, C. Viret, E. De Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau and T. Boon (1996). "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene." *J Exp Med* **183**(3): 1173-83.
- Gutgemann, A., M. Golob, S. Muller, R. Buettner and A. K. Bosserhoff (2001). "Isolation of invasion-associated cDNAs in melanoma." *Arch Dermatol Res* **293**(6): 283-90.
- Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford and H. Wagner (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." *Embo J* **17**(21): 6230-40.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet and J. P. Allison (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature* **356**(6370): 607-9.
- Hausmann, D. H., B. Yu, S. Hausmann and K. W. Wucherpfennig (1999). "pH-dependent peptide binding properties of the type I diabetes-associated I-Ag7 molecule: rapid release of CLIP at an endosomal pH." *J Exp Med* **189**(11): 1723-34.
- Hauss, P., F. Selz, M. Cavazzana-Calvo and A. Fischer (1995). "Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ T cells." *Eur J Immunol* **25**(8): 2285-94.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* **194**(6): 769-79.
- Hellstrom, I., J. P. Brown and K. E. Hellstrom (1982). "Workshop on monoclonal antibodies to human melanoma-associated antigens: findings of the Seattle group." *Hybridoma* **1**(4): 399-402.
- Hellstrom, K. E., I. Hellstrom and J. P. Brown (1982 b). "Human tumor-associated antigens identified by monoclonal antibodies." *Springer Semin Immunopathol* **5**(2): 127-46.
- Hoeger, P. H., M. A. Tepper, A. Faith, J. A. Higgins, J. R. Lamb and R. S. Geha (1994). "Immunosuppressant deoxyspergualin inhibits antigen processing in monocytes." *J Immunol* **153**(9): 3908-16.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan and F. R. Carbone (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." *Cell* **76**(1): 17-27.
- Hosken, N. A., K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy and A. O'Garra (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model." *J Exp Med* **182**(5): 1579-84.
- Houghton, A. N., M. Eisinger, A. P. Albino, J. G. Cairncross and L. J. Old (1982). "Surface antigens of melanocytes and melanomas. Markers of melanocyte differentiation and melanoma subsets." *J Exp Med* **156**(6): 1755-66.

- Hu, R., C. Beck, Y. B. Chang and L. J. DeGroot (1992). "HLA class II genes in Graves' disease." *Autoimmunity* **12**(2): 103-6.
- Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll and H. Levitsky (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." *J Exp Med* **188**(12): 2357-68.
- Hunter, C. A. and S. L. Reiner (2000). "Cytokines and T cells in host defense." *Curr Opin Immunol* **12**(4): 413-8.
- Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger and A. Lanzavecchia (1999). "The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization." *Eur J Immunol* **29**(12): 4092-101.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara and et al. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* **180**(5): 1849-60.
- Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R. N. Germain, I. Mellman and R. M. Steinman (2000). "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli." *J Exp Med* **191**(6): 927-36.
- Ishida, T., T. Oyama, D. P. Carbone and D. I. Gabrilovich (1998). "Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors." *J Immunol* **161**(9): 4842-51.
- Ishii, T., H. Udono, T. Yamano, H. Ohta, A. Uenaka, T. Ono, A. Hizuta, N. Tanaka, P. K. Srivastava and E. Nakayama (1999). "Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96." *J Immunol* **162**(3): 1303-9.
- Itoh, K. (1987). "[Tumor-infiltrating lymphocytes from human metastatic melanoma]." *Gan To Kagaku Ryoho* **14**(6 Pt 2): 2119-26.
- Jager, E., M. Ringhoffer, M. Arand, J. Karbach, D. Jager, C. Ilsemann, M. Hagedorn, F. Oesch and A. Knuth (1996). "Cytolytic T cell reactivity against melanoma-associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals." *Melanoma Res* **6**(6): 419-25.
- Jager, E., M. Ringhoffer, H. P. Dienes, M. Arand, J. Karbach, D. Jager, C. Ilsemann, M. Hagedorn, F. Oesch and A. Knuth (1996 b). "Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo." *Int J Cancer* **67**(1): 54-62.
- Jager, E., M. Maeurer, H. Hohn, J. Karbach, D. Jager, Z. Zidianakis, A. Bakhshandeh-Bath, J. Orth, C. Neukirch, A. Necker, T. E. Reichert and A. Knuth (2000). "Clonal expansion of Melan A-specific cytotoxic T lymphocytes in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides." *Int J Cancer* **86**(4): 538-47.
- Jager, E., D. Jager, J. Karbach, Y. T. Chen, G. Ritter, Y. Nagata, S. Gnjjatic, E. Stockert, M. Arand, L. J. Old and A. Knuth (2000 b). "Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma." *J Exp Med* **191**(4): 625-30.
- Janeway, C. A., Jr., P. J. Conrad, E. A. Lerner, J. Babich, P. Wettstein and D. B. Murphy (1984). "Monoclonal antibodies specific for Ia glycoproteins raised by immunization with activated T cells: possible role of T cellbound Ia antigens as targets of immunoregulatory T cells." *J Immunol* **132**(2): 662-7.
- Janeway, C. (1989). "Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0." *Immunol Today* **10**(9): 283-6.
- Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." *Nature* **375**(6527): 151-5.
- Johnson, J. P., M. Demmer-Dieckmann, T. Meo, M. R. Hadam and G. Riethmuller (1981). "Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin." *Eur J Immunol* **11**(10): 825-31.
- Jones, L. A., L. T. Chin, D. L. Longo and A. M. Kruisbeek (1990). "Peripheral clonal elimination of functional T cells." *Science* **250**(4988): 1726-9.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink and A. H. Enk (2001). "Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells." *Trends Immunol* **22**(7): 394-400.
- Josien, R., H. L. Li, E. Ingulli, S. Sarma, B. R. Wong, M. Vologodskaja, R. M. Steinman and Y. Choi (2000). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **191**(3): 495-502.
- Jurgens, M., A. Wollenberg, D. Hanau, H. de la Salle and T. Bieber (1995). "Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI." *J Immunol* **155**(11): 5184-9.

- Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner and P. Golstein (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science* **265**(5171): 528-30.
- Kaisho, T. and S. Akira (2001). "Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice." *Trends Immunol* **22**(2): 78-83.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." *Immunol Today* **20**(12): 561-7.
- Katz, J. D., C. Benoist and D. Mathis (1995). "T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes." *Science* **268**(5214): 1185-8.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P. F. Robbins, L. Rivoltini, J. R. Yannelli, E. Appella and S. A. Rosenberg (1994). "Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes." *J Exp Med* **180**(1): 347-52.
- Kawakami, Y., P. F. Robbins, X. Wang, J. P. Tupesis, M. R. Parkhurst, X. Kang, K. Sakaguchi, E. Appella and S. A. Rosenberg (1998). "Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles." *J Immunol* **161**(12): 6985-92.
- Kennard, M. L., D. R. Richardson, R. Gabathuler, P. Ponka and W. A. Jefferies (1995). "A novel iron uptake mechanism mediated by GPI-anchored human p97." *Embo J* **14**(17): 4178-86.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.
- Klein, G., H. O. Sjogren, E. Klein and K. E. Hellstrom (1960). "Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host." *Cancer Res* **20**: 1561-72.
- Kohrgruber, N., N. Halanek, M. Groger, D. Winter, K. Rappersberger, M. Schmitt-Egenolf, G. Stingl and D. Maurer (1999). "Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines." *J Immunol* **163**(6): 3250-9.
- Kondo, T., I. Cortese, S. Markovic-Plese, K. P. Wandinger, C. Carter, M. Brown, S. Leitman and R. Martin (2001). "Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen." *Nat Immunol* **2**(10): 932-8.
- Kotera, Y., K. Shimizu and J. J. Mule (2001). "Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization." *Cancer Res* **61**(22): 8105-9.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, L. J. Stern and G. J. Hammerling (1995). "Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules." *Science* **270**(5240): 1357-9.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, G. Moldenhauer, J. Hammer, J. S. Blum and G. J. Hammerling (1996). "Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM." *Embo J* **15**(22): 6144-54.
- Kropshofer, H., G. J. Hammerling and A. B. Vogt (1997). "How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest?" *Immunol Today* **18**(2): 77-82.
- Kropshofer, H., S. O. Arndt, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling and A. B. Vogt (1997 b). "HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH." *Immunity* **6**(3): 293-302.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena and G. J. Hammerling (1998). "A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules." *Embo J* **17**(11): 2971-81.
- Kropshofer, H., G. J. Hammerling and A. B. Vogt (1999). "The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules." *Immunol Rev* **172**: 267-78.
- Kropshofer, H., S. Spindeldreher, T. A. Rohn, N. Platania, C. Grygar, N. Daniel, A. Wolpl, H. Langen, V. Horejsi and A. B. Vogt (2002). "Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes." *Nat Immunol* **3**(1): 61-8.
- Kuchroo, V. K., C. A. Martin, J. M. Greer, S. T. Ju, R. A. Sobel and M. E. Dorf (1993). "Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis." *J Immunol* **151**(8): 4371-82.
- Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi and L. H. Glimcher (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." *Cell* **80**(5): 707-18.
- Kwok, J. C. and D. R. Richardson (2002). "The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation?" *Crit Rev Oncol Hematol* **42**(1): 65-78.

- Kwon, E. D., A. A. Hurwitz, B. A. Foster, C. Madias, A. L. Feldhaus, N. M. Greenberg, M. B. Burg and J. P. Allison (1997). "Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8099-103.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lang, S. H., C. Hyde, I. N. Reid, I. S. Hitchcock, C. A. Hart, A. A. Bryden, J. M. Vilette, M. J. Stower and N. J. Maitland (2002). "Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma." *Prostate* **52**(4): 253-63.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol* **1**(4): 311-6.
- Leach, D. R., M. F. Krummel and J. P. Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." *Science* **271**(5256): 1734-6.
- Lee, P. P., C. Yee, P. A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J. S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thompson, P. D. Greenberg, M. Roederer and M. M. Davis (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat Med* **5**(6): 677-85.
- Lenschow, D. J., K. C. Herold, L. Rhee, B. Patel, A. Koons, H. Y. Qin, E. Fuchs, B. Singh, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes." *Immunity* **5**(3): 285-93.
- Li, G., C. D'Souza-Schorey, M. A. Barbieri, R. L. Roberts, A. Klippel, L. T. Williams and P. D. Stahl (1995). "Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10207-11.
- Li, K., M. Adibzadeh, T. Halder, H. Kalbacher, S. Heinzl, C. Muller, J. Zeuthen and G. Pawelec (1998). "Tumour-specific MHC-class-II-restricted responses after in vitro sensitization to synthetic peptides corresponding to gp100 and Annexin II eluted from melanoma cells." *Cancer Immunol Immunother* **47**(1): 32-8.
- Liu, Y. J., N. Kadowaki, M. C. Rissoan and V. Soumelis (2000). "T cell activation and polarization by DC1 and DC2." *Curr Top Microbiol Immunol* **251**: 149-59.
- Lo, D., L. C. Burkly, R. A. Flavell, R. D. Palmiter and R. L. Brinster (1989). "Tolerance in transgenic mice expressing class II major histocompatibility complex on pancreatic acinar cells." *J Exp Med* **170**(1): 87-104.
- Lopez-Nevot, M. A., E. Garcia, C. Romero, M. R. Oliva, S. Serrano and F. Garrido (1988). "Phenotypic and genetic analysis of HLA class I and HLA-DR antigen expression on human melanomas." *Exp Clin Immunogenet* **5**(4): 203-12.
- Ludewig, B., A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, D. Paulin, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2000). "Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease." *J Exp Med* **191**(5): 795-804.
- Lupetti, R., P. Pissarra, A. Verrecchia, C. Farina, G. Nicolini, A. Anichini, C. Bordignon, M. Sensi, G. Parmiani and C. Traversari (1998). "Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage." *J Exp Med* **188**(6): 1005-16.
- Marshall, K. W. and J. D. Marks (2001). "Engineering and characterization of a novel fusion protein incorporating B7.2 and an anti-ErbB-2 single-chain antibody fragment for the activation of Jurkat T cells." *J Immunother* **24**(1): 27-36.
- Martin, G. R. and M. J. Evans (1975). "Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(4): 1441-5.
- Martin, W. D., G. G. Hicks, S. K. Mendiratta, H. I. Leva, H. E. Ruley and L. Van Kaer (1996). "H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection." *Cell* **84**(4): 543-50.
- Mason, D. and F. Powrie (1998). "Control of immune pathology by regulatory T cells." *Curr Opin Immunol* **10**(6): 649-55.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- Matzinger, P. (2001). "Introduction to the series. Danger model of immunity." *Scand J Immunol* **54**(1-2): 2-3.
- McLaughlin, J. P., J. Schlom, J. A. Kantor and J. W. Greiner (1996). "Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2." *Cancer Res* **56**(10): 2361-7.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." *Trends Microbiol* **8**(10): 452-6.

- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* **106**(3): 255-8.
- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* **195**(1): 15-21.
- Mittelbrunn, M., M. Yanez-Mo, D. Sancho, A. Ursa and F. Sanchez-Madrid (2002). "Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC." *J Immunol* **169**(12): 6691-5.
- Miyazaki, T., P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist and D. Mathis (1996). "Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway." *Cell* **84**(4): 531-41.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky and A. Kupfer (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Montoya, M. C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, H. T. He, P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive and F. Sanchez-Madrid (2002). "Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs." *Nat Immunol* **3**(2): 159-68.
- Moreau-Aubry, A., S. Le Guiner, N. Labarriere, M. C. Gesnel, F. Jotereau and R. Breathnach (2000). "A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma." *J Exp Med* **191**(9): 1617-24.
- Morris, P., J. Shaman, M. Attaya, M. Amaya, S. Goodman, C. Bergman, J. J. Monaco and E. Mellins (1994). "An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules." *Nature* **368**(6471): 551-4.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" *Immunity* **19**(1): 5-8.
- Mosyak, L., D. M. Zaller and D. C. Wiley (1998). "The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation." *Immunity* **9**(3): 377-83.
- Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber and H. Schreiber (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8633-8.
- Muranski, P., B. Chmielowski and L. Ignatowicz (2000). "Mature CD4+ T cells perceive a positively selecting class II MHC/peptide complex in the periphery." *J Immunol* **164**(6): 3087-94.
- Muul, L. M., P. J. Spiess, E. P. Director and S. A. Rosenberg (1987). "Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma." *J Immunol* **138**(3): 989-95.
- Naujokas, M. F., L. S. Arneson, B. Fineschi, M. E. Peterson, S. Sitterding, A. T. Hammond, C. Reilly, D. Lo and J. Miller (1995). "Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development." *Immunity* **3**(3): 359-72.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **4**(3): 328-32.
- Nestle, F. O., J. Banchereau and D. Hart (2001). "Dendritic cells: On the move from bench to bedside." *Nat Med* **7**(7): 761-5.
- Nicholson, L. B., J. M. Greer, R. A. Sobel, M. B. Lees and V. K. Kuchroo (1995). "An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis." *Immunity* **3**(4): 397-405.
- Nicholson, L. B. and V. K. Kuchroo (1996). "Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease." *Curr Opin Immunol* **8**(6): 837-42.
- Nicholson, L. B. and V. K. Kuchroo (1997). "T cell recognition of self and altered self antigens." *Crit Rev Immunol* **17**(5-6): 449-62.
- Norcross, M. A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." *Ann Immunol (Paris)* **135D**(2): 113-34.
- Nussbaum, A. K., C. Kuttler, K. P. Haderl, H. G. Rammensee and H. Schild (2001). "PAPROC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the [WWW](http://www.immunogenetics.org)." *Immunogenetics* **53**(2): 87-94.
- Old, L. J. (1996). "Immunotherapy for cancer." *Sci Am* **275**(3): 136-43.
- O'Rourke, A. M. and M. F. Mescher (1992). "Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events." *Nature* **358**(6383): 253-5.
- Ossendorp, F., E. Mengede, M. Camps, R. Filius and C. J. Melief (1998). "Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors." *J Exp Med* **187**(5): 693-702.
- Palucka, K. and J. Banchereau (2002). "How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses." *Curr Opin Immunol* **14**(4): 420-31.

- Panelli, M. C., M. P. Bettinotti, K. Lally, G. A. Ohnmacht, Y. Li, P. Robbins, A. Riker, S. A. Rosenberg and F. M. Marincola (2000). "A tumor-infiltrating lymphocyte from a melanoma metastasis with decreased expression of melanoma differentiation antigens recognizes MAGE-12." *J Immunol* **164**(8): 4382-92.
- Panelli, M. C., J. Wunderlich, J. Jeffries, E. Wang, A. Mixon, S. A. Rosenberg and F. M. Marincola (2000 b). "Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100." *J Immunother* **23**(4): 487-98.
- Panjwani, N., O. Akbari, S. Garcia, M. Brazil and B. Stockinger (1999). "The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation." *J Immunol* **163**(4): 1936-42.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." *Annu Rev Immunol* **11**: 331-60.
- Patil, N. S., A. Pashine, M. P. Belmares, W. Liu, B. Kaneshiro, J. Rabinowitz, H. McConnell and E. D. Mellins (2001). "Rheumatoid arthritis (RA)-associated HLA-DR alleles form less stable complexes with class II-associated invariant chain peptide than non-RA-associated HLA-DR alleles." *J Immunol* **167**(12): 7157-68.
- Pieper, R., R. E. Christian, M. I. Gonzales, M. I. Nishimura, G. Gupta, R. E. Settlage, J. Shabanowitz, S. A. Rosenberg, D. F. Hunt and S. L. Topalian (1999). "Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells." *J Exp Med* **189**(5): 757-66.
- Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman and I. Mellman (1997). "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." *Nature* **388**(6644): 787-92.
- Pierre, P. and I. Mellman (1998). "Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells." *Cell* **93**(7): 1135-45.
- Powrie, F. and K. J. Maloy (2003). "Immunology. Regulating the regulators." *Science* **299**(5609): 1030-1.
- Prehn, R. T. and J. M. Main (1957). "Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas." *J Natl Cancer Inst* **18**(6): 769-78.
- Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky and C. Maliszewski (2001). "Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors." *Trends Immunol* **22**(1): 41-7.
- Qi, L., J. M. Rojas and S. Ostrand-Rosenberg (2000). "Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo." *J Immunol* **165**(10): 5451-61.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells." *Immunity* **12**(6): 677-86.
- Rao, J. B., R. S. Chamberlain, V. Bronte, M. W. Carroll, K. R. Irvine, B. Moss, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo (1996). "IL-12 is an effective adjuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression." *J Immunol* **156**(9): 3357-65.
- Reed, A. M., E. J. Collins, L. P. Shock, D. G. Klapper and J. A. Frelinger (1997). "Diminished class II-associated Ii peptide binding to the juvenile dermatomyositis HLA-DQ alpha 1*0501/DQ beta 1*0301 molecule." *J Immunol* **159**(12): 6260-5.
- Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." *J Exp Med* **178**(2): 509-19.
- Renkvist, N., C. Castelli, P. F. Robbins and G. Parmiani (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." *Cancer Immunol Immunother* **50**(1): 3-15.
- Renner, C., W. Jung, U. Sahin, R. Denfeld, C. Pohl, L. Trumper, F. Hartmann, V. Diehl, R. van Lier and M. Pfreundschuh (1994). "Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells." *Science* **264**(5160): 833-5.
- Rescigno, M., F. Granucci, S. Citterio, M. Foti and P. Ricciardi-Castagnoli (1999). "Coordinated events during bacteria-induced DC maturation." *Immunol Today* **20**(5): 200-3.
- Ressing, M. E., A. Sette, R. M. Brandt, J. Ruppert, P. A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H. M. Grey, C. J. Melief and W. M. Kast (1995). "Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides." *J Immunol* **154**(11): 5934-43.
- Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour and A. Trautmann (2001). "Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells." *Nat Immunol* **2**(10): 925-31.
- Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, M. J. Surman, J. A. Barbosa and P. Cresswell (1992). "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides." *Nature* **360**(6403): 474-7.
- Richardson, D. R. (2000). "The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell." *Eur J Biochem* **267**(5): 1290-8.

- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rocha, B. and H. von Boehmer (1991). "Peripheral selection of the T cell repertoire." *Science* **251**(4998): 1225-8.
- Roche, P. A. and P. Cresswell (1990). "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding." *Nature* **345**(6276): 615-8.
- Romagnoli, P. and R. N. Germain (1994). "The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy." *J Exp Med* **180**(3): 1107-13.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." *J Immunol Methods* **196**(2): 137-51.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings and C. Traversari (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." *J Exp Med* **193**(2): F5-9.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, C. A. Seipp and et al. (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N Engl J Med* **319**(25): 1676-80.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn and D. E. White (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." *J Natl Cancer Inst* **86**(15): 1159-66.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, M. E. Dudley, S. L. Schwarz, P. J. Spiess, J. R. Wunderlich, M. R. Parkhurst, Y. Kawakami, C. A. Seipp, J. H. Einhorn and D. E. White (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Nat Med* **4**(3): 321-7.
- Rosenberg, S. A., Y. Zhai, J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, B. Roberts and D. E. White (1998 b). "Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens." *J Natl Cancer Inst* **90**(24): 1894-900.
- Rovere, P., C. Vallinoto, A. Bondanza, M. C. Crosti, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Rugarli and A. A. Manfredi (1998). "Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function." *J Immunol* **161**(9): 4467-71.
- Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown and S. T. Hwang (1999). "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* **162**(5): 2472-5.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." *Cell* **101**(5): 455-8.
- Sala, R., W. A. Jefferies, B. Walker, J. Yang, J. Tiong, S. K. Law, M. F. Carlevaro, E. Di Marco, A. Vacca, R. Cancedda, F. D. Cancedda and D. Ribatti (2002). "The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo." *Eur J Cell Biol* **81**(11): 599-607.
- Salazar-Onfray, F. (1999). "Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance." *Med Oncol* **16**(2): 86-94.
- Salio, M., V. Cerundolo and A. Lanzavecchia (2000). "Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells." *Eur J Immunol* **30**(2): 705-8.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin and A. Lanzavecchia (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **28**(9): 2760-9.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-40.
- Salter, R. D., D. N. Howell and P. Cresswell (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." *Immunogenetics* **21**(3): 235-46.

- Santambrogio, L., A. K. Sato, G. J. Carven, S. L. Belyanskaya, J. L. Strominger and L. J. Stern (1999). "Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15056-61.
- Santambrogio, L., A. K. Sato, F. R. Fischer, M. E. Dorf and L. J. Stern (1999 b). "Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15050-5.
- Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj (2000). "Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells." J Exp Med **191**(3): 423-34.
- Schadendorf, D. and F. O. Nestle (2001). "Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer--an update." Recent Results Cancer Res **158**: 236-48.
- Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic and H. G. Rammensee (2000). "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." Eur J Immunol **30**(8): 2216-25.
- Schirle, M., T. Weinschenk and S. Stevanovic (2001). "Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens." J Immunol Methods **257**(1-2): 1-16.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
- Sebzda, E., V. A. Wallace, J. Mayer, R. S. Yeung, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1994). "Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide." Science **263**(5153): 1615-8.
- Seder, R. A. and W. E. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol **12**: 635-73.
- Sekyere, E., M. R. Food and D. R. Richardson (2002). "A second melanotransferrin gene (MTF2) and a novel protein isoform: explanation for the membrane-bound and soluble forms of melanotransferrin?" FEBS Lett **512**(1-3): 350-2.
- Sette, A., S. Ceman, R. T. Kubo, K. Sakaguchi, E. Appella, D. F. Hunt, T. A. Davis, H. Michel, J. Shabanowitz, R. Rudersdorf and et al. (1992). "Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant." Science **258**(5089): 1801-4.
- Sette, A., S. Southwood, J. Miller and E. Appella (1995). "Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II." J Exp Med **181**(2): 677-83.
- Sheil, A. G. (1986). "Cancer after transplantation." World J Surg **10**(3): 389-96.
- Sherman, M. A., D. A. Weber and P. E. Jensen (1995). "DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide." Immunity **3**(2): 197-205.
- Shevach, E. M. (2000). "Regulatory T cells in autoimmunity*." Annu Rev Immunol **18**: 423-49.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shurin, M. R., Z. R. Yurkovetsky, I. L. Tourkova, L. Balkir and G. V. Shurin (2002). "Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10." Int J Cancer **101**(1): 61-8.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Slingluff, C. L., Jr., G. Yamshchikov, P. Neese, H. Galavotti, S. Eastham, V. H. Engelhard, D. Kittlesen, D. Deacon, S. Hibbitts, W. W. Grosh, G. Petroni, R. Cohen, C. Wiernasz, J. W. Patterson, B. P. Conway and W. G. Ross (2001). "Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes." Clin Cancer Res **7**(10): 3012-24.
- Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins and D. M. Zaller (1995). "Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR." Nature **375**(6534): 802-6.
- Smith, M. H., A. A. Nuara, J. G. Egen, D. B. Sirjani, K. S. Lam and W. J. Grimes (1998). "Baculoviral expressed HLA class I heavy chains used to screen a synthetic peptide library for allele-specific peptide binding motifs." Mol Immunol **35**(16): 1033-43.
- Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi and A. Mantovani (1999). "The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking." J Leukoc Biol **66**(1): 1-9.
- Spits, H., F. Couwenberg, A. Q. Bakker, K. Weijer and C. H. Uittenbogaart (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-84.
- Squier, M. K. and J. J. Cohen (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol **6**(3): 447-52.

- Srivastava, P. K. (1997). "Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens." *Methods* **12**(2): 165-71.
- Srivastava, P. K., A. Menoret, S. Basu, R. J. Binder and K. L. McQuade (1998). "Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world." *Immunity* **8**(6): 657-65.
- Stackpole, C. W. (1981). "Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma." *Nature* **289**(5800): 798-800.
- Stassar, M. J., G. Devitt, M. Brosius, L. Rinnab, J. Prang, T. Schradin, J. Simon, S. Petersen, A. Kopp-Schneider and M. Zoller (2001). "Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization." *Br J Cancer* **85**(9): 1372-82.
- Stefanova, I., J. R. Dorfman and R. N. Germain (2002). "Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes." *Nature* **420**(6914): 429-34.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 351-8.
- Steinman, R. M. (2003). "The control of immunity and tolerance by dendritic cell." *Pathol Biol (Paris)* **51**(2): 59-60.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba and M. Nussenzweig (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." *Ann N Y Acad Sci* **987**: 15-25.
- Stevanovic, S. and H. G. Rammensee (1994). "Identification of T-cell epitopes using allele-specific ligand motifs." *Behring Inst Mitt*(95): 7-13.
- Stevanovic, S. (2002). "Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 514-20.
- Stockinger, B. (1999). "T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms." *Adv Immunol* **71**: 229-65.
- Strettell, M. D., P. T. Donaldson, L. J. Thomson, P. J. Santrach, S. B. Moore, A. J. Czaja and R. Williams (1997). "Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis." *Gastroenterology* **112**(6): 2028-35.
- Stutman, O. (1975). "Immunodepression and malignancy." *Adv Cancer Res* **22**: 261-422.
- Sutmuller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa and C. J. Melief (2001). "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." *J Exp Med* **194**(6): 823-32.
- Tada, T., S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X. F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara and T. Hamaoka (1991). "Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state." *J Immunol* **146**(3): 1077-82.
- Tamura, Y., P. Peng, K. Liu, M. Daou and P. K. Srivastava (1997). "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations." *Science* **278**(5335): 117-20.
- Tang, H. L. and J. G. Cyster (1999). "Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells." *Science* **284**(5415): 819-22.
- Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). "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* **190**(11): 1669-78.
- Tilgen, W., I. Hellstrom, M. Engstner, H. J. Garrigues, R. Riehl and K. E. Hellstrom (1983). "Localization of melanoma-associated antigen p97 in cultured human melanoma, as visualized by light and electron microscopy." *J Invest Dermatol* **80**(5): 459-63.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa and C. J. Melief (1999). "CD4 T cells and their role in antitumor immune responses." *J Exp Med* **189**(5): 753-6.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302**(5909): 575-81.
- Tonegawa, S. (1988). "Antibody and T-cell receptors." *Jama* **259**(12): 1845-7.
- Tonegawa, S. (1988 b). "Somatic generation of immune diversity." *Biosci Rep* **8**(1): 3-26.
- Topalian, S. L., D. Solomon and S. A. Rosenberg (1989). "Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas." *J Immunol* **142**(10): 3714-25.

- Topalian, S. L. (1994). "MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy." *Curr Opin Immunol* **6**(5): 741-5.
- Topalian, S. L., M. I. Gonzales, M. Parkhurst, Y. F. Li, S. Southwood, A. Sette, S. A. Rosenberg and P. F. Robbins (1996). "Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes." *J Exp Med* **183**(5): 1965-71.
- Topilski, I., A. Harmelin, R. A. Flavell, Y. Levo and I. Shachar (2002). "Preferential Th1 immune response in invariant chain-deficient mice." *J Immunol* **168**(4): 1610-7.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." *Science* **259**(5093): 368-70.
- Townsend, S. E., F. W. Su, J. M. Atherton and J. P. Allison (1994). "Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors." *Cancer Res* **54**(24): 6477-83.
- Tran, C. T., P. Wolz, R. Egensperger, S. Kosel, Y. Imai, K. Bise, S. Kohsaka, P. Mehraein and M. B. Graeber (1998). "Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance." *Neuropathol Appl Neurobiol* **24**(4): 293-301.
- Traversari, C., P. van der Bruggen, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. De Plaen, A. Amar-Costesec and T. Boon (1992). "A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E." *J Exp Med* **176**(5): 1453-7.
- Trinchieri, G. and P. Scott (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions." *Res Immunol* **146**(7-8): 423-31.
- Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert and I. Mellman (2003). "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation." *Science* **299**(5611): 1400-3.
- Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman and I. Mellman (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* **288**(5465): 522-7.
- Van den Eynde, B., O. Peeters, O. De Backer, B. Gaugler, S. Lucas and T. Boon (1995). "A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *J Exp Med* **182**(3): 689-98.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-7.
- van Elsas, A., R. P. Suttmuller, A. A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villaseñor, J. P. Medema, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, C. J. Melief, R. Offringa and J. P. Allison (2001). "Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy." *J Exp Med* **194**(4): 481-9.
- van Ham, S. M., E. P. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale and J. Neefjes (1997). "HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading." *Curr Biol* **7**(12): 950-7.
- Vidal, K. and P. M. Allen (1996). "The effect of endogenous altered peptide ligands on peripheral T-cell responses." *Semin Immunol* **8**(2): 117-22.
- Villadangos, J. A., M. Cardoso, R. J. Steptoe, D. van Berkel, J. Pooley, F. R. Carbone and K. Shortman (2001). "MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation." *Immunity* **14**(6): 739-49.
- Vincent, F., A. Eischen, J. P. Bergerat, A. Faradji, A. Bohbot and F. Oberling (1992). "Human blood-derived macrophages: differentiation in vitro of a large quantity of cells in serum-free medium." *Exp Hematol* **20**(1): 17-23.
- Viret, C., F. S. Wong and C. A. Janeway, Jr. (1999). "Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition." *Immunity* **10**(5): 559-68.
- Viville, S., J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist and D. Mathis (1993). "Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain." *Cell* **72**(4): 635-48.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, G. Moldenhauer and G. J. Hammerling (1996). "Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9724-9.
- Vogt, A. B., S. Spindeldreher and H. Kropshofer (2002). "Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains." *Immunol Rev* **189**: 136-51.
- von Boehmer, H. and P. Kisielow (1990). "Self-nonsel self discrimination by T cells." *Science* **248**(4961): 1369-73.
- Wang, R. F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang and S. A. Rosenberg (1996). "Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **184**(6): 2207-16.

- Wang, R. F., S. L. Johnston, S. Southwood, A. Sette and S. A. Rosenberg (1998). "Recognition of an antigenic peptide derived from tyrosinase-related protein-2 by CTL in the context of HLA-A31 and -A33." *J Immunol* **160**(2): 890-7.
- Wang, R. F. and S. A. Rosenberg (1999). "Human tumor antigens for cancer vaccine development." *Immunol Rev* **170**: 85-100.
- Wang, R. F., X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian and S. A. Rosenberg (1999). "Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen." *Science* **284**(5418): 1351-4.
- Wang, R. F., X. Wang and S. A. Rosenberg (1999 b). "Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+) T cells." *J Exp Med* **189**(10): 1659-68.
- Wang, R. F. (2001). "The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity." *Trends Immunol* **22**(5): 269-76.
- Washburn, M. P., D. Wolters and J. R. Yates, 3rd (2001). "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." *Nat Biotechnol* **19**(3): 242-7.
- Weber, D. A., B. D. Evavold and P. E. Jensen (1996). "Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM." *Science* **274**(5287): 618-20.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde and D. Beach (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science* **269**(5228): 1281-4.
- Wolpl, A., T. Halder, H. Kalbacher, H. Neumeyer, K. Siemoneit, S. F. Goldmann and T. H. Eiermann (1998). "Human monoclonal antibody with T-cell-like specificity recognizes MHC class I self-peptide presented by HLA-DR1 on activated cells." *Tissue Antigens* **51**(3): 258-69.
- Wu, L. C., D. S. Tuot, D. S. Lyons, K. C. Garcia and M. M. Davis (2002). "Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC." *Nature* **418**(6897): 552-6.
- Wulfing, C., C. Sumen, M. D. Sjaastad, L. C. Wu, M. L. Dustin and M. M. Davis (2002). "Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition." *Nat Immunol* **3**(1): 42-7.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 235-47.
- Yoshida, R., M. Nagira, M. Kitaura, N. Imagawa, T. Imai and O. Yoshie (1998). "Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7." *J Biol Chem* **273**(12): 7118-22.
- Zajac, A. J., K. Murali-Krishna, J. N. Blattman and R. Ahmed (1998). "Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells." *Curr Opin Immunol* **10**(4): 444-9.
- Zarour, H. M., B. Maillere, V. Brusic, K. Coval, E. Williams, S. Pouvell-Moratille, F. Castelli, S. Land, J. Bennouna, T. Logan and J. M. Kirkwood (2002). "NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells." *Cancer Res* **62**(1): 213-8.
- Zeng, G., C. E. Touloukian, X. Wang, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg and R. F. Wang (2000). "Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules." *J Immunol* **165**(2): 1153-9.
- Zhang, X. D., A. Franco, K. Myers, C. Gray, T. Nguyen and P. Hersey (1999). "Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma." *Cancer Res* **59**(11): 2747-53.
- Zhao, S., Z. Asgary, Y. Wang, R. Goodwin, M. Andreeff and A. Younes (1999). "Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells." *Br J Haematol* **106**(3): 827-32.
- Zhu, Y., A. Y. Rudensky, A. L. Corper, L. Teyton and I. A. Wilson (2003). "Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif." *J Mol Biol* **326**(4): 1157-74.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." *Nature* **248**(450): 701-2.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	DIC	engl.: Difference Interference Contrast
ACN	Acetonitril		
Ak	Antikörper	DMSO	Dimethylsulfoxid
APC	Antigenpräsentierende Zelle	DNA	Desoxyribonukleinsäure
APL	engl.: Altered Peptide Ligand	dsRNA	engl.: double strand RNA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DTT	1,4-Dithiotreithol
AS	Aminosäure	EBV	Epstein Barr Virus
ATCC	engl.: American Type Culture Collection	EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
AU	engl.: Arbitrary Units	ELISA	engl.: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
BAGE	B-Melanoma Antigen	engl	englisch
Bio	biotinyliert	ER	Endoplasmatisches Retikulum
B-LCL	engl.: B-Lymphoblastoid Cell Line	Eu	Europium
BSA	engl.: Bovine Serum Albumin	FACS	engl.: Fluorescence-Assisted Cell Sorting
CCR	CC Chemokin Rezeptor	FCS	fötales Kälberserum
CD	engl.: Cluster of Differentiation	Fcy-R	engl.: Fc gamma chain Receptor
CDC	engl.: Cell Division Cycle Protein	FITC	Fluorescein Isothiozyanat
CDK	engl.: Cyclin Dependent Kinase	Fmoc	9-Fluorenylmethoxy-carbonyl
cDNA	engl.: Complementary DNA	g	Gravitationskonstante
CLA	engl.: Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen	GAD	Glutamat Decarboxylase
CLIP	engl.: Class II-associated Invariant Chain Peptide	GAGE	G-Antigen 1
COL	Kollagen Typ II	GaHu	engl.: Goat-anti-Human
cSMAC	engl.: central SMAC	GaM	engl.: Goat-anti-Mouse
cTECs	corticale Thymusepithelzellen	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
CTL	Cytotoxischer T-Lymphocyt	GM-CSF	engl.: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
DC	Dendritische Zelle	GPI	Glycosyl-Phosphatidy-Inositol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O	HA	Hämagglutinin
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat	HAc	Essigsäure
		HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure

HFBA	Heptafluorbuttersäure	MIP	engl.: Macrophage
HLA	engl.: Human Leucocyte Antigen	MS	Inflammarory Protein Massenspektrometrie
HPV	Humanes Papillomavirus	MS/MS	Tandemmassenspektro- metrie
Hsp	engl.: Heat shock protein	mTECs	medulläre Thymusepithelzellen
hu	human	MTF	Melanotransferrin
ICAM	engl.: Intercellular Adhesion Molecule	MudPit	engl.: Multidimensional Protein Identification Technology
IF	Immun- Fluoreszenzmikroskopie	Mw	engl.: Molecular weight
IFN	Interferon	n	Anzahl
Ii	Invariante Kette	ng	Nanogramm
IL	Interleukin	NKT-Zelle	NK1-T-Zellen
IM	Unreife DCs (engl.: unreife DCs)	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
IP	Immunpräzipitation	nm	Nanometer
kDa	Kilodalton	NTP	Nukleosid-Triphosphat
LC	engl.: Liquid Chromatography	NY-ESO	New York Esophageal-1
LFA	engl.: Lymphocyte function- associated antigen	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorede
LPS	Lipopolysaccharid	PARP	Poly-ADP-Ribose- Polymerase
LSM	engl.: Lymphocyte Separation Medium	PBMCs	engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cells
Lys C	Endoproteinase Lys C	PBS	Phosphatpuffer
M	Molar (mol/l)	PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction
m/z	Masse pro Ladung	PE	Phycoerythrin-R
MACS	engl.: Magnetic Cell Sorting	pg	Picogramm
MAGE	engl.: Melanoma-Associated Antigen	PGE2	Prostaglandin E2
MALDI-MS	engl.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry	pH	potentia Hydrogeni
MART	engl.: Melanoma Antigen Recognited by T-Cells	PHA-L	Phytohämagglutinin-L
MAT	Reife DCs (engl.: mature DCs)	PMA	Phorbol-12-Myristat-13- Acetat
MBP	Basisches Myelinprotein	PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid
MFI	Mittlerer Fluoreszenz Index	POX	Meerrettichperoxidase
mg	Milligramm	PRR	engl.: Pattern Recognition Receptor
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex	PSD	engl.: Post Source Decay
		pSMAC	engl.: peripheral SMAC
		PVDF	Poly-(Vinyliden-Difluorid)

RNA	Ribonukleinsäure	TT	Tetanus Toxin
RP	engl.: Reversed Phase	U	engl.: Units
RP-HPLC	engl.: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographie	ÜS	Hybridom Überstand
		VEGF	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor
RT	Raumtemperatur	WB	engl.: Western Blot
RTr	Reverse Transkriptase	µg	Mikrogramm
SA	Streptavidin	µl	Mikroliter
SCX	engl.: Strong Cation Exchange	µm	Mikrometer
SDS	Sodium-Duodecylsulfat	µM	Mikromolar
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B	µs	Mikrosekunde
SFI	Spezifischer Fluoreszenz- Index		
SLC	engl.: Secondary Lymphoid tissue Chemokine		
SMAC	engl.: Supramolecular Activation Cluster		
STEP	engl.: Single Target Expression Profiling		
tBu	tert-Butyl		
TCR	T-Zell-Rezeptor		
TFA	Trifluoressigsäure		
TGF	engl.: Transforming Growth Factor		
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk		
T _H	T-Helferzelle		
TIC	engl.: Total Ion Current		
TIL	engl.: Tumor Infiltrating Lymphocytes		
TLR	engl.: Toll-Like Receptor		
TNF	Tumornekrosefaktor		
TOF	engl.: Time Of Flight		
TPI	Triosephosphat Isomerase		
TRANCE	engl.: TNF-Related Activation-induced Cytokine		
Treg	Regulatorische T-Zelle		
Tris	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan		
TRP	engl.: Tyrosinase Related Protein		

8. Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne Vogt und Herrn PD Dr. Harald Kropshofer für die Überlassung des ausgesprochen interessanten und anspruchsvollen Promotionsthemas, die exzellente Betreuung und kompetente Anleitung meiner Arbeit, ihre stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie ihren inspirierenden und motivierenden Einfluss, von dem ich viel habe lernen können. Nicht zuletzt möchte ich ihnen auch für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und ihr ständiges Interesse an meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Universität Tübingen, möchte ich in besonderer Weise dafür danken, die externe Betreuung und Berichterstattung meiner Promotion übernommen zu haben und mir die Möglichkeit zu geben, an der Universität Tübingen zu promovieren.

Herrn PD Dr. Hanno Langen und Herrn Prof. Dr. Klaus Lindpaintner danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Roche Center for Medical Genomics in der Abteilung Proteomics anfertigen zu können.

Für technische und wissenschaftliche Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Frau Caroline Lallouet für exzellente experimentelle Unterstützung, ständige Hilfsbereitschaft, angenehme und professionelle Zusammenarbeit sowie moralische Unterstützung.

Frau Nicole Platania, Nadine Daniel und Herrn Sebastian Krasnici für hervorragende technische Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Sebastian Spindeldreher für die gute Zusammenarbeit, hilfreiche Diskussionen, Unterstützung bei der konfokalen Immun-Fluoreszenzmikroskopie sowie Hilfe bei zahlreichen kleineren und größeren Computerproblemen.

Herrn Dr. Dirk Wolters und Herrn Dr. Bernd Müller für die Einarbeitung in die LC-MS/MS und die Analyse zahlreicher Proben.

Herrn Dr. Gerrit Buurman, Frau Dr. Sabine Suppmann und Frau Dr. Franziska Regennass für hilfreiche Diskussionen, wissenschaftliche Unterstützung und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Herrn Daniel Röder für die Einarbeitung in die MALDI-MS und MALDI-PSD-MS.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Certa für die Möglichkeit, die RNA-Microarray-Analyse zu erlernen.

Herrn Dr. Jürgen Hammer und Frau Dr. Holly Hilton für die experimentelle Durchführung der STEP-Analyse.

Herrn Dr. Jens Derbinski für die Präparation corticaler und medullärer Thymusepithelzellen, thymaler DCs und Makrophagen.

Am Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Frau Angela für ihre permanente und uneingeschränkte Unterstützung, ihre aufbauenden Worte, ihr Verständnis und ihre große Geduld bedanken.

Nicht zuletzt gilt meine tiefste Dankbarkeit meinen Eltern, die durch ihre wohlwollende finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotionszeit mir all dies ermöglicht haben.

9. Publikationen

Röhn, T. A., Wagenknecht, B., Roth, W., Naumann, U., Gulbins, E., Krammer, P.H., Walczak, H., Weller, M. (2001) CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene*. 20: 4128-4137.

Kropshofer, H., Spindeldreher, S., **Röhn, T. A.**, Platania, N., Grygar, C., Daniel, N., Wölpl, A., Langen H., Horejsi V., Vogt, A.B. (2002) Tetraspan micodomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nature Immunology* 3 (1): 61-68

Röhn, T. A., Schadendorf, D., Yuansheng, S., Nguyen, D., Röder, D., Langen, H., Vogt, A. B., Kropshofer, H. Melanoma cell necrosis facilitates transfer of specific sets of antigen onto MHC class II molecules of dendritic cells (*eingereicht*).

Röhn, T. A., Wolters, D., Müller, B., Langen, H., Vogt, A.B., Kropshofer, H. Self-peptide CLIP up-regulated on mature dendritic cells antagonizes T_H1 polarisation (*eingereicht*).

Patentanmeldungen:

Vogt, A. B., **Röhn, T.A.**, Kropshofer, H. Novel MHC II Associated Peptides.
European Patent Application No. 02022224.6; Filing Date October 2, 2002.

10. Wissenschaftliche Präsentationen

24.-27. September 2001: Kurzvortrag und Posterpräsentation auf der 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Dresden: „Human dendritic cells counter-regulate HLA-DR and HLA-DM in the course of maturation.“

23. Juni 2003: Kurzvortrag auf dem „Offside Meeting“ des Roche Center for Medical Genomics, Basel: „Tumor antigens in human cancer.“

10.-12. August 2003: Vortrag auf dem 2. Roche Genetics Symposium in Föhlingen, Schweiz: „Identification and validation of a novel MHC class II restricted tumor epitope.“

20.-24. September 2003: Posterpräsentation auf dem 2. ELSO Meeting in Dresden: „Melanoma cell necrosis facilitates transfer of specific sets of antigen onto MHC class II molecules of dendritic cells.“

25.-27. September 2003: Posterpräsentation auf der 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin: „Melanoma cell necrosis facilitates transfer of specific sets of antigen onto MHC class II molecules of dendritic cells.“

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Eberhard-Karls-Universität Tübingen:

Dr. Bayer, Prof. Dr. Bisswanger, Prof. Dr. Bock, Prof. Dr. Breyer-Pfaff, Prof. Dr. Bohley, Prof. Dr. Duszenko, Prof. Dr. Eisele, Prof. Dr. Fröhlich, Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Götz, Dr. Günzel, Prof. Dr. Hagenmaier, Prof. Dr. Hamprecht, Prof. Dr. Hanack, Prof. Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Jung, Prof. Dr. Lindner, Prof. Dr. Mecke, Prof. Dr. Nakel, Prof. Dr. Overath, Prof. Dr. Oelkrug, Prof. Dr. Pfaff, Prof. Dr. Pfeiffer, Prof. Dr. Pommer, Prof. Dr. Probst, Prof. Dr. Rammensee, Prof. Dr. Reutter, Prof. Dr. Dr. h.c. Strähle, Prof. Dr. Dr. h.c. Voelter, Prof. Dr. Dr. h.c. Wegmann, Prof. Dr. Weber, PD Dr. Weller, Prof. Dr. Werringloer, Prof. Dr. Weser

University of Missouri, Columbia, U.S.A:

Prof. Dr. Bennett, Prof. Dr. Cannon, Prof. Dr. Martin, Prof. Dr. Folk, Prof. Dr. Quinn, Prof. Dr. Randall, Prof. Dr. Rovetto, Dr. P. Tipton, Prof. Dr. Wall, Prof. Dr. Zahler

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen:

Prof. Dr. P. Overath

12. Tabellarischer Lebenslauf

1. ANGABEN ZUR PERSON

Name: Till Alexander Röhn
Geburtsdatum: 3. Januar 1974
Geburtsort: Oldenburg
Ehestand: verheiratet

2. AUSBILDUNG

1980-1993	Abitur am "Alten Gymnasium" in Oldenburg
7/1993 - 9/1994	Zivildienst als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst Oldenburg
10/1994 – 3/1997	Biochemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Biochemie Vordiplom)
8/1997 – 5/1998	Biochemiestudium an der "University of Missouri", USA, als Fulbright Stipendiat
3/1999 – 5/1999	Industriepraktikum am Pharmaforschungszentrum der Bayer AG in Wuppertal
11/ 1999-6/ 2000	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Weller, Abteilung Neuro-Onkologie des Universitätsklinikums Tübingen: "Apo2L/TRAIL-vermittelte Apoptose maligner Gliomzellen: Signaltransduktion und Potenzierung durch Zytostatika"
6/2000	Abschluß des Biochemiestudiums in Tübingen mit dem Diplom, Gesamtnote: sehr gut
10/2000 – 12/2003	Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Anne Vogt und PD Dr. Harald Kropshofer am Basel Institut für Immunologie bzw. Roche Center for Medical Genomics: „Endogene und tumorassoziierte MHC Klasse II-Liganden in humanen dendritischen Zellen“

