

Aus der Sektion für
Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. M. Gramatzki) des
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**SELEKTIVE AKTIVIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN
DURCH REKOMBINANTE CD40-GERICHTETE TRIBODIES
IM HINBLICK AUF DIE ANTI-TUMOR-VAKZINIERUNG
BEIM MULTIPLN MYELOM**

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
CATENHUSEN, INGA REBEKKA
aus Münster
Kiel 2013

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. R. Repp

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. D. Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung:

16.12.2013

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 16.12.2013

gezeichnet:

Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Für Lore.

„Was man von der Mutter hat, das sitzt fest und lässt sich nicht ausreden.“

(Wilhelm Raabe, 1831-1910)

Inhaltsverzeichnis.....	I-III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV-V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI-VII
1. Einleitung	1
1.1. Das Multiple Myelom	1
1.1.1. Charakterisierung und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms.....	1
1.1.2. Therapie des Multiplen Myeloms	3
1.2. Immuntherapeutische Strategien.....	4
1.3. Dendritische Zellen	6
1.3.1. Antigen-Beladung Dendritischer Zellen.....	8
1.3.2. Rezeptor-vermittelte Beladung Dendritischer Zellen.....	10
1.3.3. Strategien zur Reifung Dendritischer Zellen	12
1.3.4. Kombination von Antigen-Beladung und Reifung Dendritischer Zellen	13
1.4. Ziele der Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Kits.....	17
2.1.2. Medien, Enzyme, Lösungen	17
2.1.3. Zytokine.....	18
2.1.4. Antikörper	18
2.1.5. Lymphozyten	20
2.1.6. Bakterien, eukaryotische Zelllinien	20
2.1.7. Moleküle	20
2.2. Methoden.....	20
2.2.1. Transformation von Bakterien	20
2.2.2. Plasmid-Präparation	21
2.2.3. Hydrolyse von Plasmid-DNA.....	21
2.2.4. DNA-Gelelektrophorese.....	22
2.2.5. Gelelution.....	22
2.2.6. Ligation	22
2.2.7. Elektroporation von CHO-Zellen.....	22
2.2.8. <i>In vitro</i> Mutagenese von DNA	23
2.2.9. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen.....	23
2.2.10. Chromatographie zur Aufreinigung von Protein.....	23

2.2.11. SDS-Pulsfeldgelelektrophorese	24
2.2.12. Western-Blot	25
2.2.13. Experion™ Automated Electrophoresis System.....	25
2.2.14. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut.....	26
2.2.15. Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque™-Plus.....	26
2.2.16. Bestimmung der Zellzahl.....	27
2.2.17. Anreicherung monozytärer Zellen durch magnetische Zellseparation.....	27
2.2.18. Differenzierung monozytärer Zellen hin zu Dendritischen Zellen	28
2.2.19. Maturation unreifer Dendritischer Zellen	28
2.2.20. Durchflusszytometrie.....	29
3. Ergebnisse	31
3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine	33
3.1.1. Klonierung der Tribodies.....	33
3.1.2. Charakterisierung der [(CD40 scFv x HM1.24) x CD20 Fab]-Tribody- Klone durch DNA-Hydrolyse und Gelelektrophorese.....	35
3.1.3. Expression und Anreicherung der rekombinanten Moleküle	36
3.1.4. Qualitative und quantitative Charakterisierung der produzierten Proteine	37
3.1.5. <i>In vitro</i> Mutagenese des [(CD40 scFv x HM1.24) x CD20-Fab]-Derivats	42
3.1.6. Expression des CD20 Fab mit mutagenisiertem HM1.24	44
3.1.7. Nachweis der Bindungsspezifitäten.....	45
3.2. Charakterisierung des Ausgangsmaterials	48
3.2.1. Anteil an Monozyten und T-Zellen in Lymphozytenkonzentraten	49
3.2.2. Effizienz der CD14-positiven Selektion über MACS.....	50
3.2.3. CD40-Expression auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen	52
3.2.4. Expressionshöhe des FcγRI (CD64) Rezeptors auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen.....	54
3.3. Reifung der Dendritischen Zell-Populationen	56
4. Diskussion	60
4.1. Immuntherapeutische Strategien.....	60
4.2. Wahl des Formates zur Antigenbeladung Dendritischer Zellen <i>in vivo</i>	60
4.3. Geeignete Oberflächenantigene zur Adressierung Dendritischer Zellen	63
4.4. Gleichzeitige Beladung und Aktivierung Dendritischer Zellen-CD40 im Mittelpunkt der Immuntherapie	64
4.5. Strategien zur Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten <i>in</i>	

<i>vitro</i> und deren Einfluss auf eine Verwendung der Dendritischen Zellen zur Anti-Tumor-Impfung <i>in vivo</i>	65
4.6. Geeignete Tumorantigene des Multiplen Myeloms.....	67
4.7. Weiterentwicklung der Moleküle zur Optimierung von Anti-Tumor- Vakzinierungsstrategien	69
5. Zusammenfassung.....	71
6. Literatur.....	73
7. Veröffentlichungen.....	i
8. Danksagung.....	ii
9. Lebenslauf	iii

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependant cellular cytotoxicity (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AK	Antikörper
APC	antigen-presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
β₂-M	beta-2-Mikroglobulin
B-Zelle	B-Lymphozyt; <u>b</u> one-marrow oder <u>B</u> ursa fabricii
CAR	coxsackie adenoviral receptor (Coxsackie adenoviraler Rezeptor)
CD	cluster of differentiation (Immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
CHO	chinese hamster ovary cell line (chinesische Hamstereierstockzelllinie)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CRS	cytokine release syndrome (Zytokinfreisetzungssyndrom)
CTL	cytotoxic t-lymphocyte zytotoxischer (T-Lymphozyt)
DLI	donor lymphocyte infusion (allogene Lymphozytenspende)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dendritische Zellen (dendritic cell)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Ecdysoneless homolog (Drosophila)
ex vivo	lat. "außerhalb des Lebendigen"; Prozesse, die außerhalb des Organismus stattfinden; vor allem mit dem Organismus entnommene Zellen, z.B. im Labor
Fab	antigen binding fragment (antigen-bindendes Fragment eines Ak nach Spaltung durch das Enzym Papain)
Fc	Fragment constant (konstante Region des Antikörpers)
Fc-Rezeptoren	membranständige Rezeptoren für verschiedene Ig-Klassen (crystallisable fragment)
FDA	Food and Drug Administration (Arzneimittelzulassungs- und Lebensmittelüberwachungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika)
FITC	FluoresceinisotERICYNAT
Fv	Fragment variable (variable Region des Antikörpers)
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor (Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
GMP	good manufacturing practice (gute Herstellungspraxis)
γ-PGA NP	poly γ-glutamic acid nanoparticles (Poly-γ-Glutaminsäure Nanopartikel)
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
Hb	Hämoglobin
HEK 293T	human embryonic kidney 293T (humane embryonale Nierenzelllinie 293T)
His	Histidin
HLA	human leucocyte antigen (humanes Leukozyten-Antigen)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor (insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
in vivo	lat. "im Lebendigem"; Prozesse, die innerhalb eines Organismus ablaufen

<i>in vitro</i>	lat. "im Glas"; Prozesse außerhalb des Organismus, zum Beispiel im Reagenzglas
ISS	International Staging System (internationales System zur Stadieneinteilung einer Erkrankung)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker
MACS	magnetic activated cell separation (magnetisch aktivierte Zelltrennung)
mDZ	myeloide Dendritische Zelle
MFI	mean fluorescence intensity (durchschnittliche Fluoreszenzintensität)
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MM	Multiple Myelom, Plasmozytom
moDZ	aus Monozyten gereifte (monocyte-derived) Dendritische Zelle
MRD	minimal residual disease (minimale Resterkrankung)
mRNA	messenger-ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NHL	non-Hodgkin Lymphom
Nickel-NTA	nitrotyrosine (Nickel- Nitrotyrosinsäure)
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
p.a.	pro analysis (zu Analysezwecken)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat - gepufferte Kochsalzlösung)
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycocerythrin
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	lat. „potentia hydrogenii“, Maß für den sauren/basischen Charakter einer wässrigen Lösung
s.c.	subcutan
scFv	single chain variable fragment (einzelsträngiges variables Fragment)
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
TAA	tumor-associated-antigen (Tumor-assoziiertes Antigen)
TLR	toll-like receptor (toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zelle	T-Lymphozyt; Thymus
VEGF	vesicular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ontogenese der Dendritischen Zellen.	S.7
Abbildung 2	Charakteristika reifer und unreifer Dendritischer Zellen.	S.8
Abbildung 3	Beladung der Dendritischen Zellen mit Antigen.	S.10
Abbildung 4	Reifung Dendritischer Zellen.	S.13
Abbildung 5	Selektive Reifung Dendritischer Zellen.	S.14
Abbildung 6	Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Plaque.	S.26
Abbildung 7	Schematische Darstellung von Antikörpern, Fab-, scFv- und Tri-body-Molekülen.	S.31
Abbildung 8	Konstruktion bispezifischer Moleküle zur selektiven Adressierung Dendritischer Zellen.	S.32
Abbildung 9	Schematische Darstellung der leichten und schweren Ketten des Fab-Moleküls.	S.33
Abbildung 10	Plasmidtafeln.	S.34
Abbildung 11	Identifizierung potentieller pSecTag LC (CD20V _L x HM1.24) Klone.	S.35
Abbildung 12	Profil der Affinitätschromatographie zur Anreicherung rekombinanter Fab-Moleküle.	S.37
Abbildung 13	Coomassie-gefärbtes 10%iges-SDS Gel und Western-Blot.	S.38
Abbildung 14	Chromatogramm zur Auftrennung der Proteine im Experion, reduzierte und nicht-reduzierte Bedingungen.	S.39
Abbildung 15	Gelfiltration der aufgereinigten rekombinanten CD20-Fab – Moleküle.	S.41
Abbildung 16	Nachweis der <i>in vitro</i> – Mutagenese der HM1.24-cDNA.	S.43
Abbildung 17	Experion-Analyse der Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie des mutagenisierten [(CD20 x HM1.24 _{mut}) x CD20 Fab]-Proteins.	S.44
Abbildung 18	Gelfiltration des mutagenisierten [(CD40 x HM1.24mut) x CD20Fab]-Proteins.	S.44
Abbildung 19	Durchflusszytometrischer Nachweis der CD20-spezifischen Bindung der aufgereinigten CD20Fab-Fusionsproteine auf CD20-positiven Zellen.	S.45
Abbildung 20	Dosisabhängige Bindung des CD20Fab-Moleküls an CD20-positiven Zellen.	S.46

Abbildung 21	Dosisabhängige Bindung des [(CD64scFv x CD40scFv) x CD20Fab]-Tribodies an CD40-positive HEK 293T.	S.47
Abbildung 22	Dosisabhängige Bindung des [(CD64scFv x CD40scFv) x CD20Fab]-Moleküls an CD64-positive BHK.	S.48
Abbildung 23	Immunologische Charakterisierung des Lymphozytenkonzentrates.	S.50
Abbildung 24	Effizienz der Separation CD14-positiver Zellen mittels MACS.	S.51
Abbildung 25	Quantitative immunologische Charakterisierung der Lymphozytenkonzentrate vor MACS sowie der Positiv- und Negativ-Fraktion nach Separation CD14-positiver Zellen.	S.52
Abbildung 26	Oberflächenexpression von CD40 auf Monozyten und in vitro gereiften moDZ.	S.53
Abbildung 27	Nachweis der CD64- und CD89-Expression auf Monozyten und unreifen DZ.	S.54
Abbildung 28	Nachweis der Expression von CD205 (Dec205) und CD209 (DC-Sign) auf Monozyten und unreifen DZ-Populationen.	S.55
Abbildung 29	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD80 und CD86 als Marker für die Reifung Dendritischer Zellen.	S.57
Abbildung 30	Vergleichende Analysen der durch die rekombinanten Moleküle induzierten Expression von CD86 als Reifungsmarker für DZ.	S.58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	ISS-Stadieneinteilung der Myeloma Working Group, 2005.	S.2
Tabelle 2	Stadieneinteilung des MM nach Durie und Salmon, 1975.	S.2/3
Tabelle 3	Liste der verwendeten Kits.	S.17
Tabelle 4	Aufstellung der angewandten Medien, Enzyme und Lösungen.	S.17/18
Tabelle 5	Verzeichnis der Zytokine und ihrer Hersteller.	S.18
Tabelle 6	Aufstellung der Isotypkontrollen.	S.19
Tabelle 7	Liste der verwendeten Antikörper.	S.19
Tabelle 8	Register der verwendeten Zelllinien.	S.20
Tabelle 9	Auflistung der verwendeten Moleküle.	S.20

1. Einleitung

1.1. Das Multiple Myelom

1.1.1. Charakterisierung und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms

Bei dem Multiplen Myelom (MM, Plasmazytom) handelt es sich um eine maligne Plasmazellerkrankung mit einer Neuerkrankungsrate in Deutschland von 4/100.000 Einwohnern/Jahr, dies entspricht etwa 1% aller bösartigen Erkrankungen.

Das MM gehört zu der Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Gekennzeichnet ist es durch die Proliferation eines entarteten Plasmazellklons im Knochenmark mit Zerstörung des Knochens (Osteolyse) und Verdrängung der normalen Blutbildung, der daraus resultierenden Suppression der anderen hämatopoetischen Zellreihen, sowie der Produktion eines kompletten oder inkompletten monoklonalen Antikörpers durch den Plasmazellklon. Sogenannte Bence-Jones-Proteine beschreiben Leichtketten dieser Immunoglobuline, die im Urin der Erkrankten nachweisbar sein können. Diese Immunoglobuline sind in der Regel als M-Gradient im Serum der Patienten nachweisbar.

Bei der Erstdiagnose fallen die Patienten durch Knochenschmerzen, Infektanfälligkeit, Anämie und / oder durch Hyperkalzämie oder freie Leichtketten verursachte Nierenstörungen oder zentralnervöse Symptome auf. Ist der Tumor auf eine Lokalisation begrenzt, so spricht man auch von einem solitärem Myelom oder einem Plasmazytom.

Myelome werden nach dem Typ des produzierten Paraproteins eingeteilt.

Die Diagnosestellung erfolgt anhand der Kriterien der "International Myeloma Working Group" (Morgan, 2003), wobei die Diagnose als gesichert gilt, wenn alle der drei folgenden Kriterien erfüllt werden:

- >10% Plasmazellen im Knochenmark (Knochenmarkaspirationszytologie) und / oder Nachweis eines Plasmazytoms; bei asekretorischer Erkrankung >30% Plasmazellen im Knochenmark
- im Serum und / oder Urin nachweisbares monoklonales Protein (Immunfixations-Elektrophorese)
- Vorliegen eines Endorganschadens (CRAB):

- C** Hyperkalzämie und / oder
- R** Niereninsuffizienz (Kreatininwert >173 mmol/l oder >2 mg/dl) und / oder
- A** Anämie (Hb-Wert <10 g/dl oder 2 g/dl unter der Norm) und / oder
- B** Knochenläsion (bei solitärer Osteolyse >30% Plasmazellen im Knochenmark, bei Osteoporose Nachweis von Wirbelkörperfrakturen)

Bei Fehlen eines Endorganschadens spricht man bei einer Knochenmarksinfiltration >10% oder einem Paraprotein > 3g/dl von einem indolentem Myelom, ansonsten von einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS).

Die Einteilung der Krankheitsstadien erfolgt nach den Kriterien des „International Staging Systems (ISS) der Myeloma Working Group“ [siehe Tab. 1, (Greipp *et al.*, 2005)]. Neben der ISS findet die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (Durie *et al.*, 1975) im Klinikalltag Anwendung (vgl. Tab. 2).

Tab. 1: ISS - Stadieneinteilung des MM der Myeloma Working Group, 2005 (Greipp *et al.*, 2005).

Stage	Kriterien	Definition	Medianes Überleben (in Monaten)
I	niedriges β 2-Mikroglobulin	β 2-M < 3,5 mg/l Albumin \geq 3,5 g/dl	62
II	weder I noch III	β 2-M < 3,5 mg/l Albumin < 3,5g/dl oder β 2-M = 3,5 mg/l bis < 5,5 mg/l	44
III	hohes β 2-Mikroglobulin	β 2-M \geq 5,5 mg/l	29

Tab. 2: Stadieneinteilung des MM nach Durie und Salmon, 1975 (Durie *et al.*, 1975).

Stadium I (< $0,6 \times 10^{12}$ Tumorzellen/m ² Körperoberfläche)	<u>Erfüllung aller 4 Kriterien:</u> - Hb > 10 g/dl - Serumkalzium normal - geringe Konzentration monoklonaler Immunglobuline: IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l, Leichtketten im Urin < 4 g tägl. - radiologisch normales Skelett oder nur ein solitär im Knochen lokalisiertes Plasmozytom
--	---

Stadium II	weder Stadium I noch Stadium III
Stadium III ($> 1,2 \times 10^{12}$ Tumorzellen/m ² Körperoberfläche)	- Hb $< 8,5$ g/l - Serumkalzium erhöht - hohe Konzentrationen monoklonaler Immunglobuline: IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l, Leichtketten > 12 g täglich - radiologisch fortgeschrittene Osteolysen
Zusatz	A falls Kreatinin < 2 mg/dl (177 μ mol/l) B falls Kreatinin ≥ 2 mg/dl (177 μ mol/l)

1.1.2. Therapie des Multiplen Myeloms

Beim Multiplen Myelom (MM) handelt es sich um ein generalisiertes und in der Regel unheilbares Tumorleiden. Die Therapie folgt daher meist einer palliativen Zielsetzung. Liegt ein Endorganschaden vor, besteht die Notwendigkeit einer systemischen Therapie, sowie ggf. einer Bestrahlung bei symptomatischen oder frakturgefährdeten Osteolysen. Ziel der Erstlinientherapie bei jungen Patienten ist eine bestmögliche Remission, die derzeit durch Kombination klassischer Zytostatika, neuer Substanzen wie Bortezomib oder Imide und einer Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltherapie erreicht werden soll (Ludwig *et al.*, 2012). Die Qualität der Remission ist für eine langanhaltende progressionsfreie Zeit und somit auch für das Gesamtüberleben entscheidend, wenngleich eine Heilung hiermit nicht erzielt werden kann.

Den Patienten nach Transplantation mit minimaler Resterkrankung und den älteren, für eine Stammzelltransplantation nicht zugänglichen Patienten, müssen neue Therapien angeboten werden, die nicht nur effektiv, sondern auch gut verträglich sind. Mit den bisher auf dem Markt etablierten Chemotherapeutika und neuen Substanzen lassen sich zwar immer längere Remissionen, aber keine Heilungen erzielen (Kim *et al.*, 2009).

Ein Bestandteil der etablierten Therapieverfahren sind klassische Zytostatika, die oft ausgeprägte Nebenwirkungen zeigen. Diese Zytostatika wirken nicht selektiv auf Tumorzellen, sondern generell auf schnell proliferierende Zellen und Gewebe. So sind immer auch gesunde Gewebe wie Knochenmark, Magen- und Darmepithelien

sowie auch Haarfollikel betroffen. Nebenwirkungen der zytostatischen Therapie sind nicht selten Übelkeit, Entzündungen der Schleimhäute in Mund, Speiseröhre und Darm, Keimzellstörungen oder Haarausfall sowie Störungen der Hämatopoese (Thrombopenie, Leukopenie etc.) mit dem Risiko einer Schädigung des eigenen Immunsystems, genauso wie Langzeitschäden an Organen wie Herz, Leber oder dem Nervensystem. Auch das Auftreten von Therapie-induzierten „Zweit“-Neoplasien stellt ein Problem dar.

Die minimale Resterkrankung (MRD) nach intensiver Therapie ist die Ursache späterer Rezidive. Hinzu kommt, dass residuelle Tumorzellen durch den Selektionsdruck Resistenzmechanismen („tumor escape“) entwickeln können, so dass sie bei erneuter Behandlung therapierefraktär sein können.

Insgesamt werden durch Verbesserungen der Therapieregime und die Möglichkeit einer Transplantation immer mehr Patienten länger krankheitsfrei leben. Aufgrund der Nebenwirkungen bisheriger Therapien und dem Problem der MRD ist es jedoch erforderlich, neue Strategien zu entwickeln, die eine gezielte antitumorale Therapie ermöglichen. Im Fokus der Krebsforschung stehen dabei immuntherapeutische Strategien, die bei deutlich geringeren Nebenwirkungen eine spezifische Beseitigung von Krebszellen versprechen.

Die Wirksamkeit einer Spenderlymphozytengabe (donor lymphocyte infusion, DLI) in der Rezidivsituation verdeutlicht die Potenz von Immuntherapien in der Behandlung des Multiplen Myeloms. Dieser Therapieansatz nutzt den Graft-versus-Myeloma-Effekt der Spenderlymphozyten aus (Kroger *et al.*, 2004).

1.2. Immuntherapeutische Strategien

In Ergänzung zu den konventionellen Therapiemöglichkeiten des MM kommen immuntherapeutische Strategien wie die Antikörpertherapie, der adoptive Transfer Tumorantigen-spezifischer T-Zellen ebenso wie die Anti-Tumor-Vakzinierung, d.h. die Induktion einer Anti-Tumor-Immunreaktion *in vivo*, in Betracht.

Voraussetzung für die Induktion Antikörper-vermittelter Effektormechanismen ist die Expression eines Tumorzell-spezifischen Oberflächenmarkers auf den Zielzellen (TAA, tumor associated antigen). Die Bindung von Antikörpern an diese Zielstruktur auf der Tumorzelle kann durch direkte und indirekte Mechanismen zu Inhibition der

Zellproliferation und Induktion von Apoptose der Tumorzelle führen. Bei den indirekten Wirkmechanismen spielen die Aktivierung von Komplement ebenso eine Rolle wie die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems (Natürliche Killerzellen, Monozyten, Granulozyten sowie Makrophagen).

Für die Antikörper-basierte Therapie maligner B-Zell-Erkrankungen steht bereits der gegen CD20 gerichtete monoklonale Antikörper Rituximab (Mabthera®) zur Verfügung. Antikörper, die spezifisch gegen Oberflächenantigene des MM (z.B. Antikörper gegen CD38, CD40, CD56, IGF-1-Rezeptor; sowie der Antikörper Elotuzumab® gegen CS-1) gerichtet sind, befinden sich zurzeit in der Phase der präklinischen und klinischen Entwicklung (Benson *et al.*, 2012; de Weers *et al.*, 2011; Horton *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 2009; Scartozzi *et al.*, 2010).

Für die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen ist hingegen die Präsentation der aus zellulären Proteinen nach proteasomaler Degradation erhaltener Peptide über MHC Klasse I Moleküle auf Seite der Tumorzelle, sowie der Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Klon auf der anderen Seite, notwendige Voraussetzung. Daher eignen sich neben membranständigen Proteinen auch sämtliche zytoplasmatischen Proteine, bzw. die hiervon abgeleiteten immunogenen Peptide, als Ziele für einen T-zellulären Ansatz, sofern ihre Expression bzw. Überexpression für die Tumorentität spezifisch ist.

Klinische Daten weisen darauf hin, dass der therapeutische Erfolg einer Anti-Tumor-Vakzinierung durch die simultane Induktion einer humoralen sowie zellulären Immunantwort verstärkt wird (Weng *et al.*, 2004), daher scheinen selektiv auf Tumorzellen exprimierte Oberflächenantigene geeignete Zielantigene für die Antikörper- als auch für die T-Zell-basierte Strategie zu sein. HM1.24 (CD317) könnte dabei ein besonders geeignetes Oberflächenantigen für die Immuntherapie des MM darstellen. CD317 ist als ein auf malignen Plasmazellen überexprimiertes Protein beschrieben, welches auf Leukozyten nur schwach bzw. nicht exprimiert wird (Goto *et al.*, 1994). Aufgrund seines Expressionsspektrums kommt es daher als T-Zell-Antigen in Betracht. Darüber hinaus handelt es sich bei HM1.24 um ein Membranprotein, so dass CD317 als Oberflächenantigen für Antikörper-basierte immuntherapeutische Ansätze in Frage kommt.

Antikörper, die gegen HM1.24 gerichtet sind, zeigten bereits *in vitro* sowie im Tiermodell eine antitumorale Aktivität (Ono *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 1997). Darüber hin-

aus konnten bereits HM1.24-spezifische zytotoxische T-Zellen auf Basis adenoviral, mit rekombinantem Protein sowie mit Peptiden beladener Dendritischer Zellen generiert werden (Chiriva-Internati *et al.*, 2003; Jalili *et al.*, 2005; Rew *et al.*, 2005). Nachdem Antigen-beladene Dendritische Zellen die Induktion einer humoralen sowie einer zellulären Immunantwort *in vivo* vermitteln, stellt die Anti-Tumor-Vakzinierung unter Verwendung des Antigens HM1.24 einen vielversprechenden Ansatz zur Immuntherapie des MM dar.

1.3. Dendritische Zellen

Lange als retikulo-endotheliale und -histiozytäre Zellen bekannt, wurden die Dendritischen Zellen (DZ) 1973 von Steinman und Cohen (Steinman *et al.*, 1973) in die moderne Immunologie eingeführt. Aus der peripheren Rolle der Begleit- und Stütz-zellen wanderten sie als zentrale Schaltstelle zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort in das Zentrum der Immunreaktion.

Dendritische Zellen gehören zur Gruppe der Leukozyten. Nach heutigem Verständnis entstehen DZ aus einer myeloiden oder einer lymphoiden CD34⁺ pluripotenten Stammzelle im Knochenmark [siehe Abb. 1, (Hart, 1997; Lipscomb *et al.*, 2002)].

Neben den *in vivo* vorkommenden DZ-Populationen können Zellen mit einem DZ-ähnlichen Phänotyp durch die *ex vivo* Differenzierung von Monozyten mit Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) (Sallusto *et al.*, 1994) oder aber mit Interferon α (Lapenta *et al.*, 2006) kultiviert werden (vgl. Abb. 1). Die einzelnen Unterarten unterscheiden sich dabei z.B. in ihrem jeweiligen Potential, T-Zellen zu aktivieren.

Die Vorläuferzellen der DZ zirkulieren im Blut und gelangen so in nahezu alle Organe des Körpers, in denen sie als unreife DZ residieren. Unreife DZ besitzen eine hervorragende Fähigkeit zur Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und MHC-Synthese (Banchereau *et al.*, 1998). So exprimieren unreife DZ eine Vielzahl von Rezeptoren zur Phago- bzw. Endozytose. Ein weiteres Merkmal unreifer DZ ist die hohe Konzentration intrazellulär gespeicherter MHC-II-Moleküle (Nijman *et al.*, 1995). Sie sind jedoch aufgrund der niedrigen Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86) noch nicht fähig, T-Zellen effektiv zu aktivieren (Baggers *et al.*, 2000).

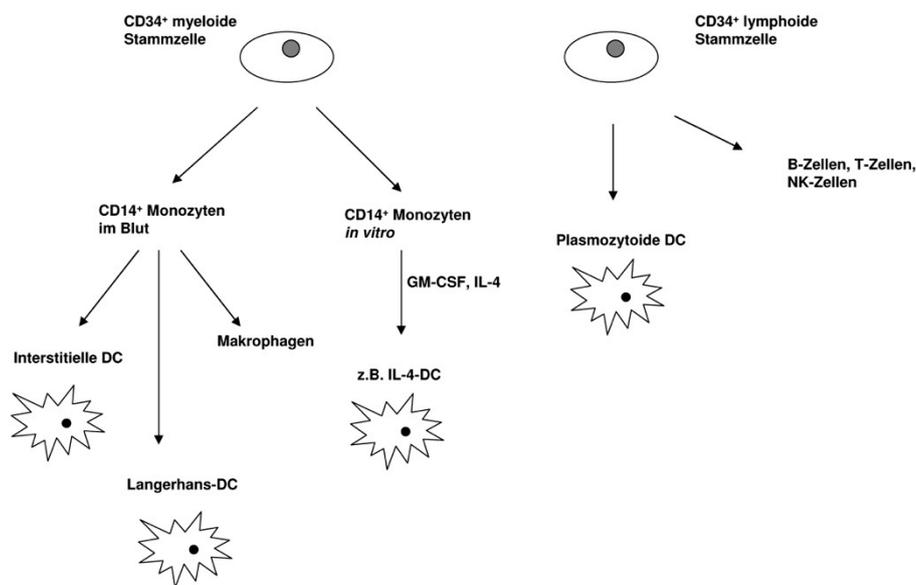


Abb. 1: Ontogenese Dendritischer Zellen.

Aus CD34⁺ myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen entstehen die Untergruppen der DZ: Myeloide Langerhanszellen und interstitielle DZ sowie lymphoide plasmazytoide DZ. Ebenso ist ein Weg der *in vitro* Generierung DZ aus CD14⁺ Monozyten des peripheren Blutes aufgezeigt.

Durch verschiedene Reize, etwa durch Kontakt mit Pathogenen oder deren Bestandteilen, wie z.B. bakterieller DNA, Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorischen Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder IL-1), wird eine Veränderung des Phänotyps der DZ induziert, die als Reifung der DZ bzw. DZ-Lizenzierung (Janeway, 2001) bezeichnet wird. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch den Verlust der Fähigkeit zur Endozytose bzw. Phagozytose (Inaba *et al.*, 1993), dies ist unter anderem auf die verminderte Expression der entsprechenden Rezeptoren zurückzuführen [vgl. Abb. 2, (Morel *et al.*, 2001)].

Charakteristisch für die reifen DZ ist nicht nur die namensgebende typische Zellmorphologie mit vielen, die Zelloberfläche vergrößernden Zellausläufern (Dendriten), sondern vor allem die Anwesenheit der Oberflächenmoleküle zur B-Zell- bzw. T-Zell-Interaktion und Kostimulation wie CD40, CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sowie die Produktion von IL-12 (Satthaporn *et al.*, 2001). Des Weiteren werden die in Lysosomen vorliegenden Antigen-MHC-II-Komplexe in nicht-lysosomale Vesikel konvertiert und als MHC-II-Moleküle zahlreich auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese Veränderungen des Phänotyps ermöglichen es den reifen

DZ, im Anschluss an ihre Migration aus der Peripherie in sekundär lymphatischen Kompartimente (z.B. Lymphknoten), eine Immunantwort zu induzieren. Diese reifen DZ werden daher als die effektivsten aller Antigen-präsentierenden Zellen angesehen (Lin *et al.*, 2006).



Abb. 2: Charakteristika unreifer und reifer Dendritischer Zellen.

1.3.1. Antigen-Beladung Dendritischer Zellen

In vitro aus Monozyten oder CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzierte Dendritische Zellen werden, mit entsprechendem Antigen beladen, bereits als Vakzine in klinischen Studien eingesetzt. Sowohl die Auswahl der Quelle des Antigens, als auch die Strategie der Applikation variieren hierbei. So werden apoptotische oder nekrotische Tumorzellen (Kotera *et al.*, 2001) ebenso wie Lysate aus Tumorzellen zum Pulsen unreifer (Nestle *et al.*, 1998) oder reifer Dendritischer Zellen (Holzl *et al.*, 1999; Holzl *et al.*, 2002) als Antigen-Quelle verwendet. Aufgrund der Fülle an potentiell im Zelllysat vorhandenen antigenen Epitopen könnte dieser Ansatz eine polyklonale T-Zell-Antwort induzieren, die gegen verschiedene stark immunogene Epitope der hier nicht weiter definierten Tumorantigene gerichtet ist.

Die Auswahl eines bekannten Tumorantigens erlaubt hingegen die Generierung einer selektiven T-Zell-Antwort, die gegen dieses eine Antigen gerichtet ist. Dies soll die Gefahr einer Autoimmunreaktion, d.h. die Reaktivität der T-Zellen gegen gesunde körpereigene Zellen, reduzieren. Die Applikation des Antigens zur Beladung der DZ kann hierbei in Form löslichen Proteins, welches von DZ *in vitro* durch Pinozytose

aufgenommen wird, erfolgen. Als Nachteil dieser Strategie erscheint jedoch, dass die Beladung der DZ durch Pinozytose bei niedrigen Antigenkonzentrationen lediglich zur Induktion einer T-Helfer-Zell-Antwort und erst bei hohen Konzentrationen auch zur gewünschten Aktivierung zytotoxischer T-Zellen führt (Brossart *et al.*, 1997; Watts, 1997).

Dem gegenüber werden Epitope endogen translaterter mRNA nur über MHC I Moleküle präsentiert, woraus eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen resultiert.

Es ist jedoch von entscheidender Bedeutung, inwiefern eine Präsentation von Antigen über MHC I oder MHC II- Moleküle stattfindet. Erfolgt die Präsentation strikt über MHC I, so führt dies zu der Induktion einer $CD8^+$ T-Zell-Antwort. Diese zytotoxische T-Zell-Antwort führt zwar akut zur Eliminierung von Zellen, es fehlt jedoch eine langanhaltende Wirkung (long lasting response). Eine Präsentation über MHC II führt zur Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen und damit zur Rekrutierung von B-Zellen, welche die Expansion von Gedächtniszellen beinhaltet. Jedoch kommt es bei einer Präsentation von Peptiden über MHC II bei fehlendem kostimulatorischen Stimulus zur Induktion von Toleranz, so dass auch die alleinige Adressierung dieser MHC-Klasse Nachteile bietet. Um die jeweiligen Limitierungen zu überwinden, scheinen Strategien, die auf eine Präsentation der Peptide über MHC I und MHC II-Moleküle im Sinne einer Kreuzpräsentation setzen, am vielversprechendsten.

Bei einer weiteren Strategie der Antigen-Beladung isolierter DZ wird der Ansatz verfolgt, die gesamte Tumor-RNA (Nair *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003) oder aber definierte Antigen-RNA (Heiser *et al.*, 2002; Pecher *et al.*, 2002) in die DZ einzubringen, um diese nachfolgend als Vakzine oder zur T-Zell-Aktivierung *in vitro* einzusetzen. Neben der transienten Expression des Tumorantigens in den DZ durch den Transfer Antigen-kodierender mRNA führt der virale Transfer der entsprechenden kodierenden DNA-Sequenz zu einer dauerhaften Expression des Antigens in den transduzierten Zellen, jedoch erscheint die klinischen Anwendung dieser als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) zu bezeichnenden DZ schwierig.

Über die definierten Antigene in Form von Protein oder RNA hinaus stellt die Verwendung Antigen-spezifischer, HLA-restringierter Peptide für die Beladung unreifer (Nestle *et al.*, 1998) und reifer DZ (Dhodapkar *et al.*, 1999; Thurner *et al.*, 1999) die selektivste Methode zur Induktion einer T-Zell-Antwort dar.

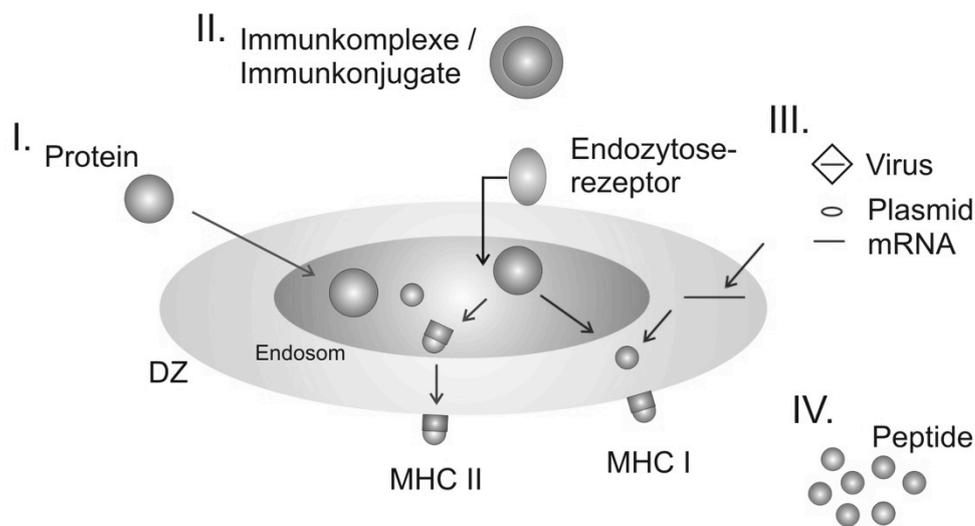


Abb. 3: Beladung Dendritischer Zellen mit Antigen.

Die Aufnahme von Antigenen in die DZ zur nachfolgenden Präsentation der Peptide über MHC I bzw. II kann *in vitro* / *in vivo* durch Pinozytose von Protein (I.), die Rezeptor-vermittelte Beladung mit Komplexen aus Antigenen und Antikörpern bzw. mit Immunkonjugaten (II.), den Transfer der für das Antigen kodierenden Sequenz (III.) bzw. das Pulsieren der Zellen mit definierten Peptiden (IV.) erfolgen.

Notwendige Voraussetzung ist hierfür nicht nur die Identifizierung des geeigneten Tumorantigens und die nachfolgende Definierung einzelner antigener Epitope, sondern auch die Auswahl der für den jeweiligen HLA-Haplotyp des Empfängers geeigneten Peptide.

Sämtliche dieser Beladungsstrategien für den klinischen Einsatz der DZ als Vakzine bzw. zur Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen setzen eine personal-, zeit- und kostenintensive Manipulation der DZ *in vitro* - und damit unter GMP-Bedingungen - voraus. Diese Schwierigkeiten könnten durch die spezifische Direktion des Antigens bzw. der hiervon abgeleiteten Peptide an die DZ *in vivo* überwunden werden.

1.3.2. Rezeptor-vermittelte Beladung Dendritischer Zellen

Die selektive Adressierung der DZ kann durch Antikörper bzw. Antikörper-Derivate erfolgen, die gegen ausgewählte, auf den DZ exprimierte Endozytose-Rezeptoren gerichtet sind. Werden diese Moleküle mit Antigenen bzw. den hiervon abgeleiteten Peptiden gekoppelt, kommt es nach der Bindung des Fusionsproteins an den entsprechenden Rezeptor zur Internalisierung des Rezeptor-Antikörper-Komplexes und damit zur Aufnahme des Antigens in die Zelle.

Als Zielstrukturen für die Beladung der DZ kommen internalisierende Rezeptoren in Frage, die vornehmlich - wenn nicht ausschließlich - auf den DZ exprimiert werden. Zudem sollte im Anschluss an die rezeptorvermittelte Beladung der DZ eine Präsentation der Antigene im Kontext von MHC Klasse I und II erfolgen. Die Effizienz dieses als Kreuzpräsentation bekannten Prozesses ist gekoppelt an den entsprechenden Rezeptor, d.h. seine Endozytose-Kinetik, seinen Transfer in das früh- oder spätendosomale Kompartiment und die nachfolgende Degradation bzw. Rezyklisierung.

Als potentielle Ziele für die rezeptorvermittelte Antigen-Beladung kommen die auf DZ exprimierten Fc-Rezeptoren in Frage. Diesen Rezeptoren (Fc α R, Fc γ RI/CD64, Fc γ RII/CD32, Fc γ RIII/CD16) kommt die Aufgabe der Endozytose von Immunkomplexen aus Antigen und Antikörpern vom IgA-, respektive IgG-Isotyp zu. So konnten DZ bereits erfolgreich durch Konstrukte mit Antigen beladen werden, die Fc γ RI/CD64 (Heijnen *et al.*, 1996), Fc γ RIIIa/CD32a (Liu *et al.*, 2006) oder Fc γ RIII/CD16 (Mende *et al.*, 2005) adressieren. Die drei Fc-Rezeptoren werden jedoch nicht selektiv auf DZ, sondern ebenso auf Monozyten (Fc γ RI/II) und NK-Zellen (Fc γ RIII) exprimiert.

Als weitere Endozytose-Rezeptoren kommen neben dem Mannose-Rezeptor auch Lektin-Rezeptoren in Betracht. Auch hier führte die Antigen-Beladung der DZ durch selektive Adressierung des Mannose-Rezeptors (He *et al.*, 2007; Ramakrishna *et al.*, 2004) bzw. der Lektin-Rezeptoren DEC-205/CD205 (Bonifaz *et al.*, 2004; Bozzacco *et al.*, 2007) sowie DC-Sign/CD209 (Engering *et al.*, 2002; Tacke *et al.*, 2005) zur nachfolgenden Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen. Da sowohl der Mannose-Rezeptor als auch DEC-205 nicht nur auf DZ, sondern auch auf Monozyten exprimiert werden, scheint DC-Sign als DZ-spezifischer Rezeptor für eine selektive Adressierung der DZ *in vivo* geeignet zu sein.

CD40, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, spielt nicht nur eine Rolle bei der Interaktion der DZ mit T-Helfer-Zellen über die Wechselwirkung von CD40 und CD40-Ligand, sondern eignet sich aufgrund seiner Internalisierungseigenschaften ebenso zur Beladung der DZ. Im Mausmodell konnte bereits eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort durch die CD40-gerichtete Beladung von DZ mit Antigenkodierenden Adenoviren generiert werden (Schjetne *et al.*, 2007; Tillman *et al.*, 2000). Neben der Expression auf DZ findet sich CD40 zudem auf B-Zellen und eig-

net sich damit eventuell auch als Rezeptor für die Antigen-Beladung der B-Zellen beim Menschen.

1.3.3. Strategien zur Reifung Dendritischer Zellen

Neben der geeigneten Strategie zur Antigen-Beladung der DZ ist die deren Reifung eine notwendige Prämisse für die Induktion einer T-Zell-Antwort. So wird bei gleicher Applikation des Antigens, z.B. über DEC-205, in Ermangelung eines solchen Reifungsstimulus Toleranz induziert (Bonifaz *et al.*, 2002), wohingegen bei simultaner DZ-Beladung und Aktivierung eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort generiert wird (Bonifaz *et al.*, 2004). Die Reifung Antigen-beladener DZ kann *in vitro* durch die Kultur mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und Prostaglandin-E₂ erfolgen (Jonuleit *et al.*, 1997).

Hierbei ist der Zeitpunkt der Applikation des Antigens sowie der Reifung-induzierenden Agenzien kritisch, da sowohl eine zu frühe als auch eine zu späte DZ-Reifung den Grad an Kreuzpräsentation vermindert (Datta *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2006).

Darüber hinaus können DZ-aktivierende Signale über sogenannte Toll-like Rezeptoren vermittelt werden (vgl. Abb. 4). Diese Rezeptoren sind auf den Untergruppen der *in vivo* vorkommenden DZ, d.h. auf den plasmazytoiden DZ (pDZ) und den myeloiden DZ (mDZ), aber auch auf den *ex vivo* aus Monozyten generierten DZ (moDZ), unterschiedlich exprimiert [(Schreibelt *et al.*, 2010); siehe Tab. in Abb. 4]. Sie ermöglichen die Perzeption von Merkmalen pathogener Organismen bei Kontakt auf der Zelloberfläche, oder aber nach Internalisierung des Organismus im endosomalen Kompartiment. Natürliche Liganden dieser Rezeptoren bzw. deren Analoga induzieren allein (van Duin *et al.*, 2006) oder in Kombination [z.B. von TLR3-Ligand poly-I:C und TLR7/8-Ligand R848; (Napolitani *et al.*, 2005)] die effiziente Reifung der DZ, da sie die Präsenz von Pathogenen imitieren.

Durch Verwendung agonistischer CD40 gerichteter Antikörper (Bonifaz *et al.*, 2004) oder CD40-Liganden (vgl. Abb. 4) kann ebenfalls eine Reifung der DZ vermittelt werden. Die Quervernetzung der CD40-Moleküle auf den DZ simuliert die Interaktion der DZ mit einer aktivierten T-Helfer-Zelle, d.h. die Bindung von CD40 auf der DZ mit den

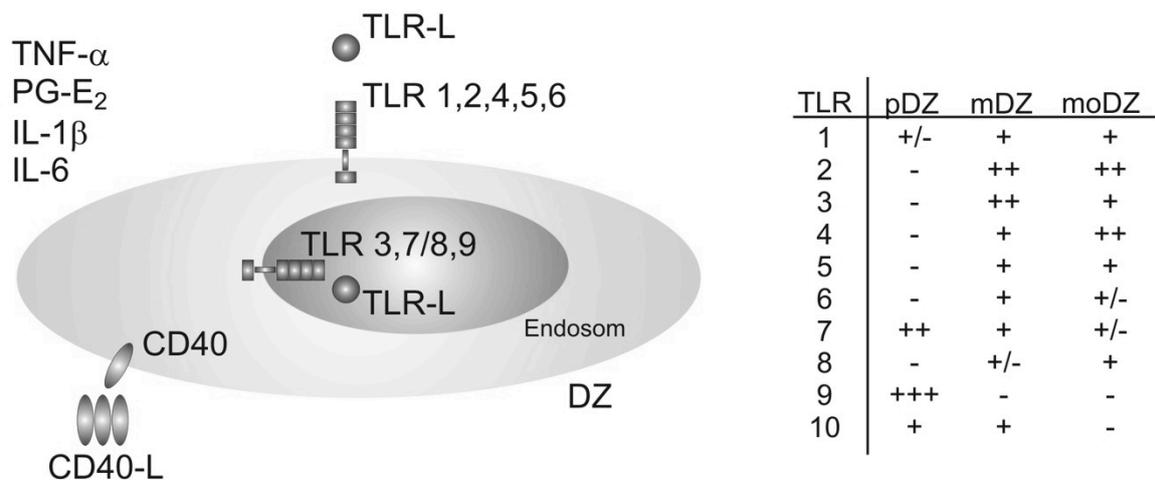


Abb. 4: Reifung Dendritischer Zellen.

Induktion der Maturation von DZ durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) und PG-E₂ (links), durch Liganden (L) für CD40 oder für Toll-like Rezeptoren (TLR), die auf DZ-Subgruppen unterschiedlich exprimiert sind (rechts; pDZ: plasmazytoide DZ; mDZ: myeloide DZ; moDZ: Monozyten-differenzierte DZ; Tab. verändert nach (Schreibelt *et al.*, 2010)).

auf T-Helfer-Zellen exprimierten CD40-Liganden (CD154) wird so nachgeahmt. Durch diese Strategie kann die effiziente Induktion einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen auch ohne die sonst notwendige T-Zell-Hilfe erfolgen (Cella *et al.*, 1996; French *et al.*, 1999).

1.3.4. Kombination von Antigen-Beladung und Reifung Dendritischer Zellen

Nachdem die Antigenbeladung der DZ in Abwesenheit eines Reifungsstimulus zur Induktion von T-Zell-Anergie führt (Bonifaz *et al.*, 2002), ist die Antigenapplikation in Kombination mit einem DZ-Aktivierungssignal („Danger“-Signal) eine notwendige Voraussetzung für die Vakzinierung, d.h. die Antigenbeladung der DZ mit nachfolgender Aktivierung von B-Zellen, T-Helfer- wie auch von zytotoxischen T-Zellen, *in vivo*.

Bei gängigen Vakzinierungsansätzen werden Antigen und Adjuvanzen simultan intramuskulär verabreicht. Die zusätzlich verabreichten Adjuvanzen sollen dabei das „Danger“-Signal, das dem blanken Antigen fehlt, vermitteln. Hier besteht jedoch die Möglichkeit, dass DZ das applizierte Antigen aufnehmen, aber der Reifung entgehen

und auf diesem Wege Toleranz induzieren. Um dies zu umgehen, scheint die Kombination des Reifungsstimulus mit dem Antigen eine potente Strategie darzustellen (Heit *et al.*, 2008). So führt die Verknüpfung des Antigens mit einem Trigger für Toll-like Rezeptoren, z.B. den TLR-Liganden R848 (Wille-Reece *et al.*, 2005) oder CPG (Cho *et al.*, 2000), zu einer erhöhten Antigenpräsentation der DZ und einer effizienteren T-Zell-Aktivierung.

Nachdem DZ einige Linien-spezifische Oberflächenmarker exprimieren, die bei geeigneten Eigenschaften zur selektiven Beladung der DZ mit Antigen verwendet werden könnten, ist eine gezielte Aktivierung der DZ durch Moleküle denkbar, die zum einen eine Aktivierungsdomäne (z.B. TLR-Liganden, CD40-Ligand o.ä.), zum anderen eine die DZ-Selektivität vermittelnde Domäne beinhalten (vgl. Abb. 5). Im Gegensatz zur systemischen Aktivierung der DZ durch Zytokine oder andere Mediatoren wäre so eine Reifung einer durch den jeweiligen spezifischen Marker gekennzeichneten DZ unter Ausschluss anderer Zellpopulationen möglich.

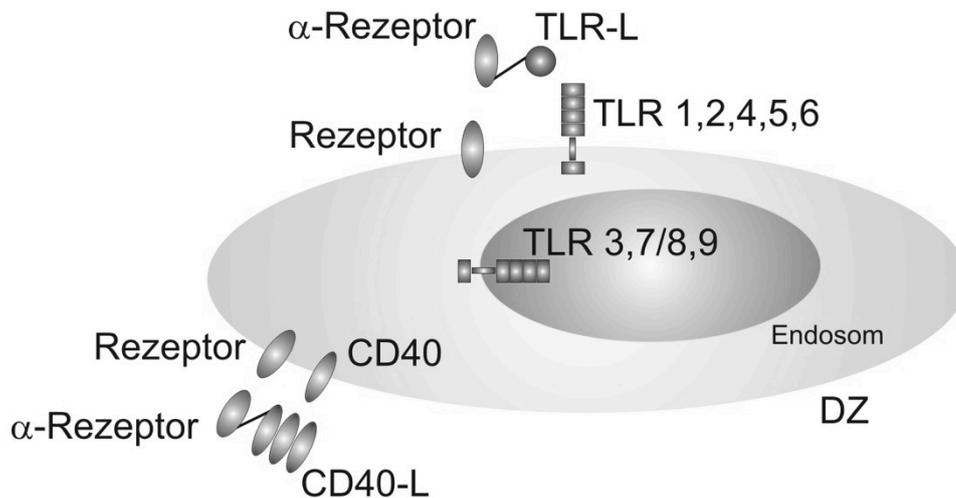


Abb. 5: Selektive Reifung Dendritischer Zellen.

Die Kombination einer gegen den Endozytoserezeptor gerichteten Domäne (α -Rezeptor) mit einer weiteren, den Reifungsstimulus durch Interaktion mit Toll-like Rezeptoren (TLR) oder CD40 vermittelnden Domäne - wie einem TLR-Liganden (TLR-L) oder aber dem CD40-Ligand (CD40-L) - könnte die selektive Adressierung des Maturationssignals an die DZ ermöglichen.

In einer Weiterentwicklung eines solchen Ansatzes der selektiven Beladung der DZ und einer spezifischen Direktion eines Reifungsstimulus könnten beide Strategien

kombiniert werden, so dass simultan zur DZ-Beladung die Induktion der DZ-Reifung initiiert wird und demnach zwingend alle Antigen-beladenen DZ einer Reifung unterzogen werden. Somit könnte eine möglichst effiziente T-Zell-Aktivierung erzielt werden.

1.4. Ziele der Arbeit

Im Hinblick auf die Entwicklung von Molekülen, die sowohl die Adressierung von Endozytoserezeptoren zur selektiven Antigenbeladung Dendritischer Zellen als auch die Vermittlung eines DZ-gerichteten Reifungsstimulus *in vivo* ermöglichen, sollten in dieser Arbeit neuartige bispezifische Moleküle entwickelt und *in vitro* hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert werden. Die rekombinanten Proteine sollten neben der agonistischen, die DZ-Reifung vermittelnden CD40-Bindedomäne („Danger“-Signal) auch eine Valenz für die Bindung von Endozytoserezeptoren, z.B. den Fc-Rezeptoren CD64 und CD89 zur Adressierung des Antigens an die Zellen, aufweisen. Die Kombination beider Domänen, d.h. die Bispezifität dieser Moleküle, sollte in einer erhöhten Selektivität für die Zielzellpopulation ebenso wie in der Bifunktionalität der Moleküle resultieren.

Ausgehend von einem vorliegenden Fab-Fragment sollten zunächst Moleküle im Tribody-Format kloniert werden. Zur selektiven Adressierung der Fc-Rezeptoren CD64 und CD89 sollten die für die variablen Regionen des parentalen, gegen CD64 bzw. CD89 gerichteten Antikörpers in Form eines scFv („single chain Fragment variable“) Verwendung finden. Die agonistische, CD40-bindende Domäne der Moleküle sollte ebenso als scFv in die Konstrukte eingefügt werden. Als Tumor-Antigen wurde das Modell-Antigen HM1.24 (CD317) vorgesehen, dessen cDNA ebenfalls im Labor kloniert vorlag. Im Anschluss an die Klonierung der einzelnen Moleküle, d.h. des [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab], des [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] und des [(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab], sollte die Expression, Aufreinigung und nachfolgende biochemische sowie funktionelle Charakterisierung der Moleküle erfolgen.

Hierzu sollten diese neuen bispezifischen Moleküle hinsichtlich ihrer Potenz, selektiv die Reifung der aus Monozyten differenzierten unreifen DZ zu induzieren, beurteilt werden.

Zudem sollten grundlegende Aussagen über die Generierung von DZ aus Monozyten gesunder Spender getroffen werden. Bezüglich der Auswahl eines Reifungscocktails zur Generierung von DZ aus Monozyten sollte der bisherige Goldstandard mit anderen Zytokin-Kombinationen mit Blick auf die Expression von CD40 sowie der zur Antigenbeladung anvisierten Endozytoserezeptoren verglichen werden.

Der Einsatzbereich der in dieser Arbeit entwickelten Konstrukte wurde im Hinblick auf die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze in der Therapie des Multiplen Myeloms als Anti-Tumor-Vakzine gewählt. Diese bis heute nahezu unheilbare Erkrankung benötigt dringend neue Behandlungsstrategien, um das Problem der Minimalen Resterkrankung zu eliminieren. Die Stärke der in dieser Arbeit produzierten Konstrukte könnte gerade in diesem Feld liegen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Sämtliche nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden in Analysequalität (p.a.) von den Firmen Sigma Aldrich, Fluka oder Roth bezogen.

2.1.1. Kits

Tab. 3: Liste der verwendeten Kits.

Bezeichnung des Kits	Hersteller
Cell Line Nucleofector® Kit V	Amaxa
LMW/HMW Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare
NuceloSpin® Extract II	Macherey & Nagel
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey & Nagel
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey & Nagel
One Shot® Mach1™-T1 chemically competent E. coli Kit	Invitrogen
PepTivator® - CMV pp65	Miltenyi Biotec
QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce

2.1.2. Medien, Enzyme, Lösungen

Tab. 4: Aufstellung der angewandten Medien, Enzyme und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
2YT Medium	Roth
CellGro® DC	CellGenix
CHO-Medium	Gibco
D-MEM	Gibco
SOC-Medium	Invitrogen

Puffer für die HisTag-Reinigung:	
- Waschpuffer	300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, 10 mM Imidazol, pH 7,4
- Elutionspuffer	300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, 500 mM Imidazol, pH 7,4
Westernblot Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 30% (v/v) Methanol, pH 8,3
Laufpuffer SDS-PAGE	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
TAE-Puffer	2 M Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0 (mit Essigsäure eingestellt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs

2.1.3. Zytokine

Tab. 5: Verzeichnis der Zytokine und ihrer Hersteller.

Zytokin	Hersteller
Interleukin 1 α	R&D Systems
Interleukin 1 β	R&D Systems
Interleukin 3	R&D Systems
Interleukin 4	R&D Systems
Interleukin 6	R&D Systems
Interferon α	R&D Systems
Interferon β	R&D Systems
GM-CSF	R&D Systems
TNF α	R&D Systems
PGE ₂	Sigma Aldrich

2.1.4. Antikörper

Bei allen in dieser Arbeit für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpern handelt es sich um monoklonale, direkt mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper, die von den Firmen Beckman Coulter, BD Bioscience, Miltenyi oder Qiagen bezogen wurden.

Tab. 6: Aufstellung der Isotypkontrollen.

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller
IgG-Maus FITC	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter
IgG-Maus PE	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter
IgG-Maus ECD	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter
IgG-Maus PC5	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter

Tab. 7: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller
Anti-Penta-His 488	IgG1	---	Qiagen
Anti-Interferon γ FITC	IgG1	AN 18.17.24	Miltenyi Biotec
CD3 – PC5	IgG1	KCHT1	Beckmann Coulter
CD3 – Krome Orange™	IgG1k	UCHT1	Beckmann Coulter
CD4 – PE	IgG1	13B8.2	Beckmann Coulter
CD8 – PE	IgG1	B9.11	Beckmann Coulter
CD14 – FITC	IgG2a	RM052	Beckmann Coulter
CD16 – PC5	IgG2a	B9E3	Beckmann Coulter
CD20 – PC5	IgG1	3G8	Beckmann Coulter
CD20 – Pacific Blue™	IgG2a	LT20	Abcore
CD33 – PC5	IgG1	D3HL60.251	Beckmann Coulter
CD40 – PE	IgG1	MAB89	Beckmann Coulter
CD45 – ECD	IgG1	J.33	Beckmann Coulter
CD56 – PC7	IgG1	N901/NKH-1	Beckmann Coulter
CD64 – FITC	IgG1	22	Beckmann Coulter
CD80 – PE	IgG2k	16-10A1	BD Biosciences
CD83 – FITC	IgG1k	HB15e	BD Biosciences
CD83 – PE	IgG1k	HB15e	BD Biosciences
CD86 – PE	IgG2b	HA5.2B7	Beckmann Coulter
CD89 – PE	IgG1	A3	Immunotech
CD205 – PE	IgG2b	MG38	Beckmann Coulter
CD209 – PE	IgG1	AzND1	Beckmann Coulter

2.1.5. Lymphozyten

Die für die Herstellung der Dendritischen Zellen benötigten Lymphozyten wurden aus Blutspenden gesunder Spender des Universitätsklinikums Schleswig Holstein (Campus Kiel, Transfusionsmedizin) gewonnen. Hierbei dienten Lymphozytenkonzentrate („Buffy coats“) als Ausgangsmaterial.

2.1.6. Bakterien, eukaryotische Zelllinien

Tab. 8: Register der verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung	Herkunft
<i>E. coli</i> Mach1	F ⁻ Φ80((<i>lacZ</i>)Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) Δ <i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i> (Invitrogen)
CHO	chinese hamster ovary (Invitrogen)
Hek 293T	human embryonic kidney (ATCC)
CD20 ⁺ Raji	Burkitt-Lymphom-Linie (ATCC)
CD40 ⁺ Hek 293T	pcDNA3.1 CD40 cDNA transfizierte Hek 293T, M. Staudinger, persönliche Mitteilung
CD64 ⁺ BHK	CD64 transfizierte BHK, M. Peipp, persönliche Mitteilung

2.1.7. Moleküle

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Moleküle.

Konstrukt	Herkunft
[(CD205 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]	Staudinger, persönliche Mitteilung
[(CD209 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]	Staudinger, persönliche Mitteilung

2.2. Methoden

2.2.1. Transformation von Bakterien

Die Plasmide bzw. Vektor-Konstrukte wurden zur Vermehrung unter Verwendung chemisch kompetenter *E. coli* Mach1 nach Anleitung des „One Shot[®] Mach1™-T1[®] Chemically Competent *E. coli* Kit“ (Invitrogen) in Bakterien eingebracht. Hierzu wurde

je 1 µl Plasmid-DNA zu der auf Eis aufgetauten Suspension von „One Shot[®] Mach1[™]-T1[®] Chemically Competent *E. coli*“ pipettiert und gemischt. DNA und Bakterien wurden 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30 Sek. in einem 42°C warmen Wasserbad. Danach wurde die Suspension zwei Min. auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde die Suspension eine Stunde bei 37°C im Brutschrank schüttelnd inkubiert. Auf zwei vorgewärmten und zuvor vorbereiteten Nährmedium-Platten (2YT Medium, 1,8% Agar-Agar, supplementiert mit dem in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor gewählten Antibiotikum) wurden 25 µl sowie 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

2.2.2. Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus zuvor transformierten *E. coli* erfolgte im Anschluss an die Anzucht Plasmid-tragender Klone. Hierzu wurde eine Kolonie der transformierten Zellen in Flüssigmedium (2 ml für Mini- und 200 ml für Maxi-Präparationen) überführt. Das Medium wurde in Abhängigkeit von dem auf dem zu präparierenden Plasmid kodierten Resistenzmarker mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd über Nacht bei 37°C.

Zur Gewinnung der über Nacht vervielfältigten DNA wurde das „NucleoBond[®] Xtra Maxi Kit“ (Macherey & Nagel) bei größeren Mengen DNA, bei kleineren Volumina das „NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit“ (Macherey & Nagel) nach Angabe des Herstellers eingesetzt.

2.2.3. Hydrolyse von Plasmid-DNA

Um DNA-Konstrukte näher zu charakterisieren, wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biotec) in dem vom Hersteller gelieferten Puffer für 2 Min. nach Protokoll des Herstellers hydrolysiert und nachfolgend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4. DNA-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich durch Elektrophorese in einem Agarosegel nach ihrer Größe auftrennen. Dabei zeigt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente im Gel über einen bestimmten Bereich eine logarithmische Abhängigkeit von der Größe der Fragmente.

Als Größen-Standard wurde die „100 bp-DNA-Leiter, extended (100 - 5000 bp)“ (Roth), als Ladepuffer „Roti[®]-Load DNA“ (Roth) eingesetzt. Verwendet wurden 1%-ige Agarose-Gele mit 1 x TAE (2 M Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer. Die Färbung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid, die Dokumentation mit Hilfe der Geldokumentationsanlage „E.A.S.Y.“ (Herolab) unter Verwendung der „Easy Win 32“ Dokumentationssoftware.

2.2.5. Gelelution

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem „Nucleo-Spin Extract II Kit“ (Macherey & Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.6. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der „T4 DNA Ligase“ (Roche) nach Angaben des Herstellers über Nacht bei Raumtemperatur vorgenommen.

2.2.7. Elektroporation von CHO-Zellen

Mit Hilfe des „Cell Line Nucleofector[®] Kits V“ (Amaxa) und des zugehörigen Nucleofectors (Amaxa) wurden CHO (= Chinese Hamster Ovary)-Suspensionszellen (Invitrogen) mittels Elektroporation nach Angaben des Herstellers transfiziert.

Hierzu wurden 1×10^6 CHO-Zellen mit 100 μ l Nucleofector Lösung vermischt. Darauf folgend wurden 1-5 μ g Plasmid-DNA zugegeben. Die Suspension wurde sodann in eine Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Programm U024 im Nucleofector (Amaxa). Mit der Transferpipette des Kits wurde die Lösung aus der Küvette entnommen und in vorgewärmtes CD-CHO-Medium pipettiert. Die transfizierten CHO-Zellen wurden dann bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 6% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.8. *In vitro* Mutagenese von DNA

Zum Austausch einzelner Nukleotide in einem Plasmid mittels PCR wurde das „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.9. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur transienten Produktion der Tribodies in der eukaryotischen Zell-Linie Hek 293T (ATCC, CRL-11268) wurden die Expressions-Plasmide mittels der Calciumphosphat-Methode (Chen *et al.*, 1987) zeitweilig in die Zelllinie eingebracht. Im Verlauf der fünftägigen transienten Expression wurde der Zellkulturüberstand zur nachfolgenden Aufreinigung des sekretierten Proteins aus dem Medium täglich gesammelt.

2.2.10. Chromatographie zur Aufreinigung von Protein

2.2.10.1 Affinitätschromatographie von His₆-Tag-Proteinen

Um die in der Kultur der mit den Konstrukten transfizierten Hek 293T gewonnene rekombinanten, 6x His-markierten Protein aufzureinigen, wurde hier die Affinitätschromatographie mittels Poly-Histidin-Tag über Nickel-NTA (Qiagen) genutzt. Dabei wurde das aufzutrennende Proteingemisch unter definierten Bedingungen, d.h. in einem Auftragspuffer (300 mM Natriumchlorid, 50 mM Natriumphosphat, 10 mM Imidazol, pH 7.4), über die Nickel-Säule gegeben, die die spezifische Bindung an den Nickel-Liganden bevorteilten. Ungebundenes bzw. unspezifisch gebundenes Protein wurde durch einen Waschschrift mit niedriger Imidazol-Konzentration (10 mM im Auftragspuffer, s.o.) nachfolgend von der Säule gewaschen. Durch Konkurrenz des His₆-Tag Proteins mit dem im Elutionspuffer in hoher Konzentration vorliegenden Imidazols (500 mM) wurde das gebundene Zielprotein wieder von der Matrix eluiert.

Für die automatisierte Aufreinigung der Tribodies aus den Kulturüberständen der transient transfizierten Hek 293T wurde der Äkta Purifier (GE Healthcare) mit His-Trap HP-Säulen (GE Healthcare) verwendet.

2.2.10.2 Affinitätschromatographie von Fab-Fragmenten über anti- κ -Matrix

Zur Anreicherung von Fab-Fragmenten aus dem Zellkulturüberstand nach stabiler oder transienter Transfektion von Hek 293 T wurde eine Chromatographie mit anti- κ -Matrix (CaptureSelect) vorgenommen. Hierzu wurde zunächst der pH Wert des Überstands auf pH 8,5 - 8,7 mit Tris-Puffer eingestellt. Nachfolgend erfolgte die Chromatographie unter Verwendung von 1 ml anti- κ -Matrix und 100 mM Tris-Puffer (pH 8,5) als Waschpuffer. Die Elution des Proteins von der Matrix erfolgte über einen pH-Wechsel mittels Citrat-Puffer (100 mM, pH 2,5). Zur sofortigen Neutralisierung wurden die Elutionsfraktionen sofort mit 1 M Tris-Puffer pH 9,0 versetzt.

2.2.10.3 Größenausschlusschromatographie von Proteinen

Zur Charakterisierung der nach κ - bzw. His-Affinitätschromatografie erhaltenen Elutionsfraktionen bzw. der aufgereinigten Moleküle hinsichtlich des Vorliegens von Mono-, Di- oder Multimeren wurde eine Größenausschlusschromatographie vorgenommen. Als Matrix für die Chromatographie über den Äkta Purifier (GE Healthcare) wurde eine Superdex Säule („Superdex 200 10/30“, GE Healthcare) verwendet, wobei als Laufmittel phosphatgepufferte Saline (PBS, Invitrogen) diente. Zur Ermittlung des Ausschlussvolumens erfolgte ein Lauf mit Dextranblau. Proteine mit definierter Größe („LMW bzw. HMW Gel Filtration Calibration Kit“, GE Healthcare) dienten als Standard zur Ermittlung des Verhältnisses von Flussvolumen zu Molekülgröße.

2.2.11. SDS-Pulsfeldgelelektrophorese

Mit Hilfe einer SDS-Page (*engl.* sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), einer Variante der Polycrylamidgel-Elektrophorese, wurden die erhaltenen Protein-Proben im Anschluss an die Aufreinigung analysiert und charakterisiert. Die Proben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer (Roth) versetzt und bei 95°C über 5 Min. denaturiert. Als Protein-Größenmarker diente ein „Precision Plus Protein™ Dual Color Standard“ (Biorad). Der Gellauf erfolgte unter Verwendung eines 10%-igen Acrylamid-Gels in Laufpuffer (siehe 2.1.2 Medien, Enzyme, Lösungen).

2.2.12. Western-Blot

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran zur nachfolgenden Detektion der His-markierten, in Hek 293T exprimierten Fusionsproteine mit einem Anti-His-Antikörper (Sigma) erfolgte mittels der „semi-dry“ Blot-Kammer (Biorad) nach Angaben des Herstellers. Die Transferzeit betrug 60 Min. bei einer angelegten Spannung von 15 Volt auf 46,75 cm² ImmunBlot™-PVDF-Membran (BioRad).

Nachfolgend wurde die Membran für die geplante Detektion der Proteine mit 2,5%-Blocking-Protein (Biorad) in PBS über eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Hybridisierung der Membran mit dem in Block-Lösung verdünnten ersten Antikörper gegen den His₆-Tag (Maus Anti-Poly-His, Sigma) erfolgte ebenfalls über eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden unspezifisch gebundene Antikörper mit PBS-Tween (1% Tween100 in PBS) durch 3 x 5 min Waschen entfernt. Der gebundene erste Antikörper wurde mit einem Sekundär-Antikörper (Anti-Maus-HRP, Dianova) gekoppelt, welcher an eine zur nachfolgenden Detektion benötigten Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden war. Als Detektionssystem wurde das „Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate“ Chemilumineszenz-Kit (Pierce), als Dokumentationsanlage die „universal hood II“ (BioRad) mit der Software „Quantity One“ verwendet.

2.2.13. Experion™ Automated Electrophoresis System

Mit dem „Experion™ Automated Electrophoresis System“ der Firma BioRad kann eine qualitative und quantitative Analyse von Proteinen mittels der „lab-on-chip“-Technologie durchgeführt werden, um genaue Daten über Menge und Reinheit der Proteine zu erhalten. Hierzu werden „Experion™ Pro260 Chips“ mit Hilfe des „Experion™ Pro260 Analysis“ Kits und der „Experion™ Priming Station“ mit Gel, Puffer und den Proben nach Angaben des Herstellers beladen. Anschließend werden an der „Experion™ Automated Electrophoresis Station“ alle Schritte einer Gel-basierten Elektrophorese automatisiert durchgeführt. Die Ergebnisse können direkt mit Hilfe der Experion™ Software ausgewertet werden.

2.2.14. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut

Monozyten sind das Ausgangsmaterial der *in vitro*-Generierung von Dendritischen Zellen. Die Monozyten gehören zusammen mit den Lymphozyten zu den peripheren mononukleären Zellen, den PBMC (peripheral blood mononuclear cells). Zur Isolierung der Monozyten aus den Lymphozytenkonzentraten wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll Paque (GE Healthcare) durchgeführt. Die verwendeten Blutproben, aus denen die „Buffy Coats“ gewonnen wurden, stammten von freiwilligen gesunden Spendern der Uniklinik Kiel, Institut für Transfusionsmedizin.

2.2.15. Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque™-Plus

Um die Zielfraktion der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus dem „Buffy Coat“ zu isolieren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll-Paque™-Plus (GE Healthcare) durchgeführt. Bei diesem Vorgang sammeln sich Lymphozyten, Thrombozyten und die gesuchten Monozyten entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Ausgangsmaterial und dem Ficoll an (vgl. Abb. 6).



Abb. 6: Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Paque.
Schichtung vor (A) und nach (B) der Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Zellen wurden steril aus einem „Buffy Coat“ entnommen und mit PBS auf vier 50 ml Röhren à 40 ml verdünnt. In acht weitere 50 ml Röhren wurde je 15 ml Ficoll-Paque™-Plus gegeben und dies mit je 20 ml verdünntem „Buffy Coat“ vorsichtig überschichtet. Die Röhren wurden nun bei 850 x g 20 Min. (ohne Bremse, Raum-

temperatur) zentrifugiert. Die PBMC befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die Zellen wurden steril abpipettiert und mit PBS auf vier 50ml Röhren à 30 ml verdünnt und nachfolgend sedimentiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 10 ml PBS gelöst.

2.2.16. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 200 µl präparierten mononukleären Zellen mit 800 µl PBS gemischt und an dem Gerät „Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer“ (Beckmann Coulter) die Zellzahl bestimmt. Das Gerät führt automatisch eine Trypan-blau-Färbung und die Auswertung dieser durch.

2.2.17. Anreicherung monozytärer Zellen durch magnetische Zellseparation

Damit eine möglichst reine Population von Monozyten zur Differenzierung zur Verfügung stand, wurden CD14-positive-Zellen aus den PBMC durch magnetische Zellseparation an einer „MidiMACS™“-Säule unter Verwendung von „CD14-MicroBeads“ (Miltenyi Biotec) gewonnen.

Hierzu wurden 1×10^8 Zellen in 800 µl PBS suspendiert und mit 200 µl CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotec) für 20 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Verdünnung mit 10 ml PBS und nachfolgender Zentrifugation bei 544 x g für 5 Min. wurde das Pellet in 2,5 ml PBS resuspendiert und auf die vorher mit PBS äquilibrierte MACS-Säule gegeben. Die mit den CD14-Microbeads markierten Zellen stellten die Fraktion der CD14-positiven Monozyten dar. Während des Passierens der Säule am MidiMACS™-Separator (Miltenyi Biotec) wurden die markierten Monozyten an der Säule durch magnetische Wechselwirkung zurückgehalten. Im Anschluss an die Bindung der Zellen erfolgte ein Waschschrift mit 4 ml PBS zur Entfernung nicht oder unspezifisch gebundener Zellen. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Gerät - und der damit verbundenen Entnahme der Säule aus dem magnetischen Feld - wurden die Monozyten durch Spülen der Säule mit 4 ml PBS gewonnen. Das Resultat der Zellsortierung mittels MACS wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.18. Differenzierung monozytärer Zellen hin zu Dendritischen Zellen

Die durch die MACS-Zellsortierung gewonnene Fraktion der CD14-positiven Monozyten wurde nun in Kultur gebracht und mit Hilfe von Zytokinen zu unreifen Dendritischen Zellen differenziert.

Dazu wurde die CD14-positive Zellfraktion nach der MACS-Sortierung mit PBS gewaschen und nachfolgend in 30 ml auf 37°C vorgewärmtem CellGro® DC-Medium (CellGenix) aufgenommen und nachfolgend mit unterschiedlichen Kombinationen von Zytokinen versetzt:

IL-4 / GM-CSF:	500 U/ml IL-4 800 U/ml GM-CSF
IFN- α / GM-CSF:	1000 U/ml IFN- α 800 U/ml GM-CSF
IFN- β / IL-3:	1000 U/ml IFN- β 500 U/ml IL-3

Die Zytokine wurden am Tag 0 und nachfolgend alle zwei Tage zugesetzt. Dafür wurden die Zellen bei 544 x g für 5 Min. zentrifugiert, das Pellet in 10 ml Medium mit dem spezifischen Zytokin-Cocktail resuspendiert und erneut bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach sechs Tagen wurden die so differenzierten Zellen geerntet.

2.2.19. Maturation unreifer Dendritischer Zellen

Zur Maturation unreifer Dendritischer Zellen wurden je 1×10^6 der unterschiedlich differenzierten unreifen DZ in 1 ml CellGro®-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturplatte pipettiert. Zur Analyse des Einflusses der in Hek 293T exprimierten und nachfolgend aufgereinigten Tribodies auf die Ausreifung der DZ wurde das Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen der Tribodies supplementiert. Bei der Positivkontrolle wurde das CellGro®-Medium mit einem definierten Zytokin-Cocktail aus den proinflammatorischen Zytokinen Prostaglandin E₂ (PGE₂), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) versetzt. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank (37°C, 95% Luftfeuchte, 6% CO₂) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde mittels Antikörper-Färbung im Durchflusszytometer die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD83 untersucht.

2.2.20. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Analyse von Größe, Granularität und Fluoreszenz von in Suspension befindlichen Zellen. Das Prinzip beruht auf der Emission optischer Signale einer Zelle bei Passage durch einen Laser. Mittels Photodetektoren werden diese optischen Signale in Form von Vorwärtsstreuung (Forward Scatter) und Seitwärtsstreuung (Side Scatter) sowie die Fluoreszenz der Zellen gemessen.

Um bestimmte Eigenschaften wie z.B. die Expression von Oberflächenmarkern auf Zellen nachzuweisen, können diese mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die gesuchten Marker hybridisiert werden. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen monochromatischen Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt dann unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf sein Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage über z.B. die Expressionshöhe von Oberflächenmolekülen. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zelle (Kerngröße, Granularität) gewonnen.

Es wurden die Durchflusszytometer FC500 (Beckmann Coulter) und Navios (Beckmann Coulter) verwendet. Beide Geräte verfügten über einen Argon-Laser der Wellenlänge 488nm. Zur Färbung von Zelloberflächenantigenen wurden Antikörper verwendet, an die FITC, PE, PC5 oder ECD gekoppelt war. Es wurden Antikörpern der Firmen BD-Biosciences, Beckmann-Coulter, Miltenyi, Abcore und Qiagen verwendet. Die Durchflusszytometrie wurde einerseits zur Überprüfung der einzelnen Schritte der Monozyten-Gewinnung genutzt, andererseits gab sie Aufschluss über die Expression von Oberflächenmarkern auf den untersuchten Zellen, wie z.B. über die Reifungsmarker auf den DZ CD80 und CD86. Darüber hinaus konnte die spezifische Bindung der exprimierten und aufgereinigten Tribodies auf den Antigen-exprimierenden Zellen untersucht werden.

Für eine Probe wurden 1×10^5 Zellen in 100 μ l PBS suspendiert. Fc-Rezeptoren wurden nachfolgend zunächst mit Poly-IgG für 10 Min. bei 4°C geblockt. Danach wurde die Probe in einem zweiten Schritt mit je 8 μ l der direkt mit einem Fluorochrom markierten Antikörper versetzt. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 μ l PBS resuspendiert

und für die Analyse mittels FACS eingesetzt. Zum Nachweis der Tribody-Bindung wurde zunächst eine Inkubation der Zellen mit den hergestellten Molekülen vorgenommen, die dann im Anschluss an einen Waschschrift mit einem an den His- oder Strep-Tag der Tribodies bindenden, direkt Fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper detektiert werden konnten. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der CXP-Software und der Kaluza-Software der Firma Beckmann Coulter.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung rekombinanter bispezifischer Moleküle, die neben der selektiven Adressierung der Dendritischen Zellen auch deren Maturation induzieren sollten.

Hierbei sollte die Spezifität zur Bindung an die DZ als Zielzellpopulation durch Verwendung von Domänen, die selektiv an Oberflächenproteine der DZ binden, erfolgen. Besonders geeignet erscheinen die auf den DZ exprimierten Endozytoserezeptoren, da sie neben der Selektivität auch die Option einer Antigenbeladung im Hinblick auf eine spätere weitergehende Entwicklung der Moleküle bieten. Als Zielstruktur wurde daher der auf humanen DZ vorkommende hochaffin IgG-bindenden $Fc\gamma$ -Rezeptor I ($Fc\gamma RI/ CD64$) ausgewählt. Zur Induktion der DZ-Reifung sollten die Moleküle zudem eine agonistische, CD40-gerichtete Domäne enthalten.

Als Format für die Rezeptor- bzw. CD40-bindenden Domäne wurden sogenannte scFv („*single chain Fragment variable*“) gewählt. In diesem Format sind die variablen Regionen der leichten und schweren Kette des parentalen Antikörpers über einen verknüpfenden, flexiblen Bereich miteinander auf einem Strang verbunden (vgl. Abb. 7). Obwohl hierdurch die für die Antigenbindung notwendige Sequenz auf ein Mindestmaß reduziert wird, bleibt die Antigenspezifität des Moleküls erhalten.

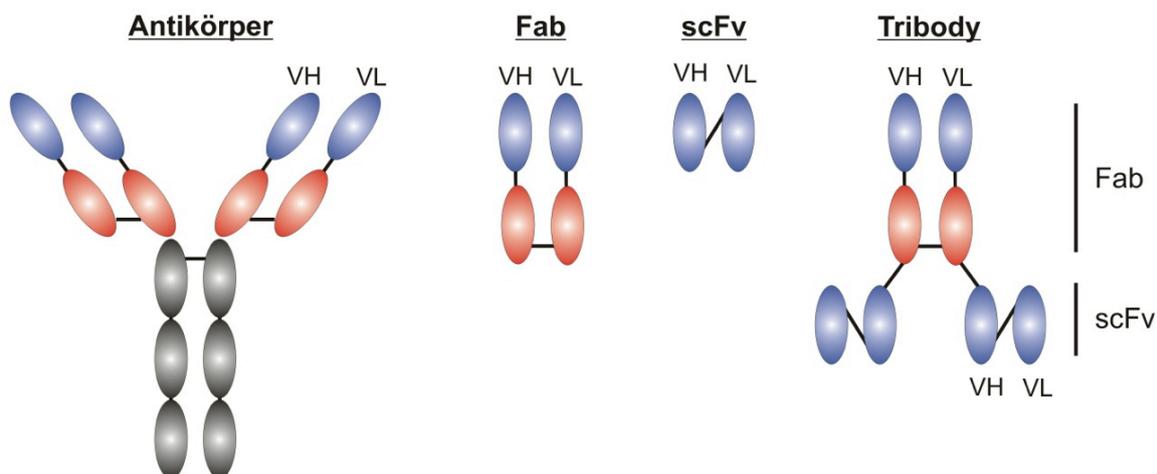


Abb. 7: Schematische Darstellung von Antikörper, Fab-, scFv- und Tribody-Molekül.

Die Rekombination der Antigen-bindenden (blau) und konstanten Regionen (rot) des Fab-Anteils des parentalen Antikörpers ermöglicht die Konstruktion neuer mono-, bi- oder trivalenter Moleküle mit ausgewählten Bindungsspezifitäten.

Zur Verknüpfung der beiden scFv Domänen wurde das Fab-Fragment als Format verwendet. Die Bindung der konstanten Regionen eines Fab und deren Verknüpfung über eine Disulfidbrücke im Anschluss an die Synthese und Sekretion in das Endoplasmatische Retikulum sorgen für die Heterodimerisierung. Die beiden scFv-Domänen können so rekombinant mit dem Fab-Anteil der leichten (V_L) bzw. schweren (V_H) Kette verknüpft werden (siehe Abb. 8). Dies ermöglicht die freie Kombinierbarkeit der scFv- V_H -Sequenz mit verschiedenen scFv- V_L -Konstrukten, was auch im Hinblick auf eine einfache Weiterentwicklung dieses Ansatzes wünschenswert erscheint.

Die zunächst allein für die Heterodimerisierung verwendete freie Valenz der gegen CD20-gerichteten Fab-Region ließe sich nachfolgend ebenso mit einer weiteren Bindungsspezifität variieren, so dass die zunächst bispezifischen Moleküle hinsichtlich einer Trispezifität weiterentwickelt werden können.

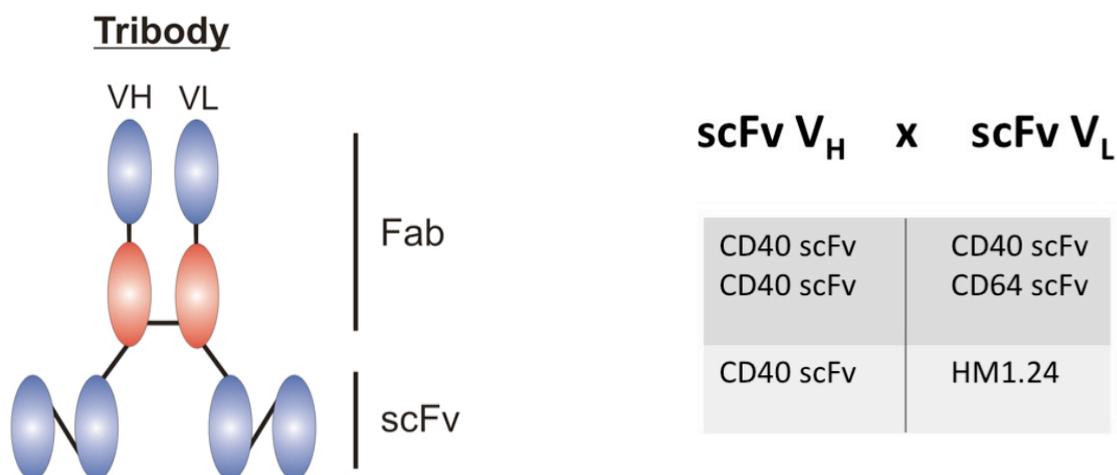


Abb. 8: Konstruktion bispezifischer Moleküle zur selektiven Adressierung Dendritischer Zellen. An die für die leichte (V_L) und schwere (V_H) Kette des Fab-Fragments (links) kodierenden Sequenzen werden die für die ausgewählten scFv-Anteile (links) kodierenden Bereiche angefügt. Auf diese Weise können homo- und heterodimere Moleküle generiert werden, welche die agonistische, DZ-aktivierenden CD40-Domäne mono- oder bivalent allein $[(CD40 \text{ scFv} \times CD40 \text{ scFv}) \times CD20 \text{ Fab}]$ bzw. $[(CD40 \text{ scFv} \times HM1.24) \times CD20 \text{ Fab}]$, oder aber in Kombination mit den Fc-Rezeptor-bindenden scFv (CD64), verbinden.

3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

3.1.1. Klonierung der Tribodies

Die Konstruktion der für die Arbeit vorgesehenen Fab-Moleküle sollte ausgehend von bereits vorliegenden CD20-Fab Derivaten (Staudinger, pers. Mitteilung) erfolgen. Die schwere Kette (V_H) besteht hierbei aus dem konstanten Anteil C_{H1} und der variablen Region V_H eines gegen CD20 gerichteten Antikörpers (vgl. Abb. 9). Im 5'-Bereich ist der scFv, welcher gegen CD40 gerichtet ist, eingefügt. Im 3'-Bereich des V_H -Anteils wurde zur späteren Anreicherung und Detektion des rekombinanten Proteins eine für sechs Histidine kodierende Nukleotid-Sequenz angefügt. Die leichte Kette (V_L) setzt sich aus einem scFv-Anteil im 5'-Bereich, dem konstanten Anteil (C_L) und der variablen Region (V_L) der leichten Kette des CD20-Antikörpers zusammen. Zur Sekretion des rekombinanten Proteins aus transgenen Zellen tragen die cDNA-Anteile zudem einen für ein Sekretionssignal kodierenden Anteil im 5'-Bereich.

Sowohl die schwere Kette des Tribody [CD40 scFv x CD20 V_H], als auch die leichten Ketten mit jeweils einem CD20 V_L -Anteil und den scFv gegen CD40 und CD64 lagen bereits als Plasmide für die Expression in Säugerzellen im Vektor pSecTag kloniert vor.

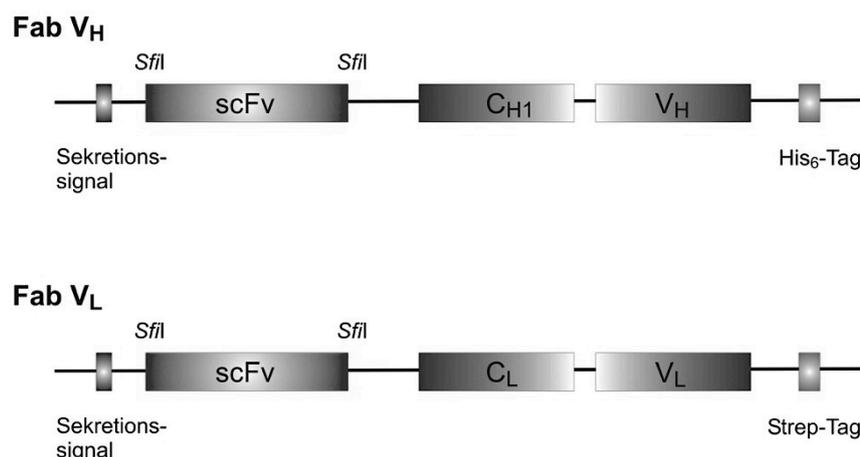


Abb. 9: Schematische Darstellung der leichten und schweren Kette des Fab-Moleküls.

(Abkürzungen: V_H : variable schwere Kette, V_L : variable leichte Kette, C_L : konstante leichte Kette, C_{H1} konstante schwere Kette, scFv: einzelsträngiges variables Fragment, *Sfi*I Erkennungssequenz für die Restriktionendonuklease *Sfi*I).

Demnach musste in einem der Plasmide, welches die Leichtketten-Sequenzen trägt, der scFv-Anteil durch die für HM1.24 kodierende Sequenz ausgetauscht werden. Dies erfolgte durch Hydrolyse der Plasmid-DNA des Vektors pSecTag [LC CD20 V_L x CD64 scFv] mittels der Restriktionsendonuklease *Sfi*I (siehe Abb. 10). Aus dem Plasmid pSecTag [HM1.24 x GFP] wurde die zu inserierende HM1.24 cDNA ebenfalls durch *Sfi*I-Hydrolyse erhalten. Die anschließend vorliegenden Hydrolyseprodukte wurden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Fragmente sowohl des *Sfi*I-Vektor-Anteils pSecTag [LC CD20 V_L] (6,6 kb), als auch des 370 bp großen *Sfi*I-HM1.24-Fragments, aus dem Gel eluiert. Das so erhaltene pSecTag [LC CD20 V_L] Vektor-Fragment wurde mit der HM1.24-cDNA ligiert. Nach Transformation von *E. coli* XL1 Blue erfolgte die Propagation potentieller Klone aufgrund der im Vektor pSecTag kodierten Ampicillin-Resistenz durch Anzucht auf Ampicillin-haltigem Selektionsmedium. Potentielle, das rekombinante Plasmid-tragende Klone wurden nachfolgend kultiviert und für die Isolierung der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab eingesetzt.

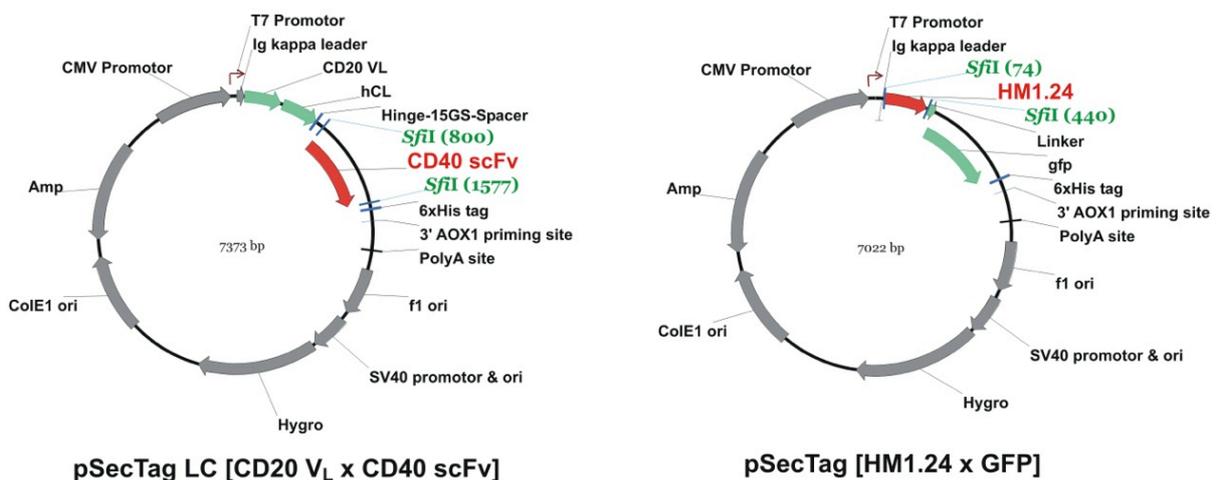


Abb. 10: Plasmidkarten des pSecTag LC [CD20 VL x CD40 scFv] und pSecTag [HM1.24 x GFP].

3.1.2. Charakterisierung der [(CD40 scFv x HM1.24) x CD20 Fab]-Tribody-Klone durch DNA-Hydrolyse und Gelelektrophorese

Zur Identifizierung des rekombinanten Plasmids pSecTag LC [CD20 V_L x HM1.24] wurde eine Hydrolyse der aus den Plasmid-DNA-Präparationen ausgewählten Klone mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I durchgeführt. Nachfolgend wurden die so erhaltenen Fragmente in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. Abb. 11). Als Kontrolle dienten die ebenfalls *Sfi*I hydrolysierten parentalen Vektoren pSecTag LC [CD20V_L x CD64 scFv] und pSecTag [HM1.24 x GFP].

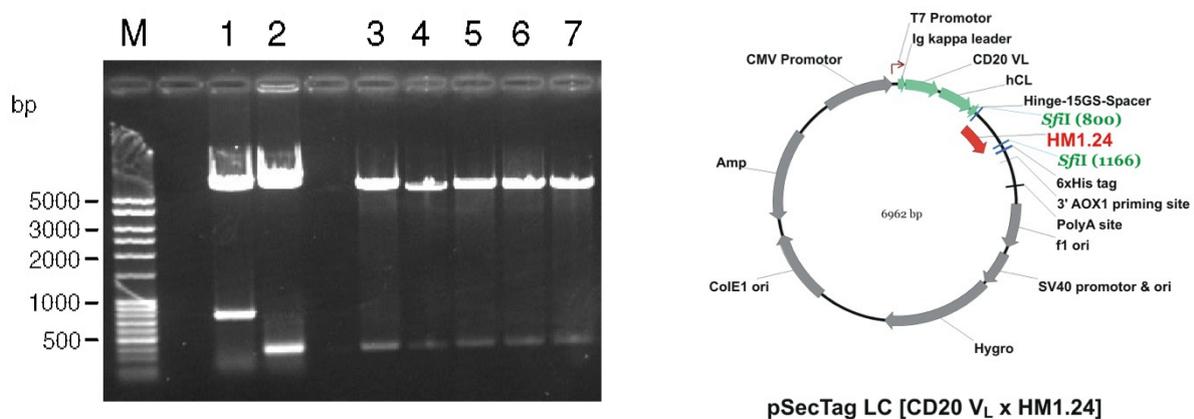


Abb. 11: Identifizierung potentieller pSecTag LC [CD20 V_L x HM1.24] Klone.

Gelelektrophoretische Auftrennung (links) *Sfi*I-hydrolysierten Plasmid-DNA fünf unabhängiger potentieller Klone (3-7) und der parentalen Vektoren pSecTag LC [CD20 V_L x CD64 scFv] (1) sowie pSecTag [HM1.24 x GFP] (2) (M: Marker; 1%-iges Agarose-TAE-Gel; Ethidiumbromid-gefärbt). Plasmidkarte des pSecTag LC [CD20 V_L x HM1.24] (rechts).

Durch *Sfi*I-Hydrolyse des parentalen Plasmids pSecTag LC [CD20 V_L x CD64 scFv] entsteht neben dem Vektor pSecTag LC [CD20 V_L] (> 6,6 kb) das 800 bp große *Sfi*I Fragment des CD64 scFv. Aus dem Plasmid pSecTag [HM1.24 x GFP] wird neben dem Vektoranteil pSecTag GFP die für HM1.24 kodierende Sequenz mit einer Größe von 370 bp erhalten. Demnach weist das Muster der Fragmentgrößen aller fünf ausgewählten Klone darauf hin, dass in den analysierten Plasmiden die HM1.24-*Sfi*I Kasette vorliegt. Eine nachfolgende Sequenzierung der Plasmide bestätigte die erfolgreiche Substitution des CD64 scFv im pSecTag LC [CD20 V_L] durch die HM1.24 cDNA (360 bp), so dass folglich alle zur Expression der CD20 Fab-Moleküle benötigten Konstrukte vorlagen.

3.1.3. Expression und Anreicherung der rekombinanten Moleküle

Durch Verwendung des Expressionsvektors pSecTag in Kombination mit der im 5'-Bereich der Konstrukte vorliegendem Sekretionssignals wird die Expression der klonierten Tribody-cDNA in eukaryotischen Zellen als sekretierte Proteine ermöglicht. Die vektorielle Translation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum erlaubt die posttranslationale Modifizierung des Proteins, wie z.B. das Schließen intra- und intermolekularer Disulfidbrücken, so dass die Dimerisierung der Tribody-Moleküle möglich wird. Im Anschluss erfolgt die Sekretion dimerer Moleküle in das Medium.

Die Expression der Fab-Derivate sollte zunächst transient in eukaryotischen Zelllinien erfolgen. Hierzu wurde die eukaryotische Expressionslinie Hek 293T (Human Embryonic Kidney) jeweils mit den entsprechenden Fab-Konstrukten, die für die leichte und schwere Kette kodierten, transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte eine fünftägige Kultur der Transfektanden. Nachdem das in den Zellen synthetisierte Protein in das Zellkulturmedium sekretiert wurde, wurde das Medium täglich gewechselt und über eine Woche gesammelt.

Die Anreicherung der Fab-Derivate aus dem Zellkulturmedium erfolgte durch Affinitätsreinigung. Die verwendete Affinitätsmatrix erlaubt aufgrund eines immobilisierten anti- κ -Domänenantikörpers die selektive Anreicherung von Molekülen, die eine humane κ -Leichtkette tragen. Aufgrund dieser Selektivität war von einer optimalen Anreicherung der rekombinanten CD20-Fab-Moleküle auszugehen. Nach Beladen der Matrix bei annähernd neutralem pH (pH 7,5) wurde nicht oder unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen mit Puffer entfernt. Im Anschluss erfolgte die Elution des gebundenen Proteins mittels eines pH-Stufengradienten (pH 3.0).

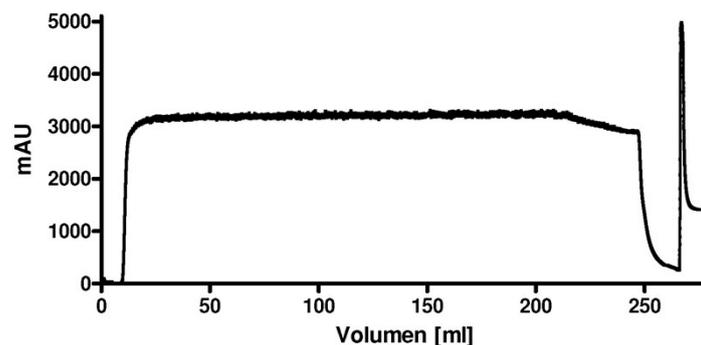


Abb. 12: Profil der Affinitätschromatographie zur Anreicherung rekombinanter Fab-Moleküle über anti- κ -Affinitätsmatrix.

3.1.4. Qualitative und quantitative Charakterisierung der produzierten Proteine

Die durch Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfractionen wurden nachfolgend mittels SDS-Page, Western-Blot und automatisierter Experion[®]-Elektrophorese qualitativ und quantitativ charakterisiert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Elutionsfraktionen mittels SDS-Page ermöglicht eine Aussage über die Größe einzelner, in den Fraktionen vorliegender Proteine, sowie über die Homogenität, d.h. die Reinheit der Fraktionen. So konnte in dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (vgl. Abb. 13, A) in den Fraktionen der Affinitätsaufreinigung des CD20 Fab mit weiterer Spezifität für CD64 scFv und CD40scFv [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei ca. 65 kDa ermittelt werden (vgl. Abb. 13, A). Diese Größe entspricht etwa der berechneten Masse der Summe der rekombinanten, reduzierten Fab-Fragmente (58 kDa). Auf gleicher Höhe liegt die Bande für das CD20 Fab-Derivat mit bivalenter Spezifität für CD40 [(CD40scFv x CD40scFv) x CD20 Fab]. Dem gegenüber weist die Fraktion nach Anreicherung des CD20 Fab-Moleküls mit monovalenter Bindungsspezifität für CD40 und dem der leichten Kette angefügtem HM1.24 Antigen zwei Banden auf. Dies ist vermutlich auf die Größendifferenz zwischen dem CD40 scFv-Anteil (58 kDa) im Vergleich zum kleineren HM1.24-Anteil (45 kDa) zurückzuführen. In allen drei Fraktionen sind neben den dominierenden Banden lediglich minimale Kontaminationen der Proben mit Proteinen anderer Größe zu detektieren.

Zur weiteren Analyse der Elutionsfraktionen wurden die Proben im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung mittels Western-Blot auf eine Membran überführt. Zur Detektion der rekombinanten Moleküle wurde eine Hybridisierung mit Antikörpern vorgenommen, die gegen die in der leichten und schweren Kette der Fab-Derivate vorliegende 6x Histidin-Sequenz (His₆-Tag) gerichtet sind. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte durch Umsatz eines Farbsubstrats durch das an die Antikörper gekoppelte Enzym „Meerrettich-Peroxidase“. Demnach handelt es sich bei den Proteinen, welche die dominierenden Banden im SDS-Gel repräsentieren, um die den 6x Histidin-Anteil tragenden leichten und schweren Ketten der rekombinanten CD20 Fab-Derivate (vgl. Abb. 13, B).

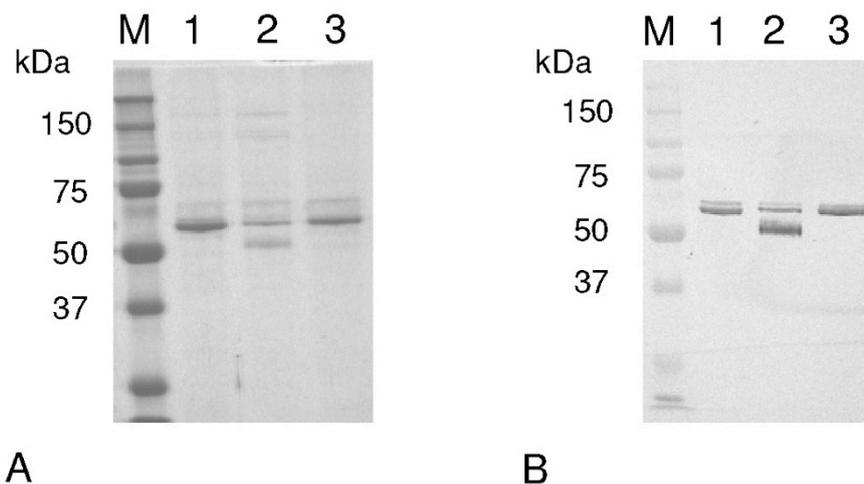


Abb. 13: Nachweis der durch Affinitätschromatographie angereicherten rekombinanten Proteine.

Nach Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese in einem 10%-igem SDS-Gel (links, Coomassie-gefärbt) erfolgte der Nachweis der Proteine mittels Western-Blot unter Verwendung eines anti-His₆-Tag-Antikörpers, eines Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären anti-Maus-Antikörpers sowie eines Chemilumineszenz Substrats (rechts).

M:	Marker
1:	[(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]
2:	[(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab]
3:	[(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]

Zur weiteren Analyse der Elutionsfraktionen insbesondere hinsichtlich der Quantifizierung der vorliegenden Proteine sowie deren Homogenität wurden diese einer automatisierten Elektrophorese mittels des „Experion™ Automated Electrophoresis System“ (BioRad) unterzogen. So konnten in den die rekombinanten Fab-Moleküle

enthaltenen Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen zwei Fragmente der Größe 69 kDa und 71 kDa nachgewiesen werden (vgl. Abb. 14). Die Größe der beiden Fragmente entspricht etwa dem Molekulargewicht der leichten bzw. schweren Kette der rekombinanten CD20 Fab Derivate.

Die Auftrennung der Elutionsfraktionen mittels des Experion-Systems erlaubt unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Aussage über das Vorliegen der die Fab-Ketten verbindenden, d.h. stabilisierenden Cystein-Bindungen (Disulfidbrücken) und damit die Detektion heterodimerer Fab-Moleküle. So konnte gezeigt werden, dass die Elektrophoreseprofile der Elutionsfraktionen des [(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab], als auch des [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] unter nichtreduzierenden Bedingungen Signale in einer Größe aufweisen, die einer Molekülmasse von 140 kDa entsprechen (siehe Abb. 14). Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der rekombinanten CD20 Fab-Dimere. Allein das Elutionsprofil des [(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab] weist aufgrund der Banden im hochmolekularen Bereich auf das Vorkommen multimeren Proteins, also auf Aggregate der rekombinanten [(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab]-Derivate in der Fraktion, hin.

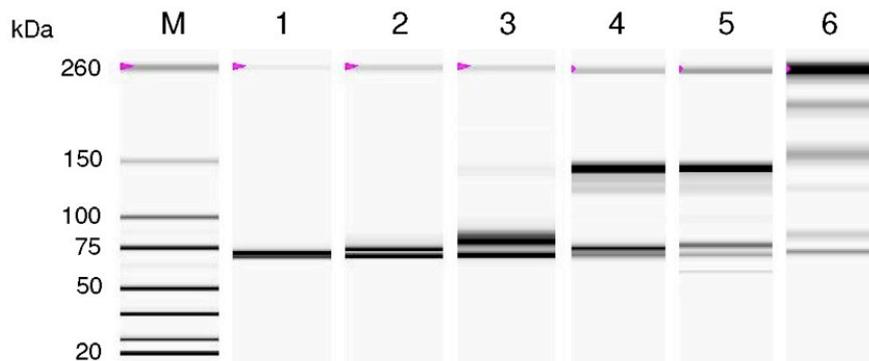


Abb. 14: Chromatographische Charakterisierung der rekombinanten Proteine hinsichtlich Reinheit und Quantität.

Die Auftrennung der aufgereinigten rekombinanten Proteine aus den Elutionsfraktionen erfolgte mittels Experion-Technologie unter reduzierenden (1-3) sowie nichtreduzierenden (4-6) Bedingungen.

- M: Marker
- 1, 3: [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]
- 2, 4: [(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]
- 3, 6: [(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab]

Da eine Reduktion der Probe, d.h. das Auflösen von Disulfid-Bindungen, zu Banden im niedermolekularen Bereich führte, welche den monomeren Fab-Anteilen entsprachen, kann von einer Multimerisierung der Fab-Anteile über Disulfidbrücken ausgegangen werden. Mögliche Ursache hierfür könnten die im HM1.24 Anteil vorliegenden drei Cysteine sein.

Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden nachfolgend mittels Größenausschlusschromatographie unter nativen Bedingungen aufgetrennt, um die Fraktionen hinsichtlich des Vorliegens dimerer bzw. multimerer Fab-Moleküle zu analysieren. Durch Verwendung eines Protein-Größenstandards wurde hierzu zunächst eine Kalibrierung vorgenommen. Da die Elutionszeit bzw. das Elutionsvolumen bei gleichen Chromatographiebedingungen proportional zur Molekülgröße sind, kann so von der Elutionszeit bzw. dem Volumen auf die Molekülgröße der Proteine in den Fraktionen geschlossen werden. Nachfolgend wurden die CD20 Fab-Derivate unter gleichen Bedingungen aufgetrennt.

Für die $[\text{CD40 scFv}]_2$ - und $[\text{CD64 scFv} \times \text{CD40 scFv}]$ -bispezifischen Fab-Moleküle wurde ein maximaler Anstieg der Absorption ($\Delta E_{280\text{nm}}$) bei einem Fließvolumen von 13,6 ml beobachtet (vgl. Abb. 15), was einer Molekülmasse von 125 kDa entspricht. Im Gegensatz hierzu konnte für das $[(\text{CD40 scFv} \times \text{HM1.24}) \times \text{CD20 Fab}]$ -Derivat eine maximale Absorption bei 11 ml belegt werden, was auf das Vorliegen großer Proteine mit einer Masse von > 200 kDa hindeutet. Damit wird die aus den Ergebnissen der SDS-Page getroffene Annahme bestätigt, dass in dieser Fraktion gehäuft multimerer Fab-Fragmente vorliegen.

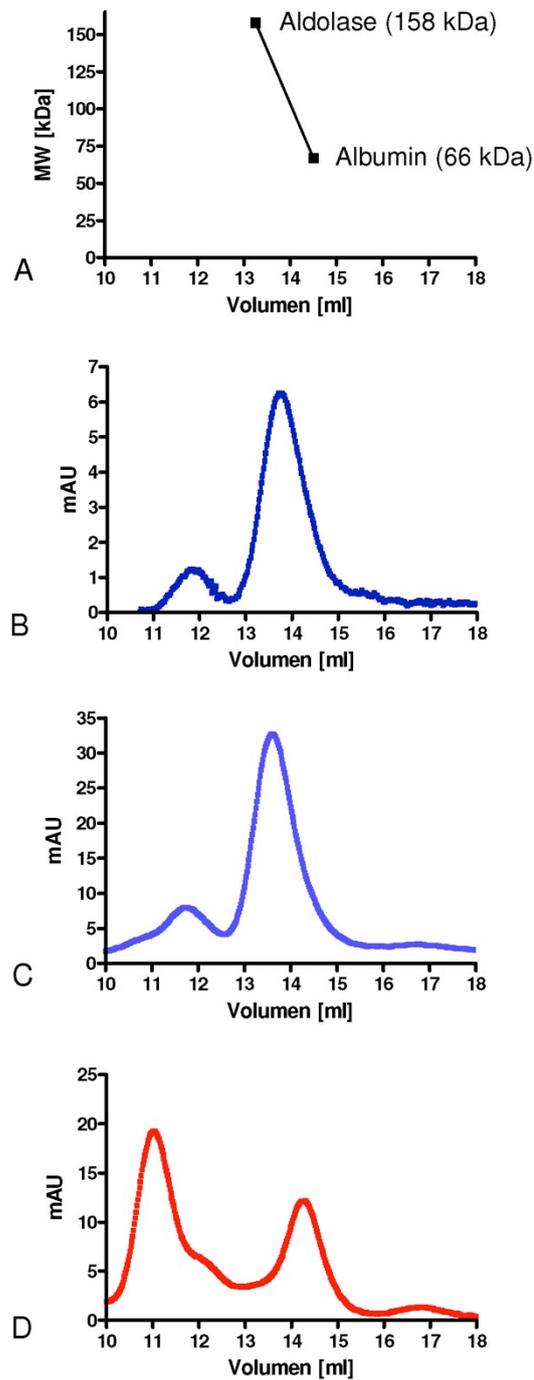


Abb. 15: Gelfiltration der aufgereinigten rekombinanten CD20-Fab-Moleküle.

- A. Größenstandard zur Kalibrierung
- B. [(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]
- C. [(CD40 scFv x CD64 scFv) x CD20 Fab]
- D. [(HM1.24 x CD40 scFv) x CD20 Fab]

3.1.5. *In vitro* Mutagenese des [(CD40 scFv x HM1.24) x CD20-Fab]-Derivats

Wie durch gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktion der [(HM1.24xCD40) x CD20-Fab]-Derivate gezeigt wurde, liegen nach der Expression der HM1.24 cDNA enthaltenen Plasmide gehäuft multimere Fab-Moleküle vor. Um eine Multimerisierung der Fab-Derivate über die in der HM1.24-cDNA vorliegenden und für drei Cysteine kodierenden Triplets zu verhindern, wurde eine *in vitro* Mutagenese der HM1.24 cDNA in dem entsprechenden Konstrukt vorgenommen. Hierdurch sollten die drei Cysteine an Position 158, 187 und 271 durch Serin ausgetauscht werden. Durch die so erhaltene cDNA Sequenz wird ein mutagenisiertes HM1.24 Protein kodiert, welches die gleichen immunogenen CD8-restringierten Epitope wie das ursprüngliche Epitop aufweisen sollte. Dies konnte durch eine computerbasierte Berechnung bzw. Vorhersage der entsprechenden von den translatierten cDNAs abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen ermittelt werden (verwendete Algorithmen auf <http://www.syfpeithi.de> und <http://tools.immune-epitope.org>).

Zur Substitution der für die Cysteine kodierenden Triplets wurde zunächst ausgehend von der ursprünglichen HM1.24 cDNA eine Mutagenese-PCR mit dem Oligonukleotid HM1.24-mut1 vorgenommen. Nach selektiver Hydrolyse der parentalen Plasmid-DNA mit *DcmI* wurde eine Transformation von *E. coli* vorgenommen. So erhaltene *E. coli* Klone wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA eingesetzt. Nachdem der vorgenommene Austausch des Nukleotids durch Sequenzierung bestätigt wurde, konnte die nun vorliegende mutagenisierte HM1.24 cDNA für eine weitere PCR-Mutagenese mit dem Oligonukleotid HM1.24-mut2 zur Substitution der Base an Position 187 verwendet werden. Letztlich wurde diese HM1.24 Mutagenese noch mit dem Oligonukleotid HM1.24-mut3 vorgenommen, so dass schließlich Plasmide mit der an drei Positionen mutagenisierten HM1.24 cDNA vorliegen. Diese wurde nach Bestätigung der Basenaustausche zur Substitution der parentalen HM1.24 cDNA im Expressionsplasmid pSecTag LC [CD20 VL x HM1.24] eingesetzt, so dass das Plasmid pSecTag [CD20 VL x HM1.24_{mut}] erhalten werden konnte.

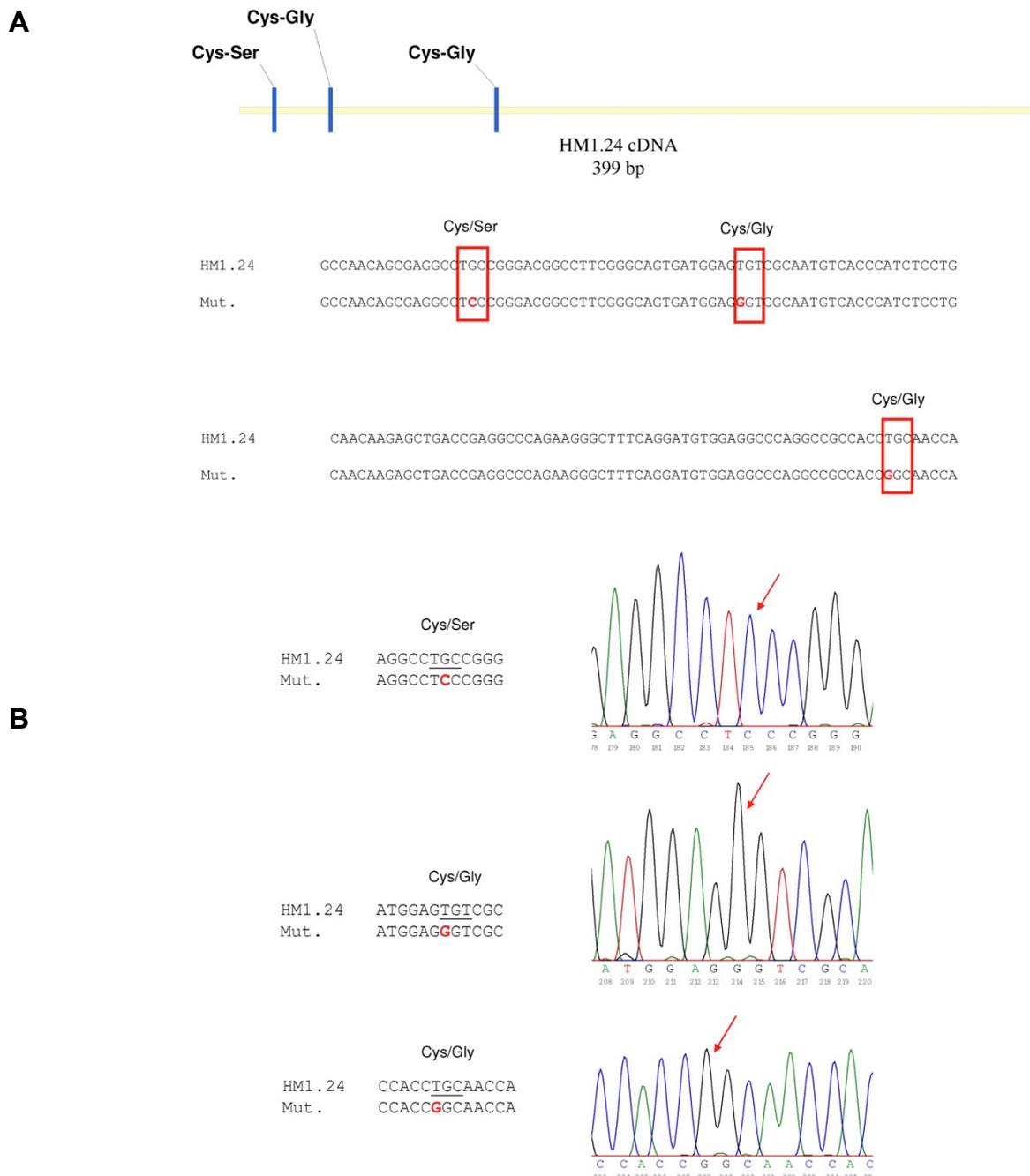


Abb. 16: Nachweis der *in vitro* Mutagenese in der HM1.24-cDNA.

Schematische Darstellung der HM1.24 cDNA (A) und der zu mutagenisierende Cysteine (hervorgehoben). Nachweis der erfolgten Mutagenese der HM1.24 cDNA durch Sequenzierung (B).

3.1.6. Expression des CD20 Fab mit mutagenisiertem HM1.24

Das nach der in vitro Mutagenese (s.o.) erhaltene Plasmid wurde zur Expression der dimeren CD20 Fab Derivate mit CD40 scFv und HM1.24 Antigen [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab] eingesetzt. Die Reinigung wurde durch Affinitätschromatographie an einer Anti-Kappa-Matrix vorgenommen. Die so gewonnenen Elutionsfraktionen wurden nachfolgend für eine Größenausschlusschromatographie zur Identifizierung dimerer CD20 Fab-Moleküle eingesetzt. Im Gegensatz zu den nach Expression des parentalen HM1.24 Konstruktes erhaltenen Signale, konnten hierbei lediglich Signale detektiert werden, die auf das Vorhandensein dimerer CD20 Fab Moleküle schließen ließen. Größere Moleküle mit einem Molekulargewicht über 160 kDa lagen in dieser Präparation nicht vor.

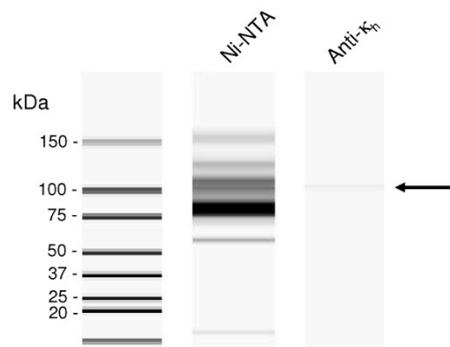


Abb. 17: Experi-Analyse der Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie des mutagenisierten [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab]-Proteins.

Neben der nach Affinitätschromatografie über Ni-NTA-Matrix erhaltenen Fraktion (Ni-NTA) wurde die Elutionsfraktion nach Aufreinigung des [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab]-enthaltenen Überstands über Anti-κ-Matrix (Anti-κ_h) zur Charakterisierung der Fraktionen hinsichtlich Homogenität sowie Quantifizierung der Proteine aufgetrennt.

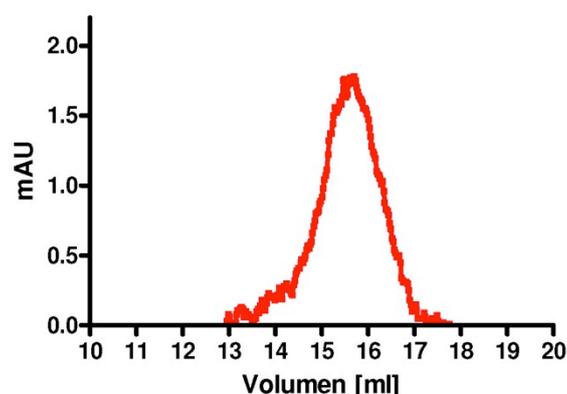


Abb. 18: Gelfiltration des mutagenisierten [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab]-Proteins.

Zur weiteren Charakterisierung der durch Affinitätschromatografie erhaltene Elutionsfraktion des [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab]-Proteins wurde eine Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Größe des Proteins vorgenommen.

3.1.7. Nachweis der Bindungsspezifitäten

Nachdem alle rekombinanten scFv-Fab-Fusionsmoleküle exprimiert und zur Homogenität aufgereinigt werden konnten, sollte die Antigen-Spezifität der scFv-Domänen und die des CD20-gerichteten Fab-Anteils ermittelt werden. Hierzu wurden Antigenbindungstests unter Verwendung vorliegender Antigen-positiver Zellen bzw. transfizierter Zelllinien durchgeführt, wobei Antigen-negative bzw. nicht transfizierte Zellen als Kontrollen dienten.

Zur Analyse der Antigen-Bindungsspezifität des CD20-Fab-Anteils der verschiedenen Fusionsproteine wurden CD20-positive Raji-Zellen eingesetzt. Die Detektion der Bindung der rekombinanten Fab-Moleküle an diese Zellen erfolgte durchflusszytometrisch unter Einsatz eines gegen den in den Proteinen vorliegenden His₆-Anteil (Hexa-Histidin-Tag) gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörpers. Sowohl für das [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab], als auch für die [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] und [(CD40 x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab]-Moleküle konnte eine dosisabhängige spezifische Bindung an Raji-Zellen (CD20⁺) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 19 und 20).

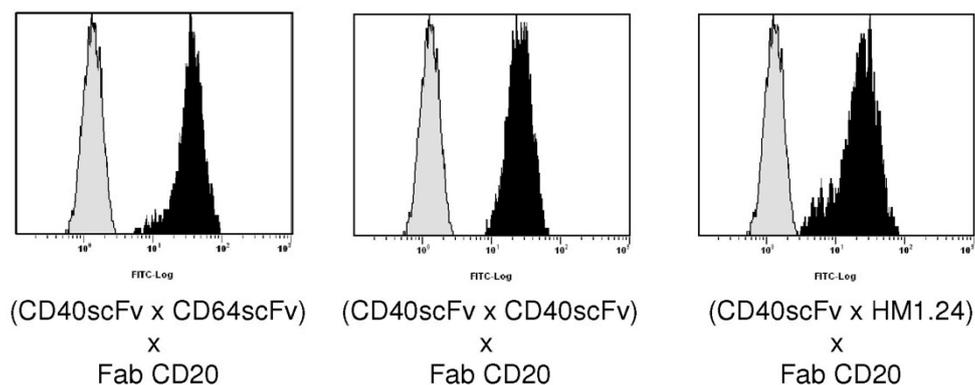


Abb. 19.: Durchflusszytometrischer Nachweis der Antigen-spezifischen Bindung der aufgereinigten rekombinanten CD20-Fab-Fusionsproteine auf CD20-positiven Zellen.

CD20-positive Zellen (Raji) wurden zum Nachweis der Antigen-spezifischen Bindung der rekombinanten CD20-Fab-Moleküle eingesetzt. Zur durchflusszytometrischen Detektion der Bindung dieser Fab-Moleküle an die Zellen wurde ein FITC-gekoppelter anti-His₆-Tag Antikörper eingesetzt.

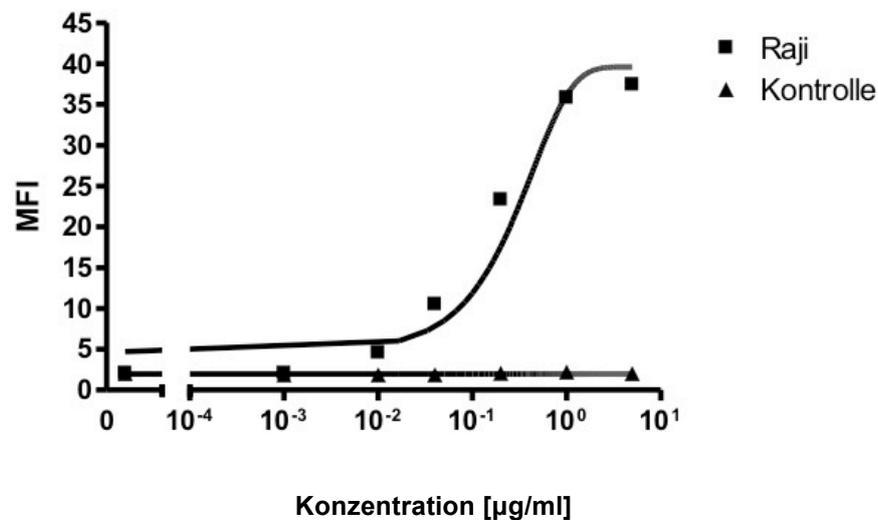


Abb. 20: Dosisabhängige Bindung des CD20 Fab-Moleküls an CD20-positive Zellen.

Zum Nachweis der dosisabhängigen Bindung der rekombinanten CD20-Fab-Moleküle wurden CD20-positive Raji-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Moleküle inkubiert. Nachfolgend wurden die gebundenen Proteine mit einem FITC-markierten anti-His₆-Tag-Antikörper im Durchflusszytometer quantifiziert. Als Kontrolle diente ein irrelevantes Fab-Molekül. (Abk.: MFI: durchschnittliche Fluoreszenzintensität, „mean fluorescent intensity“).

Nachdem die rekombinanten Fab-Moleküle neben dem CD20-gerichteten Fab-Anteil Domänen für die Adressierung von CD40 respektive CD64 im [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab], [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] bzw. [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab] aufweisen, sollte nachfolgend zudem die antigenspezifische Bindung an diese Antigene nachgewiesen werden. Hierzu standen Zelllinien zur Verfügung, welche die Antigene rekombinant exprimierten.

Der Nachweis der CD40-Bindung erfolgte unter Verwendung CD40-positiver CHO-Zellen, welche die CD40 kodierende cDNA tragen. Die Expression des CD40-Antigens konnte mit CD40-gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Zur Analyse der Bindung der exprimierten und aufgereinigten CD20-Fab-Moleküle mit CD40-Bindungsdomänen an CD40-positive Zellen (M. Staudinger, pers. Mitteilung) erfolgte indirekt durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der gegen den Hexa-Histidin-Tag gerichtet ist. Aufgrund der monovalenten Bindung des [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] weist dieses Molekül eine niedrigere Avidität im Vergleich zum bivalent CD40-bindenden [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab] auf (vgl. Abb. 21).

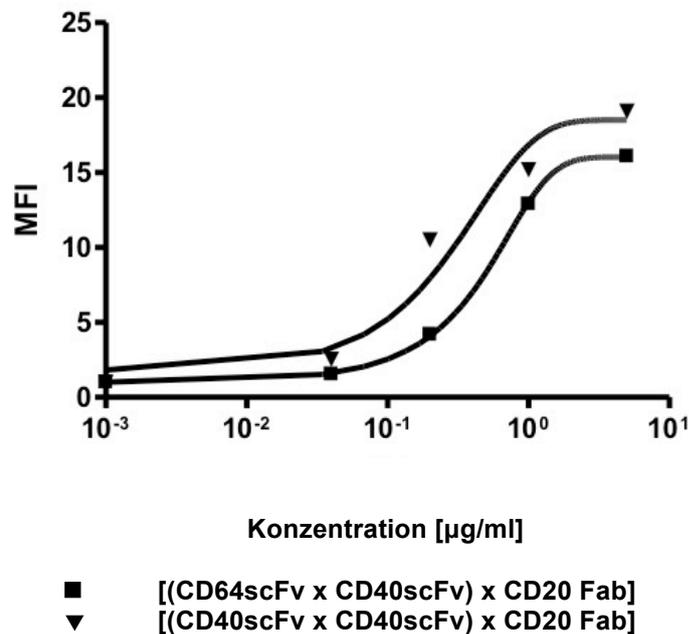


Abb. 21: Dosisabhängige Bindung des [(CD64scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]-Tribody auf CD40-positiven Hek293T.

Zum Nachweis der CD40-seitigen Bindung der rekombinanten Moleküle wurden transgene Hek293T-Zellen eingesetzt, die aufgrund einer stabilen Transfektion eine für CD40-kodierende cDNA tragen (Staudinger, pers. Mitteilung). Der Nachweis der Bindung der Moleküle auf den Zellen erfolgte wieder durchflusszytometrisch mit einem FITC-gekoppelten anti-His₆-Tag-Antikörper.

CD64-positive BHK-Zellen (M. Peipp, pers. Mitteilung) dienen zum Nachweis der Bindung der gegen CD64-gerichteten Domäne im CD20-Fab-Derivat [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]. Vergleichend wurde das [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab]-Molekül eingesetzt. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem gegen den His₆-Tag gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörper durchflusszytometrisch. Im Gegensatz zum bivalent CD40-bindenden Molekül konnte so eine dosisabhängige Bindung des CD20-Fab-Derivats mit CD64-bindenden Domäne an die CD64-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 22).

Zusammenfassend konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der Bindungsspezifitäten gezeigt werden, dass die Tribody-Moleküle [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab], [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] und [(CD40 scFv x HM1.24_{mut}) x CD20 Fab] als heterodimere Moleküle vorliegen, die entsprechenden Bindungswerten für CD20, CD40 bzw. CD64 aufweisen und damit für die weiteren funktionellen Analysen zur Verfügung stehen.

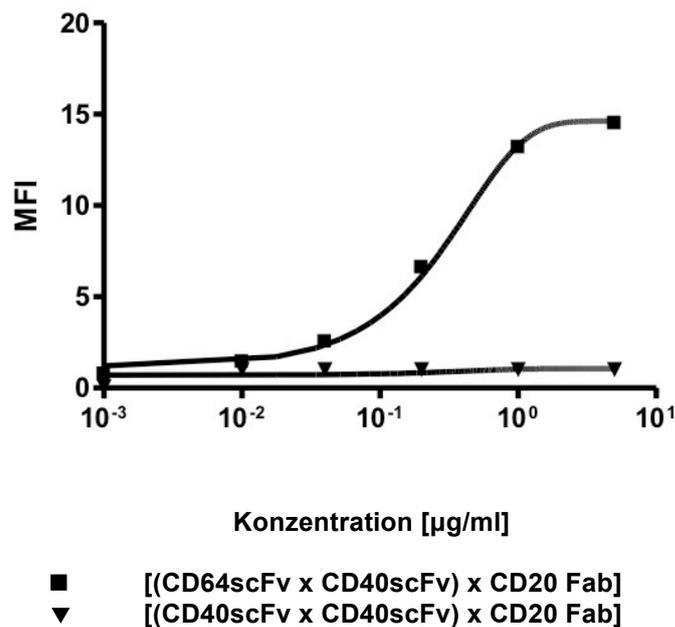


Abb. 22: Dosisabhängige Bindung des [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab]-Tribody an CD64 positive BHK.

CD64-positive BHK wurden zum Nachweis der dosisabhängigen, Antigen-spezifischen Bindung des CD64 scFv-tragenden Tribodies verwendet. Als Kontrolle diente das [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab]-Molekül. Durchflusszytometrisch wurde die quantitative Bindung der Moleküle über einen FICT-gekoppelten anti-His₆-Tag-Antikörper gemessen.

3.2. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Notwendige Voraussetzung für die Induktion einer T-Zell-Antwort stellen professionell Antigen-präsentierende Zellen, zum Beispiel Dendritische Zellen, dar. Aufgrund der geringen Frequenz dieser Zellen im Blut gesunder Spender werden für *ex vivo* Versuche zur Antigen-Beladung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen zumeist die aus Monozyten differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen verwendet. Diese Monozyten können aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert werden, wobei neben Vollblutspenden auch Lymphozytenkonzentrate eingesetzt werden können. Hieraus werden mononukleäre Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation zunächst angereichert, bevor Monozyten durch immunomagnetische Separation über den auf Monozyten selektiv vorkommenden Oberflächenmarker CD14 isoliert werden.

3.2.1. Anteil an Monozyten und T-Zellen in Lymphozytenkonzentraten

Nachdem sich Lymphozytenkonzentrate für die Präparation der Monozyten aufgrund ihrer Verfügbarkeit anboten, sich aber in ihrer Zusammensetzung von peripherem Blut gesunder Spender unterscheiden können, sollte zunächst eine qualitative und quantitative Analyse der Lymphozytenkonzentrate hinsichtlich ihres Gehalts an T-Zellen sowie Monozyten erfolgen. Durch Verwendung fluoreszenzgekoppelter Antikörper, welche die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen, T-Helfer-Zellen und Monozyten erlauben, kann eine Aussage über den relativen Gehalt dieser Zellpopulationen in der Fraktion mononukleärer Zellen erfolgen.

Darüber hinaus erlaubt die durchflusszytometrische Analyse der Monozyten gleichzeitig die Höhe der Expression der für eine Antigen-Direktion in Frage kommenden Fc-Rezeptoren, d.h. des hochaffinen IgG-Rezeptors $Fc\gamma RI$ (CD64) und des IgA-Rezeptors $Fc\alpha R$ (CD89), als auch des für die geplante Aktivierung/Reifung der Zellen vorgesehenen Rezeptor CD40, zu bestimmen.

Im Durchschnitt lag der Anteil der T-Zellen (CD3-positiv) in der Fraktion der mononukleären Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation bei ca. 60%. Hierbei wiesen 20% den immunologischen Marker CD8 auf, so dass es sich um die Population der zytotoxischen T-Zellen handelte. Bei den restlichen 40% der T-Zellen konnten der Gruppe der T-Helfer-Zellen zugeordnet werden (siehe Abb. 23).

Monozyten lassen sich durchflusszytometrisch über ihre Eigenschaften der Lichtstreuung, zudem jedoch auch immunologisch über die Expression von CD14, definieren. Die Frequenz CD14-positiver Zellen lag in den Lymphozytenkonzentraten bei durchschnittlich rund 17% (vgl. Abb. 23). Zudem wiesen diese Zellen zusätzlich die Expression der Marker CD64 und CD89 auf. Hierbei handelt es sich um den hochaffinen IgG-bindenden $Fc\gamma$ -Rezeptor I (CD64) sowie den IgA-bindenden $Fc\alpha$ -Rezeptor (CD89), welche beide für eine Antikörper-vermittelte Antigenbeladung der DZ in Frage kommen. Darüber hinaus konnte auf allen Monozyten CD40 detektiert werden. Über diesen Rezeptor könnte eine Aktivierung bzw. Reifung der Zellen induziert werden.

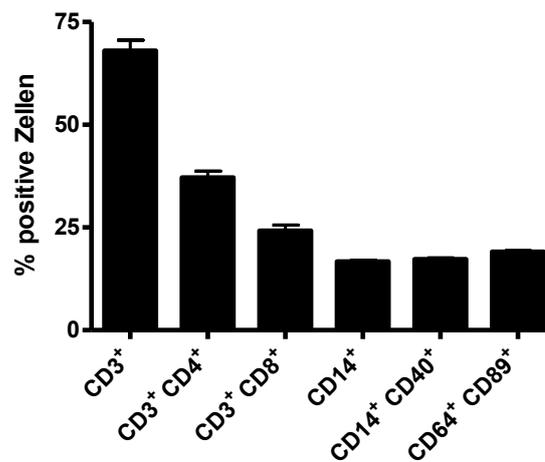


Abb. 23: Immunologische Charakterisierung der Lymphozytenkonzentrate.

Der Anteil der einzelnen Zell-Populationen in der Fraktion der mononukleären Zellen aus den Lymphozytenkonzentraten gesunder Spender wurde durchflusszytometrisch aufgrund der linienspezifischen Expression von CD3 auf T-Zellen (weitere Unterteilung anhand CD4: T-Helfer-Zellen und CD8: zytotoxische T-Zellen) und CD14 auf Monozyten bestimmt. Zur näheren Charakterisierung der Monozyten wurden die Fc-Rezeptoren CD64 (Fc γ RI) und CD89 (Fc α R) sowie CD40 durchflusszytometrisch nachgewiesen.

3.2.2. Effizienz der CD14-positiven Selektion über MACS

Die Anreicherung der Monozyten aus der Fraktion der mononukleären Zellen erfolgte immunologisch unter Verwendung eines gegen den auf Monozyten exprimierten Oberflächenrezeptor CD14 gerichteten Antikörpers (siehe Material und Methoden – 2.2.17.). Dieser Ansatz erlaubt die selektive Bindung paramagnetischer Partikel auf den Monozyten, welche dann in einem magnetischen Feld von den nicht markierten Zellen getrennt werden. Mittels dieser Magnet-basierten Zell-Separationstechnologie (MACS) erfolgte eine schonende, quantitative Separation der markierten Zellen aus gemischten Populationen.

Zur Analyse der Effizienz dieser Methode im Hinblick auf die Gewinnung hochreiner Monozyten-Präparate wurden die bei der Separation erhaltenen Fraktionen, also die CD14-positive sowie die CD14-negative Zellfraktion, durchflusszytometrisch untersucht. Die Ausbeute an CD14-positiven Zellen in der CD14-positiven-Fraktion lag bei durchschnittlich mehr als 90% (s. Abb. 24). In der CD14-negativen-Fraktion wurden <1% CD14-positiven Zellen nachgewiesen. Die Anreicherung ist demnach quantitativ annähernd verlustfrei.

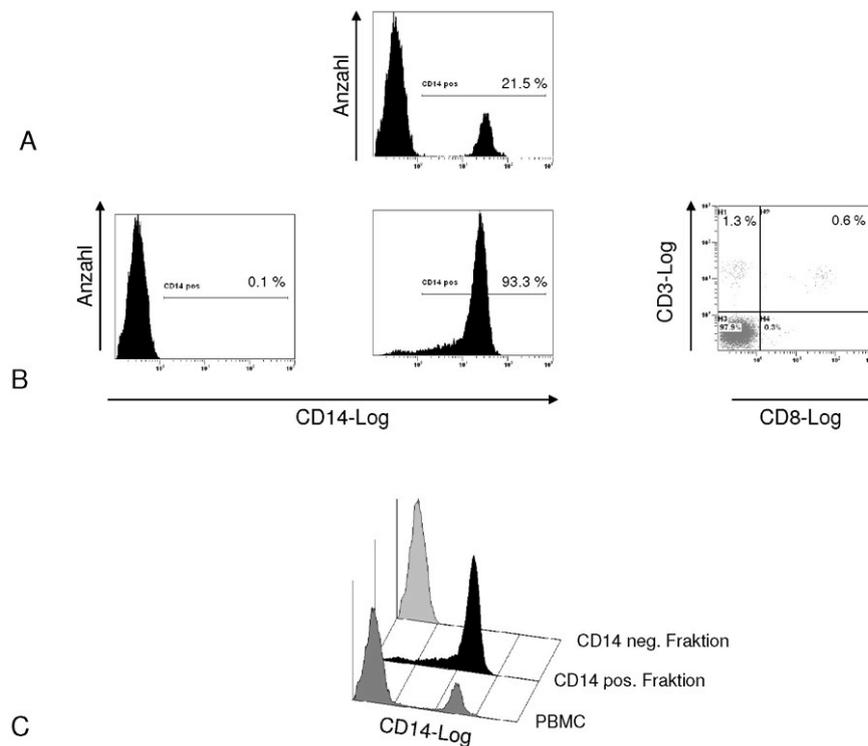


Abb. 24: Effizienz der Separation CD14-positiver Zellen mittels MACS.

Der Anteil CD14-positiver Monozyten in der Fraktion mononukleärer Zellen in Lymphozytenkonzentraten gesunder Spender vor (A) und in den im Anschluss an die Separation CD14-positiver Zellen erhaltenen Negativ- (B, links) wie Positiv-Fractionen (B, mittig) wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Immunologisch konnten zudem die in der CD14-positiv Fraktion enthaltenen T-Zellen in T-Helfer-Zellen (CD3, CD4) sowie zytotoxischen T-Zellen (CD3, CD8) differenziert und quantifiziert werden (B, rechts). Die Anreicherung der Monozyten erfolgte basierend auf der MACS-Technologie quantitativ (C).

Die Zellfraktionen vor und nach der Positiv-Selektion der Monozyten wurden zudem hinsichtlich ihres relativen Anteils an B-Zellen (CD20⁺), T-Zellen (CD3⁺), NK-Zellen (CD56⁺, CD3⁻) und NKT-Zellen (CD56⁺, CD3⁺) charakterisiert (Abb. 25). Im Verlauf des Separationsvorgangs werden diese Zellpopulationen in der Monozyten-enthaltenen Positivfraktion substantiell depletiert (Abb. 25 B). Der relative Anteil der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen in der Negativfraktion (Abb. 25 C) ist aufgrund der Extraktion der Monozyten leicht erhöht. Diese Fraktion könnte nachfolgend als Quelle für T-Zellen zur Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen Verwendung finden.

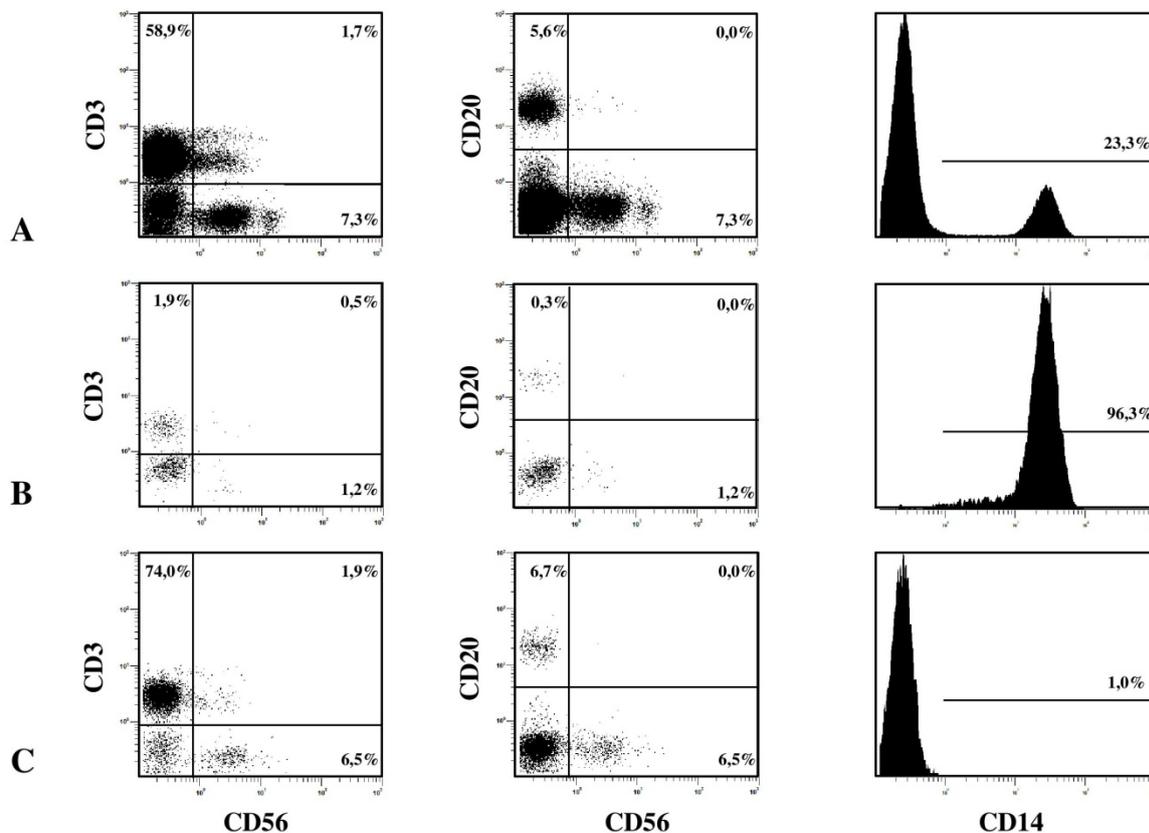


Abb. 25: Quantitative immunologische Charakterisierung der Lymphozytenkonzentrate vor MACS, sowie der Positiv- und Negativ-Fraktion nach Separation CD14-positiver Zellen.

A. Relativer Anteil von T-Zellen (CD3⁺), B-Zellen (CD20⁺), regulativen NK-Zellen (CD56^{high}) und zytotoxischen NK-Zellen (CD56^{dim}), NKT-Zellen (CD3⁺, CD56⁺) sowie Monozyten (CD14⁺) in den Lymphozytenkonzentraten vor CD14-Positivselektion mittels MACS. B, C. Analyse der in den Fraktionen nach Separation von CD14-positiven Zellen in der Positiv-Fraktion (B) sowie im Durchlauf (C) verbliebenen Monozyten sowie B-, T- und NK-Zellen.

3.2.3. CD40-Expression auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen

Die in dieser Arbeit entwickelten, für die simultane Antigen-Beladung sowie DZ-Aktivierung vorgesehenen, rekombinanten Fab-Derivate verfügen über drei Valenzen: eine zur Beladung vorgesehene, gegen Endozytose-Rezeptoren gerichtete Domäne (hier exemplarisch CD64), eine gegen CD40-gerichtete Aktivierungsdomäne und eine noch freie Valenz, die durch einen irrelevanten Fab-Anteil gebildet wird.

Für die Funktionalität der Moleküle ist demnach neben der Expression von CD40, dem Triggermolekül für die Maturation der DZ, die gleichzeitige Expression der ausgewählten Endozytose-Rezeptoren auf den Antigen-präsentierenden Zellen not-

wendig. Nachdem die Differenzierung der Monozyten zu einer Veränderung des Phänotyps einschließlich der Expression der Oberflächenmoleküle führt, wurde zunächst der Einfluss der Zytokin-Kombinationen auf die Monozyten-Differenzierung und Expression des Aktivierungstriggers CD40 untersucht.

Vergleichend wurde hierzu die Differenzierung der Monozyten durch einen Standard-Ansatz mittels Interleukin (IL)-4 / Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) vorgenommen, oder durch Interferon (IFN)- α /GM-CSF bzw. die Kombination von Interferon (IFN)- β mit IL-3 (Jonuleit *et al.*, 1997) induziert. Die CD40-Expression wurde durchflusszytometrisch auf den Monozyten und den drei verschiedenen unreifen DZ-Populationen nachgewiesen.

Im Vergleich zu Monozyten weisen alle unreifen DZ-Populationen eine erhöhte Expression von CD40 auf (vgl. Abb. 26), so dass die Induktion einer DZ-Reifung über die Adressierung von CD40 mittels mono- oder bivalent CD40-tragender scFv-Fab-Moleküle möglich war.

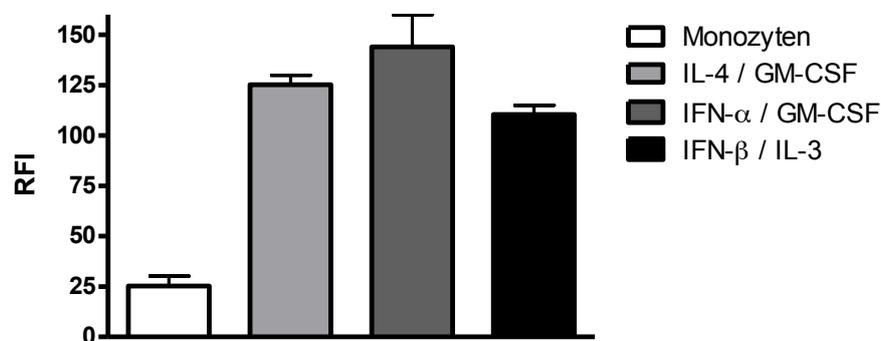


Abb. 26: Oberflächenexpression von CD40 auf Monozyten und *in vitro* aus Monozyten generierten DZ-Populationen.

Die aus Lymphozytenkonzentraten gesunder Spender isolierten Monozyten wurde vor und nach 7d Kultur im Differenzierungsmedium (IL-4/GM-CSF, IFN- α /GM-CSF und IFN- β /IL-3) durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression des CD40 untersucht.

3.2.4. Expressionshöhe des Fc γ RI (CD64) Rezeptors auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen

Neben der Expressionshöhe des Aktivierungstriggers CD40 ist zudem die Oberflächenexpression der ausgewählten Endozytose-Rezeptoren Grundlage für die Bindung der rekombinanten Moleküle an die unreifen DZ und damit die nachfolgend geplante Beladung der Zellen mit Antigen. Daher sollte zunächst durchflusszytometrisch die Expressionshöhe der Fc-Rezeptoren in Abhängigkeit von den jeweiligen Differenzierungsbedingungen, also den verwendeten Zytokin-Kombinationen, auf den DZ bestimmt werden.

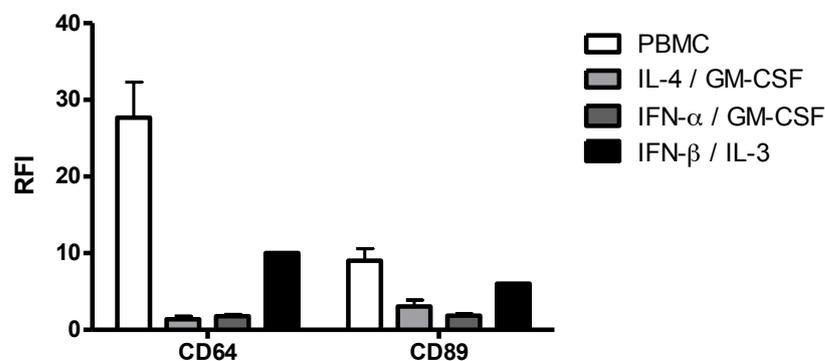


Abb. 27: Nachweis der Fc γ RI- (CD64) und Fc α - (CD89) Expression auf Monozyten und unreifen DZ-Populationen.

Monozyten gesunder Spender sowie die aus den Monozyten mittels Kultur in Zytokin-haltigem Medium (IL-4/GM-CSF, IFN- α /GM-CSF und IFN- β /IL-3) über 7 Tage differenzierten DZ wurden mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihrer Expression von Fc γ RI (CD64) und Fc α R (CD89) untersucht. Irrelevante Maus-IgG dienten als Isotyp-Kontrolle.

Für die gegen Fc-Rezeptoren-gerichteten, zur DZ-Beladung bzw. Reifung vorgesehenen Konstrukte wurde die Höhe der Oberflächenexpression des Fc γ RI (CD64) und Fc α R (CD89) auf Monozyten und unreifen DZ untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der untersuchte Fc γ RI (CD64) auf den undifferenzierten Monozyten deutlich höher exprimiert wird als auf den unreifen DZ (vgl. Abb. 27). Neben der reduzierten Expression des Fc γ RI durch Differenzierung der Monozyten in Anwesenheit von IL-4 (Fanger *et al.*, 1997) scheint auch die Supplementation des Mediums mit GM-CSF oder IFN- α zu einer verminderten Oberflächenexpression von CD64 zu führen. Auffällig ist zudem, dass die unreifen IFN- β /IL-3 DZ eine vergleichsweise er-

höhte Expression des Fc γ RI im Vergleich zu den mit GM-CSF differenzierten DZ zeigen. Gleiches fällt für die Expression des Fc α -Rezeptors auf. Auch dieser ist auf Monozyten höher exprimiert. Auf den GM-CSF-differenzierten DZ fällt hingegen die Expressionshöhe ab. Die IFN- β /IL-3 DZ weisen jedoch eine etwas erhöhte CD89 Expression auf. Die Daten könnte darauf hinweisen, dass die Differenzierung der Monozyten durch Kultur in GM-CSF-haltigem Medium zu einer verminderten Endozytosefähigkeit, d.h. zu einer reduzierten Aufnahme von Antikörper-opsonisierten Partikeln, bzw. von Antikörper-gebundenem Antigen, über diese Fc-Rezeptoren führt.

Auch im Hinblick auf die Adressierung der Aktivierungssignale über die entwickelten Fc-Rezeptor-gerichteten scFv-Fab-Moleküle könnte die ermittelte Expressionshöhe der Rezeptoren auf den in GM-CSF differenzierten DZ problematisch sein. Daher wurden weitere Fab-Moleküle, welche mit einer Valenz an Stelle der Fc-Rezeptoren die auf den DZ exprimierten Lektin-Rezeptoren CD205 (Dec205) und CD209 (DC-Sign) binden, für weiterführende Analysen hinzugenommen (Moleküle zur Verfügung gestellt durch M. Staudinger, persönliche Mitteilung). Beide Endozytoserezeptoren werden auf Monozyten und DZ exprimiert. Sie internalisieren mit dem an sie gebundenen Liganden und eignen sich daher ebenfalls zur Antigenbeladung von DZ (Bonifaz *et al.*, 2004; Engering *et al.*, 2013).

Die Untersuchung der Expression des CD205 bzw. CD209 auf den durch die drei unterschiedlichen Zytokin-Kombinationen aus Monozyten differenzierten unreifen DZ zeigte, dass die Expression von CD205 kaum durch die Zytokin-Supplementierung beeinflusst wird (vgl. Abb. 28). Die Expressionshöhe von CD209 wird dem gegenüber durch IL-4 verstärkt [Relloso *et al.*, 2002]. So weisen auch die IL-4/GM-CSF moDZ eine erhöhte Oberflächenexpression von CD209 im Vergleich zu den mit IFN- α /GM-CSF bzw. IFN- β /IL-3 erhaltenen unreifen DZ auf (vgl. Abb. 28).

Auf Basis der Expressionshöhe erscheint die Adressierung von CD205 und CD209 zur Antigenbeladung und DZ-Reifung insbesondere unter der Verwendung IL-4/GM-CSF gereifter moDZ vielversprechend. Aufgrund dessen fiel der Entschluss, die Konstrukte [(CD205scFv x CD40scFv) x CD20 Fab] und [(CD209scFv x CD40scFv) x CD20 Fab] für die weiteren Versuche hinzuzunehmen.

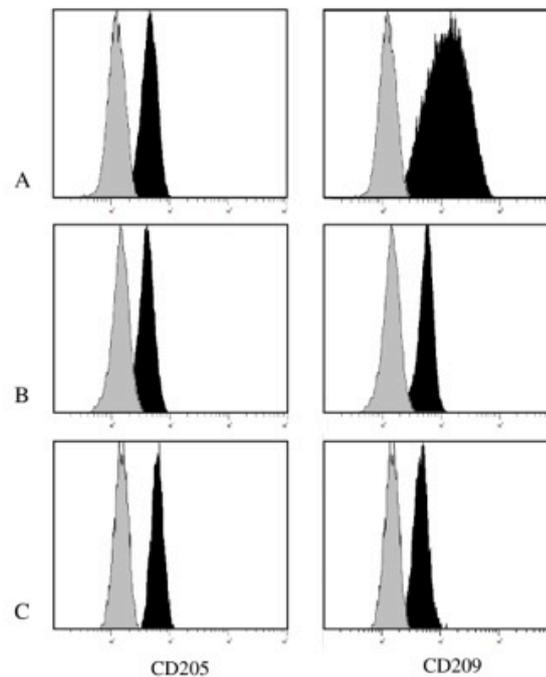


Abb. 28: Nachweis der Expression von CD205 (Dec205) und CD209 (DC-Sign) auf Monozyten und unreifen DZ-Populationen.

Expression der Lektin-Rezeptoren CD205 und CD209 auf unreifen Dendritischen Zellen, die ausgehend von isolierten Monozyten gesunder Spender durch Kultur in IL-4 und GM-CSF (A), IFN- α und GM-CSF (B) oder IFN- β und IL-3 (C) differenziert wurden (schwarz, Isotyp-Kontrolle: grau).

3.3. Reifung der Dendritischen Zell-Populationen

Nachdem die Reifung der Dendritischen Zellen eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung naiver zytotoxischer T-Zellen ist, sollte nachfolgend untersucht werden, in wie weit die entwickelten und charakterisierten mono- bzw. bispezifischen Moleküle in der Lage sind, die Maturation der aus Monozyten mittels IL-4/GM-CSF generierten DZ zu induzieren. Als Standard für die DZ-Reifung wurden die hierfür gängig eingesetzten Zytokine (PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α) verwendet. Nach Kultur mit und ohne Zytokin-Supplementation konnte der Grad der Reifung der DZ auf Basis der Oberflächenexpression der B7-Moleküle CD80 und CD86 im Durchflusszytometer untersucht werden (vgl. Abb. 29). Vergleichend wurde eine Kultur der unreifen DZ unter Zusatz der rekombinanten, mono- oder bivalent CD40-bindenden Tribodies (50 ng/ml) angesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass das bivalent CD40 bindende Tribody-Molekül [(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] unter den gewählten Bedingungen in der Lage ist, die Oberflächenexpression des Reifungsmarkers CD86 zu induzieren, wobei der Grad der CD86 Expression im Vergleich zur Zytokin-Kontrolle etwas geringer ist. Dem gegenüber ist die CD86 Expression bei Kultur der DZ in Medium, welches mit dem monovalent bindenden [(CD40 scFv x CD64 scFv) x CD20 Fab] versetzt ist, nur leicht erhöht.

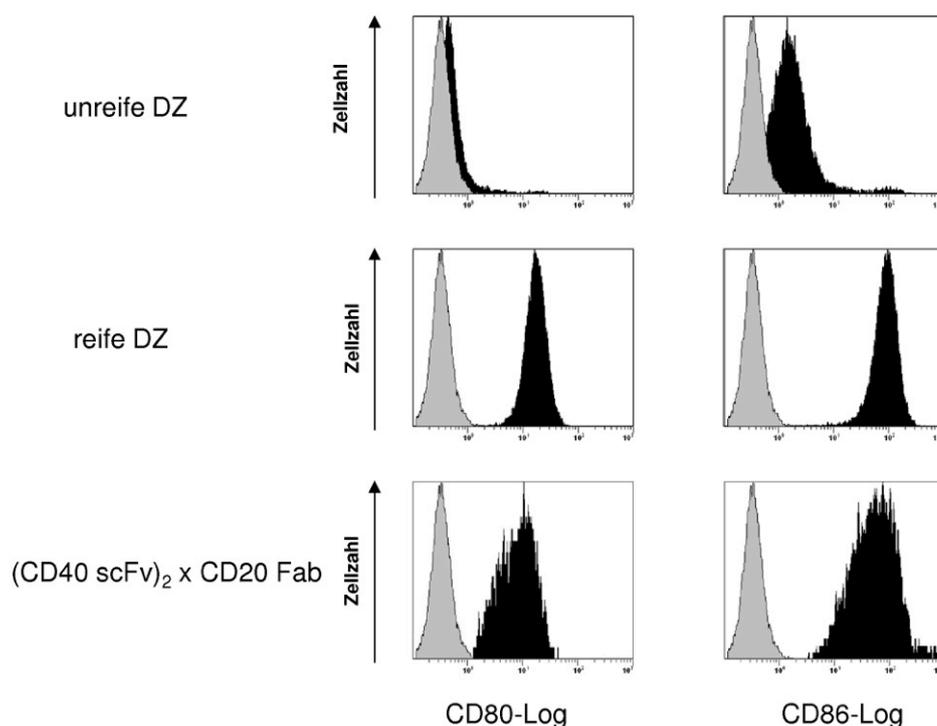


Abb. 29: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD80 und CD86 als Marker für die Reifung Dendritischer Zellen.

Neben unreifen, aus Monozyten differenzierten Dendritischen Zellen (oben) wurden die mittels des Zytokin-Ansatzes (IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂) gereiften DZ (mittig) bezüglich ihrer Expression von CD80 und CD86 als Marker für die DZ-Reifung untersucht. Vergleichend wurden unreife DZ mit dem rekombinanten Molekül [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab] kultiviert und hinsichtlich der Expression der Reifungsmarker analysiert.

Die beiden für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Konstrukte [(CD40 scFv x CD205 scFv) x CD20 Fab] sowie [(CD40 scFv x CD205 scFv) x CD20 Fab] weisen je einer Valenz für CD40 und eine weiteren für die Lektin-Rezeptoren CD205 bzw. CD209 im Format des scFv auf.

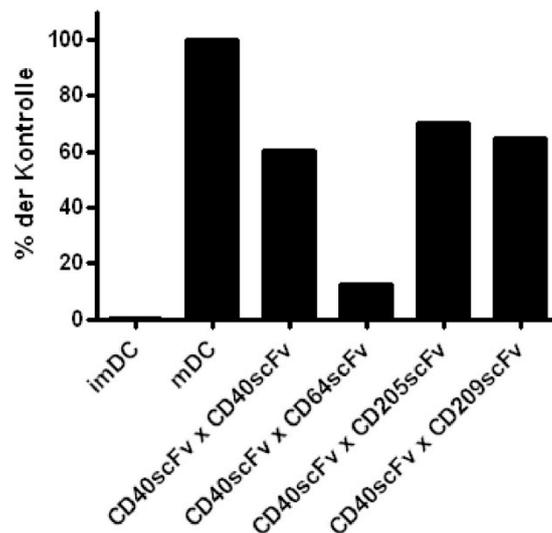


Abb. 30: Vergleichende Analyse der durch die rekombinanten Moleküle induzierten Expression von CD86 als Reifungsmarker für Dendritische Zellen.

Die Oberflächenexpression des Reifungsmarkers CD86 wurde auf unreifen und Zytokin-maturierten DZ durchflusszytometrisch bestimmt. Vergleichend wurden unreife DZ mit den rekombinanten Fab-Molekülen (50 ng/ml) kultiviert, um den Einfluss der Kombination der mono- oder bivalenten CD40-gerichteten Aktivierungsdomäne allein oder mit unterschiedlichen Endozytose-Rezeptoren (CD64, CD89, CD205 und CD209) zu untersuchen.

Die Expression erfolgte in Analogie zu den für diese Arbeit verwendeten Tribody-Molekülen in Säugerzellen Hek293T (Staudinger, pers. Mitteilung). Durch Immunaffinitätschromatographie mittels einer Anti-Kappa-Matrix wurde das rekombinante Protein zur Homogenität aufgereinigt. Darüber hinaus konnte die Bindespezifität der Moleküle unter Verwendung Antigen-positiver Zelllinien, d.h. CD205-positiver CHO sowie CD209-transgener Hek293T, durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Die funktionelle Charakterisierung der beiden, mit einer Valenz gegen CD205 bzw. CD209 gerichteten CD40 scFv-CD20 Fab-Moleküle erfolgte in dieser Arbeit im Vergleich zu dem bispezifisch CD40-adressierenden Tribody [(CD40 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] sowie dem monovalent CD40 bindenden Tribody [(CD40 scFv x CD64 scFv) x CD20 Fab]. Die durchflusszytometrisch messbare Expression von CD86 wurde hierbei als Maß für die erfolgte Reifung der aus Monozyten mit IL-4 und GM-CSF generierten DZ herangezogen.

Im Vergleich mit den übrigen rekombinanten Molekülen weist der Tribody mit der Bindungsspezifität für CD64 ein geringes Potential auf, die Expression von CD86 zu induzieren (siehe Abb. 30). Möglicherweise ist dies auf die niedrige Expression des Fc γ RI auf den unreifen DZ zurückzuführen (s.o.). Dem gegenüber induzierten sowohl

der gegen CD205 als auch der gegen CD209 gerichtete Tribody mit monovalenter CD40-Bindung eine erhöhte Expression des Reifungsmarkers CD86, die dem Expressionsgrad nach bivalenter Adressierung von CD40 durch das Molekül [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab] vergleichbar war (vgl. Abb. 30). Demnach scheint die duale Spezifität dieser beiden Moleküle, d.h. die simultane Adressierung der Endozytoserezeptoren CD205 respektive CD209 in Verbindung mit der agonistischen CD40-Domäne, ausreichend, um eine spezifische und effiziente Reifung der DZ zu induzieren.

In einer Weiterentwicklung dieser beiden Tribody-Moleküle könnte nachfolgend die Spezifität des hier verwendeten CD20 Fab-Moleküls in ein CD40-Fab überführt werden. Die CD40 scFv-Domäne könnte durch das in dieser Arbeit für die Expression optimierte Modell-Tumor-Antigen HM1.24 ersetzt werden, so dass diese abgeleiteten Moleküle für die funktionelle Analyse zur Beladung der DZ mit Tumorantigen über die Lektin-Rezeptoren Dec205 (CD205) bzw. DC-Sign (CD209) - in Verbindung mit der CD40-vermittelten DZ-Aktivierung - im Hinblick auf die Generierung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen verwendet werden könnten.

4. Diskussion

4.1. Immuntherapeutische Strategien

Immuntherapeutische Strategien („Krebsimmuntherapie“) beschreiben ein relativ neues Feld in der Onkologie. Neben den klassischen Behandlungsmethoden, d.h. Operation, Radiatio und Chemotherapie, zeichnen sich diese Therapieansätze durch ihre hohe selektive Wirkung gegen Krebszellen aus. Die Induktion einer spezifischen Immunantwort durch eine aktive Immunisierung ist ein potentiell interessanter Ansatz zur Eliminierung einer minimalen Resttumorkrankung nach konservativer Tumortherapie. Bei der aktiven Immunisierung werden dem Körper Substanzen als Vakzine verabreicht, die eine Immunantwort im Körper (*in vivo*) auslösen. Die Idee der Anti-Tumor-Vakzinierung („Krebsimpfung“) wurde bereits 1909 von Paul Ehrlich postuliert (Ehrlich, 1913) und ist derzeit Objekt vieler Forschungsarbeiten auf der Suche nach neuen Strategien zur Malignomtherapie. Die hervorgerufene Immunantwort soll bei der Anti-Tumor-Vakzinierung spezifisch gegen die Tumorzellen gerichtet sein und idealerweise zur selektiven Eliminierung der Krebszellen, zum Beispiel durch Induktion von Apoptose, Zelltod oder Lyse, führen.

Klinische Daten weisen darauf hin, dass der therapeutische Erfolg von Anti-Tumor-Vakzinen durch die simultane Stimulierung einer humoralen und einer zellulären Immunantwort verstärkt wird, so dass die Dendritischen Zellen mit ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, d.h. zur Induktion einer Immunantwort von T-Helfer-Zellen ebenso wie die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und die Induktion einer B-Zell-Antwort, ein attraktives Ziel dieser Forschung darstellen.

4.2. Wahl des Formates zur Antigenbeladung Dendritischer Zellen *in vivo*

Eine mögliche Strategie zur Krebsimpfung stellt die Beladung patienteneigener professioneller Antigen-präsentierender Zellen, z.B. Dendritischer Zellen, *ex vivo* dar. Hierbei werden beispielsweise autologe DZ eines Patienten zunächst *ex vivo* mit apoptotischen / nekrotischen Tumorzellen beladen und dem Patienten nachfolgend

wieder zugeführt, d.h. es wird eine patientenspezifische Anti-Tumor-Impfung durchgeführt.

In einigen Fällen führte dieses Vorgehen bereits zu einer kompletten Remission der Krebserkrankung (Dillman *et al.*; 2010; Fay *et al.*, 2006). Auch in der Behandlung des multiplen Myeloms zeigte eine Impfung mit autologen DZ, die mit Myelomzellen der Patienten *ex vivo* fusioniert wurden und bei deren Verabreichung eine gleichzeitige GM-CSF-Behandlung des Patienten stattfand, Erfolge. So konnte das Fortschreiten der Krankheit über 41 Monate hinweg bei 3 der 15 Patienten einer Studie aufgehalten werden (Rosenblatt *et al.*, 2011).

Jedoch sind diese personalisierten Ansätze der *ex vivo* Manipulation der DZ mit nachfolgender Impfung zeit- und kostenintensiv. Sie führen zudem in zahlreichen Studien nicht zu überzeugenden Erfolgen. So zeigen *ex vivo* beladenen DZ nur eine geringere Fähigkeit zur Migration und führen dadurch zu einer nur suboptimalen Wirkung der Impfung (Adema *et al.*, 2005).

Die *in vivo* Adressierung, Beladung und Reifung Dendritischer Zellen stellt daher eine attraktive Alternative dar. In dieser Arbeit wurde hierfür das Format eines rekombinanten bispezifischen Antikörperderivates gewählt. Dieses Molekül besteht aus zwei scFv (Rezeptordomänen), die über ein Fab-Fragment miteinander kombiniert auf einem Molekül vorliegen. Dieses Format bietet eine Reduktion der für eine Antigenbindung notwendigen Sequenz auf ein Mindestmaß. Zudem ermöglicht dieses Format die simultane Adressierung mehrerer Rezeptoren auf den DZ. Ebenso ist zusätzlich die Möglichkeit gegeben, ein tumorspezifischen Antigen (TAA) in dieses rekombinante Molekül einzubringen.

Eine gleichzeitige selektive Adressierung, Aktivierung und Beladung der DZ mit Antigen durch nur ein Molekül ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu Ansätzen, die auf mehrere Moleküle zur Aktivierung und Beladung von DZ setzen, da hier nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle beladenen DZ notwendigerweise auch von dem Aktivierungsagenz erreicht werden und demnach als unreife DZ eine Antigen-Toleranz induzieren könnten.

Die aktuelle Forschung konzentriert sich bei den Vehikeln zur Antigenbeladung neben der Anwendung adenoviraler Vektoren auf die Verwendung von Nanopartikeln und Antikörperderivaten. Die Vorteile adenoviraler Vektoren liegen in der einfachen Verfügbarkeit und Kultivierung, geringen Toxizität, vielfältigen Klonierungsmöglich-

keiten und dem effektiven Gentransfer in Zellen. Jedoch müssen ebenso Nachteile wie die Existenz neutralisierender Antikörper gegen virale Vektoren im Patienten und die Notwendigkeit von Adaptermolekülen genannt werden. Auch mit adenoviralen Vektoren können jedoch bifunktionale Adaptermoleküle mit dem Ziel der gleichzeitigen Adressierung und Aktivierung von DZ realisiert werden. Eine aktuelle Studie zeigt die erfolgreiche Induktion einer CTL-Antwort gegen MART-1 durch einen CD40-gerichteten adenoviralen Vektor (Hangalapura *et al.*, 2010). Interessanterweise weist dieser Ansatz in der Wahl des Rezeptors CD40 und in der Idee der gekoppelten Adressierung, Aktivierung und Antigenbeladung starke Parallelen zu dem in dieser Arbeit verfolgten Konzept.

Die Verwendung von Nanopartikeln in der Medizin ist ein innovativer Ansatz, der auch im Feld der Anti-Tumor-Vakzinierung Anwendung findet. So konnten agonistische CD40-Antikörper mit γ -PGA NP (poly γ -glutamic acid nanoparticles) eingekapselt werden. Sie zeigten in einer Studie im murinen Blasenkrebsmodell bei s.c.-Impfung eine deutliche Reduktion der CD40-Antikörper-vermittelten Nebenwirkungen wie Leberschädigungen, Zytokinfreisetzungssyndrom (cytokin-release syndrome, CRS) und Kapillarlecksyndrom (vascular leak syndrome). Außerdem zeigte sich in dieser Studie eine stärkere Aktivierung der DZ bei gleichwertiger Induktion einer CTL-Antwort (Relloso *et al.*, 2002). Dies bildet eine elegante Möglichkeit der Kombination bisheriger Antikörpertherapien mit der Nanomedizin.

Klassische Antikörper wie der agonistische monoklonale anti-CD40-Antikörper können durch Interaktion mit DZ eine Aktivierung und Reifung der DZ bewirken und werden in Studien als Immunstimulanz allein oder in Verbindung mit Antigen als kostimulatorischer Reiz eingesetzt (French *et al.*, 2007). Andererseits zeigten Studien im Mausmodell, dass eine ausreichend hohe Dosis des Antikörpers zur Aktivierung der APC potentiell mit zunehmenden Nebenwirkungen vergesellschaftet sein könnte. Daher sind neuartige Antikörperformate und Antikörperderivate von besonderem Interesse, die Nebenwirkungen klassischer Antikörper überwinden und mehrere Funktionen in einem Konstrukt verbinden zu können. Die Konstruktion der „Vaccibodies“ und „Troybodies“ in aktuellen Studien, bei denen eine CD40-bindende scFv-Domäne auf verschiedene Arten jeweils mit Antigen (B-Zell-Tumor Antigen) gekoppelt wurde, sind Beispiele für diesen Ansatz. In einer Studie zeigten diese Konstrukte im Mausmodell die Induktion einer tumorspezifischen T-Zellantwort in der prophylaktischen

Situation und damit einen Schutz gegen diese Krebserkrankung (Schjetne *et al.*, 2007) bei nur geringen Nebenwirkungen.

4.3. Geeignete Oberflächenantigene zur Adressierung Dendritischer Zellen

Aufgrund der aktuellen Literatur fiel die Wahl eines geeigneten Oberflächenantigens Dendritischer Zellen zunächst auf den kostimulatorischen Rezeptor CD40. Dieser gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren und wird auf DZ, aber auch auf anderen Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen und Makrophagen, exprimiert. Neuere Forschungen bestätigen die essentielle Rolle dieses Rezeptors bei der DZ-Aktivierung und der Interaktion der DZ mit T-Zellen und somit der Generierung einer Tumor-gerichteten zytotoxischen T-Zell-Antwort (vgl. 4.2.). Zur Adressierung des CD40-Oberflächenmoleküls enthielten die in dieser Arbeit entwickelten und charakterisierten Moleküle eine CD40-bindende Domäne, die zudem agonistische Eigenschaften aufweist.

Aufgrund der Struktur der Moleküle verfügten diese über die Möglichkeit, zwei weitere Rezeptoren zu adressieren. In Frage kamen dazu insbesondere die Fc-Rezeptoren (CD64, CD89) sowie die Lektin-Rezeptoren DEC-205 / CD205 und DC-Sign / CD209.

Die hier gewählten Antigene finden auch in anderen Arbeiten Anwendung. So zeigte ein DNA-kodiertes chimäres Molekül aus einem gegen CD205-gerichtete scFv, einem Antigen bestehend aus einem MHC-II-restringiertem T-Zell-Epitop, einem B-Zell-Epitop und einem CD40-Ligand-Motiv, im Kalbmodell die Induktion einer tumorspezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort (Njongmeta *et al.*, 2012). Hier zeigte sich zudem, dass die Adressierung beider DZ-Rezeptoren synergistisch wirkte, so dass aufgrund der Kombination dieser beiden Ziele eine einmalige, niedrig dosierte Impfung bereits zu einer erfolgreichen zytotoxischen T-Zell-Antwort führte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die effektive Reifung der DZ durch den bivalenten [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab] sowie durch [(CD40 scFv x CD205 scFv) x CD20 Fab] und [(CD40 scFv x CD209 scFv) x CD20 Fab], bei der eine Aktivierung durch Bindung an CD40 und CD205 respektive CD209 zu einer DZ-Maturation zu führen scheint. Im Vergleich dazu zeigt das Konstrukt [(CD64 scFv x CD40 scFv) x

CD20 Fab] nur ein geringes Aktivierungspotential. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf die nur geringe Expression des Fc γ -Rezeptors I (CD64) auf den IL-4/GM-CSF DZ und damit auf eine nur schwache monovalente Bindung des Moleküls über den CD40 scFv-Anteil zurückzuführen.

4.4. Gleichzeitige Beladung und Aktivierung Dendritischer Zellen-CD40 im Mittelpunkt der Immuntherapie

Die in dieser Arbeit entwickelten Moleküle entstanden anhand der Maßgabe, eine selektive Adressierung Dendritischer Zellen, deren Aktivierung und gleichzeitige Antigen-Beladung durch ein Konstrukt zu erreichen. Aufgrund der aktuellen Studienlage wurden die in dieser Arbeit entwickelten Konstrukte mit einer Bindungswalenz für CD40 ausgestattet. CD40 gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren, wird auf Antigen-präsentierenden Zellen wie den DZ, B-Zellen und Makrophagen exprimiert, und gehört zu den wichtigsten kostimulatorischen Rezeptoren der DZ.

Die Interaktion von CD40 mit seinem natürlichen Liganden CD40-Ligand (CD40L, CD154) reguliert entscheidende Schritte der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Während einer natürlichen T-Zell-Antwort induziert die Bindung von CD40L der aktivierten T-Zelle an CD40 der DZ eine verstärkte Expression von CD40 auf der DZ. Es kommt zur Kreuzvernetzung der CD40-Moleküle, was eine Reifung der DZ bewirkt und sie dazu befähigt, effektiv den T-Zellen Antigen zu präsentieren und damit eine zytotoxische T-Zell-Antwort zu generieren (Bennett *et al.*, 1998). Bisher konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Adressierung von Antigen über CD40 zu einer Aktivierung und Reifung von DZ und sogar zu einer messbaren CTL-Antwort führt (Schjetne *et al.*, 2007). Es konnte ferner gezeigt werden, dass ein agonistischer monoklonaler anti-CD40-Antikörper die Interaktion des CD40L der T-Zelle mit CD40 der DZ substituieren kann. In unseren Versuchen zeigte sich, dass die bivalente Bindung an CD40 durch [(CD40scFv)₂ x CD20 Fab] zu einer effektiven DZ-Maturation führte. Im Gegensatz dazu zeigte eine monovalente Bindung an CD40 ohne weitere Bindungswalenz an die DZ durch das Konstrukt [(CD64 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] kein ausreichendes DZ-Aktivierungspotential. Eine Adressierung von CD40 und CD205/CD209 führte jedoch wieder zu einer effektiven DZ-Reifung. Es können daraus zwei wichtige Schlussfolgerungen gezogen werden:

Erstens scheint die bivalente CD40-Bindung durch das Molekül [(CD40scFv)₂ x CD20 Fab] der natürlichen Immunreaktion mit Kreuzvernetzung der CD40-Moleküle sehr nahe zu kommen und stellt damit ein vielversprechendes Format zur DZ-Aktivierung dar.

Zweitens kann auch durch eine duale Adressierung der DZ mittels CD40 und CD205/209 eine erfolgreiche DZ-Maturation bewirkt werden. Notwendige Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass Rezeptoren ausgewählt werden, die auf den DZ in ausreichendem Maß exprimiert werden.

Für weitere Forschungsansätze ist zu diskutieren, ob die bivalente CD40-Adressierung Vorteile gegenüber der dualen Adressierung über CD40 plus beispielsweise CD205 bringt. Kann durch die duale Ansteuerung eine spezifischere Aktivierung der DZ bei gleichem Aktivierungspotential erreicht werden?

Weiterführend ist festzuhalten, dass das in dieser Abhandlung vorgestellte Konstrukt [(CD205 scFv x CD40 scFv) x CD20 Fab] die erfolgreiche Kombination von CD205 Adressierung mit der DZ-Reifung über CD40 in einem Molekül demonstriert. Beide Prinzipien zeigten getrennt bereits im Mausmodell Erfolge (Bonifaz *et al.*, 2004; Carling *et al.*, 2012). Zudem könnte dieses Konstrukt ohne Zugabe von Zytokinen *in vivo* verabreicht werden und würde damit die Problematik der optimalen DZ-Generierung aus Monozyten und die Frage nach einem geeigneten Reifungscocktail umgehen (vgl. 4.5.). Es stellt folglich ein interessantes Format für die Anti-Tumor-Vakzinierung über DZ dar.

4.5. Strategien zur Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro* und deren Einfluss auf eine Verwendung der Dendritischen Zellen zur Anti-Tumor-Impfung *in vivo*

Obwohl zunehmend Dendritische Zellen in klinischen Anti-Tumor-Impfstudien zum Einsatz kommen, fehlt bis heute ein optimales Protokoll zur Herstellung funktionsfähiger, reifer DZ *in vitro*.

Um Dendritische Zellen in großen Mengen für die klinische Forschung herzustellen, gewinnt man Monozyten aus Blut- oder Lymphozytenspenden und reift diese *ex vivo* mittels Zytokinen zu Dendritischen Zellen aus (moDC). Seit 1997 ist der Goldstandard zur moDZ-Produktion ein Differenzierungscocktail aus IL4 und GM-CSF

über mehrere Tage hinweg und die nachfolgende Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine (IL1 β , IL6, TNF α) und PGE₂ (Jonuleit *et al.*, 1997). In dieser Arbeit erfolgte die Differenzierung der Monozyten hin zu moDZ mit Hilfe dreier verschiedener Zytokincocktails: der klassische Cocktail aus IL-4/GM-CSF, daneben IFN α /GM-CSF und IFN β /IL-3. Die Kombination der Zytokine IFN- β und IL-3 zeigte bereits in anderen Studien Erfolge. Dabei lösten die durch diesen Zytokincocktail gereiften DZ erfolgreich eine T-Helfer-Zell-Antwort mit einer im Vergleich zu IL-4/GM-CSF moDZ stärkeren Produktion von IL-5 und IFN- γ aus (Buelens *et al.*, 2002). IL-3 spielt zudem bei der Ausreifung von plasmazytoiden DZ aus CD34-positiven Progenitorzellen eine Rolle (Ebner *et al.*, 2002).

Es zeigte sich, dass die Auswahl des Zytokincocktails die Expression der Rezeptoren auf den moDZ beeinflusste. Die Differenzierung der Monozyten durch Kultur in GM-CSF-haltigem Medium führte zu einem Abfall der Expressionshöhe der Fc-Rezeptoren CD64 und CD89, was darauf hinweisen könnte, dass diese Kulturbedingungen nachfolgend zu einer verminderten Endozytosefähigkeit über diese Rezeptoren (vgl. 3.2.4.) führt. Bereits in einer anderen Studie zeigte sich, dass die Kultur von Monozyten mit IL-4 zu einer Herabregulation des Fc γ -RI (CD64) führte (te Velde *et al.*, 1990). Diese Beobachtungen bedeuten, dass die Wahl des Zytokincocktails die späteren Eigenschaften der DZ beeinflussen könnte und so moDZ mit extrem unterschiedlichen Eigenschaften entstehen könnten. Dies kann jedoch nicht im Interesse einer Anwendung von *in vitro* gereiften moDZ in klinischen Studien sein.

Zudem scheinen die mit dem Goldstandard gereiften moDZ *in vivo* einige essentielle Eigenschaften für die Verwendung von DZ im Kontext einer Anti-Tumor-Vakzinierung nicht zu erfüllen. Neben der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Beeinflussung der Expression des Fc-Rezeptors CD64 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die mit dem „Goldstandard“ gereiften moDZ nicht in der Lage sind, NK-Zellen zu aktivieren (Gustafsson *et al.*, 2008), bzw. IL-12p70 produzieren (Kim *et al.*, 2008), wobei hier der Einfluss von PGE₂ auf die Produktion von IL-12p70 und die Induktion einer TH₂-Immunantwort strittig bleibt (Steinbrink *et al.*, 2000). Andere Reifungscocktails scheinen hingegen deutlich funktionstüchtigere und optimalere DZ produzieren zu können (Kaka *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008)

Doch in diesen Studien zeigten sich weitere Schwierigkeiten. Nicht nur der Reifungscocktail selbst, sondern auch die Antigenquelle, mit der die moDZ beladen werden

sollten, hatte Einfluss auf die Funktionalität der moDZ. Darüber hinaus zeigten unterschiedliche Zeitpläne zur DZ-Erzeugung unterschiedliche Erfolge. Klassischerweise wurden die Monozyten über sieben Tage mit den Zytokinen kultiviert. Neuere Protokolle, wie etwa das „fastDC“-Protokoll (Dauer *et al.*, 2008), benötigen jedoch nur 48 Stunden zur DZ-Generierung. Diese Zeitspanne entspricht etwa der Differenzierungszeit *in vivo*. Dem gegenüber zeigte sich, dass eine Stimulation mit einer Vielzahl von Zytokinen, CD40L und TLR-Liganden die DZ-Maturation veränderte, so dass nach 48h Inkubation nur noch bereits erschöpfte, funktionsbeeinträchtigte DZ gewonnen werden konnten (Kaka *et al.*, 2008).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Diversität der möglicherweise durch verschiedene Reifungsprotokolle entstehenden moDZ ein grundlegendes Problem in der Entwicklung von DZ-Impfstrategien darstellt.

Es wird daher ein neues, allgemeingültiges Protokoll zur Generierung von funktionsfähigen, reifen DZ aus Monozyten benötigt. Neben der Optimierung der Zytokincocktails könnte eine Kombination mit CD40L und Poly-(I:C) ein erfolgsversprechender Ansatz sein.

Notwendige Fähigkeiten für die moDZ stellen die Fähigkeit zur Produktion von IL-12p70, die Migration der DZ aufgrund einer Interaktion mit dem CCR7-Rezeptor und die phänotypische Reifung (Antigenexpression über MHC-I und II-Moleküle) dar, sie sind die Kernkompetenzen, über die *in vitro* gereifte DZ zum Einsatz in klinischen Vakzinierungsstudien verfügen müssen.

Im Gegensatz zu vielen anderen Ansätzen in der Vakzinierungsforschung setzen die in dieser Arbeit entwickelte Konstrukte auf die *in vivo* Aktivierung der körpereigenen DZ und umgehen in der späteren klinischen Anwendung die Notwendigkeit eines optimalen DZ-Reifungscocktails. Doch um grundlegende Aussagen über die Wirkung der Proteine treffen zu können, benötigt auch dieser Ansatz *in vitro*-Modelle, um die Moleküle präklinisch zu validieren.

4.6. Geeignete Tumorantigene des Multiplen Myeloms

Neoplasien entwickeln Mechanismen, um dem Immunsystem des Körpers zu entkommen [Konzept der „immunosurveillance“ und des „immunoediting“, (Burnet, 1967)]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Immunsystem unter anderem

durch äußere Einwirkung wieder dazu befähigt werden kann, Tumorzellen als „fremd“ zu erkennen und zu bekämpfen. Um diesen Grundgedanken der Tumor-Vakzinierungsstrategien umzusetzen, benötigt man ein tumorspezifisches Antigen.

In der Therapie des Multiplen Myeloms zeigte der Einsatz von allogenen Leukozyteninfusionen des Spenders nach erfolgter allogener Knochenmarkstransplantation anhand des Graft-versus-Myeloma-Effekt die Potenz einer derartigen immunologischen Manipulation (Tricot *et al.*, 1996).

Für das Multiple Myelom scheint das Antigen HM1.24 (CD317) als selektiv auf malignen Plasmazellen exprimiertes Antigen geeignet für eine Vakzinierungsstrategie (Rew *et al.*, 2005). Neuere Forschungen zeigen jedoch, dass das Antigen HM1.24 vermutlich auch auf anderen Zellen zu finden ist (Erikson *et al.*, 2011). Im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung ist es jedoch essentiell sicherzustellen, dass es nicht zu ungewollten, eventuell sogar lebenslangen T-Zell-vermittelten Zytotoxizitäten kommt. So stellt das in der vorgelegten Arbeit gewählte Tumorantigen HM1.24 ein Modell-Antigen dar, das in weiteren Studien durch andere tumorspezifische Antigene ersetzt werden kann. Dies mindert jedoch nicht die Bedeutung der in dieser Schrift dargestellten Strategie der Kombination von spezifischer DZ-Reifung mit Antigenbeladung *in vivo*.

Als mögliche Kandidaten für ein myelomspezifisches Tumorantigen konnten in aktuellen Studien einige Antigene identifiziert werden. MAGE-C1/CTZ und NY-ESO-1 zählen zu den Cancer/Testis Antigenen (CTA), einer Gruppe von Proteinen, die ausschließlich in Keimzellen und einigen Tumorentitäten exprimiert werden, und deren Expression sich auf den meisten Myelomzellreihen nachweisen lässt (de Carvalho *et al.*, 2011; Szmania *et al.*, 2006).

Weitere myelomspezifische Antigene, deren Nutzung als Zielantigen in Studien evaluiert wird, sind Muzin-1/MUC-1 (Brossart *et al.*, 2001), Wilms Tumor Protein-1/WT-1 (Rosenfeld *et al.*, 2003), Dickkopf1/DKK-1 (Menezes *et al.*, 2012) und der Rezeptor für Hyaluronsäure-vermittelte Motilität [receptor for hyaluronic acid-mediated motility, RHAMM; (Maxwell *et al.*, 2004)]. Hinsichtlich der *ex vivo*-Beladung Dendritischer Zellen spielt ebenfalls das myelomspezifische Paraprotein, kurz Id (Idiotype Protein), eine Rolle. Das Id ist das monoklonale IgG des malignen Plasmazellklons und ist demnach zwar tumor-, jedoch auch patientenspezifisch, und eignet sich so nur bedingt für den in dieser Arbeit gewählten Ansatz (Wen *et al.*, 1998).

4.7. Weiterentwicklung der Moleküle zur Optimierung von Anti-Tumor-Vakzinierungsstrategien

DZ-basierte Vakzine sind das effektivste und interessanteste Werkzeug in der Krebs-Immuntherapie und werden derzeit an 20 verschiedenen Krebserkrankungen erprobt. *In vitro* und im Mausmodell konnten Anti-Tumor-Vakzine bereits tumorspezifische Immunantworten auslösen und auch das Fortschreiten eines Malignoms verhindern. Jedoch sind bisher die klinischen Ergebnisse DZ-basierter Impfstrategien enttäuschend. In der Regel kann eine DZ-basierte Vakzinierung eine antigenspezifische Immunantwort auslösen. Diese führt aber nur selten zu einer Rückbildung des Tumors oder gar zu einer Heilung des Malignoms (Nguyen-Pham *et al.*, 2012).

Bisherige Impfstrategien beschäftigen sich vorrangig mit *ex vivo* beladenen DZ. Bei diesen Ansätzen bleiben noch viele Fragen ungeklärt. Wie erhält man möglichst reife, funktionstüchtige moDZ? Welches Tumorantigen soll wie mit den DZ fusioniert werden? Welche Art der Applikation und welche Dosis zeigen den besten Effekt?

Ein kleiner Erfolg auf dem Weg zur Anti-Tumor-Vakzinierung stellt die Zulassung des Immuntherapeutikums Sipuleucel-T(Provenge)[®] durch die FDA zur Behandlung des asymptomatischen, hormonrefraktären und metastasierten Prostatakarzinoms dar. Sipuleucel-T besteht aus autologen Dendritischen Zellen, die *ex vivo* mit dem Fusionsprotein PA2024 beladen werden, um dann durch Reinfusion in den Patienten ihre Wirkung zu entfalten. Diese zelluläre Impfung zeigte in klinischen Studien einen Überlebensvorteil für die behandelte Patientengruppe (Madan *et al.*, 2011).

Durch die detailliertere Erforschung von Krebserkrankungen eröffnen sich zudem neue Fragestellungen. Die Erkenntnis, dass die Tumor-Mikroumgebung selbst einen Einfluss auf das Immunsystem und somit den Erfolg DZ-basierter Impfstrategien hat, macht deutlich, warum bisherige Impfstrategien nur unzureichende Wirkung entfalten konnten. So konnte die Kombination von *ex vivo*-Impfstrategien mit immunmodulierenden Medikamenten wie Cyclophosphamid oder Lenalidomid die Zahl der T-Suppressorzellen und die Freisetzung supprimierend wirkender Zytokine wie IL-6 und VEGF in der Tumorumgebung reduzieren und so die Wirksamkeit einer Impfung verbessern (Muthuswamy *et al.*, 2008).

In der Tat präsentieren die in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte ein Format, mit dem einige Limitierungen der *ex vivo*-Impfstrategien überwunden werden könnten.

Vor allem das Konstrukt [(CD40 scFv x CD205 scFv) x CD20 Fab] zeigt anschaulich, wie eine selektive Adressierung der DZ, eine Reifung der DZ und die Beladung der DZ mit Antigen in einem Molekül ohne zusätzlichen Stimulus oder Adjuvanzien ablaufen könnte. Die Adressierung von DZ über CD205 in Kombination mit der Reifung über CD40 zeigte bereits im Mausmodell mit getrennten Antikörpern bzw. Antikörperderivaten für CD205 und CD40 Erfolge (Demangel *et al.*, 2005).

Die Wahl des geeigneten Antigens und die Beladung der DZ mit diesem Antigen über die dritte Valenz der Tribodies könnten den Schwerpunkt einer Weiterentwicklung der vorgestellten Moleküle bilden. Dabei könnten die Bausteine CD40 Fab, CD205 scFv (bzw. CD209 scFv) und HM1.24 (respektive ein anderes Tumorantigen) in dem gewählten Molekülformat kombiniert werden. Ein Format [(CD205 scFv x Tumorantigen scFv) x CD40 Fab] wäre zudem denkbar und könnte durch den Austausch des CD20Fab-Fragmentes durch ein CD40 Fab über weitere Vorteile im Bindungsverhalten *in vivo* verfügen. Die Grundlagen für die Entwicklung eines derartigen Moleküls sind in dieser Arbeit gegeben.

Vorteile der beschriebenen Proteine sind eine einfach und kostengünstige Produktion und Applikation, wohingegen DZ für *ex vivo*-Impfstrategien aufwendig hergestellt und längere Zeit kultiviert werden, beladen und appliziert, sowie den Weg in die T-Zell-Aktivierungsregionen finden müssen. Das Ziel weiterer Forschung zur *in vivo*-DZ-Impfung muss sein, dass Patienten auch klinisch von dem *in vitro* demonstriertem Potential DZ-basierter Impfstrategien in der Krebstherapie profitieren.

5. Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung des Multiplen Myeloms in den letzten 20 Jahren kann nur in Ausnahmefällen eine Heilung erreicht werden. Immer häufiger ist es möglich, die Erkrankung bis auf eine minimale Resterkrankung (MRD) zurück zu drängen. Neue Therapiestrategien zur Kontrolle der MRD sind daher von großem Interesse. Dabei rücken zunehmend immuntherapeutische Strategien zur Anti-Tumor-Vakzinierung in das Interesse der Forschung. Neben der Vakzinierung der Patienten mit *ex vivo* generierten, mit Antigen-beladenen und nachfolgend gereiften Dendritischen Zellen (DZ) oder aber dem adoptiven Transfer Tumorantigen-spezifischer T-Zellen kommt insbesondere die *in vivo*-Applikation von Antigen und Reifungsstimulus in Betracht.

In dieser Arbeit wurden bispezifische Konstrukte entwickelt, um die Präsentation von Tumorantigen in DZ über eine gezielte Aufnahme über Endozytoserezeptoren zu verbessern und simultan eine Reifung der DZ über eine CD40-Aktivierungsdomäne zu induzieren. Durch die Verwendung rekombinanter Fab-Fragmente wurden Konstrukte generiert, die neben der monovalenten, über einen CD40 scFv vermittelten Bindung an CD40, eine ebenfalls über scFv-Fragmente kodierte Bindedomäne für die Endozytoserezeptoren CD64, CD205 oder CD209 enthalten. Darüber hinaus wurde zur bivalenten Adressierung von CD40 ein gegen einen Endozytoserezeptor-gerichteter scFv durch einen weiteren CD40 scFv substituiert. Mit Blick auf die Rezeptor-vermittelte Antigenbeladung der DZ wurde zudem an Stelle eines scFv-Fragments die für das Tumor-Modell-Antigen HM1.24 (CD317) kodierende cDNA in ein Molekül eingeführt. Zur Optimierung der Expression dieses CD317-Konstrukts wurde zudem eine *in vitro* Mutagenese der für drei Cysteine kodierenden Triplets (Cystein-Serin bzw. Glycin) vorgenommen, wodurch die Aggregation des Proteins verhindert werden kann.

Als Surrogat für die Analyse der DZ-Reifung wurden Monozyten aus dem Blut gesunder Spender isoliert und durch Zytokinen-Supplementation (IL4, GM-CSF) zu unreifen DZ differenziert. Vergleichend zu einem als Standard für die DZ-Reifung angesehenen Zytokin-Cocktail (IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂) wurde der Einfluss der rekombinanten Moleküle auf die Reifung der DZ auf Basis der durchflusszytometrisch erfassten Expressionshöhe von CD83 und CD86 ermittelt. Hierbei zeigte sich eine op-

timale Induktion der DZ-Aktivierung bei dem bivalent CD40 adressierenden Molekül [(CD40 scFv)₂ x CD20 Fab], wohingegen eine monovalente CD40-Bindung im Molekül [(HM1.24_{mut} x CD40 scFv) x CD20 Fab] keinen Einfluss auf die Reifung der Zellen hatte. Das CD40- und CD64-bindende bispezifische Konstrukt konnte keine vergleichbar prägnante Reifung der DZ induzieren, was auf die verminderte Expression von CD64 auf den IL4-gereiften DZ zurückzuführen sein könnte. Eine simultane Adressierung von CD205 bzw. CD209 und CD40 induzierte hingegen ebenso effizient die Maturierung der DZ gemessen an der Expression von CD80 sowie CD86 wie bei bivalenter Adressierung von CD40.

Schlussfolgernd könnten die hier generierten und charakterisierten bispezifischen Moleküle, welche die agonistische CD40-Domäne mit der gegen die Endozytoserezeptoren CD205 bzw. CD209 gerichteten Valenz in einem Molekül verbinden, ergänzt um ein noch einzuführendes Tumorantigen, geeignete Kandidaten für eine Weiterentwicklung von Konstrukten sein, welche die Antigenbeladung der DZ und die simultane Induktion der Reifung dieser Zellen in einem Molekül vereinen und so ein passendes Format für die Anti-Tumor-Vakzinierung darstellen.

6. Literatur

- Adema GJ, de Vries IJ, Punt CJ, Figdor CG. (2005). Migration of dendritic cell based cancer vaccines: *in vivo* veritas? *Curr Opin Immunol*. 17. 2: 170-174.
- Baggers J, Ratzinger G, Young JW. (2000). Dendritic cells as immunologic adjuvants for the treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 18. 23: 3879-3882.
- Banchereau J, Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392. 6673: 245-252.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 393. 6684: 478-480.
- Benson DJ, Byrd J. (2012). CS1-directed monoclonal antibody therapy for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 30. 16: 2013-2025.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 196. 12: 1627-1638.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. (2004). *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 199. 6: 815-824.
- Bozzacco L, Trumppfeller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, Nussenzweig MC, Piperno AG, Steinman RM. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104. 4: 1289-1294.
- Brossart P, Bevan MJ. (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: 1594-1599.
- Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grunebach F, Wirths S, Kanz L, Buhring HJ, Brugger W. (2001). The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*. 61. 18: 6846-6850.
- Buelens C, Bartholome EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, Willems F, Goldman M. (2002). Interleukin-3 and interferon β cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood*. 99. 3: 993-998.
- Burnet FM. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*. 1. 7501: 1171-1174.
- Carlring J, Szabo MJ, Dickinson R, De Leenheer E, Heath AW. (2012). Conjugation of lymphoma idiotype to CD40 antibody enhances lymphoma vaccine immunogenicity and antitumor effects in mice. *Blood*. 119. 9: 2056-2065.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. (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. *The Journal of experimental medicine*. 184. 2: 747-752.

- Chen C, Okayama H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 7. 8: 2745-2752.
- Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, Grizzi F, You H, Zhou W, Bumm K, Barlogie B, Mehta JL, Hermonat PL. (2003). Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood.* 102. 9: 3100-3107.
- Cho HJ, Takabayashi K, Cheng PM, Nguyen MD, Corr M, Tuck S, Raz E. (2000). Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism. *Nat Biotechnol.* 18. 5: 509-514.
- Datta SK, Redecke V, Prilliman KR, Takabayashi K, Corr M, Tallant T, DiDonato J, Dziarski R, Akira S, Schoenberger SP, Raz E. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of immunology.* 170. 8: 4102-4110.
- Dauer M, Lam V, Arnold H, Junkmann J, Kiefl R, Bauer C, Schnurr M, Endres S, Eigler A. (2008). Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E2 in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production. *J Immunol Methods.* 337. 2: 97-105.
- de Carvalho F, Costa ET, Camargo AA, Gregorio JC, Masotti C, Andrade VC, Strauss BE, Caballero OL, Atanackovic D, Colleoni GW. (2011). Targeting MAGE-C1/CT7 expression increases cell sensitivity to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma cell lines. *PLoS One.* 6. 11: e27707.
- de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst HM, van de Winkel JG, Parren PW. (2011). Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *Journal of immunology.* 186. 3: 1840-1848.
- Demangel C, Zhou J, Choo AB, Shoebridge G, Halliday GM, Britton WJ. (2005). Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells. *Mol Immunol.* 42. 8: 979-985.
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest.* 104. 2: 173-180.
- Dillman RO, Nanci AA, Williams ST, Kim RB, Hafer RL, Coleman CL, Wang PC, Duma CM, Chen PV, Selvan SR, Cornforth AN, Depriest C. Durable Complete Response of Refractory, Progressing Metastatic Melanoma After Treatment with a Patient-Specific Vaccine. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.*
- Dillman RO, Nanci AA, Williams ST, Kim RB, Hafer RL, Coleman CL, Wang PC, Duma CM, Chen PV, Selvan SR, Cornforth AN, DePriest C. (2010). Durable complete response of refractory, progressing metastatic melanoma after treatment with a patient-specific vaccine. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 25. 5: 553-557.
- Durie BG, Salmon SE. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer.* 36. 3: 842-854.

- Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Furhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C, Romani N. (2002). A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *Journal of immunology*. 168. 12: 6199-6207.
- Ehrlich P. (1913). Address in Pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J*. 2. 2746: 353-359.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of immunology*. 168. 5: 2118-2126.
- Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. (2013). The Dendritic Cell-specific adhesion receptor DC-Sign nternalizes Antigen for presentation to T-cells. *The Journal of Immunology*. 168. 2: 2118-2126.
- Erikson E, Adam T, Schmidt S, Lehmann-Koch J, Over B, Goffinet C, Harter C, Bekeredjian-Ding I, Sertel S, Lasitschka F, Keppler OT. (2011). *In vivo* expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108. 33: 13688-13693.
- Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano RF, Pfefferkorn LC, Guyre PM. (1997). Characterization of Expression, Cytokine Regulation, and Effector Functions of the High Affinity IgG Receptor FcγRI (CD64) Expressed on human blood Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 158. 3090-3098.
- Fay JW, Palucka AK, Paczesny S, Dhodapkar M, Johnston DA, Burkeholder S, Ueno H, Banchereau J. (2006). Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*. 55. 10: 1209-1218.
- French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. (1999). CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nature medicine*. 5. 5: 548-553.
- French RR, Taraban VY, Crowther GR, Rowley TF, Gray JC, Johnson PW, Tutt AL, Al-Shamkhani A, Glennie MJ. (2007). Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood*. 109. 11: 4810-4815.
- Goto T, Kennel SJ, Abe M, Takishita M, Kosaka M, Solomon A, Saito S. (1994). A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood*. 84. 6: 1922-1930.
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 23. 15: 3412-3420.
- Gustafsson K, Ingelsten M, Bergqvist L, Nystrom J, Andersson B, Karlsson-Parra A. (2008). Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Res*. 68. 14: 5965-5971.

- Hangalapura BN, Oosterhoff D, Aggarwal S, Wijnands PG, van de Ven R, Santegoets SJ, van den Tol MP, Hooijberg E, Pereboev A, van den Eertwegh AJ, Curiel DT, Scheper RJ, de Gruijl TD. (2010). Selective transduction of dendritic cells in human lymph nodes and superior induction of high-avidity melanoma-reactive cytotoxic T cells by a CD40-targeted adenovirus. *J Immunother.* 33. 7: 706-715.
- Hart DN. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 90. 9: 3245-3287.
- He LZ, Crocker A, Lee J, Mendoza-Ramirez J, Wang XT, Vitale LA, O'Neill T, Petromilli C, Zhang HF, Lopez J, Rohrer D, Keler T, Clynes R. (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *Journal of immunology.* 178. 10: 6259-6267.
- Heijnen IA, van Vugt MJ, Fanger NA, Graziano RF, de Wit TP, Hofhuis FM, Guyre PM, Capel PJ, Verbeek JS, van de Winkel JG. (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc γ RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J Clin Invest.* 97. 2: 331-338.
- Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 109. 3: 409-417.
- Heit A, Busch DH, Wagner H, Schmitz F. (2008). Vaccine protocols for enhanced immunogenicity of exogenous antigens. *Int J Med Microbiol.* 298. 1-2: 27-32.
- Holtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, Radmayr C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. (1999). Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urol.* 161. 3: 777-782.
- Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH, Jr., Thurnher M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 8. 11: 3369-3376.
- Horton HM, Bernett MJ, Peipp M, Pong E, Karki S, Chu SY, Richards JO, Chen H, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA. (2010). Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood.* 116. 16: 3004-3012.
- Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J Exp Med.* 178. 2: 479-488.
- Jalili A, Ozaki S, Hara T, Shibata H, Hashimoto T, Abe M, Nishioka Y, Matsumoto T. (2005). Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral-blood stem-cell harvests in patients with multiple myeloma. *Blood.* 106. 10: 3538-3545.
- Janeway CA. 2001. Immunologie. 5. Auflage ed: Spektrum Verlag.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 27. 12: 3135-3142.

- Kaka AS, Foster AE, Weiss HL, Rooney CM, Leen AM. (2008). Using dendritic cell maturation and IL-12 producing capacity as markers of function: a cautionary tale. *J Immunother.* 31. 4: 359-369.
- Kim S, Kim HO, Kim HJ, Lee K, Kim HS. (2008). Generation of functionally mature dendritic cells from elutriated monocytes using polyinosinic : polycytidylic acid and soluble CD40 ligand for clinical application. *Clin Exp Immunol.* 154. 3: 365-374.
- Kim YK, Sohn SK, Lee JH, Yang DH, Moon JH, Ahn JS, Kim HJ, Lee JJ. (2009). Clinical efficacy of a bortezomib, cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (Vel-CTD) regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase II study. *Ann Hematol.*
- Kotera Y, Shimizu K, Mule JJ. (2001). Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* 61. 22: 8105-8109.
- Kroger N, Shimoni A, Zagrivnaja M, Ayuk F, Lioznov M, Schieder H, Renges H, Fehse B, Zabelina T, Nagler A, Zander AR. (2004). Low-dose thalidomide and donor lymphocyte infusion as adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood.* 104. 10: 3361-3363.
- Lapenta C, Santini SM, Spada M, Donati S, Urbani F, Accapezzato D, Franceschini D, Andreotti M, Barnaba V, Belardelli F. (2006). IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur J Immunol.* 36. 8: 2046-2060.
- Lin KW, Jacek T, Jacek R. (2006). Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther.* 2. 2: 35-40.
- Lipscomb MF, Masten BJ. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82. 1: 97-130.
- Liu Y, Gao X, Masuda E, Redecha PB, Blank MC, Pricop L. (2006). Regulated expression of Fc γ R in human dendritic cells controls cross-presentation of antigen-antibody complexes. *Journal of immunology.* 177. 12: 8440-8447.
- Ludwig H, Avet-Loiseau H, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh, J., , Cavo M, Davies F, de la Rubia J, Delimpasi, S., Dimopoulos, M., , Drach J, Einsele H, Facon T, Goldschmidt H, Hess U, Mellqvist U, Moreau P, San-Miguel J, Sondergeld, P., Sonneveld, P., , Udvardy M, Palumbo A. (2012). European perspectives on multiple myeloma treatment strategies: update following recent congresses. *The Oncologist.* 17. (5): 593-606.
- Lutz RJ, Whiteman KR. (2009). Antibody-maytansinoid conjugates for the treatment of myeloma. *mAbs.* 1. 6: 548-551.
- Madan RA, Gulley JL. (2011). Sipuleucel-T: harbinger of a new age of therapeutics for prostate cancer. *Expert Rev Vaccines.* 10. 2: 141-150.
- Maxwell CA, Rasmussen E, Zhan F, Keats JJ, Adamia S, Strachan E, Crainie M, Walker R, Belch AR, Pilarski LM, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr., Reiman T. (2004). RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. *Blood.* 104. 4: 1151-1158.
- Mende I, Hoffmann P, Wolf A, Lutterbuse R, Kopp E, Baeuerle PA, de Baey A, Kufer P. (2005). Highly efficient antigen targeting to M-DC8+ dendritic cells via Fc γ RIII/CD16-specific antibody conjugates. *Int Immunol.* 17. 5: 539-547.

- Menezes ME, Mitra A, Shevde LA, Samant RS. (2012). DNAJB6 governs a novel regulatory loop determining Wnt/ β -catenin signalling activity. *Biochem J.* 444. 3: 573-580.
- Morgan. (2003). Criteria for the Classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology.* 121. 5: 749-757.
- Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. (2008). Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.* 68. 14: 5972-5978.
- Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, Lysterly HK. (2002). Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg.* 235. 4: 540-549.
- Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 6. 8: 769-776.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4. 3: 328-332.
- Nguyen-Pham TN, Lee YK, Lee HJ, Kim MH, Yang DH, Kim HJ, Lee JJ. (2012). Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma. *Korean J Hematol.* 47. 1: 17-27.
- Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, Kenemans P, Kast WM, Geuze HJ, Melief CJ. (1995). Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med.* 182. 1: 163-174.
- Njongmeta LM, Bray J, Davies CJ, Davis WC, Howard CJ, Hope JC, Palmer GH, Brown WC, Mwangi W. (2012). CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4(+) T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. *Vaccine.* 30. 9: 1624-1635.
- Ono K, Ohtomo T, Yoshida K, Yoshimura Y, Kawai S, Koishihara Y, Ozaki S, Kosaka M, Tsuchiya M. (1999). The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. *Mol Immunol.* 36. 6: 387-395.
- Ozaki S, Kosaka M, Wakatsuki S, Abe M, Koishihara Y, Matsumoto T. (1997). Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood.* 90. 8: 3179-3186.
- Pecher G, Haring A, Kaiser L, Thiel E. (2002). Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol Immunother.* 51. 11-12: 669-673.
- Ramakrishna V, Trembl JF, Vitale L, Connolly JE, O'Neill T, Smith PA, Jones CL, He LZ, Goldstein J, Wallace PK, Keler T, Endres MJ. (2004). Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *Journal of immunology.* 172. 5: 2845-2852.
- Relloso M, Puig-Kröger A, Pello O, Rodriguez-Fernandez J, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Munoz-Fernandez M, Sanchez-Mateos, P., Corbo, AL. (2002). DC-

- SIGN (CD209) is IL-4 dependant and is negatively regulated by IFN, TGF- β , and inflammatory agents. *J Immunol.* 168. 2034-2043.
- Rew SB, Peggs K, Sanjuan I, Pizzey AR, Koishihara Y, Kawai S, Kosaka M, Ozaki S, Chain B, Yong KL. (2005). Generation of potent antitumor CTL from patients with multiple myeloma directed against HM1.24. *Clin Cancer Res.* 11. 9: 3377-3384.
- Rosenblatt J, Vasir B, Uhl L, Blotta S, Macnamara C, Somaiya P, Wu Z, Joyce R, Levine JD, Dombagoda D, Yuan YE, Francoeur K, Fitzgerald D, Richardson P, Weller E, Anderson K, Kufe D, Munshi N, Avigan D. (2011). Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. *Blood.* 117. 2: 393-402.
- Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. (2003). WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia.* 17. 7: 1301-1312.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179. 4: 1109-1118.
- Satthaporn S, Eremin O. (2001). Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb.* 46. 1: 9-19.
- Scartozzi M, Bianconi M, Maccaroni E, Giampieri R, Berardi R, Cascinu S. (2010). Dalotuzumab, a recombinant humanized mAb targeted against IGFR1 for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 12. 3: 361-371.
- Schjetne KW, Fredriksen AB, Bogen B. (2007). Delivery of antigen to CD40 induces protective immune responses against tumors. *Journal of immunology.* 178. 7: 4169-4176.
- Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy.* 59. 10: 1573-1582.
- Steinbrink K, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. (2000). Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res.* 292. 9: 437-445.
- Steinman RM, Cohn ZA. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 137. 5: 1142-1162.
- Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 63. 9: 2127-2133.
- Szmania S, Tricot G, van Rhee F. (2006). NY-ESO-1 immunotherapy for multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 47. 10: 2037-2048.
- Tacken PJ, de Vries IJ, Gijzen K, Joosten B, Wu D, Rother RP, Faas SJ, Punt CJ, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood.* 106. 4: 1278-1285.
- te Velde AA, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. (1990). IL-4 decreases Fc γ R membrane expression and Fc γ R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *Journal of immunology.* 144. 8: 3046-3051.

- Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. (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: 1669-1678.
- Tillman BW, Hayes TL, DeGrujil TD, Douglas JT, Curiel DT. (2000). Adenoviral vectors targeted to CD40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. *Cancer Res*. 60. 19: 5456-5463.
- Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B. (1996). Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood*. 87. 3: 1196-1198.
- van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. (2006). Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol*. 27. 1: 49-55.
- Watts C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*. 15. 821-850.
- Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH. (1998). Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 4. 4: 957-962.
- Weng WK, Czerwinski D, Timmerman J, Hsu FJ, Levy R. (2004). Clinical outcome of lymphoma patients after idotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *Journal of clinical oncology*. 22. 23: 4717-4724.
- Wille-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, Kedl RM, Seder RA. (2005). Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *Journal of immunology*. 174. 12: 7676-7683.
- Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, Forehan SP, Mount A, Steptoe RJ, Shortman KD, de Koning-Ward TF, Belz GT, Carbone FR, Crabb BS, Heath WR, Villadangos JA. (2006). Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol*. 7. 2: 165-172.

7. Veröffentlichungen

“Maturation of Monocyte-derived Dendritic Cells induced by dual Targeting of Endocytosis Receptor and CD40“

Matthias Staudinger, Inga R. Catenhusen, Matthias Peipp, Christian Kellner, Roland Repp, Martin Gramatzki

ASH Annual Meeting Abstracts in *Blood* (2010). 116(21): 4293

“DC maturation induced by dual targeting of CD40 and endocytosis receptors”

Inga R. Catenhusen, Matthias Staudinger, Matthias Peipp, Christian Kellner, Roland Repp, Martin Gramatzki

Norddeutsche Immunologentagung 2010, Borstel

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Roland Repp für die freundliche und kompetente Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. Matthias Staudinger aussprechen. Er hat mich nicht nur in die Geheimnisse der Labortätigkeit eingeführt, sondern durch stete Zusprache und ausdauernde Korrekturen diese Arbeit entscheidend begleitet. Von Schwierigkeiten im Auffinden der richtigen Zytokine im Eisfach bis hin zu den Z-Problemen beim Schreiben der Dissertation ließ er sich nicht aus der Ruhe bringen. Ich habe mich zu jeder Zeit rundum großartig betreut gefühlt und danke ihm für sein Engagement, das sicherlich nicht selbstverständlich ist.

Ich danke zudem dem „Labor-Team“ im Dr. Mildred Scheel-Haus in Kiel. Es wurde mir stets sehr leicht gemacht, hier zu arbeiten. Jede Frage (Wo finde ich eigentlich...?) wurde freundlich und geduldig beantwortet.

Mein Dank gilt zudem meinen Freundinnen, die durch das Korrekturlesen dieser Schrift dazu beigetragen haben, dass sich möglichst wenig Fehler in die Endversion eingeschlichen haben...

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie. Klaus, der mich immer wieder motivierte, diese Arbeit zu beenden und der einfach für mich da ist – egal in welcher Lebenssituation. Papa, der durch sein hartnäckiges Nachfragen auch seinen Teil zur Beendigung dieser Schrift beitrug. Meinem Bruder, der immer ein liebes, aufmunterndes Wort für mich parat hat. Und meiner Mutter, die sich über die vielen verschachtelten Sätze in dieser Arbeit freuen würde und der ich so vieles verdanke.

Dankeschön.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 06.10.1980 in Münster, Westfalen

Ausbildung:

14.06.2000	Abitur am Ratsgymnasium Münster
2000 – 2002	Studium der Diplom-Journalistik und des Magister Amerikanistik an der Leibniz-Universität zu Leipzig
2002 – 2009	Studium der Humanmedizin an der Leibniz-Universität zu Leipzig, der Westfälischen-Wilhelms-Universität zu Münster und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
30.06.2009	Ärztliche Prüfung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01.07.2009	Approbation als Ärztin

Tätigkeit:

2009 - 2010	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe am Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster
seit 01.12.2010	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe am Städtischen Krankenhaus Kiel

wissenschaftliches Arbeiten:

seit 01.10.2007	Doktorandin an der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie im Dr. Mildred-Scheel-Haus der II. medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
-----------------	---