

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. M. Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**REKOMBINANTE ANTIKÖRPER-DERIVATE ZUR
SELEKTIVEN BELADUNG HUMANER DENDRITISCHER
ZELLEN MIT TUMORANTIGEN**

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

vorgelegt von
SATHYA LAUFER
aus Eckernförde
Kiel 2015

Referent: Prof. Dr. M. Gramatzki, Leiter der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, Dr. Mildred-Scheel-Haus

Koreferent: Prof. Dr. T. Valerius, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gezeichnet:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Dendritische Zellen	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Typen.....	2
1.1.3. Antigenaufnahme und Präsentation	4
1.1.4. Reifung	5
1.2. Antigenbeladung Dendritischer Zellen	6
1.2.1. Adressierung der Endozytoserezeptoren.....	7
1.2.2. Tumorantigene	11
1.2.3. Differenzierungsstrategien	12
1.3. Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Materialien.....	14
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.2. Puffer und Lösungen	15
2.1.3. MicroBeads.....	15
2.1.4. Antikörper	16
2.1.5. Peptide	16
2.1.6. Vektoren	17
2.1.7. cDNA	17
2.1.8. Primer	17
2.1.9. Bakterienstämme.....	17

2.1.10.	Restriktionsendonukleasen	17
2.1.11.	Zelllinien	18
2.1.12.	Kulturmedien	18
2.1.13.	Kits	18
2.1.14.	Sonstige Materialien.....	19
2.2.	Methoden	19
2.2.1.	Isolierung von RNA aus Zellen	19
2.2.2.	Reverse Transkription isolierter RNA	19
2.2.3.	Klonierung nach PCR	19
2.2.4.	Restriktionsverdau von DNA.....	19
2.2.5.	Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.6.	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	20
2.2.7.	Ligation von DNA.....	20
2.2.8.	Transformation von Plasmid-DNA	20
2.2.9.	Plasmid-Präparation	21
2.2.10.	DNA-Sequenzierung	21
2.2.11.	Anreicherung von rekombinanten Antikörpern aus Zellkulturmedium	21
2.2.12.	Aufkonzentrierung von Antikörpern	22
2.2.13.	Quantifizierung von Antikörpern	22
2.2.14.	Bestimmung der Zellzahl.....	22
2.2.15.	Isolierung von Zellen	22
2.2.16.	Transfektion von HEK293T-Zellen	22
2.2.17.	Kryokonservierung von Zellen.....	23
2.2.18.	Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen	23
2.2.19.	Aktivierung und Expansion CMV-spezifischer T-Zellen.....	23
2.2.20.	Durchflusszytometrische Messung der spezifischen Bindung eines Antikörpers.....	24

2.2.21. Durchflusszytometrische Messung der T-Zellaktivierung	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Herstellung der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine.....	25
3.1.1. Aufbau des Antikörpers	25
3.1.2. Klonierung	27
3.1.3. Charakterisierung potentieller Klone.....	29
3.1.4. Expression und Anreicherung der rekombinanten scFv-Miniantikörper	31
3.1.5. Quantitative Charakterisierung	31
3.2. Bindungsnachweis auf transgenen Zellen.....	32
3.2.1. Herstellung einer CD209 exprimierenden CHO-Zelllinie.....	32
3.2.2. Nachweis der Bindungselektivität und -aktivität.....	36
3.3. Nachweis der Expression der Zielrezeptoren auf Dendritischen Zellen	36
3.4. Bindungsnachweis auf Dendritischen Zellen.....	38
3.5. Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen.....	40
4. Diskussion	44
4.1. Vakzinierungsstrategien.....	44
4.2. Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten.....	48
4.3. Wahl des Adjuvans	49
4.4. Applikationswege	52
4.5. Ausblick.....	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literatur	57
7. Veröffentlichungen	65
8. Danksagungen	66
9. Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity („Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität“)
AK	Antikörper
APC	antigen-presenting cell („Antigen-präsentierende Zelle“)
BHK	Baby Hamster Kidney (immortalisierte Zelllinie aus Hamster-Nieren-Fibroblasen)
CD	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“, Immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
cDNA	complementary DNA („komplementäre DNA“)
CHO	Chinese Hamster Ovary (immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters)
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CMV	Zytomegalievirus
DNA	deoxyribonucleic acid („Desoxyribonukleinsäure“)
DZ	Dendritische Zelle
E. coli	Escherichia coli
Fab	fragment antigen binding („antigenbindendes Fragment“ eines Antikörpers)
Fc	fragment crystallizable (konstante Region eines Antikörpers)
Fc-Rezeptoren	Membranständige Rezeptoren für verschiedene Immunglobulinisotypen
FDA	Food and Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	fragment variable (variable Region eines Antikörpers)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
GMP	Good Manufacturing Practice („gute Herstellungspraxis“ bei der Herstellung von Medizinprodukten)
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293T (humane embryonale Nierenzelllinie 293T)

His	Histidin
HLA	Human Leucocyte Antigen (humanes Leukozyten-Antigen)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
kDZ	klassische Dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker
MACS	magnetic-activated cell sorting („magnetisch aktivierte Zelltrennung“)
mDZ	myeloide Dendritische Zelle
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MoDZ	aus Monozyten gereifte Dendritische Zelle
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NLR	NOD-like receptor („NOD-ähnlicher Rezeptor“)
PAMP	pathogen-associated molecular patterns (pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell („mononukleäre Zellen des peripheren Blutes“)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction („Polymerase-Kettenreaktion“)
pDZ	plasmozytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PRR	pattern-recognition receptor („Mustererkennungsrezeptor“)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction („Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion“)
scFv	single chain fragment variable („einzelsträngiges variables Fragment“)
TAA	tumor-associated antigen (Tumor-assoziiertes Antigen)

TAE	TRIS-Acetat-EDTA (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan - Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure)
TLR	toll-like receptor („toll-ähnlicher Rezeptor“)
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vascular endothelial growth factor („vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor“)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Ontogenese Dendritischer Zellen und deren Verteilung	S. 3
Abbildung 3.1	Übersicht der notwendigen Schritte zur Herstellung der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine, zur Herstellung, Reifung und Beladung Dendritischer Zellen sowie zur T-Zell-Aktivierung	S. 25
Abbildung 3.2	Schematischer Aufbau der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine	S. 26
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung der DNA des vollständigen Antikörpermoleküls	S. 27
Abbildung 3.4	Mit der Restriktionsendonuklease <i>Sfi</i> I geschnittener Vektor "pSecTag2/Hygro B" mit FcKO und HM1.24 sowie scFv Inserts	S. 28
Abbildung 3.5	Plasmidkarten des pSecTag2/Hygro B mit FcKO-IgG1, HM1.24 und scFv-Insert	S. 29
Abbildung 3.6	Nachweis der Insertion der scFv-Kassette durch Hydrolyse der erhaltenen scFv FcKO HM1.24 Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease <i>Sfi</i> I	S. 30
Abbildung 3.7	Nachweis von HM1.24 in den erhaltenen scFv FcKO HM1.24 Konstrukten durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease <i>Xho</i> I	S. 30
Abbildung 3.8	Automatisierte chromatographische Charakterisierung der rekombinanten Proteine zur Beurteilung von Reinheit und Qualität sowie zur Bestimmung der erhaltenen Menge	S. 32
Abbildung 3.9	RT-PCR zur Amplifikation der CD209 cDNA	S. 33
Abbildung 3.10	Nachweis des Inserts nach Klonierung der CD209-cDNA mittels TA-Cloning-Kit	S. 34
Abbildung 3.11	Nachweis von CD209 in den erhaltenen Konstrukten durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen <i>Hind</i> III und <i>Xba</i> I	S. 35

Abbildung 3.12	Durchflusszytometrischer Nachweis der CD-209-Expression auf den mit dem CD209-cDNA-Konstrukt transfizierten CHO-Zellen	S. 35
Abbildung 3.13	Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität und -selektivität der aufgereinigten Antigen-Antikörper-Fusionsproteine	S. 37
Abbildung 3.14	Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression von CD64, CD89, CD205 und CD209 auf unreifen Dendritischen Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Reifungsstimuli	S. 39
Abbildung 3.15	Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität der aufgereinigten Antigen-Antikörper-Fusionsproteine auf unreifen Dendritischen Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Reifungsstimuli	S. 41
Abbildung 3.16	Durchflusszytometrischer Nachweis der T-Zell-Aktivierung	S. 43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Expression verschiedener C-Typ-Lektin-Rezeptoren auf unterschiedlichen Subtypen Dendritischer Zellen	S. 11
Tabelle 2.1	Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	S. 14
Tabelle 2.2	Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	S. 15
Tabelle 2.3	Liste der verwendeten MicroBeads	S. 15
Tabelle 2.4	Liste der genutzten Antikörper	S. 16
Tabelle 2.5	Liste der verwendeten Peptide	S. 16
Tabelle 2.6	Liste der verwendeten Vektoren	S. 17
Tabelle 2.7	Liste der verwendeten cDNA	S. 17
Tabelle 2.8	Liste der verwendeten Primer	S. 17
Tabelle 2.9	Liste der verwendeten Bakterienstämme	S. 17
Tabelle 2.10	Auflistung der genutzten Zelllinien	S. 18
Tabelle 2.11	Liste der verwendeten Kulturmedien	S. 18
Tabelle 2.12	Liste der verwendeten Kits	S. 18
Tabelle 2.13	Auflistung sonstiger verwendeter Materialien	S. 19

1. Einleitung

Die Immuntherapie maligner Tumoren versucht, sich die Leistungsfähigkeit und Spezifität des Immunsystems zu Nutze zu machen, um gezielt Tumorzellen zu zerstören. Dendritische Zellen bilden als professionelle antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) die zentrale Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Sie sind in der Lage, sowohl Immuntoleranz als auch starke Immunantworten zu induzieren. Damit scheinen sie das ideale Ziel für eine therapeutische Vakzinierung zu sein.

In den letzten Jahren wurde das immuntherapeutische Potential Dendritischer Zellen intensiv erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Tat starke, gegen Tumorantigene gerichtete humorale und zelluläre Immunantworten induzieren lassen. Es wurden dabei bisher vor allem *ex vivo* generierte Dendritische Zellen verwendet. Bei diesem Ansatz ist jedoch problematisch, dass für eine Tumorthherapie jedem Patienten Zellen individuell entnommen, anschließend mit Antigen beladen und nachfolgend aktiviert werden müssen. Dies ermöglicht zwar eine gute Kontrolle der einzelnen Prozessierungsschritte, ist jedoch mit erheblichem Kosten- und Arbeitsaufwand verbunden.

Eine Antigenbeladung und Reifung der Dendritischen Zellen *in vivo* würde den Aufwand deutlich reduzieren. Außerdem ließen sich natürliche und seltene Subtypen Dendritischer Zellen gezielt erreichen, die möglicherweise Eigenschaften aufweisen, welche den *ex vivo* erzeugten, artifiziellen Dendritischen Zellen überlegen sind.

1.1. Dendritische Zellen

1.1.1. Allgemeines

Unter dem Begriff „Dendritische Zelle“ wird eine Gruppe von Zellen zusammengefasst, welche auf die Präsentation von Antigenen spezialisiert ist. Sie haben eine herausragende Fähigkeit, sowohl Toleranz zu induzieren als auch Immunität in Form von starken zellulären und humoralen Immunantworten hervorzurufen. Das macht sie zu einer zentralen Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Hart 1997; Palucka und Banchereau 2012).

1.1.2. Typen

Die Vorläuferzellen der Dendritischen Zellen entwickeln sich aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen. Über das Blut gelangen diese Vorläuferzellen in nahezu alle Organe, wo sie sich zu verschiedenen Subtypen von unreifen Dendritischen Zellen differenzieren (Lipscomb und Masten 2002; Collin 2013). Es lassen sich vier Haupttypen unterscheiden (Collin 2013; Segura und Amigorena 2014):

- Myeloide Dendritische Zellen (mDZ),
auch klassische Dendritische Zellen (kDZ) genannt
- Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ)
- CD14⁺ („inflammatorische“) Dendritische Zellen
- Langerhans-Zellen und möglicherweise Mikroglia

Myeloide Dendritische Zellen zeichnen sich durch die myeloiden Antigene CD11b, CD11c, CD13 und CD33 aus. Sie lassen sich weiter unterteilen in CD1c⁺ (BDCA-1⁺) und CD172a⁺ mDZ sowie die seltenen CD141⁺ mDZ (Palucka und Banchereau 2012; Collin 2013; Guilliams 2014). Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen beiden Arten von mDZ auch um die Vorläuferzellen der entsprechenden im Gewebe vorkommenden Untertypen (Segura und Amigorena 2014). CD141⁺ mDZ sind besonders befähigt, exogene Antigene über einen als Kreuzpräsentation bezeichneten Weg auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren (siehe Seite 4). Außerdem exprimieren sie XCR1, den ausschließlich auf Dendritischen Zellen zu findenden Rezeptor für das Chemokin Lymphotoxin (XCL1), welches von NK-Zellen und aktivierten CD8⁺ T-Zellen produziert wird. Damit sind sie in der Lage, starke zelluläre Immunantworten auszulösen (Palucka und Banchereau 2012; Collin 2013; Hartung 2015).

Plasmazytoiden Dendritischen Zellen fehlen die genannten typischen myeloiden Antigene. Sie lassen sich durch ihren besonderen Phänotyp, die Expression von CD123 (IL-3R), CD303 (CLEC4C; BDCA-2) und CD304 (Neuropilin; BDCA-4) erkennen. Sie sind die zahlreichsten Dendritischen Zellen im Blut und finden sich in peripheren lymphatischen Organen, jedoch kaum im Gewebe. Im Gegensatz zu den anderen Subtypen wandern sie wahrscheinlich direkt über das Blut in die lymphatischen Organe ein. Ihre Hauptaufgabe scheint die Abwehr viraler Infektionen zu sein (Lipscomb und Masten 2002; Liu 2005; Palucka und Banchereau 2012; Collin

2013). CD1c⁺ und CD141⁺ mDZ sowie pDZ finden sich in unreifer Form im Blut (siehe Abb. 1.1; Ziegler-Heitbrock 2010; Palucka und Banchereau 2012).

Weitere Untergruppen myeloider Dendritischer Zellen sind die vermutlich von Monozyten abstammenden CD14⁺ Dendritischen Zellen sowie die bei Entzündungen vorkommenden, aus eingewanderten Monozyten hervorgegangenen, inflammatorischen Dendritischen Zellen (Collin 2013).

Langerhanszellen stellen die epidermale DZ-Population. Sie lassen sich durch Langerin auf der Zelloberfläche identifizieren. Eine Besonderheit gegenüber den anderen Untertypen ist die Fähigkeit, unabhängig vom Knochenmark zu proliferieren. Langerhanszellen sind ähnlich wie die CD141⁺ mDZ hervorragende Kreuzpräsentierer. Ob Mikroglia zu den Dendritischen Zellen gehören, ist nach wie vor unklar (Collin 2013; Fehres 2013; Palucka und Banchereau 2013).

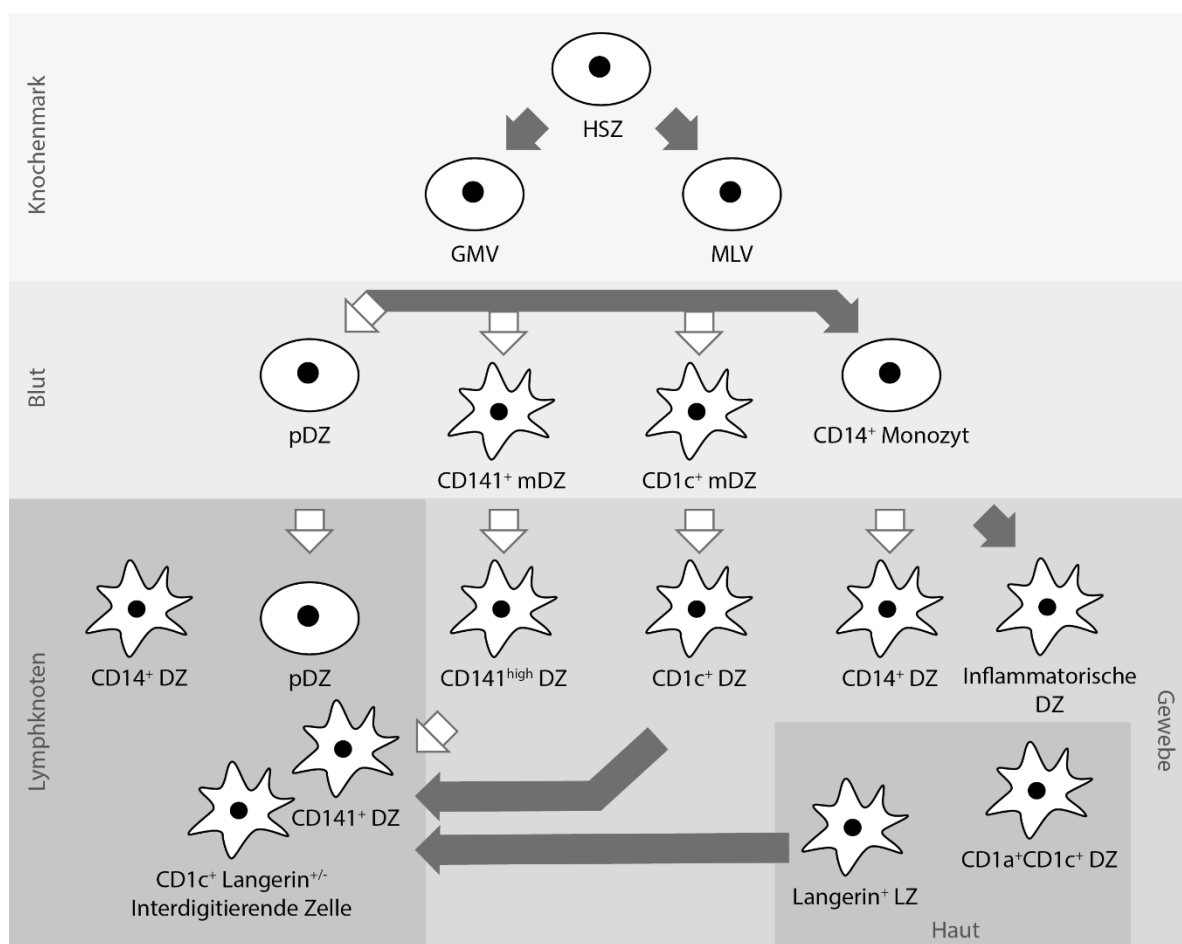


Abb. 1.1: Ontogenese Dendritischer Zellen und deren Verteilung

Weiße Pfeile zeigen Entwicklungsschritte, die für menschliche Dendritische Zellen noch bestätigt werden müssen. HSZ: CD34⁺ hämatopoetische Stammzelle; GMV: Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen; MLV: Multi-lymphoide Vorläuferzellen; mDZ: Myeloide Dendritische Zelle; pDZ: Plasmazytoide Dendritische Zelle; LZ: Langerhans-Zelle (Klechevsky 2009; Ziegler-Heitbrock 2010; Palucka und Banchereau 2012; Collin 2013)

In der oberflächlichen Dermis finden sich noch CD1a⁺ mDZ. Sie stellen mit 30-35% der Dendritischen Zellen die größte Hautpopulation dar. Möglicherweise handelt es sich um die dermale Population der CD1c⁺ mDZ, da sich CD1c ebenfalls auf der Zelloberfläche findet. Es ist auch möglich, dass es sich um die Vorläuferzellen der Langerhanszellen handelt (Klechevsky 2009; Fehres 2013).

Zusätzlich zu den genannten Typen, lassen sich *in vitro* Zellen mit DZ-charakteristischem Phänotyp und den funktionellen Eigenschaften inflammatorischer Dendritischer Zellen durch Inkubation von Monozyten mit IL-4 und GM-CSF erzeugen (abgekürzt MoDZ; Sallusto und Lanzavecchia 1994; Segura und Amigorena 2014).

Neben den bereits genannten Besonderheiten und Funktionen der DZ-Populationen gibt es noch viele weitere, welche zum Teil immer noch wenig verstanden oder noch unbekannt sind (Tacke und Figdor 2011; Collin 2013; Fehres 2013).

1.1.3. Antigenaufnahme und Präsentation

Unreife Dendritische Zellen nehmen Antigene über Pinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose auf. Wichtige Endozytose-Rezeptoren, über welche Antigene aufgenommen werden, sind Fc- und C-Typ-Lektin-Rezeptoren. Zudem können Antigene aber auch von anderen Zelltypen auf Dendritische Zellen übertragen werden (Lipscomb und Masten 2002; Tacke 2007).

Antigene werden auf unterschiedlichen Wegen prozessiert. Zum einen werden zytosolische Proteine durch das Immunproteasom gespalten und in das Endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort binden sie an MHC-Klasse-I-Moleküle und können nach Reifung der Dendritischen Zelle zytotoxische T-Zellen aktivieren (Hart 1997; Lipscomb und Masten 2002).

Dem gegenüber erfolgt der Abbau des durch Pinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommenen Antigens in späten Endosomen, wodurch es zu einer Präsentation der antigenen Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen und nachfolgend zur Stimulation von T-Helferzellen kommt (Hart 1997; Lipscomb und Masten 2002).

Zusätzlich können Antigene den endozytotischen Weg verlassen und ebenfalls über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden, so dass nach Reifung zytotoxische T-Zellen aktiviert werden können. Dies wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Für die Kreuzpräsentation ist es wichtig, dass Antigene möglichst in frühen Endosomen akkumulieren, d. h. nicht in späten Endosomen abgebaut werden (Chatterjee 2012).

Der dritte bekannte Weg führt zur Präsentation von Lipid-Antigenen auf CD1-Molekülen (Palucka und Banchereau 2012).

1.1.4. Reifung

Neben Rezeptoren für die Antigenaufnahme besitzen Dendritische Zellen auch Rezeptoren für „Gefahrensignale“. Diese Signale führen zur Reifung der Dendritischen Zelle und nachfolgend zur Wanderung in das nächstgelegene periphere lymphatische Organ. Je nach Gefahrensignal können unterschiedliche Phänotypen Dendritischer Zellen entstehen, welche unterschiedliche Immunantworten hervorrufen (Palucka und Banchereau 2012).

Es lassen sich endogene und exogene Gefahrensignale unterscheiden. Endogene Signale sind beispielsweise Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β , bestimmte Hitzeschockproteine oder CD40L (Lipscomb und Masten 2002). Exogene Signale sind vor allem pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) wie beispielsweise virale RNA oder bakterielle Lipoteichonsäure, LPS oder CpG-Motive. Wichtige Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR) zur Erkennung dieser Moleküle sind die sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär vorkommenden toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptors, TLR), intrazelluläre NOD-ähnliche Rezeptoren (NOD-like receptors, NLR) und intrazelluläre Helikasen (Lipscomb und Masten 2002; Palucka und Banchereau 2013).

Ohne Gefahrensignal erfolgt keine Reifung der Dendritischen Zelle. Die Reifung ist essentiell für die Entwicklung von Immunität, da nur reife Dendritische Zellen in der Lage sind, T-Zellen effektiv zu aktivieren (Lipscomb und Masten 2002; Tacke 2007). Die Präsentation von Antigenen durch unreife Dendritische Zellen führt zu Toleranz zum einen durch die Induktion von Anergie in den T-Zellen und zum anderen durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen (T_{Reg}) (Palucka und Banchereau 2012).

Die Reifung führt zu einer Vielzahl von Veränderungen in der Dendritischen Zelle. Sie verändert sich morphologisch; die Dendriten verlängern und verbreitern sich, so dass sich damit die Oberfläche für Zellinteraktionen vergrößert (Foged 2002). Es werden andere Chemokinrezeptoren exprimiert, was zu einer Wanderung der Dendritischen Zelle in Richtung der peripheren lymphatischen Organe führt. Weiterhin werden kostimulierende Moleküle für die T-Zell-Interaktion wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) exprimiert und Chemokine produziert, welche T-Zellen rekrutieren und somit die Wahrscheinlichkeit für einen DZ-T-Zell-Kontakt erhöhen. Verstärkt exprimiert werden

außerdem unter anderem CD83, CD40, CD11c, CD54 (ICAM1) und MHC-Klasse-II-Moleküle. Zusätzlich werden Zytokine wie Interleukin-12 produziert, welche die T-Zell-Differenzierung beeinflussen. Durch die Reifung verlieren Dendritische Zellen die Fähigkeit zur Antigenprozessierung, so dass naive T-Zellen nur für kurze Zeit stimuliert werden können (Morel 2001; Lipscomb und Masten 2002).

1.2. Antigenbeladung Dendritischer Zellen

Damit Dendritische Zellen eine Immunantwort auslösen können, ist die Beladung mit Antigen notwendig. Das ist auf unterschiedlichen Wegen möglich. Die erste Gruppe von Antitumorvakzinen nutzt Strategien, welche die *Ex-vivo*-Beladung Dendritischer Zellen mit Tumor-assoziierten Antigenen (tumor-associated antigens, TAA) gemeinsam haben. Die Dendritischen Zellen werden dabei meist entweder aus hämatopoetischen Vorläuferzellen oder aus Monozyten des Patienten erzeugt (Galluzzi 2012; Palucka und Banchereau 2013). Folgende Verfahren lassen sich unterscheiden (Galluzzi 2012):

1. Inkubation mit Tumorzell-Lysaten oder apoptotischen Tumorzellen
2. Inkubation mit gereinigten Tumor-assoziierten Antigenen
3. Transfektion der DZ mit Antigen-kodierender mRNA
4. Genetische Manipulation der DZ zur Expression von Tumor-assoziierten Antigenen
5. Fusion von DZ mit Tumorzellen

Die zweite Gruppe fasst Verfahren zur *In-vivo*-Beladung Dendritischer Zellen mit TAA zusammen. Unter anderem (Condon 1996; Tacke 2006; Galluzzi 2012):

1. Direkte Kopplung von TAA an monoklonale Antikörper gegen Oberflächenrezeptoren oder Liganden von Oberflächenrezeptoren Dendritischer Zellen
2. Verpackung von TAA in Mikropartikeln wie Liposomen oder Polymerpartikeln und Kopplung von Antikörpern oder Rezeptorliganden an das Partikel
3. Lebende Vektoren, wie beispielsweise Adenoviren, welche TAA-DNA in das Zytoplasma Dendritischer Zellen einschleusen
4. Vakzinierung mit für TAA kodierender nackter DNA

Die dritte Gruppe beinhaltet Strategien, welche von Dendritischen Zellen abstammende und *ex vivo* gewonnene Exosomen verwenden. Diese Exosomen sind 30 bis 90 nm große Vesikel, welche MHC-Klasse-II- sowie kostimulierende Moleküle auf der

Oberfläche besitzen und somit T-Zellen direkt stimulieren können (Viaud 2010; Galluzzi 2012).

1.2.1. Adressierung der Endozytoserezeptoren

Für die gerichtete *In-vivo*-Beladung Dendritischer Zellen ist die Wahl eines geeigneten Rezeptors entscheidend. Je nach Rezeptor und teilweise je nach Ligand bzw. bei Verwendung von Antikörpern je nach gewählter Zielstruktur auf dem Rezeptor werden die Antigene unterschiedlich prozessiert (Tacke und Figdor 2011).

Der gewählte Rezeptor sollte vorwiegend auf Dendritischen Zellen exprimiert sein (Tacke 2006). Weiterhin ist es für die erfolgreiche Tumorstimmung essentiell, dass das Antigen nach der Prozessierung sowohl auf MHC-Klasse-I- als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird (Palucka und Banchereau 2013). Wünschenswert wäre außerdem, wenn der Rezeptor die Reifung der Dendritischen Zelle auslöst, damit kein kostimulatorisches Signal appliziert werden muss (Tacke 2006).

Je nach adressiertem Rezeptor lassen sich zudem unterschiedliche Subtypen Dendritischer Zellen erreichen. Somit kann die Art der Immunantwort beeinflusst werden (siehe Tabelle 1; Tacke und Figdor 2011).

Für die rezeptorvermittelte Beladung der Dendritischen Zellen kommen eine ganze Reihe von Oberflächenrezeptoren in Betracht. Die meisten dieser Rezeptoren gehören zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRR). Die wichtigsten Familien stellen die C-Typ-Lektin-Rezeptoren sowie die Fc-Rezeptoren dar. Als weitere bereits untersuchte Rezeptoren, welche zur Antigenpräsentation führen, sind die β_2 -Integrine (CD11b/CD18 und CD11c/CD18) sowie das Oberflächenantigen CD40 (Figdor 2002; Tacke 2006) zu nennen.

1.2.1.1. Fc-Rezeptoren

Die Fc-Rezeptoren bilden eine Rezeptorfamilie, welche die Fähigkeit zur Interaktion mit der konstanten Region von Immunglobulinen hat. Es gibt sowohl aktivierende als auch inhibierende Fc-Rezeptoren. Sie sind unter anderem wichtig für die Phagozytose, Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) und Antigenpräsentation. Auf Dendritischen Zellen finden sich Rezeptoren zur Erkennung von IgG (Fc γ R), IgA (Fc α R) und IgE (Fc ϵ R) (Tacke 2006). Bei Verwendung von Fc-Rezeptoren als Zielstruktur ist es notwendig,

diese nicht über den Fc-Teil zu adressieren, um die Bindung an inhibitorische Fc-Rezeptoren zu vermeiden (Kalergis 2002).

Fc γ -Rezeptor I (CD64)

Der Fc γ -Rezeptor I (Fc γ RI, CD64) ist der bestuntersuchte Fc γ -Rezeptor. Die Beladung mit Antigen führt zu einer Präsentation sowohl auf MHC-Klasse-I- als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen (Wallace 2001; Amigorena 2002; Schuurhuis 2006; Tacke 2006). Er bindet IgG-Moleküle mit hoher Affinität und findet sich vorwiegend auf von Monozyten abstammenden Dendritischen Zellen und Makrophagen und hier vor allem auf Zellen aus entzündeten Geweben (Guilliams 2014).

In Mäusen führt die Gabe von gegen diesen Rezeptor gerichteten Antigen-Antikörper-Fusionsproteinkomplexen zu tumorprotektiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten (Rafiq 2002; Tacke 2006).

Ein Nachteil ist, dass im Vergleich zu Monozyten die Expression auf Dendritischen Zellen niedriger ist (Fanger 1996). Damit bei *In-vivo*-Applikation nicht überwiegend Monozyten und Makrophagen beladen werden, ist entsprechend entweder eine Applikation des Vakzins notwendig, bei der Monozyten nur begrenzt erreicht werden (z. B. subkutan) oder das Vakzin wird zur *Ex-vivo*-Beladung von Dendritischen Zellen verwendet. Leider scheinen die so beladenen MoDZ schlecht zu migrieren (Guilliams 2014).

Fc α -Rezeptor (CD89)

Der Fc α -Rezeptor (Fc α R, CD89) wird auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und auf einigen Subtypen myeloider Dendritischer Zellen exprimiert. Der natürliche Ligand ist Serum-IgA. Lösliches IgA wird kaum gebunden (Otten und van Egmond 2004). Nach Adressierung dieses Rezeptors ist kein zusätzlicher Reifungsstimulus erforderlich. Die Beladung von CD89 führt bei Quervernetzung zur Hochregulierung des für die T-Zell-Interaktion wichtigen kostimulierenden Moleküls und als Reifungsmarker verwendeten CD86 sowie MHC-Klasse-II-Molekülen auf Dendritischen Zellen (Geissmann 2001; Bajtay 2006). Ohne Quervernetzung wirkt der Rezeptor immunsuppressiv (Geissmann 2001; Pasquier 2004; Pasquier 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass humane, aus Monozyten generierte Dendritische Zellen *in vitro* durch IgA-Komplexe aktiviert werden (Geissmann 2001; Pasquier 2004).

Die Expression von CD89 ist wie die von CD64 auf Monozyten deutlich höher als auf Dendritischen Zellen (Heystek 2002). CD89 ist außerdem auf vielen weiteren myeloiden Zellen zu finden. Vor allem die Expression auf neutrophilen Granulozyten ist hoch (Ottens und van Egmond 2004). Das macht die systemische *In-vivo*-Anwendung problematisch, so dass ebenfalls eine Applikation des Vakzins erforderlich ist, bei der überwiegend Dendritische Zellen erreicht werden.

1.2.1.2. C-Typ-Lektin-Rezeptoren

Die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR) sind eine Gruppe von Rezeptoren, welche Kohlenhydrate Calcium-abhängig über konservierte Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (carbohydrate recognition domains, CRD) binden können. Sie kommen sowohl als lösliche Proteine als auch als Transmembranrezeptoren vor und sind möglicherweise neben anderen Aufgaben wichtig für die Erkennung von Pathogenen (Figdor 2002).

Die meistuntersuchten Rezeptoren dieser Familie sind der Mannose-Rezeptor (MR), DEC-205 (CD205) und DC-SIGN (CD209) (Tacke 2006). Relevant sind außerdem Langerin sowie das erst vor wenigen Jahren identifizierte CLEC9A (DNCR-1) (Sancho 2009; Tacke und Figdor 2011).

DEC-205 (CD205)

DEC-205 (von „**d**endritic and **e**pithelial **c**ell“ oder **Dec**alektin und der Masse von 205 kD; CD205) ist ein Typ-I-CLR (Aminoterminus extrazellulär), welcher auf den meisten DZ-Subtypen und Monozyten stark, auf B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen schwach exprimiert wird (Swiggard 1995; Kato 2006; Steinman 2012). Er ist der zur Zeit am besten untersuchte Rezeptor für die Antigenbeladung Dendritischer Zellen (Hesse 2013). Die natürlichen Liganden sind noch unbekannt, allerdings binden synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) an DEC-205 (Steinman 2012; Caminschi 2013).

Durch Kopplung von Antigen an einen monoklonalen Antikörper gegen diesen Rezeptor wurde gezeigt, dass die Immunogenität von Antigen-Antikörper-Fusionsproteinen *in vivo* deutlich höher ist als die von löslichem Antigen. Für die MHC-Klasse-I-Präsentation ist in der Maus etwa 1000-mal weniger, für die MHC-Klasse-II-Präsentation etwa 50-mal weniger Antigen erforderlich (Bonifaz 2004; Steinman 2012). Durch seine Beladung lassen sich mit zusätzlichem Reifungsstimulus starke

CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Antworten auslösen, welche sowohl vor Tumoren als auch vor Virusinfektionen schützen. Ohne Reifungsstimulus wird hingegen Toleranz induziert (Bonifaz 2004; Tacke 2007). In Mäusen konnten bereits präexistierende Tumoren erfolgreich geheilt werden (Mahnke 2005).

Da sich CD205 im Menschen überwiegend auf Dendritischen Zellen findet, ist es für eine *In-vivo*-Beladung geeignet. Es muss allerdings dennoch die Endozytose durch andere myeloide Zellen in Kauf genommen werden (Tacke 2007).

Auch für die *Ex-vivo*-Beladung scheint CD205 ein geeigneter Rezeptor. Gegenüber der Beladung mit löslichem Antigen ist die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentation um ein vielfaches effizienter (Bonifaz 2004). Bei Verwendung humaner Dendritischer Zellen ist die zytotoxische T-Zell-Antwort jedoch weit weniger ausgeprägt (Kastenmüller 2014). Es scheint aber, dass sich diese durch Gabe von Substanzen, welche die Immunantwort verstärken - sogenannten Boostern (z. B. HIV-Gag-Impfstoff) - deutlich verbessern lässt (Kastenmüller 2014).

DC-SIGN (CD209)

DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM3 grabbing nonintegrin; CD209) ist ein Typ-II-CLR, welcher überwiegend auf CD14⁺ dermalen Dendritischen Zellen und auf einem Teil der Dendritischen Zellen in Lymphknoten exprimiert wird (vgl. Tab. 1.1). Es ist unklar, ob es sich bei letzteren um eingewanderte CD14⁺ Dendritische Zellen oder um Lymphknotenpopulationen handelt (Tacke und Figdor 2011). Auf reifen Dendritischen Zellen ist der Rezeptor nur noch schwach exprimiert. Außer auf Dendritischen Zellen findet er sich in geringer Menge auch auf Makrophagen (Geijtenbeek 2000; Figdor 2002; Tacke und Figdor 2011; Hesse 2013). Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit genutzten Rezeptoren hat CD209 die beste Spezifität für Dendritische Zellen. Die natürlichen Liganden sind Kohlenhydratstrukturen, welche Mannose enthalten (van Kooyk und Geijtenbeek 2003).

Tabelle 1.1: Expression verschiedener C-Typ-Lektin-Rezeptoren auf unterschiedlichen Subtypen Dendritischer Zellen (aus Tacke 2011)

	<i>MR</i>	<i>DEC-205</i>	<i>DC-SIGN</i>	<i>Langerin</i>	<i>CLEC9A</i>
<i>MoDZ</i>	+	+	+	-	-
<i>Blut-CD1c⁺</i>	-	+	-	-	-
<i>Blut-CD16⁺</i>	-	+	-	-	-
<i>Blut-BDCA-3⁺</i>	-	+	-	-	+
<i>pDZ</i>	-	+	-	-	-
<i>Dermal-CD14⁺</i>	+	-	+	-	?
<i>Dermal-CD1a⁺</i>	±	?	-	-	?
<i>LZ</i>	-	+	-	+	?

Dieser Rezeptor lässt sich nicht in Mäusen mit nicht-humanem Immunsystem untersuchen, da diese Formen von CD209 exprimieren, welche funktionell keinen Bezug zu ihrem menschlichen Gegenstück haben (Tacke 2007).

In transgenen DC-SIGN⁺ Mäusen werden jedoch durch ein Antigen-Antikörper-Fusionsproteinen gegen diesen Rezeptor starke CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten ausgelöst, welche, auch über längere Zeit, effektiv vor Infektionen schützen (Hesse 2013). In Mäusen mit humanem Immunsystem wird Raji-Zell-Tumorwachstum nach Administration von gegen DC-SIGN gerichteten und mit Antigen verknüpften Antikörpern und gleichzeitiger Gabe von gegen DC-SIGN gerichteten und mit dem Adjuvans KLH verknüpften Antikörpern erfolgreich gehemmt (Kretz-Rommel 2007). Vermutlich ist für effektive Immunantworten ein zusätzlicher Reifungsstimulus erforderlich (Hesse 2013), auch wenn dieser nicht absolut notwendig scheint (Ueno 2010).

1.2.2. Tumorantigene

Da die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen über die Präsentation von Peptiden über MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgt, eignen sich im Gegensatz zu antikörper-basierten Therapien prinzipiell sowohl membranständige als auch intrazelluläre Proteine als Antigene. Weil jedoch neben der zellulären auch eine humorale Immunantwort

induziert wird, ist dennoch die Wahl von Antigenen sinnvoll, welche auf der Tumorzelloberfläche zu finden sind.

Daneben scheint es sinnvoll, mutierte tumorspezifische Proteine zu wählen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein geeigneter T-Zell-Klone höher, da T-Zellen gegen nicht-mutierte Proteine oft bereits durch negative Selektion autoreaktiver Zellen nicht mehr vorhanden sind. Zudem existieren oft regulatorische T-Zellen gegen nicht-mutierte Selbstantigene, was eine effektive Immunantwort zusätzlich erschwert (Palucka und Banchereau 2012).

1.2.3. Differenzierungsstrategien

Dendritische Zellen lassen sich nur schwierig aus menschlichem Gewebe isolieren (Tacke und Figdor 2011). Daher werden für Laborversuche meist Dendritische Zellen aus leicht isolierbaren CD14⁺ Blutmonozyten differenziert. Dies geschieht mit Hilfe von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) in Kombination mit Interleukin-4 (Romani 1994), Interleukin-3 plus Interferon- β (Buelens 2002), Tumor-Nekrose-Faktor α (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Chomarat 2003), Interferon- α (Paquette 1998) oder Interleukin-15 (Mohamadzadeh 2001). GM-CSF bewirkt dabei die myelomonozytäre Differenzierung der Zellen. Die weiteren Zytokine inhibieren die Entstehung von Makrophagen (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Della Bella 2004).

Je nach gewählter Zytokinkombination entstehen Dendritische Zellen unterschiedlichen Phänotyps. Daher ist die Wahl geeigneter Zytokine essentiell (Palucka und Banchereau 2012). Als Standard hat sich die Kombination aus GM-CSF und Interleukin-4 etabliert. Die damit generierten Dendritischen Zellen sind vermutlich *In-vitro*-Äquivalente inflammatorischer Dendritischer Zellen (Segura und Amigorena 2014). Sie sind jedoch möglicherweise nicht in der Lage, zum nächsten lymphatischen Organ zu wandern (Della Bella 2004).

Dendritische Zellen, welche mit der Kombination GM-CSF plus Interferon- α generiert wurden, scheinen diese Einschränkungen nicht aufzuweisen. Sie sind möglicherweise sogar in der Lage, T-Zellen ohne weiteren Reifungsstimulus zu aktivieren (Mohty 2003). Interleukin-3 in Kombination mit Interferon- β induziert die Bildung von CD123⁺ Dendritischen Zellen (Buelens 2002). Diese haben also Ähnlichkeit mit plasmazytoiden Dendritischen Zellen, besitzen jedoch noch myeloide Antigene. Mit

Interleukin-15 erzeugte Dendritische Zellen haben Ähnlichkeit mit Langerhanszellen (Mohamadzadeh 2001).

1.3. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Herstellung rekombinanter Antikörper, welche von dendritischen Zellen so prozessiert werden, dass ein gebundenes Antigen sowohl auf MHC-Klasse-I- als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird, um die Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen zu ermöglichen. Für die Beladung wurden die Fc-Rezeptoren CD64 und CD89 sowie die C-Typ-Lektin-Rezeptoren CD205 und CD209 ausgewählt. Als Modellantigen wurde das auf Multiplen-Myelom-Zellen exprimierte HM1.24 gewählt.

Weiterhin sollte die Höhe der Expression von CD64, CD89, CD205 und CD209 auf Dendritischen Zellen ermittelt werden, welche unter Einfluss unterschiedlicher Zytokinkombinationen aus Monozyten differenziert wurden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
100 Bp-DNA Leiter EXTENDED	Carl Roth
6x Gelladepuffer (für DNA-Proben)	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Accutase	Invitrogen
Agarose	Bio-Rad
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Brefeldin	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumcarbonat	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	CellGenix
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Glyzin	Carl Roth
Hygromycin B	Invitrogen
Imidazol	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth

Magermilchpulver (MMP)	Bio-Rad
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck

2.1.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x HBS	50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05
αKappa/αLambda-Bindepuffer	1x PBS, pH 7,5
αKappa/αLambda-Elutionspuffer	0,1M Glyzin, pH 2,0
DZ-Einfriermedium	CellGro DC Medium, DMSO, BSA
HEK293T-Einfriermedium	DMEM, 10% (v/v) DMSO, 5% (w/v) BSA
His-Tag-Bindepuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 8,0
His-Tag-Elutionspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM Imidazol, pH 8,0
50x Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer (TAE)	2M Tris, 50mM EDTA, 1mM Eisessig, pH 8,0
10x Tris-buffered Saline (TBS)	1,5M NaCl, 100mM Tris, pH 7,6
Tris-buffered Saline (TBS) + Tween	1x TBS + 0,1% Vol. Tween 20
Western-Blot-Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glyzin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3

2.1.3. MicroBeads

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten MicroBeads

MicroBeads	Hersteller
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.1.4. Antikörper

Tabelle 2.4: Liste der genutzten Antikörper

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller
Penta-His Alexa Fluor 488	IgG1	-	Qiagen
Anti-IFN- γ (FITC)	IgG1	AN 18.17.24	Miltenyi Biotec
IgG1-Isotypkontrolle (FITC)	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter
IgG1-Isotypkontrolle (PE)	IgG1	679.1Mc7	Beckmann Coulter
CD3 (PC5)	IgG1	KCHT1	Beckmann Coulter
CD3 (PC7)	IgG1	UCHT1	Beckmann Coulter
CD4 (PE)	IgG1	13B8.2	Beckmann Coulter
CD8 (PE)	IgG1	B9.11	Beckmann Coulter
CD8 (PC5)	IgG1	SFCI21Thy2D3	Beckmann Coulter
CD14 (FITC)	IgG2a	RM052	Beckmann Coulter
CD20 (PC5)	IgG1	3G8	Beckmann Coulter
CD45 (FITC)	IgG1	J.33	Beckmann Coulter
CD64 (FITC)	IgG1	22	Beckmann Coulter
CD80 (PE)	IgG2k	16-10A1	Beckmann Coulter
CD83 (FITC)	IgG1 κ	HB15E	BD Biosciences
CD83 (PE)	IgG1 κ	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. Peptide

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Peptide

Name	Hersteller
PepTivator (CMV pp65 Peptidgemisch)	Miltenyi Biotec

2.1.6. Vektoren

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Vektoren

Vektor	Hersteller
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾	Invitrogen
pCR4-TOPO	Invitrogen
pSecTag2/Hygro B	Invitrogen

In dem für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Ausgangsvektor „pSecTag2 IgG1-FcKO-HM1.24“ liegt bereits eine cDNA vor, die für ein Derivat des Fc-Teils eines humanen IgG1-Antikörpers kodiert. Es handelt sich hierbei um die Knockout-(KO)-Variante des IgG1-Fc-Teils, welche keine Bindungsaffinität für humane Fc-Rezeptoren mehr aufweist.

2.1.7. cDNA

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten cDNA

cDNA	Herkunft
CD64	Zur Verfügung gestellt von M. Peipp
CD89	Zur Verfügung gestellt von M. Peipp
CD205	Zur Verfügung gestellt von D. Dudziak
CD209	Zur Verfügung gestellt von M. Staudinger

2.1.8. Primer

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Primer

Beschreibung	Sequenz
CD209 5'	GAAGCTTATGAGTGACTCCAAGGAACCAAGAC
CD209 3'	TCTAGACTACGCAGGAGGGGGTTTGGGGTGGCG

2.1.9. Bakterienstämme

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Lieferant
One Shot Mach1-T1 ^R	Invitrogen

2.1.10. Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs bezogen.

2.1.11. Zelllinien

Tabelle 2.10: Auflistung der genutzten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
CD64 ⁺ BHK-21	Baby Hamster Kidney	Zur Verfügung gestellt von M. Peipp
CD89 ⁺ BHK-21	Baby Hamster Kidney	(Guettinger 2010)
CD205 ⁺ CHO	Chinese Hamster Ovary	Zur Verfügung gestellt von D. Dudziak
CD209 ⁺ CHO	Human Embryonic Kidney	Eigene Herstellung
Raji	Humane Burkitt-Lymphom-Zellen	DSMZ
HEK293T	Human Embryonic Kidney	

2.1.12. Kulturmedien

Tabelle 2.11: Liste der verwendeten Kulturmedien

Bezeichnung	Hersteller	Verwendet für
2x YT Agar	Carl Roth	One Shot Mach1-T1R
2x YT Medium	Carl Roth	One Shot Mach1-T1R
CellGro DC Medium	CellGenix	PBMC, DZ
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% Kälberserum	Invitrogen	HEK293T
MACS Mo-DC Differentiation Medium	Miltenyi Biotec	Monozyten, DZ
RPMI 1640 + 10% Kälberserum	Invitrogen	Raji

2.1.13. Kits

Tabelle 2.12: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
Experion Pro260 Analysis Kit	Bio-Rad
NucleoBond Xtra Maxi	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin Extract II	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin Plasmid QuickPure	MACHEREY-NAGEL
QIAGEN LongRange 2Step RT-PCR	Qiagen

Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche
SuperSignal West Dura Extended Duration Chemiluminescent	Thermo Fisher Scientific
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec

2.1.14. Sonstige Materialien

Tabelle 2.13: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien

Bezeichnung	Hersteller
MACS LS Column	Miltenyi Biotec
CaptureSelect LC Kappa (Hu) Affinity Matrix	Life Technologies
POROS CaptureSelect LC Kappa Chromatography Column	Life Technologies
Vivaspin	Sartorius
Erweiterter 100bp-Marker	Carl ROTH

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits von QIAGEN nach Herstelleranweisung.

2.2.2. Reverse Transkription isolierter RNA

Für die reverse Transkription wurde das LongRange-2Step-RT-PCR-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.3. Klonierung nach PCR

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kits for Sequencing (Life Technologies) nach Protokoll des Herstellers.

2.2.4. Restriktionsverdau von DNA

Zu etwa 2µg Plasmid-DNA wurden 1µl Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) und 2µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers gegeben und mit

destilliertem Wasser auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die anschließende Inkubation erfolgte je nach Enzym nach Herstellerempfehlung bei entweder 37°C oder 50°C für mindestens 30 Minuten.

2.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die Proben wurden mit 6x-Gelladepuffer versehen. Anschließend wurden diese parallel mit einer 100bp-DNA-Leiter auf ein 1%-iges Agarosegel gegeben. Als Laufpuffer diente 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer. Die DNA wurde bei einer Spannung von 80-120V für etwa 60 Minuten aufgetrennt. Dann folgte für etwa 15 Minuten eine Färbung im Ethidiumbromidbad. Die Dokumentation erfolgte mit der Gel-Dokumentationsanlage E.A.S.Y. 440 K (Herolab).

2.2.6. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Nach der Agarosegelelektrophorese wurde das Fragment passender Größe mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gelstück ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurde dann das NucleoSpin-Extract-II-Kit der MACHEREY-NAGEL nach Herstelleranweisung verwendet.

2.2.7. Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA Fragmenten wurde die T4-Ligase (Roche) nach Herstelleranweisung genutzt. Durch Behandlung des Vektors mit einer alkalischen Phosphatase („shrimps alkaline phosphatase“, Roche) wurde, wenn notwendig, die Re-Ligation des Vektors verhindert.

2.2.8. Transformation von Plasmid-DNA

2.2.8.1. Transformation mit salzfreier Plasmid-DNA

Zunächst wurden 2µl der Plasmid-DNA zu 50µl elektrisch kompetenter One-Shot-Mach1-T1^R *Escherichia coli* (Life Technologies) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Elektroporation und Zugabe von 250µl SOC-Medium. 25, 50 und 225µl Suspension wurden auf je eine vorgewärmte 2xYT-Agarplatte mit dem zur im Vektor vorhandenen Resistenz passendem Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8.2. Transformation mit salzhaltiger Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden chemisch kompetente One-Shot-Mach1-T1^R-*Escherichia coli* (Life Technologies) verwendet. Zu 50µl dieser Bakterien wurde 2µl Plasmid-DNA gegeben. Das Gemisch wurde für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C. Nach kurzem Abkühlen auf Eis und Zugabe von 250µl SOC-Medium wurden unterschiedliche Volumina auf das Selektionsmedium (vgl. 2.2.8.1) ausplattiert.

2.2.9. Plasmid-Präparation

Im Anschluss an die Anzucht plasmidtragender Klone auf Agarplatten wurde je eine Kolonie der transformierten Bakterien in entweder 2 ml oder 200 ml 2xYT-Flüssigmedium weiter kultiviert. Entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln.

Zur Gewinnung der Plasmide wurde entweder das „NucleoSpin-Plasmid-QuickPure-Kit“ für 2-ml-Kulturen oder das „NucleoBond-Xtra-Maxi-Kit“ für 200-ml-Kulturen nach Herstelleranweisung verwendet (MACHEREY-NAGEL).

2.2.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch das Zentrum Molekulare Biowissenschaften (ZMB) der Universität Kiel nach deren Vorgaben.

2.2.11. Anreicherung von rekombinanten Antikörpern aus Zellkulturmedium

Zunächst wurde der Zellkulturüberstand durch mehrmalige Zentrifugation und anschließende Filtration (Porengröße 0,22µm) von Zellresten befreit. Es folgte die Anreicherung des Proteins ausgehend von ca. 2 l Überstand durch Affinitätschromatografie mit Hilfe der „CaptureSelect LC-kappa (Hu) Affinity Matrix“ (Thermo Fisher).

Dazu wurde nach ca. 16h Inkubation unter ständigem Rühren bei 4°C die Matrix durch Zentrifugation aus der Suspension angereichert. Nach Waschen bei neutralem pH wurde zur Elution des gebundenen Proteins ein 0,1 M Glycin-Puffer mit pH 2 nach Angabe des Herstellers der Matrix verwendet.

2.2.12. Aufkonzentrierung von Antikörpern

Zur Aufkonzentrierung von bereits gereinigten Antikörpern wurden Vivaspin-Zentrifugationseinheiten der Firma Sartorius nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.13. Quantifizierung von Antikörpern

Die Antikörpermenge wurde mit Hilfe des Experion-Pro260-Analysis-Kits der Firma Bio-Rad nach Herstelleranweisung bestimmt.

2.2.14. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Vi-CELL von Beckman Coulter ermittelt.

2.2.15. Isolierung von Zellen

2.2.15.1. Isolierung mononukleärer Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) aus humanem Blut

Zunächst wurde ein Buffy-Coat (50ml) mit PBS auf 200ml verdünnt. Es folgte zur Isolierung der Leukozyten eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque PLUS (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer). Dazu wurden je 25ml verdünnter Buffy-Coat vorsichtig auf 15ml Ficoll „geschichtet“ und anschließend für 10 Minuten bei 2000 U/Min, Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Die abpipettierten Leukozyten wurden anschließend noch zur Entfernung der Thrombozyten mehrmalig mit PBS gewaschen.

Die Buffy-Coats wurden aus Blut freiwilliger gesunder Spender am Institut für Transfusionsmedizin Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein gewonnen.

2.2.15.2. Isolierung von Monozyten

Die Isolierung von Monozyten erfolgte mit Hilfe von CD14-MicroBeads von Miltenyi Biotec nach Herstelleranweisung.

2.2.16. Transfektion von HEK293T-Zellen

2.2.16.1. Transfektion mit Hilfe von Liposomen

Für die Transfektion wurde „Lipofectamine LTX & PLUS Reagent“ der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.16.2. Kalziumphosphat-Transfektion

Auf 100mm-Platten wurden je etwa 6×10^6 HEK293T-Zellen gegeben. Nach etwa 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und 8ml neues Medium auf jede Platte gegeben. Pro Platte wurden dann 20 μ g DNA, 100 μ l (2,5M) CaCl₂ und 5 μ l (100mM) Chloroquin zusammengemischt und mit destilliertem Wasser auf 1ml aufgefüllt. Anschließend wurde in einem 15ml Falcon-Röhrchen Luft durch 1ml 2xHBS gepumpt, und die DNA-CaCl₂-Chloroquin-Lösung tröpfchenweise hinzu pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Mischung auf die Zellen getropft.

Nach 9 bis 10 Stunden wurde das Medium ausgetauscht. An den darauffolgenden Tagen wurde täglich der Überstand abgenommen und frisches Medium zu den Zellen gegeben, bis sich diese von der Platte lösten.

2.2.17. Kryokonservierung von Zellen

2.2.17.1. Kryokonservierung von Dendritischen Zellen und T-Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Dendritischen Zellen oder T-Zellen zunächst gezählt und dann je 10^7 Zellen in 1 ml DZ-Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Einfrierröhrchen pipettiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß (Qualifreezer, Nalgene) bei -80°C gefroren.

2.2.17.2. Kryokonservierung von HEK293T-Zellen

Die Kryokonservierung der HEK293-Zellen erfolgte nach 2.2.17.1. in HEK-Einfriermedium (80% DMEM, 10%DMSO, 10%FCS).

2.2.18. Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen

Für die Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen wurden die Monozyten in „CellGro DC Medium“ (Cellgenix) aufgenommen. Zu Letzterem wurden 800 U/ml GM-CSF plus 500 U/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF plus 1000 U/ml IFN- α oder 1000 U/ml IFN- β plus 500 U/ml IL-3 gegeben. In diesen Medien erfolgte eine Inkubation bei 37°C für sieben Tage. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert.

2.2.19. Aktivierung und Expansion CMV-spezifischer T-Zellen

Zur Beladung der Dendritischen Zellen mit Antigen wurden 10^6 MoDZ mit 10 μ l PepTivator (Miltenyi Biotech) für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Induktion der Zellreifung folgte die Zugabe von je 1 μ l/ml IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF- α (10 ng/ml)

und PGE₂ (1 µg/ml). Nach einem Tag wurde je eine Probe zur Analyse der T-Zell-Aktivierung kryokonserviert. Zur T-Zell-Stimulation wurden 1x10⁶ Antigen-beladene, gereifte Dendritische Zellen zu 10⁷ T-Zellen gegeben. Nach einer Inkubation über 6 Tage bei 37°C erfolgte die Analyse.

2.2.20. Durchflusszytometrische Messung der spezifischen Bindung eines Antikörpers

Im ersten Schritt wurden etwa 300.000 Zellen in 100µl PBS aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an Primärantikörper für 20 Minuten bei 4°C. Bei erforderlichem Sekundärantikörper erfolgten einmaliges Waschen mit PBS und Zugabe desselben für erneut 20 Minuten bei 4°C. Danach wurde 1ml PBS zu der Zellsuspension gegeben. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mittels Epics, FC 500 oder Navios (Beckman Coulter).

Bei indirekter Immunfluoreszenz wurde eine Zellprobe als Negativkontrolle mit einem irrelevanten Antikörper inkubiert. Bei direkt gekoppelten Primärantikörpern wurde eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt.

2.2.21. Durchflusszytometrische Messung der T-Zellaktivierung

Zur Messung der T-Zellaktivierung wurden 1x10⁶ Antigen-beladene Dendritische Zellen mit antigenstimulierten T-Zellen co-inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 1µl/ml Brefeldin. Nach weiteren 3 Stunden Co-Kultur folgte die Färbung der Zellen mit direkt gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD69 über 15 Minuten. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen unter Verwendung des Inside-Stain-Kits (Miltenyi Biotec) nach Herstellerprotokoll fixiert. Zur Färbung des intrazellulären Interferon γ wurden die Zellen mit dem Insideperm-Puffer des Kits permeabilisiert und mit dem Interferon- γ -Antikörper nach Herstellerangaben in Insideperm-Puffer für 20 Minuten inkubiert. Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer erfolgte anschließend in Insideperm-Puffer.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung von Fusionsproteinen aus einem Tumorantigen und rekombinanter Fc-Rezeptor-Knockout-Derivate humaner IgG1-Antikörper. Die gewählten Antikörper sind gegen Rezeptoren gerichtet, die eine Endozytose des gebundenen Antigen-Antikörper-Fusionsproteins in Dendritische Zellen ermöglichen sollten, so dass im Anschluss an die Degradation des in die Zelle aufgenommenen Tumor-Antigens die Präsentation der Tumor-Antigen-Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen erfolgen sollte (siehe Abbildung 3.1).

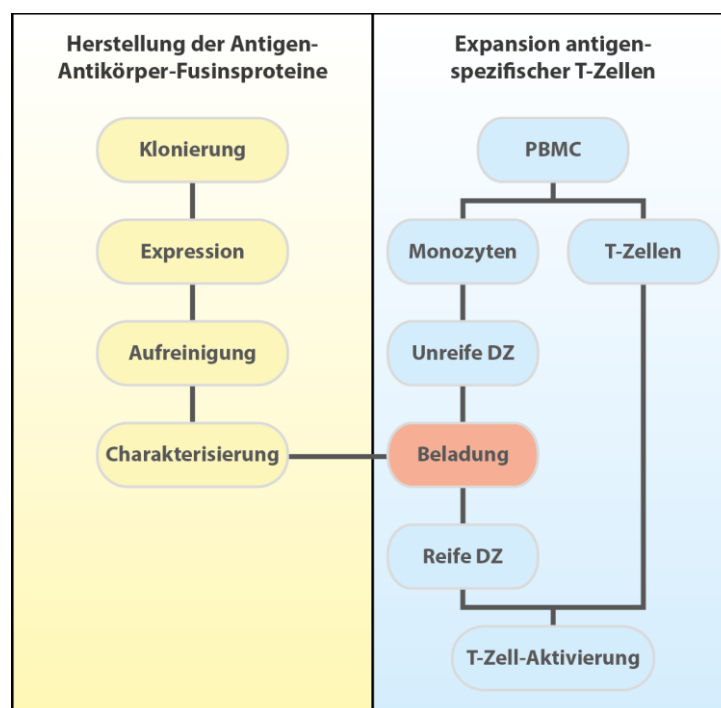


Abb. 3.1: Übersicht der notwendigen Schritte zur Herstellung der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine, zur Herstellung, Reifung und Beladung Dendritischer Zellen sowie zur T-Zell-Aktivierung

3.1. Herstellung der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine

3.1.1. Aufbau des Antikörpers

Während die konstanten Regionen eines Antikörpers für die Induktion der indirekten Wirkmechanismen, d. h. die Rekrutierung von Komplement und Effektorzellen verantwortlich sind, bestimmen die variablen Regionen die Bindungselektivität und Bindungsaktivität des Antikörpers zu seinem Antigen.

Zur Konstruktion von Antikörperderivaten kann die genetische Information für die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette eines Antikörpers derart neu kombiniert werden, dass die beiden variablen Domänen des Antikörpers über einen Linker miteinander verbunden sind. Solch ein einzelsträngiges variables Fragment (scFv, single chain fragment variable) kann mit dem Fc-Teil eines Antikörpers kombiniert werden, um einen rekombinanten scFv-Mini-Antikörper zu erhalten (siehe Abbildung 3.2). Die Bindungsselektivität des Mini-Antikörpers sollte hierbei dem des parentalen Antikörpers entsprechen. Da die für die beiden variablen Domänen kodierenden Bereiche in der scFv-Sequenz auf einem Plasmid vorliegen, entfällt die Notwendigkeit einer Co-Transfektion von schwerer und leichter Kette.

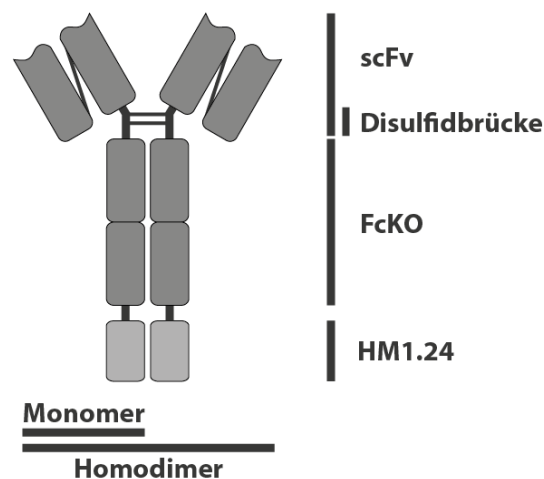


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau der Antigen-Antikörper-Fusionsproteine

Die jeweiligen scFv-Anteile wurden mit einem modifizierten Fc-Teil fusioniert. Die in die Sequenz des Fc-Teils eingeführten Mutationen führen zu je einem Aminosäureaustausch an drei Positionen. Hierdurch wird die Bindungsaktivität des Fc-Teils zu Fc-Rezeptoren vermindert (FcKO, Oganesyanyan 2008). Ohne eine solche Veränderung würde die selektive Adressierung der Endozytoserezeptoren CD89, CD205 und CD209 mit der Endozytose über den hochaffinen Rezeptor für IgG (CD64) interferieren. Zudem verhindert der Aminosäureaustausch die Induktion der Antikörper-abhängigen, Zell-vermittelten sowie der Komplement-vermittelten Zytotoxizität, so dass es nicht zu einer Lyse der Dendritischen Zellen nach Bindung des Antikörpers kommen kann.

Zur Beladung der Zielzellen wurde der scFv-Miniantikörper N-terminal mit dem Modell-Tumorantigen HM1.24 fusioniert. Hierzu wurden ausschließlich die extrazellulären, d. h. hydrophilen Anteile des HM1.24 kloniert. Innerhalb der verwendeten Sequenz liegen drei für Cystein kodierende Bereiche. Um eine Di- bzw. Multimerisierung des HM1.24 Anteils im rekombinanten Protein auszuschließen, wurden die entsprechenden Triplets durch eine gerichtete Mutagenese eliminiert. Das Fusionskonstrukt aus dem humanen FcKO-Anteil und dem mutagenisierten HM1.24 wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Klonierung

Ausgangspunkt für die Herstellung der chimären Mini-Antikörper war der Vektor pSecTag2/Hygro B (Invitrogen). Dieser Vektor erlaubt die Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen sowie die Etablierung stabiler Transfektanden auf Basis des Hygromycin-Resistenzgens.



Abb. 3.3: Schematische Darstellung der DNA des vollständigen Antikörpermoleküls

Im 3'-Bereich liegt die für das Modell-Antigen HM1.24 kodierende cDNA vor (siehe Abb. 3.3). Dieses Konstrukt ermöglicht die Expression des Tumor-Antigens als C-terminale Fusion mit dem chimären FcKO-Mini-Antikörper. Zur selektiven Adressierung der Endozytoserezeptoren auf humanen Dendritischen Zellen wurden die Fc-Rezeptoren CD64 (FcγRI) und CD89 (FcαR) sowie die Lektin-Rezeptoren CD205 (DEC-205) und CD209 (DC-SIGN) ausgewählt.

Für die Generierung der Mini-Antikörper lagen cDNAs vor, die für die entsprechenden Bindungsdomänen der Antikörper in Form eines scFv (single chain fragment variable) kodieren. Hierbei sind die variablen Bereiche der schweren (VH) und leichten (VL) Kette des jeweiligen Antikörpers über einen Linker auf einem cDNA-Strang miteinander verknüpft. Dies erlaubt die Fusion des scFv mit dem Fc-Teil eines IgG1 zu einem scFv-Mini-Antikörper.

Sowohl die CD64-, CD89-, CD205- und CD209-scFv-Anteile als auch der Ausgangsvektor weisen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *SfiI* auf. Diese

Schnittstelle erlaubt eine gerichtete Klonierung der jeweiligen scFv-cDNA in den 5'-Bereich des IgG1-FcKO-Bereichs. Um die jeweiligen scFv-Fragmente in den Vektor einzubringen, wurde dieser ebenso wie die scFv-enthaltenden Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I hydrolysiert. Das Hydrolyseprodukt sowie die scFv-Anteile wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nachfolgend durch Extraktion aus dem Agarosegel gewonnen (siehe Abb. 3.4).

Anschließend wurden die jeweiligen scFv-Anteile mit dem Vektor ligiert. Nach der Transformation von *E. coli* erfolgte die Selektion potentieller Klone auf Ampicillin-haltigem Nährmedium, da der Klonierungsvektor eine Ampicillin-Resistenz vermittelt.

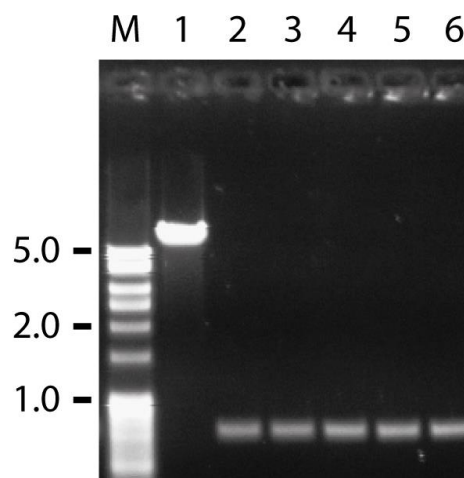


Abb. 3.4: Mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I geschnittener Vektor "pSecTag2/Hygro B" mit FcKO und HM1.24 sowie scFv-Inserts

M: Marker; 1: *Sfi*I-geschnittener Vektor "pSecTag2/Hygro B" mit FcKO und HM1.24; 2: Kontrolle; 3: CD64 scFv; 4: CD89 scFv; 5: CD205 scFv; 6: CD209 scFv.

Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

3.1.3. Charakterisierung potentieller Klone

Nach der Präparation sollte die Plasmid-DNA an dieser Stelle den schematischen Darstellungen in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.5 entsprechen. Zum Nachweis des scFv-Fragments sowie zur Auswahl eines für die Expression geeigneten Plasmids wurden die Konstrukte erneut mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I hydrolysiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Hydrolyse-Produkte zeigt für jedes Plasmid eine Bande mit einer Größe von mehr als 5 kb, was dem Vektor-Anteil entspricht sowie eine Bande bei 800 bp, was in der Größe dem eingefügten scFv-Anteil entspricht (vgl. Abb. 3.6).

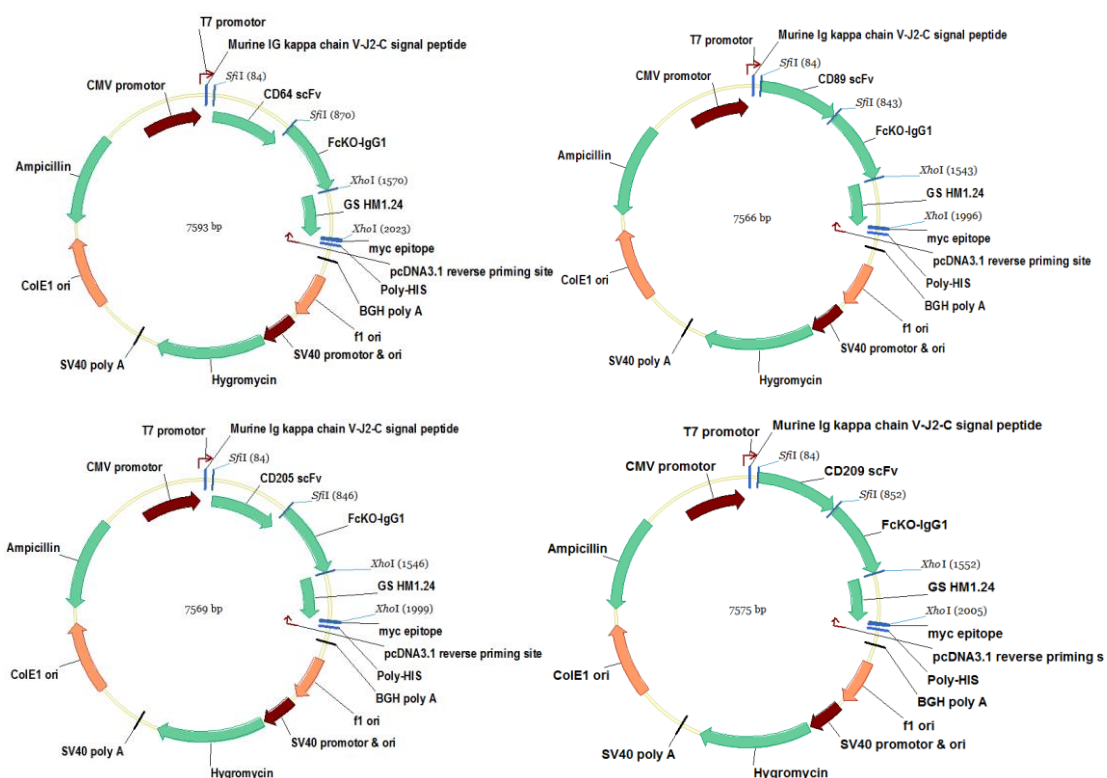


Abb. 3.5: Plasmidkarten des pSecTag2/Hygro B mit FcKO-IgG1, HM1.24 und scFv-Insert

Zum Nachweis des HM1.24-Anteils erfolgte zudem eine Hydrolyse mit *Xho*I. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Hydrolyseprodukte zeigt neben der Vektor-Bande (>5 kb) eine Bande mit einer Größe von knapp 500 bp, was der erwarteten Größe der hydrolysierten HM1.24-cDNA entspricht (vgl. Abb. 3.7).

Um die Identität der Konstrukte zu belegen, wurde eine Sequenzierung vorgenommen. So konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden CD64-, CD89-, CD205- und CD209-Anteile in den Plasmiden in Fusion mit dem FcKO-HM1.24-Anteil

vorliegen. Damit standen alle für die nachfolgende Expression notwendigen Konstrukte zur Verfügung.

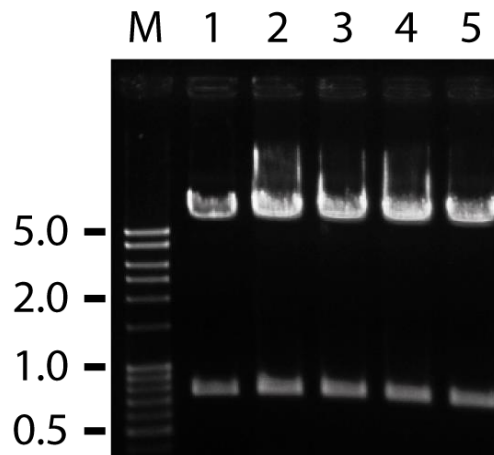


Abb. 3.6: Nachweis der Insertion der scFv-Kassette durch Hydrolyse der erhaltenen scFv-FcKO-HM1.24-Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I

M: Marker; 1: Kontrolle; 2: CD64 scFv FcKO HM1.24; 3: CD89 scFv FcKO HM1.24; 4: CD205 scFv FcKO HM1.24; 5: CD209 scFv FcKO HM1.24.

Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

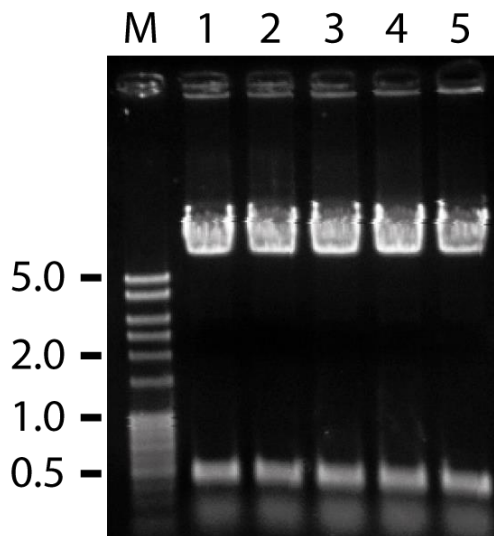


Abb. 3.7: Nachweis von HM1.24 in den erhaltenen scFv FcKO HM1.24 Konstrukten durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Xho*I

M: Marker; 1: Kontrolle; 2: CD64 scFv FcKO HM1.24; 3: CD89 scFv FcKO HM1.24; 4: CD205 scFv FcKO HM1.24; 5: CD209 scFv FcKO HM1.24.

Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

3.1.4. Expression und Anreicherung der rekombinanten scFv-Miniantikörper

Die Expression der vier Konstrukte erfolgte in eukaryotischen HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney) nach transienter Transfektion. Eukaryotische Zellen wurden gewählt, um posttranslationale Modifikationen, wie die Homodimerisierung durch Bildung einer Disulfidbrücke und die Glykosylierung der Proteine, zu ermöglichen.

Die Anreicherung der scFv-Mini-Antikörper erfolgte ausgehend von dem über eine Woche gesammelten Zellkulturüberstand der transient transfizierten HEK-Zellen durch Affinitätschromatographie unter Verwendung einer anti-k-Matrix. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen der Matrix mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei neutralem pH-Wert entfernt. Die Elution der gebundenen scFv-Mini-Antikörper erfolgte durch Senkung des pH-Wertes auf 3,0.

3.1.5. Quantitative Charakterisierung

Zur Beurteilung der Reinheit und zur Quantifizierung wurden die mittels Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfractionen mit Hilfe des Experion-Pro260-Analysis-Kits (Bio-Rad) gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abbildung 3.8). Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Dies ermöglicht eine Aussage über das Vorliegen der die beiden Monomere verbindenden Disulfidbrücken. Die Analyse zeigte jeweils nur eine Bande in der Größe von 140 kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht der homodimeren Antikörper-Derivate entspricht. Verunreinigungen können ebenso wie multimere Proteine ausgeschlossen werden.

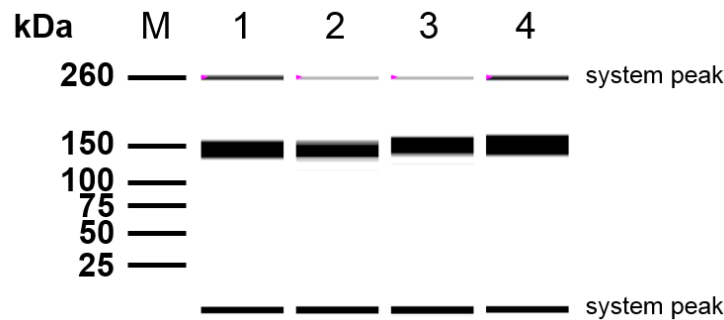


Abb. 3.8: Automatisierte chromatographische Charakterisierung der rekombinanten Proteine zur Beurteilung von Reinheit und Qualität sowie zur Bestimmung der erhaltenen Menge

M: Marker; 1: CD64 scFv FcKO; 2: CD89 scFv FcKO; 3: CD205 scFv FcKO; 4: CD209 scFv FcKO. Die Auftrennung erfolgte mittels automatisierter Elektrophorese mit Hilfe des „Experion Automated Electrophoresis System“ der Firma Bio-Rad.

3.2. Bindungsnachweis auf transgenen Zellen

Nachdem die rekombinanten Fusionsproteine aus Antikörper-Derivat und dem Tumor-Antigen HM1.24 erfolgreich exprimiert und mittels Affinitätschromatographie zur Homogenität angereichert werden konnten und diese quantitativ charakterisiert waren, sollte nachfolgend eine qualitative, d. h. funktionelle Analyse der Moleküle erfolgen. Um die selektive Bindung der Fusionskonstrukte an die Endozytoserezeptoren CD64, CD89, CD205 und CD209 nachzuweisen, wurden Zielzellen eingesetzt, welche die jeweiligen Rezeptoren als rekombinante Moleküle exprimieren. Während CD64- und CD89-exprimierende BHK-Zelllinien bereits im Labor etabliert waren, wurde eine CD205-transgene CHO-Linie freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis der Bindung des gegen CD209 gerichteten Fusionsproteins musste hingegen zunächst eine entsprechend CD209 transgen exprimierende Zelllinie generiert werden.

3.2.1. Herstellung einer CD209-exprimierenden CHO-Zelllinie

Die Klonierung des Lektin-Rezeptors DC-SIGN (CD209) erfolgte durch Amplifikation der 1214 bp großen CD209-cDNA mittels RT-PCR ausgehend von RNA, die aus Monozyten isoliert wurde. Grundlage für das Design der Primer war die publizierte mRNA-Sequenz (NCBI-Referenz NM_021155.3). Durch die Primer sollten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *HindIII* im 5'-Bereich und *XbaI* im 3'-Bereich in die cDNA eingefügt werden. Dies ermöglicht im Anschluss an eine Zwischenklonierung des RT-PCR-Produkts die gerichtete Klonierung der CD209-

cDNA in den ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen hydrolysierten Expressionsvektor „pcDNA 3.1(+)“ (Invitrogen). Der verwendete Vektor „pcDNA 3.1(+)“ erlaubt die Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen aufgrund eines CMV-Promotors. Mit Hilfe des Neomycin-Resistenzgens können zudem stabile Transfektanten etabliert werden.

Mittels RT-PCR konnte ein ca. 1200 bp großes Fragment amplifiziert werden, wie nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ersichtlich wurde (vgl. Abb. 3.9, Spur 4). Die Kontrolle ohne Zugabe der Reversen-Transkriptase ergab kein PCR-Produkt (vgl. Abb. 3.9, Spur 3), so dass tatsächlich eine amplifizierte cDNA vorliegt.

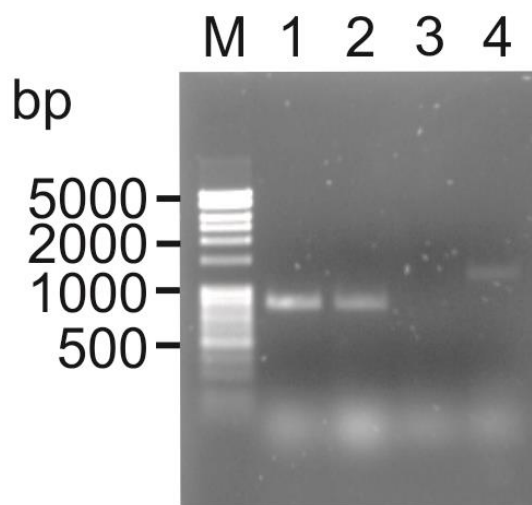


Abb. 3.9: RT-PCR zur Amplifikation der CD209 cDNA

M: Marker; 1 und 2: Kontrollen; 3: PCR-Kontrolle ohne reverse Transkription zum Nachweis von DNA-Kontaminanten; 4: cDNA.

Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

Die cDNA wurde aus dem Gel eluiert und nachfolgend mittels Topo-TA-Cloning-Kit (Invitrogen) in den 3,9 kb großen Vektor „pCR TOPO“ eingebracht. Im Anschluss an die Transformation von *E. coli* wurde Plasmid-DNA von potentiellen Klonen isoliert. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der mit *HindIII/XbaI*-hydrolysierten Plasmid-DNA zeigt, dass bei zwei Klonen Banden mit einer Größe von ca. 4000 bp sowie 1200 bp vorliegen (vgl. Abb. 3.10). Dieses Restriktionsmuster entspricht den erwarteten Fragmentgrößen, wenn das inserierte CD209-Fragment und der Vektoranteil durch die Hydrolyse voneinander separiert werden. Anschließend wurden positive Klone einer Sequenzierung des inserierten Fragments unterzogen. Bei einem der Klone konnte so belegt werden, dass keine durch die RT-PCR bedingten Mutationen in der

Sequenz vorlagen. Dieser Klon wurde nachfolgend für die Umklonierung des CD209-cDNA Fragments in den Vektor „pcDNA 3.1(+)" verwendet.

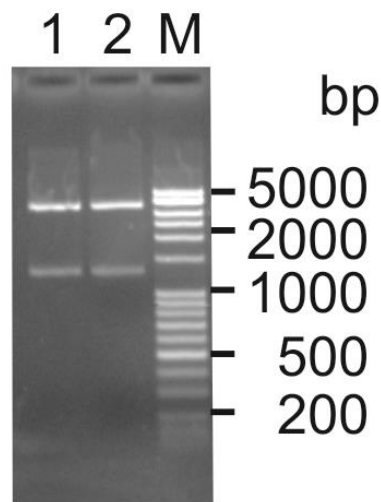


Abb. 3.10: Nachweis des Inserts nach Klonierung der CD209-cDNA mittels TA-Cloning-Kit
M: Marker; 1 und 2: Bei gut 1,2kbp potentielle Klone. Die zweite Bande ist der Klonierungsvektor.
Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

Im Anschluss an die Hydrolyse des Plasmids mittels *Hind*III und *Xba*I wurden der Anteil des Vektors und das inserierte CD209-cDNA-Fragment gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das aus dem Gel eluierte CD209-Fragment konnte dann mit dem *Hind*III- und *Xba*I-hydrolysierten Vektor „pcDNA 3.1(+)" mittels T4-Ligase ligiert werden. Plasmide der nach Transformation von *E. coli* erhaltenen potentiellen Klone wurden durch eine Hydrolyse mit *Hind*III und *Xba*I hinsichtlich des inserierten CD209-Fragments analysiert. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung der Hydrolyse-Produkte konnte ein Fragment mit einer Größe von über 5 kb sowie ein ca. 1200 bp großes Produkt detektiert werden (vgl. Abb. 3.11). Demnach könnte die CD209-cDNA in allen analysierten Klonen in dem Expressionsvektor vorliegen. Eine Sequenzierung der einzelnen Klone bestätigte dieses. Somit lag der für die Generierung einer rekombinant CD209-exprimierenden Zelllinie benötigte Expressionvektor vor.

Die Expression der CD209-Plasmide erfolgte in eukaryotischen CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary). Zur Etablierung stabiler Linien wurde Neomycin als Selektionsmarker verwendet. Die Expression des CD209 auf der Zelloberfläche potentieller Transfektanden wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung kommerziell

erhältlicher fluoreszenzgekoppelter CD209-Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 3.12).

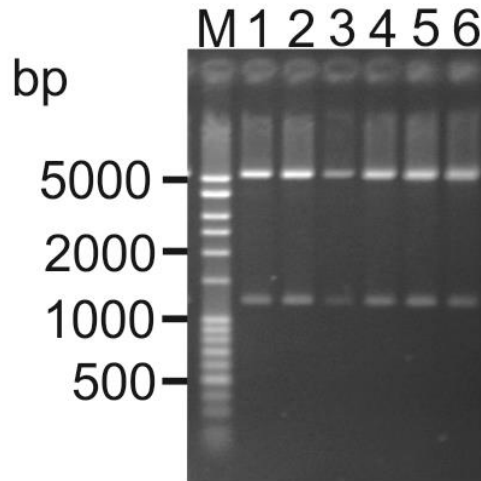


Abb. 3.11: Nachweis von CD209 in den erhaltenen Konstrukten durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI*

M: Marker; Spur 1 bis 6: Sechs unabhängige potentielle Klone.

Die Trennung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

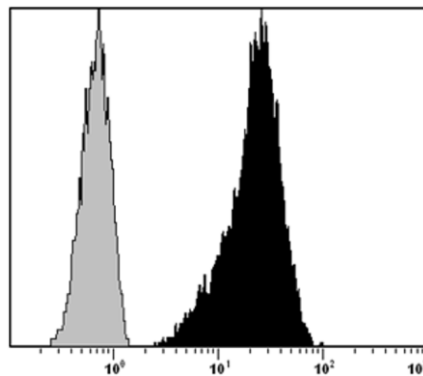


Abb. 3.12: Durchflusszytometrischer Nachweis der CD-209-Expression auf den mit dem CD209-cDNA-Konstrukt transfizierten CHO-Zellen

Grau: Isotyp-Kontrolle; Schwarz: Nachweis von CD209 mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen CD209-PE-Antikörpers (Beckmann Coulter).

3.2.2. Nachweis der Bindungsselektivität und -aktivität

Die Bindungsaktivität wurde durch Inkubation der Antikörper mit Zellen untersucht, welche das jeweilige Antigen exprimieren. Als Kontrolle und zum Nachweis der Bindungsselektivität dienten Antigen-negative Zellen. Als Zelllinien wurden für CD64 und CD89 antigen-positive BHK-21- (Baby Hamster Kidney), für CD205 und CD209 Antigen-positive CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) verwendet. Die Detektion der Bindung erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe eines gegen den humanen Fc-Teil gerichteten FITC-gekoppelten Antikörpers. Es konnte dabei für alle vier Antikörper eine dosisabhängige spezifische Bindung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13). Der CD64-scFv Miniantikörper weist eine relativ gute Bindungsaktivität auf (EC₅₀ 0,72 µg/ml). Die halbmaximale Bindung des CD209-gerichteten Moleküls erfolgt bei einer Konzentration des scFv-Miniantikörpers von 3,9 µg/ml. Dem gegenüber zeigen die CD89-scFv und CD205-scFv Konstrukte nur eine vergleichbar schwache Bindungsaktivität (EC₅₀ 12,4 µg/ml bzw. 11,2 µg/ml).

3.3. Nachweis der Expression der Zielrezeptoren auf Dendritischen Zellen

Nachdem humane Dendritische Zellen in nur geringem Umfang aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert werden können, wurden Zellpopulationen ausgehend von Monozyten generiert, die einen Phänotyp ähnlich dem der Dendritischen Zellen aufweisen. Die Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen erfolgt hierbei durch Kultur in Medium, dem unterschiedliche Zytokine zugegeben wurden. Die mehrtägige Kultur der Monozyten in Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) stellt hierbei den Standard für die Differenzierung dar. Darüber hinaus kann eine Population von DZ-ähnlichen Zellen aber auch durch die Zugabe von Interferon- α (IFN- α) und GM-CSF oder aber IFN- β und IL-3 erhalten werden.

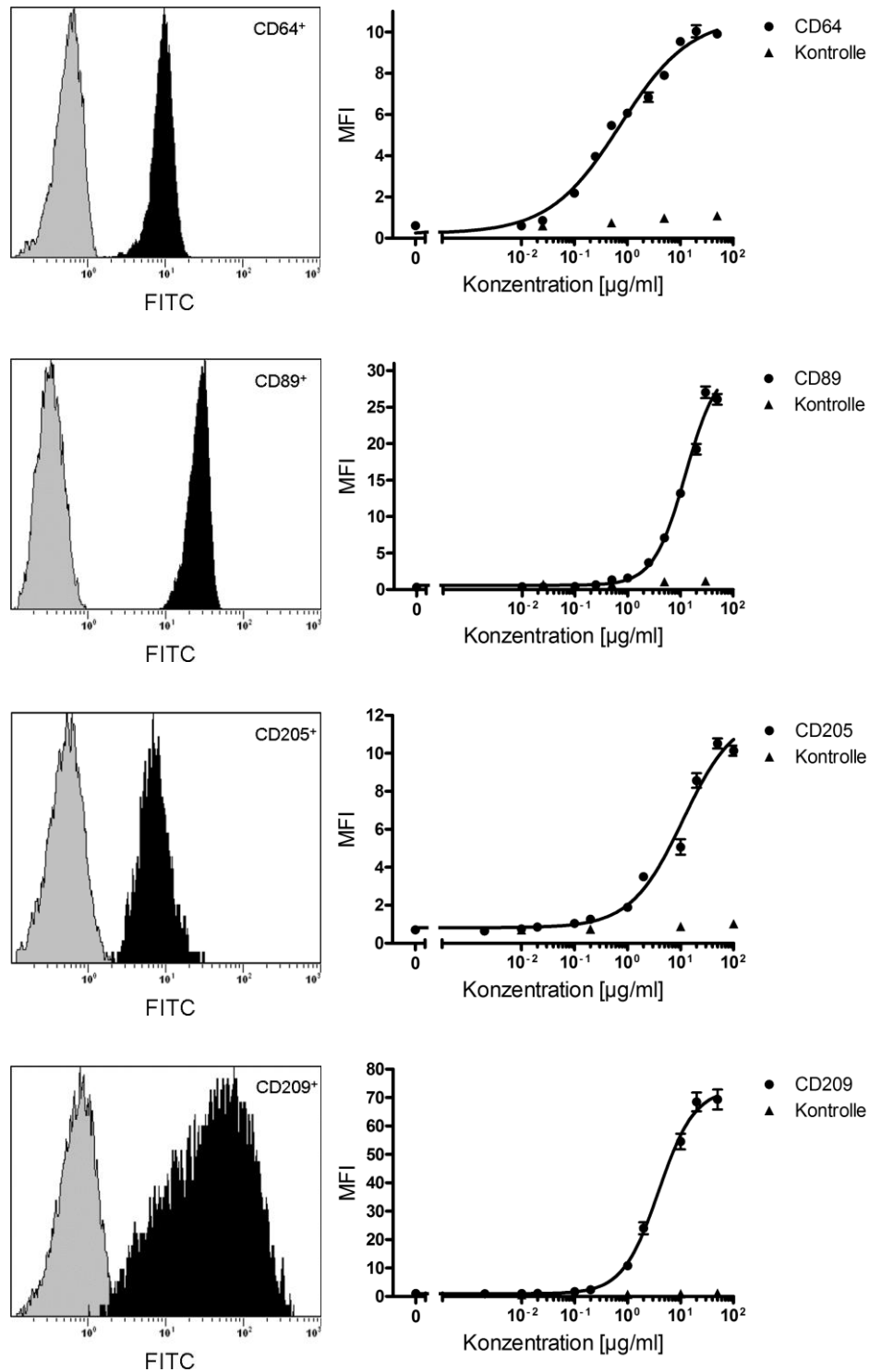


Abb. 3.13: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität und -selektivität der aufgereinigten Antigen-Antikörper-Fusionsproteine

Zum Nachweis der dosisabhängigen Bindung der rekombinanten scFv-Antigen-Fusionsmoleküle wurden transgene Zelllinien (CD64⁺ BHK-21, CD89⁺ BHK-21; CD205⁺ CHO; CD209⁺ CHO) sowie untransfizierte Zellen als Kontrollen verwendet. Die Detektion der Moleküle erfolgte durchflusszytometrisch mit einem gegen den Fc-Teil gerichteten Fluorescein-gekoppelten Antikörper.

Links: Grau: Isotyp-Kontrolle; Schwarz: Detektion des rekombinanten Moleküls bei maximaler Konzentration (Abbildung rechts). **Rechts:** Dosisabhängige Bindung an Antigen-positive Zellen (Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten).

Notwendige Voraussetzung für die Adressierung der gewählten Endozytose-rezeptoren ist die selektive Expression dieser Marker auf den Zytokin-gereiften Zielzellen, d. h. auf den aus Monozyten differenzierten Zellen mit DZ-ähnlichem Phänotyp. Daher wurde zunächst die Expression des hochaffinen Fc γ -Rezeptors I (CD64), des IgA-bindenden Fc α -Rezeptors (CD89) sowie der zwei ausgewählten Lektin-Rezeptoren DEC-205 (CD205) und DC-SIGN (CD209) mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abb. 3.14).

Es zeigt sich unabhängig von der Wahl der Reifungsfaktoren, dass alle vier untersuchten Rezeptoren auf Monozyten sowie den mit den verschiedenen Zytokin-Kombinationen von Monozyten differenzierten Dendritischen Zellen exprimiert werden. Es sind jedoch Unterschiede in der Expressionshöhe erkennbar (Abb. 3.14). Während CD64 vergleichsweise stark auf Monozyten und den mit IFN- β /IL-3 differenzierten DZ nachgewiesen werden kann, ist die Expressionshöhe auf den mit IL-4/GM-CSF bzw. IFN- α /GM-CSF aus Monozyten differenzierten Zellen reduziert. Der Lektin-Rezeptor CD209 wird hingegen nur in geringem Maß auf Monozyten sowie den mit den Zytokin-Kombinationen IFN- α /GM-CSF bzw. IFN- β /IL-3 differenzierten Zellen exprimiert. Demgegenüber zeigen die mit IL-4/GM-CSF erhaltenen Zellen eine starke Expression von CD209. Die Expressionshöhe von CD89 und CD205 ist hingegen auf Monozyten und den Zytokinen-differenzierten Zellen vergleichbar hoch und demnach nicht von den verwendeten Differenzierungsagentien abhängig.

3.4. Bindungsnachweis auf Dendritischen Zellen

In einem zweiten Schritt wurde die Bindungsaktivität der in dieser Arbeit konstruierten und hergestellten scFv-Miniantikörper auf Dendritischen Zellen getestet, welche mit den drei für diese Arbeit gewählten Reifungsstimuli - IL-4/GM-CSF, IFN- α /GM-CSF und IFN- β /IL-3 - aus Monozyten differenziert wurden (Abb. 3.15). Der Nachweis der Bindung der scFv-Miniantikörper bei sättigenden Antikörperkonzentrationen erfolgte durchflusszytometrisch mit einem FITC-markierten anti-humanen Fc-Antikörper.

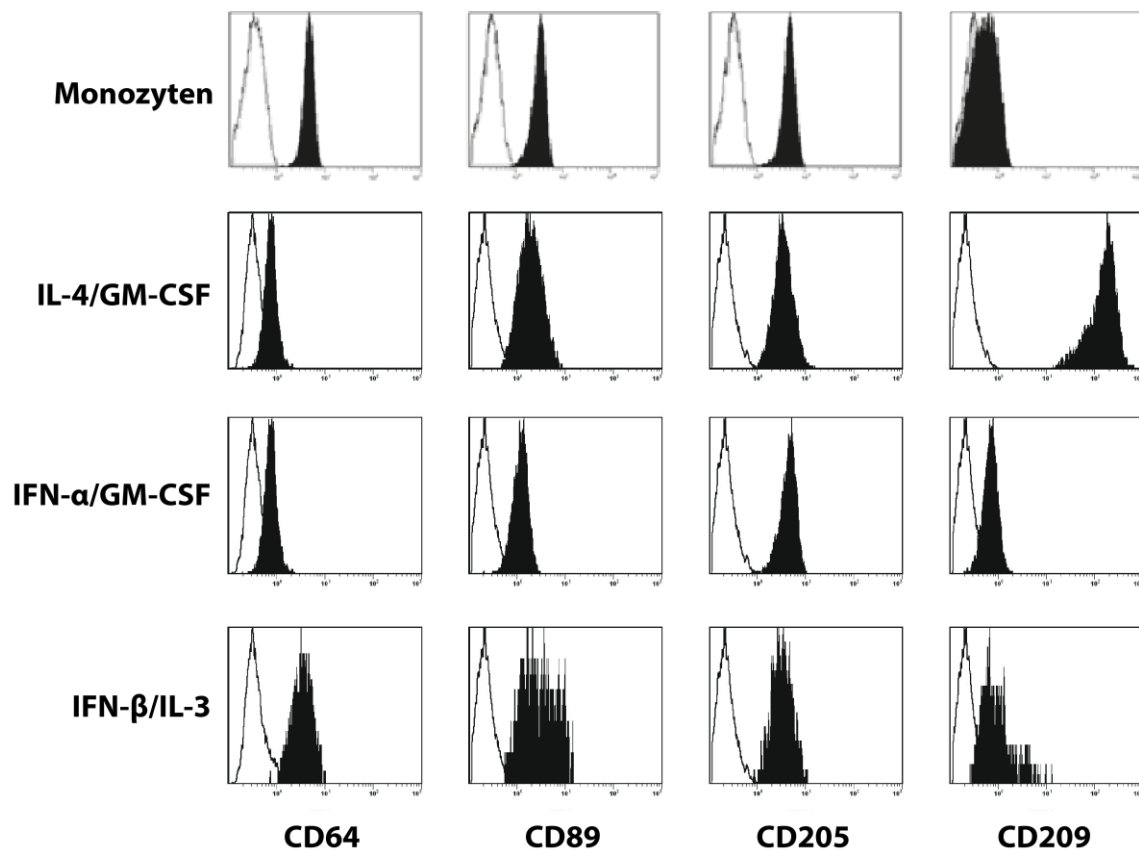


Abb. 3.14: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression von CD64, CD89, CD205 und CD209 auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Reifungsstimuli
 Für die Reifung wurden Monozyten gesunder Spender 7 Tage lang mit IL-4/GM-CSF, IFN- α /GM-CSF oder IFN- β /IL-3 kultiviert. Als Kontrolle dienten fluoreszenzmarkierte Antikörper gleichen Isotyps (schwarz: spezifischer Antikörper; weiß: Isotyp-Kontrolle). Die Analyse wurde mit Zellen von drei unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen.

Das Bindungsmuster der rekombinanten Miniantikörper entspricht dem Färbemuster, welches unter Verwendung der kommerziell erhältlichen, direkt mit einem Fluorochrom konjugierten Antikörper erhalten wurde (vgl. Abb. 3.14 und 3.15).

So konnte auch für den CD64-gerichteten Miniantikörper eine verstärkte Fluoreszenz bei den mit IFN- β /IL-3-differenzierten Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zellpopulationen festgestellt werden, was demnach auf die erhöhte Expression des CD64 auf diesen Zellen zurückzuführen ist.

Für CD89 konnte auf den drei unterschiedlichen Zellpopulationen vergleichbare Expressionshöhe des Rezeptors nachgewiesen werden. Der rekombinante CD89-Miniantikörper zeigt hingegen nur eine schwache Bindung an die hier verwendeten DZ-Populationen. Möglicherweise ist die schwache Bindungsaktivität des scFv-Mini-

antikörpers (EC50: 12,4 µg/ml, vgl. Kap. 3.2) in Kombination mit der schwachen Rezeptorexpression (vgl. Kap. 3.3) ursächlich für die in Summe schwache Bindung des Moleküls an die Zellen.

Die Expression des Lektin-Rezeptors CD205 war auf allen drei der hier untersuchten Zellpopulationen ähnlich stark ausgeprägt und im Vergleich zu CD89 deutlich erhöht (vgl. Kap. 3.3). Trotz der geringen Bindungsaktivität des CD205-scFv-Miniantikörpers (siehe Kap. 3.2) konnte die Bindung der CD205-scFv-Konstrukte auf den Zellen nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der Bindung des CD209-scFv-Miniantikörpers zeigt sich, dass dieses Konstrukt auf allen drei DZ-Populationen bindet. Eine besonders starke Expression des Lektin-Rezeptors CD209 konnte jedoch auf den mit IL-4/GM-CSF differenzierten Zellen detektiert werden (vgl. Kap. 3.3.) Die starke Expression des Zielantigens auf IL-4/GM-CSF Zellen bedingt hier demnach die erhöhte Bindung des scFv-Miniantikörpers auf dieser Zellpopulation.

Sowohl die Expressionshöhe der Lektinrezeptoren CD205 und CD209 auf den hier untersuchten, mit drei unterschiedlichen Zytokin-Kombinationen aus Monozyten erhalten Zellpopulationen wie auch die Bindungsaktivität der rekombinanten scFv-Miniantikörper lassen diese beiden Rezeptoren als besonders geeignete Zielstrukturen für eine Antikörper-basierte Antigenbeladung erscheinen. Während CD205 sowohl auf Monozyten wie auch den DZ-Populationen exprimiert wird, ermöglicht das Expressionsmuster von CD209 die selektive Adressierung der IL-4/GM-CSF Zellpopulation mit den in dieser Arbeit generierten CD209-scFv-Antigen-Fusionsproteinen.

3.5. Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen

Nachdem die rekombinanten Antikörper-Antigen-Fusionsproteine eine selektive, dosisabhängige Bindung an ihr jeweiliges Zielantigen zeigen (siehe Abschnitt 3.2.2), stehen sie für die abschließende funktionelle Charakterisierung, d.h. zur Beladung von antigenpräsentierenden Zellen zur Verfügung. Als antigenpräsentierende Zellen kommen hier die drei Zellpopulationen in Frage, die bei der Differenzierung der Monozyten mit den drei unterschiedlichen Zytokinkombinationen erhalten wurden (vgl. Abschnitt 3.3).

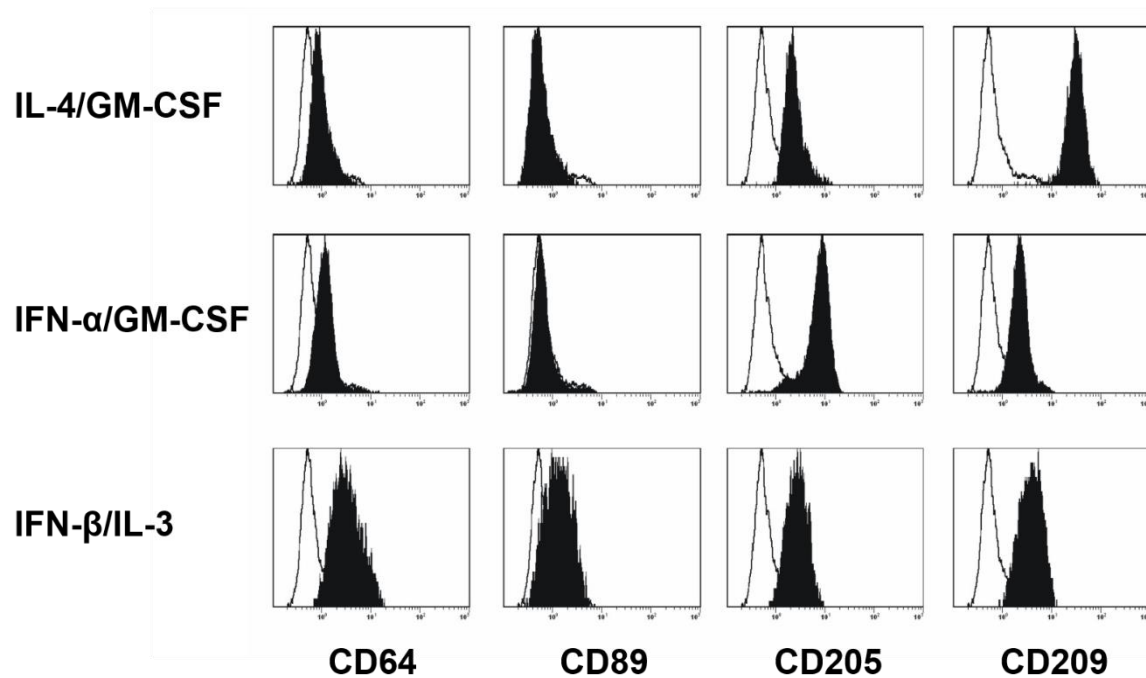


Abb. 3.15: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität der aufgereinigten Antigen-Antikörper-Fusionsproteine auf unreifen Dendritischen Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Reifungsstimuli

Schwarz: Antigen-Antikörper-Fusionsprotein; Weiß: Isotyp-Kontrolle. Für die Reifung wurden Monozyten gesunder Spender 7 Tage lang mit IL-4/GM-CSF, IFN- α /GM-CSF oder IFN- β /IL-3 kultiviert. Als Kontrolle dienten fluoreszenzmarkierte Antikörper gleichen Isotyps. (Repräsentatives Experiment aus unabhängigen Messungen unter Verwendung von Zellen dreier unterschiedlicher Spender).

Im Vergleich zeigten die drei Zellpopulationen unterschiedliche Phänotypen, die sich insbesondere in der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Endozytose-rezeptoren widerspiegeln. Möglicherweise beeinflussen die verwendeten Zytokine auch die Fähigkeit der Zellen, Rezeptor-Antikörper-Komplexe zu internalisieren, die so aufgenommenen Antigene zu prozessieren und nachfolgend die Peptide zu präsentieren. Daher sollte zunächst ein Test-System etabliert werden, um diese Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation zu charakterisieren.

Als Antigen wurde hierfür das vom Zytomegalie-Virus (CMV) stammende Protein pp65 ausgewählt. Blut CMV-serumpositiver Spender enthält einen entsprechenden Anteil CMV-spezifischer T-Zellen, so dass über die Reaktivierung dieser T-Zellen sehr einfach das Potential der Interleukin-differenzierten Zellen zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung bestimmt werden kann. Ein Peptid-Gemisch wie der CMV-pp65-„Peptivator“ besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Peptide des gesamten CMV-pp65-Antigens, die in die Zelle aufgenommen, prozessiert und nachfolgend im

Kontext von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II präsentiert werden können. Eine Vorauswahl der Spender aufgrund des HLA-Typs entfällt somit.

Zur Etablierung eines solchen T-Zell-Assays wurden Monozyten CMV-serumpositiver Spender mittels IL-4 und GM-CSF zu Zellen mit einem DZ-ähnlichen Phänotyp differenziert. Nach einer einstündigen Inkubation der so erhaltenen unreifen Dendritischen Zellen mit dem Peptid-Gemisch wurde eine Reifung der Zellen mit einem Reifungscocktail (Interleukin-1 β , Interleukin-6, Prostaglandin-E₂ und Tumornekrose-Faktor α) über 16 Stunden vorgenommen. In der nachfolgenden Co-Kultur dieser Peptid-beladenen, gereiften Zellen mit den T-Zellen desselben Spenders (Verhältnis DZ zu T-Zellen 1:10) erfolgte die Aktivierung und Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen. Anschließend erfolgte eine Restimulation der T-Zellen mit peptidbeladenen und gereiften Dendritischen Zellen desselben Spenders (DZ zu T-Zell-Verhältnis 1:10).

Als Marker für die Aktivierung der T-Zellen diente die Expression des Oberflächenantigens CD69. Dieser Aktivierungsmarker ist bereits wenige Stunden nach einer Aktivierung der T-Zellen auf deren Zelloberflächen durchflusszytometrisch nachzuweisen. Aktivierte T-Zellen zeichnen sich zudem durch die Sekretion von Zytokinen, z. B. von Interferon- γ aus. Zum Nachweis der T-Zell-Aktivierung wurde die Sekretion des IFN- γ durch Brefeldin A inhibiert, so dass intrazellulär akkumulierendes IFN- γ als weiterer Marker zur Verfügung stand. Die Detektion des IFN- γ erfolgte hierbei durch eine intrazelluläre Färbung. Zur Identifizierung der T-Zellen erfolgte eine intrazelluläre Färbung des T-Zell-Markers CD3, da eine T-Zell-Aktivierung zur Internalisierung des CD3 führen kann. Zur selektiven Analyse der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen wurden diese CD3-positiven Zellen zusätzlich mit CD4 (T-Helferzellen) und CD8 (zytotoxische T-Zellen) differenziert.

Mit einem Anteil von 2,1% aktivierter T-Helferzellen und 4,5% aktivierter zytotoxischer T-Zellen zeigte sich eine sehr gute Aktivierung und Expansion der prävalenten CMV-spezifischen T-Zellen innerhalb des einwöchigen Zeitraums (siehe Abbildung 3.16). Mit diesem Test-System steht damit eine Methode zur Verfügung, um nachfolgend die drei phänotypisch unterschiedlichen Populationen antigenpräsentierender Zellen vergleichend hinsichtlich ihres T-Zell-aktivierenden Potentials zu charakterisieren.

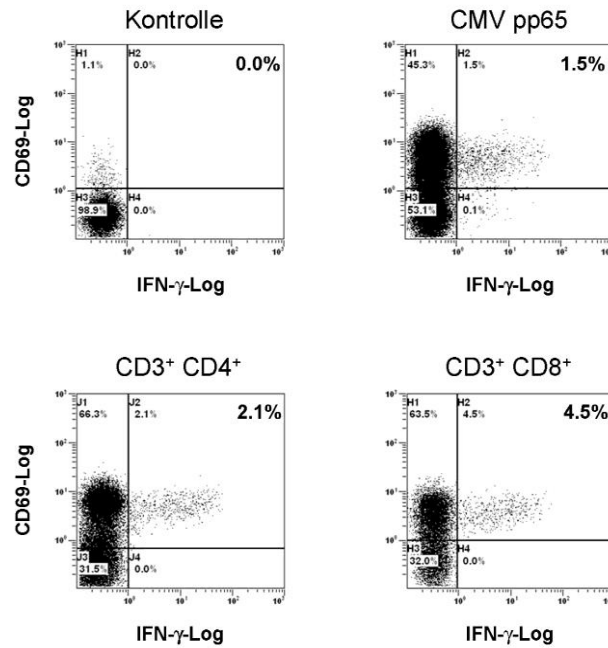


Abb. 3.16: Durchflusszytometrischer Nachweis der T-Zell-Aktivierung

Oben links: Kontrolle ohne CMV-Peptide; **Oben rechts:** Interferon- γ - und CD69-exprimierende Zellen nach Inkubation mit CMV-pp65-aktivierten Dendritischen Zellen. Differenzierung der T-Helfer-Zellen über CD3 und CD4 (**unten links**) und zytotoxische T-Zellen über CD3 und CD8 (**unten rechts**). Die Analysen wurden mit Zellen dreier unabhängiger Spender durchgeführt. Die Abbildungen entsprechen einem repräsentativen Ergebnis dieser drei Experimente.

4. Diskussion

Neben den klassischen Behandlungsmethoden maligner Tumoren haben sich in den letzten Jahren unterschiedliche immuntherapeutische Ansätze etabliert. Diese zeichnen sich vor allem durch eine hohe selektive Wirkung gegen Tumorzellen aus. Die therapeutische, aktive Tumorzellvakzinierung ist dabei ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der minimalen Resterkrankung nach konservativer Behandlung. Man erhofft sich die Verhinderung eines Tumorrezidivs durch die Induktion einer langanhaltenden, selektiven gegen Tumorantigene gerichteten Immunantwort.

Neben einer humoralen Antwort sind dafür vor allem zytotoxische T-Lymphozyten erforderlich, welche in das Tumormilieu eindringen, von Malignomzellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierte tumorspezifische Antigene erkennen und die Tumorzellen anschließend zerstören können. Idealerweise sollte auch die Bildung CD8⁺ T-Gedächtniszellen stimuliert werden (Palucka und Banchereau 2013). Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zellen ist die Präsentation eines passenden Tumorantigens auf antigenpräsentierenden Zellen. Da Dendritische Zellen die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen sind (Steinman 2012), stellen diese eine vielversprechende Zellpopulation für die Anti-Tumor-Vakzinierung dar.

4.1. Vakzinierungsstrategien

Dendritische Zellen als zelluläre Vakzine

In den meisten klinischen Studien wurden Dendritische Zellen bisher *ex vivo* beladen. Hierbei werden autologe, aus Monozyten oder CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen gereifte Dendritische Zellen von Patienten mit Tumorantigen versehen und anschließend wieder reinfundiert. Mit den verwendeten Strategien konnte bei einer Reihe von Patienten eine Verlängerung der Überlebenszeit, in Einzelfällen sogar eine Komplettremission beobachtet werden (Fay 2006; Dillman 2010; Galluzzi 2012). Seit 2010 ist in den USA auch ein therapeutisches Vakzin (Sipuleucel-T, Provenge) zugelassen, bei dem dieses Verfahren zur Vakzinierung genutzt wird.

Die Manipulation antigenpräsentierender Zellen *ex vivo* ermöglicht es, ein breites Spektrum an Methoden zur Antigen-Beladung anzuwenden. So können die Zellen mit Proteinextrakten bzw. Lysaten von Tumorzellen mit einem komplexen Gemisch aus potentiellen Tumorantigenen beladen werden. Die gegen verschiedene Antigene

gerichtete T-Zell-Antwort ist wünschenswert, um eine möglichst breite Immunantwort gegen die Tumorzelle zu induzieren, birgt aber das Problem, dass die Spezifität der T-Zellen nicht genauer definiert werden kann. Zudem kann eine so induzierte Immunantwort auch gegen auf gesunden Zellen präsentierte Peptide, d. h. gegen Autoantigene, gerichtet sein.

Weitaus definierter erscheinen hier Beladungsansätze, bei denen lösliches Tumorantigen bzw. der hiervon abgeleiteten Peptide genutzt werden. Letztere müssen allerdings für den jeweiligen HLA-Typ des Spenders angepasst und speziell synthetisiert werden, während das komplette Antigen von der Zelle selbst prozessiert wird. Da jedoch die Aufnahme von Antigenen aus dem extrazellulären Raum hauptsächlich zur Präsentation der Peptide im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen führt, scheint diese Beladungsstrategie nicht besonders geeignet, um eine effiziente Immunantwort zytotoxischer T-Zellen zu induzieren. Für die Beladung Dendritischer Zellen mit löslichem Antigen bzw. löslichen Peptiden *in vivo* sind zudem relativ hohe Dosen (100 µg und mehr) für eine erfolgreiche Beladung der Zellen erforderlich.

Im Gegensatz zu Antigenen, die von außen in die Zelle aufgenommen wurden, werden Peptide, die von der Degradation endogener Proteine herrühren, hauptsächlich über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert. In diesem Fall ist demnach die Induktion der Immunantwort primär seitens CD8⁺ T-Zellen zu erwarten. Sowohl die Transfektion wie auch die Transduktion der Dendritischen Zellen bieten zwei Methoden, die für entsprechende Tumorantigene kodierenden Sequenzen in die Zellen einzubringen, um so eine MHC-I-restringierte Präsentation der entsprechenden Peptide zu erzielen (Tuyaerts 2003). Zudem lässt sich die Präsentation der Peptide über MHC-Klasse-II noch deutlich verbessern, indem lysosomale oder endosomale Zielsignalpeptide an das Antigen gekoppelt werden. Die MHC-Klasse-I-Präsentation lässt sich bei Erhalt der guten MHC-Klasse-II-Präsentation durch zusätzliche Kopplung des Antigens an ein MHC-Klasse-I-Zielsignalpeptid (MHC class I trafficking signal, MITD) erhöhen (Kreiter 2007).

Die Transduktion der antigenpräsentierenden Zellen ermöglicht, effektiv Tumorantigen-kodierende Gene in Zellen zu transferieren. Leider sind Dendritische Zellen relativ resistent gegen adenovirale Infektionen, da ihnen möglicherweise die für den Viruseintritt notwendigen Rezeptoren fehlen (Tillman 1999), so dass eine Transduktion der Zellen auf diesem Weg erschwert ist. Durch gezielte Adressierung der Viruspartikel an Oberflächenrezeptoren wie CD40 oder DC-SIGN lässt sich die

Infektionsrate jedoch deutlich verbessern (Tillman 1999; Korokhov 2005; Tacken 2007). Dieser Ansatz wurde bereits zur Induktion antigenspezifischer T-Zellantworten verfolgt (Brandão 2003; Hangalapura 2010; Galluzzi 2012). Bei der Wahl DZ-aktivierender Rezeptoren wie CD40 entfällt zudem die Notwendigkeit der Gabe eines zusätzlichen Reifungsstimulus.

Im Gegensatz zu der nur transienten Expression der für das Tumorantigen kodierenden Sequenz bei der RNA-Transfektion erfolgt im Anschluss an die Transduktion eine stabile Integration der Sequenz in die Zielzelle. Diese gentechnische Veränderung kann hilfreich sein, ist aber auch mit Gefahren verbunden. So ist die transiente Expression des Antigens nach RNA-Transfektion aufgrund der stattfindenden Degradation der mRNA zeitlich begrenzt. Entsprechend kommt es nur in dem begrenzten Zeitraum zu Induktion einer gegen das Antigen gerichteten Immunantwort. Eine stabile Integration der Antigen-kodierenden Sequenz in die DNA der Dendritischen Zellen könnte zu einer dauerhaften Immunantwort führen. Hier wäre ein Weg wünschenswert, der eine solche dauerhafte T-Zell-Aktivierung bei Bedarf beenden lässt. Bei beiden Verfahren kommt es leider nicht zur Präsentation der vom Antigen abgeleiteten Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen und damit zur Aktivierung CD4⁺ T-Zellen. Diese ist für die Entwicklung einer tumorprotektiven Immunantwort aber essentiell (Palucka und Banchereau 2013).

Die *Ex-vivo*-Beladung ermöglicht eine gute Kontrolle der hierfür notwendigen Komponenten. So werden nur die isolierten Dendritischen Zellen aktiviert. Zudem lässt sich der Aktivierungsstatus der Zellen überprüfen. Jedoch ist das Verfahren aufgrund der individuellen Therapie und der Notwendigkeit, die Beladung der Zellen mit Tumorantigen bzw. Peptiden sowie die nachfolgende Reifung der Dendritischen Zellen unter GMP-Bedingungen durchzuführen, mit erheblichem Arbeits-, Kosten-, logistischem und damit in Summe hohem finanziellen Aufwand verbunden.

Beladung Dendritischer Zellen *in vivo*

Eine Beladung der antigenpräsentierenden Zellen im Patienten in Anlehnung an derzeit gängige Vakzinierungen böte dem gegenüber entsprechende Vorteile. Monoklonale Antikörper bieten aufgrund ihrer Bindungseigenschaften eine hervorragende Möglichkeit, die auf Dendritischen Zellen exprimierten internalisierenden Rezeptoren zu adressieren. Dies ermöglicht die selektive Beladung der Zellen mit Antigenen oder Peptiden, die an den jeweiligen Antikörper gekoppelt sind. Da eine

solche Strategie gezielt zur Aufnahme des Antigens in die gewählte Zellpopulation führt, reduziert sich die für eine effiziente Antigenpräsentation bzw. T-Zell-Aktivierung notwendige Menge an Antigen (Steinman 2012).

Neben der spezifischen Adressierung der jeweiligen Population an antigenpräsentierenden Zellen, bietet die Rezeptor-vermittelte Endozytose des Antikörper-Tumorantigen-Konstrukts einen weiteren essentiellen Vorteil. Während die Aufnahme löslichen Antigens in die Zellen zu einer Präsentation der vom Antigen erhaltenen Peptide überwiegend im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen führt und sowohl die RNA-Transfektion als auch die Transduktion zur ausschließlichen Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen, kommt es nach Endozytose des Antikörper-Konjugats zu einer Kreuz-Präsentation der Peptide über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle (Schuurhuis 2006). Somit wird in diesem Fall auch die notwendige Aktivierung zytotoxischer T-Zellen verbessert. Selbst *ex vivo* führt die Rezeptor-vermittelte Beladung der Dendritischen Zellen zu einem gesteigerten Potential der Zellen, entsprechende Immunantworten zu induzieren (Schuurhuis 2006; Tacke 2008).

Weiterhin lassen sich bei antikörpervermittelter *In-vivo*-Beladung im Gegensatz zu *Ex-vivo*-Strategien DZ-Populationen erreichen, welche nicht oder nur unter großem Aufwand isolierbar sind. Auch ist es möglich, unterschiedliche Subtypen der Dendritischen Zellen gleichzeitig anzusprechen, wodurch möglicherweise eine bessere Kontrolle der Immunantwort möglich ist (Tacke und Figdor 2011). Die Verteilung der *in vivo* mit Antigen beladenen Dendritischen Zellen an multiplen Orten im Organismus ist zudem für die Aktivierung von T-Zellen vermutlich von Vorteil (Tacke 2007).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die genutzten DZ-Subtypen eine natürlich vorkommende Population antigenpräsentierender Zellen darstellen, so dass sie möglicherweise in ihrer Funktionalität den für die Beladung *ex vivo* meist aus Monozyten gewonnenen Dendritischen Zellen überlegen sind. Vor allem ist die Migrationsfähigkeit dieser Dendritischen Zellen nicht eingeschränkt, was bei der *Ex-vivo*-Beladung bisher noch ein unzureichend gelöstes Problem ist (Adema 2005; Cruz 2011).

Eine Einschränkung der Verwendung von Antikörpern zur Vakzinierung ist die begrenzte Molekülanzahl, welche sich an diese binden lassen. Um multiple Komponenten in einem Konstrukt zu kombinieren, lassen sich als komplexes

Beladungssystem Mikropartikel verwenden (Tacke 2007; Cruz 2014). Eingesetzt werden aktuell vor allem Liposomen oder Polymerpartikel (Tacke 2006). Zur selektiven Beladung der Zielzelle können Antikörper oder Rezeptorliganden in die Oberfläche eingebaut werden (Badiie 2007; Cruz 2011), so dass die Komponenten ausschließlich am gewünschten Zielort wirken (Kreutz und Tacke 2013). Im Gegensatz zu viralen Vektoren sind Liposomen und Polymerpartikel selbst nicht immunogen. Der Vorteil der Polymerpartikel gegenüber Liposomen liegt in der größeren Stabilität (Kreutz 2013). Sind die Polymerpartikel biologisch abbaubar, werden die enthaltenen Komponenten langsam über Tage bis Wochen freigesetzt (Kreutz 2013).

Mikropartikel haben jedoch den Nachteil, dass sie deutlich aufwändiger und damit teurer in der Herstellung sind als einfache Antikörper. So lange sich die Beladung mit gleich gutem Ergebnis bewerkstelligen lässt, ist die Beladung über Antikörper-Tumorantigen-Fusionsproteine entsprechend der sinnvollere Ansatz.

4.2. Differenzierung Dendritischer Zellen aus Monozyten

Für die einfache Gewinnung von Dendritischen Zellen in größeren Mengen hat sich etabliert, Monozyten aus Blut- oder Lymphozytenspenden zu isolieren und diese anschließend Zytokin-vermittelt zu Zellen mit einem DZ-ähnlichem Phänotyp zu differenzieren (MoDZ). Neben dem als Standard verwendeten Differenzierungscocktail wurden in dieser Arbeit eine Kombination aus GM-CSF und IFN- α bzw. IL-3 und IFN- β verwendet, um den Einfluss dieser Zytokine auf die Expression der Endozytose-Rezeptoren zu untersuchen.

Obwohl die Kombination aus IL-4 und GM-CSF vielfach zur Differenzierung der Monozyten eingesetzt wird, scheint diese Auswahl an Zytokinen nicht in jeder Hinsicht optimal für die Induktion einer T-Zell-Antwort zu sein. So scheinen die mit IL-4 erzeugten Dendritischen Zellen nicht in der Lage zu sein, zum nächstgelegenen lymphatischen Organ zu wandern (Della Bella 2004). Weiterhin führt IL-4 zu einer Verminderung der CD64-Expression (te Velde 1990). Entsprechend weisen auch die in dieser Arbeit mittels IL-4/GM-CSF generierten Zellen eine im Vergleich zu Monozyten geringe Expression von CD64 auf. Eine ähnliche Verminderung der CD64-Expression zeigte sich für die mit IFN- α /GM-CSF differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen. Die CD64-Expression könnte zum Beispiel mit IFN- γ (Fanger 1996) oder IL-10 (te Velde 1992) gesteigert werden. Inwieweit diese Zytokine einen

Einfluss auf die Reifung der Zellen in Bezug auf die Endozytosefähigkeit und T-Zell-Aktivierung haben, wäre zu untersuchen.

Bei IFN- β /IL-3-differenzierten Zellen findet sich eine vergleichsweise hohe Konzentration von CD64 auf der Zelloberfläche, jedoch ist hier die Oberflächenexpression von CD209 minimiert.

Die in dieser Arbeit gewählten Kombinationen der Zytokine zur Differenzierung der Monozyten sind entsprechend nicht alle gleich gut geeignet, um abschließend eine vergleichende Analyse der Moleküle hinsichtlich ihres Potentials vorzunehmen, diese Zellen mit Antigen zu beladen und nachfolgend T-Zell-Antworten zu induzieren. Neben der hier charakterisierten Expression der Oberflächenmarker wäre nachfolgend auch die Kinetik der Endozytose von Rezeptor und Antikörper-Antigen-Fusionsprotein in Abhängigkeit von den verwendeten Zytokincocktails zu untersuchen.

Darüber hinaus könnte das über die adressierten vier Endozytose-Rezeptoren in die Zelle eingebrachte Antigen in der Zelle unterschiedlich prozessiert werden und damit die Präsentation über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle beeinflusst sein. Es ist geplant, dies in weiterführenden Arbeiten zu untersuchen.

Schließlich könnte die Auswahl der Zytokine auch einen Einfluss auf die Fähigkeit der so erhaltenen Antigen-präsentierenden Zellen haben, auf einen Reifungsstimulus zu reagieren. Die Reifung der Zellen im Anschluss an die Antigen-Beladung ist jedoch notwendig für die Induktion der T-Zell-Antwort. Dieser Punkt ist ebenfalls in anschließenden Arbeiten zu untersuchen.

4.3. Wahl des Adjuvans

Ein Adjuvans verstärkt die antigenspezifische Immunantwort durch Verbesserung der Qualität, der Dauer oder des Ausmaßes der Immunantwort (Dubensky und Reed 2010). Adjuvantien haben im Zusammenhang mit der Beladung von Dendritischen Zellen vor allem zwei Aufgaben. Zum einen sollen sie die Verfügbarkeit von Antigenen solange verlängern, dass eine effiziente T-Zell-Aktivierung stattfinden kann. Zum anderen sind sie in der Lage, Dendritische Zellen zu aktivieren. Da Dendritische Zellen Antigen über längere Zeit speichern können, ist vor allem letzterer Punkt entscheidend (van Montfoort 2009). Bei Beladung über CD205 und CD209, aber auch über andere Rezeptoren, ist die Verwendung von Adjuvantien eine Notwendigkeit, da ansonsten Toleranz induziert wird (Steinman 2012).

Wichtig für den Einsatz im Rahmen der therapeutischen Tumorstimmulierung ist eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen über Typ1-T-Helferzellen. Viele der aktuell *in vivo* verwendeten Adjuvantien, allen voran die Aluminiumsalze, führen jedoch zu einer Polarisierung hin zu Typ2-T-Helferzellen und damit zur Produktion von Antikörpern (Dubensky und Reed 2010). Daher ist die weitere Suche nach passenden Substanzen essentiell. Weitere wichtige Eigenschaften eines optimalen Adjuvans sind (Dubensky und Reed 2010):

- ungefährliche, sichere Anwendung
- Stabilität der Substanz vor Administration
- leichte Abbaubarkeit und Elimination im menschlichen Körper
- kostengünstige Herstellung

Die Dendritischen Zellen müssen nach Differenzierung und Aktivierung vor allem folgende Eigenschaften aufweisen (Mailliard 2004; Dauer 2008; Kalinski 2013):

- phänotypische Reife
- Fähigkeit zur Migration nach CCR7-Rezeptor-Ligation
- Interleukin-12-Produktion

In-vitro erfolgte die Aktivierung der Dendritischen Zellen bisher meist unter Einfluss der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α und Prostaglandin-E₂ (Jonuleit 1997), so auch in dieser Arbeit.

Das im Standard-Aktivierungscocktail enthaltene Prostaglandin-E₂ scheint die Potenz der Dendritischen Zellen in Bezug auf ihre Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation deutlich zu steigern (Steinbrink 2000). Es führt zu einer hohen Expression kostimulierender Moleküle und befähigt Dendritische Zellen durch Induktion der Expression von CCR7 zur Migration (Nguyen-Pham 2012; Kalinski 2013). Prostaglandin-E₂ vermindert jedoch auch die Interleukin-12-Produktion der Dendritischen Zellen und führt damit zu einer TH₂-Verschiebung der Immunantwort (Watchmaker 2010; Kalinski 2013). Daher werden Prostaglandin-E₂-haltige Aktivierungscocktails in aktuellen Arbeiten nicht mehr verwendet.

Weiteres deutet darauf hin, dass der Standard-Aktivierungscocktail nicht optimal für die Reifung Dendritischer Zellen ist. Die Kombination aus Interleukin-1 β , Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interferon- α und CD40-Ligand scheint einen Typus

Dendritischer Zellen zu generieren, der den mit dem Standard-Ansatz gereiften Zellen funktionell deutlich überlegen ist (Kaka 2008). Die Kombination aus CD40-Ligand mit dem TLR3-Liganden poly I:C scheint ebenso zu Zellen zu führen, die ein verbessertes Potential der T-Zell-Stimulation aufweisen (Kim 2008). Auch bei der Beladung Dendritischer Zellen im Mausmodell über CD205 hat sich poly I:C als sehr effektives Adjuvans herausgestellt (Kastenmüller 2014).

Neuere Adjuvantien sind weiterhin der im HPV-Impfstoff Cervarix verwendete TLR4-Ligand Monophosphoryl Lipid A (MPL), weitere TLR-Liganden wie CpG, Resiquimod oder Flagellin, Montanide und Saponine (Dubensky und Reed 2010; Speiser und Romero 2010).

Aktuell wird versucht, Dendritische Zellen unter Bedingungen reifen zu lassen, welche virale Infektionen imitieren. Vielversprechend scheinen sogenannte α -Typ1-polarisierte Dendritische Zellen (α DZ1) zu sein, welche mit einer Kombination aus Interleukin-1 β , Tumor-Nekrose-Faktor- α , poly I:C, Interferon- γ und Interferon- α aktiviert werden. Mit dem oben genannten Standard-Aktivierungscocktail aktivierte Dendritische Zellen sind zwar bezogen auf die Expansion zytotoxischer T-Zellen genauso effektiv, Aktivität zytotoxischer T-Zellen, Granzym-B-Expression und Chemokin-Reaktivität sind jedoch nur bei Verwendung von α DZ1 zu finden (Watchmaker 2010). Zudem ist das regulatorische T-Zellen anziehende CCL22 im Gegensatz zu Prostaglandin-E₂-aktivierten Dendritischen Zellen reduziert. Zusätzlich wirkt der Anziehung regulatorischer T-Zellen noch Interferon- α entgegen (Muthuswamy 2008). Interferon- α bewirkt auch eine Erhöhung der CCR7-Expression (Mailliard 2004). Jedoch ist die Expression von CCR7 geringer als nach Reifung mit Prostaglandin-E₂ (Nguyen-Pham 2012).

Für die Antigenbeladung Dendritischer Zellen werden weiterhin noch gegen CD40-gerichtete Antikörper verwendet (Tacke und Figdor 2011; Wimmers 2014). Sie funktionieren gut, sind im Vergleich zu PRR-Liganden jedoch teuer.

Neben der Wahl des Adjuvans ist ein weiteres Problem der Einfluss des verwendeten Antigens und die Reifungszeit auf die Funktionalität der Dendritischen Zellen (Kaka 2008; Kim 2008). Auch die klassische 7-Tage-Reifung zur Erzeugung der Dendritischen Zellen aus Monozyten ist möglicherweise nicht optimal (Dauer 2008).

Es wird deutlich, dass zum einen das gewählte Adjuvans die Eigenschaften der Dendritischen Zellen stark beeinflusst und dass weiterhin die Notwendigkeit für ein einheitliches Differenzierungs- und Aktivierungsprotokoll besteht.

4.4. Applikationswege

Antikörper und Adjuvans können entweder dermal, subkutan oder intravenös appliziert werden. Je nach Applikationsweg lassen sich unterschiedliche DZ-Subtypen erreichen, bei intravenöser Injektion von Antikörpern sogar die Dendritischen Zellen praktisch aller Lymphknoten (Pereira 2007).

Es macht einen großen Unterschied, ob subkutan oder intradermal vakziniert wird. Subkutane Injektionen ermöglichen den direkten Transport der injizierten Substanz Richtung Lymphknoten. Bei intradermaler Injektion werden die Dendritischen Zellen lokal aktiviert und migrieren anschließend Richtung Lymphknoten und Milz (Idoyaga 2008; Flacher 2012). Interessant ist, dass sich intradermal injizierte Antikörper neben dermalen Dendritischen Zellen auch auf epidermalen Langerhanszellen finden. Das heißt, Immunglobuline können durch die Basalmembran der Epidermis diffundieren (Flacher 2010). Auch die intramuskuläre oder intranasale Applikation kommt möglicherweise in Frage.

In der Vergangenheit waren intravenös injizierte, *ex vivo* beladene Dendritische Zellen weniger effektiv in der Aktivierung von Typ1-T-Helferzellen als subkutan oder dermal applizierte (Wimmers 2014). Das ist ein Grund, weshalb sich klinische Studien bisher vor allem auf die kutanen Applikationswege fokussiert haben. Da es inzwischen aber viele neue Erkenntnisse zur Differenzierung und Aktivierung Dendritischer Zellen gibt, wäre die erneute Überprüfung der intravenösen Applikation auch *ex vivo* beladener Dendritischer Zellen interessant.

Gegenüber der *Ex-vivo*-Beladung Dendritischer Zellen ist bei *In-vivo*-Beladung für das Erreichen möglichst vieler Dendritischer Zellen die intravenöse Gabe jedoch deutlich interessanter. Außerdem ist ein Problem der lokalen Applikation, dass der Großteil des injizierten Vakzins vom Körper entweder eliminiert oder von anderen Immunzellen aufgenommen wird (Rosalia 2015). Ein großes Problem der intravenösen Vakzinierung ist jedoch, dass viele der als kostimulatorisches Signal benötigten Adjuvantien bei systemischer Gabe schwere Nebenwirkungen verursachen (Tacken und Figdor 2011). Daher lassen sich diese als Reinsubstanz nur lokal appliziert anwenden. Eine Möglichkeit, beide Probleme zu umgehen, wäre neben dem Antigen auch das Adjuvans an einen Antikörper zu koppeln oder Antigen und Adjuvans in Mikropartikel zu verpacken (siehe Abschnitte 4.1 und 4.5).

Für die *Ex-vivo*-Beladung ist noch interessant, dass die Migrationsfähigkeit Dendritischer Zellen bei geringer Dichte deutlich besser ist als bei hoher (Aarntzen 2013). Zudem scheint die Vorbehandlung der Injektionsstelle mit Adjuvantien keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der injizierten Dendritischen Zellen zu haben (Aarntzen 2013).

Eine weitere bereits getestete, kompliziertere Möglichkeit ist die Injektion des Vakzins direkt intranodal in das Lymphsystem der Haut. Dies scheint bei *Ex-vivo*-Beladung zwar schlechter zu funktionieren als die dermale Injektion (Wimmers 2014), bei *In-vivo*-Beladung über Mikropartikel jedoch gut (Jewell 2011).

4.5. Ausblick

In einem nächsten Schritt müsste die Effizienz der Internalisierung der in dieser Arbeit konstruierten Antikörper, der nachfolgenden Prozessierung des Tumorantigens sowie der MHC-vermittelten Antigen-Präsentation in Abhängigkeit von dem jeweils adressierten Rezeptor in weiteren Experimenten *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Die beiden vielversprechendsten Antikörper – CD205 und vermutlich auch CD209 – benötigen ein Adjuvans als zusätzlichen Aktivierungsstimulus. Dieser lässt sich aufgrund der schweren Nebenwirkungen nicht systemisch verabreichen. Daher ist die *In-vivo*-Anwendung auf lokalisierte Applikationswege, wie der subkutanen oder dermalen Gabe, beschränkt. Um diese Einschränkung zu umgehen, könnte ein Aktivierungsstimulus wie beispielsweise ein Mustererkennungsrezeptorligand oder ein gegen CD40 gerichtetes Molekül an die Antikörper gegen CD205 und CD209 gekoppelt werden. Damit ließen sich dann auch nicht-dermale DZ-Populationen erreichen. Außerdem erhielten so nur Dendritische Zellen einen Aktivierungsstimulus, welche auch mit Antigen beladen wurden.

Im Mausmodell wurde die Kopplung von Adjuvans und Antigen an einen Antikörper bereits erfolgreich getestet (Palucka und Banchereau 2012). Es muss allerdings noch geklärt werden, ob so aktivierte humane Dendritische Zellen sämtliche notwendigen Eigenschaften aufweisen (Palucka und Banchereau 2012). Leider scheint die Kombination eines gegen CD205 gerichteten Antikörpers mit Ovalbumin als Modellantigen und zumindest CpG als Adjuvans problematisch, da die Beladung der Dendritischen Zelle zum Teil durch direkte Bindung des Nukleinsäureteils unabhängig von CD205 erfolgt. Ob dies auch für andere Moleküle der Fall ist, bleibt zu

untersuchen. Trotzdem sind Antigen-Adjuvans-Antikörper-Kombinationen den Antigen-Antikörper-Kombinationen mit löslichem Adjuvans überlegen (Kreutz 2012).

Wahrscheinlich ist es auch sinnvoll, mehrere verschiedene Subtypen Dendritischer Zellen parallel zu beladen. Dadurch lässt sich die Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Typen erreichen - beispielsweise hochpotente zytotoxische T-Zellen bei Adressierung CD141⁺ Dendritischer Zellen und CD103⁺CD8⁺ T-Gedächtniszellen bei Adressierung CD1c⁺ Dendritischer Zellen (Kastenmüller 2011; Palucka und Banchereau 2013).

Ein weiteres zu überwindendes Problem ist das immunsuppressive Milieu der Tumoren. Die immunsuppressive Tumor-Mikroumgebung ist vermutlich einer der wichtigsten Gründe, warum viele Studien bisher trotz messbarer spezifischer T-Zell-Antworten enttäuschende Ergebnisse lieferten (Gajewski 2007; Tacke und Figdor 2011). Tumoren können auf unterschiedliche Weise immunsuppressiv wirken. Zum einen exprimieren viele Tumoren nur geringe Mengen T-Zell-anziehender Chemokine wie CXCL9, CXCL10 und CCL5. Gleichzeitig ist die Produktion des regulatorische T-Zellen anziehenden CCL22 und des suppressive plasmazytoide Dendritische Zellen sowie myeloide Suppressorzellen anziehenden CXCL12 oft erhöht (Muthuswamy 2012; Kalinski 2013).

Aber selbst wenn aktivierte T-Zellen es bis zum Tumor schaffen – es gibt eine ganze Reihe Tumoren, in welchen sich aktivierte tumorantigen-spezifische T-Zellen finden – greifen diese die Tumorzellen meist nicht an. Stattdessen sind diese T-Zellen trotz funktionaler T-Zellen im Blut dysfunktional. Das liegt an zahlreichen T-Zell- und DZ-supprimierenden Mechanismen (Gajewski 2007):

- Interleukin-10: Inhibiert die Expression von MHC- und kostimulierenden Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Außerdem bewirkt es eine Herabregulierung der Zytokinausschüttung von Typ1-T-Helferzellen und induziert regulatorische T-Zellantworten (Sato 2011).
- Prostaglandin E₂: Siehe Abschnitt 4.3
- Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO): Supprimiert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und aktiviert regulatorische T-Zellen (Munn 2012).
- VEGF: Sorgt für eine fehlerhafte funktionale Reifung Dendritischer Zellen (Ohm und Carbone 2001).
- TGF- β : Bewirkt eine systemische Immunsuppression. Neutralisierung verstärkt T-Zell- und NK-Zell-Antworten gegen Tumoren (Yang 2010).

- Kontrollpunkt-Blockade: Darunter werden immunsuppressive Interaktionen in späteren Stadien der Immunantwort zusammengefasst. Die wichtigsten sind die Interaktionen zwischen zytotoxischem T-Lymphozyten-assoziiertem Antigen 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4) mit B7.1 und B7.2 sowie „Programmierter Tod 1“ (programmed death 1, PD1) mit seinem Liganden PD-L1. Beide sorgen für eine Herabregulierung T-Zell-Aktivierender Signalwege (Riley 2009; Hodi 2010).

Es gibt noch eine Reihe weitere bekannte (Palucka und Banchereau 2012) und sicherlich auch noch viele unbekannt Mechanismen.

Ein anti-CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab) sowie ein PD-1 Antikörper (Nivolumab) sind inzwischen zur Behandlung des malignen Melanoms zugelassen worden. Die Blockade einer Reihe löslicher Mediatoren wurde bereits erfolgreich in klinischen Studien getestet (Kalinski 2013). Tumor-Mikroumgebung-modifizierende Substanzen in Kombination mit DZ-basierter Vakzinierung zu testen, ist eine interessante Aufgabe für die nächsten Jahre.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DZ) sind als professionelle Antigen-präsentierende Zellen in den vergangenen Jahren ein potentes Werkzeug zur Immuntherapie maligner Tumoren geworden. Um die *Ex-vivo*-Manipulation der DZ zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Strategie zur Beladung dieser Zellpopulation *in vivo* verfolgt. Für die Antigenbeladung dieser Zellen kommen insbesondere Endozytoserezeptoren in Frage. Die Endozytose führt zu einer Kreuzpräsentation der durch Degradation erhaltenen Peptide im Kontext von MHC-Klasse I und II, d. h. zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen wie auch T-Helferzellen, was als vorteilhaft für die Induktion einer zellulären Immunantwort angesehen wird.

Die Bindungselektivität monoklonaler Antikörper ermöglicht es, diese Endozytoserezeptoren selektiv zu adressieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Fusionsproteine aus einer Antikörper- und einer Tumorantigen-Domäne in Form von Mini-Antikörpern generiert. Zur Herstellung des Mini-Antikörpers wurden einzelsträngige variable Fragmente (scFv), die gegen die Endozytoserezeptoren CD64, CD89, CD205 und CD209 gerichtet sind, mit einem Derivat eines humanen IgG₁-Fc-Teils rekombinant verknüpft, welches eine reduzierte Bindungsaktivität für humane Fc-Rezeptoren aufweist. C-terminal wurde das Tumormodellantigen HM1.24 an die Sequenz des Fc-Teils fusioniert.

Die in eukaryotischen Zellen exprimierten Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie angereichert. Die selektive Bindung der Moleküle an die Endozytoserezeptoren konnte durch eine durchflusszytometrische Analyse gezeigt werden. Hierbei wurden transgene Zelllinien eingesetzt, welche den jeweiligen Endozytoserezeptor exprimieren. Abschließend wurde die Bindung der Moleküle auf humanen DZ verifiziert. Die DZ wurden durch eine zytokininduzierte Differenzierung von Monozyten gesunder Spender erhalten. Hierbei zeigte sich, dass die Oberflächenexpression der Fc-Rezeptoren (CD64, CD89) in Abhängigkeit von den gewählten Zytokinen (IL-4/GM-CSF; IFN- α /GM-CSF; IFN- β /Interleukin-3) variierte. Aufgrund der Expressionshöhe und relativ selektiven Expression auf DZ scheinen daher die beiden Lektinrezeptoren CD205 und CD209 besonders gut für eine Antigenbeladung geeignet. Um das Potential der beiden Rezeptoren für die Vakzinierung zu belegen, stehen die beiden Antigen-Antikörper-Fusionsproteine für eine weitergehende funktionelle Charakterisierung zur Verfügung.

6. Literatur

- Aarntzen, E. H., M. Srinivas, F. Bonetto, L. J. Cruz, P. Verdijk, G. Schreibelt, M. van de Rakt, W. J. Lesterhuis, M. van Riel, C. J. Punt, G. J. Adema, A. Heerschap, C. G. Figdor, W. J. Oyen und I. J. de Vries (2013). "Targeting of 111In-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells." *Clinical Cancer Research* **19**(6): 1525-1533.
- Adema, G. J., I. J. de Vries, C. J. Punt und C. G. Figdor (2005). "Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas?" *Curr Opin Immunol* **17**(2): 170-174.
- Amigorena, S. (2002). "Fcγ Receptors and Cross-Presentation in Dendritic Cells." *Journal of Experimental Medicine* **195**(1): F1-F3.
- Badiee, A., N. Davies, K. McDonald, K. Radford, H. Michiue, D. Hart und M. Kato (2007). "Enhanced delivery of immunoliposomes to human dendritic cells by targeting the multilectin receptor DEC-205." *Vaccine*(25): 4757-4766.
- Bajtay, Z., E. Csomor, N. Sándor und A. Erdei (2006). "Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells." *Immunology Letters* **104**(1-2): 46-52.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, A. Charalambous, D. Darguste, S.-I. Fujii, H. Soares, M. Brimnes, B. Moltedo, T. Moran und R. Steinman (2004). "In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination." *The Journal of Experimental Medicine* **199**(6): 815-824.
- Brandão, J. G., R. J. Scheper, S. M. Loughheed, D. T. Curiel, B. W. Tillman, W. R. Gerritsen, A. J. M. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, H. J. Haisma und T. D. de Gruijl (2003). "CD40-targeted adenoviral gene transfer to dendritic cells through the use of a novel bispecific single-chain Fv antibody enhances cytotoxic T cell activation." *Vaccine* **21**(19-20): 2268-2272.
- Buelens, C., E. Bartholomé, Z. Amraoui, M. Boutriaux, I. Salmon, K. Thielemans, F. Willems und M. Goldman (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.
- Caminschi, I., S. Meuter und W. R. Heath (2013). "DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides." *Oncoimmunology* **2**(3): e23128.
- Chatterjee, B., A. Smed-Sörensen, L. Cohn, C. Chalouni, R. Vandlen, L. Byoung-Chul, J. Widger, T. Keler, L. Delamarre und I. Mellman (2012). "Internalization and endosomal degradation of receptor-bound antigens regulate the efficiency of cross presentation by human dendritic cells." *blood* **120**(10): 2011-2020.
- Chomarat, P., C. Dantin, L. Bennett, J. Banchereau und A. K. Palucka (2003). "TNF Skews Monocyte Differentiation from Macrophages to Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* **171**(5): 2262-2269.
- Collin, M., N. McGovern und M. Haniffa (2013). "Human dendritic cell subsets." *Immunology* **140**(1): 22-30.
- Condon, C., S. C. Watkins, C. M. Celluzzi, K. Thompson und L. D. Falo (1996). "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells." *Nature Medicine* **2**(10): 1122-1128.
- Cruz, L. J., R. A. Rosalia, J. W. Kleinovink, F. Rueda, C. W. Lowik und F. Ossendorp (2014). "Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study." *J Control Release* **192**: 209-218.

- Cruz, L. J., P. J. Tacken, F. Bonetto, S. I. Buschow, H. J. Croes, M. Wijers, I. J. de Vries und C. G. Figdor (2011). "Multimodal imaging of nanovaccine carriers targeted to human dendritic cells." *Mol Pharm* **8**(2): 520-531.
- Dauer, M., V. Lam, H. Arnold, J. Junkmann, R. Kiefl, C. Bauer, M. Schnurr, S. Endres und A. Eigler (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." *Journal of Immunological Methods* **337**(2): 97-105.
- Della Bella, S., S. Nicola, A. Riva, M. Biasin, M. Clerici und M. L. Villa (2004). "Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha." *J Leukoc Biol* **75**(1): 106-116.
- Dillman, R. O., A. A. Nanci, S. T. Williams, R. B. Kim, R. L. Hafer, C. L. Coleman, P. C. Wang, C. M. Duma, P. V. Chen, S. R. Selvan, A. N. Cornforth und C. DePriest (2010). "Durable complete response of refractory, progressing metastatic melanoma after treatment with a patient-specific vaccine." *Cancer Biother Radiopharm* **25**(5): 553-557.
- Dubensky, T. W., Jr. und S. G. Reed (2010). "Adjuvants for cancer vaccines." *Semin Immunol* **22**(3): 155-161.
- Fanger, N., K. Wardwell, L. Shen, T. Tedder und P. Guyre (1996). "Type I (CD64) and Type II (CD32) Fcγ Receptor-Mediated Phagocytosis by Human Blood Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* **157**(2): 541-548.
- Fay, J. W., A. K. Palucka, S. Paczesny, M. Dhodapkar, D. A. Johnston, S. Burkeholder, H. Ueno und J. Banchereau (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.
- Fehres, C., J. J. Garcia-Vallejo, W. W. Unger und Y. van Kooyk (2013). "Skin-resident antigen-presenting cells: instruction manual for vaccine development." *Front Immunol* **4**: 157.
- Figdor, C., Y. van Kooyk und G. Adema (2002). "C-Type Lectin Receptors on Dendritic Cells and Langerhans Cells." *Nature Reviews Immunology* **2**: 77-84.
- Flacher, V., C. H. Tripp, B. Haid, A. Kissenpfennig, B. Malissen, P. Stoitzner, J. Idoyaga und N. Romani (2012). "Skin langerin+ dendritic cells transport intradermally injected anti-DEC-205 antibodies but are not essential for subsequent cytotoxic CD8+ T cell responses." *J Immunol* **188**(5): 2146-2155.
- Flacher, V., C. H. Tripp, P. Stoitzner, B. Haid, S. Ebner, F. Koch, C. Park, R. Steinman, J. Idoyaga und N. Romani (2010). "Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis." *J Invest Dermatol* **130**(3): 755-762.
- Foged, C., A. Sundblad und L. Hovgaard (2002). "Targeting Vaccines to Dendritic Cells." *Pharmaceutical Research* **19**(3): 229-238.
- Gajewski, T. F. (2007). "Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment." *Clinical Cancer Research* **13**(18 Pt 1): 5256-5261.
- Galluzzi, L., L. Senovilla, E. Vacchelli, A. Eggermont, W. H. Fridman, J. Galon, C. Sautés-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel und G. Kroemer (2012). "Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy." *Oncoimmunology* **1**(7): 1111-1134.
- Geijtenbeek, T., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. Adema, Y. van Kooyk und C. Figdor (2000). "Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses." *Cell* **100**: 575-585.

- Geissmann, F., P. Launay, B. Pasquier, Y. Lepelletier, M. Leborgne, A. Lehuen, N. Brousse und R. C. Monteiro (2001). "A Subset of Human Dendritic Cells Expresses IgA Fc Receptor (CD89), Which Mediates Internalization and Activation Upon Cross-Linking by IgA Complexes." *Journal of Immunology* **166**(1): 346-352.
- Guettinger, Y., K. Barbin, M. Peipp, J. Bruenke, M. Dechant, H. Horner, D. Thierschmidt, T. Valerius, R. Repp, G. H. Fey und B. Stockmeyer (2010). "A recombinant bispecific single-chain fragment variable specific for HLA class II and Fc alpha RI (CD89) recruits polymorphonuclear neutrophils for efficient lysis of malignant B lymphoid cells." *J Immunol* **184**(3): 1210-1217.
- Guilliams, M., P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad und B. N. Lambrecht (2014). "The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages." *Nat Rev Immunol* **14**(2): 94-108.
- Hangalapura, B. N., D. Oosterhoff, S. Aggarwal, P. G. J. T. B. Wijnands, R. van de Ven, S. J. A. M. Santegoets, M. P. van den Tol, E. Hooijberg, A. Pereboev, A. J. M. van den Eertwegh, D. T. Curiel, R. J. Scheper und T. D. de Gruijl (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." *Journal of Immunotherapy* **33**(7): 706-715 [10.1097/CJI.1090b1013e3181eccbd1094](https://doi.org/10.1097/CJI.1090b1013e3181eccbd1094).
- Hart, D. (1997). "Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response." *Blood*(90): 3245-3287.
- Hartung, E., M. Becker, A. Bachem, N. Reeg, A. Jakel, A. Hutloff, H. Weber, C. Weise, C. Giesecke, V. Henn, S. Gurka, K. Anastassiadis, H. W. Mages und R. A. Kroccek (2015). "Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1." *J Immunol* **194**(3): 1069-1079.
- Hesse, C., W. Ginter, T. Förg, C. T. Mayer, A. M. Baru, C. Arnold-Schrauf, W. W. Unger, H. Kalay, Y. van Kooyk, L. Berod und T. Sparwasser (2013). "In vivo targeting of human DC-SIGN drastically enhances CD8 T-cell-mediated protective immunity." *Eur J Immunol*.
- Heystek, H., C. Moulon, A. M. Woltman, P. Garonne und C. van Kooten (2002). "Human Immature Dendritic Cells Efficiently Bind and Take up Secretory IgA Without the Induction of Maturation." *Journal of Immunology* **168**(1): 102-107.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos und W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *The New England Journal of Medicine* **363**(8): 711-723.
- Idoyaga, J., C. Cheong, K. Suda, N. Suda, J. Kim, H. Lee, C. G. Park und R. Steinman (2008). "Cutting Edge: Langerin/CD207 Receptor on Dendritic Cells Mediates Efficient Antigen Presentation on MHC I and II Products In Vivo." *The Journal of Immunology* **180**(6): 3647-3650
- Jewell, C., S. López und D. Irvine (2011). "In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(38): 15745-15750.
- Jonuleit, H., U. Kühn, G. Müller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, K. J. und A. Enk (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *European Journal of Immunology* **27**(12): 3135-3142.

- Kaka, A. S., A. E. Foster, H. L. Weiss, C. M. Rooney und A. M. Leen (2008). "Using dendritic cell maturation and IL-12 producing capacity as markers of function: a cautionary tale." *J Immunother* **31**(4): 359-369.
- Kalergis, A. M. (2002). "Inducing Tumor Immunity through the Selective Engagement of Activating Fcγ Receptors on Dendritic Cells." *Journal of Experimental Medicine* **195**(12): 1653-1659.
- Kalinski, P., R. Muthuswamy und J. Urban (2013). "Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies." *Expert Review of Vaccines* **12**(3): 285-295.
- Kastenmüller, K., U. Wille-Reece, R. W. Lindsay, L. R. Trager, P. A. Darrah, B. J. Flynn, M. R. Becker, M. C. Udey, B. E. Clausen, B. Z. Igyarto, D. H. Kaplan, W. Kastenmuller, R. N. Germain und R. A. Seder (2011). "Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets." *The Journal of Clinical Investigation* **121**(5): 1782-1796.
- Kastenmüller, W., K. Kastenmüller, C. Kurts und R. A. Seder (2014). "Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype?" *Nat Rev Immunol* **14**(10): 705-711.
- Kato, M., K. J. McDonald, S. Khan, I. L. Ross, S. Vuckovic, K. Chen, D. Munster, K. P. MacDonald und D. Hart (2006). "Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes." *Int Immunol* **18**(6): 857-869.
- Kim, S., H. O. Kim, H. J. Kim, K. Lee und H. S. Kim (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.
- Klechevsky, E., M. Liu, R. Morita, R. Banchereau, L. Thompson-Snipes, A. K. Palucka, H. Ueno und J. Banchereau (2009). "Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines." *Hum Immunol* **70**(5): 281-288.
- Korokhov, N., S. Nouredini, D. Curiel, S. Santegoets, R. Scheper und T. de Gruijl (2005). "A Single-Component CD40-Targeted Adenovirus Vector Displays Highly Efficient Transduction and Activation of Dendritic Cells in a Human Skin Substrate System." *Molecular Pharmaceutics* **2**(3): 218-223.
- Kreiter, S., A. Selmi, M. Diken, M. Sebastian, P. Osterloh, H. Schild, C. Huber, O. Tureci und U. Sahin (2007). "Increased Antigen Presentation Efficiency by Coupling Antigens to MHC Class I Trafficking Signals." *The Journal of Immunology* **180**(1): 309-318.
- Kretz-Rommel, A. (2007). "In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models." *Journal of Immunotherapy* **30**(7): 715-726.
- Kreutz, M., B. Giquel, Q. Hu, R. Abuknesha, S. Uematsu, S. Akira, F. Nestle und S. Diebold (2012). "Antibody-Antigen-Adjuvant Conjugates Enable Co-Delivery of Antigen and Adjuvant to Dendritic Cells in Cis but Only Have Partial Targeting Specificity." *PLoS ONE* **7**(7): 1-12.
- Kreutz, M. und P. J. Tacken (2013). "Targeting dendritic cells – why bother?" *Blood* **121**(15): 2836-2844.
- Lipscomb, M. F. und B. J. Masten (2002). "Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease." *Physiological Reviews*(82): 97-130.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors." *Annual Review of Immunology* **23**: 275-306.

- Mahnke, K., Y. Qian, S. Fondel, J. Brueck, C. Becker und A. Enk (2005). "Targeting of Antigens to Activated Dendritic Cells In vivo Cures Metastatic Melanoma in Mice." *Cancer Res* **65**(15): 7007-7012.
- Mailliard, R., A. Wankowicz-Kalinska, Q. Cai, A. Wesa, C. Hilkens, M. Kapsenberg, J. Kirkwood, W. Storkus und P. Kalinski (2004). " α -Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity." *Cancer Research* **64**(17): 5934-5937.
- Mohamadzadeh, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka und J. Banchereau (2001). "Interleukin 15 Skews Monocyte Differentiation into Dendritic Cells with Features of Langerhans Cells." *Journal of Experimental Medicine* **194**(7): 1013-1019.
- Mohty, M., A. Vialle-Castellano, J. A. Nunes, D. Isnardon, D. Olive und B. Gaugler (2003). "IFN- α Skews Monocyte Differentiation into Toll-Like Receptor 7-Expressing Dendritic Cells with Potent Functional Activities." *The Journal of Immunology* **171**(7): 3385-3393.
- Morel, Y., A. Truneh, R. W. Sweet, D. Olive und R. T. Costello (2001). "The TNF Superfamily Members LIGHT and CD154 (CD40 Ligand) Costimulate Induction of Dendritic Cell Maturation and Elicit Specific CTL Activity." *The Journal of Immunology* **167**(5): 2479-2486.
- Munn, D. H. (2012). "BlockingIDO activity to enhance anti-tumor immunity." *Frontiers in bioscience (Elite edition)* **4**: 734-745.
- Muthuswamy, R., E. Berk, B. F. Junecko, H. J. Zeh, A. H. Zureikat, D. Normolle, T. M. Luong, T. A. Reinhart, D. L. Bartlett und P. Kalinski (2012). "NF-kappaB hyperactivation in tumor tissues allows tumor-selective reprogramming of the chemokine microenvironment to enhance the recruitment of cytolytic T effector cells." *Cancer Research* **72**(15): 3735-3743.
- Muthuswamy, R., J. Urban, J. J. Lee, T. A. Reinhart, D. Bartlett und P. Kalinski (2008). "Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation." *Cancer Research* **68**(14): 5972-5978.
- Nguyen-Pham, T. N., Y. K. Lee, H. J. Lee, M. H. Kim, D. H. Yang, H. J. Kim und J. J. Lee (2012). "Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma." *The Korean Journal of Hematology* **47**(1): 17-27.
- Oganesyan, V., C. Gao, L. Shirinian, H. Wu und W. F. Dall'Acqua (2008). "Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**(Pt 6): 700-704.
- Ohm, J. und D. Carbone (2001). "VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency." *Immunologic Research* **23**(2-3): 263-272.
- Otten, M. und M. van Egmond (2004). "The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89)." *Immunology Letters* **92**(1-2): 23-31.
- Palucka, K. und J. Banchereau (2012). "Cancer immunotherapy via dendritic cells." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 265-277.
- Palucka, K. und J. Banchereau (2013). "Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines." *Immunity* **39**(1): 38-48.
- Paquette, R., N. C. Hsu, S. M. Kiertscher, A. N. Park, L. Tran, M. D. Roth und G. J. A. (1998). "Interferon- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells." *Journal of Leukocyte Biology* **64**: 358-367.

- Pasquier, B., P. Launay, Y. Kanamaru, I. C. Moura, S. Pfirsch, C. Ruffié, D. Hénin, M. Benhamou, M. Pretolani, U. Blank und R. C. Monteiro (2005). "Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM." *Immunity* **22**(1): 31-42.
- Pasquier, B., Y. Lepelletier, C. Baude, O. Hermine und R. C. Monteiro (2004). "Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells." *Journal of Leukocyte Biology* **76**(6): 1134-1141.
- Pereira, C., R. Torensma, K. Hebeda, A. Kretz-Rommel, S. Faas, C. Figdor und G. Adema (2007). "In Vivo Targeting of DC-SIGN-positive Antigen-presenting Cells in a Nonhuman Primate Model." *Journal of Immunotherapy* **30**(7): 705-714.
- Rafiq, K., A. Bergtold und R. Clynes (2002). "Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity." *Journal of Clinical Investigation* **110**(1): 71-79.
- Riley, J. L. (2009). "PD-1 signaling in primary T cells." *Immunological Reviews* **229**(1): 114-125.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. Fritsch, R. Steinman und G. Schuler (1994). "Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood " *Journal of Experimental Medicine* **180**: 83-93.
- Rosalia, R. A., L. J. Cruz, S. van Duikeren, A. T. Tromp, A. L. Silva, W. Jiskoot, T. de Gruijl, C. Löwik, J. Oostendorp, S. H. van der Burg und F. Ossendorp (2015). "CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses." *Biomaterials* **40**(0): 88-97.
- Sallusto, F. und A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *The Journal of Experimental Medicine* **179**(4): 1109-1118.
- Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell und C. Reis e Sousa (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." *Nature* **458**(7240): 899-903.
- Sato, T., M. Terai, Y. Tamura, V. Alexeev, M. J. Mastrangelo und S. R. Selvan (2011). "Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy." *Immunologic Research* **51**(2-3): 170-182.
- Schuurhuis, D. H., N. van Montfoort, A. Ioan-Facsinay, R. Jiawan, M. Camps, J. Nouta, C. J. M. Melief, J. S. Verbeek und F. Ossendorp (2006). "Immune Complex-Loaded Dendritic Cells Are Superior to Soluble Immune Complexes as Antitumor Vaccine." *The Journal of Immunology* **176**(8): 4573-4580.
- Segura, E. und S. Amigorena (2014). "Cross-presentation by human dendritic cell subsets." *Immunol Lett* **158**(1-2): 73-78.
- Speiser, D. E. und P. Romero (2010). "Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity." *Semin Immunol* **22**(3): 144-154.
- Steinbrink, K., L. Paragnik, H. Jonuleit, T. Tüting, J. Knop und A. H. Enk (2000). "Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins." *Archives of Dermatological Research* **292**(9): 437-445.
- Steinman, R. M. (2012). "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." *Annu Rev Immunol* **30**: 1-22.
- Swiggard, W. J., A. Mirza, M. C. Nussenzweig und R. Steinman (1995). "DEC-205, a 205-kDa Protein Abundant on Mouse Dendritic Cells and Thymic Epithelium That Is Detected by the Monoclonal Antibody NLDC-145: Purification, Characterization, and N-Terminal Amino Acid Sequence." *Cellular Immunology* **165**(2): 302-311.

- Tacke, P. J., I. J. de Vries, R. Torensma und C. G. Figdor (2007). "Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 790-802.
- Tacke, P. J. und C. G. Figdor (2011). "Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines." *Semin Immunol* **23**(1): 12-20.
- Tacke, P. J., B. Joosten, A. Reddy, D. Wu, A. Eek, P. Laverman, A. Kretz-Rommel, G. Adema, R. Torensma und C. G. Figdor (2008). "No Advantage of Cell-Penetrating Peptides over Receptor-Specific Antibodies in Targeting Antigen to Human Dendritic Cells for Cross-Presentation." *The Journal of Immunology* **180**: 7687-7696.
- Tacke, P. J., R. Torensma und C. G. Figdor (2006). "Targeting antigens to dendritic cells in vivo." *Immunobiology* **211**(6-8): 599-608.
- te Velde, A., R. Huijbens, J. de Vries und C. Figdor (1990). "IL-4 decreases FcγR membrane expression and and FcγR-mediated cytotoxic activity of human monocytes." *The Journal of Immunology* **144**(8): 3046-3051.
- te Velde, A., R. Waal Malefijt, R. Huijbens, J. de Vries und C. Figdor (1992). "IL-10 stimulates monocyte FcγR surface expression and cytotoxic activity." *The Journal of Immunology* **149**(12): 4048-4052.
- Tillman, B., T. de Gruijl, S. Luykx-de Bakker, R. Scheper, H. Pinedo, T. Curiel, W. Gerritsen und D. Curiel (1999). "Maturation of Dendritic Cells Accompanies High-Efficiency Gene Transfer by a CD40-Targeted Adenoviral Vector." *The Journal of Immunology* **162**(11): 6378-6383.
- Tuyaerts, S., A. Michiels, J. Corthals, A. Bonehill, C. Heirman, C. de Greef, S. M. Noppe und K. Thielemans (2003). "Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells." *Cancer Gene Ther* **10**(9): 696-706.
- Ueno, H., N. Schmitt, E. Klechevsky, A. Pedroza-Gonzalez, T. Matsui, G. Zurawski, S. Oh, J. Fay, V. Pascual, J. Banchereau und A. K. Palucka (2010). "Harnessing human dendritic cell subsets for medicine." *Immunol Rev* **234**(1): 199-212.
- van Kooyk, Y. und T. Geijtenbeek (2003). "DC-SIGN: escape mechanism for pathogens." *Nat Rev Immunol* **3**(9): 697-709.
- van Montfoort, N., M. G. Camps, S. Khan, D. V. Filippov, J. J. Weterings, J. M. Griffith, H. J. Geuze, T. van Hall, J. S. Verbeek, C. J. Melief und F. Ossendorp (2009). "Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(16): 6730-6735.
- Viaud, S., C. Théry, S. Ploix, T. Tursz, V. Lapiere, O. Lantz, L. Zitvogel und N. Chaput (2010). "Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?" *Cancer Res* **70**(4): 1281-1285.
- Wallace, P. K., K. Y. Tsang, J. Goldstein, P. Correale, T. M. Jarry, J. Schlom, P. Guyre, M. S. Ernstoff und M. W. Fanger (2001). "Exogenous antigen targeted to FcγRI on myeloid cells is presented in association with MHC class I." *Journal of Immunological Methods* **248**: 183-194.
- Watchmaker, P. B., E. Berk, R. Muthuswamy, R. B. Mailliard, J. A. Urban, J. M. Kirkwood und P. Kalinski (2010). "Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8+ T cell expansion by dendritic cells." *The Journal of Immunology* **184**(2): 591-597.

- Wimmers, F., G. Schreibelt, A. E. Skold, C. G. Figdor und I. J. De Vries (2014). "Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From in vitro Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets." *Front Immunol* **5**: 165.
- Yang, L., Y. Pang und H. L. Moses (2010). "TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression." *Trends in Immunology* **31**(6): 220-227.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn und M. B. Lutz (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *blood* **116**(16): e74-80.

7. Veröffentlichungen

Laufer S, Staudinger M, Peipp M, Kellner K, Repp R, und Gramatzki M (2010). **Targeting endocytosis receptors on DC for antigen delivery by recombinant mini-antibodies.** *33rd Symposium of the North-German Immunologists*, Borstel

8. Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Staudinger für die herausragende Betreuung meiner Arbeit sowie seine großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ich danke auch den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen des Instituts für die ausgesprochen liebe Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung meiner Versuche.

Weiterhin danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Roland Repp für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt auch meiner Freundin Claire, die mit ihrer stetigen Motivation das Schreiben dieser Arbeit vorangebracht hat.

Ganz besonders empfinde ich tiefste Dankbarkeit meinen Eltern gegenüber, die mit ihrer Unterstützung mein Studium und das Schreiben dieser Arbeit erst ermöglichten.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sathya Laufer
Geburtsdatum: 22. Juli 1985
Geburtsort: Eckernförde

Ausbildung

2005 – 2014 **Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit der Abschlussnote 1,83**

12/2012 – 01/2013 Halbes Tertial des Praktischen Jahres in der Allgemeinen und Thoraxchirurgie sowie Unfallchirurgie des Christian Medical College in Vellore (Indien).

10/2012 – 12/2012 Halbes Tertial des Praktischen Jahres in der Allgemeinen und Thoraxchirurgie sowie der Herz- und Gefäßchirurgie des Shanghai East Hospital (China)

09/2012 Teilnahme an der Summer School Neurologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel

06/2012 – 10/2012 PJ-Tertial in der Inneren Medizin des Westküstenklinikums in Heide

07/2012 – 06/2012 PJ-Tertial in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel

- 02/2011 – 03/2011 Famulatur in der Inneren Medizin des Komfo Anokye Teaching Hospitals in Kumasi (Ghana) über den BVMD
- 03/2010 Famulatur im Labor der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel
- 09/2010 – 10/2010 Famulatur in der Klinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel
- 08/2010 – 09/2010 Famulatur in der ophthalmologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel
- 09/2009 Famulatur in der Inneren Medizin des Friedrich-Ebert-Krankenhauses in Neumünster
- 10/2008 – 02/2009 Besuch von Vorlesungen, Seminaren und Praktika der Studienfächer Physik und Informatik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 09/2008 – 10/2008 Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Grötzinger im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 1996 – 2005** **Abitur an der Kieler Gelehrtenschule**
- 2002 1. Preis im Landeswettbewerb Jugend forscht im Fachgebiet Mathematik/Informatik