

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung  
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Tumorvakzinierung: Chitosan-Nanopartikel als Vehikel zur Verbesserung der Antigen-  
aufnahme von antigenpräsentierenden Zellen und einer tumorgerichteten Immunantwort**

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

vorgelegt von

**Elsa Winter**

aus Schwalmstadt

Kiel 2024

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.04.2025

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Krebserkrankungen und -therapie.....	1
1.1.1 Entstehung von Krebs .....	1
1.1.2 Die gesellschaftliche Rolle von Krebs .....	2
1.1.3 Konventionelle Krebstherapie .....	2
1.2 Immunsystem.....	4
1.2.1 Einführung .....	4
1.2.2 Unspezifisches Immunsystem.....	5
1.2.3 Spezifisches Immunsystem.....	6
1.2.4 Immunsystem und Krebs.....	7
1.3 Immuntherapie gegen Krebs .....	8
1.3.1 Notwendigkeit zielgerichteter Krebstherapie .....	8
1.3.2 Anwendung von Immuntherapie .....	9
1.4 Tumorstabilisierung.....	10
1.4.1 Nutzung von Nanopartikeln .....	13
1.4.2 Nanopartikel aus Chitosan.....	15
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2 Material .....</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte und Zubehör.....	18
2.2 Verbrauchsgegenstände.....	20
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	20
2.4 Puffer.....	22
2.5 Zellbiologische Materialien.....	22
2.5.1 Humane Zelllinien.....	22
2.5.2 Murine Zelllinie .....	23
2.5.3 Humane Primärzellen.....	23
2.5.4 Zellkulturzusätze .....	24
2.5.5 Wachstumsfaktoren und Zytokine .....	24
2.5.6 Mykoplasmen-Kontaminationstest .....	24
2.6 Medien.....	25
2.7 Antikörper .....	26

---

2.7.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	26
2.7.2	Antikörper für die ImageStream-Analyse.....	27
2.7.3	Antikörper für die Konfokalmikroskopie .....	28
2.8	Chitosan-Nanopartikel .....	28
2.9	Software .....	28
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Kultivierung von Zelllinien.....	29
3.1.1	Auftauen der Zellen .....	29
3.1.2	Lagerung und Passagierung von Zellen.....	29
3.1.3	Zählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer.....	30
3.1.4	Einfrieren von Zellen .....	31
3.2	Isolierung humaner Primärzellen.....	31
3.2.1	Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung primärer mononukleärer Zellen aus Spenderblut .....	31
3.2.2	Gegenstromzentrifugation zur Trennung von Lymphozyten und Monozyten .....	32
3.2.3	Bestimmung der Monozytenreinheit mittels Durchflusszytometrie.....	33
3.3	Differenzierung humaner Primärzellen zu antigenpräsentierenden Zellen .....	34
3.3.1	Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen .....	34
3.3.2	Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen .....	35
3.4	Aussaat der Zellen für Nanopartikelaufnahmeversuche.....	35
3.5	Kokultur.....	36
3.6	Chitosan-Nanopartikel .....	36
3.6.1	Herstellung der Chitosan-Nanopartikel.....	36
3.6.2	Größe der Chitosan-Nanopartikel.....	37
3.7	Inkubation der Zellen mit Chitosan-Nanopartikeln.....	37
3.8	Durchflusszytometrische Analyse .....	38
3.8.1	Vorbereitung der Zellen.....	38
3.8.2	Färbung zur Analyse der Zellcharakterisierung.....	38
3.8.3	Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertungsmethode.....	39
3.9	ImageStream-Analyse .....	40
3.10	Konfokalmikroskopie.....	41
3.11	Statistische Auswertung.....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1	Assoziation von Chitosan-Nanopartikeln und antigenpräsentierenden Zellen .....	43
4.1.1	Analyse der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie .....	43
4.1.2	Bestimmung des Anteils an FITC-positiven Zellen .....	44
4.2	Morphologie dendritischer Zellen nach Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel.....	46
4.3	Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in antigenpräsentierende Zellen .....	47
4.3.1	Analyse der Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln mittels ImageStream-Verfahren .....	47
4.3.2	Bestimmung des Internalisierungsscores.....	50
4.3.3	Bestimmung des Anteils der Zellen mit Chitosan-Nanopartikelaufnahme.....	51

---

4.4	Konfokalmikroskopie dendritischer Zellen nach Chitosan-Nanopartikelzugabe .....	53
4.5	Assoziation von Chitosan-Nanopartikeln mit anderen Zelltypen.....	54
4.5.1	Analyse der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie .....	54
4.5.2	Bestimmung des Anteils an FITC-positiven Zellen .....	55
4.6	Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in andere Zelltypen .....	57
4.6.1	Analyse mittels ImageStream-Verfahren .....	57
4.6.2	Chitosan-Nanopartikelaufnahme in Lungenepithelzellen .....	58
4.7	Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in dendritische Zellen kokultiviert mit Lungenepithelzellen .....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
5.1	Effiziente Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel in antigen- präsentierende Zellen .....	62
5.2	Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel auch in nicht-antigenpräsentierende Zelltypen .....	66
5.3	Einfluss der Größe der Chitosan-Nanopartikel .....	68
5.3.1	Kein ausgeprägter Einfluss der Chitosan-Nanopartikel-Größe auf die Aufnahme in Zellen .....	68
5.3.2	Beeinflussung der Morphologie dendritischer Zellen durch große Chitosan-Nanopartikel .....	71
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	72
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>
8.1	Ethikvotum .....	87
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	„Cancer-Immunity Cycle“, Ablauf der Immunreaktion gegen Krebszellen.....	7
Abbildung 2	DC-Vakzinierung <i>ex vivo</i> .....	12
Abbildung 3	Schematische Darstellung der möglichen Aufnahmewege antigenbeladener Nanopartikel über die Mukosa.....	14
Abbildung 4	Chemische Struktur von Chitosan.....	15
Abbildung 5	Schichtung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation.....	32
Abbildung 6	Elutriationsschema.....	33
Abbildung 7	Durchflusszytometrische Differenzierung zwischen Monozyten- und Lymphozytenpopulationen.....	34
Abbildung 8	Chitosan-Nanopartikel.....	36
Abbildung 9	Durchflusszytometrie „Gating“.....	40
Abbildung 10	Mediane Fluoreszenzintensität bei antigenpräsentierenden Zellen nach Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Chitosan-Nanopartikeln.....	44
Abbildung 11	Anteil an FITC-positiven antigenpräsentierenden Zellen nach Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Chitosan-Nanopartikeln.....	45
Abbildung 12	Lichtmikroskopie der humanen dendritischen Zellen nach Zugabe von Chitosan-Nanopartikeln verschiedener Größe.....	46
Abbildung 13	ImageStream-Bilder von humanen dendritischen Zellen nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln.....	48
Abbildung 14	Bestimmung der Internalisierung der Chitosan-Nanopartikel und Berechnung der Internalisierung anhand der Hellfeldmikroskopie oder Membranfärbung.....	49
Abbildung 15	Internalisierungsscores der durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommenen Chitosan-Nanopartikel.....	51
Abbildung 16	Anteil der antigenpräsentierenden Zellen mit Chitosan-Nanopartikelaufnahme.....	52
Abbildung 17	Konfokalmikroskopie dendritischer Zellen nach Chitosan-Nanopartikelaufnahme.....	53

---

Abbildung 18	Mediane Fluoreszenzintensität bei Lungen- und Pankreasepithelzellen sowie pankreatischen Fibroblasten nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln.....	55
Abbildung 19	Anteil an FITC-positiven Lungenepithelzellen und Pankreasepithelzellen sowie pankreatischen Fibroblasten nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln.....	56
Abbildung 20	ImageStream-Bilder von Lungenepithelzellen und pankreatischen Zellen nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln.....	57
Abbildung 21	Chitosan-Nanopartikelaufnahme in Lungenepithelzellen.....	58
Abbildung 22	ImageStream-Bilder von humanen dendritischen Zellen und Lungenepithelzellen nach Kokultur und Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln.....	59
Abbildung 23	Anteil der Zellen mit Chitosan-Nanopartikelaufnahme nach Kokultur von humanen Lungenepithelzellen und dendritischen Zellen.....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chitosan-Nanopartikelgrößen.....	37
-----------	----------------------------------	----

## Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	<i>Antigen presenting cells</i> , antigenpräsentierende Zellen
AT	Österreich
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen (immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen)
CH	Schweiz
CMC	Carboxymethylcellulose
CNP	Chitosan-Nanopartikel
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> , zytotoxische T-Zellen
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>
DC	<i>Dendritic cells</i> , dendritische Zellen
DE	Deutschland
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
<i>Et al.</i>	<i>Et alii</i> , und andere
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Zellsortierung anhand Fluoreszenz
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Frankreich
FSC	<i>Forward scatter (channel)</i> , Vorwärtsstreuung
G	Gravitationskonstante
g	Gramm

---

GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPDE	<i>Human pancreatic duct epithelium</i> , humanes pankreatisches Gangepithel
HPV	Humanes Papillomavirus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JP	Japan
l	Liter
m	Milli
M	Mol
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> , Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
M-Zelle	<i>Microfold cell</i> , spezialisierte Immunzelle im Epithel des MALT
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting/separation</i> , magnetische Zellseparation
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i> , Schleimhaut-/Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
M $\phi$	Makrophagen
$\mu$	Mikro
NALT	<i>Nasal-associated lymphoid tissue</i> , nasenassoziiertes lymphatisches Gewebe
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
p	p-Wert (Signifikanzwert)
Pa·s	Pascalsekunde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , duktales Pankreasadenokarzinom
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin

---

PFA	Paraformaldehyd
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
Poly I:C	Polyinosinsäure-Polycytidylsäure-Natriumsalz
PSC	<i>Pancreatic stellate cells</i> , Pankreassternzellen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	<i>Side scatter (channel)</i> , Seitwärtsstreuung
TH	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
U	Unit
UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen und -therapie

### 1.1.1 Entstehung von Krebs

Bei Krebserkrankungen kommt es zu einer unkontrollierten Vermehrung von Zellen des eigenen Körpers mit invasiv-infiltrierendem Wachstum in gesundes Gewebe hinein (Hanahan und Weinberg, 2000). Dies wird als malignes Tumorwachstum bezeichnet. Die sich schnell teilenden und verbreitenden Krebszellen sind zusätzlich dazu in der Lage, sich über Blut- und Lymphbahnen auszubreiten und Tumorabsiedelungen, sogenannte Metastasen, in entfernteren Körperregionen zu bilden (Valastyan und Weinberg, 2011).

Normalerweise durchlaufen Körperzellen einen kontrollierten Zellzyklus und teilen sich nur bei Bedarf. Dabei unterliegen sie einem Regulationssystem, das sicherstellt, dass geschädigte Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose, übergehen (Rassow *et al.*, 2012). Durch eine Folge von Mutationen kann aus einer Körperzelle eine Tumorzelle werden. Relevante Mutationen finden vor allem in Genen statt, die das Zellwachstum und die Zellproliferation regulieren, sowie in solchen, die eine Rolle in der DNA-Reparatur innehaben. Typische Mutationsschritte bei der Karzinogenese (Krebsentstehung) sind die Aktivierung von Protoonkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Apoptose-regulierenden Genen (Schmezer, 2006). So entziehen sich die Tumorzellen den regulatorischen Einflüssen und können sogar in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren proliferieren, eine unbegrenzte Anzahl von Zellteilungen durchführen und invasiv wachsen (Rassow *et al.*, 2012).

Neben dem Alter als wichtigster und nicht vermeidbarer Risikofaktor für Krebs sind karzinogenesebegünstigende Faktoren eine Exposition gegenüber bestimmten chemischen Noxen, z.B. aromatischen Kohlenwasserstoffen in Benzin und Zigarettenrauch, oder biologischen Stoffen wie Aflatoxinen aus Schimmelpilzsporen. Auch physikalische Noxen wie UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung führen zu DNA-Schäden. Außerdem kann eine Infektion mit einem onkogenen Virus, wie z.B. Humanes Papillomavirus (HPV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) durch Inaktivierung der Zellzyklusregulation eine Karzinomentstehung zur Folge haben (Hiddemann *et al.*, 2010). Je nach Krebserkrankung spielen neben Rauchen und Alkoholkonsum weitere Lebensstilfaktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel und eine ungesunde Ernährung eine gewichtige Rolle (Jackson *et al.*, 2018, Norat *et al.*, 2015).

Auch genetische Veranlagung kann das Risiko für ein Auftreten bestimmter Krebsentitäten erhöhen (Sifri, Gangadharappa und Acheson, 2004).

### 1.1.2 Die gesellschaftliche Rolle von Krebs

Krebserkrankungen spielen in Deutschland eine große Rolle. Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind sie hierzulande die zweithäufigste Todesursache (Böhm, 2021). Zwar geht die altersstandardisierte Krebssterblichkeit durch die Möglichkeiten besserer Prävention, Früherkennung und Behandlung zurück, fünf Jahre nach Diagnosestellung lebt jedoch weiterhin im Durchschnitt nur noch die Hälfte aller Krebserkrankten (Kaatsch *et al.*, 2019). Den größten Anteil an krebsbedingten Sterbefällen in Deutschland machte im Jahr 2020 bei Frauen mit 17,6 % Brustkrebs aus, es folgten mit 16,3 % Lungenkrebs, 10,2 % Darmkrebs und mit 9 % Pankreaskarzinome. Bei Männern führte mit 22,2 % Lungenkrebs die Krebstodesursachen an, mit 12,3 % folgte Prostatakrebs, vor Darmkrebs und Pankreaskarzinomen.

Rund eine halbe Millionen Personen erkranken jährlich in Deutschland neu an Krebs. Aufgrund der demographischen Entwicklung wird mit einem Anstieg der Krebsneuerkrankungen gerechnet. Statistisch betrachtet wird jede zweite deutsche Person in ihrem Leben von einer Krebserkrankung betroffen sein (Ronckers *et al.*, 2023).

Krebserkrankungen sind jährlich für rund 20 % der gesamten krankheitsbedingt verlorenen Lebenszeit und Lebensqualität der deutschen Bevölkerung verantwortlich (Schlander, Hernandez-Villafuerte und Thielscher, 2018).

### 1.1.3 Konventionelle Krebstherapie

#### 1.1.3.1 Chemotherapie

Eine Reduzierung der schnell proliferierenden Tumorzellen kann bei Krebserkrankungen mit dem Einsatz von Zytostatika im Rahmen einer Chemotherapie erfolgen. Unterschiedliche Zytostatikawirkgruppen, wie Alkylanzien, Topoisomerase-Hemmstoffe, Mitosehemmstoffe und Antimetabolite, können bei verschiedenen Krebsarten eingesetzt werden. Chemotherapeutika können außer als kurative Therapie auch neoadjuvant zur präoperativen Reduktion der Tumormasse eingesetzt werden, adjuvant zur postoperativen Senkung eines Rezidivrisikos, oder palliativ zur Verlängerung der Lebenszeit oder Reduzierung der tumorbedingten Symptomaten (Pfreundschuh, 2006).

Bei jedem chemotherapeutisch eingesetzten Wirkstoff wirkt der toxische Effekt nicht nur auf die sich schnell teilenden Krebszellen, sondern auch auf sich schnell teilende gesunde Körperzellen, z.B. die des blutbildenden Systems und die der Magen- und Darmschleimhaut. So kann es zu

einer Myelosuppression kommen, die mit erhöhter Infektanfälligkeit, Blutungsneigung und einer Anämie einhergehen kann. Außerdem treten häufig Enteritiden, Übelkeit, Erbrechen sowie Haarausfall auf (Pfreundschuh, 2006).

Im Verlauf oder auch schon zu Beginn einer Chemotherapie können Krebszellen Resistenzen gegen die Wirkung von Zytostatika bilden. Bei den häufig verwendeten Mitosehemmstoffen wie Taxanen, die als Spindelgift einen Stillstand der Mitose in Tumorzellen bewirken, können die Zellen, die eine Resistenz ausgebildet haben, dem Mitosestopp, der normalerweise den Zelltod auslöst, entkommen, in den Zellzyklus zurückkehren und sich weiter teilen (Haschka *et al.*, 2018). Außerdem verursachen Zytostatika selbst Mutationen in Keimzellen und wirken damit wiederum karzinogen (Pfreundschuh, 2006).

Chemotherapie ist eine oft gut wirksame Methode zur Behandlung von Krebserkrankungen, die allerdings nicht in allen Fällen erfolgsversprechend eingesetzt werden kann. Starke Nebenwirkungen sind häufig therapielimitierend und die eigene Induktion von Mutationen begünstigt das Risiko für das Auftreten von Zweittumoren.

### **1.1.3.2 Operationen**

Gerade in einem frühen Krebsstadium kann es möglich sein, (solide) Tumoren operativ vollständig zu entfernen und dabei das umliegende gesunde Gewebe so ausreichend zu schonen, dass es in seiner Funktion erhalten bleibt. Je nach Ausdehnung und Lokalisation des Tumors kann es aber zusätzlich auch nötig sein, umliegende (tumorzellinfiltrierte) Lymphknoten und Organe oder Organteile mitzuentfernen, was entsprechende Nebenwirkungen nach sich ziehen kann. Ist aufgrund der Ausdehnung des Tumors, der notwendigen Funktionserhaltung von Organen oder des klinischen Zustands der erkrankten Person keine radikaloperative Krebsentfernung möglich, können Operationen zur Verkleinerung großer Tumoren symptomlindernd wirken und/oder die Voraussetzungen für eine Chemo- oder Strahlentherapie verbessern. Auch einzelne Metastasen operativ zu entfernen kann oft sinnvoll sein (Pfreundschuh, 2006).

Insgesamt stellt der Einsatz von Operationen eine sinnvolle Methode in der Krebstherapie dar, die aber nicht bei jeder Krebserkrankung angewendet werden kann und oft nur in frühen Stadien alleine ausreicht, um eine Heilung zu bewirken.

### **1.1.3.3 Hormontherapie**

Bei Krebsarten die hormonsensitiv sind und abhängig von körpereigenen Hormonen wachsen, wie z.B. einige Mamma- oder Prostatakarzinome, können Hormontherapien zum Einsatz kommen. So können beim Prostatakarzinom Östrogene oder Antiandrogene gegeben werden, oder

bei Brustkrebs Antiöstrogene oder Aromatasehemmer zugeführt werden (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2020; S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2021).

Bei endokrinen Tumoren, die selbst Hormone produzieren und damit Beschwerden verursachen, können antihormonelle Therapien die tumorverursachten Symptome lindern. Zudem können Kortikosteroide wegen ihres lymphoklastischen und proliferationshemmenden Effekts bei Lymphomen und Leukämien Anwendung finden (Student *et al.*, 2020).

Die Nebenwirkungen dieser Therapieform ergeben sich aus den Wirkungen der Hormone, die zugeführt oder blockiert werden. Eine Heilung einer Krebserkrankung nur durch Hormontherapie ist kaum möglich, sie wird ergänzend zu anderen Therapieformen angewendet. Zudem verlieren Krebszellen häufig nach einiger Zeit ihre Hormonsensitivität, sodass die Therapie dann ihre tumorhemmende Wirkung verliert (Student *et al.*, 2020).

#### **1.1.3.4 Radiotherapie**

Im Verlauf einer Tumorerkrankung wird etwa bei jeder zweiten krebserkrankten Person eine Radiotherapie durchgeführt (Baskar *et al.*, 2012). Hierbei kommt Strahlung zur Anwendung, die Mutationen in Tumorzellen herbeiführt. Die Tumorzellen können diese schlechter als gesunde Körperzellen beheben, sodass sie untergehen. Strahlentherapie kann allein oder in Kombination mit anderen Therapieformen eingesetzt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass das zu behandelnde Tumorgewebe strahlensensibel ist und, dass das umliegende gesunde Körpergewebe ausreichend vor den schädigenden Strahlen geschützt werden kann.

Es treten lokale Nebenwirkungen, aber auch Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Müdigkeit auf. Langzeitfolgen sind nicht-reversible bindegewebige Umstrukturierungen in von der Strahlentherapie betroffenen Geweben. So kann es z.B. zu Lungenfibrose, Kardiomyopathie, Fertilitätsstörungen, Osteonekrosen und Schilddrüsenfunktionsstörungen kommen. Auch treten durch die karzinogene Wirkung der ionisierenden Strahlung strahleninduzierte Zweittumore auf (Molls *et al.*, 2006).

## **1.2 Immunsystem**

### **1.2.1 Einführung**

Das Immunsystem erfüllt im Körper die Funktion, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden. Es ist gleichzeitig dazu in der Lage, Fremdkörper und Mikroorganismen, die den Körper schädigen und zu einer Infektion führen könnten, abzuwehren, während solche, die dem Körper nützlich sind, toleriert werden. Ebenso werden gealterte, beschädigte und maligne Zellen

ausgesondert, während gleichzeitig körpereigene, gesunde Zellen intakt bleiben. Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten: einer angeborenen, unspezifischen und einer erworbenen, spezifischen Abwehr (Rassow *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Unspezifisches Immunsystem

Zum unspezifischen Teil des Immunsystems gehören angeborene Mechanismen zur Abwehr möglicher Krankheitserreger. Physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren an den Körperoberflächen wie der Haut, dem Respirationstrakt und dem Verdauungstrakt bilden einen ersten Schutz gegenüber möglichen eindringenden Fremdkörpern (Day und Schultz, 2001).

Phagozytierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Granulozyten können mögliche Krankheitserreger (Pathogene) erkennen, binden und aktiv aufnehmen. Für die Erkennung von Pathogenen über Rezeptoren in den Zellmembranen von DC und Makrophagen sind pathogenassoziierte molekulare Muster wie bakterielle DNA oder Lipopolysaccharide in der äußeren Schicht gramnegativer Bakterien wesentlich (Rassow *et al.*, 2012). Mittels Phagozytose können Pathogene sehr schnell aufgenommen und zerstört werden, ohne, dass die spezifische Immunabwehr daran beteiligt sein muss (Murphy und Weaver, 2017).

DC fungieren als Bindeglied zwischen der unspezifischen, angeborenen und der spezifischen, adaptiven Immunantwort. Sie können eindringende Pathogene aufnehmen, prozessieren und die entsprechenden Antigene präsentieren, was wiederum über eine T-Zell-Aktivierung eine spezifische Immunantwort auslöst. Zudem sind DC an der Produktion von Interferonen im Rahmen der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt (Murphy und Weaver, 2017).

Makrophagen nehmen je nach (Mikro-)Umgebung unterschiedliche Polarisierungen an. Bei pro-inflammatorischen Signalen nehmen sie einen M1-Zustand ein, wirken selbst (z.B. durch Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen) eher pro-inflammatorisch und bekämpfen Pathogene. In der Umgebung entzündungshemmender Signale erfolgt die Polarisierung zu eher anti-inflammatorisch aktiven (und immunsupprimierende Zytokine sezernierenden) M2-Makrophagen, welche z.B. die Gewebeheilung fördern (Na, Je und Seok, 2018, Mantovani *et al.*, 2004).

Weiterer Bestandteil des unspezifischen Immunsystems sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen). An der Oberfläche nahezu jeder kernhaltigen Zelle befinden sich *Major-Histocompatibility-Complex* (MHC)-I-Rezeptoren. Hierüber werden zelleigene, intrazelluläre Antigene präsentiert. Sie dienen somit Immunzellen zur Erkennung der Zelle als körpereigene Zelle. Weil virusinfizierte und ent-

artete Zellen körperfremde bzw. veränderte Antigene präsentieren, können sie im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr von NK-Zellen erkannt werden, die dann durch Ausschüttung ihrer zytotoxischen Enzyme dazu in der Lage sind, die veränderten Zellen abzutöten (Rassow *et al.*, 2012, Murphy und Weaver, 2017).

Eine weitere wichtige Rolle im unspezifischen Immunsystem spielt das Komplementsystem, welches mithilfe von Komplementfaktoren durch Bildung eines Membranangriffskomplexes die direkte Lyse von Erregern initiieren, sowie eine Opsonisierung - eine Markierung zur Steigerung der Phagozytose - von Erregern bewirken kann. Mithilfe von Entzündungsmediatoren wie Chemokinen können zudem phagozytierende Zellen stimuliert und damit die Entzündungsreaktion insgesamt gesteigert werden (Rassow *et al.*, 2012).

### 1.2.3 Spezifisches Immunsystem

Die spezifische, erworbene Immunantwort dauert im Gegensatz zur schnell ablaufenden unspezifischen Immunantwort mehrere Stunden bis Tage und wird vor allem durch Lymphozyten wie B- und T-Zellen ausgeführt (Murphy und Weaver, 2017).

Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, DC und B-Zellen exprimieren MHC-II-Rezeptoren. Hierüber werden aufgenommene fremde, extrazelluläre Antigene den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helferzellen, TH-Zellen) präsentiert. Wenn APC zu den speziellen Rezeptoren der Lymphozyten passende spezifische Pathogenantigene präsentieren, vermehren sich die entsprechenden Lymphozyten und die spezifische Immunantwort läuft ab.

T-Helferzellen können andere Immunzellen bei der Elimination von Pathogenen unterstützen. Sie bestehen aus zwei Gruppen: Antigen-spezifische TH1-Zellen aktivieren (durch Ausschüttung von Zytokinen) insbesondere Makrophagen, TH2-Zellen aktivieren B-Zellen. B-Zellen differenzieren daraufhin zur Plasmazelle und produzieren Antikörper, die dann Pathogene direkt neutralisieren oder wiederum Komponenten der unspezifischen Immunabwehr aktivieren und dadurch die Phagozytose oder Lyse der Pathogene induzieren (Murphy und Weaver, 2017).

In der Initiation der spezifischen Immunabwehr spielen insbesondere DC eine entscheidende Rolle (Banchereau und Steinman, 1998). Als Kreuzpräsentation wird ihre Fähigkeit bezeichnet, fremde, extrazelluläre Antigene auch über MHC-I-Rezeptoren präsentieren zu können, wodurch direkt CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen (CTL) aktiviert werden. CTL töten antigenspezifisch infizierte oder entartete Zellen ab (Rassow *et al.*, 2012).

Bei Ablauf einer adaptiven Immunantwort bilden sich antigenspezifische B- und T-Zellen, die als Gedächtniszellen bezeichnet werden und längere Zeit erhalten bleiben. Bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger können diese schneller und effektiver auf die Infektion reagieren (Rassow *et al.*, 2012).

#### 1.2.4 Immunsystem und Krebs

Stark veränderte Zellen werden regelhaft im Zellzyklus in die Apoptose überführt. Außerdem sind DC dazu in der Lage, tumorassoziierte Antigene zu erkennen und diese den CTL zu präsentieren, sodass die CTL die Krebszellen zerstören können (Chen und Mellman, 2013). Viele Tumorzellen werden also vom Immunsystem erkannt und unschädlich gemacht, bevor sie sich in großem Ausmaß vermehren und zu einem Krebsgeschwür heranwachsen (Abbildung 1).

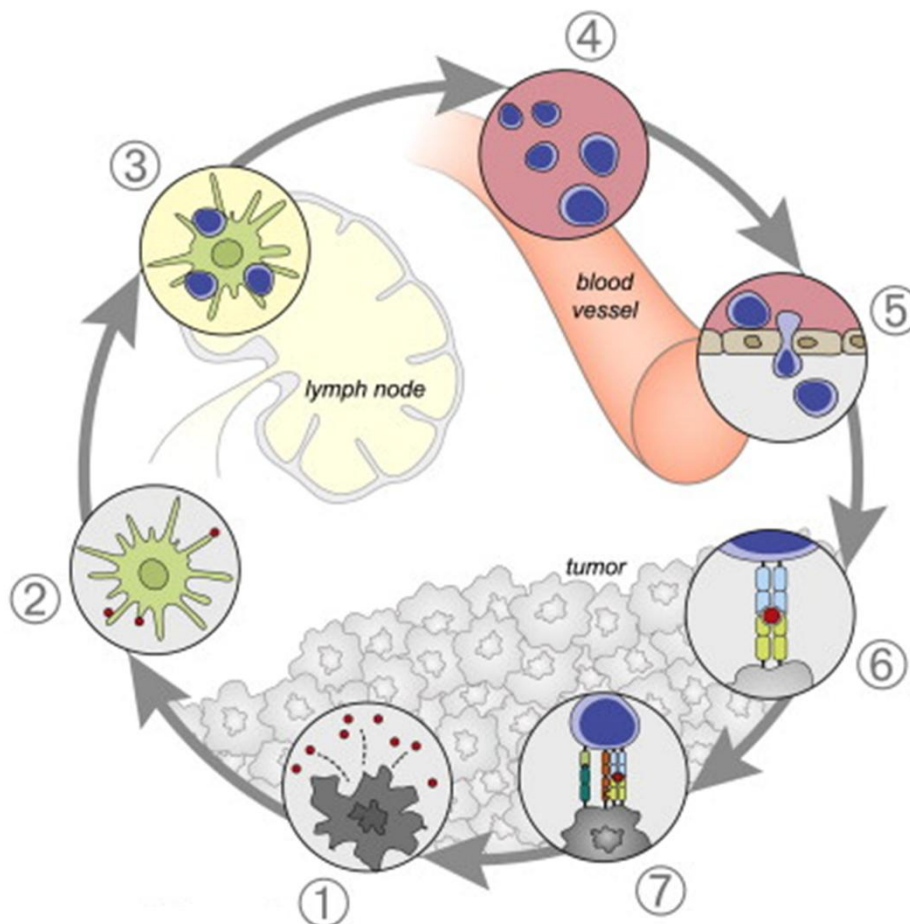


Abbildung 1: „*Cancer-Immunity Cycle*“, Ablauf der Immunreaktion gegen Krebszellen

**1:** Freisetzung von Tumorantigenen **2:** Antigenpräsentation durch dendritische Zellen **3:** Aktivierung von T-Zellen (durch die präsentierten Antigene) **4-5:** Zytotoxische T-Zellen wandern in den Tumor ein (Tumorinfiltration) **6-7:** Zytotoxische T-Zellen erkennen die Krebszellantigene und zerstören die Krebszellen (Chen and Mellman, 2013)

Allerdings können sich einige Krebszellen diesen körpereigenen Abwehrmechanismen entziehen, sodass ein Tumor auswachsen kann. Strategien, mit denen sich Krebszellen vor dem Immunsystem „verstecken“, werden als Immun-Escape-Mechanismen oder Immunevasion bezeichnet. Tumorzellen sind dazu in der Lage, ihre Umgebung immunsuppressiv zu modulieren (Kim *et al.*, 2006, Whiteside, 2008, Disis, 2014, Peters, 2018, Gonzalez, Hagerling und Werb, 2018).

Ein Beispiel eines Immun-Escape-Mechanismus ist das Verbergen der Krebszellen vor den Immunzellen durch eine verringerte Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Jedoch werden NK-Zellen durch Zellen, bei denen wenig MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert sind, aktiviert und zerstören diese Zellen. Tumoren bewirken deswegen z.B. wiederum eine Herunterregulierung von NK-Zellen (Whiteside, 2008). Selbst (tumorspezifische) T-Zellen können beeinflusst werden (Gajewski, Schreiber und Fu, 2013).

Die Veränderung des sogenannten Tumormikromilieus trägt insgesamt durch reduzierte Immunantworten nachweislich massiv zur Tumorentwicklung bei (Coussens und Werb, 2002).

## 1.3 Immuntherapie gegen Krebs

### 1.3.1 Notwendigkeit zielgerichteter Krebstherapie

Zwar sind konventionelle Therapieverfahren wie Chemo-, Strahlentherapie und Operationen in vielen Krebsbehandlungsfällen wirksam und etabliert, besonders bei bereits fortgeschrittener Erkrankung sind diese Therapien aber oft nicht ausreichend. Um eine Heilung zu bewirken, müsste in diesen Fällen z.B., um eine vollständige Tumorentfernung zu erreichen, zu viel gesundes Körpergewebe funktionseinschränkend mitentfernt oder beschädigt werden.

Eine gezieltere Therapie gegen Krebszellen, die gesunde Körperzellen unbeschadet lässt, ist daher dringend vonnöten. Zielgerichtete Therapien („*targeted therapies*“) zielen spezifisch auf molekulare Eigenschaften von Krebszellen und Vorgänge ab, die für das Tumorstadium wichtig sind, die aber gesunde Körperzellen nicht besitzen (Yan, Rosen und Arteaga, 2011). Es können z.B. Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockiert werden, sodass die Bindung von Wachstumsfaktoren verhindert wird, oder auch durch Kinasehemmer intrazelluläre Signalübertragungswege der Krebszellen verhindert werden, sodass diese beschädigt werden, während gesunde Körperzellen unbeeinträchtigt bleiben (Shariati und Meric-Bernstam, 2019).

### 1.3.2 Anwendung von Immuntherapie

Ziel von Immuntherapien ist es, der Immunabwehr die Antigene von Krebszellen wieder besser zugänglich zu machen und/oder die körpereigenen Abwehrstrategien für eine Krebszellzerstörung zu stimulieren, sodass die entarteten Zellen spezifisch zerstört werden können (Dougan und Dranoff, 2009, Zou, 2005).

Um überschießende Immunantworten zu verhindern, werden Immunantworten des Körpers über sogenannte Checkpoints reguliert. Diese Immun-Checkpoints sind z.B. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) und *programmed cell death protein 1* (PD-1) und fungieren als körpereigene „Immunbremse“. Sie regulieren die Stimulation von T-Helferzellen durch APC sowie die Aktivierung von CTL durch DC (Chemnitz *et al.*, 2005) .

Tumorzellen nutzen diese regulatorischen Mechanismen für sich aus und verstärken sie, um die gegen sie gerichtete T-Zell-Aktivität besser zu unterdrücken (Pardoll, 2012).

Mithilfe des immuntherapeutischen Einsatzes von monoklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 oder PD-1/PD-L1 (Checkpoint-Inhibitoren) werden die spezifischen, gegen den Tumor gerichteten T-Zell-Antworten des Immunsystems wiederhergestellt (Buchbinder und Desai, 2016). Insbesondere bei Melanomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Nierenzellkarzinomen wird diese Therapieform bereits erfolgreich angewendet (Seidel, Otsuka und Kabashima, 2018, Zander *et al.*, 2020).

Monoklonale Antikörper, die gegen spezifische Tumorantigene gerichtet sind, ermöglichen ebenfalls eine Therapie bestimmter Krebsentitäten, z.B. Lymphome, Leukämien, kolorektale Karzinome, Plattenepithel-, Mamma-, Nierenzell- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (An, 2010).

Eine weitere immuntherapeutische Behandlungsmöglichkeit ist die CAR-T-Zell-Therapie, die zurzeit schon bei bestimmten Leukämien und Lymphomen zur Anwendung kommt. Dem Patienten entnommene T-Zellen werden *in vitro* vermehrt und durch Transduktion so modifiziert, dass sie einen chimären Antigenrezeptor (CAR) exprimieren, der spezifisch an ein Tumorantigen bindet. Es erfolgt danach die Reinfusion in den Patienten, mit dem Ziel, dass die individuellen T-Zellen spezifisch die entsprechenden Tumorzellen zerstören (Ogba *et al.*, 2018).

Eine lebensbedrohliche Nebenwirkung der CAR-T-Zell-Therapie ist der sogenannte „Zytokin-sturm“, bei dem es durch übermäßige Stimulierung der Leukozyten und pro-inflammatorische Zytokinfreisetzung zu einer starken systemischen Entzündungsreaktion kommt (Cosenza, Sacchi und Pozzi, 2021). Auch neurologische Nebenwirkungen können auftreten (Rubin *et al.*, 2019).

Allgemein sind mögliche Nebenwirkungen von Immuntherapien meist autoimmuner Art. Durch eine zu starke Aktivierung des Immunsystems kann es zu einer überschießenden Immunreaktion kommen, die sich am häufigsten an der Haut manifestiert, oder z.B. als Kolitis, Hepatitis oder in Form von Endokrinopathien äußert. Auch Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen sowie Lymphknotenschwellungen können auftreten (Heinzerling *et al.*, 2019).

Immuntherapien sind bei vielen Krebsarten zum Bestandteil der Standardtherapie geworden (Phan *et al.*, 2003, Postow, Callahan und Wolchok, 2015). Von großem Vorteil ist, dass bei Ansprechen einer immuntherapeutischen Behandlung nicht nur das Krebsgeschwür behandelt wird, sondern sich durch die körpereigene Immunreaktion auch das Risiko für ein Wiederauftreten der Erkrankung und für die Ausbildung von Metastasen reduziert (Garnier *et al.*, 2022, Park, Heo und Han, 2018).

## 1.4 Tumorstabilisierung

Ein Vakzin (Impfstoff) im herkömmlichen Sinne soll im Körper eine langfristige Immunreaktion mit Bildung von Gedächtniszellen und Antikörpern auslösen, die dazu führt, dass das Immunsystem bei späterem Kontakt mit dem Erreger schon „gelernt“ hat, mit ihm umzugehen und ihn effektiv und schnell abwehren kann; So entsteht ein Schutz vor bestimmten bakteriellen oder viralen Infektionskrankheiten (Zepp, 2016).

Impfungen gegen eine Infektion mit Viren, die bestimmte Krebsentstehungen fördern, können vor diesen Krebsarten schützen. Gegen einige HPV-Stämme, die das Risiko für Gebärmutterhalskrebs sowie weitere Krebsarten im Genital- oder Mund-/Rachenbereich erhöhen, ist Impfen möglich. Eine Impfung gegen HBV senkt das Risiko für die Entwicklung einer Hepatitis mit nachfolgender Entwicklung von Leberkrebs (Signorelli *et al.*, 2017, Chang *et al.*, 2009).

Jedoch nicht nur prophylaktisch, sondern auch therapeutisch im Falle einer ausgebrochenen Krebserkrankung, können Impfungen als sogenannte Tumorstabilisierung angewendet werden. Tumorstabilisierungen stellen einen vielversprechenden Ansatz der Immuntherapie maligner Tumoren dar, wobei sie zurzeit als Standardtherapie gegen Krebs noch keine Anwendung finden (Guo *et al.*, 2013).

Das Immunsystem ist oft durch die Krebserkrankung selbst oder durch notwendige Therapien geschwächt. Zudem kommt es durch die Immun-Escape-Mechanismen des Tumors zu einer reduzierten Immunantwort auf die Krebszellen (Kapitel 1.2.4). Mit einer Tumorstabilisierung sollen den Immunzellen tumorspezifische Antigene verstärkt zugänglich gemacht werden, sodass

wieder eine starke, spezifische Immunabwehrreaktion gegen die entsprechenden Krebszellen erzeugt wird. Die Zuführung des Antigens kann auf unterschiedliche Wege erfolgen: als Gesamt-Zell-Präparat, als Protein oder Peptidfragment von Tumorantigenen, in RNA- oder DNA-Form, über virale Vektoren oder mithilfe antigenpräsentierender Zellen (Patel, Kaufman und Disis, 2017, Dougan, Dranoff und Dougan, 2019).

Da das Immunsystem regelhaft spezifische Tumorantigene von APC präsentiert bekommt, ist es im Hinblick auf Immuntherapien gegen Krebs ein aussichtsreicher Ansatz, diese Zellen, die genau darauf spezialisiert sind, fremde Partikel aufzunehmen und sie weiteren Immunzellen zu präsentieren, zielgerichtet zu nutzen (Banchereau und Palucka, 2005). Aufgrund ihrer Fähigkeit, endozytierte Tumorantigene über Kreuzpräsentation über MHC-I zu präsentieren und damit spezifische CD8<sup>+</sup>-CTL direkt zu aktivieren, stellen DC hierfür die bedeutungsvollsten APC dar (Fillee und Dey, 2017, Palucka und Banchereau, 2012).

Für eine *ex vivo*-DC-Tumorvakzinierung werden DC (oder ihre Vorläuferzellen Monozyten) isoliert, *in vitro* optimal differenziert und mit Tumorantigenen beladen, bevor sie der an Krebs erkrankten Person zurück-injiziert werden (Abbildung 2). Diese DC präsentieren die Tumorantigene dann CTL, sodass eine spezifische Immunantwort gegen die entsprechenden Tumorzellen initiiert oder verstärkt wird (Neill, Adams und Bhardwaj, 2004).

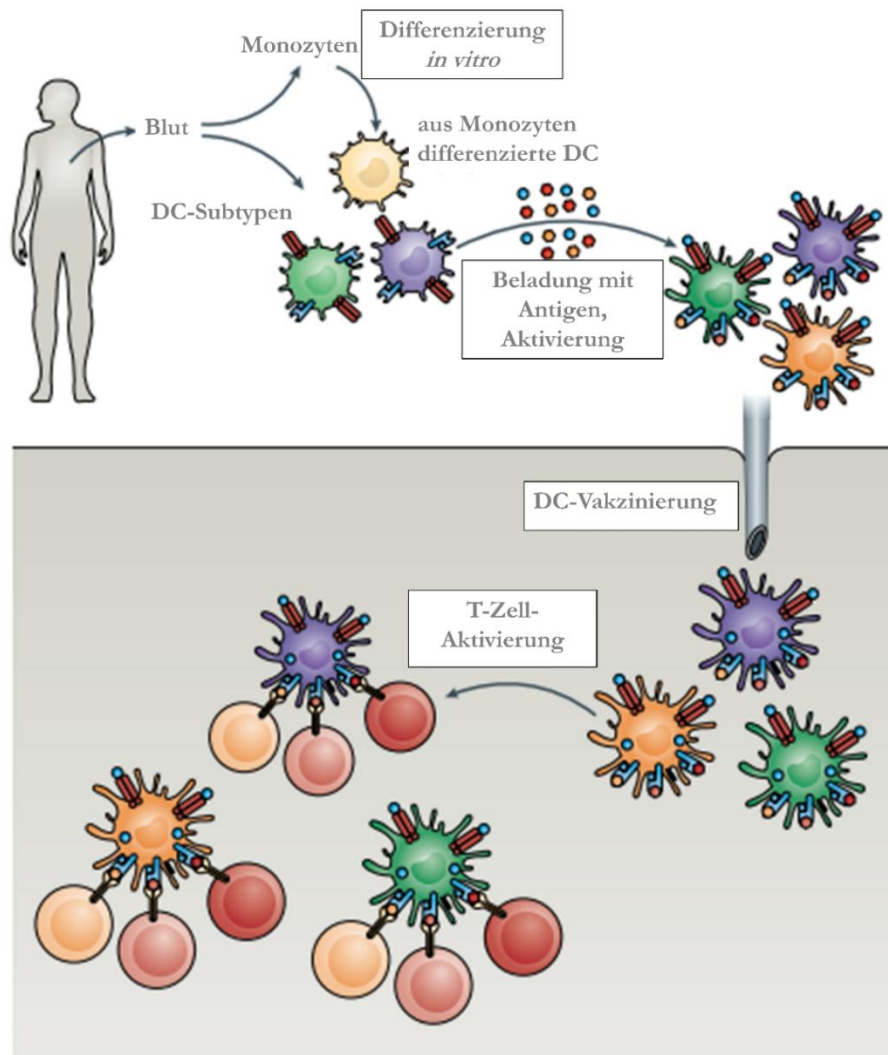


Abbildung 2: **DC-Vakzinierung *ex vivo***

Schematische Darstellung einer *ex vivo* DC-Tumorvakzinierung: Dem Krebskranken wird Blut entnommen und die isolierten dendritischen Zellen (DC) oder Monozyten werden *in vitro* optimal differenziert und nach Beladung mit Tumorantigenen re-infundiert. Im Körper der erkrankten Person induzieren sie dann eine tumorantigenspezifische T-Zell-Antwort. (Wculek *et al.*, 2020)

In Deutschland ist ein therapeutischer Impfstoff (DCVax-L) mit autologen, lebenden, tumorlysatbeladenen DC zur Ergänzung der Standardtherapie für die Behandlung von Glioblastomen zugelassen und eine klinisch relevante Verbesserung des Gesamtüberlebens nachgewiesen (Deng, Debus und König, 2023).

Eine *in vivo*-Strategie ist die Konjugation von Tumorantigenen an Antikörper (und ggf. ein Adjuvans, was die Immunantwort noch verstärken soll), die sich gegen einen von DC exprimierten Rezeptor richten und den Patienten über geeignete Vehikel appliziert werden. Die Tumorantigen-Antikörper-Komplexe binden an DC und werden von ihnen endozytiert und prozessiert. Nach-

folgend werden die Antigen(fragmente) präsentiert und über T-Zell-Aktivierung eine spezifische Immunreaktion ausgelöst (Kastenmüller *et al.*, 2014).

DC-basierte Tumorstimmungen werden im Allgemeinen gut vertragen und gerade in Kombination mit anderen Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren haben sich vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Die Rate des Therapieansprechen ist jedoch gering, sodass insgesamt noch wenige Patienten profitieren (Anguille *et al.*, 2014).

Eine Verbesserung der Vakzineffizienz zur Erzeugung einer wirksameren Immunantwort bleibt also von höchstem Interesse.

#### 1.4.1 Nutzung von Nanopartikeln

Zur Verbesserung der Effizienz von *in vivo*-Tumorstimmungen kann die Auswahl eines geeigneten Vehikels beitragen, um die Beladung von DC mit Tumorantigenen zu verbessern, sodass es zu einer verstärkten Aktivierung der spezifischen Immunabwehr gegen die entsprechenden Krebszellen kommt. Die Nutzung von Nanopartikeln für die Verkapselung von Tumorantigenen scheint hierfür ein zukunftsweisender Weg zu sein (Shao *et al.*, 2015, Park, Heo und Han, 2018).

Durch eine spezifische Nanopartikel-Umkapselung kann eine gezielte und kontrollierte Abgabe des Inhalts in vorzugsweise lymphatisches Gewebe, wo der Antigenkontakt und die Differenzierung von Lymphozyten erfolgt, erreicht werden (Fan und Moon, 2015).

Nanopartikel schützen die in ihnen transportierten Antigene vor unerwünschtem (z.B. enzymatischem) Abbau und somit vor vorzeitiger Inaktivierung (Pachioni-Vasconcelos *et al.*, 2016). Auch kann die Dauer des Aufenthalts der Antigene (und ggf. eines die Immunantwort verstärkenden Adjuvans) im lymphatischen Gewebe durch die Nutzung von Nanopartikeln als Vehikel für die Antigene erhöht werden und dadurch die Antigenaufnahme sowie -präsentation verstärkt werden (Fan und Moon, 2015). Zur Erreichung einer gezielten Abgabe der Antigene spielen Größe, Form, Material und Oberfläche der Nanopartikel eine entscheidende Rolle (Benne *et al.*, 2016). Nanopartikel weisen zudem je nach Material auch selbst eine Adjuvans-Wirkung auf (Bastola *et al.*, 2017).

Nanopartikel als Umkapselung zu nutzen, um den DC die Antigene zugänglich(er) zu machen, ist für zukunftsorientierte Immuntherapien des Weiteren deswegen aussichtsreich, weil es möglich ist, sie nicht-invasiv zu verabreichen (Bernocchi, Carpentier und Betbeder, 2017). Neben dem Vorteil, dass so die konventionelle, parenterale Gabe einer Impfung als Injektion durch eine angenehmere pulmonale Medikamentenverabreichung, z.B. als Inhalations- oder Nasenspray, ersetzt werden könnte, konnte gezeigt werden, dass nach Verabreichung der Impfung über die Mukosa sowohl eine antigenspezifische, systemische Immunreaktion induziert wird, als auch eine

starke Immunreaktion in der Schleimhaut entsteht (Mitragotri, 2005, Csaba, Garcia-Fuentes und Alonso, 2009). Mögliche Wege der Aufnahme antigenbeladener Nanopartikel über die Mukosa sind die aktive Aufnahme über transepitheliale Dendriten der DC oder das passive Durchdringen der Epithelschicht bis zur Aufnahme in DC (Abbildung 3 A+B). Auch eine Aufnahme über M-Zellen, die die Nanopartikel und Antigene dann Immunzellen zugänglich machen, erscheint möglich (Abbildung 3 C). M-Zellen sind Teil des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) und damit auch des nasenassoziierten lymphatischen Gewebes (NALT). Ein weiterer Weg der Aufnahme wäre eine endozytische Aufnahme in Epithelzellen, was wiederum über eine nachfolgende Zytokinproduktion Immunzellen aktivieren würde (Abbildung 3 D) (Bernocchi, Carpentier und Betbeder, 2017).

Nach der Nanopartikelaufnahme präsentieren DC die Tumorantigene und eine gegen die Tumorantigene gerichtete CTL-Aktivierung wird induziert.

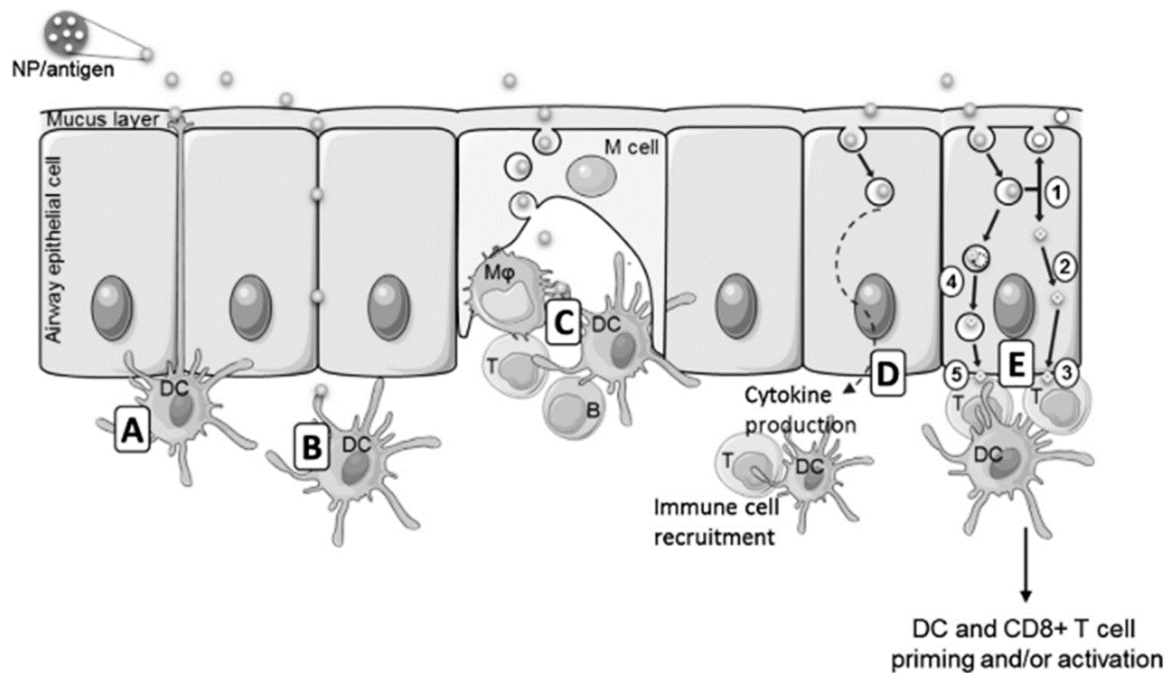


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der möglichen Aufnahmewege antigenbeladener Nanopartikel über die Mukosa**

**A:** Aufnahme der Nanopartikel (NP) über transepitheliale Dendriten der dendritischen Zellen (DC). **B:** Nanopartikelaufnahme durch (passives) Durchdringen der Epithelschicht bis zum Erreichen der Immunzellen. **C:** M-Zellen bahnen nach apikaler Aufnahme der NP auf ihrer basalen Seite den Kontakt von Antigenen zu den Immunzellen (Mφ = Makrophage, DC, T- und B-Zellen). **D:** Aufnahme der NP über Endozytose in die Epithelzelle, wodurch eine Anregung der Zytokinproduktion erfolgt, was wiederum die Rekrutierung von Immunzellen nach sich zieht. **E:** Nach Aufnahme der NP und Präsentation der Antigene über MHC erfolgt die CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zell-Aktivierung. (Bernocchi, Carpentier und Betbeder, 2017)

### 1.4.2 Nanopartikel aus Chitosan

Chitosan lässt sich unter alkalischen Bedingungen über Deacetylierungsschritte aus dem Polysaccharid Chitin gewinnen (Tømmeraas *et al.*, 2002). Es ist das in der Natur am zweithäufigsten vorkommende Polymer und findet sich in den Exoskeletten von Krustentieren und Krebsen, sowie der Zellwand von Pilzen. Chitosan besteht aus  $\beta$ -1,4 glycosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosaminresten (Abbildung 4, Muanprasat and Chatsudthipong, 2017).

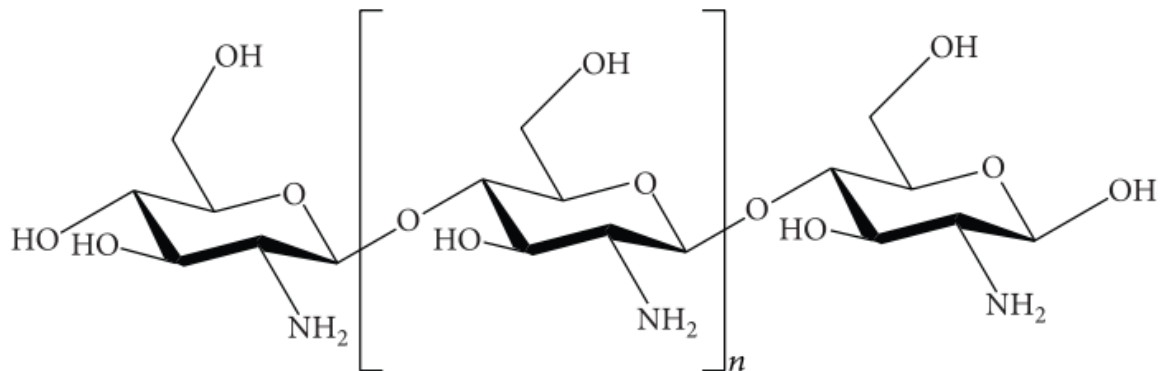


Abbildung 4: **Chemische Struktur von Chitosan** (Li *et al.*, 2013)

Chitosan wird bereits als sicheres Medizinprodukt bei der Behandlung von Wunden angewendet (Tianhong, Tanaka und Hamblin, 2011). Es ist biologisch abbaubar und ungiftig (Baldrick, 2010). Neben vielfältiger kommerzieller Anwendung, z.B. als Emulsionsstabilisator in Kosmetika, wurde es sogar zur Verwendung in Nahrungsergänzungsmitteln zugelassen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2017). Durch seine Biokompatibilität ist Chitosan sehr gut als Trägersubstanz für Arzneimittel nutzbar (Shariatinia, 2019). Aus Chitosan hergestellte Nanopartikel wurden bereits in mehreren Studien als Vehikel für den Transport verschiedenster Medikamente untersucht und als geeignet bestätigt (Mohammed *et al.*, 2017, Alan Smith und Hinchcliffe, 2014).

Dank mukoadhäsiver Eigenschaften eignen sich Chitosan-Nanopartikel (CNP) ideal für eine nicht-invasive, z.B. nasale oder inhalative Applikation (Li *et al.*, 2013). Je höher das Molekulargewicht und der Deacetylierungsgrad von Chitosan, desto stärker ist die elektrostatische Anziehung und damit die Mukoadhäsion des positiv geladenen Chitosan an die zu großen Teilen negativ geladenen Mukosabestandteile. Dadurch wird die dortige Verweildauer von Chitosan, und damit auch des transportierten Inhalts, verlängert - und im Falle des Transports von Tumorantigenen werden stärkere Immunantworten gegen die entsprechenden Krebszellen erreicht (Li *et al.*, 2016). Ein weitere vorteilhafte Eigenschaft von Chitosan ist seine eigene Wirkung als Adjuvans mit verstärkter Aktivierung der Immunzellen (Nishimura *et al.*, 1984, Ravindranathan *et al.*, 2016). So-

wohl eine Förderung der DC-Reifung und verstärkte TH1-Antworten durch Chitosan wurden nachgewiesen als auch eine Stimulation von NK-Zellen (Carroll *et al.*, 2016, Zaharoff *et al.*, 2007). Auf die Ausprägung der immunstimulierenden Wirkung haben Größe, Molekulargewicht, Deacetylierungsgrad und Viskosität von Chitosan einen Einfluss (Scherließ *et al.*, 2013).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Stellenwert von Immuntherapien gegen Krebs ist in den letzten Jahren gestiegen. Die klinische Anwendung erfolgt für immer mehr Krebsarten erfolgreich. Gerade Kombinationstherapien haben die Lebensqualität und die Überlebensdauer von vielen erkrankten Personen verbessern können.

Trotz dieser Erfolge sind viele Krebsarten wie z.B. das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) nach wie vor kaum kurativ behandelbar. PDAC wird aufgrund wenig und unspezifischer Symptome meist erst im fortgeschrittenen, oft schon metastasierten Stadium erkannt und hat eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von nur ca. 11 %. Die Neuerkrankungs- und Sterbefälle nahmen in den letzten Jahren zu (Siegel *et al.*, 2021). Es wird angenommen, dass PDAC bis ins Jahr 2030 zur zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache wird (Rahib *et al.*, 2014). Multiple, ausgeprägte immunsupprimierende Mechanismen zeichnen die Tumormikroumgebung des PDAC aus, was zu einer außergewöhnlichen Resistenz gegen Immuntherapien führt (Fan *et al.*, 2020, Bockorny, Grossman und Hidalgo, 2022).

Dies verdeutlicht die Wichtigkeit und Notwendigkeit, erfolgsversprechende immuntherapeutische Strategien weiter zu verbessern. Die Nutzung von Nanopartikeln aus Chitosan zur Förderung der Aufnahme von Tumorantigenen in APC im Rahmen einer Tumorstimmung stellt hierfür einen aussichtsreichen Ansatz dar, um die Effizienz der Antigenaufnahme und damit der tumorgerichteten Immunantwort auch in sehr immunsupprimierten Umgebungen zu steigern.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aufnahme von CNP unterschiedlicher Größe in verschiedene APC zu untersuchen. Das übergeordnete Ziel ist die Nutzung der CNP als Vehikel für die Verstärkung der (Tumor-) Antigenaufnahme und -präsentation, um dadurch schließlich eine effektive tumorgerichtete Immunantwort durch CTL auszulösen.

In dieser Arbeit wurden Analysen der Aufnahme von CNP in drei Größen in Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den CNP durchgeführt. Der Aufnahmezeitpunkt sowie die optimale CNP-Konzentration wurden durch Kinetik- sowie Titrationsuntersuchungen in Vorversuchen bestimmt.

Neben der Aufnahme in humane DC wurde die Aufnahme von CNP auch in M1- sowie M2-polarisierte Makrophagen analysiert. Vergleichend erfolgte zudem die Analyse der Partikelauflösung.

nahme in die murine DC-Linie DC2.4, um im Hinblick auf zukünftige *in vivo*-Experimente im Mausmodell sicherzustellen, dass nicht nur humane, sondern auch murine DC CNP aufnehmen (und verkapselte Tumorantigene präsentieren).

Untersucht werden sollte zudem, ob CNP spezifisch von APC oder auch von anderen Zelltypen aufgenommen werden. Aufgrund einer zukünftig geplanten inhalativen Applikation der Nanopartikel spielten hier Lungenepithelzellen eine besondere Rolle.

Die Bestimmung der CNP-Aufnahme in die verschiedenen Zelltypen erfolgte mittels zweier Verfahren: mit Durchflusszytometrie sowie mit dem ImageStream-Verfahren.

Langfristiges Ziel des Projekts ist eine non-invasive Tumorstimmung mittels Verkapselung von Tumorantigenen in CNP, deren pulmonale Applikation und - durch die Aufnahme der Tumorantigene in APC (insbesondere DC) - die Induktion einer tumorgerichteten Immunantwort.

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Zubehör

Gerät	Firma
<b>Zentrifugen</b>	
Avanti™ J-20 XP Zentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Eppendorf Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heraeus Biofuge pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, DE
JE-5.0 Elutriator	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Rotina 420 R	A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Sprout mini-centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
<b>Inkubatoren</b>	
BBD 6220 CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Gyro Twister 3D Schüttler	Labnet, Woodbridge, USA
W 12 Wasserbad	GB Labortechnik Medingen, Arnsdorf, DE
WTC ED-53 Inkubator	Binder, Tuttlingen, DE
<b>Messgeräte</b>	
Amnis ImageStream®X (ISX) Mk II- Imaging Flow Cytometer	Merck Millipore, Darmstadt, DE
FACScalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
LSRFortessa Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, DE
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, DE
<b>Mikroskope</b>	
AE2000	Motic, Wetzlar, DE
Evos XL Core Cell Imaging System	AMG, Bothell, USA
Konfokalmikroskop CLSM	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE

---

**Andere Geräte**


---

ARPEGE 110 Stickstofftank	KWG Isotherm, Karlsruhe, DE
Autoklav SC	Matachana GmbH, Selmsdorf, DE
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
HERAFreeze Basic Tiefkühler (-80 °C)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Magnetrührer Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, DE
Mini Sprühtrockner B-290	Büchi Labortechnik, Essen, DE
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Vortex Genius 3	IKA-Werke, Staufen, DE
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Malvern, UK

---

**Sterilwerkbänke**


---

HERA Safe	Thermo Scientific, Schwerte, DE
HERA Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, DE
HERAEUS LaminAir HB 2448	Thermo Scientific, Schwerte, DE

---

**Waagen**


---

Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

---

**Pipetten**


---

Finnpipette™ F1 0,2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ F1 1-10 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ F1 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ F1 10-100 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ F1 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ F1 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ Multichannel 5-50 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette™ Multichannel 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Pipetboy® acu	Integra-Biosciences, Fernwald, DE
Ripette® multistep dispenser	Ritter, Schwabmünchen, DE

## 2.2 Verbrauchsgegenstände

Verbauchsgegenstand	Firma
0,1-10 µl; 10-200 µl; 100-1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
0,05 ml; 1,25 ml; 5,0 ml Ritips®	Ritter, Schwabmünchen, DE
0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE
15 ml; 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
5 ml; 10 ml; 25 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
6-; 12-; 96-Well Flachbodenplatten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96-Well Rundbodenplatte	Sarstedt, Nümbrecht, DE
CryoPure Gefäß 1,8 ml; weiß	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Coverslips Thermanox Plastik, 15 mm	Nunc Brand Products, Rochester, New York, USA
FACS-Röhrchen 500 µl	Sterilin, London, UK
Micro-Touch Nitril Handschuhe	Ansell GmbH, München, DE
Parafilm M	Brand GmbH, Wertheim, DE
Pasteurpipetten ISO 7712; 230 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim/Röhn, DE
Skalpell	Feather, Osaka, JP
Spritze 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Vue Life Zellkulturbeutel 32-C 32 ml	CellGenix GmbH, Freiburg im Breisgau, DE/ Saint-Gobain, Courbevoie, FR
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma
Accutase®-Lösung mit 0,5 mM EDTA	EMD Millipore Corporation, Temecula, California, USA/PAN Biotech, Aidenbach, DE
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Biomol, Hamburg, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA, Pasching, AT

---

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Essigsäure 10 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethanol 99 %, vollvergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Ethanol, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
FACSflow sheath Trägerflüssigkeit	BD Biosciences, San Jose, USA
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
FcR Blocking Reagent, murin	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat	eBioscience, Frankfurt, DE
Fixierungs-/Permeabilisierungsdiluent	eBioscience, Frankfurt, DE
Fluormount Aqueous Mountingmedium	Sigma-Aldrich, München, DE
FluorSave™ Reagent	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Hoechst #33258	Sigma-Aldrich, München, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Keratinocyten MCDB 153 serumfreies Medium	Biochrom, Berlin, DE
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Mounting Medium	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Nagellack Pro Shine Base Coat	Manhattan, Paris, FR
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom, Berlin, DE
Pancoll human; 1,077 g/l	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4,5 % (w/v)	BUEFA Chemikalien GmbH, Hude, DE
Phosphat-gepufferte Saline (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg <sup>2+</sup> , niedriger Endotoxingehalt	PAA, Pasching, AT/ Merck Millipore, Darmstadt, DE
Propidiumiodid	Life technologies, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium: 20 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 11 mM Glukose, kein L-Glutamin, niedriger Endotoxingehalt	Biochrom, Berlin, DE

Salzsäure 1,0 M	Chemosolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Solution 555 Rotor Cleaning Concentrate	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Trypanblau-Lösung Fluka 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, AT

## 2.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS (10x)	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 97,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 17,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Elutriationspuffer	0,1 % (v/v) FCS in PBS 10 mM EDTA pH 7,4
Fixierungslösung	1 % (w/v) PFA in MACS-Puffer
FixPerm-Lösung	25 % (v/v) Fixierungs-/Permeabilisierungs- konzentrat in Fixierungs-/Permeabilisierungs- diluent
MACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA in PBS 2 mM EDTA pH 7,4

## 2.5 Zellbiologische Materialien

Folgende Zellen wurden in dieser Arbeit für die Untersuchung der Aufnahme von CNP verwendet:

### 2.5.1 Humane Zelllinien

#### 2.5.1.1 Lungenepithelzellen

H441 ist eine immortalisierte humane Zelllinie, gewonnen aus Perikardflüssigkeit eines Patienten mit papillärem Lungenadenokarzinom (Gazdar *et al.*, 1990), die als *in-vitro*-Modellzelllinie zur Analyse des Verhaltens von humanem distalen Lungenepithel genutzt werden kann (Salomon *et al.*, 2014).

Zur Verfügung gestellt wurde die Zelllinie freundlicherweise von Prof. Dr. Fuchs, Experimentelle Orthopädie und Unfallchirurgie, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel.

### 2.5.1.2 Pankreatische Zellen

HPDE-pBp (auch HPDE6c7 oder H6c7-pBp-Zellen) sind immortalisierte, benigne humane Pankreasgangepithelzellen (*human pancreatic duct epithelial cells* (HPDE)), die aufgrund ihres den normalen Pankreasepithelzellen sehr ähnlichen Geno- und Phänotyps als Modell derselbigen dienen können. Sie wurden via HPV-16 E6-/E7-Onkogen immortalisiert (Ducts *et al.*, 1996; Ouyang *et al.*, 2000).

Generiert und zur Verfügung gestellt wurden die Zellen von Prof. Dr. Tsao, Ontario Cancer Institute, Toronto, Kanada.

Für die Generierung der RLT-PSC-Zelllinie wurden aus humanem Pankreasgewebe pankreatische Sternzellen (PSC) isoliert und durch Transduktion von retroviralem Antigen SV40T und hTERT immortalisiert (Jesnowski *et al.*, 2005). PSC sind Bindegewebszellen, die im ruhenden Zustand Vitamin A und Fett speichern, im aktiven Zustand dagegen myofibroblastische Eigenschaften annehmen und Extrazellulärmatrix und Kollagenfasern sezernieren (Apte *et al.*, 1998).

### 2.5.2 Murine Zelllinie

DC2.4-Zellen sind immortalisierte, murine dendritische Zellen aus Knochenmark von C57BL/6-Mäusen. Transduktion mittels retroviraler Vektoren führte bei ihnen zu einer Expression von *myc*- und *raf*-Onkogenen. Sie zeigen die typischen morphologischen und funktionellen Charakteristika dendritischer Zellen und exprimieren auch deren spezifische Zellmarker (Shen *et al.*, 1997), sodass sie in diesem Projekt als DC-Modell-Zelllinie verwendet wurden.

Zur Verfügung gestellt wurde diese Zelllinie freundlicherweise von Prof. Dr. Scherließ, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

### 2.5.3 Humane Primärzellen

Die humanen Primärzellen, aus denen APC wie DC und Makrophagen generiert wurden, wurden aus Leukozyten-Reduktionskammern isoliert. Die Reduktionskammern wurden vom UKSH-Blutspendezentrum im Citti-Park in Kiel zur Verfügung gestellt.

Bei den Blutspendern handelte es sich ausnahmslos um gesunde und freiwillige Personen, die über die Nutzung ihres Blutes für Forschungszwecke informiert worden waren und dem zuge-

stimmt hatten. Die entsprechende Ethikkommissionsgenehmigung über die Verwendung des erhaltenen Blutes zu diesem Zwecke liegt vor (Aktenzeichen D 490/17, siehe Anhang 8.1).

Der Transport wurde freundlicherweise durch Prof. Dr. Wesch (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) und Dr. Rösner (Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie, UKSH Kiel) organisiert.

#### 2.5.4 Zellkulturzusätze

Zellkulturzusatz	Firma
Fötale Kälberserum (FCS)	BioLegend, Fell, DE
L-Glutamin	PAA, Pasching, AT
MEM nicht-essenzielle Aminosäuren-Lösung (100X)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	PAA, Pasching, AT
Puromycin	InvivoGen, Toulouse, FR
Rinderhyophysenextrakt	Life Technologies, Darmstadt, DE

#### 2.5.5 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktor/Zytokin	Firma
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human rekombinant	Life Technologies, Darmstadt, DE
Interleukin-4 (IL-4), human rekombinant	BioLegend, Fell, DE
Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), human rekombinant	BioLegend, Fell, DE
Monozytenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), human rekombinant	BioLegend, Fell, DE

#### 2.5.6 Mykoplasmen-Kontaminationstest

PCR-Kitsystem	Firma
MycoAlert™ Mycoplasma detection kit	Lorenza Group, Basel, CH

## 2.6 Medien

Zelllinie	Zusammensetzung des Mediums
DC2.4	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Pen-Strep 1 % (v/v) MEM nicht-essenzielle Aminosäuren-Lösung
H441	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Pen-Strep
HPDE-pBp	50 % (v/v) Keratinozyten Serum-freies Medium und 50 % (v/v) RPMI 1640 mit 5 % (v/v) FCS 0,5 % (v/v) L-Glutamin 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt 5 ng/ml EGF 4 µg/ml Puromycin
Humane DC	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Pen-Strep
Humane Makrophagen	RPMI 1640 mit 1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Pen-Strep
RLT-PSC	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % Natriumpyruvat

## 2.7 Antikörper

Alle aufgelisteten Antikörper wurden, wenn nicht mit \* oder \*\* anders angegeben, von der Firma BioLegend, Fell, DE bezogen.

### 2.7.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>Antigen/Fluorochrom (Klon)</b>	<b>Spezies (Isotyp)</b>	<b>Stock-Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Isotypenkontrollen</b>			
IgG1-AF647 (MOPC-21)	Maus (IgG1)	0,2 mg/ml	1:10
IgG1-PE (MOPC-21)	Maus (IgG1)	0,2 mg/ml	1:13
IgG2a-FITC (MOPC-173)	Maus (IgG2a)	0,5 mg/ml	1:250
IgG2a-PE (MOPC-173)	Maus (IgG2a)	0,2 mg/ml	1:50
IgG2b-Allophycocyanin (MPC-11)	Maus (IgG2b)	0,1 mg/ml	1:10
<b>Antikörper gegen humane Antigene</b>			
CD11b-PE (ICRF-44)	Maus (IgG1)	0,15 mg/ml	1:10
CD11c-Allophycocyanin (S-HCL-3)	Maus (IgG2b)	0,1 mg/ml	1:10
CD14-PE (M5E2)	Maus (IgG1)	0,2 mg/ml	1:50
CD16-PE (3G8)	Maus (IgG1)	0,1 mg/ml	1:50

E-Cadherin-AF647 (67A4)	Maus (IgG1)	0,2 mg/ml	1:10
HLA-DR-FITC (L243)	Maus (IgG2a)	0,2 mg/ml	1:10

### 2.7.2 Antikörper für die ImageStream-Analyse

Antigen/Fluorochrom (Klon)	Spezies (Isotyp)	Stock-Konzentration	Verdünnung
<b>Antikörper gegen humane Antigene</b>			
CD11-c-Allophycocyanin (S-HCL3)	Maus (IgG2b)	0,1 mg/ml	1:10
CD49d-PE (9F10)	Maus (IgG1)	0,125 mg/ml	1:20
CD49d-PE* (MZ18-24A9)	Maus (IgG2b)	0,1 mg/ml	1:11
E-Cadherin-AF647 (67A4)	Maus (IgG1)	0,2 mg/ml	1:40
E-Cadherin-AF647 (DECMA-1)	Ratte (IgG1)	0,5 mg/ml	1:5
EpCAM-PE (CO17-1A)	Maus (IgG2a)	0,25 mg/ml	1:5
<b>Antikörper gegen murine Antigene</b>			
mCD11c-PE** (HL3)	Armenischer Hamster (IgG1)	0,2 mg/ml	1:5

### 2.7.3 Antikörper für die Konfokalmikroskopie

Antigen/Fluorochrom (Klon)	Spezies (Isotyp)	Stock-Konzentration	Verdünnung
<b>Antikörper gegen humanes Antigen</b>			
CD11-c-Allophycocyanin (S-HCL3)	Maus (IgG2b)	0,1 mg/ml	1:50

\*Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE

\*\*BD Pharmingen Biosciences, San Jose, USA

## 2.8 Chitosan-Nanopartikel

Die Herstellung und Bereitstellung der Nanopartikel erfolgte durch die AG Prof. Dr. Scherließ im Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Kapitel 3.6).

## 2.9 Software

Software	Firma
FACScalibur CellQuest	BD Biosciences, San Jose, USA
FlowJo vs 10.1	FlowJo, LCC, Ashland, USA
IDEAS <sup>®</sup> Image Analysis Software	Merck Millipore, Darmstadt, DE
ImageJ vs 1.46	National Institutes of Health, Bethesda, USA
LSM image browser	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sigma Plot vs 12.5	Systat Software GmbH, Erkrath, DE
Weasel vs 3.0	Walter and Eliza Hall Institute of medical research, Victoria, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung von Zelllinien

#### 3.1.1 Auftauen der Zellen

Ein Kryo-Röhrchen der aufzutauenden Zelllinie wurde aus dem Stickstofftank (-196 °C) entnommen und, um einen entstehenden Unterdruck zu vermeiden, der Verschluss des Röhrchens sofort leicht gelöst. Das Röhrchen wurde für zwei Minuten in den Brutschrank gestellt, sodass sich die darin befindende Zellsuspension langsam erwärmen konnte, ehe sie mit 5-10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium vorsichtig vollständig verflüssigt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt wurde. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 300 G für 5 Minuten entstand ein Überstand, der abgesaugt werden konnte. Das am Boden des 50 ml-Röhrchens entstandene Pellet mit den Zellen wurde in 10 ml frischem, der Zelllinie entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und die entstandene Zellsuspension in Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium in diesen Zellkulturflaschen erneuert.

#### 3.1.2 Lagerung und Passagierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit je 10 ml entsprechenden Kulturmediums im Brutschrank bei kontinuierlichen 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % relativer Feuchte kultiviert. Sie wurden regelmäßig auf das Vorhandensein von Mykoplasmen-Kontaminationen kontrolliert.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter sorgfältiger Einhaltung der Sterilität unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Ab einer unter dem Lichtmikroskop geprüften 85 %-igen Konfluenz der Zellen am Zellkulturflaschenboden wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium mithilfe der Vakuumpumpe abgesaugt, anschließend 5 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben, dieses am Zellkulturflaschenboden leicht geschwenkt und wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wird als „Waschen“ der am Boden der Flaschen angewachsenen Zellen bezeichnet. Schließlich wurden 5 ml Trypsin, bzw. bei DC2.4-Zellen stattdessen 3-5 ml Accutase-Lösung, hinzugegeben und je nach Zelllinie 5-20 Minuten inkubiert, bis die Zellen sich abgekugelt und ihre Adhärenz am Zellkulturflaschenboden aufgegeben hatten. Dies wurde unter dem Mikroskop überprüft, um anschließend nach leichtem

Aufspülen die Reaktion dieser enzymatischen Ablösung der Zellen durch Zugabe der äquivalenten Menge entsprechenden Mediums zu stoppen. Die entstandene Suspension wurde nun in ein 50 ml-Röhrchen überführt und es erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 G. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das sich am Boden des Röhrchens befindende entstandene Zellpellett in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Nun wurden die Zellen gezählt und gegebenenfalls erforderliche Mengen für Versuche abgenommen. Die verbliebenen Zellen in Suspension wurden je nach Zellzahl, Wachstumsgeschwindigkeit und je nach Teilungsrate im Verhältnis 1:3 bis 1:5 aufgeteilt, in neue Zellkulturflaschen überführt, jeweils mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt, und wieder im Brutschrank gelagert. Wenn dies aufgrund schnellen Stoffwechsels und Wachstums erforderlich war, erfolgte an Tagen zwischen den Passagierungen zusätzlich ein Mediumwechsel. Dieser wurde durchgeführt, indem die Zellen nach Kontrolle unter dem Mikroskop wie oben beschrieben gewaschen wurden und danach 10 ml frischen Mediums hinzugegeben wurde.

### 3.1.3 Zählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben gewaschen, abgelöst, zentrifugiert und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. 10  $\mu$ l der Zellsuspension, die vorher noch einmal vorsichtig, aber gründlich resuspendiert wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im 50 ml-Röhrchen zu gewährleisten, wurden abgenommen und seitlich in eine Neubauer-Zählkammer hineinpipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun mithilfe der Zählkammer diejenigen Zellen gezählt, die eine regelmäßige, klar begrenzte und intakte Kontur besaßen, da bei ihnen von ihrer Viabilität ausgegangen werden konnte. Optional konnte zum Erkennen von nicht-viablen Zellen zusätzlich eine Trypanblaufärbung im Verhältnis 1:10 stattfinden. Bei dieser werden tote Zellen blau angefärbt, da der Farbstoff Trypanblau infolge der nicht mehr intakten Membran dieser Zellen in sie eindringen kann. Nach Standardprotokoll wurden beim Zählen an den Rändern der Quadrate nur die Zellen an den linken und oberen Quadranten der Neubauer-Zählkammer mitgezählt. Das gezählte Ergebnis der vier Quadrate wurde durch vier dividiert und so die Zellkonzentration mit der Einheit  $10^4$ /ml ermittelt. Bei einer sehr hohen Zellkonzentration wurde zur Erleichterung der Zählung eine 1:10-Verdünnung hergestellt, deren Zählergebnis schließlich wieder mit dem Faktor 10 multipliziert wurde.

### 3.1.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde zunächst ein Zellpellet generiert, indem die Zellen gewaschen, aus den Zellkulturflaschen abgelöst und zentrifugiert wurden, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l DMSO und 900  $\mu$ l FCS aufgenommen und die entstandene Suspension unverzüglich in Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden für 24 Stunden bei  $-80$  °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierkarussell belassen, um ein gleichmäßiges Einfrieren zu ermöglichen. Danach wurden die Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

## 3.2 Isolierung humaner Primärzellen

### 3.2.1 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung primärer mononukleärer Zellen aus Spenderblut

Vom zur Generierung von humanen Makrophagen und DC verwendeten Blut wurden im Blutspendezentrum Citti-Park Kiel in einer Leukozytenreduktionskammer Blutplasma und Thrombozyten herausgetrennt, sodass ein kegelförmiger Behälter mit Leukozyten- und Erythrozytenkonzentrat übrigblieb, der weiterverwendet werden konnte.

Das etwa 5 ml fassende Blutkonzentrat im Kegel wurde in eine mit 10 ml PBS befüllte Zellkulturflasche tropfen gelassen, mit PBS auf ein Volumen von 140 ml aufgefüllt und gemischt. Je 35 ml dieser Blut-PBS-Suspension wurden anschließend auf je 15 ml Pancoll-Lymphozyten-Separationsmedium in spitzen 50 ml-Röhrchen langsam hinaufpipettiert, sodass eine klare Schichtung entstand. Bei Raumtemperatur und 800 G wurden die befüllten Röhrchen für 25 Minuten ohne abruptes Beschleunigen oder Abbremsen zentrifugiert.

Diese Dichtegradientenzentrifugation mit dem Zentrifugationsmedium Pancoll, einem Polymer der Sucrose, führt dazu, dass die Blutbestandteile anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit und Dichte aufgetrennt werden (Bøyum, 1964). Es entsteht eine Schichtung, bei der sich in dem spitzen Röhrchen unten tote Zellen, Granulozyten und aggregierte Erythrozyten sammeln, während sich mittig das Zentrifugationsmedium Pancoll befindet. Darüber ordnen sich die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) an und die oberste Schicht beinhaltet restliches Plasma (Abbildung 5).

Die PBMC konnten aus dieser Schichtung durch vorsichtiges Herauspipettieren entnommen werden.

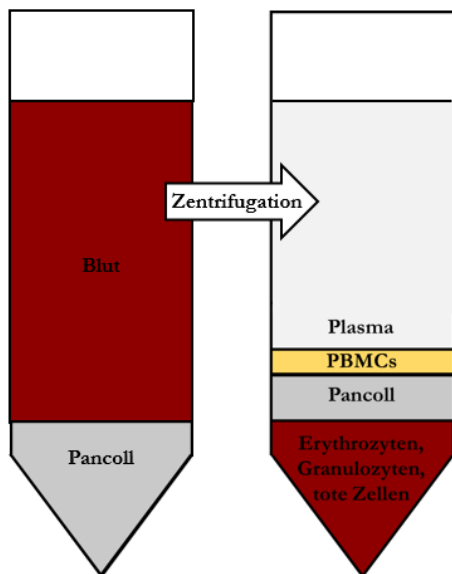


Abbildung 5: **Schichtung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation**

35 ml Blut-PBS-Suspension werden in einem 50 ml-Röhrchen auf 15 ml Pancoll-Separationsmedium hinaufgeschichtet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation befinden sich die (Blut-)Bestandteile ihrer Dichte nach getrennt. Unten sammeln sich tote Zellen, Granulozyten und aggregierte Erythrozyten, darüber folgen Pancoll, die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und zuoberst restliches Plasma. (Riedhammer, Halbritter and Weissert, 2014)

### 3.2.2 Gegenstromzentrifugation zur Trennung von Lymphozyten und Monozyten

Nach zweifachem Waschen der erhaltenen PBMC-Zellsuspension und jeweils nachfolgender Zentrifugation bei 4 °C und 300 G für zehn und dann sieben Minuten, erfolgte die Elutriation. Dafür wurden die Zellen gezählt und in einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Zellen pro 50 ml in Elutriationspuffer aufgenommen.

Die Elutriation beruht auf dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation, bei der die Zentrifugalkraft eines Elutriatorrotors und die Zugkraft der Strömungsgeschwindigkeit des verwendeten Mediums genutzt werden (Abbildung 6). Zellen unterschiedlicher Größe und Dichte können so in einer Elutriationskammer konzentriert und dann, je nach eingestellter Fließgeschwindigkeit der Zellsuspension, als voneinander getrennte Zellfraktionen isoliert aufgefangen werden (Banfalvi, 2008). So ist es möglich, Lymphozyten und Monozyten anhand ihres sich unterscheidenden Sedimentationspotentials voneinander zu trennen.

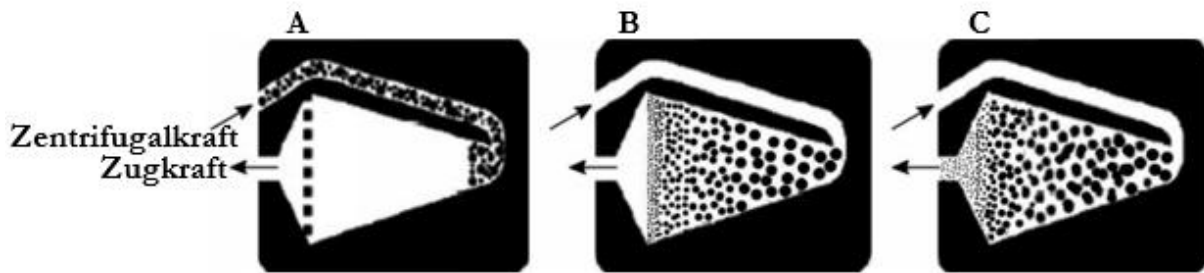


Abbildung 6: **Elutriationsschema**

**A:** Durch die Zentrifugalkraft strömen die Zellen in die Elutriationskammer. **B:** Es wirken Zentrifugal- sowie die Zugkraft der Fluss-/Strömungsgeschwindigkeit der Suspension auf die Zellen. Es erfolgt eine Sortierung nach Größe und Dichte. **C:** Die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit führt dazu, dass zunächst kleine, dann die größeren Zellen aus der Elutriationskammer strömen und diese schließlich sortiert aufgefangen werden können. (Banfalvi, 2008)

Die im Elutriationspuffer gelösten PBMC wurden bei 2305 G der Elutriationszentrifuge, 4 °C und einer Flussrate von 26 ml/Minute vollständig in das Elutriationssystem geladen, nachdem dieses mit 70 %-igem Ethanol, dann autoklaviertem Aqua Bidest (doppelt destilliertem Wasser) und Elutriationspuffer gewaschen worden war. Die Flussrate konnte in 2 ml-Schritten von 26 ml/Minute bis auf eine Rate von 32 ml/Minute erhöht werden, während dabei je 50 ml Zellsuspension aufgefangen wurden. Ab dann wurde die Flussgeschwindigkeit bis zu 46 ml/Minute in 1 ml-Schritten erhöht und weiterhin bei jedem Flussgeschwindigkeitsschritt je 50 ml der Lösung in Röhrchen aufgefangen. Zum Auffangen der letzten noch verbliebenen Zellen in der Elutriationskammer wurde die Zentrifuge ausgeschaltet und die hinausgespülten Zellen in einem weiteren Röhrchen aufgefangen. Von jeder aufgefangenen Zellfraktion wurden je 100 µl entnommen und davon eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

### 3.2.3 Bestimmung der Monozytenreinheit mittels Durchflusszytometrie

Die Vorwärtsstreuungsintensität (*forward scatter (FSC) intensity*) in der Durchflusszytometrie (auch: FACS: *Fluorescence activated cell sorting* (Zellsortierung anhand Fluoreszenz)) bietet eine Aufteilungsmöglichkeit der Zellen anhand ihrer Größe. Monozyten sind größer als Lymphozyten. Anhand der Seitwärtsstreuungsintensität (*side scatter (SSC) intensity*) lassen sich die Zellen anhand ihrer inneren Strukturen, z.B. Granula, Vesikel und Zellkern, aufteilen. Bei Monozyten sind diese im Vergleich zu Lymphozyten komplexer.

Anhand der durchflusszytometrischen Differenzierung zwischen Lymphozyten und Monozyten konnten die bei der Gegenstromzentrifugation aufgefangenen Zellfraktionen unter Nutzung von FSC und SSC auf ihre Reinheiten hin kontrolliert werden (Abbildung 7).

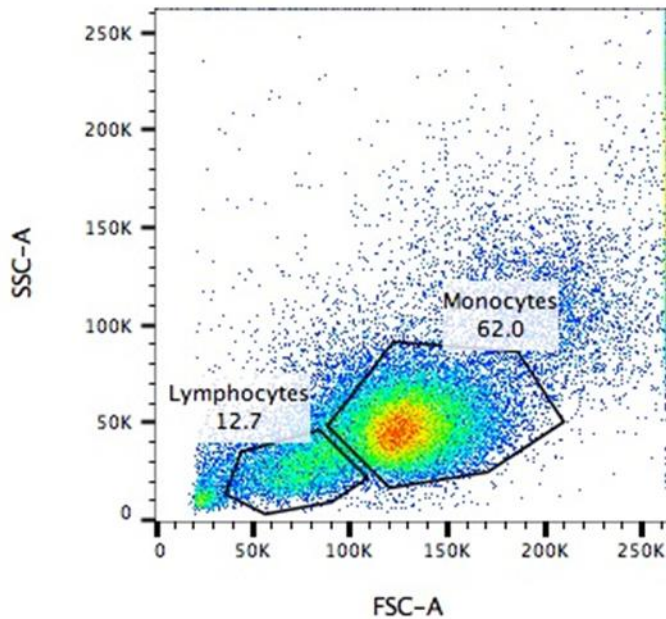


Abbildung 7: **Durchflusszytometrische Differenzierung zwischen Monozyten- und Lymphozytenpopulationen**

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen „Dot Plot“ einer Elutriationsfraktion, in der Lymphozyten und Monozyten enthalten sind. Auf der X-Achse ist anhand FSC (*forward scatter*) die ansteigende Größe der Zellpopulationen, auf der Y-Achse anhand SSC (*side scatter*) die ansteigende Granularität dargestellt. Es zeigen sich zwei Zellpopulationen, wobei die kleinere und weniger granulierte Population Lymphozyten (hier 12,7 %) und die größere, mehr granulierte Population Monozyten (in dieser Fraktion 62 %) sind. Punkte außerhalb der Populationsumrahmung wurden als Debris gewertet. Farbliche Darstellung der Zunahme des Anteils von blau, über grün und gelb bis rot.

Ausschließlich Monozytenfraktionen mit einer Reinheit ab 90 % wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet. Die Monozyten wurden bei 300 G für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, die Überstände abpipettiert, die Zellen zusammengefügt und gezählt. Die benötigte Zellzahl wurde in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, welches mit 10 % FCS für die anschließende Differenzierung zu DC oder 1 % FCS für die anschließende Differenzierung zu Makrophagen, sowie je 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt wurde.

### 3.3 Differenzierung humaner Primärzellen zu antigenpräsentierenden Zellen

#### 3.3.1 Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen

Für die DC-Differenzierung wurden die erhaltenen Monozyten in ihrem Medium mit 10 % FCS in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml/Well in einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden

zuerst adhären gelassen und dann nach etablierten Standardprotokollen (Posch, Lass-Flörl und Wilflingseder, 2016, Nair, Archer und Tedder, 2012) am ersten und erneut am dritten Tag mit je 800 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 stimuliert und für insgesamt fünf Tage differenzieren gelassen. Der stattgefundene Differenzierungsprozess der DC wurde regelmäßig mittels phänotypischer Oberflächencharakterisierungen von CD11b, CD11c, HLA-DR, CD14 und CD16 durchflusszytometrisch bestätigt (Kapitel 3.8).

### 3.3.2 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurden je  $15 \times 10^6$  Zellen in 27 ml Makrophagen-Medium mit 1 % FCS und 240 U/ml GM-CSF oder M-CSF luftbläschenfrei in Zellkultur-Teflonbeutel überführt, die mit 70 %-igem Ethanol befüllt gelagert und vor der Befüllung mit Zellen zweifach mit sterilem PBS gespült worden waren. Die mit der Monozytensuspension befüllten Beutel wurden im Brutschrank gelagert. Nach sieben Tagen Differenzierungszeit wurde der Beutel für eine Stunde auf Eis gelegt, sodass die Zellen sich vom Beutellinneren ablösen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, die Zellen bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert, in 10 ml entsprechendem Medium resuspendiert und gezählt. Der Beutel wurde zweimal mit PBS und zweimal mit Ethanol gespült, ehe er mit 15 ml Ethanol befüllt bei Raumtemperatur wieder eingelagert wurde.

Bei einer Stimulation der Monozyten mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF erhielten die entstehenden Makrophagen eine eher proinflammatorische M1-Polarisierung, während sie bei Stimulation mit M-CSF eine überwiegend antiinflammatorische M2-Polarisierung erfuhren. Dies konnte anhand durchflusszytometrischer Phänotypisierung der Oberflächenmoleküle verifiziert werden (Kapitel 3.8).

## 3.4 Aussaat der Zellen für Nanopartikelaufnahmeversuche

Für die Nanopartikelaufnahmeversuche wurden alle Zellen in 12-Well-Platten in je 1 ml/Well ausgesät und vor dem eigentlichen Versuchsbeginn für 24 Stunden am Wellboden anwachsen gelassen. Die ausgesäte Zellzahl war hierbei abhängig vom unterschiedlich schnellen Wachstum und den verschiedenen Teilungsraten der verwendeten Zellen. Je nach benötigter Zellzahl wurden für die durchflusszytometrischen Versuche und für die Konfokalmikroskopie für die Versuchsansätze zwei Wells ausgesät, diese gleich behandelt und zur Analyse der Zellen gepoolt. Für ImageStream-Analysen und durchflusszytometrische Analysen, bei denen weitere Färbungen notwendig waren, wurden jeweils vier Wells genutzt.

Die pankreatischen Zelllinien wurden jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen wachsen gelassen, um das Aufnahmeverhalten der Zellen in einem eher lockeren Zellverband und in einem dichten Zellrasen differenziert beurteilen zu können.

### 3.5 Kokultur

Zu den differenzierten humanen DC wurden pro Well in einer 12-Wellplatte je  $1 \times 10^5$  H441-Lungenepithelzellen in 50  $\mu\text{l}$  Zellmedium zugegeben. Zusätzlich wurden als Kontrolle sowohl DC als auch H441-Zellen alleine als Monokultur ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der epitheliale Phänotyp der H441-Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Zellverhältnis von 1:3 DC zu H441-Zellen erreicht und die CNP wurden zugegeben.

### 3.6 Chitosan-Nanopartikel

#### 3.6.1 Herstellung der Chitosan-Nanopartikel

Die Herstellung der CNP erfolgte durch die AG Prof. Scherließ im Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Durch ionische Gelierung und unter Verwendung von Carboxymethylcellulose (CMC) als Gegenion wurden aus Chitosan CNP hergestellt (Abbildung 8).

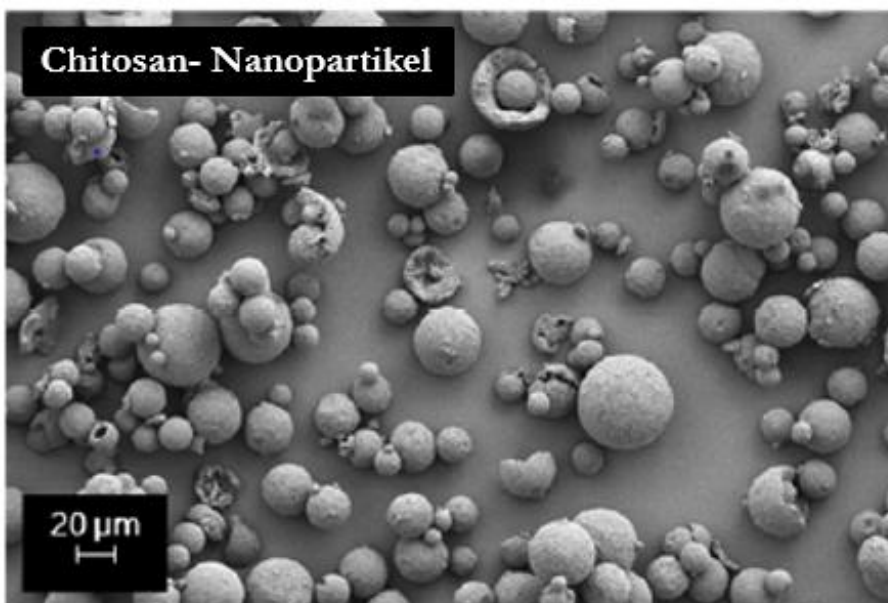


Abbildung 8: **Chitosan-Nanopartikel**

Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Chitosan-Nanopartikel in Mannitol (Heidland, 2018)

Die Größe der CNP konnte durch Variierung der Menge der CMC beeinflusst werden und wurde von der AG Prof. Scherließ durch eine Messung mit dem Zetasizer verifiziert.

Die Partikel wurden mit Fluorescein-Isothiocyanat Isomer I (FITC)-Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, um sie in den experimentellen Analysen sichtbar machen zu können.

Nach Sprühtrocknung der Partikel war es möglich, diese in Pulverform bei 4 °C im Dunklen zu lagern. Als Trägersubstanz für die verwendeten CNP wurde im Verhältnis 1:20 Mannitol benutzt. Die verwendeten Portionen à 42 mg enthielten somit je 2 mg Chitosan und 40 mg Mannitol.

### 3.6.2 Größe der Chitosan-Nanopartikel

Genutzt wurden CNP mit unterschiedlicher Größe: 90/10, 90/20 und 90/50. Einfluss auf die Größe der CNP haben sowohl Deacetylierungsgrad als auch Viskosität.

Der Deacetylierungsgrad ist dabei in Prozent als erste Ziffer angegeben und betrug bei allen verwendeten Partikeln 90 %.

Das Molekulargewicht kann über die Viskosität definiert werden, welche jeweils als zweite Ziffer als Viskosität einer 1 %-igen Lösung in 1 % Essigsäure in mPa·s angegeben ist.

Die kleinsten Partikel (90/10-CNP) befanden sich im Größenbereich von 180 nm bis 260 nm, während die mittlere Partikelgröße (90/20-CNP) 400 nm bis 550 nm und die größte (90/50-CNP) 980 nm bis 1000 nm betrug. Durchschnittlich wurden 200 nm, 450 nm und 980 nm erreicht (Tabelle 1).

#### Tabelle 1: Chitosan-Nanopartikelgrößen

Einfluss auf die Größe der Chitosan-Nanopartikel (CNP) haben sowohl Deacetylierungsgrad als auch Viskosität. Die erste angegebene Ziffer der CNP bezeichnet den Deacetylierungsgrad in Prozent, die zweite Ziffer bezeichnet die Viskosität in mPa·s. Angegeben ist die durchschnittlich erreichte Größe der CNP in nm.

Chitosan-Nanopartikel	Durchschnittliche Größe
90/10-CNP	200 nm
90/20-CNP	450 nm
90/50-CNP	980 nm

### 3.7 Inkubation der Zellen mit Chitosan-Nanopartikeln

Die pulverisierten CNP dreier Größen in Portionen à 2 mg Chitosan (und 40 mg Mannitol als Trägersubstanz) wurden in je 2 ml Zellkulturmedium gelöst. Von der entstandenen Suspension

wurde je 100  $\mu\text{l}$  zu je 1 ml/Well der 24 Stunden zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden immer auch Wells mit Zellen ohne Nanopartikelbehandlung belassen. Die Zellen wurden nach der Zugabe der CNP für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

## 3.8 Durchflusszytometrische Analyse

### 3.8.1 Vorbereitung der Zellen

Die für 24 Stunden mit CNP inkubierten Zellen und die unbehandelten Kontrollen wurden unter dem Lichtmikroskop auf Vitalität kontrolliert und anschließend mit je 500  $\mu\text{l}$  PBS pro Well gewaschen. Bei den humanen und murinen DC wurden danach 500  $\mu\text{l}$  Accutase-Lösung pro Well hinzugegeben und im Brutschrank bis zur Abkugelung der Zellen inkubiert. Alle anderen Zellen wurden mit je 500  $\mu\text{l}$  Trypsin pro Well vom Wellboden gelöst.

Zum vollständigen Ablösen der Zellen wurden 400  $\mu\text{l}$  der 500  $\mu\text{l}$ -Zellsuspension vorsichtig aus dem Well heraus pipettiert, dieses noch einmal damit gespült, und schließlich die kompletten 500  $\mu\text{l}$  Volumen pro Well aufgenommen. Die jeweils zwei zusammengehörigen Zellsuspensionen einer Behandlung wurden gemeinsam in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, wo die enzymatische Reaktion der Ablösung der Zellen mit der äquivalenten Menge von 1 ml Medium abgestoppt wurde. Nun erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Zellen bei 300 G. Eine Ausnahme bildeten die humanen DC, die lediglich 5 Minuten zentrifugiert wurden. Die entstandenen Überstände wurden abgenommen und das Zellpellet in 300  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer gelöst. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und wiederum die Überstände abgenommen.

Für die Analyse der Zell-CNP-Assoziation mittels Durchflusszytometrie wurden die pelletierten Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und unmittelbar danach mit dem Durchflusszytometer gemessen.

### 3.8.2 Färbung zur Analyse der Zellcharakterisierung

Für die Charakterisierungen der humanen DC sowie der Makrophagen, erfolgte eine Färbung von spezifischen Oberflächenantigenen der Zellen. Auch für die Kokulturversuche mit den humanen DC und Lungenepithelzellen erfolgte dies, um beide Zellpopulationen voneinander differenzieren und die jeweiligen Nanopartikelassoziationen eindeutig einem Zelltyp zuordnen zu können.

Für die Färbung wurden nach der Zentrifugation die Zellen gezählt, pro Ansatz  $1 \times 10^5$  Zellen in 25  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer und FC-Block (1:100) aufgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Nach einer Zugabe von 100  $\mu$ l MACS-Puffer pro Well wurden die Zellen für 10 Minuten bei 300 G und 4 °C zentrifugiert. Die DC wurden nur 5 Minuten zentrifugiert.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter größtmöglicher Vermeidung von Lichtexposition durchgeführt. Die entstandenen Überstände wurden entfernt und die Zellen in der benötigten Antikörper-Verdünnung in 25  $\mu$ l MACS-Puffer pro Ansatz in einer spitzen 96-Wellplatte aufgenommen. Die jeweils verwendeten Verdünnungen für die Antikörperfärbungen sind im Abschnitt 2.7.1 aufgeführt.

Die Inkubation mit den fluoreszenzdirektkonjugierten Antikörpern erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen, zentrifugiert und schließlich in 100  $\mu$ l 1 % PFA in MACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt, welches bis zur Analyse mit Parafilm verschlossen wurde.

### 3.8.3 Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertungsmethode

Am Durchflusszytometer wurden für jede Messung mindestens zehntausend Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden zuerst hinsichtlich ihrer Größe und Granularität im Vorwärts- und Seitwärtslicht (FSC und SSC) gemessen. Damit wurde ein „Gating“ erstellt, anhand dessen z.B. Detritus, tote Zellen und freie CNP aus den folgenden Analysen ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 9 A).

Die anschließenden Messungen erfolgten hinsichtlich des FITC-Signals der CNP gegenüber FSC. Hierbei erfolgte das „Gating“ anhand der Kontrollgruppe, d.h. den Zellen, denen keine CNP zugefügt worden waren (Abbildung 9 B).

Es wurde mithilfe der Weasel und der FlowJo-Software sowohl die Fluoreszenzintensität als auch der Anteil an FITC-positiven Zellen bestimmt.

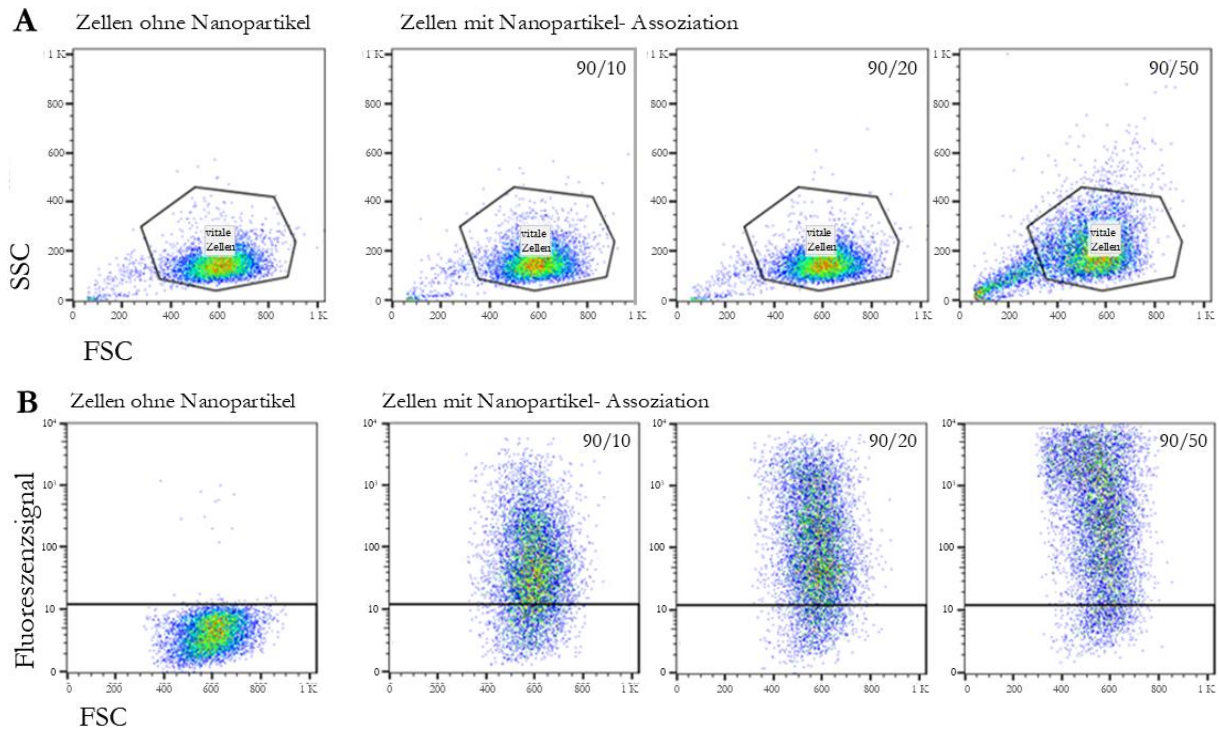


Abbildung 9: Durchflusszytometrie „Gating“

**A:** Lediglich die mutmaßlich vitale Zellpopulation wurde in die Analyse eingeschlossen (schwarze Umräumung). Tote Zellen sowie Zellteile und freie Nanopartikel (außerhalb der schwarzen Umräumung) wurden aus der Analyse ausgeschlossen. **B:** Es erfolgte die Analyse des Fluoreszenzsignals der zuvor eingeschlossenen Zellpopulation. Die Grenze für die Analyse wurde anhand der Zellkontrolle ohne Nanopartikelzugabe gesetzt (schwarze Linie). Die Fluoreszenzintensität und der Anteil an Fluoreszenz-positiven Zellen wurde für alle drei Chitosan-Nanopartikelgrößen (90/10, 90/20, 90/50) bestimmt. Farbliche Darstellung der Zunahme des Anteils von blau, über grün und gelb bis rot.

### 3.9 ImageStream-Analyse

Die Membranfärbung der Zellen für die ImageStream-Analyse der CNP-Aufnahme erfolgte weitgehend nach dem Färbeprotokoll für die Durchflusszytometrie (Kapitel 3.8.2). Es waren hierfür jedoch doppelt so viele Zellen notwendig. Die Zellen wurden nach ihrer Ablösung und den Waschschritten für 30 Minuten in 50  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Antikörperverdünnungslösung bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach erfolgter Färbung wurden die Zellsuspensionen nach zweimaliger Waschung mit MACS-Puffer in 50  $\mu\text{L}$  eines 1 %-igen PFA/MACS-Puffers fixiert und bis zur Messung kalt und dunkel gelagert.

ImageStream kombiniert die durchflusszytometrische Technik mit detaillierter Mikroskopie. Durch die Membranfärbung der Zellen sowie durch die hellfeldmikroskopischen Bilder konnten die Zellgrenzen visuell dargestellt werden, sodass die Möglichkeit entstand zu bestimmen, ob sich Nanopartikel-FITC-Signale innerhalb oder außerhalb der Zelle befanden. Es wurde das Verhält-

nis von intrazellulärem zum gesamten FITC-Signal und somit ein Internalisierungsscore errechnet. Je mehr Fluoreszenzsignal sich intrazellulär befand, desto höher war der Internalisierungsscore. Des Weiteren wurde der Anteil an Zellen in Prozent bestimmt, in denen sich intrazelluläres FITC-Signal befand, die also CNP aufgenommen hatten.

Die ImageStream-Analyse erfolgte mit dem Amnis ImageStream®X Mk II Imaging Flow Cytometer und der IDEAS® Image Software.

### 3.10 Konfokalmikroskopie

Für die Färbung der Zellen zur Darstellung unter einem Konfokalmikroskop wurden die zuvor nach beschriebenem Protokoll (Kapitel 3.3.1) - aber auf Deckgläschen - differenzierten DC in einer Dichte von ca. 350.000 Zellen/Well für 24 Stunden mit FITC-gekoppelten CNP inkubiert und danach mit 500 µl PBS/Well gewaschen. Nach einer sich anschließenden 15-minütigen Fixierung der in der Wellplatte verbliebenen Zellen mit 4,5 %-igem PFA wurden die Zellen dreimalig auf einem Schüttler mit PBS gewaschen. Daran schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit 4 % BSA/PBS bei Raumtemperatur zur Blockierung unspezifischer Immunglobulinbindungen an. Pro Deckgläschen wurden je 100 µl einer 1 % BSA/PBS-Lösung mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper (Kapitel 2.7.3) für die Zellmembranfärbung und Hoechst #33258 (Verdünnung 1:500) für die Kernfärbung auf eine mit Parafilm bezogene Glasplatte pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette aus der Well-Platte entnommen und mit der Zellseite bläschenfrei auf die Lösung gelegt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen in einer Feuchtkammer. Nach sich anschließendem viermaligen, 5-minütigen Waschen mit PBS im Dunklen, wurden die Deckgläschen mit Eindeckelungsmedium auf Objektträger aufgebracht, trocknen gelassen und schließlich mithilfe durchsichtigen Nagellacks befestigt und versiegelt. Bis zur Durchführung der Konfokalmikroskopie wurden die Deckgläschen dunkel und bei 4 °C gelagert.

### 3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgte mit SigmaPlot Version 12.5. Nach dem Shapiro-Wilk-Normalitätstest, der durchgeführt wurde, um festzustellen, ob die Daten normalverteilt sind, folgte ein Test auf gleiche Varianz.

Für den Vergleich zweier normalverteilter, parametrischer Datengruppen wurde der t-Test verwendet. Mehr als zwei Gruppen wurden untereinander mit dem *one-way analysis of variance* (ANOVA) auf statistisch signifikante Unterscheidungen hin geprüft.

Zwei nicht-parametrische Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummentest analysiert, während multiple Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test (*one-way ANOVA on ranks*) geprüft wurden.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit p-Werten  $< 0,05$  gewertet. Diese wurden mit der Student-Newman-Keuls-Methode bei parametrischen Daten und mit der Dunn-Methode bei nicht-parametrischen Daten ermittelt. Sie wurden mit \* gekennzeichnet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Assoziation von Chitosan-Nanopartikeln und antigenpräsentierenden Zellen**

#### **4.1.1 Analyse der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie**

Um zunächst die Assoziation von CNP und Zellen zu untersuchen, erfolgte 24 Stunden nach Inkubation der APC mit den CNP eine durchflusszytometrische Analyse. Bei allen untersuchten APC konnte mittels Fluoreszenzintensitätsmessung eine Assoziation der Zellen mit den fluoreszenzgekoppelten CNP nachgewiesen werden. Es zeigte sich in allen untersuchten Zellgruppen ein deutlicher Anstieg der gemessenen medianen Fluoreszenzintensität mit ansteigender Nanopartikelgröße (Abbildung 10).

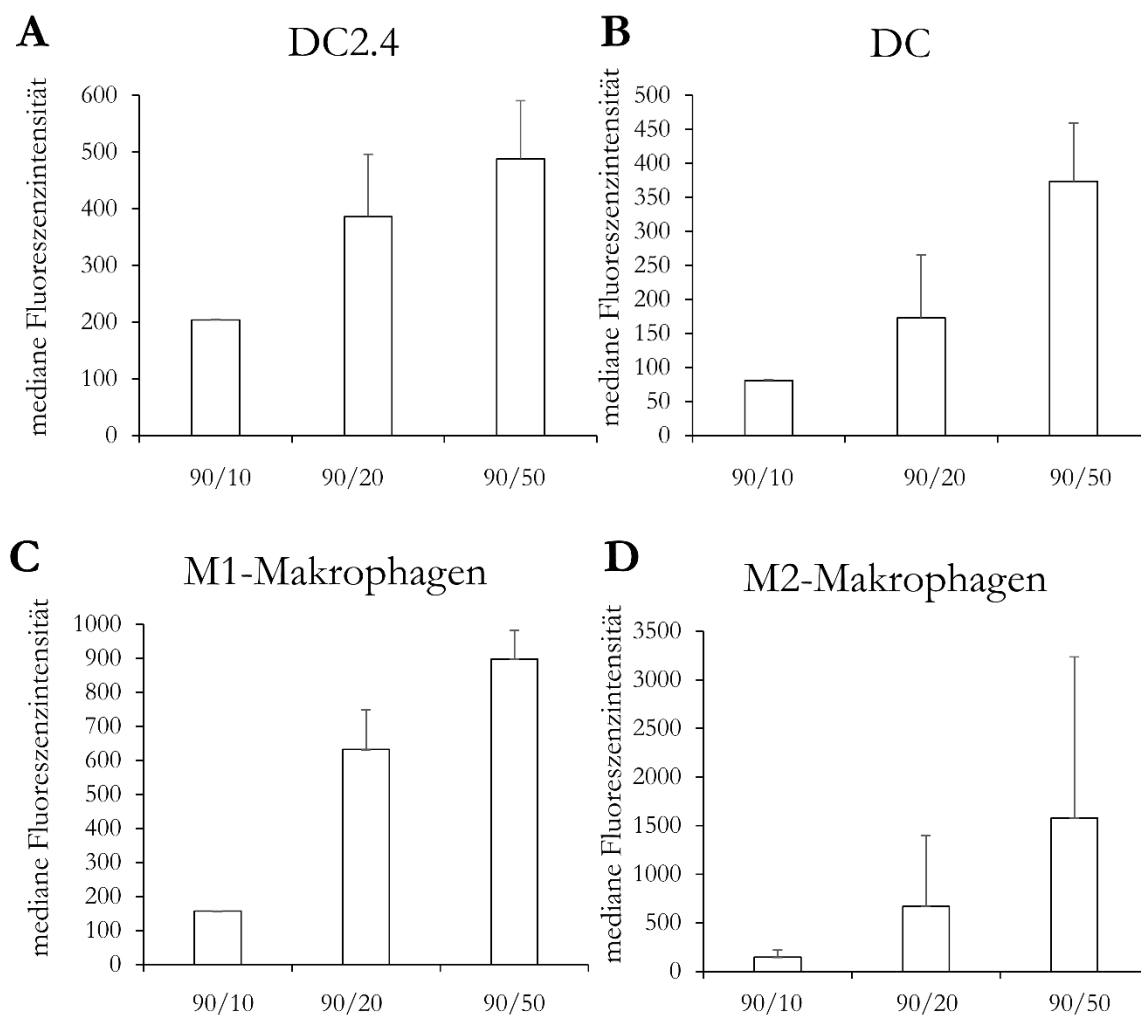


Abbildung 10: **Mediane Fluoreszenzintensität bei antigenpräsentierenden Zellen nach Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Chitosan-Nanopartikeln**

Durchflusszytometrische Analysen 24 Stunden nach Zugabe der CNP (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) zu dendritischen Zellen (**A**: murine DC2.4, **B**: humane DC) und **C**: M1-Makrophagen und **D**: M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensität des abgegebenen FITC-Signals mit den Zellen assoziierter CNP mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.1.2 Bestimmung des Anteils an FITC-positiven Zellen

Neben der Fluoreszenzintensität wurde 24 Stunden nach Inkubation der APC mit den CNP anhand der durchflusszytometrischen Analysen und mithilfe der Weasel- sowie FlowJo-Software der Anteil an Zellen bestimmt, die ein Fluoreszenzsignal abgaben und somit mit den fluoreszenzkonjugierten Nanopartikeln assoziiert waren (Abbildung 11).

In den Analysen der murinen DC ergab sich ein Anteil an FITC-positiven Zellen von über 99 % für alle drei Nanopartikelgrößen (Abbildung 11 A). Bei den humanen DC ergab sich mit anstei-

gender Nanopartikelgröße ein steigender Anteil an Zellen, die mit CNP assoziiert waren: 61 % bei 90/10-CNP, 79 % bei 90/20-CNP und 84 % bei 90/50-CNP (Abbildung 11 B). In allen Makrophagenversuchen lag der Anteil an Zellen mit Nanopartikelassoziation bei über 90 % (90,5-93 %) (Abbildung 11 C+D).

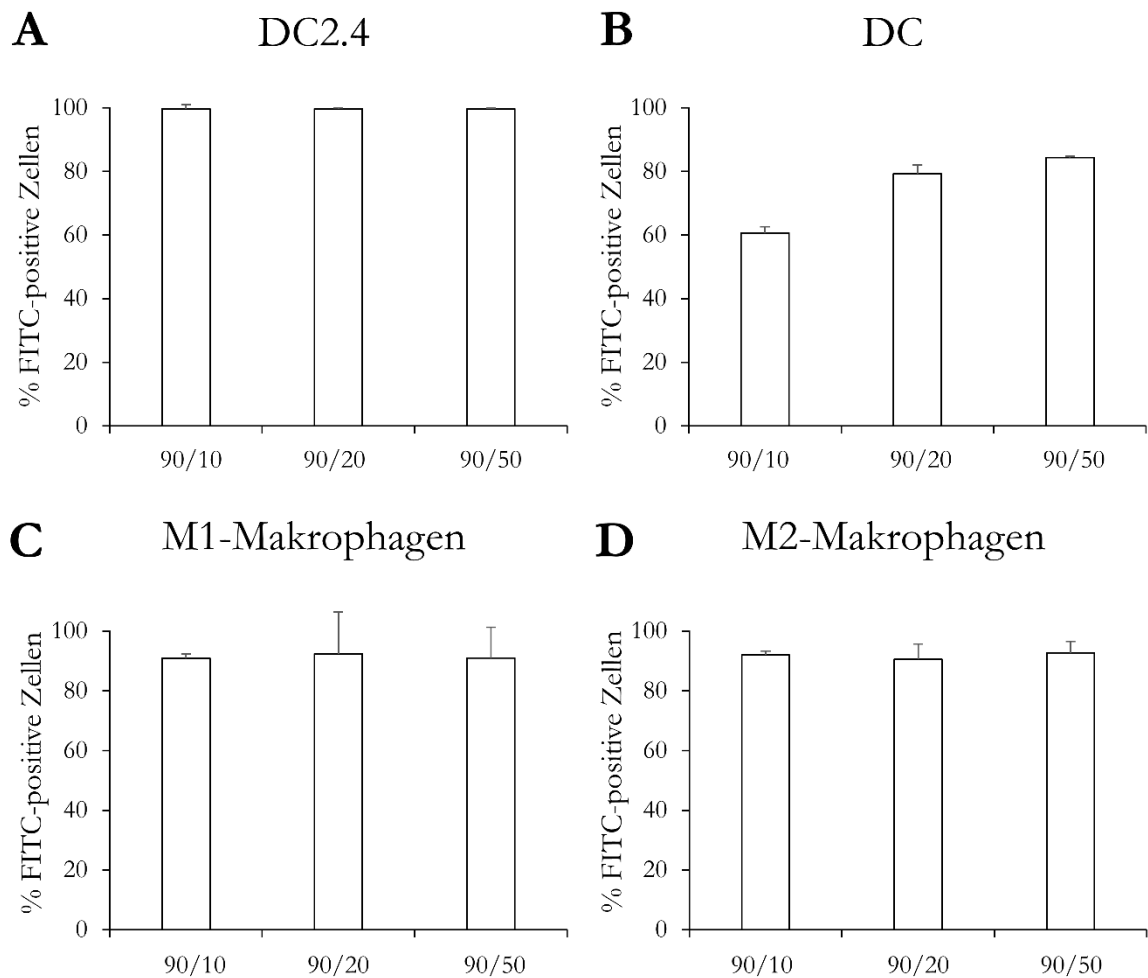


Abbildung 11: Anteil an FITC-positiven antigenpräsentierenden Zellen nach Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Chitosan-Nanopartikeln

Durchflusszytometrische Analysen 24 Stunden nach Zugabe der CNP (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) zu dendritischen Zellen (**A**: murine DC2.4, **B**: humane DC) und **C**: M1- und **D**: M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Mittelwerte des Anteils an Zellen in Prozent, die mit FITC-konjugierten CNP assoziiert sind, mit Standardabweichung, aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 4.2 Morphologie dendritischer Zellen nach Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel

Um eine mögliche morphologische Veränderung der Zellen, vor allem der DC, durch die Zugabe von CNP zu erkennen, wurden die humanen DC 24 Stunden nach Inkubation mit den verschiedenen großen CNP lichtmikroskopisch untersucht. In der unbehandelten Kontrollgruppe präsentierten sich die DC mit charakteristischer Differenzierung mit langen, dünnen Zellfortsätzen (Dendriten) in einer gleichmäßigen Verteilung über den Wellboden (Abbildung 12 A). Nach Inkubation mit 90/10-CNP und 90/20-CNP für 24 Stunden ergab sich keine lichtmikroskopisch erkennbare veränderte Zellmorphologie der humanen DC, jedoch ein mit der Größe der Partikel ansteigender Anteil an orange-braunen Ansammlungen, die mutmaßlich agglomerierte Nanopartikel darstellten (Abbildung 12 B+C). Eine sichtbare Veränderung der Morphologie der DC zeigte sich nach Stimulation mit den größten CNP, den 90/50-CNP (Abbildung 12 D). Der Anteil an mit Ausläufern differenzierten DC war erniedrigt und die Zellverteilung im Well gruppiert. Der Anteil an abgekugelten Zellen erhöhte sich und agglomerierte CNP waren gehäuft darstellbar.

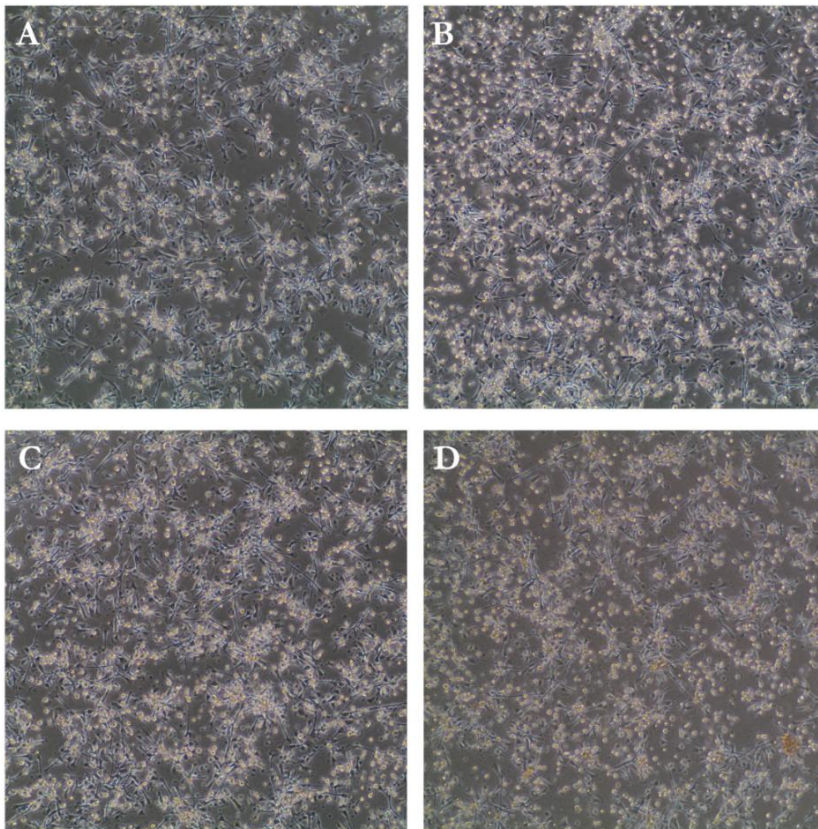


Abbildung 12: Lichtmikroskopie der humanen dendritischen Zellen nach Zugabe von Chitosan-Nanopartikeln verschiedener Größe

Repräsentative lichtmikroskopische Bilder humaner dendritischer Zellen, aufgenommen mit 280-facher Vergrößerung. **A**: unbehandelt; **B-D**: 24 Stunden nach Zugabe von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chitosan-Nanopartikeln in Größe **B**: 90/10, **C**: 90/20, **D**: 90/50.

### 4.3 Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in antigenpräsentierende Zellen

#### 4.3.1 Analyse der Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln mittels ImageStream-Verfahren

Mit dem ImageStream-Verfahren, welches hochauflösende Mikroskopie und Durchflusszytometrie kombiniert, sollte untersucht werden, ob die CNP nicht nur mit den Zellen assoziiert sind, sondern von ihnen aufgenommen werden. Mit dem Verfahren wurde differenzierbar, ob die FITC-gekoppelten CNP an der Zelle assoziiert sind oder sich innerhalb der Zelle befinden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Oberflächenmarkierung der zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern (Kapitel 2.7.2, Kapitel 3.8.2), um die Zellgrenzen genau darzustellen und die Unterscheidung von intra- oder extrazellulärem FITC-CNP-Signal zu ermöglichen. Mittels ImageStream-Verfahren ließen sich Zellen ohne CNP-Aufnahme (Abbildung 13 A) deutlich von Zellen mit Aufnahme von CNP (Abbildung 13 B+C) unterscheiden. Auch die Differenzierung zwischen sich an der Zelle befindenden CNP oder vollständig internalisierten CNP erfolgte mittels ImageStream (Abbildung 13 B).

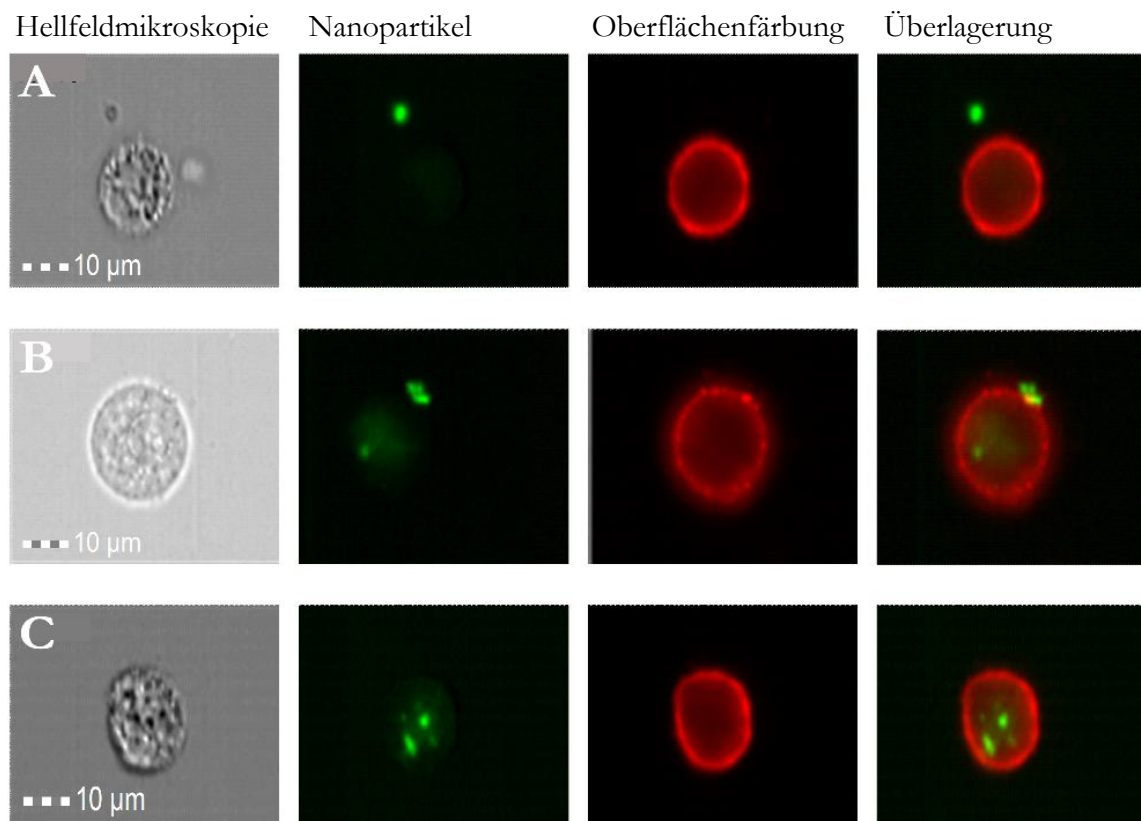


Abbildung 13: **ImageStream-Bilder von humanen dendritischen Zellen nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln**

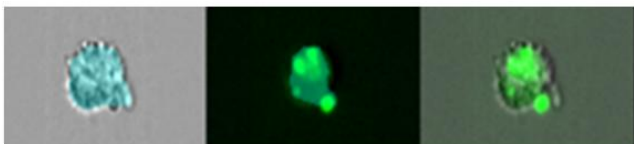
Darstellung repräsentativer Bilder humaner dendritischer Zellen (DC) nach Inkubation mit 100 µg/ml 90/10-CNP für 24 Stunden, analysiert mit ImageStream-Bildzytometrie. **A:** DC ohne CNP-Aufnahme: jegliches CNP-FITC-Signal befindet sich extrazellulär. **B:** CNP innerhalb und außerhalb (an) der Zelle. **C:** CNP ausschließlich innerhalb der DC. Grün = FITC-konjugierte CNP; rot = CD11c-Allophycocyanin-Oberflächenfärbung der DC

Mittels der hellfeldmikroskopisch erzeugten Aufnahmen jeder gemessenen Zelle ließ sich über die IDEAS® Image Analysis Software eine automatisierte Erkennung der Zellgrenzen ohne Nutzung der Membranfärbung einrichten. Abbildung 14 A zeigt ein mögliches Problem der automatisierten Zellgrenzenerkennung lediglich anhand der Hellfeldmikroskopie. Die Zellgrenzen wurden in diesem Beispiel durch außen an der Zelle haftende mit eingeschlossene CNP falsch erfasst, sodass diese CNP fälschlicherweise als intrazellulär gewertet wurden. Durch die Internalisierungsbestimmung anhand der Oberflächenfärbung bei der gleichen Zelle wurde deutlich, dass sich Teile der CNP extrazellulär befinden (Abbildung 14 B).

Über einen direkten Vergleich der Messungen anhand der Zellgrenzen in Hellfeldmikroskopie oder anhand der Oberflächenfärbung zeigte sich, dass diese Fälle nicht in relevanter Anzahl vorkommen, sodass sie das Ergebnis der Image Stream-Analysen, für die jeweils mindestens zehntausend Zellen gemessen wurden, nicht verändern (Abbildung 14 C). Eine manuelle Anpassung

der Internalisierungsmaske anhand der visuellen Überprüfung der gemessenen Zellen war möglich. Die Bestimmung der Internalisierung von CNP in Zellen konnte anhand der erstellten Internalisierungsmaske somit auch für Zellen ohne eine nach der CNP-Inkubation erfolgte Membranfärbung etabliert werden.

### A Hellfeld-Internalisierungsmaske



### B Bestimmung der Internalisierung anhand Membranfärbung

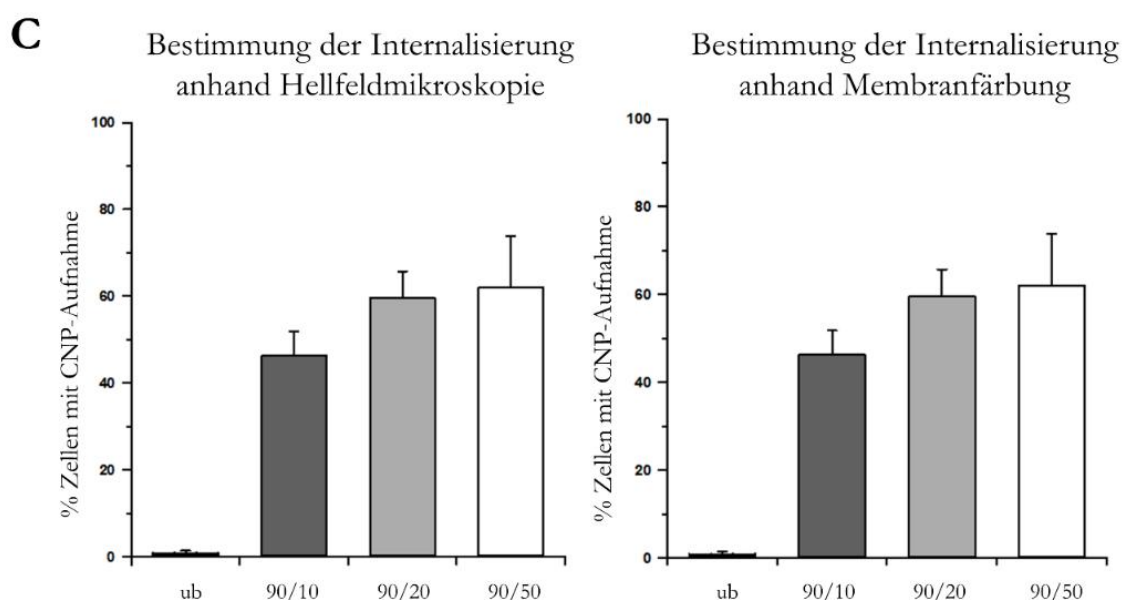
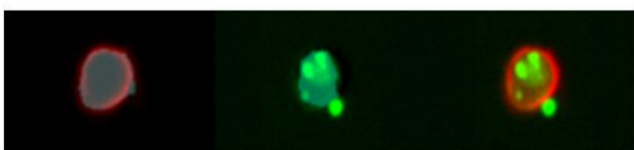


Abbildung 14: **Bestimmung der Internalisierung der Chitosan-Nanopartikel und Berechnung der Internalisierung anhand der Hellfeldmikroskopie oder Membranfärbung**

**A+B:** Repräsentative Bilder einer humanen dendritischen Zelle (DC) nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  90/10-CNP für 24 Stunden, aufgenommen und analysiert mittels ImageStream-Verfahren. **A:** Zellgrenzenbestimmung mittels Hellfeldmikroskopie. **B:** Zellgrenzenbestimmung mittels Fluoreszenz-Oberflächenmarkierung/Membranfärbung. **C:** Berechnung des Anteils an humanen DC, die CNP in drei verschiedenen Größen (90/10, 90/20 und 90/50) nach Inkubation (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 24 Stunden aufgenommen haben, anhand der Hellfeldmikroskopie (links) oder der Membranfärbung (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Blau = „Internalisierungsmaske“; grün = FITC-konjugierte-CNP; rot = CD11c-Allophycocyanin-Oberflächenmarkierung der DC; ub = unbehandelt

### 4.3.2 Bestimmung des Internalisierungsscores

Das Ausmaß der Aufnahme der fluoreszenzgekoppelten CNP in die APC wurde durch Bestimmung eines Internalisierungsscores ermittelt. Je mehr Fluoreszenzsignal sich intrazellulär befand, desto mehr CNP waren aufgenommen worden und desto höher war der Wert des Internalisierungsscores. Bei gleichem Verhältnis von intra- zu extrazellulären Nanopartikeln ergäbe der Score den Wert null, bei mehr extra- als intrazellulären Nanopartikeln ergäbe sich ein negativer Score.

Bei den murinen DC ergab sich ein ansteigender Internalisierungsscore (3,5-3,8) mit Anstieg der CNP-Größe (Abbildung 15 A).

Die höchsten Internalisierungsscores (4,8-5,4) ergaben sich bei der Analyse der CNP-Aufnahme in humane DC (Abbildung 15 B). Der Trend von höheren Scores bei größeren CNP (90/50) ergab sich auch hier.

Bei den M1-Makrophagen lag der Internalisierungsscore bei 2,8 (90/10-CNP), 3,5 (90/20-CNP) und für die 90/50-CNP bei 3,2 (Abbildung 15 C). Eine zur CNP-Aufnahme in die DC umgekehrte Tendenz zeigte sich bei den M2-Makrophagen (Abbildung 15 D). Der Internalisierungsscore der 90/10-CNP lag bei 4,6; bei den 90/50-CNP dagegen nur bei 3,5.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Internalisierungsscores der drei unterschiedlich großen CNP ergaben sich in keiner der untersuchten Zellgruppen.

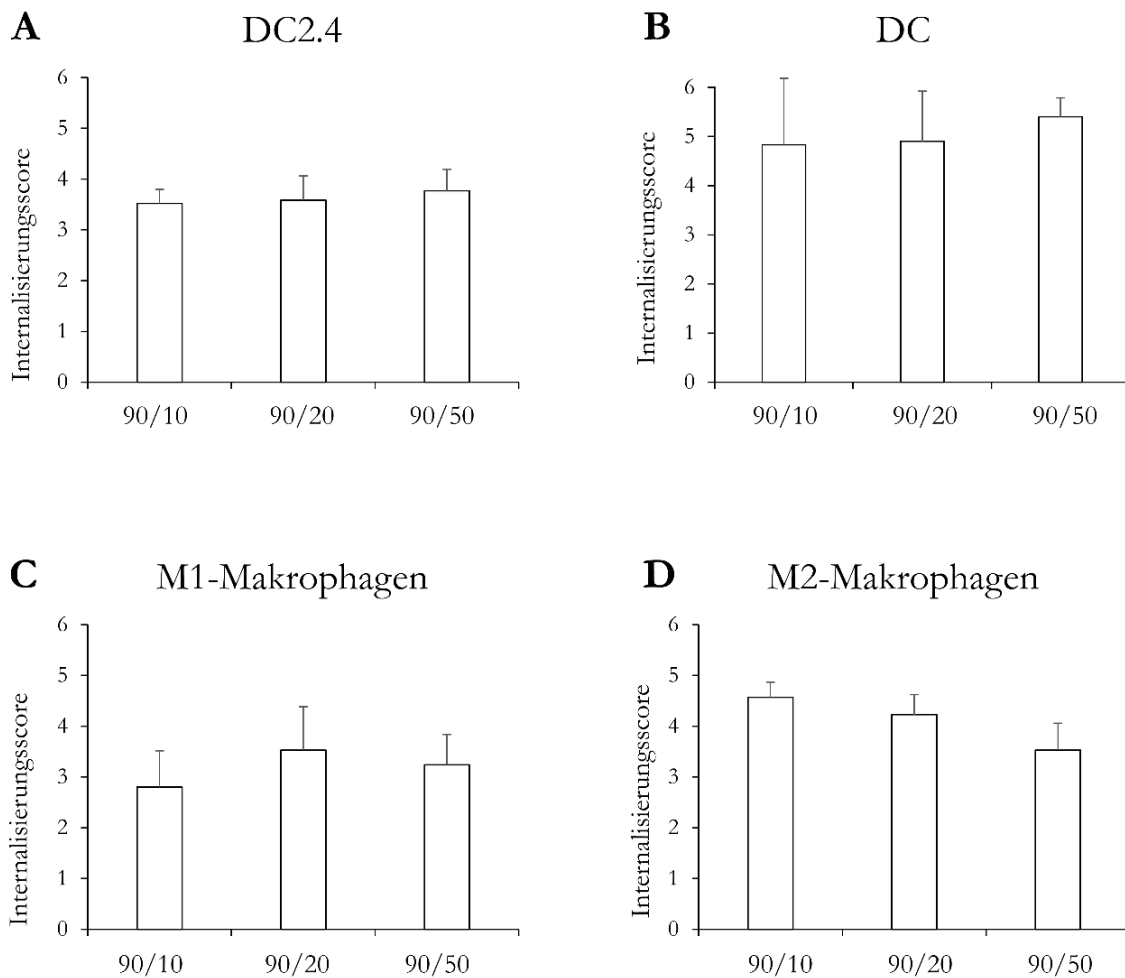


Abbildung 15: **Internalisierungsscores der durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommenen Chitosan-Nanopartikel**

Mittels ImageStream-Verfahren wurde der Internalisierungsscore 24 Stunden nach der Inkubation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  90/10-, 90/20- oder 90/50-CNP bei **A**: murinen und **B**: humanen dendritischen Zellen (DC), **C**: M1- und **D**: M2-Makrophagen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.3.3 Bestimmung des Anteils der Zellen mit Chitosan-Nanopartikelaufnahme

Als nächstes wurde bildzytometrisch neben dem Internalisierungsscore auch der Anteil an Zellen bestimmt, die CNP aufgenommen hatten.

Bei allen APC zeigte sich der größte Anteil an Zellen mit intrazellulär aufgenommenen CNP bei den größten CNP (90/50). 70,5 % der DC2.4 internalisierten die 90/50-CNP (Abbildung 16 A), 62 % der humanen DC (Abbildung 16 B) sowie 60 % der M1- und 73 % der M2-Makrophagen (Abbildung 16 C+D). Eine ansteigende CNP-Aufnahme mit steigender Nanopartikelgröße war bei den Makrophagen signifikant und zeigte sich auch bei den DC deutlich. Statistisch signifikant

war jeweils auch der Unterschied zwischen allen unbehandelten und mit CNP inkubierten Zellgruppen (nicht dargestellt).

Insgesamt wurde durch das ImageStream-Verfahren für alle untersuchten APC nachgewiesen, dass sie zu einem hohen Anteil CNP unterschiedlicher Größe intrazellulär aufnehmen.

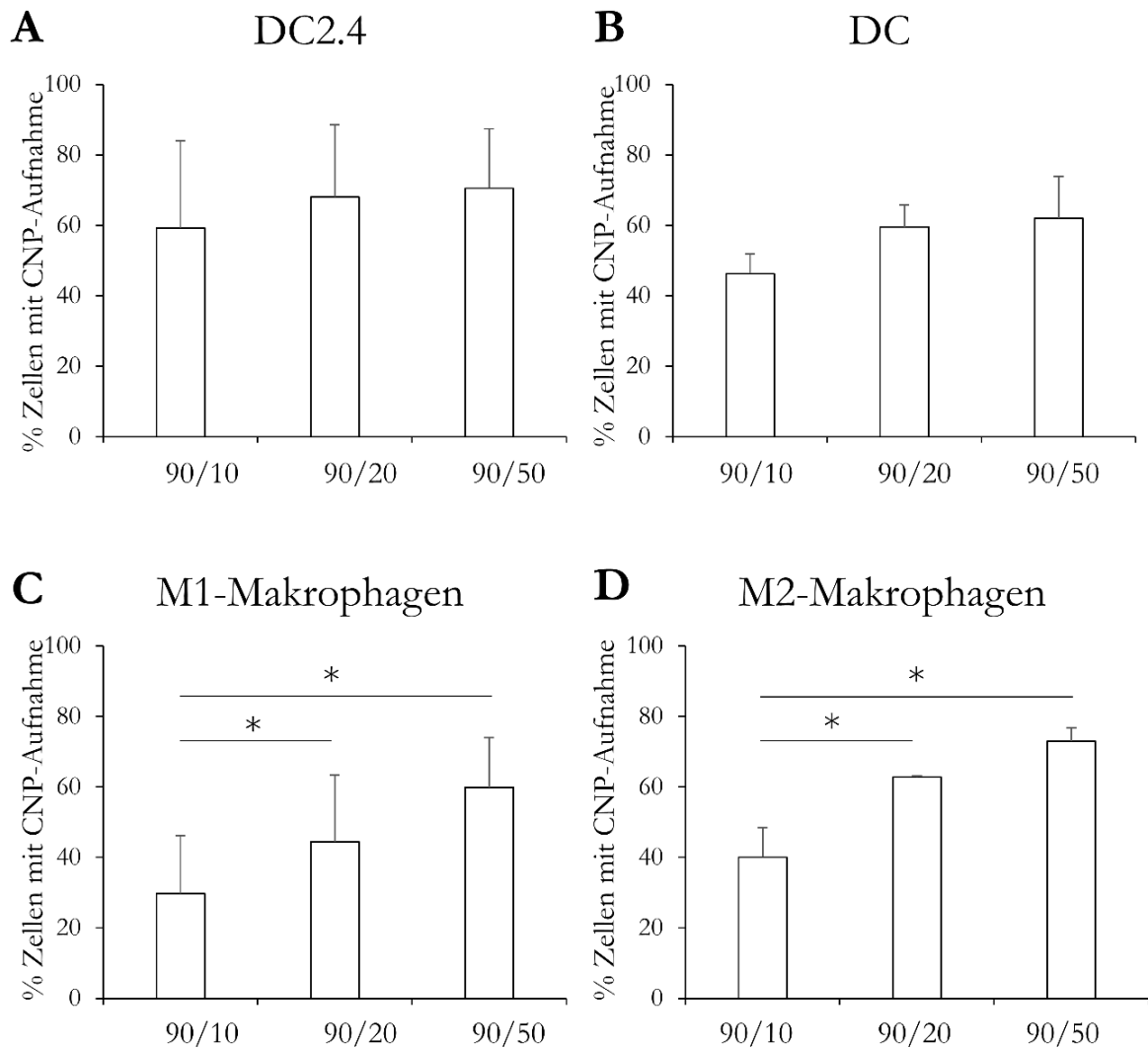


Abbildung 16: Anteil der antigenpräsentierenden Zellen mit Chitosan-Nanopartikel-aufnahme

Mithilfe des ImageStream-Verfahrens wurde 24 Stunden nach Inkubation der antigenpräsentierenden Zellen mit CNP der Größe 90/10, 90/20 und 90/50 der Anteil der Zellen in Prozent bestimmt, die CNP aufgenommen hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens je drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten an **A**: murinen und **B**: humanen dendritischen Zellen (DC) sowie **C**: M1-Makrophagen und **D**: M2-Makrophagen. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Konfokalmikroskopie dendritischer Zellen nach Chitosan-Nanopartikelzugabe

Um die Aufnahme der CNP in DC zu bestätigen, wurden die humanen DC nach der Zugabe von 100 µg/ml 90/10-CNP mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Durch die damit mögliche detaillierte Durchrasterung war die Erstellung von hochaufgelösten Schnittbildern in verschiedenen Tiefen des DC-Präparates möglich. Es bestätigte sich mittels der Konfokalmikroskopie, dass die CNP in DC aufgenommen wurden (Abbildung 17).

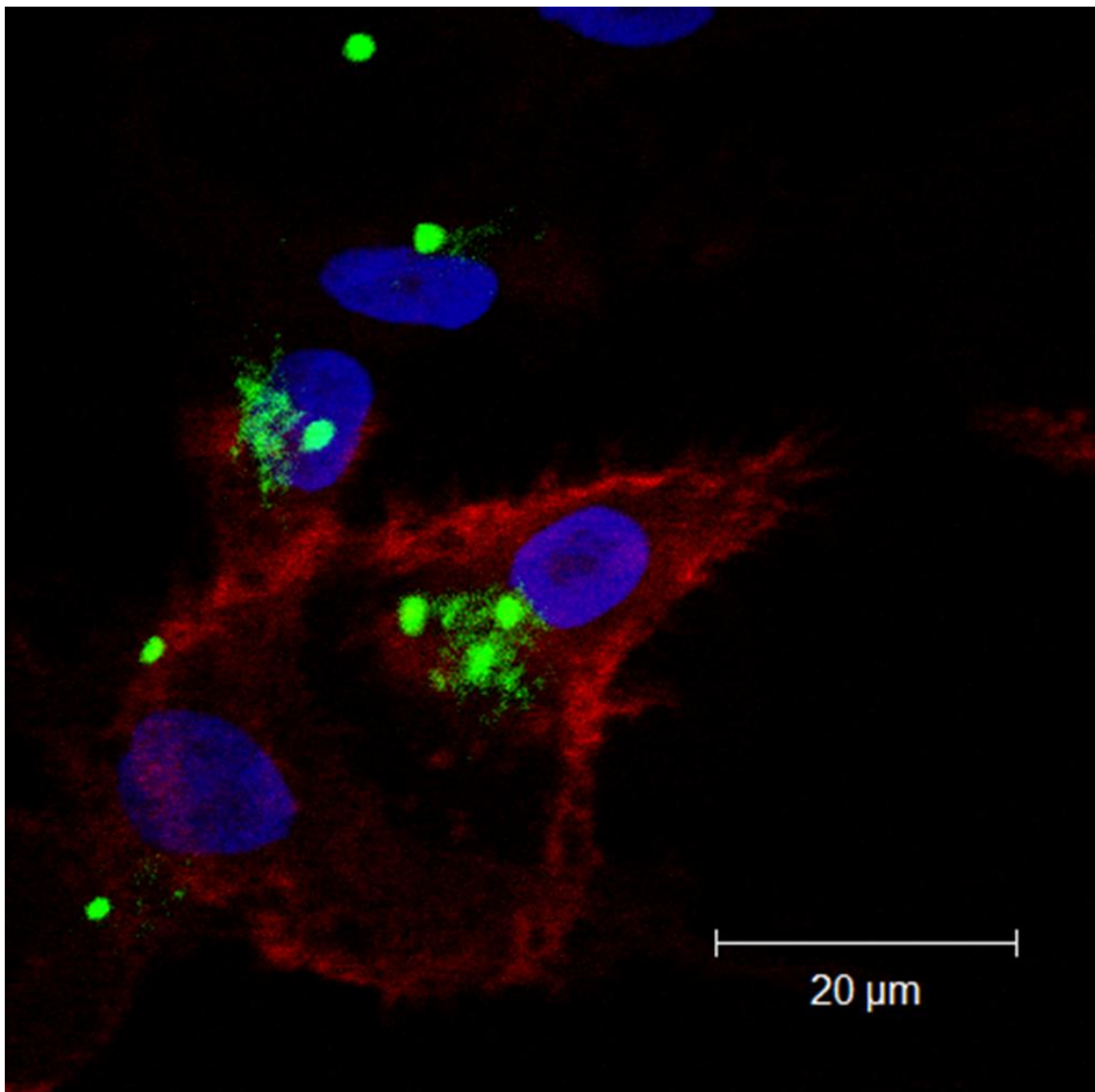


Abbildung 17: **Konfokalmikroskopie dendritischer Zellen nach Chitosan-Nanopartikel-aufnahme**

Repräsentatives konfokalmikroskopisches Bild humaner dendritischer Zellen (DC) mit intrazellulären CNP. Die Aufnahme erfolgte nach Inkubation der DC mit 100 µg/ml 90/10-CNP für 24 Stunden. Blau = Hoechst Zellkernfärbung; rot = CD11c-Allophycocyanin-Zellmembranfärbung der DC; grün = FITC-gekoppelte CNP

## 4.5 Assoziation von Chitosan-Nanopartikeln mit anderen Zelltypen

Um zu untersuchen, ob die CNP vornehmlich von APC oder auch von anderen nicht-antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden, wurden humane Lungenepithelzellen (Zelllinie H441), pankreatische Epithelzellen (Zelllinie HPDE-pBp) und pankreatische Fibroblasten (Zelllinie RLT-PSC) mit den CNP verschiedener Größe inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die CNP-Assoziation mit den Zellen bestimmt.

### 4.5.1 Analyse der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometer erfolgte die Bestimmung der medianen Fluoreszenzintensität 24 Stunden nach Zugabe der CNP in den drei Größen 90/10, 90/20 und 90/50 zu den H441-, HPDE-pBp- und RLT-PSC-Zellen. In allen Zelltypen zeigte sich eine Assoziation von CNP mit den Zellen (Abbildung 18).

In den H441-Lungenepithelzellen zeigte sich bei den 90/10- und 90/50-CNP eine höhere Fluoreszenzintensität als bei den 90/20-CNP (Abbildung 18 A). Bei den pankreatischen Epithelzellen (HPDE-pBp) und pankreatischen Fibroblasten (RLT-PSC), die in jeweils zwei unterschiedlichen Zellzahlen (lockerer Zellverband ( $2 \times 10^4$ ) sowie dichter Zellrasen ( $5 \times 10^4$ )) ausgesät worden waren, wurde, wie bei den APC, ein stärkeres Fluoreszenzsignal gemessen, je größer die verwendeten CNP waren (Abbildung 18 B+C).

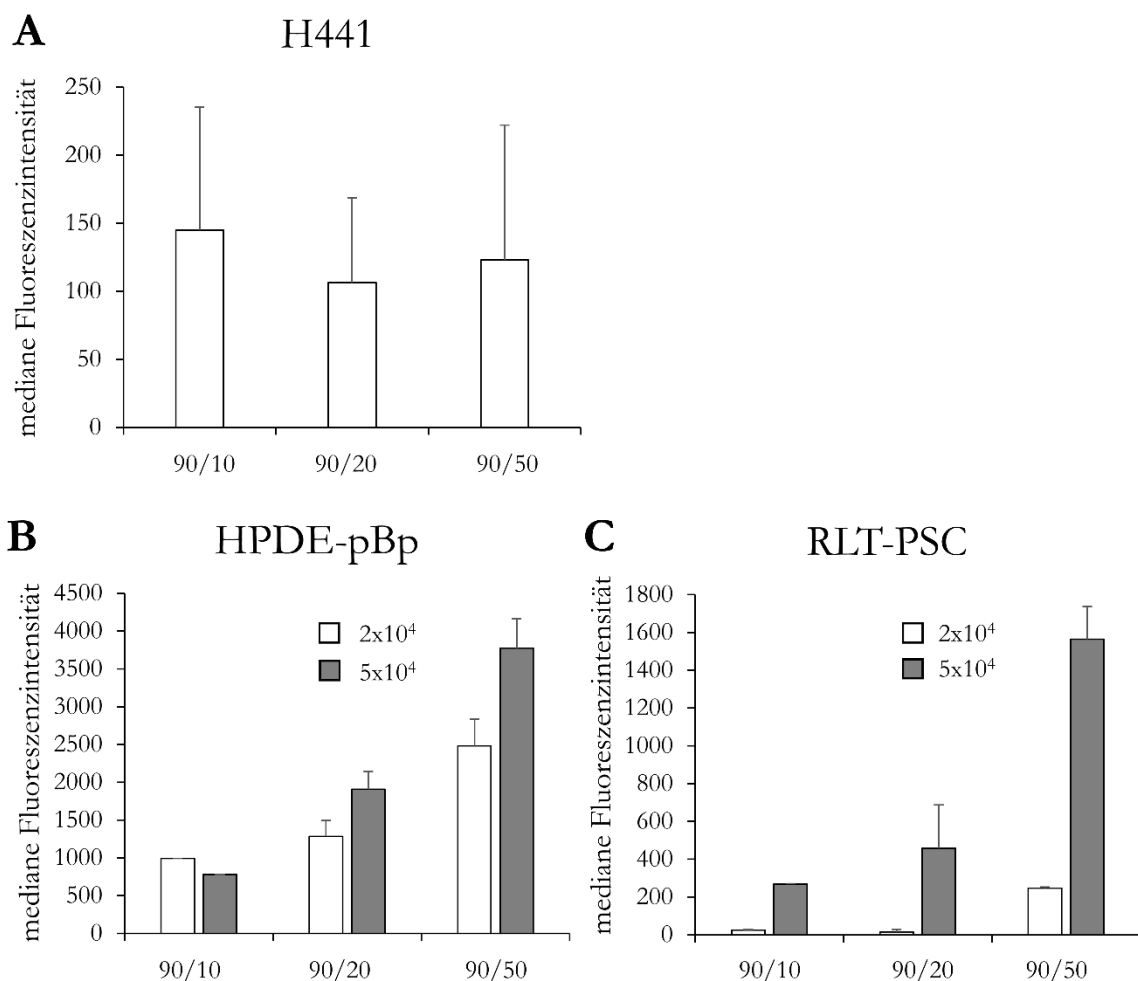


Abbildung 18: **Mediane Fluoreszenzintensität bei Lungen- und Pankreasepithelzellen sowie pankreatischen Fibroblasten nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln**

Durchflusszytometrische Analysen 24 Stunden nach Zugabe der CNP (100 µg/ml) in drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) zu **A**: H441-, **B**: HPDE-pBp- und **C**: RLT-PSC-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensität des abgegebenen FITC-Signals der mit den Zellen assoziierten CNP mit Standardabweichung aus je mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.5.2 Bestimmung des Anteils an FITC-positiven Zellen

98 % der Lungenepithelzellen, welche 24 Stunden zuvor mit 100 µg/ml fluoreszenzkonjugierten 90/10-CNP inkubiert worden waren, waren FITC-positiv. Über 90 % derjenigen Zellen, die mit 90/20-CNP behandelt worden waren, gaben ein Fluoreszenzsignal ab und 79 % der Zellen, welche mit den größten CNP (90/50) inkubiert worden waren (Abbildung 19 A).

Bei den pankreatischen Epithelzellen HPDE-pBp war der Anteil an FITC-positiven Zellen unabhängig von der Dichte der Zellverbände und unabhängig von der CNP-Größe in allen unter-

suchten Gruppen nahezu 100 % (Abbildung 19 B). Dies war auch bei den pankreatischen Fibroblasten, welche sich in einem engen Zellrasen ( $5 \times 10^4$  Zellen) befanden, der Fall. Im lockeren Zellverband ( $2 \times 10^4$  Zellen) zeigten sich bei den RLT-PSC-Zellen hingegen distinkte Unterschiede in der Assoziation mit den CNP je nach Partikelgröße: 72 % der Zellen waren mit 90/10-CNP, 55 % mit 90/20-CNP und 65 % mit den 90/50-CNP assoziiert (Abbildung 19 C).

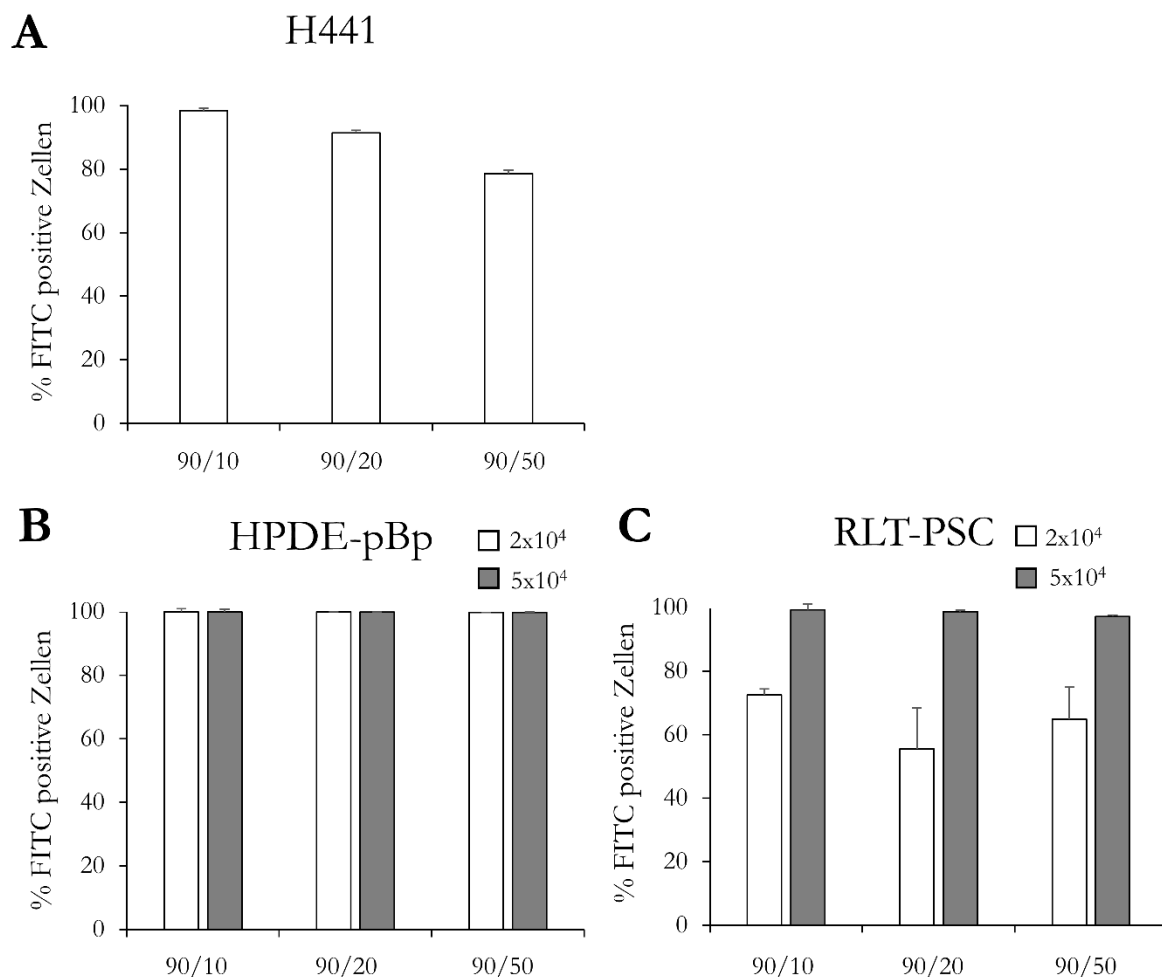


Abbildung 19: Anteil an FITC-positiven Lungenepithelzellen und Pankreasepithelzellen sowie pankreatischen Fibroblasten nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln

Durchflusszytometrische Analysen 24 Stunden nach Zugabe der CNP in drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) zu **A**: H441-, **B**: HPDE-pBp- und **C**: RLT-PSC-Zellen. HPDE-pBp- und RLT-PSC-Zellen wurden in zwei unterschiedlichen Zelldichten ( $2 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$ ) ausgesät. Dargestellt ist der mittlere Anteil an Zellen in Prozent mit Standardabweichung, an die FITC-konjugierte CNP assoziiert sind, aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Insgesamt bestätigte das Verfahren der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse, dass auch bei nicht-antigenpräsentierenden Zellen eine Assoziation der CNP mit den Zellen stattgefunden hatte.

## 4.6 Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in andere Zelltypen

### 4.6.1 Analyse mittels ImageStream-Verfahren

Nach der durchflusszytometrischen Analyse zeigten ImageStream-Analysen, dass Lungenepithelzellen (H441), pankreatische Epithelzellen (HPDE-pBp) und Bindegewebszellen (RLT-PSC), nicht nur mit CNP assoziierten, sondern diese Zellen die CNP auch internalisierten (Abbildung 20).

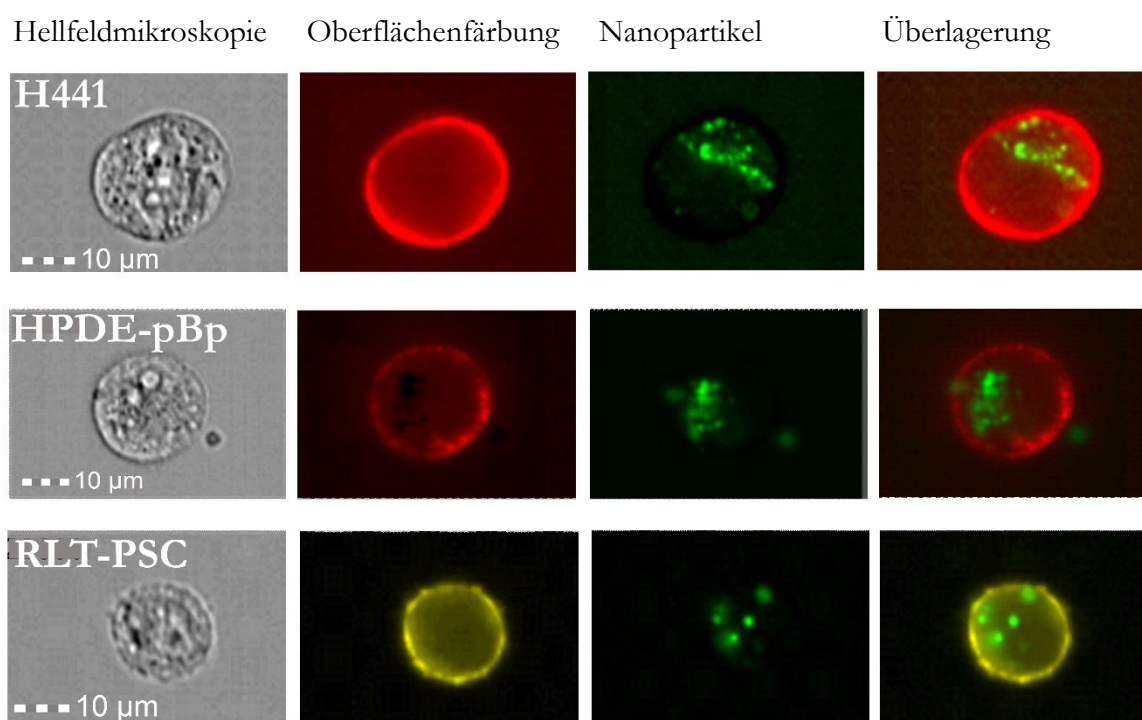


Abbildung 20: **ImageStream-Bilder von Lungenepithelzellen und pankreatischen Zellen nach Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln**

Repräsentative ImageStream-Bilder von H441-, HPDE-pBp- und RLT-PSC-Zellen nach Inkubation mit 100 µg/ml 90/10-CNP für 24 Stunden. Rot = E-Cadherin(CD324)-AF647-Oberflächenfärbung der H441- sowie der HPDE-pBp-Zellen; grün = FITC-konjugierte CNP; gelb = CD49d-PE-Oberflächenfärbung der RLT-PSC-Zellen

Somit bestätigte sich mittels Bildzytometrie, dass eine Aufnahme von CNP nicht nur in auf Endozytose spezialisierte APC, sondern auch in weitere Zelltypen erfolgte.

#### 4.6.2 Chitosan-Nanopartikelaufnahme in Lungenepithelzellen

Da eine Anwendung der CNP über die Atemwege angestrebt wird, war besonders relevant zu untersuchen, inwiefern Lungenepithelzellen die Partikel aufnehmen. Daher wurden bei der Lungenepithelzelllinie H441 zusätzlich die Internalisierungsscores sowie der Anteil an Zellen mit aufgenommenen CNP mittels ImageStream-Verfahren ermittelt.

Die Internalisierungsscores bei den H441-Lungenepithelzellen lagen bei 4,4-4,6 (Abbildung 21 A). Es wurde, wie bei den murinen und humanen DC, bei größeren CNP (90/50) ein höherer Internalisierungsscore gemessen, wobei sich insgesamt höhere Internalisierungswerte (4,8-5,4) in den humanen DC ergeben hatten (Abbildung 15 B).

Mittels ImageStream-Analyse wurde auch für die Lungenepithelzellen der Anteil an Zellen bestimmt, die überhaupt CNP aufgenommen hatten. Während sich in den APC ein deutlich ansteigender Anteil an Zellen mit internalisierten CNP bei ansteigender Partikelgröße zeigte (Abbildung 16), ließ sich diese Tendenz in den H441-Zellen nicht erkennen (Abbildung 21 B). Hier lag der größte Anteil an Zellen mit intrazellulären CNP bei den kleinsten CNP (90/10) mit 59,5 %. Die 90/20-CNP wurden von durchschnittlich 47,5 % der H441-Zellen aufgenommen, die 90/50-CNP von 49,5 %.

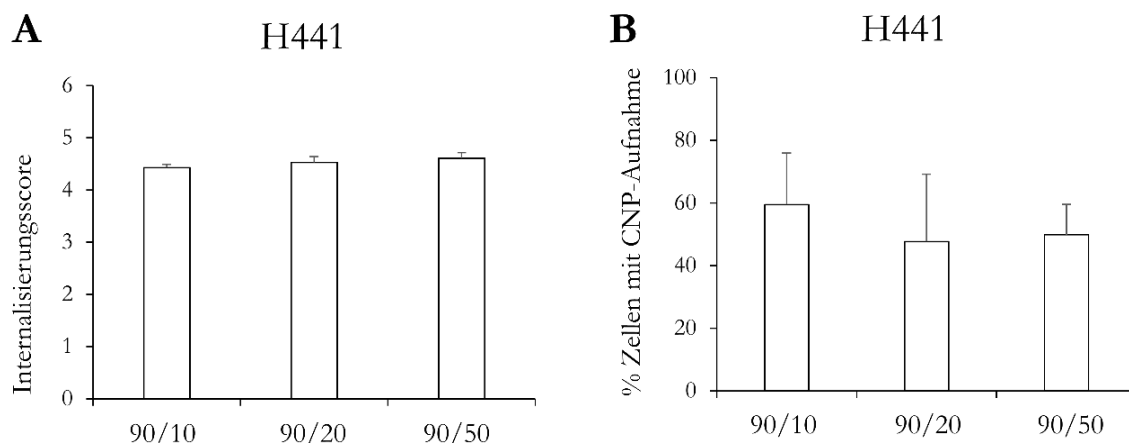


Abbildung 21: **Chitosan-Nanopartikelaufnahme in Lungenepithelzellen**

Mittels ImageStream-Analyse errechneter **A**: Internalisierungsscore und **B**: Anteil an Zellen mit CNP-Aufnahme 24 Stunden nach der Zugabe der 90/10-, 90/20- oder 90/50-CNP (100 µg/ml) zu den H441-Lungenepithelzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 4.7 Aufnahme von Chitosan-Nanopartikeln in dendritische Zellen kokultiviert mit Lungenepithelzellen

Sowohl für DC als auch für Lungenepithelzellen (H441-Zelllinie) konnte eine intrazelluläre Aufnahme von CNP unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Da eine Anwendung der CNP über die Atemwege angestrebt wird, wurde die Aufnahme von Nanopartikeln in DC in Kokultur mit Lungenepithelzellen untersucht.

Hierfür erfolgten eine Durchflusszytometrie- sowie ImageStream-Analysen von humanen kokultivierten DC und H441-Zellen, die mit CNP inkubiert wurden. Für beide Analysen wurden die DC und H441-Zellen durch verschiedenen fluoreszierende Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker voneinander differenziert (Abbildung 22) und so der jeweilige Anteil an Zellen, die CNP aufgenommen hatten, bestimmt.

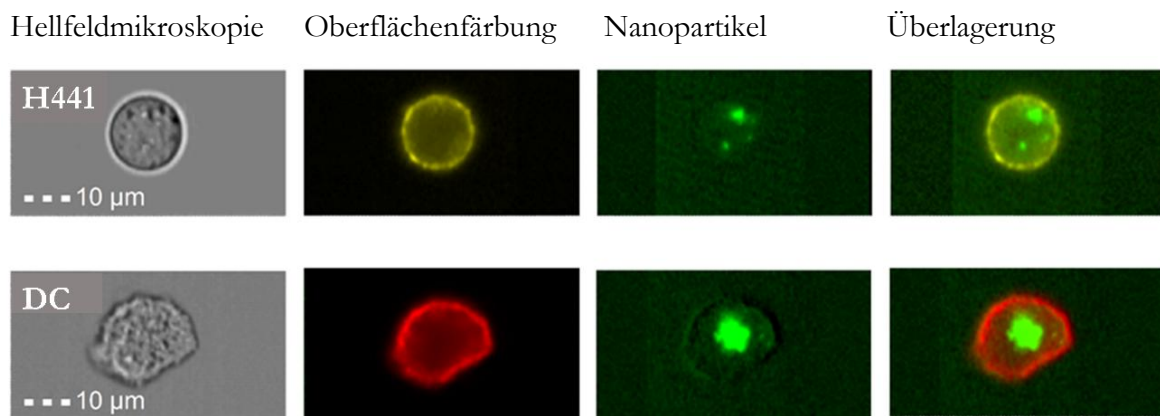


Abbildung 22: **ImageStream-Bilder von humanen dendritischen Zellen und Lungenepithelzellen nach Kokultur und Inkubation mit Chitosan-Nanopartikeln**

Repräsentative Bilder einer H441-Lungenepithelzelle sowie humanen dendritischen Zelle (DC) nach Kokultur für 24 Stunden und Inkubation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  90/10-CNP für weitere 24 Stunden. Gelb = EpCAM(CD326)-PE-Oberflächenfärbung der H441-Zellen; grün = FITC-konjugierte CNP; rot = CD11c-Allophycocyanin-Oberflächenfärbung der DC

Die DC internalisierten CNP zu einem höheren Anteil als die Lungenepithelzellen (Abbildung 23). 65 % der DC nahmen 90/10-CNP auf, 67 % 90/20-CNP und 73,5 % nahmen 90/50-CNP auf. Im Gegensatz dazu internalisierten nur 37,5 % der H441-Zellen 90/10-CNP, 45 % 90/20-CNP und 46 % 90/50-CNP. Die Aufnahme von CNP in H441-Zellen lag in Kokultur mit DC damit zudem etwas niedriger als in der H441-Monokultur, in der 47,5- 59,5 % der Zellen CNP aufgenommen hatten (Abbildung 21 B).

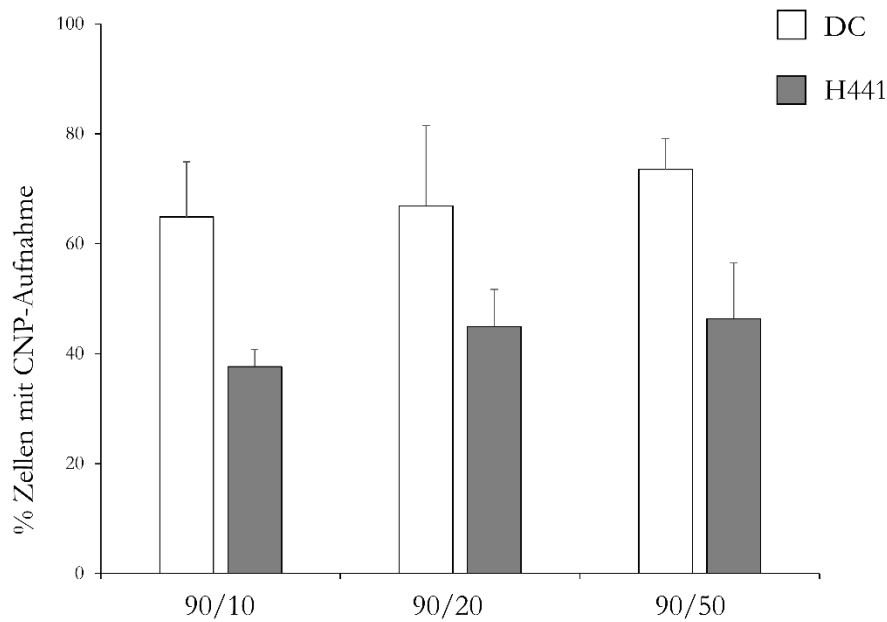


Abbildung 23: **Anteil der Zellen mit Chitosan-Nanopartikelaufnahme nach Kokultur von humanen Lungenepithelzellen und dendritischen Zellen**

In kokultivierten humanen dendritischen Zellen (DC) und Lungenepithelzellen (H441) wurde 24 Stunden nach Zugabe von  $100 \mu\text{g/ml}$  CNP in drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) mittels ImageStream-Verfahren der Anteil an Zellen bestimmt, die CNP aufgenommen hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 5 Diskussion

Ein wachsendes Verständnis über die Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung von Krebszellen war die Grundlage für die Entwicklung der Krebsimmuntherapien.

1867 wurde an der Universitätsklinik Bonn eine Beobachtung dokumentiert, die rückblickend als eine der ersten immuntherapeutischen Behandlungen zu bezeichnen ist: Bei einer Patientin habe sich ihre Krebserkrankung zurückentwickelt, nachdem sie in ein Bett gelegt worden sei, in dem zuvor ein Patient mit Erysipel (Infektion der Haut und dermalen Lymphgefäße mit meist Streptokokken) gelegen habe. Angenommen wird, der Bakterienkontakt habe zu einer Stimulation ihres Immunsystems geführt, sodass es die Krebszellen nun effektiv habe angreifen und zerstören können (Kudrin, 2013). Im späten 19. Jahrhundert soll auch William Coley in New York von einem Patienten erfahren haben, bei dem sich nach mehrfachen Erysipelen ein inoperabler Tumor zurückgebildet hatte. Bei der Suche nach weiteren solcher Fälle habe er mehrfach Rückbildungen von Krebsgeschwüren nach fieberhaften Erkrankungen beobachtet. Coley führte daraufhin bei Patienten mit fortgeschrittenen Sarkomen absichtlich Infektionen herbei, indem er ihnen eine Bakterienmischung injizierte. Bei einem kleinen, aber relevanten Anteil der Patienten reduzierte sich das Tumorausmaß (Coley, 1891, McCarthy, 2006, Kienle, 2012).

Frank M. Burnet stellte schließlich die Hypothese über die Fähigkeit des Immunsystems, mutierte Zellen und damit potenzielle Krebszellen zu erkennen und zu eliminieren, auf und betonte die Beteiligung des Immunsystems bei der Vorbeugung von Krebserkrankungen (Burnet, 1957). Schließlich wurde, nachdem zunächst unspezifische Immuntherapieversuche z.B. mittels IL-2-Gabe durchgeführt worden waren (Rosenberg *et al.*, 1987), 2011 mit Ipilimumab als monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 erstmals eine spezifische Krebsimmuntherapie (zur Behandlung von nicht-resezierbaren oder metastasierten Melanomen) zugelassen (Lipson and Drake, 2011).

Seitdem führte ein immer detaillierteres Verständnis für Tumor-Immunevasionsmechanismen zur Entwicklung und Zulassung weiterer immunonkologischer Medikamente. Zurzeit werden Immuntherapien gegen mehrere Krebsentitäten wie maligne Melanome, kolorektale Karzinome, Lungen-, Nierenzell- und Mammakarzinome sowie verschiedene Lymphome und Leukämien erfolgreich eingesetzt (Postow, Callahan und Wolchok, 2015, Seidel, Otsuka und Kabashima, 2018, Zander *et al.*, 2020).

Um die Einsatzmöglichkeiten der Immuntherapien auszuweiten, bleibt es von größter Bedeutung, die Kenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen immunsuppressiver Tumormikroumgebungen zu erweitern, um weitere Ansatzpunkte für mögliche Immuntherapien zu

erhalten. Zudem gilt es, durch weitere Verbesserung bereits etablierter Behandlungen die Ansprechraten zu erhöhen (Melief *et al.*, 2015).

Vielversprechend für effizientere Krebsimmuntherapien sind Tumorstimmungsstrategien, die darauf abzielen, die Tumorantigenpräsentation durch APC zu verstärken und dadurch eine effektive Aktivierung von CTL zu induzieren, sodass eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort herbeigeführt oder gesteigert wird (Palucka *et al.*, 2011, Guo *et al.*, 2013). Der therapeutische Effekt ist hierbei stark von der Ausprägung der Antigenaufnahme (und nachfolgenden Antigenpräsentation auf MHC-I und -II) abhängig. Um die tumorgerichtete Immunantwort zu steigern, liegt der Fokus innerhalb der APC insbesondere auf DC, weil sie über die Antigen-Kreuzpräsentation die stärkste CTL-Aktivierung bewirken (Banchereau und Steinman, 1998, Banchereau und Palucka, 2005, Palucka und Banchereau, 2011, 2012 und 2013).

Um eine gesteigerte Antigenaufnahme in APC zu erwirken, ist der Einsatz eines geeigneten Transportvehikels für die Tumorantigene, ein aussichtsreiches Konzept. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit die Eignung von CNP als mögliches Transportvehikel für den zukünftigen Einsatz in Tumorstimmungen geprüft, indem die CNP-Aufnahme in verschiedene Zelltypen, insbesondere APC, untersucht wurde.

## 5.1 Effiziente Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel in antigenpräsentierende Zellen

Chitosan ist ein Material, welches schon mehrfach als ein potenziell gut geeignetes Transportvehikel für Vakzinierungen beschrieben wurde (Illum *et al.*, 2001, Zaharoff *et al.*, 2007, Gordon *et al.*, 2008, Garcia-Fuentes und Alonso, 2012) und sich gut in (Nano-)Partikelform bringen lässt. Erste Studien zur Aufnahme von Chitosan-Partikeln in Zellen wurden daher bereits durchgeführt.

Chua *et al.* untersuchten die Aufnahme von FITC-konjugierten Chitosan-Mikropartikeln (1-6  $\mu\text{m}$ ) und CNP (30-500 nm) in murine DC nach 24-stündiger Inkubation in unterschiedlichen Konzentrationen. Mittels Durchflusszytometrie bestimmten Chua *et al.* den Anteil an FITC-positiven Zellen. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde durch Trypanblau-Zugabe ein Quenching des Fluoreszenzsignals der Partikel, die sich nicht intrazellulär sondern an der Zelloberfläche befanden, durchgeführt. Die Analysen erbrachten einen mit der Inkubationskonzentration steigenden Anteil an murinen DC, die mutmaßlich Partikel aufgenommen hatten, mit interessanterweise vergleichbaren Daten für Mikro- verglichen mit Nanopartikeln. Mittels konfokal-

mikroskopischer Untersuchung wurde eine intrazelluläre Partikellokalisierung nachgewiesen (Chua *et al.*, 2012).

Han *et al.* ermittelten die Aufnahme von mit FITC konjugiertem Polyinosinsäure-Polycytidylsäure-Natriumsalz (poly I:C) beladenen CNP in murine DC. Zudem analysierten sie die Aufnahme von in CNP verkapseltem Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-konjugierten Ovalbumin in murine DC. Hierzu führten sie nach 15-minütiger Inkubation der murinen DC mit den  $254 \pm 3,2$  nm großen CNP eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen durch, in der sich eine starke Assoziation von sowohl FITC-poly I:C als auch TRITC-Ovalbumin mit den murinen DC erkennen ließ. Zur Bestätigung der intrazellulären Lokalisation nutzen auch Han *et al.* die Konfokalmikroskopie (Han *et al.*, 2016).

Shi *et al.* wiesen in ihrer Arbeit eine Aufnahme von mit Tumorzelllysate beladenen CNP mit durchschnittlicher Größe von 120 nm (Größenbereich: 20-600 nm) in murine DC nach. Methodisch erfolgte auch in dieser Studie eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel mit FITC, die nach Inkubation der Zellen mit den Nanopartikeln eine durchflusszytometrische Analyse der CNP-Zell-Assoziation ermöglichte. Shi *et al.* ermittelten die mediane Fluoreszenzintensität der Zellen nach unterschiedlich langer Inkubationszeit (2, 4, 6, 12, 24 oder 48 Stunden). Des Weiteren wurden nach 4-stündiger Inkubation konfokalmikroskopische Bilder angefertigt, mittels derer eine intrazelluläre CNP-Lokalisation nachweisbar war (Shi *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse aller drei beschriebenen Studien lassen die Interpretation zu, dass CNP in murine DC aufgenommen werden. Sowohl Chua *et al.*, Han *et al.* als auch Shi *et al.* nutzten Konfokalmikroskopie, um sicher nachzuweisen, dass sich CNP nach den Aufnahmeversuchen intrazellulär befinden. Eine Quantifizierung der Partikelaufnahme mittels Konfokalmikroskopie ist allerdings wegen der hierfür erforderlichen hohen Zellzahl aufgrund des enormen Aufwands kaum möglich. Zur Quantifizierung der Partikelaufnahme wurden in den beschriebenen Studien die durchflusszytometrischen Analysen genutzt.

Es ist zur Bestimmung von Partikelaufnahmen in Zellen gängige Praxis, die Partikel zur Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC) zu konjugieren und die Zellen nach der Inkubation mit den Partikeln mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie zu analysieren. Die Durchflusszytometrie erlaubt eine schnelle Analyse einer großen Anzahl von Zellen (Jaroszeski und Radcliff, 1999, Elsaesser *et al.*, 2010, McKinnon, 2018). Zellen, von denen kein Fluoreszenzsignal ausgeht, gelten hierbei üblicherweise als Zellen, die keine Partikel aufgenommen haben, während bei fluoreszenz-positiven Zellen häufig auf eine erfolgte Partikelaufnahme geschlossen wird (Suzuki, Toyooka und Ibuki, 2007, Shapero *et al.*, 2011, Ibuki und Toyooka, 2012, Zucker und Boyes, 2020, Shin *et al.*, 2020). Jedoch werden dabei auch Zellen mit lediglich an ihrer Zellober-

fläche extrazellulär anhaftenden Fluoreszenz-konjugierten Partikeln als fluoreszenz-positive Zellen gemessen. Eine Gleichsetzung aller fluoreszenz-positiven Zellen mit Zellen, die Partikel internalisiert haben, ist also eigentlich nicht möglich.

Um an der Zelloberfläche gebundene Partikel zu entfernen, erfolgen nach Standardprotokollen vor durchflusszytometrischen Analysen, in denen eine Partikelaufnahme bestimmt werden soll, Waschschrte. Aber nicht jede Adhäsion von Partikeln an Zellen kann damit tatsächlich gelöst werden. In Studien, in denen neben der Partikelaufnahme eine Partikelbindung an die Zellmembranen beachtet und untersucht wird, finden sich noch nach mehrfachen Waschvorgängen neben der intrazellulären Partikel regelmäßig auch an die Zelloberfläche gebundene Partikel (Besic Gyenge *et al.*, 2011, Vranic *et al.*, 2013). Besic Gyenge *et al.* untersuchten z.B. die Aufnahme von 200-300 nm großen Siliziumdioxid-Nanopartikeln in die humane Krebszelllinie UMB-SCC-745 und konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie trotz vorangegangenen Waschschrten einen relevanten Anteil extrazellulärer an die Zelloberfläche gebundener Partikel detailliert darstellen und von internalisierten Partikeln abgrenzen (Besic Gyenge *et al.*, 2011).

In einer ausführlichen Studie von Vranic *et al.*, wurden Methoden zur Quantifizierung von Partikelaufnahmen miteinander verglichen und die Durchflusszytometrie, auch mit Quenching, als nicht hinreichend genau befunden (Vranic *et al.*, 2013).

Es sollte festgehalten werden, dass mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie eine Tendenz für (nachfolgende) Aufnahmeversuche von fluoreszenzmarkierten Partikeln in Zellen ermittelt werden kann, weil die Partikel-Zell-Assoziation bestimmt werden kann. Eine Partikel-Internalisierung sollte rein durchflusszytometrisch aber weder nachgewiesen noch quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde daher bezogen auf die Versuche, die mittels Durchflusszytometrie erfolgten, konsequenterweise eine „Assoziation“ der CNP mit den untersuchten Zellen beschrieben, statt von einer „Aufnahme“ oder „Internalisierung“ in die Zellen zu sprechen.

Neben der durchflusszytometrischen Analyse wurden in dieser Arbeit ebenso wie in den Studien von Chua *et al.*, Han *et al.* und Shi *et al.*, konfokalmikroskopische Bilder erstellt, um die CNP-Aufnahme in humane DC darzustellen. Zur Quantifizierung der Partikelaufnahme wurde das ImageStream-Verfahren gewählt. Durch die hierbei mit Mikroskopie verknüpften durchflusszytometrischen Funktionen stellt es eine präzise Methode dar, um die CNP-Aufnahme sicher und quantifizierbar nachzuweisen.

Mit den ImageStream-Analysen wurde ein Internalisierungsscore bestimmt, der bei ausgeglichenem Verhältnis von intra- zu extrazellulären CNP den Wert null ergeben würde, und umso positiver wird, desto mehr CNP-FTTC-Fluoreszenz sich intrazellulär befindet. Zudem wurde der Anteil an Zellen bestimmt, die überhaupt CNP internalisierten.

Während in dieser Arbeit für alle CNP-Größen 99 % der murinen DC (DC2.4-Zelllinie) durchflusszytometrisch als fluoreszenz-positiv identifiziert werden konnten (Abbildung 11), wurde mithilfe der ImageStream-Analyse ermittelt, dass der Anteil an murinen DC, die mit den fluoreszenzmarkierten CNP nicht nur assoziiert waren, sondern diese auch internalisiert hatten, niedriger lag: 59 % der murinen DC internalisierten 90/10-CNP, 68 % 90/20-CNP und 70,5 % 90/50-CNP (Abbildung 16).

Dass CNP von murinen DC aufgenommen werden, wie es von Chua *et al.*, Han *et al.* und Shi *et al.*, beschrieben wurde, bestätigte sich also in dieser Arbeit. Anzumerken ist jedoch, dass die deutliche Differenz zwischen den durchflusszytometrischen Ergebnissen und des mittels ImageStream-Verfahren valide bestimmten Anteil an Zellen, die CNP aufnehmen, anzeigt, dass eine relevante Menge an CNP an der Zelloberfläche haften blieb, nicht internalisiert wurde und mit dem vorangegangenen „Waschen“ der Zellen nicht entfernt wurde.

Diese Beobachtung stützt die Forderung von Vranic *et al.*, dass eine Quantifizierung der Partikelaufnahme in Zellen nicht mittels Durchflusszytometrie erfolgen sollte (Vranic *et al.*, 2013). Für weitere Studien, in denen eine Quantifizierung des Zellanteils mit Partikelaufnahme angestrebt wird, empfiehlt sich, wie auch von Smirnov *et al.* beschrieben, die Nutzung des ImageStream-Verfahrens (Smirnov *et al.*, 2015).

Die Untersuchung der CNP-Aufnahme beschränkte sich in dieser Arbeit nicht auf murine DC, sondern es wurde auch die CNP-Aufnahme in weitere und vor allem humane APC (DC, M1- und M2-Makrophagen) analysiert. Auch diese APC internalisierten zu hohen Anteilen CNP in den unterschiedlichen Größen (Abbildung 16) und es ergaben sich hohe Internalisierungsscores (Abbildung 15). Festzuhalten bleibt wie für die murinen DC genauso für diese Zelltypen, dass sich der Anteil an durchflusszytometrisch als FITC-positiv identifizierte Zellen, mit dem mittels ImageStream-Verfahren ermittelten Anteil an Zellen, die FITC-konjugierte CNP internalisierten, nicht deckte. Hatten sich durchflusszytometrisch 61-84 % FITC-positiv humane DC und über 90 % FITC-positiv M1- und M2- Makrophagen ergeben (Abbildung 11), ergab sich mittels ImageStream-Verfahren ein niedrigerer Anteil von 46-62 % der humanen DC, die tatsächlich CNP internalisiert hatten und 30-60 % der M1-Makrophagen sowie 40-73 % der M2-Makrophagen (Abbildung 16). Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Wichtigkeit, eine valide Messmethode für die Bestimmung und Quantifizierung der CNP-Aufnahme zu wählen.

Nicht unerwähnt bleiben sollte, dass der Anteil an Zellen ohne CNP-Internalisierung, nicht vollständig durch Zellen zustande kommen muss, die generell keine CNP aufnehmen. Die erfolgte CNP-Aufnahme wurde in dieser Arbeit nur zu einem einzigen Zeitpunkt, nämlich 24 Stunden

nach Inkubation der Zellen mit CNP, untersucht. In Vorstudien hatte sich dieser Zeitpunkt für die Analyse als geeignet erwiesen. Dass eine geringe zusätzliche CNP-Internalisierung später aber noch stattgefunden hätte, ist nicht komplett auszuschließen. Hierzu könnten Aufnahmestudien mit mehreren Messpunkten im Zeitverlauf weiteren Aufschluss geben.

Während der Schwerpunkt dieser Arbeit vor allem auf der Untersuchung der CNP-Aufnahme in APC und weitere Zelltypen lag, untersuchten Shi *et al.* nach dem erfolgten Nachweis der CNP-Aufnahme in murine DC als nächsten Schritt die Auswirkungen einer 48-stündigen Inkubation mit CNP, welche mit Mannose versetzt und mit Tumorzellysate beladen waren, auf die murinen DC. Die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86, die eine DC-Reifung anzeigen, war hiernach erhöht, des Weiteren die Expression von MHC-I und MHC-II (Shi *et al.*, 2017).

Nachdem in dieser Arbeit die effektive Aufnahme von unbeladenen CNP insbesondere in humane APC nachgewiesen wurde, wurden im gemeinsamen Projekt der AG Inflammatorische Karzinogenese des Instituts für Experimentelle Tumorforschung und der Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Pharmazeutischen Instituts an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Analysen zur Aufnahme von CNP mit Antigenbeladung durchgeführt, die Auswirkungen auf den DC-Phänotyp analysiert und überprüft, ob die DC nach Aufnahme antigenbeladener CNP dazu in der Lage sind CTL zu aktivieren.

## 5.2 Aufnahme der Chitosan-Nanopartikel auch in nicht-antigenpräsentierende Zelltypen

Neben der CNP-Aufnahme in APC wurde die CNP-Aufnahme auch in weitere humane Zelltypen untersucht und festgestellt, dass CNP nicht spezifisch von APC aufgenommen werden. Auch von pankreatischen Epithelzellen (HPDE-pBp) und pankreatischen Fibroblasten (RLT-PSC) sowie Lungenepithelzellen (H441) wurden die CNP in allen drei Größen (90/10, 90/20 und 90/50) aufgenommen.

Als nächster Schritt erfolgte daher eine Analyse der CNP-Aufnahme in humane H441-Lungenepithelzellen und DC in Kokultur. Damit sollte die angestrebte zukünftige Applikation der CNP (als Tumorstimmulierung) über eine Inhalation als stark vereinfachtes Modell nachgestellt werden, um zu überprüfen, ob, trotz dessen, dass CNP nicht selektiv von APC aufgenommen werden, eine effiziente CNP-Aufnahme in DC erfolgt - was langfristig die Voraussetzung für die erwünschte Induktion der Immunantwort wäre. Die Analyse erfolgte mittels ImageStream.

Rund zwei Drittel der humanen DC internalisierten auch in Kokultur CNP aller drei Größen (Abbildung 23). Dass die CNP-Aufnahme in DC auch in einer gewissen Konkurrenzsituation mit Lungenepithelzellen stattfindet, konnte somit bestätigt werden.

Interessanterweise nahmen auch die H441-Lungenepithelzellen in diesem Modell CNP auf, wenngleich der Anteil an H441-Zellen, die CNP internalisierten, niedriger lag als bei den DC (Abbildung 23).

Die Fähigkeit zur Aufnahme von Substanzen ist nicht auf APC beschränkt, sondern eine Eigenschaft, die auch von anderen Zelltypen benötigt wird. Hierdurch lässt sich die Aufnahme der CNP auch in die pankreatischen Epithelzellen und Bindegewebszellen sowie Lungenepithelzellen erklären. Für Epithelzellen ist die Endozytose (oder Transzytose) ein wichtiger Aufnahmeprozess, z.B. bei der Nährstoffresorption der Darmwand-Epithelzellen und beim Filtern von eingeatmeten Partikeln und Mikroorganismen durch das Atemwegsepithel (Rassow *et al.*, 2012, Invernizzi, Lloyd und Molyneaux, 2020). Jedoch erfolgt hier die Aufnahme (und im Fall der Transzytose der intrazelluläre Transport und die Freisetzung an der anderen Zellseite) normalerweise selektiv nur für die Erfüllung dieser spezifischen Funktionen. DC dagegen haben als APC eine hohe Aufnahmekapazität, da die Substanzaufnahme und anschließende Präsentation von Antigenen ihre Hauptfunktion ist, auf die sie hochspezialisiert sind. Dies könnte der Grund für den im Vergleich zu den Lungenepithelzellen höheren Anteil an DC mit erfolgter CNP-Internalisierung sein.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass CNP nicht spezifisch von APC internalisiert werden, wäre es in Anbetracht geplanter Tumorstimmulierung mit Nanopartikeln relevant, die Aufnahme verschiedener Nanopartikel in weitere Zelltypen und etwaige Auswirkungen davon genauer zu analysieren. Durán *et al.* verglichen die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)-Nanopartikeln und PLGA-CNP in verschiedene humane Immunzellen. Während in den durchflusszytometrischen Analysen ein signifikanter Anteil an DC und Monozyten nach Partikel-Inkubation fluoreszenz-positiv war, wurden lediglich 20 % der B-Zellen nach Inkubation mit PLGA-Partikeln fluoreszenz-positiv, ansonsten kam es bei B- und T-Zellen zu keiner Partikelassoziation oder -aufnahme (Durán *et al.*, 2019). In der Literatur sind sonst keine Studien, die eine Nanopartikelaufnahme in APC mit der Aufnahme in andere Zelltypen vergleichen, zu finden. Studien, die das Ziel verfolgen, eine geeignete Nanopartikelformulierung für die Nutzung in Tumorstimmulierung herzustellen, fokussieren meist auf den ersten Schritt mit der Frage, ob die Partikel effektiv in APC (oder konkrete andere Zielzellen, bspw. maligne Zellen) aufgenommen werden, wenngleich es von höchster Relevanz wäre, auch die Spezifität der Aufnahme in diese Zellen vergleichend zu analysieren, gerade in Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen

bei einer unkontrollierten Aufnahme von Nanopartikeln (und ggf. der in ihnen transportierten Substanzen) in andere Zellen als die Zielzellen.

Ein größeres Verständnis dafür, welches Nanopartikeldesign von welchen Zellen präferiert aufgenommen wird, würde ggf. eine Anpassung der Nanopartikel ermöglichen, hin zu einer spezifischen Nanopartikelaufnahme in die Zielzellen.

Da in diesem Projekt langfristig die Anwendung von CNP als Vehikel zur Förderung der Tumorantigenaufnahme und -präsentation angestrebt wird, um eine tumorgerichtete Immunantwort durch CTL zu induzieren, wäre in Anbetracht dessen, dass die untersuchten CNP nicht spezifisch von APC aufgenommen werden, ein sinnvoller nächster Schritt vor *in vivo*-Experimenten, ergänzend *in vitro* zu untersuchen, ob kokultivierte DC trotz konkurrierender CNP-Aufnahme nach Aufnahme von antigenbeladenen CNP dazu in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren.

### 5.3 Einfluss der Größe der Chitosan-Nanopartikel

Für die Eigenschaften wie Löslichkeit, Viskosität und Kationenaustauschkapazität von Chitosan, die wiederum die adjuvante Wirkung beeinflussen, ist der Deacetylierungsgrad entscheidend (Zhang *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden einheitlich Nanopartikel aus Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 90 % verwendet, weil es sich in vorherigen Studien als niedrig zytotoxisch und potenziell gut geeignet für Vakzinierungsstrategien herausgestellt hatte (Diedrich, 2015). Heidland untersuchte, inwiefern der Grad der Deacetylierung die Größe der CNP beeinflusst: Ein relevanter Einfluss ließ sich nicht nachweisen. Die bei der Herstellung erreichte CNP-Größe war abhängig von der Art und Geschwindigkeit der Zugabe von CMC, insbesondere aber wurde sie von der Chitosan-Molekülmasse bestimmt (Heidland, 2018).

Die Größe der in dieser Arbeit genutzten 90/10-CNP lag zwischen 180-260 nm, die der 90/20-CNP zwischen 400-550 nm und die der 90/50-CNP zwischen 980-1000 nm. Im Durchschnitt waren die CNP 200 nm, 450 nm und 980 nm groß (Kapitel 3.6.2, Tabelle 1).

#### 5.3.1 Kein ausgeprägter Einfluss der Chitosan-Nanopartikel-Größe auf die Aufnahme in Zellen

In dieser Arbeit wurde bei allen untersuchten APC (murine und humane DC, humane M1- und M2-Makrophagen) mittels Durchflusszytometrie nach 24-stündiger CNP-Inkubation mit ansteigender CNP-Größe von 90/10 über 90/20 zu 90/50 ein Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität ermittelt (Abbildung 10). Das Gleiche galt für die pankreatischen Epithelzellen (HPDE-pBp) und Fibroblasten (RLT-PSC), sowohl im lockeren als auch im dichten Zellverband (Abbil-

dung 18 B+C). Lediglich bei der Analyse der H441-Lungenepithelzellen ergab sich kein strikter Anstieg der Fluoreszenzintensität mit ansteigender Partikelgröße (Abbildung 18 A).

Da die größeren CNP aus mehr mit dem FITC-Farbstoff verbundenen Chitosan bestehen, war ein Anstieg der Fluoreszenzintensität allerdings schon allein deswegen zu erwarten. Die Fluoreszenzintensität war daher für den Vergleich der Assoziationsstärke der unterschiedlichen CNP (90/10, 90/20, 90/50) mit den Zellen als gering verwertbar zu beurteilen. Folglich wurde durchflusszytometrisch zur besseren Vergleichbarkeit neben der Intensität des Fluoreszenzsignals auch der Anteil an Zellen ermittelt, die überhaupt FITC-Signal abgaben (=FITC-positive Zellen), die also mit FITC-gekoppelten CNP assoziiert sein mussten.

Bei den murinen DC (DC2.4-Zelllinie) lag der durchflusszytometrisch ermittelte Anteil an FITC-positiven Zellen für alle CNP-Größen bei 99 % und bei den Makrophagen (M1- und M2-Makrophagen) bei über 90 % (Abbildung 11). Vergleichbar assoziierten nahezu 100 % der pankreatischen HPDE-pBp-Zellen und nahezu 100 % der RLT-PSC-Zellen im engen Zellverband mit CNP unabhängig von der Partikelgröße (Abbildung 19 B+C), sodass sich, wegen des insgesamt sehr hohen Anteils an Zellen, die mit CNP assoziiert waren, eine größenabhängige Zell-CNP-Assoziationsstärke nicht differenzieren ließ.

Der Anteil an FITC-positiven Zellen lag bei den humanen DC wie auch die mediane Fluoreszenzintensität, mit ansteigender Größe der FITC-konjugierten CNP höher: 61 % (90/10-CNP) bis 84 % (90/50-CNP) (Abbildung 11 B). Eine entgegengesetzte (wenngleich nicht signifikante) Tendenz ergab sich bei der Bestimmung des Anteils der nach Inkubation mit den CNP FITC-positiven H441-Lungenepithelzellen (Abbildung 19 A). 98 % der H441-Zellen waren mit 90/10-CNP assoziiert, 90 % mit 90/20-CNP und 79 % mit 90/50-CNP. Bei der Analyse der RLT-PSC-Zellen im lockeren Zellverband ließen sich zwar diskrete Unterschiede in der Zell-CNP-Assoziation feststellen, jedoch fand hier die niedrigste Zell-CNP-Assoziation bei den 90/20-CNP statt (55 % FITC-positive Zellen, dagegen 72 % bei 90/10-CNP und 65 % bei 90/50-CNP) (Abbildung 19 C).

Valide Interpretationen zum Ausmaß der CNP-Aufnahme in Zellen in Abhängigkeit von der CNP-Größe lassen sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten, zumal wegen der in Kapitel 5.1 beschriebenen Limitationen der durchflusszytometrischen Analyse.

Mittels ImageStream-Analysen wurden für alle in dieser Arbeit analysierten APC und H441-Zellen jeweils für jede CNP-Größe Internalisierungsscores bestimmt. Diese unterschieden sich in Bezug auf die Partikelgröße nicht statistisch signifikant voneinander (Abbildung 15 und 21 A).

Bei der Bestimmung des Anteils an Zellen, die CNP aufgenommen hatten, war feststellbar, dass sich der höchste Anteil an APC mit intrazellulären CNP jeweils bei den größten CNP (90/50)

ergab. Bei den M1- und M2-Makrophagen war der Anteil an Zellen, die CNP internalisierten, bei größerer CNP-Größe signifikant höher. Bei den murinen und humanen DC war eine ansteigende Tendenz nicht signifikant (Abbildung 16). Für die H441-Lungenepithelzellen ergaben sich keine ausgeprägten Unterschiede im Anteil der Zellen, die CNP aufgenommen hatten (Abbildung 21). Somit war in dieser Arbeit insgesamt also kein deutlicher Einfluss der CNP-Größe auf die Aufnahme der CNP in unterschiedliche Zelltypen feststellbar.

Im Gegensatz dazu hatten die Ergebnisse einiger Studien auf deutliche Effekte der Partikelgröße auf die Aufnahme in Zellen hingewiesen (Foged *et al.*, 2005, Koppolu und Zaharoff, 2013, Zhang, Gao und Bao, 2015). Andere Autoren betonen, dass gerade APC gut dazu befähigt sind, partikuläre Substanzen im Größenbereich von 20 nm bis 3  $\mu\text{m}$  aufzunehmen und sich in Zusammenschau mehrerer Studien keine klare Größenpräferenz habe feststellen lassen (Bachmann und Jennings, 2010).

Foged *et al.*, die in ihrer Studie die Aufnahme von Polystyrolpartikeln in verschiedenen Größenbereichen (40 nm bis 15  $\mu\text{m}$ ) in humane DC untersucht hatten, stellten die ausgeprägteste Partikelaufnahme im Größenbereich der Partikel von unter 500 nm fest (Foged *et al.*, 2005).

Um die Einflüsse auf die Partikelaufnahme besser zu verstehen - mit dem Ziel schließlich die Nanopartikel für eine gezielte Aufnahme in bestimmte Zellen optimieren zu können - ist es daher von größter Bedeutung aufzuklären, über welchen Weg die CNP von Zellen, vor allem von DC als die potentesten APC, aufgenommen werden. Phagozytose und Makropinozytose gelten (insbesondere für über 500 nm große Partikel) bislang als wahrscheinlichste Hauptaufnahmewege in DC, wenngleich die genauen Mechanismen noch nicht ausreichend identifiziert werden konnten (Ma *et al.*, 2013, Yameen *et al.*, 2014).

Für kleinere Partikel wird häufig eine Clathrin-vermittelte Aufnahme postuliert: Harush-Frenkel *et al.* wiesen eine rein Clathrin-vermittelte Aufnahme positiv geladener,  $\sim 100$  nm großer PLGA-CNP in HeLa-Zellen (immortalisierte Zervixkarzinom-Epithelzelllinie) nach (Harush-Frenkel *et al.*, 2007). Durán *et al.* schlossen in Bezug auf die Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln ( $183 \pm 26$  nm) in humane DC ebenso auf einen Clathrin-vermittelten Aufnahmeweg (Durán *et al.*, 2019).

Harush-Frenkel *et al.* explorierten jedoch auch, dass negativ statt positiv geladene Nanopartikel der gleichen Größe nicht über diesen Endozytoseweg aufgenommen werden und Foged *et al.* stellten fest, dass sich die Aufnahme größerer Partikel ( $\sim 1$   $\mu\text{m}$ ) in humane DC durch positiv geladene Partikeloberflächen (wie z.B. bei CNP vorhanden) deutlich steigern lässt (Foged *et al.*, 2005, Harush-Frenkel *et al.*, 2007). Auch betonen Champion und Mitragoti, dass in Bezug auf

Phagozytose neben der Größe der aufzunehmenden Partikel die Partikelform eine Rolle spielt (Champion und Mitragotri, 2006).

Zusammengefasst sind neben der Größe der Nanopartikel auch Form, Ladung und Oberflächenstruktur als mögliche die Partikelaufnahme und den Partikel-Aufnahmeweg beeinflussende Faktoren zu beachten (Ma *et al.*, 2013, Kettler *et al.*, 2014, Jia *et al.*, 2018).

### 5.3.2 **Beeinflussung der Morphologie dendritischer Zellen durch große Chitosan-Nanopartikel**

Wenngleich in dieser Arbeit die CNP-Aufnahme nicht deutlich durch die Partikelgröße bestimmt wurde, ergaben sich Hinweise darauf, dass die Größe der CNP für die Verträglichkeit und damit Viabilität der Zellen eine gewichtige Rolle spielt.

In dieser Arbeit wurden die humanen DC nach der 24-stündigen Inkubation mit 100 µg/ml 90/10-, 90/20- oder 90/50-CNP hinsichtlich der Verträglichkeit der CNP lichtmikroskopisch untersucht (Abbildung 12). Es sei darauf hingewiesen, dass die Lichtmikroskopie hierfür nur erste Anhaltspunkte liefern kann. Während sich nach der Inkubation mit den 90/10- und 90/20-CNP keine deutlichen Auswirkungen feststellen ließen, waren nach der Inkubation mit den 90/50-CNP neben agglomerierten CNP auch Änderungen an den Zellen sichtbar. Die Zellen waren unregelmäßig verteilt im Well gruppiert, der Anteil an abgekugelten Zellen deutlich erhöht und weniger Zellen präsentierten sich mit den für die DC charakteristischen Zellausläufern (Dendriten). Insgesamt musste aufgrund der Vielzahl an mikroskopierten Zellen, bei denen deutliche zellmorphologische Veränderungen sichtbar waren, von einem schädlichen Einfluss der 90/50-CNP auf die DC ausgegangen werden. Zytotoxizitätstests wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

In einem Review von Shang *et al.* wurden die Ergebnisse der Nanopartikelverträglichkeit in Abhängigkeit von der Nanopartikelgröße aus mehreren Studien zusammengetragen und der Rückschluss gezogen, dass zumeist kleinere Partikel eine höhere toxische Auswirkung haben (Shang, Nienhaus und Nienhaus, 2014).

In der Fortführung dieses Projektes erfolgten Verträglichkeitsprüfungen der CNP, um die Auswirkungen der verschiedenen großen CNP auf die Zellen miteinander vergleichen zu können und die verträglichsten CNP für weitere Studien auszuwählen. Neben der lichtmikroskopischen Morphologie-Beurteilung wurden hierfür nach der 24-stündigen CNP-Inkubation Caspase 3/7-Assays und Propidium-Iodid-Färbungen durchgeführt. Eine sehr gute Verträglichkeit der 90/10-CNP wurde nachgewiesen, während nach Inkubation der humanen DC mit den größeren 90/50-CNP eine signifikant höhere Caspase 3/7-Aktivität messbar war, welche anzeigt, dass Zellen sich

in einem Zustand der Apoptose befinden. Auch war mittels Propidium-Iodid-Färbung eine reduzierte Viabilität der Zellen mit Anstieg der CNP-Größe erkennbar (Walter, 2022).

Die hier genutzten kleinsten Partikel (90/10-CNP) befanden sich allerdings im Größenbereich um 220 nm, während in anderen Studien teilweise sehr viel kleinere Nanopartikel im Größenbereich von 10 nm genutzt werden, sodass diese Ergebnisse nicht im Gegensatz zu den zusammengestellten Erkenntnissen von Shang *et al.* stehen (Shang, Nienhaus und Nienhaus, 2014).

#### 5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µg/ml FITC-konjugierten CNP dreier Größen (90/10, 90/20 und 90/50) wurde in dieser Arbeit eine effiziente CNP-Aufnahme in APC (murine und humane DC, humane M1- und M2-Makrophagen) aber auch in weitere Zelltypen (pankreatische Epithel- und Bindegewebszellen und Lungenepithelzellen) mittels ImageStream-Verfahren nachgewiesen.

Für eine Nutzung der CNP als Vehikel für Tumorantigene in der Tumorstabilisierung, ist eine gezielte oder zumindest effiziente Aufnahme der Nanopartikel in APC gewünscht, damit die APC die Antigene verstärkt aufnehmen und präsentieren und eine effektive Immunantwort induziert wird. Zum Zweck des Nachweises der CNP-Aufnahme in DC auch in „konkurrierender“ Situation, wurde die CNP-Aufnahme in kokultivierten humanen DC und Lungenepithelzellen analysiert. Eine effiziente CNP-Aufnahme in DC fand statt.

Insgesamt war der Einfluss der Größe der CNP auf die Internalisierung in die Zellen gering ausgeprägt, jedoch erwiesen sich die 90/10-CNP als am besten verträglich, sodass diese für weitere Versuche ausgewählt wurden.

In der Fortführung dieses Projektes von Frederik Walter aus der AG Inflammatorische Karzinogenese des Instituts für Experimentelle Tumorforschung, wurde zunächst der Einfluss von unbeladenen oder mit dem Modellantigen SIINFEKL (Ovalbumin 257-264) beladenen 90/10-CNP auf den DC-Phänotyp untersucht. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 war bei den humanen DC nach Inkubation mit antigenbeladenen CNP deutlich erhöht. Bei den murinen DC (DC2.4-Zelllinie) wurde ein pro-inflammatorischer Phänotyp sowohl durch die Inkubation mit SIINFEKL-beladenen als auch mit unbeladenen 90/10-CNP erreicht. Eine erfolgreiche SIINFEKL-Präsentation via MHC-I von den murinen DC nach Inkubation der Zellen mit SIINFEKL-beladenen 90/10-CNP fand statt, am ausgeprägtesten nach fünf Stunden.

Im nachfolgenden Schritt konnte eine Aktivierung von aus OT-1-Mäusen gewonnenen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch die DC2.4-Zellen, die mit SIINFEKL-beladenen 90/10-CNP inkubiert worden waren, mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25, CD44 und CD69 nachgewiesen werden und zudem die Fähigkeit der auf diese Art aktivierten SIINFEKL-spezifischen CTL zur Zerstörung von Tumorzellen erfolgreich an SIINFEKL-exprimierenden PancOVA-Zellen (murine PDAC-Zellen, Panc02-Zellen mit Ovalbumin 257-264-Transfektion) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Ergebnisse von Frederik Walter darauf hin, dass CNP ein vielversprechendes Vehikel für die Tumorzellvaksinierung darstellen (Walter *et al.*, 2020)

Um das Potenzial dieser Strategie weiter zu validieren, ist ein sinnvoller nächster Schritt, zu prüfen, ob sich mit in CNP verpackten humanen tumor-spezifischen Antigenen auch T-Zell-Antworten gegen humane Tumorzellen induzieren lassen. Auch hierfür müsste die Zytolyse maligner Zellen, die das entsprechende den DC über CNP zugeführte Tumorantigen tragen, nach Zugabe der aktivierten antigenspezifischen CTL analysiert werden. Hierfür käme die Testung mit dem häufig beim PDAC mutierten KRAS an PDAC-Zellen mit entsprechendem KRAS-Mutationsstatus in Betracht.

Zudem sollten weitere Studien folgen, um einen trotz der Biokompatibilität von Chitosan möglichen schädigenden Einfluss von 90/10-CNP auf nicht-antigenpräsentierende Zellen auszuschließen, da auch in sie eine unspezifische Aufnahme der CNP erfolgt. Um eine etwaig notwendige Anpassung der CNP hin zu einer optimierten Aufnahme in die Zielzellen zu ermöglichen, sollten zudem die Hauptaufnahmewege der CNP in verschiedene Zelltypen identifiziert werden.

Shi *et al.* analysierten den Effekt einer Behandlung mit B16-Melanom-Tumorzelllysate-beladenen und mit Mannose versetzten CNP bereits im Mausmodell *in vivo*. Die CNP wurden C57BL/6-Mäusen mittels subkutaner Injektion verabreicht, anschließend wurden den Mäusen B16-Tumorzellen zugeführt und das Tumorgewebe beobachtet. Das Tumorgewebe in den mit Tumorzelllysate beladenen CNP behandelten Mäusen wuchs signifikant langsamer als in den Kontrollgruppen von gar nicht vorbehandelten Mäusen oder lediglich mit unbeladenen CNP behandelten Mäusen. Zudem war die Menge an CTL in den Lymphknoten und Milzen der Mäuse, die mit den Mannose-Tumorzelllysate-CNP behandelt worden waren, höher als in den Vergleichsgruppen. Auch als die Mäuse zunächst mit B16-Melanom-Zellen behandelt wurden, bevor sie sieben Tage später die Vakzinierung mit Mannose-Tumorzelllysate-CNP erhielten, wurde das Tu-

morwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant aufgehalten (Shi *et al.*, 2017).

Das große Potenzial von CNP als Vehikel in Tumorstabilisierungen wurde hiermit bereits erstmalig *in vivo* demonstriert und untermauert die aussichtsreiche Möglichkeit, diese Strategie in der Therapie von Krebserkrankungen zu nutzen.

## 6 Zusammenfassung

Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen und dendritische Zellen (DC) sind auf die Aufnahme und nachfolgende Präsentation von Antigenen spezialisierte Zellen. Durch die Präsentation der Antigene über MHC-II werden insbesondere  $CD4^+$ -T-Helferzellen zur Einleitung einer Immunantwort angeregt. DC sind durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation endozytierter Antigene über MHC-I darüber hinaus dazu in der Lage, direkt  $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, welche dann die Zellen, die das präsentierte Antigen tragen, spezifisch zerstören. Werden Tumorantigene erkannt und präsentiert, wird über die Aktivierung von T-Zellen so eine spezifische Immunreaktion gegen die entsprechenden malignen Zellen induziert.

Durch verschiedene Immun-Escape-Mechanismen kann es Krebszellen jedoch gelingen, sich diesem Angriff zu entziehen. Präsentieren sie z.B. reduziert Antigene auf ihrer Zelloberfläche, werden sie von APC schlechter erkannt. Infolgedessen werden die Tumorantigene nicht effektiv von APC präsentiert und eine Aktivierung von gegen die Krebszellen gerichteten T-Zellen bleibt aus.

Tumorvakzinierungen stellen einen aussichtsreichen immuntherapeutischen Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen dar, bei dem APC Tumorantigene (wieder) verstärkt zugänglich gemacht werden, sodass eine effektive und spezifische Immunantwort gegen die Krebszellen induziert wird. Chitosan-Nanopartikel (CNP) könnten für den Transport von Tumorantigenen geeignet sein, um eine verbesserte APC-Antigenaufnahme und -präsentation zu erwirken und darüber eine tumorgerichtete Immunantwort zu induzieren. Eine non-invasive Applikation der CNP über Inhalation ist möglich. Chitosan ist aufgrund seiner Biokompatibilität und mukoadhäsiven Eigenschaft mit eigener immunstimulierender Wirkung ein vielversprechendes Material für die Formung von Nanopartikeln und Verwendung als Vehikel in der Tumorvakzinierung.

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierter CNP in APC analysiert, um ihre potenzielle Eignung als Vehikel zu untersuchen. Es wurden CNP in drei unterschiedlichen Größen untersucht: 200 nm (90/10-CNP), 450 nm (90/20-CNP) und 980 nm (90/50-CNP).

Humane APC (DC, M1- und M2-Makrophagen) wurden dafür durch Zugabe von Wachstumsfaktoren aus Monozyten differenziert, die zuvor aus dem Blut gesunder Spender isoliert worden waren. Zudem wurde die CNP-Aufnahme in murine DC analysiert. Vergleichend wurde die Aufnahme von CNP auch in humane nicht-antigenpräsentierende Zellen (pankreatische Epithel- und

Bindegewebszellen sowie Lungenepithelzellen) untersucht. Alle Analysen erfolgten 24 Stunden nach Zugabe der CNP zu den unterschiedlichen Zelltypen.

Es wurde durchflusszytometrisch eine starke Assoziation der CNP mit allen untersuchten Zelltypen ermittelt. Mithilfe von ImageStream-Analysen (Kombination von Durchflusszytometrie und hochauflösender Mikroskopie) wurde eine effiziente Aufnahme der CNP in alle untersuchten APC und auch nicht-antigenpräsentierende Zellen nachgewiesen. Mittels Konfokalmikroskopie wurde die Aufnahme von CNP in humane DC bestätigt.

Wesentliche Unterschiede der CNP-Aufnahme in Abhängigkeit von ihrer Größe ergaben sich keine. Es zeigten sich lichtmikroskopisch jedoch Hinweise auf eine schlechtere Verträglichkeit der größeren CNP (90/50), während die Viabilität der humanen DC nach der Inkubation mit den kleineren CNP (90/10 sowie 90/20) unbeeinträchtigt schien.

Aufgrund der angestrebten pulmonalen Anwendung der CNP wurde die CNP-Aufnahme in humane DC, die mit humanen Lungenepithelzellen kokultiviert wurden, untersucht. Hierbei wurde eine Aufnahme der CNP in beide Zelltypen nachgewiesen, wobei die Aufnahme in DC höher war als die in Lungenepithelzellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CNP effizient von humanen APC aufgenommen werden. Um die Eignung von CNP als Vehikel in Tumorstimmungsstrategien für die Induktion einer effektiven, tumorgerichteten Immunantwort weiter zu evaluieren, sind weitere Untersuchungen mit in CNP verkapselten relevanten humanen Tumorantigenen geplant, bevor die Wirkung anschließend in *in vivo*-Studien eruiert werden sollte.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alan Smith, M. P., Hinchcliffe, M. (2014): Chitosan. *Hum Vaccin Immunother*, 10, 797-807
- An, Z. (2010): Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell*, 1, 319-330
- Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., van Tendeloo V. F., Berneman, Z. N. (2014): Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol*, 15, 257-267
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., Wilson, J. S. (1998): Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: Identification, isolation, and culture. *Gut*, 43, 128-133
- Bachmann, M. F., Jennings, G. T. (2010): Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*, 10, 787-796
- Baldrick, P. (2010): The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol*, 56, 290-299
- Banchereau, J., Palucka, A. K. (2005): Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.*, 5, 296-306
- Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252
- Banfalvi, G. (2008): Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat Protoc*, 3, 663-673
- Baskar, R., Lee, A. L., Yeo, R., Yeoh, K.-W. (2012): Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*, 9, 193-199
- Bastola, R., Noh, G. Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y., Lee, S. (2017): Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*, 40, 1238-1248
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2017): Bekanntmachung einer Allgemeinverfügung gemäß § 54 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) für das Verbringen in die Bundesrepublik Deutschland und das Inverkehrbringen eines Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Chitosan. BVL 17/01/003
- Benne, N., van Duijn, J., Kuiper, J., Jiskoot, W., Slütter, B. (2016): Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J Control Release*, 234, 124-134
- Bernocchi, B., Carpentier, R., Betbeder, D. (2017): Nasal nanovaccines. *Int J Pharm*, 530, 128-138

- Besic Gyenge, E., Darphin, X., Wirth, A., Picles, U., Walt, H. Bredell, M., Maake, C. (2011): Uptake and fate of surface modified silica nanoparticles in head and neck squamous cell carcinoma. *J Nanobiotechnology*, 9, 32
- Bockorny, B., Grossman, J. E., Hidalgo, M. (2022): Facts and hopes in immunotherapy of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 28, 4606-4617
- Statistisches Bundesamt, Böhm, K. (2021): Datenreport 2021 - 9.1 Gesundheitszustand der Bevölkerung und Ressourcen der Gesundheitsversorgung. *Datenreport 2021*, 325-345.
- Bøyum, A. (1964): Separation of white blood cells. *Nature*, 204, 793-794
- Buchbinder, E. I., Desai, A. (2016): CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*, 39, 98-106
- Burnet, F. M. (1957): Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*, 1, 841-847
- Carroll, E. C., Jin, L., Mori, A., Muñoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H. B. T., Mansouri, S., McEntee, C. P., Lambe, E., Agger, E. M., Andersen, P., Cunningham, C., Hertzog, P., Fitzgerald, K. A., Bowie, A. G., Lavelle, E. C. (2016): The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*, 44, 597-608
- Champion, J. A., Mitragotri, S. (2006): Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4930-4934
- Chang, M.-H., You, S.-L., Chen, C.-J., Liu, C.-J., Lee, C.-M., Lin, S.-M., Chu, H.-C., Wu, T.-Z., Yang, S.-S., Kuo, H.-S., Chen, D.-S. (2009): Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst*, 101, 1348-1355
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., Riley, J. L. (2005): CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25, 9543-9553
- Chen, D. S., Mellman, I. (2013): Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39, 1-10
- Chua, B. Y., Al Kobaisi, M., Zeng, W., Mainwaring, D., Jackson, D. C. (2012): Chitosan micro-particles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines. *Mol Pharm*, 9, 81-90
- Coley, W. B. (1891): II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg*, 14, 199-220
- Cosenza, M., Sacchi, S., Pozzi, S. (2021): Cytokine release syndrome associated with T-cell-based therapies for hematological malignancies: pathophysiology, clinical presentation, and treatment. *Int J Mol Sci*, 22, 14
- Coussens, L. M., Werb, Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867
- Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., Alonso, M. J. (2009): Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 140-157
- Day, M., Schultz, R., Parkin, J., Cohen, B. (2001): An overview of the immune system. *Lancet*, 357, 1777-1789

- Deng, M. Y., Debus, J., König, L. (2023): Verlängerung des Gesamtüberlebens durch die Impfung von autologen tumorlysatzbeladenen dendritischen Zellen (DCVax-L) bei Patienten mit neu diagnostiziertem und rezidivierendem Glioblastom. *Strahlenther Onkol*, 199, 327-329
- Diedrich, A. (2015): Entwicklung einer nanopartikulären Formulierung zur Vakzinierung über den Respirationstrakt. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Disis, M. L. (2014): Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol*, 41, S3-S13
- Dougan, M., Dranoff, G. (2009): Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*, 27, 83-117
- Dougan, M., Dranoff, G., Dougan, S. K. (2019): Cancer immunotherapy: Beyond checkpoint blockade. *Annu Rev Cancer Biol*, 3, 55-75
- Ducts, P., Furukawa, T., Duguid, W. P., Rosenberg, L., Viallet, J., Galloway, D. A., Tsao, M. S. (1996): Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol*, 148, 1763-1770
- Durán, V., Yasar, H., Becker, J., Thiyagarajan, D., Loretz, B., Kalinke, U., Lehr, C.-M. (2019): Preferential uptake of chitosan-coated PLGA nanoparticles by primary human antigen presenting cells. *Nanomedicine*, 21, 102073
- Elsaesser, A., Taylor, A., de Yanés, G. S., McKerr, G., Kim, E.-M., O'Hare, E., Howard, C. V. (2010): Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 1447-1457
- Fan, J.-Q., Wang, M.-F., Chen, H.-L., Shang, D., Das, J. K., Song, J. (2020): Current advances and outlooks in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 19, 32
- Fan, Y., Moon, J. J. (2015): Nanoparticle drug delivery systems designed to improve cancer vaccines and immunotherapy', *Vaccines*, 3, 662-685
- Filley, A. C., Dey, M. (2017): Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *J Neurooncol*, 133, 223-235
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., Sundblad, A. (2005): Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm*, 298, 315-322
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., Fu, Y.-X. (2013): Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14, 1014-1022
- Garcia-Fuentes, M., Alonso, M. J. (2012): Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J Control Release*, 161, 496-504
- Garnier, L., Pick, R., Montorfani, J., Sun, M., Birghouse, D., Liaudet, N., Kammertoens, T., Blankenstein, T., Page, N., Bernier-Latamani, J., Tran, N.-L., Petrova, T. V., Merkler, D., Scheiermann, C., Hugues, S. (2022): IFN- $\gamma$ -dependent tumor-antigen cross-presentation by lymphatic endothelial cells promotes their killing by T cells and inhibits metastasis. *Sci Adv*, 8, 23
- Gazdar, A. F., Kurita, R. I. L., Oie, H. K., Mulshine, J. L., Clark, J. C., Whitsett, J. A. (1990): Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 50, 5481-5487

- Gonzalez, H., Hagerling, C., Werb, Z. (2018): Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*, 32, 1267-1284
- Gordon, S., Saupe, A., McBurney, W., Rades, T., Hook, S. (2008): Comparison of chitosan nanoparticles and chitosan hydrogels for vaccine delivery. *J Pharm Pharmacol*, 60, 1591-1600
- Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., Wang, X.-Y. (2013): Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res*, 119, 421-475
- Han, H. D., Byeon, Y., Jang, J.-H., Jeon, H. N., Kim, G. H., Kim, M. G., Pack, C.-G., Kang, E. H., Jung, I. D., Lim, Y. T., Lee, Y. J., Lee, J.-W., Shin, B. C., Ahn, H. J., Sood, A. K., Park, Y.-M. (2016): In vivo stepwise immunomodulation using chitosan nanoparticles as a platform nanotechnology for cancer immunotherapy. *Sci Rep*, 6, 38348
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70
- Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., Altschuler, Y. (2007): Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 353, 26-32
- Haschka, M., Karbon, G., Fava, L. L., Villunger, A. (2018): Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? *EMBO Rep*, 19, e45440
- Heidland, J. M. (2018): Chitosan nanoparticles for mucosal vaccination - understanding the particle formation process and formulation for nasal application. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Heinzerling, L., de Toni, E., Schett, G., Hundorfean, G., Zimmer, L. (2019): Checkpoint inhibitors - the diagnosis and treatment of side effects. *Dtsch Arztebl Int*, 116, 119-126
- Hiddemann, W., Bartram, C. R., (2010): Die Onkologie - Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. 2. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Ibuki, Y., Toyooka, T. (2012): Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 926, 157-166
- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N., Davis, S. S. (2001): Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 51, 81-96
- Invernizzi, R., Lloyd, C. M., Molyneaux, P. L. (2020): Interaktionen zwischen respiratorischem Mikrobiom und Epithelzellen formen Immunität in der Lunge. *Kompass Pneumol*, 8, 240-251
- Jackson, A., World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2018): Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report 2018, 1-116
- Jarozeski, M. J., Radcliff, G. (1999): Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*, 11, 37-53
- Jesnowski, R., Fürst, D., Ringel, J., Chen, Y., Schrödel, A., Kleeff, J., Kolb, A., Schareck, W. D., Löhr, M. (2005): immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest*, 85, 1276-1291
- Jia, J., Zhang, Y., Xin, Y., Jiang, C., Yan, B., Zhai, S. (2018): Interactions between nanoparticles and dendritic cells: from the perspective of cancer immunotherapy. *Front Oncology*, 8, 404

- Kaatsch, P., Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin
- Kastenmüller, W., Kastenmüller, K., Kurts, C., Seder, R. A. (2014): Dendritic cell-targeted vaccines - hope or hype? *Nat Rev Immunol*, 14, 705-711
- Kettler, K., Veltmann, K., van de Meent, D., van Wezel, A., Hendriks, A. J. (2014): Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem*, 33, 481-492
- Kienle, G. S. (2012): Fever in cancer treatment: Coley's therapy and epidemiologic observations. *Glob Adv Health Med*, 1, 92-100
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Arihiro, K. (2006): Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66, 5527-5536
- Koppolu, B. P., Zaharoff, D. A. (2013): The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells', *Biomaterials*, 34, 2359-2369
- Kudrin, A. (2013): Cancer immunotherapy: paradigms, practice and promise. *Hum Vaccin Immunother*, 9, 1553-1554
- Li, D., Fu, D., Kang, H., Rong, G., Jin, Z., Wang, X., Zhao, K. (2016): Advances and potential applications of chitosan nanoparticles as a delivery carrier for the mucosal immunity of vaccine', *Curr Drug Deliv*, 14, 27-35
- Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., Chen, D., Nordquist, R. E., Chen, W. R. (2013): Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol*, 387023
- Lipson, E. J., Drake, C. G. (2011): Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 17, 6958-6962
- Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang T., Tang, Y., Wang, H., Moul, X., Chen, Z., Hel, N. (2013): Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol*, 13, 6485-6498
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-686
- McCarthy, E. F. (2006): The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*, 26, 154-158
- McKinnon, K. M. (2018): Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-11
- Melief, C. J. M., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., van der Burg, S. H. (2015): Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest*, 125, 3401-3412
- Mitragotri, S. (2005): Immunization without needles. *Nat Rev Immunol*, 5, 905-916
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., Wasan, E. K. (2017): An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 9, 4, 53

- Molls, M., Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K. (2006): Kompendium Internistische Onkologie. 4. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Muanprasat, C., Chatsudthipong, V. (2017): Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther*, 170, 80-97
- Murphy, K. M., Weaver, C. (2017): Janeway's Immunobiology. 9. Auflage, Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC
- Na, Y. R., Je, S., Seok, S. H. (2018): Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett*, 413, 46-58
- Nair, S., Archer, G. E., Tedder, T. F. (2012): Isolation and generation of human dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*, 7:7.32.1-23
- Neill, D. W. O., Adams, S., Bhardwaj, N. (2004): Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*, 104, 2235-2247
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., Azuma, I. (1984): Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 2, 93-99
- Norat, T., Scoccianti, C., Boutron-Rualt, M.-C., Anderson, A., Berrino, F., Cecchini, M., Espina, C., Key, T., Leitzmann, M., Powers, H., Wiseman, M., Romieu, I. (2015): European code against cancer 4th edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiol*, 39, S56-S66
- Ogba, N., Arwood, N. M., Bartlett, N., Bloom, M., Brown, P., Brown, C., Budde, E. L., Carlson, R., Farnia, S., Fry, T. J., Garber, M., Gardner, R. A., Gurschick, L., Kropf, P., Reltan, J. J., Sauter, C., Shah, B., Shpall, E. J., Rosen, S. T. (2018): Chimeric antigen receptor T-cell therapy. *J Natl Compr Canc Netw*, 16, 1092-1106
- Ouyang, H., Mou, L.-j., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J., Tsao, M.-S. (2000): Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol*, 157, 1623-1631
- Pachioni-Vasconcelos, J. de A., Lopes, A. M., Apolinário, A. C., Valenzuela-Oses, J. K., Costa, J. S. R., Nascimento, L. de O., Pessoa, A., Barbosa, L. R. S., Rangel-Yagui, C. de O. (2016): Nanostructures for protein drug delivery. *Biomater Sci*, 4, 205-218
- Palucka, K., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J. (2011): Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med*, 269, 64-73
- Palucka, K., Banchereau, J. (2012): Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*, 12, 265-277
- Palucka, K., Banchereau, J. (2013): Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39, 38-48
- Pardoll, D. M. (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-264
- Park, W., Heo, Y. J., Han, D. K. (2018): New opportunities for nanoparticles in cancer immunotherapy. *Biomater Res*, 22, 24
- Patel, A., Kaufman, H. L., Disis, M. L. (2017): Next generation approaches for tumor vaccination. *Chin Clin Oncol*, 6, 19

- Peters, J. M., Gonzalez, F. J. (2018): The evolution of carcinogenesis. *Toxicol Sci*, 165, 272-276
- Pfreundschuh, M., Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K. (2006): *Kompendium Internistische Onkologie*. 4. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Shery, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. O., Davis, T., Rosenberg, S. A. (2003): Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8372-8377
- Posch, W., Lass-Flörl, C., Wilflingseder, D. (2016): Generation of human monocyte-derived dendritic cells from whole blood. *J Vis Exp*, 118, 54968
- Postow, M. A., Callahan, M. K., Wolchok, J. D. (2015): Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol*, 33, 1974-1982
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., Matrisian, L. M. (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74, 2913-2921
- Rassow, J., Netzker, R., Hauser, K. (2012): *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Ravindranathan, S., Koppolu, B. p., Smith, S. G., Zaharoff, D. A. (2016): Effect of chitosan properties on immunoreactivity. *Mar Drugs*, 14, 5, 91
- Riedhammer, C., Halbritter, D., Weissert, R. (2014): Peripheral blood mononuclear cells: Isolation, freezing, thawing, and culture. *Methods Mol Biol*, 1304, 53-61
- Ronckers, D. C., Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2023): *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. 14. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitmann, S., Linehan, W. M., Robertson, S. N., Lee, R. E., Rubin, J. T. (1987): A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med*, 316, 889-897
- Rubin, D. B., Danish, H. H., Ali, A. B., Li, K., LaRose, S., Monk, A. D., Cote, D. J., Spendley, L., Kim, A. H., Robertson, M. S., Torre, M., Smith, T. R., Izzy, S., Jacobson, C. A., Lee, J. W., Vaitkevicius, H. (2019): Neurological toxicities associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Brain*, 142, 1334-1348
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom (2021): S3-Leitlinie Prostatakarzinom. Version 6.2 - Oktober 2021, AWMF-Registernummer: 043/002OL. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom (2020): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.4 - Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-045OL. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemein-

schaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) e. V. (Leitlinienprogramm Onkologie)

Salomon, J. J., Muchitsch, V. E., Gausterer, J. C., Schwagerus, E., Huwer, H., Daum, N., Lehr, C.-M., Ehrhardt, C. (2014): The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier. *Mol Pharm*, 11, 995-1006

Scherließ, R., Buske, S., Young, K., Weber, B., Rades, T., Hook, S. (2013): In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. *Vaccine*, 31, 4812-4819

Schlander, M., Hernandez-Villafuerte, K., Thielscher, C. (2018): Kosten der Onkologie in Deutschland. *Forum*, 33, 330-337

Schmezer, P., Layer, G., Kaick, G., Delorme, S. (2006): Krebsentstehung - eine Einführung. Radiologische Diagnostik in der Onkologie, Band 1, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Seidel, J. A., Otsuka, A., Kabashima, K. (2018): Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol*, 28:86

Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U. (2014): Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology*, 12:5

Shao, K., Singha, S., Clemente-Casares, X., Tsai, S., Yang, Y., Santamaria, P. (2015): Nanoparticle-based immunotherapy for cancer. *ACS Nano*, 9, 16-30

Shapero, K., Fenaroli, F., Lynch, I., Cotell, D. C., Salvati, A., Dawson, K. A. (2011): Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. *Mol. BioSyst*, 7, 371-378

Shariati, M., Meric-Bernstam, F. (2019): Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 28, 977-988

Shariatnia, Z. (2019): Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid Interface Sci*, 263, 131-194

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., Rock, K. L. (1997): Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*, 158, 2723-2730

Shi, G. N., Zhang, C.-N., Xu, R., Niu, J.-F., Song, H.-J., Zhang, X.-Y., Wang, W.-W., Wang, Y.-M., Li, C., Wie, X.-Q., Kong, D.-L. (2017): Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. *Biomaterials*, 113, 191-202

Shin, H. R., Kwak, M., Lee, T. G., Lee, L. Y. (2020): Quantifying the level of nanoparticle uptake in mammalian cells using flow cytometry. *Nanoscale*, 12, 15743-15751

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A. (2021): Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71, 7-33

Sifri, R., Gangadharappa, S., Acheson, L. S. (2004): Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers. *CA Cancer J Clin*, 54, 309-326

Signorelli, C., Odone, A., Giorba, V., Cella, P., Audisio, R. A., Lombardi, A., Mariani, L., Mennini, F. S., Pecorelli, S., Rezza, G., Zuccotti, G. V., Peracino, A. (2017): Human papillomavirus 9-valent vaccine for cancer prevention: a systematic review of the available evidence. *Epidemiol Infect*, 145, 1962-1982

- Smirnov, A., Solga, M. D., Lannigan, J., Criss, A. K. (2015): An improved method for differentiating cell-bound from internalized particles by imaging flow cytometry. *J Immunol Methods*, 423, 60-69
- Student, S., Hejmo, T., Poterala-Hejmo, A., Leśniak, A., Buldak, R. (2020): Anti-androgen hormonal therapy for cancer and other diseases. *Eur J Pharmacol*, 866:172783
- Suzuki, H., Toyooka, T., Ibuki, Y. (2007): Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol*, 41, 3018-3024
- Tianhong D., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., Hamblin, M. R. (2011): Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 857-879
- Tømmeraas, K., Vårum, K. M., Christensen, B. E., Smidsrød, O. (2002): Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches. *Carbohydr Res*, 337, 2455-2462
- Valastyan, S., Weinberg, R. A. (2011): Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-292
- Vranic, S., Boggetto, N., Contremoulins, V., Mornet, S., Reinhardt, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Boland, S. (2013): Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol*, 10:2
- Walter, F., Winter, E., Rahn, S., Heidland, J., Meier, S., Struzek, A.-M., Lettau, M., Philipp, L.-M., Beckinger, S., Otto, L., Möller, J. L., Helm, O., Wesch, D., Scherließ, R., Sebens, S. (2020): Chitosan nanoparticles as antigen vehicles to induce effective tumor specific T cell responses. *PLoS ONE*, 15:e0239369
- Walter, F. (2022): Tumor vaccination: Chitosan nanoparticles as antigen vehicles to promote tumor-directed t cell responses. *Med. Diss., Kiel*
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., Sancho, D. (2020): Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 20, 7-24
- Whiteside, T. L. (2008): The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27, 5904-5912
- Yameen, B., Choi, W. I., Vilos, C., Swami, A., Shi, J., Farokhzad, O. C. (2014): Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release*, 190, 485-499
- Yan, L., Rosen, N., Arteaga, C. (2011): Targeted cancer therapies. *Chin J Cancer*, 30, 1-4
- Zaharoff, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., Greiner, J. W. (2007): Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, 25, 2085-2094
- Zander, H., Müller-Egert, S., Zwiewka, M., Groß, S., van Zandbergen, G., Engelbergs, J. (2020): Checkpoint inhibitors for cancer therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 63, 1322-1330

Zentrum für Krebsregisterdaten (2019): 3.10 Bauchspeicheldrüse. Krebs in Deutschland 2019/2020; 52-55, Robert Koch Institut, Berlin

Zepp, F. (2016): Principles of vaccination. *Methods Mol Biol*, 1403, 57-84

Zhang, S., Gao, H., Bao, G. (2015): Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano*, 9, 8655-8671

Zhang, Y., Zhang, X., Ding, R. Zhang, J., Liu, J. (2011): Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment. *Carbohydr Polym*, 83, 813-817

Zou, W. (2005): Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5, 263-274

Zucker, R. M., Boyes, W. K. (2020): Detection of silver and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 2118, 415-436

## 8 Anhang

### 8.1 Ethikvotum

Ethikvotum zum Projekt „Chitosan-Nanopartikel als Vehikel zur Verbesserung der Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen und einer tumorgerichteten Immunantwort“ mit dem Aktenzeichen D 490/17:

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

**ETHIK-KOMMISSION**



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Professor Dr. Susanne Sebens  
Institut für Experimentelle Tumorforschung  
UKSH, Campus Kiel  
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 17  
24105 Kiel

Postadresse:  
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9  
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 500-14 191  
Telefax 0431 / 500-14 195  
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 23. Juni 2017

**AZ.:** D 490/17 (bitte stets angeben)  
**Studienplan:** Chitosan-Nanopartikel als Vehikel zur Verbesserung der Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen und einer tumor-gerichteten Immunantwort  
Anschreiben/Projektbeschreibung vom 31. Mai 2017,  
Ethikvoten AZ A 110/99 vom 28. Apr 99 und AZ D 429/09 vom 09. Sept 09  
**In Bezug auf Antragsteller:** AZ A 110/99 und AZ D 429/09  
Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Experimentelle Tumorforschung  
**Antrag vom:** 31. Mai 2017 (Eingang: 22. Juni 2017)

Sehr geehrte Frau Kollegin Sebens,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.


**Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:**

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

  
Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

  
Dr. med. Christine Glinicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Tumorstimmung: Chitosan-Nanopartikel als Vehikel zur Verbesserung der Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen und einer tumorgerichteten Immunantwort“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich versichere, zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Ort, Datum

Elsa Winter

## 10 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Walter, F.\*, **Winter, E.\***, Rahn, S., Heidland, J., Meier, S., Struzek, A.-M., Lettau, M., Philipp, L.-M., Beckinger, S., Otto, L., Möller, J. L., Helm, O., Wesch, D., Scherließ, R., Sebens, S. (2020): „Chitosan nanoparticles as antigen vehicles to induce effective tumor specific T cell responses“, PLoS ONE, 15:e0239369, 1-24  
**\*geteilte Erstautorenschaft**
- Walter, F., **Winter, E.**, Otto, L., Faltinek, L., Helm, O., Heidland, J., Meier, S., Wesch, D., Lettau, M., Rahn, S., Scherließ, R., and Sebens, S.: „Tumor vaccination: chitosan nanoparticles as antigen vehicles to promote tumor-directed T cell responses“; Poster Präsentation, *20th International AEK Cancer Congress*, Heidelberg, 2019
- **Winter, E.**, Helm, O., Lettau, M., Heidland, J., Scherließ, R., Walter, F., Sebens, S.: „Tumor vaccination: chitosan nanoparticles to improve the antigen uptake by dendritic cells for an enhanced tumor-directed immune response“; Poster Präsentation und Abstract Book S. 238, *5th European Congress of Immunology*, Amsterdam, 2018
- Heidland, J., Helm, O., Lettau, M., **Winter, E.**, Sebens, S., Scherließ, R.: „Nano-in-microparticles for dry powder vaccination - nasal application and uptake in immune competent cells“; Poster Präsentation, *Respiratory Drug Delivery*, Tucson, Arizona, USA, 2018

## 11 Danksagung

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Susanne Sebens danke ich herzlich für ihre sowohl fachlich exzellente Betreuung als auch für eine menschlich ganz bewundernswerte Offenheit. Danke für die außerordentliche und sehr verlässliche Unterstützung!

Dr. Ole Helm danke ich für das gewissenhafte Erklären der Labormethoden sowie besonders für die Erarbeitung dieser Projektidee.

Für seine geduldige und große Hilfe bei der Auswertung der ImageStream-Versuche und der Konfokalmikroskopie danke ich PD Dr. Marcus Lettau sehr.

Prof. Dr. Regina Scherließ danke ich für die Kooperation in diesem Projekt. Den Mitarbeiterinnen am Pharmazeutischen Institut, besonders Dr. Judith Heidland, danke ich für die Herstellung der Chitosan-Nanopartikel.

Ein großer Dank gebührt Dagmar Leisner für die Einarbeitung im Labor, ihre immer bereitwillige Unterstützung bei jeglichen Fragen zum praktischen Arbeiten im Labor und das stetige Verbreiten guter Laune.

Für seinen Rat bezüglich der statistischen Auswertungen danke ich Dr. Sascha Rahn.

Frederik danke ich sehr für die Fortführung dieses Projekts.

Für ihre freundschaftliche Begleitung während der gemeinsamen Zeit im Labor und darüber hinaus danke ich besonders Lilli, Lisa und Luisa.

Meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Freund sei allerherzlichst für ihren immerwährend liebevollen Beistand gedankt.